

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Lactobacillus reuteri E81’de KODLANAN
GLUKANSÜKRAZ VE GLUKANOTRANSFERAZ
ENZİMLERİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU,
BU ENZİMLER İLE ÖZGÜN PREBİYOTİK
OLİGOSAKKARİTLERİN ÜRETİMİ

Hümevra İSPİRLİ

DOKTORA TEZİ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Danışman
Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman
Doç. Dr. Enes DERTLİ

Temmuz, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Lactobacillus reuteri* E81’de KODLANAN GLUKANSÜKRAZ VE
GLUKANOTRANSFERAZ ENZİMLERİNİN BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU, BU ENZİMLER İLE ÖZGÜN PREBİYOTİK
OLİGOSAKKARİTLERİN ÜRETİMİ**

Hümeysra İSPİRLİ tarafından hazırlanan tez çalışması 02.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Enes DERTLİ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ, Üye
Namık Kemal Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK, Üye
Pamukkale Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan *Lactobacillus reuteri* E81’de Kodlanan Glukansükraz ve Glukanotransferaz Enzimlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu, Bu Enzimler ile Özgün Prebiyotik Oligosakkaritlerin Üretimi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hümeysra İSPİRLİ

İmza

Bu tez çalışması TÜBİTAK 116O523 numaralı Nadir Bir Ekzopolisakkarit Olarak Alternanın Fonksiyonel Etkilerinin Belirlenmesi, Alternan Üretiminden Sorumlu Alternansükraz Enziminin Ekspresyonu ve Aktivitesinin Tespiti isimli 3501 Araştırma Destek Programı projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xix
ÖZET	xx
ABSTRACT	xxii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Laktik Asit Bakterileri ve Ekzopolisakkarit Üretimi	1
1.1.2 Ekşi Hamur Teknolojisi Açısından LAB'nin Önemi ve EPS Üretimi	3
1.1.3 Ekşi Hamur Teknolojisi Açısından EPS Üretiminin Önemi	6
1.1.4 LAB Türleri Tarafından Homopolimerik EPS Üretimi	9
1.1.5 Homopolimerik EPS Üretiminin Genetik Mekanizması	16
1.1.6 Glukansükrazların Yapısal Karakterizasyonu ve Reaksiyon Mekanizmaları	17
1.1.7 Glukanotransferazlar ve Homopolimerik EPS Üretimi	21
1.1.8 Alıcı Reaksiyonları ile Üretilen Oligosakkaritler ve Fonksiyonel Etkileri	24
1.1.9 Glukansükraz ve Glukanotransferazlar ile İlgili Gelecek Beklentileri	26
1.2 Tezin Amacı	27
1.3 Hipotez	29
2 MATERYAL VE YÖNTEM	30
2.1 Genel Mikrobiyolojik ve Moleküler Metotlar	30
2.1.1 Kültür Ortamı	30
2.1.2 Genetik Modifikasyon ve Seçim Çalışmaları İçin Kullanılan Antibiyotikler	30

2.1.3	Bakteriyel Suşlar ve Gelişme Koşulları	31
2.1.4	Genomik DNA Ekstraksiyonu	34
2.1.5	Plazmid Ekstraksiyonu	34
2.1.6	Primerler	35
2.1.7	PZR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroförezinde Kontrolü	36
2.1.8	Restriksiyon Enzimleri	37
2.1.9	Vektör DNA'nın Defosforilasyonu	38
2.1.10	Ligasyon	38
2.1.11	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	39
2.1.12	DNA Pürifikasyonu	41
2.1.13	Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu	41
2.1.14	Kompetent <i>L. reuteri</i> Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu	42
2.2	Protein Biyokimyası	43
2.2.1	Rekombinant Bakteriyel Hücrelerde Protein Ekspresyonu ve Ekstraksiyonu	43
2.2.2	Saflaştırılan Enzimlerin Protein Miktarlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi	44
2.2.3	Protein Ekspresyonlarının SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroförez) ile Kontrol Edilmesi	44
2.2.4	Histidin ile İşaretli Rekombinant Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması	45
2.3	<i>L. reuteri</i> E81 Suşundan Glukan Üretiminden Sorumlu Glukansükraz Geninin Silinmesi	46
2.3.1	<i>L. reuteri</i> E81'de Glukan Üretiminden Sorumlu Glukansükraz Geninin Tespiti	46
2.3.2	Glukansükraz Genine Spesifik Primerin Dizaynı	46
2.3.3	Glukan Üretemeyen <i>L. reuteri</i> E81 Δ gtfA Suşunun Standart Moleküler Tekniklerin Kullanımı ile Elde Edilmesi	47
2.3.4	<i>L. reuteri</i> E81 ve EPS Üretemeyen Δ gtfA Suşundan EPS İzolasyonu	48
2.3.5	Fenol-Sülfürik Asit Testi ile EPS Üretim Miktarlarının Tespiti . .	49
2.3.6	<i>L. reuteri</i> E81 ve <i>L. reuteri</i> Δ gtfA Suşundan İzole Edilen EPS'in Şeker İçeriğinin HPLC ile Belirlenmesi	49
2.4	Glukanın Ekşi Hamur ve Ekşi Hamur Ekmeği Üzerine Etkisi	49
2.4.1	<i>L. reuteri</i> E81 ve Δ gtfA Suşları ile Ekşi Hamur Üretimi	50
2.4.2	Üretilen Ekşi Hamurların Bazı Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	50
2.4.3	Dondurularak Kurutulmuş Ekşi Hamurların Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi	51

2.4.4	Üretilen Ekşi Hamurların Reoljik Özelliklerinin Belirlenmesi . .	51
2.4.5	<i>L. reuteri</i> E81 ve $\Delta gtfA$ Suşları ile Üretilen Ekşi Hamurlar Kullanılarak Ekşi Hamur Ekmeği Üretimi	51
2.4.6	<i>L. reuteri</i> E81 ve $\Delta gtfA$ Suşları ile Üretilen Ekşi Hamur Ekmeklerinin Tekstürel Özelliklerinin Belirlenmesi	52
2.5	Glukansükraz (GTFA) Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	53
2.5.1	<i>L. reuteri</i> E81'den <i>gtfA</i> Geninin Klonlanması İçin Uygun Ekspresyon Vektörünün Seçimi ve Spesifik Primerlerin Dizayını .	53
2.5.2	<i>L. reuteri</i> E81'den <i>gtfA</i> Geninin Standart Moleküler Tekniklerin Kullanımı ile Klonlanması	53
2.6	4,6- α -Glukanotransferaz (GTFB) Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	54
2.6.1	<i>L. reuteri</i> E81'den <i>gtfB</i> Geninin Klonlanması İçin Uygun Ekspresyon Vektörünün Seçimi ve Spesifik Primerlerin Dizayını .	54
2.6.2	<i>L. reuteri</i> E81'den <i>gtfB</i> Geninin Standart Moleküler Tekniklerin Kullanımı ile Klonlanması	55
2.7	GTFA ve GTFB Enzimleri ile Aktivite Çalışmaları ve Biyokimyasal Karakterizasyonları	56
2.7.1	Glukansükraz (GTFA) Enziminin Aktivitesinin Tespiti	56
2.7.2	Glukanların GTFA Enzimi ile <i>in vitro</i> Üretimi	57
2.7.3	4,6- α -Glukanotransferaz (GTFB) Enziminin Aktivitesinin Tespiti	57
2.8	Glukansükraz (GTFA) ve 4,6- α -Glukanotransferaz (GTFB) Enzimleri ile Oligosakkarit Üretimi	57
2.8.1	GTFA Enzimi ile Farklı Alıcı Şekerler Kullanılarak Oligosakkaritlerin Üretimi	57
2.8.2	GTFB Enzimi ile Farklı Alıcı Şekerler Kullanılarak Oligosakkaritlerin Üretimi	58
2.8.3	Maya Hücrelerinin İmmobilizasyonu ve Oligosakkarit Dışındaki Şekerlerin Ortamdan Uzaklaştırılması	58
2.8.4	Akseptör Reaksiyonları Sonucunda Oluşan Oligosakkaritlerin TLC ile Tespiti	58
2.8.5	Akseptör Reaksiyonları Sonucunda Oluşan Oligosakkaritlerin HPLC ile Tespiti	59
2.8.6	Akseptör Reaksiyonları Sonucunda Oluşan Oligosakkaritlerin Kimyasal Yapısının NMR Spektroskopisi ile Belirlenmesi	59
2.8.7	Oligosakkaritlerin LC/MS/Q-TOF ile Kütle Analizleri	59
2.9	GTFA VE GTFB Enzimleri ile Üretilen Oligosakkaritlerin Bağışıklık Düzenleyici Özelliklerinin Belirlenmesi	59
2.10	Glukanın ve Oligosakkaritlerin Prebiyotik Etkilerinin Belirlenmesi . . .	60

2.11 İstatistiksel Değerlendirme	61
3 BULGULAR VE TARTIŞMA	62
3.1 <i>L. reuteri</i> E81'in Genomundan <i>gtfA</i> Geninin Tamamen Silinmesi ve Δ <i>gtfA</i> Mutantın Elde Edilmesi	62
3.2 <i>L. reuteri</i> E81 ve <i>L. reuteri</i> Δ <i>gtfA</i> Suşundan İzole Edilen EPS'in Şeker İçeriği	68
3.3 <i>L. reuteri</i> E81 ve <i>L. reuteri</i> Δ <i>gtfA</i> Suşu ile Üretilen Ekşi Hamurların Bazı Kimyasal Nitelikleri	69
3.4 Dondurularak Kurutulmuş Ekşi Hamurların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüsü	69
3.5 Alternan Üretiminin Ekşi Hamurun Reolojisi Üzerine Etkisi	70
3.6 Alternan Üretiminin Ekşi Hamur Ekmeğinin Sertliği Üzerine Etkisi . . .	72
3.7 <i>L. reuteri</i> E81'den <i>gtfA</i> ve <i>gtfB</i> Genlerinin Klonlanması	73
3.8 <i>E. coli</i> BL21'de GTFA ve GTFB Enzimlerinin Üretimi ve Protein Ekspresyonlarının SDS-PAGE ile Kontrol Edilmesi	76
3.9 Histidin ile İşaretli Rekombinant Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması	77
3.10 GTFA Enziminin Biyokimyasal Özellikleri	78
3.10.1 GTFA Enzimi Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi	79
3.11 Sukrozdan <i>in vitro</i> Koşullarda α -glukan Üretimi	79
3.12 GTFB Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	80
3.13 GTFA ve GTFB Enzimleri ile Farklı Alıcı Şekerler Kullanılarak Oligosakkaritlerin Üretimi ve TLC, HPLC, LC/MS/QTOF ve NMR Analizleri	82
3.14 GTFA- Δ N ve GTFB Enzimleri ile Üretilen Oligosakkaritlerin Bağışıklık Düzenleyici Özellikleri	96
3.15 GTFA- Δ N ve GTFB Enzimleri ile Üretilen Oligosakkaritlerin Prebiyotik Fonksiyonları	102
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	106
A <i>gtfA</i> Geni	109
B <i>gtfB</i> Geni	112
KAYNAKÇA	115
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	126

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa Glikozidik Bağı
β	Beta Glikozidik Bağı
δ	Eğilme titreşimleri
Ω	Ohm
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

AB	Avrupa Birliği
Amp	Ampisilin
bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
DB	Değişken Bölge
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNS	Dinitrosalisilik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
Ery	Eritromisin
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
GBB	Glukan Bağlanma Bölgesi
GF	Gluten-Free
GH13	Glikozidik Hidrolaz 13
GH70	Glikozidik Hidrolaz 70
GRAS	Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
GS	Glukansükraz
GTs	Glukanotransferaz
HoPS	Homopolisakkarit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IPTG	Isopropyl-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
i-PZR	Inverse Polymerase Chain Reaction

Kan	Kanamisin
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterisi
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
MBHI	Modifiye Brain Heart Infusion
MCS	Multiple Cloning Sites
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
MRS	DE MAN, ROGOSA and SHARPE
ng	Nanogram
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OD	Optical Density
OS	Oligosakkarit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Ekşi hamur ortamında üretilen EPS'nin doğrudan ve üretiminden kaynaklı dolaylı etkilerinin ekmek ve ekşi hamur üzerindeki olası etkileri (Lynch vd. [47]'den alınarak modifiye edilmiştir)	8
Şekil 1.2	Glukansükrazların sükrozu substrat olarak kullanması ile glukan ve oligosakkarit üretimi [52]	10
Şekil 1.3	Ekşi hamur teknolojisi ile ilgili LAB türleri tarafından üretilen EPS'nin kimyasal olarak sınıflandırılması, üreticiler ve muhtemel fonksiyonları (Lynch vd. [47]'den alınarak modifiye edilmiştir) . . .	11
Şekil 1.4	Desktranın temel yapısal görünümü; α -1-6 zincirinin yanısıra α -1-2, α -1-3, ve α -1-4 bağları ile dallanma da yapabilmektedir [50]	12
Şekil 1.5	Alternanın temel yapısal görünümü; Glukoz ünitelerinin α -1-6 ve α -1-3 bağlarının değişerek bağlanması ile alternan oluşmaktadır [50]	13
Şekil 1.6	<i>L. brevis</i> E25 tarafından üretilen α -glukan'ın yapısal karakterizasyonu [64]	14
Şekil 1.7	Reuteranın temel yapısal görünümü; Glukoz ünitelerinin α -1-4 bağlanmasına ilave olarak α -1-6 köprüleri ile bu üniteler birbirine bağlanarak reuteran oluşmaktadır [50]	15
Şekil 1.8	Mutanın temel yapısal görünümü; Glukoz ünitelerinin çok yüksek oranda α -1-3 bağlanmasına ilave olarak az da olsa α -1-6 bağları içermektedir [50]	15
Şekil 1.9	Glukansükrazların temel yapısal organizasyonu; A; Sinyal peptit, B; N-terminal değişken bölge, C; N-terminal katalitik bölge, D; C-terminal glukan bağlanma bölgesi [52]	17
Şekil 1.10	LAB türlerinde yer alan glukansükrazların yapısının detaylı karakterizasyonu (Hijum vd. [73] 'den türetilmiştir)	18
Şekil 1.11	Glukansükrazların topolojik diyagramı (Hijum vd. [73]'den türetilmiştir)	19
Şekil 2.1	pET15b plazmidi ve <i>gtfA</i> geninin restriksiyon enzimleri ile kesimi ve ligasyon sonucu elde edilen pE8103 plazmidinin şematize olarak gösterimi	33
Şekil 2.2	HyperLadder I (Bioline, İngiltere) fragment boyutları ve miktarları .	37

Şekil 2.3	Forward (F) ve Reverse (R) primerler ile ligasyon PZR işleminin gösterimi	40
Şekil 2.4	SeeBlue Plus ladder (Invitrogen)	45
Şekil 3.1	E81'den <i>gtfA</i> geninin ilk kısmının elde edilmesini gösteren agaroz jel görüntüsü	62
Şekil 3.2	pG ⁺ host9 vektörünün ekstraksiyonunu (A) gösteren agaroz jel görüntüsü, L: Ladder	63
Şekil 3.3	Kesilen pG ⁺ host9 (A) ve ilk PZR ürününü (B) gösteren agaroz jel görüntüsü	63
Şekil 3.4	Ligasyonun test edildiği agaroz jel görüntüsü. Kırmızı ok istenen ürünü göstermektedir	64
Şekil 3.5	Koloni PZR ile transformantlar test edilmiş ve onlarca koloniden 1 adet pozitif pE8101 (pG ⁺ host9- <i>gtf1</i>) vektörü taşıyan koloni elde edilmiştir	64
Şekil 3.6	pE8101vektörünü gösteren jel görüntüsü	64
Şekil 3.7	E81 Genomundan <i>gtf2</i> geninin elde edilmesini gösteren jel görüntüsü; A-B farklı Genomik DNA konsantrasyonları ile oluşturulan PZR ürünleri, K: negatif kontrol	65
Şekil 3.8	pE8101 (A) ve <i>gtf2</i> 'nin (B) kesilmesini gösteren Agaroz jel görüntüsü	65
Şekil 3.9	Ligasyon reaksiyonunun PZR ile denenmesini gösteren agaroz jel görüntüsü, K: kontrol, A-B-C iki farklı ligaz ve bir farklı konsantrasyon denemesinin ürünleri. Mavi ok self-ligasyona uğramış pE8101 (pG ⁺ host9- <i>gtf1</i>)'i kırmızı ok ise istediğimiz vektörün oluştuğunu göstermektedir	66
Şekil 3.10	pE8102 vektörünün varlığının test edildiği koloni PZR işleminin agaroz jel görüntüsü	66
Şekil 3.11	pE8102 vektörünün <i>L. reuteri</i> E81'e atıldığını gösteren agaroz jel görüntüsü. A pozitif koloni, B plazmidin kendisi	67
Şekil 3.12	pE8102 vektörünün <i>L. reuteri</i> E81 genomuna entegre olduğunu gösteren agaroz jel görüntüsü	67
Şekil 3.13	<i>L. reuteri</i> E81 ve potansiyel mutantlarda <i>gtfA</i> geninin varlığının test edildiği PZR ürünlerini gösteren agaroz jel görüntüsü. A: E81'in DNA'sı ile PZR kurulmuştur	68
Şekil 3.14	<i>L. reuteri</i> E81 ve <i>L. reuteri</i> Δ <i>gtfA</i> mutant suşlarından ekstrakte edilen EPSlerin HPLC kromatogramı (G: glukoz)	68
Şekil 3.15	<i>L. reuteri</i> E81 (A) ve Δ <i>gtfA</i> mutant (B) ile üretilen ekşi hamurların liyofilizasyonunu takiben SEM görüntüleri. Ekşi hamurlar her iki suşun ilavesini takiben 24 saat boyunca geliştirilmiş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekşi hamurlar SEM ile görüntülenmiştir	70

Şekil 3.16 Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlarda 2. saatin sonundaki G' ve G'' değerleri	71
Şekil 3.17 Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlarda 24. saatin sonundaki G' ve G'' değerleri	71
Şekil 3.18 E81'in genomundan <i>gtfB</i> , <i>gtfA</i> 'nın amplifiye edilmesi ve ekstrakte edilen plazmidleri gösteren agaroz jel görüntüsü (A) ve bu ürünlerin ilgili restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki jel görüntüsü (B) .	74
Şekil 3.19 Ligasyon işleminin PZR sonucunu gösteren agaroz jel görüntüsü. A; negatif reaksiyon ürünü pET15b, B; pET15b ile <i>gtfA</i> geninin entegrasyonu, C; pET28a ve <i>gtfB</i> geninin entegrasyonu, D; plazmitlerdeki self-ligasyon işlemi	74
Şekil 3.20 Koloni PZR ile pE8104 (pET28a- <i>gtfB</i>) pozitif kolonilerin test edilmesi. Kırmızı oklar pET28a'ya özgü primerler ile <i>gtfB</i> geninin aktarılması sonucu oluşan 2700 bp'lik kısmı göstermektedir	75
Şekil 3.21 Koloni PZR ile pE8103 (pET15b- <i>gtfA</i>) pozitif kolonilerin test edilmesi. Kırmızı oklar pET15b'ye özgü primerler ile <i>gtfA</i> geninin aktarılması sonucu oluşan 3000 bp'lik kısmı göstermektedir	75
Şekil 3.22 GTFA ve GTFB proteinlerinin kontrolü amacıyla SDS-PAGE jel görüntüsü: A; Sırasıyla 2 (A), 3 (C) ve 4 (E) saat indüksiyon sonunda elde edilmiş GTFA klonundan elde edilen görüntü, F pET15b kontrol; Aynı işlemin 2-4 saat indüksiyon ile GTFB ile yapılması ile elde edilen sitoplazmik proteinlerin görüntüsü (B, D); GTFB'nin görüntülenmesi amacıyla hücre peletinden aynı indüksiyon süreleri sonunda elde edilen proteinler (G, H); I pET28a kontrol. B; His-tag kolonundan geçirilmesinin ardından GTFA'nın saflaştırılmasını gösteren jel görüntüsü	76
Şekil 3.23 GTFB'nin hücre peletinden (A, B, C, D) ve hücre sitoplazmasından elde edilmesi (F, G, H, I), K kontrol boş pET28a hücre pelleti, L, ladder	77
Şekil 3.24 GTFB'nin varlığının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen Western-Blot görüntüsü. Sadece hücre peleti örneklerinde ilgili protein mevcuttur	78
Şekil 3.25 GTFA enzimi ile sukrozun 1 saat inkübasyonu sonucunda glukoz ve fruktozun oluştuğunu gösteren HPLC kromatogramı. Bu HPLC kolon şartlarında dk 14,52'de glukoz, dk 17,92'de fruktoz ve dk 23,83 de ise sukroz gelmektedir	78
Şekil 3.26 GTFA enziminin aktivitesi üzerine pH (A) ve sıcaklığın (B) etkisi . .	79
Şekil 3.27 Başlangıç sukroz konsantrasyonunun GTFA enziminin aktivitesi üzerine etkisi (C) ve glukoz üretimi üzerine zamanın etkisi (D) . . .	80

- Şekil 3.28** GTFB enziminin nişasta üzerindeki etkisini ve glukoz ve maltoz alıcılarının ortamda bulunması durumunda 24 saat içinde açığa çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü, A: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125), B: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, C: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125), D: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, E: nişasta (% 0,125), F: nişasta (% 0,125) kontrol. Oklar yeni ortaya çıkan ürünleri göstermektedir 81
- Şekil 3.29** GTFB enziminin nişasta üzerindeki etkisini ve glukoz ve maltoz alıcılarının ortamda bulunması durumunda 7 gün sonunda açığa çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü, A: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125), B: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, C: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125), D: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, E: nişasta (% 0,125), F: nişasta (% 0,125) kontrol. Ok nişastanın bitmeye yakın olduğunu göstermektedir 82
- Şekil 3.30** Reaksiyon ortamında (20 mM sodium acetate tamponu, pH 5,2 and 1 mM CaCl_2) 0,2 g mL^{-1} sukroz ve 0,1 g mL^{-1} maltoz ve 1 U mL^{-1} olacak şekilde GTFA- ΔN olduğu durumda 30°C'de 60 saat inkübasyon sonundaki reaksiyon ürünleri. Standartlar G: Glukoz, F: Fruktoz, S: Sukroz, M: Maltoz; O: Oluşan oligosakkaritler 83
- Şekil 3.31** GTFA- ΔN enzimi ile farklı sukroz:maltoz konsantrasyonlarında kurulan reaksiyon ortamlarında oligosakkaritlerin oluşumunu gösteren TLC görüntüsü. S1, S2 ve S3 yukarıda ifade edilen farklı reaksiyon ortamları, M: maltoz, S: sukroz, F: fruktoz, G: glukoz, oligosakkaritler ve P: glukan 84
- Şekil 3.32** Reaksiyon ortamı S2'nin HPLC kromatogramı; oligosakkaritler 25. dk'dan itibaren tespit edilmişlerdir. Oklar oligosakkaritleri göstermektedir 84
- Şekil 3.33** GTFA- ΔN enzimi ile sukrozun donör maltozun ise alıcı olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu 85
- Şekil 3.34** Oligosakkarit karışımının 600 MHz'deki anomerik bölgesinin ^1H NMR spektrumu. L = leukroz. Diğer harflendirmeler sonuç kısmında ifade edilmiştir 86
- Şekil 3.35** GTFA- ΔN enzimi ve maltoz (H) ile oluşturulan reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü. G immobilize maya uygulamasının ardından ve maltoz ile elde edilen oligosakkarit karışımlarından fruktoz, sukroz ve varsa alıcı şekerin tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. F: fruktoz, S: sukroz, K: kontrol 87

Şekil 3.36 GTFA- Δ N enzimi ile gentiobiyoz (D) ile oluşturulan reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü. C immobilize maya uygulamasının ardından gentiobiyoz ile elde edilen oligosakkarit karışımlarından fruktoz, sukroz ve varsa alıcı şekerin tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. F: fruktoz, S: sukroz, K: kontrol	88
Şekil 3.37 Alıcı reaksiyonlarında kullanılan şekerlerin TLC görüntüsü. A: maltoheptoz, C: maltotrioz, H: gentiobioz, İ: maltoheptoz	89
Şekil 3.38 GTFA- Δ N enzimi ve maltoz (H) ile oluşturulan reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü. G immobilize maya uygulamasının ardından ve maltoz ile elde edilen oligosakkarit karışımlarından fruktoz, sukroz ve varsa alıcı şekerin tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. F: fruktoz, S: sukroz, K: kontrol	89
Şekil 3.39 GTFA- Δ N enzimi ile alıcı reaksiyonlarında sırasıyla alıcı C: gentiobioz (EÖ), D: gentiobioz (ES), kontrol, H: sukroz kullanılması ile ortaya çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü. ES: etanol çöktürmesi uygulandıktan sonra geriye kalan oligosakkaritleri içeren örnek, EÖ: etanol çöktürmesi uygulanmamış örnek, S: sukroz	90
Şekil 3.40 GTFA- Δ N enzimi ile sukrozun donör gentiobiozun ise alıcı olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu, a) 503.1 (DP3), b) 665. 2 (DP4), a) 827.2 (DP5), c) 989.3 (DP6), d) 1151. 3 (DP7), a) 1313.4 (DP8)	91
Şekil 3.41 Gentiobiozun alıcı olarak kullanılması ile üretilen oligosakkarit karışımının 500 MHz'deki anomerik bölgesinin ^1H NMR spektrumu .	92
Şekil 3.42 GTFB enziminin amiloz ve amilozun yanı sıra glukoz ve maltoz alıcılarının ortamda bulunması durumunda, maltoz, maltotrioz ve maltoheptoz ile 24 saat sonunda açığa çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü, A: Amiloz, B: maltoheptoz C: maltoheptoz kontrol, D: maltotrioz, E: maltotrioz kontrol, F: maltoz, G: maltoz kontrol H: amiloz-maltoz, I: amiloz-maltoz kontrol, K: amiloz glukoz, L: amiloz glukoz kontrol, P: glukan	92
Şekil 3.43 GTFB enziminin A: maltoheptoz, B: maltoheptoz kontrol C: maltotrioz D: maltotrioz kontrol, E: izomaltoz, F: izomaltoz kontrol, G: maltoz, H: maltoz kontrol ile test edilmesini gösteren TLC görüntüsü	93
Şekil 3.44 GTFB tarafından maltoheptozun substrat olarak kullanılmasıyla üretilen oligosakkarit karışımına ait ^1H NMR spektrumu	94
Şekil 3.45 GTFB enzimi ile maltozun substrat olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu, a) 341.1, b) 503.1 (DP3), c) 665.2 (DP4), d) 827.2 (DP5), e) 1151.3 (DP7), f) 1313.4 (DP8)	95

Şekil 3.46 GTFB enzimi ile maltoheptozun substrat olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu, a) 503.1 (DP3), b) 665.2 (DP4), c) 827.2 (DP5), d) 989.3 (DP6) e) 1151.3 (DP7), f) 1313.4 (DP8)	96
Şekil 3.47 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen IL-4 sitokin seviyesi	97
Şekil 3.48 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen IL-10 sitokin seviyesi	98
Şekil 3.49 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen IL-12 sitokin seviyesi	99
Şekil 3.50 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen TNF- α sitokin seviyesi	101

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Plazmid seçimi için kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları .	31
Tablo 2.2	Kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme koşulları	32
Tablo 2.3	Bu tezde kullanılan plazmid vektörler	33
Tablo 2.4	Tez çalışması boyunca kullanılan primerler	36
Tablo 2.5	Tez çalışmasında kullanılan restriksiyon enzimlerine ait bazı bilgiler	37
Tablo 2.6	Restriksiyon enzimleri ile kesim işlemleri için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları	38
Tablo 2.7	Defosforilasyon işlemi için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları . .	38
Tablo 2.8	Ligasyon işlemi için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları	39
Tablo 2.9	<i>gtfA</i> ve <i>gtfB</i> genlerinin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR bileşimi	39
Tablo 2.10	<i>gtfA</i> ve <i>gtfB</i> genlerinin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR şartları	40
Tablo 2.11	Ligasyon ve koloni PZR işlemleri için kullanılan PZR bileşimi	41
Tablo 2.12	Ligasyon ve koloni PZR işlemleri için kullanılan PZR şartları	41
Tablo 2.13	<i>L. reuteri</i> E81 ve $\Delta gtfA$ suşu kullanılarak üretilen ekşi hamur bileşimi ve fermantasyon şartları	50
Tablo 2.14	Prebiyotik etkinin belirlenmesi için kullanılan oligosakkaritler, probiyotik ve patojen türler	61
Tablo 2.15	Prebiyotik etkinin belirlenmesi için oluşturulan minimal ortam içerikleri	61
Tablo 3.1	Kontrol, <i>L. reuteri</i> E81 ve $\Delta gtfA$ suşu ile üretilen ekşi hamurların pH ve TTA asitliği değerleri	69
Tablo 3.2	Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlarda 2. saat ve 24. saatin sonundaki elastiklik ve viskozluk değerleri	72
Tablo 3.3	Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan ekşi hamur ekmelerinin 0, 2, 5 ve 8. gün sonundaki sertlik değerleri	73
Tablo 3.4	GTF Δ A ile sukrozun donör farklı -disakkaritlerin alıcı olarak kullanılması ile üretilen oligosakkaritlerin ve alternanın probiyotik ve patojen türlerin gelişimleri üzerindeki etkisi	103
Tablo 3.5	GTFB ile maltoz, maltotrioz ve maltoheptozun substrat olarak kullanılması ile üretilen oligosakkaritlerin probiyotik ve patojen türlerin gelişimleri üzerindeki etkisi	104

***Lactobacillus reuteri* E81’de Kodlanan Glukansükraz ve Glukanotransferaz Enzimlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu, Bu Enzimler ile Özgün Prebiyotik Oligosakkaritlerin Üretimi**

Hümeýra İSPİRLİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş-Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

Laktik asit bakterilerinin (LAB) starter kültür olarak işlevlerine ilave olarak son dönemde bu önemli mikrobiyal grubun ürettiği fonksiyonel metabolitler üzerinde durulmaktadır. Bu metabolitlerin başında da LAB türleri tarafından *in situ* olarak üretilip gıda maddelerinin fizikokimyasal niteliklerini geliştirebilen ekzopolisakkaritler gelmektedir. LAB türlerinde homopolimerik EPS üretimi ucuz substrat ve yüksek miktarda üretim nedeniyle temel olarak α -glukan üretimi çerçevesinde şekillenmektedir ve sükrözün substrat olarak kullanılması ile α -glukan üretiminden glukansükrazlar sorumludur. Son dönemde LAB türlerinde ortaya çıkartılan α -glukan üretebilen bir diğer enzim grubu da sükrözde inaktif ancak amiloz gibi α -1-4 glikozidik bağı içeren substratlara etki edip açığa çıkan glukoz ünitelerini farklı bağlar ile bağlayabilen glukanotransferazlardır. Her iki enzim grubu ile de farklı yapılar da oligo/polisakkaritlerin üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu bağlamda bu tez çalışması ile ekşi hamurdan izole edilen ve alternan üreticisi olduğu gösterilen *L. reuteri* E81’de alternan üretiminin ekşi hamur üretimi açısından fonksiyonel etkilerini ortaya koymak, alternan üretiminden sorumlu glukansükrazın ve yine aynı bakteride açığa çıkartılan 4,6- α -glukanotransferazın aktivitesinin sırasıyla verici-alıcı reaksiyonları ve farklı substratlarda üretebildikleri oligosakkaritlerin karakterizasyonu ve bu oligosakkaritlerin bağışıklık düzenleyici ve prebiyotik potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez kapsamında kullanılan *L.*

reuteri E81'in genom analizi bu bakteri de glukansükraz ve 4,6- α -glukanotransferaz enzimlerini kodlayabilecek genin yer aldığını göstermiştir. Tez çalışmasında ilk olarak ekşi hamur ve ekmeğinin nitelikleri açısından alternan üretiminin fonksiyonel etkilerinin anlaşılabilmesi için *gtfA* geni *L. reuteri* E81'den silinmiş, *L. reuteri* E81 ve alternan üretemeyen *L. reuteri* E81 Δ *gtfA* suşu ile ekşi hamur üretilip ekşi hamurun fizikokimyasal özellikleri ve ekşi hamur ekmeğinin yapısal karakteristikleri üzerine alternan üretiminin etkileri açığa çıkartılmış. İkinci olarak *L. reuteri* E81'den *gtfA* ve *gtfB* genleri *E. coli* BL21 hücrelerinde üretilip glukansükraz ve 4,6- α -glukanotransferaz enzimlerinin aktivitesi ortaya konmuş ve ürettikleri α -glukanların yapıları NMR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Takiben glukansükraz enziminin sükroz ve farklı şeker alıcılarla ve 4,6- α -glukanotransferaz enziminin ise α bağı içeren farklı substratlardan üretebildikleri oligosakkaritler TLC, NMR ve LC/MS analizleri ile karakterize edilmiştir. Son olarak GTFA ve GTFB ile üretilen bu oligosakkaritlerin fonksiyonel etkileri *in vitro* olarak HT-29 kolon hücrelerinde IL-10, IL-4, IL-12 ve TNF- α sitokinlerini indüklenme potansiyelleri ve probiyotik ve patojen bakterilerin gelişimi üzerine potansiyel etkileri ortaya konmuş ve oligosakkarit düzeyinde fonksiyonel etkinin değişiklik gösterebildiği açığa çıkartılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glukansükraz, 4,6- α -glukanotransferaz, oligosakkaritler, immun-modulasyonu, prebiyotik

ABSTRACT

Biochemical Characterization of Glucansucrase and Glucanotransferase Enzymes Encoded in *Lactobacillus reuteri* E81, Production of Unique Prebiotic Oligosaccharides with These Enzymes

Hümeýra İSPİRLİ

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Enes DERTLİ

Recently the production of functional metabolites by lactic acid bacteria (LAB) gained special interests in addition to their main functions as starter cultures. One of the main metabolites of LAB is exopolysaccharides that can be produced *in situ* during fermentation process which can affect the physicochemical properties of food products. Homopolymeric α -glucan production has a higher role for LAB due to the higher production levels and the production of this polymer from a cheap substrate and glucansucrases are responsible for the α -glucan production using sucrose as the substrate. Recently another enzyme group found in LAB as an α -glucan producer is the glucanotransferases that are inactive on sucrose but able to use different α -1-4 glycosidic linkages containing substrates such as amylose to produce α -glucans. Both enzyme groups can be used for the production of different poly/oligosaccharides. In this respect, the aims of this thesis were to determine the functional roles of alternan type EPS production in *Lactobacillus reuteri* E81 during sourdough production, to determine the activities of glucansucrase and the glucanotransferase harbored in the genome of E81 and to characterise the oligosaccharides produced these enzymes in donor-acceptor reactions and with different substrates, and to determine the functional roles of these oligosaccharides in terms of immune-modulation and prebiotic effects. The analysis of the genome of *Lactobacillus reuteri* E81 used in the thesis revealed the presence of a 4,6- α -glucanotransferase together with a

glucansucrase in its genome. Firstly, in order to understand the role of alternan production in the physicochemical properties of sourdough, the *gtfA* gene was deleted from the genome of E81 and a $\Delta gtfA$ mutant was obtained that was deficient of alternan production and then sourdough was produced with both strains to test the effects of alternan on sourdough and sourdough bread. Secondly, both *gtfA* and *gtfB* genes were cloned from strain E81 and expressed in *Escherichia coli* BL21 and the activities of glucansucrase and 4,6- α -glucanotransferase were determined and the structures of α -glucans produced by these enzymes were determined by NMR analysis. Then oligosaccharides produced by glucansucrase enzyme in donor-acceptor reactions with sucrose and different sugars and by 4,6- α -glucanotransferase enzyme with different substrates containing α -1-4 linkages were characterised by TLC, NMR and LC-MS analysis and both enzymes were shown to be able to produce novel oligosaccharides. Finally, the functional roles of oligosaccharides produced by GTFA and GTFB were determined by testing the *in vitro* cytokine induction of IL-10, IL-4, IL-12 and TNF- α cytokines in HT-29 colon cells and by testing the prebiotic functions of these oligosaccharides and these oligosaccharides were found to be effective as functional compounds and this effect was pronounced at oligosaccharide level.

Keywords: Glucansucrase, 4,6- α -glucanotransferase, oligosaccharides, immune-modulation, prebiotic

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Laktik Asit Bakterileri ve Ekzopolisakkarit Üretimi

Laktik Asit Bakterileri (LAB) fermente ürünlerin üretimini geleneksel ve endüstriyel boyutta gerçekleştiren, starter ve starter olmayan kültürler olarak gıda teknolojisi açısından büyük öneme sahip olan mikroorganizma grubudur. Son dönemlerde LAB türleri starter fonksiyonlarına ilave olarak ürettikleri bakteriyosin, ekzopolisakkarit (EPS), sağlık açısından önemli çeşitli bileşenler (B grubu vitaminleri vs.) gibi metabolitleri üretmeleri açısından da büyük önem kazanmıştır. Bununla birlikte bu bileşenlerin üretim mekanizmalarının anlaşılabilmesi ve endüstriyel boyutta üretilmeleri de bu doğrultuda önem kazanmıştır. LAB türleri genel olarak farklı fermente gıdaların yanı sıra insan ve hayvan gastrointestinal sistemi gibi farklı ortamlardan izole edilebilen, ortak özellikleri fermantasyon prosesinin sonunda laktik asit üretmeleri olan mikrobiyal gruptur. Bu mikrobiyal grupta *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* gibi cinsler yer almaktadır [1].

LAB türleri karbonhidratların fermantasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit üreten, Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmayan, çubuk veya kok şeklinde, zorunlu olarak fermentatif, aerotolerant veya anaerobik bakterilerdir [2]. Fermantasyon sonucu ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakteriler porfirinleri ve sitokromları içermedikleri için elektron taşınmasına bağlı fosforilasyon yapamazlar, sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile enerji elde ederler. LAB türleri C kaynaklarının fermantasyonu sonucunda oluşan son ürüne göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. Homofermentatif türler son ürün olarak sadece laktik asit üretirken heterofermentatif türler son ürün olarak laktik asitin yanı sıra asetik asit, etanol ve CO₂ üretmektedirler [3]. Kompleks besinsel (karbonhidratlar, amino asitler, peptitler, yağ asitleri, vitaminler) gerekliliğe sahip olan LAB'ler fermente gıdalar gibi zengin besinsel ortamlarda bulunurlar ve bu ürünlerin oluşmasında temel

olarak görev alırlar. Bakteri grupları arasında GRAS (Genel olarak güvenilir kabul edilen) statülerinden dolayı son derece önemlidirler [4]. Ayrıca probiyotik olarak adlandırılan organizmaların büyük çoğunluğu LAB grubunun üyesidir. Geleneksel olarak LAB türleri, gıda fermentasyonlarında ve gıda maddelerinin korunmasında rol alırlar ve fermente et ürünleri, süt ürünleri, turşu ve ekşi hamurdan yapılan fırın ürünlerinin kendilerine özgü tat ve tekstür özelliklerinin gelişiminden sorumludurlar [4]. Ayrıca LAB türleri insan ve hayvan gastrointestinal sistemi de dahil birçok farklı ortamda temel mikroorganizma grubu olarak yer alırlar [5, 6]. Son yıllarda artan teknolojiye bağlı olarak genomu tamamen sekanslanan LAB sayısı oldukça artmıştır ve bu çalışmalar bu bakteri grubu üyelerinin fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması için çok önemli mesafeler kat edilmesine neden olmuştur. Bu fonksiyonel özelliklerinin başında da hem üretici LAB türü açısından önemli hem de ve daha da önemlisi üretilen gıda ortamında fizikokimyasal iyileşmelere sebep olabilen EPS üretimi gelmektedir [7, 8]. LAB tarafından üretilen EPS fermente ürünlerin yapısal karakteristiklerinde olumlu etkiler oluşturmalarının yanı sıra ürünün tadında olumlu özellikler oluşturabilmekte ve önemli olarak bazı EPS'nin prebiyotik etkide olduğu da gösterilmiştir [9–11]. EPS üretiminin üretici tür açısından direkt biyolojik önemi henüz yeterince anlaşılamamıştır. Zira EPS üreticisi türlerin hemen hemen hepsi ürettiği EPS'yi ilgili yapıyı parçalayacak enzimlerin eksikliği nedeniyle besinsel olarak kullanamamaktadır [12]. Bununla birlikte doğal ortamlarında EPS'nin bakteriyi nisin, yeterli besinsel elementin olmaması, membran stresi ve düşük pH gibi çeşitli olumsuz dış etkenlere karşı koruduğu bilinmektedir [13–15]. Benzer olarak EPS üretiminin biyofilm oluşumunda, gastrointestinal ortama tutunma ve kolonizasyon sürecinde roller oynayabildiği gösterilmiştir [6, 16]. Sonuç olarak LAB türleri tarafından üretilen EPS'nin prebiyotik olmak gibi önemli biyolojik fonksiyonları bulunabilmekte ancak bu konuda henüz yeterli seviyede bir bilimsel çalışma bulunmamaktadır.

Günümüzde gıda sanayiinde kalınlaştırıcı, stabilize edici, tekstürü iyileştirici ve jelleştirici ajanların çoğu bitkilerden (nişasta ve türevleri, pektin vb.) veya alglerden (aljinat vb.) elde edilmekle birlikte son dönemde mikrobiyal EPS'ler bu kalınlaştırıcılara alternatif olarak dikkat çekmektedir [17]. Endüstriyel açıdan yüksek miktarda üretilip LAB bazlı en önemli EPS tıp, ayırma teknolojisi, gıda uygulamaları ve biyoteknoloji gibi uygulamalarda kullanılan ve *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen dekstrandır [18]. Özellikle LAB türlerinin GRAS statüsü sebebiyle LAB türleri tarafından üretilen EPS'lere olan ilgili her geçen gün artmıştır. Bu ilginin artmasının temelinde EPS'lerin fonksiyonel etkilerine ilave olarak LAB türleri tarafından çeşitli yapı ve moleküler ağırlıkta EPS'lerin üretilmesi ve EPS'lerin fonksiyonlarının da yapısal karakteristiklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmesidir. Benzer olarak LAB türlerinde EPS üretiminin özgün genetik

mekanizmasının varlığı da LAB türleri tarafından üretilen EPS'lere olan ilginin artmasına sebep olmuştur. LAB türleri farklı gıda ortamlarında hem tamamen hücre dışına salgıladıkları ve ekstra-hücresele EPS olarak adlandırılan EPS'yi hem de üreten hücreye kovalent olarak bağlı kapsüller EPS üretme kabiliyetindedirler. İlki genel itibariyle gıda teknolojisi açısından önem arz eden EPS çeşidi olup ikincisi ise yukarıda zikredilen hücre açısından olumlu özelliklerin oluşumuna katkı sunan EPS çeşididir. LAB türleri ile ilk yapılan çalışmalar genel olarak süt ve ürünleri açısından EPS uygulamaları şeklinde ortaya çıkmış [19], sonrasında farklı gıda ortamlarında örneğin fermente ürünlerin üretimi ve aynı zamanda bağırsak orijinli türlerin EPS üretimleri üzerinde de durulmaya başlanmıştır [11]. Örneğin ekşi hamur orijinli LAB türleri yapısal olarak tek bir şeker monomerinden oluşan homopolimerik EPS üretimi ile ilişkilendirilmiş ve ekşi hamurdan izole edilen LAB türlerinin glukoz ve/veya fruktan yapısında EPS üretebildiği gösterilmiştir. EPS üretebilen LAB türleri ile ekşi hamur üretiminin diğer gıdalarda olduğu gibi ekşi hamur ve ekşi hamur ekmeğinin fizyokimyasal nitelikleri üzerinde olumlu etkiler oluşturabildiği öne sürülmüştür [11, 20–22]. Ek olarak özellikle homopolimerik EPS üretimi sırasında enzimatik aktivite ile oluşturulabilen oligosakkaritler de ekşi hamur bazlı ve diğer fermente ürünlerde fizyolojik (sağlık üzerine olumlu) ve teknolojik özelliklerin gelişmesine katkı sağlamaktadırlar [9]. Benzer şekilde üretilen EPS ortamda yer alan diğer mikroorganizmalar içinde substrat olarak kullanılabilir. Nitekim yapılan bir çalışma üretilen EPS'nin bağırsak orijinli Bifidobakteriler tarafından fermente edilebilir bir karbonhidrat olarak kullanılabildiğini göstermiştir [23]. Sonuç olarak LAB tarafından üretilen EPS, GRAS statüleri, yapısal olarak özgünlükleri, farklı LAB tür ve suşlarındaki üretim miktarlarındaki farklılıklar, *in situ* olarak üretildikleri fermente gıdaların başta fizyokimyasal nitelikleri olmak üzere kalite parametreleri üzerindeki olumlu etkileri, üretici LAB türleri üzerindeki etkileri ve başta prebiyotik etki olmak üzere sağlık üzerindeki olumlu etkileri açısından değerlendirilen ve son dönemlerde başta ekşi hamur olmak üzere farklı gıda maddeleri üzerindeki etkileri araştırılan ve yeni EPS üreticisi suşların ve EPS üretiminin genetik mekanizmasının araştırılmasına konu olan LAB türlerinin ürettiği en önemli metabolitlerin başında gelmektedir.

1.1.2 Ekşi Hamur Teknolojisi Açısından LAB'nin Önemi ve EPS Üretimi

Ekşi hamur ve ekşi hamur ekmeğinin üretimi çok eski zamanlardan beri yapılagelmektedir. Ekşi hamur temel olarak un ve su kullanılarak elde edilen hamurun LAB türleri tarafından fermente edilmesiyle elde edilmektedir. Ekşi hamur aynı zamanda metabolik olarak aktif maya ve LAB türlerini barındıran bir ara ürün olarak da tanımlanabilir. Ekşi hamur teknolojisi ekmek üretimi ve fırın teknolojisi açısından aromanın, raf ömrünün ve mineral alımının arttırabilmesi açısından önemli roller

oynamaktadır [24].

Ekşi hamur genel olarak heterofermentatif LAB türleri tarafından hamurun fermente edilmesiyle elde edilmekte ve fermantasyon neticesinde laktik ve asetik asit hamura özgü olan ekşi tadın oluşmasına neden olmaktadır. Ekşi hamurun ekmek üretiminde kullanılmasının normal ekmeğe göre çok önemli avantajları bulunmaktadır. Bunlar; ekmek hamurunun teknolojik özelliklerinin örneğin işlenebilirliğinin artması, ekmeğin besleyicilik niteliğinin LAB türleri tarafından fitatların parçalanması neticesiyle artması, ekmeğin organoleptik özelliklerinin örneğin hacminin, tekstürünün gelişmesi ve tadında meydana gelen değişiklikler ve en önemlisi raf ömrünün uzamasıdır [25, 26]. Benzer olarak ekşi hamur LAB türleri tarafından meydana getirilen asidifikasyon tahıllardaki fitazları da aktive ederek besin elementlerini daha kullanılabilir hale getirir [27]. LAB türlerinin ekmek kalitesi açısından diğer önemli katkıları arasında proteolitik aktiviteleri [28], ekmeğin tadını iyileştirecek aromatik ve uçucu bileşenleri oluşturmaları [29], ekmeğin fırında kızartılmış tadını iyileştirecek arginin metabolizmasını düzenlemeleri [30], antifungal, antirop ve antibakteriyel aktiviteleri olan bileşenleri üretmeleri [31] ve en önemlilerinden bir tanesi EPS üretimi neticesinde ekmeğin raf ömrünü ve tekstürünü iyileştirilmeleri sayılabilir [32].

Ekşi hamur, bu ortama iyi bir şekilde adapte olmuş LAB türleri ve mayaları içermektedir [33]. Ekşi hamurun mikrobiyal kompozisyonu; iç faktörler olan unun kimyasal kompozisyonu ve enzimatik profili ve dış faktörler olan sıcaklık ve redoks potansiyeli gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [25]. Tipik ekşi hamur LAB türleri *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, ve *Weissella* cinslerine ait hetero ve homofermantatif türlerdir [34, 35]. Bu türler arasında termofilik *Lactobacillus reuteri* özellikle fermantasyon işlemi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinde ekşi hamur ortamında yer almaktadır. Ekşi hamurda sıklıkla yer alabilen önemli türler ise *L. sanfranciscensis*, *L. rossiae*, *L. brevis*, *Leuc. mesenteroides* ve *Weissella* spp.'dir [36]. Ekşi hamur ortamında LAB sayısı maya sayısına göre genel olarak 2 log₁₀ birim fazla yer almakta ve temel olarak fermantasyonu LAB türleri sürdürmektedir. Ekşi hamur ortamında LAB türlerinin yüksek oranda bulunup fermantasyonu gerçekleştirebilmelerinin bir sebebi de ekşi hamur ortamında yer alan maltoz ve fruktoz gibi şekerlere adapte olmuş karbonhidrat metabolizmalarıdır. Aynı zamanda ekşi hamur pH ve gelişim sıcaklığı LAB türlerinin ortamı domine etmelerine neden olmaktadır. Ek olarak LAB türlerinin biyokimyasal faaliyetleri neticesinde organik asitler, bakteriyosin gibi antimikrobiyal bileşenlerin üretimi bu türlerin rekabet etme şanslarını büyük ölçüde artırmaktadır.

LAB türleri ekşi hamur ortamında fermantasyonu sürdürürken ürettikleri en önemli metabolitlerden bir tanesi EPS'dir. Yapısal olarak LAB türleri tek bir şeker

ünitesinden oluşan homopolimerik EPS veya birden fazla şeker ünitesinden oluşan heteropolimerik EPS üretme kabiliyetindedir. Bununla birlikte ekşi hamur orijinli LAB türleri homopolimerik EPS üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Geleneksel ekşi hamur fermantasyonlarında *L. frumenti*, *L. reuteri*, *L. pontis*, *L. sanfranciscensis* suşlarının levan veya inülin olmak üzere fruktan ve dekstran, mutan ve reuteran olmak üzere glukan üretimi geniş kapsamlı olarak Tieking ve Ganzle [11] tarafından tartışılmıştır. Yine ekşi hamur LAB türleri ile yapılan kapsamlı çalışmalardan bir tanesinde Bounaix vd. [36] Fransız ekşi hamurlarından izole ettikleri LAB türlerindeki EPS üretimini incelemiş ve topladıkları her bir ekşi hamurdan izole ettikleri en az bir LAB türünün EPS üretim kabiliyetinde olduklarını göstermişlerdir. Bu çalışmada izole edilen 30 LAB suşundan 23'ü homopolimerik EPS üretmiştir. Bu suşlardan 9 adet *Leuc. citreum*, 5 adet *Leuc. mesenteroides*, 5 adet *W. cibaria* ve 1 adet *W. confusa* suşu sadece glukoz birimlerinden oluşan glukan üretirken, 2 adet *L. sanfranciscensis* suşu fruktoz birimlerinden oluşan fruktan ve son olarak bir adet *Leuc. mesenteroides* suşu ise hem glukan hem de fruktan üretmiştir. İlginç olarak bu çalışmada elde edilen LAB türleri yapısal olarak geniş bir yelpazede EPS üretimi gerçekleştirmişlerdir. Örneğin glukan üreticileri α -(1-2), α -(1-3) ve α -(1-6) bağlarının değişen oranlarını içeren glukan üretme kabiliyeti göstermişlerdir. Ekşi hamur ortamında yer alarak EPS üretimi açısından dikkat çeken bir diğer türde *L. reuteri*'dir. Ekşi hamur izolatu *L. reuteri* suşları ile yapılan çalışmalar bu suşun temel olarak glukansükraz (GS) aktivitesine bağlı olarak α -(1-4) ve α -(1-6) bağlarından oluşan ve reuteran olarak adlandırılan glukani üretme kabiliyetinde olduğunu ancak frukransükraz aktivitesi ile de β -(2-1) fruktoz ünitelerinden oluşan inülin ve β -(2-6) ünitelerinden oluşan levan EPS'de üretme kabiliyetinde olduğu gösterilmiştir [11, 37]. Benzer olarak ekşi hamur izolatu *W. confusa* ve *W. cibaria* türlerinin dekstran formunda ekşi hamur ortamında EPS ürettiği gösterilmiştir [38]. Önemli olarak ekşi hamur ortamında LAB türlerinin glukan ve fruktan üretimine ek olarak özellikle malto-oligosakkaritleri üretebildikleri ve bu bileşenlerinde ekşi hamurun ve ekmeğinin nitelikleri üzerine olumlu etkileri olabileceği vurgulanmıştır [17]. Benzer olarak Kaditzky ve Vogel [39] *L. reuteri* ile fermente edilen ekşi hamurda malto-oligosakkaritlerinde üretilbildiğini göstermiş, Galle vd. [40] ise glukansükraz aktivitesine bağlı olarak ortamda glukozun alıcı olarak değerlendirilmesi ile ekşi hamurda malto-oligosakkaritlerin meydana geldiklerini ortaya koymuştur.

Üretilen EPS'nin yapısal karakterizasyonuna ek olarak üretim miktarıda önemli bir husustur. Normal koşullarda hidrokolloidler hamurun niteliklerini iyileştirmek için hamur ortamına %1'e kadar katılabilmektedirler. Yapılan çalışmalar özellikle *Weissella* spp. ve *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen EPS'nin yaklaşık olarak 16 g kg⁻¹'e kadar çıkabildiği dolayısıyla da hamur ortamında hidrokolloidler yerine kullanılabileceği

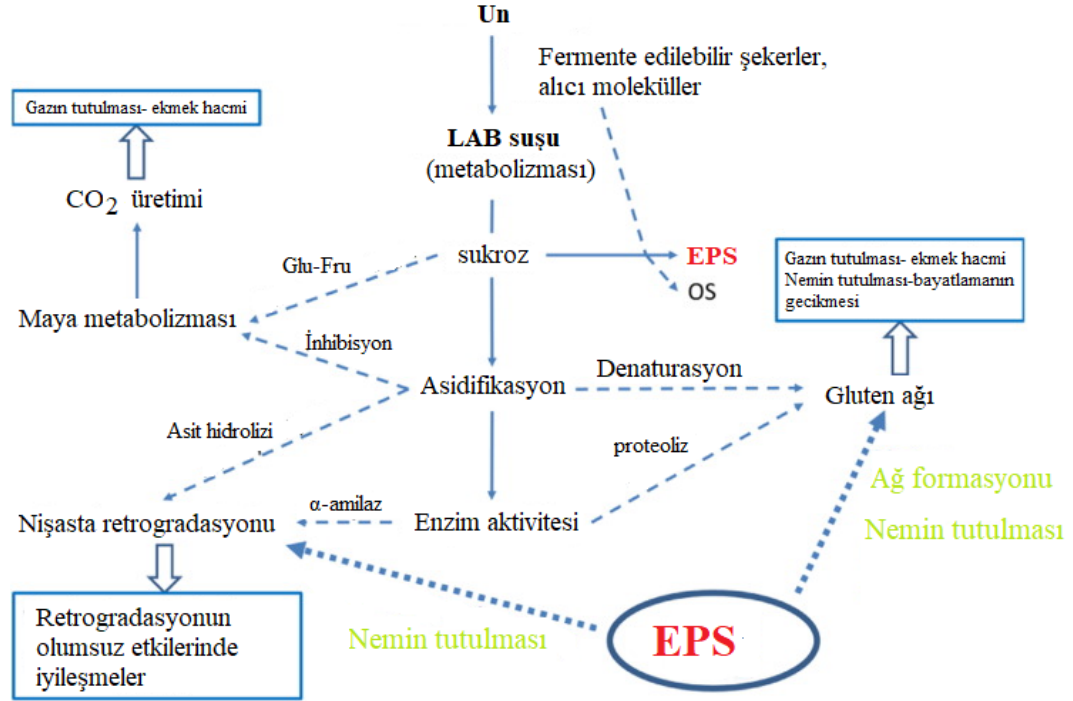
vurgulanmaktadır [17]. Bununla birlikte *in situ* EPS üretiminin hamur verimi, fermantasyon süresi, pH, süroz konsantrasyonu ve unun kimyasal niteliklerine bağlı olarak değişebileceği unutulmamalıdır. Bu noktada yapılan bir çalışmada süroz kullanılarak *L. reuteri* tarafından glukun üretiminin yumuşak hamurlarda muhtemel olarak glukansükraz enziminin substratlara erişiminin daha fazla oluşu sebebiyle fazla olduğu gösterilmiştir [39]. Sonuç olarak yapılan çalışmalar ekşi hamur oluşumundan sorumlu LAB türleri açısından EPS üretiminin temel özelliklerinden biri olduğunu ortaya koymaktadır. Yukarıda da ifade edildiği gibi ekşi hamur orijinli LAB türleri açısından homopolimerik glukun ve fruktan üretimi önemli bir niteliktir ve suşlar arasında üretilen özellikle glukunun yapısı ve üretim miktarı gibi faktörler üretilen EPS'nin ekşi hamur ortamındaki fonksiyonlarını belirleyici nitelikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ek olarak glukansükraz aktivitesine bağlı olarak glukun üretimi gerçekleşirken ekşi hamur ortamında yer alan glukoz, fruktoz ve maltoz gibi şeker alıcılara ortamdaki glukozun yine glukansükraz enzimi ile aktarılabilmesi neticesinde ekşi hamur ortamında çoğunlukla malto-oligosakkaritler meydana gelmekte ve her iki grup bileşen özellikle de glukun/fruktan EPS ekşi hamurun ve ekşi hamur ekmeğinin fizikokimyasal niteliklerini geliştirebilmektedir

1.1.3 Ekşi Hamur Teknolojisi Açısından EPS Üretiminin Önemi

Ekşi hamur ortamında fermantasyon sürecinde *in situ* olarak üretilen EPS temel olarak hidrokolloid olarak aktivite göstererek ekşi hamurun reolojisini ve sonrasında üretilen ekmeğin kalite parametrelerini olumlu yönde geliştirebilir. Bu konuda yapılan ve EPS'nin ekmek karakteristikleri ve hamur üzerindeki etkilerinin incelenmesi açısından başlangıç niteliğindeki iki çalışmada LAB türleri tarafından üretilen reuteran, levan ve dekstranın hamurun reolojik niteliklerini ve sonrasında üretilen ekmeğin kalitesinin iyileştiği gösterilmiştir [22, 41]. Bu çalışmalarda una eklenen 5 g kg^{-1} dekstranın hamurun viskoelastik özelliklerini iyileştirebildiği ve dekstran eklenen hamurlarla üretilen ekmeğin hacminin reuteran ve levan eklenene göre daha fazla olduğu gösterilmiş ve önemli olarak dışarıdan ilave edilen EPS'ye göre *in situ* EPS üretiminin hamurda ve ekmekte oluşturduğu etkinin daha olumlu olduğu tartışılmıştır [22, 41]. LAB türleri tarafından üretilen EPS'nin hidrokolloid olarak hareket edebileceğine daha önce değinilmişti. Hidrokolloidler hamur ortamında nişasta jelatinizasyonunu modifiye edebilirler ve özellikle gluten içermeyen ekmeklerde yağ ve gluten ikamesi olarak davranmaktadırlar [42]. Aynı zamanda ekmeğin ve özellikle gluten içermeyen ürünlerin üretilmesi noktasında hidrokolloidlerin önemi her geçen gün artmaktadır. Dolayısıyla sürozun substrat olarak kullanılması ile üretilen EPS pahalı hidrokolloidlerin yerini alıp onların yerine kullanılabilir [17]. Ekşi hamur ortamında LAB türleri tarafından üretilen EPS'nin ekşi hamur ve ekmeği açısından

yararlı etkileri ve teknolojik katkıları (i) hamurun su tutma ve kaldırma kuvvetinin artması, (ii) hamurun reolojisinin ve işlenebilirliğinin iyileşmesi, (iii) hamurun dondurma ve diğer işlemlere karşı stabilitesinin yükselmesi, (iv) üretilen ekmeğin hacminin ve son olarak (v) ekmeğin bayatlamasının gecikmesi şeklinde sıralanabilir [11]. Ekmek üretimi açısından EPS'in *ex situ* olarak üretimi ve hamur ortamına eklenmesi veya EPS'nin *in situ* olarak fermantasyon sırasında üretilmesi şeklinde iki uygulaması mümkün olmaktadır. *In situ* EPS üretiminin hamur ortamındaki diğer bileşenler ile daha kolay etkileşime girip teknolojik fonksiyonunun artması, katkı maddesi olarak değerlendirilmeyip tüketici beklentileri açısından olumlu etkiler oluşturması ve önemli olarak LAB türleri gelişirken ürettikleri için maliyet açısından ekstra bir yük getirmemesi gibi önemli olumlu etkileri bulunmaktadır [17]. Örneğin Di Cagno vd. [20] yaptıkları çalışmada EPS üreticisi suşlar ile üretilen hamurun viskozitesinin EPS üretmeyen suşlarla üretilen hamura göre yüksek olduğu ve bu hamurlar ile üretilen ekmeklerden EPS içeren ekmeklerin yüksek hacim ve daha az sert bir nitelik kazandıkları gösterilmiştir. Benzer olarak dekstran ile yapılan çalışmalar dekstranın hamur ortamında yüksek miktarda suyu bağlayabildiği ve böylece üretilen son ürünün tazeliğinin arttığı, dekstran ile gluten ağı arasında meydana gelen etkileşim ile oluşan yapının daha fazla gaz tutup hamurun stabilitesini yükselttiği gösterilmiştir [43, 44]. Son dönemde yapılan çalışmalarda sükrozun substrat olarak kullanılması ile üretilen homopolimerik EPS üretiminin ekşi hamur teknolojisi açısından önemini göstermektedir. Örneğin Wolter vd. [45] dekstran üreticisi *W. cibaria* MG1 ile gluten içermeyen unlar ve buğday unu ile ekşi hamur üretmiş ve her bir tahılda üretilen EPS miktarının hamurda meydana gelen metabolik süreçlerden dolayı farklı olduğunu ortaya koymuş ve önemli olarak EPS üretiminin gluten içeren ve içermeyen hamurlarda reolojik karakteristikleri iyileştirdiğini göstermiştir. Di Monaco vd. [46] yaptıkları çalışmada EPS üreticisi suşlar ile üretilen ekşi hamurlar ile yapılan ekmeklerin duyuusal algılarının daha yüksek olduğunu ve bu ekmeklerin daha açık kahverengi kabuk rengine sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu konuda yapılan çalışmaların derlenmesi ile ortaya çıkmış güzel bir çalışma olan Lynch vd. [47]'in yaptıkları çalışmada sükroz kullanılarak üretilen EPS'nin ekşi hamur ortamında oluşturdukları muhtemel etkileri şematize edilmiştir (Şekil 1.1).

Öncelikle LAB suşları tarafından üretilen tek bileşen EPS değil aynı zamanda glukansükraz aktivitesine bağlı olarak hamur ortamındaki alıcı şekerlere sükrozun parçalanması neticesinde açığa çıkan glukozun aktarılması ile üretilen oligosakkaritlerdir (OS). Bu bileşenlerinde ekşi hamur ortamında üretildiği bilinmekte olup bu bileşenlerin ekşi hamurun ve ekmeğinin nitelikleri üzerine etkileri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Şekil 1.1'den de görüleceği üzere EPS'in doğrudan ve dolaylı etkileri bulunmaktadır.



Şekil 1.1 Ekşi hamur ortamında üretilen EPS'nin doğrudan ve üretiminden kaynaklı dolaylı etkilerinin ekmek ve ekşi hamur üzerindeki olası etkileri (Lynch vd. [47]'den alınarak modifiye edilmiştir)

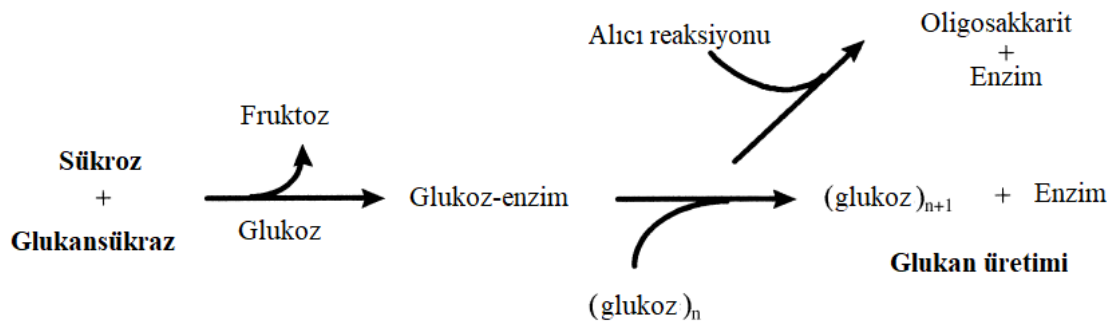
Doğrudan etkilerinden su tutma fonksiyonuna ilave olarak gluten ağı ile oluşturduğu etkileşim sayesinde hamurun ağı yapısı kuvvetlenmekte ve böylece hamurda daha fazla nem tutulmaktadır. Gluten ağı ile kurulan etkileşim sayesinde ekmek oluşurken oluşan CO₂ daha fazla ekmekte tutulabilir böylece ekmek hacminde artış meydana gelebilmektedir. Yine nemin EPS üretimine bağlı olarak daha fazla tutulabilmesi neticesinde ekmeğin bayatlaması gecikmektedir. Ekmekte EPS üretimine bağlı olarak nemin tutulması neticesinde nişasta retrogradasyonu engellenebilmekte ve akabinde ekmeğin bayatlaması ile ilgili mekanizmada gecikmeler ve raf ömrünün uzaması gerçekleşebilmektedir. EPS üretiminin doğrudan değil ancak üretim mekanizması sebebiyle oluşturduğu olumlu etkilerin ilki glukansükraz enzimi ile sukrozun parçalanması neticesinde açığa çıkan glukozun maya tarafından kullanılabilmesi ve mayanın fermantasyon kabiliyetinin iyileşmesidir. Yine sukroz metabolizmasına bağlı olarak oluşan kısmi asidifikasyon hamur ortamındaki enzimlerin (α -amilaz, proteaz) aktivitelerini hızlandırmakta ve neticede meydana gelen denaturasyon ve proteoliz ile gluten ağı kuvvetlenmektedir [47]. EPS'nin ekmeğin raf ömrünü uzatmasının bir diğer sebebi de EPS'nin nem tutma kapasitesinden kaynaklanan nişasta kristalizasyonunun gecikmesidir [48]. LAB suşlarında fark edecek şekilde ileri düzeyde asidifikasyon hamur üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Bu noktada ilginç bir şekilde *Weissella* suşları tarafından düşük miktarda asetat

üretimi ve neticede düşük asidifikasyon ve bu türün suşlarının yüksek dekstran üretim kabiliyeti bu suşlar ile üretilen ekşi hamurlar ile tekno-fonksiyonel nitelikleri çok daha yüksek ekşi hamur ve ekmeklerinin üretimini mümkün kılmaktadır [47]. Yukarıda ekşi hamurda EPS üretimine bağlı olarak farklı gluko-oligosakkaritlerin üretilbildiği hususu belirtilmişti. Bu bileşenlerin ekşi hamurdaki etkilerinin yanısıra mayalar tarafından da parçalanamaması sebebiyle ekmek ile birlikte alındığında prebiyotik etkilerinin oluşabileceği de önerilmektedir [47]. Son dönemde temelinde çölyak hastalığından kaynaklı ve medyada çıkan gluten alerjisi, çocuklarda dikkat dağınıklığı gibi sorunlara sebebiyet verebileceğine dair haberler ve önemli olarak bu konuda yapılan bilimsel çalışmalar gluten içermeyen 'gluten-free' (GF) ürünlere olan ilgiyi ve tüketicilerin raflarda bu ürünleri bulma isteğini arttırmıştır. Bu noktada son dönemde yine ekşi hamur teknolojisinin ve özellikle LAB türlerinin ürettikleri EPS'nin GF ürünlerdeki pozitif etkileri önemli sayıda çalışmaya konu olmuş ve olmaktadır. Örneğin bu konuda Rühmkorf vd. [49]'nin yaptıkları çalışmada EPS üretimi ile GF hamurda su tutma kabiliyeti önemli oranda yükselmiş, üretilen ekmeğin ise iç kısmının yumuşaklığı artmış, bayatlama oranı azalmış ve ekmeğin hacmi artmıştır. Benzer sonuçlar Wolter vd. [45] tarafından da bulunmuştur. Sonuç olarak buğday bazlı ekşi hamurun ve önemli olarak GF ekşi hamurun teknolojik fonksiyonlarının iyileştirilmesi ve üretilen ekmeklerin niteliklerinin geliştirilmesi açısından EPS üretiminin önemli etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler temel olarak ekşi hamur ortamında homopolimerik EPS üretimi ile ilişkilendirilmektedir. Yukarıdaki örneklerin ardından bu etkiler özetlenecek olursa; 1) Homopolimerik EPS üretimi ticari hidrokolloidler ve gamlara benzer özellik gösterebilmekte ve bunların yerini alıp *in situ* üretililerek maliyeti azaltabilmekte ve önemli olarak herhangi bir katkı maddesi olarak değerlendirilebilecek bileşenin ekmek ortamında bulunmasının önüne geçebilmektedir, 2) EPS üreten LAB türleri ile üretilen ekşi hamurlar ile üretilen ekmeklerin tekno-fonksiyonel nitelikleri iyileşebilmektedir, 3) EPS üretimi neticesinde ekşi hamurdan dolayı meydana gelen asidifikasyonun olumsuz etkileri engellenebilmektedir, 4) EPS üretimi ile hamurun visko-elastik özellikleri ve işlenebilirliği iyileşmektedir, ve 5) EPS üretimi üretilen ekmeğin hacmini artırmakta, raf ömrünü artırarak bayatlamayı geciktirmekte ve ekmeğin tekstürel niteliklerini iyileştirebilmektedir. Bu bağlamda ekşi hamur ortamından daha fazla EPS üreticisi suşların izole edilmesi ve bu suşlar ile üretilen farklı EPS'lerin ekşi hamur ve ekmeği üzerindeki etkilerinin açığa çıkarılabilmesi son derece önemli bir husustur.

1.1.4 LAB Türleri Tarafından Homopolimerik EPS Üretimi

Ekşi hamur orijinli LAB türleri temel olarak homopolimerik EPS üretimi gerçekleştirebilmekte olup tez kapsamında da homopolimerik EPS üretimi

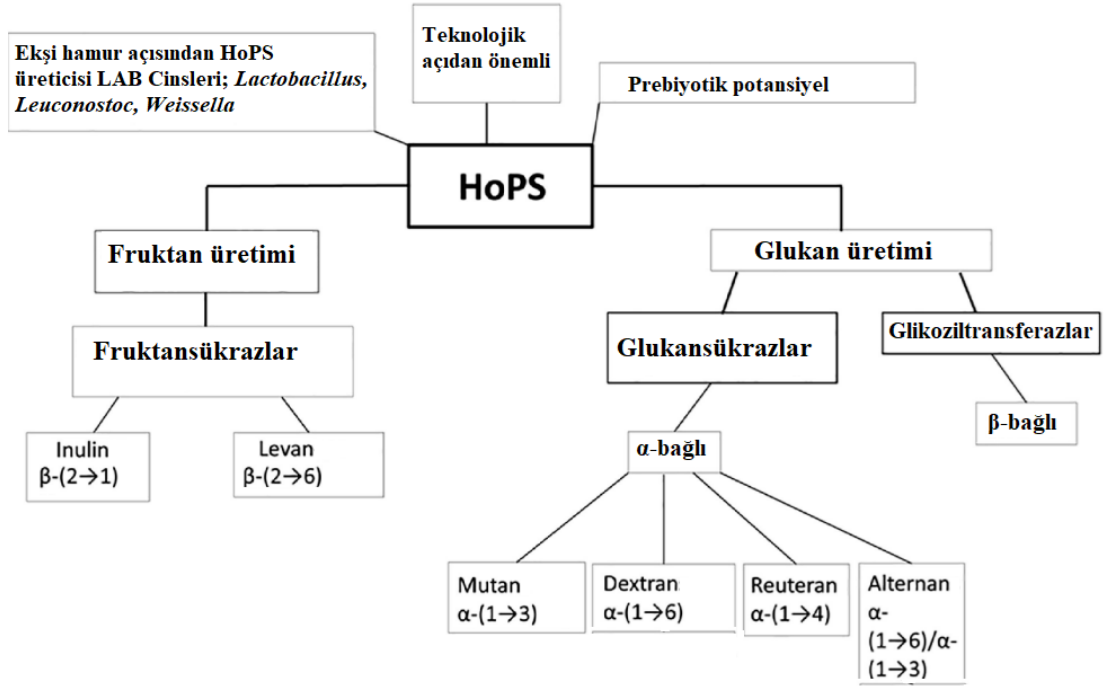
noktasından yola çıkıldığı için heteropolimerik EPS üretimine değinilmemiştir. Benzer olarak LAB türleri tarafından sitoplazmada bulunan UDP-glukoz'u kullanıp homopolimerik glukan üretimi gerçekleştirebilen glikoziltransferazlar homopolimerik EPS üretimi açısından tartışılmamıştır. Tez çerçevesinde genel olarak homopolimerik EPS üretiminden sorumlu olan glukansükrazlar ve fruktansükrazların sukrozu substrat olarak kullanarak ürettikleri glukan ve fruktan yapılarından, glukansükrazların çalışma prensipleri ve enzimatik yapılarından bahsedilmiştir. Homopolimerik EPS (HoPS) üretimi ekstraselüler olarak üretilip sukrozu substrat donör olarak kullanan glikozidik hidrolaz (GH) ailesinin üyesi olan glukansükraz/fruktansükraz enzimleri marifetiyle gerçekleştirilmektedir [50]. Şekil 1.2'de glukansükrazların sukrozu kullanarak glukan üretimi ve alıcı reaksiyonları ile oligosakkarit üretimi gösterilmektedir. Buna göre ilk olarak glukansükraz sukrozu parçalar ve bu esnada glikozidik bağın parçalanması ile açığa çıkan enerjiyi sonrasında ilgili glukoz ünitesini gelişen glukoz zincirine bağlamak amacıyla kullanır. Sukroz bu reaksiyon için tek doğal substrattır ve muhtemelen sukroz enzimin aktif katalitik bölgesinin yapısında bir değişim meydana getirerek bu reaksiyon için substrat olarak davranabilmektedir [51]. Normal koşullarda glikoziltransferazlarda olduğu gibi nükleotit-aktive edilmiş şekerler reaksiyon için gerekli olmayıp yukarıda da ifade edildiği gibi glukan zincirinin oluşması için gerekli enerji sukrozun parçalanması ile açığa çıkan enerjiden kaynaklanmaktadır [52]. Şekil 1.2'deki diğer reaksiyonda da glukansükraz sukrozun parçalanması ile açığa çıkan glukoz ünitelerini ortamda bulunan diğer alıcı şekerlere aktarabilmekte ve neticede oligosakkaritler üretilebilmektedir.



Şekil 1.2 Glukansükrazların sukrozu substrat olarak kullanması ile glukan ve oligosakkarit üretimi [52]

LAB türleri tarafından üretilen homopolimerik EPS, bağ tipi ve bağın oluşumunda yer alan C atomunun pozisyonuna bağlı olarak; α -D-glukanlar (dekstran, mutan, reuteran ve alternan) ve β -D-glukanlar (nadir olarak bulunurlar) ve fruktoz içerenlerde fruktanlar (levan ve inülin) olarak sınıflandırılmaktadırlar [53]. Son olarak nadirde olsa sadece galaktoz birimlerinden oluşan galaktan EPS'te LAB türleri tarafından üretilebilmektedir [51]. Şekil 1.3 ekşi hamur teknolojisi açısından önemli

homopolimerik EPS'lerin sınıflandırılmasını göstermektedir.



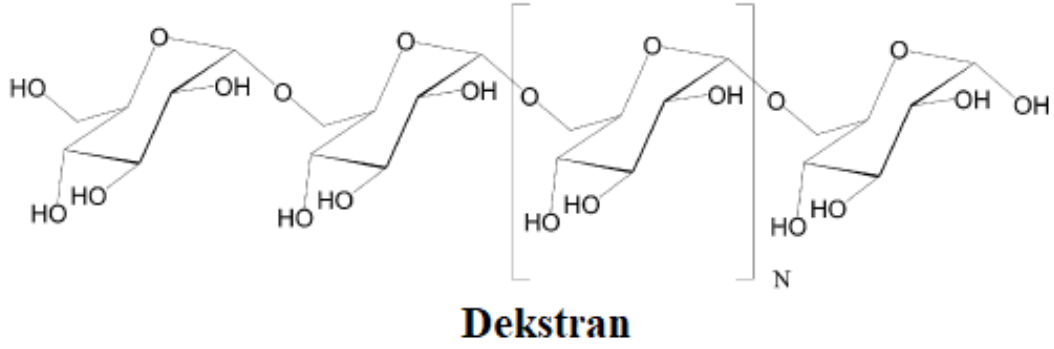
Şekil 1.3 Ekşi hamur teknolojisi ile ilgili LAB türleri tarafından üretilen EPS'nin kimyasal olarak sınıflandırılması, üreticiler ve muhtemel fonksiyonları (Lynch vd. [47]'den alınarak modifiye edilmiştir)

Ekşi hamur teknolojisi açısından önemli homopolimerik EPS fruktanlar ve glukanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Fruktanlar fruktozların β -(2-1) glikozidik bağı ile bağlanması ile oluşan inülin ve fruktozların β -(2-6) glikozidik bağı ile bağlanması ile oluşan levan olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar ve ekşi hamur teknolojisi ile ilgili LAB türleri tarafından üretilmektedirler [36]. Bununla birlikte fruktanların da ekşi hamur teknolojisi açısından özellikle ülkemiz bazlı çalışmalarda üzerinde daha fazla durulması gereken bir konu olduğu not edilmelidir. Şekil 1.3'ten de görüleceği üzere glukansükraz aktivitesine bağlı olarak üretilen glukanlar yapısal olarak dekstran, mutan, reuteran ve alternan olarak dört sınıfa ayrılmaktadır.

Dekstran

LAB türlerinin ürettiği en bilinen homopolimerik EPS'lerin başında dekstran gelmektedir. Dekstran terimi temel iskelet zinciri α -1-6 glikozidik bağı içeren geniş bir α -glukan grubuna verilen addır (Şekil 1.4). Dekstran yapıları bu temel iskelete ilave olarak α -1-2, α -1-3, ve α -1-4 glikozidik bağları ile dallanma yapabilirler [54].

Dekstran üreticisi enzimlere dekstransükraz adı verilmekte olup ilk dekstran üretimi bilindiği üzere *Leuconostoc* suşlarında gösterilmiş sonrasında ise *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Weissella* suşlarında dekstran üretebildikleri gösterilmiştir [53].



Şekil 1.4 Dekstranın temel yapısal görünümü; α -1-6 zincirinin yanısıra α -1-2, α -1-3, ve α -1-4 bağları ile dallanma da yapabilmektedir [50]

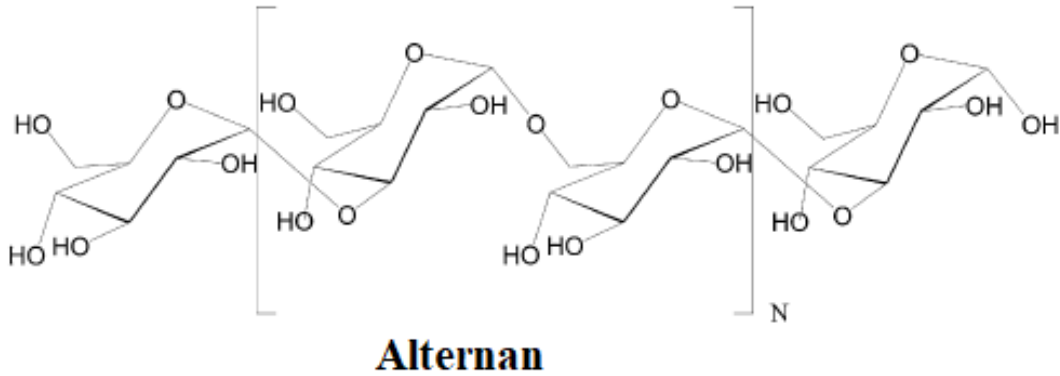
LAB türleri tarafından üretilen birçok dektransükraz temel α -1-6 zincirine az miktarda α -1-3 bağı içeren birimlerin eklenmesi ile karakterize edilen dekstran üretiminden sorumludurlar [53] (Şekil 1.4).

Dekstran bilindiği üzere ticari olarak birçok noktada kullanılmakta olup bu dekstranın üretiminden *Leuc. mesenteroides* NRR B-512B DSR suşu sorumlu olup bu suşun ürettiği dektransükraz sükrozu %95 oranında α -1-6 ve %5 oranında α -1-3 bağı içeren dekstran üretiminden sorumlu olup, üretilen bu dekstran tıp sektörü başta olmak üzere eczacılık, gıda ve biyoteknolojik amaçlar için kullanılmaktadır [51]. Dekstran üretimi, üretim miktarı, dallanma oranı gibi faktörler LAB türünün gelişme koşulları tarafından etkilenebilmektedir. Örneğin Kim vd. [55] yaptıkları çalışmada pH, sükroz konsantrasyonu, gelişme sıcaklığı gibi faktörlere bağlı olarak *Leuc. mesenteroides* B-512FMCM suşu tarafından üretilen dekstranın boyutu ve dallanma oranının değişebildiğini göstermişlerdir. Muhtemelen farklı koşullarda üretilen dekstranın yapısal değişimi dektransükraz enziminde bu faktörlere bağlı olarak meydana gelen konformasyonel değişim ile açıklanabilir. Benzer olarak farklı LAB türlerinin ürettikleri dekstranın yapısal nitelikleri de beklendiği şekilde farklı olabilmektedir. Örneğin genel olarak Laktobasillerin ürettikleri dekstran düz zincirli olurken *L. reuteri* 180'nin dallanmış yapıda dekstran üretebildiği gösterilmiştir [56]. LAB tarafından bu yoğunlukta üretilebilen dekstran 1950'lerden başlamak üzere gıda teknolojisinde kalınlaştırıcı ajan olarak kullanılmakta olup GRAS statüsünü kazanması gıda teknolojisi açısından önemini katbekat artırmıştır. Avrupa Birliği (AB) normlarına göre de dekstran özgün bir gıda katkı maddesi olarak görülmekte olup özellikle %5'e kadar fırın ürünlerinde kullanılmasının ürünlerin yumuşaklığı, kabuk tesktürü ve hacimlerinde artışa sebep olduğu vurgulanmaktadır [57]. Son olarak ekşi hamur teknolojisi açısından dekstran üreticisi ve dekstran üretiminin yeri ayrıdır. Örneğin Katina vd. [38] yaptıkları çalışmada ekşi hamur izolatu *Weissella confusa* suşunun dekstran üretebildiğini ve bu üretimin 11-16 g kg⁻¹'e kadar çıktığını göstermişler ve

ekşi hamur ve ekmeğinin nitelikleri açısından dekstran üretiminin önemi bu çalışmada vurgulanmıştır. Ekşi hamur izolatları arasında dekstran üretiminin yaygınlığı ve ekşi hamur ve ekmeği açısından öneminin gösterildiği benzer çalışmalarda mevcuttur [36, 58]. Son dönemde dekstran üreticisi suşlarla yapılan çalışmaların evrildiği diğer bir noktada dekstran üreticisi suşun bulunması, dekstran üretiminden sorumlu genin ekspresyonu ve *in vitro* koşullarda başta dekstran olmak üzere fonksiyonel oligosakkaritlerin üretilmesidir [59]. Sonuç olarak dekstran ekşi hamur izolatları dahil olmak üzere LAB türleri tarafından sükrozdan üretilen temel homopolimerik EPS'dir ve bu bileşenin öneminin daha net anlaşılabilmesi adına daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Alternan

LAB türleri tarafından üretilen bir diğer homopolimerik EPS alternandır. Alternan dallanmış bir glukoz olup yapısal olarak α -1-6 ve α -1-3 glikozidik bağlarının değişmesi ile ana zinciri oluşmaktadır (Şekil 1.5) ve bu bağ değişimi sebebiyle alternan olarak tanımlanmaktadır [60, 61]. Bu yapısal niteliği alternana ilginç özellikler kazandırmakta ve bu özellikleri de alternanı ticari dekstrandan ayırmaktadır [51].

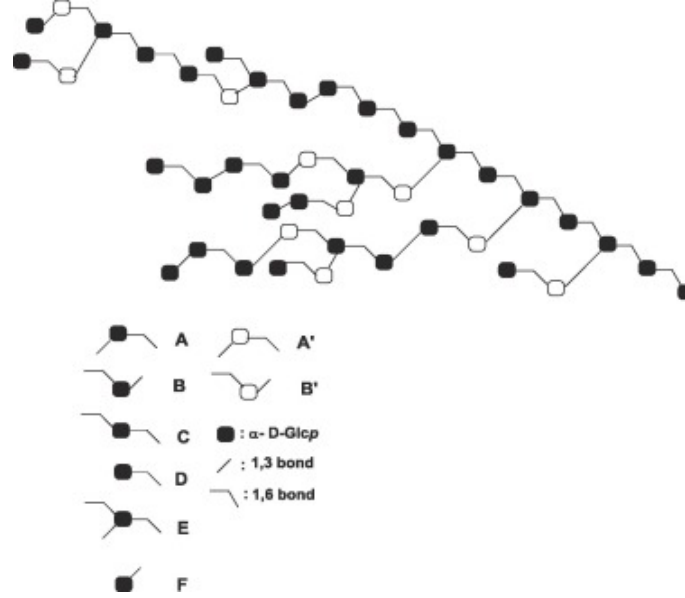


Şekil 1.5 Alternanın temel yapısal görünümü; Glukoz ünitelerinin α -1-6 ve α -1-3 bağlarının değişerek bağlanması ile alternan oluşmaktadır [50]

Örneğin alternanın çözünürlüğü daha yüksek ve viskozitesi daha düşüktür ve önemli olarak mikrobiyal ve enzimatik hidrolize çok daha dirençli olup bu özelliği potansiyel olarak prebiyotik niteliğini arttırmaktadır [62, 63]. Alternan üretimi LAB türleri açısından nadir bir husus olup şimdiye kadar *Leuc. mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501, NRRL B-1498 ve *Leuc. citreum* NRRL B-1355 ve E16'nın alternan ürettiği *L. brevis* E25'in ise benzer yapıda ancak alternana göre daha dallı bir α -glukoz ürettiği gösterilmiştir (Şekil 1.6) [36, 54, 61, 64].

Alternanın ilginç yapısal özellikleri ve önemli olarak potansiyel prebiyotik rolü LAB türleri tarafından üretilen bu nadir homopolimerik EPS'nin önemini arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında ise alternan üreticisi olduğu tespit edilmiş olan *L. reuteri* E81 suşundan alternan üretiminden sorumlu alternansükraz/glukansükraz enzimini eksprese ederek *in vitro* koşullarda α -glukan ve oligosakkaritlerin üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

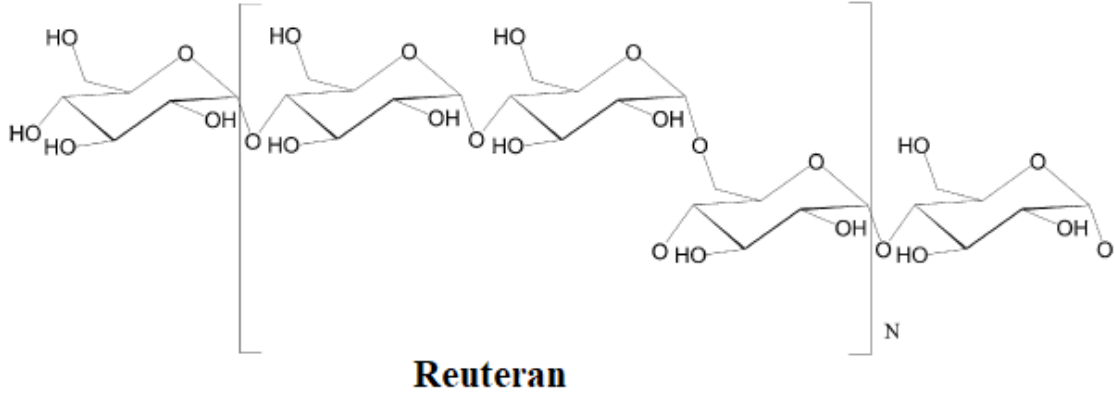


Şekil 1.6 *L. brevis* E25 tarafından üretilen α -glukan'ın yapısal karakterizasyonu [64]

Reuteran

LAB türleri tarafından üretilen bir diğer homopolimerik EPS'te reuterandır. Yapısal olarak reuteran düz α -1-4 ünitelerinin α -1-6 köprüleri ile birbirine bağlanması ile oluşan suda çözünebilir bir α -glukandır (Şekil 1.7) [53]. Özel olarak şimdiye kadar sadece *Lactobacillus reuteri* suşları tarafından üretildiği için bu ad verilmiştir. Şimdiye kadar sadece üç *Lactobacillus reuteri* suşu; LB121, 35-5 ve ATCC 55730'un reuteran ürettiği bulunmuş olup reuteran üretiminden sorumlu reuteransükraz enzimi de karakterize edilmiştir [56, 65].

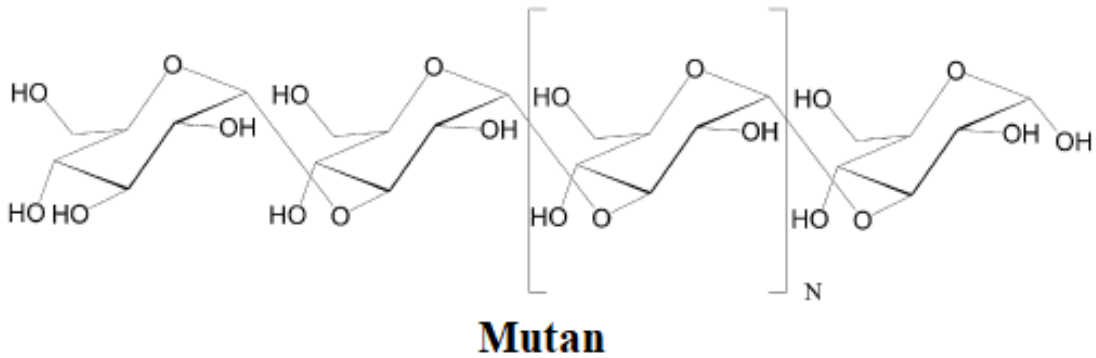
Genel itibariyle reuterandaki α -1-4 ünitelerinin oranı α -1-6 ünitelerine göre fazla olmakla birlikte farklı reuteranlarda bu orada değişim meydana gelebilmektedir ve reuteran önemli olarak sağlık açısından diyet lifi gibi davranıp yararlı bir polimer olarak dikkat çekmektedir [53]. Reuteran gıda teknolojisi açısından da hem süt ürünleri hem de fırın ürünlerinin yapısal niteliklerini iyileştirebilen bir ajan olarak dikkat çekmektedir [24, 66]. Son olarak sadece *L. reuteri* suşları reuteran üretse de *L. reuteri* tarafından üretilen tek α -glukan reuteran değildir ve farklı yapıda glukanlar bu türün suşları tarafından üretilmektedir.



Şekil 1.7 Reuteranın temel yapısal görünümü; Glukoz ünitelerinin α -1-4 bağlanmasına ilave olarak α -1-6 köprüleri ile bu üniteler birbirine bağlanarak reuteran oluşmaktadır [50]

Mutan

LAB türleri tarafından glukansükraz aktivitesine bağlı olarak üretilen son homopolimerik EPS'de mutandır. Mutan yapısal olarak çok büyük oranda α -1-3 glikozidik bağından oluşan düz iskelete sahip ve düşük oranda α -1-6 bağları içeren suda çözünmeyen bir α -glukandır (Şekil 1.8) [53]. Mutan üretiminden mutansükraz enzimi sorumlu olup bu polimerin temel üreticisi oral mikrofloranın üyesi olan *Streptococcus mutans*'tır ve bu tür tarafından ağızda üretilen mutan bu türün ağız ortamında tutunma ve kolonizasyonuna katkı sağlamaktadır [51]. Ek olarak bazı *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* suşlarının da mutan üretebildikleri gösterilmiştir [67, 68].



Şekil 1.8 Mutanın temel yapısal görünümü; Glukoz ünitelerinin çok yüksek oranda α -1-3 bağlanmasına ilave olarak az da olsa α -1-6 bağları içermektedir [50]

Mutan ucuz olması ve farklı bileşenler ile etkileşim düzeyi sebebiyle endüstriyel öneme sahip bir homopolimerik EPS olarak da dikkat çekmektedir ve çeşitli liflerin, filmlerin ve dolgu materyallerinin üretilmesinde kullanılabilmektedir [53]. Gıda uygulamalarındaki rolü üzerinde yeterli çalışma bulunmayan mutan daha çok yeni

malzemelerin üretiminde kullanılabilir.

Yukarıda da ifade edildiği gibi LAB türleri fruktansükraz aktivitelere bağlı olarak sükrozun parçalanması neticesinde açığa çıkan fruktoz ünitelerinin β -2-1 glikozidik bağı ile bağlanması ile inülin, β -2-6 bağı ile bağlanması ile de levan olmak üzere iki tip fruktan üretmektedir. Yapmış olduğumuz tez çalışması glukansükrazlar ile ilgili olduğu için glukansükraz aktivitesine bağlı olarak üretilen glukanlar üzerinde durulmuş ve fruktanlar daha fazla tartışılmamıştır. LAB türlerinin yapısal olarak farklı α -glukan üretme kabiliyetleri etki mekanizmaları aynı olsada glukansükrazların yapılarındaki farklılığa bağlı olarak meydana gelmektedir.

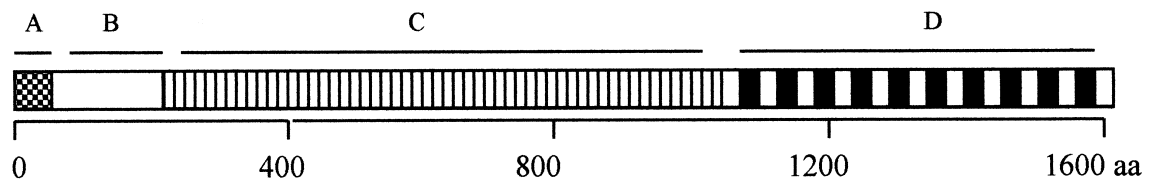
1.1.5 Homopolimerik EPS Üretiminde Genetik Mekanizması

LAB türleri yukarıda da ifade edildiği gibi glukansükraz aktivitelere bağlı olarak sükrozun substrat olarak kullanılması ile α -glukanları üretmektedir. Glukansükrazlar ile ilgili yapılan değerlendirmelerde genel olarak direkt glukansükrazların karakterizasyonu işlemine geçilmektedir. Bununla birlikte genetik seviyede bu enzimleri kodlayan bölge hakkında da bilgi verilmesi önem arz etmektedir. Bu kapsamda glukansükrazların yapısal karakterizasyonuna geçmeden bu enzimlerin kodlanması ile ilgili kısa bir bilgi verilmiştir. LAB türleri tarafından kodlanan glukansükrazlar genel olarak *gtfA* geni olarak adlandırılmaktadırlar. Glukansükrazları kodlayan *gtfA* genleri yaklaşık olarak 5300 baz çifti uzunluğunda olup oldukça büyük sayılabilecek bir boyuttadırlar ve önemli olarak kromozomal kodlanmaktadır [69]. Heteropolimerik EPS üretiminde rol alan glikoziltransferazların boyutlarının 1500 baz çifti uzunluğunda olduğu düşünülürse bu boyutun ne kadar fazla olduğu daha net anlaşılabilir [7]. LAB türlerinde kodlanan glukansükrazların genetik olarak ortaya çıkarılması çalışmaları 2000’li yılların başlarına hatta biraz daha geriye gitmektedir. Önceleri farklı LAB türlerinde *gtfA* genleri dejenere primerler ile tespit edilip ardından i-PZR gibi metotlar ile bütün genin açığa çıkarılması ve sonrasında farklı bir konakta üretilmesi işlemleri gerçekleştirilirken [69] günümüzde ise sekanslama teknolojisindeki ilerlemelere paralel olarak bütün genom sekans analizleri gerçekleştirilerek ilgili genlerin varlığı ortaya konabilmektedir. Genetik olarak *gtfA* genleri indüklenerek veya sürekli olarak üretilmektedirler. Örneğin Kim ve Robyt [70] yaptıkları çalışmada *Leuconostoc mesenteroides*’te glukansükraz üretiminin sükroz varlığına bağlı olarak gerçekleştiğini göstermişler ve sürekli olarak bu genin transkribe olup proteine dönüşmesi için mutasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda ise özellikle *Lactobacillus* türlerinde *gtfA* geninin ifadesinin sürekli olduğu gösterilmiştir [71]. Homopolimerik EPS üretiminden sorumlu *gtfA* geni glukansükrazların karakterizasyonu başlığı altında

değinildiği üzere 4 kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar 1) N-terminal sinyal bölgesi, 2) değişken bölge, 3) katalitik kısım ve 4) C-terminal bölgesidir. Günümüzde *gtfA* geni ile yapılan çalışmalar bu genin tamamının veya çoğunlukla katalitik bölgesinin ekspresyon plazmidlerine aktarılması ve takiben *gtfA* veya *gtfA*-N şeklinde bu genin eksprese edilip glukansükraz geninin üretilmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu konuda önemli seviyede çalışma gerçekleştirilmiş olsada halen özgün *gtfA* genlerinin farklı LAB türlerinde kodlanabileceği öngörülmektedir. Benzer olarak son dönemde var olan genlerin katalitik bölgesindeki amino asitlerde yapılan değişikliklerle farklı yapılar da glukan üretiminin gerçekleştirilebilmesine dönük çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir [72]. Sonuç olarak genetik seviyede gerçekleştirilecek çalışmalar ile bu genlerin fonksiyonları daha net anlaşılabilir ve hem üretici LAB türü açısından hem de gıda teknolojisi açısından önemlerinin anlaşılabilmesi sağlanabilecektir.

1.1.6 Glukansükrazların Yapısal Karakterizasyonu ve Reaksiyon Mekanizmaları

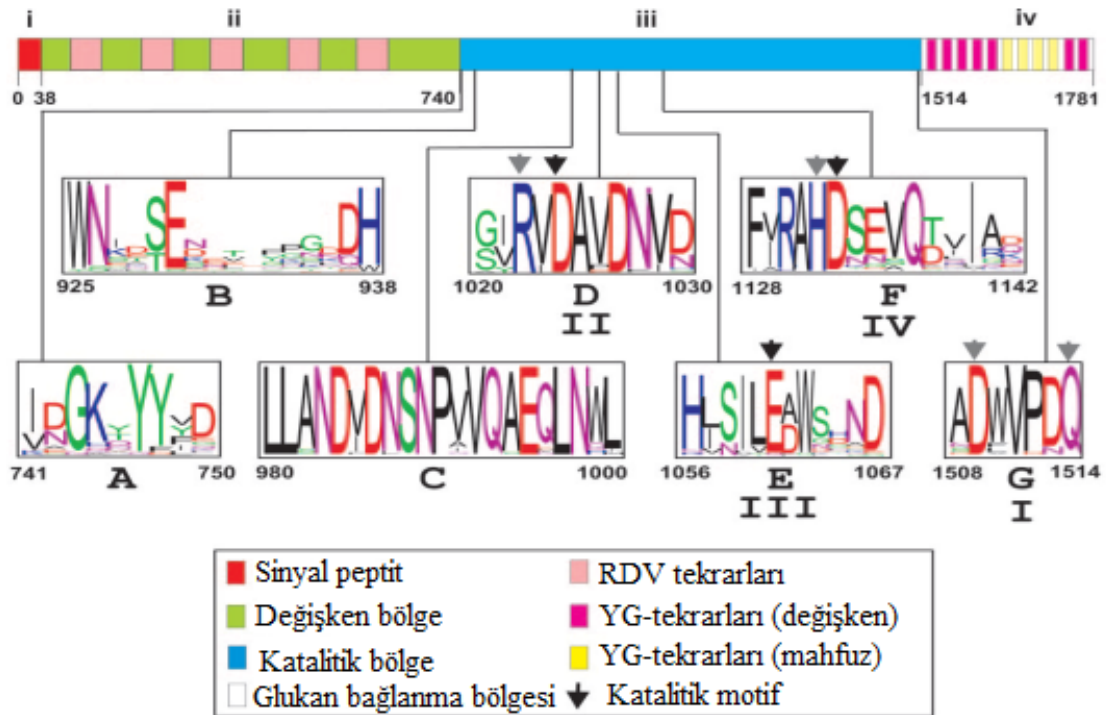
Glukansükrazların fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için yapısal karakterizasyonlarının ve fonksiyonel organizasyonlarının ortaya konması gerekmektedir. Bu bağlamda yaklaşık olarak 60 yıldır süregelen çalışmalar ile glukansükrazların yapısal karakterizasyonu anlamında belirli mesafeler alınabilmektedir. Farklı glukansükrazların karşılaştırılması ve analizi glukansükrazların birbiriyle yakından ilişkili olduklarını ve ortak bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 1.9). Bu yapı glukansükrazlar için temel fonksiyonel yapı olup bu dört fonksiyonel grubun boyutu glukansükrazlar arasında değişebilmektedir [52, 73]. Glukansükrazlar yapısal olarak 1) Bir adet sinyal peptit, 2) N-terminal farklı boyutlarda olabilen yüksek oranda değişken amino asitlerden oluşan kısım, 3) Yaklaşık 1000 amino asitten oluşan glukansükrazlar arasında yüksek oranda benzerlik gösterebilen katalitik ve/veya sükroz bağlanma bölgesi, 4) Glukan bağlanmada rol aldığı düşünülen ardarda dizilmiş tekrarlardan oluşan C-terminal bölgesinden oluşmaktadır [73].



Şekil 1.9 Glukansükrazların temel yapısal organizasyonu; A; Sinyal peptit, B; N-terminal değişken bölge, C; N-terminal katalitik bölge, D; C-terminal glukan bağlanma bölgesi [52]

Glukansükrazların yapısal olarak en önemli kısmı hiç şüphesiz birden fazla glikozidik bağı ürettikleri glukan oluşturma kabiliyetlerinden sorumlu katalitik bölgeleridir.

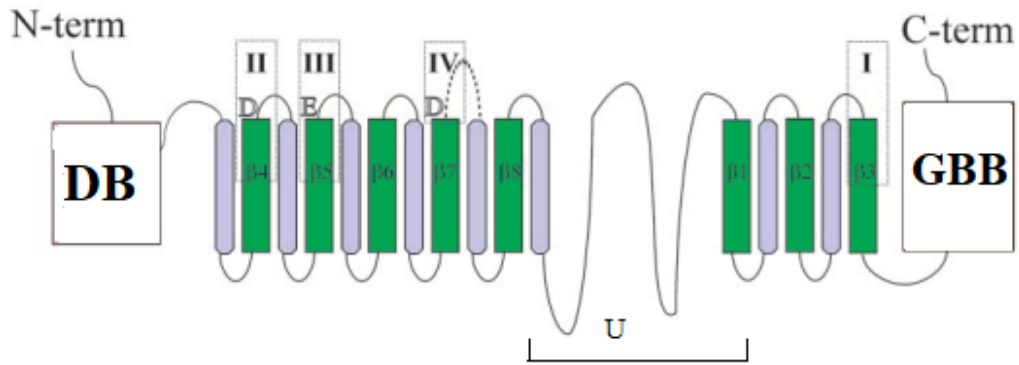
Yukarıda da ifade edildiği gibi glukansükrazların katalitik bölgelerindeki farklılıklara bağlı olarak farklı yapılarda glukana üretme kabiliyetindedirler. Glukansükrazlar bilindiği üzere hücre dışı enzimlerdir ve glukansükrazların ilk bölgesi proteinin hücre dışına salgılanması için işlev gören ve yaklaşık olarak 36-40 amino asitten oluşan sinyal peptididir. Bu kısım ile birlikte glukansükrazların yapısal olarak ikinci bölgesi yani N-terminal değişken bölge 200 ila 700 amino asit arasında bir uzunluğa sahip olabilmektedir. Bu değişken bölgede farklı LAB suşlarında yer alan glukansükrazlar için farklı tekrarlanan ünitelerin yer aldığı gösterilmiştir (Şekil 1.10) [69, 74, 75]. N-terminal değişken bölgenin ne işe yaradığı henüz net olarak anlaşılamamış olup özellikle LAB türleri ile yapılan çalışmalarda bu bölgeyi içermeyen glukansükrazın glukana üretiminde önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir [65, 76]. Bununla birlikte bu kısmın fonksiyonunun anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 1.10 LAB türlerinde yer alan glukansükrazların yapısının detaylı karakterizasyonu (Hijum vd. [73] 'den türetilmiştir)

Bu yapıda temel olarak 4 bölge gösterilmektedir: Sinyal peptit, değişken bölge, katalitik bölge ve glukana bağlanma bölgesi. Bu temel bölgelerin dışında GS'ler GH13'te olduğu gibi 7 mahfuz motifi de içermektedir (A-G). Bu 7 mahfuz bölgeden 4'ü (I-IV) ilk olarak GH13 grubunda yer aldığı gösterilmiş sonrasında da GS'lerde yer aldığı ortaya konmuştur. Resimde oklarla belirtilen kısımlar katalitik açıdan önemli korunmuş amino asitleri koyu okla belirtilen kısımlar ise daha önceki çalışmalarda rolü gösterilen ve glukana üretiminde katalitik açıdan rol alan amino asitleri göstermektedir [73].

Glukansükrazların katalitik bölgesi ile ilgili detaylı yapısal karakterizasyonu henüz elde edilememiştir. Bunun sebebi bu proteinlerin çok büyük enzimler olmalarından kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte CD analizleri ile katalitik bölgesinin yapısı ile ilgili tahmin çalışmaları yürütülmüş ve GH70 üyesi glukansükrazların Şekil 1.11’de gösterildiği gibi $(\beta/\alpha)_8$ silindirik yapıya sahip olduğu gösterilmiştir [52] ve bu yapı amilaz, amilosükraz ve siklodekstrin glukano transferazlardan oluşan GH13’lerin yapısı ile bu açıdan benzerlik göstermektedir [77]. Aynı şekilde GH13’te yer alan korunmuş bölgelerde yer alan amino asitler (I’den IV’e) glukansükrazlarda da yer almaktadır ancak silindirik yapıların yerleri GH13 ve GH70 üyesi enzimlerde farklılık arz etmektedir. Örneğin motif I GS’lerde C terminal bölgede glukon bağlanma kısmında yer almaktadır [73]. GH13 grubu enzimler ile olan benzerlikleri ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması sebebiyle bu enzimler ile yapılan karşılaştırmalar ile GH70 grubu yani glukansükrazların katalitik bölgesinde yer alan amino asitlerin fonksiyonlarına dair çıkarımlar yapılmış ve bu fonksiyonları açığa çıkarmak adına çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 1.11 Glukansükrazların topolojik diyagramı (Hijum vd. [73]’den türetilmiştir)

N terminal bölgedeki değişken kısma öncelikle α -heliks bağlanmış ve silindirik yapı β -plakası ile sonlanmaktadır. U ile gösterilen kısmın fonksiyonu henüz anlaşılamamıştır. 4 mahfuz bölge GH13’te yer aldığı gibi GS’lerde de yer almaktadır. (DB: Değişken bölge, GBB: Glukan bağlanma bölgesi).

GH13 enzimleri üzerine yapılan çalışmalar GH70 GS’lerin yapısının belirlenmesi noktasında önemli etkiler oluşturmıştır. Ek olarak GS’lere ait ilk kristal yapı *L. reuteri* 180’nin kodladığı ve N-terminal kısmı içermeyen yani sadece katalitik bölge ve glukon bağlanma bölgesi içeren versiyonunun kristal yapısı açığa çıkartılmıştır (Vujičić-Žagar et al., 2010). Bu kristal yapıdan GH70’in GH13 grubundan farklı olarak katalitik bölgesinde iki adet motifin yer aldığı ortaya çıkartılmıştır (Vujičić-Žagar et al., 2010). Daha sonra ortaya çıkartılan bu amino asit motiflerinin üretilen polimerin zincir uzunluğunun belirlenmesinde rol alabildiği gösterilmiş ve bunuda

uzayan polimeri enzimin aktif bölgesinden uzaklaştırarak bu bölgenin faaliyetlerine devam etmesini sağlayarak gerçekleştirebildiği ortaya atılmıştır [78]. GTF180-N'nin üç boyutlu yapısının ortaya konması ile substrat sükröz ve alıcı maltoz ile kurabileceği kompleks yapı irdelenmiş ve α - bağının yer değiştirme mekanizmasının GH13 grubu enzimler ile benzer mekanizmayı kullandıkları ortaya konmuştur. Bu hipoteze göre enzimin katalitik bölgesinin -1 ve +1 alt kısımlarında ilk olarak sükrözün α -1,2 bağı parçalanır ve -1 alt kısmında α -glikozil-enzim kompleksi meydana gelir. Takiben kovalent olarak bağlanan glukoz ünitesi gelişen glukan zincirinin indirgen olmayan ucundaki şekere bağlanır ve yeni bir α - glikozidik bağ oluşturur (transglikolizasyon veya polimerizasyon reaksiyonu). Alternatif olarak glikoz molekülü daha düşük molekül ağırlıklı maltoz gibi bir alıcı şekere (alıcı reaksiyonu) veya bir su molekülüne aktarılır (hidroliz reaksiyonu) [53]. Bu konuda yapılan çalışmaların sayısı arttıkça ve özellikle GS'lerin kristal yapıları ile ilgili bilgi düzeyi arttıkça bu enzimler ile ilgili gerçekleştirilebilecek işlemlerin sayısı ve fonksiyonel bileşenlerin üretiminde kullanım olanaklarının çerçevesi genişleyecektir. Özellikle son dönemde glikolizasyonun tıp ve eczacılıktaki öneminin artmasına paralel olarak bu enzimlerin karakterizasyonunun önemi her geçen gün artmaktadır. Katalitik bölgenin konformasyonu üretilen polimerin yapısal niteliğini belirlemede rol almaktadır. Benzer olarak Gangoiti vd. [53] üretilen alıcı ürünündeki bağında alıcı şekerin örneğin maltozun enzime bağlanma oryantasyonuna bağlı olarak belirlendiğini belirtmişlerdir. Meng vd. [79] ve Meng vd. [80] yaptıkları çalışmada alıcının enzime bağlandığı noktanın alt +1 ve +2 kısımlarındaki amino asit motiflerinin özel fizikokimyasal doğasının oluşan ürünün glikozidik bağını belirlediğini göstermişlerdir. Bu çalışmaları önemli kılan diğer bir yönde bu katalitik bölgede yer alan amino asitlerde gerçekleştirilen sınırlı değişikliklerin bile üretilen ürünün niteliklerini değiştirebildiğini ortaya koymasındır. Bu konuda benzer çalışmalarda yapılmış ve yapılmakta olup yapılan değişiklikler ile glukan yapısında yer alan glikozidik bağların oranlarının değiştiği gösterilmiştir [72, 81–85]. Katalitik bölgenin +1 alt kısmında yer alan ve dallanmadan sorumlu amino asitlerin değiştirilmesi ile üretilen glukanın dallanma oranının azaldığı [79, 80] ve bununla birlikte α 4 bölgesine yakın +2 alt kısmında yapılan mutasyonlarda ise dallanma oranının önemli miktarda arttığı gösterilmiştir [86]. Benzer olarak GS'lerde gerçekleştirilen mutasyon ile üretilen glukanın molekül ağırlığının arttığı veya azaldığıda gösterilmiştir [80, 87]. Ek olarak GS'lerde meydana getirilen mutasyonlar ile üretilen glukan-oligosakkarit oranının da değiştiği ve enzimin daha fazla oligosakkarit üretimini gerçekleştirebildiğide gösterilmiştir [80, 82, 86]. Aynı şekilde GS'lerde yapılan mutasyonlar ile üretilen glukan polimerlerinin suda çözünürlüklerinin de değiştiği [88] ve enzimin toplam aktivitesini değiştirdiği ve hatta tamamen durdurduğu da gösterilmiştir [89]. GS'lerin katalitik bölgesinde meydana gelen hadiselerin karakterizasyonu açısından son dönemde elde edilen yapısal derinlik

bu enzimlerin fonksiyonlarının daha net anlaşılabilmesi, bu enzimler ile üretilebilecek poli-oligosakkaritlerin sayısının ve niteliklerinin artırılması ve önemli olarak farklı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek fonksiyonel bileşenlerin üretimlerinin gerçekleştirilebilmesi adına son derece önem arz etmektedir. Ek olarak farklı LAB türlerinde yer alabilecek farklı GS'lerin aydınlatılması da en az bu enzimlerde gerçekleştirilecek mutasyon çalışmaları kadar önemlidir. Son olarak GS'lerde yer alan son kısım glukana bağlanma bölgesidir (Şekil 1.11). Glukana bağlanma bölgesinin GS'lerde rolü henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen bu bölgenin üretilen glukanın zincir uzunluğunu belirlemede rol aldığı düşünülmektedir. Benzer olarak bu kısmın glukana zinciri uzarken yeniden glukoz molekülünün katalitik bölge tarafından eklenmesine imkan verecek şekilde katalitik bölgeden taşınmasında da görev aldığı önerilmiştir [90]. Şekil 1.10'dan da görüldüğü üzere glukana bağlanma bölgesi tekrarlanan amino asit dizilerinden oluşmakta ve bu dizilerin sayısı ve dağılımı enzimden enzime göre değişebilmekte ve aynı zamanda bu kısmın toplam boyutunda enzimden enzime göre farklılık arz etmektedir [73]. Sonuç olarak GS'lerin çalışma mekanizması ile ilgili önemli sayıda çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. Bununla birlikte bu mekanizma henüz net olarak anlaşılamamıştır. Dolayısıyla GS'ler ile yapılacak daha fazla çalışma ile GS'lerde sükrözün ve alıcı moleküllerin bağlanabildiği bütün noktaların ve oluşan ürünün bağlanma noktalarının belirlenmesi, üretilen glikozidik bağın çeşidinin ve oluşturulan ürünün dallanma derecesinin nasıl meydana geldiğinin ortaya konması son derece önemli bir husustur.

1.1.7 Glukanotransferazlar ve Homopolimerik EPS Üretimi

Son yedi yıllık döneme kadar LAB türleri tarafından homopolimerik EPS üretiminin sükrözün substrat olarak kullanılması ile GS'ler tarafından gerçekleştirilebildiği bilinirken özellikle LAB türlerinin genom çalışmalarının hızlanması ve sekanslanan LAB suşu sayısının yüksek oranda artması ile bu genomlarda yapısal olarak GS'lere benzeyen ve GS'ler ile aynı GH70 enzim alt-ailesinin üyesi olan α -glukanotransferazların (α -GTs) keşfi ile LAB tarafından üretilebilen bu enzimlerin de homopolimerik α -glukana üretiminde rol alabildiği ortaya konmuştur. Glukanotransferazların glukansükralardan en temel farklı sükrözü substrat olarak kullanamayıp α -1-4 glikozidik bağı içeren nişasta, amiloz ve maltodekstrinler gibi bileşenleri substrat olarak kullanabilmeleri ve neticede açığa çıkan glukoz moleküllerini farklı bağlar ile birbirine bağlayarak α -glukooligo ve polisakkaritleri üretebilmeleridir. Bu enzimlerin keşfi ile üretilebilecek özgün oligo-polisakkaritlerin gıda sanayii başta olmak üzere sağlık ve malzeme mühendisliği açısından önemli etkilerinin oluşabileceği düşünülmektedir. Glukanotransferazlar mikrobiyal kaynakları, reaksiyon ürünleri ve yapısal karakteristikleri ile GS'lerden

ayrılmaktadırlar [53]. Glukanotransferazlar da yukarıda ifade edildiği gibi GH70 alt-ailesinin üyeleridirler ve şimdiye kadar henüz üç farklı α -1-4 glikozidik bağına etki edebilen glukanotransferazın aktivitesi gösterilmekle birlikte sekanslanan mikoorganizma sayısı arttıkça bu sayısında artacağı öngörülmektedir. Şimdiye kadar açığa çıkarılan glukanotransferazlar; a) LAB türleri tarafından kodlanan ve 4,6- α -Glukanotransferaz ve 4,3- α -Glukanotransferaz olarak fonksiyon icra ettiği gösterilen GTFB, b) LAB türü olmayan *Exiguobacterium*, *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsi gram-pozitif bakterilerde kodlanan 4,6- α -Glukanotransferaz GTFC benzeri enzimler ve son olarak c) Bitkilerle alakalı bakteriler tarafından kodlanan 4,6- α -Glukanotransferaz GTFD benzeri enzimler olarak üç alt aileye ayrılmaktadırlar [53]. Son iki enzim grubu LAB türlerinde kodlanan GTFB enzimleri ile az da olsa benzerlik göstermektedirler ve her üç grupta glukanotransferaz aktivitesi ile glukan üretmektedir. Bununla birlikte diğer iki enzim grubunda yer alan mikroorganizmaların tez konumuzla yakın ilişkide olmaması sebebi ile sadece GTFB enzimlerine burada değinilmiştir.

LAB türlerinde kodlanan ve α -1-4 glikozidik bağı içeren nişasta, amiloz ve maltodekstrinler gibi bileşenleri substrat olarak kullanarak α -glukooligo ve polisakkaritleri üretebilen ve GTFB enzimleri olarak adlandırılan glukanotrasferazlar belirli LAB suşlarında yer alan özel enzimler olarak değerlendirilebilirler. Bununla birlikte *gtfB* olarak açığa çıkarılmış bir genin BLAST analizi ile (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) farklı türlere ait örneğin *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum* gibi LAB türlerinde bu genin yer alabildiği bütün genomları açığa çıkarılmış LAB suş sayısındaki artışa paralel olarak anlaşılabilmektedir. Bununla birlikte önemli olarak şimdiye kadar bizim bilgimize göre bu muhtemel genlerin kodladığı enzimler ile yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlı olup fonksiyonu gösterilen glukanotransferazlar *L. reuteri* suşlarında 4-6-glukanotransferaz ve *L. fermentum* suşunda 4-3-glukanotransferaz şeklindedir [91–93]. Bu konuda yapılan ilk çalışmada *L. reuteri* 121'de *gtfB* geninin bu suşun genomunda *gtfA* geni ile birlikte bulunduğu ortaya konmuş olup bu genin ekprese edilmesi ile elde edilen GTFB enziminin sükrozda inaktif bununla birlikte α -1-4 glikozidik bağı içeren nişasta ve malto-oligosakkaritler gibi substratlarda hidrolaz/transglikozilaz aktivitesi göstererek α -1-4 bağına parçaladığı ve açığa çıkan glukoz ünitelerini α -1-6 bağları ile birbirine bağladığı ve neticede α -1-4 ve özellikle α -1-6 bağı içeren oligosakkaritleri üretebildiği gösterilmiştir [91]. Sonraki süreçte yapılan çalışmalarda ise üretilen bu oligosakkaritlerin diyet olarak davranıp önemli prebiyotik etki gösterdiği ortaya konmuştur [94]. *L. reuteri* 121'de kodlanan 4-6-glukanotransferazın daha yüksek oranda lineer α -1-4 bağı glukoz üniteleri ve daha düşük oranda α -1-4,6 dallanma noktası içeren substratlarda daha etkin

olduğu ve üretilen oligo/polimerin daha fazla α -1-6 bağı içerdiği gösterilmiştir [94]. Bu enzim ile yapılan çalışmalar sonrasında daha ileri seviyeye götürülmüş ve *L. reuteri* 121 GTFB enziminin N-terminal bölgesini içermeyen formunun 3D yapısı aydınlatılarak glukansükrazlar ve GH13 yani amilazlara göre farklılıkları irdelenme imkanı bulmuştur [95]. Açığa çıkarılan bu yapı sayesinde GTFB enziminin yapısal olarak kendine ve etki ettiği substratlara özgü özellikler taşıdığı gösterilmiştir. Örneğin GTFB, glukansükrazlarda olduğu gibi U-tipi katlanma organizasyonu gösterirken bu enzimin aktif bölgesinin yapısal niteliği GS'lerden farklılık arz etmektedir. GS'lerde aktif bölge sadece tek bir donör bağlanma bölgesi içerip diğer donör noktaları oluşan bir düğüm ile kapatılmış iken bu düğümün GTFB'de çok kısa olması sebebiyle GTFB enzimi α -amilazlarda olduğu gibi birden fazla substrat bağlanma bölgesi içermektedir. GTFB'nin maltooligosakkaritlere bağlanma biçimi amilazın bağlanmasına benzerlik göstermekte olup aynı tip substratlara etki edebilmeleri bu yapısal benzerlik ile açıklanabilmektedir. Bununla birlikte amilazlardan farklı olarak GTFB enzimlerinin oluşturabildiği ve donöre özgü oluk yapısını oluşturan iki uzun düğüm amilazlar sadece tek bir glikozil ünitesi transfer edebilirken bu enzimlerin neden birden fazla glikozil ünitesi transfer edebildiğini açıklamaktadır [53, 95]. *L. reuteri* 121'de GTFB enziminin açığa çıkarılmasının ardından yine aynı grup tarafından Nestle kültür koleksiyonunda yer alan LAB'lerin genom veri tabanı taranmış ve bu veri tabanında yer alan LAB'lerde 106 muhtemel *gtfB* geninin varlığı ortaya konmuş ve takiben daha önce açığa çıkardıkları *L. reuteri* 121 *gtfB* genine göre farklılık arz eden sadece yedi genin var olduğunu ortaya koymuşlar ve bunlardan bir tanesi olan *L. reuteri* NCC 233 tarafından kodlanan *gtfB* genini klonlayarak aktivitesini incelemişlerdir. Yapılan incelemede GTFB 121 tarafından üretilen ürünün düz zincirli olmasına rağmen [91], GTFB NCC 233 tarafından amilozdan üretilen ürününün dallı bir glukan formunda olduğu gösterilmiştir. Ek olarak bu suş tarafından kodlanan GTFB enziminin GTFB 121 ile homoloji modeli baz alınıp ortaya çıkartılan muhtemel yapısal karakterizasyonuna göre, bu GTFB, GTFB 121'e göre daha kısa düğümler oluşturmaktadır ve bu yapısal farklılık sebebiyle bu enzimin ürünün dallı bir karakterde olduğu düşünülmektedir [93]. Her iki enziminde 4-6-glukanotranferaz olduğu biyokimyasal olarak gösterilmiştir. Son olarak yukarıda belirtilen LAB veri tabanı taramasında GTFB 121'e göre farklı çıkan bir diğer genin *L. fermentum* NCC 2970 tarafından kodlandığı ortaya konmuştur [92]. Yapısal olarak iki genin karşılaştırılması neticesinde NCC 2970 tarafından kodlanan genin GTFB 121'e %70 benzerlik gösterdiği ve özellikle oluşturulan ürünün yapısal niteliğinin belirlenmesinde rol alan kısımların GTFB 2970'de GTFB 121'e göre farklılık arz ettiği belirlenmiştir [53, 92]. Nitekim yapılan çalışmada bu enzim ekprese edilmiş ve ürettiği ürünün karakterizasyonu sonucunda üretilen glukanın GTFB 121'den farklı olarak α -1-3 glikozidik bağı içerdiği gösterilmiştir [92]. GTFB

2970 *L. reuteri* suşlarının kodladığı GTFB enzimlerinden farklı olarak (α 1- 4) ve (α 1- 3) bağlarından oluşan dallı glukan üretmektedir ve bu enzim 4-3- α -glukanotransferaz olarak LAB'lerde kodlandığı gösterilen şimdiye kadarki tek enzimdir [53, 92].

Sonuç olarak nişasta, amiloz, maltodekstrinler gibi α -1-4 glikozidik bağlardan oluşan substratlara karşı aktivite göstererek açığa çıkan glikozil ünitelerini α -1-4 bağına ilave olarak α -1-6 bağı veya α -1-3 bağı içerecek şekilde düz veya dallı yapıda maltooligo-polisakkaritlerin üretiminden sorumlu glukanotransferazlar LAB türlerinde çok kısa bir süre önce keşfedilmiş ve şimdiye kadar 4-6- α - ve 4-3- α -glukanotransferaz olmak üzere iki GTFB formu olduğu yukarıda da belirtildiği şekilde ortaya konmuştur. Farklı LAB türlerinde yapılacak araştırmalar neticesinde enzim spesifitesine bağlı olarak farklı *gtfB* genlerinin açığa çıkabileceği öngörülmektedir. Bu sayede gıda ve sağlık sektörlerinde başta fonksiyonel gıda üretimi ve prebiyotik ilave bileşen üretimi gibi konularda ve gıdaların fizikokimyasal niteliklerinin iyileştirilmesinde kullanılmak üzere özgün α -glukanların üretilebileceği öngörülmektedir. GS'lerde yapılan mutasyon çalışmaları gibi glukanotransferazların aktif bölgesinde yapılabilecek değişiklikler ile üretilecek α -glukanların daha da özgün nitelik kazanması sağlanabilir.

1.1.8 Alıcı Reaksiyonları ile Üretilen Oligosakkaritler ve Fonksiyonel Etkileri

Fonksiyonel gıda kavramının ve insan sağlığı açısından yararlı etkileri olan gıda takviyelerinin üretimi noktasında temel unsurlardan bir tanesinde insan sindirim sistemi tarafından sindirilemeyerek bağırsağa kadar ulaşan ve burada yararlı bakteriler tarafından sindirilerek onların sayıca istenmeyenler başta olmak üzere diğer mikroorganizmalara üstünlük sağlamalarını ve bağırsak açısından önemli kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumunu hızlandıran prebiyotiklerdir. Prebiyotikler açısından en önemli bileşenlerin başında oligosakkaritler gelmektedirler. Oligosakkaritler bitkisel kaynaklar gibi doğal kaynaklardan veya kimyasal ve enzimatik olarak polisakkaritlerin hidroliz edilmesinden ve yine kimyasal ve enzimatik olarak disakkaritlerden elde edilebilirler [96]. Son dönemde farklı yapısal karakteristiklerde oligosakkaritler üretimi noktasında en dikkat çeken metodoloji ucuz ve çevreye karşı duyarlı bir şekilde GS'ler kullanılarak gerçekleştirilen üretim metodolojisidir. Yukarıda ifade edildiği gibi GS'ler sükrozu parçalayarak açığa çıkan glikozil ünitelerini yine sükrozun parçalanması ile ortaya çıkan enerjiyi kullanarak birbirine bağlamakta ve netice farklı yapılarda α -glukanlar üretilmektedir. GS'lerin gerçekleştirebildiği diğer reaksiyonda ise açığa çıkan glikozil üniteleri ortamda var olan bir monosakkarit ve çoğunlukla da disakkarit olmak üzere alıcı bir şekere aktarılmakta ve böylece oligosakkaritler üretilebilmektedir (Şekil 1.2). GS'lerin bu aktivitesinde sükroz donor

ortama ilave edilen veya ortamda var olan şekerler ise alıcı olarak adlandırılmakta ve bu reaksiyonlar ise alıcı reaksiyonları olarak isimlendirilmektedirler. Şu husus belirtilmelidir ki GS'lerin glukan üretimindeki rolüne paralel olarak GS'lerin alıcı reaksiyonları ile oligosakkarit üretimi amacıyla kullanılabilirlikleri aynı anda çalışılmaya başlanmış [97] şimdiye kadar maltoz başta olmak üzere fruktoz, mannoz, laktoz, izomaltoz, arabinoz, selebiyoz, gentiobioz, rafinoz, maltotrioz gibi çok farklı mono/di/trisakkaritler ve hatta şeker alkoller, fenolik bileşikler alıcı olarak kullanılmış ve temelde oligosakkaritler ve farklı glikozitler üretilmiştir [97–101]. Her bir alıcının GS açısından iyi bir alıcı olup olmadığı GS'nin yapısal karakteristiği ile ilgili olup alıcılar iyi veya zayıf alıcılar olarak adlandırılmaktadırlar [100]. Alıcı reaksiyonlarında üretilen oligosakkaritlerdeki glikozidik bağ, üretilen oligosakkaritlerin birbirlerine oranı ve boyutları (DP2 - DP10 gibi), düz veya dallanmış yapıda olup olmamaları GS'nin yapısına bağlı olarak değişiklik arz etmekte ve farklı GS'ler ile kurulan alıcı reaksiyonları ile özgün oligosakkaritler üretilmektedir. Önemli olarak donör ve alıcı şekerin birbirlerine olan oranı da özellikle üretilen oligosakkaritlerin boyutu, niteliği üzerinde son derece önemli etkiler oluşturabilmektedir [100]. Dolayısıyla üretilen ürünün kompozisyonu kullanılan enzim, substrat ve alıcı şekerin birbirlerine olan oranları düzenlenerek değiştirilebilir. Sonuç olarak GS'ler ucuz ve etkili oligosakkarit üretim araçları olarak görülmekte olup üretilen bu oligosakkaritlerin fonksiyonel etkileri de ortaya konmuştur. Örneğin Cote ve Holt [100] bu konudaki öncü çalışmalardan bir tanesini gerçekleştirmişler ve *Leuc. mesenteroides* NRRL B-2 tarafından üretilen alternansükraz ile farklı karbonhidratları kullanarak alıcı reaksiyonlar gerçekleştirerek farklı oligosakkaritler üretmiş ve bunların prebiyotik potansiyellerini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar dekstransükrazlar genel olarak alıcı reaksiyonlarında tek bir oligosakkarit üretebilirken test ettikleri alternansükrazın alıcı reaksiyonlarında ikiden fazla ve yüksek verimle oligosakkaritleri ürettiklerini ortaya koymuşlardır. Bu oligosakkaritler sonrasında probiyotik ve patojen suşların gelişimine olan etkileri açısından incelenmiş ve maltoz, melibiyoz ve rafinoz alıcı şekerleri ile üretilen oligosakkaritlerin *Bifidobacterium* spp. ve *Lactobacillus* spp. üzerine olumlu etki oluştururken patojen türler üzerinde ise gelişimlerini teşvik edici herhangi bir nitelik göstermemiş yani bu çalışmada üretilen oligosakkaritler prebiyotik fonksiyon icra etmişlerdir [100]. Benzer olarak Ruiz-Matute vd. [102] yaptıkları çalışmada dekstransükraz kullanarak elde ettikleri selebiyoz oligosakkarit ürününün *in vitro* prebiyotik etkilerini incelemişler ve bu oligosakkaritlerin *Bifidobacterium* suşları üzerinde son derece olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak alternansükraz tarafından maltozun alıcı olarak kullanıldığı reaksiyonda üretilen oligoalternanlar enterik patojenlerin kontrol edilmesinde de kullanılabilmişlerdir [103]. Son yapılan bir çalışmada da *Leuc. mesenteroides* URE 13 tarafından üretilen glukansükraz ile maltoz, laktoz ve rafinozun alıcı olarak kullanılması ile

oligosakkaritler üretilmiş ve bu oligosakkaritlerin probiyotik türlerin gelişimlerini teşvik ederek prebiyotik fonksiyon icra ettikleri gösterilmiştir [99]. GS'lerin alıcı reaksiyonları ile üretilen bu oligosakkaritlerin sağlık açısından fonksiyonel etkileri sadece prebiyotik faaliyetleri ile sınırlı değildir. Bu bileşenlerin prebiyotik fonksiyonlarına ek olarak bağırsak fonksiyonlarının iyileşmesi, antikarsinogenik etki, bağışıklık sisteminin teşvik edilmesi gibi fonksiyonları da mevcuttur [104, 105]. Sonuç olarak farklı alıcı şekerler ile GS'lerin aktivitesine bağlı olarak α -1,2, α -1,3, α -1,4 ve α -1,6 bağları içeren oligosakkaritler (bazen α -1,5 içeren disakkarit leukroz) üretilmekte ve bu oligosakkaritlerin başta prebiyotik aktiviteleri olmak üzere insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olabilmektedir. Dolayısıyla özgün GS'lerin açığa çıkartılıp bunlar ile farklı alıcılar kullanılarak üretilcek özgün oligosakkaritlerin yararlı etkilerinin açığa çıkartılması son derece önemli bir husustur.

GS'ler ile alıcı reaksiyonlarında üretilen oligosakkaritlerin doğrudan muhtemel sağlık üzerindeki etkilerine ilave olarak bu oligosakkaritlerin farklı fonksiyonel etkileri de rapor edilmiştir. Örneğin gentiobiozun alıcı reaksiyonu sonucu üretilen oligosakkaritin gentiobiozdan kaynaklanan 'acılığının' azaldığı ve üretilen bu oligosakkaritin tad modifiye edici ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [106]. Benzer olarak yine dekstransükraz aktivitesi ile üretilen oligosakkaritlerin ağızda yer alan *Streptococcus* spp. türlerinin gelişimini azalttığı ve neticede diş çürümelerini engelleyebildiği ifade edilmiştir [107]. GS'lerin alıcı reaksiyonlarında glikolize olabilecek biyoaktif bileşenlerde yer alabilmekte ve neticede bu bileşenlerin suda çözünürlüklerinin gelişmesi gibi fonksiyonel etkiler oluşturulabilmektedir. Örneğin Moon vd. [108] yaptıkları çalışmada kuersteini GS ile glikozile ederek kuersetin-4'-O- α -d-glukopiranozide dönüştürmüşler ve bu bileşenin kuersetine göre çok yüksek oranda suda çözünürlüğe kavuştuğunu göstermişlerdir. Bu konuda literatürde özellikle biyoaktif bileşenlere farklı nitelikler kazandırmak adına GS'lerin glikolizasyon kabiliyetlerinden faydalanarak üretilmiş önemli sayıda çalışma bulunmaktadır. Buradaki temel husus kabul edilmelidir ki GS'lerin farklı bileşenleri alıcı olarak kullanabilmelerindeki kabiliyetleridir. Sonuç olarak GS'lerin bu glikozilasyon kabiliyetleri ile ilerleyen dönemlerde de fonksiyonel etkili farklı bileşenlerin üretilebileceği öngörülmektedir.

1.1.9 Glukansükraz ve Glukanotransferazlar ile İlgili Gelecek Beklentileri

Son yedi yıla kadar LAB türlerinde α -glukan üretiminin sükroz kullanılarak glukansükrazlar ile gerçekleştirilebildiği bilinirken yapılan çalışmalar nişasta gibi α -1-4 glikozidik bağ içeren substratlara etki ederek yine α -glukan üretimini gerçekleştirebilen glukanotransferazlarında LAB türlerinin Genomlarında

kodlanabildiği ve bu türler tarafından üretilbildiği artık bilinmektedir. GS'ler ile ilgili çalışmalar önümüzdeki dönemde hem yeni, özgün yapıda GS'lerin LAB türlerinde ortaya konması üzerinde hem de önemli olarak GS'lerin katalitik bölgesinde gerçekleştirilebilecek mutasyonlar ile farklı nitelikte α -glukan üretilip üretilmeyeceği üzerinde durulabilecektir. GS'lerin katalitik mekanizmasında rol alan amino asitlerin fonksiyonları henüz net olarak anlaşılamamakla birlikte bunlarda meydana getirilecek değişikliklerin üretilen polimer üzerinde etkisi olduğu zaten gösterilmekle birlikte bu etkinin yönlendirilebilecek seviyeye gelmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak GS'lerde polimerin uzaması ile ilgili mekanizma net olarak anlaşılamamış olup bu mekanizma ile ilgili yapılacak çalışmalar ile molekül ağırlığı arttırılmış polimerlerin üretilbileceği düşünülmektedir. Son dönemde GS'ler ile ilgili yapılan çalışmalarda çevresel koşullara bağlı olarak bu enzimin aktivitesinde farklılıklar olabildiği gösterilmiş olup dolayısıyla bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulup bu konunun netliğe kavuşturulması gerekmektedir. Son dönemde önemi çok daha fazla artan fonksiyonel bileşen üretimi noktasında GS'ler farklı nitelikte oligosakkaritlerin üretimini gerçekleştirebilmektedirler. Dolayısıyla bu enzimlerin immobilizasyonu ile sürekli ve özgün oligosakkaritlerin üretimi noktasında çalışmalar yapılacağı ön görülmektedir. GS'lere ilave olarak LAB türlerinde kodlandığı gösterilen glukanotransferazların üzerinde çok daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Şimdiye kadar sadece birkaç LAB türünde 4-6 ve 4-3 olmak üzere iki farklı glukanotransferazın yer aldığı gösterilmiştir. Sekanslanan LAB suşu sayısı artışına bağlı olarak bu sayının artabileceği ve özgün glukanotransferazların açığa çıkarılabileceği düşünülmektedir. Ek olarak glukanotransferazlarda yapılabilecek mutasyon çalışmaları ile enzimin çalışma prensibinin anlaşılabilir fonksiyonel bileşenlerin üretimi noktasında çalışmalar gerçekleştirilebilir. Neticede her iki enzim grubu da son derece önemli olup bu enzimlerin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi ile fonksiyonel etkili oligo-polisakkaritlerin üretiminin hızlanacağı düşünülmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Laktik Asit Bakterilerinin fermentasyonda oynadıkları roller ürettikleri metabolitler tarafından sağlanmaktadır. Bunun en önemli örneklerinden bir tanesi son dönemde üzerinde çok fazla durulan ekzopolisakkarit üretimidir. LAB tarafından üretilen EPS gıda matriksinde ağsı bir jel oluşturup gıdanın viskozite ve reolojik özellikleri gibi fizikokimyasal niteliklerini iyileştirebilmekte ve aynı zamanda üretici türlerin probiyotik fonksiyonları açısından roller oynayabilmektedir. Aynı şekilde EPS'nin potansiyel prebiyotik etkisi, gıdanın mikrobiyotası üzerindeki etkisi ve üretildiği konak açısından immunomodulatif etkisi üzerinde durulmaktadır. Bu hususlar dikkate alındığında hem gıda teknolojisi hem de probiyotik ve prebiyotik fonksiyonlar

çerçevesinde potansiyel etkileri olabilecek bir polisakkaritin fonksiyonel etkilerinin ortaya konması oldukça önemli bir husustur. Bu bağlamda bu tez çalışmasında alternan üreticisi olduğu tespit edilmiş olan *Lactobacillus reuteri* E81 suşunda kodlanan glukansükraz ve glukanotransferaz enzimlerinin ekspresyonu ve elde edilmesi, elde edilen enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonu, bu enzimler ile özgün oligosakkaritlerin üretimi ve bu oligosakkaritlerin bazı fonksiyonel niteliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda yapılması planlanan aşamalar beş kısım altında toplanmıştır:

1) Daha önce ekşi hamurdan izole edilip alternan üretimi gerçekleştirebildiği gösterilen *L. reuteri* E81’de alternan üretiminden sorumlu ‘*asr*’ geninin tespit edilmesi ve bu gen ile ilgili mutasyonların gerçekleştirilmesi amacıyla plazmidlerin imal edilmesi,

2) *L. reuteri* E81 suşundan Δ alternan suşunun elde edilmesini takiben *L. reuteri* E81 ve mutanıtı ile ekşi hamur üretilerek alternan üretiminin hamurun reolojisi üzerine etkisi ve bu hamurlar ile üretilcek ekmeklerin tekstürel nitelikleri ortaya konarak alternan üretiminin ekşi hamur ve ekmeği üzerindeki etkisinin belirlenmesi,

3) *L. reuteri* E81’den *gtfA* ve *gtfB* genleri kopyalanarak glukansükraz ve glukanotransferaz enzimlerinin üretimi amacıyla standart metotlar kullanılarak bu genlerin *Escherichia coli* BL21 hücrelerinde eksprese edilmesi ve elde edilmesi,

4) Glukansükraz ve glukanotransferaz enzimlerinin elde edilmesini takiben glukansükraz enziminin aktivitesi sükröz ve/veya maltozun varlığında, glukanotransferaz enziminin aktivitesi ise nişasta ve/veya maltozun varlığında belirlenerek üretilebilecek oligosakkaritlerin ortaya konmaması,

5) *L. reuteri* E81 tarafından üretilen alternanın ve enzim aktivitesine bağlı olarak elde edilecek oligosakkarit(ler)in HT29 insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı kullanılarak insan hücrelerinde bağışıklık üzerine etkileri çeşitli sitokinler üzerindeki rollerinin tespit edilmesi ve aynı zamanda bu bileşenlerin prebiyotik etkilerinin ortaya çıkartılması,

Böylece LAB türleri tarafından nadir olarak üretilen alternanın ve eksprese edilecek glukansükraz ve glukanotransferaz enzimleri ile farklı akseptörler varlığında üretilcek oligosakkaritlerin fonksiyonel etkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Son yıllarda başta gıda teknolojisi olmak üzere sağlık, farmasötik ve kozmetik gibi farklı teknolojilerde kullanılmak üzere özgün karbonhidratların ucuz, çevreye duyarlı ve etkin yöntemler ile üretimi son derece önem kazanmıştır. Bu karbonhidratların başında GRAS statüsüne sahip LAB tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve yine doğal kaynaklarda yer alan polisakkaritlerin parçalanması ve çoğunlukla da özgün enzimlerin farklı şeker alıcılara glukoz, fruktoz gibi monomerleri eklemesi ile üretilen oligosakkaritler gelmektedir. Oligosakkaritler büyük öneme ve muazzam potansiyele sahip olmalarına rağmen, teknik ve farmasötik alanlarda kullanımları bu moleküllerin yüksek karmaşıklığı nedeni ile kimyasal sentezinde yaşanan sorunlardan dolayı sınırlı kalmaktadır. Büyük ölçekli sentezin uygulanabilirliği göz önüne alındığında, oligo-/polisakkaritlerin sentezi için geleneksel yaklaşımlar tam bir çözüm sunmamaktadır. Ticari olarak büyük öneme sahip olan bu karbonhidratların sentezi için basit ve faydalı yöntemlerin geliştirilmesi yeni ortaya çıkan bir alandır. Bu bağlamda özellikle oligosakkaritler gibi önemli karbonhidratların enzimatik üretimi kimyasal sentezden daha belirgin avantajlara sahiptir. Son dönemde farklı yapısal karakteristiklerde oligosakkaritler üretimi noktasında en dikkat çeken metodoloji ucuz ve çevreye karşı duyarlı bir şekilde GS'ler kullanılarak gerçekleştirilen üretim metodolojisiidir. Bu bağlamda, glukansükrazlar basit substratlardan fonksiyonel karbonhidratların üretimi için önemli araçlar olarak ortaya çıkmaktadır. GS'lerin verici-alıcı reaksiyonları ile ürettikleri bu oligosakkaritler tatlandırıcı, nem tutucu ve kabartıcı ajan olarak gıda endüstrisinde, ilaç takviyesi, kilo kontrol ajanı ve diyet lifi olarak eczacılıkta, yem teknolojisinde ve kozmetik bileşenlerin formülasyonunda yer almakta ve daha da önemlisi bağışıklık düzenleyici ve prebiyotik özelliğe sahip olmalarından dolayı dikkat çekmektedir.

Sonuç olark ticari öneme sahip olan bu oligo-/polisakkaritlerin üretimi için etkin ve ucuz bir yöntem olan glukansükraz ve glukano-transferaz enzimlerinin kullanım olanaklarının ve bu enzimler ile üretilcek özgün oligo-/polisakkaritlerin potansiyel etkilerinin açığa çıkarılması bu tezin hipotezini oluşturmaktadır.

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Genel Mikrobiyolojik ve Moleküler Metotlar

2.1.1 Kültür Ortamı

Tez çalışması boyunca kullanılan besiyeri bileşimleri ve miktarları aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth: 10,0 g L⁻¹ kazeinden elde edilen pepton; 8,0 g L⁻¹ et ekstraktı; 4,0 g L⁻¹ maya ekstraktı; 20,0 g L⁻¹ D(+) glukoz; 2,0 g L⁻¹ K₂HPO₄; 1,0 g L⁻¹ Tween 80; 2,0 g L⁻¹ di-amonyum hidrojen sitrat; 5,0 g L⁻¹ sodyum asetat; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄; 0,04 g L⁻¹ MnSO₄.

Modifiye Brain Heart Infusion (MBHI) Broth: 27,5 g L⁻¹ Besin substratları (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar); 2,0 g L⁻¹ D(+) glukoz; 5,0 g L⁻¹ NaCl; 2,5 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 30 g L⁻¹ sükröz; 5,0 g L⁻¹ kazeinden elde edilen pepton; 5,0 g L⁻¹ et ekstraktı; 5,0 g L⁻¹ sodyum asetat; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O

Luria Bertani (LB) Broth: 5,0 g L⁻¹ maya ekstraktı; 10,0 g L⁻¹ tripton; 10,0 g L⁻¹ NaCl.

SOC besiyeri (super optimal broth with catabolite repression): 20,0 g L⁻¹ tripton, 5,0 g L⁻¹ maya ekstraktı, 4,0 g L⁻¹ glukoz, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ ve 10 mM MgSO₄.

Dehidre besiyerleri damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilerek hazırlanmıştır. İlgili besiyerlerine ait katı ortamlar otoklav işleminden önce uygun besiyerine %1,5 (w/v) agar-agar ilave edilerek hazırlanmıştır.

2.1.2 Genetik Modifikasyon ve Seçim Çalışmaları İçin Kullanılan Antibiyotikler

Tez çalışması süresince genetik modifikasyon ve seçim çalışmaları için kullanılan antibiyotikler, hazırlanış şekilleri ve kullanılan konsantrasyonları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Plazmid seçimi için kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik	Stok solüsyonlarının hazırlanması	Stok konsantrasyon	<i>L. reuteri</i> için son konsantrasyon	<i>E. coli</i> için son konsantrasyon
Eritromisin	Etanol de çözündürüldü	40 mg mL ⁻¹	10 µg mL ⁻¹	400 µg mL ⁻¹
Ampisilin	Ultra saf su da çözündürüldü, filtre ile steril edildi	50 mg mL ⁻¹	-	50 µg mL ⁻¹
Kanamisin	Ultra saf su da çözündürüldü, filtre ile steril edildi	50 mg mL ⁻¹	-	50 µg mL ⁻¹

2.1.3 Bakteriyel Suşlar ve Gelişme Koşulları

Tez çalışmasında kullanılan ve tez çalışması süresince elde edilen bakteri suşları ve plazmidler sırasıyla Tablo 2.2 ve 2.3’de verilmiştir. Tablo 2.2’de belirtilen *L. reuteri* E81 suşu 116O523 nolu TÜBİTAK projesi çerçevesinde ekşi hamurdan izole edilip tanımlanmış ve diğer *L. reuteri* suşları bu çalışma kapsamında elde edilmiştir. Tüm *L. reuteri* suşları %20 gliserol içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiş ve suşlar MRS besiyerinde 37°C’de aktifleştirilmiş ve sonraki işlemlerde %1’lik konsantrasyonu ekim işlemlerinde kullanılmıştır. Tüm bakteri suşları aerobik koşullarda geliştirilmiş, ancak gerekli durumlarda anaerobik koşullar anaerobik jarda Anaerocult A (Merck, Almanya) kullanılarak sağlanmıştır. Bakteri hücrelerinin yoğunluğunun takip edilmesi gereken durumlarda UV-Spektrofotometre (SHIMADZU UV-1800, Japonya) kullanılarak bakteri yoğunlukları OD₆₀₀ nm de ölçülerek belirlenmiştir.

Genetik modifikasyon çalışmaları için bu tez kapsamında kullanılan ve elde edilen transformatlar, bu transformantların taşıdıkları plazmidler ve gelişme şartları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2 Kullanılan mikroorganizmalar ve gelişme koşulları

Suş	Açıklama	Gelişme şartları	Besiyeri	Antibiyotik direnci
<i>L. reuteri</i> E81	Doğal suş	37°C	MRS	-
* <i>L. reuteri</i> E81 Δ <i>gtfA</i>	<i>gtfA</i> geni silinmiş suş	37°C	MRS	-
* <i>E. coli</i> E8101 (<i>gtf1</i>)	<i>gtfA</i> geninin üst bölgesinden 1300 bç taşıyan pG ⁺ host9 vektörünü (pE8101) içeren suş	30°C 250 rpm	LB	Ery
* <i>E. coli</i> E8102 (<i>gtf2</i>)	<i>gtfA</i> geninin üst bölgesinden 1300 bç ve alt bölgesinden 1100 bç taşıyan pG ⁺ host9 vektörünü (pE8102) içeren suş	30°C 250 rpm	LB	Ery
* <i>E. coli</i> E8103 (<i>gtfA</i>)	<i>gtfA</i> geninin katalitik 3096 bç olan bölgesini taşıyan pET15b vektörünü (pE8103) içeren suş	37°C 250 rpm	LB	Amp
* <i>E. coli</i> E8104 (<i>gtfB</i>)	<i>gtfB</i> geninin katalitik 2663 bç olan bölgesini taşıyan pET28a vektörünü (pE8104) içeren suş	37°C 250 rpm	LB	Kan
<i>E. coli</i> TOP10	Klonlama konağı	37°C 250 rpm	LB	-
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresyon konağı	37°C 250 rpm	LB	-

* Bu çalışma kapsamında elde edilmiştir.

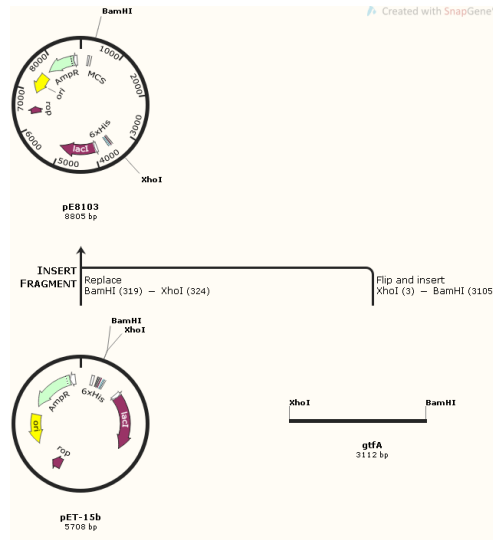
Tez çalışmasında kullanılan plazmid vektörler, kullanım amaçları ve bazı genetik özellikleri Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3 Bu tezde kullanılan plazmid vektörler

Plazmid	Detaylar	Amaç	Antibiyotik seçimi
pG ⁺ host9	Sıcaklık hassasiyetine sahip vektör	Genetik modifikasyon	Ery
pET15b	-	Ekspresyon vektörü	Amp
pET28a	-	Ekspresyon vektörü	Kan
*pE8101	<i>gtfA</i> geninin üst bölgesinden 1300 bç taşıyan pG ⁺ host9 vektörü	<i>gtfA</i> geninin silinmesi	Ery
*pE8102	<i>gtfA</i> geninin üst bölgesinden 1300 bç ve alt bölgesinden 1100 bç taşıyan pG ⁺ host9 vektörü	<i>gtfA</i> geninin silinmesi	Ery
*pE8103	<i>gtfA</i> geninin katalitik 3096 bç olan bölgesini taşıyan pET15b vektörü	GTFA enzimi için ekspresyon vektörü	Amp
*pE8104	<i>gtfB</i> geninin katalitik 2663 bç olan bölgesini taşıyan pET28a vektörü	GTFB enzimi için ekspresyon vektörü	Kan

* Bu çalışma kapsamında elde edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen pE8103 plazmidinin elde ediliş aşamaları SnapGene programı kullanılarak şematize edilmiş ve Şekil 2.1 de ilgili görsele yer verilmiştir.



Şekil 2.1 pET15b plazmidini ve *gtfA* geninin restriksiyon enzimleri ile kesimi ve ligasyon sonucu elde edilen pE8103 plazmidinin şematize olarak gösterimi

2.1.4 Genomik DNA Ekstraksiyonu

L. reuteri E81 suşundan DNA ekstrakte etmek için bakteri DNA'sı ekstraksiyon kiti (Vivantis, Malezya) kullanılmıştır. DNA ekstraksiyon işlemi üretici firmanın belirttiği prosedüre uyularak yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu için bir gece geliştirilmiş kültürden 2 mL alınarak 6.000 x g'de 2 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Toplanan bakteri hücresi üzerine 100 µL Tampon R1 ilave edilerek pipet yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Bakteri solüsyonuna 20 µL lizozim (50 mg mL⁻¹) ilave edilip 20 dk 37°C'de inkübe edilmiş ve ardından 10.000 x g'de 3 dk santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken hücre pelleti üzerine 180 µL Tampon R2 ve 20 µL ProteinazK ilave edilerek homojen bir solüsyon elde edilene kadar karıştırılmıştır. Hücre solüsyonu 65°C'de 20 dk su banyosunda inkübe edilmiş ve inkübasyon boyunca her 5 dk' da bir çalkalanmıştır. Inkübasyon sonunda elde edilen berrak lizat üzerine 400 µL Tampon BG'den ilave edilmiş ve homojen solüsyon elde edene kadar ters düz ederek karıştırılmıştır. Lizat 65°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve ardından 200 µL %96-100 'lük etanol ilave edilmiş ve hemen güçlü bir şekilde karıştırılmıştır. Hazırlanan lizat 650 µL'lik hacimlerde kolona yüklenmiş (Örnek kalması halinde santrifüj işleminden sonra kalan lizat tekrar kolona yüklenmiştir.) ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüjlenmiştir (Kolonda tıkanıklık meydana gelmesi durumunda 200 µL Tampon BG ilave edilip aynı şartlarda santrifüjlenmiştir.). Kolona 650 µL Yıkama Tamponu ilave edilerek yıkanmış ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüjlenip toplama tüpünde biriken süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kolonu kurutmak için 10.000 x g'de 1 dk santrifüjlenmiş ve kolon yeni bir 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir. Daha sonra 65°C'ye ısıtılmış Elüsyon Tamponu'ndan 50 µL ilave edilerek 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüjlenip elde edilen genomik DNA PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere çalışma süresince -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.5 Plazmid Ekstraksiyonu

Tez çalışmasında kullanılan plazmidler E.Z.N.A Plazmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tec, ABD) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. *E. coli* hücrelerinden plazmid DNA ekstraksiyon işlemi üretici firmanın belirttiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Plazmid ekstraksiyonu için uygun antibiyotiği içeren LB broth içerisinde geliştirilen kültürden 10 mL alınarak 24°C'de 1 dk 10.000 x g'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine 250 µL Çözelti I/ RNaz A solüsyonundan ilave edilip vorteks yardımıyla iyice karıştırılmış ve hücre solüsyonu 1,5 mL'lik DNA/RNA içermeyen eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Hücre solüsyonu üzerine 250 µL Çözelti II'den ilave edilmiş ve berrak bir lizat elde etmek için tüp ters düz edilerek yavaşça birkaç kez karıştırılmıştır. Lizat 5 dk'yı geçmeyecek şekilde inkübe edilmiş ve daha

sonra üzerine 350 μ L Çözelti III'den ilave edilmiş ve beyaz bir çökelti oluşana kadar yavaşça ters düz edilerek birkaç kez karıştırılmıştır. Lokalize çökelmeyi önlemek için Çözelti III ilavesinden hemen sonra solüsyonun iyice karıştırılması önemlidir. Elde edilen lizat maksimum hızda ($\geq 13.000 \times g$ 'de) 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatant hücreye dokunmadan alınarak önceden hazırlanmış olan HiBind DNA Mini kolona aktarılmıştır (HiBind DNA Mini kolonu hazırlamak için DNA mini kolonu 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 3 M NaOH 'den 100 μ L kolona ilave edilerek maksimum hızda 30-60 s'ye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü uzaklaştırılarak kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.). Berrak süpernatantın aktarıldığı HiBind DNA Mini kolon maksimum hızda 1 dk santrifüjlenerek filtrat uzaklaştırılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona HBC Tamponun'dan 500 μ L ilave edilerek maksimum hızda 1 dk santrifüjlenmiş ve filtrat uzaklaştırılarak kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Daha sonra kolona 700 μ L DNA Yıkama Tamponu ilave edilmiş ve maksimum hızda 1 dk santrifüj işleminden sonra filtrat uzaklaştırılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. DNA Yıkama Tamponu ile yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmış ve ardından kolon matrisini kurutmak için HiBind DNA Mini kolon maksimum hızda 2 dk santrifüjlenmiştir. HiBind DNA Mini kolon yeni bir 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne yerleştirilmiş ve ardından 70°C'ye ısıtılmış Elüsyon Tamponundan 50 μ L ilave edilerek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda maksimum hızda 1 dk santrifüjlenerek HiBind DNA Mini kolondan elüte edilen plazmidler çalışma süresince -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.6 Primerler

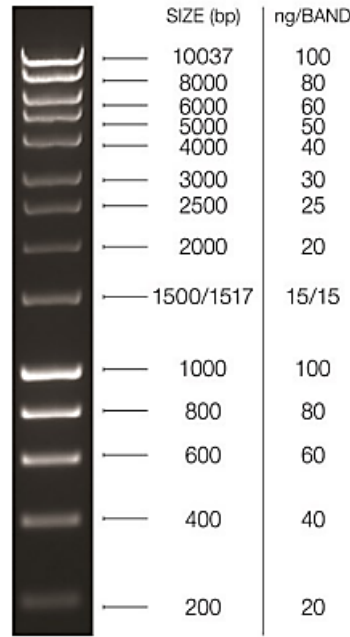
L. reuteri E81 suşundan *gtfA* ve *gtfB* genlerinin amplifikasyonu, klonlama ve mutasyon çalışmaları amacıyla kullanılan primerler, ampilifiye edilmek istenen hedef gen boyutları ve PZR şartları Tablo 2.4'de verilmiştir. Bu primerlerin kullanım amaçları ileriki bölümlerde açıklanmıştır.

Tablo 2.4 Tez çalışması boyunca kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Hedef gen	T _m (°C) Ta1-Ta2
gtf9_KpnI_F	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG	<i>gtfA</i>	44-68
gtf9_Xho_R	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		
gtf9_Xho_F	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG	<i>gtfA</i>	42-66
gtf9_HindIII_R	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		
pGhostR	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG		50
pGhost 1	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		
Gtf_Xho_2	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG	<i>gtfA</i>	48-66
Gtf_BamHI2	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		
76_HindF	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG	<i>gtfB</i>	50-69
76_XhoR	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		
T7P2	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG		50
T7T	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		
28P	TTTGGTACCATACTGACCAACCAG		50
28R	TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT		

2.1.7 PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü

PZR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü için konsantrasyonu %1 olan agaroz jeli 0,5X Tris Borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. PZR ürünleri agaroz jele yüklemeye önce yükleme boyası olan DNA Loading Buffer (Bioline, İngiltere) ile renklendirilmiştir. Bu işlem için ilk olarak parafilm üzerine 2 µL yükleme boyasından konulup üzerine 10 µL örnek aktarılarak otomatik pipet aracılığı ile örnek ve boya birbirine karıştırılmış ve renklendirilen örnekler agaroz jele yüklenmiştir. TBE tamponu kullanılarak elektroforez işlemine bırakılmıştır. Elektroforez işleminin ardından jeller 1 mg L⁻¹lik etidyum bromid çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilerek jelde yüklü olan DNA parçacıklarının boyanması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından jeller deiyonize su içerisinde kısa süre tutularak durulandıktan sonra UV-Transilluminatör kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. HyperLadder I (Bioline, İngiltere) her elektroforetik jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 HyperLadder I (Bioline, İngiltere) fragment boyutları ve miktarları

2.1.8 Restriksiyon Enzimleri

Tez kapsamında kullanılan restriksiyon enzimlerine ait bilgiler Tablo 2.5’de detaylı olarak verilmiştir. Kullanılan restriksiyon enzimleri Thermo Fisher (ABD)’den temin edilmiştir.

Tablo 2.5 Tez çalışmasında kullanılan restriksiyon enzimlerine ait bazı bilgiler

Enzim adı	Tanıma alanı ve bölünme	Oluşturduğu uç
KpnI	5' G G T A C ↓ C 3' 3' C ↑ C A T G G 5'	Yapışkan
XhoI	5' C ↓ T C G A G 3' 3' G A G C T ↑ C 5'	Yapışkan
HindIII	5' A ↓ A G C T T 3' 3' T T C G A ↑ A 5'	Yapışkan
BamHI	5' G ↓ G A T C C 3' 3' C C T A G ↑ G 5'	Yapışkan

Restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi üretici firmanın belirttiği koşullarda 10-40 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Tablo 2.6’da restriksiyon enzimleri kullanılarak PZR reaksiyonu ile amplifiye edilmiş ilgili genin ve plazmid DNA’nın kesim işlemleri için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları verilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için restriksiyon enzimleri ısı ile inaktive edilmiş ve ürünler enzimi uzaklaştırmak için Sure-Clean (Bioline, İngiltere) ile saflaştırılmıştır.

Tablo 2.6 Restriksiyon enzimleri ile kesim işlemleri için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları

Amplifiye edilen PZR ürünü için kurulan restriksiyon reaksiyonu		Plazmid DNA için kurulan restriksiyon reaksiyonu	
PZR reaksiyon ürünü (~0,1-0,5 µg)	20 µL	Plazmid DNA	4 µL
Nükleaz içermeyen su	2 µL	Nükleaz içermeyen su	3 µL
10X Tampon	2 µL	10X Tampon	2 µL
İlgili restriksiyon enzimi	1 µL	İlgili restriksiyon enzimi	1 µL
Toplam hacim	25 µL	Toplam hacim	10 µL
Reaksiyon şartları		37°C'de 1 saat	
İnaktivasyon şartları		80°C'de 20 dk	

2.1.9 Vektör DNA'nın Defosforilasyonu

Restriksiyon enzimleri ile kesim işleminden sonra self-ligasyonu önlemek için vektörlerin 5' fosfat grupları Shrimp Alkaline Fosfatase (Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Defosforilasyon işlemi üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 2.7'de vektörlerin defosforilasyon işlemi için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları verilmiştir.

Tablo 2.7 Defosforilasyon işlemi için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları

Reaksiyon bileşenleri ve miktarı		Reaksiyon şartları	İnaktivasyon şartları
Vektör DNA	15 µL	37°C-30 dk	65°C-20 dk
SAP Tamponu	2 µL		
Shrimp Alkaline Fosfatase	1 µL		
Steril H ₂ O	2 µL		
Toplam hacim	20 µL		

2.1.10 Ligasyon

PZR işlemini takiben amplifiye edilen ilgili gen bölgesi ve plazmidler ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilmiş, kesim işlemini takiben vektör defosforilize edilmiş ve jelde kesim ürünlerinin miktarının kontrolünü takiben ürünler ligasyon işlemine bırakılmıştır. Ligasyon işlemi T4 DNA Ligaz (ThermoFisher, ABD) kullanılarak üreticinin sağladığı materyaller ve protokol izlenerek Tablo 2.8'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonları kurulurken 1:3 vektör:insert oranı kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonuna katılacak vektör ve insert miktarı aşağıda verildiği gibi hesaplanmıştır.

$$[(100 \text{ ng vektör}) \times (\text{insert boyutu (bp)})] / [\text{vektör boyutu (bp)}] \times 3:1$$

Tablo 2.8 Ligasyon işlemi için kurulan reaksiyon bileşimi ve şartları

Reaksiyon bileşenleri	Miktar	Reaksiyon şartları	İnaktivasyon şartları
Doğrusal vektör DNA	~100 ng		
Insert DNA	1:3 Vektör üzerinden oran		
10X T4 DNA Ligaz Tamponu	2 μ L	22°C-10 dk	65°C-10 dk
T4 DNA Ligaz	1 U		
Nükleaz içermeyen su	20 μ L 'ye tamamla		
Toplam hacim	20 μ L		

2.1.11 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tez çalışması süresince PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler Sentegen'den (TR) temin edilmiş ve kullanılan primerlere ait bazı bilgiler Tablo 2.4'de verilmiştir. Genomik DNA temelli PZR reaksiyonlarında kullanılan Phusion Polimeraz reaksiyonları için <https://bit.ly/2sSmdZc>, ligasyon ve koloni PZR reaksiyonlarında kullanılan GoTaq reaksiyonları için <https://bit.ly/35n66QF> web sitesi kullanılarak ilgili primerlerin tavlama sıcaklıkları hesaplanmıştır. Kullanılan primerlere ait tavlama sıcaklıkları Tablo 2.4'de verilmiştir. Kurulan PZR reaksiyonlarının bileşimi ve reaksiyon şartları bölüm 2.1.11.1 ve 2.1.11.2'de detaylı olarak verilmiştir.

2.1.11.1 Genomik DNA Temelli PZR

L. reuteri E81'den elde edilen genomik DNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı, sırasıyla glukansükraz ve glukanotransferaz enzimlerini kodlayan *gtfA* ve *gtfB* genlerinin amplifiye edilmesi için kurulan PZR reaksiyonlarının bileşimi Tablo 2.9 verilmiştir.

Tablo 2.9 *gtfA* ve *gtfB* genlerinin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR bileşimi

PZR bileşenleri	Miktar (μ L)
Kalıp DNA	1 μ L
GC Tamponu	10 μ L
dNTPs (10 mM)	1 μ L
Forward primer (20 μ M)	2,5 μ L
Reverse primer (20 μ M)	2,5 μ L
DMSO	1,5 μ L
Phusion Polimeraz	0,5 μ L
Deiyonize H ₂ O	50 μ L için
Toplam hacim	50 μ L

Bu PZR reaksiyonlarında Thermofisher Phusion Polimeraz enzimi kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Her iki genin de amplifiye edilmesi için kullanılan PZR şartları Tablo 2.10 'da verilmiştir.

Tablo 2.10 *gtfA* ve *gtfB* genlerinin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR şartları

		Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
	Denatürasyon	98°C	30 s	x1
Primerin %100 aynı olduğu kısım	Denatürasyon	98°C	10 s	x5
	Bağlanma	Ta1°C	30 s	
	Uzama	72°C	15-30 s/kbs	
Primerin tamamı	Denatürasyon	98°C	10 s	x20
	Bağlanma	Ta2°C	30 s	
	Uzama	72°C	15-30s/kbs	
	Son Uzama	72°C	5 dk	
				x1

Ta1 sıcaklıkları Tablo 2.4’de verilmiştir.

2.1.11.2 Ligasyon ve Koloni PZR

Ligasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koyabilmek için rekombinant plazmidler kalıp DNA olarak kullanılmış ve plazmide özgü primerler kullanılarak PZR reaksiyonu kurulmuştur. İstenen genin vektöre entegre olduğunu doğrulamak için ligasyon PZR sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Şekil 2.3’de plazmid içine yerleşen insert DNA’nın PZR ile doğrulanması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Forward (F) ve Reverse (R) primerler ile ligasyon PZR işleminin gösterimi

Ligasyon sonucunda elde edilen rekombinant plazmidler Bölüm 2.1.13 ’de açıklandığı gibi hazırlanan kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildikten sonra plazmidin sahip olduğu antibiyotik dirençliliğine göre uygun antibiyotiği ve besiyerini içeren katı besiyeri ortamına ekilmiştir. Rekombinant plazmidi içeren kolonilerin belirlenmesi için besiyerinde gelişen kolonilerden elde edilen hücreler steril kürdan kullanılarak alınmış ve 10 µL steril deiyonize su içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu Tablo 2.11’de verilen PZR karışımında şablon olarak kullanılarak rekombinant hücreler belirlenmiştir.

Tablo 2.11 Ligasyon ve koloni PZR işlemleri için kullanılan PZR bileşimi

PZR bileşenleri	Miktar (μL)
Kalıp DNA	1 μL
5 x GoTaq Reaksiyon Tamponu	10 μL
dNTPs (10 mM)	4 μL
Forward primer (20 μM)	1 μL
Reverse primer (20 μM)	1 μL
GoTaq DNA Polymerase	0,25 μL
Deiyonize H ₂ O	50 μL için
Toplam hacim	50 μL

Ligasyon ve koloni PZR için kullanılan PZR şartları Tablo 2.12 'de verilmiştir. Bu PZR reaksiyonlarında GoTaq DNA polimeraz enzimi kullanılarak PZR işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.12 Ligasyon ve koloni PZR işlemleri için kullanılan PZR şartları

		Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
	Denatürasyon	95°C	2 dk	x1
Primerin %100	Denatürasyon	95°C	30 s	
aynı olduğu kısım	Bağlanma	Ta1°C	30 s	x25
	Uzama	72°C	15-30 s/kbs	
	Son Uzama	72°C	5 dk	x1

Ta1 sıcaklıkları Tablo 2.4'de verilmiştir.

2.1.12 DNA Pürifikasyonu

PZR ürünlerini ortamda bulunan tamponlar, dNTP ler, kısa DNA parçaları ve enzimlerden arındırmak için hızlı bir DNA temizleme aracı olan Sure-Clean (Bioline, İngiltere) kullanılarak ürünler saflaştırılmıştır. İlk olarak DNA'ya 6 μL Co-Precipitant Pink'den ilave edilip 30 s'ye vortekslenmiş ve daha sonra örnek hacmine eşit miktarda Sure-Clean tamponu ilave edilerek tamamen karışması sağlanmıştır. Elde edilen solüsyon en az 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 14.000 x g'de en az 10 dk santrifüjlenerek süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Daha sonra %70'lik etanolden başlangıç örnek hacminin iki katı kadar pellet üzerine ilave edilip 10 s'ye vortekslenmiş ve 14.000 x g'de 10 dk santrifüj işleminin ardından süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Çöken pellet etanolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak için hava ile kurutulmuş ve son olarak pellet 10 μL deiyonize suda çözündürülmüştür.

2.1.13 Kompetent *E. coli* Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu

E. coli TOP10 ve BL21 hücreleri transformasyon amacıyla elektrokompotent hale getirmek için hazırlanmıştır. Taze hazırlanmış 50 mL LB broth içerisine bir gecelik *E.*

coli kültüründen 1 mL inoküle edilerek OD_{600nm}'de 0,5-0,6 optik yoğunluğa ulaşana kadar 37°C'de çalkalayarak (250 rpm) geliştirilmiştir. İstenen yoğunluğa ulaşan kültürler hemen buz üzerine alınarak soğutulmuş ve önceden soğutulmuş rotorda (4°C) santrifüjlenerek (3.000 x g, 10 dk, 4°C) hücreler toplanmıştır. Santrifüjle elde edilen hücreler önceden soğutulmuş %10'luk steril gliserol çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır (10 dk, 3.000 x g, 4°C). Yıkama işleminin ardından toplanan hücreler 500 µL soğutulmuş %10'luk gliserol içerisinde süspanse edilerek önceden soğutulmuş 0,5 mL steril mikrofüj tüplere 50 µL'lik hacimlerde dağıtılmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Transformasyonun ikinci basamağını, hedef DNA'nın elektrokompotent *E. coli* hücrelerine elektroporasyonu oluşturmaktadır. Tüm malzemeler ve çözeltiler en az 2 saat boyunca buz üzerinde soğutulularak elektroporasyon için hazırlanmıştır. Elektroporasyon için 50 µL elektrokompotent hücre alikotuna maksimum 5 µL vektör DNA veya ligasyon karışımı ilave edilip dikkatlice karıştırılmış ve 1 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. 5 ng vektör kullanılarak pozitif kontrol ve H₂O kullanılarak negatif kontrol paralel olarak hazırlanmıştır. Hücre karışımı, önceden soğutulmuş elektroporasyon küvetlerine (Eppendorf) aktarılarak elektroporatöre yerleştirilmiştir. Elektroporasyon cihazı (Eppendorf elektroporatör 2510), 25µF kapasitans, 2,5 kV ve 200 Ω dirençli darbeler verecek şekilde ayarlanmıştır. Elektroporasyon işleminde bir darbeden sonra, 12,5 kV cm⁻¹ alan kuvvetine sahip 4,7 ila 5,0 milisaniye arasında değişen bir zaman sabiti kaydedilmiştir. Elektroporasyon işleminin ardından 450 µL SOC besiyeri (oda sıcaklığında) küvetlere eklenmiş ve bakteriler 2 mL'lik vida kapaklı tüplere aktarılmıştır. Plazmide bağlı olarak 30-37°C'de 1-2 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir.

2.1.14 Kompetent *L. reuteri* Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu

gtfA genini silmek için elde edilen rekombinant pG⁺host9 vektörünün (pE8102) *L. reuteri* E81'e atılması amacıyla ilk olarak kompetent *L. reuteri* E81 hücreleri Dertli [7]'de ifade edildiği şekilde hazırlanmıştır. Ancak diğer LAB türlerinin aksine *L. reuteri* E81 ile kompetent hücre hazırlanması oldukça zor bir süreç olmuştur. Kompetent hücrelerin hazırlanabilmesini takiben pE8102 vektörünün hücre içerisine atılması amacıyla elektroporasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla elektroporasyon işlemi 2.500 V'da gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminin ardından hücreler 3 saat mMRS (MRS+20 mM MgCl₂ + 2 mM CaCl₂)'te geliştirilmiş ve eritromisin (Ery) içeren MRS agara ekim işleminin ardından koloniler 30°C'de gelişime bırakılmıştır. Pozitif transformantlar sonrasında PZR işlemi ile doğrulandıktan sonra gen silme işlemine geçilmiştir. *L. reuteri* E81'e dışarıdan plazmid ilavesi oldukça zor olmuştur.

Bu amaçla yukarıda ifade edilen metoda ilaveten 4 farklı metot kullanılmıştır.

Metod 1: Bu metotta bir gece geliştirilmiş hücrelerden ekim yapılarak *L. reuteri*' 5 mL MRS besiyerinde OD_{600nm} 1'e kadar geliştirilmiştir. Santrifüjle elde edilen hücreler 10 mL 0,5 M süktroz %10 gliserol çözeltisi ile yıkandıktan sonra bu çözeltinin 100 µL'si ile çözölmüş ve 2.500 V'da elektroporasyona tabi tutulup 1 mL MRS'in eklenmesini takiben 2 saat geliştirilmiş ve MRS+ery 5 µg mL⁻¹'ye ekim yapılmıştır.

Metod 2: *L. reuteri* OD_{600nm} 0,6'ya kadar geliştirip santrifüj ile hücreler elde edilmiştir (10.000 x g, 10 dk, 4°C). Sonrasında pelleti 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, %10 gliserol (v/v) ve 0,3 M süktroz ile 3 defa yıkanmış ve ardından hücreler 40 µL hacimde aynı tamponda çözöndürölmüştür. Takiben 1.700 V da elektroporasyon uygulanmış ve hücreler 0,3 M süktroz, 20 mM MgCl₂ ve 2 mM CaCl₂ içeren MRS broth ta geliştirilmiştir. Ardından 0,3 M sukroz ve eritromisin (8 µL mL⁻¹) içeren MRS agara ekim yapıp transformantlar izlenmiştir.

Metod 3: *L. reuteri* hücreleri OD_{600nm} 0,2-0,3'e kadar geliştirilmiş ve santrifüj işleminin ardından pellet 5 mmol L⁻¹ NaPO₄ ve 1 mmol L⁻¹ MgCl₂ içeren çözelti (pH 7,4) ile yıkanmış ve son olarak 1 mmol L⁻¹ süktroz ve 3 mmol L⁻¹ MgCl₂'de çözölüp 2.500 V'da elektroporasyon uygulanmıştır.

Metod 4: 1 gece geliştirilmiş hücrelerden 100 mL MRS besiyerine OD_{600nm} 0,35 olacak şekilde ekilmiş ve OD_{600nm} 0,6'ya kadar gelişimin ardından hücreler hemen soğutulup santrifüj ile elde edilmiştir. Takiben hücreler bir kez soğuk 10 mM MgCl₂ ile yıkanmıştır. Daha sonra yıkama işlemi soğuk 0,5 M süktroz ve %10 gliserol ile tekrarlanmış ve aynı çözeltide çözölüp 40 µL olacak şekilde soğuk tüplere ayrılmıştır. 5 µL plazmid elektrokompotent hücrelere eklenmiş ve 3 dk inkübasyonun ardından 1.500 V'da elektroporasyon gerçekleştirilmiş ve 80 mM MgCl₂ içeren MRS'den 460 µL ilave edilip hücreler geliştirilmiştir.

2.2 Protein Biyokimyası

2.2.1 Rekombinant Bakteriyel Hücrelerde Protein Ekspresyonu ve Ekstraksiyonu

Spesifik glukonükraz ve glukonotransferaz genleri sırasıyla, IPTG ile indöklenebilir vektörler olan pET15b ve pET28a'ya klonlanmış ve konakçı *E. coli* BL21 (DE3) 'de GTFA ve GTFB enzimleri eksprese edilmiştir (Klonlama prosedürü ile ilgili detaylar Bölüm 2.1.13'de açıklanmıştır). Bu amaçla TOP10'dan elde edilen pE8103 ve pE8104 vektörleri *E. coli* BL21 (DE3)'e elektrotransformasyon ile transforme edilmiş ve vektörler sırasıyla ampisilin ve kanamisin içeren LB besiyerlerinde seçilmiş ve yine

aynı koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Takiben 1 gece boyunca gelişen kolonilerden tekrar ilgili antibiyotikleri içeren LB besiyerlerine ekim yapılmış ve hücreler orta log faza geldiklerinde (OD_{600nm} 0,4-0,6) besiyerine 0,1 M IPTG ilave edilmiştir ve hücreler 2, 3 ve 4 saat olmak üzere farklı koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Hücrelerin gelişme süresinin tamamlanmasının ardından hücreler santrifüj işlemi ile ($3.000 \times g$, 10 dk, $4^{\circ}C$) elde edilmiş ve hücre pelletleri $-20^{\circ}C$ 'de 1 gece bekletilmiştir.

Sonrasında $-20^{\circ}C$ 'de 1 gece bekletilmiş hücrelerden GTFA enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için His-tag içeren proteinler Qiagen Ni-NTA Fast Start Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Ekstraksiyon ve saflaştırma çalışmalarında üreticinin protokolü kullanılmıştır. GTFB proteininin literatür verilerine göre inklüzyon gövdesi oluşturup hücre duvarına bağlandığı gösterilmiştir [109]. Bu nedenle GTFB enziminin ekstraksiyonu için GTFA enziminden farklı bir yol izlenmiştir. GTFB enziminin hücre duvarından ekstraksiyonu B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, ABD)'ı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi üreticinin protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

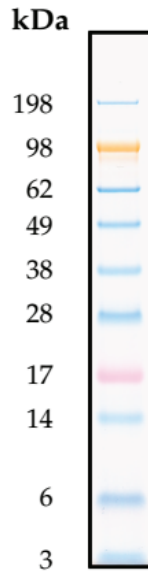
2.2.2 Saflaştırılan Enzimlerin Protein Miktarlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Ekstraktlardaki protein miktarı Bradford metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılarak protein miktarı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla $0-200 \mu g mL^{-1}$ arasında farklı konsantrasyonlarda BSA içeren çözeltiler hazırlanmış ve bu miktarın karşılık geldiği OD_{600nm} değerleri Bradford çözeltisi kullanılarak belirlenmiş ve kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Aynı metot kullanılarak örneklerdeki protein miktarı belirlenmiştir. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için spektro kuvetlerine $10 \mu L$ ekstrakte edilen proteinlerden aktararak üzerine Bradford Reagent'dan $190 \mu L$ ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben $800 \mu L$ saf su ilave edilerek OD_{600nm} değerleri ölçülmüştür.

2.2.3 Protein Ekspresyonlarının SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ile Kontrol Edilmesi

Örneklerdeki protein miktarının belirlenmesinin ardından her bir örnekte $10 \mu g mL^{-1}$ protein olacak şekilde yürütülecek örnek hacimleri belirlenmiş ve proteinlerin tespiti amacıyla SDS-PAGE işlemi uygulanmıştır [7]. Bütün SDS-PAGE ekipmanları Invitrogen'den temin edilmiştir. Protein örneklerine LDS tamponu ve indirgeme ajanı ilavesinden sonra örnekler $70^{\circ}C$ 'de 10 dk ısıtılıp denatüre edilmiş ve örneklerin belirlenen hacimleri protein jeline yüklenmiştir. Proteinlerin boyutlarının belirlenmesi

amacıyla kontrol olarak SeeBlue Plus ladder (Invitrogen) kullanılmıştır (Şekil 2.4). Protein örnekleri %10 NuPage Novex Bis-Tris jelde 3-Nmorpholinopropanesulfonic acid (MOPS) tamponu içerisinde yürütülmüştür. Örneklerin elektroforezi 200 V'da 50 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemini takiben jel kabı kırılıp jel içerisinden alınmış ve öncelikle 3 defa 5 dk boyunca dH₂O'da yıkandıktan sonra 1 saat boyunca 20 mL Simply Blue Safestain (Invitrogen) ile boyanmıştır. Son olarak jeller 1 saat veya yetmezse 1 gece boyunca dH₂O'da durulanmış ve ardından jellerin fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 2.4 SeeBlue Plus ladder (Invitrogen)

2.2.4 Histidin ile İşaretli Rekombinant Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

Proteinlerin görüntülenmesinin ardından proteinlerin doğrulanması amacıyla Western Blot işlemi uygulanmış olup bu amaçla kullanılan prosedür Dertli [7]'de bildirildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin üretildiğinin doğrulanmasının ardından yukarıda ifade edilen işlemler 500 mL hacimde kültürlerin geliştirilmesini takiben gerçekleştirilmiş ve His-tag içeren proteinler Qiagen Ni-NTA Fast Start Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma çalışmalarında üreticinin protokolü kullanılmıştır. Ek olarak GTFB proteini literatür verilerine göre inklüzyon gövdesi oluşturup hücrelerin hücre duvarına bağlandığı gösterilmiştir [109]. Dolayısıyla hücre ekstraktlarından da protein B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak elde edilmiştir.

2.3 *L. reuteri* E81 Suşundan Glukan Üretiminden Sorumlu Glukansükraz Geninin Silinmesi

2.3.1 *L. reuteri* E81’de Glukan Üretiminden Sorumlu Glukansükraz Geninin Tespiti

L. reuteri E81 suşuna ait www.rast.nmpdr.org veritabanına yüklenen tüm sekansta otomatik olarak herhangi bir *gtfA* geni ile eşleşme olmamıştır. Bunun üzerine 1984 genin tamamı BLAST sistemine yüklenmiş ve veri tabanında yüklü diğer *gtfA* genleri ile Genomdaki herhangi bir genin eşleşme yapıp yapmadığı belirlenmiş ve Genomda *gtfA* geni tespit edilmiştir. İlgili genlerin muhtemel protein yapısı <https://web.expasy.org/translate/> altyapısı kullanılarak ortaya çıkarılmış ve protein yapıları şimdiye kadar NCBI veritabanına yüklenen proteinler ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla GTFA enziminin yapısı *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB1355, *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, SD2112, I5007, 180, 121 ve TMW1.106’da ortaya çıkarılan GTFA proteinleri ile <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> çoklu sekans karşılaştırma programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

2.3.2 Glukansükraz Genine Spesifik Primerin Dizaynı

gtfA geninin tamamı 5304 bp uzunluğunda olup bu uzunluktaki genin silinmesi amacıyla iki aşamalı bir strateji izlenmiştir. Bu işlem genin upstream bölgesinden yaklaşık 1300 baz downstream bölgesinden de yaklaşık 1100 bazın alınıp bunların vektörde birleştirilmesi ve böylece inaktif genin vektör eliyle *L. reuteri* E81 genomuna ilave edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesi amacıyla ilk olarak ürüne KpnI ve XhoI bölgeleri eklenip vektör pG⁺host9’a ilave edilmiş ve ardından ikinci ürüne ise XhoI ve HindIII bölgeleri ilave edilerek PZR işlemi ile elde edilmiştir. Takiben ikinci ürün XhoI bölgesinden plasmid ile birleştirilerek vektör elde edilmiştir. Bu amaçla *gtfA* geninin ilk kısmı (*gtf1*)

gtf9_KpnI_F (5’-TTTGGTACCATACTGACCAACCAG-3’) ve

gtf9_Xho_R (5’-TCCTCGAGGTTATCACTTGCCAT-3’)

primleri marifetiyle ampilifiye edilmiştir.

Genin ikinci kısmı (*gtf2*) ise

gtf9_Xho_F (5’-TCCTCGAGTGATCAAGATGCAC-3’) ve

gtf9_HindIII_R (5’-TGTAAGCTTGCTTCAGTAGCAGA-3’)

primerleri ile ampilifiye edilmiştir.

2.3.3 Glukan Üretemeyen *L. reuteri* E81 Δ gtfA Suşunun Standart Moleküler Tekniklerin Kullanımı ile Elde Edilmesi

gtfA geninin *L. reuteri* E81 suşundan silinmesi amacı ile ilk olarak gtfA geninin ilk kısmı (gft1) Tablo 2.4'de verilen primerler için uygun Tm'de sırası ile Tablo 2.9 ve 2.10'da verilen PZR bileşimi ve PZR şartları kullanılarak ampilifiye edilmiştir. Alternan üretemeyen *L. reuteri* E81 Δ gtfA mutantının elde edilmesi amacıyla sıcaklık hassasiyeti olan pG⁺host9 vektörü kullanılmıştır. pG⁺host9 vektörü eritromisin direnç geni taşımakta olup 30°C de replike olabilirken 42°C de replike olamamaktadır [7] ve bu vektörün MCS (Multiple cloning sites) bölgesinde KpnI, XhoI ve HindIII restriksiyon bölgeleri yer almaktadır. pG⁺host9 vektörü Bölüm 2.1.5'de belirtildiği gibi E.Z.N.A Plasmid Mini Kit kullanılarak ekstrakte edilmiştir. gtfA geninin ilk kısmı (gft1) ve pG⁺host9 plazmidi, KpnI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile Bölüm 2.1.8'de belirtildiği şekilde kesilmiş ve vektör ekstra olarak Bölüm 2.1.9'da belirtilen şartlarda defosforilize edilmiştir. Takiben kesilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve miktarlarına bağlı olarak Tablo 2.8'de belirtildiği gibi Ligasyon miksi hazırlanıp bir gece ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon miksi vektöre özgü

pGhost R (5'-TACTACTGACAGCTTCCAAGG-3')

pGhost 1 (5'- AGTCACGACGTTGTAAAACGACG-3')

primerleri kullanılarak PZR işlemi ile kontrol edilmiş ve istenen ürünün vektöre entegre olup olmadığı ligasyon ürününün agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile tespit edilmiştir. Ligasyon PZR şartları ve PZR bileşimi Bölüm 2.1.11.2'de detaylı olarak verilmiştir. Ligasyon sonucu pozitif bulunan vektörler elektroporasyon ile TOP10 hücresine atılmış ve eritromisin içeren LB agara ekim işleminin ardından petriler 30°C'de koloniler gelişene kadar bekletilmiştir. Gelişen kolonilerde pE8101 vektörünün varlığı koloni PZR işlemi ile pGhost R ve pGhost 1 primerleri kullanılarak test edilmiştir. Pozitif koloni(ler) eritromisin içeren LB besiyerinde geliştirilmiş ve plasmid pE8101 E.Z.N.A plasmid ekstraksiyon kiti marifetiyle ekstrakte edilmiştir. Takiben pE8101 plazmidi ve gtfA geninin ikinci kısmına (gft2) ait PZR ürünü XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiş yukarıda gerçekleştirilen işlemleri takiben pE8102 vektörü elde edilmiştir. Elde edilen bu vektör Bölüm 2.1.14'de hazırlanışı detaylı olarak açıklanmış olan elektrokompotent *L. reuteri* E81 hücrelerine aktarılmıştır. Elektroporasyon işleminin ardından hücreler 3 saat mMRS'te geliştirilmiş ve eritromisin içeren MRS agara ekim işleminin ardından koloniler 30°C'de gelişime bırakılmıştır. Pozitif transformantlar sonrasında PZR işlemi ile

doğrulandıktan sonra gen silme işlemine geçilmiştir. Pozitif transformantlar elde edildikten sonra hücreler MRS'de 30°C'de 1 gece geliştirilmiştir. Sonraki aşamada sıcaklık 42°C'ye yükseltilmiş ve vektörün kendi başına gelişme imkanı kalmamış ve dolayısıyla *L. reuteri* E81 genomik DNAsı ile ortak olan kısımlarından DNAYA bağlanmıştır. Sonraki aşamada sıcaklık tekrar 30°C düşürülmüş daha sonra MRS+ Ery ve MRS- Ery petrilere hazırlanıp ve tekrar sıcaklık 42°C'ye yükseltilmiştir. Ardından tek koloniler aynı anda hem MRS+ ve MRS- Ery petrilere ekilmiş ve MRS- Ery'de gelişip MRS+Ery'de gelişmeyenler çift crossover için ilgili primerler vasıtasıyla kontrol edilmiştir. Sonuç olarak $\Delta gtfA$ geni *L. reuteri* E81'in Genomundan silinmiştir.

2.3.4 *L. reuteri* E81 ve EPS Üretmeyen $\Delta gtfA$ Suşundan EPS İzolasyonu

L. reuteri suşlarından EPS izolasyonu amacıyla suşlar gliserol stoklarından MRS besiyerinde aktifleştirildikten sonra MRS'de yer alan maya ekstraktının EPS'e olabilecek muhtemel kontaminasyonundan dolayı EPS izolasyonu modifiye BHI besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Modifiye BHI besiyerinin formülasyonu Bölüm 2.1.1'de detaylı olarak verilmiştir. *L. reuteri* suşları 37°C'de aerobik koşullar altında 2 gün süreyle geliştirildikten sonra EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla tez çalışması boyunca EPS izolasyonu amacıyla Dertli [7]'de ifade edilen izolasyon metodu kullanılmıştır. İnkübasyonu takiben ilk olarak hücreler 6.000 x g (4°C 30 dakika)'de elde edilmiş, bakteriyel çökelti ve süpernatant ayrılmıştır. Bakteriyel çökelti daha sonra 50 mL H₂O'da çözülmüş ve hücreye az da olsa bağlı formda olabilecek EPS sonikasyon işlemi uygulanarak veya 0,05 M EDTA ile çözülerek hücrelerden ayrılmıştır. Sonraki basamakta tekrar 6.000 x g (4°C 30 dakika)'de santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatanta eşit miktarda soğuk etanol ilave edilerek EPS 4°C'de 1 gece bekletilerek çökeltilmiştir. Esas alternanın izole edileceği ilk basamaktaki süpernatanta da eşit miktarda soğuk etanol ilave edilerek alternan çökeltilmiştir. Bu aşamadan sonra her iki EPS türüne aynı işlemler uygulanmıştır. Bir gece bekletilen örnekler 10.000 x g 'de 30 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra çökelen EPS toparlanmıştır. EPS çökeltisi daha sonra suda hafif bir ısıtma işlemi ile (50°C'de) çözülüp hacmin 2 katı kadar soğuk etanol ilave edildikten sonra bir gece daha 4°C'de bekletilmiştir. EPS tekrar santrifüj ile elde edilip H₂O'da çözülmüş ve EPS dışında bulunabilecek şeker bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için çökelti 3 gün boyunca diyaliz işlemine (12.000-14.000 Da) tabi tutulmuştur. Daha sonra EPS'ye karışmış olabilecek protein bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için dializ işlemine tabi tutulmuş EPS çözeltileri %10 TCA ile muamele edilip 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Çökelen proteinler 10.000 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek EPS'den ayrılmıştır. Bu işlemin ardından süpernatanta 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek

4°C'de bir gece çöktürme işlemi uygulanmış ve çöken EPS H₂O'da çözündürülmüştür. Bu işlemin ardından EPS çözeltisi daha sonraki dondurularak kurutma işlemi için steril filtrelerden geçirilerek 4°C'de muhafaza edilmiş ve dondurularak kurutularak liyofilize EPS elde edilmiştir.

2.3.5 Fenol-Sülfürik Asit Testi ile EPS Üretim Miktarlarının Tespiti

Tez çalışması boyunca elde edilen EPS ve diğer oligosakkaritlerin miktarları fenol-sülfürik asit metodu ile test edilmiştir [110]. Bu amaçla glukoz kullanılarak standart seyreltiler ile (0'dan 1 mg mL⁻¹'ye kadar) kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Daha sonra 50 µL örnek spektro küvetlerine konmuş ve üzerine 150 µL %98'lik sülfürik asit ilave edildikten sonra 30 µL %5'lik fenol ilave edilmiş ve 5 dakika renk gelişimi için beklenmiştir. Takiben örneklerdeki şeker miktarı spektrofotometrede OD_{490nm} ile ölçülmüş ve glukoz eğrisi kullanılarak örneklerin şeker miktarları belirlenmiştir. Fenol sülfirik asit testi ile liyofilizasyon sonrası üretilen oligosakkarit miktarı belirlenmiştir.

2.3.6 *L. reuteri* E81 ve *L. reuteri* Δ*gtfA* Suşundan İzole Edilen EPS'in Şeker İçeriğinin HPLC ile Belirlenmesi

L. reuteri E81 daha önce ifade edildiği gibi geliştirilip EPS izole edilmiş ve EPS'in tekrarlama ünitesi HPLC analizi (Schimadzu) ile belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak liyofilize EPS %72 lik perklorik asit kullanılarak 80°C'de 1 saat boyunca yakılmış ve EPS çözeltisi 5 M KOH ile nötralize edilmiştir. Yakılan örnekler oluşan tuzun çöktürülmesi için 12.000 x g (4°C'de 5 dk)'de santrifüjlenip 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve monosakkarit kompozisyonu HPLC'de belirlenmiştir. 20 µL örnek HPLC'ye verilmiş ve mobil faz H₂O, akış hızı 0,4 mL dk⁻¹ ve kolon sıcaklığı 85°C olmak üzere CARBOsep CHO-682 Pb kolon ve RID-10A refraktif indeks detektöründe şekerler tespit edilmiştir. Standart şeker olarak glukoz, galaktoz, maltoz ve fruktoz kullanılmıştır.

2.4 Glukanın Ekşi Hamur ve Ekşi Hamur Ekmeği Üzerine Etkisi

Ekşi hamurun niteliği ve ekşi hamur ekmeğinin kalite özellikleri üzerine alternan üretiminin etkisinin araştırılması amacıyla *L. reuteri* E81, Δ*gtfA* mutantı ve ilave olarak *L. reuteri* E81'den ekstrakte ettiğimiz alternan ilavesi ile ekşi hamur ekmekleri üretilip ekşi hamurların ve ekmeklerinin sırasıyla reolojik ve tekstürel nitelikleri incelenmiştir.

2.4.1 *L. reuteri* E81 ve Δ gtfA Suşları ile Ekşi Hamur Üretimi

Tablo 2.13’de belirtildiği gibi *L. reuteri* E81 ve Δ gtfA suşu kullanılarak hazırlanan taze hamur formülasyonları belirtilen şartlarda fermente edilerek ekşi hamur elde edilmiştir. Kontrol olarak ise her iki suşu da içermeyen asetik asit kullanılarak pH sı yaklaşık 4,0’a ayarlanmış kontrol hamuru hazırlanmıştır.

Tablo 2.13 *L. reuteri* E81 ve Δ gtfA suşu kullanılarak üretilen ekşi hamur bileşimi ve fermantasyon şartları

Hamur Bileşimi	Fermantasyon Şartları (sıcaklık-süre)		
	Kontrol	E81	Δ gtfA
Un (Tip 550)	100 g	100 g	100 g
Su	90 g	90 g	90 g
Sükroz	30 g	30 g	30 g
<i>L. reuteri</i> E81 (10^9 kob mL ⁻¹)	-	10 mL	-
<i>L. reuteri</i> Δ gtfA (10^9 kob mL ⁻¹)	-	-	10 mL
*Asetik asit	10 mL	-	-

* Asetik asit hamur pH’sı 4,0 olacak şekilde katılmış ve kullanılan hacim su ile 10 mL’ye tamamlanmıştır.

2.4.2 Üretilen Ekşi Hamurların Bazı Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Üretilen hamur örneklerinin 2. ve 24. saatinde pH ve titrasyon asitliği belirlenmiştir. Hamur örneklerinin pH analizi dijital pH-metre (WTW Inolab 7110) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hamur örneklerinin titrasyon asitliğini belirlemek için 5 g hamur örneği tartılmış ve üzerine 45 mL damıtık su ilave edilerek homojen karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra karşıma 0,5 mL fenolftalein indikatörü eklenerek 0,1 N NaOH ile pH 8,1 olana kadar titre edilmiştir. Hamur örneklerinin titre edilebilir asitlik derecesi % asetik asit cinsinden aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Asetik asit} = (V \times 0,006 \times 100) / m$$

V: Titrasyonda kullanılan 0,1 N NaOH miktarı (mL)

0,006: Eşdeğer asetik asit

m: Titrasyonda kullanılan ekşi hamur miktarı (g)

2.4.3 Dondurularak Kurutulmuş Ekşi Hamurların Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Alternan üretiminin ekşi hamurdaki etkisinin gözlenmesi adına *L. reuteri* E81 ve $\Delta gtfA$ mutant suşları ile yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan ekşi hamurlar liyofilize edilmiş ve *in situ* glukan üretiminin potansiyel etkisini gözlemlemek için morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile test edilmiştir. Ekşi hamur morfolojilerini SEM ile analiz etmek için FEI Nova SEM 450 cihazı kullanılmıştır. 5 mg liyofilize ekşi hamur SEM tablalarına fikse edilmiş ve yaklaşık 10 nm kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Ekşi hamur örnekleri 5.0 kV voltaj ile 250'den 2500 x büyütme seviyelerinde gözlenmiştir.

2.4.4 Üretilen Ekşi Hamurların Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Hamur örneklerinin reolojik özellikleri, kontrollü gerilimli reometre (Anton Paar MCR 302, Avusturya) sistemine entegre edilmiş nişasta hücresi (Rapid Visko Analizörü/Hızlı Vizkozite Test cihazı) kullanılarak yapılmıştır. Hamur nişastasının çirşlenme, vizkozite, yapışkanlık, jelatinizasyon, çözünürlük, sinerezis gibi reolojik özelliklerini belirlemek amacıyla aşağıdaki parametreler test edilmiştir [111]:

- a) Pik vizkozitesi (şişme sonucu vizkozitenin artarak pik noktasına ulaştığı vizkozite)
- b) Trough (ani düşüş) vizkozitesi (Maksimum sıcaklık uygulandıktan sonra ölçülen minimum vizkozite)
- c) Breakdown vizkozite (Pik sonrası minimum vizkozite)
- d) Final vizkozitesi (Test süresi sonrası vizkozite)
- e) Setback vizkozitesi (Retrogradasyon sonrası oluşan vizkozite).
- f) Pasting vizkozitesi (unun veya nişastanın ısıtılması ve soğutulması neticesinde elde edilen vizkozite)
- g) Pasting sıcaklığı (Nişasta granüllerinin şişmeye ve jelatinize olmaya başladığı sıcaklık)

2.4.5 *L. reuteri* E81 ve $\Delta gtfA$ Suşları ile Üretilen Ekşi Hamurlar Kullanılarak Ekşi Hamur Ekmeği Üretimi

Bölüm 2.4.1'de belirtildiği gibi üretilen ekşi hamurların 24 saat fermantasyon süresini tamamlamasını takiben üretilen bu ekşi hamurlar ile ekmek yapılıp ekmeğin tekstürel niteliklerine alternanın etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla ekmek hamuru Chen vd.

[76]'ya göre un, unun %55i olacak şekilde su, unun %10u olacak şekilde hazırlanan ekşi hamur, unun %2si kuru maya, unun %1,5'i olacak şekilde tuz olacak şekilde hazırlanmıştır. Kontrol hamurunda ise ekşi hamur su ve un ile yer değiştirilerek hazırlanmıştır. Ayrıca ekmek üretimi açısından EPS'in *ex situ* olarak hamur ortamına eklenmesi veya EPS'nin *in situ* olarak fermantasyon sırasında üretilmesinin ekşi hamur ekmeğinin tekstürel özellikleri üzerine etkisini belirlenmek için aşağıda belirtildiği gibi $\Delta gtfA$ mutan ve ilave olarak *L. reuteri* E81'den ekstrakte ettiğimiz alternan ilavesi ile ekşi hamur ekmeği üretilmiştir.

Sonuç olarak;

- 1- *L. reuteri* E81 ile hazırlanan ekşi hamur ile üretilen ekmek
 - 2- *L. reuteri* E81 $\Delta gtfA$ ile hazırlanan ekşi hamur ile üretilen ekmek
 - 3- *L. reuteri* E81 $\Delta gtfA$ ile hazırlanan karışıma %0,09 alternan katılarak üretilen ekmek
 - 4- *L. reuteri* E81 $\Delta gtfA$ ile hazırlanan karışıma %0,19 alternan katılarak üretilen ekmek
 - 5- Kontrol hamuru ile üretilen ekmek
- olmak üzere 5 farklı ekmek üretilmiştir.

2.4.6 *L. reuteri* E81 ve $\Delta gtfA$ Suşları ile Üretilen Ekşi Hamur Ekmeklerinin Tekstürel Özelliklerinin Belirlenmesi

Üretilen ekmeklerin sertlik değerleri Texture Analyzer cihazı (Stable Mycro Systems TA TX Plus, İngiltere) kullanılarak 0., 2., 5. ve 8. günlerde belirlenmiştir. Ekmekler depolama boyunca oda sıcaklığında poşetlerde saklanmıştır. Tekstürel niteliklerin belirlenmesi amacıyla, örnekler yüksekliğinin %50 ve %70'ine kadar sıkıştırılarak ikili sıkıştırma testi gerçekleştirilmiştir. Her iki sıkıştırma döngüsü arasındaki süre 5 s olmuştur. Kuvvet-zaman deformasyon kurveleri, 25 veya 50 kg'lık load cell'ler kullanılarak elde edilmiştir. Tekstür profil analizi ile ekmeklerin Hardness (Sertlik, N: Örneği sıkıştırmak için sarfedilen maksimum kuvvet) parametreleri test edilmiştir [112].

2.5 Glukansükraz (GTFA) Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

2.5.1 *L. reuteri* E81'den *gtfA* Geninin Klonlanması İçin Uygun Ekspresyon Vektörünün Seçimi ve Spesifik Primerlerin Dizaynı

GTFA enziminin üretimi amacıyla öncelikle enzimin katalitik bölgesi literatür bilgileri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Takiben enzimin üretimi için en ideal ekspresyon vektörünün belirlenmesi amacıyla enzimdeki mevcut restriksiyon bölgeleri <http://www.restrictionmapper.org/> programı kullanılarak belirlenmiş ve vektördeki MCS bölgelerinde bulunan restriksiyon enzimlerinin genlerin yapısında olmamasına dikkat edilmiştir. Veriler GTFA'nın pET15b'de eksprese edilebileceğini göstermiştir. pET15b vektörü IPTG ile indüklenebilir vektör olup bu şekilde protein üretimi gerçekleştirilmiştir. *gtfA* geninin pET15b'ye eklenmesi amacıyla *L. reuteri* E81'in Genomik DNA'sı DNA ekstraksiyon kiti (Vivantis, Malezya) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. *gtfA* geninin katalitik 3096 bp olan bölgesi için

Gtf_XhoI_2 (5'-TCCTCGAGACTATTAATGGCCAACAATAC-3')

Gtf_BamHI2 (5'-GTGGATCCTTTTGGCCGTTTAAAT-3')

primerleri dizayn edilmiş ve katalitik bölgeyi içeren PZR ürününe XhoI ve BamHI bölgeleri ilave edilmiştir.

2.5.2 *L. reuteri* E81'den *gtfA* Geninin Standart Moleküler Tekniklerin Kullanımı ile Klonlanması

gtfA genini amplifiye etmek için Gtf_XhoI_2 ve Gtf_BamHI2 primerleri kullanılmış ve bu amaçla Thermofisher Phusion Polimeraz kullanılarak PZR işlemi bölüm 2.1.11.1'de detaylı olarak verilen şartlarda gerçekleştirilmiştir. *gtfA* geninin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR bileşimi, tavlama sıcaklığı ve PZR şartları sırası ile Tablo 2.9, Tablo 2.4 ve Tablo 2.10'da belirtildiği şekliyle uygulanmıştır. PZR işlemini takiben PZR ürününden 10 µL alınarak DNA ladder ile birlikte agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve Etidyum bromür ile boyandıktan sonra jel görüntülenmiştir. PZR işlemini takiben amplifiye edilen *gtfA* geninin PZR ürünü ve pET15b vektörü sırasıyla XhoI ve BamHI (Thermofisher, ABD) restriksiyon enzimleri ile Bölüm 2.1.8'de ifade edildiği gibi kesilmiş ve jelde kesim ürünlerinin miktarı kontrol edilmiştir. Vektördeki self-ligasyonun engellenmesi amacıyla vektör kesim işlemini takiben FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermofisher, ABD) ile muamale edilerek defosforilize edilmiştir (Bölüm 2.1.9). Takiben Ligasyon kiti (Thermofisher, ABD) kullanılarak ürünler ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon işleminde

üreticinin önerdiği koşullara riayet edilerek işlemler gerçekleştirilmiştir (Bölüm 2.1.10). 1 gece ligasyon işlemini takiben *gtfA* geninin ligasyon ürünü pET15b'ye özgü T7P2 (5'-TGAGCGGATAACAATTCCC-3') ve T7T (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') primerleri kullanılarak PZR işlemi ile kontrol edilmiştir. Reaksiyon miksi Gotaq Polimeraz (Promega, ABD) kullanılarak Bölüm 2.1.11.2 'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Ligasyonun pozitif olmasını takiben pE8103 vektörü Bölüm 2.1.13'de hazırlanışı detaylı olarak açıklanan elektrokompotent *E. coli* TOP10 hücrelerine [7] elektroporasyon işlemi ile 2000 V uygulama voltajında atılmıştır. Hücrelerin 37°C'de 3 saat (250 rpm çalkalamalı şartlar) gelişimini takiben pE8103 plasmidini seçmek amacıyla ampicilin içeren LB agara ekim işlemi gerçekleştirilmiş ve petriler 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde tek kolonilerin gelişimini takiben koloniler 10 µL H₂O'ya alınmış ve primerler T7P2 ve T7T kullanılarak koloni PZR işlemi uygulanıp pozitif koloniler tespit edilmeye çalışılmıştır. Takiben pozitif klonlarda oryantasyon sekanslama işlemi ile doğrulanmış ve pozitif klonların gliserol stokları yapılmış ve enzim üretimi işlemi için saklanmıştır. Yukarıda ifade edildiği gibi *gtfA* geni IPTG ile uyarılabilir vektör pET15b'ye klonlanmış ve sonrasında konak *E. coli* BL21 (DE3)'de GTFA enzimi üretilmiştir. Bu amaçla TOP10'da elde edilen pE8103 vektörü *E. coli* BL21 (DE3)'e elektrotransformasyon ile transforme edilmiş ve vektör ampicilin içeren LB besiyerinde seçilmiş ve yine aynı koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Pozitif klonların gliserol stokları yapılmış ve enzim üretimi işlemi için saklanmıştır. GTFA enziminin ekspresyonu, ekstraksiyonu ve saflaştırılması Bölüm 2.2.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

2.6 4,6- α -Glukanotransferaz (GTFB) Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

2.6.1 *L. reuteri* E81'den *gtfB* Geninin Klonlanması İçin Uygun Ekspresyon Vektörünün Seçimi ve Spesifik Primerlerin Dizaynı

GTFB enziminin üretimi amacıyla öncelikle enzimin katalitik bölgesi literatür bilgileri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Takiben enzimin üretimi için en ideal ekspresyon vektörünün belirlenmesi amacıyla enzimdeki mevcut restriksiyon bölgeleri <http://www.restrictionmapper.org/> programı kullanılarak belirlenmiş ve vektördeki MCS bölgelerinde bulunan restriksiyon enzimlerinin genlerin yapısında olmamasına dikkat edilmiştir. Veriler GTFB'nin pET28a'da eksprese edilebileceğini göstermiştir. pET28a vektörü IPTG ile indüklenebilir vektör olup bu şekilde protein üretimi gerçekleştirilmiştir. *gtfB* geninin pET28a'ya eklenmesi amacıyla *L. reuteri* E81'in Genomik DNA'sı DNA ekstraksiyon kiti (Vivantis, Malezya) kullanılarak ekstrakte

edilmiştir. *gtfB* geninin katalitik 2663 bç olan bölgesi için

76_HindF (5'- TGTAAGCTTGCACCGATCAGCTCAT-3') ve

76_XhoR (5'- TCCTCGAGGTTGTTAAAGTTTAATGAAAT-3')

primerleri dizayn edilmiş ve katalitik bölgeyi içeren PZR ürününe HindIII ve XhoI bölgeleri ilave edilmiştir.

2.6.2 *L. reuteri* E81'den *gtfB* Geninin Standart Moleküler Tekniklerin Kullanımı ile Klonlanması

gtfB geni dizayn edilen 76_HindF ve 76_XhoR primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu amaçla Thermofisher Phusion Polimeraz kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. *gtfB* geninin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR miksi ve PZR şartları sırası Tablo 2.9 ve Tablo 2.10 'da belirtildiği şekliyle uygulanmıştır. PZR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenmiş ve optimize koşullarda tek bant elde edilmiştir. PZR işlemini takiben *gtfB* geninin PZR ürünü ve pET28a vektörü sırasıyla HindIII ve XhoI (Thermofisher, ABD) restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve vektördeki self-ligasyonun engellenmesi amacıyla vektör kesim işlemini takiben FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermofisher, ABD) ile muamale edilerek defosforilize edilmiştir. Ardından jelde kesim ürünlerinin miktarı kontrol edilmiştir. Takiben Ligasyon kiti (Thermofisher, ABD) kullanılarak ürünler ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon işleminde üreticinin önerdiği koşullara riayet edilerek işlemler gerçekleştirilmiştir. 1 gece ligasyon işlemini takiben *gtfB* geninin ligasyon ürünü pET28a'ya özgü 28P (5'- TTAATACGACTCACTATAGGG -3') ve 28R (5'- GGGCTTTGTTAGCAGCC -3') primerleri kullanılarak PZR işlemi ile kontrol edilmiştir. Reaksiyon miksi Gotaq Polimeraz (Promega, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır. Ligasyonun pozitif olmasını takiben pE8104 vektörü daha önceden hazırlanan elektrokompotent *E. coli* TOP10 hücrelerine elektroporasyon işlemi ile 2000 V uygulama voltajında atılmıştır. Hücrelerin 37°C'de 3 saat (250 rpm çalkalamalı şartlar) gelişimini takiben pE8104 plazmidini seçmek amacıyla kanamisin içeren LB agara ekim işlemi gerçekleştirilmiş ve petriler 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde tek kolonilerin gelişimini takiben koloniler 10 µL H₂O'ya alınmış ve primerler 28P ve 28R kullanılarak koloni PZR işlemi uygulanıp pozitif koloniler tespit edilmeye çalışılmıştır. Takiben pozitif klonlarda oryantasyon sekanslama işlemi ile doğrulanmış ve pozitif klonların gliserol stokları yapılmış ve enzim üretimi işlemi için saklanmıştır.

Yukarıda ifade edildiği gibi *gtfB* geni IPTG ile uyarılabilir vektör pET28a'ya klonlanmış

ve sonrasında konak *E. coli* BL21 (DE3)'de GTFB enzimi üretilmiştir. Bu amaçla TOP10'dan elde edilen pE8104 vektörü *E. coli* BL21 (DE3)'e elektrotransformasyon ile transforme edilmiş ve vektör kanamisin içeren LB besiyerinde seçilmiş ve yine aynı koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Pozitif klonların gliserol stokları yapılmış ve enzim üretimi işlemi için saklanmıştır. GTFB enziminin ekspresyonu, ekstraksiyonu ve saflaştırılması Bölüm 2.2.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

2.7 GTFA ve GTFB Enzimleri ile Aktivite Çalışmaları ve Biyokimyasal Karakterizasyonları

2.7.1 Glukansükraz (GTFA) Enziminin Aktivitesinin Tespiti

GTFA enziminin saflaştırılmasını takiben enzimin biyokimyasal nitelikleri Kralj vd. [69]'da belirtilen metot modifiye edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla 0,5 mL reaksiyon hacminde 1 mM CaCl_2 ve 100 mM sükroz 50 mM NaAC (pH 5,5) hazırlanmış ve 30 nM GTFA ortama ilave edilmiş ve reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilerek sükrozdan 15 dk sonunda ortaya çıkan fruktoz belirlenerek enziminin etkinliği test edilmiştir. Örnekten çıkan fruktoz DNS (Dinitrosalisilik asit) metodu kullanılarak belirlenmiş olup farklı fruktoz konsantrasyonları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak reaksiyon ortamında çıkan fruktoz oranı ve dolayısıyla enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bu aktivite diğer bütün biyokimyasal testler için kullanılmak üzere %100 olarak belirlenmiştir.

2.7.1.1 GTFA Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi

GTFA enziminin optimum çalışma sıcaklığının bulunması amacıyla reaksiyon ortamı yukarıda ifade edildiği şekilde hazırlanmış ve reaksiyon 20°C-60°C'ye kadar farklı sıcaklıklarda test edilmiştir. Her bir reaksiyonun sonunda enziminin etkinliği NaOH ilavesi ile sonlandırılmıştır.

2.7.1.2 GTFA Enzimi Üzerine pH'nın Etkisinin Belirlenmesi

GTFA enziminin optimum çalışma pH'sının bulunması amacıyla reaksiyon ortamı yukarıda ifade edildiği şekilde hazırlanmış ve reaksiyon ortamının pH'sı 3,5-9,0 arasında değişecek şekilde ayarlanmıştır. Takiben enzimin ilgili pH'lardaki aktivitesi başlangıçtaki enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak bulunmuştur.

2.7.2 Glukanların GTFA Enzimi ile *in vitro* Üretimi

GTFA enzimi ile 2.7.1’de belirtilen reaksiyon ortamı hazırlanmış ve reaksiyon 24 saat boyunca sürdürülmüştür. Takiben üretilen glukan etanol çöktürmesi ile reaksiyon ortamından alınmış ve miktarları 2.3.5’de ifade edildiği şekilde belirlenmiştir. Benzer olarak reaksiyon ortamındaki süktroz konsantrasyonunun oluşan glukan miktarına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla reaksiyon ortamına 10-100 mg mL⁻¹ ye kadar farklı konsantrasyonlarda süktroz ilave edilmiş ve 4, 8, 12 ve 24 saat olmak üzere reaksiyon sürdürülmüştür. Reaksiyonlar NaOH ilavesi ile sonlandırılmış ve üretilen glukan etanol ile çöktürülmüştür ve oluşan glukanın miktarı fenol-sülfürik asit testi ile belirlenmiştir [110].

2.7.3 4,6- α -Glukanotransferaz (GTFB) Enziminin Aktivitesinin Tespiti

GTFB enziminin *L. reuteri* E81 suşunda varlığı ortaya konmuş ve konak olarak *E. coli* BL21’de eksprese edilerek üretilmiştir. Bu enzim amiloz gibi α -1-4 bağları olan substratlardaki bu bağı hidrolize edip açığa çıkan glukoz unitelerini α -1-6 bağları ile bağlayarak hem hidroliz hem de transferaz aktivitesi göstermektedir. Bu kapsamda bu enzimin aktivitesi amiloz, patates nişastası, maltoz, izomaltoz, maltotrioz ve maltoheptozun substrat olarak kullanıldığı 25 mM NaAc, 1 mM CaCl₂ ile oluşturulan reaksiyon ortamında 37°C’de test edilmiş ve oluşan ürünlerin kontrolü TLC ve iyot testi ile gerçekleştirilmiştir.

2.8 Glukansükraz (GTFA) ve 4,6- α -Glukanotransferaz (GTFB) Enzimleri ile Oligosakkarit Üretimi

2.8.1 GTFA Enzimi ile Farklı Alıcı Şekerler Kullanılarak Oligosakkaritlerin Üretimi

GTFA enzimi ile özgün oligosakkaritlerin üretimi amacıyla maltoz ve gentiobioz alıcı olacak şekilde yukarıda belirtilen reaksiyon ortamında aksi belirtilmediği takdirde 0,4 g mL⁻¹ süktroz ve 0,1 g mL⁻¹ ilgili alıcı şeker olacak şekilde enzim ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Süktrozun ortamda bitmesi ile reaksiyon durdurularak reaksiyon ürünleri oluşan glukanın etanol ile çöktürülerek uzaklaştırılmasının ardından TLC, NMR ve LC/MS/QTOF ile karakterize edilmiştir. Reaksiyon ortamında oluşan fruktoz ve kalmış olabilecek süktroz ve diğer alıcılar 2.8.3’de belirtildiği şekilde ortamdan uzaklaştırılmıştır.

2.8.2 GTFB Enzimi ile Farklı Alıcı Şekerler Kullanılarak Oligosakkaritlerin Üretimi

GTFB'nin ortamda nispi olarak yüksek konsantrasyonda alıcı bir şekerin varlığında oluşabilecek oligosakkaritlerin tespiti amacıyla patates nişastası ve amiloz içeren yukarıda belirtilen ortama 25 mM glukoz ve 25 mM maltoz ilave edilmiş ve farklı inkübasyon süreleri sonunda oluşan ürünler TLC ile ve gerekli görüldüğü durumlarda LC/MS/QTOF ile analiz edilmiştir. Ürünlerin miktarları 2.3.5'e göre hesaplanmıştır.

2.8.3 Maya Hücrelerinin İmmobilizasyonu ve Oligosakkarit Dışındaki Şekerlerin Ortamdan Uzaklaştırılması

Alıcı reaksiyonları sonrasında ortamda kalan fruktoz ve varsa sükroz ve diğer basit şekerler ortamdan aljinatta immobilize edilmiş ticari ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Hu, Winter, Chen, & Ganzle, 2017). Bu kapsamda öncelikle maya hücreleri aljinat çözeltisinde immobilize edilerek boncuk formunda hücreler elde edilmiştir. Takiben alıcı reaksiyonlarının ürünlerine %10 oranında immobilize maya hücresi eklenmiş (%1'lik maya ilavesini yansıtacak şekilde) ve karışım 30°C'de 24 saat (eğer uzaklaştırılmak istenen şeker hala ortamda ise biraz daha fazla) inkübe edilmiştir. Reaksiyon ürünleri TLC ile takip edilmiş olup ortamda sadece mayanın metabolize etmediği oligosakkaritlerin bulunduğu tespit edilmesinin ardından aljinatta immobilize edilmiş maya hücreleri santrifüj işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Oligosakkaritlerden fruktoz ve reaksiyon sonunda kaldıysa sükroz ve diğer istenmeyen monosakkaritlerin uzaklaştırıldığı TLC işlemi ile kontrol edilmiştir.

2.8.4 Akseptör Reaksiyonları Sonucunda Oluşan Oligosakkaritlerin TLC ile Tespiti

GTFA reaksiyonları için oluşan oligosakkaritlerin gözlenmesi amacıyla TLC işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla reaksiyon ürünleri TLC plakalarına (silica gel 60 F254, 20 x 20 cm TLC sheets Merck, Darmstadt, Almanya) yüklenmiş ve ürünler Asetonitril:H₂O (80:20) çözücü sisteminde 90 dakika yürütülmüştür. Takiben reaksiyon ortamındaki karbonhidratlar metanol/sülfürik asit/N-1-naphthyl(ethylenediamine) dihydrochloride ile boyandıktan sonra ısı uygulamasına maruz bırakılarak gözlemlenmiştir.

GTFB reaksiyonlarında oluşan oligosakkaritler ise reaksiyon ürünlerinin TLC plakalarına (silica gel 60 F254, 20 x 20 cm TLC sheets Merck, Darmstadt, Germany) yüklenerek ürünlerin Butanol:Etanol:H₂O (5:5:3) çözücü sisteminde yürütülmesi ile

tespit edilmiştir. Ürünler çözücü sistemde 6 saat yürütülmüş ve takiben reaksiyon ortamındaki karbonhidratlar metanol:sülfürik asit (1:1) çözeltisine daldırıldıktan sonra ısı uygulamasına maruz bırakılarak gözlemlenmiştir.

2.8.5 Akseptör Reaksiyonları Sonucunda Oluşan Oligosakkaritlerin HPLC ile Tespiti

Oluşan oligosakkaritler TLC analizine ilave olarak HPLC ile de test edilmiştir. Oligosakkaritlerin HPLC ile analiz edilmesinde (Schimadzu) 20 µL örnek HPLC'ye verilmiş ve mobil faz olarak asetonitril:su (80:20, v/v) kullanılmıştır. Analizde HPLC'nin akış hızı 1,3 mL dk⁻¹ ve kolon sıcaklığı 35°C olmak üzere Zorbaks karbonhidrat kolonu (4,6 x 150 mm), ve RID-10A refraktif indeks detektörü kullanılmıştır

2.8.6 Akseptör Reaksiyonları Sonucunda Oluşan Oligosakkaritlerin Kimyasal Yapısının NMR Spektroskopisi ile Belirlenmesi

Akseptör reaksiyonları sonucunda üretilen oligosakkaritlerin kimyasal yapısının aydınlatılması amacıyla NMR Spektroskopisi kullanılmıştır. Bu amaçla oligosakkaritlerin hidrojen spekturumu 600 MHz (1H)'de belirlenmiştir. Örnek sıcaklığı 1H görüntülemesi için 338 K'ne çıkartılmıştır. Elde edilen spektrumlardan oligosakkaritlerin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır.

2.8.7 Oligosakkaritlerin LC/MS/Q-TOF ile Kütle Analizleri

Her iki enzimin reaksiyon ürünlerinin tespiti amacıyla LC/MS/Q-TOF kütle analizleri Yıldız Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Bu amaçla Agilent 6530 LC/MS/Q-TOF sistemi kullanılmış ve negatif iyonlaşma türünde 50-2500 m/z aralığında 2 spektra sn⁻¹ tarama aralığında 0.4 mL dk⁻¹ akış hızı ile su-metanol çözücü sisteminde 30°C'de ölçümlerin gerçekleştirilmesi amacıyla 10 µL örnek cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen spektrallarda beklenen kütlelerin varlığı takiben incelenmiştir.

2.9 GTFA VE GTFB Enzimleri ile Üretilen Oligosakkaritlerin Bağışıklık Düzenleyici Özelliklerinin Belirlenmesi

GTFA ve GTFB alıcı reaksiyon ürünleri ve alternanın pro-inflamatuar TNF-α, IL-12 ve anti-inflamatuar IL-10, IL-4 sitokinleri üzerindeki bağışıklık düzenleme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı olan HT-29

hücreleri kullanılmıştır. Bu amaçla HT-29 hücre hattı, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın, "American Tissue Type Culture Collection" (ATCC, ABD)'dan temin ettiği stoktan temin edilmiştir. HT-29 (ATCC HTB-38™, ABD) hücre hattı %10 fetal sıgır serumu (Gibco, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco, ABD) besiyerinde, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde geliştirilmiştir. Hücreler Horn vd. [113]'de ifade edildiği gibi pasajlanmış ve yeterli olgunluğa ulaştığı (6-7 pasaj sonunda) düşünüldüğünde oligosakkaritler ile indükleme işlemine geçilmiştir. Kullanılacak oligosakkaritlerin miktarı fenosülfirik asit testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla dondurularak kurutulmuş oligosakkarit karışımlarının toplam konsantrasyonu 1 mg mL⁻¹ olacak şekilde DMEM besiyerinde çözülmüştür. HT-29 hücreleri pasajlanarak sayılmış ve 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarına, kuyucuk başına 400.000 hücre olacak şekilde ekilerek 3 mL DMEM besiyerinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücre kültür kaplarının tabanına tutunan hücrelerin üzerine oligosakkarit karışımlarından, HT-29 hücrelerine 50 µg mL⁻¹ ve 100 µg mL⁻¹ olacak şekilde uygulanmış ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubuna sadece DMEM besiyeri eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra, 6-kuyucuklu plakalarda bulunan besiyerleri 15 mL'lik santrifüj tüplerine toplanmış ve toplanan besiyerleri ELIZA deneyi gerçekleşene kadar -20°C'de saklanmıştır. Sitokinlerden IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF-α miktarlarını belirlemek için gerekli ELIZA kitleri ticari olarak temin edilmiştir (Sunlong Biotech, ÇİN). Üreticinin metodolojisi takip edilerek oligosakkaritlerin indükledikleri IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF-α miktarları 450 nanometrede ELIZA okuyucu spektrofotometrede tespit edilmiştir. Sitokin indüksiyonu için işlemler iki biyolojik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar bu iki tekrarının ortalaması olarak elde edilmiştir.

2.10 Glukanın ve Oligosakkaritlerin Prebiyotik Etkilerinin Belirlenmesi

GTFA ile kurulan ve farklı alıcıların kullanıldığı alıcı reaksiyonları ile üretilen oligosakkaritlerin ve GTFB'nin maltoz, maltotrioz ve maltoheptozu substrat olarak kullanması ile ürettiği oligosakkaritlerin prebiyotik etkileri Cote ve Holt [100]'un kullandığı metoda göre belirlenmiştir. Kullanılacak oligosakkaritlerin miktarı fenosülfirik asit testi ile belirlenmiştir. Bu kapsamda kullanılan oligosakkaritler, probiyotik ve patojen türler Tablo 2.14'de verilmiştir.

Probiyotik ve patojen türler sırasıyla MRS ve BHI besiyerlerinde geliştirilmiş ve takiben oligosakkaritlerin prebiyotik fonksiyonlarının test edilmesi amacıyla LAB türleri ve Bifidobakteriler Tablo 2.15'da içeriği verilmiş olan %0,5 oligosakkarit içeren minimal

Tablo 2.14 Prebiyotik etkinin belirlenmesi için kullanılan oligosakkaritler, probiyotik ve patojen türler

GTFA-oligo	GTFB-oligo	LAB ve Bifidobakteriler	Patojen mikroorganizmalar
Alternan	Maltoz	<i>L. reuteri</i> TD-1	<i>S. Typhimurium</i> RSSK95091
Maltoz	Maltotrioz	<i>L. plantarum</i>	<i>E. coli</i> BC1402
Gentiobiyoz	Maltoheptoz	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>B. cereus</i> BC6830
		<i>B. breve</i>	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC27729
		<i>B. longum</i>	<i>S. aureus</i> ATCC25923
		<i>B. animalis</i>	

ortama %1 oranında ekilerek 37°C’de anaerobik olarak 24-48 saat geliştirilmiştir. Benzer olarak patojenler ise %0,5 oligosakkarit içeren modifiye TSB besi ortamına (Tablo 2.15) %1 oranında ekilmiş ve patojenler 37°C’de 24-48 saat aerobik olarak geliştirilmiştir.

Tablo 2.15 Prebiyotik etkinin belirlenmesi için oluşturulan minimal ortam içerikleri

Modifiye minimal MRS	g L ⁻¹	Modifiye TSB	g L ⁻¹
di-potasyum hidrojen fosfat	2,0	Kazeinden pepton	3,4
Amonyum sülfat	2,0	Sodyum klorür	5,0
Sodyum asetat	5,0	di-potasyum hidrojen fosfat	2,5
Magnezyum sülfat	0,2	Oligosakkarit	5,0
Maya ekstraktı	1,0		
Oligosakkarit	5,0		

İlgili probiyotik ve patojenlerin gelişimleri pozitif kontrol olarak glukoz ve negatif kontrol olarak hiçbir C kaynağının olmadığı şekilde de izlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir ortamdaki mikrobiyal yoğunluk OD₆₀₀ nm’de tespit edilmiş ve oligosakkaritlerin muhtemel prebiyotik etkileri belirlenmiştir.

2.11 İstatistiksel Değerlendirme

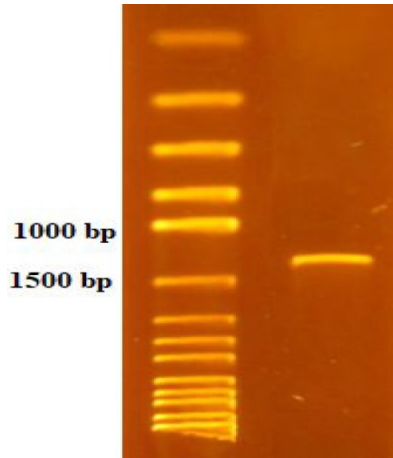
Farklı oligosakkaritlerin oluşturduğu sitokin indüksiyonu farklılıklarının tespiti amacıyla t test işlemi (graphpad) uygulanmış ve $p \leq 0,05$ oranındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli olarak sayılmıştır.

Ekmeğin tesktürel niteliklerinde ölçülen parametreler arasındaki istatistiki farklılığın belirlenmesi amacıyla ANOVA (SPSS Statistics 17.0, Armonk, NY) analizi uygulanmıştır.

3 BULGULAR VE TARTIŞMA

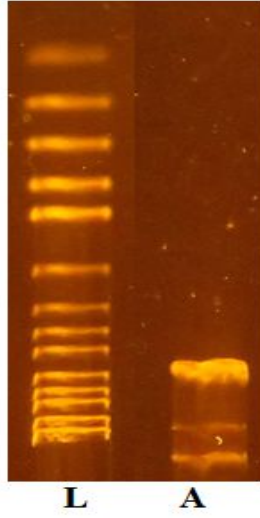
3.1 *L. reuteri* E81'in Genomundan *gtfA* Geninin Tamamen Silinmesi ve $\Delta gtfA$ Mutantın Elde Edilmesi

L. reuteri E81'de alternan üretiminden sorumlu gen 5304 bp uzunluğunda bulunmuş olup genomdan silmek için oldukça uzun bir gendir. Dolayısıyla bu genin silinmesi için genin ilk kısmından 1300 baz genin son kısmından ise 1100 baz uzunluğunda bir kısmın 30°C'de gelişebilen ancak 42°C'de gelişemeyen pG⁺host9 vektöründe birleştirilmesi yoluna gidilerek bu genin silinmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak 1300 bazlık kısım E81'den PZR işlemi ile alınarak üretilmiştir (Şekil 3.1).



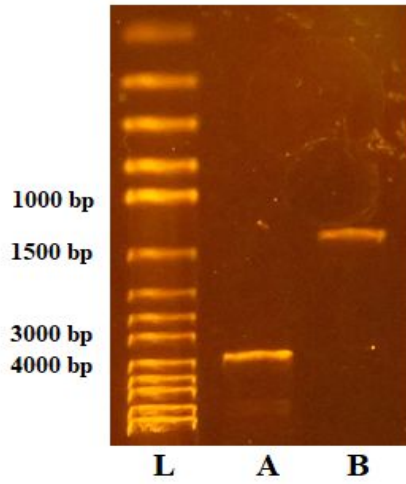
Şekil 3.1 E81'den *gtfA* geninin ilk kısmının elde edilmesini gösteren agaroz jel görüntüsü

Takiben pG⁺host9 vektörü başarılı bir şekilde eritromisinli LB'de geliştirilen TOP10'dan ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.2).



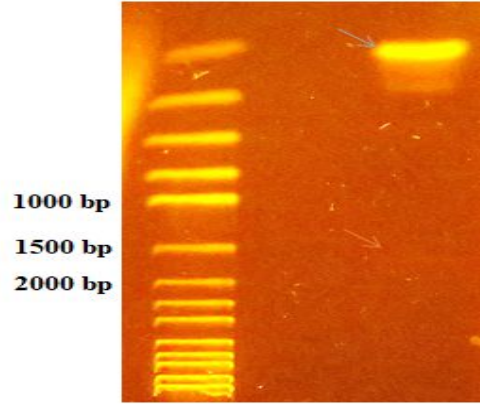
Şekil 3.2 pG⁺host9 vektörünün ekstraksiyonunu (A) gösteren agaroz jel görüntüsü,
L: Ladder

Takiben vektör ve ilk PZR ürünü KpnI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve ligasyon işlemine geçilmiştir. Şekil 3.3 kesilmiş ürünleri göstermektedir.



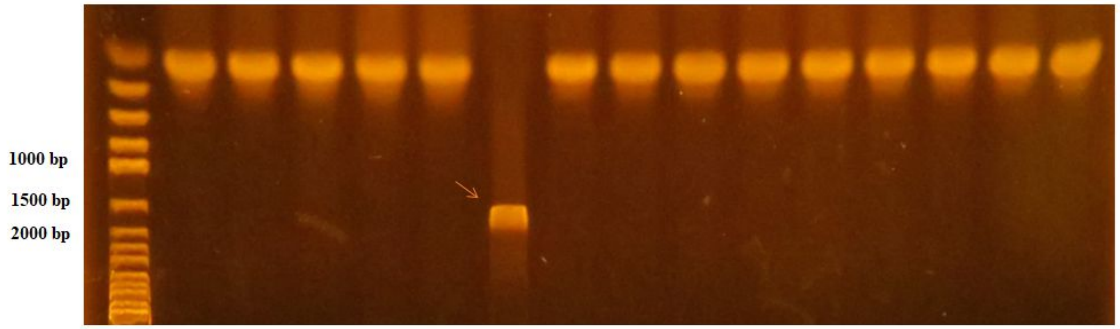
Şekil 3.3 Kesilen pG⁺host9 (A) ve ilk PZR ürününü (B) gösteren agaroz jel görüntüsü

Bir gece ligasyon işleminin ardından ligasyon işlemi pG⁺host9'a özgü primerler kullanılarak PZR işlemi ile test edilmiştir. Şekil 3.4'den de görüleceği üzere vektöre ilk PZR ürünü eklenebilmiştir. Bununla birlikte ligasyonda çoğu ürün vektörün tekrar sirküle olmasından kaynaklanan üründen elde edilmiştir (Şekil 3.4).



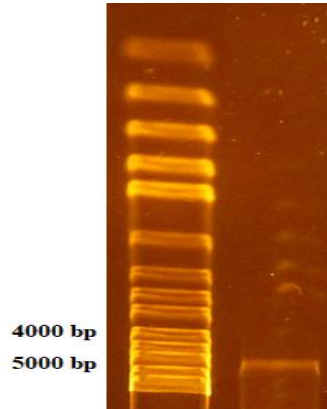
Şekil 3.4 Ligasyonun test edildiği agaroz jel görüntüsü. Kırmızı ok istenen ürünü göstermektedir

Ligasyonun ardından ligasyon ürünü TOP10 hücrelerine elektroporasyon ile atılmış ve pozitif koloni LB+Ery besiyerinde seçilmeye çalışılmıştır ve farklı denemelerin ardından pozitif koloni elde edilebilmiştir (Şekil 3.5).



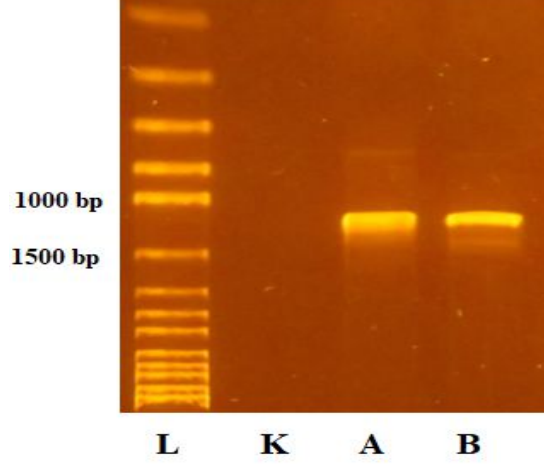
Şekil 3.5 Koloni PZR ile transformantlar test edilmiş ve onlarca koloniden 1 adet pozitif pE8101 (pG⁺host9-gtf1) vektörü taşıyan koloni elde edilmiştir

Pozitif transformant sonrasında geliştirilmiş ve plazmid ekstrakte edilmiştir. Şekil 3.6'dan da görüleceği üzere pE8101 vektörünün boyutu 1300 baz uzamıştır.



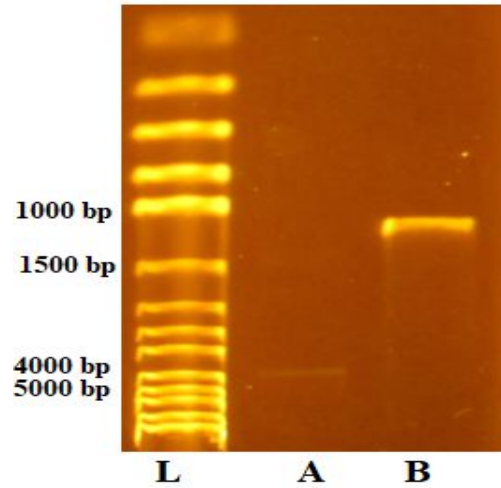
Şekil 3.6 pE8101vektörünü gösteren jel görüntüsü

Alternansükraz geninin ilk kısmının vektöre eklenmesinin ardından materyal metot kısmında belirtilen yöntem ile ikinci kısmının da oluşturulan bu vektöre bağlanması amacıyla E81'in genomunda gtf2 olarak adlandırdığımız yaklaşık 1100 bazlık kısım PZR ile elde edilmiştir. Şekil 3.7 PZR işleminin sonucunu göstermekte olup istediğimiz gen yeterli miktarda ve tek başına elde edilebilmiştir.



Şekil 3.7 E81 Genomundan gtf2 geninin elde edilmesini gösteren jel görüntüsü; A-B farklı Genomik DNA konsantrasyonları ile oluşturulan PZR ürünleri, K: negatif kontrol

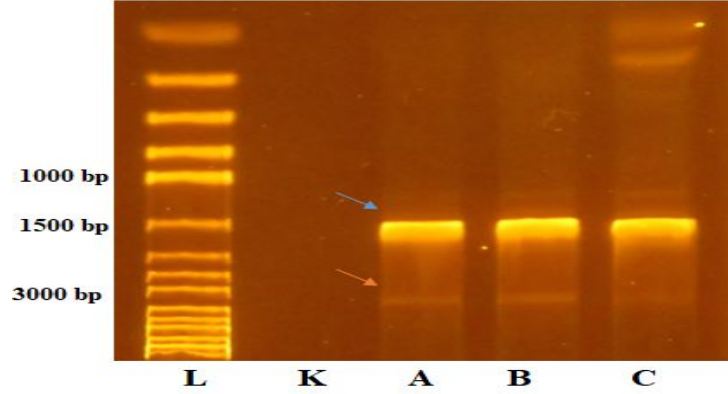
Takiben hem pE8101 hem de PZR ile elde edilen gtf2 bölgesi XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve agaroz jelde yürütüldükten (Şekil 3.8) sonra miktarları hesaplanarak ligasyon reaksiyonu kurulmuş ve ürünler 1 gece ligasyon işlemine bırakılmıştır.



Şekil 3.8 pE8101 (A) ve gtf2'nin (B) kesilmesini gösteren Agaroz jel görüntüsü

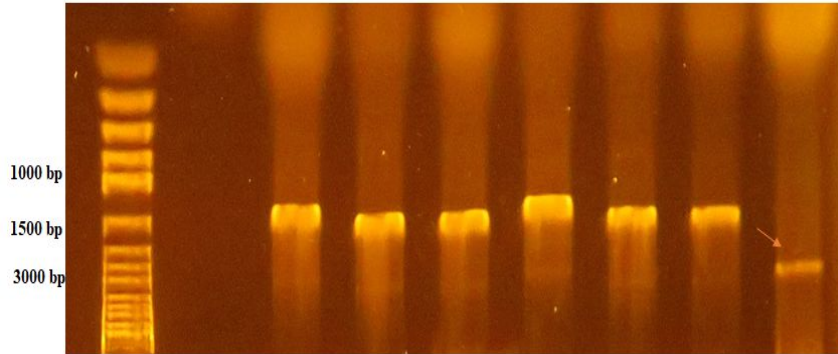
Ligasyon işlemi sonrası ürünler PZR işlemi ile denenmiş ve gtf2'nin başarılı bir şekilde pE8101 vektörüne eklendiği gözlenmiştir (Şekil 3.9). Bu işlemin ardından pE8102

vektörünün elde edilebilmesi için ligasyon ürünü TOP10 hücrelerine elektroporasyon ile atılmıştır.



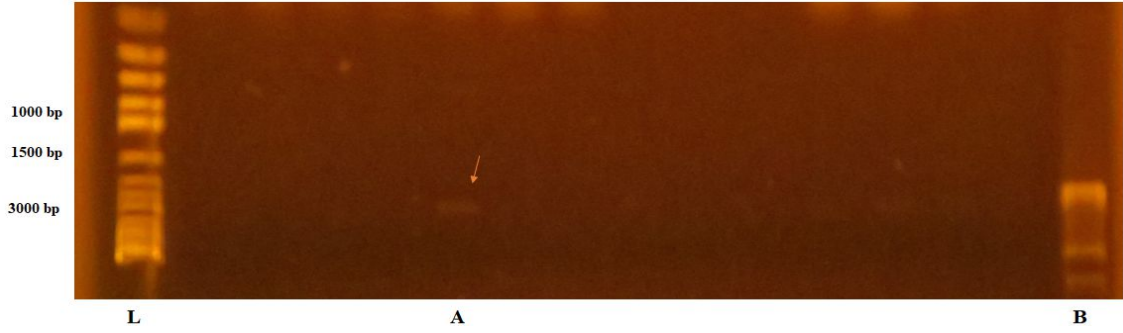
Şekil 3.9 Ligasyon reaksiyonunun PZR ile denenmesini gösteren agaroz jel görüntüsü, K: kontrol, A-B-C iki farklı ligaz ve bir farklı konsantrasyon denemesinin ürünleri. Mavi ok self-ligasyona uğramış pE8101 (pG⁺host9-gtf1)'i kırmızı ok ise istediğimiz vektörün oluştuğunu göstermektedir

Elektroporasyon başarılı bir şekilde gerçekleşmiş ve çok sayıda transformant koloni pE8102 vektörünü taşıyıp taşımadıklarının test edilmesi için koloni PZR işlemi ile kontrol edilmiştir. Şekil 3.10'dan görüleceği üzere 1 adet transformant ilgili vektörü taşımakta olup bu vektör LB+Ery besiyerinde geliştirilmiş ve ardından *L. reuteri* E81'e transforme edilmek üzere yüksek miktarda elde edilmiştir.



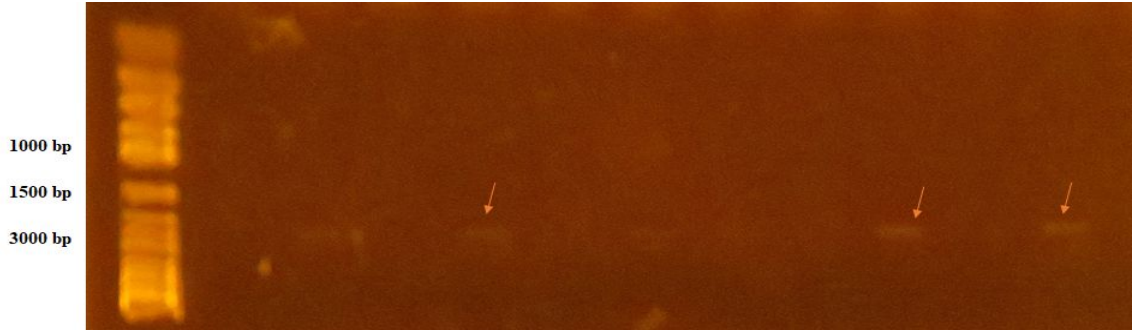
Şekil 3.10 pE8102 vektörünün varlığının test edildiği koloni PZR işleminin agaroz jel görüntüsü

L. reuteri türü elektrotransformasyonun zor olduğu LAB türleri arasında sayılmakta olup hem türün zorluğu hem de yüksek oranda hücre duvarı etrafındaki alternan varlığı E81'e pE8102 vektörünün atılması işlemini zorlaştırmıştır. Bununla birlikte farklı denemelerin ardından materyal metot kısmında metot 3 olarak adlandırılan yöntem ile alternan geninin silinmesi amacıyla hazırlanan vektör E81'e başarılı bir şekilde atılabilmektedir (Şekil 3.11). Bu işlemde Ery'de gelişen farklı koloniler test edilmiş ve pozitif olan koloni ile işlemlere devam edilmiştir.



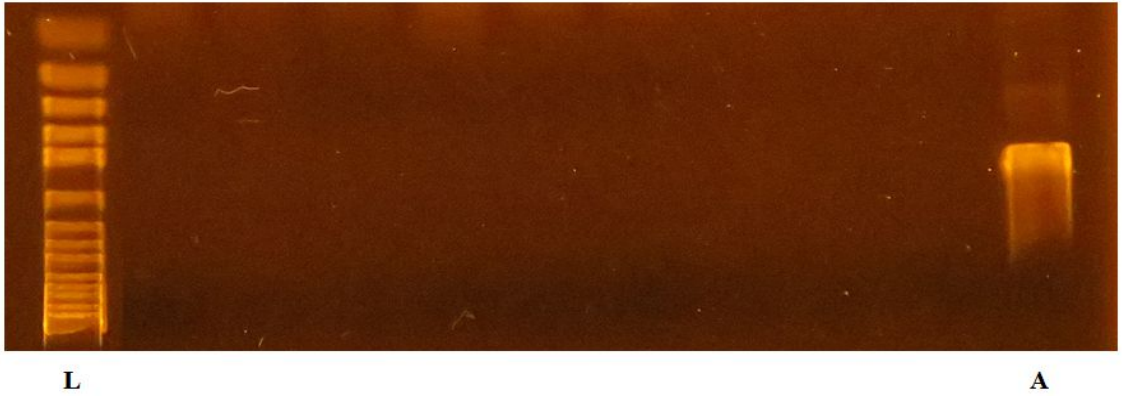
Şekil 3.11 pE8102 vektörünün *L. reuteri* E81'e atıldığını gösteren agaroz jel görüntüsü. A pozitif koloni, B plazmidin kendisi

Sonrasında metot kısmında belirtilen basamaklar takip edilmiş ve koloniler 42°C'de gelişmeye zorlanmıştır. Ardından kolonilerin başarılı bir şekilde genomu atıldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 pE8102 vektörünün *L. reuteri* E81 genomuna entegre olduğunu gösteren agaroz jel görüntüsü

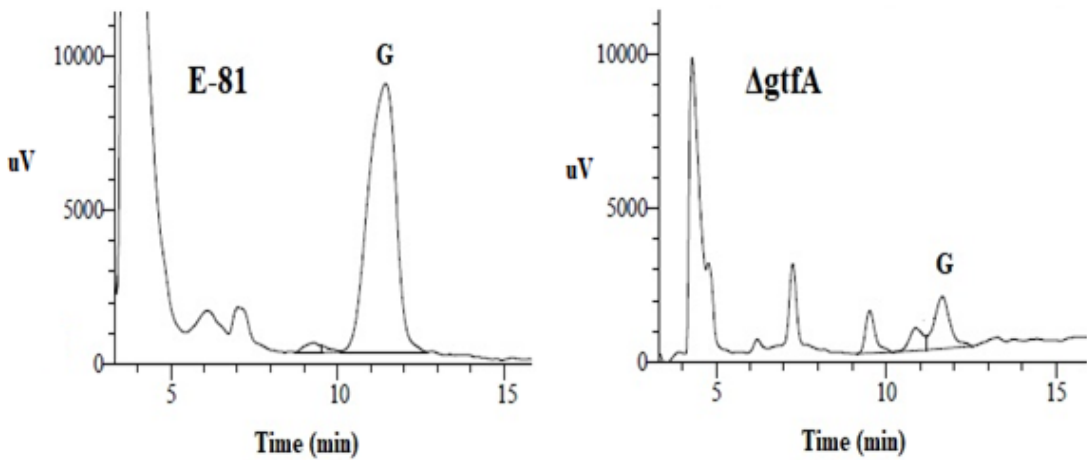
Materyal ve metot kısmında da belirtildiği gibi pG⁺host9 42°C'de gelişemediği için kromozomda yer alan *gtfA* geninin baş ve son kısımlarından pE8102 ile ortak noktalardan kromozoma entegre olmuştur. Bu işlem koloni PZR ile test edilmiş olup Şekil 3.12'de belirtilmektedir. Takiben hücreler 30°C'de geliştirilip plazmidin dışarıya çıkması sağlanmıştır. Bu işlemin amacı hücreler bölünürken dışarıya çıkan plazmidin ilgili geni alıp götürmesidir. Ardından hücreler tekrar 42°C'de eritromisinli ve eritromisinsiz agarlarda gelişime bırakılmış ve bu esnada plasmid eğer ilgili gende değişikliğe gidebildiyse eritromisinli besiyerinde 42°C'de gelişemeyecek tersi durumda ise eritromisinsiz besiyerinde gelişebilecektir. Dolayısıyla eritromisinsiz besiyerinden yaklaşık 10 koloni *gtfA* genine özgü primerler ile test edilmiş ve Şekil 3.13'de görüleceği üzere bütün koloniler bu gen açısından negatif bulunmuştur. E81 DNA'sı ile de reaksiyon kurulmuş ve Şekil 3.13-A'da görüleceği üzere genin varlığı dolayısıyla pozitif PZR ürünü elde edilmiştir. Sonuç olarak alternansükraz-glukansükraz geni E81'den başarılı bir şekilde silinebilmiş ve $\Delta gtfA$ mutant elde edilmiştir. Elde edilen mutantın gliserol stoğu yapılarak -80°C'de muhafazasına başlanmıştır.



Şekil 3.13 *L. reuteri* E81 ve potansiyel mutantlarda *gtfA* geninin varlığının test edildiği PZR ürünlerini gösteren agaroz jel görüntüsü. A: E81'in DNA'sı ile PZR kurulmuştur

3.2 *L. reuteri* E81 ve *L. reuteri* $\Delta gtfA$ Suşundan İzole Edilen EPS'in Şeker İçeriği

L. reuteri E81 ve $\Delta gtfA$ suşu sukroz içeren modifiye BHI besiyerinde geliştirilmiş ve EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.14'de E81 ve $\Delta gtfA$ suşundan izole edilmiş EPS'in HPLC kromatogramını göstermektedir. Standartlar ile karşılaştırıldığında E81 suşunun sadece glukozdan oluşan bir EPS yani bir glukan ürettiğini göstermektedir. sukroz varlığında sadece glukan formunda bir EPS'in E81 suşunca üretilebilmiş olması bu suşun glukansükraz aktivitesinden kaynaklanmakta olup bu sonuç GTFA'nın aktif bir protein olduğunu ortaya koymaktadır. Kromotogramdan da görüleceği üzere oldukça yoğun bir glukoz oluşmuş olup elde edilen glukanın boyutu hakkında fikir vermektedir. Bununla birlikte *L. reuteri* $\Delta gtfA$ suşunun EPS üretmediği kromotogramdan açıkça görülmektedir.



Şekil 3.14 *L. reuteri* E81 ve *L. reuteri* $\Delta gtfA$ mutant suşlarından ekstrakte edilen EPSlerin HPLC kromatogramı (G: glukoz)

3.3 *L. reuteri* E81 ve *L. reuteri* Δ gtfA Suşu ile Üretilen Ekşi Hamurların Bazı Kimyasal Nitelikleri

Ekşi hamur fermentasyonunda glukan pozitif ve negatif E81 ve Δ gtfA mutant suşları benzer büyüme oranları göstermiş olmasına rağmen glukan üretim kaybının, mutant suşun fermentatif kabiliyetinde daha yüksek metabolik fonksiyonlara yol açabileceği gerçeğine bağlı olarak, mutant suşta toplam asidite artışı ve pH düşüşü gözlemlenmiştir (Tablo 3.1).

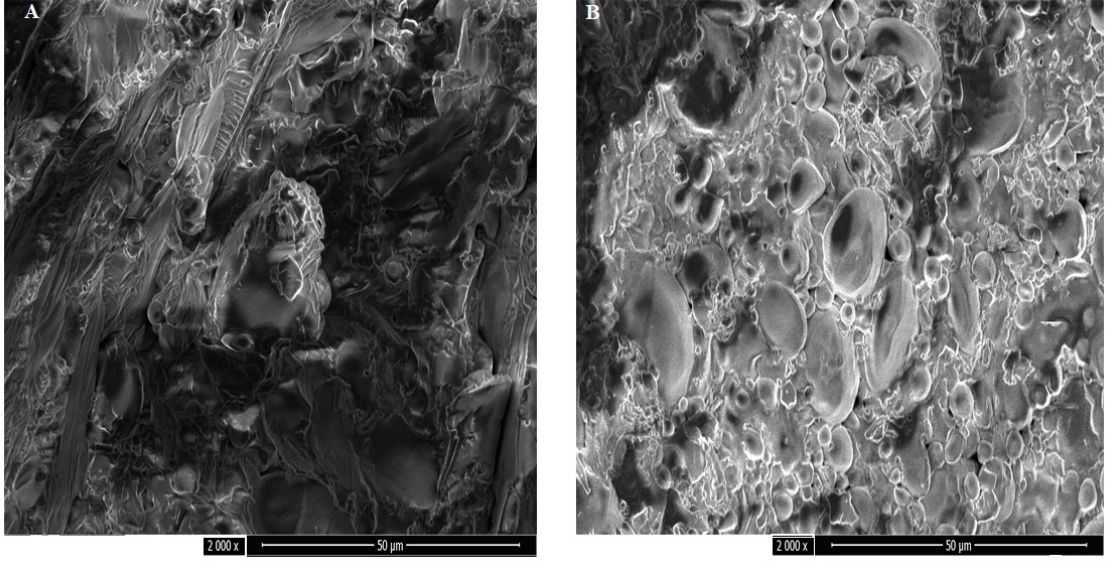
Tablo 3.1 Kontrol, *L. reuteri* E81 ve Δ gtfA suşu ile üretilen ekşi hamurların pH ve TTA asitliği değerleri

Örnek	pH		TTA (% asetik asit)	
	0. saat	24. saat	0. saat	24. saat
Kontrol	4,13	4,04 ^{a*}	0,034	0,043 ^a
E81	5,94	4,20 ^c	0,006	0,029 ^b
Δ gtfA	5,92	3,62 ^d	0,007	0,041 ^a

Her satırdaki farklı harfler, her örnekteki istatistiksel farkı temsil etmektedir (P<0,05). Veriler üç bağımsız ölçümün ortalamasıdır.

3.4 Dondurularak Kurutulmuş Ekşi Hamurların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüsü

L. reuteri E81 ve Δ gtfA suşu ile üretilen ekşi hamurların liyofilizatörde kurutulması ile elde edilen toz ekşi hamurlar taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir (Şekil 3.15). Önemli olarak SEM görüntülerinden anlaşılabileceği üzere EPS ekşi hamurda film benzeri bir yapı oluşturarak nişasta granüllerini sararken (Şekil 3.15A), EPS üretilmeyen ekşi hamurda ise nişasta granülleri oldukları gibi gözükmemektedir (Şekil 3.15B). Bu görüntüler *L. reuteri* E81 suşu tarafından üretilen alternanın kabiliyetlerini göstermesi bakımından önemlidir.

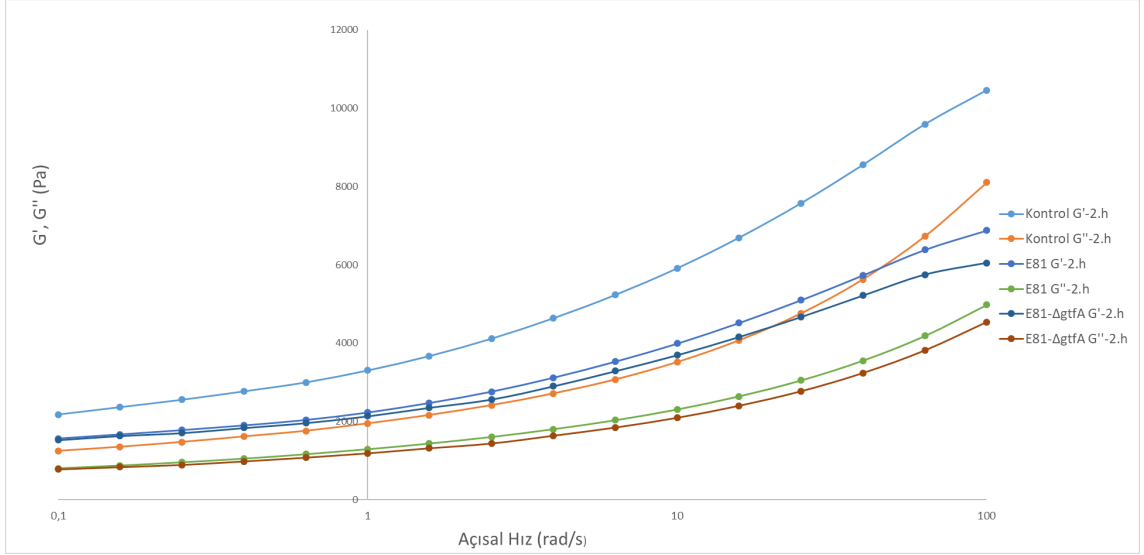


Şekil 3.15 *L. reuteri* E81 (A) ve $\Delta gtfA$ mutant (B) ile üretilen ekşi hamurların liyofilizasyonunu takiben SEM görüntüleri. Ekşi hamurlar her iki suşun ilavesini takiben 24 saat boyunca geliştirilmiş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekşi hamurlar SEM ile görüntülenmiştir

3.5 Alternan Üretimini Ekşi Hamurun Reolojisi Üzerine Etkisi

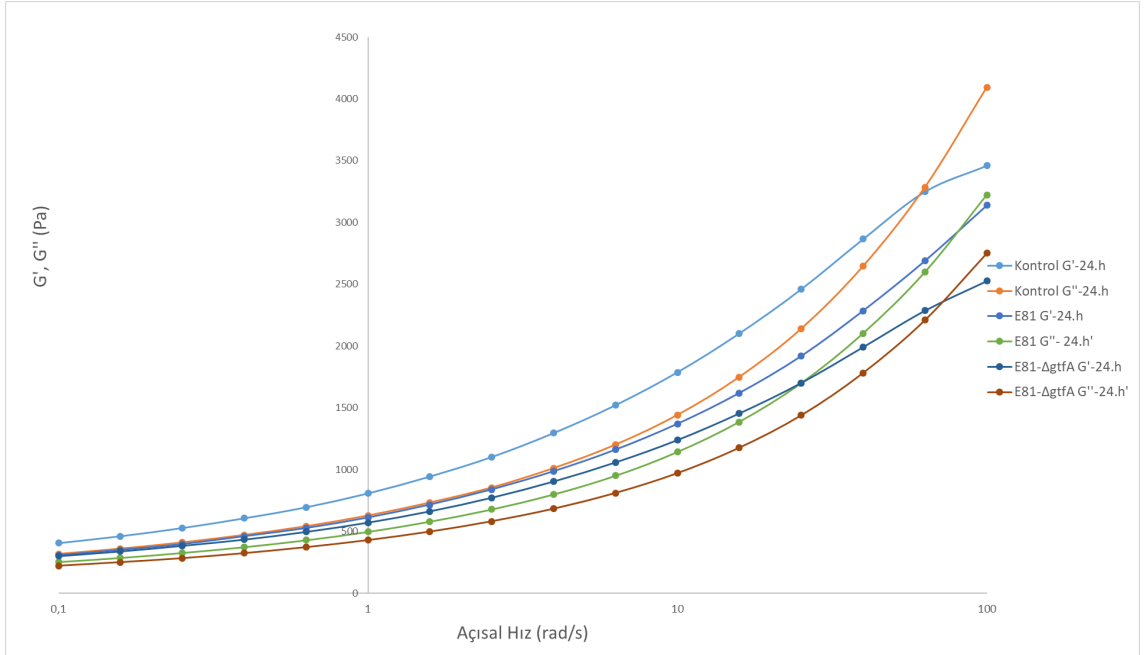
Alternan üretiminin ekşi hamurun reolojik davranışları üzerine etkisinin belirlenmesi ve bu ekşi hamurlar ile üretilen ekmeklerin tesktürel ve duyuşal niteliklerinin değerlendirilmesi amacıyla materyal metot kısmında belirtilen işlemler gerçekleştirilmiş ve alternan üreticisi *L. reuteri* E81 ve alternan üretemeyen $\Delta gtfA$ mutant ile ekşi hamur üretilmiş ve ekşi hamurların reolojik nitelikleri test edilmiştir.

Hamurlar için Frequency sweep analizi lineer viskoelastik bölgede hesaplanmış ve Linear viskoelastik bölgenin belirlenmesi için ise amplitude sweep testi yapılmıştır. İlgili testler sonucunda şekillerde verilen G' ve G'' ile, açısal hız değerleri hesaplanmıştır. Şekil 3.16 hamurlar oluşturulduktan 2 saat sonra kontrol hamuru, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlardaki G' ve G'' değerlerini göstermektedir. Şekilden de görüleceği üzere G' değeri her bir uygulama için G'' değerinden yüksek olduğu için hamurların elastikiyeti viskozite değerlerine göre yüksek bulunmuştur.



Şekil 3.16 Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlarda 2. saatin sonundaki G' ve G'' değerleri

Benzer etki 24. saatin sonunda da gözlenmiş olup hamurların fermente olması ile birlikte elastikiyet bir miktar azalsa da hala dominant durumdadır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlarda 24. saatin sonundaki G' ve G'' değerleri

Sonrasında elde edilen değerlerden 2. saat ve 24. saatteki elastikiyet katsayısı K' ve viskozluk katsayısı K'' hesaplanmıştır (Tablo 3.2). Tablodan da görüleceği üzere 2.saat ve 24.saat hamurlarında her bir uygulama için elastiklik katsayısı K' , viskozluk katsayısı K'' ile karşılaştırıldığında elastiklik katsayısı viskozluk katsayısından büyük bulunmuştur. 2.saatın sonunda E81 ve $\Delta gtfA$ ile hazırlanan hamurlardaki elastiklik

ve viskozluk değerleri kontrol hamuruna göre daha düşük bulunmuştur. 24.saatin sonunda yani ekşi hamurun ekmek hamuru üretimi için hamur karışımına ilave edileceği olgunlukta gruplar arasındaki elastiklik ve viskozluk değerleri birbirine yaklaşmış olsa da hala istatistiki olarak farklar bulunmaktadır ($p<0,05$).

Burada elde ettiğimiz en önemli ve aslında beklediğimiz sonuç E81 ve $\Delta gtfA$ arasındaki elastikiyet katsayısı yönünden farklılıktır. Tablo 3.2’den de görüleceği üzere E81 ile hazırlanan hamurun elastikiyet katsayısı $\Delta gtfA$ ile hazırlanan hamurun elastikiyet katsayısına göre önemli ölçüde ($p<0,05$) daha yüksek bulunmuştur. Bu veri alternanın ekşi hamura elastikiyet kattığının çok önemli bir göstergesidir.

Tablo 3.2 Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan hamurlarda 2. saat ve 24. saatin sonundaki elastiklik ve viskozluk değerleri

		2.Saat		
		Kontrol*	E81	$\Delta gtfA$
Elastiklik	K'	3398,682 ^{b,A,x}	2328,294 ^{c,A,x}	2226,266 ^{d,A,x}
	n'	0,246	0,239	0,223
	R2	0,998731	0,997758	0,9967957
Viskozluk	K''	1854,329 ^{a,B,x}	1249,131 ^{b,B,x}	1147,600 ^{c,B,x}
	n''	0,309	0,290	0,288
	R2	0,993531	0,995667	0,99433982
		24.Saat		
		Kontrol	E81	$\Delta gtfA$
Elastiklik	K'	852,8045 ^{a,A,y}	614,0390 ^{c,A,y}	591,5625 ^{d,A,y}
	n'	0,3166	0,3546	0,3218
	R2	0,99725057	0,99977949	0,99906782
Viskozluk	K''	572,7958 ^{a,B,y}	456,4744 ^{c,B,y}	390,6899 ^{d,B,y}
	n''	0,4211	0,4190	0,4176
	R2	0,99792112	0,9980683	0,99763829

*a–d Aynı satırda gösterilen küçük harfli st indisleri, her bir uygulama periyodu içerisinde muameleler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

A–B Aynı kolonda gösterilen büyük harfli st indisleri, aynı muameleye ait örneklerin elastikiyet ve viskoz değerleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

x–y Aynı satırda gösterilen küçük harfli st indisleri, aynı muameleye ait örneklerin fermantasyon zamanları arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

3.6 Alternan retimnin Ekşi Hamur Ekmeginin Sertliği zerine Etkisi

Tablo 3.3’de de belirtildiği gibi 5 farklı ekmek üretilmiş ve bu ekmeklerin sertlik değerleri 0, 2, 5 ve 8. günlerde belirlenmiştir. Ekmek tekstürü üzerine hamur

ortamında *in situ* üretilen glukan tip EPS'nin mevcudiyeti, sadece 0. günde ekmek sertliğinin azalmasına neden olmasına rağmen depolama süresince bu glukanın hiçbir etkisi görülmemiştir. Ancak *in situ* üretilen glukanla karşılaştırıldığında, *ex situ* glukanın hamur karışımına eklenmesinin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin hamur ortamında optimum protein-polisakkarit interaksiyonuna bağlı olarak belirli bir konsantrasyonda gözlemlenebileceği düşünülmektedir.

Tablo 3.3 Kontrol, E81 ve $\Delta gtfA$ mutant ile hazırlanan ekşi hamur ekmelerinin 0, 2, 5 ve 8. gün sonundaki sertlik değerleri

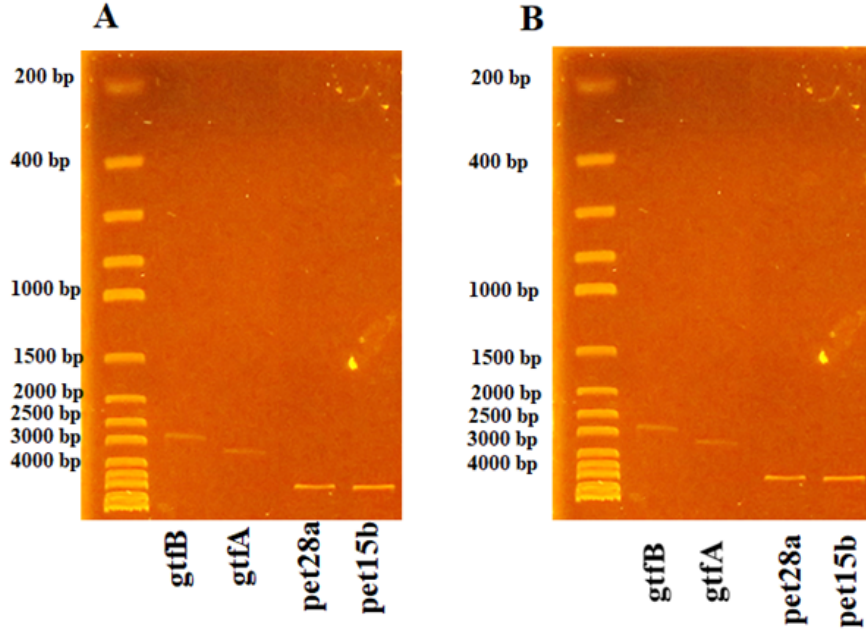
Suş Tipi	Ekmek hamuruna glukan ilavesi	Sertlik Değeri			
		0. Gün	2. Gün	5. Gün	8. Gün
Kontrol	-	130,289 ^{a*}	775,0758 ^a	1054,208 ^a	1258,673 ^a
$\Delta gtfA$	-	105,033 ^b	371,713 ^c	755,628 ^b	1244,2455 ^a
$\Delta gtfA$	%0,09 glukan	54,334 ^c	231,97 ^d	851,9915 ^c	1104,665 ^c
$\Delta gtfA$	%0,19 glukan	86,689 ^b	532,479 ^b	936,61 ^c	984,0715 ^b
E81	<i>in situ</i> glukan oluşumu	67,8875 ^d	434,753 ^c	940,306 ^c	1340,8135 ^a

^{a-d} Farklı küçük üst simge harfleri, her suş arasındaki farkları göstermektedir (P<0,05). Veriler üç bağımsız ölçümün ortalamasıdır.

3.7 *L. reuteri* E81'den *gtfA* ve *gtfB* Genlerinin Klonlanması

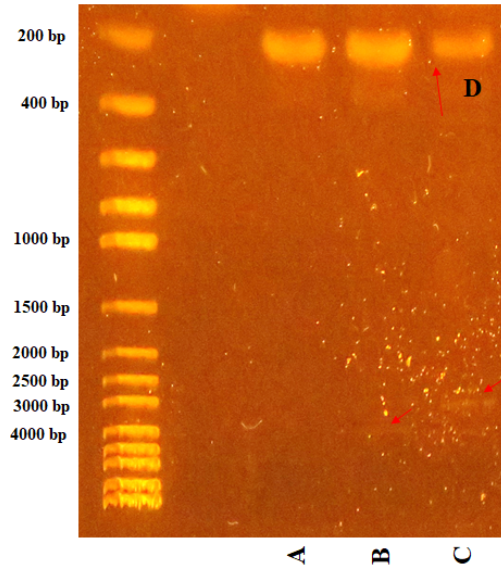
Her iki genin daha önce tanımlanan mevcut genler ile karşılaştırılmasının ardından katalitik bölgeleri ortaya konmuş ve bu bölgenin *gtfA*'da 3096 bç, *gtfB*'de ise 2663 bç olduğu açığa çıkarılmıştır ve bu bölgeler hedef alınarak klonlama işlemine geçilmiştir. Bu iki genin klonlanması ile ilgili strateji Materyal-Metot kısmında verilmiştir. Şekil 3.18A optimize ettiğimiz PZR işlemi ile her iki geninde başarılı bir şekilde elde edilmesini gösteren agaroz jel görüntüsüdür.

gtfA geninin katalitik bölgesini içeren PZR ürünü takiben XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve pET15b'de yine aynı enzimler ile kesilerek sonrasında self-ligasyonun önlenmesi amacıyla defosforilize edilerek ligasyon işlemi için hazırlanmıştır. Benzer olarak *gtfB*'nin katalitik bölgesini içeren PZR ürünü ise HindIII ve XhoI ile kesilmiş bu gen için seçilen ekspresyon plazmidi olan pET28a'da aynı enzimler ile kesildikten sonra defosforilize edilerek ligasyon işlemi için hazırlanmıştır. Şekil 3.18B kesilmiş ürünleri göstermektedir.



Şekil 3.18 E81'in genomundan *gtfB*, *gtfA*'nın amplifiye edilmesi ve ekstrakte edilen plazmidleri gösteren agaroz jel görüntüsü (A) ve bu ürünlerin ilgili restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki jel görüntüsü (B)

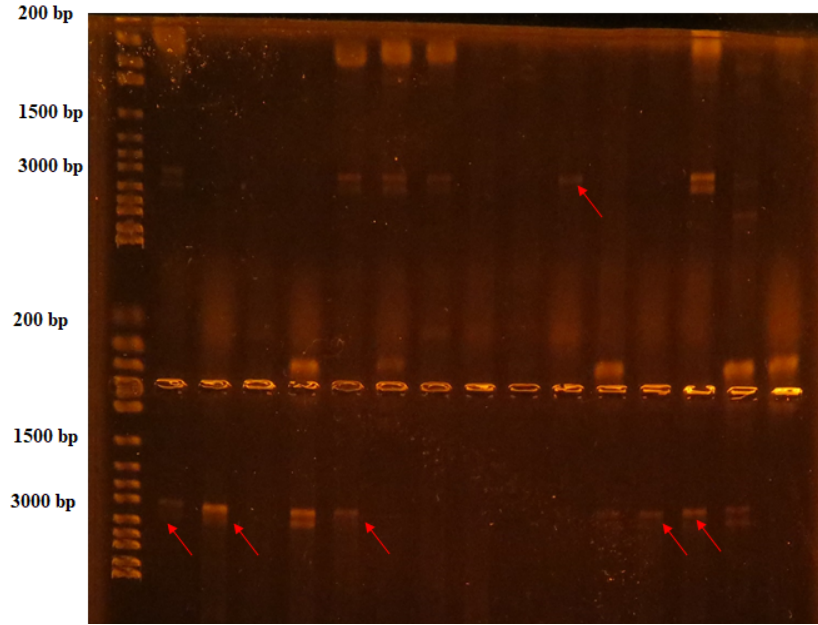
Bu ürünlerde 1 gece ligasyon işlemini takiben plazmidlere ürünlerin entegre olup olmadıkları PZR işlemi ile test edilmiş ve Şekil 3.19'da görüleceği üzere her iki üründe başarılı bir şekilde ekspresyon plazmidlerine entegre olmuştur. Ürünlerin boyutlarındaki sorunlar veya bir veya birden fazla enzimin yeterince çalışmamasından dolayı pozitif ligasyon ürünleri çok fazla denemenin ardından elde edilebilmiştir.



Şekil 3.19 Ligasyon işleminin PZR sonucunu gösteren agaroz jel görüntüsü. A; negatif reaksiyon ürünü pET15b, B; pET15b ile *gtfA* geninin entegrasyonu, C; pET28a ve *gtfB* geninin entegrasyonu, D; plazmitlerdeki self-ligasyon işlemi

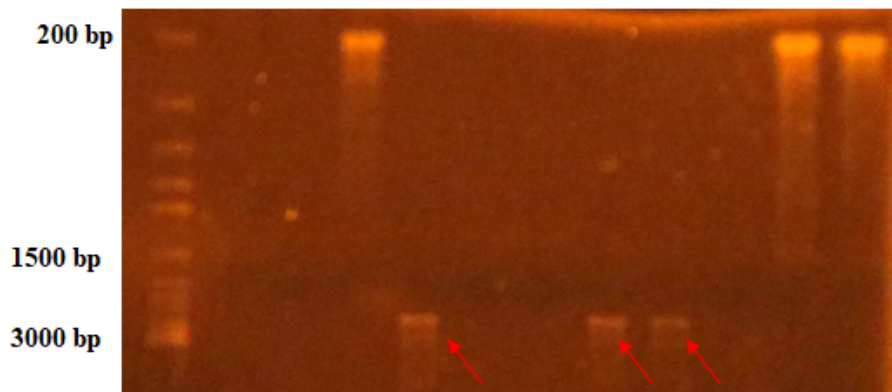
Her iki plazmitte de pozitif ligasyon ürününün elde edilmesinin ardından öncelikle

plazmitleri elde etmek ve yüksek oranda üretebilmek adına plazmitler konak *E. coli* TOP10 hücresine elektroporasyon ile atılmıştır. İlgili antibiyotiklerde gelişen petrilere çok sayıda koloni pozitif ürünün hücrede olup olmadığının tespiti için PZR ile test edilmiştir. Şekil 3.20 pE8104 (pET28a-*gtfB*) pozitif hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.20 Koloni PZR ile pE8104 (pET28a-*gtfB*) pozitif kolonilerin test edilmesi. Kırmızı oklar pET28a'ya özgü primerler ile *gtfB* geninin aktarılması sonucu oluşan 2700 bp'lik kısmı göstermektedir

Benzer olarak pE8103 (pET15b-*gtfA*) pozitif koloniler PZR işlemi ile test edilmiş ve Şekil 3.21'den görüleceği üzere istediğimiz ekspresyon ürününü içeren koloniler sonrasında ilgili antibiyotiği içeren besiyerinde geliştirilmiştir.

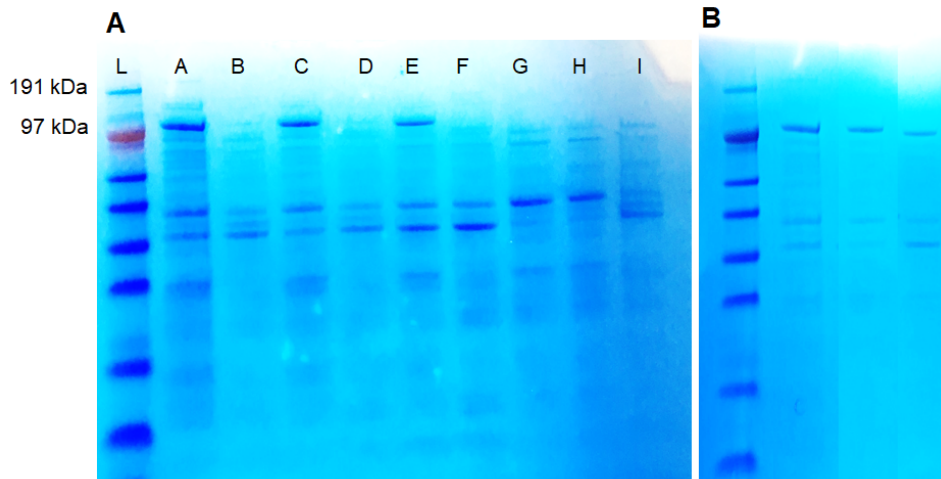


Şekil 3.21 Koloni PZR ile pE8103 (pET15b-*gtfA*) pozitif kolonilerin test edilmesi. Kırmızı oklar pET15b'ye özgü primerler ile *gtfA* geninin aktarılması sonucu oluşan 3000 bp'lik kısmı göstermektedir

3.8 *E. coli* BL21’de GTFA ve GTFB Enzimlerinin Üretimi ve Protein Ekspresyonlarının SDS-PAGE ile Kontrol Edilmesi

Her iki enzim için oluşturduğumuz plazmitler sonrasında BL21 hücrelerine aktarılmış ve protein üretimi işlemine geçilmiştir. Bu amaçla yukarıda belirtildiği şekilde hücreler IPTG ile indüklenmiştir. Bu amaçla her iki proteinin üretimi noktasında hücreler 2, 3 ve 4 saat indüklenmiş ve pE8103 (pET15b-*gtfA*) için hücre pelleti parçalanarak (Şekil 3.22A, A; C; E), pET28a için ise hem hücre peleti parçalanarak (Şekil 3.22A, B; D; F) hem de bu enzimin hücre peletine bağlanma ihtimali daha önce literatürde ifade edildiğinden hücre peletine bağlı yani ‘inclusion body’den (Şekil 3.22A, G; H; I) ekstraksiyon yapılmıştır.

Ekstraksiyon işlemini takiben Bradford metodu ile ekstraktlarda hesaplanan protein konsantrasyonları baz alınarak yaklaşık 10 µg örnek SDS-PAGE ile yürütülmüştür (Şekil 3.22).

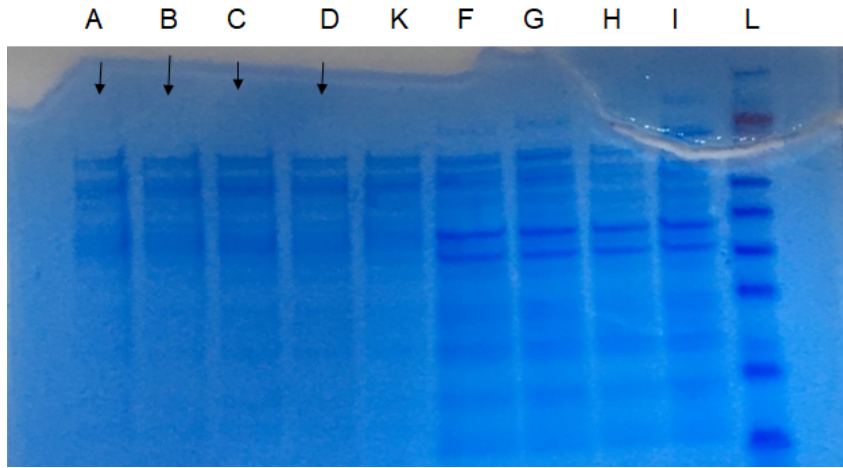


Şekil 3.22 GTFA ve GTFB proteinlerinin kontrolü amacıyla SDS-PAGE jel görüntüsü:

A; Sırasıyla 2 (A), 3 (C) ve 4 (E) saat indüksiyon sonunda elde edilmiş GTFA klonundan elde edilen görüntü, F pET15b kontrol; Aynı işlemin 2-4 saat indüksiyon ile GTFB ile yapılması ile elde edilen sitoplazmik proteinlerin görüntüsü (B, D); GTFB’nin görüntülenmesi amacıyla hücre peletinden aynı indüksiyon süreleri sonunda elde edilen proteinler (G, H); I pET28a kontrol. B; His-tag kolonundan geçirilmesinin ardından GTFA’nın saflaştırılmasını gösteren jel görüntüsü

Şekil 3.22’den görüleceği üzere GTFA proteini (115 kDa) başarılı bir şekilde üretilmiş ve ardından saf bir şekilde elde edilmiştir. GTFA’nın düşük hacimde elde edilmesinin ardından indüksiyon 250 mL LB besiyerinde gerçekleştirilmiş ve takiben His-tag kolondan geçirilmiş ve GTFA proteini daha yüksek oranda başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 3.22B). Bununla birlikte GTFB (99 kDa) proteinin üretimi bu şartlarda mümkün olmamıştır. Dolayısıyla GTFB proteinin üretimi amacıyla indüksiyon oda sıcaklığında 1 gece gerçekleştirilmiş ve tekrar protein hem hücre

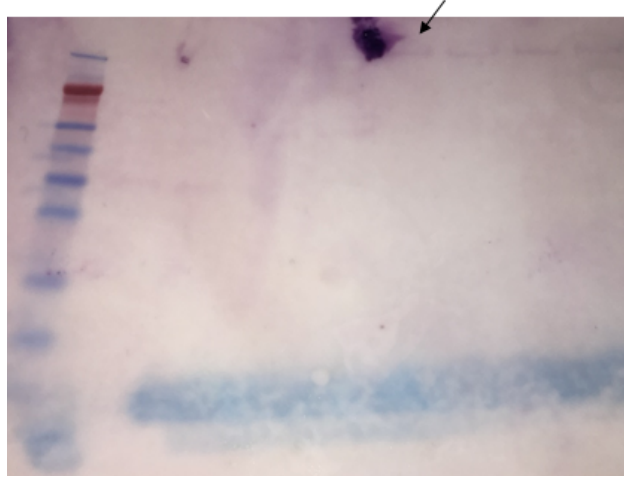
sitoplazmasından hem de hücre peletinden elde edilmiştir. Şekil 3.23 pE8104 (pET28a-*gtfB*) plazmitinin 1 gece oda sıcaklığında indüksiyonundan sonra elde edilen jel görüntüsünü göstermektedir. Bu amaçla daha önce elde edilen bütün pozitif klonlar indüksiyona tabi tutulmuştur. Hücre sitoplazmasından kontrole göre farklı 100 kDa ve üzerinde herhangi bir bant elde edilemezken hücre peletlerinden çok düşük yoğunluklu da olsa bir bant elde edilmiştir.



Şekil 3.23 GTFB'nin hücre peletinden (A, B, C, D) ve hücre sitoplazmasından elde edilmesi (F, G, H, I), K kontrol boş pET28a hücre pelleti, L, ladder

3.9 Histidin ile İşaretli Rekombinant Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

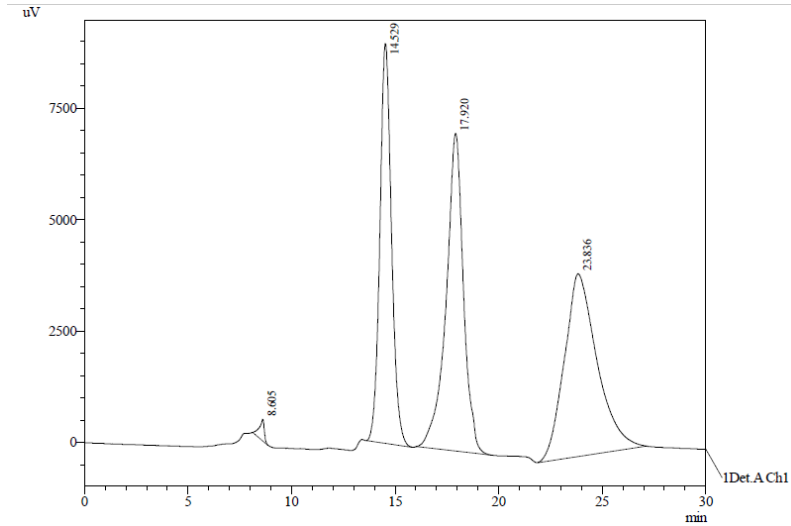
Bu düşük yoğunluklu bantların istediğimiz protein olup olmadığının kontrolü GTFB His-tag bağlı bir protein olarak üretildiğinden Western-Blot işlemi ile belirlenmiştir. Şekil 3.24'den de görüleceği üzere elde ettiğimiz bantlar His-tag Ab ile reaksiyona girmiş ve GTFB proteinin hücre sitoplazmasından değil de hücre pelletinden elde edilebildiği gösterilmiştir.



Şekil 3.24 GTFB'nin varlığının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen Western-Blot görüntüsü. Sadece hücre peleti örneklerinde ilgili protein mevcuttur

3.10 GTFA Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

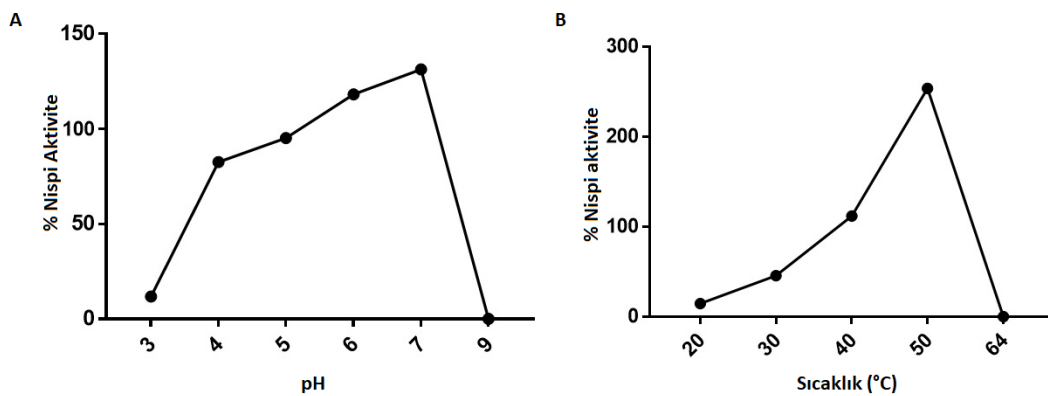
Yukarıda da ifade edildiği gibi GTFA enzimi sukrozu parçalayıp oluşan glukozu $\alpha(1-6)$ ile düz zincir $\alpha(1-3)$ bağları ile de belirli noktalardan dallanacak şekilde glukan üretmektedir. Şekil 3.25'deki HPLC kromatogramında sukroz ile enzimin 1 saat inkübasyonu sonucunda oluşan glukoz (dk 14,52) ve fruktoz (dk 17,92) ve kalan sukroz (dk 23,83) gözükmemektedir. Bu sonuç enzimin başarılı bir şekilde çalıştığının göstergesidir.



Şekil 3.25 GTFA enzimi ile sukrozun 1 saat inkübasyonu sonucunda glukoz ve fruktozun oluştuğunu gösteren HPLC kromatogramı. Bu HPLC kolon şartlarında dk 14,52'de glukoz, dk 17,92'de fruktoz ve dk 23,83 de ise sukroz gelmektedir

3.10.1 GTFA Enzimi Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

GTFA enziminin nispi aktivitesi pH 3,0-9,0 aralığında ölçülmüş (Şekil 3.26A) ve enzimin optimum çalışma pH'sı 7,0 olarak bulunmuştur. Bulduğumuz bu sonuç daha önce çeşitli glukansükrazların optimum pH değerleri ile karşılaştırılabilir olup daha önceki çalışmalarda glukansükrazların çalışma pH aralığı 4,7-7,4 aralığında ortaya konmuştur [69, 114–117]. Bununla birlikte özellikle *L. reuteri* suşlarını da içeren farklı LAB suşlarından elde edilen glukansükrazların pH optiması 5,0-6,0 aralığında bulunmuştur [114, 116, 117] ve E81 suşunda kodlanan GTFA enziminin nispi olarak yüksek optimum bir pH değerine sahip olması farklı ortamlarda değerlendirilebilmesine imkan sağlaması açısından önemli olabilir.



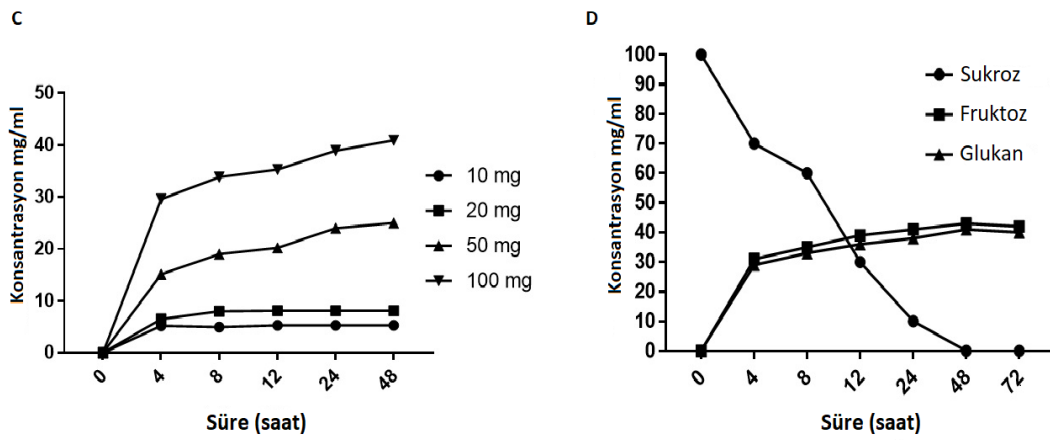
Şekil 3.26 GTFA enziminin aktivitesi üzerine pH (A) ve sıcaklığın (B) etkisi

Şekil 3.26'dan da anlaşılabileceği üzere GTFA enziminin optimum çalışma sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur ve bulunan bu değer diğer glukansükrazlar ile karşılaştırıldığında uyum göstermektedir [69, 116]. Önemli olarak 20-50°C aralığında 4 saat boyunca GTFA'nın aktivitesi test edilmiş ve bu süre zarfında aktivitede herhangi bir kayıp gözlenmemiştir. Bu sonuç literatürde gösterilen glukansükrazların çoğunun aktivitesini 40-60°C'de 0,5 saat gibi bir sürede yitirdiği göz önünde bulundurulduğunda oldukça önemlidir [115, 117]. Elde ettiğimiz bu sonuç enzimin orta derecede ısıl işlem gören gıda işleme uygulamalarına uygun olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

3.11 Sukrozdan *in vitro* Koşullarda α -glukan Üretimi

GTFA enziminin aktivitesi ve glukan üretimi açısından sukroz konsantrasyonu önemli bir faktör olabilmektedir. Dolayısıyla GTFA enziminin aktivitesi üzerine 10 mg mL⁻¹'den 100 mg mL⁻¹'ye kadar dört farklı sukroz konsantrasyonunun glukan üretimi üzerine etkisi tespit edilmiştir. Şekil 3.27'den görüleceği üzere 10 ve 20 mg mL⁻¹ sukroz konsantrasyonunda muhtemelen bütün sukrozun dönüşümü nedeniyle 8 saat içerisinde üretilen glukan seviyesi en yüksek noktaya ulaşmıştır. Sukroz

konsantrasyonunun 50 ve 100 mg⁻¹ olduğu durumlarda ise glukoz seviyesi 24. saatte maksimuma ulaşmıştır. Bu noktadan sonra glukoz üretiminde çok az bir farklılık gözlenmiştir. Benzer şekilde 24 saatin sonunda 100 mg mL⁻¹'de ulaşılan doygunluk diğer bazı glukansükrazlar içinde ifade edilmiştir [115]. Takiben sukrozun dönüşümü ile ilgili yapılan analizlerde 100 mg mL⁻¹ sukroz konsantrasyonu kullanılmıştır. Şekil 3.27D, sukrozun GTFA tarafından fruktoz ve glukana dönüşümünün kinetiğini göstermektedir. Sukrozun parçalanması ve neticede açığa çıkan glukoz ve fruktoz miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Şekilden de görüleceği üzere ilk 12 saatlik dilimde sukrozun %50'sinden fazlası dönüştürülmüş ve 24. saatin sonunda reaksiyon ortamındaki sukrozun tamamına yakını fruktoz ve α-glukana dönüştürülmüştür.

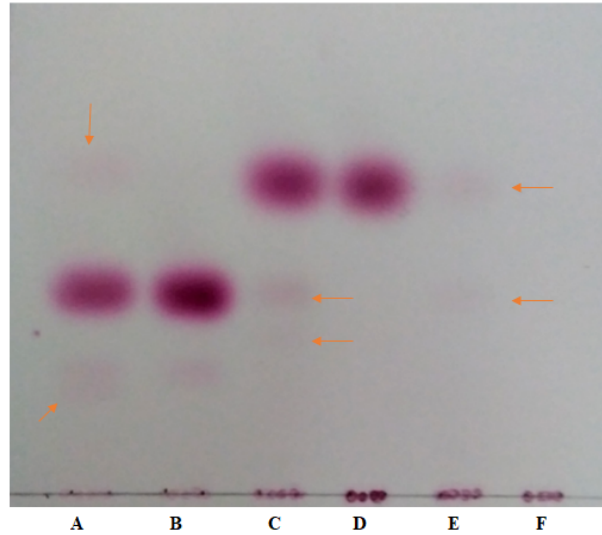


Şekil 3.27 Başlangıç sukroz konsantrasyonunun GTFA enziminin aktivitesi üzerine etkisi (C) ve glukoz üretimi üzerine zamanın etkisi (D)

3.12 GTFB Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

GTFB enzimi 4,6-α-glukanotransferaz olup amiloz gibi α1-4 bağları olan substratlardaki bu bağı hidrolize edip açığa çıkan glukoz unitelerini α1-6 bağları ile bağlayarak hem hidroliz hem de transferaz aktivitesi göstermektedir. Benzer olarak bu enzim de ortamda bulunan bir alıcıya da açığa çıkan glukoz ünitelerini α1-6 bağları ile bağlayarak oligosakkaritlerin üretimini gerçekleştirebilmektedir. GTFB enzimi ile yürütülen çalışmalarda ilk olarak bu enzimin aktivitesinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla substrat olarak patates nişastası ve amiloz % 0,125 veya % 0,25 oranında reaksiyon ortamı 25 mM NaAc, 1 mM CaCl₂ pH 4,7'ye eklenmiş ve GTFB enziminin 1 U mL⁻¹ olacak şekilde ortama ilave edilmesinin ardından başlatılan reaksiyon 37°C'de 24 saat süreyle sürdürülmüş ve ürünler TLC ile test edilmiştir. Şekil 3.28 GTFB enziminin hem nişasta ortamında aktivitesini hem de ortama maltoz veya glukoz eklendiği zaman enzimin katalitik etkisi ile parçalayarak açığa çıkardığı glukoz ünitelerini sırasıyla glukoz ve maltoza ilave etme potansiyelini göstermektedir. Şekil

3.28'den de görüleceği üzere nişasta kontrol örneğine göre (Şekil 3.28, sıra F), enzim ilave edilen örnekte glukoz ve maltoz üniteleri ve potansiyel oligosakkaritler sadece 1 U enzimin ortama ilavesi ile oluşmaya başlamışlardır (Şekil 3.28, sıra E). Bu sonuç enzimimizin aktivitesini göstermesi bakımından oldukça önemlidir. Yine benzer olarak ortama 25 mM glukoz veya 25 mM maltoz ilave edildiğinde GTFB enzimi açığa çıkardığı glukoz ünitelerini transferaz aktivitesi ile glukoz ve maltoz ünitelerine aktarabilmektedir (Şekil 3.28, sıra A ve C). Elde ettiğimiz bu sonuçlar ile E81'de kodlanan ve BLAST analizi sonucunda şimdiye kadar bu veritabanına yüklenmiş diğer 4,6- α -glukanotransferazlar ile belirli oranlarda eşleşen GTFB enziminin α 1-4 bağları içeren substratları parçalayabildiğini ve sonrasında yine ortama ilave edilen glukoz ve maltoz gibi alıcılara da açığa çıkan bu glukoz ünitelerini bağlayabildiği gösterilmiş ve bu enzimin aktif bir enzim olduğu ortaya konmuştur.

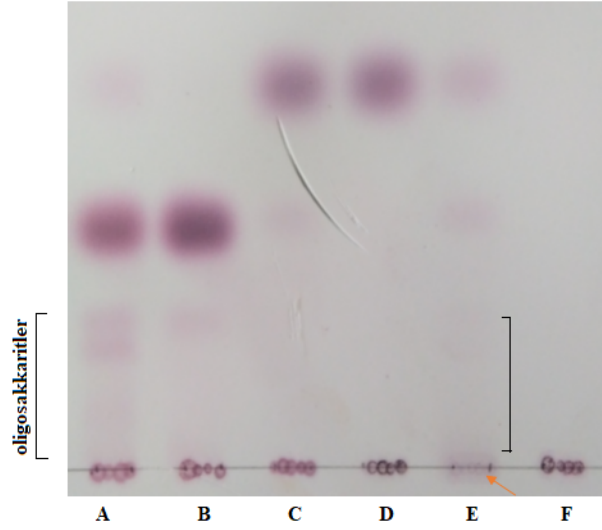


Şekil 3.28 GTFB enziminin nişasta üzerindeki etkisini ve glukoz ve maltoz alıcılarının ortamda bulunması durumunda 24 saat içinde açığa çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü, A: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125), B: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, C: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125), D: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, E: nişasta (% 0,125), F: nişasta (% 0,125) kontrol. Oklar yeni ortaya çıkan ürünleri göstermektedir

Şekil 3.28'de test edilen reaksiyon ürünleri 7 gün boyunca inkübe edilmiş ve bu inkübasyon sonrasında ortamda oluşması muhtemel diğer ürünler test edilmiştir. Şekil 3.29 bu ürünlerin test edilmesini gösteren TLC görüntüsünü göstermektedir. Bu şekilden de görüleceği üzere maltozun alıcı olarak kullanıldığı reaksiyon ürününde (Şekil 3.29, sıra A) yeni oligosakkaritler oluşmuş olup enzimin etkinliği ortaya konmuştur.

Glukozun alıcı olarak kullanılması beklendiği kadar oligosakkarit üretimine katkı sağlamamıştır (Şekil 3.29, sıra C). Bununla birlikte en önemli etki nişastada gözlenmiş

olup ortamda alıcı olmamasına rağmen GTFB nişastayı büyük oranda yeni ürünlere dönüştürmüştür (Şekil 3.29, sıra E). Bu sonuçlar ile GTFB'nin hem aktivitesi hem de oligosakkarit üretimindeki potansiyeli gösterilmiştir.



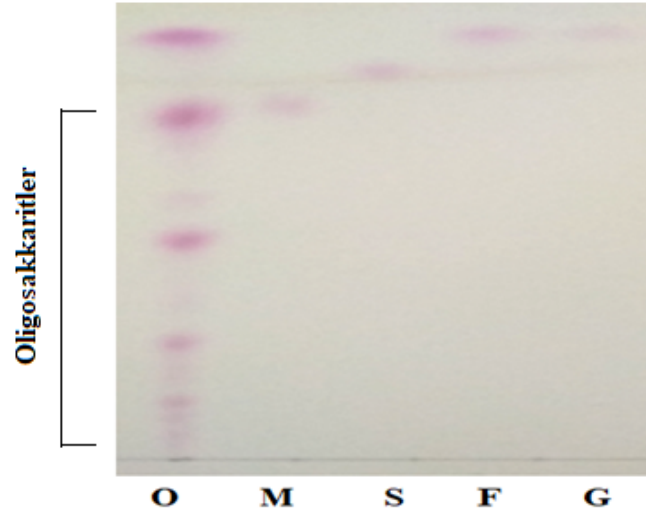
Şekil 3.29 GTFB enziminin nişasta üzerindeki etkisini ve glukoz ve maltoz alıcılarının ortamda bulunması durumunda 7 gün sonunda açığa çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü, A: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125), B: maltoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, C: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125), D: glukoz (25 mM), nişasta (% 0,125) kontrol, E: nişasta (% 0,125), F: nişasta (% 0,125) kontrol. Ok nişastanın bitmeye yakın olduğunu göstermektedir

3.13 GTFA ve GTFB Enzimleri ile Farklı Alıcı Şekerler Kullanılarak Oligosakkaritlerin Üretimi ve TLC, HPLC, LC/MS/QTOF ve NMR Analizleri

GTFA enziminin aktivitesi ile sukrozun parçalanıp açığa çıkan glukozun yine GTFA enzimi tarafından farklı alıcı şekerlere aktarılması ve yeni oligosakkaritlerin üretimi amacıyla sukrozun donör gentiobioz ve maltozun ise alıcı olarak kullanıldığı reaksiyon ortamları kurulmuş ve oluşan ürünler TLC, HPLC, LC/MS/QTOF ve NMR analizleri ile incelenmiştir.

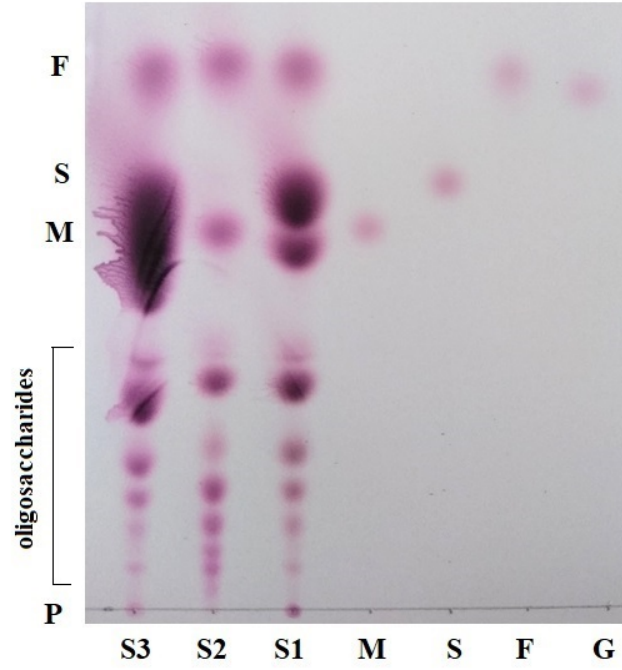
Şekil 3.30 reaksiyon ortamında $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ sukroz ve $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ maltoz olduğu durumda 30°C 'de 60 saat inkübasyon sonunda oluşan ürünleri göstermektedir (Sıra O). Şekil 3.30'dan da anlaşılabileceği üzere bu şartlarda hem sukroz hem de maltoz tamamen bitmiş olup farklı boyutlarda oligosakkaritler üretilmiştir.

GTFA- ΔN enziminin reaksiyon ortamında uzun süre faaliyeti neticesinde yukarıda belirtilen α -glukan'da ortamda üretilebilmekte olup oligosakkaritlerin analitik karakterizasyonundan önce etanol çöktürmesi ile oluşan bu EPS ortamdan



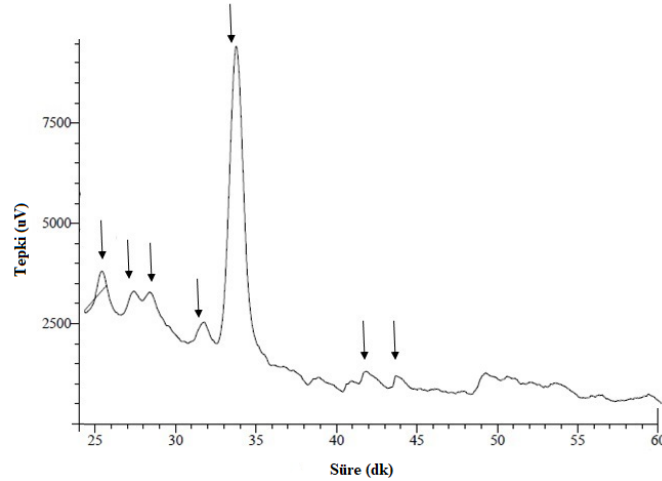
Şekil 3.30 Reaksiyon ortamında (20 mM sodium acetate tamponu, pH 5,2 and 1 mM CaCl_2) $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ sukroz ve $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ maltoz ve 1 U mL^{-1} olacak şekilde GTFA- ΔN olduğu durumda 30°C 'de 60 saat inkübasyon sonundaki reaksiyon ürünleri. Standartlar G: Glukoz, F: Fruktoz, S: Sukroz, M: Maltoz; O: Oluşan oligosakkaritler

uzaklaştırılmaktadır. GTFA- ΔN enziminin başarılı bir şekilde oligosakkaritleri üretim kabiliyetinin ortaya konmasını takiben farklı sukroz:maltoz konsantrasyonlarının oluşan ürünlere olan etkisinin incelenmesi amacıyla reaksiyon ortamları oluşturulmuştur. Reaksiyon ortamları S1 (50 mM asetat tamponu pH 5,2'de %10 sukroz ve %5 maltoz, 100 mL reaksiyon ortamı, 50 μL enzim, 30°C 36 saat inkübasyon), S2 (90 μL %10 sukroz, 90 μL %10 maltoz ve 20 μL enzim, 20 mM pH 5,4 sodyum asetat, 30°C 36 saat inkübasyon) ve S3 (100 μL reaksiyon ortamı, 20 mM pH 5,4 sodyum asetat, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ CaCl_2 , 100 g L^{-1} maltose, 400 g L^{-1} sukroz, 50 μL enzim 30°C 36 saat inkübasyon) kurularak enzim aktivitesi ve oluşan ürünler TLC ile tespit edilmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31 GTFA- Δ N enzimi ile farklı sukroz:maltoz konsantrasyonlarında kurulan reaksiyon ortamlarında oligosakkaritlerin oluşumunu gösteren TLC görüntüsü. S1, S2 ve S3 yukarıda ifade edilen farklı reaksiyon ortamları, M: maltoz, S: sukroz, F: fruktoz, G: glukoz, oligosakkaritler ve P: glukan

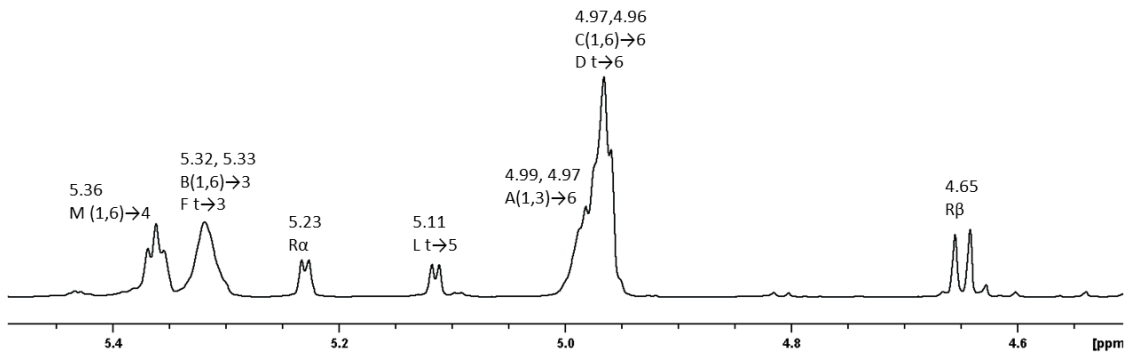
36 saatlik inkübasyon sonunda her bir reaksiyon ortamında TLC analizi sonucunda bantların yürüme boyutuna göre benzer ürünler açığa çıkmış ve reaksiyon ortamı S2’de sukroz belirgin bir şekilde tamamen kullanıldığı için sonraki analizler için bu reaksiyon ortamının ürünü kullanılmıştır. Şekil 3.32 reaksiyon ortamı S2’nin ürünlerinin HPLC ile analiz edilmesi sonucu elde edilen kromatogramı göstermektedir.



Şekil 3.32 Reaksiyon ortamı S2’nin HPLC kromatogramı; oligosakkaritler 25. dk’dan itibaren tespit edilmişlerdir. Oklar oligosakkaritleri göstermektedir

HPLC kromatogramında herhangi bir sukroz veya glukoz tespit edilmemiş olup oluşan glukozun etkin bir şekilde maltoza aktarıldığı anlaşılmaktadır. Önemli olarak

karakterizasyonu amacıyla reaksiyon karışımı liyofilize edilmiş ve NMR analizine tabi tutulmuştur. Bu amaçla oligosakkarit örneklerinin ^1H ve ^{13}C NMR spektralleri elde edilmiştir. Şekil 3.34 oligosakkarit karışımının ^1H spektrumunu göstermektedir. Şekilden de görüleceği üzere $\alpha\text{-Glc-3}$ (δ 5,32) ve $\alpha\text{-Glc-6}$ (δ 4,97) ünitelerindeki sinyallere ilave olarak oligosakkarit karışımına ait olan indirgen uçtan $R\alpha$ (δ 5,23) ve R (δ 4,65) sinyalleri ve maltozun indirgen olmayan ucundaki $\alpha\text{-Glc-4}$, M (δ 5,36), varlığından kaynaklanan sinyalde mevcuttur. Önemli olarak ^1H $\alpha\text{-Glc}$ δ 5,11'deki sinyalden anlaşılacağı üzere örnek karışımında aynı zamanda $\alpha\text{-D-Glcp-(1-5)-D-Frup}$ yapısından oluşan leukroz yer almaktadır. Bu da sukrozun parçalanması ile açığa çıkan glukozun aynı zamanda sukrozun parçalanması ile açığa çıkan fruktoza GTFA- ΔN enzimi tarafından aktarılabilirdiğini göstermesi bakımından önemlidir.



Şekil 3.34 Oligosakkarit karışımının 600 MHz'deki anomerik bölgesinin ^1H NMR spektrumu. L = leukroz. Diğer harflendirmeler sonuç kısmında ifade edilmiştir

^1H NMR spektrumunda gösterilen ünitelerin detaylı 2D NMR incelemesi oligosakkaritlerin A (1,3)Glc-6; B (1,6)Glc-3; C (1,6)Glc-6; D t-Glc-6; F t-Glc-3; M (1,6)Glc-4 bağlarından oluşan grupların ve 4-bağlı indirgen Glc, $R\alpha$ ve $R\beta$ ünitesinin yer aldığını ortaya koymuştur. A-F gruplarının NMR parametreleri benzer çalışmada bulunan NMR parametrelerine oldukça yakın bulunmuştur [64]. ^1H spektrumunda δ 5,36 da sinyal veren M ünitesinin ^{13}C NMR spektrumu ile yapılan hsqc-tocsy incelemesi bu grubun diğer glukoz ünitesi ile 6-bağlı olduğunu (3- veya 3,6 değil) göstermektedir. Şekil 3.34'de verilen ^1H spektrumundaki sinyallerin birbirine oranı ($R\alpha + R\beta$): M: (B + F): (A + C + D) = 1: 1: 1.5: 4, olarak hesaplanmıştır. Bu göstermektedir ki bu reaksiyon karışımındaki temel oligosakkaritler DP7 veya DP8 olup bu oligosakkaritlerde -6 Glu üniteleri -3 ünitelerine göre daha yüksek oranda yer almaktadır. Daha önceki çalışmalarda da elde edilen oligosakkaritler NMR ile analiz edilerek karakterize edilmeye çalışılmıştır. Örneğin GTF180- ΔN enzimi sukroz:maltoz oranı 1:1 olduğunda temel olarak trisakkarit panoz ve bir tetrasakkarit üretilirken az oranda DP4 ve DP5 oligosakkaritlerinin üretildiği gösterilmiştir [120]. Bizim çalışmamızda ise panoz ^{13}C standartı ile bizim ^{13}C spektrumumuz

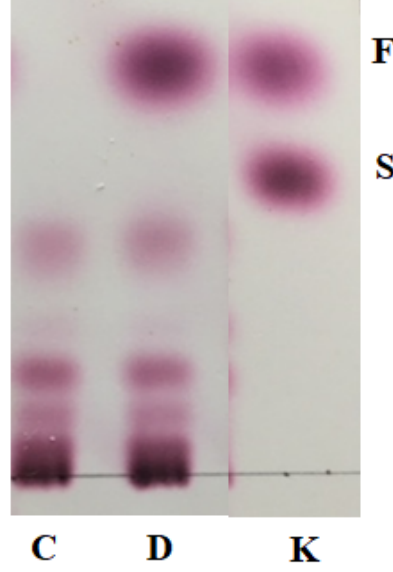
incelendiğinde panoz çok düşük oranda yer almaktadır. Sonuç olarak bütün bu sonuçlar GTFA- Δ N enziminin sukroz ve maltoz ile alıcı reaksiyonları sonucunda elde ettiğimiz oligosakkarit karışımının temel olarak DP7 veya DP8'den oluşan ve DP9'a kadar olan oligosakkaritleri içerdiğini göstermektedir.

Maltozun alıcı olarak kullanıldığı reaksiyonlar ile DP9'a kadar oligosakkaritlerinin üretiminin gösterilmesini takiben alıcı olarak gentiobioz kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. Şekil 3.35 ve 3.36'dan da görüleceği üzere GTFA- Δ N sukrozun donor ve maltoz ve gentiobiozun 'akseptör' olarak kullanılması ile farklı nitelikte oligosakkaritler üretmiştir. Normal koşullarda alıcı reaksiyonları sukroz ortamdan tamamen uzaklaşmaya kadar sürdürülmüştür. Bununla birlikte sonraki basamaklarda bu oligosakkarit karışımının saf olarak kullanılabilmesi için ortamda kalmışsa sukroz, sukrozun parçalanması neticesinde biriken fruktoz ve yine kalmışsa şeker alıcıların ortamdan uzaklaştırılması için immobilize maya hücreleri kullanılmış ve maya hücreleri ortamdaki fruktoz ve kalmışsa sukroz ve şeker alıcıları kullanarak bunları ortamdan tamamen uzaklaştırmıştır [121]. Takiben immobilize maya hücreleri de ortamdan uzaklaştırılarak oligosakkarit karışımları saf halde elde edilmişlerdir.



Şekil 3.35 GTFA- Δ N enzimi ve maltoz (H) ile oluşturulan reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü. G immobilize maya uygulamasının ardından ve maltoz ile elde edilen oligosakkarit karışımlarından fruktoz, sukroz ve varsa alıcı şekerin tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. F: fruktoz, S: sukroz, K: kontrol

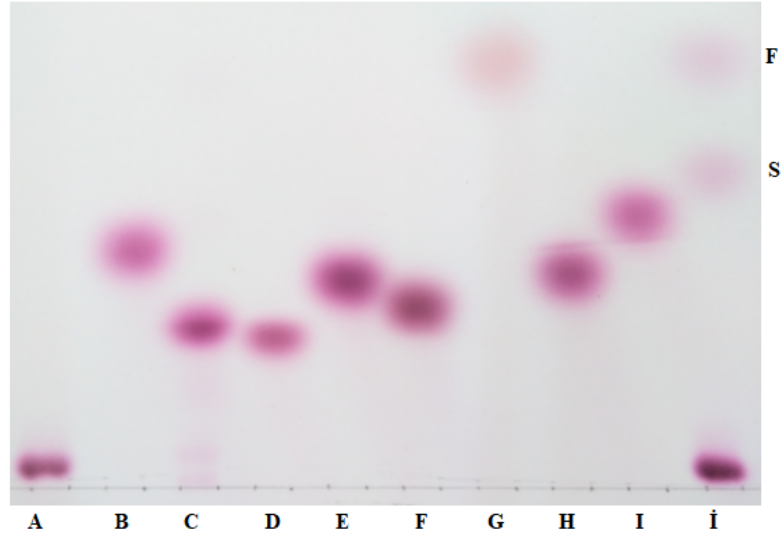
Şekil 3.35 ve 3.36 farklı şeker alıcılar ile kurulan reaksiyonlarda ortamda kalan oligosakkarit harici bileşenlerin immobilize maya hücreleri ile ortamdan uzaklaştığını gösteren TLC görüntülerini göstermektedir.



Şekil 3.36 GTFA- Δ N enzimi ile gentiobiyoz (D) ile oluşturulan reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü. C immobilize maya uygulamasının ardından gentiobiyoz ile elde edilen oligosakkarit karışımlarından fruktoz, sukroz ve varsa alıcı şekerin tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. F: fruktoz, S: sukroz, K: kontrol

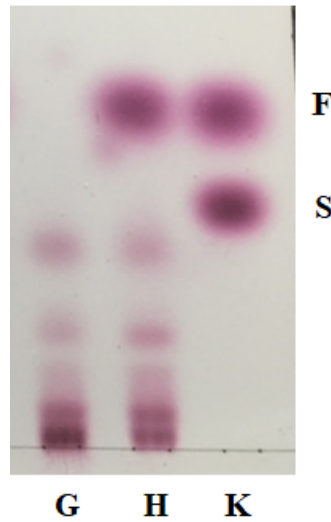
İmmobilize maya uygulaması sayesinde oligosakkaritler saf bir şekilde elde edilmiş ve prebiyotik ve immuno modülasyon testlerinde saf halde kullanılmıştır. Aşağıda verilen TLC sonuçları farklı şeker alıcılar ile kurulan reaksiyonların sonuçlarını göstermektedir. Üretilen oligosakkaritlerin fonksiyonel etkilerinin incelenmesi çalışmalarında her zaman önce immobilize maya uygulaması yapılmış ve sadece ortamda oligosakkaritler kaldığı zaman fonksiyonel etki çalışmalarına geçilmiştir. Maltoza ilave olarak gentiobioz alıcı reaksiyonlarında test edilmiştir. Şekil 3.37 kullanılan alıcı şekerlerin TLC kromatogramını göstermektedir.

Şekil 3.37’de TLC görüntüleri verilen her bir standart ile standart reaksiyon karışımında mL’de 1 U GTFA- Δ N ve sukrozun ilgili alıcıya oranı 4:1 olacağı şartlarda reaksiyonlar kurulmuş ve sukrozun tamamen bitmesini takiben reaksiyonlar sonlandırılarak oluşan ürünler test edilmiştir.



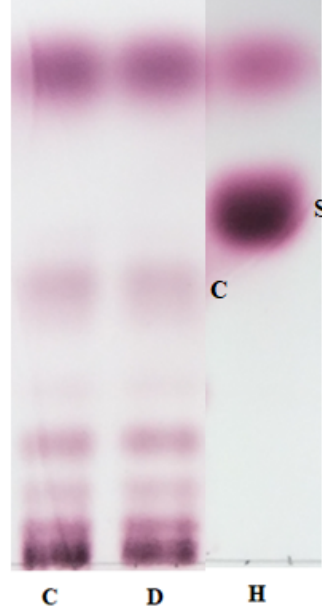
Şekil 3.37 Alıcı reaksiyonlarında kullanılan şekerlerin TLC görüntüsü. A: maltoheptoz, C: maltotrioz, H: gentiobioz, İ: maltoheptoz

Şekil 3.38’de verilen reaksiyon sonuçları 100 μ L’lik hacimde kurulmuş olup takiben farklı hacimlerde ve daha fazla enzim kullanılarak reaksiyonlar tekrar kurulmuş ve oligosakkaritlerin oluşumu izlenmiştir. Sukrozun tamamen ortamdaki uzaklaşması için farklı enzim:alıcı:sukroz konsantrasyonları denenmiş ve her seferinde ilgili oligosakkaritler oluşmuş ancak sukroz çoğunda tamamen tükenmemiştir (İlgili TLC görüntüleri tekrar niteliği taşıyacağından eklenmemiştir).



Şekil 3.38 GTFA- Δ N enzimi ve maltoz (H) ile oluşturulan reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü. G immobilize maya uygulamasının ardından ve maltoz ile elde edilen oligosakkarit karışımlarından fruktoz, sukroz ve varsa alıcı şekerin tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. F: fruktoz, S: sukroz, K: kontrol

Şekil 3.39 gentiobiozun alıcı olarak kullanıldığı reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin TLC görüntüsünü vermektedir.

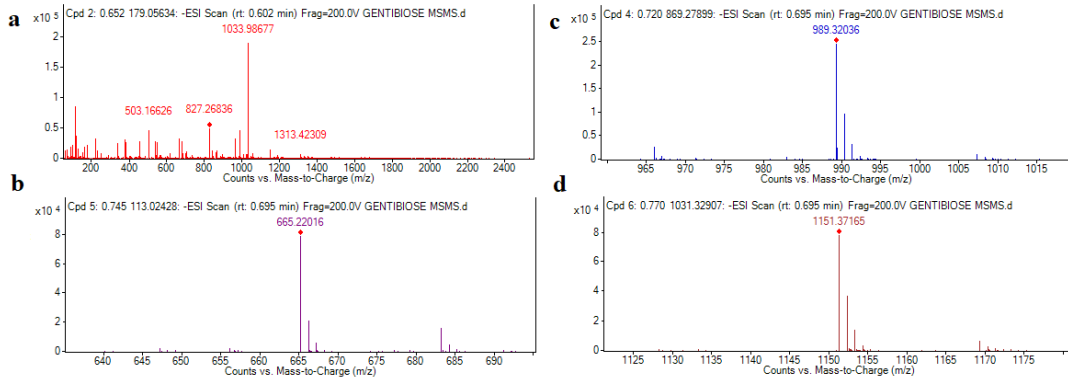


Şekil 3.39 GTFA- Δ N enzimi ile alıcı reaksiyonlarında sırasıyla alıcı C: gentiobios (EÖ), D: gentiobios (ES), kontrol, H: sukroz kullanılması ile ortaya çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü. ES: etanol çöktürmesi uygulandıktan sonra geriye kalan oligosakkaritleri içeren örnek, EÖ: etanol çöktürmesi uygulanmamış örnek, S: sukroz

Bu reaksiyonda sukroz $0,2 \text{ g mL}^{-1}$, alıcı şeker $0,05 \text{ g mL}^{-1}$, 20 mM NaAc , 1 mM CaCl_2 pH 5,4 ortamına $2,5 \text{ U GTFA-}\Delta\text{N}$ enzimi ilave edilerek 1 mL reaksiyon hacminde 30°C 'de 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.39'dan da görüleceği üzere bu şartlarda ortamda bulunan sukroz tamamen bitmiş ve dönüşüme uğramıştır. Burada GTFA- Δ N enziminin aktivitesi ile açığa çıkan glukoz alıcı şekere ilave olunarak farklı oligosakkaritlerin üretimi ile sonuçlanan reaksiyonlar gerçekleşmiştir. Mevcut şartlarda gentiobios tamamen tükenmiş olup ilgili oligosakkaritlerin üretimi gerçekleşmiştir. Bu noktada ifade olunması gereken bir diğer hususta oluşan potansiyel oligosakkarit bantlarının maltoz alıcı olarak kullanıldığı duruma göre sayısının az olması olup bu hususta farklı alıcılar arasındaki farkı göstermesi bakımından son derece önemlidir. Şekil 3.39'da gözlenen bir diğer husus ise etanol muamelesi ile reaksiyon sırasında oluşan glukoz uzaklaştırılmasına rağmen oluşan oligosakkaritlerin R_t sürelerinin çok düşük gözlenmesidir. Bir sonraki bölümde tartışacağımız LC/MS/QTOF verileri göz önüne alındığında maltoz alıcısına göre daha büyük boyutta oligosakkarit oluşmamasına rağmen TLC'deki R_t sürelerinin çok düşük olması farklı oligosakkaritlerin davranışları arasındaki farklılığın gözlenmesi noktasında önem arz etmektedir.

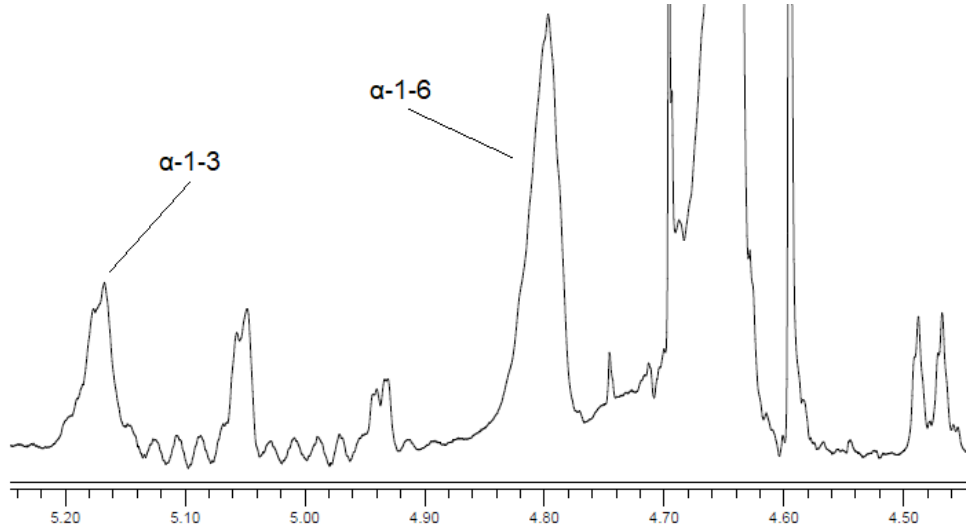
TLC analizi ile test edilen alıcılara GTFA- Δ N enziminin sukrozun parçalanması ile açığa çıkan glukozu farklı oranlarda olsa da aktarabildiği ortaya konmuş olup elde edilen bu oligosakkaritlerin boyutunun anlaşılabilmesi için bu reaksiyon

ürünleri LC/MS/QTOF analizine tabi tutulmuştur. Şekil 3.40 gentiobiozun alıcı olarak kullanılması sonucunda oluşan ürünleri göstermektedir. Gentiobioz beta-D-gluco-hexopyranosyl-(1->6)-D-gluco-hexopyranose olup Glu ünitelerinin $\beta(1-6)$ bağları ile bağlanması neticesinde oluşmuştur. Şekil 3.40 GTFA'nın sukrozu parçalayarak açığa çıkan glukozu bu disakkarite aktarması neticesinde ortaya çıkan oligosakkaritlerin boyutunu göstermektedir.



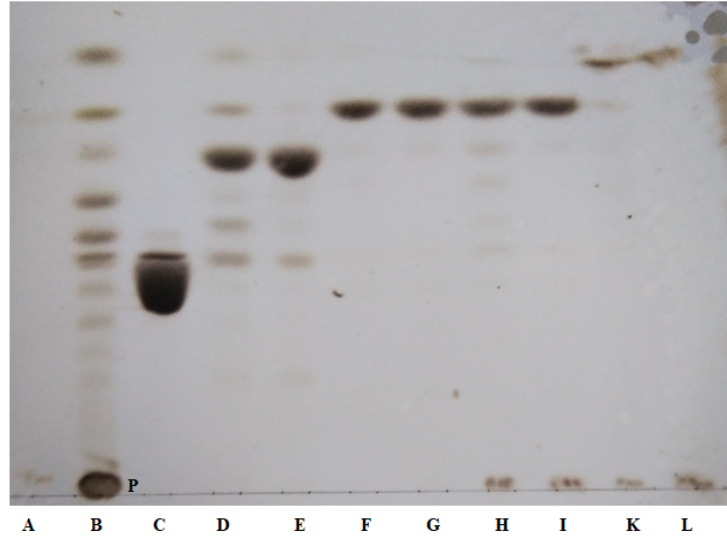
Şekil 3.40 GTFA- Δ N enzimi ile sukrozun donör gentiobiozun ise alıcı olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu, a) 503.1 (DP3), b) 665. 2 (DP4), a) 827.2 (DP5), c) 989.3 (DP6), d) 1151. 3 (DP7), a) 1313.4 (DP8)

Şekil 3.40'dan da anlaşılabileceği üzere gentiobioz alıcı reaksiyonu neticesinde DP 8'e kadar oligosakkaritlerin oluştuğu MS spektrumlarında [M]⁻ negatif modda m/z 503.2, 665.2, 827.2, 989.3, 1151.3 ve 1313.4'te oluşan iyon kütlelerinden anlaşılabilmektedir (Şekil 3.40 a-d). Benzer olarak bu oligosakkaritler GTFA- Δ N enziminin aktivitesi göze alındığında Glu ünitelerinin farklı oranlarda $\alpha(1-6)$ - ve $\alpha(1-3)$ - bağı ile bağlanması neticesinde oluşmuş olmaları çok kuvvetle muhtemeldir ki Şekil 3.41 gentiobiozun alıcı olarak kullanılması ile elde edilen oligosakkaritlerin ¹H NMR spektroskopisi sonucunu göstermektedir ve şekilden de ilgili bağların oligosakkarit ünitelerinde yer aldığı görülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F'den elde edilen bir alternansükras ile DP 5'e kadar oligosakkaritlerin gentiobioz ile üretilebildiği gösterilmiştir [106]. Elde ettiğimiz sonuçlara göre boyutu DP 8'e varabilen oligosakkaritlerin *L. reuteri* E81 GTFA- Δ N enzimi tarafından üretilebilmiş olması oldukça önemlidir.



Şekil 3.41 Gentiobiozun alıcı olarak kullanılması ile üretilen oligosakkarit karışımının 500 MHz'deki anomerik bölgesinin ^1H NMR spektrumu

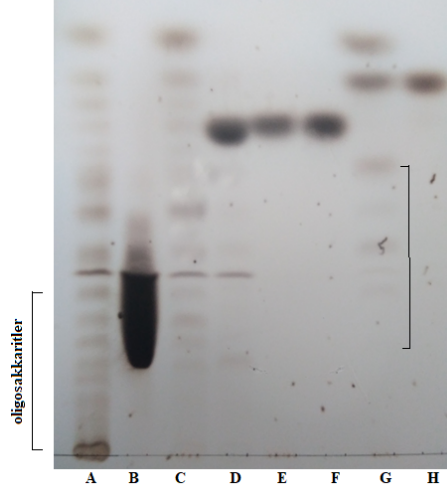
Şekil 3.42 amilozun substrat olarak ve amiloz ile birlikte glukoz ve maltozun alıcı olarak kullanılması ile ve GTFB enziminin maltoz, maltotrioz ve maltoheptoz üzerindeki etkisinin incelenmesi sonucunda 24 saat sonunda elde edilen reaksiyon ürünlerinin TLC görüntüsü verilmektedir. Burada GTFA enziminin test edilmesinde kullanılan TLC şartları değil bunun yerine butanol:etanol:su karışımında (5:5:3), 6 saat boyunca yürütme işleminin denenmesi ile en uygun TLC görüntüsü elde edilebilmiştir



Şekil 3.42 GTFB enziminin amiloz ve amilozun yanı sıra glukoz ve maltoz alıcılarının ortamda bulunması durumunda, maltoz, maltotrioz ve maltoheptoz ile 24 saat sonunda açığa çıkan ürünleri gösteren TLC görüntüsü, A: Amiloz, B: maltoheptoz C: maltoheptoz kontrol, D: maltotrioz, E: maltotrioz kontrol, F: maltoz, G: maltoz kontrol H: amiloz-maltoz, I: amiloz-maltoz kontrol, K: amiloz glukoz, L: amiloz glukoz kontrol, P: glukoz

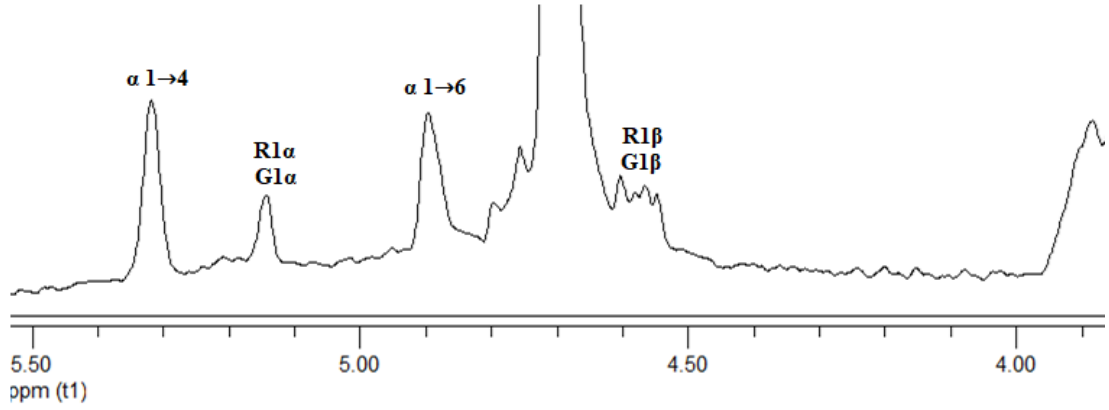
Şekil 3.42'den de görüleceği üzere enzim amilozda aktif olup (Şekil 3.42, sıra A) özellikle maltoz alıcı ile yeni ürünlerin oluşumu gözlenmiş (Şekil 3.42, sıra H) ancak glukoz uygun bir alıcı olarak davranmamıştır (Şekil 3.42, sıra K). En dikkat çekici sonuç substrat olarak maltoheptozun test edilmesi ile elde edilmiş ve burada önemli oranda hem oligosakkaritler hem de glukoz oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 3.42, sıra B).

Benzer olarak reaksiyon ortamındaki enzim miktarı 2 katına çıkartılarak maltoheptoz, maltotrioz, izomaltoz ve maltoz ile tekrar reaksiyonlar kurulmuş ve GTFB enziminin aktivitesi test edilmiştir (Şekil 3.43). Enzimin iki katına çıkarılması ile özellikle maltoz ile oluşan ürünler çok daha fazla belirginleşmişler ve maltoheptoz ve maltotriozda ise benzer sonuçlar elde edilmiştir. Önemli olarak GTFB enzimi α 1-6 Glu ünitelerinden oluşan izomaltoz üzerine herhangi bir aktivite göstermemiştir (Şekil 3.43 sıra E). Bu sonuçta enzimin spesifik etkinliğini göstermesi bakımından önem arz etmektedir.



Şekil 3.43 GTFB enziminin A: maltoheptoz, B: maltoheptoz kontrol C: maltotrioz D: maltotrioz kontrol, E: izomaltoz, F: izomaltoz kontrol, G: maltoz, H: maltoz kontrol ile test edilmesini gösteren TLC görüntüsü

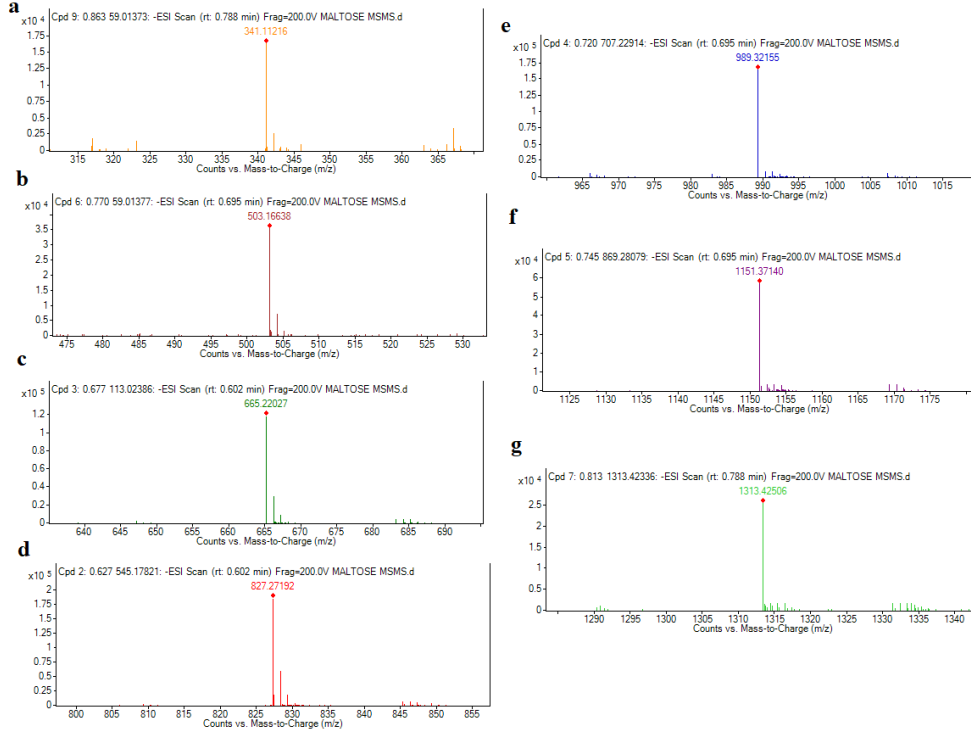
GTFB enzimi ile oluşan oligosakkaritlerde α 1-6 Glu ünitelerinin oluşumunun ispatlanması açısından maltoheptozdan elde edilen ürün ^1H NMR analizine tabi tutulmuştur. Şekil 3.44 bu reaksiyon ürününün NMR spektrasını göstermektedir. NMR spektrasından da görüleceği üzere maltoheptozda bulunan (α 1-4) bağına ilave olarak (H-1, δ 5,32), GTFB'nin aktivitesi sonucunda (α 1-6) bağları (H-1, δ 4.90) oluşmuştur. Önemli olarak 24 saatlik süre zarfında (α 1-4):(α 1-6) bağlarının oranlarının 54:46 olmasından anlaşılabileceği üzere GTFB enzimi etkin bir şekilde transferaz aktivitesi sergilemiş ve yeni (α 1-6) bağlı oligosakkaritlerin oluşumu ortaya konmuştur.



Şekil 3.44 GTFB tarafından maltoheptozun substrat olarak kullanılmasıyla üretilen oligosakkari karışımına ait ^1H NMR spektrumu

Daha önceki iki çalışmada bu oran sırasıyla *L. reuteri* DSM20016 dan elde edilen GTFW ve suş ML1'den elde edilen GTFML4 için sırasıyla 50:50 ve 53:47 olarak bulunmuştur [50] ve ek olarak inkübasyon süresinin artması ile bu oranın değişebildiği de ifade edilmiştir [91]. Ek olarak oluşan glukoz etanol ile uzaklaştırıldığı için enzimin etkisinin daha da yüksek olduğu gözden kaçırılmamalıdır. Daha önceki çalışmalara benzer olarak ortamda serbest glukozun varlığı da ^1H NMR spektrumu ile anlaşılmaktadır. Önemli olarak malto-oligosakkaritlerin dallanma noktalarını gösterecek şekilde ([H-1, δ 5.36]), [H-1, δ 3.45]) herhangi bir sinyal gözlenmemiş olup [56, 122] bu durum GTFB E81'in maltozdan düz yapılar meydana getirdiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak GTFB enziminin etkili bir 4,6- α -glukanotransferaz olduğu elde ettiğimiz sonuçlar ile kanıtlanmış olup oluşan bu oligosakkaritler LC/MS/QTOF analizine tabi tutularak kütle spektrumları belirlenmiştir. İlk olarak maltoz ile üretilen oligosakkaritlerin kütle spektrumları belirlenmiştir (Şekil 3.45).

Şekil 3.43'den de görüleceği üzere GTFB ile gerçekleştirilen ve maltozun substrat olarak kullanıldığı reaksiyonda GTFB enzimi maltozu parçalayarak açığa çıkan glukoz ünitelerini birbirine bağlamış ve LC/MS/QTOF kütle spektroskopisi analizi sonuçlarından anlaşılabileceği üzere (DP 8'e kadar glukooligosakkaritlerin olduğu MS spektrumlarında [M]⁻ negatif iyonik yükte m/z 503.2, 665.2, 827.2, 989.3 ve 1151.3 ve 1313.4'te oluşan iyon kütlelerinden anlaşılabilmektedir (Şekil 3.45).

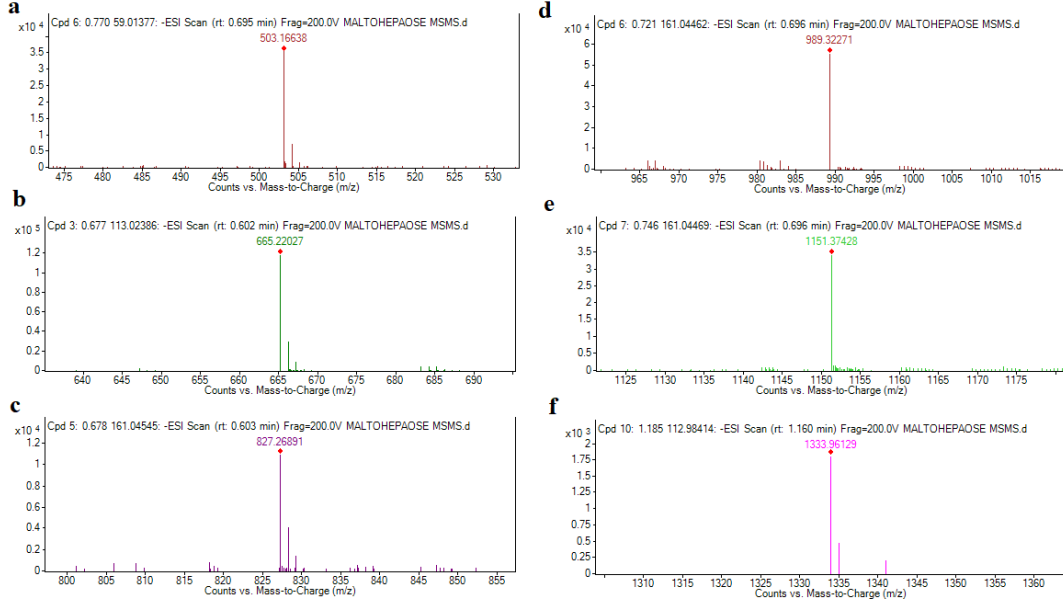


Şekil 3.45 GTFB enzimi ile maltozun substrat olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu, a) 341.1, b) 503.1 (DP3), c) 665.2 (DP4), d) 827.2 (DP5), e) 1151.3 (DP7), f) 1313.4 (DP8)

Daha önce yapılan bir çalışmada GTFB-W'nın maltozdan DP 6'ya kadar oligosakkarit üretebildiği gösterilmiş olup [50] GTFB E81 daha uzun oligosakkarit üretimini gerçekleştirebilmektedir.

TLC sonuçlarında dikkat çeken bir diğer substrat maltoheptoz olup NMR ile yüksek oranda α 1-6 bağı içeren oligosakkaritlerin mevcut olduğunun gösterilmesi elde ettiğimiz sonuçların önemini artırmıştır. Şekil 3.46 da maltoheptoz (DP7) kullanılarak üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF kütle spektroskopisi sonuçlarını göstermektedir.

Şekil 3.46'dan da anlaşılacağı üzere GTFB enzimi maltoheptozu substrat olarak kullanmış ve DP 8'e kadar (artık 1-6 bağı içeren) glukooligosakkaritlerin oluşumu MS spektrumlarında [M]⁻ negatif iyonik yükte m/z 503.2, 665.2, 827.2, 989.3 ve 1151.3 ve 1313.4'te oluşan iyon kütlelerinden ortaya çıkmıştır. Bu noktada substrat olarak kullandığımız [M]⁻ negatif iyonik yükte m/z 1151.3 kütlesi olan maltoheptozdan daha küçük boyutlu oligosakkaritler ve daha büyük bir oligosakkarit oluştuğu gözlenmiştir. TLC sonuçlarından bu substratın çok az oranda ortamda kaldığı gösterilmiş olup oluşan oligosakkaritlerinde α 1-6 ve α 1-4 bağlarından oluştuğu NMR spektroskopisi ile ortaya konmuştur.



Şekil 3.46 GTFB enzimi ile maltoheptozun substrat olarak kullanılması neticesinde üretilen oligosakkaritlerin LC/MS/QTOF spektrumu, a) 503.1 (DP3), b) 665.2 (DP4), c) 827.2 (DP5), d) 989.3 (DP6) e) 1151.3 (DP7), f) 1313.4 (DP8)

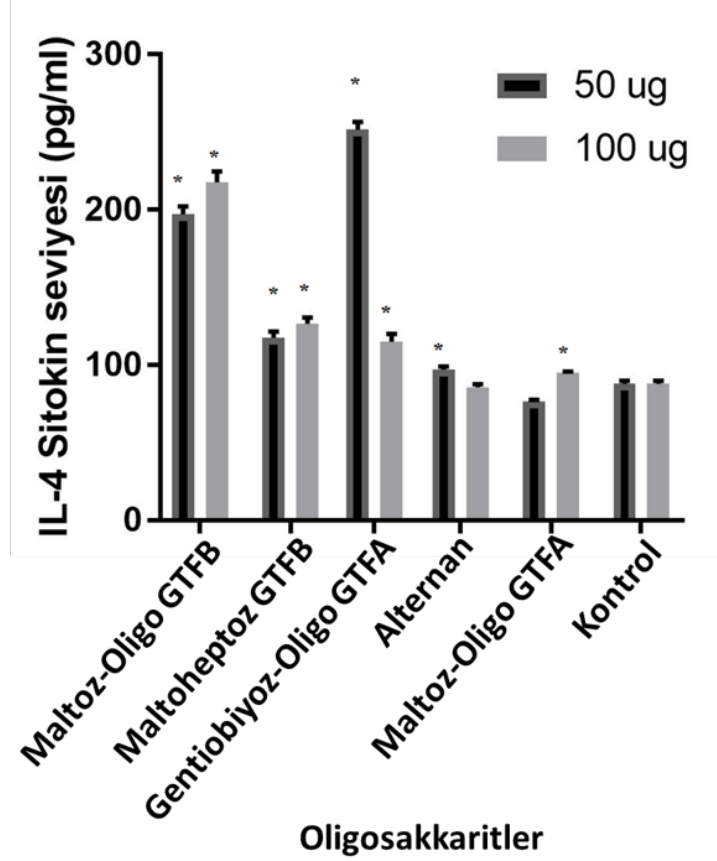
Daha önce yapılan bir çalışmada ise *L. reuteri* 121'den elde edilen GTFB'nin maltoheptozdan DP 35'e kadar oligosakkarit üretebildiği ancak DP 10'dan büyük olan oligosakkaritlerin oranının bu karışımda çok düşük olduğu gösterilmiştir [123].

3.14 GTFA- Δ N ve GTFB Enzimleri ile Üretilen Oligosakkaritlerin Bağışıklık Düzenleyici Özellikleri

Alternanın ve seçilen oligosakkaritlerin immunomodulatif etkisinin belirlenmesi amacıyla hem E81 tarafından üretilen alternan hem de tez çerçevesinde üretilen bütün oligosakkaritlerin pro-inflamatuar TNF- α , IL-12 ve anti-inflamatuar IL-10, IL-4 sitokinleri üzerindeki bağışıklık düzenleyici fonksiyonları insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde toplam alternan ve oligosakkarit miktarı 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde test edilmiştir (Şekil 3.47-3.50).

İlk olarak oligosakkaritlerin ve alternanın anti-inflamatuar IL-4 üzerindeki etkisi verilmiştir. IL-4 inflamasyonu engelleyici etkisi yanında özellikle hücreleri uyarak gelişen tümörlere karşı sitotoksik etki oluşturabildiği gösterilmiş bir sitokin olması münasebetiyle ayrıca önem taşımaktadır. Şekil 3.61, HT-29 hücrelerinin oligosakkarit karışımı ve alternanın 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde hücrelere uygulanmasının ardından alınan IL-4 tepkisini kontrole kıyasla göstermektedir. Önemli olarak şu hususunda ifade edilmesi gerekir ki oligosakkaritlere en fazla tepki IL-4 ile elde edilmiştir. Test edilen oligosakkarit karışımlarından maltozun

ve maltoheptozun GTFB tarafından oligosakkaritlere dönüştürülmesi ile elde edilen sırasıyla DP8'e kadar olan maltooligosakkaritler her iki konsantrasyonda da IL-4 sitokini istatistiksel olarak önemli olacak düzeyde ($p<0,05$) indüklemiştir (Şekil 3.47). Bu etki konsantrasyona bağlı olarak bir miktar artmıştır.

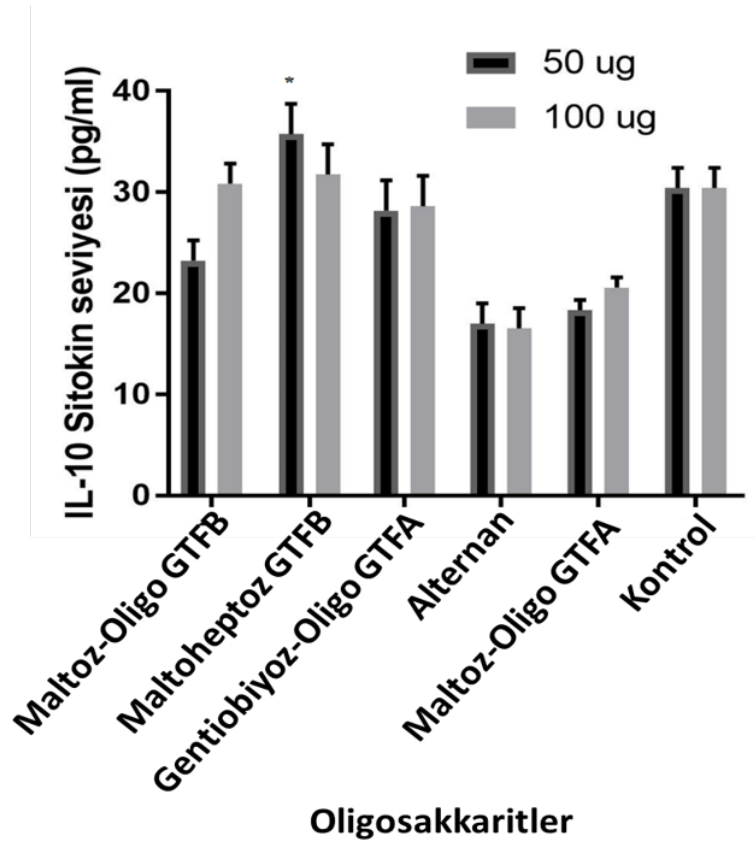


Şekil 3.47 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın $50-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen IL-4 sitokin seviyesi

İlginç olarak alternanın $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonu hiç indüklemeye oluşturmazken, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonu çok az indüklemeyi tetiklemiştir ($p<0,05$). Benzer bir durum alternan ile yapısal olarak temelde birleşen maltozun GTFA ile reaksiyon ürünlerinde $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda gözlenmiştir. IL-4 üzerinde en yüksek etkiyi oluşturan oligosakkarit karışımı DP8'e kadar ürün oluştuğunu gösterdiğimiz gentiobiyozun reaksiyon ürünlerinin $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. Bu oligosakkarit karışımının $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonu yine istatistiksel açıdan önemli oranda ($p<0,05$) IL-4 seviyesini arttırsa da etki $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyona göre daha düşük açığa çıkmıştır. Sonuç olarak yapısal olarak farklı oligosakkaritlerden ve alternandan oluşan ürünlerimiz IL-4 sitokini üzerine çok farklı etkiler oluşturmakla birlikte sevindirici olarak IL-4 üzerinde büyük bir kısmı indükleyici etki göstermiştir.

Bu sonuç inflamasyon önleyici ve tümör engelleyici bir sitokin üretiminin ürettiğimiz oligosakkaritler tarafından arttırılabildiğinin gösterilmesi bakımından önemlidir. Nitekim bizim bulgularımıza benzer olarak daha önce yapılan bir çalışmada glikoaminoglikanların önemli ölçüde IL-4 indüksiyonuna sebebiyet verdiği ve dolayısıyla bu inflamasyon önleyici sitokin artması ile birçok biyolojik sürecin düzenlenebileceği fikri ortaya atılmıştır (den Dekker et al., 2008).

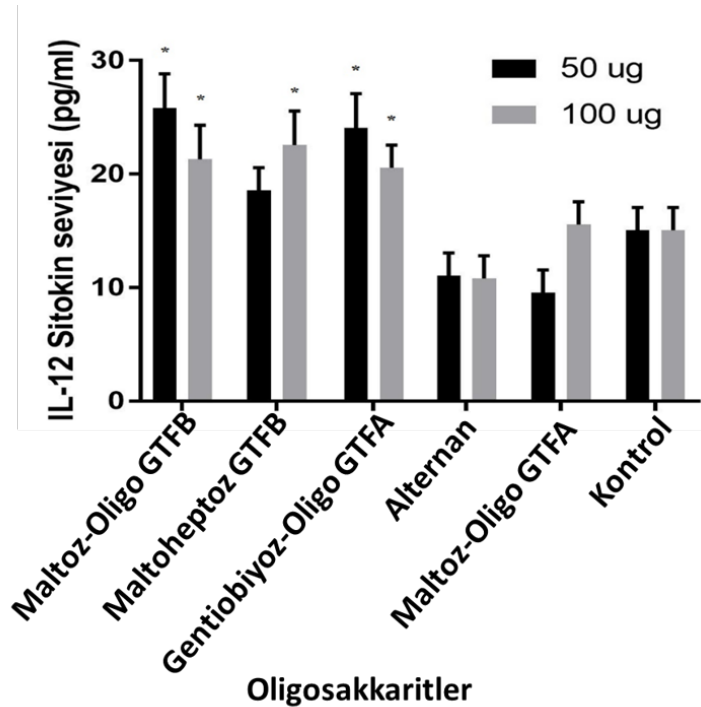
Oligosakkaritlerin ve alternanın bağışıklık düzenlenmesinin test edilmesi amacıyla test edilen bir diğer sitokin anti-inflamatuar IL-10'dur. IL-10 inflamasyonu engelleyici etkisi yanında özellikle doku hasarını azaltıp toparlanmayı hızlandırması açısından önem arz eden bir sitokindir ve probiyotiklerin fonksiyonu olarak IL-10 indüksiyonu gerçekleştirilmektedir (Gourbeyre, Denery, Bodinier, 2011). Şekil 3.48, HT-29 hücrelerinin oligosakkarit karışımı ve alternanın $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde hücrelere uygulanmasının ardından ölçülen IL-10 seviyesini kontrole kıyasla göstermektedir.



Şekil 3.48 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın $50\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen IL-10 sitokin seviyesi

Test edilen oligosakkaritlerden ve alternandan sadece bir uygulama IL-10 seviyesini kontrole kıyasla arttırmıştır. Bu oligosakkaritler maltoheptozun GTFB ile muamelesi ile elde edilen DP8'e kadar olan oligosakkarit karışımının $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonudur. Diğer test edilen bütün parametrelerin IL-10 üretimi üzerindeki etkisi kontrole kıyasla önemsiz bulunmuş ($p>0,05$) ve hatta birçoğunda herhangi bir indüksiyon meydana gelmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç belirli yapıların belirli sitokinler üzerinde etkin olabileceğinin gösterilmesi bakımından önem arz etmektedir. Bağışıklık sisteminin ne kadar karmaşık olduğu düşünüldüğünde belirgin yapılardan belirgin tepkiler alınabilmesi de aslında oligosakkaritlerin etkinliğinin gösterilmesi bakımından önemli olabilir. Örneğin alternan IL-4'te çok az etki oluşturmada dışında test ettiğimiz bütün sitokinler üzerinde etkili olamamış ve çoğu zaman kontrole göre daha düşük bir tepkinin oluşmasına neden olmuştur.

Anti-inflamatuar sitokinlere ilave olarak ürettiğimiz oligosakkaritlerin ve alternanın pro-inflamatuar IL-12 ve TNF- α sitokinleri üzerindeki etkileri de *in vitro* koşullarda HT-29 hücreleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 3.49, HT-29 hücrelerinin oligosakkarit karışımı ve alternanın $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde hücrelere uygulanmasının ardından ölçülen IL-12 seviyesini kontrole kıyasla göstermektedir. IL-12 hücre içi mikrobiyal enfeksiyonlara karşı önemli bir savunma molekülü olup indüklenmesi önem arz etmektedir.

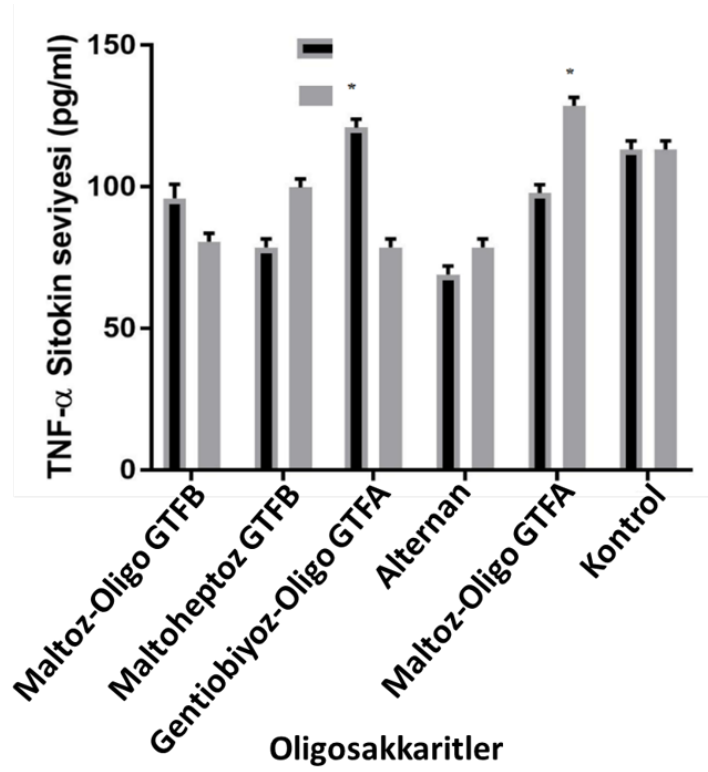


Şekil 3.49 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın $50\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen IL-12 sitokin seviyesi

Şekil 3.49'dan da görüleceği üzere maltozun GTFB tarafından oligosakkaritlere dönüştürülmesi ile elde edilen DP8'e kadar olan oligosakkarit karışımının her iki konsantrasyonu da IL-12 seviyesini kontrole kıyasla önemli oranda ($p<0,05$) arttırmıştır. Bu etki maltoheptozun oligosakkaritlerinden sadece $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonda kontrole göre bir miktar indüksiyon gerçekleştirse bile bu durum istatistiki olarak önemsiz olarak bulunmuştur ($p>0,05$). IL-12 üzerinde indükleyici etki oluşturabilen bir diğer oligosakkarit karışımı gentiobiozun alıcı olarak kullanılması ile elde edilen ürünlerdir ve bu oligosakkarit karışımı her iki konsantrasyonda da IL-12 üzerinde indükleyici etki göstermiştir. Test edilen diğer oligosakkaritler ve alternanın ise IL-12 üzerinde herhangi bir etkisi oluşmamıştır (Şekil 3.49).

Oligosakkaritlerin ve alternanın bağışıklık düzenleyici olarak test edilmesi amacıyla indüklenme seviyesi test edilen son sitokin ise pro-inflamatuar $\text{TNF-}\alpha$ 'dır (Şekil 3.50). Bu sitokin sistematik inflamasyonda yer alan ve bağışıklık sistemi tarafından akut tepkilerin verilmesini sağlayan önemli bir sitokindir. IL-12'den farklı olarak GTFB tarafından üretilen maltooligosakkaritlerin $\text{TNF-}\alpha$ üzerinde herhangi bir indükleyici etkisi oluşmamıştır. Bununla birlikte GTFA tarafından maltozun alıcı olarak kullanılması ile üretilen oligosakkaritler $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda $\text{TNF-}\alpha$ 'yı kontrole göre önemli oranda ($p<0,05$) olmak üzere indüklemişlerdir ve diğer test edilen dozun ise herhangi bir etkisi söz konusu olmamıştır. $\text{TNF-}\alpha$ üzerinde etkili olan diğer iki uygulama ise gentiobiozdan elde edilen oligosakkaritlerin (DP8) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonudur.

Diğer test edilen oligosakkaritlerin ise $\text{TNF-}\alpha$ üzerinde herhangi bir etkisi söz konusu olmamıştır. Bizim bulgularımıza benzer olarak galakto-oligosakkarit tüketiminin $\text{TNF-}\alpha$ üzerinde herhangi bir indükleyici etkisini olmadığı daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Vulevic, Drakoularakou, Yaqoob, Tzortzis, & Gibson, 2008). Bununla birlikte daha önce yapılan çalışmalarda probiyotiklerin fonksiyonlarında önemli yer tutan yüzey molekülleri olan kapsüler ekzopolisakkaritler ve peptidoglikan tabakasının $\text{TNF-}\alpha$ 'nın indükleyicisi olduğu gösterilmiş olup (Miettinen, Vuopio-Varkila, Varkila, 1996; Sato, Saito, Tomioka, Yokokura, 1988) bu durum yapısal olarak farklı bileşenlerin etkilerinin farklılığının gösterilmesi bakımından önem arz etmektedir zira elde ettiğimiz oligosakkaritler $\text{TNF-}\alpha$ üzerinde pek de etkili olamamışlardır.



Şekil 3.50 Farklı oligosakkaritlerin ve alternanın 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda HT-29 hücrelerine uygulanmalarının ardından tespit edilen TNF- α sitokin seviyesi

Sonuç olarak ürettiğimiz oligosakkaritlerin spesifik olarak bağışıklık sistemi üzerindeki potansiyel düzenleyici rolleri HT-29 hücrelerinde *in vitro* koşullarda test edilmiş ve ürettiğimiz oligosakkaritlerin ve alternanın pro-inflamatuar TNF- α , IL-12 ve anti-inflamatuar IL-10, IL-4 sitokinleri üzerindeki bağışıklık düzenleyici fonksiyonları ortaya konmuştur. Önemli olarak en belirgin etki anti-inflamatuar IL-4 sitokinleri üzerinde gözlenmiştir. Bu sitokinin tümörler üzerindeki sitotoksik etkisi düşünüldüğünde ürettiğimiz oligosakkaritlerce indüklenmesi önem arz etmektedir. Yine test edilen diğer sitokinler üzerinde de oligosakkaritler ve alternanın farklı etkileri ortaya çıkmıştır. İlginç olarak alternan sadece tek bir sitokinde ve düşük oranda bir indüklenmeye neden olmuştur. Aksine bazı oligosakkaritlerin ürünleri örneğin gentiobiozdan elde edilen DP8'e kadar oligosakkaritler farklı sitokinleri uyarıcı etkileri ile ön plana çıkmıştır. Elde ettiğimiz sonuçların bir diğer önemli yönü de yapısal olarak farklı karakterde oligosakkaritlerin önemli ölçüde farklı etkilerinin ortaya çıkabileceğinin gösterilmesidir. Önemli olarak GTFB'nin maltoz ve maltoheptozdan ürettiği oligosakkaritler de önemli oranda sitokin indüksiyonu gerçekleştirmiştir.

3.15 GTFA-ΔN ve GTFB Enzimleri ile Üretilen Oligosakkaritlerin Prebiyotik Fonksiyonları

GTFA ve GTFB enzimleri ile üretilen oligosakkaritler prebiyotik fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla Cote vd. [118]'de belirtildiği şekilde minimal besi ortamına bu oligosakkarit karışımları tek C kaynağı olacak şekilde ilave edilmiş ve probiyotik bakterilerin ve patojen türlerin gelişimleri OD ölçümü ile takip edilmiştir. Bu kapsamda test edilen probiyotik türler *Lactobacillus reuteri* TD-1, *Lactobacillus plantarum* NCDC 627, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium breve* NCTC11815, *Bifidobacterium longum* D2 ve *Bifidobacterium animalis* BL3 olurken patojen türler ise *Salmonella Typhimurium* RSSK95091, *Escherichia coli* BC1402, *Bacillus cereus* BC 6830, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'tür. Oligosakkaritler ticari potansiyelleri dikkate alınarak karışım halinde değerlendirilmiştir. Oligosakkaritleri tek tek elde etmek maliyet açısından önemli bir kalem oluşturmaktadır. Dolayısıyla ticari potansiyellerinin ortaya çıkarılması adına karışım halinde prebiyotik etkileri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda hem GTFA-ΔN hem de GTFB ile üretilen oligosakkarit karışımlarının prebiyotik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Tablo 3.4 alternan ve GTFA-ΔN tarafından farklı alıcı şekerlerden üretilen oligosakkaritlerin probiyotik ve patojen türlerin gelişimleri üzerindeki etkilerini göstermektedir. İlk olarak alternan *L. reuteri* ve *S. typhimurium* hariç olmak üzere probiyotik türlerin gelişimlerinde düşük, orta ve yüksek seviyede, patojen türlerde ise düşük gelişim düzeyine bu bakterileri geliştirecek şekilde etki etmiştir. Alternan en yüksek oranda *Lactobacillus plantarum* NCDC 627 üzerinde etki etmiştir. Şu husus belirtilmelidir ki genel olarak oligosakkaritlerin prebiyotik etkileri ile kıyaslandığında alternanın etkisi biraz daha düşük gerçekleşmiş ve önemli olarak bazı patojen bakterilerde sahip oldukları enzimler sebebiyle alternanı kullanıp gelişim göstermişlerdir. Her ne kadar düşük bir gelişim gözlenirse de bu durum alternanın prebiyotik etkisi açısından olumsuz bir husus olarak karşımıza çıkmaktadır. Benzer olarak GTFA-ΔN tarafından üretilen maltooligosakkaritler *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* üzerinde düşükte olsa gelişim noktasında etki etmiştir. Benzer bir etki *Clostridium perfringens* üzerinde de gözlenmiştir [118]. Bununla birlikte maltooligosakkaritler *Bifidobacterium* suşları üzerinde son derece olumlu etki göstermiş ve bu türlerin gelişimlerini en yüksek düzeyde gerçekleştirebilmiştir. Bu seviyede bir etki daha önce yine GTFA'nın ürünü olan maltooligosakkaritler ile gözlenmemiştir [118]. Bu açıdan maltooligosakkaritlerin Bifidojenik bu etkisi önem arz etmektedir (Tablo 3.4). Test edilen probiyotik *Lactobacillus* türleri üzerinde de maltooligosakkaritler etkili olmuş ancak gelişimleri genel itibarıyla düşük seviyede gözlenmiştir. Önemli olarak test edilen diğer oligosakkaritlerin hiçbirinde patojen bakterilerde gelişim gözlenmemiştir. Bu durum bu oligosakkaritlerin prebiyotik

fonksiyonlarının ortaya konabilmesi adına oldukça önemlidir. Gentio-oligosakkaritler ise *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* tarafından metabolize edilememiş ve bu suşlar gelişim göstermemişken, *L. plantarum*, *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium animalis* orta derecede, *Bifidobacterium breve* ise yüksek seviyede gelişim göstererek gentio-oligosakkaritleri kullanabilmişlerdir. Sonuç olarak ürettiğimiz bütün oligosakkaritler probiyotik türler üzerinde suşların spesifik etkileri gözlenmek kaydıyla prebiyotik etki göstermişlerdir. Maltooligosakkaritler hariç hiçbir oligosakkarit patojenlerin gelişimlerine sebebiyet vermemiştir ki maltooligosakkaritlerde çok düşük oranda gelişime neden olmuştur. Dolayısıyla GTFA- Δ N tarafından üretilen oligosakkaritlerin prebiyotik olarak değerlendirilebileceği elde ettiğimiz sonuçlardan anlaşılabilmektedir.

Tablo 3.4 GTFA- Δ N ile sukrozun donör farklı -disakkaritlerin alıcı olarak kullanılması ile üretilen oligosakkaritlerin ve alternanın probiyotik ve patojen türlerin gelişimleri üzerindeki etkisi

Test edilen türler	Alternan	Maltoz	Gentiobioz
<i>L. reuteri</i>	- *	+	-
<i>L. plantarum</i>	+++	++	+
<i>L. rhamnosus</i>	+	+	-
<i>B. breve</i>	++	+++	+++
<i>B. longum</i>	+	+++	++
<i>B. animalis</i>	++	+++	++
<i>E.coli</i>	+	-	-
<i>B. cereus</i>	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-

* +++ OD > 0,60; yüksek gelişim, ++ OD 0,31 - 0,59; orta seviyede gelişim, + OD 0,10 - 0,30; düşük gelişim, - OD < 0,10; etki yok.

Benzer olarak GTFB tarafından sırasıyla maltoz, maltotrioz ve maltoheptozdan üretilen oligosakkaritlerinde prebiyotik etkisi probiyotik ve patojen türlerin gelişimi üzerindeki etkileri incelenerek ortaya konmuştur (Tablo 3.5). GTFA- Δ N'nin maltozu alıcı olarak kullanması neticesinde üretilen maltooligosakkaritler gibi, GTFB tarafından maltoz ve maltotriozdan üretilen maltooligosakkaritlerde patojen türlerden bazılarının düşük de olsa gelişimine sebebiyet vermiştir. Örneğin maltoz kaynaklı maltooligosakkaritler *E. coli*, *B. cereus* ve *S. aureus*'un düşük de olsa gelişimini tetikleyebilirken bu durum maltotiroz kaynaklı oligosakkaritlerde *E. coli* ve *S. aureus*'un düşük seviyede gelişimi ile ortaya çıkmıştır. Muhtemelen bu durum bu patojen türlerin malto-oligosakkaritlere özel glukozidazları üretebilme kabiliyetlerinden kaynaklanabilmektedir.

Zaten bu patojenlerin alternanı kullanabilme kabiliyetine bile sahip olduğu

düşünüldüğünde maltoz bazlı oligosakkaritleri kullanabilmeleri pek de şaşırtıcı değildir. Bununla birlikte bu patojenlerin gelişimlerine sadece düşük seviyede etki etmişlerdir. Probiyotik türler açısından incelendiğinde ise maltoz bazlı malto-oligosakkaritler *L. reuteri* ve *B. breve* üzerinde orta seviyede gelişim ile sonuçlanan etki oluştururken diğer probiyotik türlerin ise yüksek seviyede gelişimlerini tetiklemişlerdir.

Tablo 3.5 GTFB ile maltoz, maltotrioz ve maltoheptozun substrat olarak kullanılması ile üretilen oligosakkaritlerin probiyotik ve patojen türlerin gelişimleri üzerindeki etkisi

Test edilen türler	Maltoz kaynaklı maltooligosakkaritler	Maltotrioz kaynaklı maltooligosakkaritler	Maltoheptoz kaynaklı maltooligosakkaritler
<i>L. reuteri</i>	++*	+	+
<i>L. plantarum</i>	+++	+++	++
<i>L. rhamnosus</i>	+++	+	+
<i>B. breve</i>	++	+++	++
<i>B. longum</i>	+++	+++	+++
<i>B. animalis</i>	+++	+++	+++
<i>E. coli</i>	+	+	-
<i>B. cereus</i>	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-

* +++ OD > 0,60; yüksek gelişim, ++ OD 0,31 - 0,59; orta seviyede gelişim, + OD 0,10 - 0,30; düşük gelişim, - OD < 0,10; etki yok.

Maltotrioz bazlı malto-oligosakkaritlerde ise *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* istenmeyecek şekilde düşük gelişim gösterirken diğer probiyotikler ise yüksek seviyede gelişime sebebiyet vermişlerdir. Burada GTFB tarafından benzer ancak farklı substratlarda üretilen maltooligosakkaritlerin üretilen dominant maltooligosakkaritin farklılığı, boyutu gibi hususlar dolayısıyla farklı türlerde farklı etki oluşturduğu gözlenmiştir. Benzer durum maltoheptozdan üretilen maltooligosakkaritler içinde geçerlidir. Önemli olarak maltoheptoz bazlı malto-oligosakkaritlerde sevindirici durum herhangi bir patojen türün gelişiminin bu oligosakkaritlerde gözlemlenmemiş olmasıdır. Probiyotik türler açısından ise maltotrioz bazlı oligosakkaritlere benzer olarak *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* düşük gelişim gösterirken, *L. plantarum* orta seviyede diğer probiyotikler ise yüksek seviyede gelişim gösterebilmişlerdir. Her iki enzim tarafından üretilen maltooligosakkaritlerin ve diğer oligosakkaritlerin yukarıda sayılan yapısal farklılıkları, yan zincilerinin olup olmaması, dominant oligosakkaritlerin neler olduğu ve boyutu gibi hususlara bağlı olarak farklı prebiyotik potansiyele sahip olduğu elde ettiğimiz sonuçlardan anlaşılabilmektedir.

Sonuç olarak GTFA- Δ N ve GTFB tarafından sırasıyla farklı şeker alıcılar ve substratlar kullanılarak üretilen oligosakkaritler (yukarıda belirtilen maltoz bazlı oligosakkaritler

hariç) minimal besi ortamında patojen türlerin gelişimlerinde herhangi bir etki oluşturmazken probiyotik türlerin gelişiminde çoğu türde yüksek seviyede gelişimi sağlamıştır. Dolayısıyla ürettiğimiz oligosakkaritlerin prebiyotik olarak davranabildiği ortaya konmuştur.

4 SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında kullanılan *L. reuteri* E81 suşunun alternan üreticisi olduğu tespit edilmiş ve alternan üretiminden sorumlu glukansükraz geni (*gtfA*) ile yine α -glukan üretimini gerçekleştirebilen 4,6- α -glukanotransferaz (*gtfB*) geninin gen yapıları açığa çıkarılmış, her iki gende de ekspresyon işlemi amacıyla klonlama işlemi gerçekleştirilmiş ve her iki gen de eksprese edilerek GTFA ve GTFB'nin aktif proteinler olduğu ve sırasıyla beklendiği şekilde glukansükraz ve 4,6- α -glukanotransferaz aktivitelerinde oldukları gösterilmiş, GTFA'nın *in vitro* koşullarda yine alternan üretimini gerçekleştirebildiği, GTFB'nin ise α -1-4 glikozidik bağ içeren substratlara etki ederek α -1-4 ve α -1-6 glikozidik bağlardan oluşan polimer üretebildiği, GTFA'nın sükrozun donör maltoz başta olmak üzere çok geniş bir spektrumdaki şekerlerin ise alıcı olarak davranabilmesi neticesinde çok farklı yapılarda oligosakkaritler üretebildiği TLC, HPLC, LC-MS ve NMR analizleri ile GTFB'nin ise maltoz, maltotrioz ve maltoheptozdan yine farklı karakteristiklerde malto-oligosakkaritleri üretebildiği yine aynı analizler ile gösterilmiş, her iki enzim tarafından üretilen özgün oligosakkaritlerin *in vitro* koşullarda HT-29 hücreleri ile üretilen oligosakkarite bağlı olarak pro-inflamatuar TNF- α , IL-12 ve anti-inflamatuar IL-10, IL-4 sitokinleri üzerinde bağışıklık düzenleyici fonksiyonları olabildiği ortaya konmuş, yine oligosakkaritlere özel koşullara bağlı olarak patojen türlerin gelişimine herhangi bir katkı sağlamazken probiyotik türlerin gelişimlerini önemli ölçüde tetikleyebildikleri gösterilmiş ve son olarak *L. reuteri* E81'in genomundan *gtfA* geninin silinmesi ile elde edilen alternan üretemeyen mutant ve E81 suşları ile ekşi hamur ve bu ekşi hamurlar ile ekşi hamur ekmeği üretilmesi ile alternanın ekşi hamurun elastikiyet ve ekmeğinde tekstürel nitelikleri üzerinde önemli etkileri olduğu gösterilmiştir. Tez kapsamında elde edilen önemli sonuçlar ve bu sonuçların ortaya koyabileceği hususlar şu şekilde sıralanabilir:

- Tez ile GTFA'nın aktivitesi gösterilerek üretilen alternanın yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatüre bakıldığında glukansükrazlar ile son dönemde yapılan çalışmalar glukansükrazların modifiye edilmesi yani bu

proteini oluşturan özellikle katalitik bölgedeki aminoasitlerin farklı karakterde aminoasitler ile yer değiştirmesi sonucunda üretilen modifiye glukansükrazlar ile farklı nitelikte α -glukanların üretiminin sağlanması üzerinde durulmaktadır. Benzer olarak GTFA E81'de hem katalitik bölgedeki hem de glukan bağlama bölgesindeki aminoasitlerde değişikliğe gidilip modifiye alternanların üretimi noktasında çalışmalar gerçekleştirilebilir.

- GTFA'nın alıcı reaksiyonlarında sükrozun donör maltoz, gentiobiozun alıcı olarak kullanılması ile özgün oligosakkaritlerin üretilbildiği TLC, HPLC, NMR ve LC-MS analizleri ile gösterilmiştir.
- *L. reuteri* E81'de açığa çıkarılan bir diğer karbonhidrat aktif enzim 4,6- α -glukanotransferaz olup bu enzimin aktivitesi ortaya konarak nişasta, amiloz ve maltoz gibi α -1-4 bağı ile bağlı glukoz ünitelerini parçalayıp açığa çıkan glukoz ünitelerini α -1-6 ve α -1-4 ile birbirine bağlayarak yeni bir polimerin üretimini gerçekleştirebildiği TLC, NMR ve LC-MS ile gösterilmiştir. Bu enzim GTFA'ya göre nispeten çok kısa bir süre önce LAB'lerde keşfedilmiş bir enzim olup özellikle ekşi hamur ortamında ve sonrasında ekşi hamur ekmeğinde nasıl bir etkisinin olduğu henüz bilinmemektedir. Yine bu enzimde yapılacak modifikasyonların üretilen polimer üzerinde nasıl etkisinin olabileceği ile ilgili çalışmalar mevcut değildir.
- GTFB ile maltoz, maltotrioz ve maltoheptozun substrat olarak kullanılması ile özgün oligosakkaritlerin üretilbildiği TLC ve LC-MS analizi ile gösterilmiştir.
- GTFA'nın sükrozun donör ve farklı şekerlerin alıcı olarak davranması neticesinde ürettiğimiz oligosakkaritler ve GTFB'nin maltoz, maltotrioz ve maltoheptozu substrat olarak kullanılması ile ürettiğimiz malto-oligosakkaritler test edilen oligosakkarite bağlı olarak *in vitro* koşullarda özellikle anti-inflamatuar IL-4 sitokini üzerinde indükleyici etki göstererek bağışıklığı düzenleyebilen bileşenler olarak fonksiyon icra etmişlerdir. Bu oligosakkaritlerden özellikle malto-oligosakkaritler ve gentibioz bazlı oligosakkaritlerin bağışıklık üzerindeki düzenleyici rolleri dikkat çekmiştir.
- Tez çerçevesinde elde ettiğimiz oligosakkaritlerden maltoz ve maltotirozdan elde edilen malto-oligosakkaritler hariç olmak üzere tamamı probiyotik türler üzerinde gelişimlerini sağlayıcı fonksiyon icra ederek prebiyotik etki göstermiştir. Bu etkinin gıda ortamında nasıl meydana gelebileceği yanında özellikle *in vitro* koşullarda kolon modelinin oluşturulması ve *in vivo* koşullarda ortaya konabilmesi oldukça önemli konular arasında yer almaktadır. Literatüre bakıldığında ve aynı zamanda ticari olarak galakto-oligosakkaritler ile ilgili

çok fazla bilgi ve çalışma mevcutken gluko-oligosakkaritler ile ilgili bilgi düzeyi istenen seviyede olmayıp ürettiğimiz gluko-oligosakkaritlerin prebiyotik fonksiyonlarını ortaya koymamız bu konudaki bilgi boşluğunun doldurulması açısından son derece önem arz etmektedir.

- Ayrıca bu tez çalışmasında alternanın ekşi hamur reolojisi ve ekmek tekstürü üzerinde etkin bir rol aldığının gösterilmiş olması bu tez çalışmasının önemli bir sonucu olarak görülebilir. Ekşi hamur teknolojisi ülkemizde son dönemlerde özellikle ekmekteki pek de bilimsel olmayan tartışmalar neticesinde üzerinde daha fazla durulan bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknolojiye sebebi ne olursa olsun daha fazla yer vermek ülkemiz fırıncılık endüstrisi ve tüketiciler açısından olumlu bir husustur. Bu tez çalışması ile hem ekşi hamur starteri olarak kullanılabilecek bir suşun ortaya konup ürettiği alternanın ekşi hamurun karakteristikleri üzerinde rol alabildiğinin gösterilmesi ülkemiz fırıncılık endüstrisi açısından önemsenebilecek bir durum olarak görülebilir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile ekşi hamur teknolojisi açısından alternanın fonksiyonel etkileri belirlenmiş, alternan üretiminden sorumlu GTFA enziminin aktivitesi ve fonksiyonu belirlenerek bu enzim ile farklı ve özgün oligosakkaritler üretilerek bunların bağışıklığı düzenleyici fonksiyonları ile prebiyotik etkileri ortaya konmuştur. Teknolojik ve fonksiyonel açıdan çok önemli rolleri olduğu bu tez çalışması ile de gösterilen karbonhidrat aktif enzimler ile alakalı özellikle LAB türlerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu açıktır. Bu noktada fermente ürünler zengini ülkemizde daha fazla ve özgün nitelikte çalışma yapılabilmesi gerekmekte olup bu husus özellikle üretilecek bilginin ülkemiz kaynaklı olması ve bu bilginin teknolojiye aktarılarak ticarileşmesinin ülkemizde gerçekleşebilecek olması münasebetiyle son derece önem arz etmektedir.

ATGGAAATAAAGAAACATTTTAAGTTGTATAAAAGCGGTAAACAATGGGTGACAGCAGC
 AGTTGCTACTGTTGCCGTTTCAACCGCGCTTCTTTACGGGGGAGTTGCGCATGCTGAT
 CAACAAGTTCAGTCTTCCACAACCCAAGAACAAACTTCTACTGTGAATGCTGATACTAC
 TAAACAGTAAATTTCAGATACTAATACTGACCAACCAGCTCAAACAACCTGATAAGAATCA
 AGTGGCAAACGACACTACTCCTAACCAAAGTAAAATTGATAGTACTGCAACAACCTAATAA
 ATCAGTTTCTACTTTGCCATCACTTGATAATGAAAAACAAAGTCAAACGTATAACAAACA
 GGATAATGGAACTATGGAAATGTTGACGCTGCTTACTTCAACAATAATCAATTGCATGT
 TTCAGGATGGCACGCAACAAATGCATCTCAAGGAACAGATAGTCGTCAAGTGATTGTAC
 GTGATATCACAACCTAATAATGAATTAGGGGCGTACTAATGTAACAAATAATGTTTCACGCCC
 AGATGTTAAAAACGTCCACAATGTTTATAACGCTGATAATTCTGGATTTCGATGTCAATATC
 AACATTGACTTTAGTAAGATGAAGGACTATCGTGATTCAATTGAAATTGTTAGTCGATATA
 GTGGAAATGGTAAATCTGCTGATTGGTGGTCTCAACCGATTACCTTTGATAAAAAATACT
 ATGCTCACCTAGACACATTTGAAGTGAAAAATGGTGAATTGCATGCAACCGGATGGAAT
 GCTACTAATAAGGCGATTAACTATAACCACCATTTTGTGATTTTATTTGATCAAACGAATG
 GTAAAGAAGTGGCTCGTCAAGAAGTCCGTGATGGTCAGTCACGTCCAGATGTTGCTAA
 GGTATATCCGCAAGTAGTCGGTGCTGATAACTCAGGCTTTGACGTGACATTTAATATTGG
 CGATTTAGATTATACTCATCAATACCAAATCCTTAGTCGTTATAGCAATGCGGATAATGGT
 GAAGGAGATAATGTTACTTACTGGTTTAAATCCACAATCCATTGCTCCTGCTAATCAAAGC
 AACCAAGGGTATTTAGACTCATTCAATATCAGTAAAAATGGTGAAGTAACAGTAACTGGA
 TGGAACGCTACTGATCTATCTGAATTACAAAATAACCATTATGTAATTTTATTTGACCAAA
 CTGCGGGTAAACAAGTAGCATCTGCCAAGGCTGATTTAATTTACGTCCAGATGTTGCG
 AAGGCTTATCCAACAGTAAAAACTGCTTCAAATTCTGGCTTTAAGGTAACATTTAAGGTT
 AATGATTTACAACCTGGTCATCAATACAGTGTAAGTCGTTTTTCTGCCGATGAAAAT
 GGTAACGGTAATGATAAACGTCATACAGATTATTGGTACAGCCCAGTAACCTTAAATCAA
 CTGCTTCAAATATTGATACTATCACAATGACATCTAATGGATTGCATATTACTGGTTGGATG
 GCAAGTGATAACTCAATTAATGAAGCAACTCCATATGCTATTATCCTCAATAATGGTAAAGA
 AGTTACTCGTCAAAAATTAAGCTTAACTGCACGTCCAGATGTTGCTAAGGTATATCCTTCC
 CTTTATAACAGCGCTGTCAGTGGTTTTGATACTACTATTAAATTGACTAACGCCCAATATCA
 AGCACTAAATGGTCAATTACAAGTACTCTTACGTTTTTGCAAAATCTGCCGATGGTAATCCA

AGTGGTGATAATACTGTAAGTATCAATTTAGTAAGAATTACGCTACTACTGGTGGAACCT
TTGATTACGTAAAAGTAAACGGCAACCAAATTTGAATTTAGTGGCTGGCATGCAACTAACC
AATCAAATGATAAAGATTCACAATGGATTATTGCTTTAGTTAATGGTAAAGAAGTAAAACG
TCAATTAGTTAACGATACTAAGGATGGGGCAGCTGGCTTCAACCGAAATGATGTTTATAA
AGTAAATCCAGCTATTGAAAATAGTTCTATGTCTGGATTCCAAGGTATTATTACTTTACCTG
TATCAGTTAAGAACGAAAATGTTCAACTAGTTCATCGTTTTAGTAATGATGCAAAGACTGG
TGAAGGAAACTATGTTGATTCTGCTGAGAGGTAATGCCTGTTAAGGATAACTTCCAAAA
GGGTAATGGTCCACTTAAGCAATTTGGTTTACAACTATTAATGGCCAACAATACTACATT
GATCCAACAACCTGGTCAACCCCGTAAGAATTTCTTATTACAAAATGGAAACGATTGGATCT
ACTTCGACAAAGATACTGGTGCTGGAACATAATGCTCTTAAGTTACAGTTTGATAAGGGAA
CAATTTCTGTTGATGAGCAATATCGTCGAGGAAATGAAGCTTATAGTTATGATGACAAGAG
TATTGAAAATGTAAATGGTTACTTAACAGCAGATACATGGTACCGACCAAAGCAAATCTTAA
AGGATGGCACTACTTGGACTGATTCAAAAGAAACAGATATGCGACCAATTTTAAATGGTATG
GTGGCCAAATACTGTTACTCAAGCATACTATCTTAATTATATGAAACAACATGGTAATTTATT
GCCAGCTAGTTTACCATTCTTTAATGCAGATGCAGATCCAGCAGAGTTAAATCATTACTCC
GAGATTGTTCAACAAAATATCGAAAAGCGGATCAGTGAGACCGGTAATACTGATTGGTTAC
GTACACTAATGCATGAGTTTCGTTACTAAGAATTTCTATGTGGAATAAGGATAGTGAAAACGTT
GATTACGGTGGTTTGCAATTACAAGGTGGATTCCCTTAAGTATGTAAATAGTGATCTTACTAA
ATATGCAAATTCGGATTGGCGTTTAAATGAACCGTACAGCTACTAATATTGATGGTAAGAACT
ATGGTGGTGCGGAATTTCTTATTAGCTAATGATATTGATAACTCAAACCCAGTTGTTCAAGCT
GAAGAATTGAACTGGCTTTACTATTAAATGAATTTGCGGCACAATTACAGGAAATAATCCTGA
AGCTAATTTTGATGGTATTCGTGTGGATGCTGTTGATAATGTAGATGTTGACTTATTGAGTA
TTGCACGTGATTACTTTAATGCAGCATATAACATGGAGCAAAGTGATGCTAATGCTAATAAG
CACATTAATATTTTAGAAGATTGGGGATGGGATGATCCTGCTTATGTAAATAAGATTGGAAA
TCCTCAATTAACAATGGATGATCGTTTACGAAATGCAATTATGGATACATTATCAGGAGCAC
CTGATAAAAACCAAGCATTGAATAAATTAATTACTCAGTCATTAGTAAATCGTGCTAATGATA
ATACTGAAAACGCGGTTATTCCAAGTTATAATTTGTTTCGAGCACATGATAGTAATGCTCAA
GACCAAATTCGTCAAGCTATTCAAGCTGCAACTGAAAACCATATGGCGAATTTAACTTAG
ATGATGAAAAGAAGGGTATGGAAGCATATATTAATGATCAGAATTTCTACTAATAAGAAGTGG
AATCTTTACAATATGCCTTCTGCTTATACTATTCTTCTAACGAATAAAGATTCAGTTCCTCGT
GTTTACTATGGAGACCTCTACCAAGATGGTGGTCAATATATGGAACATAAAACACGTTACTT
TGATACTATTACTAACTTATTAAAGACACGGGTTAAATATGTTGCCGGTGGACAAACTATGA
GTGTTGATAAGAATGGTATTCTTACAAGCGTTCGTTTTGGGAAAGGCGCCATGAATGCTAC
TGATACTGGTGCTGATGAAACAAGAACAGAAGGTATCGGTGTTGTAATTAGTAACAATACTA
ATTTGAAGCTTAATGATGGTGAATCAGTAGTGCTTCATATGGGAGCTGCTCATAAGAATCAA
AAGTATCGTGCTGTGATCTTAACAACCTGAAGATGGTGTGAAGAATTACACTAATGATACAGA
CGCACCAGTTGCATACACTGATGCTAATGGTGACCTTCACTTTACTAATACTAATTTAGATG
GTCAACAATATACAGCTGTTTCGTGGATATGCAAATCCTGATGTAACAGGATATCTAGCTGTT
TGGGTACCAGCTGGAGCAGCAGATGATCAAGATGCACGTACTGCACCAAGTGATGAGGCC

CATACTACAAAGACTGCTTATCGCTCTAATGCAGCCCTTGATTCTAACGTTATTTATGAAGG
ATTCTCTAACTTCATTTACTGGCCAACTACTGAAAGCGAACGGACTAATGTGAGAATTGCA
CAAAATGCGGATCTATTTAAGTCATGGGGAATTACTACCTTTGAATTAGCTCCACAATACAA
TTCAAGTAAAGATGGTACGTTCCCTTGATTCAATAATTGATAATGGATATGCCTTTACTGATC
GTTATGATTTAGGAATGAGTACTCCTAACAAGTATGGATCTGATGAAGACTTACGTAATGCT
TTACAAGCCTTACATAAAGCTGGTTTACAAGCAATTGCCGACTGGGTTCCCTGATCAAATTT
ATAACTTACCTGGTAAAGAAGCTGTAACAGTAACACGTTTACAGATGATCACGGTACTACATGG
GAAGTTTCGCCAATAAAGAATGTTGTCTATATTACAAATACGATTGGTGGAGGTGAATACCA
GAAGAAATATGGTGGTGAATTCCTTAGACACTCTTCAAAAAGAATATCCACAATTATTTAGTC
AGGTATATCCAGTAACTCAAACGACAATTGATCCTAGTGTTAAGATTAAAGAGTGGTCTGCT
AAATACTTTAATGGTACTAATATCCTTCATCGAGGTGCTGGATATGTATTGCGCTCTAATGAT
GGTAAATACTATAATCTTGGTACAAGCACTCAACAATTCTTACCGTCTCAATTATCAGGTCAA
GATAATGAAGGATATGGATTTGTAAAAGAAGGAAATAATTACCATTACTATGATGAGAATAAA
CAGATGGTAAAAGATGCGTTTATTCAAGATAGTGTTGGTAATTGGTATTACTTCGATAAAAAT
GGTAATATGGTTGCTAACC AAAAGTCCTGTTGAAATTAGTAGTAATGGAGCTTCAGGAACTTA
CCTTTTCTTGAACAATGGAACATCATTCGGTTCTGGATTGGTGAAAACCTGATGCAGGTACG
TACTATTATGATGGCGATGGCCGAATGGTTTCGTAATCAAACGGTAAGTGATGGTGCGATGAC
ATATGTTCTTGATGAAAATGGTAAACTTGTTAGTGAATCATTTGATTCATCTGCTACTGAAGC
ACACCCATTAAAACCTGGTGATTTAAACGGCCAAAAATAA

ATGGAAC TCAAAAACATTTTAAGCTGTATAAAAGTGGTAAGCAATGGGTTACAGCTGCC
GTTGCTACTATTGCTTTTTCTGCGGGGGTATTAACCACAAGTGAAGTAGTTCATGCTGAT
ACAAATACTGGTGATCAGCAAAGTGAACAGGTTACCCAGCCAAGTAATTCTACAAC TCA
GATGTAAAACAGTTAGTACAGATGCATCATCTGATACAAAAATCGTATCAGATAACAAAG
AAAATAATAACCAAGTAGGGAACACTAATGTATCTGGTCAAAATCTAGTAAGGATACTAA
GTCGATTCTTACCGGTGCTAACTCAGTAACACAAAAC TATGATCATAATGACAATGGCAAT
TATGGTTACATTGATT CAGCTAACCTTAATAATAACCAATTACAAGTGT CAGGTTGGTCAG
CTACCAATCAAAATATAAATAAAGATAATCACTTTATTATTGCTTATGACAGTACTTCTCAG
CAAGAATTAGGGCGGACAAAGGTAGAAACACCAGTCGCTCGTCCAGATGTAAAGGCTGT
TCATAATGTATATAATGCAGAAAATTCAGGCTTTAATGTTAATGTATCATTGAAC TTTGATA
AGATGAATAATTATCGTGATGCAATTAAAATTATTAGTCGCTATAGTGGAGTTCCTGATGGT
AATTCTGACTATGTGGATTTTG TATCTCAACCAATCATTTTTGACGAGAATAATTATGCTCA
TTTAGATGATTTTTCTGTCCAAAATGGTAAACTACACGTTTCTGGTTGGAATGCAACAAAT
AAGGCTATTCAAAATCCAAATCACTTCTTAATTCTTTTTGATCGTACTATTAAATCGTGAAGT
AGCACGTCAAAAAGTAACTGCCGGTATCAATCGTCCCGATGTTGAAAAAGCATATCCACA
AGTAATTAATGCAAATATTTCTGGATTTGATGCTGCTTTTGATATAACGACTTTAAATCCAA
ACGATGAATATCAAATTTTAAGTCGTTATAGCAATAATGACAATGGAGAGGGGAACTATGT
TACATACTGGTTCAAGCCTCAACGCATTGCACCAGCTAATCAATTTAACAGTGGTCATTTA
GATAGTTTTAATATCAGTAAGGCCGGAAGTTACTGTTAGTGGCTGGCAAGCAACTAATC
TTTCAAATATTCAAAGTAATCGTTTTATAATCTTATTTGATAACACTGCTAACCATCAAATCG
CTTCAACTAAGATAACAAATACTGCTCGTCCAGATGTTGAAAAAGTATACCCACAAGTATTA
AATGCAACTAATTCTGGTTATGATGTAACTTTTGGTCTAACTCAAGATCAGATTGCACAAC
TTCTTCCAAACCATAGTTATAGTATTGTAAGTCGTTACTCTGCAGATGCTAATGGTAATGGA
AACGATAAACAGCATA CAGATTTCTGGTCAACACCAATTACATTAAATAAGACCGCTTCATA
TATTGACAGCATTTCTTAAATGGCAATGAATTAAATGTAAGAGGCTGGATGGCTAGTGAT
GCAAGTGCAACACAAGCTAACCCATATATAATTGTTCTTAATAACGGTAAAGAGGTTACACG
CCAAAAGCTTACATTAGTTGCTCGTCCAGATGTAGCAAAAGTCTATCCTGATGTTTATAACA
GTTTAGATAGTGGTTTCAATACGACAATTAAATTAAGTGTCCGCAATTGAATGAATTAACA
GGTAATATGCAGGTCCTTCTTCGGTACTCTACAGCTGCAGATGGTAATCCAATTAATAACGG

TGGATTTACTGACCAATATAGTAAGAATTATGCTACTAATGGCGGAAGTTTTGATTTTCGTT
AAAGTCGATAATAACCAAGTGGCCTTTTCTGGTTGGCATGTTAGTGATCAAGCTACCGAC
AAGCCATACCAATGGATTATTGTTTTAGCCAATGGTAAAGAAGTTGGACGTCAACTAATT
TCTTCTACAACATAATGGTTTTGTCAGTTATAACCGTCCAGATGTATATAATGTAAATCCAGC
TATTAGTAACAGTAGTACGTCTGGCTTCCAAGGAATTATGACGTTAAAAGATAATATCAAG
AATGCTAATGTTCAATTGGTTCATCGTTTCAGTGACGATGGTCAAAATGGTGAAGGGAA
CCGCGTTGATTACTGGTCGGAGGTAATGCCAGTAACCAATACATTCCAAAAAGGCACCGA
TCAGCTCATGAGAACTTGGTTGCAAAACCTAATAAGAATCAATTAAAAATTTACAATGGG
AATACCTTAGTAAAAACATTAGGACCAGGTACTTGGGAAAATATGGCTTTTCGCTCAAGATA
GTAGCGCAATTAATAATATTGATGGTTACTTAAGTTATACTGATTGGTATCGTCCTTATGGCA
CAAGTCAAGATGGTAAACATGGTACGAAACAACCTGCAATGGATTGGCGTCCATTACTGAT
GTATATTTGGCCAAGTAAAGATGTTCAAGCACAATTTATTAAGTATTTTGTTAATAATGGTTA
TGAGAATGCTAATTATGGATTAACTAAAGATACTGTTGCTAACATCAATAAAGATACAAATAC
TACTGTTCTTGCTAATATGGCTCAAACTTACGCTATGTAATTGAACAGAGTATTGCTGCTA
ATAAAGGCACAAGTAACTAGCAAATGATATTAATAGTTTTTGCTGCAACGGTTTCTGAATTA
TCTGCATCATCTGAATTATCATTACAAAGCATGCCGAACATATCGACCAGATGAAAGTGGAA
ATGTTGATAGTGATCAAGTCATTTTTGTTAATAATAATTCAAAGGATCCCCGTAAAGGAAAC
ACTAGTTATGCGGACAGCAACTATCGCTTAATGAACAGGACGATTAATAATCAGGCCGGAA
ATAATAATAGTGATAACAGTCCAGAACTCCTTGTTGGTAATGATATTGATAATTCAAACCCAG
TAGTACAAGCTGAAAATCTTAACCTGGGAATACTTCTTACTAAATTATGGTAAGTTAATGGGG
TACAACCCAGATGGTAATTTTGATGGCTTCCGAGTTGATGCTGCTGATAATATTGATGTAGA
TGTCTTAGATCAGATGGGTCAACTAATGAATGATATGTATCACACAAAGGGAAATCCTCAAA
ATGCCAATGATCATCTAAGTTATAATGAGGGCTATCATCTGGTGCTGCTCAAATGCTAAAT
GAAAAAGGAAATCCTCAATTATACATGGATTCAAGGAGAATTCTATACTCTTGAAAATGTCCT
TGGACGTGCTAATAATCGTGATAATATTAGTAACTTAATTACTAATAGTGTTGTTAATCGACA
AAACGACACAACAGAGAATGAAGCTACGCCAACTGGTCATTTGTAACCTAACCATGATCAA
CGAAAGAATTTGATTAATAGATTAATTATTAAGGATCATCCTAACATTCCAGATATTATGGGT
TCAGCTTACAAAGTCGAATATGCAAATCAAGCATGGCAAGAATTCTATGCTGATCAGGAAA
AGACTAATAAGCAATATGCACAGTATAATGTTCCGGCTCAGTATGCAATTCTTTTGAGCAAT
AAAGATACGGTTCCACAAGTTTACTATGGTGACCTTTATAATGAAACGGCTCAATATATGCA
AGAGAAGTCAATTTACTATAATGCAATCACAACCTTATGAAAGCTCGTAAACACTTTGTTA
GTGGTGGTCAAACGATGACTAACTTAACAATAATTTATTAGCTAGCGTTTCGATATGGTAAG
GGTGTGTTGTTGATGCTAATAGCAATGGCACTGATAAACTTAGCCGGACAAGTGGGATGGCT
GTCTTAGTTGGTAATGATAGTAATATGGCTCAACAATCTGTTGCTATTAATATGGGACGTGC
TCATGCTAACCAACAATATCGAAATCTAATCGATACTACCGAAAATGGTTTAACATATGATGC
AGATAATAGTGAAAATCCAGCCATTTTGACAACCTGATAGTAATGGTATCTTAAAAGTAACAG
TTAAAGGATACAGTAACCCATACGTAAAGTGGTTATCTTGGTGTCTGGGTTCAGTAATTTT
TGGTGATCAAGATGTTACTACTAATGCAAGTGATGTTGTTGCTAATAAAGAAAAGACTTTT
GAATCTAATGCTGCTCTTGATTCTCATATGATCTATGAAGATTTTCAGCTTGTTCCAACCAG

AACCAACTAATGTCGAGAATCATGCTTACAATGTGATTGCTAAAAATGCTAATCTCTTCAAT
GATTTAGGCATTACTGATTTCTGGATGGCTCCTGCTTACACTTCATTTGGAATGAGTCGTT
ATAATGAAGGATACTCAGTGACGGATCGTTACAATTTAGGTACGACAGTTAATCCAACAAA
ATATGGTAGTGGAGAAGAGCTTGCAAATACAATTGCTGCATTGCATAAAGTAGGATTAAAA
GTTCAAGAAGATATTGTTATGAATCAAATGATTGGTTTCTCTGGTCGAGAAGCAGTAACAG
T TACTCGAACAAATAATCGTGGAATGCAGATTCATGTAAATGGTCAAACATATGCAAATCAA
ATTTATTTTGCATATACAACCTGGTGGCGGAAATGGTCAAGAACTTATGGTGGTAAATACCT
TGCCGAATTACAAAAGAACTATCCTGACCTATTTACGACTAAGGCAATTTGACAGGAGTT
GCACCTGATCCAACCGTTCGTATTAATGAATGGTCTGCTAAATACGAAAATGGGACATCATT
GCAAAATATTGGTATTGGTCTAGCTGTAAAATTAGCTAATGGTGATTATGCATATTTGAATAGT
GGTGATAATAAAGTTTTCAACACTTTATTACCAACTGCAATTTTATTAACTTTAACAACATAA

- [1] W. H. Holzapfel, P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth, and U. Schillinger, "Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 73, no. 2, 365s–373s, 2001.
- [2] F. Leroy and L. De Vuyst, "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 15, no. 2, pp. 67–78, 2004.
- [3] W. Holzapfel and B. Wood, "Lactic acid bacteria in contemporary perspective," in *The genera of lactic acid bacteria*, Springer, 1995, pp. 1–6.
- [4] G. W. Tannock, "A special fondness for lactobacilli," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 6, pp. 3189–3194, 2004.
- [5] M. J. Claesson, D. Van Sinderen, and P. W. O'Toole, "The genus lactobacillus—a genomic basis for understanding its diversity," *FEMS microbiology letters*, vol. 269, no. 1, pp. 22–28, 2007.
- [6] J. Walter, C. Schwab, D. M. Loach, M. G. Gänzle, and G. W. Tannock, "Glucosyltransferase a (gtfa) and inulosucrase (inu) of lactobacillus reuteri tmw1. 106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract," *Microbiology*, vol. 154, no. 1, pp. 72–80, 2008.
- [7] E. Dertli, "Biochemistry and functional analysis of exopolysaccharide production in lactobacillus johnsonii," PhD thesis, School of Biological Sciences, 2013.
- [8] S. Fanning, L. J. Hall, M. Cronin, A. Zomer, J. MacSharry, D. Goulding, M. O. Motherway, F. Shanahan, K. Nally, G. Dougan, *et al.*, "Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 6, pp. 2108–2113, 2012.
- [9] M. Korakli, M. G. Gänzle, and R. F. Vogel, "Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by lactobacillus sanfranciscensis," *Journal of applied microbiology*, vol. 92, no. 5, pp. 958–965, 2002.
- [10] M. Korakli, A. Rossmann, M. G. Gänzle, and R. F. Vogel, "Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by lactobacillus sanfranciscensis," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 5194–5200, 2001.

- [11] M. Tieking and M. G. Gänzle, "Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 16, no. 1-3, pp. 79–84, 2005.
- [12] J. Cerning, "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 7, no. 1-2, pp. 113–130, 1990.
- [13] D.-S. Kim, S. Thomas, and H. S. Fogler, "Effects of pH and trace minerals on long-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 3, pp. 976–981, 2000.
- [14] P. J. Looijesteijn, L. Trapet, E. de Vries, T. Abee, and J. Hugenholtz, "Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*," *International journal of food microbiology*, vol. 64, no. 1-2, pp. 71–80, 2001.
- [15] C. Schwab and M. G. Gänzle, "Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*," *Systematic and applied microbiology*, vol. 29, no. 2, pp. 89–99, 2006.
- [16] I. M. Sims, S. A. Frese, J. Walter, D. Loach, M. Wilson, K. Appleyard, J. Eason, M. Livingston, M. Baird, G. Cook, *et al.*, "Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23," *The ISME journal*, vol. 5, no. 7, p. 1115, 2011.
- [17] S. Galle and E. K. Arendt, "Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 54, no. 7, pp. 891–901, 2014.
- [18] W. Soetaert, D. Schwengers, K. Buchholz, and E. Vandamme, "A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*," in *Progress in Biotechnology*, vol. 10, Elsevier, 1995, pp. 351–358.
- [19] L. De Vuyst, F. De Vin, F. Vaningelgem, and B. Degeest, "Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria," *International Dairy Journal*, vol. 11, no. 9, pp. 687–707, 2001.
- [20] R. Di Cagno, M. De Angelis, A. Limitone, F. Minervini, P. Carnevali, A. Corsetti, M. Gaenzle, R. Ciati, and M. Gobbetti, "Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 26, pp. 9873–9881, 2006.
- [21] C. Schwab, M. Mastrangelo, A. Corsetti, and M. Gänzle, "Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* lth5448 and *Weissella cibaria* 10m in sorghum sourdoughs," *Cereal Chemistry*, vol. 85, no. 5, pp. 679–684, 2008.
- [22] M. Tieking, M. Korakli, M. A. Ehrmann, M. G. Gänzle, and R. F. Vogel, "In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 2, pp. 945–952, 2003.
- [23] N. Salazar, M. Gueimonde, A. M. Hernández-Barranco, P. Ruas-Madiedo, and G. Clara, "Exopolysaccharides produced by intestinal bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 15, pp. 4737–4745, 2008.

- [24] E. K. Arendt, L. A. Ryan, and F. Dal Bello, "Impact of sourdough on the texture of bread," *Food microbiology*, vol. 24, no. 2, pp. 165–174, 2007.
- [25] W. P. Hammes and M. Gänzle, "Sourdough breads and related products," in *Microbiology of fermented foods*, Springer, 1998, pp. 199–216.
- [26] U. Hellemann, J. J. Powers, H. Salovaara, K. Shinholser, and M. Ellilä, "Relation of sensory sourness to chemically analyzed acidity in wholemeal sour rye bread," *Journal of Sensory Studies*, vol. 3, no. 2, pp. 95–111, 1988.
- [27] B. Fretzdorff and J. Brummer, "Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads," *Cereal chemistry (USA)*, 1992.
- [28] R. Di Cagno, M. De Angelis, P. Lavermicocca, M. De Vincenzi, C. Giovannini, M. Faccia, and M. Gobbetti, "Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 2, pp. 623–633, 2002.
- [29] C. Thiele, M. G. Gänzle, and R. F. Vogel, "Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor," *Cereal Chemistry*, vol. 79, no. 1, pp. 45–51, 2002.
- [30] M. De Angelis, L. Mariotti, J. Rossi, M. Servili, P. F. Fox, G. Rollán, and M. Gobbetti, "Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: Purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* cb1," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 12, pp. 6193–6201, 2002.
- [31] K. Katina, M. Sauri, H.-L. Alakomi, and T. Mattila-Sandholm, "Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 35, no. 1, pp. 38–45, 2002.
- [32] O. Pepe, G. Blaiotta, G. Moschetti, T. Greco, and F. Villani, "Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 4, pp. 2321–2329, 2003.
- [33] L. De Vuyst and M. Vancanneyt, "Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria," *Food Microbiology*, vol. 24, no. 2, pp. 120–127, 2007.
- [34] A. Corsetti and L. Settanni, "Lactobacilli in sourdough fermentation," *Food Research International*, vol. 40, no. 5, pp. 539–558, 2007.
- [35] L. De Vuyst and P. Neysens, "The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 16, no. 1-3, pp. 43–56, 2005.
- [36] M.-S. Bounaix, V. Gabriel, S. Morel, H. Robert, P. Rabier, M. Remaud-Simeon, B. Gabriel, and C. Fontagne-Faucher, "Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 22, pp. 10 889–10 897, 2009.
- [37] S. Van Hijum, G. van Geel-Schutten, H. Rahaoui, M. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, "Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 9, pp. 4390–4398, 2002.

- [38] K. Katina, N. H. Maina, R. Juvonen, L. Flander, L. Johansson, L. Virkki, M. Tenkanen, and A. Laitila, "In situ production and analysis of weissella confusa dextran in wheat sourdough," *Food microbiology*, vol. 26, no. 7, pp. 734–743, 2009.
- [39] S. Kaditzky and R. F. Vogel, "Optimization of exopolysaccharide yields in sourdoughs fermented by lactobacilli," *European Food Research and Technology*, vol. 228, no. 2, p. 291, 2008.
- [40] S. Galle, C. Schwab, E. Arendt, and M. Gänzle, "Exopolysaccharide-forming weissella strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 9, pp. 5834–5841, 2010.
- [41] M. Brandt, K. Roth, and W. Hammes, "Effect of an exopolysaccharide produced by lactobacillus sanfranciscensis lth1729 on dough and bread quality," *Sourdough from fundamentals to applications*, p. 80, 2003.
- [42] C. M. Rosell, J. A. Rojas, and C. B. De Barber, "Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality," *Food hydrocolloids*, vol. 15, no. 1, pp. 75–81, 2001.
- [43] P. Decock and S. Cappelle, "Bread technology and sourdough technology," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 16, no. 1-3, pp. 113–120, 2005.
- [44] G. Lacaze, M. Wick, and S. Cappelle, "Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs," *Food Microbiology*, vol. 24, no. 2, pp. 155–160, 2007.
- [45] A. Wolter, A.-S. Hager, E. Zannini, S. Galle, M. Gänzle, D. M. Waters, and E. K. Arendt, "Evaluation of exopolysaccharide producing weissella cibaria mg1 strain for the production of sourdough from various flours," *Food microbiology*, vol. 37, pp. 44–50, 2014.
- [46] R. Di Monaco, E. Torrieri, O. Pepe, P. Masi, and S. Cavella, "Effect of sourdough with exopolysaccharide (eps)-producing lactic acid bacteria (lab) on sensory quality of bread during shelf life," *Food and bioprocess technology*, vol. 8, no. 3, pp. 691–701, 2015.
- [47] K. M. Lynch, A. Coffey, and E. K. Arendt, "Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products," *Food research international*, vol. 110, pp. 52–61, 2018.
- [48] G. Sandra, C. Schwab, F. Dal Bello, A. Coffey, M. Gänzle, and E. Arendt, "Comparison of the impact of dextran and reuteran on the quality of wheat sourdough bread," *Journal of cereal science*, vol. 56, no. 3, pp. 531–537, 2012.
- [49] C. Rühmkorf, H. Rübsam, T. Becker, C. Bork, K. Voiges, P. Mischnick, M. J. Brandt, and R. F. Vogel, "Effect of structurally different microbial homoexopolysaccharides on the quality of gluten-free bread," *European Food Research and Technology*, vol. 235, no. 1, pp. 139–146, 2012.
- [50] H. Leemhuis, T. Pijning, J. M. Dobruchowska, S. S. van Leeuwen, S. Kralj, B. W. Dijkstra, and L. Dijkhuizen, "Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications," *Journal of biotechnology*, vol. 163, no. 2, pp. 250–272, 2013.

- [51] E. Zannini, D. M. Waters, A. Coffey, and E. K. Arendt, "Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 100, no. 3, pp. 1121–1135, 2016.
- [52] V. Monchois, J. H. Lakey, and R. R. Russell, "Secondary structure of streptococcus downei gtf-1 glucansucrase," *FEMS microbiology letters*, vol. 177, no. 2, pp. 243–248, 1999.
- [53] J. Gangoiti, T. Pijning, and L. Dijkhuizen, "Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing α -glucans from starch and sucrose," *Biotechnology advances*, vol. 36, no. 1, pp. 196–207, 2018.
- [54] P. Monsan, S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R.-M. Willemot, and M. Remaud-Siméon, "Homopolysaccharides from lactic acid bacteria," *International Dairy Journal*, vol. 11, no. 9, pp. 675–685, 2001.
- [55] D. Kim, J. F. Robyt, S.-Y. Lee, J.-H. Lee, and Y.-M. Kim, "Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of leuconostoc mesenteroides b-512fmc dextranase," *Carbohydrate Research*, vol. 338, no. 11, pp. 1183–1189, 2003.
- [56] S. S. van Leeuwen, S. Kralj, I. H. van Geel-Schutten, G. J. Gerwig, L. Dijkhuizen, and J. P. Kamerling, "Structural analysis of the α -d-glucan (eps35-5) produced by the lactobacillus reuteri strain 35-5 glucansucrase gtfA enzyme," *Carbohydrate research*, vol. 343, no. 7, pp. 1251–1265, 2008.
- [57] D. Byrne, "Commission decision of january 30, 2001 on authorising the placing on the market of a dextran preparation produced by leuconostoc mesenteroides as a novel food ingredient in bakery products under regulation (ec) no. 258/97 of the european parliament and of the council official," *Journal European Commission L*, vol. 44, 2001.
- [58] N. H. Maina *et al.*, "Structure and macromolecular properties of weissella confusa and leuconostoc citreum dextrans with a potential application in sourdough," 2012.
- [59] S. Shukla, Q. Shi, N. H. Maina, M. Juvonen, A. Goyal, *et al.*, "Weissella confusa cab3 dextranase: Properties and in vitro synthesis of dextran and glucooligosaccharides," *Carbohydrate polymers*, vol. 101, pp. 554–564, 2014.
- [60] G. L. Côté, "Alternan," *Biopolymers*, vol. 5, pp. 323–350, 2002.
- [61] G. L. Côté and J. F. Robyt, "Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from leuconostoc mesenteroides nrrl b-1355 that," *Carbohydrate research*, vol. 101, pp. 57–74, 1982.
- [62] P. Biely, G. L. Côté, and A. Burgess-Cassler, "Purification and properties of alternanase, a novel endo- α -1, 3- α -1, 6-d-glucanase," *European journal of biochemistry*, vol. 226, no. 2, pp. 633–639, 1994.
- [63] H. A. Wyckoff, G. T. Hayman, and P. Biely, "Alternan and highly branched limit dextrans: Low-viscosity polysaccharides as potential new food ingredients," 1997.

- [64] E. Dertli, I. J. Colquhoun, G. L. Côté, G. Le Gall, and A. Narbad, "Structural analysis of the α -d-glucan produced by the sourdough isolate *Lactobacillus brevis* e25," *Food chemistry*, vol. 242, pp. 45–52, 2018.
- [65] S. Kralj, G. van Geel-Schutten, H. Rahaoui, R. Leer, E. Faber, M. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, "Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -(1 4) and α -(1 6) glucosidic bonds," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 9, pp. 4283–4291, 2002.
- [66] G. H. Van Geel-Schutten, C. E. A. Heddes, M. W.-J. Noort, M. P. Kats, A. Jurgens, and J. Plijter, *Bread improver*, US Patent App. 11/721,415, Dec. 2009.
- [67] G. L. Côté and C. D. Skory, "Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* nrrl b-1118," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 93, no. 6, pp. 2387–2394, 2012.
- [68] G. L. Côté, C. D. Skory, S. M. Unser, and J. O. Rich, "The production of glucans via glucansucrases from *Lactobacillus satsumensis* isolated from a fermented beverage starter culture," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, no. 16, pp. 7265–7273, 2013.
- [69] S. Kralj, G. van Geel-Schutten, M. Dondorff, S. Kirsanovs, M. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, "Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: Isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains," *Microbiology*, vol. 150, no. 11, pp. 3681–3690, 2004.
- [70] D. Kim and J. F. Robyt, "Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases," *Enzyme and microbial technology*, vol. 16, no. 8, pp. 659–664, 1994.
- [71] G. Van Geel-Schutten, E. Faber, E. Smit, K. Bonting, M. Smith, B. Ten Brink, J. Kamerling, J. Vliegthart, and L. Dijkhuizen, "Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 7, pp. 3008–3014, 1999.
- [72] S. S. van Leeuwen, S. Kralj, W. Eeuwema, G. J. Gerwig, L. Dijkhuizen, and J. P. Kamerling, "Structural characterization of bioengineered α -d-glucans produced by mutant glucansucrase gtf180 enzymes of *Lactobacillus reuteri* strain 180," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 3, pp. 580–588, 2009.
- [73] S. A. van Hijum, S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen, and I. G. van Geel-Schutten, "Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 1, pp. 157–176, 2006.
- [74] S. Bozonnet, M. Dols-Laffargue, E. Fabre, S. Pizzut, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, and R.-M. Willemot, "Molecular characterization of dsr-e, an α -1, 2 linkage-synthesizing dextranase with two catalytic domains," *Journal of bacteriology*, vol. 184, no. 20, pp. 5753–5761, 2002.
- [75] K. Funane, K. Mizuno, H. Takahara, and M. Kobayashi, "Gene encoding a dextranase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* nrrl b-512f," *Bio-science, biotechnology, and biochemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 29–38, 2000.

- [76] X. Y. Chen, C. Levy, and M. G. Gänzle, "Structure-function relationships of bacterial and enzymatically produced reuterans and dextran in sourdough bread baking application," *International journal of food microbiology*, vol. 239, pp. 95–102, 2016.
- [77] E. A. MacGregor, H. M. Jespersen, and B. Svensson, "A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases," *FEBS letters*, vol. 378, no. 3, pp. 263–266, 1996.
- [78] T. Pijning, A. Vujičić-Žagar, S. Kralj, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra, "Flexibility of truncated and full-length glucansucrase gtf 180 enzymes from *lactobacillus reuteri* 180," *The FEBS journal*, vol. 281, no. 9, pp. 2159–2171, 2014.
- [79] X. Meng, J. M. Dobruchowska, T. Pijning, G. J. Gerwig, J. P. Kamerling, and L. Dijkhuizen, "Truncation of domain v of the multidomain glucansucrase gtf180 of *lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 99, no. 14, pp. 5885–5894, 2015.
- [80] X. Meng, J. M. Dobruchowska, T. Pijning, C. A. López, J. P. Kamerling, and L. Dijkhuizen, "Residue leu940 has a crucial role in the linkage and reaction specificity of the glucansucrase gtf180 of the probiotic bacterium *lactobacillus reuteri* 180," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 47, pp. 32 773–32 782, 2014.
- [81] H. Hellmuth, S. Wittrock, S. Kralj, L. Dijkhuizen, B. Hofer, and J. Seibel, "Engineering the glucansucrase gtf180 enzyme reaction and glycosidic bond specificity: Toward tailor-made polymer and oligosaccharide products," *Biochemistry*, vol. 47, no. 25, pp. 6678–6684, 2008.
- [82] S. Kralj, W. Eeuwema, T. H. Eckhardt, and L. Dijkhuizen, "Role of asparagine 1134 in glucosidic bond and transglycosylation specificity of reuteransucrase from *lactobacillus reuteri* 121," *The FEBS journal*, vol. 273, no. 16, pp. 3735–3742, 2006.
- [83] S. Kralj, G. Gerwig, L. Dijkhuizen, J. Kamerling, *et al.*, "Structural analysis of bioengineered α -d-glucan produced by a triple mutant of the glucansucrase gtf180 enzyme from *lactobacillus reuteri* strain 180: Generation of (α 1 $\rightarrow$ 4) linkages in a native (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- α -d-glucan," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 8, pp. 2251–2258, 2008.
- [84] S. Kralj, I. G. van Geel-Schutten, E. J. Faber, M. J. van der Maarel, and L. Dijkhuizen, "Rational transformation of *lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextranase," *Biochemistry*, vol. 44, no. 25, pp. 9206–9216, 2005.
- [85] C. Moulis, G. Joucla, D. Harrison, E. Fabre, G. Potocki-Veronese, P. Monsan, and M. Remaud-Simeon, "Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 42, pp. 31 254–31 267, 2006.

- [86] X. Meng, T. Pijning, J. M. Dobruchowska, H. Yin, G. J. Gerwig, and L. Dijkhuizen, "Structural determinants of alternating (α 1 4) and (α 1 6) linkage specificity in reuteransucrase of *Lactobacillus reuteri*," *Scientific reports*, vol. 6, p. 35261, 2016.
- [87] X. Y. Chen and M. G. Gänzle, "Site directed mutagenesis of dextranase from *Weissella cibaria*: Transformation to a reuteransucrase," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 64, no. 36, pp. 6848–6855, 2016.
- [88] A. Shimamura, Y. J. Nakano, H. Mukasa, and H. K. Kuramitsu, "Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product," *Journal of bacteriology*, vol. 176, no. 16, pp. 4845–4850, 1994.
- [89] V. Monchois, M. Remaud-Simeon, R. Russell, P. Monsan, and R.-M. Willemot, "Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase (DSRs) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 48, no. 4, pp. 465–472, 1997.
- [90] V. Monchois, A. Reverte, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, and R.-M. Willemot, "Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 5, pp. 1644–1649, 1998.
- [91] S. Kralj, P. Grijpstra, S. S. van Leeuwen, H. Leemhuis, J. M. Dobruchowska, R. M. van der Kaaij, A. Malik, A. Oetari, J. P. Kamerling, and L. Dijkhuizen, "4, 6- α -glucanotransferase, a novel enzyme that structurally and functionally provides an evolutionary link between glycoside hydrolase enzyme families 13 and 70," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 22, pp. 8154–8163, 2011.
- [92] J. Gangoiti, S. S. Van Leeuwen, G. J. Gerwig, S. Duboux, C. Vafiadi, T. Pijning, and L. Dijkhuizen, "4, 3- α -glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H," *Scientific reports*, vol. 7, p. 39761, 2017.
- [93] J. Gangoiti, S. S. van Leeuwen, X. Meng, S. Duboux, C. Vafiadi, T. Pijning, and L. Dijkhuizen, "Mining novel starch-converting glycoside hydrolase 70 enzymes from the Nestlé culture collection genome database: The *Lactobacillus reuteri* NCC 2613 GTFB," *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, p. 9947, 2017.
- [94] H. Leemhuis, J. M. Dobruchowska, M. Ebbelaar, F. Faber, P. L. Buwalda, M. J. van der Maarel, J. P. Kamerling, and L. Dijkhuizen, "Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 62, no. 49, pp. 12034–12044, 2014.
- [95] Y. Bai, J. Gangoiti, B. W. Dijkstra, L. Dijkhuizen, and T. Pijning, "Crystal structure of 4, 6- α -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from α -amylases in oral bacteria," *Structure*, vol. 25, no. 2, pp. 231–242, 2017.
- [96] S. I. Mussatto and I. M. Mancilha, "Non-digestible oligosaccharides: A review," *Carbohydrate polymers*, vol. 68, no. 3, pp. 587–597, 2007.

- [97] M. Remaud-Simeon, R.-M. Willemot, P. Sarçabal, G. P. de Montalk, and P. Monsan, "Glucansucrases: Molecular engineering and oligosaccharide synthesis," *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, vol. 10, no. 1-3, pp. 117–128, 2000.
- [98] A. Bertrand, S. Morel, F. Lefoulon, Y. Rolland, P. Monsan, and M. Remaud-Simeon, "Leuconostoc mesenteroides glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents," *Carbohydrate research*, vol. 341, no. 7, pp. 855–863, 2006.
- [99] V. Bivolarski, T. Vasileva, V. Gabriel, and I. Iliev, "Synthesis of glucooligosaccharides with prebiotic potential by glucansucrase ure 13–300 acceptor reactions with maltose, raffinose and lactose," *Engineering in Life Sciences*, vol. 18, no. 12, pp. 904–913, 2018.
- [100] G. L. Cote and S. M. Holt, *Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions*, US Patent 7,182,954, Feb. 2007.
- [101] Q. Shi, Y. Hou, M. Juvonen, P. Tuomainen, I. Kajala, S. Shukla, A. Goyal, H. Maaheimo, K. Katina, and M. Tenkanen, "Optimization of isomaltooligosaccharide size distribution by acceptor reaction of weissella confusa dextranucrase and characterization of novel α -(1 2)-branched isomaltooligosaccharides," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 64, no. 16, pp. 3276–3286, 2016.
- [102] A. I. Ruiz-Matute, M. Brokl, M. L. Sanz, A. C. Soria, G. L. Côté, M. E. Collins, and R. A. Rastall, "Effect of dextranucrase cellobiose acceptor products on the growth of human gut bacteria," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 59, no. 8, pp. 3693–3700, 2011.
- [103] S. Holt, C. Miller-Fosmore, and G. Côté, "Growth of various intestinal bacteria on alternansucrase-derived oligosaccharides," *Letters in applied microbiology*, vol. 40, no. 5, pp. 385–390, 2005.
- [104] P. Monsan, M. Remaud-Siméon, and I. André, "Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis," *Current opinion in microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 293–300, 2010.
- [105] E.-S. Seo, S.-H. Nam, H.-K. Kang, J.-Y. Cho, H.-S. Lee, H.-W. Ryu, and D. Kim, "Synthesis of thermo-and acid-stable novel oligosaccharides by using dextranucrase with high concentration of sucrose," *Enzyme and microbial technology*, vol. 40, no. 5, pp. 1117–1123, 2007.
- [106] G. L. Côté, "Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness," *Carbohydrate research*, vol. 344, no. 2, pp. 187–190, 2009.
- [107] M. Kim, D. F. Day, and D. Kim, "Potential physiological functions of acceptor products of dextranucrase with cellobiose as an inhibitor of mutansucrase and fungal cell synthase," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, no. 21, pp. 11 493–11 500, 2010.

- [108] Y.-H. Moon, J.-H. Lee, D.-Y. Jhon, W.-J. Jun, S.-S. Kang, J. Sim, H. Choi, J.-H. Moon, and D. Kim, "Synthesis and characterization of novel quercetin- α -d-glucopyranosides using glucansucrase from *leuconostoc mesenteroides*," *Enzyme and microbial technology*, vol. 40, no. 5, pp. 1124–1129, 2007.
- [109] Y. Bai, R. M. van der Kaaij, A. J. J. Woortman, Z. Jin, and L. Dijkhuizen, "Characterization of the 4, 6- α -glucanotransferase gtfb enzyme of *lactobacillus reuteri* 121 isolated from inclusion bodies," *BMC biotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 49, 2015.
- [110] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. t. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Analytical chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [111] Ö. Yildiz, B. Yurt, A. Baştürk, Ö. S. Toker, M. T. Yilmaz, S. Karaman, and O. Dağlıoğlu, "Pasting properties, texture profile and stress–relaxation behavior of wheat starch/dietary fiber systems," *Food Research International*, vol. 53, no. 1, pp. 278–290, 2013.
- [112] M. C. Bourne, "Texture profile analysis," *Food Technol.*, vol. 32, pp. 62–66, 1978.
- [113] N. Horn, U. Wegmann, E. Dertli, F. Mulholland, S. R. Collins, K. W. Waldron, R. J. Bongaerts, M. J. Mayer, and A. Narbad, "Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on *lactobacillus johnsonii* surface characteristics," *PloS one*, vol. 8, no. 3, e59957, 2013.
- [114] H.-K. Kang, J.-S. Oh, and D. Kim, "Molecular characterization and expression analysis of the glucansucrase dsrwc from *weissella cibaria* synthesizing a α (1 6) glucan," *FEMS microbiology letters*, vol. 292, no. 1, pp. 33–41, 2009.
- [115] M. Miao, Y. Ma, B. Jiang, S. W. Cui, Z. Jin, and T. Zhang, "Characterisations of *lactobacillus reuteri* sk24. 003 glucansucrase: Implications for α -gluco-poly-and oligosaccharides biosynthesis," *Food chemistry*, vol. 222, pp. 105–112, 2017.
- [116] T. Pijning, T. Pijning, A. Vujičić-Žagar, S. Kralj, W. Eeuwema, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra, "Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from *lactobacillus reuteri* 180," *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 26, no. 1-2, pp. 12–17, 2008.
- [117] L. Song, M. Miao, B. Jiang, T. Xu, S. W. Cui, and T. Zhang, "*Leuconostoc citreum* sk24. 002 glucansucrase: Biochemical characterisation and de novo synthesis of α -glucan," *International journal of biological macromolecules*, vol. 91, pp. 123–131, 2016.
- [118] G. L. Côté, S. M. Holt, and C. Miller-Fosmore, "Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions," in *ACS Symposium Series*, ACS Publications, vol. 849, 2003, pp. 75–89.
- [119] J. M. Dobruchowska, X. Meng, H. Leemhuis, G. J. Gerwig, L. Dijkhuizen, and J. P. Kamerling, "Gluko-oligomers initially formed by the reuteransucrase enzyme of *lactobacillus reuteri* 121 incubated with sucrose and malto-oligosaccharides," *Glycobiology*, vol. 23, no. 9, pp. 1084–1096, 2013.

- [120] X. Meng, T. Pijning, M. Tietema, J. M. Dobruchowska, H. Yin, G. J. Gerwig, S. Kralj, and L. Dijkhuizen, "Characterization of the glucansucrase gtf180 w1065 mutant enzymes producing polysaccharides and oligosaccharides with altered linkage composition," *Food chemistry*, vol. 217, pp. 81–90, 2017.
- [121] Y. Hu, V. Winter, X. Y. Chen, and M. G. Gänzle, "Effect of acceptor carbohydrates on oligosaccharide and polysaccharide synthesis by dextransucrase dsrm from *Weissella cibaria*," *Food research international*, vol. 99, pp. 603–611, 2017.
- [122] X. Meng, J. Gangoiti, N. de Kok, S. S. van Leeuwen, T. Pijning, and L. Dijkhuizen, "Biochemical characterization of two gh70 family 4, 6- α -glucanotransferases with distinct product specificity from *Lactobacillus aviarius* subsp. *aviarius* dsm 20655," *Food chemistry*, vol. 253, pp. 236–246, 2018.
- [123] J. M. Dobruchowska, G. J. Gerwig, S. Kralj, P. Grijpstra, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, and J. P. Kamerling, "Structural characterization of linear isomalto-/malto-oligomer products synthesized by the novel gtfb 4, 6- α -glucanotransferase enzyme from *Lactobacillus reuteri* 121," *Glycobiology*, vol. 22, no. 4, pp. 517–528, 2011.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgileri: humeyra_ispirli@hotmail.com

Makale

1. İspirli, H., Colquhoun, I. J., Şahin, E., Sagdic, O., Dertli, E. (2019). Preparation of gentiobiose-derived oligosaccharides by glucansucrase E81 and determination of prebiotic and immune-modulatory functions. *Carbohydrate research*, 486, 107837.
2. İspirli, H., Onur Yüzer, M., Skory, C., Colquhoun, I. J., Sağdıç, O., Dertli, E. (2019). Characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* E81 and production of malto-oligosaccharides. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1-10.
3. İspirli, H., Özmen, D., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O., Dertli, E. (2020). Impact of glucan type exopolysaccharide (EPS) production on technological characteristics of sourdough bread. *Food Control*, 107, 106812.
4. İspirli, H., Sagdic, O., Yılmaz, M. T., Dertli, E. (2019). Physicochemical characterisation of an -glucan from *Lactobacillus reuteri* E81 as a potential exopolysaccharide suitable for food applications. *Process biochemistry*, 79, 91-96.
5. İspirli, H., Şimşek, Ö., Skory, C., Sağdıç, O., Dertli, E. (2019). Characterization of a 4, 6--glucanotransferase from *Lactobacillus reuteri* E81 and production of malto-oligosaccharides with immune-modulatory roles. *International journal of biological macromolecules*, 124, 1213-1219.

Konferans Bildirisi

1. İspirli, H., Sagdic, O., Dertli, E. (2019). Production of oligosaccharides by glucansucrase enzymes from sucrose and their functional role. 3rd International Conference on Advanced Engineering Technologies (ICADET), 19-21 September 2019, Bayburt, Turkey.
2. İspirli, H., Sagdic, O., Dertli, E. (2019). Glucanotransferases as novel enyzmes of LAB for cereal technology and food applications. 3rd International Conference on Advanced Engineering Technologies (ICADET), 19-21 September 2019, Bayburt, Turkey.