



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN ENZİMLER
İLE NIŞASTA VE NIŞASTA TÜREVLERİNDEN ALLULOZ ÜRETİMİ**

**ERVA PARILDI
DOKTORA TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN ENZİMLER
İLE NIŞASTA VE NIŞASTA TÜREVLERİNDEN ALLULOZ ÜRETİMİ**

**ERVA PARILDI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN KOLA**

ADANA, 2025

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

30/05/2024

Erva PARILDI

ÖZET

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLEN ENZİMLER İLE NİŞASTA VE NİŞASTA TÜREVLERİNDEN ALLULOZ ÜRETİMİ

Erva PARILDI

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman KOLA

Mayıs 2025, 96 sayfa

Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen enzimler kullanılarak ucuz ve bol miktarda bulunabilen nişastadan pahalı ve değerli bir nadir şeker olan D-alluloz üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, liyofilize halde satın alınan *Clostridium thermocellum* ve *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* suşları laboratuvarında aktifleştirilmiş ve bu suşlardan genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir enzim geni için özel olarak tasarlanmış primerler kullanılarak, izole edilen DNA'lardan enzimleri kodlayan genler elde edilmiştir. Elde edilen genler, pET serisi plazmid vektörler kullanılarak klonlanmış ve *E. coli* rosetta suşunda ekspresyonları sağlanmıştır. Üretilen fosfoglikoizomeraz (PGI), alluloz 6-fosfat 3-epimeraz (A6PE) ve alluloz 6-fosfat fosfataz (A6PP) enzimleri nişastanın alluloza dönüşüm prosesinde kullanılmıştır.

Çalışmada, nişasta öncelikle ticari enzimler kullanılarak glikoza hidrolize edilmiş, ardından rekombinant enzimler aracılığıyla glikoz çözeltisinden D-alluloz üretimi sağlanmıştır. Bu tez çalışması ile Türkiye'de ilk defa alluloz 6-fosfat 3-epimeraz ve alluloz 6-fosfat fosfataz enzimleri rekombinant olarak başarıyla üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Nişastanın alluloza dönüşümü prosesinde oluşan her bir ara ürün HPLC cihazında analiz edilmiş ve 48 saatlik dönüşümleri grafiğe aktarılmıştır. Elde edilen bulgular, nişastadan D-alluloz üretiminin ekonomik ve verimli bir yöntemle gerçekleştirilebileceğini göstermekte olup, bu yöntem şeker alternatiflerine yönelik endüstriyel uygulamalar için önemli bir potansiyel taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Alluloz, Rekombinant DNA Teknolojisi, Enzimatik Dönüşüm, Nişasta, Nadir Şekerler

ABSTRACT

PRODUCTION OF ALLULOSE FROM STARCH AND STARCH DERIVATIVES USING ENZYMES PRODUCED BY RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY

Erva PARILDI

PhD, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Osman KOLA

May 2025, 96 pages

In this study, the production of D-allulose, a high-value rare sugar, from abundant and inexpensive starch using enzymes produced via recombinant DNA technology. In the first stage of the study, lyophilized *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strains were activated and their genomic DNA isolated. Specific primers were designed to amplify the genes encoding enzymes from the isolated DNA. The genes were cloned into pET series plasmid vectors and expressed in *E. coli* rosetta strain. The produced enzymes -phosphoglucose isomerase (PGI), allulose 6-phosphate 3-epimerase (A6PE), and allulose 6-phosphate phosphatase (A6PP)- were used in the starch-to-allulose conversion process.

Initially, starch was hydrolyzed to glucose using commercial enzymes. Subsequently, D-allulose production was achieved by enzymatic conversion using the recombinant enzymes. Within the scope of this study, recombinant allulose 6-phosphate 3-epimerase and allulose 6-phosphate phosphatase were successfully produced and characterized for the first time in Türkiye. Each intermediate product formed during the starch-to-allulose conversion was analyzed by HPLC, and their 48-hour transformation profiles were graphically represented. The findings demonstrate that D-allulose can be efficiently and economically produced from starch, providing a promising alternative for industrial applications in the field of sugar substitutes.

Keywords: Allulose, Recombinant DNA Technology, Enzymatic Conversion, Starch, Rare Sugar

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, çalışmamın her adımında sabırla yanımda olan, çoğu zaman tezimi benden daha çok düşünen ve sorunlarıma benden önce çözüm arayan, desteği ve samimiyetiyle bu zorlu süreci benim için çok daha kolay hale getiren, her zaman yapıcı yaklaşımıyla yolumu aydınlatan ve akademik hayatıma ışık tutan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Osman KOLA'ya,

Tez jürisinde bulunan, büyük bir özveriyle tezimi inceleyip daha iyi haline ulaşmasını sağlayan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Mehmet Sertaç ÖZER, Prof. Dr. Ahmet Doğan DUMAN ve Doç. Dr. Murat Reis AKKAYA'ya,

Tez çalışmamın her aşamasında samimi desteğini gördüğüm, bu süreçte bana çok şey öğreten, meslek hayatımda uzun yıllar kullanacağım çok kıymetli bilgi ve birikimlerinden yararlandığım bölüm hocalarımızdan sayın Dr. Öğr. Üyesi Ali Emrah ÇETİN'e,

Yardıma ihtiyacım olan her an benim için değerli vakitlerini ayıran ve çalışmalarına çok önemli katkıları olan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü hocalarından sayın Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a ve biyolog Dr. Elif DİKKAYA'ya,

Tecrübesi ve bilgi birikimiyle çalışmama çok önemli katkılar sağlayan, malzeme temini konusunda her ihtiyacım olduğunda başvurduğum ve tüm malzemelerini büyük bir samimiyetle benimle paylaşan bölümümüz araştırma görevlilerinden sayın Arş. Gör. Dr. Semih Latif İPEK'e,

Çalışmam boyunca değerli katkılarını benden esirgemeyen, okulumuz Biyomühendislik Bölümü hocalarından sayın Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN'e,

Çalışmam için gerekli plazmidleri özenle bana ulaştıran Karadeniz Teknik Üniversitesi öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya,

Çalışmamın çeşitli aşamalarında bana büyük bir samimiyetle yardımcı olan, bilgi ve birikimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Fatma İnci ÖZDEMİR’e,

Tezimle ilgili birçok konuda değerli görüşlerine başvurduğum Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL’a,

Çalışmam boyunca bana moral ve motivasyon kaynağı olan değerli arkadaşlarım Neslihan KEÇELİ, Mustafa ÖZÇAY ve Ömer SOLAKLIOĞLU’na,

Tez çalışmamı 21803005 No’lu “Lisansüstü Tez Projeleri” kapsamında maddi olarak destekleyen Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi’ne,

Çalışmamın ilk kısmında büyük emekleri olan Sunar Mısır Ar-Ge laboratuvarı çalışanlarına,

Akademisyenliği, çalışkanlığı ve kişiliğiyle her zaman örnek aldığım babam Metin PARILDI’ya, sadece tez sürecinde değil hayatımın her anında benim için çok büyük bir moral ve motivasyon kaynağı olan annem Şenay PARILDI’ya hem kardeşim hem en yakın arkadaşım olan, bu sürece manevi katkıları çok büyük olan kardeşim İbrahim Selman PARILDI’ya,

Sonsuz teşekkür ederim.

Erva PARILDI

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR	xv
SEMBOLLER	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Nadir Şekerler	6
2.1.1. Alluloz	10
2.1.1.1. Alluloz kaynakları	12
2.1.1.2. Alluloz üretimi	12
2.1.1.3. Yasal düzenlemeler	17
2.1.1.4. Alluloz ve sağlık	18
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Bakteriler, plazmid DNA ve besi ortamları	21
3.1.2. Kimyasal ve diğer sarf malzemeler	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Mikroorganizmaların üretimi	24
3.2.1.1. <i>T. thermosaccharolyticum</i> bakterisinin canlandırılması ve üretimi	24
3.2.1.2. <i>C. thermocellum</i> bakterisinin canlandırılması ve üretimi	25
3.2.1.3. <i>E. coli</i> bakterisinin kültüre alınması	27
3.2.2. Genlerin restriksiyon enzim haritalarının çıkarılması	28
3.2.2.1. <i>T. thermosaccharolyticum</i> A6PE geninin restriksiyon enzim haritasının çıkarılması	28

3.2.2.2.	<i>C. thermocellum</i> A6PP geninin restriksiyon enzim haritasının çıkarılması	28
3.2.2.3.	<i>C. thermocellum</i> PGI geninin restriksiyon enzim haritasının çıkarılması	29
3.2.3.	Genomik DNA izolasyonu	30
3.2.4.	Agaroz jel elektroforezi	32
3.2.5.	PCR ve Klonlama Çalışmaları	33
3.2.5.1.	Primerlerin tasarımı	33
3.2.5.2.	Primerlerin kullanım için hazırlanması	35
3.2.5.3.	Genlerin PCR ile çoğaltılması	36
3.2.5.4.	PCR ampikonlarının restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi	38
3.2.5.5.	Plazmid DNA'ların <i>E. coli</i> 'den izolasyonu	39
3.2.5.6.	Plazmid DNA'ların restriksiyon endonükleazlar ile doğrusal hale getirilmesi	41
3.2.5.7.	Restriksiyon endonükleaz ile kesilen genlerin ve plazmidlerin agaroz jelden saflaştırılması	42
3.2.5.8.	Ligasyon	43
3.2.5.9.	<i>E. coli</i> bakterilerinin kompetent hale getirilmesi ve transformasyon	44
3.2.5.10.	Rekombinant <i>E. coli</i> rosetta kolonilerinin seçilmesi	45
3.2.6.	Enzimlerin karakterizasyonu çalışmaları	46
3.2.6.1.	Rekombinant bakterilerden toplam proteinlerin SDS-PAGE için saflaştırılması	46
3.2.6.2.	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	47
3.2.6.3.	Bradford yöntemi ile proteinlerin miktarı tayini	50
3.2.6.4.	Enzim aktivitesinin belirlenmesi	51
3.2.7.	Üretilen enzimler kullanılarak nişastanın alluloza dönüşümü	52
3.2.7.1.	Nişastanın glikoza dönüşümü	52
3.2.7.2.	Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümü	54
3.2.7.3.	Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümü	55
3.2.7.4.	Fruktoz-6-fosfatın alluloza dönüşümü	55
3.2.7.5.	HPLC analizleri	56
3.2.7.5.1.	<i>HPLC şeker analizi</i>	57
3.2.7.5.2.	<i>HPLC fosfat analizi</i>	58
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	64

4.1.	Klonlama Çalışmaları	64
4.1.1.	Bakterilerden genomik DNA'ların izolasyonu	64
4.1.2.	Plazmid DNA'ların izolasyonu	65
4.1.3.	Enzimleri kodlayan genlerinin PCR ile çoğaltılması	65
4.1.4.	PCR ürünü genler ile plazmid DNA'ların restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi ve agaroz jelden saflaştırılması	67
4.1.5.	Genlerin plazmid DNA'lara ligasyonu ve transformasyon	67
4.2.	Toplam Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	68
4.3.	Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	70
4.4.	Enzim Aktivitesi	72
4.5.	Üretilen Enzimler Kullanılarak Nişastanın Alluloza Dönüşümü	72
4.5.1.	Nişastadan glikoz üretimi	72
4.5.2.	Glikozdan glikoz-6-fosfat üretimi	73
4.5.3.	Glikoz-6-Fosfattan fruktoz-6-fosfat üretimi	75
4.5.4.	Fruktoz-6-fosfattan alluloz üretimi	78
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	84
5.1.	Sonuçlar	84
5.2.	Öneriler	84
KAYNAKÇA		86
ÖZGEÇMİŞ		

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1.	Niştastadan alluloz üretim prosesi.....	4
Şekil 2.1.	Yaygın bilinen bazı nadir şeker moleküllerinin halka (Haworth) yapısı.....	7
Şekil 2.2.	(A) Maltuloz ve (B) Laktuloz moleküllerinin halka (Haworth) yapısı.....	8
Şekil 2.3.	İzomaltuloz molekülünün halka (Haworth) yapısı.....	9
Şekil 2.4.	D-Alluloz (D-Psikoz) molekülünün halka (Haworth) ve Fischer yapıları.....	11
Şekil 2.5.	İzumoring stratejisi.....	14
Şekil 2.6.	Enzimatik biyosistem ile niştastadan alluloz üretim yolağı.....	17
Şekil 3.1	<i>Clostridium thermocellum</i> (<i>Acetivibrio thermocellus</i>) ve <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> suşlarının liyofilize formlarını içeren cam tüpler.....	21
Şekil 3.2.	pET-20b(+) plazmid DNA'sının haritası.....	22
Şekil 3.3.	pET-21a(+) plazmid DNA'sının haritası.....	22
Şekil 3.4.	DSM 61. “ <i>Thermoanaerobacterium</i> medium” besiyeri.....	25
Şekil 3.5.	DSM “520. <i>Ruminoclostridium cellulolyticum</i> (CM3) medium” besiyeri.....	27
Şekil 3.6.	A6PE geninin restriksiyon haritası.....	28
Şekil 3.7.	A6PP geninin restriksiyon haritası.....	29
Şekil 3.8.	PGI geninin restriksiyon haritası.....	29
Şekil 3.9.	Genomik DNA izolasyonu için kullanılan ticari izolasyon kiti.....	30
Şekil 3.10.	Jel görüntülemeye kullanılan moleküler DNA belirteci.....	32
Şekil 3.11.	İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforez sisteminde yürütülmesi.....	34
Şekil 3.12.	Agaroz jel elektroforezi sonrasında DNA örneklerinin görüntülenmesinde kullanılan jel görüntüleme cihazı.....	34
Şekil 3.13.	PCR reaksiyonu için kullanılan Pfu DNA polimeraz enzimi.....	36
Şekil 3.14.	Genlerin amplifikasyonu için PCR reaksiyonlarının gerçekleştirildiğı termal döngü cihazı.....	37
Şekil 3.15.	Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan GeneJET Plazmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific).....	40
Şekil 3.16.	Agaroz jelden DNA saflaştırma kiti.....	42
Şekil 3.17.	Sephadex G-100 reçine ile hazırlanan saflaştırma kolonları.....	47
Şekil 3.18.	SDS-PAGE analizi için kullanılan protein markerın jel görüntüsü.....	49

Şekil 3.19.	Saflaştırılan enzim örneklerinin SDS-PAGE’de yürütülmesi.....	50
Şekil 3.20.	Spektrofotometrik analizlerde kullanılan spektrofotometre cihazı.....	51
Şekil 3.21.	Nişasta sütünden glikoz üretim süreci.....	53
Şekil 3.22.	Glikozun Glikoz-6-fosfata dönüşüm reaksiyonu.....	54
Şekil 3.23.	Glikoz-6-fosfat’ın Fruktoz-6-fosfata dönüşüm reaksiyonu.....	55
Şekil 3.24.	Fruktoz-6-fosfatın alluloza dönüşüm reaksiyonu.....	56
Şekil 3.25.	Çalışmalarda kullanılan HPLC cihazı.....	57
Şekil 3.26.	Glikoz (500 ppm) ve alluloz (500 ppm) standardına ait HPLC kromatogramı	59
Şekil 3.27.	Glikoz ve alluloza ait kalibrasyon eğrileri.....	60
Şekil 3.28.	Glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat standardına ait HPLC kromatogramı.....	61
Şekil 3.29.	Glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfata ait kalibrasyon eğrileri.....	62
Şekil 4.1.	İzole edilen DNA’ların jel görüntüleme sisteminde görüntülenmesi.....	65
Şekil 4.2.	İzolasyonu gerçekleştirilen plazmid DNA’ların agaroz jel görüntüsü.....	66
Şekil 4.3.	PCR’da çoğaltılan genlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	66
Şekil 4.4.	Restriksiyon endonükleazla kesimleri yapılan ve agaroz jel bloklarından saflaştırılan PCR ürünü genler (A) ve plazmid DNA’lara (B) ait agaroz jel bantları.....	67
Şekil 4.5.	Transformasyon sonucu LB agar plaklarında gelişen rekombinant bakteri kolonileri.....	68
Şekil 4.6.	Koloni PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü.....	68
Şekil 4.7.	PGI, A6PE ve A6PP enzimlerinden sorumlu bantların SDS-PAGE görüntüsü	69
Şekil 4.8.	Bradford yöntemi için hazırlanan standart çözeltiler ve protein miktar tayini yapılan enzimler.....	70
Şekil 4.9.	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA standartlarının 595 nm’de ölçülen absorbansları.....	71
Şekil 4.10.	Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümünde harcanan glikozdaki değişim kromatogramı.....	74
Şekil 4.11.	Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümü esnasında zamana bağlı azalış grafiği.....	74
Şekil 4.12.	Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümünün 48 saatlik kromatogramı.....	76
Şekil 4.13.	Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşüm grafiği.....	77
Şekil 4.14.	Fruktoz-6-fosfat’ın alluloza dönüşüm kromatogramı.....	79

Şekil 4.15. Fruktoz-6-fosfatın alluloza dönüşümünde zamana bağlı oluşan alluloz konsantrasyon grafiği.....	79
---	----



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1.	<i>T. thermosaccharolyticum</i> 'dan üretilecek alluloz-6-fosfat 3-epimeraz genini PCR ile çoğaltmak için tasarlanan ileri (A6PEF) ve geri (A6PER) primerler.....	35
Tablo 3.2.	<i>C. thermocellum</i> 'dan üretilecek olan alluloz-6-fosfat fosfataz genini PCR ile çoğaltmak için tasarlanan ileri (A6PPF) ve geri (A6PPR) primerler.....	35
Tablo 3.3	<i>C. thermocellum</i> 'dan üretilecek olan fosfoglikoizomeraz genini PCR ile çoğaltmak için tasarlanan ileri (PGIF) ve geri (PGIR) primerler.....	35
Tablo 3.4.	Genlerin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.....	37
Tablo 3.5.	<i>T. thermosaccharolyticum</i> bakterisi genomunda bulunan A6PE enzimini kodlayan genin amplifikasyonu için PCR cihazına tanımlanan döngü ayarları.....	38
Tablo 3.6.	<i>C. thermocellum</i> bakterisi genomunda bulunan A6PP enzimini kodlayan genin amplifikasyonu için PCR cihazına tanımlanan döngü ayarları.....	38
Tablo 3.7.	<i>C. thermocellum</i> bakterisi genomunda bulunan PGI enzimini kodlayan genin amplifikasyonu için PCR cihazına tanımlanan döngü ayarları.....	38
Tablo 3.8.	Gen amplikonlarının restriksiyon endonükleazlar ile kesim reaksiyonu bileşenleri.....	39
Tablo 3.9.	pET-20b(+) ve pET-21a(+) plazmid DNA'ların kesim reaksiyonu bileşenleri.....	41
Tablo 3.10.	PCR ile amplifiye edilen genler ile plazmid DNA'ların ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	43
Tablo 3.11.	SDS-PAGE bileşenleri ve kullanılan miktarlar.....	48
Tablo 3.12.	2X örnek tamponu.....	49
Tablo 3.13.	SDS-PAGE jel boyama ve boyadan arındırma solüsyonlarının bileşenleri.....	49

KISALTMALAR

4GT	: 4- α -glukanotransferaz
A6PE	: Alluloz 6-fosfat 3-epimeraz
A6PP	: Alluloz 6-fosfat fosfataz
AC	: Aldol kondensasyonu
AFGP	: Antivirüs glikoprotein
AIDS	: Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu
ATP	: Adenozin trifosfat
α GP	: α -glukan fosforilaz
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CRC	: Kolorektal kanser
DAE	: D-alluloz 3-epimeraz
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTE	: D-tagatoz 3-epimeraz
DSMZ	: Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kùltürleri Koleksiyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
G1P	: Glikoz 1-fosfat
GI	: Glikoz izomeraz
GRAS	: Genel olarak güvenli olarak tanınan
HBV	: Hepatit B virüsü
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IA	: İzoamilaz
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
ISRS	: Uluslararası nadir şekerler derneğı

LD	: Ölümcül doz
LB	: Luria–Bertani
OD	: Optik yoğunluk
ORF	: Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Fotodiyot Dizi Dedektörü
PGI	: Fosfoglikoizomeraz
PGM	: Fosfoglikomutaz
PPGK	: Polifosfat glikokinaz
ppm	: Milyonda bir
RID	: Refraktif indeks dedektör
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SMB	: Simüle Edilmiş Hareketli Yatak
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetrametiletildiamin
UV	: Ultra viyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

SEMBOLLER

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	: Amonyum sülfat
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CoCl_2	: Kobalt (II) klorür
CuCl_2	: Bakır (II) klorür
FeCl_2	: Demir (II) klorür
FeSO_4	: Demir II sülfat
g	: Gram
H_2O	: Su
H_3BO_3	: Borik asit
HCl	: Hidroklorik asit
kcal	: Kilokalori
kg	: Kilogram
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
K_2HPO_4	: Dipotasyum hidrojen fosfat
L	: Litre
MgCl_2	: Magnezyum klorür
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
MnCl_2	: Mangan (II) klorür
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
Na_2MoO_4	: Sodyum molibdat
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	: Sodyum tiyosülfat
Na_2SO_3	: Sodyum sülfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NiCl_2	: Nikel (II) klorür
nm	: Nanometre
μL	: Mikrolitre
U	: Ünite
ZnCl_2	: Çinko klorür

1. GİRİŞ

Modern toplumlarda, insanların evde yemek hazırlamak için harcadıkları zamanı azaltmaya ve hazır işlenmiş gıda tüketimini artırmaya meyilli oldukları her geçen gün daha yaygın olarak gözlemlenmektedir. Tüketilen hazır gıdalarda, şeker ilavesi yalnızca işleme sırasında sağladığı olumlu özelliklerle değil, aynı zamanda önemli ölçüde enerji kaynağı olması açısından da önemlidir, ancak şekerin besinsel açıdan faydaları yok denecek kadar azdır (Campostrini ve ark., 2022).

Makrobesinler arasında sayılan ve toplam enerji alımının %40-80'ini sağlayan karbonhidratlar gıdalarda serbest ve serbest olmayan şeker formunda bulunabilmektedir. Meyve ve sebzelerin yapısında bulunan şeker, tahıllardaki nişastalı karbonhidratlar, süt ürünlerindeki laktoz, vb. serbest olmayan şekerler hücre yapısında doğal olarak bulunmaktadır. Bunun aksine, serbest şekerler doğal olarak bulunmamakta ve genellikle monosakkaritler (glikoz, fruktoz) ve disakkaritler olarak gıdalara eklenmektedir (Castro-Muñoz ve ark., 2022).

Monosakkaritler ve disakkaritler dışında, diyetle üçüncü bir karbonhidrat grubu olan polisakkaritler de kullanılmaktadır. Monosakkaritler, hidrolize olarak daha basit şekerlere ayrılamayan, glikoz, galaktoz ve fruktozdan oluşan gruptur. Monosakkaritler, disakkaritleri (glikoz ve fruktoz sakkarozu, galaktoz ve glikoz laktozu, glikoz ve glikoz maltozu) veya polisakkaritleri (nişasta) oluşturmak için birbirine bağlanmaktadır. Polisakkaritler karmaşık karbonhidratlardır ve sindirilmeleri daha uzun sürmektedir. Bu nedenle polisakkaritler kan şekeri seviyesinin yükselmesi üzerinde daha kademeli bir etkiye sahiptir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), toplam enerji alımının %50-75'inin karbonhidratlardan sağlanmasını önermektedir ve bunun esas olarak tam tahıllı gıdalardan ve meyve ve sebzelerden alınması gerektiğini vurgulamaktadır (Matthewman & Costa-Pinto, 2022).

Yüksek kiral saflıkları, sakkaritleri organik sentez işlemlerinde başlangıç malzemeleri olarak çekici kılmaktadır. Sakkaritler geleneksel olarak ince kimyasalların sentezinde kullanılmaktadır, ancak son araştırmalar bunların bazı toplu kimyasalların üretiminde de kullanılma potansiyelleri olduğunu göstermektedir. Örneğin, D-allulozun metanol içinde dehidrasyonu yoluyla furanik bileşikler üretmek için en etkili başlangıç materyali olduğu ve bu

dönüşümün D-fruktoz, L-sorboz veya D-tagatozun başlangıç materyali olarak kullanıldığı duruma göre daha yüksek verimle sonuçlandığı rapor edilmiştir (Drabo ve ark., 2023).

Fruktoz ve glikozun eşit oranda bir araya gelmesiyle oluşan sakkaroz insan diyetinde esastır, çünkü glikoz metabolizmasının adenozin trifosfat (ATP) üretmesi, farklı biyomoleküllerin sentezlenmesi ve daha da önemlisi hücresel solunum fonksiyonunun gerektiği gibi ilerlemesi için sakkaroz şarttır. Bunun yanında, fruktoz karbonhidrat ve lipid metabolizmasında bazı düzensizliklere neden olmaktadır. Yani, şeker insan diyetinde önemli bir enerji kaynağı olmasının yanında, metabolizmada istenmeyen durumları da tetikleyebilmektedir (Castro-Muñoz ve ark., 2022). Buna rağmen, 2022 yılında küresel şeker tüketimi 176 milyon tona ulaşmış ve bu değerin kişi başına günlük ortalama 0.068 kg şeker alımına eşdeğer olduğu anlaşılmıştır (Wang ve ark., 2024).

Aşırı şeker alımı, tip 2 diyabet ve obezite gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmekte ve insan sağlığı açısından ciddi sıkıntılara yol açmaktadır. Aspartam, asesülfam-K ve sukraloz gibi yapay tatlandırıcılar tatlılık kalitesi, yoğunluğu vb. özellikler açısından önemli ölçüde farklılık gösterebilir de aşırı enerji alımına neden olmadan tatlılık sağlamak için son 30 yıldır sakkaroz alternatifi olarak kullanılmaktadır (Tan ve ark., 2020; Wang ve ark., 2024). Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu yapay tatlandırıcıların kanser ve kardiyovasküler hastalık riskini artırabileceğini ve güvenliklerinin yeniden değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir. Alternatif olarak, yeni nesil daha güvenli şeker ikamelerinin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Wang ve ark., 2024).

Kilo kaybını kolaylaştırmak ve sağlıklı bir yaşam sürmek için uygulanması gereken en uygun diyetin nasıl olması gerektiği günümüzde hala tartışmalı bir konudur. Dünya çapında, obezite, hiperlipidemi, hipertansiyon ve diyabet dahil olmak üzere bazı hastalıkların görülme sıklığının ve yaygınlığının önemli ölçüde artması ile birlikte, vücut ağırlığının azaltılması için etkili ve güvenli bir diyetin belirlenmesi aciliyet arz etmektedir (Franchi ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Bu hastalıkların en önemli sebebinin aşırı şeker tüketimi ve yüksek yağlı diyetler olduğu düşünülmektedir (Li ve ark., 2021). Düşük yağ içerikli diyetler, çeşitli ulusal ve uluslararası toplumların diyet programlarının değişmez bir geleneği olmasına rağmen, günümüzde düşük karbonhidratlı diyetlere yönelik hızla artan bir ilgi vardır (Franchi ve ark., 2021).

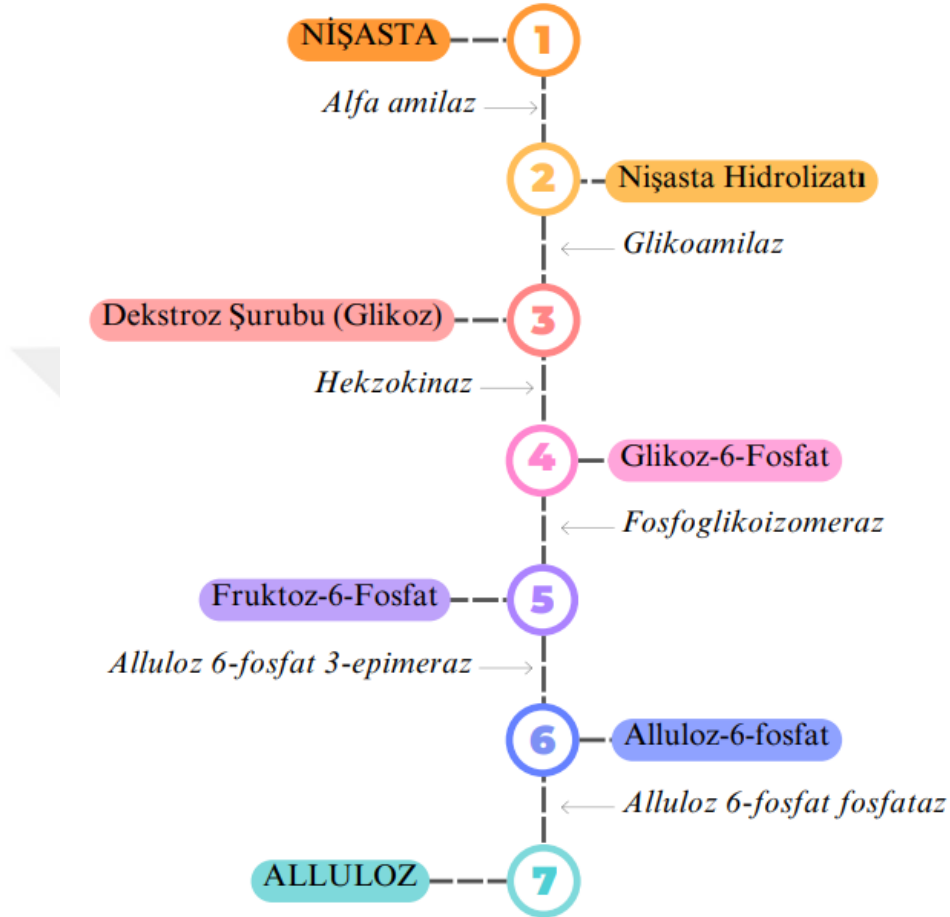
Düşük karbonhidratlı diyetlerde başlıca şeker ikameleri, nişastadan maltozun katalitik hidrojenasyonu ile elde edilen bir şeker alkolü olan maltitolün de dahil olduğu poliollerdir. Maltitol, diğer tatlandırıcılar arasında düşük kaloriye, düşük glisemik ve insülinemik indekse sahip olan ve şekeri azaltılmış çeşitli gıdalarda kullanılan karyojenik olmayan bir tatlandırıcıdır (Campostrini ve ark., 2022). Diğer bir yapay ve kalorisiz tatlandırıcı olan sukraloz vücutta parçalanmaz ve şekerden yaklaşık 600 kat daha tatlıdır. Sukraloz, farklı sıcaklık ve pH koşullarında stabildir, bu da onu birçok endüstriyel uygulama için en uygun seçenek haline getirmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar sukralozun sindirim süreçlerine etki ettiğine ve organizmadaki glikoz ve insülin seviyelerini artırarak kilo alımı ve diyabet riskini artırdığına işaret etmektedir (Castro-Muñoz ve ark., 2022).

Başka bir yaygın sentetik tatlandırıcı olan asesülfam-K, termostabil bir bileşen olarak bilinmektedir. Asesülfam-K şekerden 120 kat daha tatlıdır, ancak acı bir tada sahiptir ve bu nedenle yaygın olarak diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanılmaktadır. Asesülfam-K metabolize edilemediğinden kalori değeri sıfırdır. Bununla birlikte, asesülfam-K'nın parçalanma ürünü olan asetoasetamid, yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilmekte ve insan sağlığını tehdit edebilmektedir. Ayrıca, içerdiği metilen klorürden dolayı baş ağrısına, depresyona, mide bulantısına, zihinsel karışıklığa ve karaciğer ve böbrek hastalıklarına yol açabilmektedir (Krishnasamy, 2020).

Çeşitli sentetik tatlandırıcılar (aspartam, sakarin, sukraloz, vb.), insan sağlığıyla ilgili endişeler, daha düşük besin değerleri ve güvenli olmalarıyla ilgili tartışmalar nedeniyle popülerliklerini günden güne kaybetmektedir. Bunun tersine, doğal tatlandırıcılar, daha sağlıklı bir yaşam tarzı sağlamaları ve daha yüksek besin değerine sahip olmaları nedeniyle tüketiciler tarafından daha çok tercih edilmektedir (Castro-Muñoz ve ark., 2022). Bu konuda daha güncel bir yaklaşım ise standart şekerleri (sakkaroz, yüksek fruktozlu mısır şurubu, vb.) “nadir” ancak daha sağlıklı olduğu düşünülen şekerlerle değiştirmektir. Nadir şekerler meyve, sebze ve tahıllarda çok sınırlı miktarlarda bulunmakta, ancak sakkaroz ve fruktoz gibi yaygın şekerlerin dönüştürülmesiyle daha fazla miktarlarda üretilmektedir (Sclafani ve ark., 2023).

Bu çalışmanın amacı; nişastadan enzimatik dönüşüm yoluyla alluloz üretmektir (Şekil 1.1). Ucuz bir hammadde olan ve bol miktarda kolayca bulunabilen nişastanın, sağlıklı ve ekonomik değeri yüksek bir nadir şeker olan alluloza dönüşümü gerçekleştirilerek, hem ekonomiye katkı

hem de yaygın şekerler ve tatlandırıcılar yerine daha sağlıklı ve kalorisiz bir şeker olan allulozun kullanımının yaygınlaşmasının sağlanması, böylece olası sağlık sorunlarının önüne geçilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1.1. Nişastadan alluloz üretim prosesi

Bu kapsamda, öncelikle rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, istenen dönüşümleri sağlayacak olan enzimler üretilip saflaştırılmıştır. Nişastadan alluloz üretimi ise temel olarak 2 ayrı proses şeklinde gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, ticari enzim kullanılarak nişasta glikoza kadar parçalanmış, ikinci aşamada ise, rekombinant olarak üretilmiş olan enzimler aynı anda glikoz çözeltisiyle reaksiyona tabi tutularak alluloz oluşumu sağlanmıştır. Bu çalışmayla birlikte, alluloz üretiminde kullanılan ve dünyada ticari olarak üretimi ve satışı bulunmayan alluloz 6-fosfat 3-epimeraz ve alluloz 6-fosfat fosfataz enzimlerinin ülkemizde ilk kez üretimi gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, üretilen bu enzimlerin biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri detaylı bir şekilde belirlenmiştir. Böylelikle, enzimin verimliliğini ve fonksiyonelliğini artırmak için gerekli optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

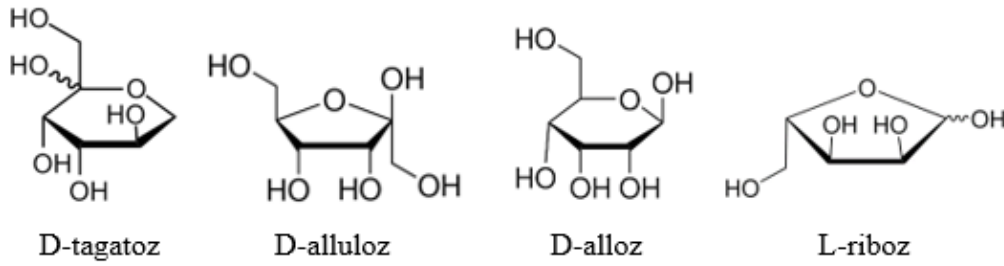
Nadir şekerler, doğada düşük miktarlarda bulunan çeşitli bir monosakkarit ve türevleri grubudur ve benzersiz özellikleri ve çeşitli endüstrilerdeki potansiyel uygulamaları nedeniyle önemli ilgi görmüştür. Düşük kalorili içerik, kan şekeri kontrolü, prebiyotik etkiler ve karyojenik olmayan faydalı özellikleri nedeniyle gıda, ilaç, tarım ve daha fazlasında umut verici uygulamalara sahiptirler. Bu kısımda nadir şeker, nadir şekerin üretimi, özellikleri ve uygulamaları incelenmiş, ayrıca endüstriyel önemleri ve sağlık yararları ele alınmıştır.

2.1. Nadir Şekerler

Monosakkaritler doğada çok çeşitli stereoizomer formlarında bulunabilmektedir. Doğal şekerlerin klasik örnekleri olan D-glikoz ve D-fruktoz gibi izomerler, bol miktarda bulundukları için istisnadır, fakat stereoizomerlerinin büyük çoğunluğunun doğal kaynaklardan izole edilmesi veya karmaşık yapıları nedeniyle kimyasal olarak sentezlenmesi zordur. Uluslararası Nadir Şekerler Derneği'nin (ISRS) tanımına göre, bu tür karbonhidratlar doğada düşük miktarda bulunan farklı monosakkaritler ve türevlerinden oluşan bir grubu temsil etmekte ve bu gruptaki şekerler nadir şekerler (rare sugars) olarak adlandırılmaktadır (Mijailovic ve ark., 2021). Bu şekerler (D-tagatoz, D-psikoz, D-alloz, L-riboz vb.) (Şekil 2.1) yenilebilir tatlandırıcı olarak kullanımının yanı sıra, düşük kalorili olma, kan şekeri kontrolü sağlama, bağırsak probiyotiklerinin gelişimini teşvik etme ve diş çürümelerini önleme gibi birçok faydalı özelliğe sahiptir (Han ve ark., 2022).

Nadir şekerler, gıda, yem, ilaç ve pestisit kontrolü gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarının yanı sıra sağlık faydaları nedeniyle de büyük ilgi görmektedir (Wang ve ark., 2023). Nadir şekerler ve bunların türevlerinin, glikozidaz inhibitörü ve güçlü kardiyak ilaç olarak kullanım potansiyelinin yanı sıra tatlandırıcı, hacim arttırıcı/kütle oluşturucu madde ve gıda katkı maddeleri gibi kullanım alanları da bulunmaktadır. Nadir şekerler antikanser, antimikrobiyal, antiviral, antidiyabetik, immünosüpresan ve nöroprotektif ilaç olarak kullanılmaktadır. Bazı nadir şekerler ise, hepatit B virüsüne (Hepatitis B virus-HBV) ve insan bağışıklık yetmezliği virüsüne (Human Immunodeficiency Virus- HIV) karşı antiviral aktivite için kullanılmaktadır. Ek olarak, bakteriyel yüzey glikanlarını içeren nadir L-heksozlar ve deoksi L-heksozlar, patojenler ve konakçı hücreler için spesifik tanınmaya sahiptir ve aşı geliştirme ve

immünoglikobiyoloji için potansiyel kimyasal problemler olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca taloz şekeri, antifriz glikoproteininde (Antifreeze glycoprotein-AFGP) yeniden kristalleşmeyi önleme (RI) aktivitesi sergilemekte ve enflamasyon ve kanserle ilişkili galaktoz bağlayıcı galektinlerin güçlü bir inhibitörü olarak bilinmektedir (Kumar ve ark., 2023). Ribuloz gibi nadir ketoz şekerler, anti-AIDS ilaçların sentezi ile birlikte tagatoz tip-II diabetes mellitus tedavisinde ve hepatik ensefalopati riskini azaltmak için doğrudan ilaç olarak kullanılabilir. Çoklu kiral bölgelere sahip hidroksil bileşikler olarak taloz, liksoz ve epilaktoz gibi nadir aldoz şekerler ise, birçok ilaçta, polimer sentezinde ve gıda endüstrisinde önemli hammadde veya bileşen olarak kullanılmaktadır (Gao ve ark., 2023).



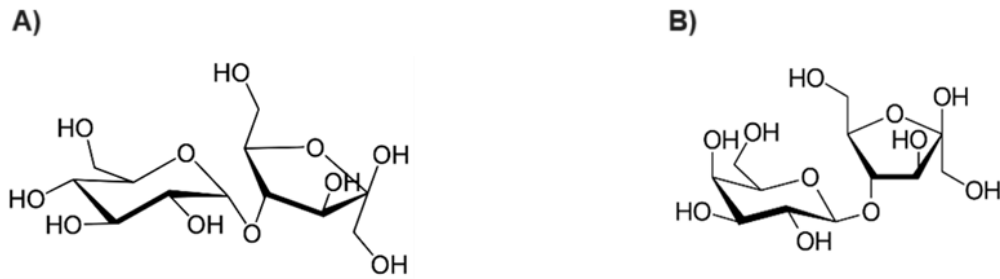
Şekil 2.1. Yaygın bilinen bazı nadir şeker moleküllerinin halka (Haworth) yapısı

Nadir şekerlerin takviye gıdalarda kullanımı amacıyla yapılan bir çalışmada, yumurta kabuğu içeren sulu galaktoz çözeltileri, nadir şeker içeren kalsiyum takviyeleri üretmek için kullanılmıştır. Yumurta kabuğu içeren sulu galaktoz çözeltileri 120 °C’de ısıtılarak ortamda oluşan nadir şeker miktarına bakılmıştır. Yumurta kabuğu içeren galaktoz çözeltilerinden yumurta kabuğu içermeyenlere kıyasla daha yüksek verimle nadir şeker üretimi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Reaksiyon sırasında yan ürün olarak organik asitler de oluşmuştur. Bu asitler, yumurta kabuklarının çözülmesiyle çözeltideki kalsiyum iyonu konsantrasyonu artışıyla nötralize edilmiştir. Kullanılan yumurta kabukları tekrar kullanılarak verim üzerindeki etkisi araştırılmış ve 3 kez kullanımda verim düşüşünün oldukça az olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan işlemler sonucunda, 295 mg/L kalsiyum iyonu içeren ve gıda takviyeleri için bileşen olarak kullanılma potansiyeline sahip sulu nadir şeker çözeltisi elde edilmiştir (Futamata ve ark., 2024).

Nadir şekerler, tarımda potansiyel kullanımları açısından da araştırılmıştır. Bazı nadir şekerlerin bitki büyümesini, bağışıklığını ve metabolizmasını etkilediği ve onları herbisitlerin,

bitki büyüme düzenleyicilerinin ve direnç indükleyicilerin gelişimi için potansiyel adaylar haline getirdiği tespit edilmiştir (Mijailovic ve ark., 2021).

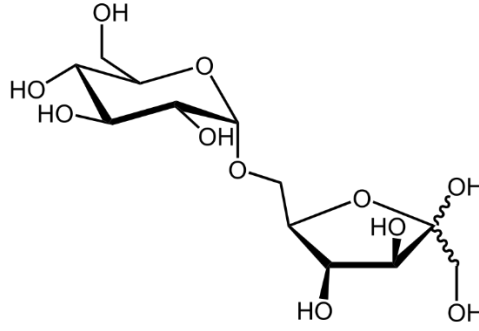
Farmasötiklerde ve fonksiyonel gıdalarda sıklıkla kullanılan maltuloz (maltozdan) ve laktuloz (laktozdan) (Şekil 2.2) gibi nadir oligosakkaritler genellikle aldoz-ketoz izomerizasyonu yoluyla sentezlenmektedir. Tipik olarak yüksek alkali ortamlarda gerçekleştirilen Lobry de Bruyn-van Ekenstein dönüşümü bu işlemin diğer adıdır.



Şekil 2.2. (A) Maltuloz ve (B) Laktuloz moleküllerinin halka (Haworth) yapısı

Nadir bir şeker olan izomaltuloz (Palatinose), sakkarozun daha yavaş sindirilen bir izomeridir (Şekil 2.3), çünkü glikoz ve fruktoz bileşenleri, sakkarozdaki α -1,2 bağlarına kıyasla hidrolize daha dirençli olan α -1,6 bağlarıyla bağlanmıştır. Ağızda hidrolize uğramadığı için karyojenik değildir. İzomaltuloz sakkarozla benzer bir tat profiline sahiptir, ancak sakkarozun tatlılık derecesinin yarısı kadar tatlılık vermektedir. Tatlılıktaki eksikliği telafi etmek için izomaltulozun gıda ürünlerinde başka bir tatlandırıcı ile desteklenerek kullanılması önerilmektedir. İzomaltuloz sakkarozla eşit kalorili (4 kcal/g) olmasına rağmen, daha yavaş sindirilmesi, kan şekeri ve insülin seviyelerini daha yavaş yükseltmesi ve potansiyel olarak daha fazla tokluk vermesi sebebiyle daha sağlıklı bir seçenek olarak kabul edilmektedir (Sclafani ve ark., 2023).

Bazı değerli nadir şekerler, hemiselüloz hidroliz sistemlerinin günümüzdeki ve gelecekteki lignoselülozik biyorafinerilere entegrasyonu için temel ekonomik güçler olarak kabul edilmektedir (Fernández Méndez ve ark., 2023).



Şekil 2.3. İzomaltuloz molekülünün halka (Haworth) yapısı

Duyusal özellikleri açısından, nadir şekerler, Rebaudioside A gibi doğal alternatif tatlandırıcıların tatlılık profilini iyileştirmek için de kullanım potansiyeline sahiptir. Rebaudioside A'nın nadir şekerlerle glikozilasyonu, acılık, burukluk ve ağızda kalan hoş olmayan tatları azaltarak genel duyusal özellikleri iyileştirebilmektedir (Jung ve ark., 2021).

Nadir şekerler sakkarozaya yakın bir tatlılık seviyesi sağlayabilir, ancak önemli ölçüde daha düşük kaloriye sahiptir (Dai ve ark., 2021). Nadir şekerlerden tagatoz, özellikle ısıtma işlemi görmüş süt bazlı ürünlerde bulunur ve sakkarozaya göre %90 nispi tatlılığa sahiptir (Moss ve ark., 2022).

D-tagatoz D-galaktozun yapısal bir izomeri olarak bilinmektedir. Düşük kalorili D-tagatozun kilo vermeye yardımcı olduğu, antiobezite özellik gösterdiği, prebiyotik olduğu ve düşük glikemik etki gösterdiği bildirilmiştir (Rai ve ark., 2023). Tagatoz 1.5 kcal/g enerji sağlarken, alluloz 0.4 kcal/g enerji sağlamaktadır. Her ikisinin de ihmal edilebilir bir glikemik etkisi vardır. Bazı çalışmalarda bu sakkaroz ikameleri, şeker alkolleri gibi diğer seçeneklere göre yüksek gastrik tolerans seviyeleri göstermiştir. Yemekle birlikte, yaklaşık 0.55 g/kgV/doz veya yaklaşık 30 g tüketen bireylerin hiçbirinde gözlemlenebilir olumsuz etki oluşmamıştır (Moss ve ark., 2022).

Tatlandırıcı olarak bal, maltitol ve bu ikisinin karışımı kullanılarak şekerleme üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, kullanılan tatlandırıcılara ilişkin olarak, bal ve maltitol kombinasyonunun kullanıldığı tatlandırıcı kombinasyonlarında, diğer kombinasyonlara kıyasla daha yüksek duyusal kabul ve stabilite sağlandığı; ayrıca bu tatlandırıcılar arasında bir sinerjik bir etkileşim olduğu gözlemlenmiştir. Üretilen bu şekerlemelerin tüketiciler için sağlıklı bir alternatif olabileceği ve rafine şekerlerin diğer alternatif tatlandırıcılarla değiştirildiği doğal

ürünlere yönelik artan talebe yanıt verebileceği düşünülmektedir (Campostrini ve ark., 2022). Maltitol, yaygın olarak şeker ikamesi olarak kullanılan bir şeker alkol (poliol)'dür. Sakkarozla kıyasla daha düşük glisemik indekse sahiptir ve kan glikoz seviyelerinde hızlı bir artışa neden olmaz. Bununla birlikte, maltitol ince bağırsakta kısmen emilir ve büyük miktarlarda tüketildiğinde laksatif etki gösterebilir (Nishimoto ve ark., 2022).

Duyusal özellikler açısından, allulozun sakkarozla benzer bir tada ve işlevselliğe sahip olduğu, maltitolün ise biraz farklı bir tat profiline sahip olabileceği ve ağızda soğuma hissine neden olabileceği bildirilmiştir (Jung ve ark., 2021).

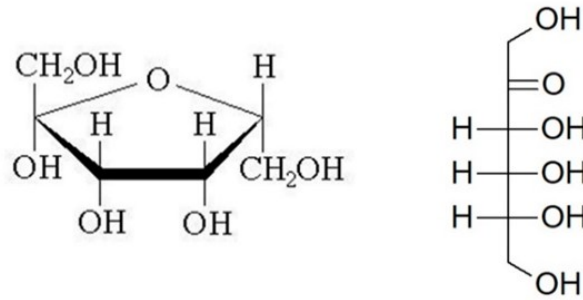
Doğada 50'den fazla nadir şeker türü vardır. D-alluloz, fizyolojik ve besleyici işlevlerine ek olarak obez bireylerde kilo verme gibi biyolojik işlevleri nedeniyle nadir şekerlerin ilginç bir örneğidir (Wang ve ark., 2023).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda makroalglerin de nadir şeker kaynağı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Nadir şekerler makroalglerde çoğunlukla polisakkaritler şeklinde bulunur. Makroalg bazlı polisakkaritler, kara bitkilerinin polisakkaritlerinden farklı olarak, sıcak suda çözünürler ve içlerinde sülfat ve/veya karboksilik asit gibi anyonik fonksiyonel grupların yüksek içeriği nedeniyle belirli bir viskozite ile kolloid bir durum oluşturabilirler. Bu özelliğinden dolayı makroalglerden elde edilen polisakkaritler hidrokolloidler veya fikokolloidler olarak da adlandırılır. Makroalglerde bulunan nadir şekerlerinin makroalg türlerine bağlı olarak farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır (Bayu ve ark., 2021).

2.1.1. Alluloz

Gıda katkı maddesi veya fonksiyonel gıda olarak kullanılabilen D-Alluloz (D-psicose, D-ribo-2-hexulose) (Şekil 2.4), düşük kalorili, önemli bir fonksiyonel nadir şekerdir ve fruktozun C-3 pozisyonunda epimerizasyon ürünüdür. Doğal ve ticari kaynaklarda doğal olarak bulunan allulozun tatlılığı glikoza eşdeğer iken sakkarozun %70'i kadardır (Li ve ark., 2021; Sa ve ark., 2022; Yermek ve ark., 2022). Bununla birlikte, sakkarozun kalorisinin sadece %10'u kadar kaloriye sahiptir ve yüksek fruktozlu mısır şurubu için ideal bir ikame olarak kabul edilir (Li ve ark., 2021; Sa ve ark., 2022). Ayrıca Maillard reaksiyonu sonrasında iyi bir aroma oluşumu

sağlaması sebebiyle sakkaroz için de ideal bir ikame olarak kabul edilmektedir (Chen ve ark., 2022a). Bunun yanında, yüksek çözünürlüğe, net bir tada, pürüzsüz bir dokuya, arzu edilen ağız hissine ve düşük glisemik indekse sahiptir. Jelleşme özelliğini ve lezzeti iyileştirmenin yanı sıra, yumurta akı proteinlerinin köpürme özelliklerini ve tereyağlı kurabiyelerin kalitesini de iyileştirmektedir (Sa ve ark., 2022). Son yıllarda muffin, sosis ve kurabiye gibi ürünlerde nadir şekerlerin kullanım sıklığı fark edilir düzeyde artmıştır (Moss ve ark., 2022).



Şekil 2.4. D-Alluloz (D-Psikoz) molekülünün halka (Haworth) ve Fischer yapıları (Parıld, 2019)

D-allulozun güvenliği, sıçanlarda akut toksisite, 90 günlük subkronik toksisite ve kronik toksisite çalışmalarının yanı sıra mutajenite ve genotoksisite çalışmaları ile kanıtlanmıştır (Sa ve ark., 2022). D-Alluloz ayrıca, bir dizi gıdada ve dondurma, çikolata ve sos gibi diyet takviyelerinde gıda katkı maddesi olarak izin almış ve böylece son derece umut verici bir pazar potansiyeline sahip olmaya başlamıştır. Gıda katkı maddelerine ek olarak, D-alluloz ayrıca antihiperlipidemik, antihiperglisemik, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkiler, reaktif oksijen türleri (ROS) temizleme aktivitesi ve ateroskleroza karşı terapötik etkiler gibi belirgin fizikokimyasal özelliklere ve fizyolojik işlevlere sahiptir. Ayrıca, bu nadir şeker, jel gücünü artırmakta, oksidasyon derecesini azaltmakta ve gıda işleme sırasında tadı iyileştirmede yüksek performans sergilemektedir (Li ve ark., 2021). D-alluloz buğday, çay bitkisi, incir, kuru üzüm, esmer şeker ve bazı bakterilerde az miktarda bulunur (Chen ve ark., 2022b; Moss ve ark., 2022). Ayrıca işlenmiş şeker kamışında ve pancar pekmezinde de bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, D-alluloz *Itea* bitkisi, meyve suyu, baharat sosları ve diğer gıda maddelerinde doğal olarak bulunabilir. Ayrıca ticari karbonhidratlarda veya tarım ürünlerinde de çok düşük seviyelerde bulunabilmektedir. Gıdalarda bulunan D-alluloz seviyesi 0.5 mg/100 g (kahve) ile 130.6 mg/100 g (Worcester sosu) arasında değişmektedir (Sa ve ark., 2022).

Fizyolojik olarak allulozun %70-80'i diğerk şekerlerle aynı biyolojik yoldan bağırsaklarda emilir. Diğerk şekerler ile tüketildiğinde genel glisemik yükü düşürürken, daha yüksek kalorili, daha yüksek glisemik indeksli şekerlerin emilimini de azaltır (Moss ve ark., 2022).

2.1.1.1. Alluloz kaynakları

Nadir bir ketoheksoz olan D-Alluloz, D-fruktozun bir epimeridir. Doğada fruktozu veya diğerk ketoheksozları alluloza dönüştüren epimerazlar tarafından üretilir, ancak aynı zamanda ısı ve pH'nın etkili olduğu kimyasal dönüşüm yoluyla fruktozdan da üretilir. Bu nedenle ısıtım işlemi görmüş ürünlerde, özellikle de yüksek konsantrasyonlarda fruktoz veya sakkaroz içeren ürünlerde allulozun tespit edilebilir miktarlarda bulunması şaşırtıcı değildir. Bu şekerlerden daha büyük miktarlarda içeren gıda ürünlerinin ısıtım işleminin, alluloz için model protein β -laktoglobulin ile kanıtlanmış olan Maillard ürünlerini oluşturmada da olağandır. Geleneksel gıda ürünlerinde (alluloz eklenmemiş) alluloz içeriği analizine dayanarak, Japonya'da ortalama günlük alluloz alımı (kahvaltı, öğle ve akşam yemeği), soda içecekleri ve bazı meyve suları da dahil, 206 mg/gün olarak tahmin edilmektedir. En yüksek miktarda allulozun karamel ve Worcester sosunda, esmer şekerde, ketçapta, kolada ve bazı kurutulmuş ve konserve meyvelerde bulunduğu tespit edilmiştir (Daniel ve ark., 2022).

2.1.1.2. Alluloz üretimi

D-allulozun üretim verimliliğini artırmak amacıyla çeşitli yöntemler uygulanmaktadır; ancak, bu yöntemler genellikle yüksek maliyetler ve karmaşık süreçler içermektedir. Kimyasal sentez yöntemlerinin büyük ölçekli üretim için pratik olmaması nedeniyle, biyosentez yaklaşımları endüstriyel üretim için daha uygun ve tercih edilebilir hale gelmektedir. İzumoring stratejisi gibi biyosentez yöntemleri, nadir şekerlerin üretiminde önemli avantajlar sunarken, bu stratejiler de belirli sınırlamalar ve maliyet faktörleri içermektedir. Günümüzde, düşük maliyetli ve yüksek verimli biyoproses yöntemleri geliştirilerek D-alluloz üretiminin ekonomik olarak sürdürülebilir hale getirilmesi hedeflenmektedir.

Fruktozun D-alluloza dönüşümü reaksiyonunda ölçülen Gibbs enerji değişimi değeri ~ 0.1 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Bu ölçümle, gerçek dönüşüm değerinin %40'tan düşük olmasına rağmen fruktozun yaklaşık %50'sinin D-alluloza dönüştürülebileceği anlaşılmıştır.

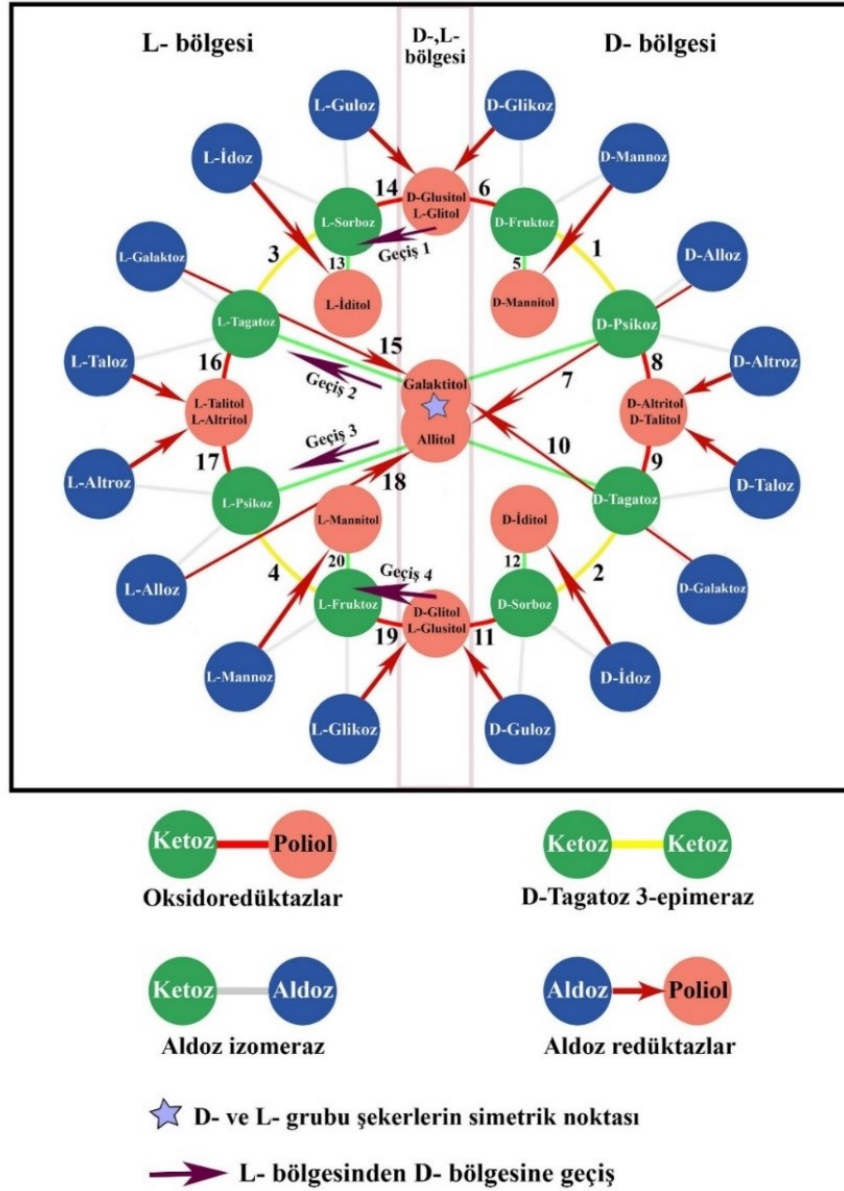
Fruktozun D-alluloza dönüşümünü iyileştirmek için, borat ilavesi ve simüle edilmiş hareketli yatak kromatografisi (SMB) ile ayırma gibi çeşitli yaklaşımlar uygulanmıştır. Bununla birlikte, bu işlemler, karmaşık ürün ayırma prosesleri ve aşırı ekipman yatırımı gibi masrafları beraberinde getirdiğinden D-allulozun üretim maliyetinin yükselmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, D-alluloz üretimi için yüksek verimli ve düşük maliyetli bir biyo-üretim yöntemi geliştirmek her geçen gün büyük bir önem kazanmaktadır (Li ve ark., 2021).

D-allulozun kimyasal sentezi, reaksiyonun karmaşıklığı, operasyonel zorluklar ve ekolojik dengenin tehlikeye girmesi nedeniyle büyük ölçekli üretim için pratik bulunmamaktadır (Chen ve ark., 2024). Buna karşılık, D-allulozun biyosentez yolu, daha uygun sentez koşulları, daha yüksek verimlilik ve sürekli üretim olanağı dahil olmak üzere çeşitli avantajlar sunmakta ve endüstriyel üretim için daha tercih edilebilir bir hale getirmektedir. D-allulozun, Izumoring stratejisi, fosforilasyon-defosforilasyon kaskad reaksiyonu ve aldol kondensasyonu (AC) yolu olmak üzere üç temel biyosentez yöntemi vardır (Chen ve ark., 2024).

Izumoring stratejisi (Şekil 2.5), çeşitli nadir şekerleri üretmek için geliştirilmiş yenilikçi bir yaklaşımdır. D-fruktoz gibi yaygın şekerlerin çok çeşitli nadir şekerlere dönüştürülmesini içermektedir (Morimoto ve ark., 2022). Bu stratejinin amacı, bilinen tüm nadir şekerlerin tek bir strateji ile üretilmesini sağlamaktır. D-fruktozun D-alluloza dönüşümünü katalize etmek için izomeraz kullanan Izumoring stratejisi, endüstriyel üretimde yaygın olarak kullanılmış ve D-alluloz üretiminde ana yöntem haline gelmiştir. Bununla birlikte, burada uygulanan izomeraz reaksiyonu, tipik olarak 40 ila 80 °C arasında yüksek sıcaklıklar gerektirmektedir. Bu stratejiye göre dönüşüm reaksiyonları tersinirdir, fakat termodinamik denge ile sınırlıdır (Chen ve ark., 2024). Izumoring stratejisi sayesinde, belirli nadir şekerlerin üretimi için çeşitli prosedürler geliştirilmiştir. Bu strateji kullanılarak başarıyla üretilen nadir şekerlerden bazıları D-alluloz (D-psikoz), D-alloz, L-galaktoz, L-taloz, L-tagatoz, D-altroz ve L-mannozdur. Bu nadir şekerler farklı yapı ve özelliklere sahiptir ve Izumoring stratejisi ile üretilmeleri çeşitli uygulamalarda kullanılmaları için fırsatlar sunmaktadır (Morimoto ve ark., 2022).

D-Alluloz, önceki yıllarda karmaşık saflaştırma işlemleri gerektiren, kimyasal atıkların ve yan ürünlerin biriktiği kimyasal yöntemlerle sentezlenmesine rağmen, son yıllarda, Izumoring izomerizasyon stratejisine dayalı olarak, “şeker 3-epimeraz” ile fruktozdan üretilmeye başlanmıştır. D-allulozun mevcut ticari üretimi, fruktozun D-alluloz 3-epimeraz tarafından

epimerizasyonu ile gerçekleştirilir. Bu dönüşüm sırasında oluşan doğal reaksiyon dengesi nedeniyle, bu yöntem, düşük dönüşüm verimi (%40'ın altında) ve dolayısıyla yüksek üretim maliyetleriyle sonuçlanmıştır (Li ve ark., 2021).



Şekil 2.5. İzumoring stratejisi (Parıld, 2019)

Allulozun en yaygın endüstriyel üretimi, “D-alluloz 3-epimeraz (DAE)” veya “D-tagatoz 3-epimeraz (DTE)” kullanılarak, D-fruktozu C3 pozisyonunda tersine çevrilebilir şekilde epimerize eden enzimatik İzumoring yoluyla gerçekleştirilmektedir. İzumoring’in en büyük dezavantajı, dengede sadece %30’a ulaşan D-fruktozun D-alluloza düşük dönüşüm oranıdır.

D-allulozun reaksiyon sisteminden sürekli olarak alınması, dönüşüm verimliliğini artırabilir, ancak izomer ayırmanın Izumoring epimerizasyonu ile birleştirilmesinin üretim maliyetini artıracığı kesindir (Guo ve ark., 2022).

Kolay bulunabilen ucuz hammaddelerden ve bazı gıda atıklarından da alluloz üretilmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada, ucuz mısır artıklarından yüksek değerli bir nadir şeker olan D-allulozun yüksek saflıkta üretilmesi için bir strateji geliştirilmiştir. Ksilan hidroliz ürünlerinin D-alluloz üretimi üzerindeki olumsuz etkisini ortadan kaldırmak için ksilanı mısır sapından tamamen uzaklaştırmak üzere NH_4Cl kullanılmıştır. Mısır sapının $160\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1 saat boyunca işlenmesi için 0.6 M NH_4Cl kullanılmış ve ksilanın %97.2'sinin uzaklaştığı görülmüştür. Ön işlemden sonra, mısır artığındaki selülozun %92'si glikoza dönüştürülmüş ve glikozun %17.9'u D-Tagatoz 3-epimeraz ve D-glikoz izomeraz tarafından D-alluloza dönüştürülmüştür. MCK-35 kalsiyum iyon reçinesi ile ayırma ve saflaştırma işleminin ardından dondurarak kurutma işleminden sonra, elde edilen katı D-allulozun %99.4 saflık oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, D-alluloz üretimi için düşük maliyetli ve uygun fiyatlı bir kaynak oluştururken, aynı zamanda lignoselülozik biyokütlenin yüksek değerli ürünlere dönüştürülebileceğini de göstermiştir (Xin & Ran, 2024).

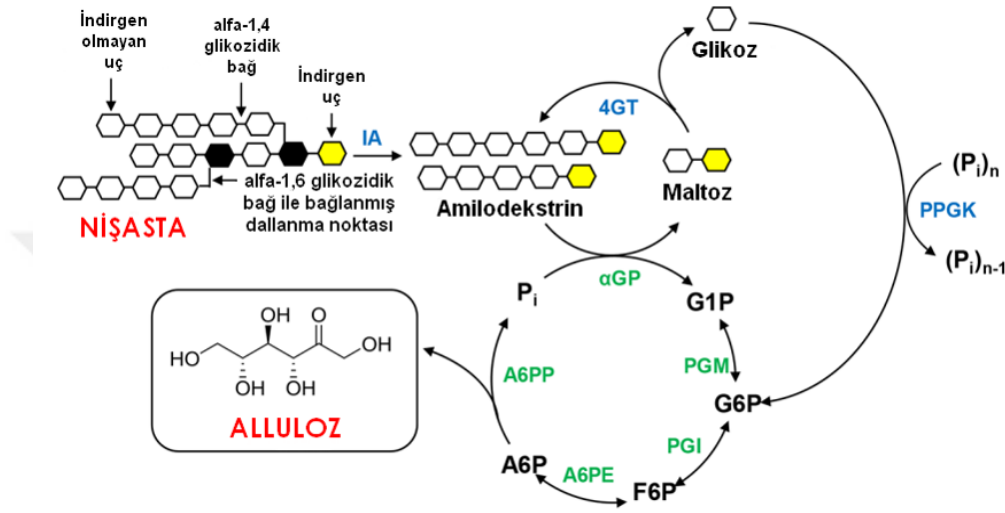
Son zamanlarda, *in vitro* sentetik enzimatik biyosistemler kullanılarak birçok katma değerli kimyasalın termodinamik odaklı üretimi yüksek verimle gerçekleştirilmiştir. Bu biyosistemlerde, nişasta ve selüloz gibi ucuz oligosakkaritler, glukon fosforilaz aracılığıyla glikoz 1-fosfat (G1P) üretmek (fosforilasyon) için substrat olarak kullanılmıştır. Bu işlemi, şeker-fosfatın izomerizasyon ve epimerizasyon vb. yoluyla dönüşümü takip etmektedir. Bu biyosistemlerin son aşaması, geri dönüşü olmayan defosforilasyon reaksiyonudur ve nihai ürünün teorik olarak verimi %100'e yakın olabilmektedir. Bir *in vitro* sentetik enzimatik biyosistem oluşturmaya yönelik bu strateji, Izumoring stratejisine dayalı olarak, D-alluloz sentezinin düşük dönüşüm verimini artırmak için umut verici bir yaklaşım sağlamaktadır (Li ve ark., 2021). Buna örnek olabilecek bir çalışmada, *in vivo* fosforilasyon-defosforilasyon yoluyla D-fruktozdan D-alluloz üretmek için bir proses tasarlanmıştır. Çalışmada, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yoluna bir ATP rejenerasyon sisteminin eklenmesi ve karbon akışının bloke edilmesi fermentasyon performansını net bir şekilde iyileştirmiş ve verimi artırmıştır (Guo ve ark., 2022).

Birden fazla enzim kombinasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde, bir önceki reaksiyon aşamasından gelen ürünün bir sonraki aşama için substrat olarak kullanılması sağlanır, bu da ara ürünlerin izolasyon vb. işlemlerden geçmesine gerek kalmadan son ürünün elde edilmesini sağlar. Bununla birlikte, enzimlerin her birinin kendine has bazı özelliklerinden dolayı, her enzim farklı optimal reaksiyon koşullarına sahiptir. Her enzimatik reaksiyonda meydana gelecek olan termodinamik denge düşünülerek, yüksek üretkenliğe ulaşmak için çoklu enzim bileşiminin yoğun optimizasyonunun yanı sıra kullanılan enzimler arasında da belirli bir uyum olmalıdır. Kinetik analiz ve modelleme, bu tür reaksiyonlarda süreç kontrolü için kesin tahminler sağlayabilir. Protein-protein etkileşimi, ürün ile substrat arasındaki ve ayrıca enzimler arasındaki rekabet vb. çoklu enzim biyotransformasyonunun anahtar faktörleri, enzim karışımının performansını önemli ölçüde etkiler. Bu nedenle, çok enzimli bir sistemde kinetik modellemeye dayalı süreç optimizasyonu önemlidir (Chen ve ark., 2022a).

Yapılan bir çalışmada, düşük maliyetli nişastadan, termodinamik güdümlü D-alluloz üretimi için fosforilasyon-defosforilasyon enzimatik kademeli dönüşüm yollarına dayalı bir *in vitro* sentetik enzimatik biyosistem tasarlanmıştır. Bu biyosistem, α -glukan fosforilaz (α GP), fosfoglikomutaz (PGM), fosfoglikoz izomeraz (PGI), D-alluloz 6-fosfat 3-epimeraz (A6PE) ve D-alluloz 6-fosfat fosfataz (A6PP) olmak üzere beş ana enzim ve izoamilaz (IA), 4- α -glukanotransferaz (4GT), polifosfat glikokinaz (PPGK) ve glikoz izomeraz (GI) olmak üzere dört yardımcı enzim içermektedir (Şekil 2.6). Reaksiyon koşulları optimize edildikten sonra, 10 g/L nişastadan %88.2 verimle D-alluloz üretilmiştir. Endüstriyel ölçekte D-alluloz üretimi için bu *in vitro* sentetik enzimatik biyosistemin potansiyel kullanımını araştırmak için, 50 g/L nişastadan (275 mM glikoz eşdeğeri) %79.2 ürün verimi ile D-alluloz sentezlenmiştir. Bu sonuçlar, D-allulozun ürün maliyetinin bu strateji ile önemli ölçüde azaltılabileceğini göstermiştir. D-alluloza ek olarak, bu termodinamik odaklı stratejinin, diğer birçok nadir şekerin (tagatoz, mannitol ve sorbitol) endüstriyel ölçekte ve uygun maliyetli bir şekilde üretimi için umut verici bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Li ve ark., 2021).

Diğer bir çalışmada, D-glikoz izomerizasyonu ve D-fruktoz epimerizasyonu reaksiyonlarının kombinasyonu ile D-glikozdan D-alluloz üretmek için tek kapta çift enzimli bir proses yürütülmüştür. Reaksiyon durumu optimizasyonu için Michaelis-Menten denklemine dayalı bir kinetik model oluşturulmuştur. Bu işlem için, D-glikoz izomeraz (GI) ve D-alluloz 3-epimeraz (DAE) enzimlerinin kombinasyonu kullanılmıştır. Kullanılan enzim miktarlarının artırılması

ve Gl'ye karşı DAE'nin molar oranları, D-alluloz veriminin %4'ten %9'a yükselmesini sağlamış ve D-fruktoz üretim hızının, daha verimli bir nadir şeker dönüşümü için temel bir faktör olduğu görülmüştür. 100 g/L ve 200 g/L substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için gereken optimum enzim miktarları, 60 U ve 200 U olarak belirlenmiştir (Chen ve ark., 2022b).



Şekil 2.6. Enzimatik biyosistem ile nişastadan alluloz üretim yolağı (Li ve ark., 2021)

D-Allulozun, yılda milyonlarca ton tüketilen diğer tatlandırıcılar gibi, yakın gelecekte büyük ölçekli üretim için rekabetçi hale geleceği öngörülmektedir. Halihazırda, D-allulozun üretimini ve fiyatını kısıtlayan faktörler, başlangıç malzemelerinin yüksek fiyatı, düşük verim ve izolasyon zorluğudur (Chen ve ark., 2022b). Alluloz pazar büyüklüğünün 2022 yılında 207.28 milyon ABD doları değerinde olduğu, 2030 yılına kadar 607.08 milyon ABD dolarına ulaşacağı ve 2024'ten 2030'a kadar %12.20'lik bir bileşik büyüme oranı ile büyüyeceği tahmin edilmektedir (Gonsalves, 2024).

2.1.1.3. Yasal düzenlemeler

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), beslenme etiketinde yaptığı birkaç önemli güncellemeye göre, önceden “Toplam ve İlave Şekerler” olarak tek başlık altında verilen şeker miktarı bilgisinin değiştirilmesine ve “İlave Şekerler” bilgisinin “Toplam Şekerler”in bir alt kümesi şeklinde ayrı olarak verilmesine karar vermiştir. FDA’ya göre “İlave Şekerler” gıdaların işlenmesi sırasında eklenen veya doğrudan paketlenen şekerleri (örneğin sofr şeker) temsil etmekte ve ayrıca

şuruplardan ve baldan elde edilen şekerleri ve meyve veya sebzeden elde edilen konsantre şekerleri içermektedir. Bununla birlikte, allulozun glisemik tepkileri çok fazla etkilememesi, 4 kcal/g'dan çok daha az kaloriye sahip olması ve diğer şekerler gibi diş çürümesi gibi olumsuzluklara sebep olmaması nedeniyle FDA allulozun “Toplam Şekerler” ve “İlave Şekerler” grubuna dahil edilmemesi konusunda kendi takdir yetkisini kullanmıştır (FDA, 2019).

D-alluloz, 2011 yılında FDA tarafından güvenli (GRAS) olarak kabul edilmiştir (GRN No. 400, 498, 693 ve 755) (Chen ve ark., 2022a; Li ve ark., 2021). FDA, 2019 yılında alluloz için yeni bir kılavuz taslağı yayınlamış ve kimyasal olarak “şeker” grubunda olan bu tatlandırıcının “Besin Değerleri” tablosundaki “Toplam veya İlave Şekerler” kısmından kaldırılmasına izin vermiştir. Nisan 2019’da yayınlanan taslak kılavuzda FDA, düşük kalorili bir tatlandırıcı olan allulozun, Ocak 2020’de yürürlüğe giren yeni “Besin Değerleri” tablosundaki “Toplam veya İlave Şekerler” kısmına dahil edilmesine gerek olmadığını duyurmuş, böylece bir tatlandırıcı ilk kez bu maddeden muaf tutulmuştur (FDA, 2019; Kaiserman, 2019). Allulozun etiketlerde ilave şeker olarak yer almasının özellikle diyabetli tüketiciler için kafa karıştırıcı olması, vücut tarafından bir enerji kaynağı olarak kullanılmamasına rağmen diğer şekerlerle aynı grupta etiketlenmenin de tüketiciler için yanıltıcı bir bilgi olması gibi sebepler de bu uygulamayı desteklemiştir (Kaiserman, 2019).

Allulozun LD50 değeri 15.9-16.3 g/kg iken bu değer fruktoz için 14.7 g/kg, eritritol için 15.3 g/kg’dır. Fruktoz ve eritritolden yüksek olan bu değer, sofr tuzundan (3.0 g/kg) çok daha yüksektir. Alluloz, bu LD50 değeriyle (15 g/kg ve üzeri), Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nun toksisite derecelendirme kriterlerine göre “nispeten zararsız” (en düşük toksisiteye sahip madde) kategorisinde yer almaktadır. Bu nedenle allulozun yiyecek veya içeceklerde kullanımının sağlık açısından bir tehlike oluşturmadığı bildirilmiştir (Fahey, 2011).

2.1.1.4. Alluloz ve sağlık

Rafine şeker, sağlıklı beslenme ve diyetle ilgili bulaşıcı olmayan hastalıkların ortaya çıkmasında baskın bir role sahiptir. Aşırı kilo ve obezite gibi hastalıkların yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabet, kas ve iskelet sistemi rahatsızlıkları (özellikle osteoartrit) ve farklı kanser türleri gibi diğer hastalıkların da ortaya çıkmasına ve gelişimine sebep olmaktadır (Campostrini ve ark., 2022).

Bu tür sağlık sorunlarına ilişkin, WHO, diyetle bağlı kronik hastalıkların yaygınlığını azaltmak için şeker tüketiminin azaltılmasını önermektedir. Bu konuda WHO, serbest şekerlerin toplam enerji alımının %10'undan az olması gerektiğini belirtmektedir (WHO, 2015). Bununla birlikte, şekerin işlenmiş gıdalarda renk, hacim, doku, lezzet ve koruma sağlama gibi birçok işlevi vardır. İşlenmiş gıdaların şeker içeriğinin azaltılması düşük kaliteli bir tekstür ve tada yol açabileceğinden, bir ürünün şeker içeriğini azaltmanın tüketici tercihleri açısından önemli bir sorun olma potansiyeli yüksektir ve yukarıda sayılan işlevlerden bazıları için alternatif bir bileşen bulmak çok kolay değildir (Campostrini ve ark., 2022; Tan ve ark., 2020; Yeung ve ark., 2017). Dolayısıyla, gıda ürününden şeker çıkarılıp yerine başka bir bileşen eklenmediğinde, kalan bileşenler 100 g bazında konsantre olacaktır. Tüketiciler, orijinal ürünle karşılaştırıldığında yeniden formüle edilmiş üründen muhtemelen benzer bir ağırlıkta tüketecekleri için, bileşenlerin besin alımı üzerindeki konsantrasyon değışikliğı etkileri incelenmelidir. Bu nedenle, birçok gıda geliştirme endüstrisi, WHO tarafından önerilen yüzdelerde şeker miktarını azaltmanın çok gerçekçi olmadığını, hatta imkansız olduğunu savunmaktadır (Yeung ve ark., 2017).

Doğal şekerin yüksek oranda alınmasının dezavantajlarına ilişkin farkındalığın artması nedeniyle, çeşitli şeker alternatifleri popülerlik kazanmıştır. Diğer şeker alternatifleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek fiyat aralığına rağmen alluloz, sağlık bilincine sahip tüketiciler arasında popülerlik kazanmaya devam etmektedir (Nair, 2020).

Yapılan bazı çalışmalarda, D-allulozun bir dizi biyolojik metabolik aktiviteye katıldığı görölmüştür. Kan şekerini düşürdüğü ve reaktif oksijen türlerini güçlü bir şekilde ortamdan uzaklaştırabildiğı tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2022b).

Alluloz, kemirgenlerde, bağırsaktaki sindirim enzimlerini ve yağ asidi sentezi ile ilgili enzimleri inhibe etmekte ve böylece enerji tüketimini artırarak hem D-glikoz emilimini, hem de yağ birikimini azaltmaktadır (Hossain ve ark., 2015; Yermek ve ark., 2022). İnsanlarda ise tokluk kan şekeri seviyesini önemli ölçüde ve güvenli bir şekilde azalttığı görölmüştür (Hayashi ve ark., 2010). Bu nedenle, alluloz rahatlıkla anti diyabetik olarak kabul edilebilecek bir nadir şekerdir (Yermek ve ark., 2022). D-Alluloz, antiobezite, antihiperglisemik, antiinflamatuvar, antioksidan, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkilerin yanında, yağ birikimini azaltma ve kan

şekerini düzenleme gibi birçok fizyolojik etkiye de sahiptir (Chen ve ark., 2022a; Guo ve ark., 2024; Wang ve ark., 2024).

Endojen biyoaktif bir monosakkarit olan alluloz, canlı organizmalarda çok sayıda bileşiğin ve metabolik süreçlerin sentezi için hayati öneme sahiptir. Alluloz, mevcut araştırmalara göre bağırsak mukoza bariyerinin temel koruyucularından biridir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve kolorektal kanserin (CRC), kemirgenlerde kimyasal kaynaklı kolitin kandaki düşük alluloz seviyesi ile bağlantı olduğu belirtilmiştir (Shi ve ark., 2024).

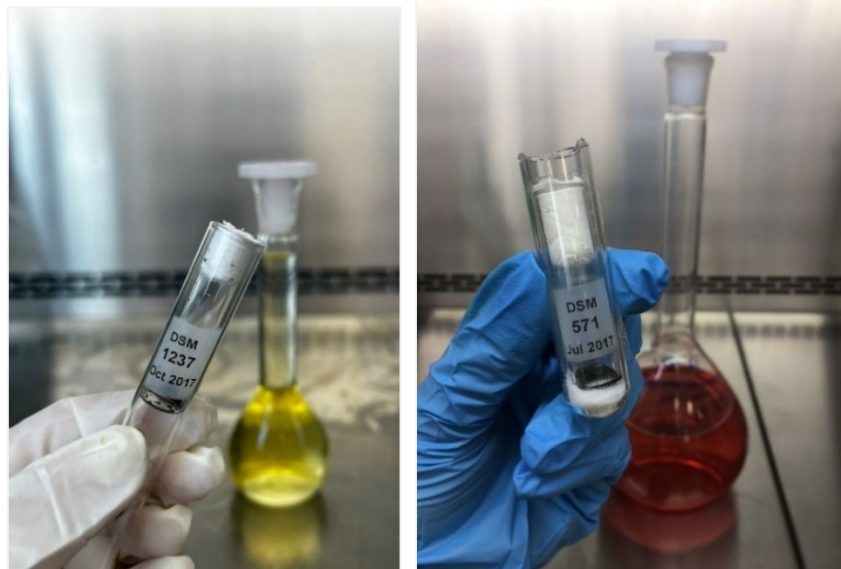
Allulozun kanseri baskılayıcı özelliklere sahip olabileceğine dair kanıtlar vardır. Çeşitli in vitro ve hayvan araştırmaları, allulozun çeşitli kanser hücresi türlerinin büyümesini ve çoğalmasını engellediğini göstermiştir. Ancak antikanser etkisinin ardındaki özel mekanizmalar hala bilinmemektedir. Allulozun kanserin önlenmesi ve tedavisindeki olası önemini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Klinik çalışmalar, allulozun bağışıklık hücresi aktivitesini artırabileceğini ve bağışıklık fonksiyonunu iyileştirebileceğini göstermektedir (Shi ve ark., 2024).

3. MATERİYAL VE METOT

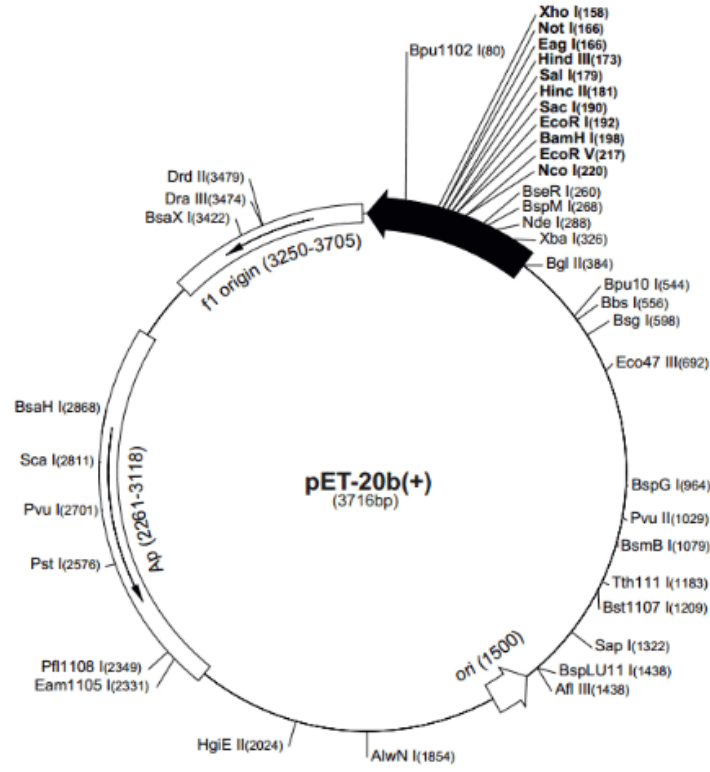
3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler, plazmid DNA ve besi ortamları

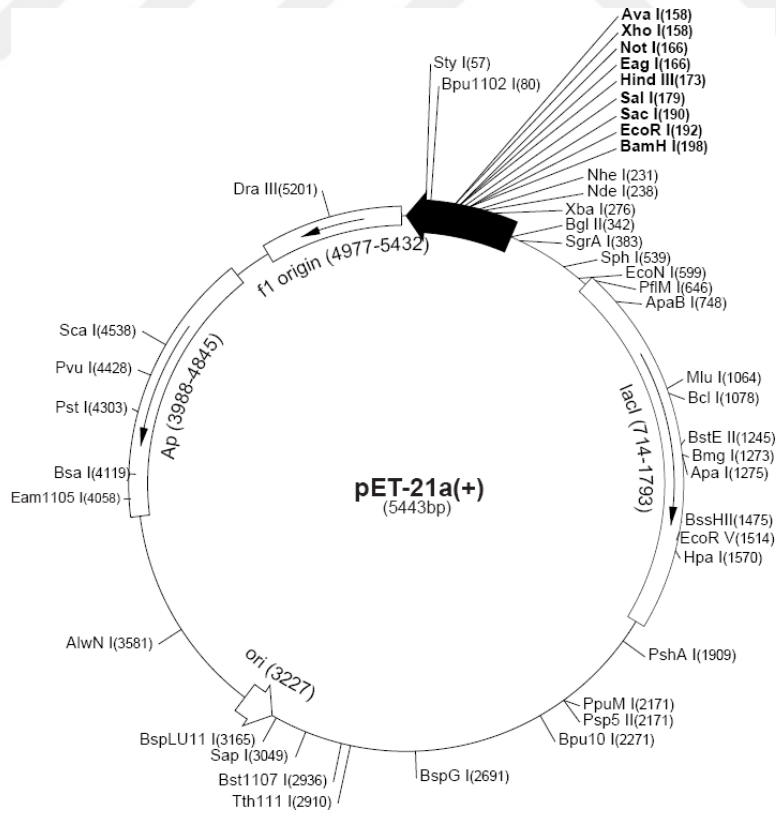
Bu çalışmada fosfoglikoizomeraz (PGI) ve alluloz-6-fosfat fosfataz (A6PP) enzimlerinin üretiminden sorumlu olan *Clostridium thermocellum* (*Acetivibrio thermocellus*) (DSM 1237) suşu ile alluloz-6-fosfat 3-epimeraz (A6PE) enziminin üretiminden sorumlu *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (DSM 571) suşu (Şekil 3.1) DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany)'den aracı firmalar aracılığı ile satın alınmıştır. Klonlama çalışmaları için ara konakçı olarak kullanılan *E. coli* rosetta suşu Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden, pET-20b(+) (Şekil 3.2) ve pET-21a(+) (Şekil 3.3) plazmid DNA'lar ise Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. pET-20b(+) plazmid vektörü *T. thermosaccharolyticum* suşundan alluloz-6-fosfat 3-epimeraz geninin ve *C. thermocellum* suşundan alluloz-6-fosfat fosfataz geninin klonlanmasında, pET-21a(+) plazmid vektörü ise *C. thermocellum* suşundan fosfoglikoizomeraz geninin klonlanmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Clostridium thermocellum* (*Acetivibrio thermocellus*) ve *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* suşlarının liyofilize formlarını içeren cam tüpler



Şekil 3.2. pET-20b(+) plazmid DNA'sının haritası



Şekil 3.3. pET-21a(+) plazmid DNA'sının haritası

C. thermocellum ve *T. thermosaccharolyticum* bakterilerinin aktifleştirilmesi ve üretilmesinde sırasıyla “520. *Ruminoclostridium cellulolyticum* (CM3) medium” ve “61. *Thermoanaerobacterium* medium” besiyerleri (DSMZ tarafından önerilen özel besiyerleri) modifiye edilerek kullanılmışlardır. *E. coli* bakterisi LB (Luria Bertani; %1 w/v tripton, %0.5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl, pH: 7.5) ve LB-agar (%5 w/v agar) besi ortamında üretilmiştir. Bakterilerden günlük kullanımlar için her bir bakteri için yukarıda belirtilen besi ortamlarından mastır plaklar oluşturulmuştur. Bunun için sıvı besiyerlerinde kültüre alınmış olan bakteriler steril öze ile alınmış ve agar içeren besiyerlerine koloniler tek tek düşecek şekilde ekimleri yapılmıştır. 37 °C’de inkübasyona bırakılan bakteriler, koloni gelişimleri tamamlandıktan sonra etiketlenerek ve plakların etrafı parafilm ile sarılarak daha sonra kullanılmak üzere +4 °C’ye kaldırılmışlardır. Bakterilerin uzun süreli muhafazaları için ise her bir bakteriden gliserol stoklar oluşturulmuştur. Bunun için sıvı besiyerinde kültüre alınan ve gelişimi tamamlanan bakterilerden steril pipet yardımıyla hesaplanan miktarda çekilerek alınmış ve daha önce otoklavlanarak steril hale getirilmiş olan gliserol içeren tüplere 80:20 oranında olacak şekilde (80 birim bakteri kültürü, 20 birim gliserol) aktarılmıştır. Tüpler birkaç dk vorteksenerek bakteri ve gliserolün iyice homojenize olması sağlanmıştır. Sonrasında tüpler etiketlenerek -20 °C’ye kaldırılmışlardır.

3.1.2. Kimyasal ve diğer sarf malzemeler

Genetik çalışmalarda kullanılan kitler, restriksiyon enzimleri ve enzim saflaştırmada kullanılan hazır kolon (HisPur™ Ni-NTA Spin Columns) Thermo Fisher Scientific’ten satın alınmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerler kullanılan primerler Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul) tarafından sentezlenmiştir.

Jel görüntülemeye boya olarak kullanılan GelRed (Biotium GelRed™ Nucleic acid 41003) Atlas Biyoteknoloji’den (Ankara), çalışmanın diğer aşamalarında kullanılan tüm kimyasallar ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Thermo Fisher Scientific, SMOBIO, Merck, Sigma Aldrich, Isolab’dan aracı firmalar aracılığı ile temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Mikroorganizmaların üretimi

Çalışmada kullanılan *C. thermocellum* (*A. thermocellus*) ve *T. thermosaccharolyticum* bakterilerinin gerek liyofilize formdan vejetatif forma dönüştürülmesinde gerekse sonraki üretim süreçlerinde DSMZ tarafından önerilen protokoller modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. *T. thermosaccharolyticum* bakterisinin canlandırılması ve üretimi

T. thermosaccharolyticum suşunun canlandırılması ve üretimi için DSMZ tarafından önerilen “61. *Thermoanaerobacterium* medium” besiyeri modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bu besiyerinin hazırlanmasında aşağıdaki kimyasallar bileşen olarak kullanılmıştır:

Tryptone	10.00 g
Yeast extract	2.00 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.20 g
Na-resazurin solution (0.1% w/v)	0.50 mL
Sucrose	10.00 g
Na ₂ SO ₃	0.20 g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0.08 g
Ultra saf su	500 mL'ye tamamlanır

Sakkaroz, Na₂SO₃ ve Na₂S₂O₃ x 5 H₂O dışındaki diğer bileşenler tartılarak üzerine bir miktar ultra saf su eklenmiş ve tamamen çözündürülmüştür. Karışımın pH'sı 0.1 N NaOH kullanılarak 7.3'e ayarlanmıştır (6.8-7.5 arasında olmalıdır). Daha sonra ultra saf suyla 470 mL'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edilmiştir.

Sakkaroz, Na₂SO₃ ve Na₂S₂O₃ x 5 H₂O ise 30 mL ultra saf suda çözündürülmüş ve 0.20 µm steril filtreden geçirilerek önceden steril edilmiş bir falcon tüpüne alınmıştır.

Otoklavdan çıkan ilk karışım soğuduktan sonra falcon tüpüne alınmış olan ikinci karışım ilk karışımın üzerine eklenmiş ve iyice homojen hale getirilmiştir. 50 mL'lik steril bir balon joje, balon jojenin ağzında hiç boşluk kalmayacak şekilde 500 mL'lik besiyerinden doldurulmuş ve

ağı çok sıkı olmayacak şekilde kapatılmıştır. Balon joje ultrasonik banyoda 30 dk boyunca degaze edilmiş ve ekime hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.4).

Liyofilize bakteriler tamamen steril ortam ve koşullarda, cam tüplerin alevden geçirilmesi sonrasında üstten kırılarak açılmasını takiben steril spatül ile alınmış ve besiyerine aktarılmıştır. Sonrasında balon jojenin ağı çok sıkı olmayacak şekilde kapatılmıştır. Balon joje ultrasonik banyoda ikinci kez 30 dk boyunca degaze edilmiştir. Bu aşamadan sonra balon jojenin ağı uygun bir tıpayla çok sıkı ve hava girmeyecek şekilde kapatılmış ve parafilmle sıkıca sarılmıştır. 60°C'ye ayarlanan etüvde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılan mikroorganizma, 48 saat sonunda aktifleşmiş ve gelişmiş ve böylece vejetatif hücreler elde edilmiştir.



Şekil 3.4. DSM 61. “*Thermoanaerobacterium medium*” besiyeri

3.2.1.2. *C. thermocellum* bakterisinin canlandırılması ve üretimi

C. thermocellum (*A. thermocellus*) canlandırılması ve üretimi için DSMZ tarafından önerilen “520. *Ruminoclostridium cellulolyticum* (CM3) medium” besiyeri modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bu besiyerinin hazırlanmasında aşağıdaki kimyasallar bileşen olarak kullanılmıştır:

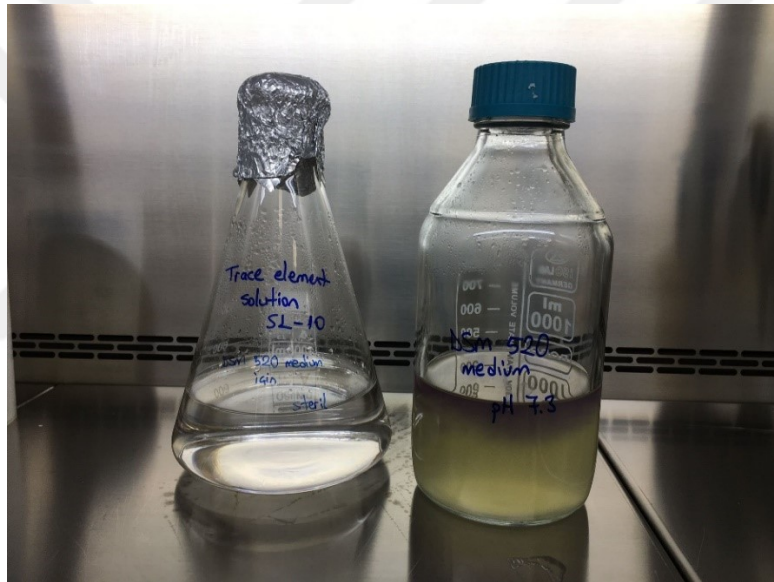
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.65 g
KH_2PO_4	0.75 g
K_2HPO_4	1.1 g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ solution (0.1% w/v in 0.1 N H_2SO_4)	0.625 mL
Trace element solution SL-10	0.50 mL
Yeast extract	1.00 g
Na-resazurin solution (0.1% w/v)	0.50 mL
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	37.50 mg
Cellobiose	3.00 g
Na_2CO_3	0.75 g
L-Cysteine-HCl $\times \text{H}_2\text{O}$	0.25 g
Ultra saf su	500.00 mL'ye tamamlanır
<u>Trace element solution SL-10:</u>	
HCl (25%)	5.00 ml
$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0.75 g
ZnCl_2	35.00 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	50.00 mg
H_3BO_3	3.00 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	95.00 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1.00 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	12.00 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	18.00 mg
Ultra saf su	495.00 ml

Öncelikle HCl çözeltisi hazırlanmış ve FeCl_2 bu çözelti içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra diğer bileşenler ilave edilerek ultra saf suyla 500 mL'ye tamamlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir.

Magnezyum klorür, kalsiyum klorür, sellobiyoz, L-sistein ve karbonat dışındaki diğer bileşenler tartılarak üzerine 400 mL ultra saf su eklenmiş ve tamamen çözündürülmüştür. Besiyerinin pH'sı NaOH ile 7.2'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu karışım otoklavda sterilize edilmiştir. Magnezyum klorür, kalsiyum klorür, sellobiyoz, L-sistein ve karbonat üzerine 100

mL su ilave edilip ultrasonik su banyosunda çözününceye kadar bekletilmiştir. Tamamen homojen hale gelen karışım 0.20 µm steril filtreden geçirilerek ana besiyerine ilave edilmiş ve böylece toplamda 500 mL besiyeri elde edilmiştir.

50 mL’lik steril bir balon jojeye, balon jojenin ağzında hiç boşluk kalmayacak şekilde 500 mL’lik besiyerinden doldurulmuş ve ağzı çok sıkı olmayacak şekilde kapatılmıştır. Balon joje ultrasonik banyoda 30 dk boyunca degaze edilmiş ve bakteri ekimine hazır hale getirilmiştir. Bakteri inokülasyonundan sonra 55°C’ye ayarlanan etüvde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılan mikroorganizma, süre sonunda aktifleşmiş ve gelişmiş bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. DSM “520. *Ruminoclostridium cellulolyticum* (CM3) medium” besiyeri

3.2.1.3. *E. coli* bakterisinin kültüre alınması

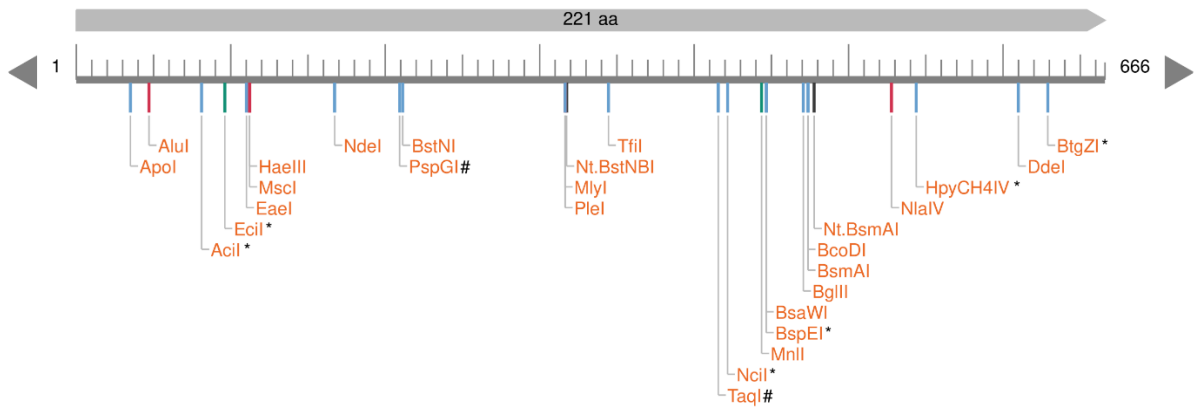
E. coli bakterisi LB (Luria Bertani; %1 w/v tripton, %0.5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl, pH: 7.5, 121°C’de 15 dk süreyle otoklavlanarak steril edilir) besi ortamında 37°C’de aerobik koşullarda üretilmiştir. Bakterinin her bir kültüre alınmasında master plakdan (master stokdan) tek bir koloni steril öze ile alınmış ve steril LB besiyerine aşılama yapılmıştır. Gliserol stokdan ekim yapıldığı durumlarda, ekim yapılacak olan LB besiyerinin hacminin %1’i olacak şekilde bakteri steril mikropipet ucu ile gliserol stokdan çekilmiş ve yine steril koşullarda LB-besiyerine aşılama yapılmıştır. Katı besiyeri kullanıldığı durumlarda LB besiyerine %5 w/v agar ilave edilmiştir. Bakterilerin LB-agar’a ekilmesinde, LB besiyerinde üremiş olan bakteriler

steril öze ile alınarak tek koloni düşecek şekilde LB-agar plağına yayılmış ve sonrasında petrinin kapağı kapatılarak besiyeri üstte kalacak şekilde 37°Cye inkübatöre konulmuştur. *E. coli* bakterilerinin gerek LB broth gerekse LB-agar besiyerlerinde üretiminde 12-24 saat zaman dilimi kullanılmıştır.

3.2.2. Genlerin restriksiyon enzim haritalarının çıkarılması

3.2.2.1. *T. thermosaccharolyticum* A6PE geninin restriksiyon enzim haritasının çıkarılması

T. thermosaccharolyticum genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_014410.1) A6PE geninin (*alsE*, GeneID: 93864552) restriksiyon enzim haritası NEBcutter programı ile hazırlanmıştır (Şekil 3.6). Gen dizisindeki restriksiyon enzim kesim haritası belirlendikten sonra, genin pET-20b(+) vektörüne klonlanması için, uç bölgelerine genin içinde kesim bölgesi bulunmayan *Bam*HI tanıma dizileri eklenerek ileri ve geri primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.1).



Şekil 3.6. A6PE geninin restriksiyon haritası (“*” ile işaretlenenler CpG metilasyonundan etkilenen, “#” ile işaretlenenler ise diğer metilasyonlardan etkilenen restriksiyon endonükleazlar).

3.2.2.2. *C. thermocellum* A6PP geninin restriksiyon enzim haritasının çıkarılması

C. thermocellum genomundaki A6PP geninin restriksiyon enzim haritası NEBcutter programı ile hazırlanmıştır (Şekil 3.7). Gen dizisindeki restriksiyon enzim kesim haritası belirlendikten sonra, genin pET-20b(+) vektörüne klonlanması için, uç bölgelerine genin içinde kesim bölgesi bulunmayan *Nde*I tanıma dizileri eklenerek ileri ve geri primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.2).

3.2.3. Genomik DNA izolasyonu

C. thermocellum ve *T. thermosaccharolyticum* bakterilerinden genomik DNA izolasyonu için ticari izolasyon kiti (ThermoFisher Scientific, GeneJET Genomic DNA Purification Kit) kullanılmıştır (Şekil 3.9).

Her iki bakteri de Gram pozitif olduğu için, kitle Gram pozitif bakteriler için verilen izolasyon yöntemi adım adım uygulanmıştır. Gram-pozitif bakterilerden genomik DNA izolasyonu yapmak için öncelikle aşağıda bileşenleri verilen lizis çözeltisi hazırlanmıştır:

Lizis Çözeltisi (pH 8.0)

- 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0)
- 0.002 M EDTA
- %1.2 SDS ve
- 20 mg/mL lizozim



Şekil 3.9. Genomik DNA izolasyonu için kullanılan ticari izolasyon kiti

0.242 g Tris tartılarak bir miktar su ilave edilmiş ve pH'sı 0.1 M HCl ile 8.0'e ayarlanmıştır. Tris tamamen çözündükten sonra içerisine 0.0744 g EDTA ilave edilmiştir. İlave edilen EDTA çözeltinin pH değerini düşürdüğü için NaOH ile pH tekrar 8.0'e ayarlanmıştır. Tris ve EDTA tamamen çözündükten sonra içerisine 1.2 g SDS ilave edilmiş ve çözündürülmüştür. Çözelti kullanılmadan hemen önce 2 g lizozim eklenmiş ve karışım saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda tamamen çözündürülen çözelti kullanıma hazır hale gelmiştir.

Gram pozitif bakterilerden genomik DNA izolasyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

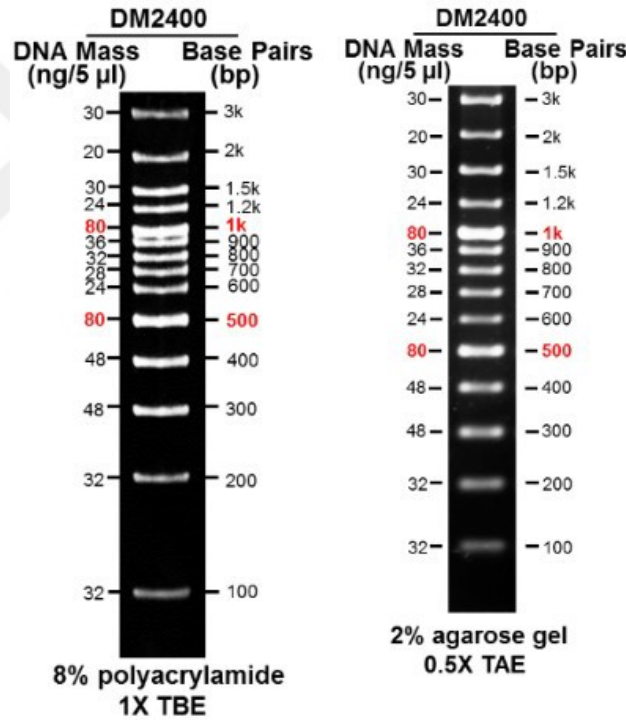
1. Sıvı besiyerlerinde geliştirilmiş olan taze bakteri kültürlerinden eppendorf tüplerine 2'şer mL aktarılmış ve tüpler santrifüj cihazında 5000 g'de 10 dk santrifüjlenerek bakteri hücreleri tüpün alt kısmında toplanmıştır.
2. Süpernatant kısmı atılarak her bir tüpe 180 µL Gram-pozitif bakteri lizis çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon sonunda tüplere 200 µL lizis çözeltisi ve 20 µL Proteinase K ilave edilerek homojen hale gelene kadar 15 sn vortekslenmiştir.
4. Karışım 56 °C'ye ayarlanmış su banyosunda çalkalanarak 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
5. Karışım, üzerine 20 µL RNase A ilave edilerek homojen hale gelene kadar vortekslenmiş ve 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
6. Tüplere 400 µL %50'lik etanol ilave edilip tekrar vortekslenmiştir.
7. Oluşan karışım kolonlu eppendorf tüplerine aktarılmış ve 6000 g'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
8. Santrifüj sonunda altta kalan tüp atılmış ve kolon kısmı yeni bir eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir.
9. Kolona 500 µL yıkama tamponu 1 (wash buffer 1) eklenmiş ve 8000 g'de 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
10. Santrifüjden sonra altta kalan kısım boşaltılmış ve kolona 500 µL yıkama tamponu 2 (wash buffer 2) ilave edilerek 15000 g'de 3 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
11. Alttaki kısım döküldükten sonra tüpler boş olarak bir kez daha 15000 g'de 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
12. Santrifüj sonunda altta kalan tüp atılmış ve kolon kısmı steril bir eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir.
13. Kolonun tam ortasına 200 µL elüsyon tamponu (elution buffer) ilave edilmiş ve 2 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda tüpler 8000 g'de 1 dk santrifüjlenerek istenen saf DNA tüpün alt kısmına toplanmıştır. DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla izole edilen DNA'lar %1.2'lik agaroz jel elektroforezi yöntemiyle görüntülenmiştir. Ayrıca, izole edilen DNA'ların konsantrasyonları, nanodrop (ThermoScientific, Nanodrop 2000c) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle 260 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. DNA'ların

saflık düzeyi ise yine aynı cihazda OD260/OD280 oranı hesaplanarak belirlenmiştir. Son olarak her bir genomik DNA konsantrasyonu 200 ng/μL olacak şekilde standardize edilmiş ve sonrasında kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel, genomik DNA’ların, plazmid DNA’ların ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi çalışmaları için aksi belirtilmedikçe %1.2, agaroz jelden DNA saflaştırma çalışmaları için ise %0.8 konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Markır DNA’nın kullanılması gerektiği durumlarda jele ayrıca 100 bp DNA markır (SMOBIO AccuBand™ 100 bp+3K DNA ladder II) (Şekil 3.10) yüklenmiştir.



Şekil 3.10. Jel görüntülemeye kullanılan moleküler DNA belirteci

Agaroz jel elektroforezi yürütme tamponu olarak 1X TBE buffer kullanılmıştır. Aşağıda bileşenleri verilen TBE buffer 10X konsantrasyonda stok olarak hazırlanmış ve kullanıldığı durumlarda saf su ile 1X’e seyreltilmiştir.

TBE Buffer (10X, pH 8.0)

- 108 g Tris baz

- 55 g Borik asit
- 40 mL 0.5 M EDTA
- 900 mL ultra saf su

Yukarıda verilen bileşenler uygun hacimli bir beher içerisine alınarak manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Sonrasında pH'sı 8.0'e ayarlanmış ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan buffer kullanılmadan önce 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Genomik DNA'ların jelde yürütülmesi amacıyla %1.2'lik agaroz jel hazırlamak için öncelikle uygun miktarda agaroz tartılıp üzerine 40 mL TBE Buffer (1X) ilave edilmiş ve mikrodalgada 1 dakika boyunca ısıtılmıştır. Mikrodalgadan çıkan karışım soğumadan üzerine 2.5 µL GelRed Nucleic Acid Gel Stain jel görüntüleme boyası ilave edilip homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Karışım agaroz jel tankına dökülmüş ve jel tarağı yerleştirildikten sonra katılaşıncaya kadar beklenmiştir. Katılaştıran jel 1X TBE dolu tank içerisine yerleştirilmiş ve tarak dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Bu arada *T. thermosaccharolyticum* ve *A. thermocellus* bakterilerinin genomik DNA'larından 5'er µL alınarak üzerine 1'er µL jel yükleme boyası (5 kısım DNA örneği + 1 kısım yükleme boyası) eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan DNA+boya karışımları bir mikropipet yardımıyla dikkatli bir şekilde jel kuyularına yüklenmiştir. Sonrasında agaroz jel tankının kapağı kapatılmış ve DNA örnekleri 100 Volt'ta 45 dakika boyunca yürütülmüştür (Şekil 3.11). Süre sonunda güç kaynağından elektrik akımı kesilerek yürütme işlemi durdurulmuştur. Jel tanktan alınarak jel görüntüleme cihazına (Azure Biosystems C200) (Şekil 3.12) aktarılmış ve DNA bantları UV ışığı altında kontrol edilmiştir.

3.2.5. PCR ve Klonlama Çalışmaları

3.2.5.1. Primerlerin tasarımı

T. thermosaccharolyticum bakterisi genomunda alluloz-6-fosfat 3-epimeraz enzimini kodlayan gen ile *C. thermocellum* genomunda alluloz-6-fosfat fosfataz ve fosfoglikoizomeraz enzimlerini kodlayan genlerin sekansları dikkatli bir şekilde incelenerek, genlerin başlama ve stop kodonları arasında kalan açık okuma çerçevesi (ORF, Open Reading Frame) PCR'da sentezlenecek şekilde primer dizileri tasarlanmıştır.



Şekil 3.11. İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforez sisteminde yürütülmesi



Şekil 3.12. Agaroz jel elektroforezi sonrasında DNA örneklerinin görüntülenmesinde kullanılan jel görüntüleme cihazı

Primerlerin uç kısımlarına, genlerin plazmid DNA'lara ligasyonlarının yapılabilmesi ve ayrıca gerekli olduğu durumlarda plazmid DNA'lardan kesilerek geri alınabilmesi amacıyla uygun restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri ayrıca eklenmiştir. Primerlerin uç kısımlarına eklenen restriksiyon endonükleazların belirlenmesinde, hedef gen içerisinde kesme dizilerinin

olmaması, buna karşılık plazmid DNA üzerinde kesme dizilerinin bulunması hususları gözönünde bulundurulmuştur. Primerler tasarlandıktan sonra SenteBioLab (Ankara) firmasından liyofilize formda satın alma yoluyla temin edilmiştir.

T. thermosaccharolyticum bakterisi genomunda alluloz-6-fosfat 3-epimeraz enzimini kodlayan gen ile *C. thermocellum* genomunda alluloz-6-fosfat fosfataz ve fosfoglikoizomeraz enzimlerini kodlayan genlerin PCR’da amplifikasyonu için tasarlanan primerler ve bazı özellikleri sırasıyla Tablo 3.1-3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.1. *T. thermosaccharolyticum*’dan üretilcek alluloz-6-fosfat 3-epimeraz genini PCR ile çoğaltmak için tasarlanan ileri (A6PEF) ve geri (A6PER) primerler (Altı çizili diziler *Bam*HI restriksiyon endonükleaz tanıma dizileridir)

Primer (5'→3')	İleri/Geri	Primer Uzunluğu (bç)	G+C Oranı (%)	Amplikon Büyükliği (bç)
<u>CGGATCC</u> ATGAAATATTTATTTTCGCCATC	İleri	30	37	677
<u>CGGATCC</u> TCCATTAATAATTGCAATCATTA	Geri	31	35	

Tablo 3.2. *C. thermocellum*’dan üretilcek olan alluloz-6-fosfat fosfataz genini PCR ile çoğaltmak için tasarlanan ileri (A6PPF) ve geri (A6PPR) primerler (Altı çizili diziler *Nde*I restriksiyon endonükleaz tanıma dizileridir)

Primer (5'→3')	İleri/Geri	Primer Uzunluğu (bç)	G+C Oranı (%)	Amplikon Büyükliği (bç)
<u>CCATATG</u> ATGATTAAATACAAAGCGGTAT	İleri	29	31	665
<u>CCATATG</u> TAAACATAAACATATCCAATAAAC	Geri	30	27	

Tablo 3.3. *C. thermocellum*’dan üretilcek olan fosfoglikoizomeraz genini PCR ile çoğaltmak için tasarlanan ileri (PGIF) ve geri (PGIR) primerler (Altı çizili diziler *Xho*I restriksiyon endonükleaz tanıma dizileridir)

Primer (5'→3')	İleri/Geri	Primer Uzunluğu (bç)	G+C Oranı (%)	Amplikon Büyükliği (bç)
<u>CGGCCTCGAG</u> ATGGAAAGAATAAAATTTGAC	İleri	28	42	1367
<u>CTAGCTCGAG</u> TTACAAACGCTCTTC	Geri	28	48	

3.2.5.2. Primerlerin kullanım için hazırlanması

Liyofilize olarak temin edilen primerlerden 100 µM konsantrasyonlarında stok hazırlamak için, üzerlerine bilgi formunda belirtilen miktarlarda TE buffer (50 mM Tris (pH 7.6), 1 mM EDTA (pH 8.0), istenen hacim için gerekli tris ve EDTA hesaplanarak stoklarından alınır, saf su ile

hacme tamamlanır) bir mikropipet yardımıyla çekilerek eklenmiş ve primerlerin çözünmesi için buzdolabında +4 °C’de ertesi güne kadar bekletilmiştir. Ertesi gün primerler dolaptan alınarak 3-5 dk süreyle vortekslenmiş ve böylece homojenize hale getirilmiştir. Son olarak her bir primer setinden 20 µM olacak şekilde kullanım stokları oluşturmak için, 1 birim primere 4 birim TE buffer (1:4 v/v) eklenmiş ve vorteksledikten sonra etiketlenmiştir. Kullanım stokları her kullanımda dondur-çöz zararını en aza indirmek için küçük hacimlere (20’şer µL) paylaştırılmıştır. 100 µM ve 20 µM konsantrasyonlarındaki primerler kullanılıncaya kadar -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.5.3. Genlerin PCR ile çoğaltılması

PCR reaksiyonu için hem proofreading aktivitesine sahip olması hem de küt uç oluşturacak şekilde ampikon üretmesi sebebiyle Pfu DNA polimeraz (Wizbio solutions, WizPure Pfu DNA Polymerase, 500 U) (Şekil 3.13) enzimi kullanılmıştır.



Şekil 3.13. PCR reaksiyonu için kullanılan Pfu DNA polimeraz enzimi

Öncelikle her genin PCR’da optimum çoğalma koşullarının belirlenebilmesi için gradient PCR yapılarak bağlanma sıcaklığı optimizasyonu yapılmıştır. Bunun için her bir primerin erime sıcaklığı göz önünde bulundurularak her biri için 3 farklı bağlanma sıcaklığı seçilmiştir. Bağlanma sıcaklığı ile eşzamanlı olarak ayrıca kalıp DNA miktarının optimizasyonu da yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda ampikon üretiminde en iyi sonucu veren primer bağlanma sıcaklığı ve DNA konsantrasyonları kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmalarında Blue-Ray TurboCycler 2 model cihaz (Şekil 3.14) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu bileşenleri her üç genin de amplifikasyonu için Tablo 3.4’de verildiği şekilde 0.2 mL’lik PCR tüplerine hazırlanmış ve *T. thermosaccharolyticum* bakterisi genomunda alluloz-6-fosfat 3-epimeraz enzimini kodlayan gen ile *C. thermocellum* genomunda

alluloz-6-fosfat fosfataz ve fosfoglikoizomeraz enzimlerini kodlayan genlerin amplifikasyonları için sırasıyla Tablo 3.5, 3.6 ve 3.7’de verilen döngü programları kullanılmıştır.



Şekil 3.14. Genlerin amplifikasyonu için PCR reaksiyonlarının gerçekleştirildiği termal döngü cihazı

Döngüler tamamlandıktan sonra her bir reaksiyon örneklerinden 5’er μL alınarak 1’er μL jel yükleme boyası ile karıştırılmış ve amplifikasyonun başarılı olduğunu belirlemek için %1.2’lik agaroz jelde elektroforez edilmişlerdir. Sonrasında ampikonlar klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmişlerdir.

Tablo 3.4. Genlerin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri (her üç gen için de aynı miktarlar kullanılmıştır)

Reaksiyon Bileşeni	Konsantrasyonu	Alınan miktar (μL)	Son Konsantrasyon
Ultra saf su	-	30.75	-
Reaksiyon Buffer	10X	5	1X
Genomik DNA	200 ng/ μL	1	200 ng
Primer F	20 pmol	2.5	50 pmol
Primer R	20 pmol	2.5	50 pmol
dNTP karışımı	2.5 mM (Herbiri)	4	200 μM (Herbiri)
MgSO ₄	20 mM	4	1600 μM
Pfu DNA polimeraz	2.5 U/ μL	0.25	0.625 U

Tablo 3.5. *T. thermosaccharolyticum* bakterisi genomunda bulunan A6PE enzimini kodlayan genin amplifikasyonu için PCR cihazına tanımlanan döngü ayarları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	1 dk	1
Denatürasyon	95		
Bağlanma	48	30 sn	30
Uzama	72		
Son uzama	72	5 dk	1
Bekletme	4	∞	-

Tablo 3.6. *C. thermocellum* bakterisi genomunda bulunan A6PP enzimini kodlayan genin amplifikasyonu için PCR cihazına tanımlanan döngü ayarları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	1 dk	1
Denatürasyon	95		
Bağlanma	48	30 sn	30
Uzama	72		
Son uzama	72	5 dk	1
Bekletme	4	∞	-

Tablo 3.7. *C. thermocellum* bakterisi genomunda bulunan PGI enzimini kodlayan genin amplifikasyonu için PCR cihazına tanımlanan döngü ayarları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	1 dk	1
Denatürasyon	95		
Bağlanma	54	30 sn	30
Uzama	72		
Son uzama	72	5 dk	1
Bekletme	4	∞	-

3.2.5.4. PCR amplikonlarının restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi

PCR ile çoğaltılan gen bölgeleri, her bir gen için tasarlanan parimerin uç bölgesine eklenen restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri göz önünde bulundurularak, tanıma dizilerine karşılık gelen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Böylece gen amplikonlarının uç bölgeleri yine aynı enzimle kesilecek olan plazmid DNA'ların uç bölgeleri ile komplementer olacak şekilde hazır hale getirilmiştir. Gen amplikonların kesim reaksiyonu

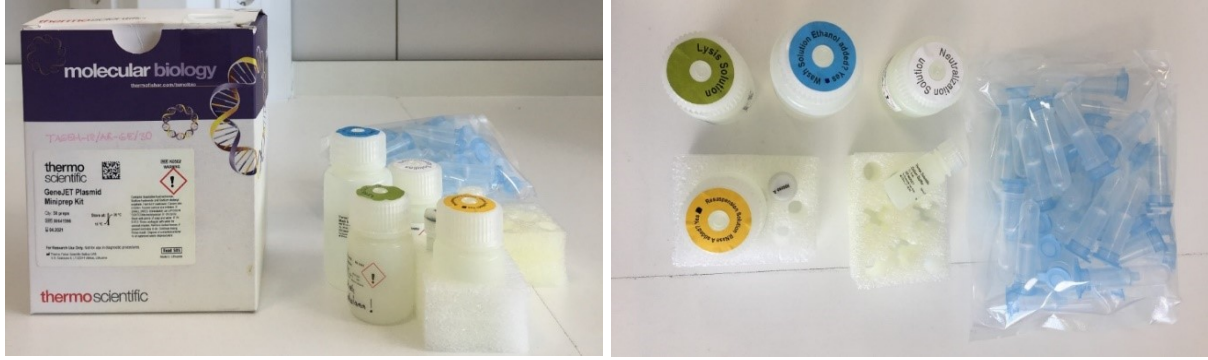
bileşenleri Tablo 3.8’de verilmiştir. Tüm kesim reaksiyonları 20 µL hacim üzerinden gerçekleştirilmiştir. Genlerin restriksiyon endonükleazlar ile kesim reaksiyonları 37 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 60 dk olacak şekilde yapılmıştır. Süre sonunda reaksiyon bileşenlerini içeren tüplerin içerisine 4 µL DNA yükleme boyası (5 birim DNA:1 birim boya) eklenerek karıştırılmıştır. DNA+boya karışımı %0.8’lik agaroz jelde 45 dk süreyle elektroforez edildikten sonra jel UV transilluminatör cihazı üzerine alınarak UV ışığı altında gen bölgeleri temiz bir büstiri yardımıyla kesilerek çıkarılmış ve 1.5 mL hacimli temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örnekleri içeren tüpler daha sonra agaroz jel bloklarından gen bölgelerinin saflaştırılması için buzdolabına -20 °C’ye kaldırılmıştır.

Tablo 3.8. Gen amplikonlarının restriksiyon endonükleazlar ile kesim reaksiyonu bileşenleri

Kesimi Yapılan Gen	Reaksiyon Bileşeni	Alınan miktar (µL)	Son konsantrasyon
A6PE	Steril ultra saf su	16	-
	A6PE geni (1.6 µg/µL)	1	1.6 µg
	10X Buffer (<i>Bam</i> HI)	2	1X
	Kesim enzimi (<i>Bam</i> HI, 10 U/µL)	1	10 U
	Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		
A6PP	Steril ultra saf su	16	-
	A6PP geni (1.44 µg/µL)	1	1.44 µg
	10X Buffer O	2	1X
	Kesim enzimi (<i>Nde</i> I, 10 U/µL)	1	10 U
	Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		
PGI	Steril ultra saf su	16	-
	PGI geni (1.18 µg/µL)	1	1.18 µg
	10X Buffer R	2	1X
	Kesim enzimi (<i>Xho</i> I, 10 U/µL)	1	10 U
	Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		

3.2.5.5. Plazmid DNA’ların *E. coli*’den izolasyonu

Klonlamada kullanılacak pET-20b(+) ve pET-21a(+) plazmid DNA’ların konukçu *E. coli* bakterilerinden izolasyonu ticari olarak temin edilen kit (Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit) (Şekil 3.15) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA’ların izolasyonu ürün kataloğunda belirtilen ve aşağıda maddeler halinde verilen işlem adımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir:



Şekil 3.15. Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific)

1. LB Broth sıvı besiyerinde 37 °C’de 24 saat boyunca geliştirilen taze hücrelerden 2’şer mL eppendorf tüplerine alınmış ve 8000 rpm’de 2 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı atılmış ve dibe çöken hücreler bir sonraki aşama için kullanılmıştır.
2. Çökelti üzerine kitin içerisinde çıkan “Resuspension Solution”dan 250 µL ilave edilmiş ve vortekslenerek tamamen homojen hale gelmesi sağlanmıştır.
3. Karışımın üzerine 250 µL “Lysis Solution” ilave edilmiş ve tüp 4-6 kere aşağı yukarı yavaş bir şekilde çalkalanarak karıştırılmıştır.
4. Fazla beklenmeden üzerine 350 µL “Neutralization Solution” ilave edilmiş ve tüp yine 4-6 kere aşağı yukarı yavaş bir şekilde çalkalanarak karıştırılmıştır.
5. Karışım 15000 rpm’de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir.
6. Santrifüjlenen karışımın süpernatant kısmı kitin içerisinde çıkan kolonlu eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
7. Tüpler 15000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüjlendikten sonra tüpün alt kısmında toplanan sıvı atılmış ve kolon kısmı tekrar aynı tüpe takılmıştır.
8. Kolona 500 µL “Wash Solution” ilave edilmiş ve 15000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Bu aşama 2 kez tekrar edilmiştir.
9. Santrifüjden sonra alt kısımdaki toplama tüpü tamamen boşaltıldıktan sonra tüpler boş bir şekilde son kez 15000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir.
10. Tüpün kolon kısmı 1.5 mL’lik steril bir eppendorf tüpüne takıldıktan sonra kolon içerisindeki membranın tam ortasına denk gelecek şekilde 50 µL “Elution Buffer” ilave edilmiş ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
11. Son olarak tüpler 15000 rpm’de 2 dk boyunca santrifüjlenmiş ve kolon atılmıştır.

12. Tüpte toplanan saf plazmid DNA'lar kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.6. Plazmid DNA'ların restriksiyon endonükleazlar ile doğrusal hale getirilmesi

Plazmid DNA'lar uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek doğrusal hale getirilmiştir. Her üç genin de klonlanması için pET-20b(+) ve pET-21a(+) plazmid DNA'ların kesim reaksiyonu bileşenleri Tablo 3.9'de verildiği ve son hacimleri 20 µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.9. pET-20b(+) ve pET-21a(+) plazmid DNA'ların kesim reaksiyonu bileşenleri

Klonlanacak gen	Plazmid DNA	Reaksiyon Bileşeni	Alınan miktar (µL)	Son konsantrasyon
A6PE	pET-20b(+)	Steril ultra saf su	15.5	-
		Plazmid DNA (900 ng/µL)	1	900 ng
		10X Buffer (<i>Bam</i> HI)	2	1X
		Kesim enzimi (<i>Bam</i> HI, 10 U/µL)	1.5	15 U
		Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		
A6PP	pET-20b(+)	Steril ultra saf su	15.5	-
		Plazmid DNA (900 ng/µL)	1	900 ng
		10X Buffer O	2	1X
		Kesim enzimi (<i>Nde</i> I, 10 U/µL)	1.5	15 U
		Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		
PGI	pET-21a(+)	Steril ultra saf su	15.5	-
		Plazmid DNA (1150 ng/µL)	1	1150 ng
		10X Buffer R	2	1X
		Kesim enzimi (<i>Xho</i> I, 10 U/µL)	1.5	15 U
		Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		

Reaksiyon bileşenlerini içeren tüpler 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda kesim reaksiyonunun başarılı olup olmadığı %0.8'lik agaroz jelde marker DNA yardımı ile kontrol edilmiştir.

3.2.5.7. Restriksiyon endonükleaz ile kesilen genlerin ve plazmidlerin agaroz jelden saflaştırılması

Gerek PCR sonucu elde edilen amplikonlar (genler) gerekse kesim reaksiyonu sonucu doğrusal hale getirilmiş olan plazmid DNA'lar DNA saflaştırma kiti (Thermo Scientific™, GeneJET Gel Extraction Kit, K0691) (Şekil 3.16) kullanılarak agaroz jelden saflaştırılmıştır.



Şekil 3.16. Agaroz jelden DNA saflaştırma kiti

Amplikonların ve kesilmiş plazmid DNA'ların agaroz jelden saflaştırılmasında ürün kataloğunda belirtilen ve aşağıda maddeler halinde verilen işlem adımları uygulanmıştır:

- 1- Jelde görüntülenen bantlar jelden dikkatli bir şekilde kesilip ayrılmış ve önceden darası alınan eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
- 2- Her bir tüpteki jelin ağırlığı içinde bulunan tüpün üzerine yazılmıştır.
- 3- Her bir tüpteki jel ağırlığı ile aynı miktarda olacak şekilde tüplere bağlayıcı tampon eklenmiştir.
- 4- Tüpler 55 °C'de su banyosunda jeller tamamen eriyinceye kadar bekletilmiştir.
- 5- Erimiş olan jeller kitin içinden çıkan saflaştırma kolonlarına ayrı ayrı aktarılmış ve 15000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- 6- Santrifüj sonunda alttaki toplama tüpleri boşaltılıp kolona tekrar takılmıştır.
- 7- Kolonlara 700 µL Wash Buffer eklenmiş ve tüpler tekrar 15000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- 8- Toplama tüpleri atılıp her bir kolon 1.5 mL'lik steril eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir.

- 9- Pipet ucu kolona değmeyecek şekilde kolonun tam ortasına 30 µL Elution Buffer eklenmiştir.
- 10- Tüpler oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiş ve 15000 rpm’de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- 11- Saf bir şekilde tüpte toplanmış olan DNA’lar kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.8. Ligasyon

Restriksiyon endonükleazlarla kesilen ve sonrasında agaroz jel bloklarından saflaştırılan genler ile plazmid DNA’lar Tablo 3.10’da verilen reaksiyon bileşenleri kullanılarak birleştirilmiştir. Reaksiyonlarda enzim olarak T4 DNA ligaz (Thermo Scientific, 1000 Weiss U) kullanılmıştır.

Tablo 3.10. PCR ile amplifiye edilen genler ile plazmid DNA’ların ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyonun DNA Bileşenleri		Temel Reaksiyon Bileşenleri		
Gen	Plazmid DNA	Reaksiyon Bileşeni	Alınan miktar (µL)	Son konsantrasyon
A6PE	pET-20b(+)	Steril ultra saf su	13	-
		Plazmid DNA (180 ng/µL)	0.5	90 ng
		Gen (260 ng/µL)	1.5	390 ng
		PEG 4000	2	-
		10X T4 DNA Ligaz Buffer	2	1X
		T4 DNA Ligaz (5 U/µL)	1	5 U
		Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		
A6PP	pET-20b(+)	Steril ultra saf su	11.5	-
		Plazmid DNA (180 ng/µL)	0.5	90 ng
		Gen (125 ng/µL)	3	375 ng
		PEG 4000	2	-
		10X T4 DNA Ligaz Buffer	2	1X
		T4 DNA Ligaz (5 U/µL)	1	5 U
		Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		
PGI	pET-21a(+)	Steril ultra saf su	12	-
		Plazmid DNA (105 ng/µL)	1	105 ng
		Gen (220 ng/µL)	2	440 ng
		PEG 4000	2	-
		10X T4 DNA Ligaz Buffer	2	1X
		T4 DNA Ligaz (5 U/µL)	1	5 U
		Toplam Reaksiyon Hacmi: 20 µL		

Bu karışım vortekslenmeden (parmak ile) dikkatli ve yavaş bir şekilde karıştırılmış ve 22 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda reaksiyon bileşenlerini içeren tüpler su banyosundan alınarak bu sefer 65 °C'ye ayarlanmış su banyosuna aktarılmış ve DNA ligaz enziminin denatürasyonu için bu su banyosunda 10 dk süreyle bekletilmişlerdir. Son olarak reaksiyon bileşenlerini içeren tüpler daha sonra transformasyon çalışmalarında kullanılıncaya kadar buz dolabına -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.5.9. *E. coli* bakterilerinin kompetent hale getirilmesi ve transformasyon

Konakçı *E. coli* rosetta hücrelerinin kompetent hale getirilmesinde ve sonrasında ligasyon bileşenlerinin kompetent bakterilere transfer edilmesinde Hanahan (1985)'de verilen protokol modifiye edilerek kullanılmıştır.

E. coli rosetta bakterilerinin kompetent hale getirilmesinde izlenen işlem adımları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Mastır plaktan tek koloni olacak şekilde steril öze yardımıyla alınan *E. coli* bakterisi 5 mL'lik LB besiyerine aktarılmış ve 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
2. Aktifleştirilen hücreler 50 mL'lik LB besiyerine aktarılmış ve 37 °C'de OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0.5 oluncaya kadar inkübe edilmiştir
3. İstenen büyüklüğe gelen bakteri kültürü 2 tüpe eşit miktarda bölünmüş ve +4 °C'de, 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı atılmış ve çökelti üzerine 4'er mL soğuk MgCl₂ (0.1 M) ilave edilmiştir. Karışım iyice vortekslenip homojen hale getirildikten sonra 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
5. Süpernatant kısmı atılmış ve her iki tüpe 4'er mL soğuk CaCl₂ (0.1 M) ilave edilmiştir. Karışım iyice vortekslenmiş ve homojen hale getirilmiştir.
6. Karışım 30 dk boyunca buzun üzerinde bekletilmiş ve daha sonra tekrar 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
7. Süpernatant kısmı atılmış ve çökelti üzerine 400 µL CaCl₂ (0.1 M) ilave edilmiştir. Karışım pipetle çekip bırakılarak hafifçe karıştırılmıştır. Böylece kompetent (serbest geni almaya hazır) bakteri elde edilmiştir.

8. Hazırlanan kompetent bakteri eppendorf tüplerine 100'er µL olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Ligasyon reaksiyonu bileşenlerinin kompetent bakterilere transfer edilmesinde (transformasyon) ise aşağıda verilen işlem adımları uygulanmıştır:

- 1- Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan 100 µL'lik kompetan hücreler üzerine 10 µL ligasyon reaksiyonu bileşeni ilave edilmiştir. Pozitif kontrol için 3 µL halkasal pET-21a(+) ve pET-20b(+), negatif kontrol için ise bu plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan reaksiyon karışımlarından 3 µL alınıp kompetent bakteri üzerine ilave edilmiştir.
- 2- Tüpler 30 dakika buzda bekletildikten sonra 42 °C'de 90 saniye ısı şoku uygulanmış, ısı şokundan sonra tekrar buzda 3-4 dakika bekletilmiştir.
- 3- Daha sonra her bir tüpe 950 µL sıvı LB besi yeri eklenmiş ve tüpler 37 °C'de, 200 rpm'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 4- İnkübasyon sonunda tüpler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantın yaklaşık 850 µL'si uzaklaştırılmıştır.
- 5- Dibe çöken hücre pelleti tüpte kalan 150 µL besiyeri içinde çözündürülmüş ve daha yoğun bir süspansiyon elde edilmiştir.
- 6- Çözölmüş her bir örnekteki hücrelerin tamamı amfisilin (30 mg/mL) içeren LB agar besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5.10. Rekombinant *E. coli* rosetta kolonilerinin seçilmesi

Transformasyon işlemi sonucunda PGI genini içeren pET-21a(+) ve *A6PE* ve *A6PP* genlerini içeren pET-20b(+) plazmidine sahip rekombinant bakteriler koloni PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. PCR işleminde her bir gen için sentezlenmiş olan ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Bunun için transformasyon plağında gelişen koloniler steril ortamda steril öze yardımıyla alınarak içerisine distile su eklenmiş olan PCR tüplerine aktarılmıştır. Seçilen koloni su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırılıp homojen hale getirilmiştir. Daha sonra PCR reaksiyonu için gereken diğer bileşenler en son polimeraz enzimi olacak şekilde sırasıyla tüpe eklenmiştir. Her bir enzim geninin çoğalması için daha önceden belirlenmiş olan PCR şartlarında PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan reaksiyon ürünleri %0.8'lik agaroz jele

yüklenerek elektroforez edilmişlerdir. Gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenen kolonilerden mastır ve gliserol stoklar hazırlanarak buzdolabına (mastır plaklar +4 °C, gliserol stoklar -20 °C) kaldırılmıştır.

3.2.6. Enzimlerin karakterizasyonu çalışmaları

3.2.6.1. Rekombinant bakterilerden toplam proteinlerin SDS-PAGE için saflaştırılması

Rekombinant *E. coli* bakterilerinden rekombinant enzimleri de içeren tüm proteinlerin saflaştırılması aşağıda verilen işlem adımları uygulanarak gerçekleştirilmiştir:

1. pET-20b(+)-A6PE, pET-20b(+)-A6PP ve pET-21a(+)-PGI taşıyan rekombinant *E. coli* rosetta kolonileri amfisilinli (30 mg/mL) LB broth besiyerine ayrı ayrı ekilmiş ve 37°C’de 200 rpm’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
2. Gelişen kolonilerden 20 mL alınıp 2 L’lik amfisilinli (30 mg/mL) LB broth besiyerine steril koşullarda aktarılmıştır. İkincil kültürler 37°C’de OD600 değeri yaklaşık 0.6 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır.
3. Bakteri kültürlerinin OD600 değeri 0.6’ya ulaştığında, steril şartlarda son konsantrasyon 0.25 mM olacak şekilde IPTG ilave edilmiştir. IPTG ilave edildikten sonra sıcaklık 18 °C’ye düşürülmüş ve rekombinant koloniler 1 gece boyunca 18 °C’de 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.
4. Gelişen koloniler 8000 rpm’de 4 °C’de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant atılarak çökelti bir falcon tüpünde toplanmıştır.
5. Çökelti iki kez % 0.85’lik NaCl ile yıkanmıştır.
6. NaCl ile yıkanmış çökelti 20 mL bağlayıcı tampon (binding buffer) (0.1 M NaCl, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, %0.1 SDS, pH 7.5) içerisinde çözündürülmüştür.
7. Daha sonra enzimatik lizis işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla son konsantrasyonda 0.2 mg/mL lizozim, 20 µg/mL DNase I, 1 mM MgCl₂, 10 µL/mL Protease Inhibitor Coctail olacak şekilde bu maddeler ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dk karıştırılmıştır.
8. Karışım 4 °C’de 15 dk süreyle sonikasyona (Bandelin Sonopuls HD 2070) tabi tutulmuş ve sonikasyondan sonra karışımın pH’sı 7.4’e ayarlanmıştır.
9. pH’sı ayarlanan çözelti 13000 rpm’de 4 °C’de 30 dk santrifüjlenmiştir.
10. Enzimlerin kısmi saflaştırılmasında öncelikle jel filtrasyon kromatografisi uygulanmıştır. Bu işlem için kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-100, kolon

olarak ise 8 cm x 2 cm boyutlarında polipropilen yapıda bir kolon tercih edilmiştir. Her bir enzim için ayrı kolon hazırlanmıştır (Şekil 3.17).

Her bir kolon için 1 gram Sephadex G-100, 30 mL bağlayıcı tampon içerisinde süspanse edilerek yarım saat bekletilmiş ve reçinenin şişmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan dolgu maddesi hava boşluğu kalmayacak şekilde kolona aktarılmış ve kolon birkaç kere bağlayıcı tampon ile yıkanmıştır. Tamamen yıkanmış olan kolona santrifüjden çıkan enzim örnekleri yüklenmiş ve kolondan saflaştırılmış olarak çıkan enzim örnekleri 2'şer mL olacak şekilde fraksiyonlar halinde toplanıp 525 nm'de her bir fraksiyonun absorbansı ölçülmüştür. Birbirine yakın değerlerde çıkan fraksiyonlar bir araya toplanmıştır. Enzim saflaştırma işleminin başarılı olup olmadığı SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.



Şekil 3.17. Sephadex G-100 reçine ile hazırlanan saflaştırma kolonları

3.2.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Bakterilere ait toplam proteinlerin SDS-PAGE'de elektroforezi, Laemmli (1970)'e göre %12 (w/v) yürütme jeli ve %4 (w/v) yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE jel bileşenleri ve kullanılan miktarlar Tablo 3.11'de verilmiştir.

SDS-PAGE sistemini kurmak üzere öncelikle cam plakalar alkolle temizlenmiş, kurutulmuş ve sızdırmayacak şekilde jel döküm standına monte edilmiştir. Temiz bir beherde yukarıdaki tabloda bileşenleri verilen yürütme jeli hazırlanmış, hızlı ve dikkatli bir şekilde, bir mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dökülmüştür. Cam

plakaların üst kısmında yükleme jeli için yaklaşık 2-3 cm boşluk bırakılmıştır. Jel döküldükten hemen sonra, jelin havayla temasını kesmek için üzerini tamamen kaplayacak şekilde izopropanol ilave edilmiştir. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45 dk boyunca polimerleşmeye bırakılmıştır. Süre sonunda (jel tamamen polimerleştikten sonra) yüzeydeki alkol temiz bir filtre kağıdına emdirilerek dikkatlice uzaklaştırılmış ve yukarıdaki tabloda bileşenleri verilen yükleme jeli hazırlanıp polimerleşmiş olan yürütme jelinin üzerine dökülmüştür. Daha sonra tarak dikkatlice yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık 45 dk polimerleşmeye bırakılmıştır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılmış ve böylece protein örneklerinin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.

Tablo 3.11. SDS-PAGE bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Bileşenler	Yürütme Jeli	Yükleme Jeli
Distile su	3.5 mL	2 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid karışımı	3.6 mL	0.35 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.69 mL	-
1 M Tris (pH 6.8)	-	0.75 mL
%10 SDS	90 µL	30 µL
%10 Amonyum Persülfat	90 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

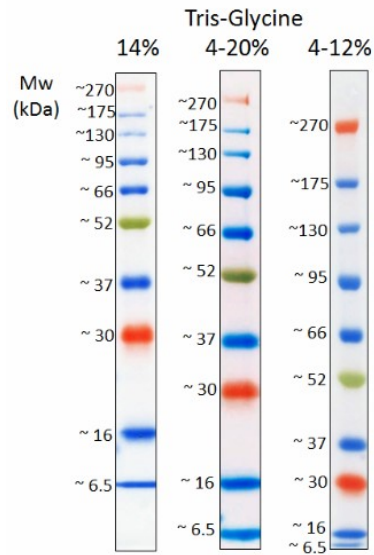
Jeller polimerize olduktan sonra enzim örnekleri 2X yükleme tamponu (Tablo 3.12) ile karıştırılarak (20 µL protein, 10 µL yükleme tamponu) kaynar suda 5 dk bekletilmiş ve protein marker (BioLegend, Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder) (Şekil 3.18) ile birlikte jele yüklenmiştir. Örnekler yükleme jelinde 60 V, 25 mA'da, yürütme jelinde ise 80 V, 40 mA'da yürütülmüştür (Şekil 3.19). Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel cam düzenden dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve jel boyama solüsyonuna (Tablo 3.13) alınarak bu solüsyon içerisinde 1 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda jel boya solüsyonundan alınarak bu sefer boyadan arındırma solüsyonuna (Tablo 3.13) alınmış ve ertesi güne kadar bu solüsyonda bekletilerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Sonrasında ortaya çıkan bantlar protein marker ile DNA bantlarının konumuna göre analiz edilmiştir.

Tablo 3.12. 2X örnek tamponu

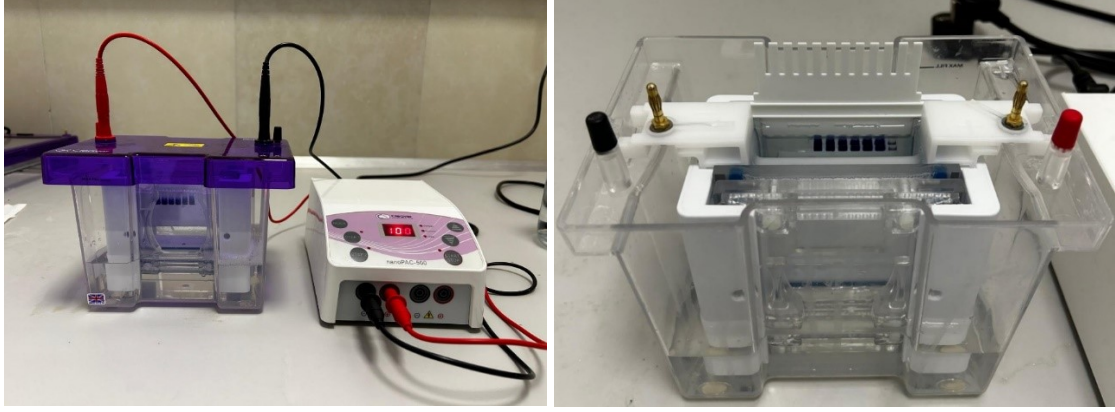
Bileşenler	Miktar
SDS	%4
Gliserol	%20
2-merkaptoetanol	%10
Bromfenol Mavisi	%0.004
Tris HCl (pH 6.8)	0.125 M

Tablo 3.13. SDS-PAGE jel boyama ve boyadan arındırma solüsyonlarının bileşenleri

Bileşenler	Coomassie Brilliant Blue Boyama Çözeltisi	Boyadan Arındırma Çözeltisi
Coomassie Brilliant Blue-R250	1 g	-
Metanol	450 mL	400 mL
Glasiyel Asetik Asit	100 mL	100 mL
Distile su	450 mL	500 mL



Şekil 3.18. SDS-PAGE analizi için kullanılan protein markerın jel görüntüsü

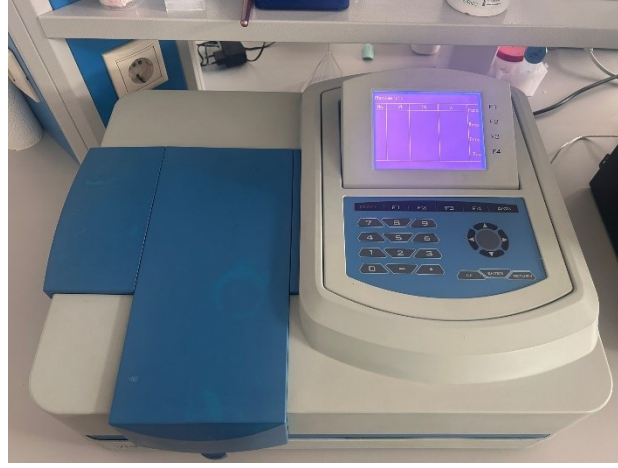


Şekil 3.19. Saflaştırılan enzim örneklerinin SDS-PAGE’de yürütülmesi

3.2.6.3. Bradford yöntemi ile proteinlerin miktarı tayini

Saflaştırılan enzimlerin protein miktarları aşağıda maddeler halinde verilen Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Bradford, 1976):

- 1- Önce Bradford çözeltisi hazırlanmıştır. Reaktif olarak Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılan çözelti için öncelikle 100 mg Coomassie Brilliant Blue boyası 50 mL %95 etanol içerisinde çözündürülmüştür. Bu karışıma 100 mL %85 fosforik asit ilave edilmiş ve distile su ile 1 L’ye tamamlanmıştır. Çözelti filtre kağıdından geçirilerek partiküllerinden uzaklaştırılmıştır.
- 2- Standart olarak 0 µL/mL, 250 µL/mL, 500 µL/mL, 750 µL/mL, 1000 µL/mL konsantrasyonlarında BSA çözeltisi hazırlanmıştır.
- 3- Hazırlanan BSA çözeltilerinden ve saflaştırılan enzimlerden spektrofotometre için kullanılan 2.5 mL hacimli küvetlere 20’şer µL alınmış ve üzerlerine 980 µL distile su ilave edilmiştir.
- 4- Daha sonra örneklerin üzerine 1 mL Bradford çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dk bekletilmiştir.
- 5- Süre sonunda bekletilmeden spektrofotometre cihazında (Rayleigh VIS-723G) (Şekil 3.20) 595 nm’de örneklerin ölçümleri yapılmıştır.
- 6- Enzim örneklerinin protein miktarı farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA standartlarından elde edilen eğriye göre hesaplanmıştır.



Şekil 3.20. Spektrofotometrik analizlerde kullanılan spektrofotometre cihazı

3.2.6.4. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Alluloz 6-fosfat 3-epimeraz ve Alluloz 6-fosfat fosfataz aktivitesi için “Enzimatik D-Alluloz Üretimi” patentindeki (Patent No. US 10,704,069 B2, 2020) aktivite testi modifiye edilerek uygulanmıştır. Aynı patentte belirtilen fosfoglikoizomeraz aktivitesi için gerekli olan kimyasallar temin edilemediğinden bu enzim için aktivite testi yapılamamıştır. Açığa çıkan serbest fosfat miktarının ölçülmesine dayanan bu yöntemde, her iki enzim için de 5 mM $MgCl_2$ ve 8 M $CoCl_2$ içeren 50 mM HEPES tamponu (pH 7.2) hazırlanmıştır.

A6PE enziminin aktivitesini hesaplamak için; hazırlanan 50 mM HEPES tamponu (pH 7.2)’ndan 3.15 mL alınmış, üzerine 1.35 mL F6P (10000 ppm) ve 0.5 mL A6PP ilave edilmiştir. Toplam 5 mL’lik karışım ile spektrofotometrede 850 nm’de sıfırlama yapılmış ve daha sonra bu karışım 50 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saat sonunda kaynar suda 5 dk bekletilmiş ve enzim aktivitesi durdurulmuştur. Aktivitesi durdurulan bu karışımdan 0.5 mL alınmış, üzerine 5 mL 0.1 M çinko asetat ve 2 mM amonyum molibdat içeren çözelti ilave edilmiştir. Son olarak, karışıma 1.25 mL %5’lik askorbik asit ilave edilmiş ve bu karışım 30 °C’de 20 dk bekletilmiştir. Bu sırada renk değişimine uğrayan karışım 850 nm’de spektrofotometrede okunmuştur.

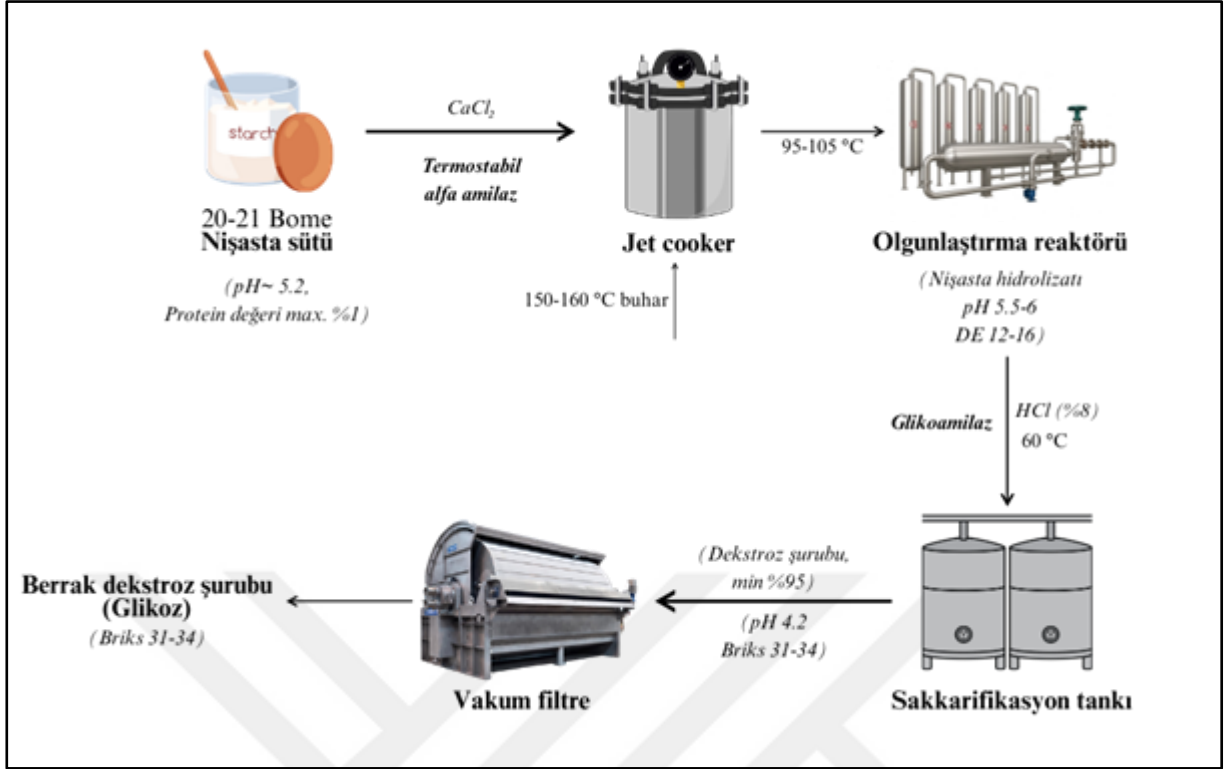
A6PP enziminin aktivitesini hesaplamak için de aynı işlemler gerçekleştirilmiş, sadece ilk adımda HEPES tamponu ve F6P üzerine A6PE ilave edilmiştir.

3.2.7. Üretilen enzimler kullanılarak nişastanın alluloza dönüşümü

3.2.7.1. Nişastanın glikoza dönüşümü

Nişastanın glikoza dönüşümü süreci, Sunar Mısır Ar-Ge laboratuvarında yürütülmüştür (Şekil 3.21). Prosesin başlangıcında yaklaşık %20 (w/v) oranında mısır nişastası çözeltisi hazırlanmış ve pH değeri 5.7–5.9 aralığına ayarlanmıştır. Elde edilen süspansiyon, termostabil alfa-amilaz enzimi (Clearflow®) ilavesiyle 95–105 °C sıcaklık aralığında jet cooker sisteminde sıvılaştırılmıştır. Alfa-amilaz enzimi, üretici firmanın önerdiği şekilde 400–500 g/ton dozajında kullanılmıştır. Alfa-amilaz enzimi, nişasta molekülünü rastgele noktalardan kırarak kısa zincirli dekstrinlere parçalamaktadır. Reaksiyon süresince ortam pH'sı 5.7–5.9 aralığında sabit tutulmuş, aynı zamanda Ca^{2+} iyon konsantrasyonu da enzimin stabilitesini koruyacak şekilde kontrol edilmiştir. Bu koşullarda yürütülen sıvılaştırma sonunda, çözeltinin dekstroz eşdeğeri (DE) değeri 12–16 aralığına ulaşmıştır.

Sıvılaştırılan nişasta çözeltisi, olgunlaştırma reaktöründe dekstroz eşdeğeri (DE) değeri 12–16 aralığına ulaşana kadar işleme tabi tutulmuştur. Bu aşamada, çözeltinin pH'ı %8'lik HCl çözeltisi kullanılarak 4.2'ye düşürülmüş ve ardından glukoamilaz (EC 3.2.1.3) enzimi eklenerek 60 °C'de sakkarifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu enzimatik şekerleşme sonucunda, yüksek dekstroz eşdeğerine sahip yaklaşık %30 briks değerinde bir glikoz çözeltisi elde edilmiştir. Söz konusu çözelti, enzimatik dönüşüm çalışmalarında ana glikoz stoğu olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.21. Nişasta sütünden glikoz üretim süreci

Elde edilen glikoz çözeltisi, vakum filtreleme ile işlem görerek protein ve diğer safsızlıklardan arındırılmış, ardından berrak dekstroz şurubu formuna getirilmiştir. Ürün karakterizasyonunda DE tayini Lane-Eynon yöntemiyle yapılmış (Lane ve Eynon, 1923); glikoz saflık oranı ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiştir.

Şeker çözeltisinde bulunan indirgen şeker miktarının belirlenmesi amacıyla, glikozun indirgeme özelliğine dayanan Lane-Eynon titrasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem kapsamında öncelikle numunenin belirli bir hacminde şeker çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiye, indirgen şekerlerin varlığına duyarlı olan gümüş nitrat (AgNO_3) ve bir alkali (genellikle sodyum hidroksit veya amonyak) ilave edilmiştir. Glikoz molekülleri, ortamda bulunan Ag^+ iyonlarını indirgemiş ve elementel gümüş (Ag^0) çökeltmiştir. Bu reaksiyon sonucunda çözeltinin rengi gözle görülür şekilde değişmiştir.

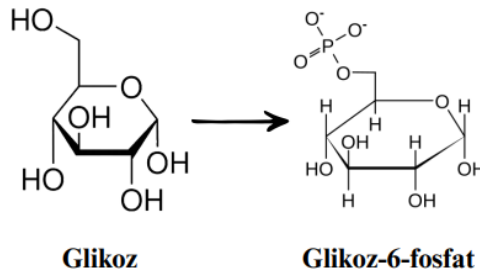
İndirgeme sonucunda ortamda açığa çıkan fazla gümüş iyonları, sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon sırasında, çözeltinin rengi sabit bir noktada değişerek titrasyonun tamamlandığını göstermiştir. Kullanılan sodyum tiyosülfat miktarı dikkate alınarak

numunedeki indirgen şeker miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen glikoz konsantrasyonu kullanılarak aşağıdaki formül (3.1) yardımıyla Dekstroz Eşdeğeri (DE) hesaplanmıştır:

$$DE = \frac{\text{Glikoz miktarı (g)}}{\text{Toplam şeker miktarı (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.7.2. Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümü

Glikoz-6-fosfat üretimi amacıyla (Şekil 3.22) gerçekleştirilen enzimatik dönüşüm deneylerinde, daha önce Lane-Eynon yöntemi ile analiz edilip saflığı doğrulanmış dekstroz çözeltisinden 1000 ppm konsantrasyonunda bir ana stok hazırlanmıştır. Bu işlemde kullanılan dekstroz çözeltisi, ticari olarak temin edilen Hekzokinaz enzimi ile reaksiyona sokulmuştur. Hekzokinaz çözeltisi, üretici firmanın önerilerine uygun şekilde 100 U aktiviteye sahip olacak biçimde hazırlanmıştır.



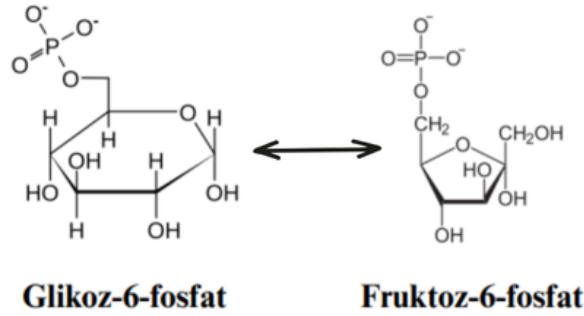
Şekil 3.22. Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşüm reaksiyonu

Dönüşüm reaksiyonu için eşit hacimlerde alınan 1000 ppm dekstroz çözeltisi ile 100 U heksokinaz çözeltisi bir vial içerisinde karıştırılmış ve karışımın son dekstroz konsantrasyonu 500 ppm olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan dekstroz–heksokinaz karışımı, HPLC sistemine yüklenmiş; sistem sıcaklığı 25 °C’ye sabitlenerek 48 saat süreyle dönüşüm takibi yapılmıştır.

HPLC analizi ile reaksiyon süresince glikoz-6-fosfat oluşumu kantitatif olarak izlenmiş ve dönüşüm kinetiği değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, enzimatik etkinlik ve substrat dönüşüm oranlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.7.3. Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümü

Glikoz-6-fosfatın Fruktoz-6-fosfata izomerizasyonu amacıyla (Şekil 3.23) yürütülen enzimatik dönüşüm çalışmaları kapsamında, 1000 ppm konsantrasyonunda glikoz-6-fosfat çözeltisi hazırlanmıştır. Bu işlemde kullanılmak üzere gerekli olan fosfoglikoizomeraz enzimi, laboratuvar ortamında rekombinant teknolojiyle elde edilmiştir.



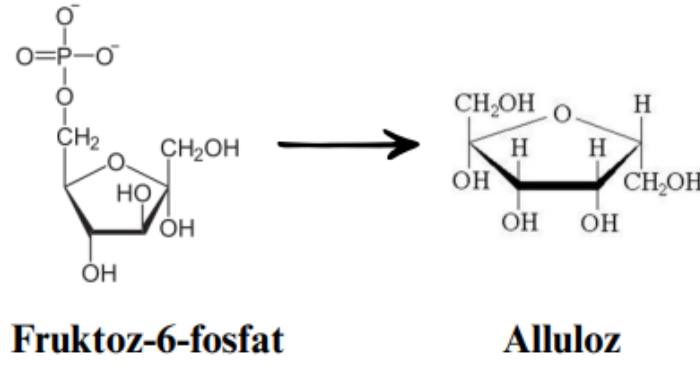
Şekil 3.23. Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşüm reaksiyonu

Dönüşüm reaksiyonu için, glikoz-6-fosfat çözeltisi ile fosfoglikoizomeraz enzimi eşit hacimlerde alınarak bir vial içerisinde karıştırılmış ve karışımın son glikoz-6-fosfat konsantrasyonu 500 ppm olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan enzim-substrat karışımı, izomerizasyonun kinetik takibi amacıyla HPLC sistemine yüklenmiş ve sistem sıcaklığı sabit tutularak 48 saatlik dönüşüm analizi başlatılmıştır.

HPLC analizleri aracılığıyla fruktoz-6-fosfat oluşumu zamana bağlı olarak kantitatif şekilde izlenmiş ve izomerizasyon verimliliği değerlendirilmiştir. Bu analiz, fosfoglikoizomeraz enziminin aktivitesinin ve reaksiyon koşullarının etkinliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.4. Fruktoz-6-fosfatın alluloza dönüşümü

Fruktoz-6-fosfattan alluloz elde edilmesine yönelik dönüşüm sürecinde (Şekil 3.24), 1500 ppm konsantrasyonunda fruktoz-6-fosfat çözeltisi hazırlanmıştır. Bu izomerizasyon ve defosforilasyon basamaklarını içeren reaksiyon sistemi için, laboratuvar ortamında rekombinant olarak üretilmiş olan alluloz 6-fosfat 3-epimeraz ve alluloz 6-fosfat fosfataz enzimleri kullanılmıştır.



Şekil 3.24. Fruktoz-6-fosfatın alluloza dönüşüm reaksiyonu

Fruktoz-6-fosfat çözeltisi ile her iki enzim çözeltisinden eşit hacimlerde alınarak steril koşullarda vial içinde karıştırılmış ve karışımın son fruktoz-6-fosfat konsantrasyonu 500 ppm'ye düşürülmüştür. Hazırlanan üçlü enzim-substrat karışımı, izomerizasyon ve defosforilasyon reaksiyonlarının kinetiğini izlemek amacıyla HPLC sistemine yüklenmiş ve reaksiyon sıcaklığı 50 °C'ye sabitlenerek 48 saat süreyle dönüşüm analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu süreçte HPLC ile yapılan kantitatif analizler, fruktoz-6-fosfat'ın önce alluloz-6-fosfata, ardından da alluloza dönüşümünü zamana bağlı olarak takip etmeye olanak sağlamıştır. Analiz sonuçları, enzimatik aktivitenin verimliliği ve dönüşüm oranlarının belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir.

3.2.7.5. HPLC analizleri

Niştastadan alluloz üretimi sürecinde meydana gelen ara ürünlerin olan glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat ile nihai ürün olan allulozun nicel olarak belirlenmesinde, Shimadzu Prominence-i LC-2030C model HPLC cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.25).

Analizlerde, fosfatlı şeker türevleri ile indirgen şekerlerin farklı kromatografik davranışları dikkate alınarak iki ayrı analiz yöntemi uygulanmıştır:

- Glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat tayinleri, fosfatlı şekerlere özgü kromatografik yöntem ile gerçekleştirilmiştir.
- Glikozdan glikoz-6-fosfat oluşumu sırasında harcanan glikoz ve dönüşüm sonunda oluşan alluloz miktarları ise indirgen şekerlere özgü analiz yöntemiyle belirlenmiştir.



Şekil 3.25. Çalışmalarda kullanılan HPLC cihazı

Her iki yöntemde de öncelikle analiz edilecek bileşiklerin sabit konsantrasyonlardaki standart çözeltileri hazırlanarak cihaza enjekte edilmiş, bu standartlara ait pik alanları belirlenmiştir. Numunelere ait kromatogramlarda gözlenen pik alanları ile standartların alanları karşılaştırılarak, ilgili bileşiklerin konsantrasyonları alan değişimleri üzerinden hesaplanmıştır. Uygulanan HPLC analiz koşulları aşağıda detaylandırılmıştır.

3.2.7.5.1. HPLC şeker analizi

Şekerlerin kantitatif tayininde HPLC cihazı kullanılmıştır. Glikoz ve allulozun belirlenmesine yönelik analizler aşağıda belirtilen kromatografik şartlar altında gerçekleştirilmiştir:

- Kolon : CarboSep 87C
- Mobil Faz : Ultra saf su
- Akış hızı : 0.4 mL/min
- Dedektör : RID
- Kolon sıcaklığı : 84 °C
- Enjeksiyon hacmi : 20 µL
- Analiz süresi : 90 dk

Analizlerde kullanılacak glikoz ve alluloz standart çözeltileri, 500 ppm konsantrasyonunda hazırlanmış ve her iki bileşiğin HPLC'deki alıkonma (retention) süreleri bu standartlar

kullanılarak tespit edilmiştir. Aşağıda, 500 ppm alluloz standardına ait kromatogram verilmiştir (Şekil 3.26).

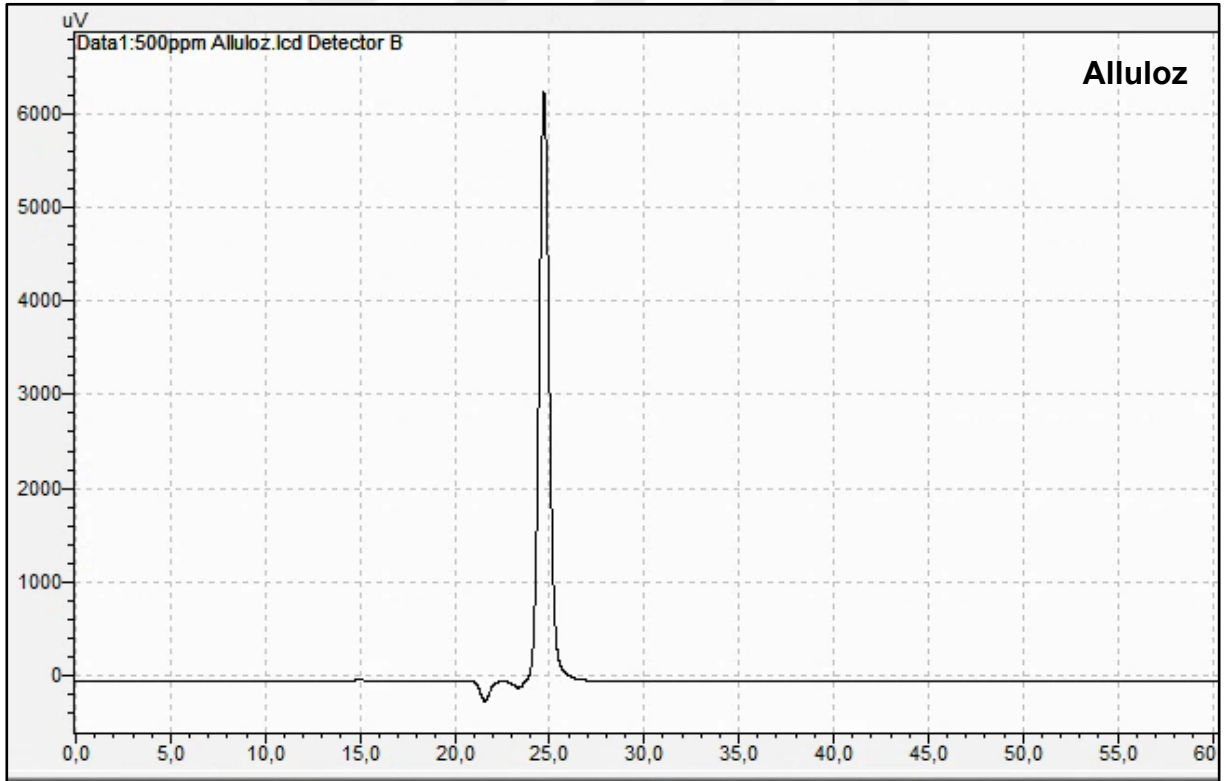
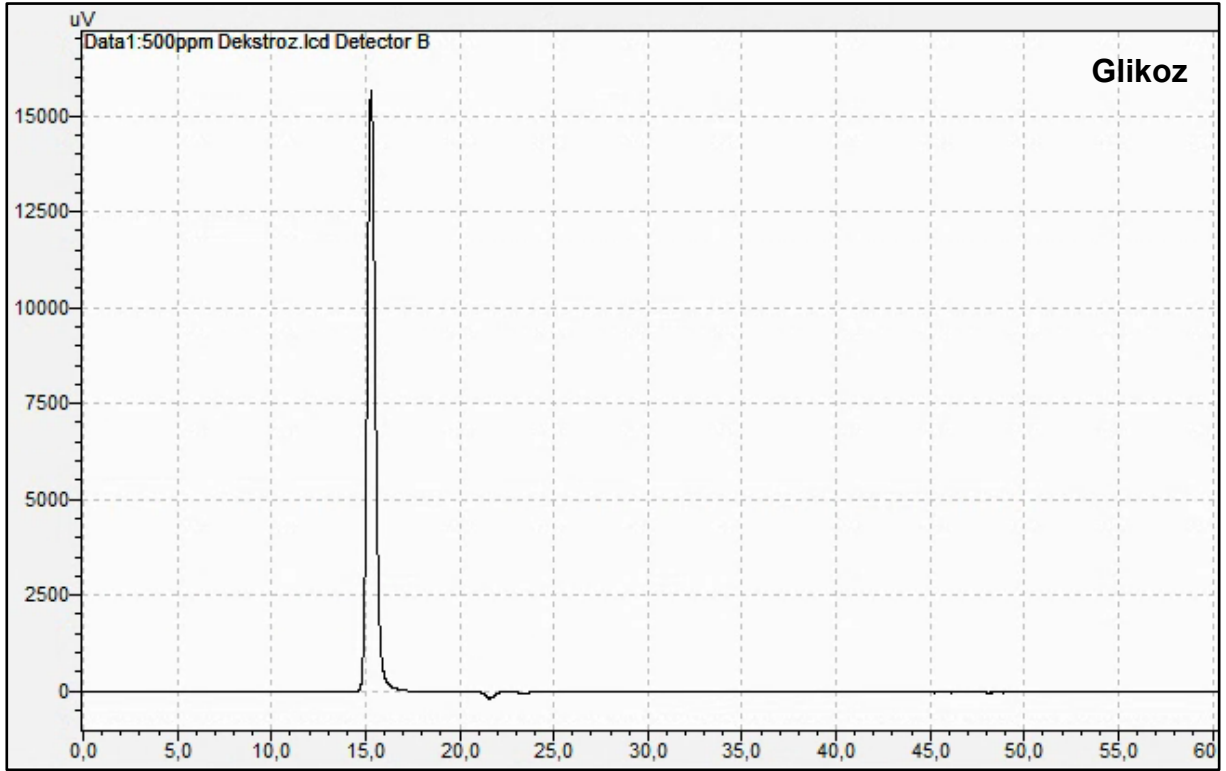
Glikoz ve allulozun kantitatif tayini için sırasıyla 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 3.27). Kalibrasyon eğrileri doğrusal regresyonla değerlendirilmiş ve elde edilen regresyon denklemleri, dönüşüm analizlerinde ürün miktarlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.2.7.5.2. HPLC fosfat analizi

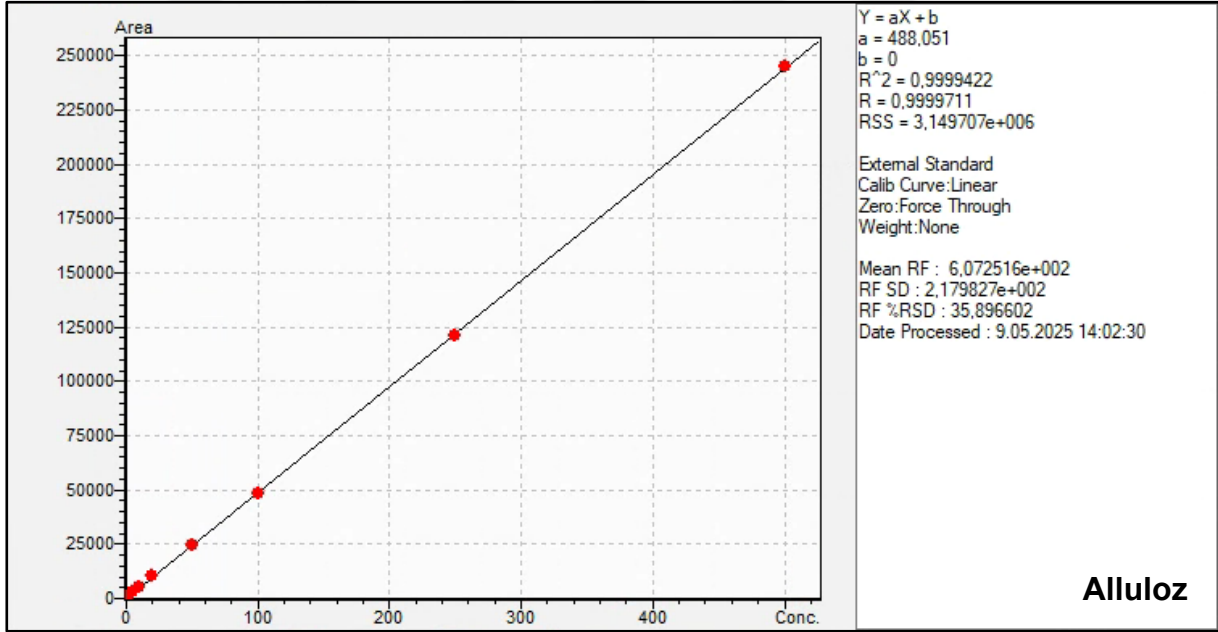
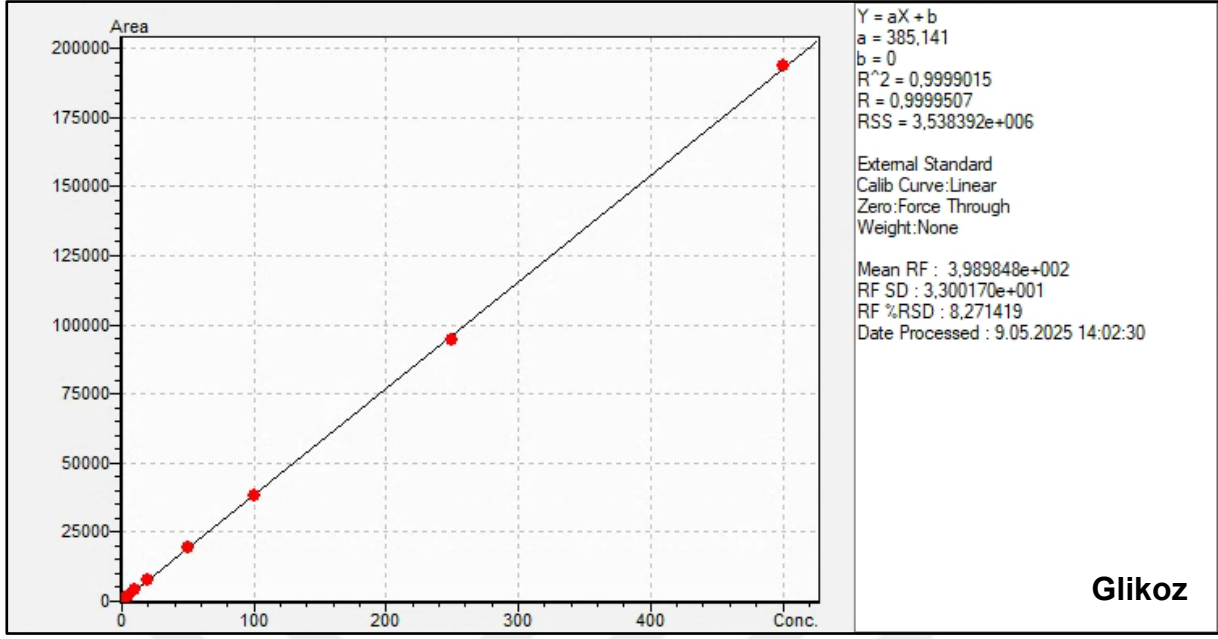
Glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat bileşiklerinin kantitatif analizi HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz, fosfatlı şekerler için optimize edilmiş kromatografik koşullar altında yürütülmüş olup analiz şartları aşağıda belirtilmiştir:

- Kolon : Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm I.D. x 250 mm)
- Mobil Faz : 150 mM Sodyum Fosfat Tamponu
- Akış hızı : 1 mL/dk
- Dedektör : PDA/RID
- Kolon sıcaklığı : 40 °C
- Enjeksiyon hacmi : 20 µL
- Analiz süresi : 120 dk

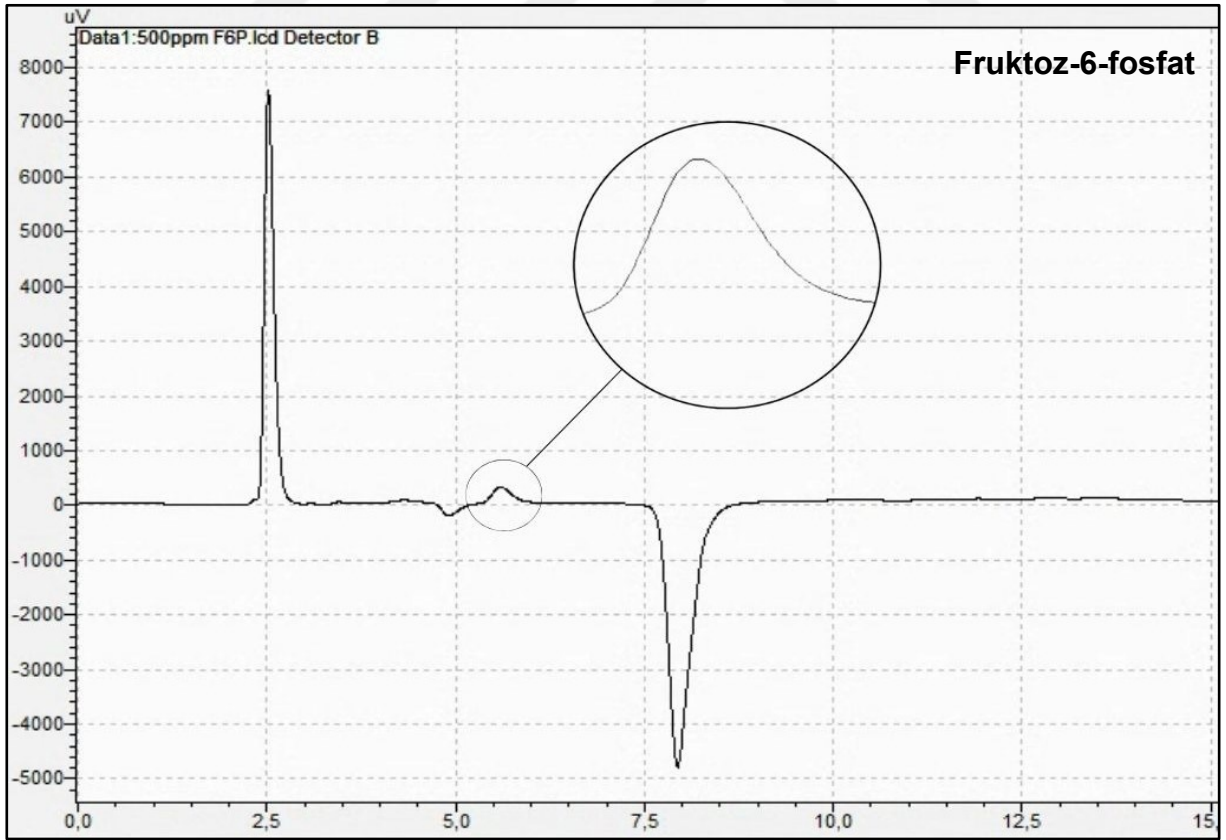
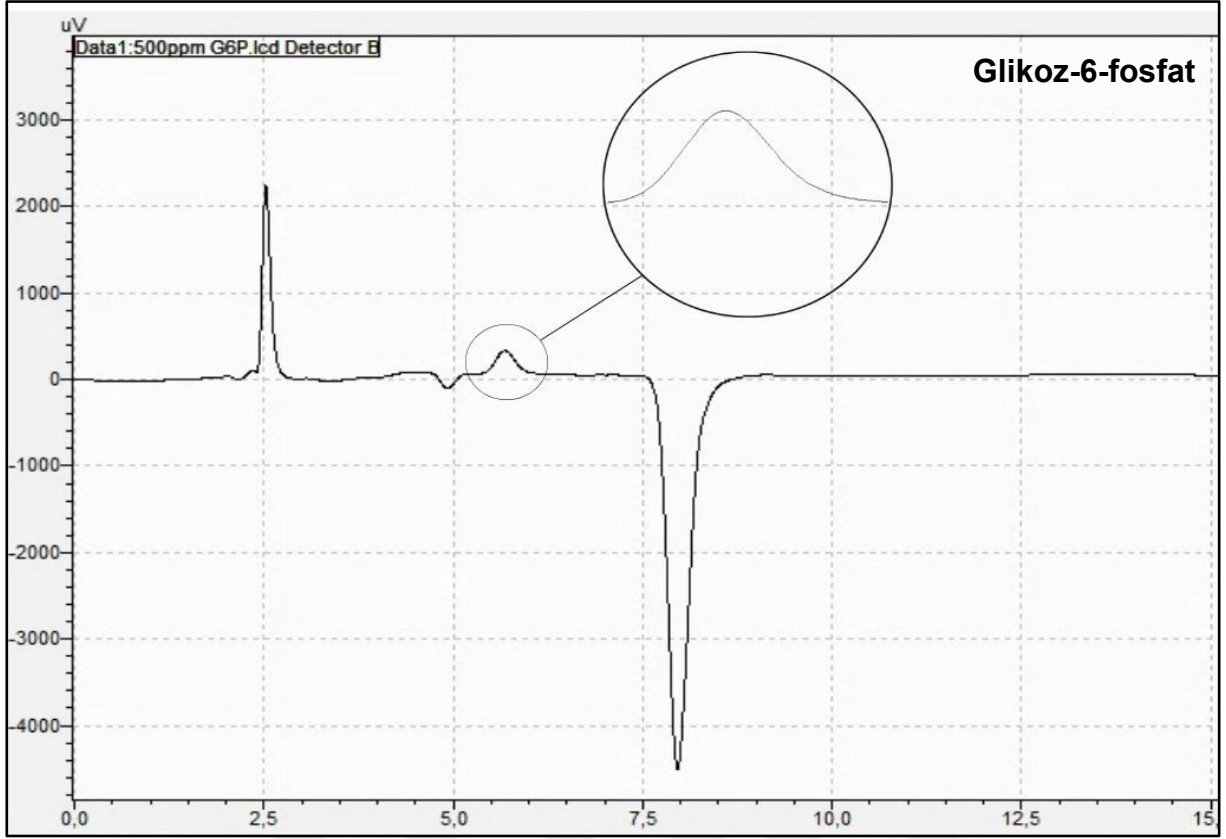
Analiz öncesinde, glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat standart çözeltileri 500 ppm konsantrasyonunda hazırlanmış ve bu standartların HPLC üzerindeki alıkonma (retention) süreleri belirlenmiştir. Aşağıda bu standart maddelere ait kromatogramlar verilmiştir (Şekil 3.28).



Şekil 3.26. Glikoz (500 ppm) ve alluloz (500 ppm) standardına ait HPLC kromatogramı

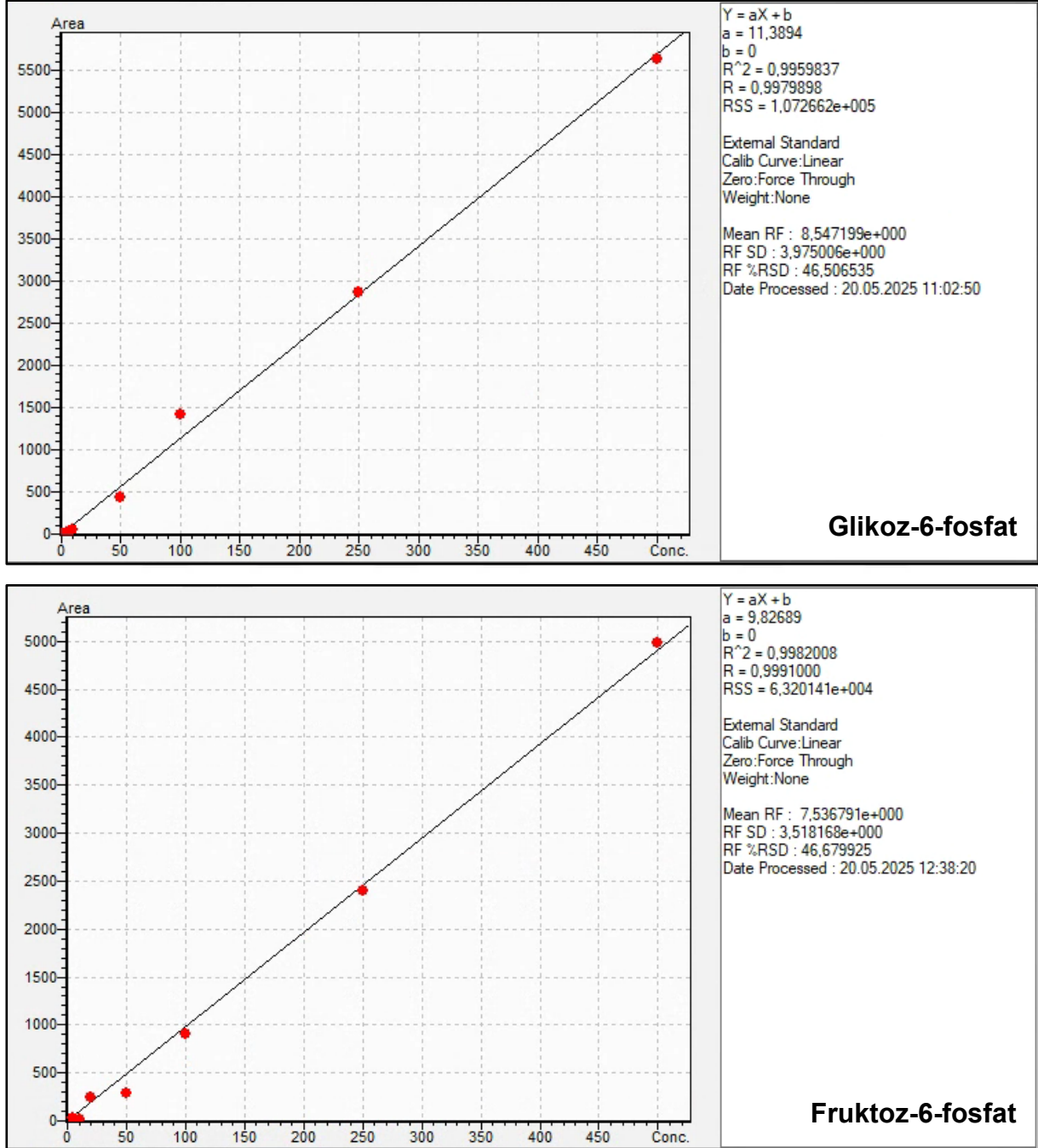


Şekil 3.27. Glikoz ve alluloza ait kalibrasyon eğrileri



Şekil 3.28. Glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat standardına ait HPLC kromatogramı

Bu bileşiklerin miktar tayini için ayrıca, sırasıyla 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen pik alanları doğrultusunda, her iki fosfatlı şeker için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş (Şekil 3.29) ve yüksek korelasyon katsayısı ($R^2 > 0.999$) elde edilmiştir.



Şekil 3.29. Glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfata ait kalibrasyon eğrileri

Bu kalibrasyon eğrileri kullanarak, dönüşüm deneylerinde harcanan glikoz-6-fosfat ve oluşan fruktoz-6-fosfat miktarları doğru ve güvenilir şekilde hesaplanmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, nişastadan başlayarak alluloz üretimine kadar uzanan çok basamaklı biyokimyasal dönüşüm süreci deneysel olarak değerlendirilmiştir. Her bir basamakta, hedef bileşiğe özgü rekombinant enzimler kullanılarak glikoz, glikoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat ve son ürün olan alluloz dönüşümleri gerçekleştirilmiştir. Ara ürünlerin ve son ürünün oluşumu HPLC yardımıyla belirlenmiş; şeker ve fosfatlı şeker analizlerine uygun metotlar kullanılarak nicel veriler elde edilmiştir. Ayrıca, her dönüşüm aşamasında zamana bağlı olarak örnekleme yapılmış ve reaksiyon kinetikleri değerlendirilmiştir. Bu bulgular, enzimatik dönüşüm basamaklarının verimliliği, reaksiyon süreleri ve ürün oluşum miktarları hakkında kapsamlı bilgiler vermiş olup, endüstriyel ölçekte biyokatalitik alluloz üretimi için temel veri niteliğindedir.

4.1. Klonlama Çalışmaları

4.1.1. Bakterilerden genomik DNA'ların izolasyonu

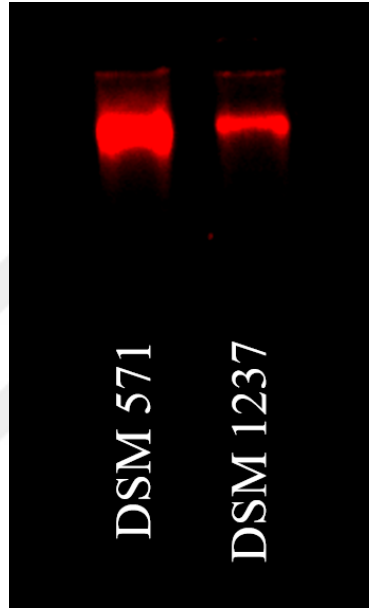
Bu çalışmada, hedef enzimlerin genetik kaynaklarını sağlamak amacıyla *C. thermocellum* ve *T. thermosaccharolyticum* suşlarından genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). İzolasyon işlemleri sonrasında elde edilen DNA örneklerinin bütünlüğü ve yeterliliği jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

Şekil 4.1'de sunulan görüntüde, her iki suşa ait genomik DNA bantlarının yoğun, kesintisiz ve dağılmamış bant yapısı gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, izolasyonun yüksek saflıkta ve bozulmadan gerçekleştirildiğini göstermektedir. Elde edilen genomik DNA örnekleri, ilerleyen PCR çoğaltma işlemlerine kadar -20 °C'de stabil şekilde muhafaza edilmiştir.

Her iki örnekte de yüksek moleküler ağırlığa sahip belirgin bant yapıları, DNA'nın başarılı şekilde izole edildiğini göstermektedir.

Jelde görüntülenen DNA'lar saflık analizi yapılmak üzere nanodrop spektrofotometre cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda *T. thermosaccharolyticum* suşundan izole edilen genomik DNA için A260/A280 oranı 1.68, *C. thermocellum* suşu için ise bu oran 2.34 olarak

okunmuştur. Saf bir DNA örneği için bu oranın yaklaşık 1.8 olması beklenir. DSM 571 için 1.8'den düşük çıkan bu değer DNA örneğinde protein kontaminasyonu olabileceğini veya DNA izolasyonu sırasında kullanılan proteinaz K gibi enzimlerin tamamen uzaklaştırılmamış olabileceğini göstermektedir. DSM 1237 için elde edilen 2.34 değeri ise DNA örneğinde RNA kalıntısı olabileceğini göstermektedir. Her iki DNA örneği de PCR çalışmalarında kullanılacağından dolayı, bir miktar protein ve RNA kontaminasyonunun sorun oluşturmayacağı düşünülmüş PCR çalışmalarına geçilmiştir.



Şekil 4.1. İzole edilen DNA'ların jel görüntüleme sisteminde görüntülenmesi

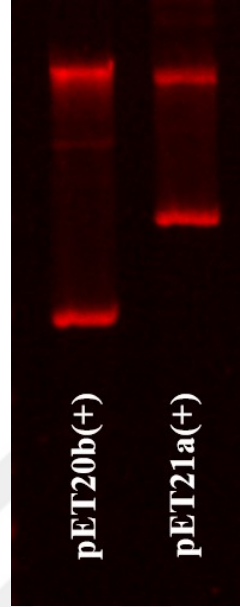
4.1.2. Plazmid DNA'ların izolasyonu

pET20b(+) ve pET21a(+) plazmid DNA'ları ticari izolasyon kiti kullanılarak konukçu *E. coli* bakterilerinden izole edilmişlerdir. Agaroz jel görüntüsü her iki plazmid DNA'nın da başarılı bir şekilde izole edildiğini ve klonlama çalışmalarında kullanılabilecek saflığa ve miktara sahip olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.2).

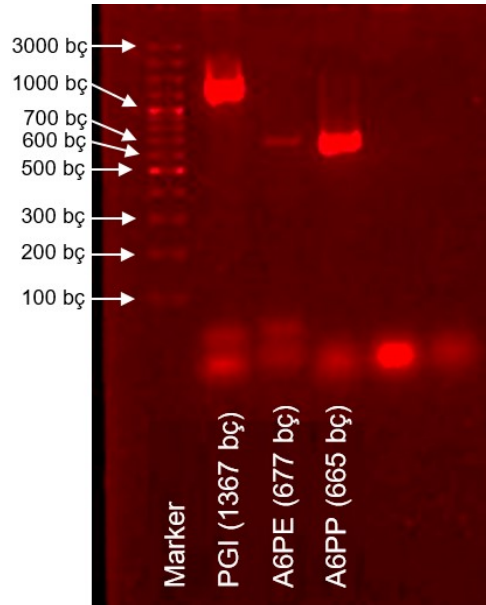
4.1.3. Enzimleri kodlayan genlerinin PCR ile çoğaltılması

Yapılan PCR çalışmaları sonucunda elde edilen ampliconların agaroz jel görüntüsü sırasıyla 1367, 677 ve 665 bp büyüklüğündeki *PGI*, *A6PE* ve *A6PP* genlerinin bakteri genomlarından başarılı bir şekilde çoğaltıldığını göstermiştir (Şekil 4.3). Gözlemlenen yoğun, kesintisiz ve

dağılmamış bant yapısı, istenmeyen yan ürünlerin oluşmadığını ve optimizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.



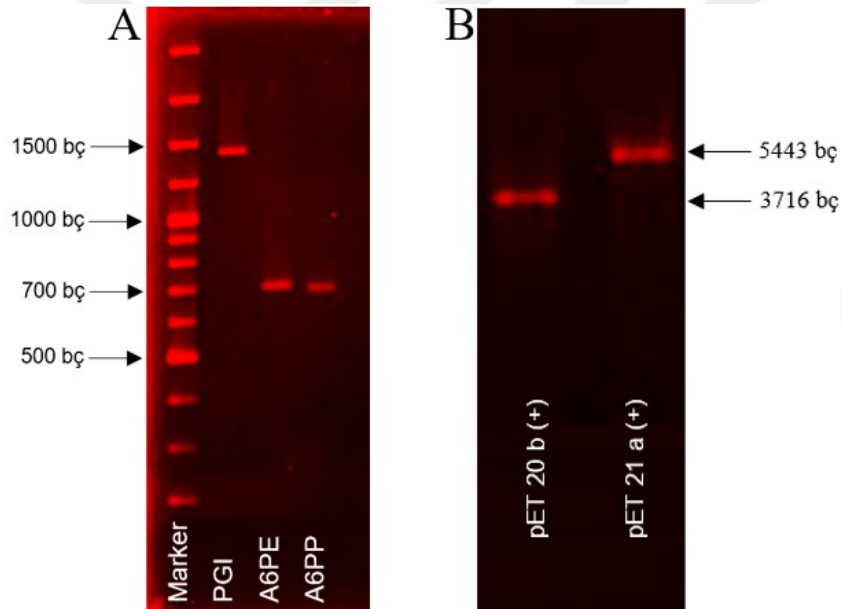
Şekil 4.2. İzolasyonu gerçekleştirilen plazmid DNA'ların agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.3. PCR'da çoğaltılan genlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.1.4. PCR ürünü genler ile plazmid DNA'ların restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi ve agaroz jelden saflaştırılması

PGI geninin klonlanacağı pET-21a(+) vektörü *XhoI*, A6PE ve A6PP genlerinin klonlanacağı pET-20b(+) vektörü ise sırasıyla *BamHI* ve *NdeI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Yine aynı şekilde PGI, A6PE ve A6PP gen amplikonları da sırasıyla *XhoI*, *BamHI* ve *NdeI* enzimleriyle kesilmişlerdir. Kesimi tamamlanan genler ve plazmid DNA'lar agaroz jelde elektroforez edildikten sonra Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction Kit kullanılarak agaroz jel bloklarından saflaştırılmış ve böylece reaksiyon bileşenlerinden arındırılmışlardır. Saflaştırma sonrasında genler (Şekil 4.4A) ve plazmid DNA'lar (Şekil 4.4B) tekrar agaroz jelde yürütülerek ligasyon öncesi son kontrolleri yapılmıştır.



Şekil 4.4. Restriksiyon endonükleazla kesimleri yapılan ve agaroz jel bloklarından saflaştırılan PCR ürünü genler (A) ve plazmid DNA'lara (B) ait agaroz jel bantları

4.1.5. Genlerin plazmid DNA'lara ligasyonu ve transformasyon

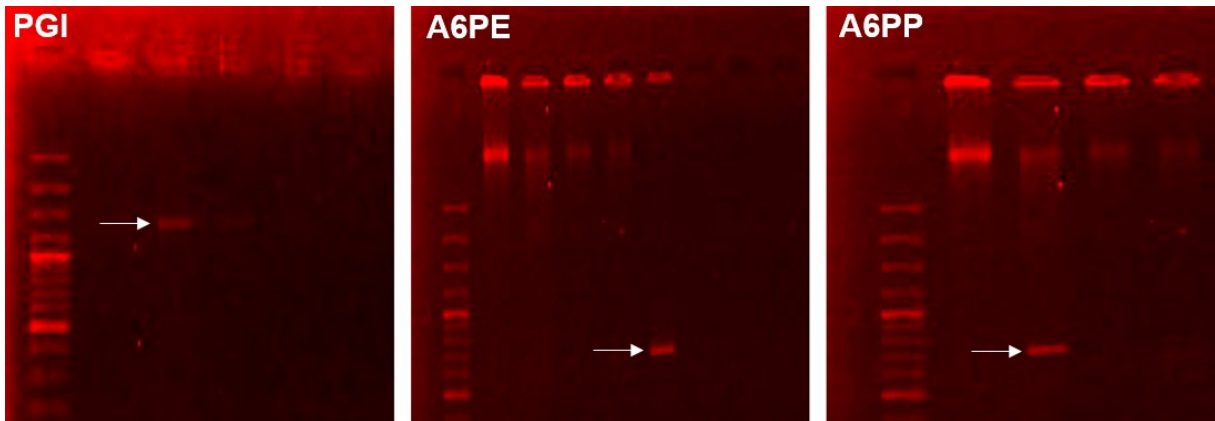
PGI/*XhoI*, A6PE/*BamHI* ve A6PP/*NdeI* genleri sırasıyla pET-21a(+)/*XhoI*, pET-20b(+)/*BamHI* ve pET-20b(+)/*NdeI* plazmid DNA'larına T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak takılmıştır. Elde edilen rekombinant vektörler kompetent hale getirilmiş olan *E. coli* rosetta hücrelerine transfer edilmişlerdir. Transformasyon işlemi sonrasında transformasyon plaklarında 10-12 arasında değişen sayılarda rekombinant bakteri kolonilerinin geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.5). Sadece restriksiyon enzimleriyle kesilmiş vektör DNA'ların kullanıldığı negatif kontrol olan

transformasyon plağında hiçbir koloni gelişimi gözlenmezken, boş plazmid DNA'ların transfer edildiği pozitif kontrol gruplarında çok sayıda koloni oluşumu meydana gelmiştir.



Şekil 4.5. Transformasyon sonucu LB agar plaklarında gelişen rekombinant bakteri kolonileri

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerin rekombinant plazmid taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan koloni PCR çalışmaları sonucunda agaroz jel görüntüleri, her üç genin de klonlandığı birer adet rekombinant bakterinin bulunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.6).

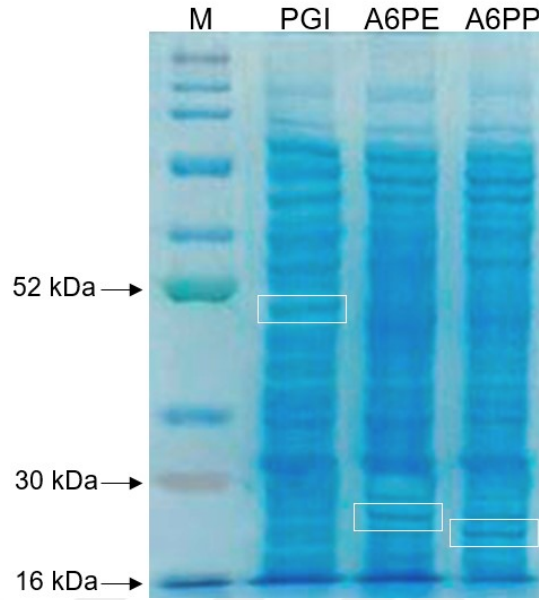


Şekil 4.6. Koloni PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü

4.2. Toplam Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektrofrez

Transformasyon sonrasında rekombinant protein ekspresyonu, IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) ile indüklenmiş ve elde edilen hücre lizatları SDS-PAGE analizi ile değerlendirilmiştir. Koloni PCR sonucu pozitif sonuç veren (rekombinant plazmid DNA'yı

alan) bakterilerden sonikatör kullanılarak izole edilen proteinler SDS-PAGE’de elektroforez edilmiş ve boyama işlemleri tamamlandıktan sonra genlerin ekspresyonunu teyit eden enzim bantları görüntülenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PGI, A6PE ve A6PP enzimlerinden sorumlu bantların SDS-PAGE görüntüsü (M: Marker)

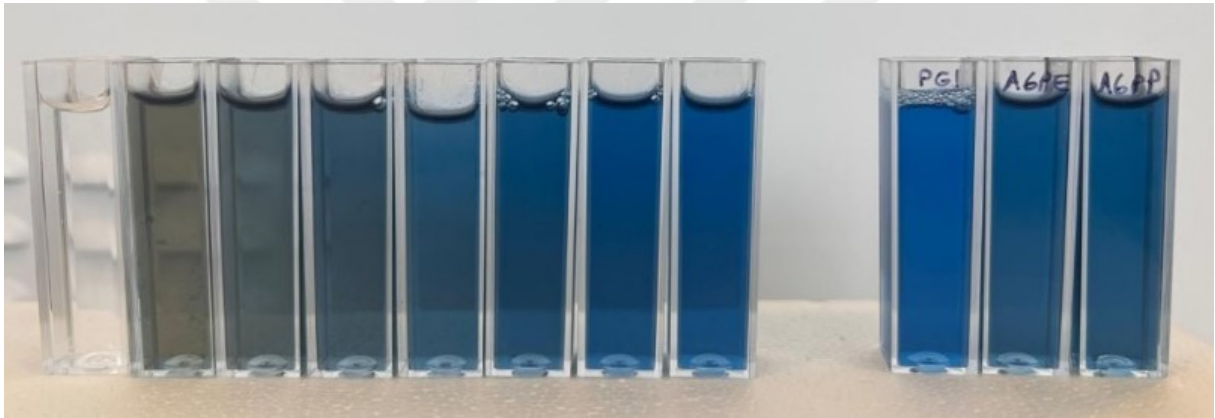
Analiz, protein saflaştırma işlemi gerçekleştirilmeden, doğrudan toplam hücre proteinlerinin elektroforeze tabi tutulmasıyla yapılmıştır. Bu nedenle jel üzerinde yalnızca hedef enzim bantları değil, hücresel proteinlere ait çok sayıda bant da gözlemlenmiştir. Önceki literatür verileri (Li ve ark., 2021) dikkate alınarak, PGI enziminin yaklaşık moleküler ağırlığının 46 kDa, A6PE ve A6PP enzimlerinin ise sırasıyla 25 ve 24 kDa büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir. İlgili moleküler ağırlıklara karşılık gelen bantlar Şekil 4.7’de beyaz dikdörtgen içerisine alınarak gösterilmiştir.

Şekilde görülen bu bantlar, her üç enzimin de *E. coli* rosetta hücrelerinde başarıyla eksprese edildiğini ve toplam protein ekstraktı içerisinde belirgin şekilde üretildiğini göstermektedir. Bu bulgular, transformasyon ve ekspresyon işlemlerinin başarıyla gerçekleştirildiğini ve ileri saflaştırma ile fonksiyonel analiz aşamalarına geçilebileceğini teyit etmektedir.

4.3. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Rekombinant olarak elde edilen PGI, A6PE ve A6PP enzimlerinin toplam protein miktarları, Bölüm 3.2.6.3'te detayları verilen Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu yöntemde, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası proteinle bağlandığında oluşan mavi renk tonundaki değişim spektrofotometrik olarak 595 nm'de ölçülmüştür. Analiz sırasında farklı konsantrasyonlardaki BSA (Bovine Serum Albumin) standart çözeltileri kullanılmış, bu standartlar aracılığıyla kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Şekil 4.8'de, sırasıyla standart çözeltiler ve analiz edilen enzim örneklerinin renk değişimleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Gözle görülür renk farkları, protein konsantrasyonundaki artışla paralel şekilde koyulaşmıştır.



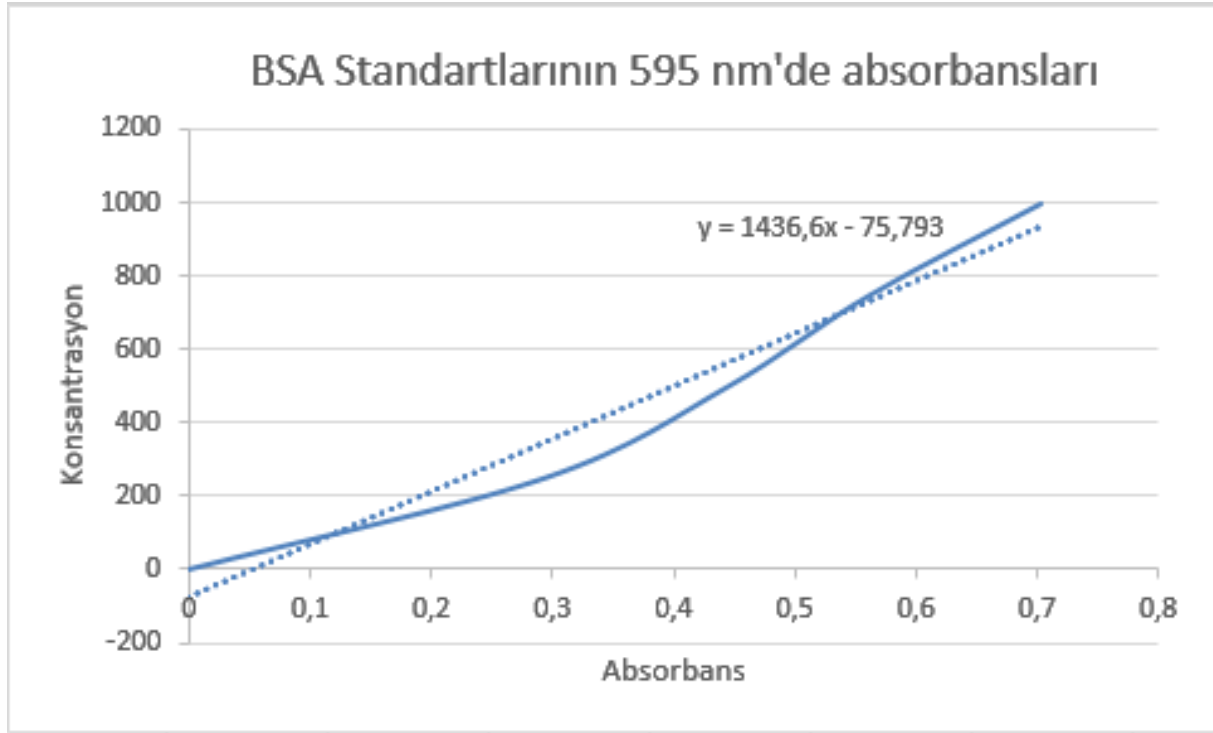
Şekil 4.8. Bradford yöntemi için hazırlanan standart çözeltiler ve protein miktar tayini yapılan enzimler

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA standart çözeltilerinin 595 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş, doğrusal regresyon denklemine göre $y=1436.6x-75.793$ formülü elde edilmiştir (Şekil 4.9). Burada, y absorbans değerini ve x ise protein konsantrasyonunu temsil etmektedir.

Bradford analizinde 595 nm'de elde edilen absorbans değerleri:

- PGI enzimi : 0.694
- A6PE enzimi : 0.323
- A6PP enzimi : 0.302

olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA standartlarının 595 nm'de ölçülen absorbansları

Bu değerlere karşılık gelen konsantrasyonlar, kalibrasyon eğrisinden hesaplandığında, her bir enzim için protein miktarı:

- PGI enzimi : 921.2 µg/mL
- A6PE enzimi : 388.2 µg/mL
- A6PP enzimi : 358.0 µg/mL

olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, elde edilen rekombinant enzimlerin toplam protein içeriğinin kantitatif olarak başarılı bir şekilde tespit edildiğini ve özellikle PGI enziminin daha yüksek oranda eksprese edildiğini göstermektedir.

4.4. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivite tayinleri, Bölüm 3.2.23.'te ayrıntılı olarak açıklanan protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir enzim için gerekli tamponlar ve reaksiyon çözeltileri hazırlandıktan sonra, analizler uygun sıcaklık ve pH koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler, enzim-substrat etkileşimleri sonucunda meydana gelen absorbans değişimini izleyerek enzim aktivitesini belirlemek amacıyla 850 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Ölçümler sonucunda;

– A6PE enzimi için	0.385
– A6PP enzimi için ise	0.673

absorbansta artış tespit edilmiştir.

Bu absorbans artışları, enzimlerin aktif olduğunu ve substrat üzerinde reaksiyon gerçekleştirdiğini göstermektedir. Özellikle A6PP enziminin daha yüksek absorbans değeri sergilemesi, test edilen koşullar altında bu enzimin daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu veriler, enzimlerin rekombinant olarak eksprese edilip biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebildiklerini göstermesi bakımından önemli bir bulgudur.

4.5. Üretilen Enzimler Kullanılarak Nişastanın Alluloza Dönüşümü

4.5.1. Nişastadan glikoz üretimi

Nişastadan glikoz üretimi prosesi sonucunda, ürünün DE değeri ≥ 95 düzeyine ulaşarak yüksek saflıkta glikoz çözeltisi elde edilmiştir. Nihai ürünün refraktometrik ölçümle belirlenen Briks değeri 31–34 aralığında bulunmuştur.

Sakkarifikasyonun ardından elde edilen dekstroz çözeltisi, içerdiği protein ve kolloidal maddelerin uzaklaştırılması amacıyla vakum filtre sisteminden geçirilmiştir. Bu işlem sayesinde özellikle protein fraksiyonları ortamdan uzaklaştırılmış ve berrak bir dekstroz şurubu elde edilmiştir.

Filtrasyon sonrası çözeltinin dekstroz içeriği ve saflığı HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Ayrıca, çözeltinin DE değeri klasik Lane-Eynon titrasyon metodu ile doğrulanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, elde edilen ürünün berrak, yüksek saflıkta ve endüstriyel kullanıma uygun dekstroz şurubu formuna ulaştığı tespit edilmiştir.

4.5.2. Glikozdan glikoz-6-fosfat üretimi

Glikozdan glikoz-6-fosfat üretiminde, glikozun heksokinaz enzimi aracılığıyla glikoz-6-fosfata (G6P) dönüşüm süreci değerlendirilmiştir. Reaksiyon kinetiği, zamana bağlı olarak HPLC yöntemi ile takip edilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalar, Bölüm 3.2.7.2’de açıklanan yöntemle uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı, 25 °C’de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Substrat olarak kullanılmak üzere 500 ppm’lik glikoz çözeltisi hazırlanmış ve üzerine 0.5 mL heksokinaz enzimi ilave edilmiştir.

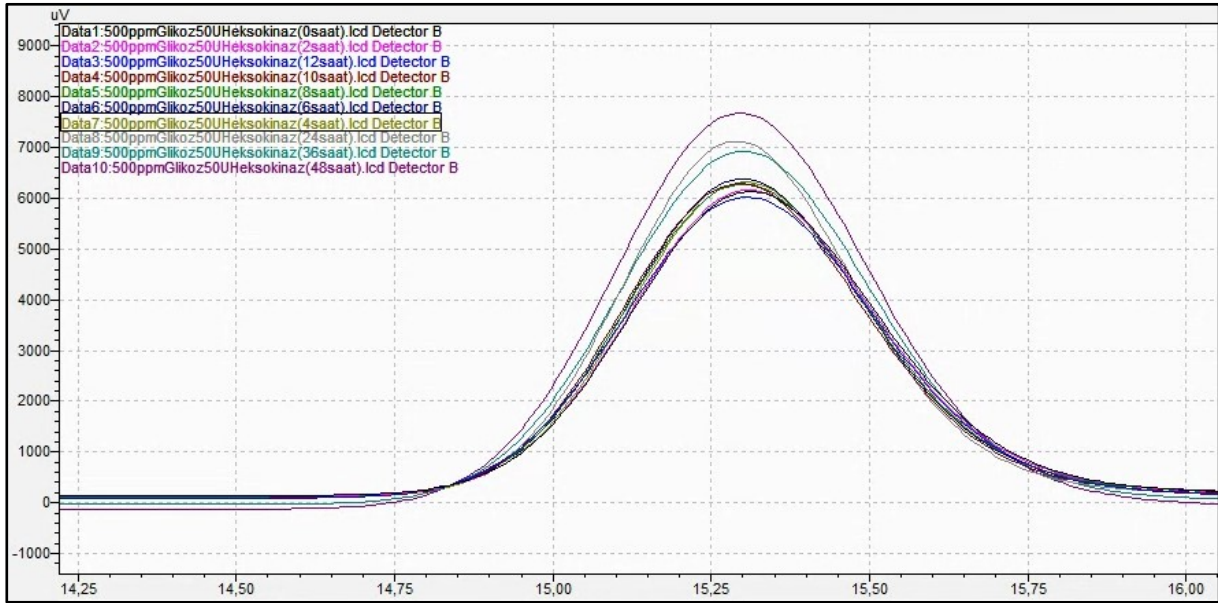
Şekil 4.10’da sunulan HPLC kromatogramlarında, 0–48 saatlik zaman aralığında her 2 saatte bir elde edilen örneklerin glikoz pik alanlarındaki değişimler gösterilmiştir. Tüm analizler, aynı dedektör koşullarında gerçekleştirilmiş ve sonuçların karşılaştırılabilir olduğu teyit edilmiştir. Glikozun karakteristik pikinin alıkonma süresinin yaklaşık 15.25 dakikada olduğu gözlemlenmiştir. Zaman ilerledikçe glikozun pik alanlarında belirgin bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu azalma, heksokinaz enzimi aracılığıyla glikozun G6P’ye dönüştürüldüğünü açıkça ortaya koymuştur.

Şekil 4.11’de glikoz konsantrasyonunun zamana bağlı olarak değişimi grafiksel olarak verilmiştir. Başlangıçta 518 ppm olarak belirlenen glikoz konsantrasyonu, ilk 960 dakika (yaklaşık 16 saat) içerisinde hızlı bir düşüş göstererek yaklaşık 432 ppm seviyesine gerilediği tespit edilmiştir. Bu azalma, enzimin yüksek katalitik etkinlikle çalıştığını ve bu evrede substrata karşı yüksek seçicilik gösterdiğini (yüksek afinite gösterdiği) belirtmektedir. Bu süreçte, enzimin maksimum dönüşüm hızına (V_{max}) ulaştığı düşünülmektedir.

16–24 saat aralığında, glikoz konsantrasyonunda beklenmedik bir artış eğilimi gözlemlenmiştir. Bu artışın;

- Glikoz-6-fosfatın spontan hidrolizi sonucu glikozun tekrar açığa çıkmasından,
- Sistemde bulunan olası fosfataz aktivitesinden ya da

- Geri dönüşümlü enzimatik reaksiyonlardan kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.



Şekil 4.10. Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümünde harcanan glikozdaki değişim kromatogramı



Şekil 4.11. Glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümü esnasında zamana bağlı azalış grafiği

Ayrıca, glikoz izomerizasyonu veya çözeltide bulunan diğer karbonhidratların parçalanması sonucu serbest glikoz oluştuğu da değerlendirilmiştir. Bu durum, dönüşüm sürecinin yalnızca

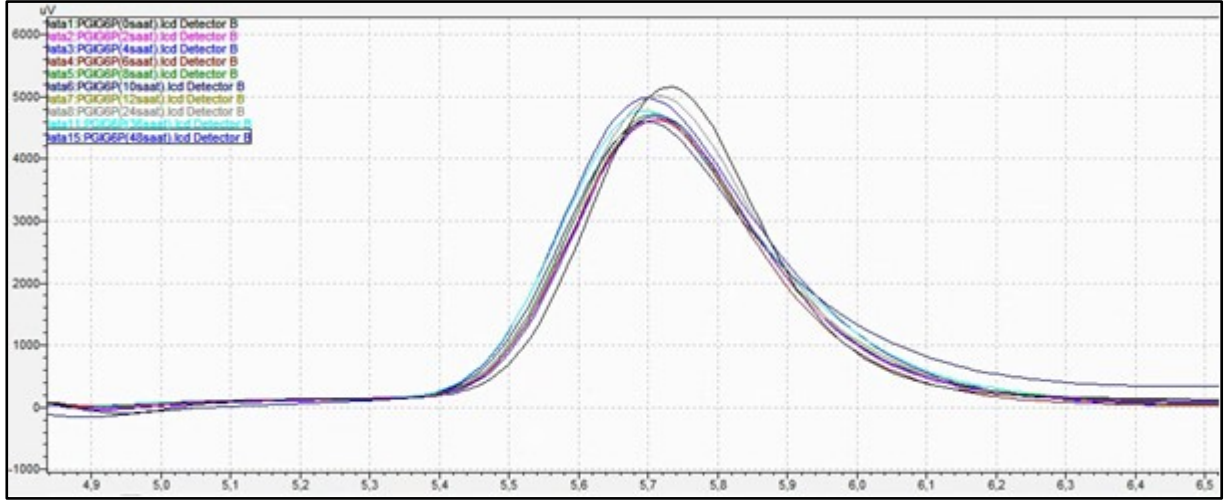
tek yönlü ve basit bir reaksiyon olmadığını, daha karmaşık bir metabolik ağın parçası olduğunu göstermiştir.

24–48 saatlik zaman diliminde ise glikoz konsantrasyonundaki değişimin oldukça sınırlı olduğu belirlenmiştir. Bu fazda reaksiyon hızının yavaşladığı ve sistemin dengeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu durum, substrat tüketiminin azalması, enzim aktivitesinin düşmesi ya da inhibitör bileşiklerin birikmesi ile açıklanmıştır. Aynı zamanda, enzimin yarı ömrünü tamamlamasıyla aktivitesinde azalma meydana gelmiş olabileceği de dikkate alınmıştır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, heksokinaz enziminin glikozun G6P'ye dönüşümünde etkili olduğu belirlenmiştir. İlk 16 saatlik zaman diliminde hızlı bir substrat tüketimi gerçekleşmiş ve bu süreç, klasik Michaelis-Menten kinetiği ile uyumlu bir başlangıç fazı olarak değerlendirilmiştir. Ancak 16–24 saat arasında gözlemlenen konsantrasyon artışı, sistemin yalnızca basit bir enzim-substrat etkileşimiyle açıklanamayacağını ve çok basamaklı, geri dönüşümlü biyokimyasal tepkimelerin söz konusu olabileceğini ortaya koymuştur. Bu durum, heksokinaz ile yürütülen glikoz fosforilasyonunun metabolik sistem içerisinde yalnızca başlangıç aşamasını oluşturduğunu ve daha geniş kapsamlı süreçlerle etkileşim halinde olduğunu göstermiştir.

4.5.3. Glikoz-6-Fosfattan fruktoz-6-fosfat üretimi

Glikoz-6-fosfatın (G6P), fruktoz-6-fosfata (F6P) dönüşüm reaksiyonu, glikoz-6-fosfat enzimi aracılığıyla yürütülmüş ve süreç boyunca dönüşüm kinetiği zamana bağlı olarak izlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar, bölüm 3.2.7.3'te ayrıntılı olarak açıklanmış olup, son konsantrasyonu 500 ppm olan G6P çözeltisi hazırlanarak 50°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi, her 2 saatte bir alınan örneklerin HPLC cihazı ile analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süreci boyunca elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle Şekil 4.12'de, glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümünün zamana bağlı olarak izlemek amacıyla elde edilen HPLC kromatogramları; Şekil 4.13'te ise bu sürece ait glikoz-6-fosfat (G6P) konsantrasyonundaki değişimin zamana karşı grafiksel olarak kinetik profili verilmiştir.

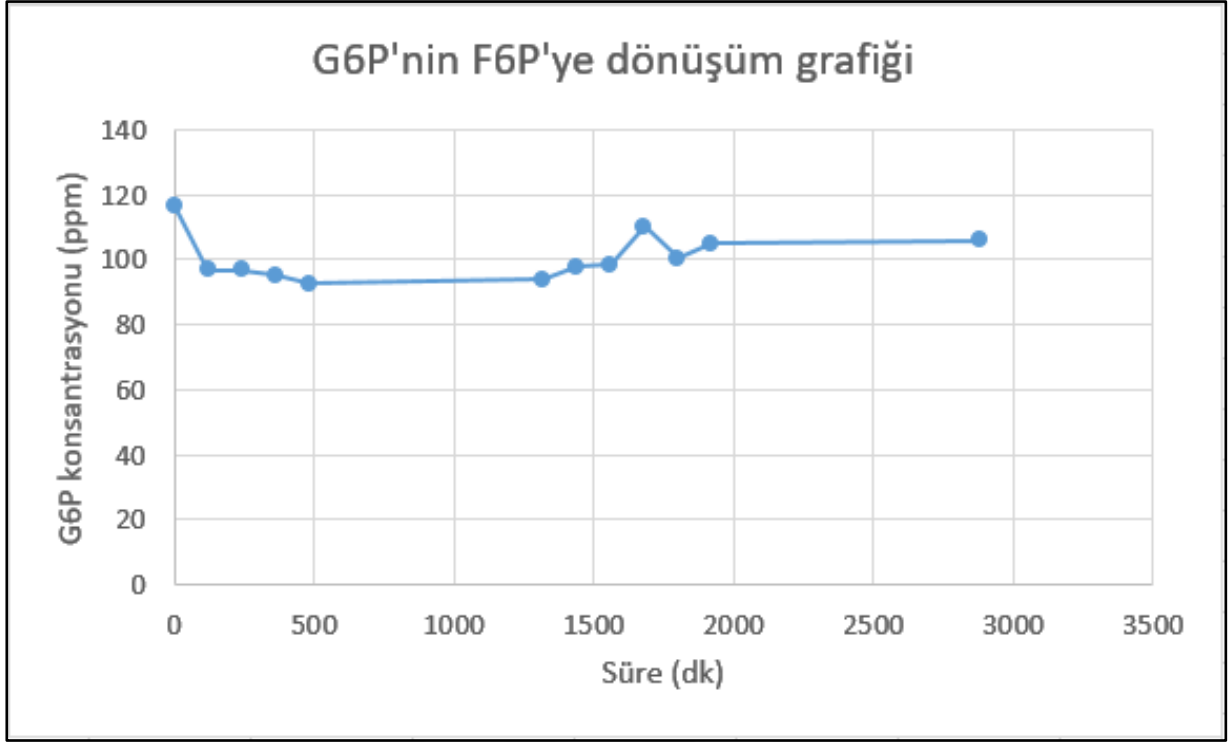


Şekil 4.12. Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümünün 48 saatlik kromatogramı

Şekil 4.12’de verilen HPLC kromatogramlarının incelenmesiyle de görülebileceği gibi, 48 saatlik süre boyunca G6P piki yüksekliğinde meydana gelen değişimleri göstermektedir. Alıkonma süresine göre, zaman ilerledikçe G6P’ye ait pik alanlarında belirgin farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu farklılıklar, izomeraz katalizi sonucu G6P’nin F6P’ye dönüştüğünü göstermiştir.

Şekil 4.13’te, G6P konsantrasyonunun zamanla değişimi grafiksel olarak verilmiştir. Başlangıçta yaklaşık 120 ppm olan G6P konsantrasyonunun ilk 240 dakikada (4 saat) hızlı bir azalma göstererek yaklaşık 95 ppm düzeyine düştüğü belirlenmiştir. Bu durum, enzimin başlangıç evresinde yüksek katalitik verimle çalıştığını ve substrata karşı güçlü bir tanıma ve bağlanma özelliği sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu faz, klasik enzim kinetiği açısından hızlı başlangıç fazı (initial velocity phase) olarak değerlendirilmiştir.

İlk 4 saatin ardından, 8. saate kadar G6P seviyesindeki azalma hızı belirgin biçimde yavaşlamış; izomerizasyonun daha düşük bir hızla devam ettiği gözlemlenmiştir. Bu duraklama, enzimin substrat doygunluğuna yaklaşması, kofaktör dengesizlikleri ya da potansiyel geri dönüşüm mekanizmalarının devreye girmesiyle açıklanabilir. Glikoz-6-fosfat (G6P) ile fruktoz-6-fosfat (F6P) arasındaki dönüşümün termodinamik olarak dengelenebilir bir izomerizasyon reaksiyonu olması durumunda, reaksiyon hızında gözlenen yavaşlamalar, literatürde enzimatik izomeraz sistemlerine özgü karakteristik bir kinetik davranış olarak tanımlanmış ve çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2018).



Şekil 4.13. Glikoz-6-fosfat'ın fruktoz-6-fosfata dönüşüm grafiği

Reaksiyonun 8–22 saatlik sürecinde ise G6P konsantrasyonunun neredeyse sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu durum, sistemin kimyasal denge durumuna hemen hemen ulaştığını ve net dönüşüm hızının sıfıra yaklaştığını göstermektedir. Bu aşamada, ileri ve geri reaksiyon hızlarının birbirine yaklaştığı ve izomeras aktivitesinin tam anlamıyla reversibl (geri dönüşümlü) çalıştığı kanısına varılmıştır. İzomerasların çift yönlü katalitik özellik göstermesi, bu sonucu destekleyen temel enzimolojik gerçeklerden biridir.

Daha dikkat çekici bir bulgu ise 26–28 saat aralığında G6P konsantrasyonunda gözlenen yeniden artış eğilimidir. Bu artışın, F6P'nin geri dönüşümlü olarak G6P'ye izomerize edilmesiyle açıklanabileceği düşünülmektedir. Bu aşamada, sistemdeki NAD(P)⁺/NAD(P)H dengesi, sıcaklık-kararlılık profili ve iyonik ortamın da reaksiyon yönü üzerinde etkili olduğu değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, F6P'nin G6P'ye dönüşümünü destekleyebilecek potansiyel izomeras ya da diğer enzimatik etkiler sistemde mevcut olabilir.

48. saate kadar olan süre içinde G6P konsantrasyonunda küçük dalgalanmaların devam ettiği gözlemlenmiştir. Bu durum, glikoz-6-fosfat ile fruktoz-6-fosfat arasında dinamik bir reaksiyon

dengesi olduğunu ve sistemin ileri–geri dönüşümlü izomerizasyon mekanizmasına sahip olduğunu açıkça göstermektedir.

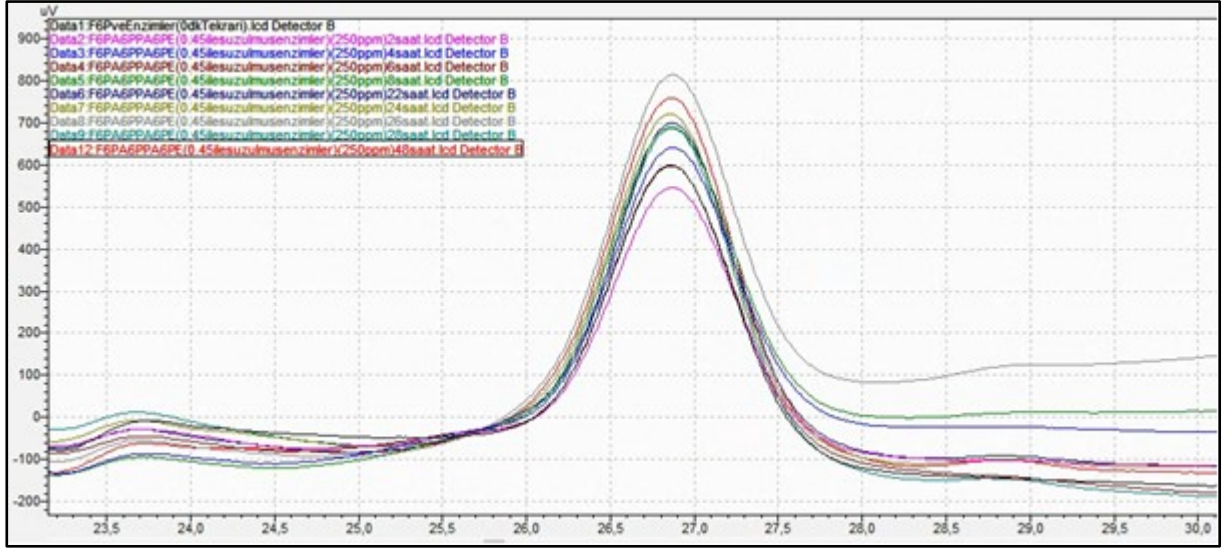
Elde edilen veriler, glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümünün, fosfoglikoizomeraz enzimi aracılığıyla başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. İlk birkaç saat içinde reaksiyonun hızlı ilerlemesi, enzimin yüksek katalitik yeterliliğe sahip olduğunu göstermiştir. Ancak daha sonra reaksiyonun belirli bir dengeye ulaşması ve ileri-geri dönüşümlü dalgalanmalar göstermesi, bu sürecin sadece tek yönlü ve lineer bir dönüşüm olmadığına; aksine termodinamik dengeye yönelen, çift yönlü ve kompleks bir izomerizasyon mekanizması içerdiğine işaret etmiştir.

Bu bağlamda, $G6P \rightarrow F6P$ dönüşüm reaksiyonu, yalnızca substrat–ürün dönüşümünü değil, aynı zamanda enzim–substrat denge ilişkisini, çevresel koşulların (pH, sıcaklık, iyonik denge) etkisini ve izomerazın reversibilitesini birlikte değerlendirmeyi gerektiren çok aşamalı bir biyokimyasal süreç olarak karakterize edilmiştir.

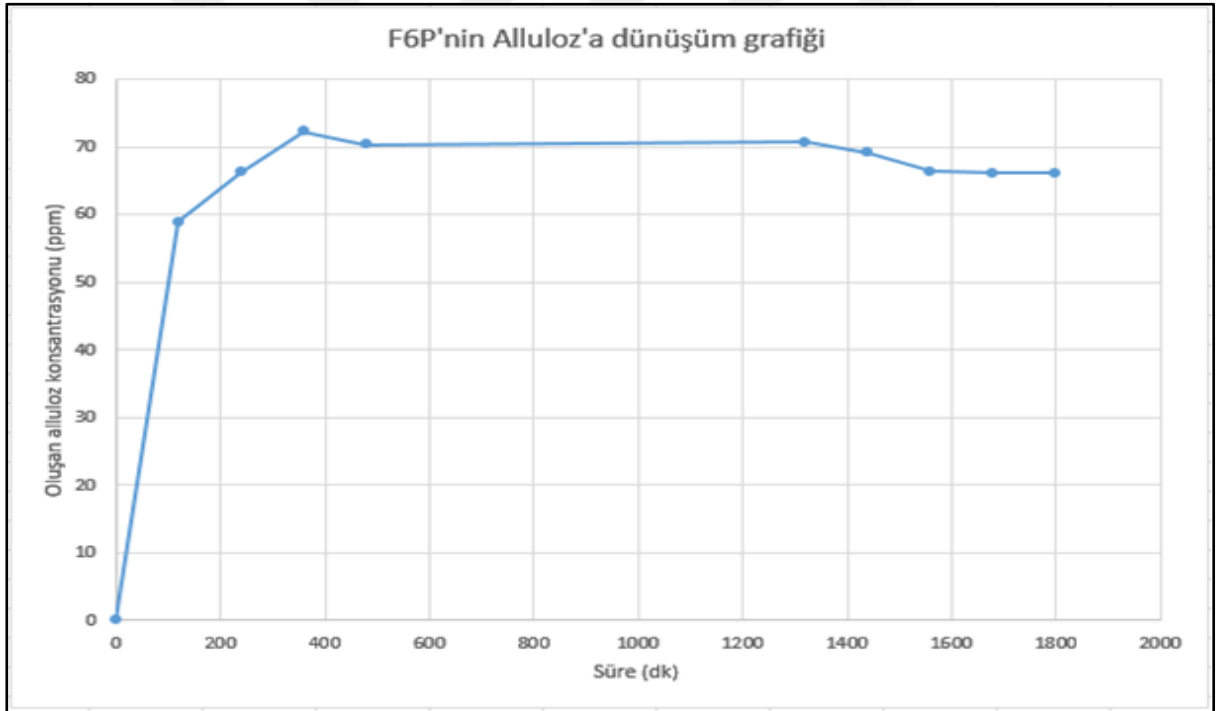
4.5.4. Fruktoz-6-fosfattan alluloz üretimi

Fruktoz-6-fosfatın (F6P) alluloza izomerizasyonu, Bölüm 3.2.7.4’te açıklanan yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Son konsantrasyonu 500 ppm olan F6P çözeltisi hazırlanmış ve reaksiyon karışımı, 50 °C’de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Dönüşüm süreci boyunca her 2 saatte bir örnek alınarak HPLC ile analiz yapılmıştır. Elde edilen kromatografik veriler Şekil 4.14’te, zamana bağlı olarak oluşan alluloz konsantrasyonu ise Şekil 4.15’te grafiksel olarak verilmiştir.

Şekil 4.15’te gösterildiği üzere, reaksiyonun ilk evresi olan 0–6 saatlik zaman diliminde alluloz oluşumunun hızlı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu süre zarfında, fruktoz-6-fosfat (F6P) substratının hızlı ve etkin bir şekilde dönüştürüldüğü belirlenmiş; buna bağlı olarak alluloz üretiminin kısa sürede maksimum düzeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Özellikle 6. saatte elde edilen alluloz konsantrasyonu, reaksiyon sisteminin en yüksek verimlilikle çalıştığı noktayı temsil etmektedir. Bu bulgu, kullanılan izomeraz enziminin başlangıç fazında yüksek düzeyde katalitik etkinlik gösterdiğini ve mevcut reaksiyon koşullarının (sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu) enzimin optimal aktivitesi için uygun bir ortam sağladığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.14. Fruktoz-6-fosfat'ın alluloza dönüşüm kromatogramı



Şekil 4.15. Fruktoz-6-fosfat'ın alluloza dönüşümünde zamana bağlı oluşan alluloz konsantrasyon grafiği

Reaksiyonun 6–22 saatlik zaman dilimi incelendiğinde, alluloz konsantrasyonunda anlamlı bir artış veya azalışın meydana gelmediği anlaşılmıştır. Bu gözlem, sistemin kinetik açıdan plato fazına girdiğini ve reaksiyon hızının minimuma indiğini göstermektedir. Sürecin bu evresinde, reaksiyonun tersinir izomerizasyon karakteri ve termodinamik denge eğilimi doğrultusunda, net ürün oluşumunun durma noktasına geldiği kanısına varılmıştır. Söz konusu denge durumu, substrat tükenmesi, ürün geri dönüşümü, ya da ürün birikiminin enzim üzerinde inhibitör etkiler

yaratması gibi mekanizmalarla açıklanabilir. Ayrıca, uzun süreli inkübasyona bağlı olarak meydana gelebilecek mikro-ortam pH değişimleri, iyonik dengenin bozulması veya enzimin yapısal kararlılığının azalması, enzimatik aktivitede gözlenen yavaşlamaya katkı sağlamış olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

22. saatten itibaren, oluşan alluloz konsantrasyonunda sınırlı bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu azalış, yüksek sıcaklıkta uzun süreli inkübasyonun alluloz stabilitesini olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, üründe meydana gelebilecek bozunma, geri dönüşüm reaksiyonları veya enzimatik degradasyon da bu düşüşe katkıda bulunmuş olabilir.

Bu bulgular doğrultusunda, izomerizasyon reaksiyonunun optimum verimlilikle gerçekleştiği sürenin ilk 4–6 saat aralığı olduğu belirlenmiştir. Daha uzun süreli inkübasyonun ise reaksiyon verimini artırmadığı, aksine belirli bir noktadan sonra ürün stabilitesinde bozulmalara yol açabileceği ortaya konmuştur.

Elde edilen veriler, fruktoz-6-fosfat'tan alluloz üretiminin izomeraz enzimi aracılığıyla verimli bir şekilde gerçekleştirilebildiğini ve ilk saatlerde reaksiyonun oldukça hızlı ilerlediğini ortaya koymuştur, ancak reaksiyonun zamanla dengeye ulaşması ve ürün konsantrasyonunda gözlenen düşüş, izomerizasyon reaksiyonunun kinetik ve termodinamik açıdan sınırlayıcı faktörlere tabi olduğunu göstermiştir.

Bu nedenle, maksimum alluloz verimi elde edebilmek için yalnızca enzim aktivitesinin değil; aynı zamanda reaksiyon süresi, sıcaklık, pH, ürün stabilitesi ve inhibitör birikimi gibi parametrelerin de dikkatle optimize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yapay tatlandırıcıların bir takım zararlı etkilerinin bilimsel olarak ortaya konulması ve insanların fazla kalori tüketimlerinden uzak durma çabaları, bu alanda alternatif tatlandırıcı üretimi çalışmalarını teşvik etmiştir. Bu boşluğu doldurmak için ortaya çıkan ve doğal kaynaklardan elde edilen nadir şekerler yapay tatlandırıcılar için güçlü bir alternatif konumundadır. Yapılan literatür taramaları özellikle son 10 yılda bu alanda yapılan bilimsel çalışmalarda önemli bir artış olduğunu ortaya koymaktadır.

Nişastadan alluloz üretiminde rol oynayan enzimlerin klonlanarak rekombinant olarak üretimine yönelik çalışmalar oldukça yeni olup, bu alanda yapılan çalışma sayısı çok azdır. Bu tez çalışmasında *T. thermosaccharolyticum* bakterisi genomunda alluloz-6-fosfat 3-epimeraz enzimini kodlayan gen ile *C. thermocellum* genomunda alluloz-6-fosfat fosfataz ve fosfoglikoizomeraz enzimlerini kodlayan genler PCR ile amplifiye edilerek pET20b(+) ve pET21a(+) vektörleri aracılığı ile *E. coli* bakterisine aktarılmış ve enzimlerin rekombinant olarak üretilmeleri sağlanmıştır.

Geçmişten günümüze kadar uzanan üretim yöntemleri göz önünde bulundurulduğunda, alluloz üretiminde enzimatik dönüşüm (izomerizasyon), mikrobiyal fermantasyon, kimyasal sentez (epimerizasyon) ve doğal kaynaklardan doğrudan ekstraksiyon yöntemlerinin kullanıldığı görölmektedir. Literatürde, allulozun bazı bitkilerden ve meyvelerden doğrudan ekstrakte edilebileceği, fakat verimin çok düşük olması sebebiyle endüstriyel üretime uygun bir yöntem olmadığı belirtilmiştir (Izumori, 2002; Matsuo 2002). Ayrıca, Granström ve ark., 2004, yaptıkları çalışmada allulozun doğada nadiren bulunduğunu ve diğer yöntemlerin doğal ekstraksiyon yöntemine göre üretim için daha uygun olduğunu vurgulamışlardır. Endüstriyel üretimde enzimatik dönüşüm ve mikrobiyal biyosentez yöntemleri geçmişte olduğu gibi günümüzde de hala geçerliliğini ve popörlüğini korumaktadır. Mikrobiyal biyosentezle glikozdan alluloz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada yaklaşık %85 verimle alluloz üretilmiş (Guo ve ark., 2023), başka bir çalışmada ise yine glikozdan alluloz dönüşümü yüksek verimle sağlanmıştır (Jia ve ark., 2023). Oysa bu tez çalışmasında nişastadan alluloz üretim verimliliği yaklaşık %50-55 aralığında kalmıştır. Bunun en önemli sebebi olarak rekombinant mikroorganizmalarca üretilen enzimlerin sağlaştırılmadan hücreiçi diğer proteinlerle birlikte dönüşüm reaksiyonlarında kullanılması düşünölebilir. Bu duruma kullanılan rekombinant enzim konsantrasyonunun istenilen seviyede olmaması ve rekombinant enzimlerin diğer bakteriyel proteinlerle antagonistik etkileşimleri sebep olmuş olabilir. Diğer bir sebep olarak ise, yukarıda bahsi geçen ve yüksek verimlilik elde edilen çalışmalarda substrat olarak doğrudan glikozun kullanılmasına karşılık bu tez çalışmasında başlangıç substratı olarak nişastanın kullanılması ve buna bağlı olarak nişastanın glikoza dönüşümünde meydana gelen kayıplar düşünölebilir. Wang ve ark. (2024), yaptıkları çalışmada yine benzer bir yöntemle sakkarozdan alluloz üretimi gerçekleştirmiştir. Üretim için D-psikoz 3-epimeraz enziminin kullanıldığı enzimatik yöntemlerde ise yine endüstriyel koşullara uygun, başarılı ve verimli üretimler gerçekleştirilmiştir (Liu ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2023). Enzimatik ve mikrobiyal

üretim yöntemlerinin yüksek saflıkta son ürün vermesi, kimyasal atık oluşumunun minimum olması, endüstriyel üretim için uygun olması ve daha birçok avantajı göz önünde bulundurularak bu tez çalışmasında allulozun nişastadan enzimatik olarak üretilmesine karar verilmiştir. Nişastanın bol miktarda kolayca bulunabilmesi ve çok ucuz bir hammadde olması sürdürülebilirlik ve maliyet açısından diğer yöntemlere göre büyük avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, nişastanın alluloza dönüşüm sürecinde çok aşamalı bir enzimatik dönüşüm prosesi uygulanması verimlilik açısından önemlidir. Bu tür biyokütle temelli üretimlerin kullanımının ekonomi ve karbon ayak izinin azaltılması gibi çevresel hedeflerle uyumlu olduğu, gıda rekabetine girmeden üretimi mümkün kıldığı ve sürdürülebilirlik yönünden diğer yöntemlerden üstün olduğu anlaşılmıştır.

D-fruktozun epimeraz enzimleri ile D-alluloza dönüştürüldüğü çok yaygın bir yöntem olan Izumoring stratejisinde dönüşüm oranı genellikle %30–40 seviyelerinde kalmaktadır (Chen ve ark., 2024; Guo ve ark., 2022). Ayrıca, ürünün saflaştırılmasına yönelik izomer ayrımı işlemleri nedeniyle hem maliyet artmakta hem de proses karmaşık hale gelmektedir. Bu bağlamda, bu tezde uygulanan nişasta temelli biyosentetik yaklaşım hem ekonomik hammadde kullanımı hem de çok basamaklı dönüşüm ile daha avantajlı bir üretim modeli sunmaktadır.

Bununla birlikte, bu tez çalışmasında Türkiye’de ilk kez rekombinant olarak alluloz 6-fosfat 3-epimeraz (A6PE) ve alluloz 6-fosfat fosfataz (A6PP) enzimlerinin başarıyla üretilmesi, karakterize edilmesi ve D-alluloz üretiminde etkinliğinin gösterilmesi, sadece süreç verimliliği açısından değil, aynı zamanda bilimsel literatüre ve ulusal biyoteknoloji kapasitesine katkı sağlaması açısından da oldukça önemlidir.

Tüm bu değerlendirmeler ışığında, tezde kullanılan yaklaşımın; düşük maliyetli, güvenli, çevre dostu ve yüksek verimli bir alternatif üretim yöntemi olarak literatürdeki güncel çalışmalarla tutarlılık gösterdiği, hatta bazı yönleriyle ilerici bir adım teşkil ettiği söylenebilir.

Ancak çalışmanın bazı sınırlılıkları da göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmada, enzimler sadece laboratuvar ölçeğinde test edilmiş, endüstriyel ölçekte üretim gerçekleştirilmemiştir. Enzimlerin ve prosesin endüstriyel üretime uygunluğunun tespit edilebilmesi için ileri optimizasyon yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Ayrıca, enzim stabilitesi ve ürün

inhibitörlerinin etkisi gibi faktörlerin uzun vadeli üretim üzerindeki etkilerinin de ortaya konması gerekmektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, ucuz ve kolay temin edilebilen nişastadan enzimatik dönüşüm yoluyla D-alluloz üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak Fosfoglikoizomeraz (PGI), Alluloz 6-fosfat 3-epimeraz (A6PE) ve Alluloz 6-fosfat fosfataz (A6PP) enzimleri üretilmiş ve üretilen enzimler dönüşüm reaksiyonlarında kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, enzimlerin optimum sıcaklık ve pH koşulları altında yüksek aktivite gösterdiğini, stabilite profillerinin ise endüstriyel kullanım için uygun olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, nişastadan glikoz elde edildikten sonra gerçekleştirilen ardışık enzimatik dönüşümler ile yüksek verimli bir şekilde D-alluloz üretimi sağlanmıştır.

Çalışmada ayrıca, ülkemizde daha önce üretimi yapılmamış olan Alluloz 6-fosfat 3-epimeraz ve Alluloz 6-fosfat fosfataz enzimlerinin üretimi ve karakterizasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu durum, hem bilimsel literatüre hem de endüstriyel üretim olanaklarına önemli katkılar sunmaktadır.

5.2. Öneriler

Çalışmada elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda verilebilecek öneriler aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Çalışmada kullanılan enzimlerin genetik optimizasyonu (örneğin mutasyon çalışmaları) ile enzim aktivitesinin ve stabilitesinin artırılması üzerine ileri çalışmalar yapılabilir.
2. Endüstriyel ölçekte üretim için, enzimlerin immobilizasyon yöntemleri ile tekrar kullanımı ve prosesin ekonomik açıdan daha verimli hale getirilmesi araştırılabilir.

3. Alternatif ucuz hammadde kaynakları (tarımsal atıklar gibi) kullanılarak D-alluloz üretimi denenebilir.
4. Rekombinant enzim üretimi sırasında farklı ekspresyon sistemlerinin (örneğin maya veya farklı bakteriyel sistemler) kullanılması, ürün verimi ve proses kolaylığı açısından değerlendirilebilir.
5. Üretilen D-allulozun gıda ürünlerinde fonksiyonel özellikleri (tat profili, stabilite, sağlık etkileri) üzerinde uygulamalı çalışmalar yapılarak tüketici kabulü artırılabilir.
6. Çalışmada üretilen enzimlerin hepsi ilk ürün olan nişasta çözeltisinin üzerine ilave edilerek alluloz oluşumu sağlanabilir.
7. Üretilen enzimler ileri teknikler kullanılarak tamamen saf hale getirilebilir.
8. Proseste oluşan ara ürünlerin saflığını ve verimini artırmak için kromatografik ayırma sistemleri kullanılabilir.
9. Çalışmada üretilen enzimler daha yüksek verim ve dönüşüm sağlayan mikroorganizmalarla tekrar üretilebilir.
10. Üretilen allulozun sıvı ve toz formlarının özelliklerinin belirlenmesiyle ilgili çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKÇA

- Bayu, A., Warsito, M. F., Putra, M. Y., Karnjanakom, S., & Guan, G. (2021). Macroalgae-derived rare sugars: Applications and catalytic synthesis. In *Carbon Resources Conversion* (Vol. 4, pp. 150–163). KeAi Publishing Communications Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.04.002>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Campostrini, F. G., Díaz, M. F., Rivero, R. C., & Sosa, N. (2022). Characterization and stability of a sweet confection made with alternative sweeteners. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 28(April), 100542. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100542>
- Castro-Muñoz, R., Correa-Delgado, M., Córdova-Almeida, R., Lara-Nava, D., Chávez-Muñoz, M., Velásquez-Chávez, V. F., Hernández-Torres, C. E., Gontarek-Castro, E., & Ahmad, M. Z. (2022). Natural sweeteners: Sources, extraction and current uses in foods and food industries. *Food Chemistry*, 370(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130991>
- Chen, B., Tang, X., Zhang, Y., Zbed, H. M., Ravikumar, Y., Iqbal, M. W., Wang, J., Zhao, M., & Qi, X. (2024). Biosensor-assisted evolution of RhaD for enhancing the biosynthetic yield of D-allulose. *Food Bioscience*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104426>
- Chen, J., Liu, Y., Wang, Y., & Zhao, Z. (2024). Enhancement of the D-allulose 3-epimerase expression in *Bacillus subtilis* through both transcriptional and translational regulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(14), 8052–8059. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c00610>
- Chen, X., Wang, F., Yu, Q., Liu, S., Wang, W., Zhang, Y., Wang, Z., & Yuan, Z. (2022a). One pot cascade biosynthesis of D-allulose from D-glucose and its kinetic modelling. *Chemical Engineering Science*, 248, 117167. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2021.117167>
- Chen, Z., Gao, X. D., & Li, Z. (2022b). Recent Advances Regarding the Physiological Functions and Biosynthesis of D-Allulose. *Frontiers in Microbiology*, 13(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.881037>
- Dai, Y., Zhang, J., Jiang, B., Zhang, T., & Chen, J. (2021). New strategy for rare sugars biosynthesis: Aldol reactions using dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent aldolases. In *Food Bioscience* (Vol. 44, pp. 1–11). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101377>
- Daniel, H., Hauner, H., Hornef, M., & Clavel, T. (2022). Allulose in human diet: The knowns and the unknowns. *British Journal of Nutrition*, 128(2), 172–178. <https://doi.org/10.1017/S0007114521003172>
- Drabo, P., Fischer, M., Emondts, M., Hamm, J., Engelke, M., Simonis, M., Qi, L., Scott, S. L., Palkovits, R., & Delidovich, I. (2023). Solvent effects on catalytic activity and selectivity in amine-catalyzed D-fructose isomerization. *Journal of Catalysis*, 418, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2022.12.029>
- Fahey, G. (2011). *GRAS Notice 000400: D-psicose*.
- FDA. (2019, April 17). *FDA Exempts Allulose from Added Sugar Labeling Requirements*. <https://Allulose.Org/Fda-Exempts-Allulose-from-Added-Sugar-Labeling-Requirements/>.
- Fernández Méndez, J., Farfan Orozco, F., Ladero Galán, M., & Grénman, H. (2023). Techno-economic evaluation of obtaining valuable rare sugars from thermo-mechanical pulping

- side streams utilizing the latest technology. *Chemical Engineering Journal*, 455. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140852>
- Franchi, F., Yaranov, D. M., Rollini, F., Rivas, A., Rios, J. R., Been, L., Tani, Y., Tokuda, M., Iida, T., Hayashi, N., Angiolillo, D. J., & Mooradian, A. D. (2021). *Effects of D-allulose on glucose tolerance and insulin response to a standard oral sucrose load : results of a prospective , randomized , crossover study*. 1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001939>
- Futamata, S., Onishi, Y., Adachi, S., Khuwijitjaru, P., Watanabe, Y., Tani, F., & Kobayashi, T. (2024). Efficient synthesis of rare sugars from galactose in hot compressed water using eggshells as an environmentally friendly catalyst. *Bioresource Technology*, 399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130642>
- Gao, D.-M., Zhang, X., Liu, H., Fujino, H., Lei, T., Sun, F., Zhu, J., & Huhe, T. (2023). Critical approaches in the catalytic transformation of sugar isomerization and epimerization after Fischer—History, challenges, and prospects. *Green Energy & Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2023.02.003>
- Gonsalves, A. (2024). *Global Allulose Market Size By Type (Liquid Form, Powder Form), By Application (Beverage, Confectionery, Dairy), By Geographic Scope And Forecast*. <https://www.verifiedmarketresearch.com/product/allulose-market/>
- Granström, T. B., Takata, G., Tokuda, M., & Izumori, K. (2004). Rare sugar D-psicose: Mass production by immobilized D-tagatose 3-epimerase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(2), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70180-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70180-7)
- Guo, D., Wang, Z., Wei, W., Song, W., Wu, J., Wen, J., Hu, G., Li, X., Gao, C., Chen, X., & Liu, L. (2024). Rational design improves both thermostability and activity of a new D-tagatose 3-epimerase from *Kroppenstedtia eburnea* to produce D-allulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2024.110448>
- Guo, Q., Liu, C.-Y., Zheng, L.-J., Zheng, S.-H., Zhang, Y.-X., Zhao, S.-Y., Zheng, H.-D., Fan, L.-H., & Lin, X.-C. (2022). Metabolically Engineered *Escherichia coli* for Conversion of D-Fructose to D-Allulose via Phosphorylation-Dephosphorylation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.947469>
- Guo, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhao, Z. (2023). Irreversible biosynthesis of D-allulose from D-glucose in *Escherichia coli* through fine-tuning of carbon flux and cofactor regeneration engineering. *Bioresource Technology*, 369, 128397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128397>
- Guo, Y., Zhao, Z., & Li, X. (2022). Phosphorylation-driven production of D-allulose from D-glucose by coupling with an ATP regeneration system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(49), 15539–15547. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04807>
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA cloning, A Practical Approach*. IRL Press Inc., Oxford. D.M. Glover (1):121-127
- Han, Z., Li, N., Xu, H., & Xu, Z. (2022). Improved thermostability and robustness of L-arabinose isomerase by C-terminal elongation and its application in rare sugar production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 637, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.11.024>
- Hayashi, N., Iida, T., Yamada, T., Okuma, K., Takehara, I., Yamamoto, T., Yamada, K., & Tokuda, M. (2010). Study on the Postprandial Blood Glucose Suppression Effect of D-Psicose in Borderline Diabetes and the Safety of Long-Term Ingestion by Normal Human Subjects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1271/bbb.90707>

- Hossain, A., Yamaguchi, F., Matsuo, T., Tsukamoto, I., Toyoda, Y., Ogawa, M., Nagata, Y., & Tokuda, M. (2015). Rare sugar d-allulose: Potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacology and Therapeutics*, 155, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.08.004>
- Izumori, K. (2002). Bioproduction of rare sugars and development of rare sugar-related technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 13(11), 451–457. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00191-0)
- Jia, Q., Wu, Z., Zhou, H., Li, Y., & Wang, M. (2023). Produce D-allulose from non-food biomass by integrating corn stalk hydrolysis with whole-cell catalysis. *Bioresource Technology*, 373, 128719. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128719>
- Jung, J., Kim, S. H., Park, S., & Hong, J. H. (2021). Sweetness profiles of glycosylated rebaudioside A and its binary mixtures with allulose and maltitol. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 423–432. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00873-w>
- Kaiserman, B. (2019). *FDA Allows Allulose to be Excluded from Total and Added Sugars*. <https://www.nosh.com/news/2019/fda-allows-allulose-to-be-excluded-from-total-and-added-sugars>
- Krishnasamy, K. (2020). *Artificial Sweeteners* (p. Ch. 17). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93199>
- Kumar, M., Kumar, N., Gurawa, A., & Kashyap, S. (2023). Protecting group enabled stereocontrolled approach for rare-sugars talose/gulose via dual-ruthenium catalysis. *Carbohydrate Research*, 523. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108705>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lane, J. H. & Eynon, L. (1923). Methods for Determination of Reducing and Non-Reducing Sugars. *Journal of Science*, 42, 32–37.
- Li, Y., Shi, T., Han, P., & You, C. (2021). Thermodynamics-Driven Production of Value-Added d-Allulose from Inexpensive Starch by an in vitro Enzymatic Synthetic Biosystem. *ACS Catalysis*, 11(9), 5088–5099. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c05718>
- Liu, H., Zhang, R., Guo, Y., & Xu, Y. (2022). Enhancing the thermostability of D-allulose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10 via a dual-enzyme screening system. *Biochemical Engineering Journal*, 184, 108491. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108491>
- Matsuo, T., Baba, Y., Hashiguchi, M., Takeshita, K., & Izumori, K. (2002). Rare sugar D-psicose: A new anti-hyperglycemic functional food component. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 32(1), 61–70.
- Matthewman, M. C., & Costa-Pinto, R. (2022). Macronutrients, minerals, vitamins and energy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 24(2), 134–138.
- Mijailovic, N., Nesler, A., Perazzolli, M., Ait Barka, E., & Aziz, A. (2021). Rare sugars: Recent advances and their potential role in sustainable crop protection. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26061720>
- Morimoto, K., Suzuki, T., Ikeda, H., Nozaki, C., & Goto, S. (2022). One-Pot Multi-Step Transformation of D-Allose From D-Fructose Using a Co-Immobilized Biocatalytic System. *The Journal of General and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.2323/jgam.2021.07.002>
- Moss, M. M., Caswell, E. N., Yeargin, A. W., Volz, N. A., Woodland, J. C., Guthrie, L. C., Ahlborn, G. J., Eggett, D. L., & Taylor, J. (2022). Optimization of flour-replacing ingredients for low-carbohydrate, gluten-free muffins via a mixture design with complete sucrose substitution by d-allulose or d-tagatose. *LWT*, 167(April), 113779. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113779>

- Nair, V. (2020, April). *Allulose Market*. <https://www.transparencymarketresearch.com/allulose-market.html>.
- Nishimoto, Y., Mizuguchi, Y., Mori, Y., Ito, M., Miyazato, S., Kishimoto, Y., Yamada, T., Fukuda, S. (2022). Resistant Maltodextrin Intake Reduces Virulent Metabolites in the Gut Environment: A Randomized Control Study in a Japanese Cohort. *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.644146>
- Parıld, E. (2019). *D-Tagatoz 3-Epimeraz Enzimi Üretimi ve Fruktozdan Alluloz (Psikoz) Eldesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi.
- Rai, S. K., Singh, A., Kauldhar, B. S., & Yadav, S. K. (2023). Robust nano-enzyme conjugates for the sustainable synthesis of a rare sugar D-tagatose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231, 123406. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123406>
- Sa, S., Seol, Y., Lee, A. W., Heo, Y., Kim, H., & Jin, C. (2022). Teratogenicity of D-allulose. *Toxicology Reports*, 9(September 2021), 821–824. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.028>
- Sclafani, A., Castillo, A., Carata, I., Pines, R., Berglas, E., Joseph, S., Sarker, J., Nashed, M., Roland, M., Arzayus, S., Williams, N., Glendinning, J. I., & Bodnar, R. J. (2023). Conditioned preference and avoidance induced in mice by the rare sugars isomaltulose and allulose. *Physiology and Behavior*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114221>
- Shi, F., Gao, Y. S., Han, S. M., Huang, C. S., Hou, Q. S., Wen, X. wen, Wang, B. S., Zhu, Z. Y., & Zou, L. (2024). Allulose mitigates chronic enteritis by reducing mitochondria dysfunction via regulating cathepsin B production. *International Immunopharmacology*, 129. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111645>
- Tan, V. W. K., Wee, M. S. M., Tomic, O., & Forde, C. G. (2020). Rate-All-That-Apply (RATA) comparison of taste profiles for different sweeteners in black tea, chocolate milk, and natural yogurt. *Journal of Food Science*, 85(2), 486–492. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15007>
- Wang, J., Lu, C., Shen, X., He, T., Lu, D., Wang, X., Zhang, Y., Lin, Z., & Yang, X. (2024). Enhancing the stability of a novel D-allulose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp. CAG55 by interface interaction engineering and terminally attached a self-assembling peptide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131986>
- Wang, L., Chen, K., Zheng, P., Huo, X., Liao, F., Zhu, L., Hu, M., & Tao, Y. (2023). Enhanced production of D-psicose from D-fructose by a redox-driven multi-enzyme cascade system. *Enzyme and Microbial Technology*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110172>
- Wang, Z., Liu, H., Zhang, J., & Li, Y. (2024). Biosynthesis of nonnutritive monosaccharide D-allulose by metabolically engineered *Escherichia coli* from nutritive disaccharide sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(14), 8023–8032. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c00394>
- WHO. (2015). *Guideline: Sugars Intake for adults and Children*. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028/>
- Wichelecki, D. J., & Rogers, E. O. (2020). Patent No. US 10,704,069 B2. Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/30/f4/62/e9b75605352fb0/US10679987.pdf>
- Xin, D., & Ran, G. (2024). Strategy for production of high-purity rare sugar D-allulose from corn stover. *Journal of Cleaner Production*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.140717>
- Yermek, R., Wang, L., Kaneko, K., Han, W., Seino, Y., Yabe, D., & Yada, T. (2022). D-Allulose cooperates with glucagon-like peptide-1 and activates proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus and central injection inhibits feeding in mice. *Biochemical*

- and *Biophysical Research Communications*, 613, 159–165.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.027>
- Yeung, C. H. C., Gohil, P., Rangan, A. M., Flood, V. M., Arcot, J., Gill, T. P., & Louie, J. C. Y. (2017). Modelling of the impact of universal added sugar reduction through food reformulation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17417-8>
- Zhang, Y., Wang, M., & Li, H. (2023). D-allulose, a versatile rare sugar: Recent biotechnological advances and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(4), 654–672. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963462>

