

MİKROBİYEL YOLLA ÜRETİLEN LEVANSÜKRAZLAR VE SENTEZLEDİĞİ BİYOPOLİMERLER

Özlem Erdal, Filiz Döner, Burcu Kaplan Türköz, Yekta Göksungur*

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir

Geliş tarihi / Received: 13.02.2016
Kabul tarihi / Accepted: 22.02.2016

Özet

Levansükrazlar (E.C.2. 4. 1. 10), GH68 glikozit hidrolaz enzim ailesine ait olup sakkarozu substrat olarak kullanarak levan ve fruktooligosakkaritlerin (FOS) oluşumunu katalizleyen fruktoziltransferaz grubu enzimlerdir. *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* ve *Zymomonas mobilis* gibi birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Levan biyopolimeri ve FOS'ların oluşumunu katalizleyen levansükraz enziminin önemi giderek artmaktadır ve bu enzimin endüstriyel üretimi genellikle farklı mikroorganizmalar kullanılarak mikrobiyal biyoprosesler ile gerçekleştirilmektedir. Levansükraz enzimi, sentezlediği fruktoz polimerleri ve bu polimerlerin farklı fonksiyonel özellikleri sayesinde gıda, kozmetik, tıp, biyomedikal ve nanoteknoloji gibi birçok endüstriyel kullanım alanına sahiptir. Bu çalışmada levansükraz enziminin mikrobiyel üretimi, saflaştırma stratejisi ve bu enzim tarafından sentezlenen biyopolimerler ve özellikleri anlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: Levansükraz, levan, fruktooligosakkarit, prebiyotik, biyopolimer

MICROBIAL PRODUCTION OF LEVANSUCRASE AND SYNTHESIZED BIOPOLYMERS

Abstract

Levansucrases (E.C.2. 4. 1. 10) are fructosyltransferase (Ftase) which belong to GH68 glycoside hydrolase enzyme family and catalyze the formation of levan and fructooligosaccharides (FOS) by using sucrose as substrate. Levansucrases are produced by several microorganisms including *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* and *Zymomonas mobilis*. The importance of levansucrase enzyme which catalyzes the formation of levan biopolymer and fructooligosaccharides is increasing day by day and the industrial production of this enzyme is usually performed through microbial bioprocesses using different microorganisms. The fructan polymers levan and FOS catalyzed by levansucrases have several industrial applications in food, cosmetic, medicine biomedical and nanotechnology. In this review, the functional properties of levansucrases, their microbial production, purification strategy and biopolymers synthesized by levansucrases was summarized.

Keywords: Levansucrase, levan, fructooligosaccharides, prebiotic, biopolymers

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yekta.goksungur@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 3027,

☎ (+90) 3232 342 7592

GİRİŞ

Levansükrazlar, sakkaroz molekülünü parçalaması ve açığa çıkan fruktoz gruplarının başka bir sakkaroz eklenmesiyle fruktan polimerlerinin oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (1). Levansükrazlar hem transfruktosilasyon, hem de hidroliz aktivitesi göstermektedir (2). Transfruktosilasyon aktivitesi ile sakkarozda bulunan $\beta(2\rightarrow1)$ bağları parçalanarak sakkaroz ve serbest glukoz gibi alıcı moleküllere fruktosil gruplarının transferi gerçekleşmektedir. Bu aktivitesi sayesinde levan ve fruktooligosakkaritlerin (FOS) oluşumu katalizlenmektedir (3). Enzimin hidroliz aktivitesi ise sakkarozdaki $\alpha(2\rightarrow1)$ bağlarını parçalayarak serbest fruktozların oluşumunu gerçekleştirmektedir. Oluşan serbest haldeki fruktozlar farklı levan oligomerlerini meydana getirmektedir (4).

Bakteriler tarafından üretilen levansükrazlar yüksek sakkaroz konsantrasyonunda levan ve/veya FOS'ların sentezlemesini sağlamaktadır (5, 6).

Levan, tekrarlayan fruktoz ünitelerinden oluşan hücre dışı bir β -fruktandır ve fruktoz ünitelerinin $\beta(2\rightarrow6)$ glikozit bağları ile bağlanmasından oluşmaktadır (7). Zincirin başında sakkaroz molekülünden gelen D-glukoz molekülü, dallanma noktalarında ise $\beta(2\rightarrow1)$ bağları bulunmaktadır (8). Mikrobiyel levantarlar molekül ağırlıkları büyük uzun zincirli polimerlerdir (48). Levan, $\beta(2\rightarrow6)$ bağları sayesinde hem suda hem de yağda çözünebilir özellik göstermektedir. Hem hidrofobik hem hidrofilik karaktere sahip olması, levanın sulu çözeltilerinde nano boyutta parçacıklar halinde bulunmasını sağlamaktadır (9). Levan; yapışkan bir özellik göstermesi, biyofilm oluşturması, düşük vizkoziteye sahip olması, yüksek su tutma kapasitesi, toksik ve mutajenik etki göstermemesi, iltihap önleyici etkisi, kandaki lipit düzeyini düşürmesi, AIDS ve tümör engelleyici özellikleri ile son yıllarda birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Bu özellikleri sayesinde levan gıda, biyomedikal, tıp, kozmetik, kimya ve nanoteknoloji gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır (10, 11). Levanın molekül ağırlığı ve dallanma derecesi hem levanı üreten mikroorganizmaya, hem de fermantasyon şartlarına göre farklılık göstermektedir ve molekül ağırlığındaki farklılıklar levanın fonksiyonel özelliklerinde etkili olup, farklı uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır (12).

Wu ve ark. (2013) tarafından *Bacillus subtilis* natto ile gerçekleştirilen çalışmada kesikli ve kesikli-beslemeli sistemlerde levan polimeri üretilmiş ve levanın molekül ağırlığına etki eden faktörler araştırılmıştır. Üretilen levanın molekül ağırlığının başlangıç sakkaroz konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiştir (12).

İnulin tipi FOS'lar başlangıç D-glukoz molekülüne fruktoz ünitelerinin $\beta(2\rightarrow1)$ bağları ile bağlanması sonucu oluşmaktadır ve FOS'ların polimerizasyon derecesi 2-9 arasında değişmektedir (13). Mikrobiyel levansükrazlar tarafından sentezlenen FOS'lar ise hem inulin, hem de levan tipi bağlar içermektedir. Zincirde bulunan fruktoz molekülünün sayısına bağlı olarak kestoz (1-kestoz, 6-kestoz), nistoz ve fruktofuranozilnistoz gibi farklı fruktooligosakkarit çeşitleri sentezlenmektedir (4).

FOS'lar üst sindirim sisteminde sindirilememeleri, *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* türleri tarafından kullanılabilmesi sayesinde prebiyotik özellik göstermektedir. Ayrıca FOS'ların zararlı mikroorganizmaların gelişimini engelleyici etki gösterdiği belirtilmiştir (13, 14). Bu özelliklere ek olarak FOS'ların diyet lifi ve düşük kalorili tatlandırıcı özelliğe sahip olmaları gıda endüstrisinde fonksiyonel kullanımını arttırmaktadır (14).

Mikrobiyel Levansükraz Üretimi

Levansükraz üretimi, genellikle sıvı kültür fermantasyon ve endüstriyel atıklar değerlendirilerek katı kültür fermantasyon ile gerçekleştirilmektedir (3, 19, 32, 33).

Çizelge 1'de görüldüğü gibi levansükrazlar birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir.

Farklı fermantasyon koşullarının levansükraz enzim üretimine etkisi çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir (3, 19, 31-33). Cote (1988), tarafından *Erwinia herbicola* ile gerçekleştirilen çalışmada sakkaroz, glukoz, fruktoz, sorbitol ve mannitol gibi çeşitli karbon kaynaklarının levansükraz üretimine etkisini incelenmiş ve fruktozun hücre gelişimini yavaşlatarak enzim üretimini azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında ise maksimum enzim üretimi elde edilmiştir (30).

Başka bir çalışmada termofilik *Bacillus* sp. ile levansükraz üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve fruktoz kullanıldığında düşük verimde enzim üretimi gerçekleşirken, sakkaroz

Çizelge 1. Levansükraz üreten mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Kaynak
<i>Aerobacter levanicum</i>	(16)
<i>Actinomyces viscosus</i>	(17)
<i>Bacillus subtilis</i>	(18)
<i>Bacillus megaterium</i>	(19)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(20)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> SK 21.002	(21)
<i>Bacillus licheniformis</i> RN – 01	(22)
<i>Erwinia amylovora</i>	(23)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	(24)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	(25)
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	(26)
<i>Lactobacillus panis</i> TMW 1.648	(27)
<i>Pseudomonas syringae</i>	(2)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> sp.aurantiaca	(2)
<i>Pantoea agglomerans</i> (= <i>Erwinia herbicola</i>)	(28)
<i>Rahnella aquatilis</i>	(49)
<i>Streptococcus mutans</i>	(34)
<i>Zymomonas mobilis</i>	(29)

kullanıldığında ise sakkarozun hücre gelişimini destekleyici etkisinin enzim üretimini arttırdığı belirlenmiştir (3). Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi karbon kaynağı levansükraz üretiminde önemli bir etkiye sahip olup kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak etki mekanizması değişmektedir. *Bacillus amyloliquefaciens* ile sakkaroz konsantrasyonu enzim üretimini artırıcı etki gösterirken, *Bacillus subtilis* NRC 33a levansükrazın hem sakkaroz hem de glukoz ile üretildiği gösterilmiştir (1).

Aynı zamanda levansükraz üretiminde azot kaynağı da önemli bir rol oynamaktadır. Farklı azot kaynaklarının (mısır ıslatma suyu, pepton, maya özütü, ekmekek mayası ve buğday kepeği) *Bacillus subtilis* NRC 33a levansükraz üretimine etkisi incelenmiş ve ekmekek mayası içeren fermantasyon ortamında en yüksek levansükraz aktivitesi elde edilmiştir (31). Başka bir çalışmada ise *Bacillus* sp. levansükraz üretiminde en uygun azot kaynağı maya özütü olarak belirlenmiştir (3).

Sıcaklık ve metal iyonları gibi diğer faktörler de levansükraz üretimini üzerine etkilidir. *Bacillus subtilis* NRC 33a levansükraz üretimi için optimum sıcaklık değeri 30 °C ve uygun metal iyonu Mg⁺² olarak belirlenmiştir (31). Termofilik *Bacillus* sp. için ise maksimum enzim üretiminin 50 °C ve 50 mM Fe⁺² varlığında gerçekleştiği gösterilmiştir (3).

Ahmed (2008), tarafından *Bacillus megaterium* ile gerçekleştirilen çalışmada çeşitli gıda ve tarımsal atıklar (portakal kabukları, muz kabukları, limon atıkları, talaş ve buğday kepeği) kullanılarak

yüksek verim sağlayan katı kültür fermantasyon ile levansükraz üretimi optimize edilmiştir. Başlangıç pH değeri 6.0 olan nemli talaş ortamında 30 °C statik koşullarda 72 saat inkübasyon sonrasında üretilen enzimin maksimum aktiviteye (140.54 U/g) sahip olduğu belirtilmiştir (32).

Levansükrazın katı kültür fermantasyon ile üretildiği başka bir çalışmada ise Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak enzim aktivitesi optimize edilmiştir. Nişasta içeren fermantasyon ortamında maksimum enzim aktivitesi 170 U/g olarak belirlenmiştir (33).

Levansükraz üretimi üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen matematiksel yöntemlerle üretiminin optimize edildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır (34). *Bacillus subtilis* natto CCT7712 ile substrat konsantrasyonu, pH ve karıştırma hızının enzim üretimi ve levan oluşumuna etkisi incelenmiş ve bu parametrelerin optimizasyonu Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 300 g/L sakkaroz içeren üretim ortamında (pH 7.5), 160 rpm karıştırma hızında en yüksek levansükraz aktivitesi (8.53 U/ml) ve levan üretimi elde edilmiştir. Ayrıca, *Bacillus subtilis* natto CCT7712 levansükraz enziminin 50 °C'de 10 gün boyunca stabilitesini koruduğu ve aktif olduğu belirlenmiş, birçok endüstriyel uygulama için kullanılabilir olduğu belirtilmiştir (34).

Levansükrazlar, farklı sıcaklıklarda transfruktosilasyon ve hidroliz aktivitesi göstermektedir, genellikle düşük sıcaklıklarda transfruktosilasyonu tercih etmektedir. *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından hücre dışı olarak üretilen levansükraz için optimum transfruktosilasyon aktivitesi 40 °C'de, optimum hidroliz aktivitesi ise 50 °C'de gözlemlenmiştir (20).

Mikrobiyel levansükrazlar genel olarak 50 °C'den daha düşük sıcaklıklarda levan üretmektedir ve üretilen levanın molekül ağırlığı fermantasyon sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir (22). *Bacillus licheniformis* RN-01 levansükraz tarafından yüksek sıcaklıkta (50 °C) üretilen levan, 612 kDa gibi yüksek molekül ağırlığına sahip iken düşük sıcaklık değerlerinde (30 °C) 11 kDa gibi düşük molekül ağırlığına sahip olduğu belirtilmiştir (22).

Saflaştırma ve Karakterizasyon Stratejisi

Farklı mikroorganizmalar kullanılarak üretilen hücre içi ve hücre dışı levansükrazların saflaştırılmasına yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır

(20, 22, 23). Üretilen bu enzimin kullanım amacına ve mikroorganizmalar tarafından üretim şekline bağlı olarak saflaştırma yöntemleri de değişmektedir (20, 22, 23). Çizelge 2'de mikrobiyel yolla üretilen levansükrazların saflaştırma stratejileri yer almaktadır. Bu çalışmaların bazılarında levansükraz *E. coli*den rekombinant olarak üretilmiş ve *E. coli*den üretilen levansükrazlar füzyon partnerine uygun affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılmıştır (23). Hücre dışına salgılanan levansükrazlar santrifüj uygulaması ile fermantasyon ortamından ayrılırken, hücre içi levansükrazlar için sonikasyon gibi hücre parçalama yöntemleri uygulanarak mikroorganizmaların hücre zarı/duvarı parçalanıp enzimin elde edildiği belirtilmiştir (22, 23). Çalışmalarda genel olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gibi tuzlar kullanılarak istenilen enzim çökelti halinde elde edilmiş ve çökteltideki tuzların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır (22, 25). Yüksek saflıkta levansükraz elde etmek için farklı kromatografik yöntemler uygulanmıştır (23, 27, 36). Çizelge 2'de görüldüğü gibi mikrobiyel yolla

üretilen levansükrazlar saflaştırıldıktan sonra hem ürettiği biyopolimerlerin hem de saflaştırılan enzimin özelliklerinin belirlenmesi amacı ile karakterize edilmiştir (20, 36). Tian ve ark. (2011), tarafından *Bacillus amyloliquefaciens* ile gerçekleştirilen çalışmada hücre içi ve hücre dışı formda üretilen levansükraz saflaştırılmış ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Levansükraz transfruktosilasyon aktivitesi dakikada 1 μmol glukozun açığa çıkması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Hücre içi levansükrazın transfruktosilasyon aktivitesi için optimum sıcaklık 25-30 °C iken, hücre dışı enzim için 40 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca hücre içi ve hücre dışı levansükrazın substrat afinitelerinin de farklı olduğu belirtilmiş ve transfruktosilasyon aktivitesi için Michealis Katsayısı (K_M) değerleri sırasıyla 322.5 mM ve 1556.4 mM olarak bulunmuştur (20).

Goldman ve ark. (2008), tarafından yapılan çalışmada *Zymomonas mobilis* levansükrazın

Çizelge 2. Levansükraz enziminin saflaştırma ve karakterizasyon stratejisi

Saflaştırma ve Karakterizasyon Stratejisi	Saflaştırılan Enzimin Özellikleri	Kaynak
Hücre dışı <i>Bacillus licheniformis</i> RN-01 Levansükraz Santrifüj, İyon Değişim Kromatografisi - Amonyum Sülfat Presipitasyonu- Diyaliz- İyon Değişim Kromatografisi- SDS-Page	Opt. Sıcaklık: 50 °C Opt pH: 6.0 Molekül ağırlığı: 52 kDa	(22)
Hücre içi <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Rekombinant Levansükraz Ultrasonikasyon, Diyaliz, Amonyum Sülfat Presipitasyonu, Jel Filtrasyon Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi,	Opt. Sıcaklık: 57 °C Opt. pH: 6.75 K_m^a : 269 (\pm 9.7) mM V_{max} : 58.48 (\pm 4.92) $\mu\text{mol}/\text{mg}$	(25)
Hücre içi Rekombinant <i>Lactobacillus reuteri</i> Rekombinant Levansükraz Ultrasonikasyon, Nikel Afinitite Saflaştırma, İyon Değişim Kromatografisi, SDS-page	Opt.Sıcaklık: 50 °C Opt: pH 5 Moleküler ağırlık: 87.6 kDa K_m^b : 21 mM	(35)
Hücre içi <i>Lactobacillus panis</i> TMW 1.648 Rekombinat Levansükraz Ultrasonikasyon, Nikel Afinitite Saflaştırma, SDS-page	Opt. Sıcaklık: 45 °C ve 50 °C K_m^b : 29.9 mM V_{max} : 69.9 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	(27)
Hücre içi ve Hücre dışı <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Levansükraz Santrifüj, Ultrasonikasyon, Ultrafiltrasyon, SDS-Page	Hücre içi Levansükraz Opt. Sıcaklık: 25 °C ve 30 °C K_m^a =322.5 V_{max} =31.5 Hücre dışı Levansükraz Opt. Sıcaklık: 40 °C K_m^a = 1556.4 V_{max} =11.3 (\pm 1.2)	(20)
Hücre içi <i>Erwinia amylovora</i> Rekombinant Levansükraz Santrifüj, Sonikasyon, Afinitite kromatografisi	Moleküler ağırlık: 46.5 kDa K_m^b : 33.6 mM	(23)
Hücre içi <i>Zymomonas mobilis</i> Rekombinant Levansükraz Santrifüj, Hücre Presleme, Santrifüj, Mangan Klorür Presipitasyonu, Santrifüj, Jel Filtrasyon Kromatografisi, SDS-Page	Opt. pH: 5.0 Moleküler ağırlık: 46.7 kDa K_m^a : 36 mM	(36)

a: Fruktosilasyon reaksiyon aktivitesi b: Toplam aktivite

transfruktosilasyon aktivitesi için K_M değeri 36 mM olarak belirlenmiş ve enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 46.7 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin ürettiği FOS'lar ise ince tabaka kromatografisi ve yüksek performans iyon değişim kromatografisi ile kestoz ve nistoz olarak belirlenmiştir (36).

Erwinia amylovora levansükrazın 37 °C optimum sıcaklıkta maksimum transfruktosilasyon aktivitesi 856 µmol/dak.mg olarak ölçülmüş, toplam aktivitesi için K_M değeri 33.6 mM olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda enzimin toplam aktivitesi reaksiyon boyunca açığa çıkan glukoz miktarı, transfruktosilasyon aktivitesi ise serbest glukoz ve serbest fruktoz miktarları arasındaki fark ölçülerek bulunmuştur (23).

Mikrobiyel Fruktooligosakkaritler ve Fonksiyonu

Son yıllarda sağlığa yararlı ve düşük kalorili gıdalara yönelim artmıştır ve bu tür fonksiyonel gıdaların içerisinde FOS'lar da yer almaktadır. FOS'ların kaynakları, mikrobiyel üretim yolları, sağlık üzerine etkileri ve fonksiyonel özellikleri gibi konulara ilgi artmıştır (14). FOS'lar FDA (Food and Drug Administration- Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsüne sahip bileşenler olarak tanımlanmaktadır (37). Bütün bunlar FOS'ların fonksiyonel gıda katkıları olarak öne çıkmasına sebep olmuştur.

Sakkarozdan 3 kat daha az tatlılık değeri olan FOS'lar, sakkaroz yerine reçeller, şekerlemeler ve çikolatalarda düşük kalorili fonksiyonel tatlandırıcı olarak kullanılmakta olup, diyabet hastaları için bu gıdaların tüketimi güvenli hale gelmektedir (13). Ayrıca prebiyotik özelliğe sahip olan FOS'lar midede sindirilememekte, kolonda *Bifidobacteria* gibi yararlı mikroorganizmaların gelişimini olumlu yönde etkileyerek mide ve bağırsak rahatsızlıklarına karşı koruyucu etki göstermektedir (14). Ayrıca FOS'ların mineral emilimi üzerine etkili olduğu, kalın bağırsakta mineral emilimini arttırdığı ve bu durumun FOS'ların kolon mikroorganizmaları tarafından fermente edilebilmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (38). FOS'lar geniş pH aralığında (pH 4.0-7.0) depolamada bir yıla kadar bozulmadan kalmalarından dolayı gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir (39). *Aspergillus oryzae* MTCC5154 levansükraz kullanarak üretilen FOS'lar mango, portakal ve ananas suyu gibi meyve sularına ilave edilerek 6

ay süresince depolanmıştır. Depolama boyunca meyve sularının fizikokimyasal yapısında değişiklik olmadığı, mikrobiyel ya da enzimatik bir bozulma gerçekleşmediği görülmüştür. Böylece FOS eklenerek hazırlanan sağlıklı içeceklerin depolama koşullarına bağlı olarak uzun süre saklanabileceği belirtilmiştir (40).

Padma Ishwarya ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışmada bisküvi üretiminde FOS kullanılarak hamur ve son ürünün özellikleri incelenmiş ve standartlara uygun olarak hazırlanan bisküvi hamuruna şeker yerine FOS ilave edilmiştir. FOS eklenen ürünlerde daha iyi bir bağlanma ve matriks stabilitesinin sağlandığı belirtilmiştir (41).

Angiolillo ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmada ise hamburgerlere fonksiyonel özellik kazandırmak için etlere FOS eklenmiş ve FOS eklenerek pişirilen etlerde pişirme kaybının azaldığı gözlenmiştir. Böylece FOS'ların katkı maddesi olarak bu üründe kullanılabileceği ve pişirme kaybını azaltarak daha kaliteli bir ürün elde edilebileceği belirtilmiştir (42).

Krem karamelli tatlı için sakkaroz ile birlikte FOS ilave ederek ürünlerin hem reolojik özellikleri, hem de duyu özellikleri incelenmiş ve ürünlerdeki FOS miktarı arttıkça jelleşme özelliğinin de arttığı saptanmıştır (43).

Mikrobiyel levansükrazlar, levan biyopolimerinin yanı sıra transfruktosilasyon aktivitesi ile FOS üretmektedir (1).

Belighith ve ark. (2012), tarafından *Bacillus* sp. ile gerçekleştirilen çalışmada %20 (w/v) sakkaroz içeren ortamda levansükraz üretimi gerçekleştirilmiş ve enzim tarafından üretilen FOS'lar ise ince tabaka kromatografisi kullanılarak belirlenmiştir (3).

Zymomonas mobilis endüstride etanol üretiminde kullanılan, fakültatif anaerob, gram negatif bir bakteridir. Aynı zamanda sakkaroz içeren ortamlarda FOS ve levan sentezinde görev alan levansükraz enzimini sentezlemektedir (44,45). Yüksek sakkaroz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklığın bu bakteri tarafından üretilen levansükraz ile FOS sentezini arttırdığı belirtilmiştir (5, 45).

Bekers ve ark. (2002), *Zymomonas mobilis* ile ürettikleri levansükraz enzimini kullanarak sakkaroz şurubundan %22-32 verimlilikte 1-kestoz, 6-kestoz, nistoz ve fruktofuranozilnistoz gibi FOS'ları üretmişler ve elde edilen bu FOS çeşitlerinin düşük kalorili prebiyotik kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (5).

Trujillo ve ark. (2001), tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansükraz rekombinant olarak *Pichia pastoris*'de üretilmiş ve rekombinant levansükrazın %50 sakkaroz içeren ortamda yüksek verimlilikte (%43) 1-kestoz sentezlediği belirtilmiştir (46).

Levan ve Fonksiyonları

Endüstriyel bir biyopolimer olan levan, hem suda hem yağda çözünebilir olması, yüksek molekül ağırlığı, düşük bir iç viskoziteye sahip olması ve ayrıca oda sıcaklığında su içinde şişmemesi gibi birçok özelliği sayesinde özellikle gıda endüstrisinde jelleştirici ajan, emülgatör, stabilizatör ve kıvam arttırıcı olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (7, 9, 11). Levan teknolojik özelliklerinin yanı sıra iltihap önleyici, AIDS ve tümör engelleyici, kandaki lipit miktarını düşürme gibi özelliklere de sahiptir (11).

Mikrobiyel levana karşı son yıllarda artan ilginin en önemli sebeplerinden biri levanın iyi bir biyofilm oluşturma özelliği ile gıda maddelerinin kaplanması ve paketlenmesinde kullanılmasıdır (47). Göksungur ve ark. (2012), kayısı ve incir gibi orta nemli meyvelerde raf ömrünün artırılması amacıyla levandan ürettikleri yenilebilir filmi, kaplama materyali olarak kullanmışlardır. Depolama süresince her iki ürün grubunda da nem kaybının az olduğu belirlenmiş ve bu sebeple levanın nem oranı düşük gıdalarda kaplama materyali olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (47).

Tinzi-Malang ve ark. (2015), yaptığı çalışmada *Weissella confusa* F3/2-2 laktik asit bakterisinin ürettiği dekstran-levan biyopolimerini ekmeğin hamurunda kullanarak hamurun reolojik özellikleri ve ekmeğin tekstürel yapısını değerlendirmişler ve hamurun elastikiyeti, su tutma kapasitesi ve tekstürel yapısının, ticari olarak üretilen ekmeğin hamurunun özelliklerine benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir (48).

Sonuç

Son yıllarda stabilizatör, emülgatör, kıvam arttırıcı özellikleri ile gıdalarda kullanımı mümkün olan levan ve fonksiyonel gıda katkıları olarak kullanılan FOS'ları üreten levansükraz, önemi giderek artan bir enzimdir. Levan ve FOS polimerlerinin

özellikle mikrobiyel enzimler tarafından, ucuz hammaddeler kullanılarak düşük maliyetle üretilmesinin, bu polimerlerin birçok alanda kullanımını geliştirilebileceği ve farklı uygulamalar için yeni çalışmaları teşvik edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Li W, Yu S, Zhang T, Jiang B, Mu W. 2015. Recent Novel Applications of Levansucrases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99 (17): 6959-6969.
2. Visnapuu T, Mardo K, Mosoarca C, Zamfir A, Vigants A, Alamäe T. 2011. Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate Specificity, Polymerizing Properties and Usage of Different Acceptors for Fructosylation. *J Biotechnol*, 155: 338-349.
3. Belghith K, Dahech I, Belghith H, Mejdoub H. 2012. Microbial Production of Levansucrase for Synthesis of Fructooligosaccharides and Levan. *Int J Biol Macromol*, 50: 451-458.
4. Santos-Moriano P, Fernandez-Arrojo L, Poveda A, Jimenez-Barbero J, Ballesteros A, Plou FJ. 2015. Levan Versus Fructooligosaccharide Synthesis Using the Levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of Reaction Conditions. *J Mol Catal B: Enzym*, 119: 18-25.
5. Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants a, Viesturs U, Danilevics a. 2002. Fructooligosaccharide and Levan Producing Activity of *Zymomonas mobilis* Extracellular Levansucrase. *Process Biochem*, 38 (5): 701-706.
6. Vigants A, Marx S, Linde R, Ore S, Bekers M, Vina I, Hicke H. 2003. A Novel and Simple Method for the Purification of Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr Microbiol*, 47: 198-202.
7. Arvidson S, Rinehart B, Gadala-Maria F, 2006. Concentration Regimes of Solutions of Levan Polysaccharide from *Bacillus sp.* *Carbohydr Polym*, 65 (2): 144-149.
8. Benigar E, Dogsa I, Stopar D, Jamnik A, Cigic I, Tomsic M. 2014. Structure and Dynamics of a Polysaccharidematrix: Aqueous Solutions of Bacterial Levan. *Langmuir*, 30 (14): 4172-4182.

9. Rehm A. 2009. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursor: Application and Perspectives. Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 145.
10. Srikanth R, Siddartha G, Sundhar Reddy C, Haris B, Janaki Ramaiah M, Uppuluri K. 2015. Antioxidant and Anti-inflammatory Levan Produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its Statistical Optimization. *Carbohydr Polym*, 123: 8-16.
11. Srikanth R, Reddy C, Siddartha G, Ramaiah M, Uppuluri K. 2015. Review on Production, Characterization and Applications of Microbial Levan. *Carbohydr Polym*, 120: 102-114.
12. Wu F, Chou S, Shih I. 2013. Factors Affecting the Production and Molecular Weight of Levan of *Bacillus subtilis* natto in Batch and Fed-batch Culture in Fermenter. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 44 (6): 846-853.
13. Yıldız S. 2011. The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants. *Food Rev Int*, 27: 16-50.
14. Sangeetha P, Ramesha M, Prapulla S. 2005. Recent Trends in the Microbial Production, Analysis and Application of Fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 16: 442-457.
15. Kaplan H, Hutkins R. 2000. Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 66 (6): 2682-2684.
16. Gupta S, Das P, Singh S, Akhtar M, Meena D, Mandal S. 2011. Microbial Levan, an Ideal Prebiotic and Immunonutrient in Aquaculture. *World Aquaculture Society*, 42 (1): 61-66.
17. Vaidya V, Prabu G, Theertha Prasad D. 2015. Heterologous Expression and Characterization of Thermostable Levansucrase (BsSacB) from *Bacillus subtilis* BB03. *J Biol Sci*, 15 (1): 10-22.
18. Porras-Dominguez J, Avila-Fernandez A, Miranda-Molina A, Rosriguez-Alegria M, Munguia A. 2015. *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB) Activity Affects Average Levan Molecular Weight. *Carbohydr Polym*, 132: 338-344.
19. Korneli C, Biedendieck R, David F, Jahn D, Wittmann C. 2013. High Yield Production of Extracellular Recombinant Levansucrase by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbial Biotechnol*, 97: 3343-3353.
20. Tian F, Inthanavong L, Karboune S. 2011. Purification and Characterization of Levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in Intra- and Extracellular Forms Useful for the Synthesis of Levan and Fructooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (10): 1929-1938.
21. Zhang T, Li R, Qian H, Mu W, Miao M, Jiang B. 2014. Biosynthesis of Levan by Levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydr Polym*, 101: 975-981.
22. Nakapong S, Pichyangkura R, Ito K, Iizuka M, Pongsawasdi P. 2013. High Expression Level of Levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and Synthesis of Levan Nanoparticles. *Int J Biol Macromol*, 54: 30-36.
23. Caputi L, Nepogodiev S, Malnoy M, Rejzek M, Field R, Benini S. 2013. Biomolecular Characterization of the Levansucrase of *Erwinia amylovora* a Promising Biocatalyst for the Synthesis of Fructooligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 61: 12265-12273.
24. Velazquez-Hernandez M, Baizabal-Aguirre V, Cruz-Vazquez F, Trejo-Contreras M, Fuentes-Ramirez L, Bravo-Patino A, Cajero-Juarez M, Chavez-Moctezuma M, Valdez-Alarcon J. 2011. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Levansucrase is Involved in Tolerance to NaCl, Sucrose and Desiccation and in Biofilm Formation. *Arch Microbiol*, 193: 137-149.
25. Inthanavong L, Tian F, Khodadadi M, Karboune S. 2013. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* Levansucrase as Potential Biocatalyst for the Synthesis of Levan and Fructooligosaccharides. *Biotechnol Prog*, 29: 1405-1415.
26. Dobruchowska J, Meng X, Leemhuis H, Gerwig J, Dijkhuizen L, Kamerling J. 2013. Glucooligomers Initially Formed by the Reuteransucrase Enzyme of *Lactobacillus reuteri* 121 Incubated with Sucrose and Malto-oligosaccharides. *Glycobiology*, 23 (9): 1084-1096.
27. Waldherr F, Meissner D, Vogel R. 2008. Genetic and Functional Characterization of *Lactobacillus panis* Levansucrase. *Arch Microbiol*, 190: 497-505.
28. Paul A, Samaddar N, Dutta D, Bagchi A, Chakravorty S, Chakravorty W, Gachhui R. 2011. Mercuric Ion Stabilizes Levansucrase Secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* Strain RG1. *Protein J*, 30: 262-272.

29. Silbir S, Dagbaglı S, Yegin S, Byasal T, Goksungur Y. 2014. Levan Production by *Zymomonas mobilis* in Batch and Continuous Fermentation Systems, *Carbohydr Polym*, 99: 454-461.
30. Cote L. 1988. Production of Constitutive Extracellular Levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL-B 1678. *Biotechnol Lett*, 10 (12): 879-882.
31. Abdel-Fattah A, Mahmoud D, Esawy M. 2005. Production of Levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzyme Sythesis of Levan and Fructo-oligosaccharides. *Curr Microbiol*, 51: 402-407.
32. Ahmed S. 2008. Optimization of Production and Extraction Parameters of *Bacillus megaterium* Levansucrase Using Solid-State Fermentation. *J Appl Sci Res*, 4: 1199-1204.
33. Esawy M, Abdel-Fattah A, Ali M, Helmy W, Salama B, Taie H, Awad G. 2013. Levansucrase Optimization Using Solid State Fermentation and Levan Biological Activities Studies. *Carbohydr Polym*, 96 (1): 332-341.
34. Gonçalves B, Mantovan J, Ribeiro M, Borsato D, Antonia M, Celligoi P. 2013. Optimization Production of Thermo-active Levansucrase from *Bacillus subtilis* (natto) CCT7712. *J Appl Biol Biotechnol*, 1: 001-008.
35. vanHijum S, Szalowska E, van der Maarel M, Dijkhuizen L. 2004. Biochemical and Molecular Characterization of a Levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 150: 621-630.
36. Goldman D, Lavid N, Schwartz A. 2008. Microfibril Structure of the Two Active Forms of *Zymomonas mobilis* Levansucrase. *J Biol Chem*, 283: 32209-32217.
37. Food and Drug Administration, "GRAS Notice No. GRN 000044" (Son erişim tarihi 28 Ocak 2016).
38. YuWang M, Tao Zeng M, Shu-e Wang M, WeiWang M, QianWang M, Hong-XiaYu M. 2010. Fructooligosaccharides Enhance the Mineral Absorption and Counter Act the Adverse Effects of Phytic Acid in Mice. *Nutrition*, 26: 305-311.
39. Ganaie M, Lateef A, Gupta U. 2014. Enzymatic Trends of Fructooligosaccharides Production by Microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol*, 172: 2143-2159.
40. Renuka B, Kulkarni G, Vijayananol P, Prapulla G. 2013. Fructooligosaccharides for Notification of Selected Fruit Juice Beverages: Effect on the Quality Characteristic. *Lwt-Food Sci Technol*, 42: 1031-1033.
41. Padma Ishwarya S, Prabhasankar P. 2013. Fructooligosaccharide-Retention During Baking and its Influence on Biscuit Quality. *Food Biosci*, 4: 68-80.
42. Angiolillo L, Conte A, Del Nobile M. 2015. Technological Strategies to Produce Functional Meat Burgers. *Lwt-Food Sci Technol*, 62 (1): 697-703.
43. Protonotariou V, Euagelia K, Evageliou V, Yanniotis S, Mandala I. 2013. Rheological and Sensory Attributes of Cream Caramel Dessert Containing Fructooligosaccharides as Substitute Sweeteners. *Int J Food Sci Tech*, 48: 663- 668.
44. Borsari J, Celligi C, Buzato B, Silva F. 2006. Influence of Carbon Source and the Fermentation Process on Levan Production by *Zymomonas mobilis* Analyzed by the Surface Response Method. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 26: 604-609.
45. Dagbaglı S, Göksungur Y. 2012. Mikrobiyel polisakkaritler. *Gıdalarda Isısal Olmayan İşlemler*, (Baysal T, İçier F.), Nobel Yayın, Ankara, Türkiye, s.113-155.
46. Trujillo E, Arrieta G, Dafhnis F, Garcia J, Valdes J, Tambara Y, Perez M. 2001. FOS Production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* Levansucrase Expressed in the Methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Tech*, 28: 139-144.
47. Göksungur Y, Baysal T, Dağbağlı S, Giray N. 2012. Organik Orta Nemli Bazı Meyvelerin Üretiminde Organik Biyokoruyucu İçeren Yenilebilir Levan Filmle Kaplamanın Kaliteye Etkileri, Tübitak Projesi (Proje no :110O079).
48. Tinz- Malang K, Rast P, Grattepache F, Sych J, Lacroix C. 2015. Exopolysaccharides from co-cultures of *Weissella confusa* 11GU-1 and *Propionibacterium freudenreichii* JS15 Act Synergiestically on Wheat Dough and Bread Texture. *Int J Food Microbiol*, 214: 91-101.
49. Youssef G, Youssef A, Talha S, El-Aassar S. 2014. Increased Fructosyltransferase (Levansucrase) Production by Optimizing Culture Condition from *Pediococcus acidilactici* strain in Shaking Batch Cultures. *Life Sci*, 11 (7): 33-47.