

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* KG9'da
EKSTRASELLÜLER β -GALAKTOZİDAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Alevcan KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
HAZİRAN- 2010

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* KG9'da
EKSTRASELLÜLER β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Alevcan KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Kemal GÜVEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


DİYARBAKIR
HAZİRAN-2010

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR


Alevcan KAPLAN tarafından yapılan “ Termofilik *Bacillus licheniformis* KG9’da Ekstrasellüler β -Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Kemal GÜVEN (Danışman) 

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR 

Üye : Doç. Dr. Sait ERDOĞAN 

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../ 2010

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

ÖZ

Bu çalışmada Batman Taşlıdere sıcak su kaplıcasından izole edilen termofilik *Bacillus licheniformis* KG9'un biyoteknolojik öneme sahip ekstrasellüler β -galaktozidaz enziminin bazı özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde laktozlu (%1) ve laktozsuz ortamlarda 6-96 saatler arasında kültüre alınarak zamana bağlı enzim üretimi araştırıldı. Laktozlu ortamda enzim aktivitesinin 48.saatten (1.39 U/mg) başlayarak 96. saate (3.25 U/mg) kadar artarak devam ettiği görüldü. Laktozsuz ortamda ise enzim aktivitesinin 36.saatten (1.38 U/mg) başlayarak 96.saate (2.45 U/mg) kadar artarak devam ettiği ancak bu artışın laktozlu ortamdakine nazaran düşük olduğu görüldü.

pH ve sıcaklığın β -galaktozidaz enzimi üzerine etkisi pH 4 -10 ve 30°C ile 90 °C aralığında ham enzimde hem de kısmi olarak saflaştırılan enzim solüsyonunda yapıldı. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 8.0 ve 55 °C olarak bulundu.

Enzim aktivitesi üzerine farklı substrat konsantrasyonlarının etkisi 0.25 -6 mM aralığında araştırıldı. En uygun substrat konsantrasyonu 3 mM olarak tespit edildi.

Enzim üretimi üzerine farklı besiyerlerinin etkisi içerikleri farklı olan NB, BM1, BM2, BM3 besiyerlerinde araştırıldı. En iyi enzim aktivitesi NB besiyerinde elde edildi.

Enzim üretimi üzerine %1 oranındaki farklı azot ve karbon kaynaklarının etkisi araştırıldı. Karbon kaynaklarının enzim üretimi arttırmadığı tespit edildi. Laktozda araştırılan diğer karbon kaynaklarına göre daha yüksek bir aktivite tespit edildi. Galaktoz, glukoz ve çözünebilir nişastanın ekstrasellüler enzim üretimini

büyük oranda inhibe ettiği tespit edildi. Azot kaynaklarından glisin ve amonyum sülfatın enzim üretimini az miktarda arttırdığı tespit edildi. Yeast ekstrakt, beef ekstrakt , pepton ve tripton'un enzim üretimini arttırmadığı tespit edildi.

Enzim amonyumsülfat çöktürmesi ve diyaliz aşamasından geçirilerek kısmi olarak saflaştırıldı. Ham ekstraktta enzimin spesifik aktivite değeri 1631 U/mg, verim %100, saflaştırma katsayısı 1 iken diyaliz sonrasında sırasıyla spesifik aktivite değerinin 19030.45 U/mg, verimin %15.7 ve saflaştırma katsayısının 11.66 olarak değiştiği tespit edildi.

Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların, metallerin, metal şelatörlerin etkisi araştırıldı. $MgCl_2$ 8 mM'da %16 oranında β -galaktozidaz aktivitesini arttırdığı, $ZnCl_2$ ve $CuCl_2$ 'ün 1mM'da sırasıyla%99.5 ve %93.5 oranında enzim aktivitesini inhibe ettiği, $CaCl_2$ 'ün 20 mM'da enzim aktivitesini %62 oranında inhibe ettiği, metal şelatörleri olan EDTA ve 1,10-phenanthroline monohidrat'ın ise enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin olmadığı tespit edildi. DTT ve β -mercaptoethanol'un 10 mM'da sırasıyla %37 ve %24 oranında enzim aktivitesini arttırdığı, PCMB'nin 4 mM'da enzim aktivitesini %52 oranında inhibe ettiği, Iodoacetamide'in 20 mM'da enzim aktivitesini %53 oranında inhibe ettiği, N-ethylenemaleimide ve PMSF'nin ise enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin olmadığı tespit edildi.

Kısmi olarak saflaştırılan enzimde gliserol ve sorbitolün dondurma-çözdürme işleminde koruyucu etkisi %1-5 konsantrasyonlarında araştırıldı. Sorbitol için en iyi koruyucu etki %5 konsantrasyonunda olduğu tespit edildi. Gliserol de ise %1'de %83, %2- 5 konsantrasyonlarında yaklaşık %90 oranında dondurma ve çözme işleminde koruduğu tespit edildi.

Enzimin termal stabilitesi 50 -65 °C sıcaklık aralıklarında araştırıldı. Enzimin aktivitesini 50 °C 120dk. sonunda %90 oranında koruduğu, 55 °C'de 120 dk. sonunda aktivitesini tamamı ile koruduğu, 60 °C'de 120dk. sonunda %90 oranında koruduğu tespit edildi. 65 °C'de ise 20 dk.'da enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edildi.

Glukoz ve galaktozun, enzim üzerinde yaptığı inhibisyon etkisi belirlendi. Glukoz ve galaktozun 2 -128 mM konsantrasyonları test edildi. Glukozun enzim üzerine ihibisyon etkisi gözlenmedi. Galaktoz'un ise 128 mM'da %97 oranında inhibisyona neden olduğu tespit edildi. Galaktoz'un inhibisyon çeşidini belirlemek amacı ile 4 mM, 16 mM, 32 mM konsantrasyonlarında ve belirli enzim konsantrasyonlarında, 1 -6 mM aralığındaki ONPG konsantrasyonları kullanıldı. Galaktoz'un enzim üzerinde yarışmalı bir inhibisyona neden olduğu tespit edildi. ONPG için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre sırası ile 3.52 mM ve 1.602 μ mol/dk. olarak hesaplandı.

12- 96. saatler arasında kültüre alınan bakterilerde zamana bağlı enzim üretim oranları non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi ile teyit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : *Bacillus licheniformis* KG9, Biyoteknoloji, β -Galaktozidaz, Ekstrasellüler enzim üretimi ve karakterizasyonu.

ABSTRACT

In this study it was aimed to investigate some features of biotechnologically important β -galactosidase enzyme produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* KG9 isolated from hot spring in Batman Taşlıdere.

Time related enzyme production was investigated by culturing *Bacillus licheniformis* KG9 in lactose-containing and lactose free NB medium between 6-96 hours. It was observed that enzyme activity in lactose-containing medium continuously increased, starting at 48 h (1.39 U/mg) up to 96 h (3.25 U/mg). It was seen that enzyme activity in lactose-free medium continuously increased, starting at 36 h (1.38 U/mg) up to 96 h (2.45 U/mg), but the increasing in this medium was less than the increasing in lactose containing medium.

The effect of pH and temperature on β -galactosidase enzyme and partially purified enzyme solution was investigated between the pH values 4- 10 and temperatures between 30°C and 90 °C. The optimum pH and temperature were found 8.0 and 55°C respectively.

The effect of different substrate concentrations on enzyme activity was investigated between 0.25 -6 mM. The most convenient substrate concentration was determined as 3 mM.

The impact of different mediums on enzyme production was investigated in NB, BM1, BM2, BM3 mediums which had different content. The best enzyme activity was gained from NB medium.

The effect of different nitrogen and carbon sources in % 1 ratios on the production of enzyme was investigated. It was determined that carbon sources didn't increase the enzyme production. It was determined that lactose showed higher

activity than the other investigated carbon sources. It was determined that galactose, glucose and soluble starch substantially inhibited extracellular enzyme production. It was observed that the nitrogen sources glycine and ammonium sulphate slightly increased enzyme production. Yeast extract, beef extract, pepton and tripton didn't increase enzyme production.

Enzyme was partially purified by using ammonium sulphate precipitation and dialysis. In crude extract specific activity value was 1631 U/mg, efficiency %100, purification coefficient was 1, after dialysis the specific activity value was 19030.45 U/mg, efficiency %15.7 and purification coefficient was change 11.66 respectively.

The effects of some chemicals, metals and metal chelating agent on partially purified enzyme was studied. It was determined that $MgCl_2$ increased β -galactosidase activity at the rate of %16 at 8 mM, $ZnCl_2$ and $CuCl_2$ at 1 mM inhibited enzyme activity at the percentage of %99.5 and % 93.5 respectively, $CaCl_2$ at 20 mM inhibited enzyme activity at the percentage of %62, while metal chelating agent EDTA and 1,10-phenanthroline monohydrate didn't effect on the enzyme activity. DTT and β -mercaptoethanol at 10 mM increased enzyme activity at the rate of %37 and %24 respectively, PCMB at 4 mM inhibited at the rate of %52, Iodoacetamide at 20 mM inhibited at the percentage of %53, while PMSF and N-ethylenemaleimide didn't effect on the enzyme activity.

Glycerol and sorbitol's protective effect to freeze-solve process on partially purified enzyme was investigated in %1-5 concentrations. The best protective effect for sorbitol was %5 concentration while it has been determined that glycerol protected, %83 percent at %1, and %90 percent in %2- 5 concentrations.

Thermal stability of the enzyme was investigated in 50 °C -65 °C temperature intervals. Enzyme had %90 activity at 50 °C for 120 min. Enzyme protected its all activity at 55 °C for 120 min. Enzyme had %90 activity at 60 °C for 120 min. Enzyme lost all activity at 65 °C in 20 min.

The effect of glucose and galactose on enzyme activity was determined. 2-128mM concentrations were investigated. No inhibition effect of glucose on enzyme activity was observed. Galactose at 128 mM caused inhibition at the rate of %97. In order to detect the type of inhibition, 4mM, 16 mM and 32 mM at concentrations and determined enzyme concentration were used with 1-6mM ONPG concentrations. It has been determined that the Galactose had a racial inhibition effect on enzyme. For ONPG K_m ve V_{max} values of ONPG according to Lineweaver–Burk plot was estimated as 3.52 mM and 1.602 μ mol/dk.

The rate of time related enzyme production in bacteria cultured between 12-96 hours was confirmed with non-denature polyacrylamid gel electrophoresis.

Key Words : *Bacillus licheniformis* KG9, Biotechnology, β -Galactosidase, Extracellular enzyme production and characterization.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca, daima yol gösteren, bilimsel emeklerinin yanı sıra bir büyük olarak yardım ve yakın ilgisini esirgemeyen değerli hocam sayın **Prof. Dr. Kemal GÜVEN** ' e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında beni her konuda destekleyip, yardımlarını esirgemeyen ve benim için her türlü fedakârlığı yapan değerli eşim **Mahmut KAPLAN** ' a ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Deneysel aşamada bilgi ve deneyimlerini paylaşan sayın hocam **Dr. Reyhan Gül GÜVEN**' e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşamada ve tez yazım aşamasında bilgisini ve yardımını esirgemeyen sayın hocam **Arş. Gör. Fatma MATPAN BEKLER**' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında Hidrobiyoloji laboratuvarının imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve her daim manevi desteğini gördüğüm sayın hocam **Doç. Dr. Elif İpek CENGİZ**' e ve **Prof. Dr. Erhan ÜNLÜ**' ye teşekkürü bir borç bilirim.

Deneyselerimin spektroskopik okunmasına yardımcı olan ve Biyokimya laboratuvarı' nın imkânlarından faydalanmamı sağlayan sayın **Prof. Dr. Çetin AYTEKİN**' e, **Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL**' a, **Dr. M.Hüseyin ALKAN**' a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında yardım ve desteğini gördüğüm değerli arkadaşım **Ömer ACER**' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında manevi desteğini benden esirgemeyen arkadaşlarım **Pelin UĞURLU** ve **Besi SERİN**' e teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuarı paylaştığımız yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonunun 08-FF-19 numaralı projemize vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
1.1.Enzimler	2
BÖLÜM KAYNAKLARI.....	5
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1 Biyoteknoloji.....	7
2.2. Ekstrem Mikroorganizmalar	8
2.2.1. Termofilik Mikroorganizmalar	9
2.3. <i>Bacillus</i> Cinsi	11
2.3.1. Termofilik Basiller	12
2.3.1.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	13
2.4. Termostabil Enzimler ve Biyoteknolojide Kullanımı	14
2.5. β-Galaktozidaz.....	16
2.5.1. Reaksiyon Mekanizması	17
2.7. β-Galaktozidaz'ın Fizikokimyasal Özellikleri	23
2.8.β-Galaktozidaz'ın Biyoteknolojik Kullanım Alanları	23
2.8.1. Peyniraltı suyundaki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı	23

2.8.2. Süt ve süt ürünlerindeki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı.....	24
2.8.3. Oligosakkaritlerin sentezlenmesinde kullanımı.....	25
2.9.Önceki Çalışmalar.....	27
BÖLÜM KAYNAKLARI.....	36
3. MATERYAL VE METOD.....	47
3.1. Biyolojik Materyal.....	47
3.2. Kimyasal Maddeler.....	47
3.2.1. Besiyeri Maddeleri.....	47
3.2.2. Karbon Kaynakları.....	47
3.2.3. Azot Kaynakları.....	47
3.2.4. Kimyasal Maddeler, Metaller ve Şelatörler.....	47
3.2.5. Elektroforetik Maddeler.....	48
3.3. Besiyerleri.....	48
3.3.1. Sıvı Besiyerleri.....	48
3.3.2. Katı Besiyeri.....	49
3.4. Tamponlar.....	49
3.5. Kullanılan Aletler.....	49
3.6. Bakterinin Kültüre Alınması.....	50
3.7. β-Galaktozidaz Aktivite Tayini.....	50
3.8. Protein Miktar Tayini.....	51
3.9. Değişik Zaman Peryotlarında %1 Laktozlu ve Laktozsuz Ortamlarda Enzim üretiminin Araştırılması.....	51
3.10. Optimum Sıcaklık Tayini.....	52
3.11. Optimum pH Tayini.....	52

3.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Konsantrasyonlarının.....	52
Etkisinin Araştırılması	52
3.13. Farklı Besiyerlerinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	52
3.14. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması.....	53
3.15. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması.....	53
3.16. Enzimin Kısmi Saflaştırılması: Çöktürme ve Diyaliz.....	53
3.17. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması	54
3.18. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Şelatörlerin Etkilerinin Araştırılması.....	55
3.19. Gliserol ve Sorbitol'ün Enzim Aktivitesi Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması	55
3.20. Termal Stabilite'nin Belirlenmesi.....	56
3.22. Elektroforez	57
3.22.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmli, 1977) ³	57
BÖLÜM KAYNAKLARI.....	60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	61
4.1. BULGULAR	61
4.1.1. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamlarda Zamana Bağlı Enzim Aktivitesindeki Artışın Belirlenmesi	61
4.1.2. pH'nın β-Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	61
4.1.3. Sıcaklığın β-Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	62

4.1.4.Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Etkisi	62
4.1.5. Farklı Besiyerlerinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	62
4.1.6. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi	63
4.1.7. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi.....	63
4.1.8. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması	64
4.1.9.Ünite Tanımı İçin o-Nitrophenol'e ait "Extinction Sabitesi"nin Bulunması	
.....	65
4.1.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkileri.....	65
4.1.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Şelatörlerin Etkileri	66
4.1.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Gliserol ve Sorbitol'ün Koruyucu Etkisi	67
4.1.13. Termal Stabilite.....	67
4.1.14. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Tespiti	68
4.1.15. Non-denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi	69
4.2. TARTIŞMA	70
4.3. ŞEKİLLER	86
Kimyasallar	90
Metaller ve Şelatörler.....	91
BÖLÜM KAYNAKLARI.....	94
5. SONUÇ VE ÖNERİLER:.....	100
BÖLÜM KAYNAKLARI.....	104
6. ÖZGEÇMİŞ	105

ÇİZELGELERİN DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı Ekstreozimler ve Uygulama Alanları

Çizelge 2.2. *Bacillus licheniformis*'in taksonomik yeri

Çizelge 2.3. Mikrobiyal β -D Galaktozidaz Kaynakları

Çizelge 2.4. Dünyadaki Yaygın β -Galaktozidaz Eksikliği

Çizelge 2.5. Laktoz Hidrolizi Boyunca Oluşan Oligosakkaritlerin Yapıları

Çizelge 4.1. Kısmi Saflaştırma Tablosu

Çizelge 4.2. β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkisi

Çizelge 4.3. β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal ve Şelatörlerin Etkisi

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Şekil 2.1. β -galaktozidaz tarafından glikozidik bağın kırılma reaksiyonu

Şekil 2.2. β -Galaktozidaz tarafından laktozun hidrolizi

Şekil 2.3. β -galaktozidaz tarafından katalizlenen galaktozil transfer reaksiyonu.

Şekil4.1. Laktozlu ve laktozsuz ortamlarda zamana bağlı β -galaktozidaz aktivitesindeki artış.

Şekil 4.2. pH'nın β -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkisi .

Şekil 4.3. Sıcaklığın β -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkisi.

Şekil 4.4. β -galaktozidaz aktivitesi üzerine farklı substrat konsantrasyonlarının etkisi.

Şekil 4.5. Farklı besiyerlerinin β -galaktozidaz üretimi üzerine etkisi.

Şekil 4.6. β -galaktozidaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi.

Şekil.4.7. β -galaktozidaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi.

Şekil 4.8. ONP'ye ait "Milimolar extinction coefficient(mE)" sabitesi.

Şekil 4.9. β -galaktozidaz aktivitesi üzerine gliserol ve sorbitol'ün koruyucu etkisi.

Şekil 4.10. Zamana bağlı β -galaktozidaz termal stabilite tayini.

Şekil 4.11. Lineweaver Burk Plot'a göre β -galaktozidaz'ın kinetik parametreleri.

Şekil4.12. Non- denatüre poliakrilamid jel elektroforezi.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ONPG	; O-Nitro-fenil- β -D-galactopyranoside
NB	; Nutrient Broth
PCMB	; <i>p</i> -Chloromercuribenzoate
PMSF	; Phenylmethylsulfonylfluoride
DTT	; Dithiothreitol
NEM	; N-Ethylenemaleimide
EDTA	; Ethylenediamintetraaceticacide
OECD	; Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
GOS	; Galaktooligosakkarit
PAS	; Peynir altı suyu
mM	; Milimolar
Rpm	; Devir/dakika
K_m	; Michaelis-Menten hız sabiti (mM)
V_{max}	; Maksimum hız (μ mol/ dk)
U/mg	; Ünite/miligram
OD	; Optik density
SDS	; Sodyum dodesil sülfat
FCR	; Folin reaktifi
TEMED	; N-N-N`-N`-Tetrametiletlen daimin
APS	; Amonyum persülfat
BNG	; 6-Bromo-2 naphthly- β -D-galactopyranoside
BFB	; Brom Fenol Blue

1. GİRİŞ

Tüm dünya ülkelerinde endüstriyel alandaki yatırımlar giderek artmaktadır. Ülkemizde ise 20. yüzyılın ortalarında başlayan ve giderek hızlanan endüstrileşme sürecinde, özellikle gıda, tekstil, kimya gibi sektörler öne çıkmaktadır¹. Bununla birlikte bu endüstriyel alanların, üretimlerinde ve üretim sonrası oluşan atık maddelerinin uzaklaştırılması ve/veya onlardan yeni ürünlerin elde edilmesi teknolojisinin geliştirilmesi yolunda yapılan çalışmalar hız kazanmaktadır². Bu çalışmalardan özellikle endüstriyel enzimlerle ilgili alan oldukça dikkat çekmektedir.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır³. Endüstriyel yolla enzim üretiminde mikrobiyal kaynaklı enzim kullanılmasında fermentasyon metodlarının gelişmesi, çevre koşullarının kontrol altında tutulması, doğru suşların seçimi ile üretim potansiyeli artmakta ve miktar sınıflandırması faktörü de ortadan kalkmaktadır⁴.

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, rennin %10, tripsin %3, lipaz %3, diğer karbonhidratı parçalayan enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır. Parasal olarak yüz milyonlarca dolar şeklinde tanımlanan ekonomik değeri vardır. 1985 yılında yapılan bir değerlendirmede, dünyadaki enzim satışının 450 milyon doları bulduğu belirtilmektedir. Bugün dünyadaki enzim satışında 2- 3 kat artış olduğu bilinmektedir⁵. Enzim kullanımı açısından gıda endüstrisi, tek başına %50'lik bir paya sahiptir⁶.

Gıda sektörünün önemli bir yan kolu olan süt ve süt ürünlerinin üretimi ve işlenmesi de, hem üretim kapasitesi hem de çevreye verdiği kirlilik yükü bakımından ülkemizde önemli bir yer tutmaktadır¹. Süt ve süt ürünleri endüstrisi bünyesinde gerçekleşen biyoteknolojik dönüşümlerde, enzimlerin kullanılması, sağladığı avantajlar bakımından günümüzde oldukça önemli bir yerdedir.

1.1.Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğinde olan protein yapısındaki maddelerdir. Bazı reaksiyonları gerçekleştiren ve ribonükleik asit yapısında olan ribozimler dışında enzimlerin tamamı protein yapısındadır⁷.

Canlı organizmalarda gerçekleşen çok sayıda reaksiyon enzimlerle katalizlenir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karşıtlarına göre $10^7 - 10^{16}$ kez daha hızlı gerçekleşir. Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlar. Bu nedenle enzimler tıp alanında, kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, tarım ve ziraat alanlarında oldukça önemli bir yere sahiptirler⁸. İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmaktadır. Örneğin alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani' nin atmaca mide suyunun eti eritebildiğini bulması, 1811 yılında Kirchoff' un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan' nın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi

enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir. Payen ve Persoz' un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol ktürmesiyle elde etmeleri enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri olmuřtur⁹ . Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir³.

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun tipine bağlı olarak 6 ana gruba ayrılmışlardır. Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, sentetazlar ve ligazlar olarak sınıflandırılmıřlardır¹⁰. Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur³.

Mikrobiyal kaynaklı ekstrasellüler enzimler ekolojik ve ekonomik olarak mikrobiyal hücrenin ekonomisi ve global karbon döngüsünde önemlidirler¹¹. Ekstrasellüler enzimler ortamda bulunan yüksek moleköl ağırlıklı besin maddelerini hidroliz ederek mikroorganizma tarafından alınabilir forma dönüştürürler. Ekstrasellüler enzimler mikroorganizmanın ürediği/üretildiği ortama salındığı için, ortamın fiziksel ve kimyasal özelliklerine karşı kendisini stabil kılan bazı özelliklere sahip olması gerekir.

Ekstrasellüler enzimler mikroorganizma için gerekli ise fazla miktarda üretilebilir, söz konusu enzimin substratı ortamda bulunursa enzim üretimi indüklenebilir. Bu özelliği sayesinde, ekstrasellüler enzimler endüstriyel alanlarda kullanılmak için uygun ve vazgeçilmez moleküller haline gelmiştir. Günümüzde mikrobiyal enzimlerin pek çoğu önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üreilmeye, sanayi, endüstri alanında kullanılmaya başlanmıřtır¹².

β -galaktozidaz(lâktaz), proteaz, lipaz, katalaz, transglutaminaz gibi enzimler süt ve ürünlerinin üretiminde veya kalitelerinin arttırılmasında kullanılan başlıca mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir¹³.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar mikrobiyal kaynaklı enzimlerden termofilik olan grup üzerine yoğunlaşmıştır. Termofillerden elde edilen termostabil enzimlerin, mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda bile stabil oldukları ve termofil enzimlerinin daha sağlam oldukları belirlenmiştir¹⁴. Termostabil enzimlerden bazılarının mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termostabilitelerinin bozulmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğu belirtilmiştir^{15,16}.

β -galaktozidaz (β -D galaktozid galaktohidroliz, E.C. 3.2.1.23), laktozdaki β -glikozidik bağının enzimatik hidrolizini katalizleyerek, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü laktoza göre daha fazla olan glukoz ve galaktozun oluşmasını sağlamaktadır¹⁷.

Bu çalışmada, hızla gelişen süt ve süt endüstrisinin, üretiminde, üretim sonrası oluşan atık suların prosesinde, süt ürünlerinin insanlar tarafından tüketilmesi ile ortaya çıkan sorunların giderilmesinde, fonksiyonel gıda olarak değerlendirilen ve intestinal mikrobiyal dengenin korunmasında elzem olan prebiyotik besin üretiminde biyoteknolojik olarak önemli bir yere sahip olan β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışma *Bacillus licheniformis* türlerinde yapılan ilk ekstrasellüler β -galaktozidaz çalışma olması yönüyle biyoteknolojik uygulamaların geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

BÖLÜM KAYNAKLARI

1. Yiğit, N. “ *Peyniraltı suyundan sürekli sistemde biyogaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi* “ Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3–4-5s, **2007**.
2. Kahyaoğlu, M.; Kıvanç, M. *Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 2007*, 17(2): 61 -66.
3. Kıran, Ö.E. ; Çömlekçioğlu, U. ; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 2006*, 9(1).
4. Topal, Ş. *Mikrobiyal Enzimler ve Biyoteknolojik Yolla Rennin Üretimindeki Gelişmeler, Gıda Dergisi, 1988*, 13 (3), 183 -190.
5. Kıran E.Ö. ; Çömlekçioğlu U. *Zeytin Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik Bacillus sp. Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi; KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 2003*, 6(2),s. 41 -48.
6. Topal, Ş. ; Pembeci, C. ; Borcaklı, M. *Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz, Turk J Biol, 2000*, 24, 79–93.
7. Şener, A. ; Ünal, M.Ü. *Enzim Stabilizasyonu, Türkiye 9. Gıda Kongresi 24-26 Mayıs, 2006*, Bolu.
8. Telefoncu, A. , *Enzimoloji, Yüksek Lisans Yazokulu, 1997*, 21–27 Eylül. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446s.
9. Aehle, W. *Enzymes in Industry. Production and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 2004*, Weinheim.
10. Gözükar, M.E. *Biyokimya, 1997*, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara

11. Dhaked, K.R. . ; Alam, I. S. and Singh, L. *Characterization of β -galactosidase from an Antarctic Bacillus sp., Indian Journal of Biotechnology*, **2005**, vol.4, pp.227-231.
12. Kuzu, S.B. “*Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*” Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1s, **2008**.
13. Er, B. ; Sarıahmetoğlu, B. *Süt endüstrisinde mikrobiyel enzim kullanımı, Vet Hekim Der Derg.* **2009**, 80(1): 25 -30.
14. Sabato, D. ; Nucci, R. ; Rossi, M. ; Gorczynski, I. ; Gorczynski , Z. and Lakowicz, J. *The β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. Biophys. Chem.* , **1999**, 81: 23–31.
15. Niehaus, F. ; Bertoldo, C. ; Kahler, M. ; Antranikian, G. *Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. Appl Microbiol Biotechnol*, **1999**, 51: 711- 729.
16. Jaenicke, R. and Böhm, G. *The stability of proteins in extreme environments. Current Opinion in Structural Biology*, **1998**, 8; 738-748.
17. Panesar, P. S. ; Panesar, R.; Singh S R.; Kennedy F. J.; Harish K. “*Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase*” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2006**, 81:530–543.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1 Biyoteknoloji

Günümüzün en yaygın, en etkin jenerik teknolojilerinden bir tanesi olan biyoteknoloji; canlı organizmaların veya canlılığın moleküler temellerini oluşturan kavram ve işleyiş kurallarının kullanımı ile geliştirilen teknolojileri ve teknolojik ürünleri kapsamaktadır. İnsanlık tarihiyle eşdeğer bir geçmişe sahip olan “geleneksel biyoteknoloji”, son elli yılda moleküler biyoloji ve genetik alanlarında gerçekleşen bilimsel ilerlemeler sayesinde, yepyeni bir anlam ve önem kazanmıştır. Genetik bilgi ve malzemeyi önemli bir hammadde olarak kullanan ve son yirmi yıl içinde baş döndürücü bir hızla gelişerek özellikle sağlık, tarım, gıda, çevre ve enerji uygulamalarında geniş kullanım ve büyük kazanımlar elde edilen “modern biyoteknoloji” , 21. yüzyılda yalnızca ekonominin değil, neredeyse hayatın bütün alanlarını etkileyerek son derece köklü değişikliklere neden olması beklenen teknolojiler arasında en ön sıralarda yer almaktadır¹. Bu gelişmelere paralel olarak 1982 yılında OECD tarafından biyoteknolojinin tanımı yapılmıştır. Buna göre “Biyoteknoloji; temel bilimlerin ve mühendislik ilkelerinin, hammaddelerin biyolojik araçlar yardımı ile ürünlere dönüştürüldüğü süreçlere uygulandığı bir teknolojidir².”

Biyoteknolojinin çalışma alanları dünyanın temel problemlerini oluşturur. Örneğin; protein üretimi ve insan beslenmesinin garantiye alınması, hammadde ve enerji stoklarının daha verimli değerlendirilmesi, insan ve hayvan sağlığını koruyucu bileşiklerin üretilmesi, bitkilerin biyoteknolojik korunması, bulaşıcı ve salgın hastalıklar ile savaş, atık su arıtılması, çevre korunması ve atıkların yeniden değerlendirilmesi gibi. Son yirmi yılda, dünyadaki uygulama ve araştırma konularına

göz atıldığında, biyoteknolojinin özellikle sağlık, tarım, gıda sektörleri ile kimyasalların çevreye verdiği zararın giderilmesi için kullanıldığı görülmektedir³.

2. 2. Ekstrem Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitelerin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, düşük sıcaklık, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ekstrem olarak tabir edilen çevrelerde de bulunabileceğini ortaya koymuştur⁴. Bununla birlikte bu olağandışı bölgelerde başta bakteriler ve arkealar olmak üzere çoğu organizmalar kolonize olurlar⁵. Ekstremofiller olarak adlandırılan bu organizmalar değişik ekstrem çevrelerde yaşamaya yapısal ve moleküler düzeyde adapte olmuşlardır. Yaşadıkları bu ekstrem koşullar nedeniyle çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılan eşsiz biyokatalizörler üretirler⁶.

Bazı ekstremozimler ve uygulama alanları **Çizelge 2.1.**'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı Ekstremozimler ve Uygulama Alanları⁷.

Ekstremofil Enzim	Enzim	Endüstriyel uygulamalar
Termofil (55- 113 °C)	Amilazlar Ksilanazlar Proteazlar DNA polimerazlar	Tatlandırıcılar için glikoz ve fruktoz Kağıt beyazlatma Fırıncılık, bira, deterjan Genetik mühendisliği
Psikrofil (-2- 20 °C)	Proteazlar Dehidrogenazlar Amilazlar	Peynir olgunlaştırılması, süt üretimi Biyosensörler Deterjanlarda polimer degradasyonu
Asidofil (pH< 3)	Sülfür oksidaz	Kömür desülfürizasyonu
Alkafil (pH> 8)	Selülazlar	Deterjanlarda polimer degradasyonu
Halofil (2– 5 M NaCl)	-	Poli (α -glutamik asit)(PGA) üretimi Poli (β -hidroksi butirik asit)(PHB) üretimi
Barofil (Yüksek basınç)	Tüm mikroorganizma	Jellerin ve nişasta granüllerinin oluşturulması
Metalofil (Yüksek metal konsantrasyonu)	Tüm mikroorganizma	Maden cevheri elde edilmesi, biyomineralizasyon

Ekstrem şartlara dayanıklı olan enzimlerin kullanılmak istenmesinin nedeni endüstriyel açıdan önemli olan birçok kimyasal işlemlerin yüksek sıcaklık ve basınç gibi sert koşullar altında gerçekleşmesidir. Günümüzde endüstride yaygın olarak kullanılan mezofilik mikroorganizmaların avantajlarının fazla olmasına rağmen kimyasal işlemlerdeki ekstrem pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu gibi uygulamalarda kullanımları sınırlı kalmaktadır. Buna karşılık ekstrem mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstremozimler) bahsedilen sert koşullara dayanıklıdır. Bu nedenle ekstremozimler son 20 yılda biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu enzimler ayrıca protein mühendisliğinde termoaktivite ve termostabilitenin tam olarak anlaşılabilmesi için model enzimler olarak kullanılmaktadır^{8,9}.

Günümüze kadar, ekstremofil ve hipertermofil mikroorganizmalardan polisakkarit parçalayan selülaz, amilaz, pullulanaz, lipaz, esteraz, fitaz gibi enzimlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve endüstriyel işlemler için yeni imkanlar sağlanmıştır¹⁰.

2.2.1. Termofilik Mikroorganizmalar

Ekstrem mikroorganizmalar ile ilgili son yıllarda yapılan birçok çalışmada en çok termofilik mikroorganizmalar grubu dikkat çekmektedir. Termofilik mikroorganizmaların biyokatalitik potansiyelleri ve enzimleri üzerinde birçok araştırmalar yapılmıştır¹¹. Termofilik mikroorganizmaların mezofilik mikroorganizmalara göre yüksek üreme hızları, son ürünün kolay kazanılması, yüksek işlem stabilitesi ve verimi, nişasta selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan

fermente edebilmeleri gibi birçok avantajları vardır. 60 -110 °C arasında yüksek sıcaklıklarda gelişebilen termofilik mikroorganizmalar, volkanik ve jeotermal kaynaklarda bulunurlar. Bunlara örnek olarak solfatarik alanlar (yanardağların püskürmesi sırasında başlangıcı gösteren gaz tütme bölgeleri), nötral sıcak su kaynakları ve deniz dibi sıcak su kaynakları ile yüksek sıcaklığa sahip deniz ve karasal ortamları sayılabilir¹².

Geniş sıcaklık aralıklarında üreyebilen termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıkta optimum fonksiyon göstermek için biyolojik membranlarında çeşitli adaptasyonlara ihtiyaç duyarlar. Genelde bakterilerin fosfolipit kompozisyonu gelişim sıcaklığı ile değişir¹³. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden yapılmıştır. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik bir çevre sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi yeterince stabil tutar¹⁰. Bu mikroorganizmalar diğer geleneksel mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında, doğaları nedeniyle hücresel komponentleri, enzimleri ve proteinleri de oldukça termostabildir. Enzimleri mezofilik homologlarına göre sadece termostabil değildir ayrıca kimyasal ajanlara da dayanıklıdır bu da endüstriyel uygulamalar için oldukça önemlidir¹⁴.

Son yıllarda biyoteknolojik kullanımlarda önem kazanan bazı termofilik *Bacillus* üyelerinin varlığı bilinmektedir. +50 °C ile +70 °C arasında yaşayanlardan bazıları *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus thermophilus*, *Bacillus clostridium*'dur¹⁵.

2.3. *Bacillus* Cinsi

Yaygın olarak hemen her yerde bulunabilen *Bacillaceae* familyası içinde olan *Bacillus* cinsi bakteriler aerob veya fakültatif anaerob, gram pozitif ya da değişken gram olan spor formlu çomak yapan bakterilerdir. Vejetatif formları 0.5 – 1.2 µm eninde 2.5 – 10 µm büyüklüğünde olabilir ve 25- 37 °C arasındaki optimal sıcaklıklarda gelişebilirler. Buna rağmen termofilik ve psikrofilik olan üyeleri 75 °C nin üstündeki ve 3 °C nin altındaki sıcaklıklarda çoğalabilirler. Bazı türleri pH 2 ve 10 gibi ekstrem asidite ve alkalinite şartlarında gelişebilirler. Çoğu ırkı katalaz pozitifdir, peritrişli (çevre kirpikler) flagellaya sahiptir^{16,17}. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır¹⁸. Türlerinin hepsi ısıya dayanıklı spor üretme yeteneğindedirler. Sporları silindirik, elipsoid, küresel olabilir ve santral, subterminal veya terminal konumda bulunurlar. *Bacillus anthracis* dışındakilerin hepsi saprofitiktir genellikle patojenik değildirler. Mezofilik cinsler çoğunlukta olsa da zorunlu termofil, psikrofil, asidofil ve halofil cinslerde bulunur¹⁹.

Genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. Çünkü, gram negatif bakteriler ürettikleri proteinleri protoplazmalarında ya da periplazmik boşluklarında biriktirirler ve bu da üretilen ürünün izolasyonunu güçleştirerek suştan birden fazla kez yararlanılmasını engeller. Ayrıca sentezlenen ürünlerin organizmaya karşı toksik etki oluşturması söz konusudur. İntrasellüler ortamda sentez ürünlerinin biriktirilmesi çözünmeyen protein oluşumu, yanlış protein katlanmaları ve etkin olmayan disülfid bağ formasyonu gibi sorunları beraberinde

getirmektedir. Ayrıca gram negatif bakteriler, insanlara toksik olan endotoksin ve intrasellüler protein üretmeleri nedeniyle, proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında ekstra maliyet oluşturmaktadırlar²⁰.

Mantarlardaki aflatoksin gibi toksik yada alerjen bileşik üretimi de göz önünde bulundurulduğunda, gram pozitif bakteriler, özellikle *Bacillus* türleri endüstriyel enzim üretiminde öncelikli olarak tercih edilmektedirler.

Bacillus türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukanaaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar²¹.

2.3.1. Termofilik Basiller

Termofilik Basiller 1994 yılında iki cins halinde (*Bacillus* ve *Alicyclobacillus*) sınıflandırılmaktaydı ve türlerin çoğu *Bacillus* cinsi içerisinde yer almaktaydı. Son yıllarda, artan *Bacillus* cinsi bakterilerinin geniş ve çeşitli grupları yeni cinslere bölünmüştür. Bu cinsler; *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Ureibacillus* ve son olarak *Geobacillus*'tur. Bu yeni cinsler 16S rRNA gen sekans analizleri baz alınarak ayrı filogenetik gruplara dahil edilmiştir^{22,23}.

Termofilik basiller, sıcaklıkla muamele edilmiş besin ürünlerinin kontaminantları olarak düşünülse de esas potansiyelleri proteaz, amilaz, lipaz ve DNA restriksiyon enzimleri gibi termostabil enzimlerin kaynağı olarak öneme sahiptirler²². *Bacillus* sp. cinsleri endüstriyel önemi olan termoaktif, termostabil, alkalik, ve şelatör dirençlilik özelliğine sahip enzimler üretirler. Bu enzimler

kaotropik ajanlara (üre, tiyöüre vb.) ve organik çözücüler gibi kimyasal denatüranlara karşı genellikle dirençlidirler²⁴.

2.3.1.1. *Bacillus licheniformis*

Yeryüzündeki çoğu toprak ve bitki materyallerinden izole edilebilen *Bacillus licheniformis* gram pozitif, fakültatif anaerob ve endospor formlu saprofitik organizmalardır. *B.licheniformis* izolatları denitrifikasyon yeteneği göstererek besin döngüsünde önemli bir yer tutmaktadırlar. Organizmanın hayvanlar ve bitkiler için patojen olmadığı rapor edilmiştir²⁵.

Bacillus licheniformis genom sekansları belirlenmiş olan *Bacillus* cinslerinden *Bacillus subtilis*'in olduğu grupta yer almaktadır. Bunlar *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve alkalifilik türlerden olan *Bacillus halodurans* ve *Bacillus subtilis*'tir²⁵.

Çizelge 2.2. *Bacillus licheniformis*'in taksonomik yeri²⁶.

Soy > Hücresel mikroorganizma

- > Bacteria
- > Firmicutes
- > Bacilli
- > Bacillales
- > Bacillaceae
- > Bacillus
- > Bacillus subtilis group
- > Bacillus licheniformis

20-25g/l gibi büyük miktarlarda protein içeren ekzoenzimleri biyoteknolojik olarak antibiyotiklerin, biyokimyasalların imalatında, endüstriyel uygulama alanları bulmaktadır^{25,27}. Son zamanlarda endüstride kullanılan enzimleri arasında farklı proteazlar, α -amilaz, penisilinaz, pentosanaz, sikloglikoziltransferaz, β -mannanaz ve farklı pektinolitik enzimler bulunmaktadır. Spesifik *Bacillus licheniformis* türleri basitrasin ve protisin gibi peptid antibiyotikleri üretmede kullanılırlar buna ek olarak çoğu türleri de sitrik asit, inozin, inozinik asit ve poli γ -glutamik asit gibi kimyasalların üretilmesinde kullanılırlar²⁷.

2.4. Termostabil Enzimler ve Biyoteknolojide Kullanımı

Enzimler hayatımıza bizim asla fark edemeyeceğimiz derecede girmişlerdir. Enzimler, yiyeceklerin, içeceklerin üretiminde, hazırlanmasında, giysilerin temizlenmesinde, hastalıkların teşhisinde kullanılır. Enzimler hayatın arkasındaki protein yapısındaki makinelerdir ve biyoteknoloji teknikleri ve enstrümanları ile biyolojik maddelerin hazırlanmasında kullanılmak üzere adaptasyonları yapılmaktadır²⁸.

Enzim teknolojisi, ekonomik, etkili ve ekolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Üretimi, sabitlenmesi (non-reaktive), paketlenmesi ve belirli ölçeklerde dağıtımının yapılabilmesi sonucu, enzimler, raflarda duran ekzotik bir maddeden ziyade, büyük depolarda muhafaza edilebilen endüstriyel bir madde olmuştur. Enzim endüstrisindeki ulaşılan nokta, onun yeni pazarlara ve yeni uygulama alanlarına girişini teşvik etmektedir²⁸.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir²⁹.

Ekstrem mikroorganizmalardan özellikle termofiller, termostabil biyokatalizörlerinden dolayı çok ilgi çekmektedir. Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkânsız olduğu sıcaklıklarda bile termofil bakterilerin enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmalar yapmaya yöneltmiştir³⁰.

Biyoteknolojik açıdan büyük potansiyellere sahip olan ekstreozimler içerisindeki en önemli enzimler termostabil enzimlerdir ve bu enzimler protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır. Diğer önemli bir neden ise bu enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik işlemlerdeki avantajlarıdır³¹. Yüksek sıcaklık bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini azaltır. Ayrıca sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilirliği açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir³².

Termostabil proteinler değişik denatüre şartlara yüksek tolerans gösterirler. Bu proteinler mezofilik proteinlere nazaran daha yüksek α heliks ve β tabakası içeriğine sahiptirler. Ayrıca bu proteinler çok yavaş katlanma hızı gösterirler. Bu özelliğin değişik denatüre şartlarında doğal yapıyı korumada önemli olduğu

sanılmaktadır^{4,10}. Termofillerin ısıya, denatürasyona, proteolizise dayanıklı proteinler içerdikleri rapor edilmiştir. Bu organizmalar tarafından sentezlenen ve şaperonin proteinleri olarak adlandırılan bu proteinler, denatüre proteinlerin katlanmasına yardımcı olarak doğal formlarını almalarına ve fonksiyonlarını yeniden kazanmalarına yardımcı olurlar. Ayrıca termofiller non-termotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara adapte olurlar¹⁰.

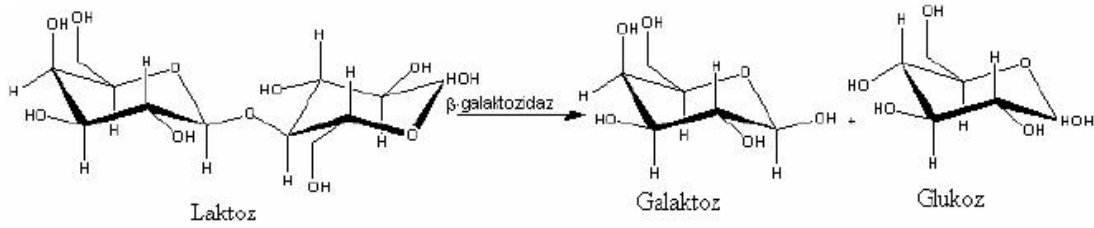
Biyoteknolojinin ilerlemesiyle ve enzimlerin saf olarak elde edilmeleriyle uygulamalar birçok alanda artmıştır ve termostabil enzimlerin kullanılabilirliğiyle endüstriyel işlemler için bir çok yeni imkan ortaya çıkmıştır. Termostabil enzimler çoğunlukla termofilik organizmalardan izole edilirler ve doğal yapılarındaki stabiliteden dolayı birtakım ticari uygulama alanları bulurlar¹⁰.

Bu güne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış olup, bunlar arasında yaklaşık 100 tanesi ticari kullanıma uygun bulunmasına rağmen günümüzde sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla kullanılmaktadır. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır²⁹.

2.5. β -Galaktozidaz

Glikozidazlar (EC 3.2.1, EC 3.2.2, EC 3.2.3) iki veya daha fazla karbonhidrat arasında veya bir karbonhidrat ile karbonhidrat olmayan bir başka bileşik arasındaki glikozidik bağları katalizleyen enzimler olarak bilinirler³³. Biyoteknolojik olarak en çok dikkat çekici olan glikozidazlar β -galaktozidazlardır. β -galaktozidazlar genellikle aminoasit dizilerindeki benzerliklere göre 4 farklı

famlyada sınıflandırılmışlardır: GH-1, GH-2, GH-35, GH-42³⁴. Bunlardan GH-2 en iyi çalışılan olup, *Escherichia coli*, *Aspergillus*, *Bacillus megaterium* ve *S.solfactorius* β -galaktozidazlarını içine alır, oysa termofilik basiller de dahil olmak üzere termofilik bakteriler, psikrofilik ve halofilik mikroorganizmalar GH -42' ye aittir³⁵. β -galaktozidaz (β -D-galaktozid galaktoliz, E.C. 3.2.1.23), laktozdaki β -glikozidik bağının enzimatik hidrolizini katalizleyerek, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü laktoza göre daha fazla olan glukoz ve galaktozun oluşmasını sağlamaktadır³⁶. Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir (Şekil 2.1.):



Şekil 2.1. β -Galaktozidaz tarafından glikozidik bağın kırılma reaksiyonu.

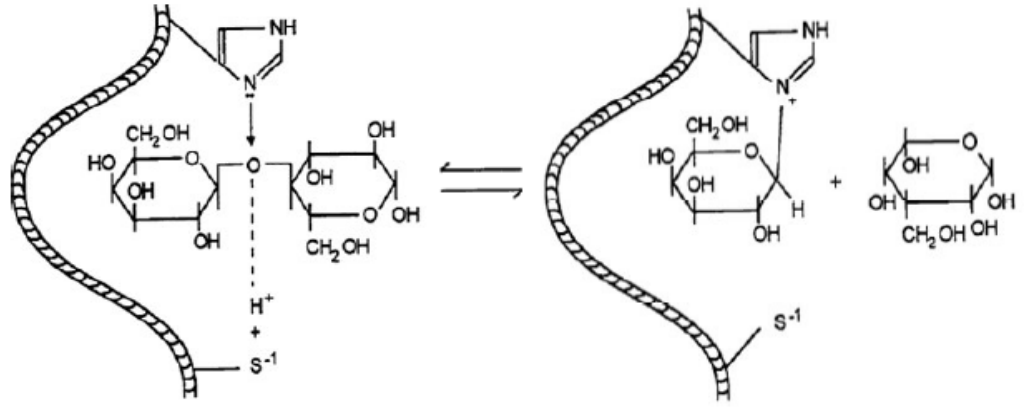
2.5.1. Reaksiyon Mekanizması

Laktozun enzimatik hidrolizi besin endüstrisinin önemli biyoteknolojik uygulamalarından birisidir. β -Galaktozidaz tarafından glikozidik bağın kırılma mekanizması

İçinde, β -Galaktozidaz'ın karbonyum iyon galaktozil geçiş bölgesi aracılığıyla bir glikozil enzim ara ürünü oluşturup hidrolize eden bir çift yer değiştirme reaksiyon mekanizması önerilmektedir³⁷.

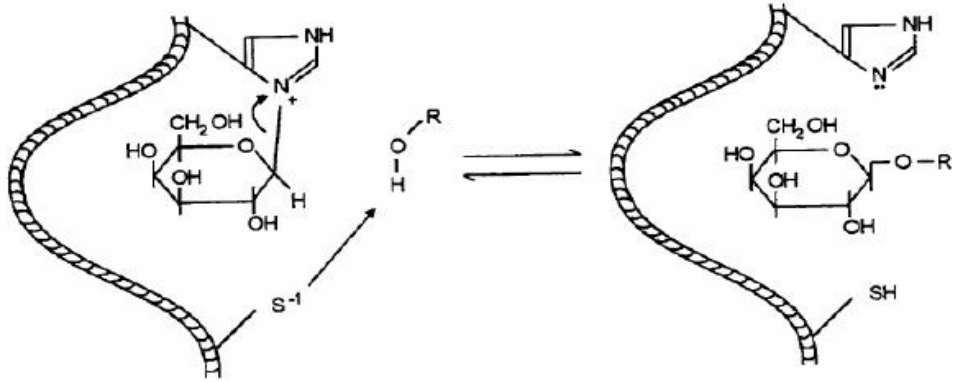
Literatürlerde, β -galaktozidaz'ın aktif mekezinde sistein ve histidin aminoasidinin bulunduğu ve fonksiyonlarının sırasıyla proton vericisi ve proton alıcısı olduğu

bildirilmektedir. Enzimatik hidroliz prosedürü boyunca sistein aminoasidinde bulunan sülfidril grubu proton vericisi, histidin aminoasidinde bulunan imidazol grupları da nükleofil bölge olarak davranarak glikozidik bağın kırılmasını kolaylaştırırlar^{36,38}.



Şekil 2.2. β -Galaktozidaz tarafından laktozun hidrolizi³⁹.

Enzimatik reaksiyon esnasında galaktozil reaksiyonu olarak da adlandırılan ikinci bir reaksiyon daha meydana gelir. Bu reaksiyonda β -Galaktozidaz, galaktozil'i hidroksil grubu içeren alıcıya transfer eder (**Şekil 2.3**). Bu alıcı su olduğu zaman, hidroliz sonucu serbest galaktoz meydana gelir. Bununla birlikte, belirli koşullar altında, diğer şekerler alıcı olarak davranabilirler ve oligosakkarit oluşumlarına edenolurlar³⁸.



Şekil 2.3. β -Galaktozidaz tarafından katalizlenen galaktozil transfer reaksiyonu³⁹.

2.6. Endüstriyel Açından Önemli β -Galaktozidaz Kaynakları

β -Galaktozidazlar doğada yaygın bir şekilde dağılım gösterirler⁴⁰. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok farklı biyolojik sistemlerde bulunmaktadır⁴¹. Ticari kullanımlar için, yüksek oranda β -galaktozidaz üreticisi olan çoğu organizmaların varlığı bilinmektedir⁴². Buna rağmen genellikle maya (intraseküler), mantar ya da küfler (ekstraseküler) enzim üreticisi olarak bilinmektedir. Bakteriyel kaynaklar kolay fermentasyonları, yüksek enzim aktiviteleri ve stabiliteleri ile giderek önem kazanmaya başlamıştır.

Ticari olarak kullanılan β -galaktozidaz kaynakları mikrobiyal orjinlidir (**Çizelge 2.3.**) Bununla birlikte bu mikroorganizmalardan elde edilen β -galaktozidazlar farklı özelliktedirler. Bu nedenle çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadırlar. Enzimin uygulanabilirliğini operasyonel pH oranı belirlemektedir. Bu karakteristik özelliklere göre enzimler iki grup içermektedirler, bunlardan birincisi mantarlardan elde edilen asidik pH'ya sahip enzimlerdir, ikincisi mayalardan ve bakterilerden elde edilen nötral pH'ya sahip enzimlerdir⁴³.

Mantarlardan elde edilen enzimlerin optimum pH'ı 3 ile 5 arasında iken

oldukça yüksek olan optimum sıcaklıkları da 55–60 C° arasında değişmektedir. Bilindiği gibi düşük asit ve yüksek sıcaklık mikroorganizmaların büyümesini engellemektedir. Sonuç olarak bu özellikleri ile mantarlara ait β -galaktozidazların kullanımları yüksek asit ürünleri ve farmasötik preparasyonlarla sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte mayalardan elde edilen β -galaktozidazlar nötral pH' ya sahip olmaları ile karakterize edilirler. Bu nedenle sütteki laktozun hidrolizinde ve tatlı peyniraltı suyu proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mayalardan β -galaktozidaz üretilmesi, yüksek oranda ve düşük fiyatta elde edilmeleri ve beslenme için güvenli olmaları açısından avantajlıdır. Bununla birlikte , bu enzimin en önemli karakteristiği düşük sıcaklıkta stabil olmasıdır. Sıcaklık 55 C°'nin üstüne çıktığında enzim hızlı bir şekilde inaktif olmaktadır⁴³.

Bakteriyel β -galaktozidazlar nötral pH' ya sahip olmaları ile karakterize edilmektedirler. Optimum sıcaklıkları türden türe değişiklik göstermektedir⁴⁴. Termofilik kaynaklar termostabil β -galaktozidazlar üretirler⁴⁵. Termofilik β -galaktozidazlar, mezofilik karakterdeki β -galaktozidazlar kullanıldığında karşılaşılan sorunlara termal stabiliteleleri ile çözüm getirirler. Bu özellikleri ile süt ve süt ürünleri endüstrisinde yüksek sıcaklık gerektiren ürünlerin sterilize edilmesinde ve mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltmada avantaj sağlamaktadırlar⁴⁶.

Çizelge2.3. Mikrobiyal β -D galaktozidaz kaynakları^{47,35*}.

Kaynak	Mikroorganizma(lar)
Mantarlar	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. palmi</i> <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. carbonarius</i>

	<i>Auerobasidium pullulans</i>
	<i>Beauveria bassiana</i>
	<i>Curvularia inaequalis</i>
	<i>Fusarium moniliforme, F. oxysporum</i>
	<i>Mucor meihei, M. pusillus</i>
	<i>Neurospora crassa</i>
	<i>Paecilomyces varioti</i>
	<i>Penicillium conescens, P. Chrysogenum</i>
	<i>Rhizobium meliloti</i>
	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>
	<i>Scopulariopsis sp.</i>
	<i>Streptomyces violaceus</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
Mayalar	<i>Bullera singularis</i>
	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Saccharomyces anamensis, S. fragilis</i>
	<i>Kluyveromyces bulgaricus, K. fragilis, K. lactis,</i>
	<i>K. marxianus</i>
Bakteriler	<i>Arthrobacter sp.</i>
	<i>Bacillus acidocaldarius, B. circulans,</i>
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius ssp. Rittmannii*</i>
	<i>B. coagulans, B. subtilis</i>
	<i>B. megaterium, B. stearothermophilus</i>
	<i>Bacteroides polypragmatus</i>

Bifidobacterium bifidum, *B. infantis*
Clostridium acetobutylicum,
C. thermosulfurogens
Corynebacterium murisepticum
Enterobacter agglomerans, *E. cloacae*
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus acidophilus, *L. bulgaricus*,
L. kefiranofaciens, *L. Helviticus*
L. lactis, *L. sporogenes*, *L. thermophilus*,
L. delbrueckii
Leuconostoc citrovorum
Pediococcus acidilacti, *P. pento*
Propionibacterium shermanii
Pseudomonas fluorescens
Pseudoalteromonas haloplanktis
Streptococcus cremoris, *S. lactis*,
S. thermophilus
Sulfolobus solfataricus
Thermoanaerobacter sp.
Thermus rubus, *T. aquaticus*, *T. thermophilus*
Vibrio cholera
Xanthomonas campestris

2.7. β -Galaktozidaz'ın Fizikokimyasal Özellikleri

Enzim, çeşitli mikrobiyal kaynaklarda, protein zincirinin uzunluğu ve aktif merkez pozisyonunun farklı olması gibi özelliklere sahiptir. Bununla birlikte yapılan son çalışmalarda farklı kaynaklardaki β -galaktozidaz enzimlerinin, katalitik merkezlerinde benzer olarak glutamik asit kalıntıları bulunmuştur.

β -Galaktozidaz'ın molekül ağırlığı organizmalar arasında farklılık göstermektedir. *E.coli*' ye ait β -galaktozidaz'ın molekül ağırlığı yaklaşık 116,353 kDa 'dur³⁶. *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 ait β -Galaktozidaz'ın molekül ağırlığı 357 kDa'dur⁴⁸.

Bir ve iki değerlikli kationların etkisi birçok çalışmada belirtilmiştir^{49,50}. Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi iki değerlikli kationlar β -galaktozidaz'ın aktivitesini artırırken, tek değerlikli kationlar pozitif ya da negatif etkiye neden olabilmektedirler⁴⁵

Ca^{+2} β -Galaktozidazların inhibitörü olarak bilinmektedir. Fakat sütte bulunan Ca^{+2} iyonlarının tamamı kazeine bağlıdır ve çözelti içerisinde serbest halde bulunmamaktadır. Bu nedenle β -galaktozidaz'ın aktivitesini inhibe etmemektedir⁴⁹.

2.8. β -Galaktozidaz'ın Biyoteknolojik Kullanım Alanları

2.8.1. Peyniraltı suyundaki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı

Peyniraltı suyu; süt fabrikalarının atık maddesi olup, sütün peynir mayası veya organik asitlerle pıhtılaştırılmasından ve peynirin esasını oluşturan kazeinin çöktürülmesinden sonra geri kalan yeşilimsi sarı renkte bir sıvıdır. Zengin bir içeriğe sahip olan peyniraltı suyu gelişmiş ülkelerde ilaç, yem ve laktoz üretimi gibi alanlarda kullanılmakta fakat ülkemizde hemen hemen hiç değerlendirilmeden toprak veya su ortamına verilmektedir^{51,52}. β -galaktozidazın peyniraltı suyunda yoğun

miktarda bulunan laktozun hidrolizi, endüstriyel uygulamalarda çevre kirliliğinin önlenmesi açısından oldukça önemli bir yer tutmaktadır⁵³. Peyniraltı suları hidrolize edildikten sonra geri dönüşümlü olarak insanların ve büyükbaş hayvanların besin kaynağı olarak kullanılabilirler gibi ayrıca laktoz içermeyen yeni ürünlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadırlar⁵⁴. PAS' dan laktozun geri kazanılmasıyla bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba ve şarküteri ürünlerinin imalatında, belirli oranlarda kullanıldığında süt tozunun yerine kullanılabilen bir ürün elde edilmekte ve aynı zamanda ekonomiye katkı sağlanmaktadır²¹. Lâktaz enzimiyle muamele edilmiş peynir suyu gıda endüstrisinde şekerleme, fırın ürünleri ve şurup üretiminde kayda değer uygulama alanı bulmaktadır.

2.8.2. Süt ve süt ürünlerindeki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı

Laktoz hidrolizi, bileşiminde laktoz bulunmayan yeni ürünlerin oluşturulması için yiyecek ve içecek endüstrisinde tercih edilen bir prostestir⁵⁵. Dünya üzerindeki yetişkinlerin yaklaşık 2/3'ü laktoz intoleransın' dan (ya da laktozun sindirilememesinden) dolayı sıkıntılar yaşamaktadır⁵⁶.

Çizelge 2.4. Dünyadaki yaygın β -galaktozidaz eksikliği⁵⁷.

Etnik grup	% populasyon
Kuzey Avrupalı	<10
Merkez ve Güney Avrupalı	70
Batı Asyalı	100
Yerli Amerikalı	80-100
Meksikalı Amerikalı	53
Güney Afrikalı	13-90

Laktoz intoleransı, karbohidrat malabsorbsiyonunun bir şeklidir ve lâktaz enziminin yetersizliği sonucunda oluşmaktadır⁵⁸. Laktoz intoleransı olan kişilerde sindirilmeyen kalan laktoz osmotik dengeyi bozarak bağırsak içinde sıvı ve elektrolit birikmesine neden olur. Genişleyen bağırsaklarda hareketlilik artar ve diyare ortaya çıkar. Öte yandan serbest halde yıkılmadan kalın bağırsaklara ulaşan laktoz buradaki bakteriler tarafından fermantasyona uğrar ve hidrojen, metan ve karbondioksit gazları ortaya çıkar. Fazla miktardaki hidrojen hem diyareyi arttırır hem de gaz ve şişkinlik başta olmak üzere diğer sindirim sistemi yakınmalarına yol açar. Laktoz intoleransının başlıca belirtileri, aşırı gaz, şişkinlik, bulantı ve sulu diyare gibi sindirim sistemi yakınmalarıdır⁵⁶. β -Galaktozidaz'ın insan bağırsağında bulunmasına rağmen bazı kişilerde yaşam boyunca hiç aktivite göstermediği veya aktivitesinin zamanla kaybedebildiği rapor edilmektedir.

Laktoz intoleransı rastlanan kişilerin tüketimine sunulacak olan sütteki laktozun hidrolizi, düşük çözünürlüğe sahip olduğundan dondurulan tatlılarda laktozun kristalleşmesiyle oluşan kumlu görüntünün engellenmesi için, şekerleme üretiminde tatlılık oranını arttırmak için β -galaktozidaz kullanılmaktadır^{55,59}. Lâktaz aynı zamanda asitli peynirlerde ve düşük laktoz içerikli yoğurt elde etmede kullanılmaktadır.

2.8.3. Oligosakkaritlerin sentezlenmesinde kullanımı

β -Galaktozidaz enzimi laktozun hidrolizini katalizlerken transgalaktozilasyon reaksiyonunu da katalizleyebilmektedir⁶⁰. Oligosakkarit oluşumunun miktarı ve çeşidi transgalaktozil reaksiyonuna bağlı olarak başlıca enzimin kaynağına, çeşidine ve substrat konsantrasyonuyla ilgilidir³⁸. (Çizelge 2.5).

Başlangıç yüksek laktoz konsantrasyonları ile yapıldığında, maksimum oligosakkarit üretimi, toplam şeker miktarının %30–40’ kadardır. Bununla birlikte, düşük laktoz konsantrasyonlarında, transferaz aktivitesi düşer, Maksimum oligosakkarit kazanma oranı %22–25’ tir⁶¹.

Çizelge 2.5. Laktoz hidrolizi boyunca oluşan oligosakkaritlerin yapıları³⁸.

Disakkaritler	β -D-Gal (1→6)-D-Glc	allolaktoz galaktobioz
	β -D-Gal (1→6)-D-Gal	
	β -D-Gal (1→3)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→2)-D-Glc	
Trisakkaritler	β -D-Gal (1→3)-D-Gal	6’ digalaktozil-glukoz 6’ galaktozil-laktoz 6’ galaktotrioz 3’ galaktozil-laktoz 4’ galaktozil-laktoz
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)-D-Gal	
	β -D-Gal (1→3)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
Tetrasakkaritler	β -D-Gal (1→4)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	6’ digalaktozil-laktoz
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
Pentasakkaritler	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	6’ trigalatozil-laktoz

Birçok çalışmada bağırsaklarda bulunan ve sağlık için birçok faydaları bulunan bifidobakteriler’in artışı sağlayan fizyolojik olarak fonksiyonel gıdalar oldukları bildirilmektedir³⁸.

Son zamanlarda araştırmacılar oligosakkaritlerin üretiminin insan sağlığı üzerinde faydalı olduğunu belirtmektedirler. Çocuk mamalarına (GOS) “bifidus faktörleri” olarak galaktooligosakkaritlerin eklenmesi bağırsaklarda bulunan bifidobakterilerin çoğalmasını uyararak bağırsak hareketlerinin düzenlenmesini sağlar⁶². Bundan başka olarak, oligosakkaritleri tüketmenin terapötik faydaları arasında kandaki kolesterol seviyesini düşürmesi, bağırsaktaki Ca⁺²’un absorpsiyonunun arttırılması ve vitamin B kompleksi sentezini arttırdığı belirtilmektedir⁶³.

2.9.Önceki Çalışmalar

Khalid, A.A.R. ve ark.⁶⁴ (1991) psikotropik *Bacillus subtilis* KL88 'e ait β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin geçiş metallerinden Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} tarafından yarışmalı olarak inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Galaktoz, glukoz ve Ca^{+2} 'un yüksek konsantrasyonlarının enzimi kısmen inhibe ettiğini bulmuşlardır. Alkalın metal iyonlarının (Na^+ , K^+ , Li^+) enzimi aktive ettiğini bildirmişlerdir.

Itoh, K. ve ark.⁶⁵ (1992) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 bakterisini izole ederek β -galaktozidaz enzimini karakterize etmişlerdir. Optimum pH'sını 6.5 ve sıcaklığını $50^{\circ}C$ olarak belirlemişlerdir. Molekül ağırlığını yaklaşık 311.000 olarak hesaplamışlardır. Glukoz ve galaktozun enzim aktivitesini inhibe ettiğini ancak galaktozun diğer türlere göre daha az bir inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. $MnCl_2$, and $MgCl_2$ 'nin aktivite üzerine etkilerinin olmadığını ancak $FeSO_4$, $AgNO_3$, and $HgCl_2$ 'ün inhibisyon etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. β -merkaptotanol ve L-sistein'in enzimi aktive ettiğini, iodoacetamid 'in ise inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. ONPG için K_m değerini 4.92mmol/l olarak tespit etmişlerdir.

Choi, Y.J. ve ark.⁶⁶ (1995) alkalofilik ve termofilik *Bacillus* sp. TA-11' den β -galaktozidaz enzimini izole ederek karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 200kDa olarak belirlemişlerdir. Optimum pH'sını 6 ve sıcaklığını $40^{\circ}C$ olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesini EDTA, galaktoz ve +2 yüklü iyonlardan Zn^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} 'un büyük oranda inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Ohtsu, N. ve ark.⁶⁷ (1998) Atagawa sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Thermus* sp. A4' deki termofilik β -Galaktozidazı saflaştırıp karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin monomerik olduğunu ifade etmişlerdir. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulayarak enzimin molekül ağırlığını 75kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin son derece termostabil olduğunu ve 70 °C' de 20 saat inkübasyona rağmen aktivitesini yitirmediğini rapor etmişlerdir. Enzimin galaktozil hidrolaz 42 ailesine üye olduğunu belirtmektedirler.

Vetere, A. ve ark.⁶⁸ (1998) *Bacillus circulans*' tan β -galaktozidazın 3 tip izorformunun karakterizasyonunu yapmaya çalışmışlardır. İzorformların molekül ağırlıklarını sırasıyla 212 kDa (I), 145 kDa (II) ve 86 kDa (III) olarak tespit etmişlerdir. Kinetik parametreleri ONPG ve laktozun hidrolizine göre belirlenmiştir. Buna bağlı olarak Km değerlerini sırasıyla 3.6(I), 5.0(II) and 3.3(III) mM olarak belirlemişlerdir.

Shaikh, S.A. ve ark.⁶⁹ (1999) termofilik bir fungus olan *Rhizomucor sp.*'ye ait β -galaktozidaz üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 4.5 ve 60 °C olarak belirlemişlerdir. Enzimin 60 °C'de 4 saat stabil olduğunu rapor etmişlerdir. K_m ve V_{max} değerlerini ONPG için 1.32 mM ve 4.45 mmol min⁻¹- mg⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.

Chakraborti, S. ve ark.⁷⁰ (2000) *Bacillus sp.* MTCC 3088'den ekstrasellüler yeni β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH 8 ve 60°C sıcaklıkta aktivite gösterdiğini ve bu enzim üzerinde bazı metallerin ve kimyasal maddelerin aktiviteyi nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Mg⁺²'nin iyi bir aktivatör olduğunu belirlemişlerdir.

Nagy, Z. ve ark.⁷¹ (2001) *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237'den intrasellüler β -galaktozidaz enzimini amonyumsülfat çöktürmesi, DEAE–Sephadex iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve kromato odaklamasını içeren prosedürleri kullanarak saflaştırmışlardır. *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside substratını olarak kullanarak enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Optimum pH'sını ve sıcaklığını sırasıyla 4.0 ve 30 °C olarak belirlemişlerdir. *P. chrysogenum*'e ait β -galaktozidazın multimerik bir yapıda olduğunu, molekül ağırlığının ise yaklaşık 270kDa olup her biri 66kDa olan monomerler içerdiğini rapor etmişlerdir.

Nagy, Z. ve ark.⁷² (2001) *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 cinsinin üremesi ve β -galaktozidaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. *P. chrysogenum*'un Glukoz, sükroz, gliserol ve galaktoz kullanıldığında iyi üreme gösterdiğini ancak laktozun üreme üzerine etkisinin düşük olduğunu belirtmişlerdir. β -galaktozidaz aktivitesinin laktoz kullanıldığında en yüksek, kullanılan diğer karbon kaynaklarında ise çok düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Ladero, M. ve ark.⁵⁴ (2001) *Escherichia coli* den elde ettikleri β -galaktozidaz'ın laktoz ve *o*-Nitrophenol- β -D-galactoside (ONPG) solüsyonlarını hidrolizinin kinetiği üzerine çalışmalar yapmışlardır ve bu solüsyonların silika alüminüna' ya kovalent olarak immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada reaksiyon ürünü galaktozun β -galaktozidaz'ı inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun laktoz hidrolizi ile paralel bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Laktoz hidrolizinin daha etkin olabilmesi için immobilize enzim içeren reaktörlerin kullanılması

gerektiğini ancak bu şekilde ortamda biriken galaktoz ve benzeri ürünlerin reaktörden yıkanarak uzaklaştırılacağını ve oluşan inhibisyon etkisinin bu şekilde önleneceğini rapor etmişlerdir.

Bury, D. ve ark.⁷³ (2001) tatlandırılmış modifiye peyniraltı suyunda yetişen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 11842 (LB 11842) 'un besiyerine 0-%1 maya ekstraktı ekleyerek β -galaktozidaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. %1 maya ekstraktı eklendiğinde β -galaktozidaz aktivitesi'nin 3 kat arttığını tespit etmişlerdir. Maksimum β -galaktozidaz aktivitesinin %1 maya ekstraktı ile mililitrede dakika başına $1.08 \pm 0.15 \mu\text{mol ONP}$ olduğunu rapor etmişlerdir.

Batra, N. ve ark.⁷⁴ (2002) sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Bacillus coagulans* RCS3'a ait β -galaktozidaz enziminin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 6-7 ve 65°C olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 5-8 arasında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Bu enzimin hidroliz ürünü galaktoz tarafından yarışmalı olarak inhibe edildiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte, hem laktoz solüsyonu hem de peynir suyundaki laktozun 36 saat boyunca 50°C 'de hidroliz edilebileceğini göstermişlerdir. +2 Değerlikli katyonlardan Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} 'in 0.5-2 mM konsantrasyonlarında enzimi inhibe ettiğini bulmuşlardır. Enzimin pH stabilitesi, termostabilitesi ve hidroliz aktivitesinin iyi olmasından dolayı endüstriyel uygulamalar için potansiyel olarak yararlı olacağını rapor etmişlerdir.

Hidaka, M. ve ark.⁷⁵ (2002) ekstrem termofil olan *Thermus thermophilus* A4'e ait β -galaktozidaz (A4- β -Gal) enzimi üzerine bazı çalışmalar yapmışlardır. Enzimin termostabil olduğunu ve galaktozil hidrolaz ailesinden GH-42'ye ait

olduğunu tespit etmişlerdir. (A4- β -Gal) 'ın aktif merkezinde katalitik kalıntılar olarak Glu141 and Glu312 olduğunu belirtmişlerdir.

Ladero, M. ve ark.⁷⁶ (2002) termofilik *Thermus* sp. T2 cinsinden ve mezofilik bir organizma olan *Kluyveromyces fragilis*'ten izole ettikleri β -galaktozidaz'ların aktivite ve stabilitelerini karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Her iki enzimin de güçlü hidrolitik aktivite gösterdiklerini ancak zayıf transgalaktozilasyon aktivitesine sahip olduklarını belirlemişlerdir. Her iki enziminde ekstrem pH, sıcaklık ve kimyasal ajanlara karşı dirençli olduklarını bulmuşlardır. Ancak termofilik olan enzimin hidrofobik ajanlara, sıcaklığa, pH 'ya ve kimyasallara daha dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Galaktozun, termofilik β -galaktozidazı, mezofilik olan karıştırdan daha güçlü bir şekilde yarışmalı olarak inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Chakraborti, S. ve ark.⁷⁷ (2003) Hindistandaki Manikaran sıcak su kaynaklarından *Bacillus polymyxa* bakterisini izole ederek uygulama potansiyeli yüksek olan yeni bir β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Çalışılan azot ve karbon kaynakları arasında laktoz ve et özütünün enzim aktivitesini oldukça arttırdığını tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı 7, sıcaklığı 60 °C olarak belirtmişlerdir. Enzimin 50 °C de oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır. 60 °C de β -Galaktozidaz'ın 50 °C'ye göre daha az stabil olduğunu rapor etmişlerdir. 65 ve 70 °C enzimin stabil olmadığını tespit etmişlerdir. *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside substrat olarak kullanıldığında K_m sabitini 4,72mM olarak hesaplamışlardır. Zn^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} ve Ag^{+2} gibi farklı metal iyonlarının 2.5 ile 25 mM arasındaki

oranlarda enzim aktivitesini inhibe ederken şelatlayıcı bir ajan olan EDTA'nın katalitik aktivite üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını rapor etmişlerdir.

Hsu C.A. ve ark.⁶² (2005) Bifidobakteri' nin değişik kültür koşullarında β -galaktozidaz üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 6.5 ve optimum sıcaklığını 37 °C olarak belirlemişlerdir. *B.Longum* CCRC 15708'in en yüksek seviyedeki β -galaktozidaz üretimini laktoz ve maya ekstraktı içeren karbon ve azot kaynaklı besiyerlerinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Gül-Güven, R. ve ark.³⁵ (2007) *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*' den termostabil β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 6.0 ve optimum sıcaklığını 65°C olarak belirlemişlerdir. Enzimin Km ve kcat değerlerini 8.9 mM ve 1074 min⁻¹ olarak belirlemişlerdir.

Konsoula, Z. ve ark.⁷⁸ (2007) taze koyun sütünden izole ettikleri *Bacillus subtilis*'in ekstrasellüler termostabil α -amilaz ve β -galaktozidazın birlikte üretimi üzerine üç kategoriden oluşan karbon, organik azot ve kompleks organik kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır. Test edilen organik azot kaynakları arasında tripton ve mısır likörünün enzim üretimini desteklediğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında substrat olarak çözünebilir nişasta yerine farklı nişastalı substratlar kullanmışlardır, bunlardan mısır unu her iki enzim üzerine pozitif etki oluşturmuştur. Ayrıca mısır likörü ve tripton farklı unlarla karıştırılmasının enzimlerin üretimini 2 kat arttırdığını ifade etmişlerdir. *Bacillus subtilis*' ten elde edilen α -amilaz ve β -galaktozidazın sırasıyla 135 °C ve 65 °C sıcaklıklarında maksimum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Di-Laura, B. ve ark.⁷⁹ (2008) *Alicyclobacillus acidocaldarius*'de β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, genin klonlanması, ekspresyonunu ve rekombinant enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 65 °C olarak belirlemişlerdir. Enzimin yeni galaktozidaz hidrolaz 42 (GH42) ailesinden olduğu belirlenmiştir.

Chen, W. ve ark.⁸⁰ (2008) *Bacillus stearothermophilus*'a ait termostabil β -galaktozidazın *bgaB* genini klonlayarak *Bacillus subtilis* WB600'te ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen rekombinant enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 70kDa olarak belirlemişlerdir. Optimum sıcaklığını ve pH' sını sırasıyla 70 °C ve 7 olarak belirlemişlerdir. K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2.96 mM ve 6.62 μ mol olarak tespit etmişlerdir. Termostabil olan bu enzimin metal katyonlarla ve EDTA ile aktive olmadığını bulmuşlardır. Ancak +2 değerlikli metal iyonlarından Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} ile enzim aktivitesinin inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Tiyol belirteçleri olan DTT ve β -mercaptoethanol gibi kimyasal ajanların enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını, sülfidril bloke edici belirteçler olan PCMB ve Iodoacetamide'in ise enzim aktivitesi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Enzimin yüksek derece transgalaktozilasyon aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Li, L. ve ark.⁸¹ (2009) *Thermatoga maritima* MSB8' de bulunan β -galaktozidaz (TM-0310) geninin *Escherichia coli* de ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant β -galaktozidaz enzimini saflaştırarak enzimin molekül ağırlığını 78kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH'sını ve

sıcaklığını sırasıyla 5.5 ve 80 °C olarak belirlemişlerdir. Enzimin 75 °C de termostabil olduğunu rapor etmişlerdir.

Alazzeah, A.Y. ve ark.⁸² (2009) *Lactobacillus reuteri*'den salgılanan α ve β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzim üretimi üzerine farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisini inlemişlerdir. Test ettikleri karbon ve azot kaynakları arasında sırasıyla en iyi karbon kaynağının laktoz en iyi azot kaynağının ise yeast ekstrakt olduğunu rapor etmişlerdir.

Li, Y. ve ark.⁸³ (2009) *Bacillus megaterium* 2-37-4-1' den elde ettikleri β -galaktozidaz enzimini saflaştırmışlardır ve enzime ait bgaBM geninin analizini ve ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Optimum sıcaklığını ve pH' sını sırasıyla 55 °C ve 7.5 -8 olarak bulmuşlardır. Enzimin 40 °C' nin altındaki sıcaklıklarda pH 6-9 da stabil olduğunu tespit etmişlerdir. K_m ve V_{max} değerlerini ONPG için 9.5 mM, 16.6 mM/min, laktoz için 12.6 mM, 54.4 mM/min olarak belirlemişlerdir.

Işık- Ustok, F. ve ark.⁸⁴ (2010) Toros dağlarından izole ettikleri *Streptococcus thermophilus* 95/2 (St 95/2) ve *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* 77 (Lb 77)'nin saf ve karma kültürlerde üretimini gerçekleştirerek β -galaktozidaz enzimlerinin biyokimyasal ve termal özelliklerini karakterize etmişlerdir. Optimum sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 45-50 °C ve 7 olarak belirlemişlerdir. Her iki enzimin pH 7-9 ve 20-37 °C sıcaklık aralıklarında stabil olduklarını başlangıç aktivitelerinin %80-90 oranında koruduğunu belirlemişlerdir.

Bazı metal iyonlarının enzim üzerine etkisini araştırmışlardır. Mg^{+2} ve Mn^{+2} ,nin her iki enzimlerin aktiviteleri üzerinde aktivasyon etkisine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ca^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} iyonları enzim aktivitesinde inhibisyon etkisi göstermektedir.

Song, C. ve ark.⁸⁵ (2010) psikotolerant bir maya olan *Guehomyces pullulans* 17-1'e ait ekstrasellüler β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 50 °C ve 4.0 olarak belirlemişlerdir. K_m ve V_{max} değerlerini ONPG için 3.3 mM ve 9.2 μ mol/dk. olarak belirlemişlerdir. Enzimin moleköl ağırlığını 335kDa olarak tespit etmişlerdir.

BÖLÜM KAYNAKLARI

1. Karademir, R.G.. *Biyoteknoloji, Türkiye Kalkınma Bankası A.Ş. Teknoloji İzleme ve Araştırma Müdürlüğü*,2007, Ankara. TR15, syf. 1.
2. Ekinci, S.M.; Akyol İsmail. ; Karaman, Mesut. ; Özköse, Emin. *Hayvansal Biyoteknoloji Uygulamalarında Güncel Gelişmeler, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2005**, 8(2).
3. Özdemir, S. *Musa textilis Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermantasyon Tekniği ile (SSF) Bacillus sp'de α - Amilaz Üretilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dicle üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 1s, **2004**.
4. Van den Burg, B. *Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology*, **2003**, p. 213 -218.
5. D'Amico, S.; Marx, Jean-Claude.; Gerday, C. and Feller, G., *Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes, The Journal of Biological Chemistry*, **2003** , Vol. 278, No. 10, Issue of March 7, pp. 7891–7896.
6. Niehaus, F. ; Bertoldo, C.; Kahler, M.; Antranikian, G. *Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. Appl Microbiol Biotechnol*, **1999**, 51: 711–729.
7. Demirijian,D.C . ; Moris, F.V and Cassidy,C.S. *Enzymes from extremophiles, Current Opinion in Chemical Biology*.,**2001**,5,144-151.
8. Kumar, S. and Nussinov, R. *How do thermophilic proteins deal with heat? Cell Mol. Life Sci.* ,**2001**, (58):1216–1233.
9. Sterner, R. and Liebl, W. *Thermophilic adaptation of proteins. Crit. Rev. Biochem Mol.* ,**2001**, (36): 39-106.

10. Haki, G.D. ; Rakhshit, S.K. *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, Biosources Technology* , **2003**, 89, 17-34.
11. Gomes, J. and Steiner, W. *The Biocatalytic potential Extremophiles and extremozymes. Food Technol. Biotechnol.* ,**2004**, 42 (4) 223–235.
12. Brock, T. D. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures New York: Springer Verlag*, 1978 xi, 465 p.: ill. ; 25 cm.
13. De Vrij. W. ; Bulthuis. R.A.; and Konings. W.N. *Comparative Study of Energy-Transducing Properties of Cytoplasmic Membranes from Mesophilic and Thermophilic Bacillus Species. J. Of Bacte.* **1988**, 170: 2359 -2366.
14. Lara, I . ; Beranguer, J. *Thermophilic enzymes and their biotechnological potential, Microbiologia*, **1993**, Dec;9(2):77–89.
15. [http://www.nenedir.net/nenedir/Gida-ve Beslenme](http://www.nenedir.net/nenedir/Gida-ve_Beslenme). (13.04.2010.saat 21: 41)
16. Ayhan, K. *Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını*,**2000**, 43- 44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
17. Drobniewski, F.A. *Bacillus cereus and Related Species, Clinical Microbiology Reviews*, **1993**, oct. ,p. 324–338.
18. Kalaylı, E. ve Beyatlı, Y. *Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2003**, 01(12), 24–35.
19. Ustaçelebi, Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi*, **1999**, sayfa:411 -412, 624 -625.

20. Boyce, A. and Walsh, G. *Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,2 (4)- β -glucanase from *Rhizomucor miegei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* ,**2007**,76:835 -841.*
21. Uhlig, H. *Industrial Enzymes and Their Applications*, **1998**, Wiley, New York.
22. Rainey, F.A. ; Fritze, D.; Stackebrandt, E. *The Phylogenetic Diversty of Thermophilic Members of the Genus Bacillus as Revealed by 16sRNA Analysis. FEMSMicrobiol. Lett*, **1994**, 115:205-212.
23. Banat I.M. ; Marchant R and Rahman T.J. *Geobacillus debilis sp.nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of Bacillus pallidus to Geobacillus pallidus comb. nov. Int. J. of Sys. and Evol. Microbio*,**2004**, 54:2197–2201.
24. Arıkan, B. *Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic Bacillus sp. isolate A3 -15, Bioresource Technology*, **2008**, 99:3071-3076.
25. Veith, B.; Herzberg, C.; Stechel, S.; Feesche, J.; Maurer, H, K.; Ehrenreich, P.; Baumer, S.; Henne, A.; Liesegang, H.; Merkl, R.; Ehrenreich, A.; Gottschalk, G. *The Complete Genome Sequence Bacillus licheniformis DSM13, an Organism with Great Industrial Potential, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2004** , 7:204-211.
- 26 . <http://www.uniprot.org/taxonomy/279010>, 22.06.2010. , saat 21: 49.
27. Rey, W. M.; Ramaiya, P. ; Nelson, A. B. ; Brody-Karpın, D. S. ; Zaretsky, J. E. ; Tang, M. . ; Lopez de Leon, A.; Xiang, H.; Gusti, V. *Complete genome*

sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species, Genome Biology, 2004, 5:R77.

28. Karademir, A. ; Akgül, M. ; Tutuş, A. *Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1), KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 2002, 5(1).*

29. Kıran, Ö.E. ; Çömlekçioglu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 2006, 9(1).*

30. Akkaya E. S. ; Kıvanç M. *Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram Negatif Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 2009, Cilt: 07 Sayı: 1 Sayfa: 01 -23.*

31. Becker, P. ; Abu-Reesh, I. ; Markossian, S. ; Antranikian, G.and Markl, H. *Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile Bacillus sp. IHI-91 on olive oil. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48.184-90.*

32. Bruins,M.E. ; Janssen, A.E.; Boom, R.M. *Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents, . Appl Microbiol Biotechnol, ,2001, 90(2): 155-86.*

33. Sheridan, P. P. and Brenchly, E. J. *Characterization of a Salt-Tolerant Family 42 β -Galactosidase from a Psychrophilic Antarctic Planococcus Isolate, Applied and Environmental Microbiology,2000, p. 2438-2444.*

34. Shaikh-Aidha, F. ; Müllegger, J. ; He, S. ; Withers, G. S. *Identification of the catalytic nucleophile in Family 42 β -galactosidases by intermediate trapping and peptide mapping: YesZ from Bacillus subtilis, FEBS Letters, 2007, 581,2441-2446.*

35. Gül-Güven, R. ; Güven, K. ; Poli, A. ; Nicolaus, B. *Purification and Some Properties of a β -Galactosidase from The Thermoacidophilic Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. Rittmannii Isolated from Antarctica*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, vol: 40 pp: 1570–1577.
36. Zhou, Q.Z.K.; Chen X.D. *Immobilization of β -Galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde*. *Journal of Food Engineering*, **2001**, 48: 69–74.
37. Wallenfels, K. ; Malhotra, O.P. *Galactosidases*. *Advances in Carbohydrate Chemistry*,**1961**, Vol.16, p.239–298.
38. Mahoney, R.R. *Galactosyl-oligosaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: A Review*. *Food Chemistry*, **1998**, **63** (2): 147–154.
39. Richmond, M.L. *β -galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns and Immobilization* *Journal of Dairy Science*, **1981**, 64: 1759–1771.
40. Goulas, T. ; Goulas, A. ; Tzortzis, G. ; Gibson, R. G. *Comparative analysis of four β -galactosidases from Bifidobacterium bifidum NCIMB41171: purification and biochemical characterisation*, *Applied and Environmental Microbiology*, **2009**, 82,1079–1088.
41. Choi, Youn-Jeung. ; Shin¹,Hyun-Jae. ; Bucke, C.. *Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from Bullera singularis*, *Biotechnology Letters*, **2003**, 25: 2107–2111.
42. Gekas, V. ; Lopez-Leiva, M. *Hydrolysis of lactose*. *Process Biochem.*, **1985** Vol.2, p.2–12.

43. Mahoney, R.R. *Modification of lactose and lactose-containing dairy products with β -galactosidase.*” *Developments in Dairy Chemistry, Vol.3.* (P.F. Fox, ed.). Elsevier Applied Science Publishers, **1985**, New York, NY, p. 69–110.
44. Vasiljevic, T. ; Jelen, P. *Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria.* *Innovative Food Sci. & Emerg. Technol.* ,**2001**, Vol. 2, p. 75–85.
45. Greenberg, N.A. ; Mahoney, R.R. *Production and characterization of β -galactosidase from Streptococcus thermophilus,* *J. Food Sci.* ,**1982**, Vol. 47, p.1824-1828.
46. Pessela, C.Ch. B. ; Mateo, C. ; Fuentes, M.; Vian, A. ;García, L. J. ; Carrascosa, V. A. ; Guisán, M. J. ; Fernández-Lafuente, R. *The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition Complete hydrolysis of lactose in dairy products,* *Enzyme and Microbial Technology*, **2003** , 33: 199–205.
47. Panesar, P. S. ; Panesar, R.; Singh, S. R.; Kennedy F. J.; Harish K. “*Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase*” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2006**, 81.530–543.
48. Hsu, C. A. ; Yu, R. C. ; Chou, C. C. *Purification and characterization of a sodium-stimulated β -galactosidase from Bifidobacterium longum CCRC 15708,* *World Journal of Microbiology & Biotechnology*,**2006**, 22: 355–361.
49. Garman, J. ; Coolbear, T. ; Smart, J. *The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria.* *Appl Microbiol Biotechnol*, **1996**, Vol.46, p.22–37.

50. Vasiljevic, T., Jelen, P. *Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus*11842*, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2002**, Vol. 3, p.175 -184.
51. Kurt, A., Süt Teknolojisi, *Atatürk Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü Yayınları*, (**1996**), Erzurum, 353.
52. Kahyaoğlu, M.; Kıvanç, M. *Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi*, *Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, **2007**, 17(2): 61 -66.
53. Jurado E. ; Camacho, F.; Luzón, G.; Vicaria, J.M. *A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis**, *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 31, 300–309.
54. Ladero M.; Santos A.; Garcı'a L.J. F.; Garcı'a-Ochoa F, *Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered bgalactosidasefrom *Escherichia coli* in solution and immobilized:Kinetic modelling*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2001**, 29: 181–193.
55. Pıvarnick, L.F.; Senecal, A.G.; Rand, A.G. *Hydrolytic and Transgalactosylic Activities of Commercial β -Galactosidase (Lactase) in Food Processing*. *Advances in Food and Nutrition Research*, **1995** 38: 1–102.
56. Gürsoy, O.; Kınık, Ö.; Gönen, İ. *Probiyotikler ve Gastrointestinal Hastalığa Etkileri*, *Türk Mikrobiyol Cem Der*, **2005**, 35: 136–148.
57. Vesa, T.H. ; Marteau, P. ;Korpela, R. *Lactose Intolerance*, *Journal of the American College of Nutrition*, **2000**, Vol. 19, p.165–175.

58. Er, B. ; Sariahmetoğlu, B. *Süt endüstrisinde mikrobiyel enzim kullanımı*, *Vet Hekim Der Derg.* **2009**, 80(1): 25 -30.
59. Kim, W.J.; Rajagopal, S.N, *Isolation and Characterization of β -galactosidases from Lactobacillus crispatus*, *Folia Microbiology*, **2000**, 45(1), 29–34.
60. El-Gindy, A. *Production, Partial Purification and Some Properties Of β -Galactosidase from Aspergillus carbonarius*, *Folia Microbiol*, **2003**,48 (5), 581–584.
61. Huber, R.E. ; Kurz, G.; Wallenfels, K. *A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (E. coli) on lactose* *Biochemistry*,**1976**, Vol:15(9), p.1994-2001.
62. Hsu, C. A. ; Yu, R. C. ; Chou, C. C. *Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions*, *International Journal of Food Microbiology*, **2005**, 104, 197–206.
63. Onishi, N. ; Yamashiro, A. ; Yokozeki, K. *Production of galactooligosaccharide from lactose by Stengmatomyces elviae CBS8119.”* *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, Vol.61,p. 4022–4025.
64. Khalid, A.A.R. and Byong, H. L. *Specificity, Inhibitory Studies, and Oligosaccharide Formation by P-Galactosidase from Psychrotrophic Bacillus subtilis KL88*, *J Dairy Sci*,**1991**, 74: 1773 -1778.
65. Itoh, K. ; Toba, T. ; Itoh, T. ; Adachi, S. *Properties of β -galactosidase of Lactobacillus kefiranofaciens K-1 isolated from kefir grains*, *Letters in Applied Microbiology*, **1993**, 15,232–234.

66. Choi, Y.J. ; Kim, I.H. ; Lee, B.H.; Lee, J.S. *Purification and characterization of Beta-Galactosidase from Alkalophilic and Thermophilic Bacillus sp. TA-1*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **1995**, Vol.22, No.2, pp. 191 - 201.
67. Ohtsu, N.; Motoshima H. ; Goto, K. ; Tsukasaki, F. ; Matsuzawa H. *Thermostable β -galactosidase from an Extreme Thermophile, Thermus sp. A4: Enzyme Purification and Characterization, and Gene Cloning and Sequencing*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62 (8), 1539- 1545.
68. Vetere, A. ; Paoletti, S. *Separation and characterization of three β -galactosidases from Bacillus circulans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, 1380, 223 – 231.
69. Shaikh, S.A. ; Khire, J.M.; Khan, M.I. *Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus Rhizomucor sp*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, 1472, 314-322.
70. Chakraborti, S. ; Sani, R. K. ; Banerjee, U.C and Sobti, R.C. *Purification and Characterization of a Novel β -Galactosidase from Bacillus sp. MTCC 3088*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2000**, vol:24, pp: 58-63.
71. Nagy, Z. ; Kiss, T. ; Szentirmai, A. and Biro, S. *β -Galactosidase of Penicillium chrysogenum: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme, Protein Expression and Purification*, **2001**, 21, 24–29.
72. Nagy, Z. ; Keresztess, Z. ; Szentirmai, A.. ; Biro, S. *Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in Penicillium chrysogenum*, *J. Basic Microbiol*, **2001**, 41, 6, 351–362.

73. Bury, D. ; Geciova, J. ; Jelen, P. *Effect of Yeast Extract Supplementation on β -Galactosidase Activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 11842 Grown in Whey, Czech J.Food Sci., 2001, vol.19. No.5: 166–170.*
74. Batra, N. ; Shing, J. ; Banerjee, U.C. ; Patnaik, P.R. ; Sobti, R.C. *Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3, Biotechnol. Appl. Biochem., 2002,36, 1- 6.*
75. Hidaka, M.; Fushinobu, S. ; Ohtsu, N. ; Motoshima, H. ; Matsuzawa, H. ; Shoun, H. ; Wakagi. T. *Trimeric Crystal Structure of the Glycoside Hydrolase Family 42 β -Galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the Structure of its Complex with Galactose, J. Mol. B.2002, 322, 79–91.*
76. Ladero, M.; Santos, A. ; Garcí'a L.J. F. ; Garcí'a-Ochoa, F. *Studies on the Activity and the Stability of β -Galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*, Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30, 392-405.*
77. Chakraborti, S. ; Sani, R. K. ; Banerjee, U.C and Sobti, R.C. *Production and Partial Characterization of a novel β -Galactosidase from a newly isolated *Bacillus polymyxa*, Scientia Iranica, 2003, vol.10, No.3, pp.279–286.*
78. Konsoula, Z. ; Liakopoulou-Kyriakides, M. *Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates, Bioresource Technology. 2007, 98, 150–157.*
79. Di-Laura, B.; Strazzulli, A.; Perugino, G.; La-Cara, F.; Bedini, E.; Corsaro, M. M.; Rossi, M.; Moracci, M. *Isolation and Characterization of A New Family 42 β -Galactosidase from The Thermoacidophilic *Alicyclobacillus**

acidocaldarius: Identification of The Active Site Residues, Biochimica et Biophysica Acta, **2008**, vol: 1784 pp: 292–301.

80. Chen, W. ; Chen, H. ; Xia, Y. ; Zhao J. ; Tian, F and Zhang, H. *Production, Purification, and Characterization of a Potential Thermostable Galactosidase for Milk Lactose Hydrolysis from Bacillus stearothermophilus*, *J. Dairy Sci*, **2008**, 91,1751–1758.

81. Li, L.; Zhang, M. ; Jiang, Z. ; Tang, L. ; Cong, Q. *Characterisation of a thermostable family 42 b-galactosidase from Thermotoga maritima*, *Food Chemistry*, **2009**, 112, 844–850.

82. Alazzeh, A.Y. ; Ibrahim, S.A. ; D. Song, A. ; Shahbazi, A.A. Abu Ghazaleh *Carbohydrate and Protein Sources Influence the Induction of α -and β -Galactosidases in Lactobacillus reuteri*, *Food Chemistry*, **2009**, doi: 10.1016/j.foodchem .04.065.

83. Li, Y. ; Wang, H. ; Lu, L.; Li, Z. ; Xu, X. ; Xiao, M. *Purification and Characterization of a Novel β -Galactosidase with Transglycosylation Activity from Bacillus megaterium 2–37–4–1*, *Appl Biochem Biotechnol*, **2009**, 158:192–199.

84. Ustok- Isik, F. ; Tari, C.; Harsa, Ş. *Biochemical and thermal properties of b-galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures*, *Food Chemistry*, **2010**, 119 1114–1120.

85. Song, C. ; Guang-Lei, L.; Jin-Li, Xu.; Zhen-Ming, C. *Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast Guehomyces pullulans 17–1 isolated from sea sediment in Antarctica*, *Process Biochemistry*, **2010**,doi: 10,1016./j.procbio.2010.02.025.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Biyolojik Materyal

Çalışmalarımızda biyolojik materyal olarak Batman Taşlıdere kaplıcasından izole edilen *Bacillus licheniformis* KG9 kullanıldı¹.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. Besiyeri Maddeleri

Nutrient Broth ve Agar Merck Darmstadt'dan temin edilmiştir.

3.2.2. Karbon Kaynakları

Glukoz ve Nişasta Merck Darmstadt'dan; Galaktoz Difco'dan; Laktoz Sigma'dan temin edilmiştir.

3.2.3. Azot Kaynakları

Pepton OXOID'den; Tripton, Glisin Sigma'dan; Beef ekstrakt, Acumedia'dan; Amonyum sülfat, Yeast ekstrakt, Merck Darmstadt'dan temin edilmiştir.

3.2.4. Kimyasal Maddeler, Metaller ve Şelatörler

p-Chloromercuribenzoate (PCMB), Dithiothreitol (DTT), N-Ethylenemaleimide (NEM), 1,10-Phenanthroline monohydrate, Iodoacetamide (IAA) Sigma'dan ; Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) Fluka Biochemica'dan ; β -mercaptoethanol Merck Schuchardt'dan temin edilmiştir.

CaCl₂, EDTA, CuCl₂ Merck Darmstadt'dan; MgCl₂ Kimetsan'dan ; ZnCl₂ LACHEMA'dan temin edilmiştir.

3.2.5. Elektroforetik Maddeler

Tris-Base[Tris(hydroxymetyl) amino methane], akrilamid, N-N-metilen bisakrilanid, TEMED (N-N-N`-N`-Tetrametiletilen diamin), APS (Amonyum persulfat), standart proteinler (ticari β -galaktozidaz) ve Glisin Sigma Chemical Co. , St. Louis 'den, 6-Bromo-2 naphthly- β -D-galactopyranoside(BNG) , Diazo-blue B Sigma'dan , BFB (Brom Fenol Blue), SDS (Sodyum dodesil sulfat), ve Gliserol Merck Darmstadt dan temin edildi.

3.3. Besiyerleri

3.3.1. Sıvı Besiyerleri

Nutrient Broth(NB)

8 g NB ve distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

BM1 Besiyeri

%1 Pepton, %0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %1 Yeast extract, %0.3 K_2HPO_4 , %0.1 KH_2PO_4 , %0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oranlarında tartılarak saf su ile çözülmesi sağlanıp otoklavlandı.

BM2 Besiyeri

%0.1 Pepton, %0.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %0.3 K_2HPO_4 , %0.1 KH_2PO_4 , %0.03 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0.1 NaCl oranlarında tartılarak saf su ile çözülmesi sağlanıp otoklavlandı.

BM3 Besiyeri

%0.5 (NH₄)₂SO₄, %0.5 Yeast extract, %0.5 NaCl, %0.1 K₂HPO₄, %0.05 KH₂PO₄, %0.02 MgSO₄.7H₂O oranlarında tartılarak saf su ile çözülmesi sağlanıp otoklavlandı.

3.3.2. Katı Besiyeri

8 g Nutrient Broth besi yerine 15 g agar ilave edilip distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

3.4. Tamponlar

- 0.1 M Sitrik Asit tamponu: pH:4 -5.5 hazırlandı.
- 0.1 M Sodyum Fosfat tamponu: pH:6 -8 hazırlandı.
- 0.1 M Tris-HCl tamponu: pH:8.5 -9.5 hazırlandı.
- 0.1 M Glisin-NaOH tamponu: pH:10 hazırlandı.

3.5. Kullanılan Aletler

Steril Kabin	(Telstar AV -100)
Spektrofotometre	(UV mini 1240 SHIMADZU)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K15)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Etüv	(Heraus)
Vorteks	(VWR INTERNATIONAL)
Çalkalayıcı	(P SELECTA UNITRONICOR)
İnkübatör	(Sanyo)

Deep-Freeze	(Harris, -95 °C)
Hassas Terazı	(GEG, AVERY)
Otoklav	(HICLAVE HV-50L)
Su Banyosu	(Grant 6G, -20, +100 °C)
Sterilizatör	(Heraus)
pH metre	(METLER TOLEDO MP220)

3.6. Bakterinin Kültüre Alınması

Bacillus licheniformis KG9 NB sıvı besiyerinde kültüre alındı. 100ml'lik erlenlerin içerisindeki 25ml sıvı besiyerine, 1ml bakteri inoküle edildi. İnkübasyon 50 °C çalkalamalı su banyosunda 120 rpm de gerçekleştirildi.

Bakteri peleti 10.000 rpm de 5 dk. santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Üst sıvı (süpernatant) alındı. Elde edilen üst sıvı β -galaktozidaz aktivite tayini için kullanıldı.

3.7. β -Galaktozidaz Aktivite Tayini

β -galaktozidaz aktivitesi 0.1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde 60mM O-Nitro-fenil- β -D-galactopyranoside (ONPG) çözeltisinden o-nitrophenol ürününün salınımı ile tespit edildi. 850 μ l tampon içerisine (çalışılan sıcaklıkta preinkübasyona tabi tutularak) 100 μ l enzim çözeltisi bırakıldı ve reaksiyonu başlatmak için 50 μ l substrat (ONPG) ilave edildi.10 dk. inkübasyondan sonra, reaksiyon 1 M 500 μ l Na_2CO_3 solüsyonu eklenerek durduruldu. Oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 405 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.8. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı². Standart eğrinin çizilebilmesi için konsantrasyonu bilinen 1mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) hazırlandı. Tüplere artan konsantrasyonlarda hazırlanan BSA solüsyonundan, 50 µl enzim solüsyonundan bırakılarak tüplerin hepsine 5ml alkalın çözeltisi eklendi. 15 dk. 40 °C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra bütün tüplere 1:1 oranında seyreltilmiş 500 µl FCR (Folin reaktifi) eklendi ve 30 dk. karanlıkta bekletildi. 660 nm' de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Alkalın çözeltisinin hazırlanışı

- 100ml % 4 Na₂CO₃ hazırlandı.
- 10ml % 4 oranında Na-K tartarat hazırlandı.
- 10ml % 2 oranında CuSO₄.5H₂O hazırlandı.

100ml % 4 Na₂CO₃ içerisine 1'er ml Na-K tartarat ve CuSO₄.5H₂O eklenerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Aliminyum folyo ile sarılı balon joje içerisinde oda sıcaklığında saklandı.

3.9. Değişik Zaman Peryotlarında %1 Laktozlu ve Laktozsuz Ortamlarda Enzim üretiminin Araştırılması

6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 saatler arasında %1 laktoz içeren NB ve laktoz içermeyen NB besiyerinde bakteriler inkübasyona bırakıldı. Her inkübasyon süresi için örnek üst sıvı alındı, β-galaktozidaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı.

3.10. Optimum Sıcaklık Tayini

β -galaktozidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi hem ham ekstrakt hem de kısmi saflaştırması gerçekleştirilen enzim solüsyonlarında araştırılmıştır. NB besiyerinden elde edilen üst sıvı ile diyaliz sonrası elde edilen enzim solüsyonlarında enzime ait optimum sıcaklık değerini belirlemek için 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90°C sıcaklıklarda 0.1M Sodyum fosfat tamponu içerisinde 60mM'lık ONPG solüsyonu kullanılarak tespit edildi. Optimum sıcaklık tayini deneyinde tampon, çalışılan her sıcaklık için preinkübasyona tabi tutuldu.

3.11. Optimum pH Tayini

β -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi, hem ham ekstrakt hem de kısmi saflaştırması gerçekleştirilen enzim solüsyonlarında, 0.1 M sitrik asit tamponu (pH 4.0-5.5) , 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0- 8.0) , 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.5-9.5) ve 0.1M Glisin-NaOH tamponu (pH 10) kullanılarak araştırıldı. 60mM'lık ONPG solüsyonu kullanıldı.

3.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Etkisinin Araştırılması

β -galaktozidaz aktivitesi üzerine farklı substrat konsantrasyonların etkisini belirlemek amacı ile 60 mM'lık stok bir ONPG solüsyonu hazırlanarak 0,25 – 6 mM aralığı incelendi.

3.13. Farklı Besiyerlerinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

İçerikleri farklı olan NB, BM1, BM2, BM3 besiyerleri hazırlanarak otoklavlandı. Daha sonra besiyerlerine 1ml bakteri inokile edildi. Ekimi yapılan

bakteri 50 °C’de 120 rpm’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üst sıvılardan β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı.

3.14. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması

NB besiyeri hazırlanarak otoklavlandıktan sonra %1’lik karbon kaynaklarından laktoz, galaktoz, glukoz, çözünebilir nişasta sterilizasyon amacıyla 15 dk. UV ışını altında bekletildi. Daha sonra NB besiyerine eklendi ve 1ml bakteri ekimi yapıldı. Ekimi yapılan bakteriler 50 °C’de 120 rpm’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üst sıvılardan β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı.

3.15. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması

NB besiyeri hazırlandıktan sonra %1’lik azot kaynaklarından yeast ekstrakt, pepton, amonyumsülfat, glisin, beef ekstrakt, tripton besiyerine eklendi ve otoklavlandı. Daha sonra bakteri ekimi yapıldı. Ekimi yapılan bakteriler 50 °C’ de 120 rpm’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üst sıvılardan β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı.

3.16. Enzimin Kısmi Saflaştırılması: Çöktürme ve Diyaliz

NB içeren besiyerine bakteri ekimi yapılarak, 50 °C’ de 120 rpm de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri 10.000 rpm’ de 5 dk. santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak %70 oranındaki amonyum sülfatın azar azar eklenerek, magnetik karıştırıcıyla buz altında çözdürülmesi sağlandı. Ardından üst sıvı 1 gece +4 derecede magnetik karıştırıcı ile çöktürmeye bırakıldı. Çöktürme sonrasında sıvı 15.000 rpm’ de 20 dk. santrifüj edildi ve pelet 0.1M Na-fosfat pH 8

tamponu kullanılarak çözümlenmesi sağlandı. Daha sonra hazırlanan diyaliz hortumu içerisine çöktürme sonrasında elde edilen sıvı bırakıldı. 1 litre 0.1M Na-fosfat pH 8 tamponu içerisinde 1 gece +4 derecede magnetik karıştırıcı üzerinde amonyum sülfattan arındırmak amacıyla inkübasyona bırakıldı. Diyaliz aşamasında toplam 2.5 litre tampon kullanıldı. Diyaliz sonunda final hacim ölçüldü. Ham ekstrakt ve diyaliz sonrasında Lowry yöntemine göre protein miktar tayini ve β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı

3.17. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması

Bakteriler NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve kısmi saflaştırması gerçekleştirildi.

Enzim aktivitesi üzerine PCMB, PMSF, DTT , β -mercaptoethanol, NEM, Iodoacetamide gibi bazı kimyasalların etkisinin araştırılması için Iodoacetamide, NEM, DTT, PMSF, PCMB, β -mercaptoethanol'den stok solüsyonlar hazırlandı. NEM ve PMSF etanolde çözüldü, diğer inhibitörler, 0.1M Na-fosfat pH 8 tamponda çözdürüldü, β -mercaptoethanol 0.1M Na-fosfat tamponda pH 8 ile seyreltildi. PCMB (0.25-4mM), PMSF (1-10mM), DTT (1-10mM), β -mercaptoethanol (1-10mM), NEM (1-10mM), Iodoacetamide (1-20mM) konsantrasyon aralıkları araştırıldı. Enzim, kimyasal maddeler ile 15 dk. muamele edildi daha sonra 50 μ l substrat eklendi ve 10 dk. 55 °C inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 μ l 1M Na₂CO₃ ile durduruldu. Oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 405 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.18.Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Şelatörlerin Etkilerinin Araştırılması

Bakteriler NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi , elde edilen enzim solüsyonunda bulununan metal iyonlarını bertaraf etmek için kısmi saflaştırma yapılarak amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri gerçekleştirildi.

Daha sonra β -galaktozidaz aktivitesi üzerine bazı metallerin ve şelatörlerin etkisi belirlemek için 1,10- Phenanthroline monohydrate, CaCl_2 , EDTA, CuCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 stok solüsyonlar hazırlandı. Bütün metaller 0,1M Na-fosfat pH 8 tamponunda çözünmediği için 0.1M Tris-HCl pH 7 tamponunda, 1,10- Phenanthroline monohydrate ise metanolde çözdürüldü. CaCl_2 (1 -20mM), MgCl_2 (1 -10mM), CuCl_2 (0.05 -10 mM), ZnCl_2 (0.1 -20 mM), EDTA (1-10mM), 1- 10 Phenanthroline monohydrate (1-10mM) konsantrasyon aralıkları araştırıldı. Enzim, metallerle ve metal şelatörleri ile 15dk. muamele edildi daha sonra 50 μl substrat eklendi ve 10 dk 55 °C inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 μl 1M Na_2CO_3 ile durduruldu. Oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 405 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.19. Gliserol ve Sorbitol'ün Enzim Aktivitesi Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Bakteriler NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve enzim solüsyonunun kısmi saflaştırması gerçekleştirildi.

Kısmi saflaştırması gerçekleştirilen enzim dondurma işlemi ile aktivitesini büyük oranda kaybettiği için gliserol ve sorbitol'ün enzim aktivitesini koruyucu etkisi araştırıldı. Her iki madde için de %1 -5 konsantrasyon aralıkları araştırıldı. Enzim belirlenen bu konsantrasyonlardaki gliserol ve sorbitol ile birlikte donduruldu.

Daha sonra kontrol olarak +4 °C de bekletilen enzim ve dondurulan enzim kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 405 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.20. Termal Stabilite'nin Belirlenmesi

Bakteriler NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi, elde edilen enzim solüsyonunun kısmi saflaştırması gerçekleştirildi.

Elde edilen enzim solüsyonunun termostabilitesinin araştırılması 50–65 °C sıcaklık aralıkları kullanılarak yapıldı. Enzim solüsyonu test edilen her sıcaklıkta 20-120dk. bekletildi. Daha sonra 50 µl substrat eklendi ve 10 dk. 55 °C inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500µl 1M Na₂CO₃ ile durduruldu. Oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 405 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.21. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvı(süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutuldu.

Elde edilen enzim solüsyonunda galaktozun ve glukozun inhibisyon türü araştırıldı. 1M ve 100mM oranındaki stok glukoz ve galaktoz çözeltileri 0.1M Na-fosfat pH 8 tamponda çözündürülerek bilinen konsantrasyonlarda hazırlandı ve enzim solüsyonu ile etkileştirildi. Daha sonra 50 µl substrat eklendi ve 10 dk. 55 °C inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500µl 1M Na₂CO₃ ile durduruldu. Oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 405 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Okunan

absorbanslar kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği elde edildi. Bu grafikten faydalanılarak ONPG için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.22. Elektroforez

3.22.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmli, 1977)³

Çözeltiler

% 30 akrilamid / % 0,8 bis akrilamid: 30 g akrilamid, 0,8 g bis akrilamid saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edildi. Koyu renkli şişede 4 °C 'de saklandı.

1.5 M Tris.HCl pH 8,8: 54,45 g Tris-base 150 ml'ye tamamlandı, 1N HCl ile pH 8,8'e ayarlandı, hacim saf su ile 300 ml 'ye tamamlandı, filtre edilerek 4 °C'de saklandı.

0.5 M Tris. HCl pH 6,8: 6 g Tris-base 60 ml saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 6,8'e getirildi, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edilerek 4 °C'de saklandı.

% 10'luk APS (amonyum per sülfat) : 0,1 g APS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. Taze olarak hazırlanmalıdır.

Elektroforez tamponu: 3 g Tris, 14,4 g glisin, 0,1 g SDS, 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı ve 4 °C'de saklandı.

İz boya (örnek boya) : 7 ml 0,1M Tris. HCl pH 6,8, 3,6 ml gliserol, 1,2 mg BFB ile 10 ml saf su ilave edildi. 1'er ml olacak şekilde, ependorflara konarak -70 °C'de saklandı.

% 10'luk SDS: 0,1 g SDS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

Jelin Hazırlanması

Çalışmalarımızda % 7'lik jel kullanıldı. Ayırma jeli için, 3.5 ml akrilamid / bis akrilamid, 3.75 ml 0.1 M Tris. HCl (pH 8.8), 7.75 ml saf su, 75 µl % 10 'luk APS (Amonyum per sülfat), 7.5µl % 10'luk SDS, 10 µl TEMED buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

Konsantrasyon jeli için, 520µl akrilamid/bis akrilamid, 1 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 6.8) , 20 µl % 10 'luk APS, 4µl TEMED, 4µl % 10'luk SDS ve 2.44 ml saf sudan oluşan karışım hazırlandı. İşlemler buz içersinde ve karıştırılarak yapıldı.

İki cam levha arasına 6 cm yükseklikte ayırma jeli döküldü, üzerine pastör pipetiyle, su ile doyurulmuş bütanol konarak hava ile teması kesildi. Oda ısısında 30–60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol distile su ile yıkandı. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve konsantrasyon jeli döküldü. Hava ile temasını kesmek için, üzerine bütanol kondu. Oda sıcaklığında 30–45 dakika sonra polimerizasyon gözlemlendi.

Elektroforez İşlemi

Standart protein olarak, ticari β-galaktosidaz'dan 10 µl alındı ve üzerine 15µl izboya eklendi. Numunelerden 40µl, çöktürme ve diyaliz işlemi sonucu elde edilen solüsyondan 36µl, ham ekstraktan ise 20µl alınıp ayrı ayrı ependorflara konularak üzerlerine 20µl izboya bırakıldı. Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su alındı. Örnekler kuyucuklara sırasıyla konuldu. 1.00 mm'lik jele 250V (40 mA) akım verildi, yaklaşık 2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı. Camlar arasındaki

jel çıkarıldıktan sonra %10(v/v) metanol içeren 0.1M sodyum fosfat pH 8'de %0.025 6-Bromo-2 naphthyl- β -D-galactopyranoside(BNG)' de inkübe edildi. İnkübasyon 55 °C' de 30 dk. uygulandı. İnkübasyondan sonra aktivite jeli, distile suya %0.125'lik Diazo-blue B eklenerek hazırlanan solüsyon ile 2-5 dk. muamele edildi. Enzimin varlığı mor bir bandın oluşmasıyla tespit edildi. Daha sonra jel %75'lik asetik asit içinde fiske edildi ve durulandı¹.

BÖLÜM KAYNAKLARI

1. Gül-Güven, R. *Sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. Rittmanii'nin β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması*, Doktora Tezi, Dicle üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, **2007**.

2. Lowry, O.H. ; Rosebrough. N.J. ; Farr, A.L. *Protein measurement with the folin phenol reagent, J.biol. Chem. ,1951*, 193, 265- 275.

3. Laemmli U.K. *Nature*, **1977**, vol.227, p. 680–685.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamlarda Zamana Bağlı Enzim Aktivitesindeki Artışın Belirlenmesi

6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 saatler arasında kültüre alınan bakterilerde laktozlu (%1) ve laktozsuz ortamlarda zamana bağlı enzim üretimi araştırılmıştır. İnkübasyon periyotlarından sonra elde edilen üst sıvı ile bakteri OD (optik density)'si ölçülüp hem β -galaktozidaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir.

Şekil 4.1.'de laktozlu ortamda enzim aktivitesi 48.saatten başlayarak 96.saate kadar artarak devam ettiği görülmektedir. Laktozlu ortam için 48, 72, 96. saatlerdeki enzimin spesifik aktivite değerleri sırasıyla 1.38 U/mg, 2.12U/mg, 3.25U/mg olarak tespit edilmiştir. Laktozsuz ortamda ise enzim aktivitesinin 36.saatten başlayarak 96.saate kadar artarak devam ettiği ancak bu artışın 96.saatte laktozlu ortamdakine nazaran düşük olduğu görülmektedir. Laktozsuz ortam için 36, 48, 72, 96. saatlerdeki enzimin spesifik aktivite değerleri sırasıyla 1.38 U/mg, 1.85U/mg, 2.0U/mg ve 2.45U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.)

4.1.2. pH'nın β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

β -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi hem ham ekstrakt hem de kısmi olarak saflaştırılan enzim solüsyonlarında, 0.1 M sitrik asit tamponu (pH 4.0-5.5), 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0- 8.0), 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.5-9.5) ve 0.1 M Glisin-NaOH tamponu (pH 10) kullanılarak araştırılmıştır. Ham ekstraktta, NB besiyerinde *Bacillus licheniformis* KG9 üretilerek 48. saatteki

besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Enzim aktivitesinin pH 5.5 -6.0 arasında hızlı bir artış gösterdiği, pH 6.0 -8.0 aralığında optimuma yakın aktivite gösterdiği, daha sonra gittikçe azalan bir aktivite eğiliminde olduğu görülmüştür. Optimum pH 8. 0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).

4.1.3. Sıcaklığın β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

β -galaktozidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi hem ham ekstrakt hem de kısmi olarak saflaştırılan enzim solüsyonlarında araştırılmıştır. Ham ekstraktta, NB besiyerinde *Bacillus licheniformis* KG9 üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst sıvı (supernatant)'da ve kısmi saflaştırılan enzim solüsyonlarında 30°C ile 90 °C aralığı test edilmiştir. Optimum sıcaklık 55°C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4 .3.).

4.1.4.Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Etkisi

β -galaktozidaz aktivitesi üzerine farklı substrat konsantrasyonlarının etkisini belirlemek amacı ile 60 mM'lık stok bir ONPG solüsyonu hazırlanarak 0.25 – 6 mM aralığı incelenmiştir. En uygun substrat konsantrasyonu 3 mM olarak tespit edilmiştir (Şekil4.4.).

4.1.5. Farklı Besiyerlerinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Enzim üretimi üzerine değişik besi yerlerinin etkisinin araştırılması için içerikleri farklı olan NB, BM1, BM2, BM3 besi yerlerinde bakteriler 50 °C'de 120 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodundan sonra üst sıvılardan β -galaktozidaz aktivite tayini yapılmış ve sırayla enzim üretimi açısından

en fazla olandan en az olana doğru NB> BM3> BM1> BM2 olduğu tespit edilmiştir (Şekil4.5.).

4.1.6. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

NB besiyeri hazırlanarak otoklavlandıktan sonra %1'lik karbon kaynaklarından laktoz, galaktoz, glukoz, çözünebilir nişasta eklenerek bakteri ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan bakteriler 50 °C'de 120 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodundan sonra üst sıvılardan hem β -galaktozidaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Kontrolle (1.38U/mg) karşılaştırıldığında karbon kaynaklarının aktiviteyi arttırmadığı görülmektedir. Laktoz araştırılan diğer karbon kaynaklarına göre kontrolle karşılaştırıldığında daha yüksek bir aktivite göstermiştir. Bununla birlikte galaktoz, glukoz, çözünebilir nişastada kontrolden daha düşük bir aktivite elde edilmiştir. En yüksek aktivite laktozda (0.93 U/mg) en düşük aktivite glukozda (0.04 U/mg) elde edilmiştir (Şekil4.6.)

4.1.7. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

NB besiyeri hazırlandıktan sonra %1'lik azot kaynaklarından yeast ekstrakt, pepton, amonyumsülfat, glisin, beef ekstrakt, tripton besiyerine eklendi ve otoklavlanarak bakteri ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan bakteriler 50 °C'de 120 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodundan sonra üst sıvılardan hem β -galaktozidaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Kontrolle (2.65U/mg) karşılaştırıldığında

azot kaynaklarından, glisin ve amonyumsülfatta enzim aktivitesinin zayıf bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yeast extract, pepton, beef extract ve tripton'un ise kontrolden daha düşük bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktivite amonyumsülfatta (2.8 U/mg) en düşük aktivite Beef extractta (1.2 U/mg) elde edilmiştir (Şekil4.7.).

4.1.8. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması

NB içeren besiyerine bakteri ekimi yapılarak, 50 °C' de 120 rpm de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri 10.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı alınarak %70 oranındaki amonyum sülfat azar azar eklenerek, magnetik karıştırıcıyla buz altında çözdürülmesi sağlanmıştır. Ardından üst sıvı 1 gece +4 derecede magnetik karıştırıcı ile çöktürmeye bırakılmıştır. Çöktürme sonrasında sıvı 15.000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilerek, peletin 0.1M Na-fosfat pH 8 tamponu kullanılarak çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra % 20'lik etil alkolde 30 dk. kaynatılan ve saf su ile tekrar kaynatılarak temizlenen diyaliz hortumu içerisine çöktürme sonrası elde edilen sıvılar bırakılmıştır. 1 litre 0.1M Na-fosfat pH 8 tamponu içerisinde 1 gece +4 derecede magnetik karıştırıcı üzerinde amonyum sülfattan arındırmak amacıyla inkübasyona bırakılmıştır. Diyaliz sonunda final hacim ölçülmüştür. Ham ekstrakt ve diyaliz sonrasındaki enzim solüsyonundan hem β -galaktozidaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite(U/mg) tespit edilmiştir. Ham ekstraktta enzimin spesifik aktivite değeri 1631 U/mg, verim %100, saflaştırma katsayısı 1 iken diyaliz sonrasında sırasıyla spesifik aktivite değerinin 19030.45

U/mg, verimin %15.7 ve saflaştırma katsayısının 11.9 olarak değiştiği tespit edildi (Çizelge 4.1).

4.1.9. Ünite Tanımı İçin o-Nitrophenol'e ait "Extinction Sabitesi"nin Bulunması

β -Galaktozidaz aktivitesinin bir ünitesi, belirli şartlar altında (55 °C, 0.1M Na-fosfat tamponu pH 8) dakikada ONPG substratından 1 μ M o-nitrophenol salınmasına yol açan enzim miktarı olarak tanımlanır.

405 nm'deki absorbans değerleri, o-nitrophenol için "milimolar extinction sabitesi" 4.383 mM⁻¹ x cm⁻¹ olarak bulunarak (Şekil 4.8.) , o-nitrophenol konsantrasyonuna dönüştürüldü.

Spesifik aktivite, bovine serum albumin(BSA) standart olarak kullanılarak Lowry yöntemi ile tespit edilen 1mg protein başına düşen β -galaktozidaz üniteleri olarak tanımlanmıştır.

4.1.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkileri

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı(süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

Daha sonra β -galaktozidaz aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini belirlemek için Iodoacetamide, N-ethylenemaleimide, DTT, PMSF, PCMB, β -mercaptoethanol kullanılmıştır. Enzim solüsyonu bu kimyasallar ile 15dk. muamele edilmiştir ve aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. PCMB'nin 4 mM'da enzim aktivitesini %52 oranında inhibe ettiği Iodoacetamide'in 20 mM'da enzim

aktivitesini %53 oranında inhibe ettiği, PMSF ve N-ethylenemaleimide'in enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. DTT ve β -mercaptoethanol'un enzim aktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. DTT ve β -mercaptoethanol için en iyi aktivasyon etkisinin sırasıyla 10 mM'da %37, %24 oranında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

4.1.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Şelatörlerin Etkileri

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı(süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

Daha sonra β -galaktozidaz aktivitesi üzerine bazı metallerin ve şelatörlerin etkisi belirlemek için 0.2M 1,10-Phenanthroline monohydrate, CaCl_2 , EDTA, CuCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Enzim solüsyonu bu kimyasallar ile 15 dk. muamele edilmiştir ve aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. CuCl_2 ve ZnCl_2 en yüksek inhibisyon etkilerini 1 mM'da sırasıyla %99.5 ve %93.5 oranında enzim aktivitesini inhibe ederek göstermişlerdir. CaCl_2 20 mM'da enzim aktivitesini %62 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. EDTA ve 1,10-Phenanthroline monohydrate'in enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. MgCl_2 enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. MgCl_2 için en iyi aktivasyon etkisi, 8 mM'da %16 oranında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge4.3.)

4.1.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Gliserol ve Sorbitol'ün Koruyucu Etkisi

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı(süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

Elde edilen enzim solüsyonunda gliserol ve sorbitol'ün aktiviteyi koruyucu etkisini tespit etmek amacı ile %1-5 oranlarında solüsyonlar hazırlanarak enzim bu maddeler ile etkileştirilerek dondurulmuştur. Daha sonra β -galaktozidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Sorbitolün koruyucu etkisi kontrolle karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. En iyi koruyucu konsantrasyon %5 olarak tespit edilmiştir. Gliserolde ise koruyucu etkisi kontrolle karşılaştırıldığında %1'de %83, %2 -5 konsantrasyonlarında ise %90 oranında koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 9.).

4.1.13. Termal Stabilite

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı(süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

Elde edilen enzim solüsyonunun termostabilitesini tespit etmek için 50 -65 °C sıcaklıkları kullanılmıştır. Enzim solüsyonu test edilen her sıcaklıkta 20 – 120 dk. arasındaki sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra β -galaktozidaz aktivite tayini yapılarak absorbans spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzimin 50 °C'de 120dk.'da aktivitesini %90 oranında koruduğu, 55 °C'de 120 dk. sonunda aktivitesini tamamı ile koruduğu, 60 °C'de 120dk.'da aktivitesini %90 oranında koruduğu tespit

edildi. 65 °C’de 20 dk’da enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edildi (Şekil 4.10.).

4.1.14. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Tespiti

Bacillus licheniformis KG9 NB besiyerinde üretilerek 48. saatte besiyeri 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur.

Enzim solüsyonunda glukoz ve galaktozun, enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi belirlenmiştir. 1M ve 100mM Glukoz ve galaktoz standart solüsyonları kullanılıp değişik konsantrasyonlar hazırlanarak enzim ile etkileştirilmişlerdir ve daha sonra aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Glukozun enzim üzerine ihibisyon etkisi gözlenmemiştir. Galaktoz ise 128 mM’da %97 oranında inhibisyona neden olmuştur.

Daha sonra galaktozun 4 mM, 16 mM, 32 mM konsantrasyonları farklı ONPG konsantrasyonları ile etkileştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüş ve galaktozun inhibisyon türü belirlenerek ONPG için K_m ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi galaktoz enzim üzerinde yarışmalı bir inhibisyona neden olmaktadır. Burada substrat ve inhibitör derişimleri kıyaslandığında substrat için K_m değerinin büyüdüğü görülmektedir. Bunun yanında inhibitör derişimi ile doğrunun eğimi değişmektedir, ancak $1/v$ ekseninde bulunan $1/ V_{max}$ kesim noktasının aynı kaldığı da görülmektedir. ONPG için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk plot’a göre sırası ile 3.52 mM ve 1.602 $\mu\text{mol/ dk.}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11.).

4.1.15. Non-denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

12–96. saatler arasında kültüre alınan bakterilerde zamana bağlı enzim üretimindeki artış non-denatüre jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. 1. kuyucukta 155kDa non-denatüre *Alicyclobacillus acidocaldarius* ssp. *rittmannii* (strain MR1)'e ait β -galaktozidaz, 2. kuyucukta ham ekstrakt, 3.kuyucukta diyaliz sonrası enzim solüsyonu, 4–9 arası kuyucuklarda ise 12–96.saatlere ait enzim solüsyonları, 10.kuyucukta ise 116kDa *E.coli*'ye ait prestained weight marker bulunmaktadır. Şekil15'de görüldüğü gibi 12–96. saatlerinde enzim aktivitesinin artışına bağlı olarak enzimlerin bulunduğu bantlarda giderek koyulaşan renk değişimi görülmektedir. β -galaktozidaz'ın molekül ağırlığının 116kDa'dan küçük olduğu tespit edilmiştir(Şekil 4.12.).

4.2. TARTIŞMA

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerinde yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde transformasyon geçiren, çok yeni ve geleceğe damgasını vuracak bir alandır¹.

30 yılı aşkın bir süredir bilim adamları, ekstrem sıcak, soğuk, pH'lara sahip alanlardan bakteriler izole etmektedirler. Bu bakterilerden elde edilen enzimler birçok değişik endüstriyel alanlarda kullanılmaktadırlar². Çalışmamızda da sıcak su kaynaklarından izole edilen ve termofilik bir bakteri olan *Bacillus licheniformis* KG9'a ait ekstrasellüler β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmamızda %1 laktozlu ve laktozsuz olan ortamlarda 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96. saatler arasında kültüre alınan bakterilerde laktozlu ortamda enzim üretimi 48.saatten başlayarak 96.saate kadar artarak devam ettiği görülmüştür. Laktozsuz ortamda 36.saatten itibaren başlayan ve 96.saate kadar devam eden bir enzim aktivitesi artışı tespit edilmiştir. Enzimin aktivitesindeki bu artış sentezinin konstitüf (temel enzim) olduğu sonucunu göstermektedir. Kullanılan bakterinin büyüme hızı ve inkübasyon süresi enzim üretme özelliğini etkilemektedir.

Gül-Güven, R.³ (2004) *Alicyclobacillus acidocaldarius* *subspecies Rittmannii*'nin β -galaktozidaz enzimi üzerine yaptığı çalışmada 3- 48 saatlik sürelerde %1 laktozlu ve laktozsuz ortamlarda zamana bağlı enzim üretimini çalışmıştır. En yüksek β -galaktozidaz aktivitesini %1 laktozlu ortamda 24 saatte elde etmiştir. Laktozsuz ortamda da 40. saate kadar enzim aktivitesinin arttığını tespit etmiştir.

Javorsky, P. ve ark.⁴ (1990) *Fibrobacter succinogenes* 'e ait β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. En iyi enzim aktivitesi için uygun inkübasyon süresini 12 saat olarak belirlemişlerdir.

Chakraborti, S. ve ark.⁵ (2000) *Bacillus sp.* MTCC 3088'den salgılanan ekstrasellüler β -galaktozidaz üzerine çalışmalar yapmışlardır. En uygun inkübasyon süresini 16 saat olarak belirlemişlerdir.

Somkuti, G.A. ve ark.⁶ (1979) *Streptococcus thermophilus*'a ait ekstrasellüler β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. En uygun inkübasyon süresini 16 saat olarak belirlemişlerdir.

Fantes, P.A. ve ark.⁷ (1973) *Aspergillus nidulans* 'a β -galaktozidazın laktoz varlığında enzim sentezinin arttığını rapor etmişlerdir.

Hsu, C.A. ve ark.⁸ (2005) *Bifidobacterium longum* CCRC 15708'e ait β -galaktozidaz üzerine çalışmalar yapmışlardır. En uygun inkübasyon süresini 12 saat olarak belirlemişlerdir.

Hirata, H. ve ark.⁹ (1985) *Bacillus stearothermophilus*'a ait β -galaktozidaz genini *Bacillus subtilis*' te klonlamışlardır ve enzimin laktoz varlığında indüklenerek sentezinin arttığını ve enzimin *Bacillus subtilis*'te konstitüf olarak sentezlendiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzimin aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerini bulmak amacı ile sırasıyla pH 4 ile 10 ve 30°C ile 90 °C aralıkları test edilmiştir. Şekil4.2.'de görüldüğü gibi enzim pH 6.0-8.0 aralığında optimuma yakın aktivite göstermektedir. Optimum pH ise 8.0 olarak tespit edilmiştir. Enzim pH 6.0 -8.0 aralığında optimuma yakın aktivite gösterdiğinden çeşitli endüstri dallarında kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Enzim bu özelliği ile süt ürünleri endüstrisinde,

sütteki laktozun hidrolize edilmesinde ve tatlı peyniraltı suyu prosesler gibi işlemlerde kullanılabilir. Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 55°C olarak tespit edilmiştir. Enzim yüksek sıcaklıklara dayanıklı olduğundan süt ve süt ürünleri endüstrisinde yüksek sıcaklık gerektiren işlemlerdeki mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltmada avantaj sağlayacaktır.

Griffiths, M.W. ve ark.¹⁰ (1978) termofilik bir *Bacillus*'tan tarafından salgılanan β -galaktozidazın optimum pH'sını ve sıcaklığını sırası ile 6 ve 60 °C olarak tespit etmişlerdir.

Somkuti, G.A. ve ark.⁶ (1979) *Streptococcus thermophilus*'a ait β -galaktozidazın optimum pH'sını ve sıcaklığını sırası ile 8 ve 55 °C olarak tespit etmişlerdir.

Itoh, K. ve ark.¹¹ (1993) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 bakterisinin salgıladığı β -galaktozidaz enziminin optimum pH'sını ve sıcaklığını sırası ile 6.5 ve 50 °C olarak tespit etmişlerdir.

Chakraborti, S.ve ark.⁵ (2000) *Bacillus sp.* MTCC 3088'den salgılanan ekstrasellüler β -galaktozidazın optimum pH'sını ve sıcaklığını sırası ile 8 ve 60 °C olarak tespit etmişlerdir.

Batra, N. ve ark.¹² (2002) sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Bacillus coagulans* RCS3'a ait β -galaktozidazın optimum pH'sını ve sıcaklığını sırası ile 6-7 ve 65 °C tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda β -galaktozidaz aktivitesi için en uygun substrat (ONPG) konsantrasyonu belirlemek için 60 mM'lık stok bir ONPG solüsyonu hazırlanarak

0,25 – 6 mM aralığı incelenmiştir. Şekil4.4'de görüldüğü gibi yeterli substrat konsantrasyonu 3 mM olarak tespit edilmiştir. Bu durum belirlenen substrat konsantrasyonu olan 3 mM'ın enzim aktivitesi için doygun bir derişim olduğu şeklinde açıklanabilir.

Kim, W.J. ve ark.¹³ (2000) *Lactobacillus crispatus*'a ait β -galaktozidaz aktivitesi için yeterli substrat miktarı olarak 3mmol/L konsantrasyonunu kullanmışlardır.

Hsu, C.A. ve ark.⁸ (2005) *Bifidobacterium longum* CCRC 15708'e ait β -galaktozidazın aktivitesi için yeterli substrat miktarı olarak 7.5 mM konsantrasyonunu kullanmışlardır.

Haider, T. ve ark.¹⁴ (2007) *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β -galaktozidazın aktivitesi için yeterli substrat miktarı olarak 2 mM konsantrasyonunu kullanmışlardır.

Sheridan, P.P. ve ark.¹⁵ (2000) psikrofilik *Planococcus*' den elde edilen β -galaktozidazın aktivitesi için yeterli substrat miktarı olarak 2.6 mM konsantrasyonunu kullanmışlardır.

Nagy, Z. ve ark.¹⁶ (2001) *Penicillium chrysogenum*' den elde edilen β -galaktozidazın aktivitesi için yeterli substrat miktarı olarak 3mM konsantrasyonunu kullanmışlardır.

Çalışmamızda farklı besiyerlerinin β -galaktozidaz üretimi üzerine etkisini incelemek amacı ile içerikleri farklı olan NB, BM1, BM2, BM3 besiyerleri kullanılmıştır. Şekil4.5.'de görüldüğü gibi en iyi enzim üretimi NB besiyerinde gözlenmiştir. Bu durum NB besiyerinin, içerik olarak β -galaktozidaz üretimi için yeterli olması şeklinde açıklanabilir. Diğer besiyerleri enzim üretimi açısından en

fazla olandan en az olana doğru BM3> BM1> BM2 olarak tespit edilmiştir. Bu besiyerilerinde kullanılan azot, karbon kaynaklarının ve diğer kimyasal maddelerin kombinasyonlarının enzim üretiminde gözle görülen bir artışa neden olmadıkları görülmektedir.

Hsu, C.A. ve ark.⁸ (2005) *Bifidobacterium longum* CCRC 15708'e ait β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Maksimum β -galaktozidaz aktivitesi için uygun kültür ortamı olarak %4 laktoz, %3.5 yeast ekstrakt, %0.3 K₂HPO₄, %0.1 KH₂PO₄, %0.05 MgSO₄.7H₂O, %0.03 L-sistein içeren besiyeri olduğunu tespit etmişlerdir.

Konsoula, Z. ve ark.¹⁷ (2007) *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz ve β -galaktozidaz enzimlerinin birlikte üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada uygun kültür ortamı olarak %0.25 K₂HPO₄, %0.25 Na₂HPO₄, 0.1 NaCl, 0.2 (NH₄)₂SO₄; 0.005 MgSO₄.7H₂O, %0.2 çözünebilir nişasta ve %0.2 tripton içeren besiyerinin maksimum α -amilaz ve β -galaktozidaz üretimi için uygun olduğunu tespit etmişlerdir.

Alazzeh, A.Y. ve ark.¹⁸ (2009) *Lactobacillus reuteri*'den salgılanan α ve β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada uygun kültür ortamı olarak olarak 1% g laktoz, 1% g rafinoz, 122 0.5% NaCH₃COO, 123 0.05% MgSO₄.7O, 0.005% MnSO₄.4H₂O, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% L124 cysteine, 0.1% Tween 80 %2 yeast ekstrakt içeren besiyerinin maksimum ve α ve β -galaktozidaz üretimi için uygun olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi %1 oranında farklı karbon kaynakları ekleyerek araştırılmıştır. Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi kontrolle karşılaştırıldığında karbon kaynaklarının aktiviteyi arttırmadığı

görülmektedir. Laktoz araştırılan diğer karbon kaynakları ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir aktivite göstermiştir. Bununla birlikte galaktoz, glukoz, çözünebilir nişastanın kontrole göre enzim üretimini oldukça fazla düşürdüğü gözlemlendi. Düşük aktivitenin galaktoz, glukoz ve çözünebilir nişastanın bakterinin enzim sentezleme mekanizması üzerinde negatif etki özelliğine sahip olmalarıyla açıklayabiliriz.

Konsoula, Z. ve ark.¹⁷ (2007) *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz ve β -galaktozidaz enzimlerinin birlikte üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak çözünebilir nişasta kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Hsu, C.A. ve ark.⁸ (2005) *Bifidobacterium longum* CCRC 15708'e ait β -galaktozidaz enziminin üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir. Galaktoz ve glukozun ise enzim aktivitesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Kim, W.J. ve ark.¹³ (2000) *Lactobacillus crispatus*'un sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak MRS broth besiyerine galaktoz eklendiğinde en iyi β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir. Laktoz glukoz ve maltozda ise β -galaktozidaz aktivitesinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Fiedurek, J. ve ark.¹⁹ (1994) *Kluyveromyces fragilis*'in sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Shaikh, S.A. ve ark.²⁰(1997) *Rhizomucor* sp.'nin sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi %1 oranında farklı azot kaynakları ekleyerek araştırılmıştır. Şekil4.7.'de görüldüğü gibi kontrole karşılaştırıldığında azot kaynaklarının aktiviteyi fazla arttırmadığı görülmektedir. Glisin ve amonyumsülfat kullanıldığında, enzim aktivitesi kontrole göre çok az bir etkiye yol açtığı olduğu görülmektedir. Yeast ekstrakt, pepton, beef ekstrakt ve tripton ise kontrolden daha düşük bir aktiviteye yol açmıştır..

Konsoula, Z. ve ark.¹⁷ (2007) *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz ve β -galaktozidaz enzimlerinin birlikte üretimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada azot kaynağı olarak yeast ekstrakt kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Hsu, C.A. ve ark.⁸ (2005) *Bifidobacterium longum* CCRC 15708'e ait β -galaktozidaz enziminin üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Azot kaynağı olarak yeast ekstrakt kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Ramana Rao, M.V. ve ark.²¹ (1977) *Streptococcus thermophilus*'un sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Azot kaynaklarının mikrobiyal β -galaktozidazın biyosentezini etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Azot kaynağı olarak proteoz pepton kullanıldığında en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Shaikh, S.A. ve ark.²⁰ (1997) *Rhizomucor* sp.'nin sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Azot kaynaklarının mikrobiyal β -galaktozidazın biyosentezini etkileyebileceğini belirtmişlerdir.

Fiedurek, J. ve ark.¹⁹ (1994) *Kluyveromyces fragilis*'in sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Azot kaynağı olarak yeast ekstrakt kullanıldığında, en yüksek β -galaktozidaz aktivitesini elde etmişlerdir.

Çalışmamızda β -galaktozidaz aktivitesi üzerine Iodoacetamide, N-ethylenemaleimide, DTT, PMSF, PCMB, β -mercaptoethanol gibi bazı kimyasalların etkileri incelenmiştir. izelge4.2.'de kimyasal maddelerin etkileri görülmektedir. PCMB'nin 4 mM'da enzim aktivitesini %52 oranında inhibe ettiği, Iodoacetamide'in 20 mM'da enzim aktivitesini %53 oranında inhibe ettiği, PMSF ve N-ethylenemaleimide enzimde inhibisyona neden olmadığı, DTT ve β -mercaptoethanol enzim aktivitesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. DTT ve β -mercaptoethanol için en iyi aktivasyon etkisinin 10 mM'da sırasıyla %37, %24 oranında olduğu tespit edilmiştir. Iodoacetamide histidin, PCMB sistein aminoasidinin inhibitörüdür. Bu kimyasal maddelerin belli konsantrasyonlarda enzimin aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Enzimin aktifmerkez bölgesinde sistein ve histidin aminoasidinin bulunabileceklerini ve katalitik mekanizmada rol aldıkları söylenebilir. Literatürlerde, β -galaktozidaz'ın aktif mekezinde sistein ve histidin aminoasidinin bulunduğu ve fonksiyonlarının sırasıyla proton vericisi ve proton alıcısı olduğu bildirilmektedir. Enzimatik hidroliz prosedürü boyunca sistein aminoasidinde bulunan sülfidril grubu proton vericisi, histidin aminoasidinde bulunan imidazol grupları da nükleofil bölge olarak davranarak glikozidik bağın kırılmasını kolaylaştırırlar^{22,23}. Tiyol grupları içeren DTT ve β -mercaptoethanol gibi ajanlar ise

aktif merkezdeki –SH grubu içeren aminoasitleri stabilize ederek enzim aktivasyonuna yol açtığı söylenebilir. PMSF serin aminoasidi'nin inhibitörüdür enzimin aktivitesini etkilememesi enzimin katalitik aktivitesinde serin aminoasidinin rol oynamadığını gösterebilir.

Somkuti, G.A. ve ark.⁶ (1979) *Streptococcus thermophilus*'de β-galaktozidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzim aktivitesini β-mercaptoethanol ve DTT'nin stimüle ettiğini, PCMB'in ise inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Goncalves, J.A. ve ark.²⁴ (1982) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 111'deki β-galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzim aktivitesinin *p*-Chloromercuribenzoate (PCMB) ile sınırlı yarışmalı olarak inhibe olduğunu rapor etmişlerdir.

Itoh, K. ve ark.¹¹ (1993) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1'den sentezlenen β-galaktozidaz enzimini karakterize etmişlerdir. . β-merkaptetanol enzimi aktive ettiğini, iodoacetamide 'in ise inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Chen, W. ve ark.²⁵ (2008) *Bacillus stearothermophilus*'a ait termostabil β-galaktozidazın *bgaB* genini klonlayarak *Bacillus subtilis* WB600'te ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen bu rekombinant enzimin aktivitesi üzerine tiyol belirteçleri olan DTT ve β-mercaptoethanol gibi kimyasal ajanların enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını, sülfidril bloke edici belirteçler olan PCMB ve Iodoacetamide'in ise enzim aktivitesi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Mahoney, R.R. ve ark.²⁶ (2007) *Kluyveromyces fragilis*'ten salgılanan β-galaktozidaz enziminin aktivitesini PCMB'in inhibe ettiğini, DTT'nin stimüle ettiğini, NEM'in ise inhibisyon etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Gote, M.M. ve ark.²⁷ (2007) *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) ' den salgılanan α -galaktozidaz enziminin aktivitesini PCMB'in inhibe ettiğini, NEM ve iodoectamide ve PMSF'nin inhibisyon etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda β -galaktozidaz aktivitesi üzerine bazı metallerin ve şelatörlerin etkisini belirlemek için 1,10- phenanthroline monohydrate, CaCl_2 , EDTA, CuCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 solüsyonlar hazırlanmıştır. Çizelge 4.3.'de görüldüğü gibi CuCl_2 ve ZnCl_2 1 mM'da sırasıyla %99.5 ve %93.5 oranında enzim aktivitesini inhibe ettikleri tespit edilmiştir. CaCl_2 20 mM'da enzim aktivitesini %62 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. MgCl_2 enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. MgCl_2 için en iyi aktivasyon etkisi, 8 mM'da %16 oranında olduğu tespit edilmiştir. EDTA ve 1,10- Phenanthroline monohydrate'nin enzim aktivitesinde etkiye yol açmadığı tespit edilmiştir. Bu durum enzimin metaloenzim olmadığı şeklinde açıklanabilir.

Somkuti, G.A. ve ark.⁶ (1979) *Streptococcus thermophilus*'de β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzim aktivitesini Mg^{+2} 'un stimüle ettiğini, Cu^{+2} ise inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Khalid, A.A.R. ve ark.²⁸ (1991) psikotropik *Bacillus subtilis* KL88 'e ait β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzim aktivitesini Cu^{+2} , Zn^{+2} tarafından inhibe olduğunu, Ca^{+2} 'un yüksek konsantrasyonlarının enzimi kısmen inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Itoh, K. ve ark.¹¹ (1993) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1'den sentezlenen β -galaktozidaz enzimini karakterize etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine MgCl_2 'ün etkisinin olmadığını, FeSO_4 'ın ise enzim aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Choi, Y.J. ve ark.²⁹ (1995) alkalofilik ve termofilik *Bacillus* sp. TA- 11' den salgılanan β -galaktozidaz enzimi üzerinde çalışmışlardır. Enzim aktivitesini EDTA ve Zn^{+2} 'nin büyük oranda inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Chakraborti, S. ve ark.⁵ (2000) *Bacillus* sp. MTCC 3088'den salgılanan ekstrasellüler yeni β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Enzim üzerinde bazı metallerin ve kimyasal maddelerin aktiviteyi nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Mg^{+2} , nin iyi bir aktivatör olduğunu belirlemişlerdir.

Chakraborti, S. ve ark.³⁰ (2003) *Bacillus polymyxa*' nin salgıladığı uygulama potansiyeli yüksek olan yeni bir β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , metal iyonlarının 2,5 ile 25 mM arasındaki oranlarda enzim aktivitesini inhibe ederken şelatlayıcı bir ajan olan EDTA'nın katalitik aktivite üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını tespit etmişlerdir.

Işık-Ustok, F. ve ark.³¹ (2010) *Streptococcus thermophilus* 95/2 (St 95/2) ve *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* 77 (Lb 77)'den sentezlenen β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Mg^{+2} 'un her iki enzimin aktiviteleri üzerinde aktivasyon etkisine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ca^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} iyonları enzim aktivitesinde inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda β -galaktozidaz enziminin termostabilitesini tespit etmek için 50 -65 °C sıcaklık aralıkları kullanılmıştır. Enzim solüsyonu test edilen her sıcaklıkta 20 – 120 dk. arasındaki sürelerde bekletilmiştir. Şekil4.10'da görüldüğü gibi enzim 55 °C'de 120 dk. sonunda aktivitesini korumaktadır. 50 °C ve 60 °C'de ise enzim aktivitesini yaklaşık %90 oranında korumaktadır. Bu durum yüksek sıcaklık

gerektiren uygulamalarda enzimin, biyoteknolojik olarak kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Chakraborti, S. ve ark.³⁰ (2003) *Bacillus polymyxa*'nın salgıladığı uygulama potansiyeli yüksek olan yeni bir β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Enzimin 50 °C de oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır. 60 °C de β -galaktozidaz'ın 50 °C'ye göre daha az stabil olduğunu rapor etmişlerdir. 65 ve 70 °C enzimin stabil olmadığını tespit etmişlerdir.

Goncalves, J. A. ve ark.²⁴ (1982) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 111'den salgılanan β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin 52 °C de 4 dk.da tamamen inhibe olduğunu, 50 °C de 90 dk da %50 oranında aktivitesinin kaldığını tespit etmişlerdir.

Levin, R.E. ve ark.³² (1981) *Bacillus coagulans* L4' ten salgılanan β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Enzimin 55 °C de 30 dk. da %70 oranında aktivitesi kaybettiğini tespit etmişlerdir.

Cowan, D.A ve ark.³³ (1984) ekstrem termofilik olan *Thermus* 4-1A'ün indüklenebilen β -galaktozidaz enzimini çalışmışlardır. Enzimin 90 °C de oldukça stabil olduğunu tespit etmişlerdir.

Ohtsu, N. ve ark.³⁴ (1998) *Thermus* sp. A4' den salgılanan termofilik β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Enzimin son derece termostabil olduğunu ve 70 °C' de 20 saat inkübasyona rağmen aktivitesini yitirmediğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda β -Galaktozidaz enziminin aktivitesini gliserol ve sorbitol'ün koruyucu etkisini tespit etmek amacı ile %1 -5 oranlarında hazırlanan solüsyonlar kullanılmıştır. Şekil4.11.'de görüldüğü gibi sorbitol'ün koruyucu etkisi kontrolle karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. En iyi koruyucu konsantrasyon %5 olarak tespit edilmiştir. Gliserolde ise koruyucu etkisi kontrolle karşılaştırıldığında %1'de %83, %2 , %3 , %4 ,%5 konsantrasyonlarında ise %90 oranında olduğu tespit edilmiştir.

Holmes, M ve ark.³⁵ (1997) ekstrem halofilik bir bakteri olan *Haloferax alicantei*'nin sentezlediği β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada enzimi stabilize etmek için gliserol ve sorbitol kullanmışlardır. %30 oranında sorbitol kullanıldığında enzimin stabilize olduğunu tespit etmişlerdir.

Athe`s, V. ve ark.³⁶ (1997) *Kluyveromyces lactis*'a ait β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada kullandıkları poliollerin(gliserol, eritrol, ksilitol, ve sorbitol) enzim aktivitesini stabilize edici etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Somkuti, G.A. ve ark.⁶ (1979) *Streptococcus thermophilus*'deki β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada enzimin +4 °C de %10 gliserol içeren ortamda enzimin aktivitesini 3 ay boyunca koruduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzim solüsyonunda glukoz ve galaktozun, enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Farklı glukoz ve galaktoz konsantrasyonları hazırlanarak enzim ile etkileştirilmiştir. Glukozun enzim üzerine inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Galaktoz ise 128 mM'da %97 oranında inhibisyona neden olmuştur. Daha sonra galaktozun 4 mM , 16 mM , 32 mM konsantrasyonları farklı ONPG

konsantrasyonları ile etkileştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüş ve galaktozun inhibisyon türü belirlenerek ONPG için K_m ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. Şekil4.12.'de görüldüğü gibi galaktoz enzim üzerinde yarışmalı bir inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir. ONPG substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 3.52 mM ve 1.602 μ mol/dk. olarak tespit edilmiştir.

Chen, W. ve ark.²⁵ (2008) *Bacillus stearothermophilus*'a ait termostabil β -galaktozidazın *bgaB* genini klonlayarak *Bacillus subtilis* WB600'te ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant enzim için ONPG substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 2.96 mM ve 6.62 μ mol olarak tespit etmişlerdir.

Goncalves, J. A. ve ark.²⁴ (1982) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 111'deki β -galaktozidazın galaktoz ile yarışmalı olarak inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Michaelis-Menten sabitesinin O-Nitro-fenil- β -D-galactopyranoside (ONPG) için 3.1 mM olduğunu tespit etmişlerdir.

Levin, R.E. ve ark.³² (1981) *Bacillus coagulans* L4' ten salgılanan β -galaktozidazın galaktoz ile yarışmalı olarak inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. ONPG için K_m değerini 4.2- 5.6 mM olarak belirlemişlerdir

Ladero, M. ve ark.³⁷ (2001) *Escherichia coli* 'nin salgıladığı β -galaktozidaz üzerine çalışmışlardır. Çalışmada reaksiyon ürünü galaktozun β -galaktozidaz'ı inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun laktoz hidrolizi ile paralel bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Batra, N. ve ark.¹² (2002) *Bacillus coagulans* RCS3'a ait β -galaktozidazın hidroliz ürünü galaktoz tarafından yarışmalı olarak inhibe edildiğini bulmuşlardır.

Çalışmamızda yaptığımız non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezinde 12-96. saatler arasında kültüre alınan bakterilerde zamana bağlı enzim üretim artışı teyit

edilmiştir. Şekil4.12.'de görüldüğü gibi 12-96. saatlerinde enzim aktivitesinin artışına bağlı olarak enzimlerin bulunduğu bantlarda giderek koyulaşan renk değişimi görülmüştür. β -Galaktozidaz'ın molekül ağırlığının 116kDa'dan küçük olduğu tespit edilmiştir.

Itoh, K. ve ark.¹¹ (1993) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1'den salgılanan β -galaktozidazın molekül ağırlığını yaklaşık 311.000 olarak hesaplamışlardır.

Choi, Y.J. ve ark.²⁹ (1995) alkalofilik ve termofilik *Bacillus* sp. TA-11' den salgılanan β -galaktozidazın molekül ağırlığını 200kDa olarak belirlemişlerdir.

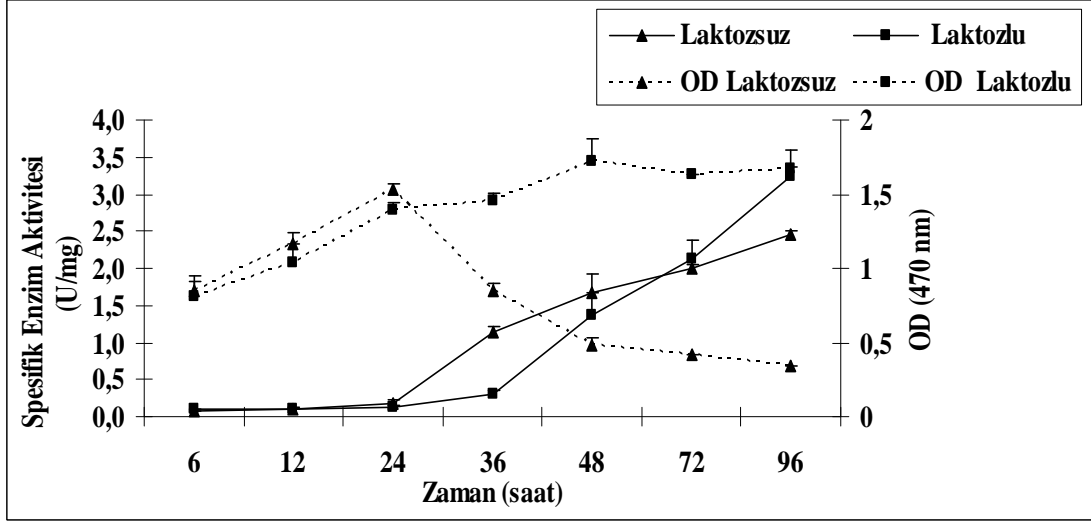
Ohtsu, N. ve ark.³⁴ (1998) *Thermus* sp. A4' den salgılanan β -galaktozidazın molekül ağırlığını SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulayarak 75kDa olarak belirlemişlerdir.

Nagy, Z. ve ark.¹⁶ (2001) *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237'den salgılanan β -galaktozidazın multimerik bir yapıda olduğunu, molekül ağırlığının ise yaklaşık 270kDa olup her biri 66kDa olan monomerler içerdiğini tespit etmişlerdir.

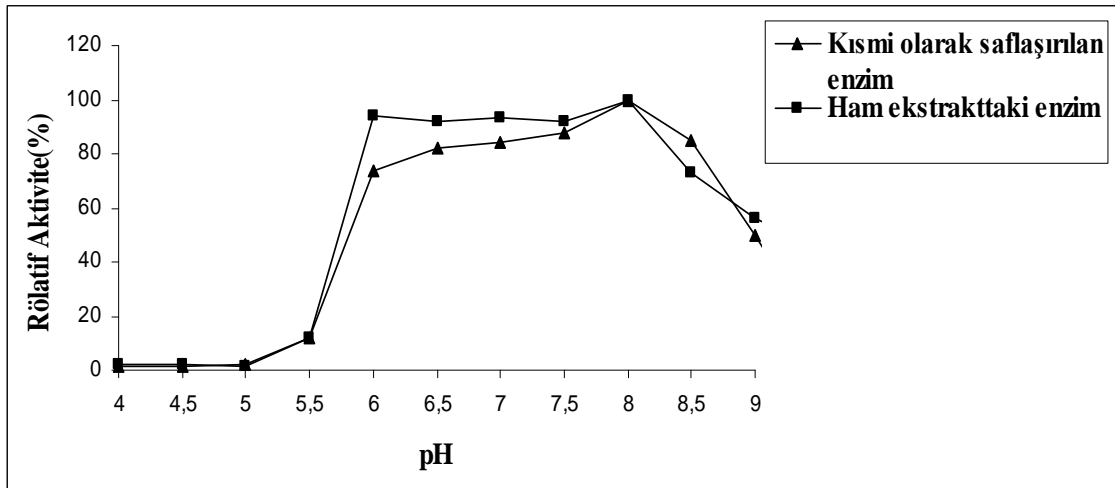
Sıcak su kaynaklarından izole edilen *Bacillus licheniformis* KG9'un sentezlediği ekstrasellüler β -galaktozidaz enzimi üzerine yapılan bu çalışmada enzimin belirlenen özelliklerinden pH 6 -8 aralığında ve 55°C'de aktif olması yüksek sıcaklık gerektiren süt ve süt ürünleri proseslerinin geliştirilmesi teknolojisinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte artan inkübasyon sürecinde(6- 96 saat aralığında) mikroorganizmanın ürettiği enzim miktarı artmaktadır bu durum fazla miktarda enzim eldesi için istenilen bir faktördür. Enzimin ekstrasellüler olması uygulanacak işlemler açısından ekonomik ve pratiktir. Enzim 60°C' de 120dk. sonunda yaklaşık %90 oranında aktivitesini korumaktadır. Zor ortam koşulları gerektiren ve yüksek sıcaklık gerektiren süt ve süt ürünleri

proseslerinde mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltmada aranılan bir durumdur. Bunlara ilaveten enzim dondurma ve çözme işlemlerinde aktivitesini büyük oranda yitirmektedir. Bu durumda enzime sorbitol veya gliserol ilave edildiğinde enzim aktivitesini korumaya devam etmektedir. Enzimin saflaştırılarak bazı özelliklerinin ileri düzeyde çalışılması gerekmektedir.

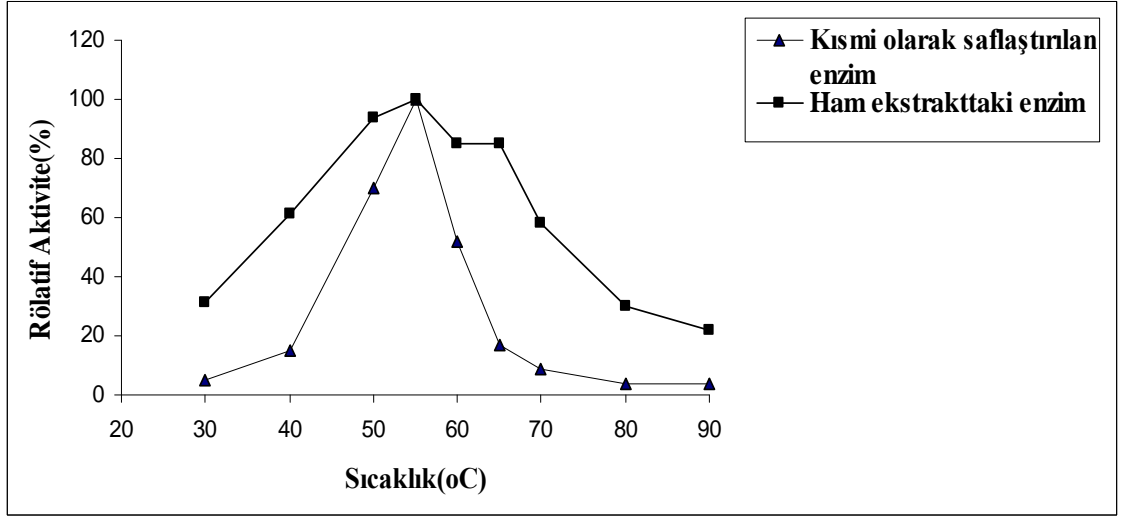
4.3. ŞEKİLLER



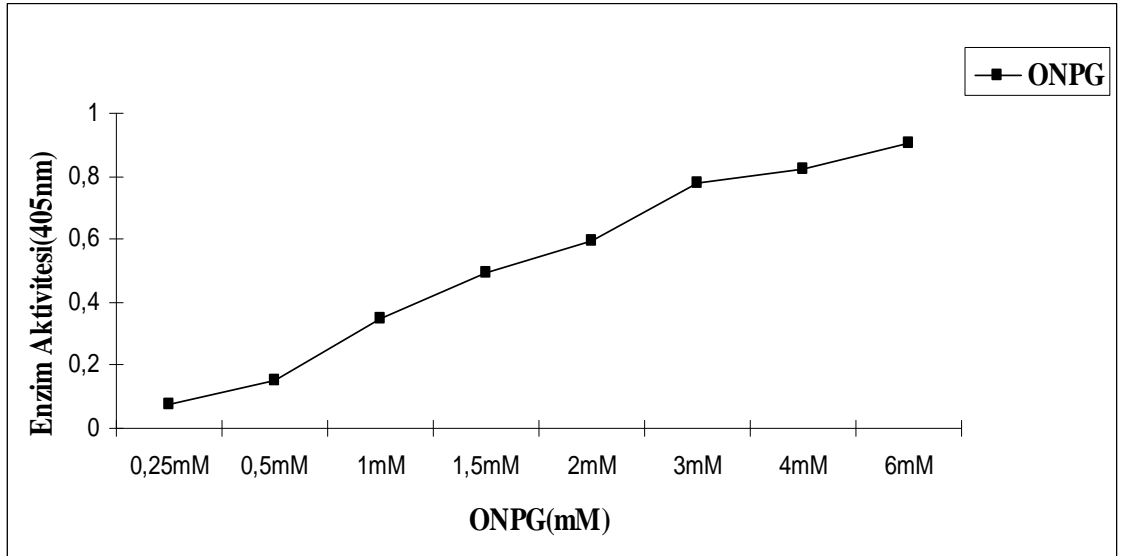
Şekil 4.1. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamlarda Zamana Bağlı β -Galaktozidaz Aktivitesindeki Artış



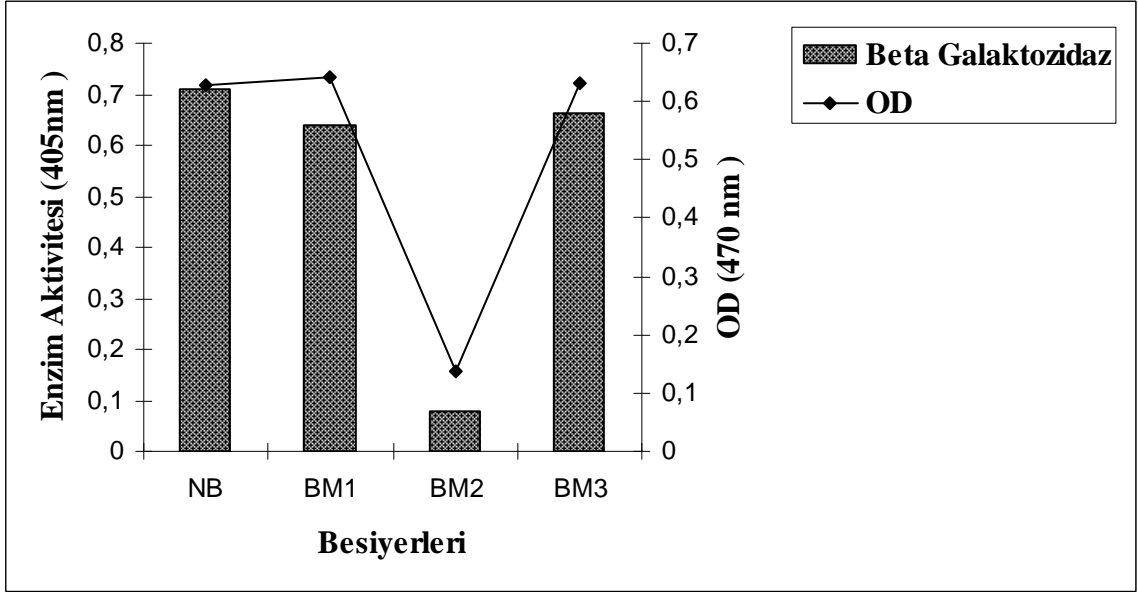
Şekil 4.2. pH'nın β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



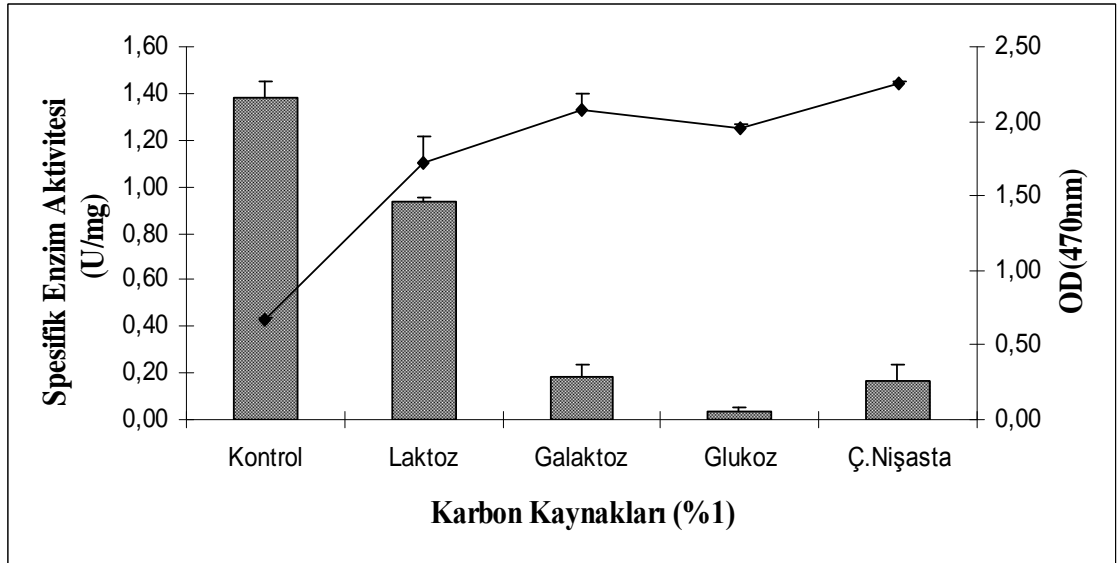
Şekil 4.3. Sıcaklığın β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



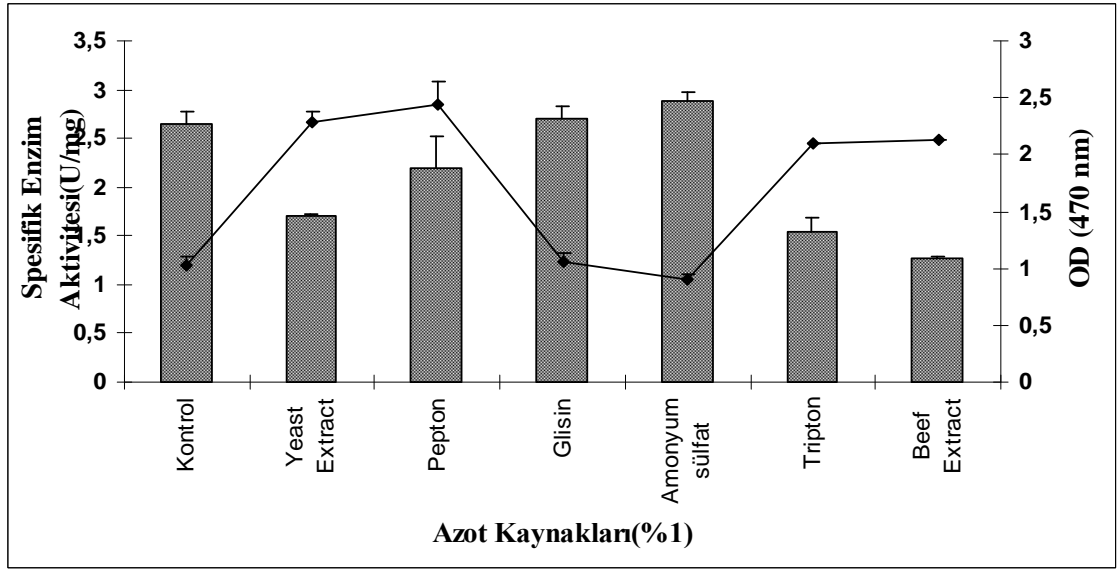
Şekil 4.4. β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Etkisi



Şekil 4.5. Farklı Besiyerlerinin β-Galaktozidaz Üretimi Üzerine Etkisi



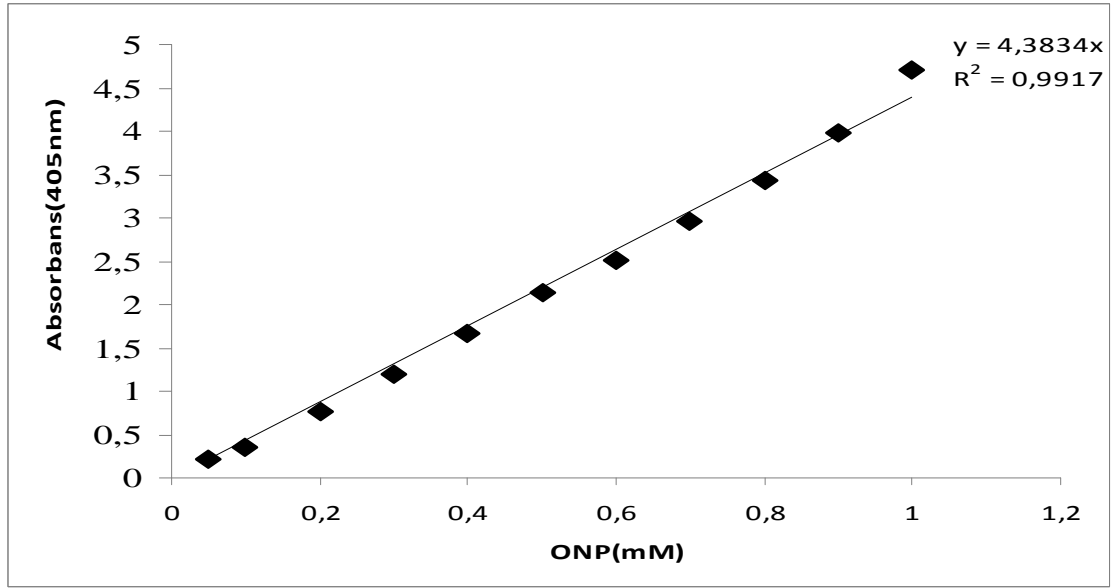
Şekil 4.6. β-Galaktozidaz Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi



Şekil.4.7. β -Galaktozidaz Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

Çizelge 4.1. Kısmi Saflaştırma Tablosu

	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham ekstrakt	18109	11.10	1631	1	100
Çöktürme ve Diyaliz	2845.05	0.1495	19030.43	11.66	15.7



Şekil 4.8. ONP'ye ait "Milimolar extinction coefficient(mE)" Sabitesi

Çizelge 4.2. β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkisi

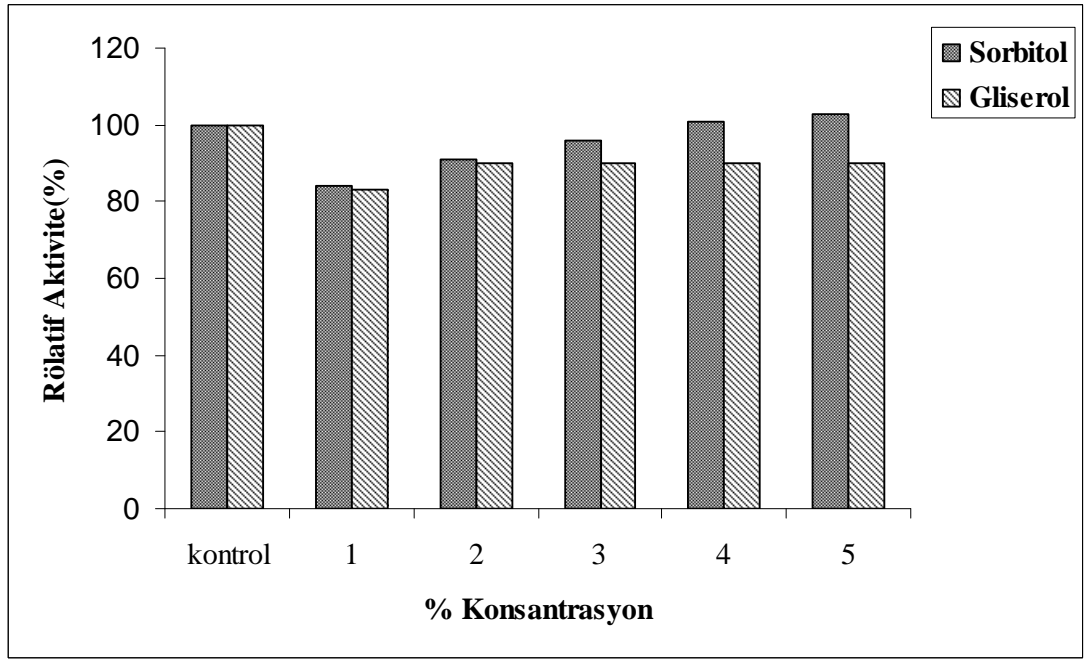
Kimyasallar	Kalan Aktivite (%)						
	0.5 mM	1 mM	2 mM	4 mM	8 mM	10 mM	20 mM
PCMB	78	62	49	48	-	-	-
Iodoacetamide	-	97	93	90	86	76	47
DTT	-	119	125	126	129	137	-
β -mercaptoethanol	-	119	120	121	122	124	-

Çizelge 4.3. β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal ve Şelatörlerin Etkisi

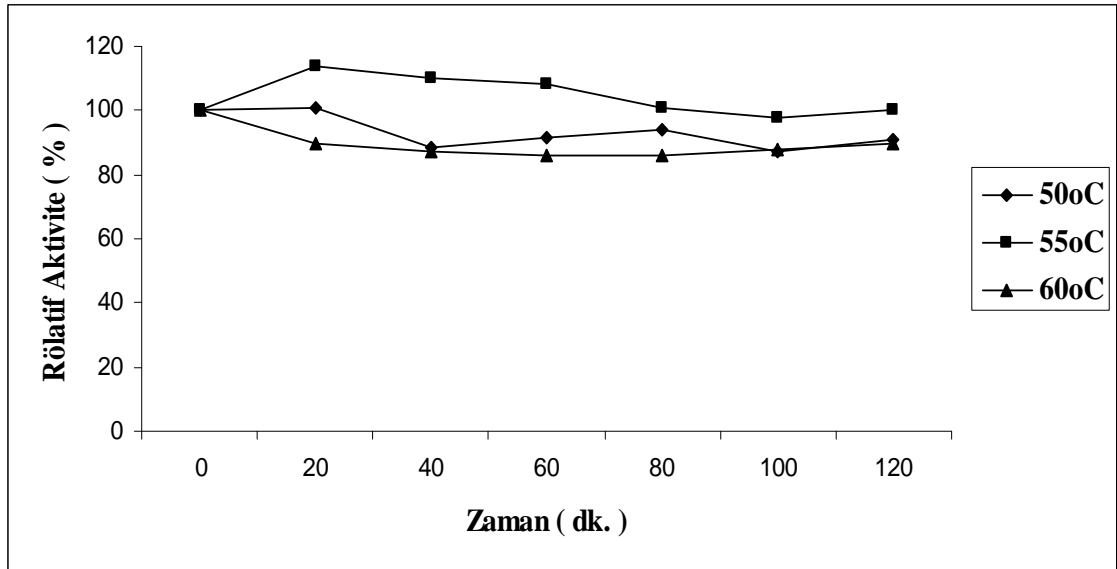
Metaller ve Şelatörler	Kalan Aktivite (%)								
	0.05 mM	0.1 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM	4 mM	8 mM	10 mM	20 mM
CuCl₂	68.5	53	35	0.5	ND	ND	ND	ND	-
ZnCl₂	-	47	7	6.5	ND	ND	ND	ND	ND
CaCl₂	-	-	-	96	94	92	85	81	38
MgCl₂	-	-	-	106	107	114	116	-	-

ND: Enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin görülmediğini gösterir.

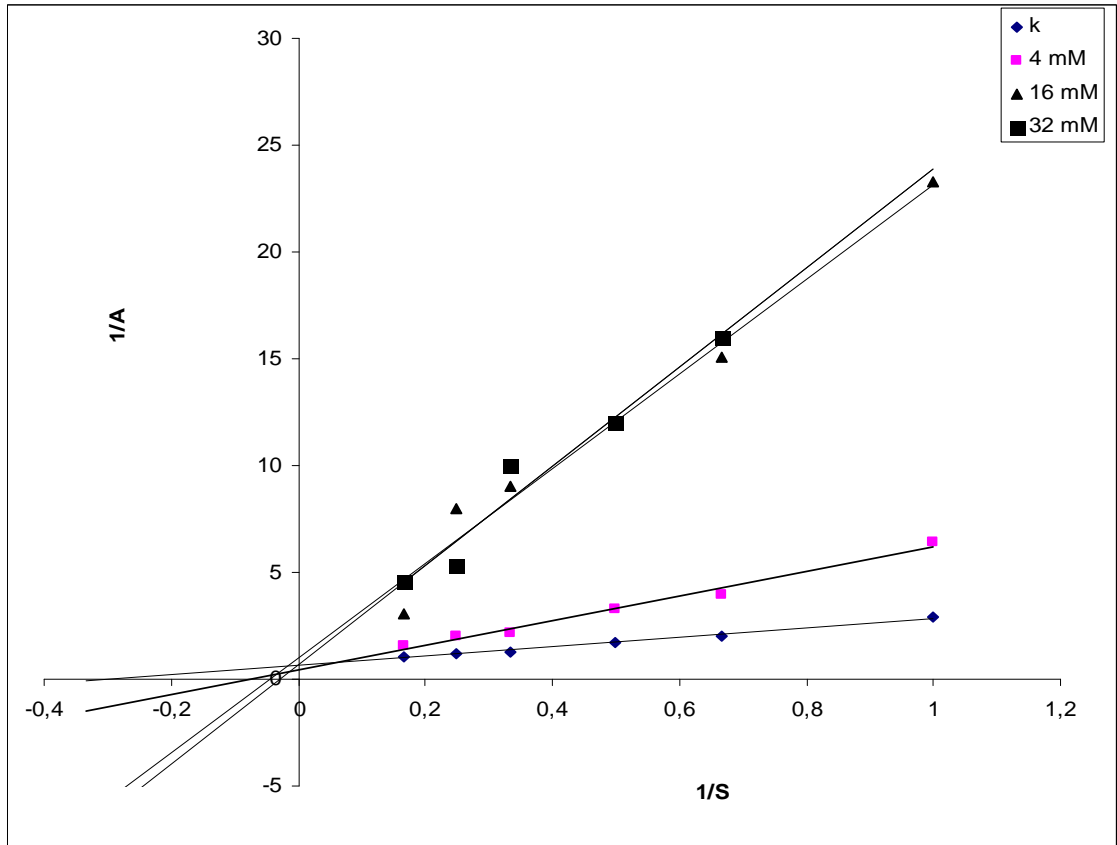
- : Denenmeyen konsantrasyonları gösterir.



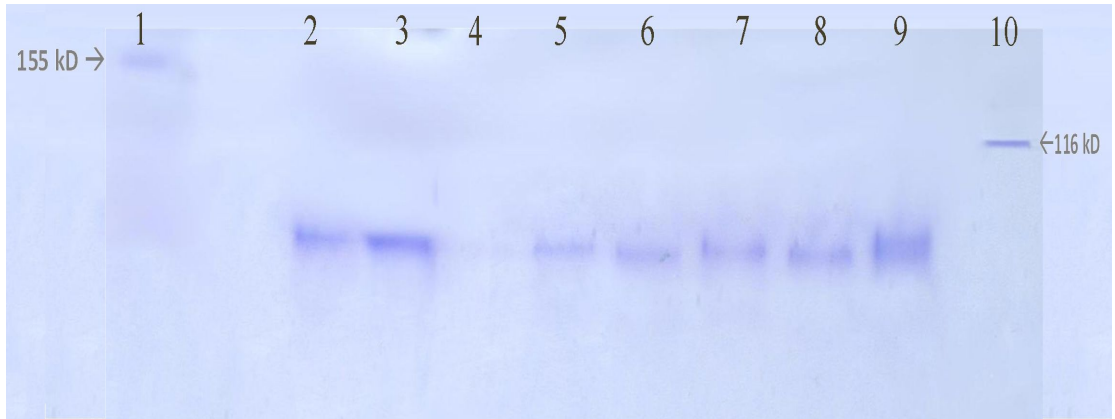
Şekil 4.9. β -Galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Gliserol ve Sorbitol'ün Koruyucu Etkisi



Şekil 4.10. Zamana Bağlı β -Galaktozidaz Termal Stabilite Tayini



Şekil 4.11. Lineweaver Burk Plot'a göre β -Galaktozidaz'ın Kinetik Parametreleri



Şekil4.12. Non –Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

BÖLÜM KAYNAKLARI

1. Kıran, Ö.E. ; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**, 9(1).
2. Madigan, M.T.; Mars, B.L. *Extremophiles, Sci.Am.*,**1997**, 276(4):82-7.
3. Gül-Güven, R. *Alicyclobacillus acidocaldarius subspecies Rittmannii'nün β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Dicle üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 50-51s, **2004**.
4. Javorsky, P. ; Lee, F. S. ; Verrinder G., Ann M.; Forsberg, C. W. *Extracellular β -Galactosidase Activity of a Fibrobacter succinogenes S85 Mutant Able To Catabolize Lactose, Applied and Environmental Microbiology*, **1990**, Dec., p. 3657-3663.
5. Chakraborti, S. ; Sani, R. K. ; Banerjee, U.C and Sobti, R.C. *Purification and Characterization of a Novel β -Galactosidase from Bacillus sp. MTCC 3088, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2000**, vol:24, pp: 58–63.
6. Somkuti, G. A. ; Steinberg, D. H. *Beta-D- Galactoside galactohydrolase of Streptococcus thermophilus: induction, purification, and properties, J. Appl. Biochem.*, **1979**, 1,357-368.
7. Fantes P. A. and Roberts, C. F. β -Galactosidase Activity and Lactose Utilization in *Aspergillus nidulans*, *Journal of General Microbiology*, **I 973**, 77,47 I -486.
8. Hsu, C. A. ; Yu, R. C. ; Chou, C. C. *Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions, International Journal of Food Microbiology*, **2005**, 104, 197 -206.

9. Hirata, H. ; Negoro, S. and Okada, H. *High Production of Thermostable β -Galactosidase of Bacillus stearothermophilus in Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.* ,**1985**, pp.1547 -1549.
10. Griffiths, M. W. ; Muir, D.D.. *Properties of a thermostable β -Galactosidase from a thermophilic Bacillus: Comparison of the enzyme activity of whole cells, purified enzyme and immobilised whole cells*, *Journal of the Science of food and Agriculture*, **1978**, Vol. 29, Issue 9, pp.753 – 761.
11. Itoh, K. ; Toba, T. ; Itoh, T. ; Adachi, S. *Properties of β -galactosidase of Lactobacillus kefiranofaciens K-1 isolated from kefir grains*, *Letters in Applied Microbiology*, **1993**, 15,232–234.
12. Batra, N. ; Shing, J. ; Banerjee, U.C. ; Patnaik, P.R. ; Sobti, R.C. *Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from Bacillus coagulans RCS3*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2002**,36, 1- 6.
13. Kim, W.J. ; Rajagopal, S.N, *Isolation and Characterization of β -galactosidases from Lactobacillus crispatus*, *Folia Microbiology*, **2000**, 45(1), 29–34.
14. Haider, T. ; Qayyum, H. *Calcium alginate entrapped preparations of Aspergillus oryzae β -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2007**, 41 72–80.
15. Sheridan, P. P. and Brenchley E. J. *Characterization of a Salt-Tolerant Family 42 β -Galactosidase from a Psychrophilic Antarctic Planococcus Isolate*, *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**, p. 2438–2444.

16. Nagy, Z. ; Kiss, T. ; Szentirmai, A, and Biro, S. *β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme, Protein Expression and Purification*, **2001**, 21, 24–29.
17. Konsoula, Z. ; Liakopoulou-Kyriakides, M. *Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates*, *Bioresource Technology*, **2007**, 98, 150–157.
18. Alazzeah, A.Y. ; Ibrahim, S.A.; D. Song, A. ; Shahbazi, A.A.Abu Ghazaleh *Carbohydrate and Protein Sources Influence the Induction of α -and β -Galactosidases in *Lactobacillus reuteri**, *Food Chemistry*, **2009**, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.065.
19. Fiedurek, J. ; Szczodrak, J. ; *Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis**. *Acta Microbiol. Pol.* ,**1994** ,43, 57– 65.
20. Shaikh, S.A. ; Khire, J.M.; Khan, M.I. *Production of β --galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor sp.** *J. Ind. Microbiol. Biotech.* ,**1997**, 19, 239– 245.
21. Ramana- Rao, M.V. ; Dutta, S.M. *Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey*. *Appl. Environ. Microbiol.* ,**1977**, 34, 185– 188.
22. Zhou, Q.Z.K.; Chen X.D. *Immobilization of β -Galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde*. *Journal of Food Engineering*, **2001**, 48: 69–74.
23. Mahoney, R.R. *Galactosyl-oligosaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: A Review*. *Food Chemistry*, **1998**, 63 (2): 147–154.

24. Goncalves, J. A. ; Castillo J, F. *Partial Purification and Characterization of from Kluyveromyces marxianus*, *Journal of Dairy Science*,**1982**,vol.65.No.11.

25. Chen, W. ; Chen, H. ; Xia, Y. ; Zhao J. ; Tian, F and Zhang, H. *Production, Purification, and Characterization of a Potential Thermostable Galactosidase for Milk Lactose Hydrolysis from Bacillus stearothermophilus*, *J. Dairy Sci*, **2008**, 91: 1751–1758.

26. Mahoney, R. R.. ; Whitaker, J. R. *Stability and Enzymatic Properties of β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis*,*Journal of Food Biochemistry*,**2007**, Volume 1 Issue 4, Pages 327 – 350.

27. Gote, M.M. ; Khan, M.I. ; Khire M. J. *Active site directed chemical modification of β -galactosidase from Bacillus stearothermophilus (NCIM 5146): Involvement of lysine, tryptophan and carboxylate residues in catalytic site*, *Enzyme and Microbial Technology* , **2007** ,40 1312–1320.

28. Khalid, A.A.R. and Byong, H.L. *Specificity, Inhibitory Studies, and Oligosaccharide Formation by P-Galactosidase from Psychrotrophic Bacillus subtilis KL88*, *J Dairy Sci*,**1991**, 74: 1773 -1778.

29. Choi, Y.J. ; Kim, I.H. ; Lee, B.H.; Lee, J.S. *Purification and characterization of Beta-Galactosidase from Alkalophilic and Thermophilic Bacillus sp. TA-1*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*,**1995**, Vol.22, No.2, pp. 191 - 201.

30. Chakraborti, S. ; Sani, R. K. ; Banerjee, U.C and Sobti, R.C. *Production and Partial Characterization of a novel β -Galactosidase from a newly isolated Bacillus polymyxa*, *Scientia Iranica*, **2003**, vol.10, No.3, pp.279–286.

31. Ustok- Isik, F.; Tari, C.; Harsa, Ş. *Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures*, *Food Chemistry*, **2010**, 119 1114–1120.
32. Levin, R. E. ; Mahoney, R. R. *Purification and characterization of β -galactosidase from a strain of *Bacillus coagulans**, *Antonie van Leeuwenhoek*, **1981**, 47(1), 53 -64.
33. Cowan, D. A. ; Daniel, R. M.; Martin, A. M. ; Morgan, H. W. *Some properties of a β -galactosidase from an extremely thermophilic bacterium*, *Biotechnology and Bioengineering.* ,**1984**, Vol. XXVI, Pp. 1141–1 145.
34. Ohtsu, N. ; Motoshima H. ; Goto, K. ; Tsukasaki, F. ; Matsuzawa H. *Thermostable β -galactosidase from an Extreme Thermophile, *Thermus sp. A4: Enzyme Purification and Characterization, and Gene Cloning and Sequencing**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62 (8), 1539- 1545.
35. Holmes L. M. ; 1, Scopes K. R. ; Moritz L. R .; Simpson J. R. ; Englert, C. ; Pfeifer, F. ; Dyall-Smith, L. M. *Purification and analysis of an extremely halophilic β –galactosidase from *Haloferax alicantei**, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1997**, 1337: 276–286.
36. Athe`s V. and Combes D. *Influence of additives on high pressure stability of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and invertase from *Saccharomyces cerevisiae**, *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, 22: 532–537.
37. Ladero,M. ; Santos,A.; Garcí'a, .J. F.;Garcí'a-Ochoa,F.*Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia**

coli in solution an immobilized kinetic modelling, Enzyme and Microbial Technology,
2001, 29: 181-193.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER:

Biyoteknolojik açıdan büyük potansiyellere sahip olan ekstreozimler içerisindeki en önemli enzimler termostabil enzimlerdir ve bu enzimler protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır. Diğer önemli bir neden ise bu enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik işlemlerdeki avantajlarıdır¹. Fakat endüstriyel uygulamalar bakımından bu enzimlerin yeterli miktarda elde edilmesi için mikroorganizmaların çok miktarda elde edilmesi gereklidir. Bunun için ise özel fermantasyon biyoreaktörleri kullanılmaktadır².

Bu çalışmada Batman Taşlıdere sıcak su kaynağından izole edilen termofilik *Bacillus licheniformis* KG9'un salgıladığı ekstrasellüler β -galaktozidaz enziminin karakterizasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Yapılan çalışma bu bakteri cinsinde ilk çalışılan ekstrasellüler β -galaktozidaz enzimi olması özelliğiyle önem arz etmektedir.

Çalışmamızda %1 laktozlu ve laktozsuz ortamlarda enzim aktivitesinin, laktozsuz ortamda 36.saatten başlayarak 96.saate kadar artarak devam ettiği, laktozlu ortamda ise 48.saatten başlayarak 96.saate kadar artarak devam ettiği tespit edilmiştir. Ancak laktozsuz ortamda 96.saate, bu artışın laktozlu ortamda olana nazaran düşük olduğu tespit edilmiştir.

Enzimin optimum sıcaklığı ve pH değeri sırasıyla 55 °C ve 8 olarak tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi için en uygun substrat konsantrasyonu 3 mM olarak tespit edilmiştir.

Farklı besiyerilerinin enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir ve en uygun besiyerinin NB(Nutrient broth) olduğu tespit edilmiştir.

%1 oranındaki farklı karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında karbon kaynaklarının aktiviteyi arttırmadığı görülmüştür. Laktoz araştırılan diğer karbon kaynaklarına göre daha yüksek bir aktivite göstermiştir. Bununla birlikte galaktoz, glukoz, çözünebilir nişastada kontrolden daha düşük bir aktivite elde edilmiştir. %1 oranındaki azot kaynaklarının kontrolle karşılaştırıldığında, kontrole göre glisin ve amonyumsülfatta enzim aktivitesinin zayıf bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yeast ekstrakt, pepton, beef ekstrakt ve triptonda ise kontrolden daha düşük bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Ünite Tanımı İçin o-Nitrophenol'e ait "Extinction Sabitesi" $4,383 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

Enzim amonyumsülfat çöktürmesi ve diyaliz aşamasından geçirilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ham ekstraktta enzimin spesifik aktivite değeri 1631 U/mg , verim %100, saflaştırma katsayısı 1 iken diyaliz sonrasında sırasıyla spesifik aktivite değerinin 19030.45 U/mg , verimin %15.7 ve saflaştırma katsayısının 11.66 olarak değiştiği tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi incelenmiştir. PCMB ve Iodoacetamide'in enzim aktivitesini inhibe ettiği, DTT ve β -mercaptoethanol'ün enzim aktivitesini arttırdığı, N-ethylenmaleimide ve PMSF'nin ise enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin ve şelatörlerin etkisi incelenmiştir. CaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 'ün enzim aktivitesini inhibe ettiği, MgCl_2 'ün enzim aktivitesini arttırdığı, metal şelatörleri olan EDTA ve 1,10-Phenanthroline

monohydrate'ın ise enzim aktivitesi üzerinde etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle enzimin bir metaloenzim olmadığı belirlenmiştir.

Enzim aktivitesi üzerine gliserol ve sorbitol'ün koruyucu etkisi incelenmiştir. Dondurulan enzimin aktivitesini gliserol'ün %2- 5 konsantrasyon aralıklarında %90 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Sorbitol'ün ise %5 konsantrasyonunda enzim aktivitesini tamamı ile koruduğu tespit edilmiştir.

Enzimin termostabilitesi'nin belirlenmesi için 50 -65 °C sıcaklıkları 20– 120 dk. arasındaki sürelerinde incelenmiştir. Enzimin aktivitesini 50 °C 120 dk. sonunda %90 oranında koruduğu, 55 °C'de 120 dk. sonunda aktivitesini tamamı ile koruduğu, 60 °C'de 120dk. sonunda %90 oranında koruduğu tespit edilmiştir. 65 °C'de ise 20 dk.'da enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir.

Enzimin kinetik parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır. Glukozun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi tespit edilmemiştir. Galaktozun ise enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. ONPG için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3.52 mM ve 1.602 $\mu\text{mol/dk.}$ olarak tespit edilmiştir.

Enzimin varlığını teyit etmek ve moleköl ağırlığını yaklaşık olarak tespit etmek amacı ile non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmıştır. Enzimin moleköl ağırlığının 116kDa' dan küçük olduğu tespit edilmiştir.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen *Bacillus licheniformis* KG9'un sentezlediği ekstrasellüler β -galaktozidaz enziminin tayin edilen optimum şartları (pH , sıcaklık, inhibisyon vs.) ve karakterizasyonu doğrultusunda endüstride kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu enzimin saflaştırılıp bazı özelliklerinin ileri düzeyde araştırılması gerekmektedir. Ayrıca enzimin,

probiyotik gıda üretiminde önemli bir yere sahip olan galaktooligosakkaritleri (GOS) oluşturma seviyesi belirlenmelidir.

BÖLÜM KAYNAKLARI

1. Becker, P. ; Abu-Reesh, I. ; Markossian, S. ; Antranikian, G.and Markl, H.
Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile Bacillus sp. IHI-91 on olive oil. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48.184-90.

2. Schiraldi, C.and De Rosa, M. *The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. TRENDS in Biotechnology, 2002, Vol.20 No.12 December.*

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Alevcan KAPLAN

Doğum Yeri: ANTAKYA

Doğum Tarihi: 31.10.1984

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Naim Atakaş Anadolu Lisesi (1998–2002)

Lisans : Dicle Üniversitesi (2003-2007)

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi (2007- 2010)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Yok

Yayımları (SCI ve diğer):