

**FARKLI YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZE
EDİLMİŞ β -GALAKTOSİDAZIN
GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

UMUT AYKUT

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi MF-144 no'lu
Proje ile Desteklenmiştir.

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ β -GALAKTOSİDAZİN
GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİ**

UMUT AYKUT

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**AKADEMİK DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Hasan TEMİZ**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI**

SAMSUN-2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 26/05/2011 tarihinde yapılan sınav ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. A. Kadir HURŞİT

Üye: Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Üye: Prof. Dr. A. Hilmi ÇON

Üye: Yrd. Doç. Dr. Hasan TEMİZ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sadettin TURHAN

ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2011

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

FARKLI YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ β -GALAKTOSİDAZIN GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Bu çalışmada, galaktooligosakkarit üretimi için *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Galaktosidaz serbest formda ve iki farklı yöntemle immobilize edilerek kullanılmıştır. Araştırmanın amacı galaktooligosakkarit üretimi için etkili immobilizasyon yöntemini belirlemektir.

Bu amaçla fiziksel adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri seçilmiştir. Fiziksel adsorbsiyon için Duolite XAD761 reçinesi kullanılmıştır. Çapraz bağlama yönteminde sığır serum albümini (BSA), glutaraldehit ve destek materyali olarak pamuklu bez kullanılmıştır. Immobilizasyon koşulları çeşitli parametreler denenerek optimize edilmiştir. Serbest β -Galaktosidaz için V_{max} değeri 97.08 $\mu\text{mol ONP/dk/mg}$ enzim, K_m değeri 3.15 mM olarak bulunmuştur. K_m değerinin immobilizasyonla arttığı, V_{max} değerinin ise düştüğü saptanmıştır. β -Galaktosidazın optimum pH değeri immobilizasyonla pH 6.6'dan pH 7.0'a yükselmiştir. Çapraz bağlama yöntemi β -Galaktosidazın ısıl stabilitesini artırmıştır.

Serbest ve immobilize β -Galaktosidazlarla üretilen galaktooligosakkarit (GOS) miktarları, laktoz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmiştir. GOS üretiminde serbest ve immobilize β -Galaktosidazların optimum laktoz konsantrasyonu %35, optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak belirlenmiştir. Optimum pH değerleri ise immobilize β -Galaktosidazlar için 6.5, serbest β -Galaktosidaz için 7.5 olarak bulunmuştur.

Serbest, Duolite XAD761'e adsorbe ve çapraz bağlı β -Galaktosidazlar ile elde edilen maksimum GOS miktarları sırasıyla %31.44, %28.76 ve %17.95 olmuştur. Serbest ve immobilize β -Galaktosidazlarla üretilen galaktooligosakkaritler içinde di ve trisakkaritlerin (GOS2 ve GOS3) oluştuğu ve disakkarit miktarının trisakkarit miktarından fazla olduğu belirlenmiştir.

İmmobilize enzimlerden Duolite XAD761'e adsorbe β -Galaktosidaz yüksek miktarda galaktooligosakkarit üretmiştir. Ancak, Duolite XAD761'e adsorbe β -Galaktosidazın ısıl stabilitesinin düşük olması nedeniyle galaktooligosakkarit proseslerinde 40 °C'de kullanımının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: β -galaktosidaz, galaktooligosakkarit, immobilizasyon, fiziksel adsorbsiyon, çapraz bağlama

THE EFFECT OF β -GALACTOSIDASE IMMOBILIZED BY DIFFERENT METHODS ON GALACTOOLIGOSACCHARIDE SYNTHESIS

ABSTRACT

In this research, β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* is utilized in free form and by making immobilized with two different methods for galactooligosaccharides production. The research's aim is determining efficient immobilization methods for galactooligosaccharides production.

For these purposes, physical adsorption and cross linking methods are chosen. Duolite XAD761 resin is used for physical adsorption. Bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde and cotton cloth as the support material are used for cross-linking method. The immobilization conditions are optimized by trying different parameters. It is found that K_m value is 3.15 mM and V_{max} value is 97.08 $\mu\text{mol ONP}/\text{min}/\text{mg}$ enzymes for free β -Galactosidase. It is observed that K_m value is increasing, V_{max} value is decreasing by immobilization. The optimum pH for β -Galactosidase is changed with immobilisation from pH 6.6 to pH 7.0. Cross-linking method increased the heat stability of β -Galactosidase.

GOS amounts produced with free and immobilized β -Galactosidases are affected from lactose concentration, pH and temperature changing. It is determined that optimum lactose concentration and optimum temperature value of free and immobilized β -Galactosidase in the GOS production is 35% and 50 °C orderly. It is found that optimum pH values are 6.5 for immobilized β -Galactosidases, 7.5 for free β -Galactosidase.

Maximum GOS amount produced by free, adsorbed to Duolite XAD761 and cross-linked β -Galactosidases are 31.44%, 28.76%, 17.95% respectively. Disaccharides and trisaccharides (GOS2 and GOS3) are formed by free and immobilized β -Galactosidase and disaccharide amount is much more than trisaccharide.

The one of the immobilized enzymes, β -Galactosidase adsorbed to Duolite XAD761 produce high amount galactooligosaccharides. However, it is concluded that adsorbed β -Galactosidase to Duolite XAD761 comply with processes of galactooligosaccharides in 40°C because of its low heat stability.

Key words: β -galactosidase, galactooligosaccharide, immobilization, physical adsorption, cross-linking

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve yazımı sırasında yardımlarından dolayı danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan TEMİZ'e ve ikinci danışmanım sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde laboratuvar imkanlarını sağlayan Prof. Dr. Ahmet Faik KOCA ve Prof. Dr. A. Kadir HURŞİT'e, projemin desteklenmesinde ek katkısı ve yardımlarından dolayı özellikle Prof. Dr. Yüksel ARDALI'ya, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyeleri ve asistanlarına, çalışmanın laboratuvar kısmında çok büyük emekleri olan Gıda Mühendisliği Bölümü öğrencilerine ve özellikle Ali AYYILDIZ'a, doktora çalışmam boyunca beni destekleyen ve fedakarlık eden sevgili eşim Gıda Yük. Müh. Esra CİNGÖZ AYKUT'a, doktora eğitimim sırasında dünyaya gelen ve yoğun çalışma temposu içinde oluşan stresten beni arındıran sevgili oğlum Enes AYKUT'a, çalışmalarım boyunca manevi açıdan beni yalnız bırakmayan annelerim ve babalarım ve bana bu konuda yardımcı olan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Umut AYKUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Prebiyotikler.....	4
2.1.1. Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	5
2.2. Oligosakkaritler.....	6
2.3. Galaktooligosakkaritler.....	7
2.3.1. Galaktooligosakkaritlerin Bazı Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	8
2.3.2. Galaktooligosakkaritlerin Pazar Durumu.....	9
2.3.3. Galaktooligosakkaritlerin Ticari Üretimi.....	11
2.3.4. Galaktooligosakkarit Üretimine Etki Eden Faktörler.....	12
2.4. β -Galaktosidaz.....	13
2.5. İmmobilize Enzimler.....	17
2.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	18
2.5.2. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri.....	18
2.5.2.1. Kovalent Bağlama.....	19
2.5.2.2. Fiziksel Adsorbsiyon.....	19
2.5.2.3. İyonik Bağlama.....	20
2.5.3. Çapraz Bağlama Yöntemleri	20
2.5.4. Tutuklama Yöntemleri.....	21
2.5.4.1. Jelde Tutuklama.....	21
2.5.4.2. Mikrokapsülleme.....	22
2.5.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemi Seçimi.....	22
2.6. β -Galaktosidazlara Uygulanan İmmobilizasyon Yöntemleri.....	22
2.7. Bu alanda yapılmış çalışmalar.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Materyaller.....	34
3.1.1. Enzim.....	34
3.1.2. İmmobilizasyon Materyalleri.....	34
3.1.2.1. Pamuklu Bez.....	34
3.1.2.2. Duolite XAD761.....	34

3.1.3. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	35
3.2. Yöntemler.....	35
3.2.1. Analitik Yöntemler.....	36
3.2.1.1. Protein Tayini.....	36
3.2.1.2. Enzim Aktivite Tayini.....	36
3.2.1.3. Karbonhidrat Analizi.....	36
3.2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	37
3.2.2.1. Enzimin Çapraz Bağlama Parametrelerinin Belirlenmesi.....	37
3.2.2.2. Enzimi Duolite XAD761'e Adsorbsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.3. Serbest Enzim Analizleri.....	39
3.2.3.1. Tampon Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	39
3.2.3.2. MgCl ₂ Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	40
3.2.3.3. pH'nın Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	40
3.2.3.4. Sıcaklığın Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	40
3.2.3.5. Serbest Enzimde Kinetik Katsayıların Belirlenmesi.....	40
3.2.3.6. pH Stabilitesi	41
3.2.3.7. Isıl Stabilite.....	41
3.2.4. İmmobilize Enzim Analizleri.....	41
3.2.4.1. İmmobilize Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine pH'nın Etkisi.....	41
3.2.4.2. İmmobilize Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	42
3.2.4.3. İmmobilize Enzimlerde Kinetik Katsayıların Belirlenmesi.....	42
3.2.4.4. İmmobilize Enzimlerin pH Stabilitesi.....	42
3.2.4.5. İmmobilize Enzimlerin Isıl Stabilitesi.....	42
3.2.5. GOS Üretimine Etki Eden Faktörler.....	43
3.2.5.1. Laktoz Konsantrasyonunun GOS Üretimine Etkisi.....	43
3.2.5.2. pH'nın GOS Üretimine Etkisi.....	44
3.2.5.3. Sıcaklığın GOS Üretimine Etkisi.....	44
3.2.5.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin GOS Üretim ve Verimlerinin Karşılaştırılması.....	44

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	46
4.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerine Ait Parametrelerin Belirlenmesi.....	46
4.1.1. Çapraz Bağlama Parametrelerinin Belirlenmesi.....	46
4.1.1.1. BSA Konsantrasyonunun Çapraz Bağlamaya Etkisi.....	46
4.1.1.2. Gluteraldehit Konsantrasyonunun Çapraz Bağlamaya Etkisi.....	47
4.1.1.3. Enzim Konsantrasyonunun Çapraz Bağlamaya Etkisi.....	49
4.1.1.4. Pamuklu Bez Yüzey Alanının Çapraz Bağlamaya Etkisi.....	50
4.1.1.5. pH'nın Çapraz Bağlamaya Etkisi.....	51
4.1.2. Duolite XAD761'e Adsorbsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi.....	52
4.1.2.1. pH'nın Adsorbsiyona Etkisi.....	52
4.1.2.2. Sıcaklığın Adsorbsiyona Etkisi.....	53
4.1.2.3. Enzim Konsantrasyonunun Adsorbsiyona Etkisi.....	54
4.1.2.4. İmmobilizasyon Süresinin Adsorbsiyona Etkisi.....	55
4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu.....	57
4.2.1. Tampon Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	57
4.2.2. MgCl ₂ Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	58
4.2.3. pH'nın Serbest ve İmmobilize Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	59
4.2.4. Sıcaklığın Serbest ve İmmobilize Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	61
4.2.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Kinetik Katsayıları.....	64
4.2.6. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin pH Stabilitesi.....	67
4.2.7. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Isıl Stabilitesi.....	68
4.3. GOS Sentezi Sonuçları.....	70
4.3.1. Laktoz Konsantrasyonunun GOS Üretimine Etkisi.....	73
4.3.2. pH'nın GOS Üretimine Etkisi.....	84
4.3.3. Sıcaklığın GOS Üretimine Etkisi	93
4.3.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin GOS Üretim ve Verimlerinin Karşılaştırılması.....	102
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	112
6. KAYNAKLAR.....	118

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler

dk	dakika
cm	santimetre
g	gram
mg	miligram
µg	mikrogram
L	litre
mL	mililitre
µL	mikrolitre
M	molar
mM	milimolar
µmol	mikromol
kDa	kilodalton
K_m	Michealis sabiti
V_{max}	Maksimum hız
a_w	Su aktivitesi

Kısaltmalar

OS	Oligosakkarit
GOS	Galaktooligosakkarit
TD	Transgalaktosile disakkarit
DP3	3 monomerden meydana gelen
DP4	4 monomerden meydana gelen
GOS2	2 monosakkaritten oluşan galaktooligosakkarit
GOS3	3 monosakkaritten oluşan galaktooligosakkarit
β-Gal	β-Galaktosidaz
ONPG	<i>o</i> -nitrofenol-β-D-Galaktopiranozid
ONP	<i>o</i> -nitrofenol
PNPG	<i>p</i> -nitrofenol-β-D-Galaktopiranozid
BSA	Sığır serum albümini
EU	Enzim ünitesi

GRAS	Genellikle güvenilir kabul edilen
NMWCO	Nominal moleköl ağırlığı geçiş sınırı
E.C.	Enzim komisyonu
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
DEAE	Dietilaminoetil
THP	Tris(hidroksimetil)fosfın
CLEA	apraz bağlı enzim agregatı
DEGDE	Dietilen glikol dietil eter

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Çeşitli oligosakkaritlerin prebiyotik etkileri.....	5
Çizelge 2.2. Çeşitli oligosakkaritler ve kaynakları.....	6
Çizelge 2.3. β -Gal'ların laktozdan oluşturduğu bazı oligosakkaritler.....	8
Çizelge 2.4. Bazı ticari GOS'lerin bileşimleri.....	10
Çizelge 2.5. Japonya'da üretilen oligosakkaritler.....	10
Çizelge 2.6. Bazı ticari β -D-Galaktosidazlar ve kaynakları.....	14
Çizelge 2.7. Farklı mikroorganizma kaynaklarından elde edilen β -Gal'ların aktif merkezleri ve diğer fiziksel özellikleri.....	15
Çizelge 2.8. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	19
Çizelge 2.9. β -Galaktosidazlara uygulanan çeşitli immobilizasyon metodları.....	23
Çizelge 2.10. Çeşitli β -Galaktosidazların reaksiyon şartları ve GOS üretim miktarları.....	33
Çizelge 3.1. Duolite XAD761'in bazı özellikleri.....	34
Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan kimyasallara ait bilgiler.....	35
Çizelge 3.3. Enzimin çapraz bağlama parametreleri.....	38
Çizelge 3.4. Enzimin Duolite XAD761'e adsorbsiyonundaki parametreler.....	39
Çizelge 3.5. <i>Kluyveromyces spp.</i> kaynaklı enzim aktivite yöntemlerine ait parametreler...	39
Çizelge 3.6. Kinetik katsayıların hesaplanmasında kullanılan farklı grafiksel yöntemlerin karşılaştırması.....	41
Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize enzimlere ait kinetik katsayılar.....	64
Çizelge 4.2. Karbonhidrat standartları ile literatürde verilen referans alıkonma süreleri....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Galaktooligosakkaritlerin genel kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.2. GOS üretiminin genel akış diyagramı.....	12
Şekil 2.3. Laktozun β -Galaktosidazla hidroliz mekanizması.....	16
Şekil 2.4. β -Galaktosidazın genel reaksiyon mekanizması.....	17
Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	18
Şekil 3.1. GOS üretiminde kullanılan kesikli tip karıştırmalı tank reaktörü.....	43
Şekil 4.1. BSA konsantrasyonunun enzimın çapraz bağlanmasına etkisi	47
Şekil 4.2. Glutaraldehit konsantrasyonunun enzimın çapraz bağlanmasına etkisi	48
Şekil 4.3. Enzim konsantrasyonunun enzimın çapraz bağlanmasına etkisi	49
Şekil 4.4. Bez yüzey alanının enzimın çapraz bağlanmasına etkisi	50
Şekil 4.5. pH'nın enzimın çapraz bağlanmasına etkisi	51
Şekil 4.6. Çapraz bağlı β -Galaktosidaz	52
Şekil 4.7. pH'nın enzimın XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi	53
Şekil 4.8. Sıcaklığın enzimın XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi	54
Şekil 4.9. Enzim konsantrasyonunun enzimın XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi.....	55
Şekil 4.10. İmmobilizasyon süresinin enzimın XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi.....	56
Şekil 4.11. Duolite XAD761'e adsorbe β -Galaktosidaz	56
Şekil 4.12. Tampon konsantrasyonunun serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi	57
Şekil 4.13. $MgCl_2$ konsantrasyonunun serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi	58
Şekil 4.14. pH'nın serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkisi	60
Şekil 4.15. Sıcaklığın serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkisi	62
Şekil 4.16. Serbest ve immobilize enzimlere ait Arrhenius grafiği.....	63
Şekil 4.17. Hanes-Woolf modeli ile açıklanan serbest ve immobilize enzimlerin kinetik davranışları	65
Şekil 4.18. Serbest ve immobilize enzimlerin pH stabilitesi.....	67
Şekil 4.19. Serbest ve immobilize enzimlerin ısıl stabilitesi	69
Şekil 4.20. Serbest β -Galaktosidaz enzimiyle laktozun hidrolizi sonucu oluşan karbonhidrat profiline ait örnek bir HPLC kromatogramı.....	71
Şekil 4.21. <i>K. lactis</i> kaynaklı β -Gal kullanılarak elde edilen ürüne ait kromatogram	72

Şekil 4.22. Serbest enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS oluşumuna etkisi.....	74
Şekil 4.23. Çapraz bağlı enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS oluşumuna etkisi.....	74
Şekil 4.24. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS oluşumuna etkisi.....	75
Şekil 4.25. Serbest enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.....	78
Şekil 4.26. Çapraz bağlı enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.....	79
Şekil 4.27. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.....	79
Şekil 4.28. Serbest enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	81
Şekil 4.29. Çapraz bağlı enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	82
Şekil 4.30. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	83
Şekil 4.31. Serbest enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi	84
Şekil 4.32. Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi.....	85
Şekil 4.33. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi.	86
Şekil 4.34. Serbest enzim ortamında pH'nın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.....	88
Şekil 4.35. Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi	88
Şekil 4.36. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.....	89
Şekil 4.37. Serbest enzim ortamında pH'nın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	91
Şekil 4.38. Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	91
Şekil 4.39. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	92
Şekil 4.40. Serbest enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi.....	93

Şekil 4.41. Çapraz bağlı enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi	94
Şekil 4.42. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi.....	95
Şekil 4.43. Serbest enzim ortamında sıcaklığın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi...	96
Şekil 4.44. Çapraz bağlı enzim ortamında sıcaklığın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.	97
Şekil 4.45. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi.....	98
Şekil 4.46. Serbest enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	99
Şekil 4.47. Çapraz bağlı enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	100
Şekil 4.48. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi.....	101
Şekil 4.49. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS üretimleri.....	103
Şekil 4.50. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS verimleri.....	106
Şekil 4.51. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS2 üretimleri.....	107
Şekil 4.52. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS3 üretimleri.....	108
Şekil 4.53. Serbest ve immobilize enzimlerin glikoz ve galaktoz üretimleri.....	110

1. GİRİŞ

Probiyotik olarak adlandırılan mikroorganizmaların son yıllarda insan sağlığına yansıyan olumlu etkileri nedeniyle hem bilimsel hem de ticari anlamda gelişim gösterdiği aşikârdır. Yine bu mikroorganizmaların gelişme faktörleri olarak adlandırılabilir prebiyotikler de bu sürece paralel biçimde gelişim göstermektedir. Prebiyotik pazarının fonksiyonel gıda pazarı içindeki yeri giderek büyümektedir. Özellikle Japonya’da bu alanda ticari olarak faaliyet gösteren firmalar bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde fonksiyonel gıdaların da dahil olduğu toplam gıda pazarının yıllık %5.5 artışla 2010 yılında yaklaşık 34 milyar doları bulması beklenmektedir (Valero, 2009). Prebiyotiklerin Türkiye’de kullanımı yeni olmasına karşın giderek artış göstermekte ve özellikle bebek mamaları, aromalı yoğurtlar, fermente süt ürünleri ve içecekler gibi gıda sanayisinin çeşitli dallarında kullanılmaya başlanmıştır. Prebiyotik özellik gösteren oligosakkarit (OS) gruplarından biri olan galaktooligosakkaritler de (GOS) çeşitli tipleri ile bu pazarda yerini almaktadır. GOS’lerin insan sağlığına yarar sağlaması ve gıdalara sağladığı olumlu etkilerinden dolayı gıda katkı maddesi olarak kullanılması ekonomik değeri yüksek bir ürün olmasını sağlamıştır.

GOS’ler doğada insan sütünde ve çok düşük miktarda inek sütünde bulunmaktadırlar. Ancak bu doğal kaynakların teknolojik ve ekonomik olarak gıda proseslerinde kullanılabilmesi mümkün olmadığından, GOS’lerin uygun teknolojik altyapı ile üretimleri zorunludur. GOS’lerin üretim yöntemlerine bakıldığında kimyasal ve enzimatik proseslerin uygulanabildiği fakat ekonomik ve güvenilir düzeyde üretim için enzimatik üretimin tercih edildiği görülmektedir. Enzimatik prosesler içinde ise β -Galaktosidaz (β -Gal) ticari üretimin belkemiğini oluşturmaktadır. β -Gal’ın hidrolitik aktivitesi yanında transgalaktosilasyon reaksiyonu ile GOS sentezleyebilmesi bu enzim üzerine yapılan araştırmaları canlı tutmakta ve halen yoğun bir şekilde çalışmalar sürmektedir. Bu durum β -Gal’ı gıda alanında aranan enzimlerden biri konumuna getirmekte ve yeni kaynaklardaki β -Gal’ların özelliklerinin belirlenmesi gereğini ortaya koymaktadır. Ayrıca GOS üretimi, β -Gal’ın substrat kaynağı olan peynir altı suyunun oluşturduğu çevre kirliliğini engelleyebilecek ve katma değer sağlayabilecek bir işlemdir. Uygun enzim ve uygun çalışma koşulları, istenilen son ürün eldesini sağlamaktadır. GOS üretimi için substrat olan laktoz ticari olarak yaygın ve makul

fiyatta olmasına rağmen, GOS üretiminde kullanılacak olan enzimin üretim maliyetinin yüksek olması ve substrata uygulanma şekilleri maliyeti arttıran sebeplerdendir. Bunlar göz önünde bulundurulduğunda daha düşük maliyetle GOS üretimini gerçekleştirebilmek için transgalaktosilasyon aktivitesi yüksek, üretim maliyeti daha düşük olan enzim üretimi üzerine ya da enzimden daha fazla yararlanma olanağı sağlayan immobilizasyon yöntemleri üzerine çalışmak fayda sağlayacaktır.

Yapılan araştırmalarda yaygın olarak kullanılan mikroorganizma kaynaklı β -Gal'larla elde edilen GOS verimleri %10 ila 55 arasında değişim göstermekte ve çoğunlukla immobilize β -Gal formları serbest β -Gal formuna göre daha düşük verimler oluşturmaktadır (Shin ve ark., 1998; Gaur ve ark., 2006). *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal enziminin GOS verimi ise %28-35 arasında değişmektedir (Maugard ve ark., 2003; Cheng ve ark., 2006a).

Kluyveromyces spp. kaynaklı β -Gal'ların GRAS (genellikle güvenilir kabul edilen) statüsünde olmasından dolayı (Mlichova ve Rosenberg, 2006) bu araştırmada GOS üretimi amacıyla bu enzim kaynağının kullanılması tercih edilmiştir. *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'larla bir çok immobilizasyon çalışması bulunmakta ve bunların çoğu laktozun hidrolizi üzerine yoğunlaşmış durumdadır (Kim ve ark., 1997; Giacomini ve ark., 1998; Santos ve ark., 1998; Zhou ve Chen, 2001a; Zhou ve Chen, 2001b; Jurado ve ark., 2002; Roy ve Gupta, 2003; Mateo ve ark., 2004; Neri ve ark., 2008). GOS üretimine yönelik *Kluyveromyces spp.* kaynaklı serbest β -Gal ile yapılmış çalışmalar mevcutken (Asp ve ark., 1980; Boon ve ark., 2000; Zhou ve ark., 2003; Cheng ve ark., 2006a; Martinez-Villaluenga ve ark., 2008; Cardelle-Cobas ve ark., 2009; Hellerova ve Curda, 2009; Valero, 2009) β -Gal'ın immobilize formları ile yapılan araştırmalar sınırlı sayıda (Maugard ve ark., 2003; Güleç, 2009). Bu yüzden GOS üretimi için enzimin immobilize edilerek çalışılması düşünülmüş ve bu amaçla iki immobilizasyon yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemler fiziksel adsorbsiyon ve çapraz bağlamadır.

Fiziksel adsorbsiyon uygulamasıyla enzimin kimyasal olarak bağlanması sözkonusu olmadığından enzim konformasyonunda çok az değişim meydana gelmektedir (Panesar ve ark., 2010). Böylece fiziksel adsorbsiyon uygulanan enzimde, serbest enzimin reaksiyon yeteneğine yakın özelliklerin görülmesi beklenebilir. Bu yüzden immobilizasyon yöntemlerinden birinin fiziksel adsorbsiyon olması tercih

edilmiş ve bu amaçla taşıyıcı olarak literatürde denenmediği tespit edilen Duolite XAD761 reçinesiyle çalışılması uygun görülmüştür.

Bir immobilizasyon uygulaması olan çapraz bağlamayla da enzimin ısıl stabilitesinin arttığı bildirilmektedir (Cao, 2005). Bu özellikten yararlanarak serbest enzime göre çapraz bağlı enzimde optimum sıcaklığın artırılması düşünülmekte ve böylece çözünürlüğü artan laktozla yüksek laktoz konsantrasyonlarında çalışma imkanı sağlanabileceği ve bunun da yüksek GOS üretimini gerçekleştirmeye yardımcı olacağı düşünülmektedir. Bu yüzden ikinci immobilizasyon yöntemi olarak çapraz bağlama uygulanmasına karar verilmiş ve bu amaçla çapraz bağlama ajanı olarak glutaraldehit, destek materyali olarak da pamuklu bez seçilerek β -Gal'in immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmada *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal enziminin laboratuvar şartlarında sıcaklık, pH ve laktoz konsantrasyonu gibi parametrelere göre en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi ve laktoz çözeltisi ile oluşturulan model sistemlerde serbest olarak ve ayrıca çapraz bağlama ve fiziksel adsorbsiyon gibi iki farklı yöntemle immobilize edilerek enzimlerin GOS üretimleri ve verimlerinin karşılaştırılması ve etkili immobilizasyon yönteminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla araştırma üç temel aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak β -Gal'in immobilizasyon yöntemleri için parametreler denemiş ve uygun şartlar seçilmiş, sonrasında serbest ve immobilize enzimlerin çalışma koşulları ve kinetikleri belirlenmiş ve son olarak da serbest ve immobilize enzimlerin kesikli tip karıştırmalı tank reaktörde laktozdan ürettikleri GOS miktarları ve verimleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prebiyotikler

Prebiyotik kavramı ilk olarak ortaya atıldığında “bağırsakta bulunan bir veya sınırlı sayıda bakterinin gelişimi ve/veya aktivitesini seçici olarak teşvik ederek konakçının sağlığı üzerine faydalı bir şekilde etki eden sindirilemeyen gıda bileşenleri” şeklinde tanımlanmıştır. Sindirilemeyen oligosakkaritlerin tamamının bu kapsam içine girmediği de ayrıca belirtilmiştir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Bu tanımlamayla birlikte on yıllık süreç içinde prebiyotik oligosakkarit çeşitleri bildirilmiştir. Bunlara örnek olarak; inülin tip fruktanlar, trans-galaktooligosakkaritler, laktuloz, izomaltooligosakkaritler, laktosukroz, ksilooligosakkaritler, soya fasülyesi oligosakkaritleri, glukooligosakkaritler, karbonhidratlar ve fruktooligosakkaritler örnek verilebilir. Kısmen sindirilemeyen süt kaynaklı bazı peptit ve proteinlerin prebiyotik özellik gösterdiği bildirilse de oligosakkaritlerin bu alanda rolü daha baskındır (Rastall ve Maitin, 2002; Manning ve Gibson, 2004; Wang, 2009).

Fakat prebiyotik tanımı “konakçının refahı ve sağlığı üzerine yararlar sağlayan gastrointestinal mikrofloranın kompozisyonu ve/veya aktivitesi üzerine spesifik değişikliklere izin veren seçici olarak fermente edilen bileşenler” olarak güncellenmiştir (Roberfroid, 2007). Bununla birlikte bir gıda bileşeninin prebiyotik olabilmesi için gerekli kriterler şunlardır;

- 1- Mide asidine, memeli enzimleri ile hidrolize ve gastrointestinal absorpsiyona karşı dirençli olmalı,
- 2- İntestinal mikroflora tarafından fermente edilebilmeli,
- 3- Konakçı sağlığına yararlı etkisi olmalı,
- 4- Probiyotiklerin uyarılmasında seçici olmalı,

Bunlara ek olarak Wang (2009)’ın belirttiği önemli bir diğer kriter de prebiyotiklerin gıda işleme yöntemlerine dayanıklı olması gerektiğidir.

Roberfroid (2007) bu kriterlere göre bazı oligosakkaritlerin prebiyotik etkilerini derlemiş ve yeterli bilgi olmadığından birçok oligosakkaritin prebiyotik etkili olmadığını bildirmiştir. Elde edilmiş verilere dayanarak Çizelge 2.1.’de görüldüğü üzere inülin-oligofruktoz, galaktooligosakkaritler ve laktulozun prebiyotik özelliğe sahip olduğunu bildirmiştir.

Çizelge 2.1. Çeşitli oligosakkaritlerin prebiyotik etkileri (Roberfroid, 2007)

Karbonhidrat	Sindirime Dayanıklılık	Fermentasyon	Seçicilik	Prebiyotik Durumu
İnülin ve oligofruktoz	Evet	Evet	Evet	Evet
Galaktooligosakkaritler	Muhtemelen	????	Evet	Evet
Laktuloz	Muhtemelen	????	Evet	Evet
İzomaltooligosakkaritler	Kısmen	Evet	Ümit verici	Hayır
Laktosukroz	BY	BY	Ümit verici	Hayır
Ksilooligosakkaritler	BY	BY	Ümit verici	Hayır
Soya fasülyesi oligosakkaritleri	BY	BY	BY	Hayır
Glukooligosakkaritler	BY	BY	BY	Hayır

BY: Bilgi Yok, ????: İlk çalışmalara ait sonuçlar, daha fazla sonuca gereksinim var

2.1.1. Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri

Prebiyotikler kolon kanserine karşı koruma sağlamaktadırlar. Bu iki yolla gerçekleşmektedir. Birinci yol prebiyotiklerden fermentasyonla koruyucu bir metabolit olan bütiratın üretilmesidir. Oluşan bütirat kolondaki kanserli hücrelerin ölümü (apoptosis) için uyarıcı bir etki oluşturmaktadır. İkinci yol ise kolondaki lipid ve protein metabolizmasının yerine karbonhidrat metabolizmasının baskın hale gelmesini sağlamasıdır. Bu metabolizma sonucu oluşan ürünlerin daha zararsız olması kolonda olumlu etki yaratmaktadır (Manning ve Gibson, 2004).

Prebiyotikler, laktobasiller ve bifidobakteriler gibi mikroorganizmaların gelişimini teşvik ederek patojenlere karşı direnç oluşturmakta ve metabolik son ürünlerden biri olan asit ile ortam pH'sını düşürerek patojenlerle etkili bir şekilde rekabet etmektedir.

Mineral maddelerin absorpsiyonundaki artış çeşitli yollarla olmaktadır. Bağırsaklardaki prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ile pH'nın düşmesi sonucu mineral maddelerin çözünürlükleri artmakta ve buna bağlı olarak emilimleri artış göstermektedir. Ayrıca bitki kaynaklı olan fitatlar iki değerli katyonlarla çözünmez bileşikler meydana getirmekte bu da iki değerli katyonların emilimini azaltmaktadır. Bakteri metabolizması ile fitatların fermente olması kalsiyumun serbest kalmasına yol açmakta ve emilebilirliğini artırmaktadır. Kolonda bulunan SCFA'den H⁺ ayrılmakta ve hücreler arası ortama girdiğinde kolondaki Ca ile yer değiştirmekte ve emilimi artmaktadır (Sako ve ark, 1999; Manning ve Gibson, 2004).

Ayrıca prebiyotiklerin serumdaki kolesterol seviyesini azalttığı (Martinez-Villaluenga, 2008) ve kan basıncını düzenlediği bildirilmektedir (Zheng ve ark, 2006).

2.2. Oligosakkaritler

Karbonhidratlar mono-, oligo- ve polisakkaritler olmak üzere 3 ana gruba ayrılabilirler. Monosakkaritler birbirine kovalent (glikozidik) bağlarla bağlanarak glikozidleri oluştururlar ve 2-10 adet monosakkaritten meydana gelen glikozidler oligosakkarit olarak adlandırılırlar (Saldamlı, 1998). OS'lerin çeşitli tipleri doğada bulunmaktadır, fakat buldukları organizmalardaki OS içerikleri genellikle düşüktür. OS'lerin yapıları ve sentetik üretim yolları ile endüstriyel ölçekte üretimleri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak OS gereksinimi ve karbonhidrat aktif enzimler üzerindeki teknik ve bilgi birikimi, endüstriyel ölçekte OS çeşitlerinin geniş yelpazede üretimini mümkün kılmıştır (Taniguchi, 2005). OS'ler ve türevleri, biyolojik sistemlerdeki önemli fonksiyonların değişiminde etkili biyomoleküllerdir. OS'ler prebiyotiklerin sağlık üzerine etkilerine ek olarak B kompleksi vitaminlerin sentezlenmesi gibi olaylara da yardımcı olmaktadır (Gaur ve ark., 2006). Çeşitli oligosakkaritler ve kaynakları Çizelge 2.2.'de görülmektedir.

Çizelge 2.2. Çeşitli oligosakkaritler ve kaynakları (Taniguchi, 2005)

Kaynak	Oligosakkaritler
Nişasta	Malto-oligosakkarit
	İsomalto-oligosakkarit
	Nigero-oligosakkarit
	Gentiooligosakkarit
	Trehaloz
	Siklodekstrin
Sakaroz	Trehaluloz
	Palatinoz
	Glikosilsukroz
	Frukto-oligosakkarit
	Laktosukroz
Diğer	Galakto-oligosakkarit
	Ksilooligosakkarit

Galaktooligosakkaritler kolonda özellikle *Bifidobacteria* gibi yararlı bakterilerin gelişimiyle oluşturulan ve prebiyotik özellik gösteren glikoz ve galaktoz ünitesinden meydana gelmiş önemli bir grubu oluşturmaktadır (Chen ve ark., 2003; Cruz-Guerrero ve ark., 2006; Matella ve ark., 2006; Nakkharat ve Haltrich, 2007).

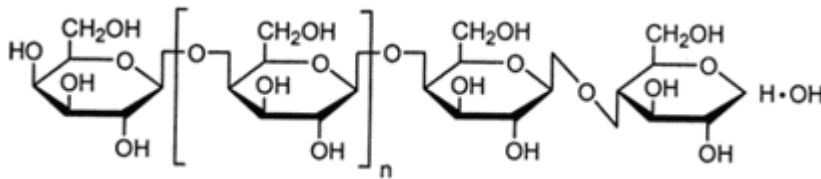
2.3. Galaktooligosakkaritler

Galaktooligosakkaritler, kimyasal ya da enzimatik hidroliz, kimyasal ve enzimatik sentez veya ökaryotik kültürlerle fermentasyon gibi metodlardan herhangi biriyle üretilmektedir (Shin ve ark., 1998; Hansson ve Adlercreutz, 2001; Tzortzis ve ark., 2005). OS üretiminde kimyasal işlemler çok basamaklıdır ve verim düşük olmaktadır. Bundan dolayı enzimatik sentez daha etkili bir yöntem olarak görülmektedir (Hansson ve Adlercreutz, 2001). Oligosakkaritlerin enzimatik sentezi için glikosiltransferazlar ya da glikosidazlar kullanılmaktadır. Pahalı olmaları, stabil olmamaları, pahalı başlangıç materyallerine ihtiyaç duymaları ve az bulunmaları, mükemmel seçiciliğe sahip glikosiltransferazların kullanılmasına engel olmaktadır (Reuter ve ark., 1999; Hansson ve Adlercreutz, 2001). β -Glikosidaz ve β -Glukosidazlar gibi diğer karbonhidrat aktif enzimler benzer reaksiyon verse de (Gosling ve ark., 2010) son zamanlarda GOS sentezleme yeteneğine sahip β -Galaktosidazların (β -Gal) transgalaktosilasyon aktivitesi ilgi çekmekte ve bu konu üzerine yoğun çalışmalar bulunmaktadır (Cruz ve ark., 1999a; Cruz ve ark., 1999b).

Genel olarak galaktooligosakkaritler (GOS) ;



olarak tanımlanmakta ve formülde n: β -1,4 bağıyla bağlı galaktoz ünitesi sayısını, X: β -1,6 > β -1,4, β -1,3'ü Y : β -1,2, β -1,6 > β -1,4' ü ifade etmektedir. Bu formül β -Gal'ların sentezlediği baskın β -1,4 bağlarından başka β -1,3 ve β -1,6 bağlarının da meydana geldiğini göstermektedir (Bielecki, 2004). Şekil 2.1.'de görüldü üzere GOS (β 1-4 bağlı galaktosil)_n – laktoz karışımıdır (Taniguchi, 2005).



Şekil 2.1. Galaktooligosakkaritlerin genel kimyasal yapısı (Taniguchi, 2005)

GOS üretimi esnasında reaksiyonlar sonucunda trisakkaritten hekzasakkarite kadar ürünler oluşurken, iki galaktoz ya da glikoz ve galaktoz arasında, farklı β -glikozid bağlarıyla bağlanmış transgalaktosile disakkaritler (TD) de oluşmaktadır ve bu disakkaritler uzun zincirli GOS'lere benzer fizyolojik özellikler taşımaktadırlar (Sako ve ark., 1999). β -Gal kullanılarak laktozdan elde edilen bazı GOS yapıları Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. β -Gal'ların laktozdan oluşturduğu bazı oligosakkaritler (Mahoney, 1998)

Disakkaritler	Yaygın adı
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Glc	Allolaktoz
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal	Galaktobioz
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Glc	
β -D-Gal (1 \rightarrow 2)-D-Glc	
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal	
Trisakkaritler	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Glc	6' digalaktosil-glikoz
β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	6' galaktosil-laktoz
β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal	6' galaktotrioz
β -D-Gal (1 \rightarrow 3) β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	3' galaktosil-laktoz
β -D-Gal (1 \rightarrow 4) β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	4' galaktosil-laktoz
Tetrasakkaritler	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	6' digalaktosil-laktoz
β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 3) β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	
β -D-Gal (1 \rightarrow 3) β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	
Pentasakkaritler	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 6) β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc	6' trigalaktosil-laktoz

Gal: Galaktoz; Glc: Glikoz

2.3.1. Galaktooligosakkaritlerin Bazı Özellikleri ve Kullanım Alanları

GOS'ler, insan sütü ve geleneksel yoğurt bileşiminde bulunması ve insan bağırsaklarındaki yararlı bakteriler tarafından sentezlenmesi nedeniyle GRAS statüsünde kabul edilmektedir. GOS'ler stabildirler ve nötr pH'da 160 °C'de 10 dakika, pH 3'te 120 °C'de 10 dakika ve pH 2'de 100 °C'de 10 dakika bekletildiğinde değişmeden kalabilmektedirler. Normalde bu uygulamalar sakkarozun yarısından fazlasının parçalanmasına neden olmaktadır. Japon pazarına ait bir GOS olan Oligomate 55 yüksek fruktozlu mısır şurubuna göre biraz daha viskoz bir yapıya sahiptir. Aynı

konsantrasyondaki sakkaroz çözeltisi ile benzer ozmotik basınca sahiptir. Sakaroz ile aynı su aktivitesine sahip iken, yüksek fruktozlu mısır şurubuna göre daha düşük su aktivitesi ve donma noktasına ve daha yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Fruktooligosakkaritlere göre daha stabil olduğundan GOS'lerin kullanımı önerilmektedir (Sako ve ark., 1999; Valero, 2009).

Son 20 yıldır GOS üretimi, gıdalarda katkı ve prebiyotik olarak kullanımındaki gelişim nedeniyle ilgi çekmektedir (Reuter ve ark., 1999; Cruz-Guerrero ve ark., 2006). Yüksek sıcaklığa ve asidik koşullara karşı stabil olması nedeniyle ekmek hamuruna katılan GOS'ler hamur fermentasyonu ve pişirme sürecinde ekmekte parçalanmadan kalabilmekte ve mükemmel bir lezzet ve tekstür sağlamaktadırlar. Bunun yanında Japonya ve Avrupa'da probiyotik içeren fermente süt ürünleri de GOS içermektedir. GOS'lerin kalori değeri 2 kcal/g olarak verilse de Japon standardında 1.73 kcal/g olarak bildirilmektedir (Sako ve ark., 1999). Tatlılık derecesi sakarozun % 35'idir (Taniguchi, 2005). Genellikle toz ya da şurup halinde ve farklı saflık derecelerinde üretilen GOS karışımlarının önemli bir kısmı içeceklerde kullanılmakta iken bebek mamaları, sütlü tatlılar ve şekerlemelerde düşük kalorili tatlandırıcı olarak da büyük bir kullanım alanı vardır (Shin ve ark., 1998; Sako ve ark., 1999; Rivero-Urgell ve Santamaria-Orleans, 2001). Ayrıca dondurulmuş gıdalara, cipslere, çerezlere katkı olarak ilave edilmekte hayvan yemlerine katkı olarak kullanılmakta, eczacılıkta yeni ilaç geliştirmede ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (Valero, 2009).

2.3.2. Galaktooligosakkaritlerin Pazar Durumu

2000 yılı itibariyle 20'den fazla ticari firmada 12 OS tipi üretildiği bilinmektedir (Rivero-Urgell ve Santamaria-Orleans, 2001). Üreticiler başta Japonya ve Hollanda'da bulunmakla beraber 2009 yılı itibariyle ABD'de GOS üreten ticari bir firma bulunmamaktaydı. Fakat sağlık üzerine olumlu etkileri fark edildiğinden beri ABD'deki marketlerde GOS'lere ulaşılabilir. Bazı ticari GOS'lerin bileşimleri Çizelge 2.4.'de verilmiştir. Dünyada 1995 yılında toplam OS üretim miktarı yaklaşık 85000 ton, GOS üretim miktarı 15000 ton iken (Sako ve ark., 1999) Japonya'da 2001 yılı itibariyle toplam OS üretimi 60000 tondur ve bundan elde edilen gelir 15 trilyon Japon Yeni'dir (Taniguchi, 2005). GOS'lerin ABD marketlerindeki ortalama kg fiyatı 17 \$'ın üstündedir (Valero, 2009).

Çizelge 2.4. Bazı ticari GOS'lerin bileşimleri (Playne ve Crittenden, 2004)

Ticari ad	Üretici firma - Ülke	Bileşim
CUP OLIGO	Nissin Sugar, Japonya	Kurumaddesinin minimum %70'i GOS (şurup ve toz olarak mevcut) Tip: 4'-galaktosil laktoz
TOS 85 POWDER	Borculo-Domo, Hollanda	%85 GOS, %0.3 Galaktoz, %3.3 Glikoz, %10.7 Laktoz
TOS Elix'or SYRUP	Borculo-Domo, Hollanda	%73.9 kurumadde, kurumaddenin %58.5'i GOS, %0.12'si Galaktoz, %19.7'si Glikoz ve %20.65'i Laktoz
OLIGOMATE 55 SYRUP	Yakult Honsha, Japonya	%75 Kurumadde, Kurumaddenin %55'inden fazlası GOS, %45'i monosakkaritler ve laktoz
OLIGOMATE 55 POWDER	Yakult Honsha, Japonya	%55'ten fazla GOS, %45 monosakkarit ve laktoz
TOS pure POWDER	Yakult Honsha, Japonya	%99 GOS (%5'ten az nem)

Çizelge 2.5.'de Japonya'da ticari olarak üretilen gıda ve gıda bileşeni amaçlı 13 OS görülmekte ve bunlardan 10 tanesi enzimatik sentezle üretilmektedir. Enzimler mikrobiyal orijinli (EC3) hidrolaz ya da (EC2) transferazlardır (Taniguchi, 2005).

Çizelge 2.5. Japonya'da üretilen oligosakkaritler (Taniguchi, 2005)

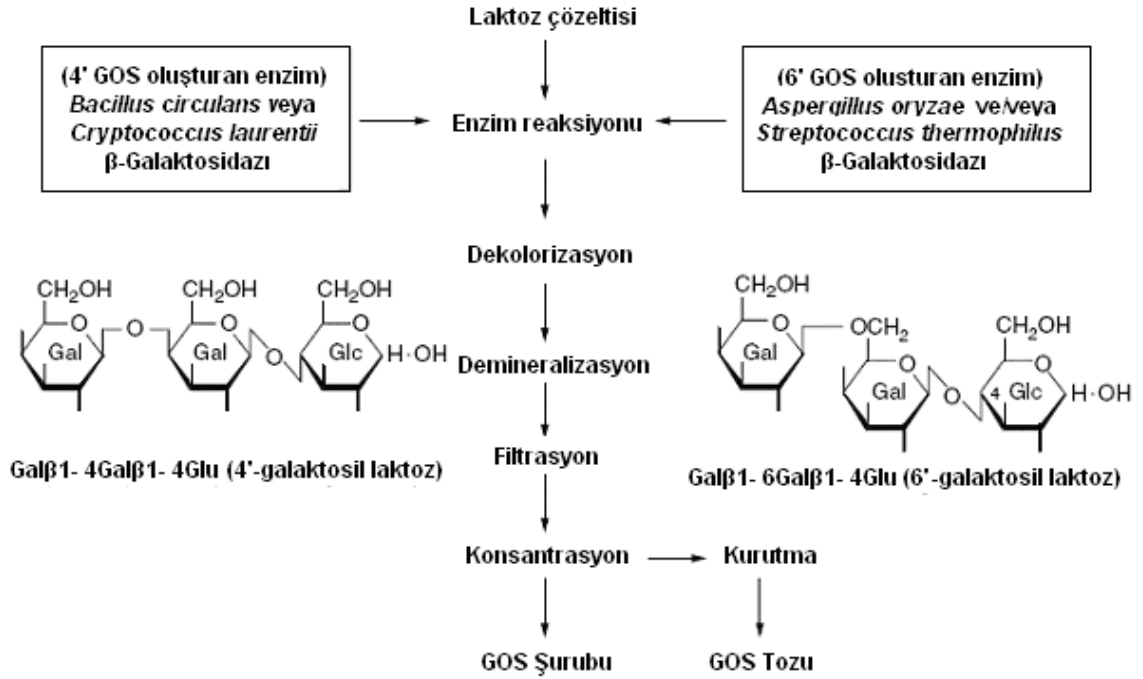
Oligosakkaritler	Üretim (ton/yıl)	Fiyat (J.Yeni/kg)	Üretici
Trehaloz	25.000	300	Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.
İzomaltooligosakkaritler	11.000	140	Showa Sangyo Co. Ltd.
Galaktooligosakkaritler	6.000	500	Yakult Pharmaceutical Ind Co. Ltd., Nissin Sugar MFG. Co. Ltd.
Fruktooligosakkaritler	4.000	390	MeijZi Seika Kaisha Ltd.
Laktuloz	2.800	1.000	Morinaga Milk Industry Co Ltd.
Laktosukroz	2.000	500	Bioresearch Corporation of Yokohama
Siklodekstrinler	1.800	1.450	Bioresearch Corporation of Yokohama
Soya oligosakkaritleri	1.000	700	Calpis Co. Ltd.
Gentiooligosakkaritler	1.000	300	Nihon Shokuhin Kako Co. Ltd.
Ksilooligosakkaritler	650	2.500	Suntory Limited
Nigerooligosakkaritler	300	300	Nihon Shokuhin Kako Co. Ltd.
Rafinoz	230	2.000	Nippon Beet Sugar Mfg. Co. Ltd.
Palatinoz	150	1.000	Shin Mitsui Sugar Co. Ltd.

2.3.3. Galaktooligosakkaritlerin Ticari Üretimi

β -Gal ile laktozdan GOS sentezi için yüksek laktoz konsantrasyonu, yüksek sıcaklık, düşük su aktivitesine ihtiyaç vardır. Yüksek sıcaklık laktozun çözünürlüğünü artırarak konsantrasyonu artırmakla birlikte enzimin denatürasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle ya yüksek sıcaklıkta çalışabilen hipertermofillerden elde edilmiş enzimler kullanılmalı ya da immobilizasyonla sıcaklığa karşı enzimin stabilitesi artırılmalıdır (Reuter ve ark., 1999; Hansson ve Adlercreutz, 2001; Gaur ve ark., 2006; Panesar ve ark., 2006). Su aktivitesinin düşürülmesi için organik çözücüler kullanılabilir, fakat organik çözücüler de enzimler üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler. Ayrıca organik çözücünün laktozu çözme gücü verimi etkilemektedir (Cruz-Guerrero ve ark., 2006). GOS yapısı ve ürün verimi enzim kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Farklı biyolojik kaynaklardan ve hatta farklı bakteri cinslerinden elde edilen β -Gal'lar GOS sentezinde farklı kabiliyetlere sahiptirler ve belirli bağları ve yapıları oluşturma yetenekleri çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle üretim aşamasında enzimlerin seçimi önemlidir. Bazı kaynaklardan elde edilen enzimler β 1-4 bağları oluştururken, diğer kaynaklardan elde edilen enzimler β 1-6 bağları oluşturmaktadırlar. OS karışımının kompozisyonu kullanılan enzimlerin farklılığına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin bazı kaynaklardan elde edilen enzimler daha fazla tetra, penta ve hekzasakkarit üretmektedir (Playne ve Crittenden, 2004). Ticari ürünlerde 4'-galaktosil laktoz ($\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{Gal}\beta$ 1-4Glu) ve 6'-galaktosil laktoz ($\text{Gal}\beta$ 1-6 $\text{Gal}\beta$ 1-4Glu) baskın olarak bulunmaktadır. Bunun yanında 3'-galaktosil laktoz da yaygın olarak oluşmaktadır (Taniguchi, 2005).

GOS'lerin ticari üretiminde; *Cryptococcus laurentii* ve *Bacillus circulans* kaynaklı enzim ile β 1-4 bağlı GOS (4'-galaktosil laktoz), *Aspergillus oryzae* ve *Streptococcus thermophilus* kaynaklı enzimle de β 1-6 bağlı GOS (6'-galaktosil laktoz) üretimi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.2.). Yakult firmasının TOS 100 ürünü gibi bazı ürünlerde, elde edilen ham ürün çok yüksek konsantrasyona ulaştırılıp ardından daha ileriki proseslerde kromatografik ayırımla uzun zincirli oligosakkaritlerden mono ve disakkaritler uzaklaştırılarak ürün elde edilmektedir (Playne ve Crittenden, 2004).



Şekil 2.2. GOS üretiminin genel akış diyagramı (Taniguchi, 2005)

Proses sonunda ortamdaki laktozun %55'den fazlası GOS'lere dönüşmektedir. GOS şurubu içindeki şeker kompozisyonu %15 tetrasakkarit, %23.5 trisakkarit, %20 transfer edilmiş disakkarit ve %1.3 galaktozdan oluşmaktadır (Bielecki, 2004; Taniguchi, 2005). Bazı farklı proseslerde de genel olarak trisakkarit üretiminin baskın olduğu ve karışımdaki toplam oligosakkaritin %80'den fazlasını oluşturduğu belirtilmektedir.

2.3.4. Galaktooligosakkarit Üretimine Etki Eden Faktörler

GOS sentezine etki eden koşullar temelde enzimatik reaksiyonlara ya da enzim aktivitesine direkt etkisi olan pH, sıcaklık, a_w , inhibitör varlığı, aktivatör varlığı gibi çevresel şartlara bağlı olmaktadır.

GOS sentezine etki eden faktörler içerisinde en önemlisi reaksiyon ortamındaki başlangıç laktoz konsantrasyonudur. Konsantrasyon artışı GOS verimini artırmaktadır (Albayrak ve Yang, 2002a; Nakkharat ve Haltrich, 2007). Burada reaksiyona girecek olan su miktarının azaltılması GOS verimi üzerinde pozitif etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle su miktarının etkilerini incelemek amacıyla organik çözücü içeren ortamlarda reaksiyonların gerçekleşmesi denenmiştir. Ancak organik çözücülerin enzimler üzerinde yarattığı olumsuz etkiler sonunda meydana gelebilecek olan aktivite kayıpları göz

önünde bulundurulmalıdır. Yapılan bir araştırmada 2-pentanon, bütülasetat, toluen, heptan ve nonan gibi çözücülerini kullanarak gerçekleştirilen GOS reaksiyonlarında, toluen ve nonan kullanılan reaksiyonlardaki GOS veriminin çözücü içermeyen reaksiyonlardaki GOS verimine yakın olduğu ama bu verimin üstüne çıkılamadığı, diğer çözücülerinin ise verimi olumsuz yönde etkilediği görülmüştür (Hansson ve Adlercreutz, 2001).

Enzim kaynağı açısından bakıldığında farklı enzimlerin sahip oldukları farklı K_m , optimum pH ve sıcaklık gibi etkenler nedeniyle üretilen GOS miktarı ve yapısı değişiklik göstermektedir. Nötral pH'larda aktivite gösteren bakteri ve maya kaynaklı enzimlerin verimleri, düşük pH'larda aktivite veren küf kaynaklı enzimlerine göre daha yüksektir. *Kluyveromyces fragilis*, *Bacillus circulans*, *Streptococcus thermophilus* ve *Saccharopolyspora rectivergula* kaynaklı enzimlerde verimin %40 civarlarında olduğu bildirilmiştir (Mahoney, 1998).

Sıcaklık, reaksiyon hızına etki eden önemli bir faktördür (Splechtna ve ark., 2006). GOS oluşumunda sıcaklığın artırılması laktoz çözünlüğünü artırarak olumlu bir etki ortaya koymuş olsa da enzim denatürasyonu, enzim ile karbonhidrat arasında istenmeyen ürünlerin oluşması ve Maillard gibi esmerleşme reaksiyonlarının da artışına neden olması dikkate alınmalıdır (Bruins ve ark., 2003a; Bruins ve ark., 2003b).

GOS üretiminde verime etki eden diğer bir faktör de reaksiyon sonucunda açığa çıkan glikoz ve galaktozun konsantrasyonuyla bağlantılı olarak β -Gal'ı inhibe etmesidir. Galaktoz β -Gal'ın kompetitif inhibitörüdür (Boon ve ark., 2000). Buna bağlı olarak GOS üretim verimi düşmektedir (Albayrak ve Yang, 2002a). Bunun çözümlü için ortamdaki monosakkaritlerin uzaklaştırılması denenmiş ve GOS verimi artırılmıştır (Güleç, 2009).

2.4. β -Galaktosidaz

Çeşitli biyolojik ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğine sahip protein yapısındaki maddeler enzim olarak adlandırılmaktadır. Molekülleri parçalama, birleştirme, belirli grupları bir molekülden diğer moleküle taşımak gibi katalitik güce sahip olan enzimlerin canlılar dışında da faaliyet göstermeleri nedeniyle önemi artmış ve endüstriyel alanda kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Telefoncu, 1997; Saldamlı, 1998).

Gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı karbonhidrazlar, proteolitik enzimler ve lipazlar gibi hidrolitik enzimlerdir (Saldamlı, 1998). β -Gal

E.C.'na göre 3.2.1.23 nolu, β -D-Galaktozid-Galaktohidrolaz isimli enzim olarak tanımlanmaktadır ve hidrolazlar sınıfının glikosidazlar (Karbonhidrat aktif enzimler) alt sınıfı içinde, glikozid hidrolazlar alt bölümünde bulunan bir enzimdir (Panesar ve ark., 2006).

β -Gal'lar hayvansal (Fraser ve ark., 1983), bitkisel (Halder ve Bhaduri, 1997; Tu ve ark., 1999; Li ve ark., 2001; Biswas ve ark., 2003) ve mikrobiyal (Holmes ve ark., 1997; Wanarska ve ark., 2005; Nakkharat ve Haltrich, 2006) kaynaklardan elde edilebilmektedir. Kolay elde edilebilme, yüksek verim ve genetik modifikasyon gibi birçok avantajlarından dolayı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler daha çok tercih edilmektedir. Ticari anlamda β -Gal üretiminde mikroorganizmalardan elde edilen bazı ticari enzimler ve kaynakları Çizelge 2.6.'da verilmiştir. *Kluyveromyces spp.* ve *Aspergillus sp.* enzim üretiminde en yaygın olarak kullanılan güvenilir mikroorganizmalardır. Toksikite riski nedeniyle *E. coli*'den elde edilen β -Gal'ların gıdalarda kullanımı pek tercih edilmemektedir (Panesar ve ark., 2006).

Çizelge 2.6. Bazı ticari β -D-Galaktosidazlar ve kaynakları (Panesar ve ark., 2006)

Enzim kaynağı	Marka adı	Üretici
Bakteriler		
<i>Bacillus spp.</i>	Novozym 231	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danimarka
<i>Escherichia coli</i>	β -Galaktosidaz	Sigma-Aldrich, İngiltere
Mayalar		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact	DSM Food Specialties, Delft, Hollanda
	Lactase	SNAM Progetti, İtalya
	β -Galaktosidaz	Sigma-Aldrich, İngiltere
<i>Saccharomyces fragilis</i>	β -Galaktosidaz	Sigma-Aldrich, İngiltere
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactozyme	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danimarka
<i>Kluyveromyces spp.</i>	Lactase NL	Enzyme Development Co., NewYork, ABD
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral lactase	Pfizer, Milwaukee, ABD
Küfler		
<i>Aspergillus niger</i>	Sumylact	Sumitomo Chemical, Japonya
	Lactase	Valio Laboratory, Finlandiya
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal lactase	Enzyme Development Co., NewYork, ABD
	Biolactase	Biocon (US) Inc., Lexington ABD
	Lactase 2214C	Rohm, Darmstadt, Almanya
	β -Galaktosidaz	Sigma-Aldrich, İngiltere

Fungal β -Gal'ların optimum çalışma sıcaklığı 50 °C'nin üzerinde ve asidik pH'da (2.5–5.4) bulunmaktadır (Casteren ve ark., 2000; Nagy ve ark., 2001). Bu nedenden dolayı asidik peyniraltı suyu ve bunun ultrafiltrasyon permeatlarının işlenmesinde uygundur. *Aspergillus niger* kaynaklı β -Gal kuvvetli hidrolitik aktiviteye sahiptir (Playne ve Crittenden, 2004). Mayalardan elde edilen β -Gal'ların optimum çalışma pH'sı nötr bölgeye yakındır (Dickson ve ark., 1979). Gıdalarda kullanılmaları güvenlidir ve laktoz hidrolizine daha uygun özellik taşımaktadırlar. Birçok bakteriden β -Gal elde edilmesine karşın (Craven ve ark., 1965; Vetere ve Paoletti, 1998; Maciunski ve ark., 1998; Karasova-Lipopova ve ark., 2003) çok az tür güvenilir kaynak olarak nitelenmektedir.

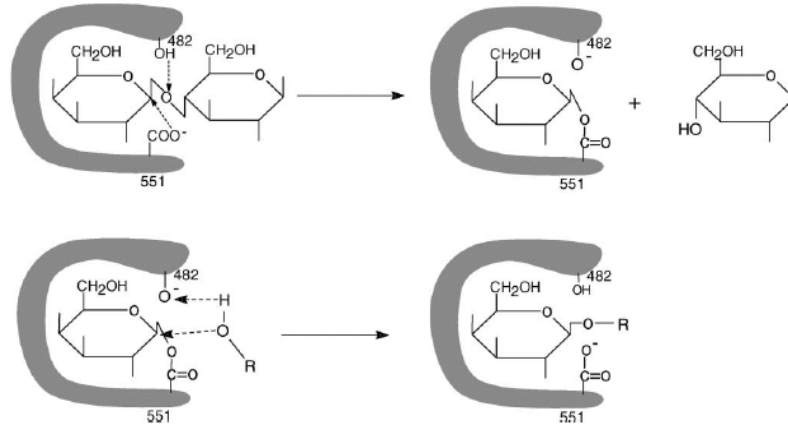
Bunlardan ikisi *Streptococcus thermophilus* ve *Bacillus stearothermophilus*'dur. Bakterilerden 65 °C'de optimum çalışma sıcaklığına sahip (*Bacillus coagulans*) termotolerant ve 5 °C'nin altındaki sıcaklıklarda çalışabilen soğuk-aktif (*Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus*'un soğuğa dayanıklı P429S ve L317F mutantları) enzimler elde edilebilmektedir (Panesar ve ark., 2006). Farklı mikroorganizma kaynaklarından elde edilen β -Gal'ların aktif merkezleri ve diğer fiziksel özellikleri Çizelge 2.7.'de görülmektedir.

Çizelge 2.7. Farklı mikroorganizma kaynaklarından elde edilen β -Gal'ların aktif merkezleri ve diğer fiziksel özellikleri (Zhou ve Chen, 2001b)

Enzim kaynağı	<i>K. lactis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (subunit)	<i>A. niger</i>
Molekül ağırlığı (Da)	117618	116351	118016	119160
Uzunluk (AA)*	1025	1023	1031	1006
Proton donörü	Glu ⁴⁸²	Glu ⁴⁶¹	Glu ⁴⁴⁹	Glu ²⁰⁰
Nükleofil/baz	Glu ⁵⁵¹	Glu ⁵³⁷	Glu ⁵¹²	Glu ²⁹⁸

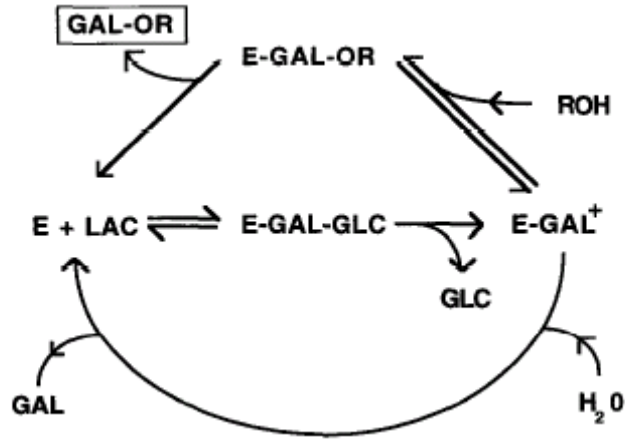
* AA: amino asit

Laktozun yapısındaki glikozidik bağın enzimatik hidrolizi genel bir asit katalizidir ve enzimde bulunan proton donörü ve nükleofil/baz gibi iki kritik kısmı sayesinde gerçekleşmektedir. β -Gal, eş zamanlı enzimatik reaksiyon veren proton donörü ve nükleofil/baz olan glutamik asit (Glu⁴⁸² ve Glu⁵⁵¹) parçalarına sahiptir. Hidroliz mekanizması Şekil 2.3.'de görülmektedir.



Şekil 2.3. Laktozun β-Galaktosidazla hidroliz mekanizması (Zhou ve Chen, 2001b)

Genel olarak β-Gal'ın reaksiyon mekanizmasında birinci adımda enzim-galaktosil kompleksi oluşurken glikoz serbest hale geçmektedir. İkinci adımda enzim-galaktosil kompleksi bir hidroksil grup içeren akseptöre transfer edilir. Eğer reaksiyon seyreltik laktoz çözeltisi içinde gerçekleşiyorsa su, laktoz ve galaktoz gibi karbonhidratlara göre akseptör olmak için daha aktif davrandığından reaksiyon sonunda galaktoz oluşmakta ve aktif merkezden ayrılmaktadır. Diğer taraftan reaksiyon yüksek laktoz konsantrasyonunda gerçekleşirse laktoz molekülü suya göre akseptör olmak için daha fazla şansa sahip olmaktadır (Şekil 2.4.) (Mahoney, 1998). β-Gal'ın laktozu hidrolize etmesinin yanında belli koşullar altında enzimin galaktozu başka bir karbonhidrata ya da uygun bir galaktosil donörüne transfer etmesi sonucunda GOS sentezi gerçekleşmekte ve bu reaksiyon transgalaktosilasyon olarak adlandırılmaktadır (Albayrak ve Yang, 2002a; Taniguchi, 2005; Cruz-Guerrero ve ark., 2006; Nakkharat ve Haltrich, 2007). Çoğu laktoz kaynaklarındaki yüksek su varlığından dolayı hidroliz daha üstündür ve GOS üretimi ve verimi düşüktür. Verimi artırmak için daha yüksek şeker konsantrasyonuna ve/veya su içeriğinin azaltılmasına gerek duyulmaktadır (Mahoney, 1998).



E : Enzim
 GAL⁺ : Karbonyum geçiş durumu
 LAC : Laktoz
 ROH : Şeker akseptörü
 GAL : Galaktoz
 GAL-OR : Galaktosil-Şeker (OS)
 GLC : Glikoz

Şekil 2.4. β -Galaktosidazın genel reaksiyon mekanizması (Mahoney, 1998)

2.5. İmmobilize Enzimler

Enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla suda çözünmeyen bir kopolimerizasyonda bir monomer olarak enzimin yapıya katılmasıyla ya da suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerle tutuklanma işlemine immobilizasyon denir. İmmobilizasyonun serbest enzim kullanımına göre sağladığı avantajlar şöyle sıralanabilir;

Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaşanmaz,

Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır,

Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.

Sürekli işlemlere uygulanabilir,

Doğal enzime göre daha kararlıdır,

Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir,

Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur,

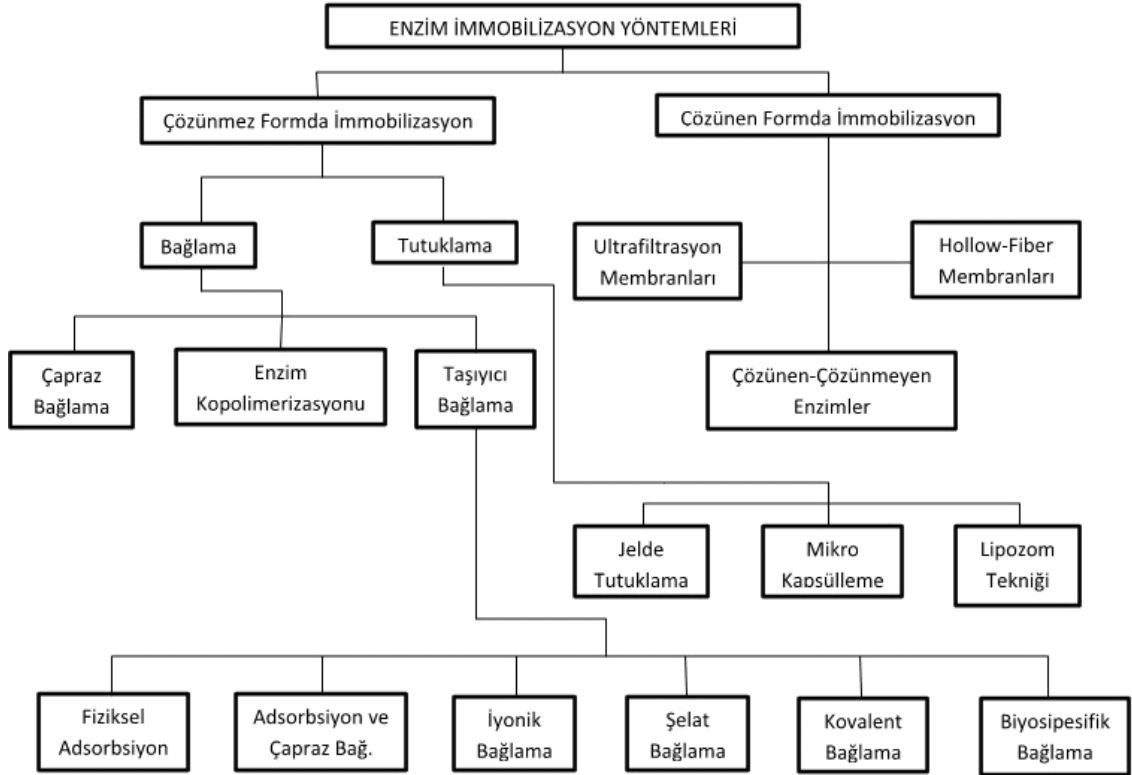
Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir,

Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

Enzimlerin endüstride kullanımları, serbest enzim formu, çözünen immobilize form ve çözünmeyen immobilize form şeklinde gerçekleşmektedir (Telefoncu, 1997).

2.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Ortaya çıkışından günümüze kadar geçen süreçte immobilizasyonun çok çeşitli uygulamaları olmuştur. Yaygın olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.5.'de görülmektedir. Bazı araştırmacılar ise immobilizasyon yöntemlerini kimyasal ve fiziksel yöntemler şeklinde iki ana başlık altında incelemektedirler.



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997)

2.5.2. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon uygulamalarından yaygın bir kullanıma sahip olan taşıyıcıya bağlamada, enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Protein özelliğinde olan enzimlerin molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanma olayında rol almaktadırlar. İmmobilizasyon işlemi taşıyıcı olarak birçok organik ve inorganik materyal kullanılmakta ve bunların belirli özelliklere sahip olması istenmektedir. Bu özellikler; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli (poröz) yapı, mekanik stabilite ve uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşıması, mikroorganizmalara karşı

dirençlilik, ucuzluk, zehirsizlik ve rejenere olabirliktir. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar Çizelge 2.8.'de verilmiştir (Telefoncu, 1997).

Çizelge 2.8. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar (Telefoncu, 1997)

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil, cam	Sellüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamit
Bentotit	Dekstran	Naylon
Hidroksilapatit	Agar ve agaroz	Vinin ve allil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyum dioksit	Kollagen	Metakrilat
Nikeloksit	Kitin ve kitozan	İyon değıştirici reçineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleyik anhidrit polimerleri
Aktif karbon	Albümin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler		

2.5.2.1. Kovalent Bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemler ile ve genelde sulu ortamda gerçekleştirilir. Taşıyıcıya kovalent bağlanmada bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmamasına dikkat edilmesi gerekir (Panesar ve ark., 2006). Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. Taşıyıcı üzerinde bağlanma için gerekli kimyasal gruplar mevcut değilse yardımcı bir reaktif ile aktivite edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon şartlarının çok yumuşak (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleşmesine özen gösterilmelidir. Taşıyıcının reaksiyon koşullarından ve enzimden etkilenmemesi gerekir. Bu yöntemde bağlanma kuvvetli olmakta fakat aktif bölgenin bağlanması, enzimin konformasyonunun bozulması nedeniyle aktivite gösterememesi ve kullanılan kimyasalların enzimi inaktif hale getirebilmesi gibi dezavatajlar bulunmaktadır.

2.5.2.2. Fiziksel Adsorbsiyon

Adsorbsiyon, enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yöntemde taşıyıcı ile enzim arasında meydana gelen hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve bunların kombinasyonları gibi fiziksel

etkileşimler meydana gelmektedir (Grosava, 2008). İşlem, yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin fazlasının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır.

Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO₃, kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfat enzim immobilizasyonunda adsorban olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Bir enzimin taşıyıcıya adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu yüzden adsorpsiyon yönteminde bu faktörlerin etkileri değerlendirilerek optimize edilmesi gerekmektedir.

Enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlaması gibi avantajlara sahip olan adsorpsiyon yöntemi, immobilizasyon işleminde optimal koşulların saptanmasında zorluk, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmaması durumunda desorpsiyonun meydana gelmesi ve ürünlerin kirlenmesi gibi dezavantajlar taşımaktadır (Telefoncu, 1997).

2.5.2.3. İyonik Bağlama

Bu yöntemde, yüklü gruplara sahip taşıyıcı ile enzimin yapıtaşı olarak yer alan lisinin amino grubu ya da aspartik asit ve glutamik asidin karboksil grubu gibi yüklü amino asitler arasındaki etkileşimle bağlanma gerçekleşmektedir. Bu amaçla sentetik olarak üretilmiş anyonik ya da katyonik reçineler ve DEAE selüloz gibi çapraz bağlı polisakkarit türevleri kullanılmaktadır (Cao, 2005).

İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur (Telefoncu, 1997).

2.5.3. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Çapraz bağlama amacıyla küçük moleküllü aldehitler ve aminler gibi bi- veya multi-fonksiyonel reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda

çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. Bu yöntemde enzim molekülleri arasındaki bağlanmalar yanında enzim molekülü içinde de bağlanmalar meydana gelmektedir.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir;

- a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsulfonlar, p-benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinler'dir.

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdırlar.

2.5.4. Tutuklama Yöntemleri

Enzim molekülünün belirli bir mekanda durmaya zorlanmasına tutuklama denir. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Kovalent bağlama ve çapraz bağlamaya göre bu yöntemin farkı enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

2.5.4.1. Jelde Tutuklama

Yöntemde polimerizasyon ve çapraz bağlamayla meydana gelen kafes sistemi içinde enzim tutuklanmaktadır. Bu yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile

çapraz bağlanmış poliakrilamid'dir. Oluşan kafes sisteminde çapraz bağ oranının iyi ayarlanması substratla enzimin buluşması için önemlidir. Ayrıca sıkı bir kafes yapısı enzimin aktivite kaybına ya da tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Tutuklama yöntemi ile immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekülü olması gerekir.

Yöntemin avantajları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır. Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük molekülü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir (Telefoncu, 1997).

2.5.4.2. Mikrokapsülleme

Enzimin etrafında membran benzeri fiziksel bir bariyer oluşumu enkapsülasyon olarak tanımlanmaktadır. Mikroenkapsülasyonda yarı geçirgen membranla çevrilmiş 1-100 µm boyutlu kürecikler meydana gelmektedir (Cao, 2005). Bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır (Telefoncu, 1997).

2.5.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemi Seçimi

Bir enzimin immobilizasyonu için çok değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir. İmmobilizasyon yönteminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır: güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık (Telefoncu, 1997).

2.6. β-Galaktosidazlara Uygulanan İmmobilizasyon Yöntemleri

Farklı kaynaklardan elde edilmiş β-Gal'ların immobilizasyonunda kullanılan yöntemler Çizelge 2.9.'da görülmektedir (Grosava, 2008).

Çizelge 2.9. β -Galaktosidazlara uygulanan çeşitli immobilizasyon metodları (Grosava, 2008)

Enzim kaynağı	İmmobilizasyon metodu	Aktivite Kazanımı (%)
<i>K. fragilis</i>	Mısır irmiğine kovalent bağlama	8
	Selüloz beadlere kovalent bağlama	82
	Glutaraldehitile modifiye edilmiş gözenekli silanize cama kovalent bağlama	90
	Aljinat-karragenan jelinde tutuklama	-
	Fenol-formaldehit reçineye adsorpsiyon	23
	Kemik tozuna adsorpsiyon	83
	<i>K. lactis</i>	Glutaraldehit-agaroz kovalent bağlama
Tiyosülfinat-agaroz kovalent bağlama		60
Grafit yüzeye kovalent bağlama		0.01
<i>K. marxianus</i>	Oksit desteklere kovalent bağlama	< 5
<i>E. coli</i>	Glutaraldehit-agaroz kovalent bağlama	39
	Tiyosülfinat-agaroz kovalent bağlama	75-85
	Lipozomlar içinde tutuklama	28
	Kromiyum(III)asetatla çapraz bağlı jelatine kovalent bağlama	25
	Glutaraldehitile çapraz bağlı jelatine kovalent bağlama	22
	Kromosorb-W'ye adsorpsiyon	-
<i>B. circulans</i>	Polivinilklorit ve silikadan üretilmiş çıkıntılı membrana adsorpsiyon	-
<i>A. oryzae</i>	Aljinat ve jelatinle hazırlanmış fiberlere glutaraldehitile çapraz bağlama	56
	Aljinat beadlere karboimid bağlama	76
	Glutaraldehitile çapraz bağlı kobalt aljinat beadlerde tutuklama	83
	Aljinat beadlerde mikroenkapsülasyon	64
	Jelatinle enkapsülasyon ve transglutaminaz ile çapraz bağlama	8-46
	Fenol-formaldehit reçineye adsorpsiyon	54
	Polivinilklorite adsorpsiyon	-
	Silika jel membrana adsorpsiyon	-
	Celit'e adsorpsiyon	2
	Kitosan'a kovalent bağlama	18.4
	Glutaraldehitile çapraz bağlı kümeleştirme	13.5
	Poliüretan köpüğe kovalent bağlama	-
	Tosil edilmiş pamuklu beze kovalent bağlama	55
<i>A. niger</i>	Gözenekli seramik parçaya adsorpsiyon	80

2.7. Bu Alanda Yapılmış Çalışmalar

Ateş ve Mehmetoğlu (1997), rastladıkları literatürlerde β -Gal için belirtilen en yüksek aktiviteye sahip %83 relatif aktiviteli kobalt aljinat beadlere enzimin tutuklanmasını sağlayan yeni bir β -Gal immobilizasyon metodu geliştirmişlerdir. Enzim aktivitesi ve yeniden uygulanabilirliği üzerine sıcaklık ve pH'nın etkilerini çalışmışlardır. Bu metod yüksek aktivite ve iyi fizikokimyasal karakteristikler sağlamış ve immobilize partiküller plug-flow reaktörde kullanılmıştır. Operasyon süresi üzerine sıcaklığın etkisini de araştırmışlardır. Bu metodun, kobalt tuzuyla inaktive olmayan diğer farklı enzimlerin immobilizasyonu için genel bir sistem olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Sürekli bir sistemde β -Gal'ın poli(2-hidroksimetakrilat) (pHEMA)membrana immobilizasyonu ve performansı üzerine Arıca ve ark. (1999), bir çalışma yapmışlar ve pHEMA membrana immobilize edilen β -Gal'ın aktivitesinin pHEMA'a yüklenen enzim miktarının artmasıyla arttığını görmüşlerdir. Serbest ve immobilize enzimlerin K_m değerlerini sırasıyla 0.26 ve 0.81 mM olarak bulmuşlardır. Yine serbest ve immobilize β -Gal için optimum reaksiyon sıcaklığının 50 °C, optimum pH'nın da 7.5 olduğunu tespit etmişlerdir. Sürekli sistemde laktozun hidrolizi süresince β -Gal karakterize edilmiş ve immobilize enzimin işlem inaktivasyon hız sabitini (k_{iop}) 3.1×10^{-5} / dakika olarak bulmuşlardır.

Zhou ve Chen (2001a), araştırmalarında çapraz bağlama ajanı olarak glutaraldehit kullanarak *Kluyveromyces lactis*'ten elde edilen β -Gal'ı grafit yüzeye immobilize etmişlerdir. Grafit dış yüzeye yüklenen enzim miktarı 1.8 ve 1.1 U/cm² iken spesifik aktivite verimini sırasıyla %17 ve %25 olarak belirlemişlerdir. Enzim yüklemesinin artmasıyla aktivitede azalma olduğunu görmüşlerdir. Serbest enzim için Michealis-Menten kinetik parametrelerini K_m , 1.74 mM ve V_m , 77.34 μ mol o-nitrofenol dak⁻¹.mg⁻¹ enzim olarak tespit etmişlerdir. İmmobilize enzimin K_m değerinin serbest enziminin 5 katı olduğunu gözlemlemişlerdir. İmmobilize enzimle %5 (w/w) konsantrasyonundaki laktozun hidrolizini de araştırmışlar ve 37 °C'de 3 saatin üzerindeki sürede laktoz hidroliz derecesini yaklaşık %70 olarak belirlemişlerdir. İmmobilize enzimin iyi depolama ve operasyonel stabiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Zhou ve Chen (2001b), *Kluyveromyces lactis*'ten elde edilen β -Gal'ı çapraz bağla grafit yüzeye immobilize ederek çalışmışlar ve 35 °C'den 55 °C'ye kadar olan

sıcaklıklarda immobilize enzimin termal deaktivasyonunu araştırmışlardır. İmmobilize enzimin deaktivasyon enerjisi için Arrhenius kanunun sonucu olarak aktivasyon enerjisini yaklaşık 200 kJ/mol olarak bulmuşlardır. Sıcaklık aktivite eğrisinin serbest ve immobilize enzim için benzer özellik taşıdığını belirlemişlerdir. Ayrıca yağsız süt kullanarak immobilize enzimin laktoz hidrolizini sürekli enzimatik reaktörde araştırmışlar ve 15 dakikalık süreçte laktozun %90'ının hidroliz edildiğini belirlemişlerdir.

Pessela ve ark. (2003), sepabead destekler üzerine termofilik β -Gal immobilizasyonunun ürün inhibisyonunu azaltması üzerine bir çalışma yapmışlardır. *Thermus sp.* T2 (Htag-BgaA)'dan elde edilen β -Gal, galaktoz (3.1 mM) ile yarışmalı inhibisyona uğramıştır. Bu inhibisyonların heterofonksiyonel epoksi sepabeadlere immobilizasyonu ile oldukça düştüğü bildirilmiştir. Enzimin K_m (laktoz) değeri sadece o değerlerin 2 katına çıkarken, immobilizasyon hazırlıklarının (boronat epoksi sepabead 12.5 mM ve çelat-epoksi-sepabead 11.7 mM) galaktozun yarışmalı inhibisyon sabitini (K_i) arttırdığını görmüşlerdir. Yarışmasız sabitte de önemli bir artış (yaklaşık 2 kat) olduğunu bulmuşlardır. İnhibisyon sabitindeki bu artışların enzimin endüstriyel performansları üzerine önemli etkileri olacağından bahsedilmiştir. Böylece %5 laktozun hidrolizasyonunda çözünür enzim kullanımı reaksiyonun %90 hidroliz düzeyinde durmasına neden olurken her iki immobilize preparatta ise hidrolizin %99'dan fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca β -Gal'ın immobilize formlarının, 70 °C'de bile peynir altı suyundaki laktozun hidrolizinde kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Cheng ve ark. (2006b), laktozdan GOS üretmek için kitosan üzerine bağlayıcı ajan olarak tris(hidroksimetil)fosfin (THP) kullanarak β -Gal'ı immobilize etmişlerdir. İmmobilize ve serbest enzimlerin maksimum aktivitesini pH 5.0'de verdiğini bulmuşlar ve optimum çalışma sıcaklığını 55 °C olarak belirlemişlerdir. Sodyum asetat tamponunda (0.1 mol/dm³) 55 °C'de 13 gün boyunca inkübasyon sonucunda THP kullanılarak immobilize edilen enzim ile serbest enzimin aktivitelerini sırasıyla %75 ve %25 olarak saptamışlardır. Serbest ve THP kullanılarak immobilize edilen enzimle (β -Gal) GOS sentezlenmiştir. GOS veriminin 55 °C ve %36 (w/v) laktoz konsantrasyonu şartlarında serbest enzimde %43 (w/w), THP ile immobilize edilmiş enzimde ise %41 (w/w) olduğunu belirlemişlerdir.

Nakkharat ve Haltrich (2007), *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58'den elde edilen β -Gal'ı Eupergit C'ye immobilize ederek kesikli ve kapalı yatak reaktöründe

sürekli sistemde GOS üretmek için çalışmışlardır. Kesikli sistem denemelerinde başlangıç 50, 100 ve 200 g/L laktoz konsantrasyonu için maksimum GOS verimini sırasıyla 12, 39 ve 80 g/L olarak belirlemişlerdir. İmmobilize enzimin laktoz hidrolizi ve transformasyonunda birkaç döngü için yeniden kullanılabilirliğe sahip olduğunu saptamışlardır. Kapalı yatak reaktöründe laktozun sürekli sistemde çevrimi ile elde edilen trisakkarit miktarının immobilize kesikli sistemden daha fazla olduğunu görmüşlerdir.

Albayrak ve Yang (2002a), pamuk bez üzerine immobilize ettikleri *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile laktozdan GOS üretimi üzerine çalışmışlardır. GOS üretiminde tip ve miktarın başlangıç laktoz konsantrasyonundan etkilendiğini saptamışlar ve genel olarak daha fazla ve büyük GOS sentezlemek için başlangıçta daha yüksek laktoz konsantrasyonuna ihtiyaç duyulduğunu görmüşlerdir. Başlangıçtaki laktozun %27'sini GOS'lere çevirebilmişlerdir. Toplam elde edilen GOS'lerin %70 gibi büyük miktarı trisakkarit şeklinde oluşmuştur. Sıcaklık ve pH reaksiyon hızına etki etmiş fakat GOS oluşumunda bir değişimin meydana gelmediği izlenmiştir. Maksimum GOS konsantrasyonları karşılaştırıldığında glikoz ve galaktoz varlığında reaksiyonun inhibe olduğu ve GOS üretiminin %15'e kadar düştüğü belirlenmiştir. Enzim immobilizasyonu için destek materyali olarak pamuk bez kullanılmasının enzimin taşınmasını sınırlandırmadığından GOS oluşturma karakteristiklerini etkilemediğini bildirmişlerdir. Enzimin termal stabilitesi, immobilizasyonla serbest enzimin termal stabilitesine göre 25 kat artmıştır. İmmobilize enzimin yarı ömrünü 40 °C'de 1 yıldan daha uzun, 50 °C'de ise 48 gün olarak belirlemişlerdir. İki hafta boyunca bir problem yaşamaksızın stabil sürekli operasyon sağlayabilmişlerdir. Maksimum GOS üretiminin pH 4.5'de ve 40 °C'de 200 ve 400 g/L laktoz içeren besleme çözeltisinde sırasıyla toplam şekerlerin %21 ve %26'sı kadar olduğunu gözlemlemişlerdir.

Gaur ve ark. (2006), üç farklı teknikle (selit üzerine adsorbsiyon, Kitosan'a kovalent bağlama, çapraz bağlama) immobilize ettikleri *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile çalışmışlardır. Bu teknikler OS sentezinde stabilite ve etkinlik açısından, enzimatik karakteristikler açısından ve immobilizasyondaki verim açısından karşılaştırılmıştır. İmmobilizasyonla her durumda K_m 'de artış görülmüştür. Kitosanla yapılan immobilizasyonla maksimum enzim bağlanması sağlanmış ve en yüksek OS sentezine ulaşmışlardır. Kitosan'a immobilize edilen enzimin matriks etkisinin korumasından dolayı 60 °C'de serbest enzime göre 1.6 kat daha stabil olduğunu görmüşlerdir. Bunun

yanında 65 °C'de β -Gal'in çapraz bağlı (CLEA) enzim agregatlarının yarı ömür ($t_{1/2}$) değeri 1.07 saat iken serbest enzimde ise 0.79 saat olmuştur. Kitosan ve CLEA ile yapılan her iki immobilizasyon metodu OS sentezi için kullanılmış ve %20 (w/v) laktoz çözeltisi kitosanla immobilize edilen enzimle maksimum OS verimi sağlanmıştır. Bu toplam şekerlerin %17.3'ünü oluşturmuş ve 40 °C'de 2 saatte elde edilen bu veriler serbest enzimle tekrarlandığında verim %10 olmuştur. CLEA ile immobilize enzimin 12 saat içinde %78 monosakkarit ürettiği ve bu yöntemin laktozun hidrolizine daha yatkın olduğu sonucuna varmışlardır.

Shin ve ark. (1998), kapalı yatak reaktöründe *Bullera singularis* ATCC 24193'den elde edilen β -Gal'in immobilize edilmesiyle laktozdan sürekli GOS üretmişlerdir. Kısmi saflaştırılmış β -Gal'i Kitopearl BCW 3510 yatağa (970 GU/g resin) basit adsorbisyonla immobilize etmişler ve 15 günlük süreç boyunca 100 g/L laktoz solüsyonundan 4.4 g/L.saat verimlikle %55 (w/w) OS'i sürekli sitemde elde etmişlerdir. Kesikli sistemde ise 300 g/L laktoz çözeltisinden 6.5 g GOS/L.saat üretim sağlamışlardır.

Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Lactozym 3000 L HP G kullanarak laktoz hidrolizi esnasında galaktooligosakkarit oluşumu üzerine etkili olan şartların optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Sentez 300 dakika sürerken, sıcaklıklar 40, 50 ve 60 °C, pH'lar 5.5, 6.5 ve 7.5, laktoz konsantrasyonları 150, 250 ve 350 mg/mL ve enzim konsantrasyonları 3, 6 ve 9 U/mL olacak şekilde çalışmayı yürütmüşlerdir. Oluşan ürünün analizini atımlı amperometrik detektöre sahip anyon değiştiricili yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPAEC-PAD) ile gerçekleştirmişlerdir. Enzim tarafından laktoz hidrolizi süresince glikoz, galaktoz, galaktobiyoz, allolaktoz ve 6' galaktosil laktoz gibi karbonhidratların oluştuğunu saptamışlardır. Di ve trisakkaritlerin oluşumunda reaksiyon şartları etkisinin farklı olduğunu ve buna göre galaktobiyoz ve allolaktoz sentezi için optimal şartların 50 °C, pH 6.5, 250 mg/mL laktoz konsantrasyonu ve 3 U/mL enzim konsantrasyonunda 300 dakikayken, 6' galaktosil laktoz üretimi için en iyi reaksiyon şartlarının 40 °C, pH 7.5, 250 mg/mL laktoz konsantrasyonu ve 3 U/mL enzim konsantrasyonunda 120 dakika olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre Lactozym 3000 L HP G ile farklı kompozisyona sahip reaksiyon karışımı elde edilmesinin çalışma koşullarına bağlı olduğunu belirlemişlerdir.

Geleneksel ve mikrodalga radyasyon ile ısıtma uygulanarak *Kluyveromyces lactis* kaynaklı serbest ve immobilize β -Gal (Lactozym 3000 L HP G) ile laktozdan

GOS sentezlenen bir çalışmada β -Gal'ın Duolit A-568'e immobilize edilmesiyle GOS sentezinin arttığı belirtilmiştir. Yüksek laktoz konsantrasyonu ve yardımcı çözücülerle su aktivitesi düşürülen ortamlarda GOS seçiciliğinin (GOS sentezi/laktoz hidrolizi oranı) yükseldiğini saptanmıştır. GOS oluşumu üzerine mikrodalga ısıtmanın avantajı da incelenmiştir. Ortama çözücü ilave edilmesi ve mikrodalga ısıtma altında reaksiyonun gerçekleşmesi GOS üretiminde bir artış sağlamıştır. Immobilize edilmiş β -Gal ve hekzanol gibi bir çözücü ilave edilerek mikrodalga ısıtma şartları GOS sentezi için seçiciliğin 217 kat artmasına neden olmuştur (Maugard ve ark., 2003).

Chockchaisawasdee ve ark. (2005), *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal (Maxilact L 2000) ile laktozdan GOS sentezi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Karıştırıcılı tank reaktör içinde pH 7.0 ve 40 °C'de 220-400 mg/mL laktoz konsantrasyonu ve 3-9 U/mL enzim konsantrasyonu aralığında GOS sentezi gerçekleştirmişlerdir. Denemeler sonucunda GOS oluşum miktarına enzim konsantrasyonunun değil laktoz konsantrasyonunun etkili olduğunu belirlemişlerdir. Galaktozun yarışmalı, glikozun ise yarışmasız inhibitör etki gösterdiğini görmüşlerdir. Bu çalışmaya ek olarak laboratuvar ölçekli reaksiyon sistemini 10 kDa NMWCO rejener selüloz membran ile sürekli sistem şeklinde denemişlerdir. Reaktörde zıt çapraz akım metodunu uygulamışlardır. Akış ve üretim üzerine işlem basıncının etkisini sisteme uygulanan farklı transmembran basıncı ile araştırmışlardır. Aynı enzim ve laktoz konsantrasyonunda pH 7.0 ve 40 °C'de sürekli sistemin kesikli sistemden daha iyi performans gösterdiğini saptamışlardır. Oluşan ürün yapılarının sürekli ve kesikli sistemde benzer olduğunu fakat ticari ürün olan (Vivinal® GOS) GOS'ten farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada organik bir sistem içinde hipertermofilik β -Gal kullanılarak GOS sentezi üzerine laktoz konsantrasyonu ve su aktivitesinin etkisi incelenmiştir. GOS üretiminin su aktivitesi artışıyla kademeli olarak arttığı daha sonra ise su aktivitesinin artışıyla üretimin azaldığı gözlenmiştir. Farklı su aktivitesi ve laktoz konsantrasyonlarının GOS üretimine ve zincir uzunluğuna nasıl etki ettiğini belirlemek için cevap yüzey metodunu kullanmışlar ve her durumda GOS üretimi üzerine en etkili değişkenin su aktivitesi olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek GOS3 sentezine 0.44-0.57 su aktivitesi aralığında % 0.06-0.1 laktoz konsantrasyonunda ulaşılırken GOS4 için 0.47-0.57 su aktivitesi aralığında GOS5 için ise 0.49-0.60 su aktivitesi aralığında maksimum üretim gerçekleşmiştir. Daha uzun zincirli GOS sentezlemek için su

aktivitesinin yükseltilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (Cruz-Guerrero ve ark., 2006).

Matella ve ark. (2006), serbest immobilize enzimle geri dönüşlü kesikli prosesleri denemişler ve bu sistemleri karşılaştırmışlardır. Optimum başlangıç koşullarını kesikli sistemlerde belirlemişlerdir. Bu optimum koşullar kullanılarak bir ultrafiltrasyon (UF) serbest enzim sistemi geliştirmişler ve enzim performansı üzerine UF akış basıncının (100-400 psi) etkisini incelemek için ve 0 psi basınçlı kesikli sistemle karşılaştırma yapmışlardır. Optimum koşulları ayrıca polietilenimin (PEI), glutaraldehit (GA) ve pamuklu bez kullanılan bir immobilize enzim sistemini geliştirmek için de kullanmışlardır. PEI ve GA immobilizasyon ajanlarının enzim üzerine inaktivasyon etkisini de çalışmışlardır. Sonunda tutarlı olan serbest ve immobilize dönüşümlü kesikli sistemleri GOS üretimi için kullanmışlardır. Optimum başlangıç koşullarını 270 g/L laktoz, 4.5 g/L enzim (*Aspergillus oryzae*, 9400 U/g) ve 30 dakika reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Serbest enzim için UF membran sisteminde akış basıncının enzim performansı üzerine önemli bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Eşit serbest ve immobilize enzim sistemlerinin benzer maksimum GOS üretimi ve laktoz çevrimi verdiğini saptamışlardır. Serbest enzim sisteminde yaklaşık %22 GOS verimine 15 dakikada ulaştıklarını ve %50 laktoz çevrimi olduğunu, immobilize sistemde ise yaklaşık %20 GOS verimine 17 dakika ulaştıklarını ve laktoz çevriminin %50 olduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (2003), ters miseller içerisinde kontrollü su konsantrasyonu altında *E. coli* kaynaklı β -Gal kullanarak GOS sentezi üzerine çalışmışlardır. Ürünleri asetonitril ilave ederek çöktürmüşler ve yarı preparatif HPLC kolonu ile ayırmışlardır. ^{13}C NMR analizinde elde ettikleri sonuçlara göre ana ürün allolaktoz olmuştur. En yüksek üretimi pH 6.5, 37 °C de ve su surfektan molar oranı $W_0=19.32$ iken %29.7 allolaktoz %14 diğer GOS'ler şeklinde elde etmişlerdir. W_0 'ın artışının GOS üretimini azalttığını belirlemişlerdir. Sıcaklık artışının GOS üretimini etkilemediğini fakat daha fazla %45 allolaktoz üretildiğini (45 °C pH 6.5 $W_0=19.32$ 'de) bildirmişlerdir. Bu çalışmayla ters misel içerisinde serbest su içeren bir transgalaktosilasyon modelini amaçlamışlar ve deneysel verilerle iyi bir korelasyon bulmuşlardır.

Hsu ve ark. (2007), *Bifidobacterium longum* BCRC 15708 kaynaklı β -Gal kullanılarak transgalaktosilasyon reaksiyonuyla GOS üretimi üzerine bir araştırma

yapmışlardır. Enzimle %40 laktoz konsantrasyonunda gerçekleştirilen reaksiyon sonunda glikoz, galaktoz, laktoz, GOS3 ve GOS4'den oluşan ürünlerin açığa çıktığını ve GOS'ler içinde GOS3'ün baskın olduğunu görmüşlerdir. Başlangıç laktoz konsantrasyonunun artışı karşısında reaksiyon karışımındaki GOS miktarının da arttığını bildirmişlerdir. Laktoz çevrimi %59.4 iken pH 6.8 ve 40 °C'de %40 laktoz konsantrasyonlu denemede %32.5 GOS ile en yüksek verimi elde etmişlerdir. Bu da 13.0 g/L.h üretime denk gelmiştir. Test organizmasından elde edilen β -Gal'in transgalaktosilasyon aktivitesinin diğer organizmalardan elde edilenlere göre glikoz ve galaktoza karşı daha düşük hassasiyet gösterdiğini saptamışlardır. Reaksiyon karışımına ilave edilen %5 ya da %10 glikoz ya da galaktozun, β -Gal'in transgalaktosilasyon aktivitesinde önemli ($p>0.05$) bir düşüşe neden olmadığını bildirmişlerdir.

Zheng ve ark. (2006), yaptıkları bir çalışmada *Aspergillus candidus* CGMCC3.2919'dan elde edilen rekombinant β -Gal'ı immobilize ederek GOS üretmeyi denemişlerdir. Immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6.5 ve 40 °C olarak belirlemişlerdir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu artışının GOS verimini artırdığını ve sürekli GOS üretimi boyunca seyreltme oranının temel bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. 400 g/L laktoz çözeltisinin 0.8/saat seyreltme oranında beslenmesi esnasında en yüksek üretime (87 g/L.h) ulaşmışlardır. En yüksek GOS verimini %37 olarak, 0.57/h seyreltme oranında yakalamışlardır. Kapalı yatak reaktöründe GOS üretiminde düşüş görülmeksizin 20 gün boyunca sürekli operasyonun sürdürüldüğünü belirtmişlerdir. Ortalama 64 g/L.h'lik üretime denk gelen %32 lik GOS verimini GOS üretim uygulamaları için potansiyel olan immobilize rekombinant β -Gal ile sağlamışlardır.

Neri ve ark. (2009), serbest ve manyetik polisiloksan-polivinil alkol üzerine bağlanmış *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -Gal ile GOS sentezi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Maksimum GOS miktarını %26 olarak belirlemişler, bunun da yaklaşık %55'lik laktoz çevrimi esnasında gerçekleştiğini ve deney şartlarını 4.5 pH, 40 °C sıcaklık, %50 (w/v) laktoz konsantrasyonu olarak bildirmişlerdir. Maksimum GOS konsantrasyonu değerine yaklaşan glikoz ve galaktoz konsantrasyonlarında reaksiyonun inhibe olduğunu ve GOS veriminin düştüğünü saptamışlardır. Enzim taşıyıcının difüzyonal sınırlamasının bulunmadığı mPOS-PVA yapısına immobilize edilmiş enzimin, GOS üretiminin etkilenmediğini belirtmişlerdir. Ayrıca immobilize enzimin 10 kez kullanıldıktan sonra bile başlangıç aktivitesinin %84'ünü koruduğunu görmüşlerdir.

İlave olarak farklı başlangıç konsantrasyonları için kinetik parametreleri belirlemişler ve serbest enzim ile immobilize enzimi karşılaştırmışlardır.

Hansson ve Adlercreutz (2001), laktozdan maksimum GOS sentezi için *Sulfolobus solfataricus* ve *Pyrococcus furiosus* kaynaklı β -Glikosidazlarla çalışmışlar, 95 °C sıcaklık ve %90'dan fazla laktoz konsantrasyonu gibi ekstrem koşullarda bu enzimlerin performanslarını incelemişlerdir. Son derece termostabil olan bu enzimlerin GOS sentezi için çok uygun olduklarını belirtmişlerdir. Her iki enzimin de %70 laktoz konsantrasyonunun üzerine kadar artan laktoz konsantrasyonu karşısında GOS veriminin yükseldiğini, ayrıca sıcaklık artışının da verimi artırdığını fakat optimum pH'nın sıcaklığa göre değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Optimum koşullarda *Sulfolobus solfataricus* kaynaklı enzimin trisakkarit ve tetrasakkarit toplamı olarak GOS verimini %37 (w/w) *Pyrococcus furiosus* kaynaklı enzimininkini de %40 (w/w) olarak saptamışlardır. Sulu çözeltiyle karşılaştırıldığında heptan ve nonanlı iki fazlı çözelti içinde tetrasakkarit/trisakkarit oranının arttığını görmüşlerdir. Hipertermofilik organizmalardan elde edilen her iki enzimin de mezofilik termofilik karakterli organizmalardan elde edilen enzimlere göre yüksek substrat konsantrasyonlarında daha fazla GOS ürettiğini bildirmişlerdir.

Reuter ve ark. (1999), *Sulfolobus solfataricus*'dan elde edilen termostabil β -Gal'ı ticari ürün olan *Aspergillus oryzae* kaynaklı termotolerant β -Gal ve *Escherichia coli* kaynaklı termostabil olmayan β -Gal ile karşılaştırmak için bir araştırma yapmışlardır. Farklı sıcaklıklarda GOS'leri sentezlemek için model transgalaktosilasyon reaksiyonunda verici olarak laktoz, alıcı olarak da N-asetillaktozamin kullanmışlardır. Laktoz parçalanma ürünlerinin N-asetillaktozamine bağlanmasıyla oluşan ürünleri tespit etmişlerdir. Sonuçlar incelendiğinde *S. solfataricus* enziminin GOS verimi %48, *A. oryzae* enziminin %36 ve *E. coli* enzimininki ise %32 olarak belirlenmiştir. *S. solfataricus*'un termostabil β -Gal'ının ürettiği ana ürünlerin β -D-Gal-[1-6]-D-GlcNAc, β -D-Gal-[1-4]-D-GlcNAc ve birkaç OS olduğu belirtilmiştir. *A. oryzae* kaynaklı enzimin de benzer ürünler verdiğini fakat GOS veriminin düşük olduğunu görmüşlerdir. *E. coli* enziminin oluşturduğu ana disakkarit ürününün β -D-Gal-[1-6]-D-GlcNAc olduğunu ve diğer ürünlerin iz miktarda belirlendiğini bildirmişlerdir.

Cruz ve ark. (1999a), topraktan izole ettikleri *Penicillium simplicissimum* kaynaklı β -Gal'ı yüksek konsantrasyonlu laktoz çözeltisinde inkübe ettiklerinde yüksek transgalaktosilasyon aktivitesi belirlemişlerdir. Laktoz konsantrasyonu %5 (w/v) iken

hidrolitik aktivite için optimum pH'yı 4.0-4.6, optimum sıcaklığı 55-60 °C aralığı olarak bulmuşlardır. Maksimum galaktosiltransferaz aktivitesini pH 6.5 ve 50 °C'de bulmuşlardır. Transferaz aktivitesini en iyi derecede sağlayan sıcaklık ve pH koşullarında 50 mL %60 (w/v) laktoz çözeltisine 26.6 U β -Gal ilave ederek %30.5 GOS (183 mg/mL), %27.5 kalıntı laktoz, %42.0 monosakkarit elde etmişlerdir.

Boon ve ark. (2000), oligosakkaritlerin enzimatik olarak sentezlenmelerinde enzim kaynağının ve sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için bir araştırma yapmışlardır. Enzim kaynağı ve sıcaklığın önemli proses parametreleri olması sebebiyle bunların oligosakkarit sentezine etkilerinin önemli olduğunu savunarak, *Kluyveromyces fragilis*, *K.lactis*, *A.oryzae* ve *Bacillus circulans* kaynaklı β -Gal kullanarak 20, 30, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda kesikli sistemlerde kinetik parametreleri belirlemişlerdir. Sıcaklığın kinetik parametreler üzerine etkisini Arrhenius eşitliği ile göstermişlerdir. Yüksek sıcaklıklarda büyük moleküllü oligosakkarit veriminin az olduğunu görmüşlerdir. β -Gal'lar arasındaki farklılığın üretilen oligosakkaritin miktar, boyut, ve tipini etkilediğini saptamışlardır. *B. circulans*'dan elde edilen β -Gal'ın en verimli şekilde, en farklı ve büyük boyutlarda oligosakkarit ürettiğini, *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'ların ise çoğunlukla trisakkarit formunda oligosakkarit ürettiğini belirlemişlerdir.

Son on yıl içerisinde yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında (Çizelge 2.10.) enzim kaynağına, reaksiyon koşullarına ve ayrıca enzimin serbest ya da immobilize olma durumuna göre laktozdan elde edilen GOS miktarlarının %10 ila %55 arasında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 2.10. Çeşitli β -Galaktosidazların reaksiyon şartları ve GOS üretim miktarları

Enzim kaynağı	İmmobilizasyon metodu	Reaksiyon şartları			
		Başlangıç laktoz konsantrasyonu (g/L)	Sıcaklık (°C)	pH	Maksimum GOS Miktarı (%)*
<i>Bullera singularis</i> ^a	Kitosan kürelere bağlı	100	45	4.8	55
<i>Bullera singularis</i> ^b	Serbest	180	50	5.0	50
<i>Talaromyces thermophilus</i> ^c	Serbest	200	40	6.5	50
	Eupergit C'ye bağlı	200	40	6.5	45
<i>Bacillus spp.</i> ^d	Serbest	360	55	5.0	43
	THP ile Kitosan'a bağlı	360	55	5.0	41
<i>Pyrococcus furiosus</i> ^e	Serbest	700	95	5.0	40
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ^e	Serbest	700	85	6.5	37
<i>Lactobacillus reuteri</i> ^f	Serbest	205	30	6.5	38
<i>Aspergillus candidus</i> ^g	D113 reçineye bağlı	400	40	6.5	37.1
<i>Kluyveromyces lactis</i> ^h	Serbest	330	50	5.0	35
<i>Bacillus spp.</i> ^h	Serbest	330	50	5.0	34
<i>Aspergillus oryzae</i> ^h	Serbest	330	40	5.0	21
<i>Bifidobacterium longum</i> ⁱ	Serbest	400	45	6.8	32.5
<i>Penicillium simplicissimum</i> ^j	Serbest	600	50	6.5	30.5
<i>Kluyveromyces lactis</i> ^k	Serbest	250	50	6.5	29.5
<i>Kluyveromyces lactis</i> ^l	Duolite A-568'e bağlı	318	40	6.5	28
<i>Aspergillus oryzae</i> ^m	Pamuklu beze bağlı	400	40	4.5	26.6
<i>Aspergillus oryzae</i> ⁿ	Pamuklu bez üzerine polietilen	400	40	4.5	26
	imin ile çok tabakalı bağlı				
<i>Aspergillus oryzae</i> ^o	Kitosa'a bağlı	200	40	4.0	17.3
	Serbest	200	40	4.5	10

^aShin ve ark., 1998^bCho ve ark., 2003^cNakkharat ve Haltrich, 2007^dCheng ve ark., 2006b^eHansson ve Adlercreutz, 2001^fSplechtna ve ark., 2006^gZheng ve ark., 2006^hCheng ve ark., 2006aⁱHsu ve ark., 2007^jCruz ve ark., 1999a^kMartinez-Villaluenga ve ark., 2008^lMaugard ve ark., 2003^mAlbayrak ve Yang, 2002aⁿAlbayrak ve Yang, 2002b^oGaur ve ark., 2006

*Maksimum GOS miktarı (%): Toplam GOS miktarı x 100 /Başlangıç laktoz miktarı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Enzim

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan enzim *Kluyveromyces lactis* kaynaklı bir β -Galaktosidaz olup Sigma G 3665 kodlu üründür. Firma, enzimi Novozyme adlı bir başka firmadan tedarik etmekte ve ticari olarak Lactozym 3000 L HP G olarak piyasada bulunmaktadır.

3.1.2. İmmobilizasyon Materyalleri

3.1.2.1. Pamuklu Bez

Tutuklamada destek materyali olarak kullanılan pamuklu bez pazardan temin edilmiş tekstil ürünüdür. Bezin özellikleri şu şekildedir. Örgü yapısı bezayağı dokuma kumaş, %100 pamuklu, atkı sıklığı 15 tel/cm², çözgü sıklığı 20 tel/cm² ve gramajı 170 g/m²'dir.

3.1.2.2. Duolite XAD761

Çalışmada immobilizasyon amacıyla kullanılan Duolite XAD761 Supelco firmasından temin edilmiştir. Duolite XAD761 granüler formda, çok gözenekli, fenolik karakterli adsorban bir reçinedir. Bu reçineye ait çeşitli özellikler Çizelge 3.1.'de görülmektedir.

Çizelge 3.1. Duolite XAD761'in bazı özellikleri

Matriks	Çapraz bağlı fenol-formaldehit polikondensat
Fonksiyonel grup	Fenol
Nem tutma kapasitesi	%62-70
Özgül ağırlık	1.070-1.130
Partikül boyutu	0.560-0.760 mm
Porozite	0.95-1.18 mL/g
Yüzey alanı	150-250 m ² /g
Ortalama gözenek çapı	600 Å
Çalışma pH'sı	8.0 pH'ya kadar
Çalışma sıcaklığı	Maksimum 80 °C'ye kadar

3.1.3. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmanın yürütülmesinde kullanılan kimyasal maddeler alındıkları yer, katalog numarası ve kullanıldığı yer belirtilerek Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan kimyasallara ait bilgiler

Kimyasalın adı	Alındığı firma	Katalog Numarası	Kullanıldığı Analiz
NaOH	Carlo Erba Reagenti	480507	Tampon hazırlamada
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M2670	Tampon hazırlamada
Tris	Amresco	0826	Tampon hazırlamada
K ₂ HPO ₄	Carlo Erba Reagenti	361757	Tampon hazırlamada
KH ₂ PO ₄	Carlo Erba Reagenti	361507	Tampon hazırlamada
Potasyum asetat	Carlo Erba Reagenti	358907	Tampon hazırlamada
Asetik asit	Carlo Erba Reagenti	302011	Tampon hazırlamada
2-Nitrofenol	Aldrich	N19702	Enzim aktivite tayininde
Glutaraldehit	Merck	S4661903 711	İmmobilizasyon için
BSA	Amresco	73660	Protein tayini
ONPG	Fluka	73660	Enzim aktivite tayininde
D-(+)-Galaktoz	Carlo Erba Reagenti	453126	HPLC standardı
Laktoz monohidrat	Merck	UL953257 803	Enzimatik reaksiyon için
D-(+)-Glikoz	Fluka	49139	HPLC standardı
D-(+)-Galaktoz	Fluka	48260	HPLC standardı
D-(+)-Laktoz	Fluka	61339	HPLC standardı
Maltotrioz	Sigma	M8378	HPLC standardı
Maltotetroz	AppliChem	A7739,0100	HPLC standardı
Maltopentoz	Supelco	4-7876	HPLC standardı
Maltoheksoz	Sigma	M9153	HPLC standardı
Gliserol	Sigma	G8773	HPLC standardı
Asetonitril	Carlo Erba Reagenti	412372	HPLC analizleri için

3.2. Yöntemler

Bu çalışma üç aşamalı şekilde yürütülmüştür. Birinci aşamada β -Gal'ın immobilizasyon yöntemlerine ait pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, süre vb. gibi çeşitli parametrelerin denenmesi ve uygun şartların belirlenmesi, ikinci aşamada serbest ve immobilize enzimlere ait tampon konsantrasyonu, çalışma pH'sı, çalışma sıcaklığı, kinetik katsayılar vb. gibi çeşitli karakteristiklerin belirlenmesi ve immobilizasyonla meydana gelen değişimin incelenmesi, üçüncü aşamada ise laktoz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin serbest ve immobilize enzimlerin GOS üretimlerine

etkisi incelenmiş uygun parametrelere sahip şartlar altında serbest ve immobilize enzimlerin GOS üretimleri ve verimler belirlenmiştir.

3.2.1. Analitik Yöntemler

3.2.1.1. Protein Tayini

Çalışmada kullanılan sıvı enzimin protein miktarlarının saptanması ve immobilizasyon verimlerinin belirlenmesi için protein tayini yapılmıştır. Protein miktarları, boya bağlamaya dayalı olan Bradford yöntemine göre belirlenmiştir (Bradford, 1976). Standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan stok boya çözeltisi, 50 mg Coomassie Brilliant Blue G boyası, 25 mL %96'lık etanol, 50 mL %85'lik fosforik asit karıştırıldıktan sonra kalan hacim 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlanarak hazırlanmış ve Whatman No 1 kağıdından süzülmüştür. Analiz öncesinde stok boya çözeltisi deiyonize su ile 5 kat seyreltilmiştir. Örnekten (enzim) 20 µL alınarak üzerine 1 mL boya çözeltisi ilave edilmiş hızlı bir karıştırmanın ardından 5 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda Thermo Spectronic marka Helios Gamma UV spektrofotometre ile 595 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları belirlenmiştir. Enzim çözeltilerindeki protein oranları BSA saf proteini ile hazırlanan şahit eğriden yararlanılarak BSA cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.1.2. Enzim Aktivite Tayini

Aktivite tayini Cavaille ve Combes (1995)'in yönteminde modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Substrat çözeltisi ONPG, 6.6 pH'lı 50 mM potasyum fosfat ve 1.5 mM MgCl₂ içeren tamponda 7.2 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Analiz 37 °C'de 2 mL ONPG çözeltisine ilave edilen 100 µL enzimle başlatılmış ve 2 dakika boyunca Thermo Spectronic marka Helios Gamma UV spektrofotometre ile 420 nm dalga boyunda renk gelişimi ölçülmüştür. Bir enzim ünitesi (EU) analiz koşullarında mL başına dakikada ONPG'den 1 µmol ONP (*o*-nitrofenol) açığa çıkaran enzim miktarı olarak belirlenmiştir.

3.2.1.3. Karbonhidrat Analizi

Serbest ve immobilize enzim kullanarak oligosakkarit üretim süreçleri sonucunda elde edilen ürünlerin karbonhidrat kompozisyonunun belirlenmesi için

Shimadzu marka HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) sistemi kullanılmıştır. Sistem CBM-20A sistem kontrol ünitesi, LC-20AD pompa ünitesi, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO-10ASvp kolon fırını ve RID-10A refraktif indeks detektöründen oluşmuştur. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde LC solution paket programı kullanılmıştır. Karbonhidrat ayrımları Inertsil NH₂ 5 µm 4.6 x 50 mm koruyucu kolon ve Inertsil NH₂ 5 µm 4.6 x 250 mm kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 70/30 asetonitril/su kullanılmıştır. Örnekten 20 µL enjeksiyon yapılarak 1.5 mL/dk akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Detektör ve kolon fırını sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanmıştır. Karbonhidratların (laktoz, glikoz, galaktoz ve toplam oligosakkaritler gibi) konsantrasyonları (w/v) bu karbonhidratlara ait olan pik alanlarından hesaplanmıştır (Boon ve ark., 2000). Pik alanlarından karbonhidrat konsantrasyonları toplam karbonhidrat veya başlangıç laktozun ağırlık yüzdeleri şeklinde belirlenmiştir. Buradan hareketle laktozun GOS ve diğer ürünlere dönüşüm oranları hesaplanmıştır.

3.2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

3.2.2.1. Enzimin Çapraz Bağlama Parametrelerinin Belirlenmesi

β-Gal enziminin çapraz bağlanması Zhou ve ark. (2003)'larına göre glutaraldehit ve BSA kullanılarak yapılmıştır. Pamuklu bezin fiziksel destek olarak görev yaptığı immobilizasyon işleminde, enzim ve BSA'daki amino asit parçalarının NH₂ grupları üzerinden glutaraldehit ile çapraz bağlı yapı meydana gelmektedir. Glutaraldehit ile çapraz bağlama çalışmalarında bağlanmaya etki eden enzim konsantrasyonu, glutaraldehit konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve tutuklama süresi gibi faktörlerin denenerek optimize edildiği bildirilmiştir. Oda sıcaklığında yapılan çapraz bağlamalarda 4 saat veya daha kısa sürenin yeterli olduğu belirtildiğinden (Migneult ve ark., 2004) tutuklama süresi parametre olarak denenmemiş ve süre 4 saat olarak seçilmiştir. En yüksek çapraz bağlamayı saptamak için diğer parametreler denenmiştir. Bu amaçla çalışılan parametreler Çizelge 3.3.'de görülmektedir. Aktivite tayinleri Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Enzimin çapraz bağlama parametreleri

Parametreler	İncelenen Değerler
BSA konsantrasyonu (%)	5, 10, 20
Enzim konsantrasyonu (EU/mL enzim çözeltisi)	275, 550, 1100, 1650
Glutaraldehit konsantrasyonu (%)	0.4, 0.8, 1.2, 2.4
Pamuklu bez yüzey alanı (cm ²)	2.25, 3.0625, 4, 5.0625
Tutuklama ortamının pH'sı	6.0, 6.6, 7.0, 7.5, 8.0

3.2.2.2. Enzimin Duolite XAD761'e Adsorbsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Yöntemde Duolite XAD761 ile β -Gal arasında Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve bunların kombinasyonları gibi fiziksel etkileşimler meydana gelmektedir (Grosava, 2008). Yüksek gözenek miktarına sahip reçinenin 8.0 pH'ya ve 80 °C'ye kadar sıcaklıkta çalışabildiği (Çizelge 3.1.) ve bu özelliklere sahip reçinenin adsorbsiyon temelli immobilizasyon gerçekleştirdiği belirtilmektedir (<http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/enzymes.htm> 03.07.2010).

β -Gal enziminin Duolite (Amberlite) XAD761'e adsorbsiyonu Boyacı (2001)'ya göre yapılmıştır. Denemelerin her biri için 1 g XAD761 tartılmış ve üzerine 10 mL enzim çözeltisi ilave edilerek işlem süresince manyetik karıştırıcı ile karıştırma uygulanmıştır. İşlem bittiğinde reçineler her seferinde karıştırma eşliğinde 5 dakikalık yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Önce 3 kere deiyonize su ile ardından en az 3 defa olmak kaydıyla yıkama suyunda enzim aktivitesi kalmayınca kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Enzim konsantrasyonu denemelerinde sıcaklık 30 °C, ortam pH'sı 8.0 ve işlem süresi 60 dakika, pH denemelerinde enzim konsantrasyonu 220 EU/mL, sıcaklık 30 °C ve işlem süresi 60 dakika, sıcaklık denemelerinde, enzim konsantrasyonu 220 EU/mL, ortam pH'sı 8.0 ve işlem süresi 60 dakika, işlem süresi denemelerinde ise enzim konsantrasyonu 220 EU/mL, sıcaklık 30 °C ve ortam pH'sı 8.0 olacak şekilde sabitlenmiştir. En yüksek adsorbsiyonun belirlenmesi için kullanılan parametrelerin ön denemesi gerçekleştirilmiş ve bu denemelerin sonuçlarına göre ilgili parametrelerin çalışılması gereken aralıkları belirlenmiştir. Bu amaçla denenen parametreler ve çalışılan aralıklar Çizelge 3.4.'de görülmektedir. Aktivite tayinleri Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Enzimin Duolite XAD761'e adsorbsiyonundaki parametreler

Parametreler	İncelenen Değerler
Enzim konsantrasyonu (EU/mL enzim çözeltisi)	22, 110, 220, 550, 1100, 1650
pH	5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0
Sıcaklık (°C)	20, 30, 40, 50
Süre (dk)	30, 60, 120, 210

3.2.3. Serbest Enzim Analizleri

Kluyveromyces spp. kaynaklı enzimlerle yapılmış olan çeşitli araştırmalardaki aktivite tayinlerine ait parametreler Çizelge 3.5.'de görülmektedir.

Çizelge 3.5. *Kluyveromyces spp.* kaynaklı enzim aktivite yöntemlerine ait parametreler

β -Gal Kaynağı	Tampon Konsantrasyonu (mM)	MgCl ₂ Konsantrasyonu (mM)	pH	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>K. lactis</i>	200	0.1	6.5	37	Kim ve ark., 1997
<i>K. lactis</i>	100	1.5	6.6	37	Zhou ve ark., 2003
<i>K. lactis</i>	50	1.5	7.0	37	Kim ve ark., 2004
<i>K. lactis</i>	100	1.5	7.3	37	Cavaille ve Combes, 1995
<i>K. lactis</i>	25	1.5	7.3	40	Boon ve ark., 2000
<i>K. fragilis</i>	25	1	6.5	40	Boon ve ark., 2000
<i>K. lactis</i>	50	-	6.8	37	Asp ve ark., 1980
<i>K. lactis</i>	50	1	6.5	40	Martinez-Villaluenga ve ark., 2008
<i>K. lactis</i>	10	-	7.0	40	Cheng ve ark, 2006b
<i>K. lactis</i>	25	-	6.6	37	Jeon ve Mantha, 1985
<i>K. lactis</i>	20	2	7.0	-	Giacomini ve ark., 2001
<i>K. lactis</i>	10	-	7.0	37	Tello-Solis ve ark., 2005
<i>K. lactis</i>	200	2	7.0	40	Chockchaisawasdee ve ark., 2005
<i>K. lactis</i>	50	10	6.5	25	Maugard ve ark., 2003

Serbest enzimin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun, MgCl₂ konsantrasyonunun, pH'nın ve sıcaklığın etkilerini incelemek için seçilen parametrelerde Çizelge 3.5.'de görülen değerler ve bu değerlerden yola çıkılarak gerçekleştirilen ön deneme sonuçlarına göre çalışma noktaları belirlenmiştir.

3.2.3.1. Tampon Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzim aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için 10, 25, 50, 75 ve 100 mM konsantrasyonlarında fosfat tamponları ile hazırlanmış

ONPG çözeltileri kullanılmış ve Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3.2. MgCl₂ Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzim aktivitesi üzerine MgCl₂ konsantrasyonunun etkisini incelemek için 0, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2 mM konsantrasyonlarında MgCl₂ içeren 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanmış ONPG çözeltileri kullanılmış ve Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3.3. pH'nın Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için 5.5, 6.0, 6.3, 6.6, 6.7, 6.9, 7.0, 7.2 ve 7.9 pH değerlerine sahip 1.5 mM MgCl₂ içeren 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanmış ONPG çözeltileri kullanılmış ve Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3.4. Sıcaklığın Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 ve 55 °C sıcaklıklarda pH 6.6'yı veren ve 1.5 mM MgCl₂ içeren 50 mM fosfat tamponları ile hazırlanmış ONPG çözeltileri kullanılmış ve Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3.5. Serbest Enzimde Kinetik Katsayıların Belirlenmesi

β -Gal'a ait V_{max} ve K_m sabitleri 0.4125, 0.825, 1.65, 3.3, 6.6, 13.2 ve 26.4 mM'lık ONPG substratları kullanılarak belirlenmiştir. Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayini pH 6.6 ve sıcaklık 45 °C olacak şekilde düzenlenmiş ve aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Copeland (2000) kinetik katsayıların hesaplanmasında kullanılan yöntemlerin gerçek sonuca ne kadar yaklaştığını incelemiştir. Araştırmasından elde ettiği sonuçlar Çizelge 3.6.'da görülmektedir. Çizelgeden de Hanes-Woolf yönteminin en iyi sonuçları verdiği saptanmıştır. Bundan dolayı bu çalışmada elde edilen Michealis-Menten eğrileri Hanes-Woolf yaklaşımına göre doğrusallaştırılarak kinetik katsayılar hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6. Kinetik katsayıların hesaplanmasında kullanılan farklı grafiksel yöntemlerin karşılaştırması (Copeland, 2000)

Grafiksel Yöntem	K_m (μM)	Gerçek K_m Değerinden Sapma (%)	V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	Gerçek V_{\max} Değerinden Sapma (%)
Gerçek değerler	12		100	
Michealis-Menten	11.63	3.08	100.36	0.36
Lineweaver-Burk (tüm veri seti)	7.57	36.92	79.28	20.72
Lineweaver-Burk ($s=0.25-5K_m$)	9.17	23.58	91.84	8.16
Eadie-Hofstee	9.66	19.50	94.45	5.55
Hanes-Woolf	11.84	1.33	100.97	0.97

3.2.3.6. pH Stabilitesi

Serbest enzime ait aktivitelerin ortam pH'sının değişmesiyle nasıl etkilendiğini belirlemek amacıyla bu test yapılmıştır. Stabilite testi, Güleç (2009)'e göre yapılmıştır. Farklı pH'larda (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 pH) hazırlanan tampon çözeltiler içersinde 18 saat bekletilen serbest ya da immobilize β -Gal'lar, süre sonunda tamponlar uzaklaştırılarak aktivite analizinin gerçekleştirileceği tampon ile bir defa yıkanmıştır. Sonrasında Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3.7. Isıl Stabilite

Serbest enzimin farklı sıcaklıklarda uğradıkları aktivite kaybını belirlemek amacıyla bu analiz gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla serbest ve tutuklu enzim 40 ve 50 °C'lerde 30 dakika, 60 °C'de ise 5 dakika boyunca bekletilmiş ve belirli aralıklarla alınan ve soğutulan örneklerin aktiviteleri Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiç ısıl işlem görmemiş olan enzim aktivitesiyle ve ısıl işlem sonucu belirli sürelerde elde edilen aktiviteler birbirlerine oranlanarak sonuçlar elde edilmiştir.

3.2.4. İmmobilize Enzim Analizleri

3.2.4.1. İmmobilize Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine pH'nın Etkisi

İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için 5.0, 5.5, 6.0, 6.6, 7.0, 7.5 ve 8.0 pH değerlerinde olacak şekilde 1.5 mM MgCl_2 içeren 50 mM'lık fosfat tamponu ile ONPG çözeltileri hazırlanmıştır. Çapraz bağlı β -Gal için 0.6x0.6

cm'lik immobilize bez parçası, Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal için ise yaklaşık 30 mg immobilize reçine kullanarak Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.4.2. İmmobilize Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Sıcaklığın Etkisi

İmmobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 20, 30, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C'lerde pH 6.6, olacak şekilde 1.5 mM MgCl₂ içeren 50 mM'lık fosfat tamponları ile ONPG çözeltileri hazırlanmıştır. Çapraz bağlı β -Gal için 0.6x0.6 cm'lik immobilize bez parçası, Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal için ise yaklaşık 30 mg immobilize reçine kullanarak Bölüm 3.2.1.2.'de ayrıntıları verilen enzim aktivite tayinine göre aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.4.3. İmmobilize Enzimlerde Kinetik Katsayıların Belirlenmesi

İmmobilize enzimlerin V_{max} ve K_m değerlerinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.3.5.'de verilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemdeki pH, sıcaklık ve immobilize enzim miktarlarındaki farklılık şunlardır; çapraz bağlı β -Gal'da pH 7.0 ve 50 °C sıcaklık şartlarında yaklaşık 0.6x0.6 cm'lik immobilize bez parçası, Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal için ise pH 7.0 ve 45 °C sıcaklık şartlarında yaklaşık 30 mg immobilize reçine. Bunlar kullanılarak ONPG ile reaksiyon sonuçlarına göre katsayılar belirlenmiştir.

3.2.4.4. İmmobilize Enzimlerin pH Stabilitesi

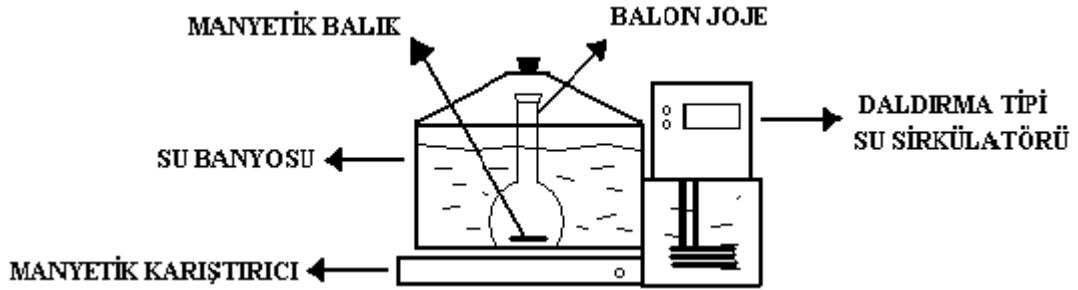
Çapraz bağlı β -Gal için 0.6x0.6 cm'lik immobilize bez parçası, Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal için ise yaklaşık 30 mg immobilize reçine kullanarak immobilize enzimlerin pH stabilitesinin belirlenmesi Bölüm 3.2.3.6'da belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.2.4.5. İmmobilize Enzimlerin Isıl Stabilitesi

Çapraz bağlı β -Gal için 0.6x0.6 cm'lik immobilize bez parçası, Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal için ise yaklaşık 30 mg immobilize reçine kullanarak immobilize enzimlerin ısı stabilitesinin belirlenmesi Bölüm 3.2.3.7'de belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.2.5. GOS Üretimine Etki Eden Faktörler

GOS üretimine etki eden faktörlerin incelenmesi Martinez–Villaluenga ve ark. (2008)'larına göre yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Laktoz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık gibi önemli faktörlerin etkilerini incelemek için laboratuvar şartlarında oluşturulan model laktoz çözeltileri ile serbest ve immobilize enzimlerle kesikli tip karıştırmalı tank reaktöründe (Şekil 3.1.) reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaktör için VELP® Scientifica GDE Enzymatic Digester analiz düzeneği kullanılmıştır. Düzenek içinde 0.1 °C hasasiyeti bulunan daldırma tipi sıcak su sirkülatörü, kapaklı pleksiglas malzemeden yapılmış su banyosu için hazne ve 6'lı manyetik karıştırıcı bulunmaktadır.



Şekil 3.1. GOS üretiminde kullanılan kesikli tip karıştırmalı tank reaktörü

GOS üretimi için gereken laktoz çözeltilerini hazırlamak amacıyla 1.5 mM $MgCl_2$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Çözeltiler 50 mL'lik balon jodelerde hazırlanıp reaktöre yerleştirilmişler ve ardından serbest ya da immobilize enzim ilavesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon süresinin belirli aşamalarında alınan örnekler 5 dakika kaynayan su banyosunda tutularak ortamda bulunabilecek serbest enzim inaktif hale getirilmiş ve ardından elde edilen örnek 25 mm çaplı, 0.45 μm 'lik naylon membran disk filtreden geçirilerek viallere doldurulmuş ve HPLC'de karbonhidrat analizi yapılana kadar -18 °C'de saklanmıştır.

3.2.5.1. Laktoz Konsantrasyonunun GOS Üretimine Etkisi

GOS üretimi üzerine laktoz konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla pH 6.5'te sıcaklık ise 50 °C'de sabit tutularak %25, %35, %45 (250, 350 ve 450 mg/mL) konsantrasyonlu üç laktoz çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler reaktörde

uygun sıcaklığa geldikten sonra serbest enzimden 4 EU/mL laktoz çözeltisi, çapraz bağlı enzimde 0.12 EU/mL laktoz çözeltisi ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 0.4 EU/mL laktoz çözeltisi olacak şekilde enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyonlar 300 dakika sürdürülmüş, 30, 60, 90, 120, 210 ve 300. dakikalarda örnekler alınmış ve karbonhidrat analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.2. pH'nın GOS Üretimine Etkisi

GOS üretimi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla laktoz konsantrasyonunu 350 mg/mL'de sıcaklık ise 50 °C'de sabit tutularak 5.5, 6.5 ve 7.5 pH'lara sahip üç laktoz çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler reaktörde uygun sıcaklığa geldikten sonra serbest enzimden 4 EU/mL laktoz çözeltisi, çapraz bağlı enzimde 0.12 EU/mL laktoz çözeltisi ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 0.4 EU/mL laktoz çözeltisi olacak şekilde enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyonlar 300 dakika sürdürülmüş, 30, 60, 90, 120, 210 ve 300. dakikalarda örnekler alınmış ve karbonhidrat analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.3. Sıcaklığın GOS Üretimine Etkisi

Sıcaklığın GOS üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla pH 6.5'te laktoz konsantrasyonunu 350 mg/mL'de sabit tutularak 250, 350 ve 450 mg/mL konsantrasyonlu üç laktoz çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler reaktörde uygun sıcaklığa geldikten sonra serbest enzimden 4 EU/mL laktoz çözeltisi, çapraz bağlı enzimde 0.12 EU/mL laktoz çözeltisi ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 0.4 EU/mL laktoz çözeltisi olacak şekilde enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyonlar 300 dakika sürdürülmüş, 30, 60, 90, 120, 210 ve 300. dakikalarda örnekler alınmış ve karbonhidrat analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin GOS Üretim ve Verimlerinin Karşılaştırılması

Bu aşamada serbest ve immobilize enzimlerde GOS oluşumuna etki eden faktörlerden elde edilen sonuçlara bakılarak deneme şartları oluşturulmuştur. Bu amaçla her bir enzim formu için maksimum GOS üretimi sağlayan laktoz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık noktaları belirlenmiş ve bunlara göre oluşturulan model sistemlerde elde edilen GOS miktarları saptanmıştır. Çalışma, oluşturulan deneme şartları haricinde Bölüm

3.2.5.'deki gibi yürütülmüştür. Reaksiyonlar için serbest enzimden 4 EU/mL laktoz çözeltisi, çapraz bağlı enzimde 0.12 EU/mL laktoz çözeltisi ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 0.4 EU/mL laktoz çözeltisi olacak şekilde enzim ilave edilmiştir. Reaksiyon süreleri serbest enzim için 360 dakika, çapraz bağlı enzim için 300 dakika, Duolite XAD761'e adsorbe enzim için ise 600 dakika olmuştur. Serbest ve immobilize enzim konsantrasyonlarındaki farklılık nedeniyle grafikler kullanılan laktoz miktarına karşılık ürün miktarları şeklinde oluşturulmuş ve sonuçlar bu şekilde verilmiştir. Sonuçlar serbest ve immobilize enzimlere göre toplam GOS miktarı, GOS2 miktarı, GOS3 miktarı, oluşan glikoz ve galaktoz miktarı ve GOS verimi şeklinde grafiklerle belirtilmiştir.

GOS verimi, bazı araştırmalarda toplam şeker miktarı içinde oluşan toplam GOS yüzdesi olarak verilmesine karşın (Zheng ve ark., 2006; Hsu ve ark., 2007), hesaplama Albayrak ve Yang (2002a), Güleç (2009) ve Valero (2009)'nun yöntemine göre yapılmıştır.

$$\text{GOS verimi (\%)} = \frac{\text{Toplam GOS Miktarı} \times 100}{\text{Kullanılan Laktoz Miktarı}}$$

Çalışma iki tekrarlamalı olarak yürütülmüştür.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerine Ait Parametrelerin Belirlenmesi

4.1.1. Çapraz Bağlama Parametrelerinin Belirlenmesi

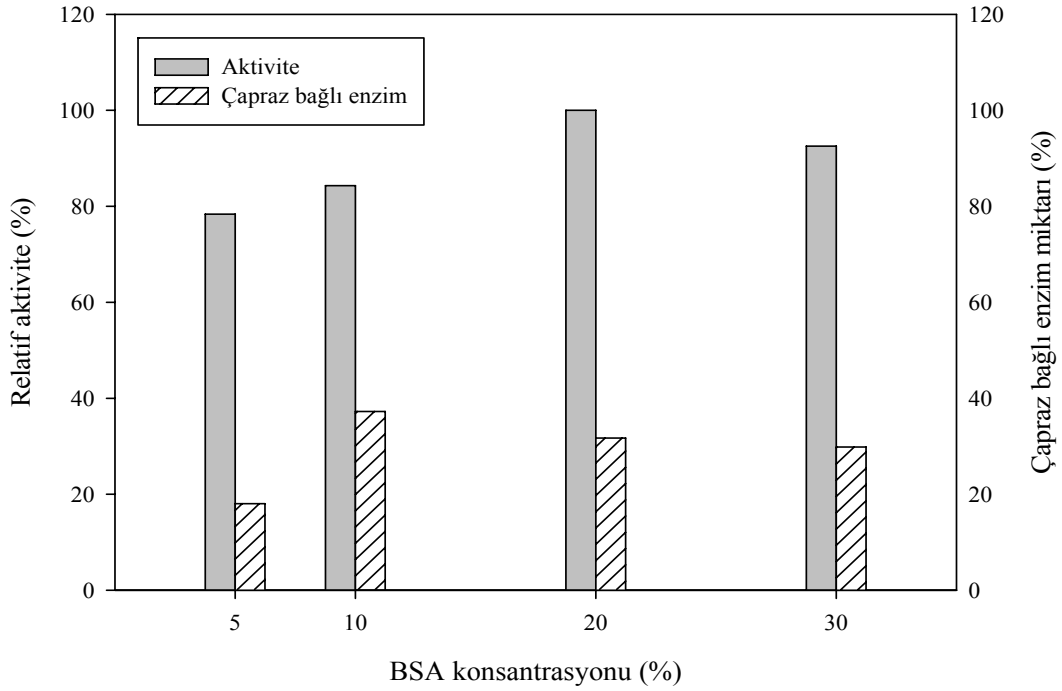
4.1.1.1. BSA Konsantrasyonunun Çapraz Bağlamaya Etkisi

Enzimlerin immobilizasyonunda glutaraldehitte çapraz bağlama temel olarak iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. İlk yöntem molekül içi çapraz bağlanma sonucunda oluşan, üç boyutlu ağ yapısının meydana gelmesidir. İkinci yöntem ise naylon, gözenekli cam ve ayrıca BSA ve jelatin gibi çapraz bağlı proteinlerden oluşan çözünmez taşıyıcılara bağlanmadır. Enzimin yapısı ve özellikle lizin içeriği onun glutaraldehitte çözünmez yapı oluşturmasını etkilemektedir. Enzimde lizin miktarının az olması durumunda ya da enzime modifikasyon uygulamasında sakınca varsa, lizin içeriği bakımından zengin, inert proteinlerin kullanılması önerilmektedir. Serbest lizin miktarı 59 adet olan BSA, glutaraldehitte çapraz bağlamaya en uygun proteinlerden biridir (Migneault ve ark., 2004; Silva ve ark., 2004).

Enzimin çapraz bağlanmasında kullanılan BSA miktarının artışı immobilize enzim aktivitesini %20 konsantrasyona kadar yükseltmiş ve bu konsantrasyondan sonra aktivite %92.54'e inmiştir (Şekil 4.1.). Başlangıçta %5'lik BSA konsantrasyonunda relatif aktivite %78.37 olarak belirlenmiştir. BSA konsantrasyonu %10 iken, %37.25 olan çapraz bağlı enzim miktarı BSA konsantrasyonunun %30'a çıkmasıyla %29.84'e düşmüştür. Topçular ve Ayhan (2008), taşıyıcı içermeyen çapraz bağlı peroksidaz agregatı oluşturmak için çalışmışlar, çapraz bağlama için 1, 5 ve 7.5 mg BSA kullanarak enzim aktivitesine etkilerini incelemişler ve 5 mg BSA miktarında en yüksek aktivite elde etmişlerdir. Bu noktadan sonra aktivitede azalma kaydetmişlerdir. Shah ve ark. (2006) da çalışmalarının bir bölümünde lipaz enziminin çapraz bağlı agregat oluşumunu denemişler ve Topçular ve Ayhan (2008)'a ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu sonuçlar elde ettiğimiz verilere benzerlik göstermektedir. Bu durum optimum BSA konsantrasyonunun altında yetersiz serbest amino grubu bulunması nedeniyle çok fazla çapraz bağ oluşumunun engellenmesi, bu konsantrasyonun üstüne çıkıldığında ise BSA'daki serbest amino gruplarının enzimdeki serbest amino gruplarıyla rekabete

girmeleri sonucunda enzimin yeterli çapraz bağ oluşturmasından kaynaklanmıştır (Shah ve ark., 2006).

Elde edilen analiz sonuçlarına göre tutuklamada kullanılan %20 BSA konsantrasyonu azami aktivite verdiği için immobilizasyonda bu konsantrasyonun kullanılması uygun görülmüştür.



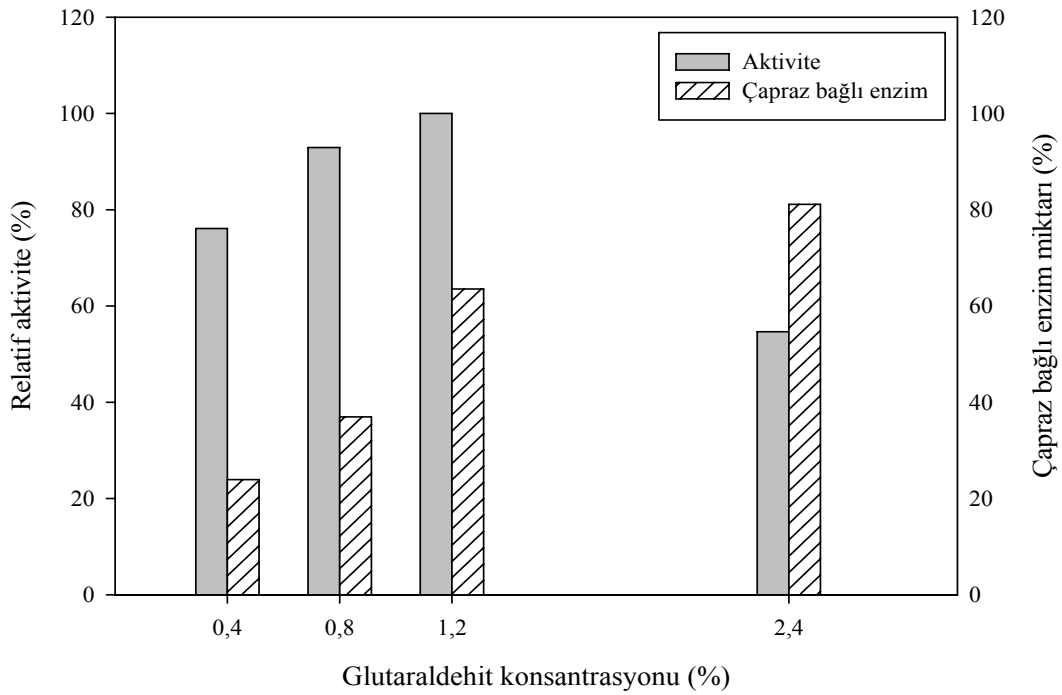
Şekil 4.1. BSA konsantrasyonunun enzimin çapraz bağlanmasına etkisi

4.1.1.2. Glutaraldehit Konsantrasyonunun Çapraz Bağlamaya Etkisi

Glutaraldehit yaygın ve bulunabilir olması, ucuz olması ve buna ilaveten diğer aldehit türleri içinde en yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olması nedeniyle en çok kullanılan çapraz bağlama ajanıdır (Migneault ve ark., 2004).

Çapraz bağlamanın glutaraldehit konsantrasyonu ile değişimi Şekil 4.2.'de görülmektedir. Çapraz bağlı β -Gal'in aktivitesi %1.2 glutaraldehit konsantrasyonuna kadar artmıştır. Glutaraldehit konsantrasyonu artışına paralel olarak çapraz bağlı enzim miktarı da artış göstermiştir. %2.4 glutaraldehit konsantrasyonunda çapraz bağlı enzim miktarı %81.1 ile maksimum seviyeye çıkmasına rağmen, reaktifin enzimin aktif bölgesine etki edecek düzeyde bağlanma gerçekleştirilmesinden ya da aşırı bağlanmadan kaynaklanan difüzyonel zorluk nedeniyle relatif aktivite %100'den %54.63'e düşmüştür.

Zhang ve ark. (2008), manyetik kompozit mikroküreciklere β -Gal'ı immobilize etmek için %0.2-2.0 oranları arasında glutaraldehit kullanmışlar ve %0.8 oranında maksimum aktivite elde etmişlerdir. Glutaraldehit konsantrasyonunun %0.8'in üstüne çıkmasıyla aktivitede azalma gözlemişlerdir. Düşük glutaraldehit konsantrasyonlarının yetersiz çapraz bağlamaya neden olduğunu, yüksek konsantrasyonun ise mikroküreciklerin yüzeyindeki boşlukların yapısını etkileyerek immobilizasyon sonunda enzim konformasyonunun değişmesiyle aktiviteyi düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yine Topçular ve Ayhan (2008) da çapraz bağlamada 2, 4 ve 6 μ L/mL konsantrasyonlarında denedikleri glutaraldehitte 4 μ L/mL konsantrasyonun en yüksek aktiviteyi verdiğini ve sonrasında konsantrasyon artışının aktiviteyi düşürdüğünü saptamışlardır. Shah ve ark. (2006) da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu sonuçlar bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

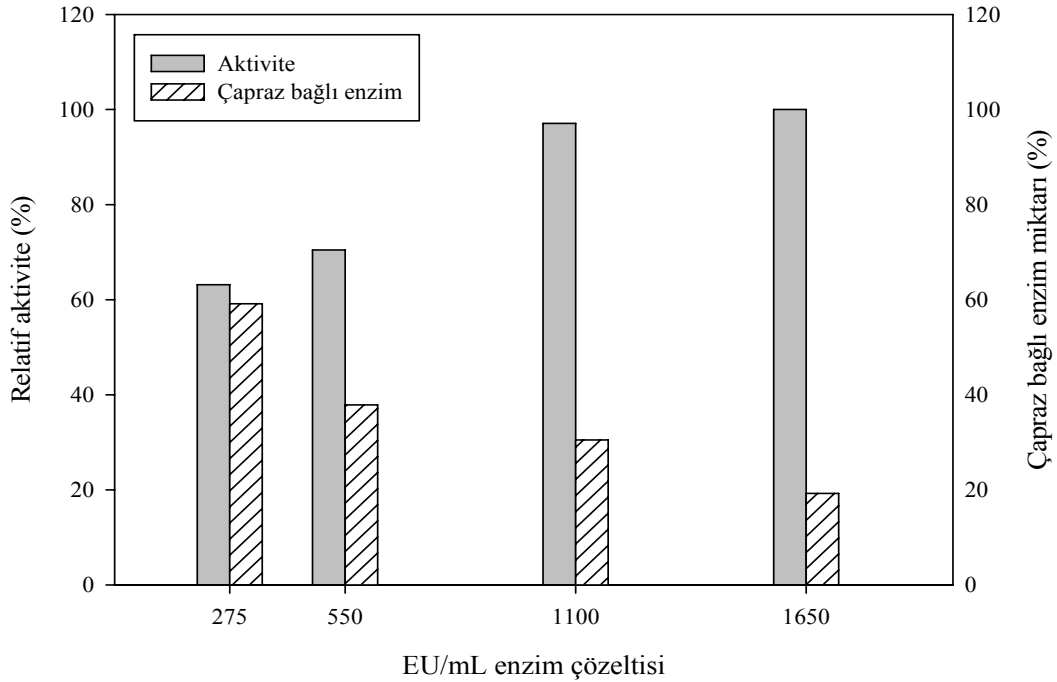


Şekil 4.2. Glutaraldehit konsantrasyonunun enzimin çapraz bağlanmasına etkisi

Elde edilen analiz sonuçlarına göre %1.2 glutaraldehit konsantrasyonu en yüksek aktiviteyi verdiğinden çapraz bağlamada bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.1.3. Enzim Konsantrasyonunun Çapraz Bağlamaya Etkisi

Çapraz bağlama denemelerinde enzim konsantrasyonu artışı karşısında çapraz bağlı enzim miktarının %59.16'dan başlayarak %19.26'ya düşüş göstermesine rağmen relatif aktivitenin ise devamlı artış gösterdiği saptanmıştır. Fakat 1100 EU/mL enzim konsantrasyonundan sonra aktivite de artış hızı yavaşlamıştır (Şekil 4.3.). Relatif aktivite, enzim konsantrasyonu 1650 EU/mL iken %100, 1100 EU/mL iken %97.1 olarak belirlenmiştir. Zhang ve ark. (2008), 190-1140 EU aralığında çalıştıkları enzim konsantrasyonu denemesinde 760 EU'lık enzim miktarının en iyi aktiviteyi verdiğini belirlemişlerdir. Enzim konsantrasyonunun daha da artmasıyla aktivitenin düştüğünü saptamışlar ve bu durumu bağların doymasıyla ilişkilendirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Topçular ve Ayhan (2008) da çapraz bağlama uygulamasında enzim konsantrasyonlarını 0.010 ila 0.1 mg/mL arasında denemişlerdir. Enzim aktivitesinin 0.05 mg/mL konsantrasyona kadar arttığını bu konsantrasyondan sonra ise aktivitenin düştüğünü belirlemişlerdir.



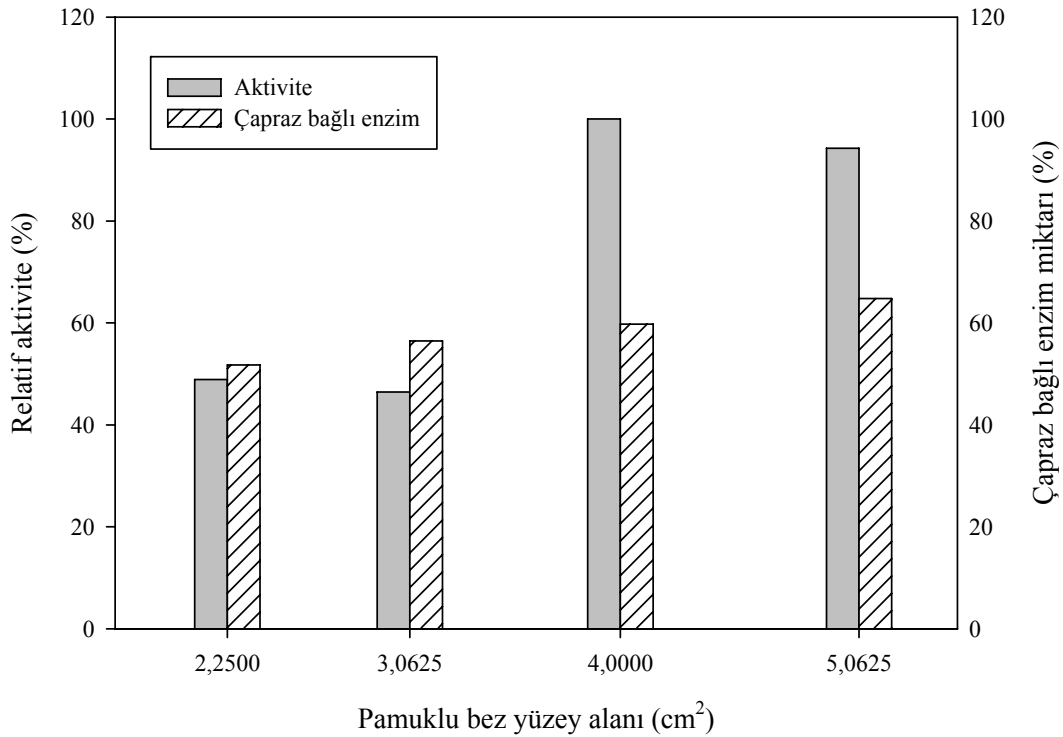
Şekil 4.3. Enzim konsantrasyonunun enzimin çapraz bağlanmasına etkisi

Araştırmamızın sonuçlarına göre relatif aktivitede düşüş kaydedilmemesine rağmen bağların doyuma ulaştığı görülmektedir. Burada enzim konsantrasyonunun 1100'den 1650 EU/mL'ye 1.5 kat artışına karşın aktivitede hemen hemen bir artış

olmaması nedeniyle immobilizasyon için uygun olan enzim konsantrasyonu 1100 EU/mL olarak seçilmiştir.

4.1.1.4. Pamuklu Bez Yüzey Alanının Çapraz Bağlamaya Etkisi

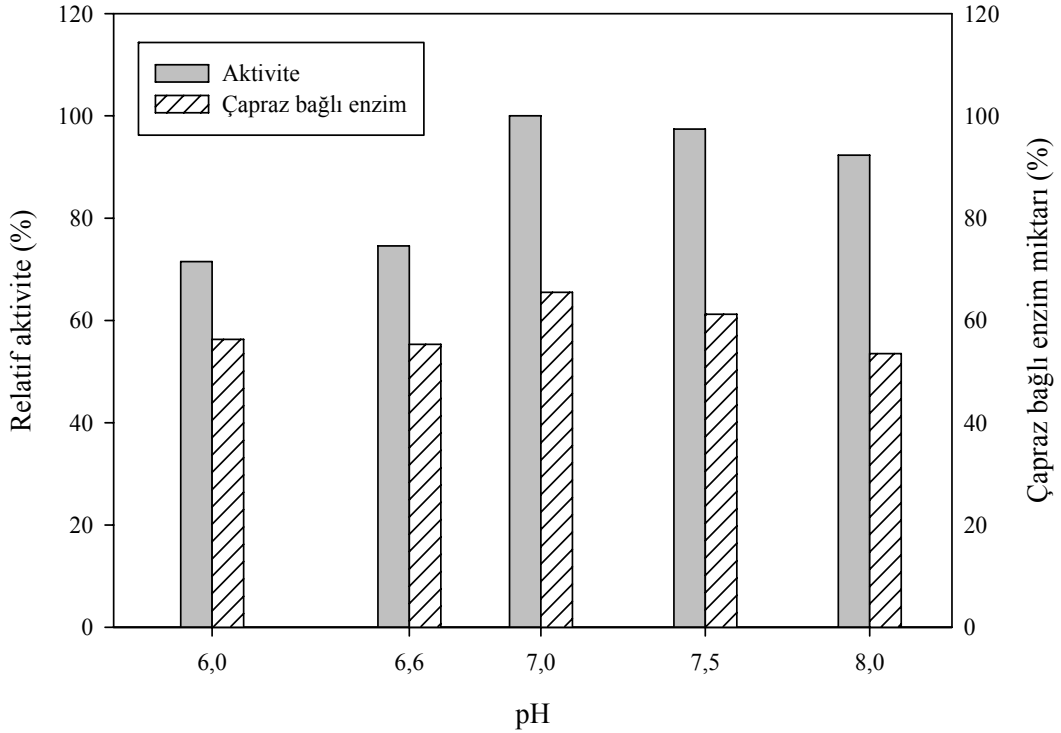
İmmobilizasyon için hazırlanan çözeltinin pamuklu beze emdirilmesi işleminde, hazırlanan çözeltiyi en çok emebilen ve yüksek aktivite sağlayan bez alanını belirlemek için kenar uzunluğu 1.5, 1.75, 2 ve 2.25 cm olan kare şeklinde pamuklu bez parçaları kullanılmıştır. Şekil 4.4.'de deneylere ait sonuçlar görülmektedir. Yüzey alanının artmasıyla çapraz bağlı enzim miktarı düzenli bir artış göstermiştir. Relatif aktivite bakımından yüzey alanının etkisi incelendiğinde 2.25 ve 3.0625 cm²'lik yüzey alanlarında aktivite %50'ye yaklaşırken, 4 cm²'lik alanda aktivite 2 kat artarak %100'e ulaşmıştır. Yüzey alanı 5.0625 cm²'ye çıktığında ise relatif aktivite biraz düşerek %92.26 olmuştur. Bu sonuçlar göz önünde tutulduğunda 4 cm²'lik pamuklu bez kullanılarak çapraz bağlama uygulamasının immobilizasyon için uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Bez yüzey alanının enzimin çapraz bağlanmasına etkisi

4.1.1.5. pH'nın Çapraz Bağlamaya Etkisi

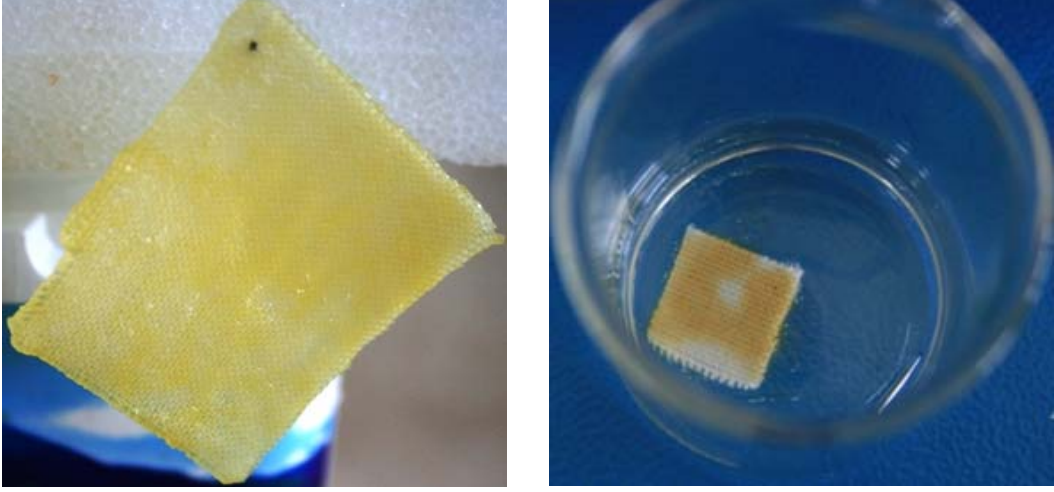
Çapraz bağlamaya pH'nın etkisi Şekil 4.5.'de verilmiştir. Hem relatif aktiviteye hem de çapraz bağlı enzim miktarı üzerine ortam pH'sının etkisi benzerlik göstermiştir. Şekil 4.5.'de görüldüğü üzere asidik pH'larda aktivite daha düşük, bazik pH'larda ise aktivite daha yüksek bulunmuştur. Ortam pH'sı 7.0 iken %100 relatif aktiviteye ve %65.49 çapraz bağlı enzim miktarına ulaşılmıştır. Bu nedenle pH'nın bu etkisi dikkate alınarak çapraz bağlama işleminde pH'nın 7.0'a ayarlanmasına karar verilmiştir. Çapraz bağlama üzerine pH etkisi denenmemesine karşın çeşitli araştırmalarda nötr bölgeye yakın pH'lar kullanılmıştır. Glutaraldehitte çapraz bağlama için Zhang ve ark. (2008), 7.3 pH, Topçular ve Ayhan (2008), 7.0 pH'da çalışmışlardır. Glutaraldehitin nötral pH'ya yakın bölgede amin gruplarıyla hızlı bir şekilde reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Migneault ve ark., 2004).



Şekil 4.5. pH'nın enzimin çapraz bağlanmasına etkisi

Bu sonuçlar çerçevesinde β -Gal'in çapraz bağlanmasında tercih edilen immobilizasyon parametreleri; BSA konsantrasyonu %20, glutaraldehit konsantrasyonu %1.2, enzim konsantrasyonu 1100 EU/mL, pamuklu bez yüzey alanı 4 cm² ve pH 7.0 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ilerleyen bölümlerinde bu parametreler esas alınarak

immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş, elde edilen çapraz bağlı enzimin çeşitli özellikleri test edilmiş ve GOS üretimindeki özellikleri incelenmiştir. Çapraz bağlı β -Gal'a ait fotoğraflar Şekil 4.6.'da görülmektedir.

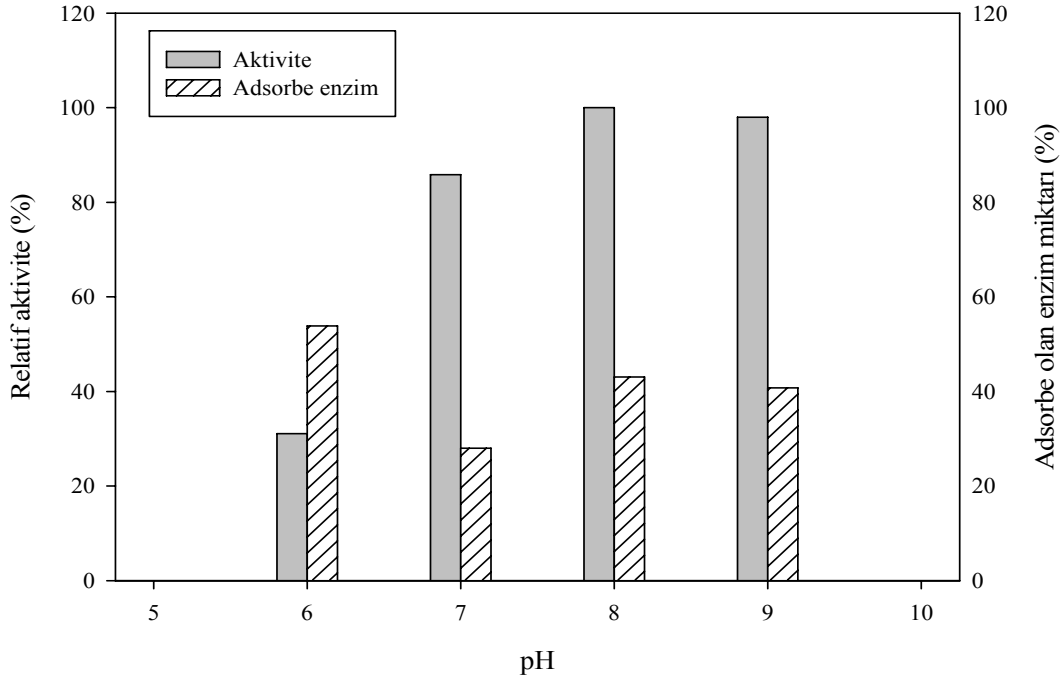


Şekil 4.6. Çapraz bağlı β -Galaktosidaz

4.1.2. Duolite XAD761'e Adsorbsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi

4.1.2.1. pH'nın Adsorbsiyona Etkisi

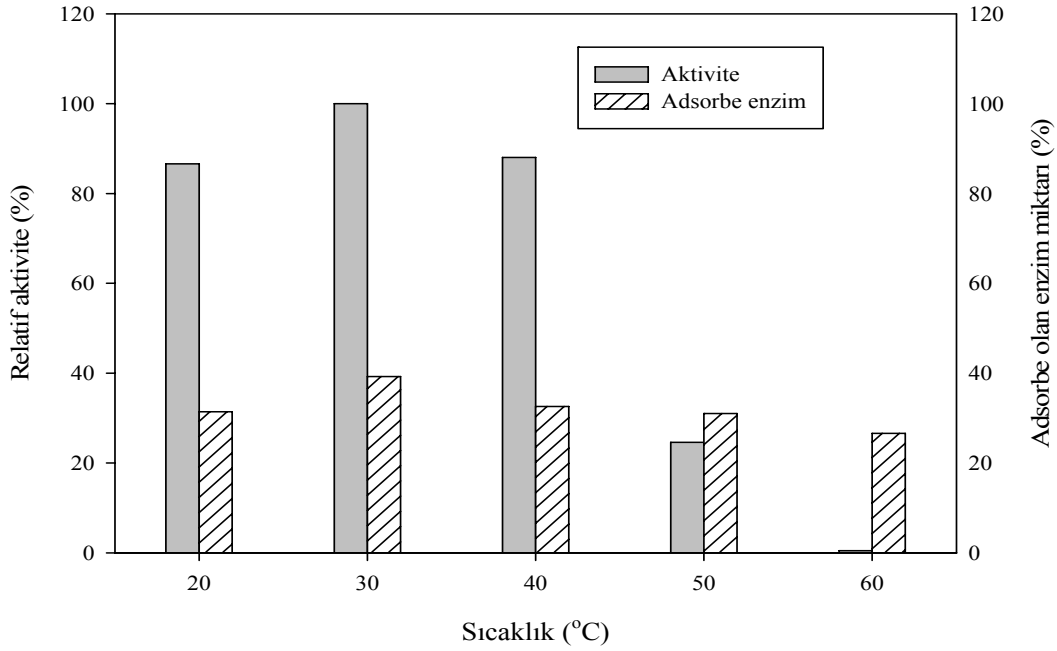
Enzimin Duolite XAD761'e adsorbe edilmesinde ortam pH'sının etkisi incelendiğinde bazik pH'larda aktivitenin yüksek olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.7.). pH 8.0 iken en yüksek aktiviteye ulaşılmıştır. Ortam pH'sı 6.0 olduğunda enzim adsorbsiyonu %53.9 ile en yüksek düzeyde olmasına karşın %31'lik en düşük relatif aktiviteye sahiptir. Boyacı (2001), glikozoksidaz enziminin immobilizasyonu için bir reçine olan Duolite A568'i kullanmıştır. Immobilizasyon şartlarını belirlemek için pH'nın etkisini 4.0 ile 8.0 aralığında incelediğinde maksimum aktivitenin 5.0 pH'da gözlemlendiğini ve bu pH'nın altında ve üstünde aktivitenin düştüğünü bildirmiştir. Guidini ve ark. (2010), yaptıkları çalışmanın bir bölümünde Duolite A568'e *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -Gal'ı immobilize etmek için 3.2 ile 5.6 pH'lar arasında cevap yüzey yöntemini kullanarak çalışmışlardır. Immobilizasyon için optimum pH değerini 4.5 olarak saptamışlardır. Ulaşılan bu sonuçlara göre yüksek aktivite ve adsorbe enzim miktarını sağlayan adsorbsiyon pH'sının 8.0 olması nedeniyle bu pH immobilizasyon için uygun görülmüştür.



Şekil 4.7. pH'nın enzimin XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi

4.1.2.2. Sıcaklığın Adsorbsiyona Etkisi

Adsorbsiyon işleminde enzimin Duolite XAD761'e tutunması ve enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkilerini incelemek için 20 ila 60 °C'ler arasında çalışmalar yürütülmüştür. Şekil 4.8.'de görüldüğü üzere 40 °C'ye kadar olan aralıkta %86'nın üzerinde aktivite elde edilmiştir. Sonrasında 50 °C ve üzerindeki sıcaklıkta adsorbe olan enzim miktarı %26.6'nın üzerinde olmasına karşın muhtemel denaturasyon nedeniyle aktivitede büyük bir düşüş gözlenmiştir. Yüksek aktivite ve %39,2'lik adsorbe enzim miktarını gerçekleştiren adsorbsiyon sıcaklığının 30 °C olması nedeniyle enzim adsorbsiyonu işleminde bu sıcaklık kullanılmıştır. Boyacı (2001), glikozoksidazın Duolite A568'e adsorbsiyon çalışmasında sıcaklığın immobilizasyona etkisini incelemiş, bu amaçla 20 ile 55 °C'ler arasında sıcaklıklarda işlemleri gerçekleştirmiştir. Optimum immobilizasyon sıcaklığını 35 °C olarak elde etmiştir. Bu sıcaklık değeri bizim sonucumuza benzerlik göstermektedir.



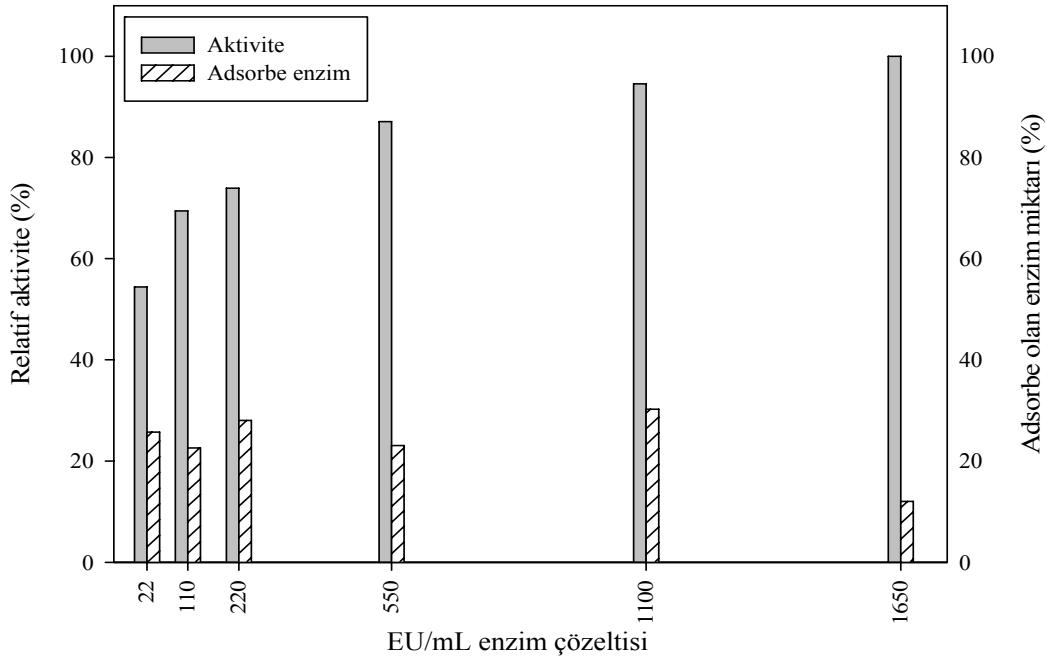
Şekil 4.8. Sıcaklığın enzimin XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi

4.1.2.3. Enzim Konsantrasyonunun Adsorbsiyona Etkisi

Enzim konsantrasyonunun adsorbsiyona etkisini incelemek için 22 ile 1650 EU/mL enzim çözeltisi konsantrasyonları arasında toplam 6 noktada analizler gerçekleştirilmiştir. Başlangıç enzim konsantrasyonunda %54 relatif aktivite elde edilmiştir (Şekil 4.9.). Enzim konsantrasyonu 220 EU/mL iken %74 aktivite ve %28 adsorbe enzim miktarı, 1100 EU/mL iken ise %94 aktivite ve %30 adsorbe enzim miktarı saptanmıştır. Burada enzim konsantrasyonunun 5 kat artmasına karşın aktivitede 1.27 katlık bir artış olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı fazla enzim kullanımına gerek kalmadan etkili aktivite ve adsorbe enzim düzeyini ortaya koyan 110 EU/mL konsantrasyonunun immobilizasyon için uygun olduğu düşünülmüştür.

Boyacı (2001), enzim konsantrasyonunun adsorbsiyona etkisini incelemek için 0.05 ile 2.0 mg/mL konsantrasyonları arasında denemeler gerçekleştirmiş ve elde ettiği sonuç bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Yine Bayramoğlu ve ark. (2007), *E. coli* kaynaklı β -Gal'ı manyetik beadlere adsorbe etmişler ve enzim konsantrasyonunun immobilizasyona etkisini 0.1 ila 1 mg enzim/mg bead konsantrasyonları arasında incelediklerinde bizim grafiğimizde elde ettiğimize benzer bir eğri oluştuğunu saptamışlardır. Guidini ve ark. (2010) da 6 ila 26 g/L β -Gal konsantrasyonları arasındaki enzim konsantrasyonunun immobilizasyona etkisini incelemişler ve yüksek

konsantrasyona doğru aktivitede hafif bir azalma tespit etmişlerdir. Bizim grafiğimizdeki eğri de bu araştırmacılarınkine benzerlik göstermektedir. Araştırmamızın ve diğer araştırmacıların sonuçlarından da anlaşılacağı üzere adsorbsiyon ile β -Gal immobilizasyonunda konsantrasyon artışıyla enzim aktivitesi artmakta ve belirli bir noktadan sonra aktivite artık sabitlenmektedir. Bu dönüm noktasındaki enzim konsantrasyonunun immobilizasyonda tercih edildiği görülmektedir.

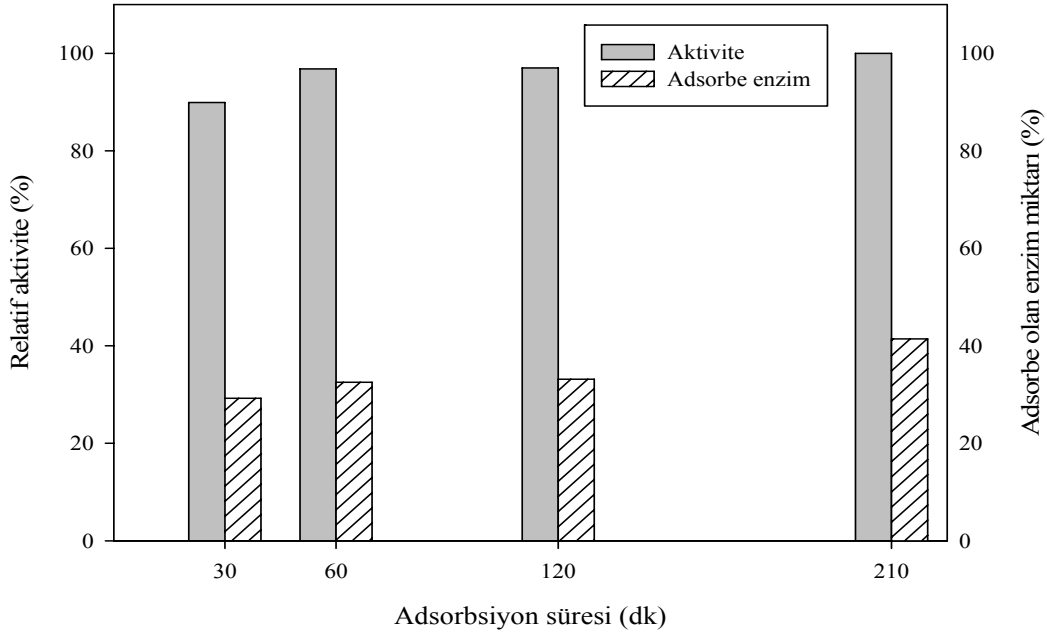


Şekil 4.9. Enzim konsantrasyonunun enzimin XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi

4.1.2.4. İmmobilizasyon Süresinin Adsorbsiyona Etkisi

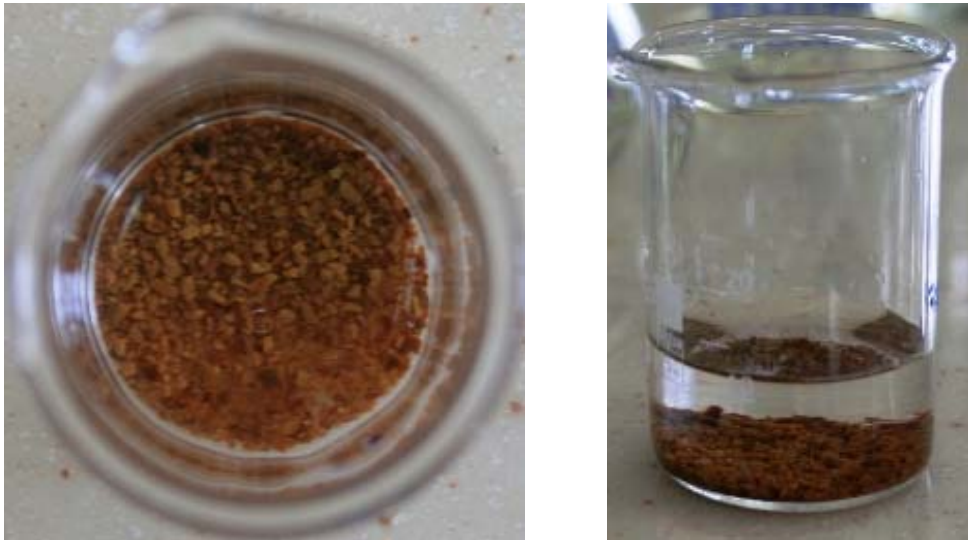
İmmobilizasyon süresinin adsorbsiyona etkisi 30 ila 210 dakika aralığında test edilmiştir. Şekil 4.10.'da görüldüğü üzere 30. dakikada %90 olan aktivite 60. dakikada %97'ye yükselmiş bu süreden sonra relatif aktivite yatay bir seyir izlemiştir. Adsorbsiyon süresinin 60 dakika olarak seçilmesinin uygun olduğu düşünülmüştür.

Boyacı (2001), glikozoksidazın adsorbsiyonu için immobilizasyon süresini 300 dakikaya kadar incelemiş ve 210 dakikaya kadar enzim aktivitesinde bir artışın olduğunu ve bundan sonra aktivite değerlerinin çok değişmediğini belirlemiştir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda aktivite daha kısa sürede sabitlenmiştir.



Şekil 4.10. İmmobilizasyon süresinin enzimin XAD761'e adsorbsiyonuna etkisi

β -Gal'm Duolite XAD761'e adsorbsiyonu için tercih edilen immobilizasyon şartları; pH 8.0, sıcaklık 30 °C, enzim konsantrasyonu 110 EU/mL ve süre 60 dakika olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu parametrelere bağlı olarak Duolite XAD761'e adsorbe edilen enzimin çeşitli kinetik özellikleri değerlendirilmiş ve GOS üretim parametreleri incelenmiştir. Elde edilen immobilize β -Gal'a ait fotoğraflar Şekil 4.11.'de görülmektedir.

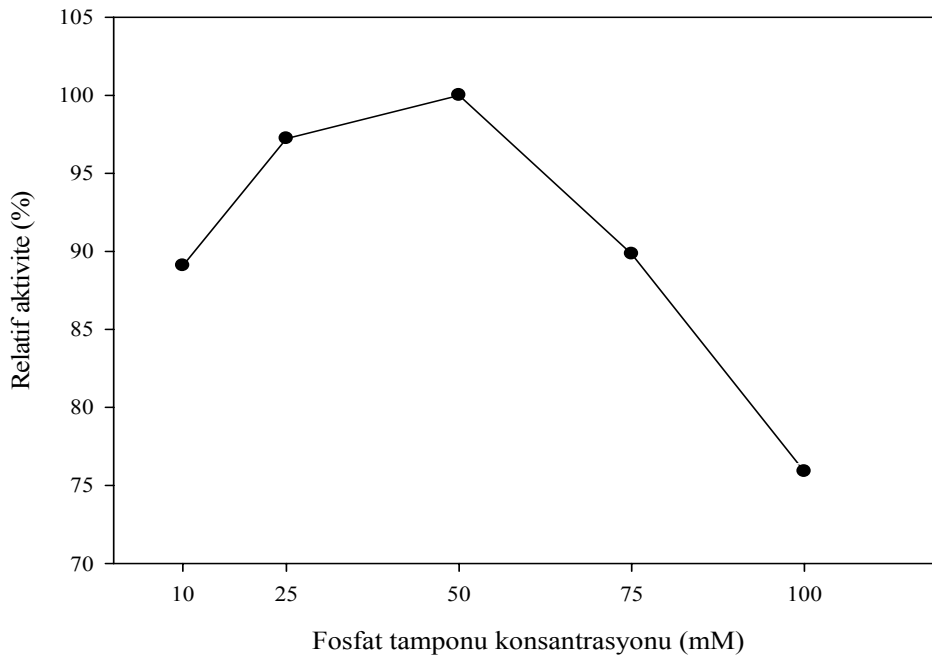


Şekil 4.11. Duolite XAD761'e adsorbe β -Galaktosidaz

4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

4.2.1. Tampon Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzim aktivitesi üzerine fosfat tamponunun etkisini incelemek için 10-100 mM konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Deney sonuçları Şekil 4.12.'de görülmektedir. Başlangıç konsantrasyonunda %89 olan relatif aktivite tampon konsantrasyonu 50 mM'a çıktığında %100'e ulaşmış ve daha sonra da hızla düşüş göstermiştir. Buradan β -Gal için uygun tampon konsantrasyonunun 50 mM olduğu belirlenmiştir. Alagöz (2007), *K. lactis* kaynaklı β -Gal (Lactozym 3000 L HPG) ile yaptığı çalışmada β -Gal aktivitesini laktozun parçalanmasına göre ölçmüş ve tampon konsantrasyonunun etkisini 50-150 mM aralığında denemiştir. Deneylein sonucunda 100 mM tampon konsantrasyonunun en yüksek aktiviteyi verdiğini saptamıştır. Kim ve ark. (1997), Sigma firmasından temin ettikleri *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile laktoz ve ONPG substratlarını kullanarak substratların hidrolizlerindeki farklılıkları araştırmışlar ve çalışmalarının bir aşamasında tampon (potasyum fosfat) konsantrasyonunun etkisini gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara bakıldığında iki substrat için farklı tampon konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde etmişlerdir. Bu değerler laktoz için 40 mM, ONPG için 80 mM'dır.

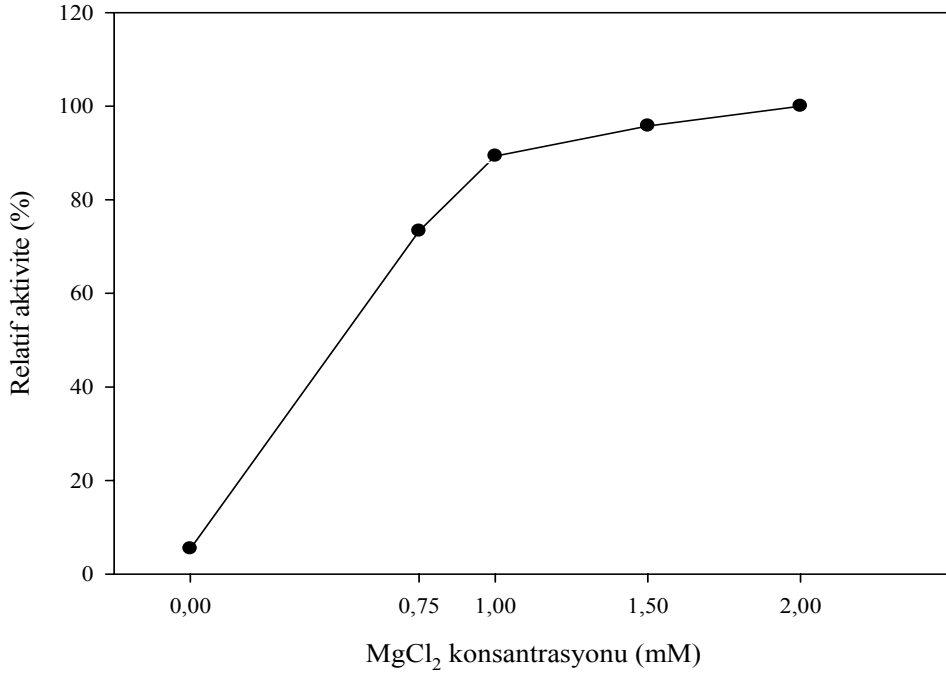


Şekil 4.12. Tampon konsantrasyonunun serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.2.2. MgCl₂ Konsantrasyonunun Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Fungal β -Gal'lar herhangi bir iyonla gerek olmadan aktivite sağlarken, maya kaynaklı β -Gal'lar aktivite verebilmeleri için Mn^{+2} , Mg^{+2} , K^+ gibi iyonlara ihtiyaç duymaktadırlar (Mlichova ve Rosenberg, 2006). Araştırmamızda kullanılan β -Gal'in maya kaynaklı olması nedeniyle enzimden aktivite elde edebilmek için Çizelge 3.5.'deki literatürde çoğunlukla kullanıldığı görülen ve Mg^{+2} kaynağı olan $MgCl_2$ seçilmiş ve uygun konsantrasyonun belirlenmesi için denemeler yapılmıştır.

Serbest enzim aktivitesi üzerine $MgCl_2$ konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.13.'de görülmektedir. $MgCl_2$ içermeyen tamponda %5.41'lik aktivite veren β -Gal 1 mM $MgCl_2$ konsantrasyonuna kadar relatif aktivitede hızlı bir artış göstermiştir. Ancak sonra enzim aktivitesinde artış yatay seyretmeye başlamıştır. $MgCl_2$ konsantrasyonu 2 mM olduğunda deneme şartları içinde relatif aktivitenin maksimum olduğu belirlenmiştir. $MgCl_2$ konsantrasyonu 1.5 mM iken relatif aktivite %95.8'tir ve maksimum aktiviteye yakın olduğundan çalışmalarımızın başında belirlemiş olduğumuz aktivite analizlerindeki 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu, sonraki deneylerde de çalışılmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.13. $MgCl_2$ konsantrasyonunun serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uwajima ve ark. (1972), *Saccharomyces fragilis*'ten saflaştırdıkları β -Gal'in Mg^{+2} iyonu için verdiği aktiviteleri ölçmüşler ve 10^{-6} mM konsantrasyonunda %20 civarında belirledikleri relatif aktivitenin 1 mM'a geldiğinde %100'e çıktığını ve daha yüksek konsantrasyonlarda aktivitenin neredeyse sabit kaldığını gözlemlemişlerdir. Dickson ve ark. (1979) da *K. lactis*'ten izole edip saflaştırdıkları β -Gal'in 0.5-7.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu aralığında maksimum aktivite verdiğini bildirmişlerdir. Bu iki araştırıcının sonuçları bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

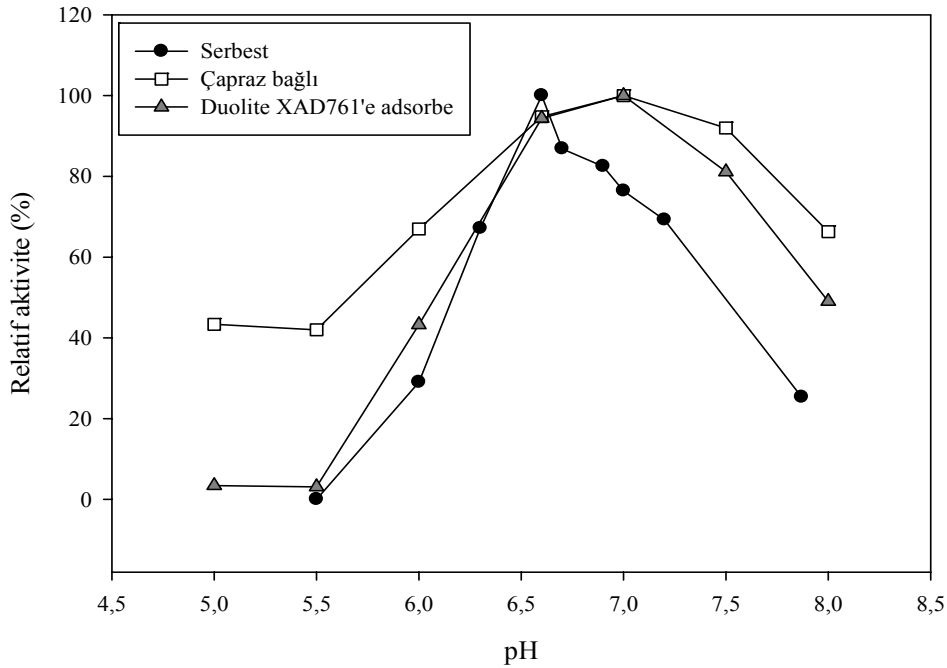
Deneyler sonucunda serbest β -Gal için tercih edilen tampon ve $MgCl_2$ konsantrasyonu değerleri immobilize enzimlerde de çalışmanın ilerleyen bölümlerinde kullanılmıştır.

4.2.3. pH'nın Serbest ve İmmobilize Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri pH'dır. Enzimlerin büyük çoğunluğunun protein yapıda olmaları nedeniyle pH'ya bağlı olarak üzerlerindeki toplam yük durumunun değişmesi proteinin yapısında ve enzimin aktif bölgesinde değişimlere neden olmaktadır. Ayrıca immobilizasyon uygulamasıyla da benzer değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu etkiler göz önüne alındığında serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'larında değişiklik oluşabilmektedir.

Serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine pH'nın etkisini incelemek için serbest enzimde 5.5-7.9 pH aralığında, çapraz bağlı ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerde ise 5.0-8.0 pH aralığında deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14.'de görülmektedir. Serbest enzimde 5.5 pH'da relatif aktivite 0 iken, immobilizasyonun etkisi nedeniyle 5.0 ve 5.5 pH'larda, Duolite XAD761'e adsorbe enzimde %3'ün, çapraz bağlı enzimde ise %42'nin üstünde relatif aktivite elde edilmiştir. Serbest enzimde optimum pH 6.6 iken, her iki immobilize enzimde optimum pH'nın 7.0'a kaydığı saptanmıştır. Çapraz bağlı enzimdeki daha geniş olmakla birlikte immobilize enzimlerin pH eğrileri serbest enziminkine göre daha genişlemiştir. Bu etki immobilize enzimlerin pH değişiminden daha az etkilendiğinin bir göstergesidir ve reaksiyon ortamında immobilize enzimlerin pH açısından kontrolünü kolaylaştırmaktadır. Çeşitli araştırmacıardan elde edilen veriler ışığında *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragilis* kaynaklı serbest β -Gal'lara ait optimum çalışma pH'larının 6.5-7.3 arasında değiştiği ve 5.0-5.5 pH'lar arasında enzimin aktivitesinin tamamını ya da büyük bir kısmını yitirdiği görülmektedir (Uwajima ve ark., 1972;

Dickson ve ark., 1979; Santos ve ark., 1998; Zhou ve Chen, 2001b; Roy ve Gupta, 2003; Samoshina ve Samoshin, 2005; Alagöz, 2007; Zhang ve ark., 2008; Güleç, 2009). Maya kaynaklı enzimlerin izoelektrik noktaları farklı araştırmacılar tarafından 4.4 ve 5.42 olarak bildirilmiştir (Zhou ve Chen, 2001b; Samoshina ve Samoshin, 2005). Ortam pH'sının 5.5'in altına inmesiyle enzimin izoelektrik noktasına yaklaşıldığı ve bundan dolayı aktivitenin düştüğü belirtilmiştir (Zhou ve Chen, 2001b).



Şekil 4.14. pH'nın serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkisi

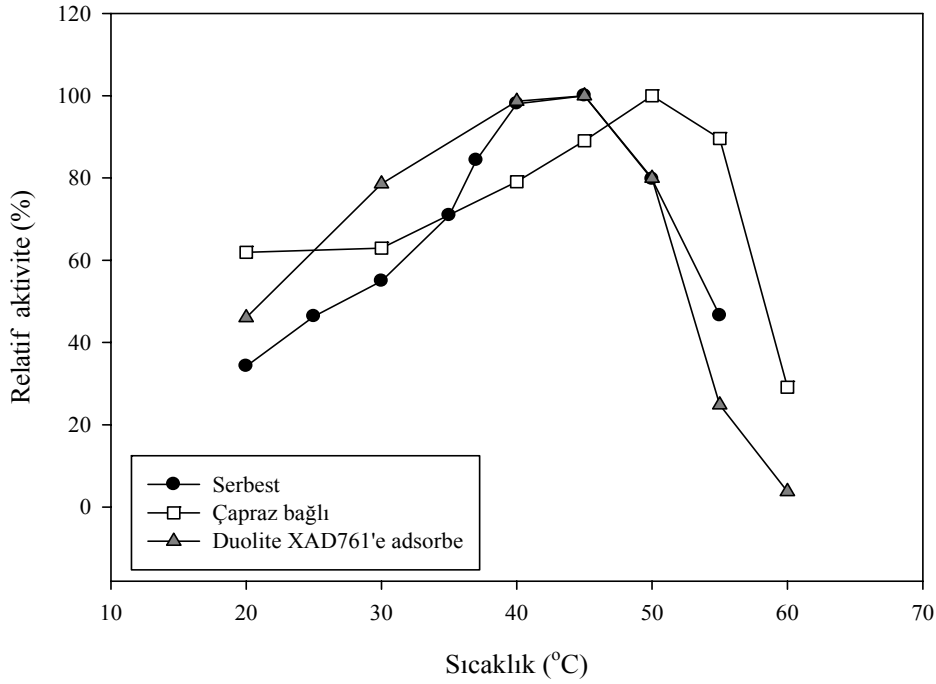
Kluyveromyces spp. kaynaklı β -Gal ile yapılmış olan immobilizasyon çalışmalarında optimum pH değerinin genellikle bazik pH'ya doğru kaydığı gözlenmektedir. Örnek olarak; Zhou ve Chen (2001b), β -Gal'ı pamuklu beze glutaraldehit ile çapraz bağlamışlar ve optimum pH'nın 6.6'dan 7.7'ye, yine benzer şekilde Roy ve Gupta (2003), epiklorhidrin kullanarak β -Gal'ı (Lactozym) selüloz beadlere bağlamışlar ve optimum pH'nın 6.5'den 7.0'ye kaydığını saptamışlardır. Özellikle bu sonuçlar çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Zhang ve ark. (2008), β -Gal'ı manyetik kompozit mikroküreciklere immobilize etmişler ve serbest enzim için optimum pH'yı 7.3, immobilize enzim için ise 8.3 olarak belirlemişlerdir. Bunların aksine Güleç (2009), Lactozym'i modifikasyona uğratılan selüloz asetat üzerine polietilenimin ile tutuklamış ve optimum pH'nın 7.0'dan 6.5'e (asidik bölgeye) kaydığını tespit etmiştir.

β -Gal ile reaksiyon sonucunda asidik karakterli bir ürünün oluşmamaktadır. Bu sonuç göz önüne alındığında çalışmamızda immobilize β -Gal'lara ait optimum pH değerlerinin bazik bölgeye hareket etmesi enzimlerin üzerindeki yük dağılımının immobilizasyon işleminden etkilendiğini göstermektedir. Özellikle çapraz bağlama işleminde β -Gal'ın glutaraldehit ile BSA'ya bağlanmasında enzim üzerindeki reaktif grupların bağlandığı ve net yükün değiştiği söylenebilir. Ayrıca BSA üzerinde bulunan glutaraldehit ile bağlanmamış serbest amin gruplarının H^+ 'leri enzim mikro çevresinden koruduğu ve enzimin pH değişimlerine bu nedenle daha dayanıklı olduğu düşünülmektedir. Duolite XAD761 anyonik ya da katyonik bir reçine değildir. Fonksiyonel grubu başlıca fenol grubundan oluşmaktadır. Ortam pH'sının değişmesiyle reçine yüzeyine adsorbe olan enzimin, reçinedeki fonksiyonel gruplar tarafından etkilendiği β -Gal üzerinde bir değişimin olduğu düşünülmekte, fakat bunun diğer immobilizasyon yöntemine göre kuvvetli bir etki göstermediği görülmektedir.

4.2.4. Sıcaklığın Serbest ve İmmobilize Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Enzimlerin katalitik aktivitesi sıcaklık artışına bağlı olarak artış göstermekle beraber enzimin, protein yapısında olması nedeniyle yüksek sıcaklıklarda meydana gelen ısı denaturasyon aktivitenin azalmasına ve hatta hiç aktivite göstermemesine sebep olmaktadır.

Serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi Bölüm 3.2.3.4. ve 3.2.4.2.'de verildiği gibi serbest enzim için 20-55 °C, immobilize enzimler için de 20-60 °C aralığında çalışılmıştır. Serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimin 20 °C'de sırasıyla %34.3 ve %46.1'den başlayan relatif aktivite değerleri 40 °C'de her iki enzim için %98'in üstüne, 45 °C'de ise %100'e ulaşmıştır (Şekil 4.15.). Buradan serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerin optimum çalışma sıcaklığının 40-45 °C aralığında olduğu belirlenmiştir. Çapraz bağlı enzimin relatif aktivitesi 20 °C'de %62 gibi yüksek bir değer göstermiş ve 30 °C'ye kadar yatay seyretmiş, 30 °C'den 50 °C'ye kadar ise artmıştır. Çapraz bağlı enzim için optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiş ve 60 °C'de bile analiz koşullarında %29.1 aktivite sağlayabilmiştir. Buradan enzimin çapraz bağlanarak immobilizasyonunun daha geniş aralıkta ve yüksek sıcaklıkta çalışmaya uygun olduğu görülmektedir.

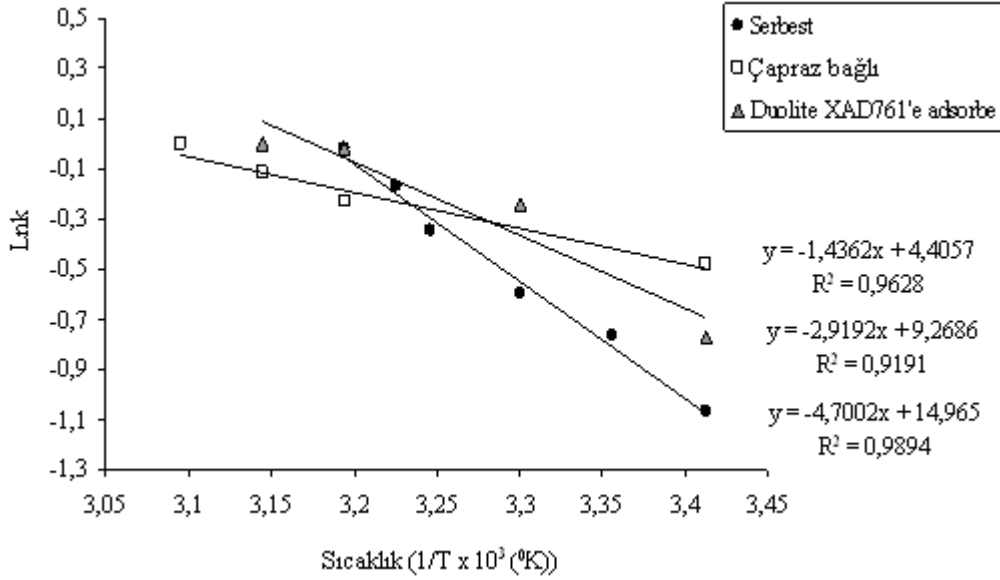


Şekil 4.15. Sıcaklığın serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkisi

Kluyveromyces spp. kaynaklı serbest β -Gal'a ait optimum sıcaklık değerleri 37-50 °C arasında değişmektedir (Uwajima ve ark., 1972; Zhou ve Chen, 2001b; Roy ve Gupta, 2003; Alagöz, 2007; Zhang ve ark., 2008; Güleç, 2009). Genellikle immobilizasyon işleminin ardından *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'ların optimum sıcaklık değerleri 5-10 °C civarında artış göstermekte ve bu değer üstüne çıktığında ise hızlı bir aktivite kaybı meydana gelmektedir. Bu sonuçların alındığı çeşitli araştırmalar şunlardır; Zhou ve Chen (2001b)'in araştırmasında çapraz bağlama uyguladıkları β -Gal'ın optimum sıcaklık değerinin 40'dan 50 °C'ye yükseldiği, Güleç (2009)'in immobilizasyon uygulamasının da aynı sonucu verdiği, Zhang ve ark. (2008)'nin β -Gal'ı, manyetik kompozit mikroküreciklere immobilize etmesiyle optimum çalışma sıcaklığının 37'den 42 °C'ye yükseldiği bildirilmiştir. Literatürdeki bu sonuçların çalışmamızdaki çapraz bağlı enzim sonuçlarına benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bunların dışında Roy ve Gupta (2003), Lactozym'i selüloz beadlere immobilize ettiklerinde serbest ve immobilize enzim için optimum çalışma sıcaklığının değişmediğini ve bu sıcaklığın 50 °C olduğunu belirlemişlerdir. Bu da Duolite XAD761'e adsorbe enzim için elde edilen sonuca benzerlik göstermektedir.

Enzimlere ait aktivasyon enerjilerinin (E_a) belirlenmesi için Arrhenius grafiği (Şekil 4.16.) kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre serbest enzim için E_a 39 kJ/mol

olarak bulunmuşken, bu değer çapraz bağlı enzim için 11.94 kJ/mol, Duolite XAD761'e adsorbe enzim için ise 24.27 kJ/mol olarak saptanmıştır. İmmobilize enzimlerde E_a değerinin düştüğü görülmüştür.



Şekil 4.16. Serbest ve immobilize enzimlere ait Arrhenius grafiği

Matioli ve ark. (2001), Lactozym ile yaptıkları bir araştırmada enzimin E_a 'ni 39.81 kJ/mol olarak saptamışlardır. Neri ve ark. (2008), *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal'ı, polisiloksan-polivinil alkolle oluşturdukları manyetik parçacıklara immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyonla birlikte E_a 'nin düştüğünü saptamışlardır. Serbest ve immobilize enzim için E_a 'ni sırasıyla 32.6 ± 5.8 ve 25.5 ± 8.7 kJ/mol olarak belirlemişlerdir. Jurado ve ark. (2002), Lactozym için E_a 'ni 46.9 kJ/mol olarak tespit etmiştir. Bu araştırma sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Yine benzer şekilde Güleç (2009), Lactozym'in serbest formu için E_a 'ni 201, immobilize form için ise 102 kJ/mol bulmuştur. İmmobilizasyonla birlikte düşüş görülmesine karşın E_a değerleri çalışmamızdaki sonuçların çok üstündedir. Bunların dışında bazı araştırmalarda immobilizasyonun E_a 'de artış meydana getirdiği saptanmıştır. Buna örnek olarak; nohutdan elde edilen β -Gal farklı şekilde modifikasyon uygulanmış iki D202 reçinesine immobilize edilmiş ve serbest β -Gal için E_a , 41.6 kJ/mol, immobilize β -Gal'lar için ise 60.0 ve 71.02 kJ/mol olarak hesaplanmıştır (Tu ve ark., 1999).

Yüksek E_a 'nin, küçük bir sıcaklık artışıyla reaksiyonda söz konusu olan bileşiğin daha hızlı ürüne dönüşmesine neden olduğu bildirilmektedir (Özkan ve ark., 2010). İmmobilize enzimlerde elde edilen düşük E_a 'nin sıcaklık artışı karşısında ürün oluşumunun hızını pek artırmadığı Şekil 4.15.'de elde edilen geniş eğrilerden de anlaşılmaktadır. İmmobilize edilen enzimlerde enzimle taşıyıcı arasında oluşan bağların durumu enzim konformasyonunu stabil hale getirmektedir. Böylece sıcaklık değişimlerine karşı daha dayanıklı bir yapı oluşmaktadır (Telefoncu, 1997). Özellikle kimyasal bağlanmanın gerçekleştiği çapraz bağlı enzimin konformasyonundaki stabilite elde edilen sonuçları açıklamaktadır. Bunun yanında Duolite XAD 761'e adsorbe edilen enzim de ise fiziksel adsorbsiyon olduğu ve serbest enzime benzer sonuçların alınması da enzim konformasyonunu etkileyecek düzeyde kuvvetli bir kimyasal bağ oluşmadığını göstermektedir.

4.2.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Kinetik Katsayıları

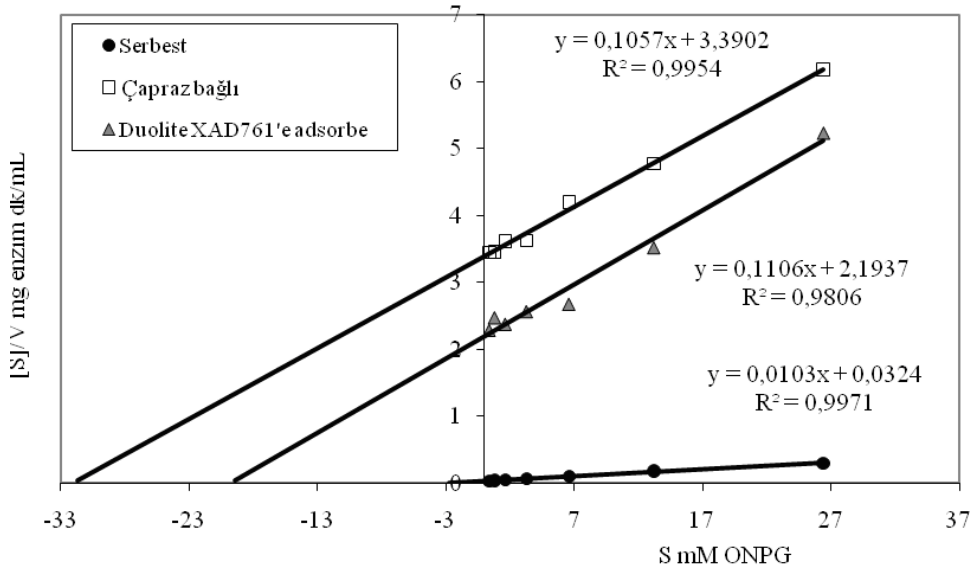
İmmobilizasyon sonucunda enzimin yapısında ve etrafında meydana gelen değişiklikler kinetik davranışlar üzerine etki etmektedirler. Elde edilecek olan V_{max} ve K_m değerleri immobilizasyonun ne şekilde etki gösterdiğini belirtmesi bakımından önemlidir. Bu yüzden 0.4125 ile 26.4 mM ONPG konsantrasyonu aralığında Bölüm 3.2.3.5.'de verilen yöntemle göre serbest ve immobilize enzimlerin en yüksek aktivite verdikleri sıcaklık ve pH ortamında deneyler yapılmış ve Hanes-Woolf doğrusallaştırması kullanılarak kinetik katsayılar elde edilmiştir. Enzimlere ait Hanes-Woolf grafiği Şekil 4.17.'de, kinetik katsayılar ise Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize enzimlere ait kinetik katsayılar

	Serbest enzim	Çapraz bağlı enzim	Duolite XAD761'e adsorbe enzim
V_{max} *	97.08	9.46	9.04
K_m **	3.15	32.07	19.83

* $\mu\text{mol ONP/dk/mg enzim}$

** mM



Şekil 4.17. Hanes-Woolf modeli ile açıklanan serbest ve immobilize enzimlerin kinetik davranışları

Serbest enzimin V_{max} değeri $97.08 \mu\text{mol ONP/dk/mg}$ enzim ve K_m değeri 3.15 mM olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonla birlikte çapraz bağlı ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerde V_{max} değerleri yaklaşık 10 katlık düşüş göstermiş ve sırasıyla 9.46 ve $9.04 \mu\text{mol ONP/dk/mg}$ enzim olarak saptanmıştır. K_m değerlerine bakıldığında ise çapraz bağlı enzimde serbest enziminkine göre yaklaşık 10 katlık bir artışla 32.07 mM , Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 6.3 katlık bir artışla 19.83 mM olarak belirlenmiştir.

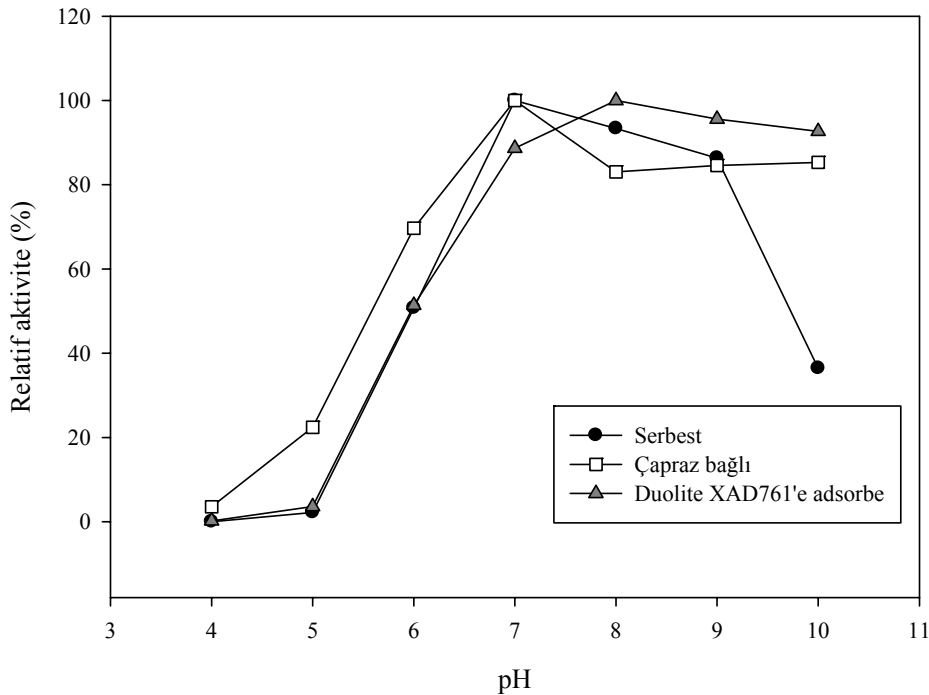
Samoshina ve Samoshin (2005), laktoz ve ONPG ya da PNPG kullanımının Michealis sabiti üzerine etkisini incelemiştir. Birçok araştırma sonucunu değerlendirerek elde ettiği MCR (Michealis sabiti oranı) (K_m laktoz / K_m ONPG ya da PNPG) sonuçlarında MCR'ni fungal kaynaklı β -Gal için 35 ± 3 , maya kaynaklı β -Gal'lar için ise 10 ± 1.5 olarak tespit etmiştir. Buradan görüldüğü üzere ölçüm yapılan substratın, K_m değeri üzerine etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Enzim kaynakları ve analiz şartlarından kaynaklanan faktörler de hesaba katıldığında K_m değerinin karşılaştırılmasında benzer mikroorganizma kaynağının kullanılması ve substratın ONPG olduğu literatürün kullanımını gerektirmektedir. Buradan hareketle *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'lar için elde edilmiş K_m değerleri belirli çalışmalarda 1.61 - 2.0 mM aralığında (Dickson ve ark., 1979; Cavaille ve Combes, 1995; Giacomini ve ark., 1998; Giacomini ve ark., 2001; Zhou ve Chen, 2001a; Zhou ve Chen, 2001b; Roy ve Gupta, 2003), bazı çalışmalarda da 3.6 ve 4.0 mM olarak (Uwajima ve ark., 1972; Mateo ve ark., 2004)

tespit edilmiştir. Araştırmamızda serbest β -Gal için tespit ettiğimiz K_m değeri literatüre uygunluk göstermektedir. Yine, Samoshina ve Samoshin (2005), *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'lar için K_m değerlerini 1.18-5.0 mM olarak vermiştir. V_{max} değeri bir çok araştırmada 77.5 μ mol ONP/dk/mg enzim (Cavaille ve Combes, 1995; Zhou ve Chen, 2001a; Zhou ve Chen, 2001b; Roy ve Gupta, 2003) olarak belirlenmiş, bunların dışında bazı araştırmalarda bizim çalışmamıza benzer şekilde 91 μ mol ONP/dk/mg enzim (Giacomini ve ark., 1998; Giacomini ve ark., 2001) olarak tespit edilmiştir.

İmmobilizasyon uygulamasıyla enzime ait kinetik parametrelerde değişme saptanmayan araştırma sonuçları da mevcuttur (Mateo ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2008; Neri ve ark., 2008). Bunların aksine, bazı araştırmalarda genel olarak immobilizasyon sonrasında V_{max} değerinde azalma (1.4-8850 kat) K_m değerinde ise artış (1.9-6.5 kat) belirlenmiştir (Giacomini ve ark., 1998; Giacomini ve ark., 2001; Zhou ve Chen, 2001a; Zhou ve Chen, 2001b; Roy ve Gupta, 2003; Bayramoğlu ve ark., 2007; Güleç, 2009). K_m değeri, enzimin substratına ne kadar ilgisi olduğunu göstermektedir. K_m değerinin artması enzimin substratına olan ilgisinin azalması anlamına gelmektedir. Bu durumda V_{max} değerinin azalması kaçınılmazdır. İmmobilizasyonla birlikte enzim ve substrat arasındaki etkileşimler ve difüzyondaki sınırlamalar nedeniyle K_m 'de artış meydana gelebilmektedir. Difüzyon sınırlaması dış ve iç difüzyon olarak ele alınmakta ve dış difüzyon sınırlaması immobilize enzimin dışındaki hareketsiz tabakadan (Nerst tabakası) kaynaklanmaktadır ve karıştırma ile kısmen azaltılabilir. Fakat matris bir ağ içindeki immobilize enzimlerde iç difüzyon sınırlaması problem yaratmaktadır (Telefoncu, 1997; Giacomini ve ark., 2001; Zhou ve Chen, 2001a). Zhou ve Chen (2001b), benzer etkiyle karşılaşmışlar ve ilk olarak difüzyon sorunu nedeniyle substratın enzime ulaşmasındaki güçlükler dikkat çekmişlerdir. Çözüm olarak substrat konsantrasyonunun artırılmasının uygun olacağını bildirmişlerdir. Bu etkinin ikinci nedeni olarak çapraz bağlamayla enzimin aktif bölgesinin bloke olmasını göstermişlerdir. Ayrıca Bayramoğlu (2007), manyetik beadlere immobilize ettiği β -Gal için benzer sonuçlar elde etmiş ve bunun sebeplerinin taşıyıcının enzim konformasyonunu değiştirmiş olmasından ya da yapısal engelleme olmasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Çapraz bağlı enzimin K_m değerinin çok yüksek çıkması bu şekilde açıklanabilir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimde de benzer etkilerin görüldüğü düşünülmektedir.

4.2.6. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin pH Stabilitesi

Bölüm 3.2.3.6.'da verilen yönteme göre 4-10 pH aralığındaki tamponlarda oda sıcaklığında 18 saat bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin kalan aktiviteleri ölçülerek pH stabilitesi belirlenmiştir. Şekil 4.18'de serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimin nötr pH'ya kadar benzer bir dayanım gösterdiği, fakat serbest enzimin maksimum dayanım gösterdiği pH'nın 7.0 olmasına karşın Duolite XAD761'e adsorbe enzimde bu pH'nın 8.0 olduğu görülmektedir. Serbest ve immobilize enzimlerin asidik pH'larda stabilitesinin genelde düşük olduğu, fakat çapraz bağlı enzimin diğerlerine göre asidik koşullara daha dayanıklı olduğu ve en yüksek dayanımının pH 7.0'da ortaya çıktığı Şekil 4.18.'de görülmektedir. Serbest enzimle kıyaslandığında stabilite açısından bazik ortamların immobilize enzimler için daha uygun olduğu ortaya çıkmıştır. Serbest enzimde pH 9.0'dan sonra stabilite büyük oranda azalmış ve relatif aktivite %36.4'e düşmüştür. İmmobilize enzimlerde pH 8.0'dan sonra çok fazla bir değişim görülmemiştir.



Şekil 4.18. Serbest ve immobilize enzimlerin pH stabilitesi

Güleç (2009), modifikasyona uğratılan selüloz asetat üzerine Lactozym'i polietilenimin ile tutukladığı çalışmasında serbest ve immobilize enzim için pH stabilite değerlerini bizim serbest ve çapraz bağlı β -Gal için bulduğumuz sonuçlara benzer

olarak 7.0 pH şeklinde gözlemlenmiştir. Yalnız 7.0 pH'dan sonra aktivite kaybının hızlı olduğu göze çarpmaktadır. Tu ve ark. (1999), nohuttan (*Cicer arietinum*) elde etikleri β -Gal'ı iki farklı biçimde immobilize ettikleri çalışmada, pH stabilitesi denemelerinde serbest enzimin 3.5-6.5 pH aralığında stabil olduğunu, birinci immobilizasyon işleminin diğer immobilizasyon metoduna göre daha iyi bir stabilite ortaya koyarak 3.0-7.0 pH aralığında dayanıklı olduğunu ve ikinci immobilizasyon metondunda ise bu aralığın diğerlerine nazaran daha bazik bölgeye kayarak immobilize enzimin 6.0-10.0 pH aralığında dayanıklılık kazandığını belirtmişlerdir. Batra ve ark. (2005), *Bacillus coagulans*'dan elde edilen β -Gal'ı hem DEAE ile hem de kalsiyum aljinat jeli ile immobilize etmişler ve pH stabilitesini incelediklerinde kalsiyum aljinat ile immobilize etikleri β -Gal'ın 6.0-12.0 pH aralığında yüksek dayanım gösterdiğini tespit etmişlerdir. Diğer β -Gal'lar için sonuçları incelediklerinde serbest β -Gal'ın 6.0-10.0 aralığında stabil kaldığını, fakat DEAE ile immobilize edilen β -Gal'ın 6.0-7.0 aralığında stabilitesini koruduğunu ve bazik bölgeye doğru stabilitede çok hızlı bir kayıp olduğunu fark etmişlerdir.

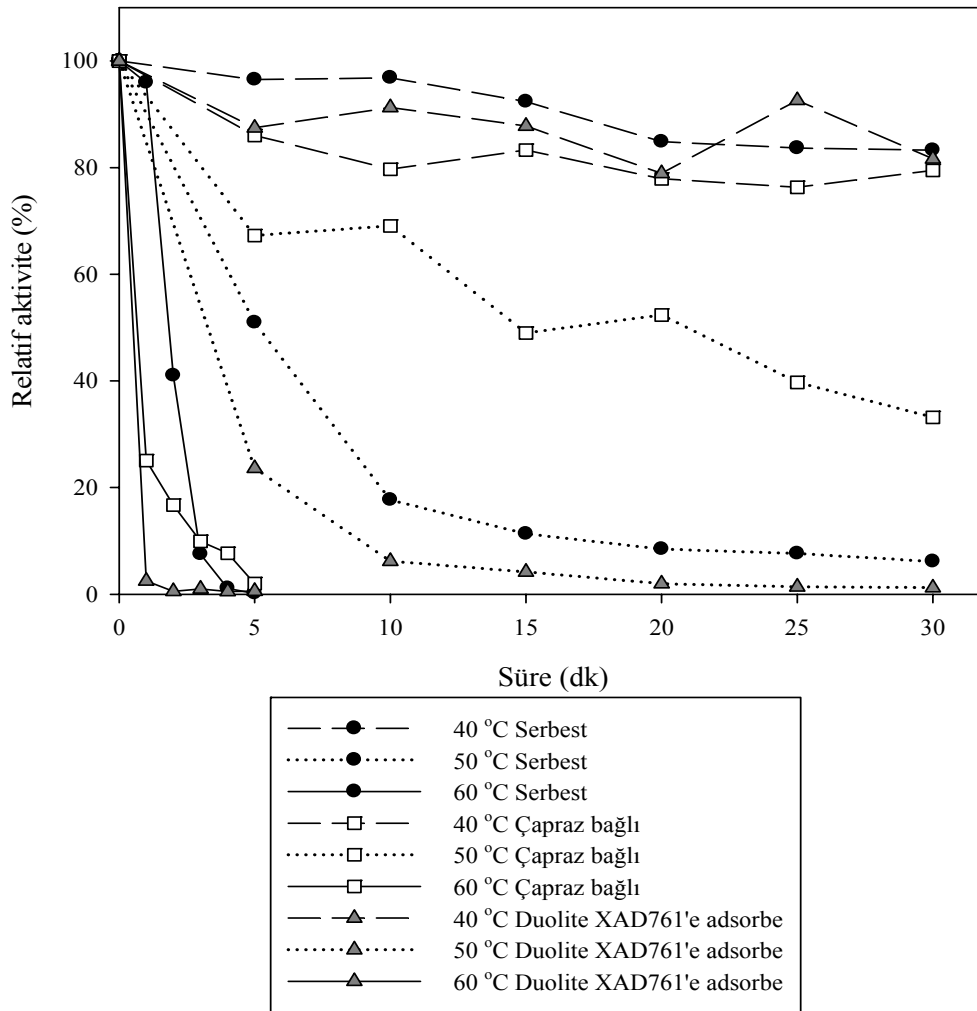
Çapraz bağlı enzimde nötr pH'dan bazik bölgeye geçişte meydana gelen yaklaşık %25-27'lik stabilite kaybı, enzimin çapraz bağ ile oluşturulan ağ yapısını değiştirmesinden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir.

4.2.7. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Isıl Stabilitesi

Serbest ve immobilize enzimlerin ısıl stabilitesini belirlemek için 40-60 °C'ler arasındaki sıcaklıklarda Bölüm 3.2.3.7. ve 3.2.4.5.'de verilen yöntemlere uygun olarak analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.

Enzimlerin ısıl stabiliteleri 40 °C sıcaklıkta değerlendirildiğinde serbest ve immobilize β -Gal'ların 30 dakikalık sürede benzer bir dayanıklılık gösterdiği görülmektedir. Bu sıcaklıkta enzim formlarının dayanımları sıralandığında serbest enzim dayanımının en yüksek olduğu ve bunu Duolite XAD761'e adsorbe ve çapraz bağlı enzimin izlediği ve süre sonunda relatif aktivitelerin sırasıyla %83.3, %81.6 ve %79.5'e düştüğü görülmektedir. Isıl stabilite incelemesinde 50 °C'lik sıcaklık uygulamasında enzimlerin dayanımları arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. Çapraz bağlı enzimin bu sıcaklıkta gözle görülür bir biçimde daha stabil olduğu ve 30 dakikalık işlem sonunda başlangıç aktivitesinin %33.2'sini koruduğu görülmektedir. Serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerde ilk 10 dakika içinde relatif aktivitenin çok hızlı

bir biçimde düştüğü ve sonrasında düşüş hızının yavaşladığı ve yataya yakın bir seyir izlediği görülmüştür. Bunun yanında 30. dakikada serbest enzimde relatif aktivite %6.1, Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise %1.2 olarak saptanmıştır. Isıl stabilite denemelerinde uygulanan 60 °C sıcaklığın tüm enzim formları üzerinde çok hızlı aktivite kaybı yarattığı gözlenmiştir. Deneylerde 5 dakikalık süreçte relatif aktivite değerleri, çapraz bağlı enzimde %2, serbest enzimde %0.6, Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise %0.2 olarak bulunmuştur. En hızlı aktivite kaybı Duolite XAD761'e adsorbe enzimde kaydedilmiştir.



Şekil 4.19. Serbest ve immobilize enzimlerin ısıl stabilitesi

Uwajima ve ark. (1972), *Saccharomyces (Kluyveromyces) fragilis*'ten β -Gal'ı saflaştırmışlardır. β -Gal'a 10 dakika farklı sıcaklıklarda ısıl işlem uyguladıktan sonra enzimin kalan aktivitesini ölçerek ısıl stabiliteyi belirlemişlerdir. Bu çalışma şartlarında

β -Gal'in 40 °C sıcaklığa kadar stabil olduğunu, bu sıcaklıktan sonra stabilitenin azaldığını ve 52 °C civarında aktivitenin sıfırlandığını belirlemişlerdir. Matioli ve ark. (2001), Lactozym'in serbest formu ile yaptıkları çalışmada 20-40 °C'ler arasında ısıl stabilitenin çok fazla etkilenmediğini, fakat 45 °C'den 55 °C'ye kadar olan aralıkta sıcaklık artışına göre hızlı bir stabilite kaybı görüldüğünü saptamışlardır. Bu sonuçlar çalışmamızdaki serbest enzim sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Güleç (2009), ısıl stabilite açısından yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimin serbest enzime göre daha dayanıklı olduğunu saptamıştır. Fakat, Giacomini ve ark. (1998), *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal'ı iki farklı şekilde immobilize etmişler, serbest ve immobilize enzimlerin ısıl stabilitelerini 21, 40 ve 50 °C'lerde ölçmüşlerdir. Immobilize edilen enzimlerden birinin serbest enzime göre daha stabil olmasına karşın diğerinin bu konuda daha zayıf kaldığını görmüşlerdir. 30 dakika sonunda, 50 °C'de serbest enzimde %26, immobilize enzimlerde de %7 ve %34 aktivite saptamışlardır. Bu veriler çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

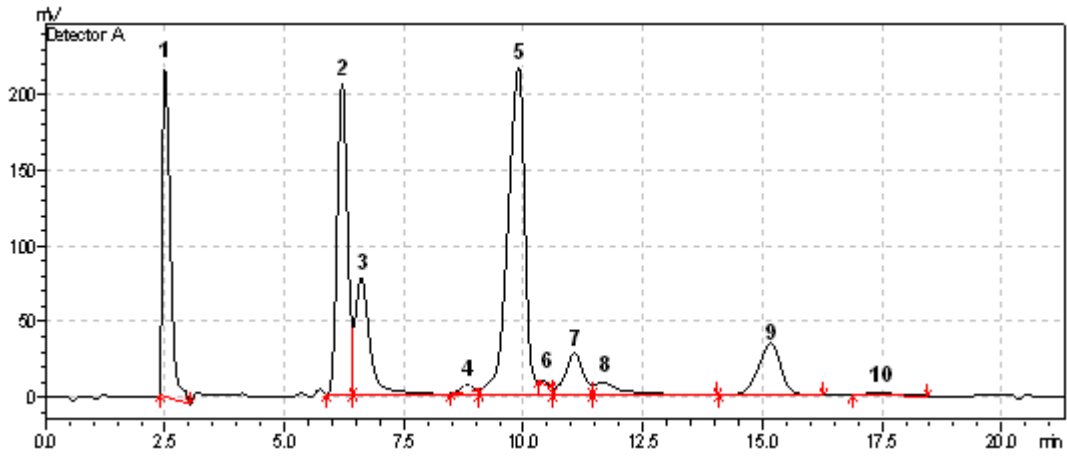
Çapraz bağlı enzimin ısıl stabilite açısından daha iyi olması immobilizasyon sonucunda enzim konformasyonunun kimyasal bağların oluşması nedeniyle stabil hale geldiğini göstermektedir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise fiziksel adsorbsiyon oluşumu nedeniyle immobilize enzimin serbest enzime benzer bir tutum sergilediği gözlenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha düşük stabilite göstermesinin nedeni olarak taşıyıcı reçinenin ısıl iletiminin düşük olması düşünülmektedir. Bu durum enzime uygulanan sıcaklık etkisini kontrol etmede güçlük yaratacağı ya da en azından daha fazla enerji gereksinimine neden olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

4.3. GOS Sentezi Sonuçları

Model laktoz çözeltilerinin β -Gal ile reaksiyonu sonucunda oluşturdukları karbonhidratlara ait örnek bir kromatogram Şekil 4.20.'de verilmiştir. Kromatogram, serbest enzim ile 6.5 pH'da, %25 laktoz konsantrasyonunda ve 50 °C'de 2 saatlik reaksiyon sonunda elde edilen ürüne aittir. HPLC sisteminde karbonhidrat analizi 70/30 asetonitril/su karışımından oluşan mobil fazın 1.5 mL/dakika akış hızında verilmesiyle, toplam analiz süresi 23 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kromatogramda elde edilen piklerin karşılaştırılmasında karbonhidrat standartları kullanılmıştır. Standartların

alıkonma süreleri ile literatürde verilen referans alıkonma sürelerine ait değerler Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Buna göre kromatogramdaki 2, 3 ve 5 nolu pikler sırasıyla glikoz, galaktoz ve laktoz olarak saptanmıştır. Kromatogramdaki 1 nolu pik ise çözücü (su) piki olarak belirlenmiştir. Elde edilen GOS'lerin belirlenmesi amacıyla kullanılan maltotrioz (DP3) ve maltotetroz (DP4) karbonhidratlarının alıkonma süreleri ile GOS'lere ait piklerin alıkonma süreleri aynı olmadığından sonuçların değerlendirilmesinde literatürden faydalanılmıştır.

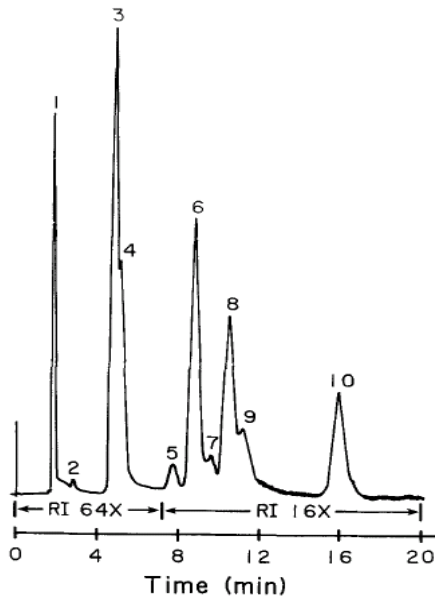


Şekil 4.20. Serbest β -Galaktosidaz enzimiyle laktozun hidrolizi sonucu oluşan karbonhidrat profiline ait örnek bir HPLC kromatogramı (Inertsil NH₂ 5 μ m 4.6 x 250 mm kolon) (Piker; 1-su, 2-glikoz, 3-galaktoz, 4-GOS2, 5-laktoz, 6, 7 ve 8-GOS2, 9 ve 10-GOS3)

Çizelge 4.2. Karbonhidrat standartları ile literatürde verilen referans alıkonma süreleri

Standart	Karbonhidrat standartlarının	Literatürdeki (Jeon ve Mantha, 1985)
	Alıkonma süresi (dk)	Referans alıkonma süresi (dk)
Su	2.495	2.0
Glikoz	6.211	5.0
Galaktoz	6.613	5.5
GOS2	-	7.7
Laktoz	9.907	8.9
GOS2	-	9.7
GOS2	-	10.6
GOS2	-	11.5
Maltotrioz (DP3)	12.992	-
GOS3	-	16.0
Maltotetroz (DP4)	17.884	-

Şekil 4.21’de Jeon ve Mantha (1985)’nın *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile %20 laktoz konsantrasyonunda 37 °C’de 1 saat sonunda elde ettikleri ürüne ait kromatogram görülmektedir. Mobil fazın 75/25 asetonitril/su, kolonun Amino Spheri-5, detektörün ise refraktif indeks detektörü olduğu belirtilmiştir. Kromatogramda (Şekil 4.21.) elde edilmiş pikler ((1) çözücü, (2) bilinmeyen madde, (3) glikoz, (4) galaktoz, (6) laktoz, (5, 7, 8, 9) GOS2 ve (10) GOS3 ve alıkonma süreleri bizim elde ettiğimiz kromatogramla (Şekil 4.20) benzerlik göstermektedir. Martinez-Villaluenga ve ark. (2008) da Lactozym 3000 L HPG kullanarak yaptıkları çalışmada 60 °C sıcaklıkta enzimin sadece trisakkarit (6' galaktosil-laktoz) oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda sıcaklığın GOS üretimine etkisi incelenirken 60 °C sıcaklık uygulamasında GOS olarak tanımlanan piklerden (Şekil 4.20.) 9 nolu pik baskın bir şekilde elde edilmiştir. Cheng ve ark. (2006a), benzer HPLC şartları ile elde ettikleri kromatogramda laktozdan hemen önce gelen piki GOS olarak tanımlamışlardır. *K. lactis* kaynaklı β -Gal’in temelde GOS2 ve GOS3 ürettiğini belirtmişlerdir. Maugard ve ark. (2003) ise *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile gerçekleştirdikleri çalışmada asetonitril/su (80/20) ile oluşturdukları mobil fazı 2 mL/dakika akış hızında kullanmışlar ve sıcaklığı 70 °C’ye ayarlamışlardır. Topladıkları pik fraksiyonlarını MS analizine göre değerlendirmişlerdir. Laktozdan hemen sonra gelen piki GOS2 ve laktozdan 2.5 ve 5 dakika sonra gelen pikleri GOS3 olarak belirlemişlerdir.



Şekil 4.21. *K. lactis* kaynaklı β -Gal kullanılarak elde edilen ürüne ait kromatogram (Jeon ve Mantha, 1985)

Ayrıca Çizelge 4.2.'de verilen maltotriozun (DP3) alıkonma süresi 12.992, maltotetrozun (DP4) ise 17.884 dakikadır. Bu süreler arasında gelen piklerin trisakkarit olması muhtemeldir.

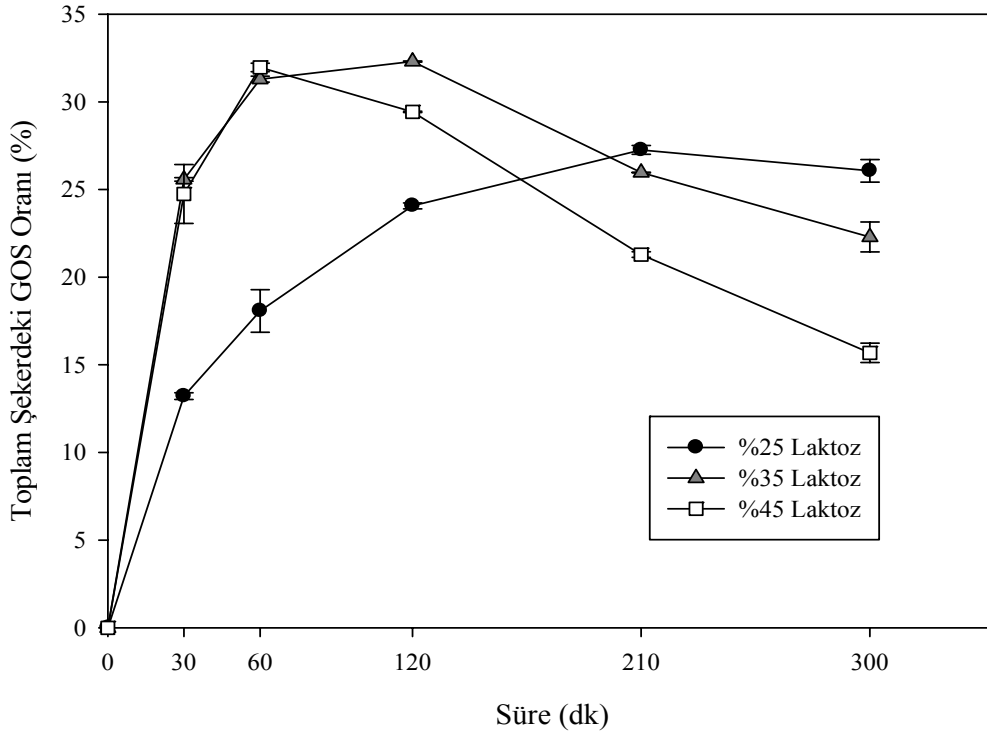
Bu literatür bilgileri ve HPLC sonuçları dikkate alındığında Şekil 4.20.'de verilen kromatogramda 4, 6, 7 ve 8 nolu pikler disakkarit yani GOS2, 9 ve 10 nolu pikler ise trisakkarit yani GOS3 olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar buna göre hesaplanmıştır.

4.3.1. Laktoz Konsantrasyonunun GOS Üretimine Etkisi

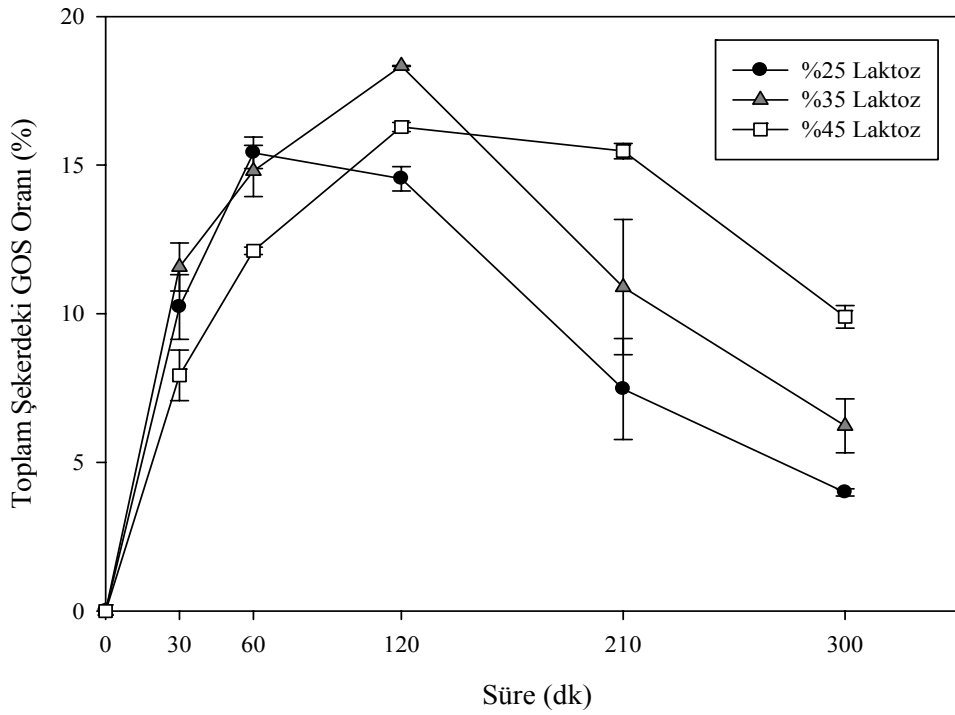
GOS üretiminde reaksiyon ortamındaki çözeltide bulunan laktoz miktarı üretilen GOS miktarını etkilemektedir. Çözeltideki laktoz konsantrasyonu arttıkça GOS üretiminin arttığı pek çok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (Mahoney, 1998; Hansson ve Adlercreutz, 2001; Albayrak ve Yang, 2002a; Maugard ve ark., 2003; Cruz-Guerrero ve ark., 2006; Splechtna ve ark., 2006; Valero, 2009).

Şekil 4.22.'de serbest enzimle çeşitli laktoz konsantrasyonlarında (%25, %35, %45) elde edilen GOS miktarları görülmektedir. GOS miktarı toplam şekerdeki % GOS olarak verilmiştir. Burada laktoz konsantrasyonu artışıyla %35 laktoz konsantrasyonuna kadar GOS üretiminde artış görülmüş ve sonrasında üretimde artış durmuştur. Maksimum GOS üretimleri %25 laktoz konsantrasyonu için 210. dakikada %27.26, %35 laktoz konsantrasyonu için 120. dakikada %32.3 ve %45 laktoz konsantrasyonu için ise 60. dakikada %31.96'dır. Laktoz konsantrasyonunun yüksek olması reaksiyon hızının artışıyla beraberinde getirmekte ve daha kısa sürede maksimum GOS üretimine ulaşıldığı belirlenmiştir. Yine görüldüğü üzere, en yüksek GOS miktarının bulunduğu noktalardan sonra GOS miktarlarında azalma dikkati çekmektedir. Uzun reaksiyon sürelerinde meydana gelen maksimum GOS miktarındaki düşüş rehidrolizasyon olarak adlandırılmaktadır (Foda ve Lopez-Leiva, 2000).

Çapraz bağlı enzimde başlangıç laktoz konsantrasyonunun GOS üretimi üzerine etkisi Şekil 4.23.'de görülmektedir. En yüksek GOS üretimleri değerlendirildiğinde, %25, %35 ve %45 başlangıç laktoz konsantrasyonu için sonuçlar sırasıyla %15.41, %18.34 ve %16.28 olarak bulunmuştur. Reaksiyonun 60. dakikasında %25 laktoz konsantrasyonu için, 120. dakikadan sonra ise %35 ve %45 laktoz konsantrasyonları için rehidrolizasyonun başladığı görülmektedir.

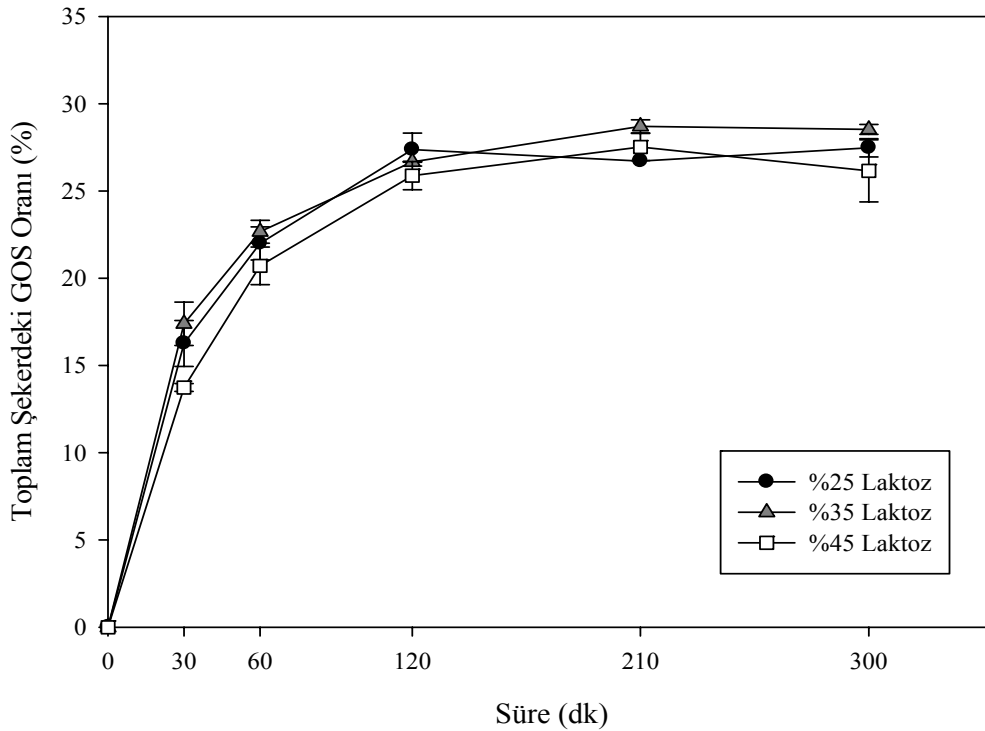


Şekil 4.22. Serbest enzim ortamında laktöz konsantrasyonunun GOS oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)



Şekil 4.23. Çapraz bağlı enzim ortamında laktöz konsantrasyonunun GOS oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

Başlangıç laktoz konsantrasyonunun Duolite XAD761'e adsorbe enzimle GOS üretimine etkisi incelendiğinde bütün laktoz konsantrasyonlarında GOS üretim miktarlarının birbirine yakın seyrettiği belirlenmiştir (Şekil 4.24.). Başlangıç laktoz konsantrasyonu %35 iken, maksimum GOS üretimi %28.7 olarak belirlenmiş, bunu %45 laktoz konsantrasyonu (%27.52 GOS) ve %25 laktoz konsantrasyonu (%27.4 GOS) izlemiştir. Burada geçen 300 dakikalık süre içerisinde rehidrolizasyon çok etkili bir şekilde oluşmamıştır. Bunun sebebi olarak analiz ortamında mL laktoz çözeltisi başına 0.4 EU kadar enzim kullanılması gösterilebilir. Ayrıca enzimde denaturasyon oluşması ihtimali de düşünülmektedir. Enzim miktarının az olması reaksiyon hızının yavaşlamasına neden olmuş, fakat 300 dakikalık süre içerisinde maksimum GOS üretimine ulaşılabilmektedir. Başlangıç laktoz konsantrasyonları %35 ve %45 iken 210. dakikadan sonra GOS miktarında azalma başlamıştır. Reaksiyonun 120. dakikasından sonra %25 laktoz konsantrasyonu için GOS üretim hızı sabitlenmiştir.



Şekil 4.24. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

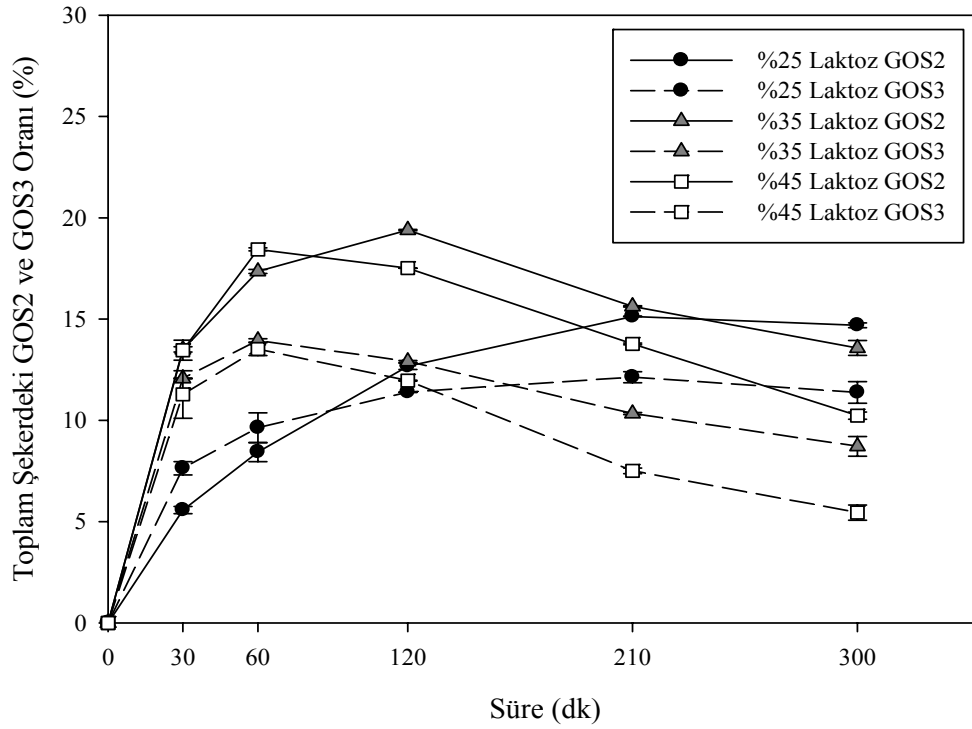
Valero (2009), *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile laktoz konsantrasyonunun GOS oluşumu üzerine etkisini %5-50 laktoz konsantrasyonu aralığında çalışmıştır. Laktoz konsantrasyonu %5 iken %14 GOS, %50 iken ise %32.3 GOS üretmişler ve laktoz

konsantrasyonu artışının GOS üretimini artırdığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda serbest β -Gal ile elde ettiğimiz maksimum GOS miktarı %32.3 ile Valero (2009)'nun sonucuna benzerlik göstermiş, fakat daha düşük laktoz konsantrasyonunda (%35 laktoz) bu sonuca ulaşılmıştır. Yine benzer şekilde Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Lactozym kullanarak yaptıkları çalışmada serbest enzim ile 150, 250 ve 350 mg/mL konsantrasyonlarındaki laktoz çözeltileri ile GOS sentezlemişler ve 250 mg/mL'lik laktoz konsantrasyonunda reaksiyonun 120. dakikasında maksimum (%30) GOS üretimi elde etmişlerdir. Laktoz konsantrasyonu 350 mg/mL'ye çıktığında ise GOS üretiminde artış belirlememişlerdir. Bu sonuç araştırmamızda elde edilen GOS üretim miktarına benzerlik göstermiş, fakat yüksek miktarda GOS üretilen laktoz konsantrasyonu çalışmamızdakinden düşük bulunmuştur. Hsu ve ark. (2007), *Bifidobacterium longum* BCRC 15708'dan elde ettikleri β -Gal ile GOS sentezlemişlerdir. Başlangıç laktoz konsantrasyonunun etkisini incelemek için %5-50 laktoz konsantrasyonu aralığında çalışmışlar ve %5'den %40'a kadar GOS üretim miktarının arttığını (%32.5 GOS) ve bu noktadan sonra GOS üretiminin azaldığını saptamışlardır. Hansson ve Adlercreutz (2001), hipertermofilik mikroorganizma kaynaklı β -Gal ile %10-90 laktoz konsantrasyonu aralığında çalışmışlar ve %70 laktoz konsantrasyonuna kadar GOS üretiminde artış olduğunu bu noktadan sonra artışın durduğunu belirlemişlerdir. Cruz-Guerrero ve ark. (2006), hipertermofilik β -Glikosidaz kullanarak GOS üretimi üzerine su aktivitesinin etkisini incelemişlerdir. Su aktivitesini aseton kullanarak ayarlamışlardır. En yüksek su aktivitesi değerinde ($a_w=0.61$) GOS üretiminin az olduğunu bunun yerine hidrolizin baskın olduğunu, sonrasında su aktivitesinin düşmesiyle GOS üretiminin arttığını fakat en düşük su aktivitesi değerinde ($a_w=0.24$) GOS üretiminin tekrar azaldığını ve hidrolizin arttığını görmüşlerdir. Bunu; düşük su aktivitesi değerlerinde enzimin daha sert (rigid) olması nedeniyle reaksiyon esnasında hidroksil grubu olarak su gibi daha küçük moleküllerin kullanılabileceği, buna karşın su aktivitesinin artmasıyla enzimin esnekleştiği ve hidroksil grubu olarak karbonhidratlar gibi daha büyük molekülleri kullanabileceği şeklinde açıklamışlardır. Bu çalışmalara benzer olarak çalışmamızda laktoz konsantrasyonunun en yüksek olduğu noktalardaki GOS üretiminin düşük olması laktoz konsantrasyonu artışıyla ortaya çıkan a_w düşüşünün kullandığımız enzimi olumsuz yönde etkilediğini, enzimin esnekliğini azalttığını düşündürmektedir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu artışıyla GOS üretiminin arttığını

gösteren serbest enzimlerle yapılmış bir çok çalışma mevcuttur (Boon ve ark., 2000; Cruz ve ark., 1999a; Splechtna ve ark., 2006).

İmmobilize β -Gal'lar ile yapılan çalışmalara bakıldığında Maugard ve ark. (2003), Lactozym'i reçineye adsorbe etmişler ve laktoz konsantrasyonu artışının GOS üretimini arttırdığını ve 318 g/L'lik laktoz konsantrasyonunda %28,3'lük maksimum GOS miktarına ulaştıklarını bildirmişlerdir. Bu sonuç çalışmamızdaki Duolite XAD761'e adsorbe enzimle elde ettiğimiz sonuca (%28.7) oldukça yakındır. Neri ve ark. (2009), serbest ve manyetik polisiloksan-polivinil alkol üzerine bağlanmış *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -Gal ile GOS sentezi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Başlangıç laktoz konsantrasyonunun etkisini, serbest ve immobilize enzimle denemişler ve her ikisinde benzer sonuçlar verdiğini ve %50 laktoz konsantrasyonunda %26 civarında GOS üretimi elde edildiğini bildirmişlerdir. Zheng ve ark. (2006), *Aspergillus candidus* kaynaklı rekombinant β -Gal'ı D113 reçinesine adsorbe ettikten sonra sodyum aljinat ile tutuklama uygulamışlar ve stabilizasyon için glutaraldehit ile muamele etmişlerdir. İmmobilize ettikleri enzimin 150 g/L laktoz konsantrasyonun altında GOS üretmediğini, 200 g/L'den sonra üretimin arttığını ve 400 g/L laktoz konsantrasyonunda %21.75 GOS üretiminin sağlandığını belirtmişlerdir. Nakkharat ve Haltrich (2007), *Talaromyces thermophilus*'dan elde edilen β -Gal'ı Eupergit C'ye adsorbe etmişler ve 50, 100, 200 g/L laktoz çözeltilerinde GOS üretimini test etmişlerdir. Elde ettikleri GOS üretim miktarlarının sırasıyla %24, %39 ve %40 olduğunu bildirmişlerdir. Albayrak ve Yang (2002a), pamuklu bez üzerine immobilize ettikleri *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile laktozdan GOS üretimi üzerine çalışmışlar ve %5-50 laktoz konsantrasyonu aralığını denemişlerdir. Başlangıç laktoz konsantrasyonunun GOS üretimini arttırdığını belirlemişler ve maksimum GOS üretimini %50 laktoz konsantrasyonunda %27 olarak tespit etmişlerdir.

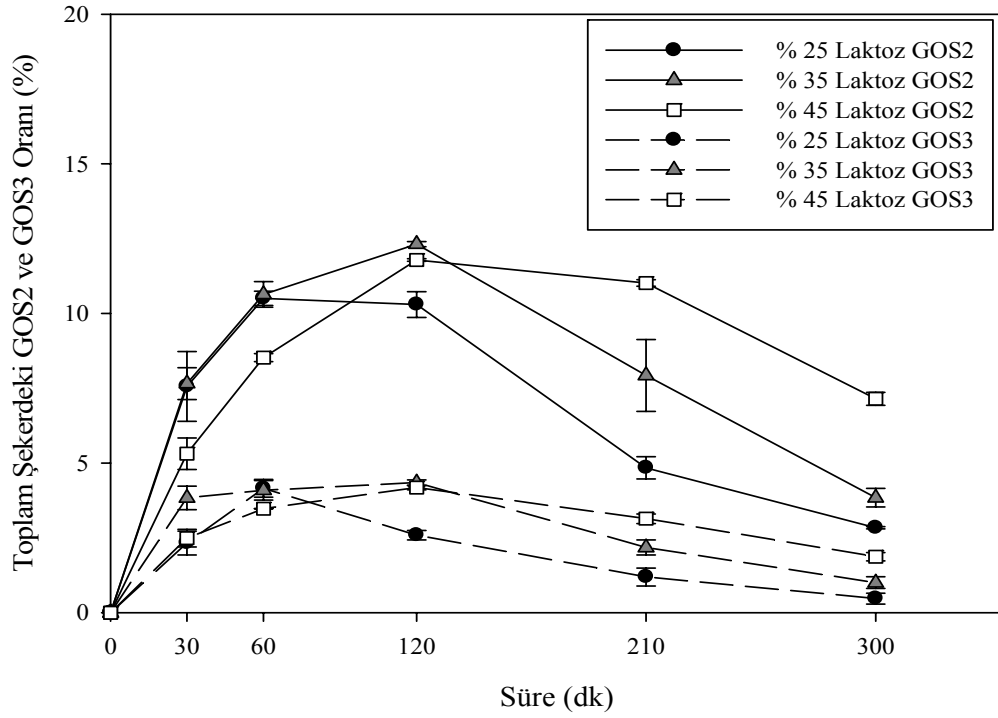
Serbest enzim kullanılarak farklı laktoz konsantrasyonlarında üretilen GOS'ler disakkarit (GOS2) ve trisakkarit (GOS3) olarak incelendiğinde, GOS2 üretiminin daha baskın olduğu görülmektedir (Şekil 4.25.). Maksimum GOS2 ve GOS3 üretimleri açısından serbest enzimin sonuçları incelendiğinde, başlangıç laktoz konsantrasyonu %25 iken 210. dakikada %15.13 GOS2, %12.13 GOS3 üretimi gerçekleşmiştir. Laktoz konsantrasyonu %35'e çıktığında GOS2 %19.4, GOS3 %13.95 olarak tespit edilmişken %45 laktoz konsantrasyonunda %18.44 GOS2 ve %13.52 GOS3 elde edilmiştir.



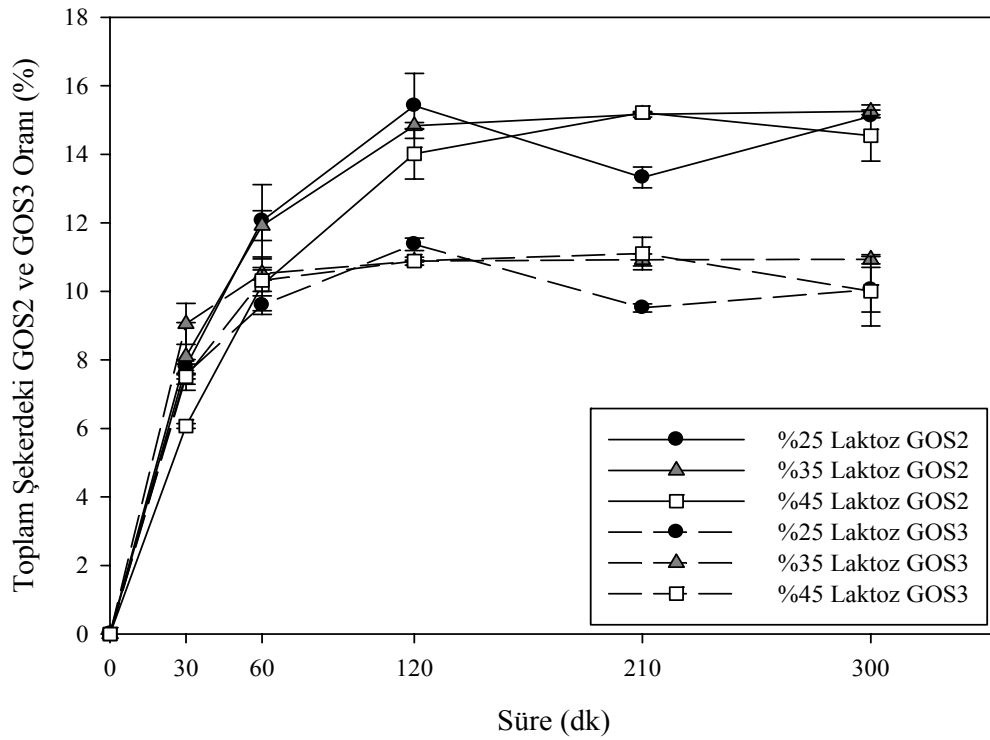
Şekil 4.25. Serbest enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

Şekil 4.26.'da çapraz bağlı enzimün çeşitli başlangıç laktoz konsantrasyonlarında oluşturdukları GOS2 ve GOS3 miktarlarına ait grafik görülmektedir. Maksimum GOS2 ve GOS3 miktarlarına %25 laktoz konsantrasyonu için 60. dakikada, diğer laktoz konsantrasyonları için ise 120. dakikada ulaşılmıştır. Bu sürelerde elde edilen GOS2 ve GOS3 miktarları sırasıyla %25 laktoz konsantrasyonu için %10.5 ve %4.15, %35 laktoz konsantrasyonu için %12.31 ve %4.34, %45 laktoz konsantrasyonu için %11.78 ve %4.18 olarak belirlenmiştir.

Farklı laktoz konsantrasyonlarında maksimum GOS2 ve GOS3 üretimleri açısından Duolite XAD761'e adsorbe enzim sonuçları incelendiğinde %25 laktoz konsantrasyonunda %15.41 GOS2, %11.37 GOS3, %35 laktoz konsantrasyonunda %15.26 GOS2, %10.93 GOS3 ve %45 laktoz konsantrasyonunda ise %15.22 GOS2, %11.1 GOS3 elde edilmiştir (Şekil 4.27.).



Şekil 4.26. Çapraz bağlı enzim ortamında laktöz konsantrasyonunun GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

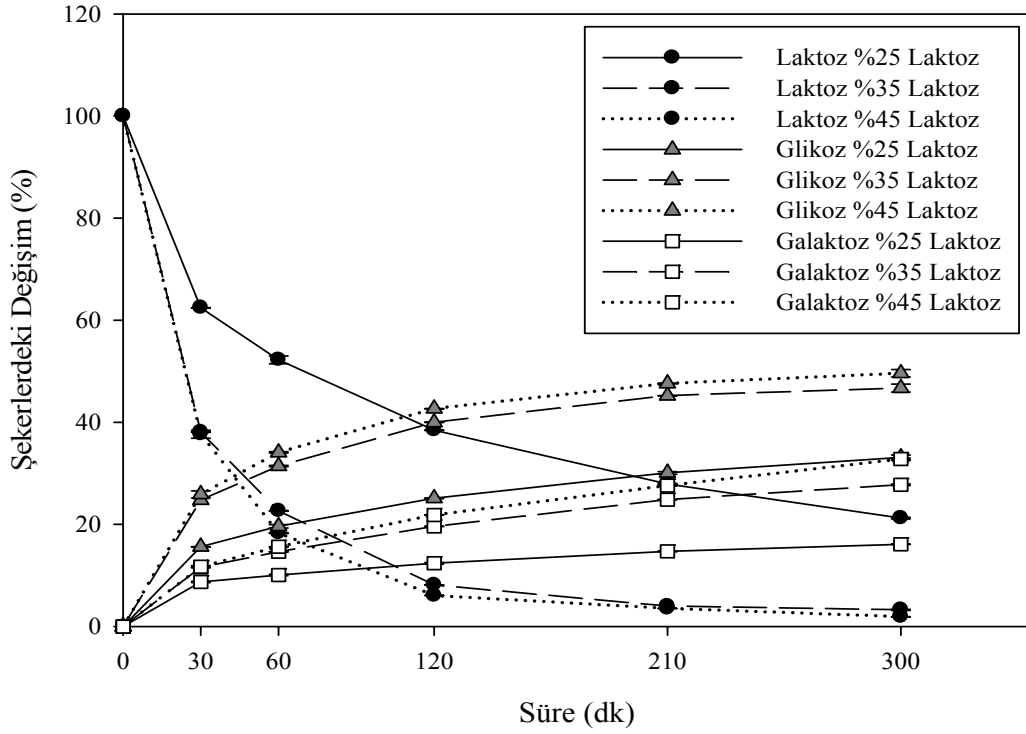


Şekil 4.27. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında laktöz konsantrasyonunun GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

Serbest ve immobilize enzimlerde maksimum GOS2 ve GOS3 üretimlerinin gerçekleştiği noktalardan elde edilen GOS2/GOS3 oranları karşılaştırıldığında serbest enzim için bu oranın ortalama 1.30, Duolite XAD761'e adsorbe enzim için ortalama 1.38 ve çapraz bağlı enzim için ise ortalama 2.72 olduğu saptanmış ve çapraz bağlı enzimin kendi üretimi içinde GOS2'yi GOS3'e göre daha baskın bir şekilde ürettiği belirlenmiştir.

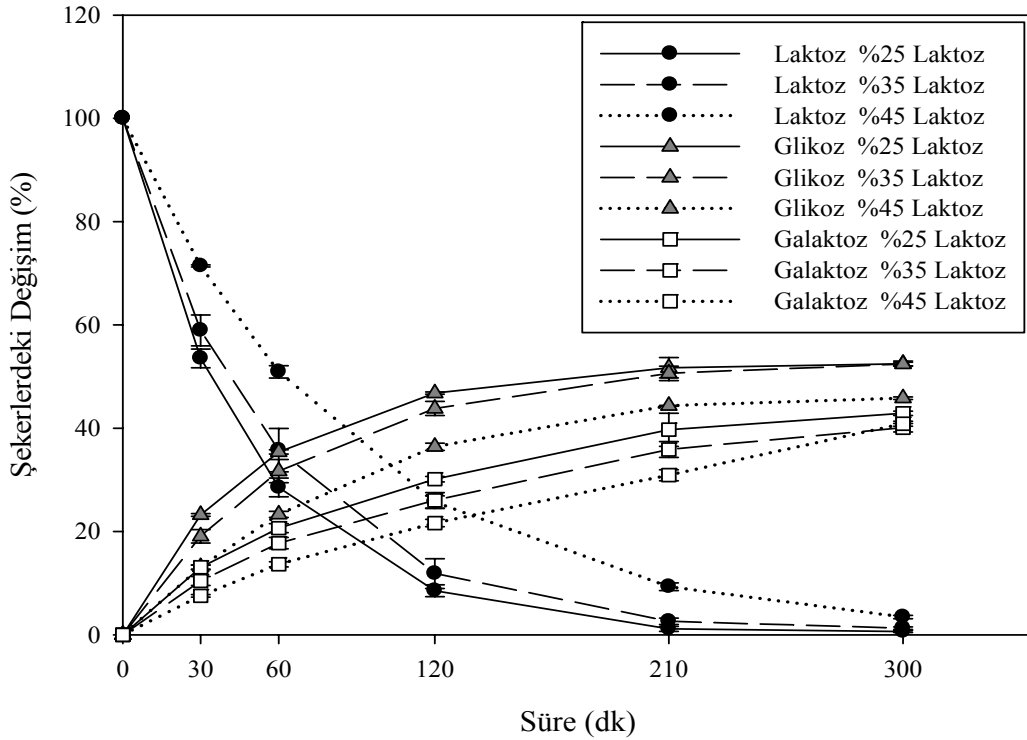
Boon ve ark. (2000), yaptıkları araştırmada *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'lar ile elde edilen GOS'leri trisakkarit ve tetrasakkarit olarak değerlendirmişler, GOS2 sonuçlarına bakmamışlardır. Buna göre *K. lactis* ve *K. fragilis*'in temel olarak trisakkarit ürettiğini bildirmişlerdir. Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Lactozym ile sentezledikleri GOS'lerin sonuçlarını disakkaritler (galaktobioz+allolaktoz) ve trisakkarit (6' galaktosil-laktoz) olarak vermişlerdir. Bu ölçüm yöntemine göre elde ettikleri sonuçlarda trisakkarit miktarının disakkaritlerden daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Laktoz konsantrasyonlarına göre oluşan trisakkarit miktarlarını 150 mg/mL konsantrasyon için %14.8, 250 mg/mL konsantrasyon için %17.1, 350 mg/mL konsantrasyon için %15.9, disakkarit miktarlarını ise verilen konsantrasyon sıralamasına göre %13, %13 ve %15.2 olarak bulmuşlardır. Cheng ve ark. (2006a) ise *A. oryzae*, *K. lactis* ve *Bacillus spp.* kaynaklı β -Gal'larla gerçekleştirdikleri çalışmada *K. lactis* kaynaklı β -Gal'ın laktozdan oluşturduğu GOS'lerin GOS2 ve GOS3 olduğu ve Martinez-Villaluenga ve ark. (2008)'nin aksine GOS2'lerin baskın şekilde oluştuğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar Cheng ve ark. (2006a)'nın sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Şekil 4.28.'de serbest enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi görülmektedir. İlk 30 dakikada tüm laktoz konsantrasyonları için reaksiyon hızının yüksek olduğu görülmektedir. Bu noktadan sonra laktoz hidrolizi ile glikoz ve galaktoz oluşum hızında yavaşlama görülmüştür. Reaksiyonun bitirildiği 300. dakika sonunda parçalanmadan kalan laktoz miktarları, %45 laktoz konsantrasyonu için %1.9, %35 laktoz konsantrasyonu için %3.26 ve %25 laktoz konsantrasyonu için %21.23 olarak bulunmuştur. Glikoz ve galaktoz miktarları açısından sonuçlara bakıldığında 300 dakikalık reaksiyon sonunda glikoz miktarları %33.11 (%25 laktoz) - %49.61 (%45 laktoz) arasında, galaktoz miktarları ise %16.11 (%25 laktoz) - %32.81 (%45 laktoz) arasında değişim göstermiştir.



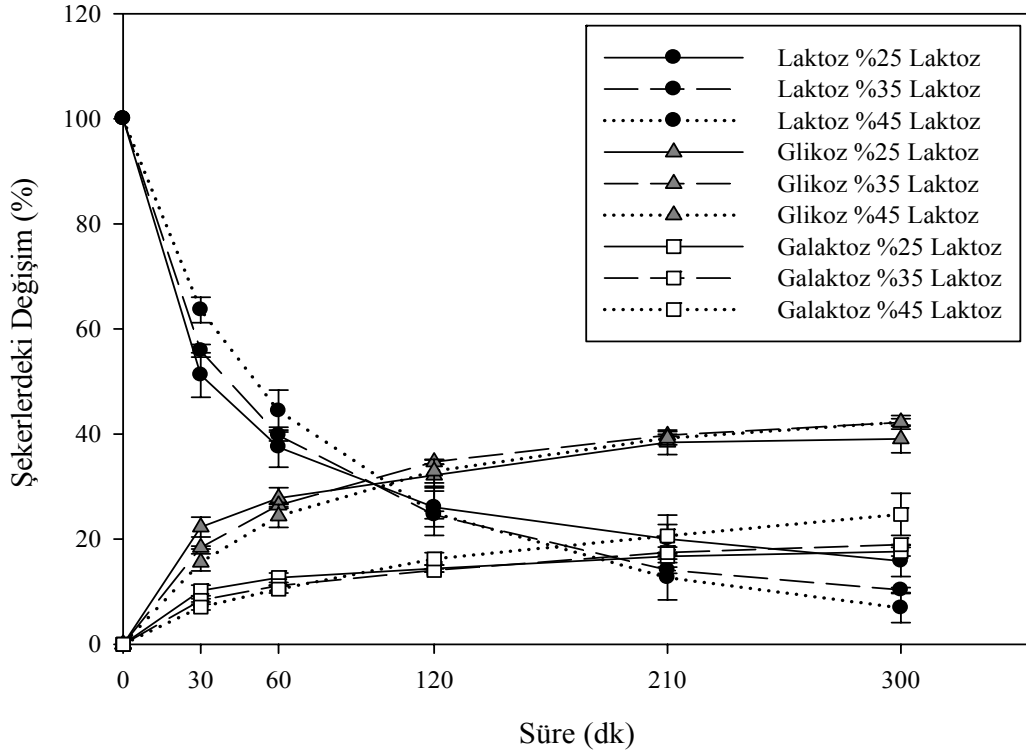
Şekil 4.28. Serbest enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

Çapraz bağlı enzim için farklı laktoz konsantrasyonlarındaki reaksiyonlarda elde edilen laktoz, glikoz ve galaktoz miktarları Şekil 4.29.'da verilmiştir. Reaksiyonun sonunda bütün laktoz konsantrasyonları için laktozun iyi hidroliz edildiği görülmüş ve kalan laktoz miktarları %25 laktoz konsantrasyonu için %0.62, %35 laktoz konsantrasyonu için %1.27 ve %45 laktoz konsantrasyonu için ise %3.43 olarak bulunmuştur. Laktoz konsantrasyonu %45 iken laktozun hidroliz hızının diğer konsantrasyondakilere göre yavaş olduğu fakat reaksiyon sonunda diğerlerine yaklaştığı görülmektedir. Bunun çapraz bağlamada oluşan ağ yapısının difüzyon sınırlaması oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca reaksiyon sonunda elde edilen glikoz ve galaktoz miktarlarına bakıldığında glikozun %45.81 (%45 laktoz)-%50 (%25 laktoz) aralığında, galaktoz miktarlarının ise %40.07 (%35 laktoz) - %42.89 (%25 laktoz) aralığında değiştiği görülmektedir.



Şekil 4.29. Çapraz bağlı enzim ortamında laktöz konsantrasyonunun laktöz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

Duolite XAD761'e adsorbe enzimin farklı laktöz konsantrasyonlarında oluşturduğu laktöz, glikoz ve galaktoz miktarları Şekil 4.30.'da görülmektedir. İmmobilize enzimle laktözün reaksiyonu sonunda 300. dakikada ortamda reaksiyona giremeyen laktöz miktarları %25 laktöz konsantrasyonu için %15.84, %35 laktöz konsantrasyonu için %10.31 ve %45 laktöz konsantrasyonu için %6.88 olarak tespit edilmiştir. Serbest enzime benzer şekilde ilk 30 dakikada reaksiyonun hızının yüksek olduğu görülmektedir. Laktözün hidroliziyle açığa çıkan glikoz ve galaktoz miktarlarına bakıldığında oluşan glikoz miktarlarının galaktoz miktarlarının yaklaşık iki katı olduğu görülmektedir. Reaksiyonun sonlandırıldığı noktada ortamda bulunan glikoz miktarları %39.1 (%25 laktöz) - %42.24 (%45 laktöz) arasında, galaktoz miktarları ise %17.62 (%25 laktöz) - %24.72 (%45 laktöz) arasında saptanmıştır.



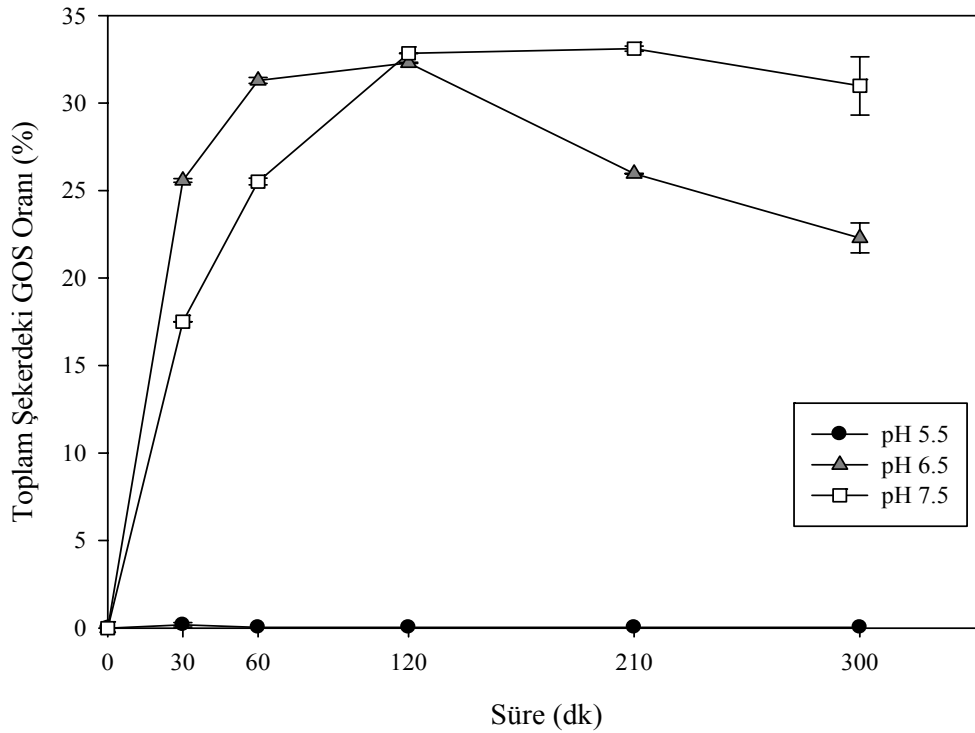
Şekil 4.30. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında laktoz konsantrasyonunun laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (pH 6.5 ve 50 °C sıcaklıkta)

Çapraz bağlı enzimde elde edilen galaktoz miktarının serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzim sonuçlarına göre yüksek olduğu görülmektedir. Çapraz bağlı enzimin hidrolitik aktivitesinin yüksek olması, ayrıca daha küçük molekül boyutlarına sahip GOS2 üretiminin baskın şekilde gerçekleşmesi ve toplam GOS üretiminin düşük olması, hem difüzyon sınırlamasıyla hemde çapraz bağlarla oluşan ağ yapısı içinde enzimin büyük molekül (GOS) üretebilecek yeterli alanı bulamadığını ya da ağ yapısı içinde meydana gelen enzim konformasyonunun bu reaksiyona izin vermediğini düşündürmektedir.

Serbest ve immobilize enzimlerle oluşturulan model sitemlerde laktoz konsantrasyonuna bağlı olarak GOS üretimleri belirlenmiştir. Bu üretimler içinde en yüksek GOS miktarını sağlayan laktoz konsantrasyonları GOS üretimi için gerçekleştirilecek reaksiyonlarda parametre olarak kullanılacaktır. Bu sebeple serbest β -Gal, çapraz bağlı β -Gal ve Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal için %35 laktoz konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.2. pH'nın GOS Üretimine Etkisi

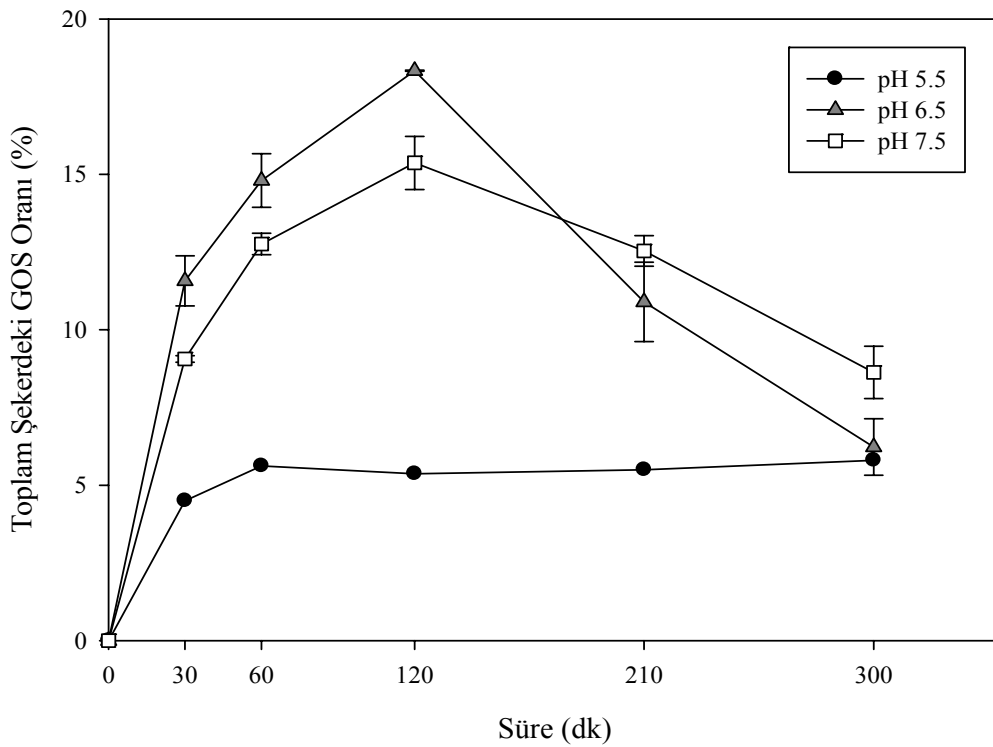
Serbest enzimde pH'nın GOS üretimine etkisi 5.5, 6.5 ve 7.5 pH'lı tamponlarla hazırlanan %35'lik laktoz çözeltilerinde gerçekleştirilmiştir. Serbest enzimin nötr bölgeye yakın pH'larda aktivite göstererek GOS ürettiği Şekil 4.31.'de görülmektedir. pH'nın 5.5 olduğu durumda serbest enzim ile GOS elde edilememiştir. Daha önce ONPG kullanılarak elde edilen aktivite üzerine pH'nın etkisi incelemesinde de (Şekil 4.14) pH 5.5'de serbest enzimin inaktif olduğu ve aktivite gösteremediği belirlenmiştir. GOS üretimi için laktoz ile gerçekleştirilen bu bölümde de aynı sonuçla karşılaşılması normal kabul edilmektedir. Maksimum GOS üretimleri 6.5 pH'da 120. dakikada %32.3, 7.5 pH'da ise 210. dakikada %33.11 olarak elde edilmiştir. Üretilen GOS miktarları açısından 6.5 ve 7.5 pH uygulamalarında sonuçlar birbirine yakın olmasına karşın reaksiyon hızının 6.5 pH'da daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.31. Serbest enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)

Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın GOS üretimine etkisi Şekil 4.32.'de verilmiştir. Çapraz bağlı enzimde serbest enzimin aksine tüm pH uygulamalarında GOS üretiminin gerçekleştiği görülmüştür. pH 5.5'de 60. dakikada %5.62 olan GOS miktarı bu noktadan sonra değişim göstermemiştir. Bu pH'da immobilize enzim aktivitesini 60

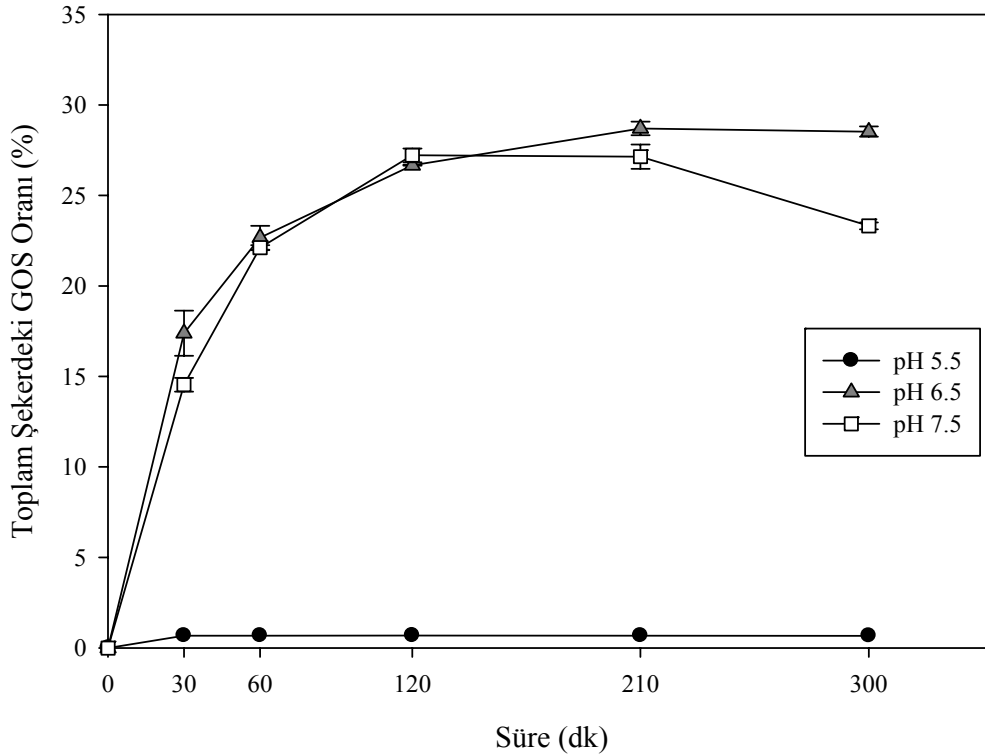
dakika boyunca korumuş, fakat bu süreden sonra inaktive olmuştur. Bu durum hem elde edilen GOS miktarında azalma olmaması yani rehidrolizasyonun görülmemesi, hem de Şekil 4.38.'de görüleceği üzere 5.5 pH'da laktoz hidrolizasyonunun 60. dakikada durmasıyla açıklanabilir. pH 6.5'de üretilen maksimum GOS miktarı %18.34 ile 120. dakikada sağlanmıştır. pH 7.5'de ise maksimum GOS üretimi % 15.37 olarak elde edilmiştir. pH 6.5 ve 7.5'de 120. dakikadan sonra rehidrolizasyon başlamıştır. Çapraz bağlı enzimle GOS üretiminde pH'nın hem reaksiyon hızına hem de üretilen GOS miktarlarına etkisi belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)

Şekil 4.33.'de Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi görülmektedir. pH'ya bağlı olarak GOS üretiminin farklılık gösterdiği saptanmış ve 5.5 pH'da enzim ilk 30 dakika içinde çok az bir aktivite göstererek %0.68 GOS üretmiş ve bundan sonra immobilize enzimin inaktif olması nedeniyle GOS miktarının aynı seviyede kaldığı saptanmıştır. pH'nın 6.5'e çıkmasıyla Duolite XAD761'e adsorbe enzimde üretilen GOS miktarı maksimuma çıkmış ve reaksiyonun 210. dakikasında %28.7 olmuştur. pH'nın 7.5'e çıkmasıyla, üretilen GOS miktarında bir

miktar düşüş görülmüş ve başlangıçta ortamda bulunan laktozun %27.22'si GOS'lere dönüşmüştür.



Şekil 4.33. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın GOS oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)

Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Lactozym ile yaptıkları araştırmada pH'nın GOS üretimi üzerine etkisini incelemişler ve 5.5 pH'da enzimin inaktive olduğunu, *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile optimal GOS üretimi için pH değerinin 6.5-7.5 arasında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Valero (2009), *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae* ve *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal'ların serbest formlarını kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada pH'nın GOS üretimine etkisini incelemiştir. *B. circulans* kaynaklı β -Gal için 4.5-7.5 pH aralığını, *A. oryzae* kaynaklı β -Gal için 3.5-6.0 pH aralığını ve *K. lactis* için de 5.0-8.0 pH aralığını test etmiş ve *B. circulans* ve *A. oryzae* kaynaklı β -Gal'ların GOS üretim miktarları üzerine pH'nın etkisi olmadığını sadece reaksiyon hızlarının bu durumdan etkilendiğini bildirmiştir. Bunlardan farklı olarak bizim çalışmamıza benzer bir şekilde *K. lactis* kaynaklı β -Gal'in GOS üretiminin pH'dan etkilendiğini ve 5.0 pH'da enzimin inaktive olması nedeniyle GOS oluşmadığını tespit etmiştir. Hsu ve ark. (2007), *Bifidobacterium longum* kaynaklı β -

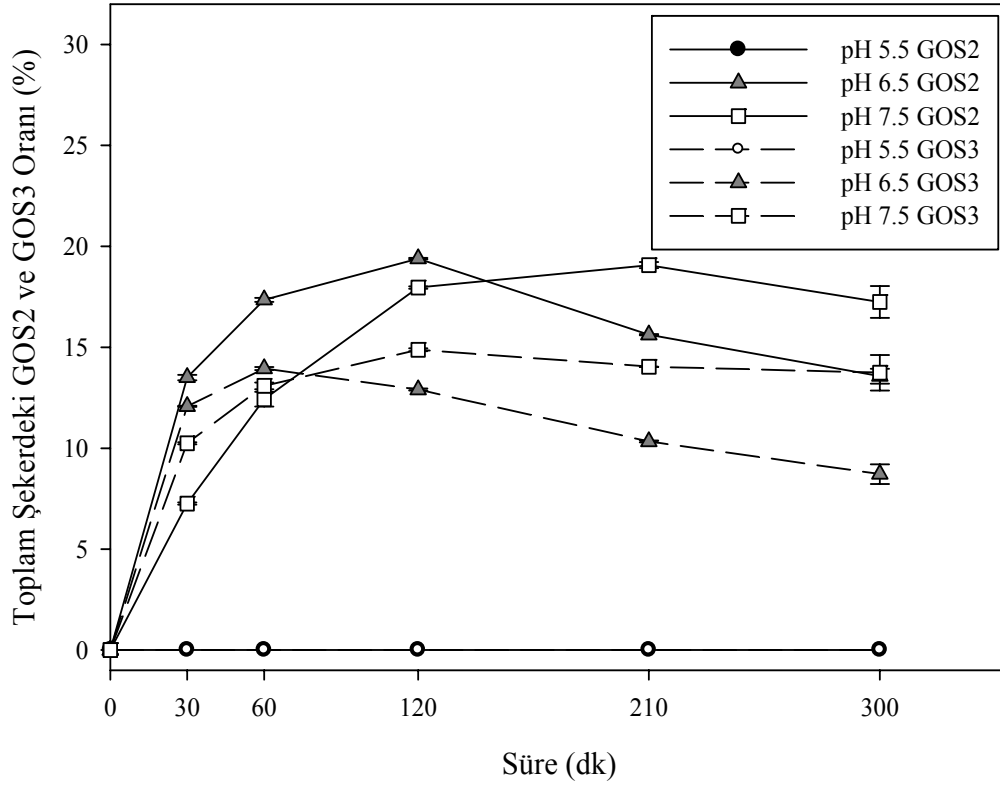
Gal'in serbest formuyla GOS üretmişler ve pH'nın üretilen GOS miktarı üzerine etki ettiğini saptamışlardır. Maksimum GOS üretimini 6.8 pH'da elde etmişler ve bu pH'nın altında ve özellikle üstündeki pH değerlerinde GOS üretiminin azaldığını görmüşlerdir. Cruz ve ark. (1999a), *Penicillium simplicissimum* kaynaklı serbest β -Gal ile ürettikleri GOS miktarının pH artışıyla 6.5 pH'ya kadar arttığını ve sonrasında da azaldığını belirlemişlerdir. Rustom ve ark. (1998), *A. oryzae*, *K. lactis* ve *K. fragilis* kaynaklı β -Gal'lar ile GOS üretmişlerdir. pH'nın yükselmesiyle *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile üretilen GOS miktarında düşüş, diğer β -Gal'lar ile elde edilen GOS miktarlarında ise artış saptamışlardır.

Neri ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada serbest ve immobilize enzimlerde pH'nın 3.5-5.5 arasında değişmesinin GOS üretimini etkilemediğini bildirmişlerdir. Yine benzer şekilde Albayrak ve Yang (2002a), *A. oryzae* kaynaklı immobilize β -Gal ile yaptığı çalışmada 4.5-6.0 pH aralığında gerçekleştirdiği GOS denemelerinde GOS üretim miktarının pH'dan etkilenmediğini saptamışlardır.

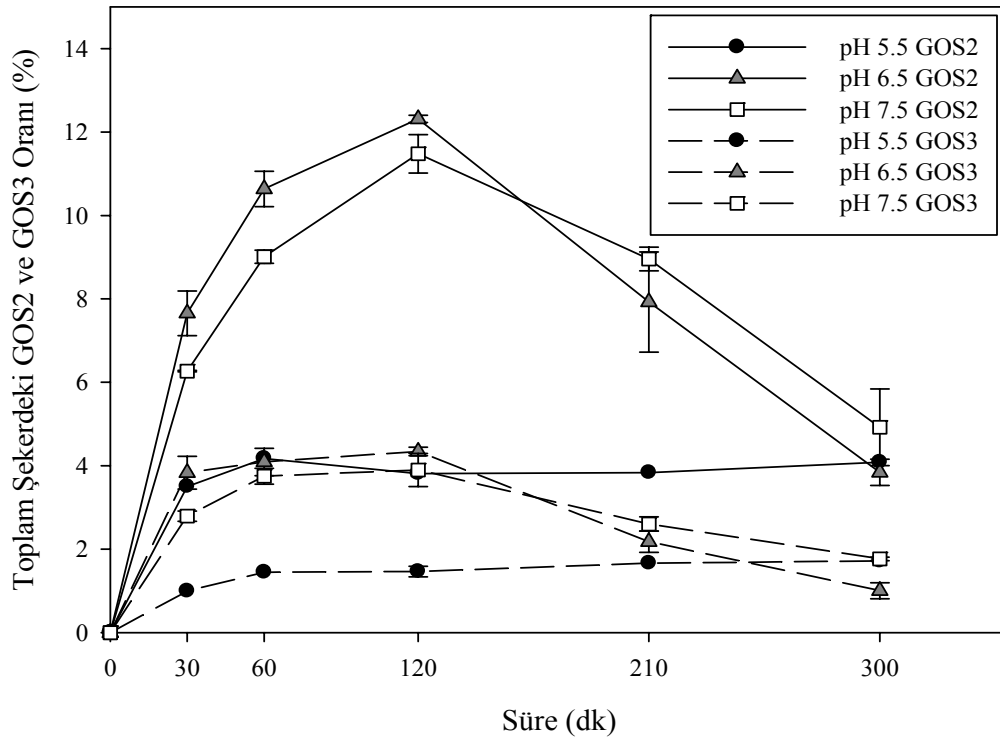
Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde GOS üretiminin pH'dan etkilenme durumunun, genellikle enzim kaynağıyla ilişkili olduğu söylenebilir. Özellikle *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile GOS üretiminin pH değişiminden etkilenmediği göze çarpmaktadır. *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'ların kullanıldığı GOS üretimleri pH değişiminden etkilenmekte özellikle 5.5 pH değerinin altında meydana gelen inaktivasyon nedeniyle GOS elde edilememektedir.

Serbest β -Gal'in ürettiği GOS2 ve GOS3 miktarları üzerine pH'nın etkisi Şekil 4.34.'de verilmiştir. Serbest enzimin 5.5 pH'da inaktif olduğu bu analizde de kendini göstermiş ve GOS2 ve GOS3 üretimi saptanamamıştır. pH 6.5'de %19.4 GOS2, %13.95 GOS3 üretimi elde edilirken, pH 7.5'de ise %19.07 GOS2, %14.88 GOS3 üretimi sağlanmıştır. Üretilen GOS2 ve GOS3 miktarlarının pH değişimi tarafından etkilendiği belirlenmiş, 6.5 pH'da GOS2'nin, 7.5 pH'da da GOS3'ün daha fazla miktarda üretiminin gerçekleştiği görülmüştür.

Şekil 4.35.'de çapraz bağlı enzim ortamında pH'ya bağlı olarak GOS2 ve GOS3 oluşumunun grafiği görülmektedir. Çapraz bağlı enzimin pH stabilitesinin (Şekil 4.18.) ve aktif olduğu pH aralığının serbest enzime göre geniş olması (Şekil 4.14.) nedeniyle laktozla gerçekleştirilen GOS üretimi deneylerinde de seçilen tüm pH değerlerinde GOS2 ve GOS3 üretimi sağlanmıştır. pH 5.5'de ilk 60 dakika boyunca hızlı bir üretim sergileyen immobilize enzimin bu süreden sonra üretim miktarlarının neredeyse



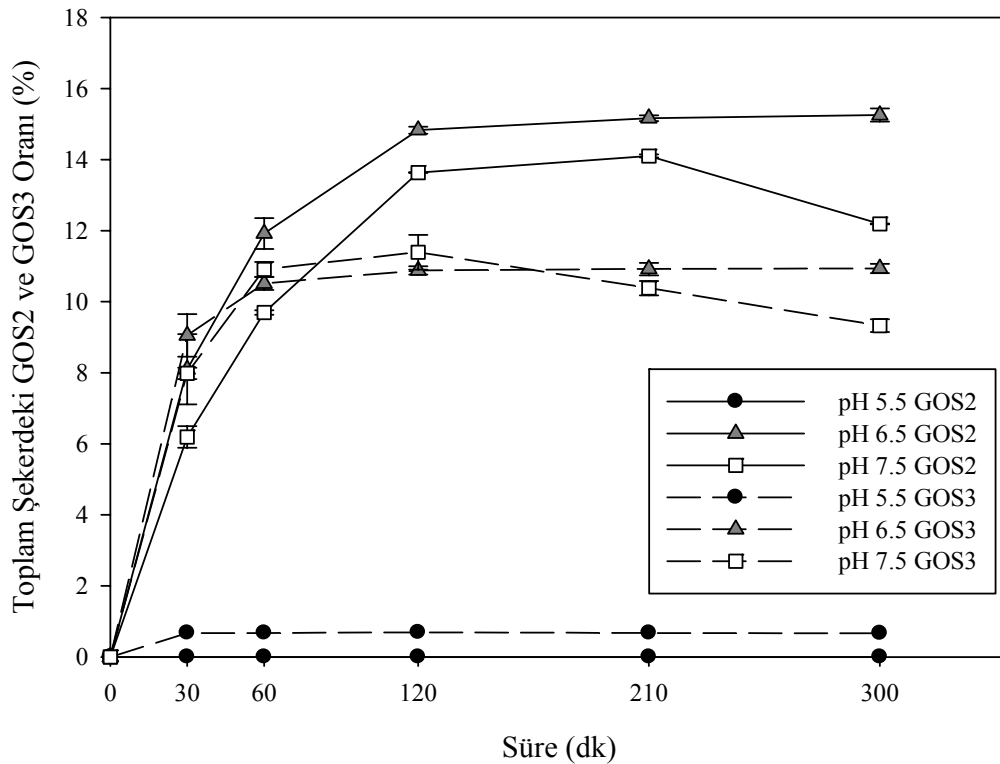
Şekil 4.34. Serbest enzim ortamında pH'nın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)



Şekil 4.35. Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)

sabitlendiği görülmektedir. Bu pH'da %4.17 GOS2, %1.72 GOS3 üretiminin olduğu görülmüştür. pH 6.5 ve 7.5 iken immobilize enzimin maksimum GOS2 ve GOS3 üretimlerini 120. dakikada oluşturduğu dikkati çekmektedir. Bu süreden sonra rehidrolizasyonun başladığı tespit edilmiştir. Diğer pH değerlerine göre kıyaslandığında 6.5 pH'da GOS2 ve GOS3 üretimlerinin daha yüksek olduğu ve bu pH'da %12.31 GOS2, %4.34 GOS3 üretildiği, 7.5 pH'da ise %11.48 GOS2, %3.9 GOS3 üretildiği görülmektedir.

Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal ile farklı pH'larda üretilen GOS2 ve GOS3 miktarlarına ait grafik Şekil 4.36.'da görülmektedir. Burada immobilize enzimin serbest enzime göre pH 5.5'de inaktive olması gecikmiş ve bunun sonucunda az da olsa GOS3 üretimi (%0.68) gerçekleşmiştir. Sonrasında enzimin inaktive olduğu ve GOS3 miktarının sabitlendiği belirlenmiştir. Enzimin inaktif olana kadar sadece GOS3 üretmesi laktozun parçalanmaya başlaması aşamasında ortamda çok miktarda serbest glikoz ve galaktoz olmaması nedeniyle hidroksil grubu olarak laktozun öne çıkarak trisakkarit oluşumunu öncelikli olarak gerçekleştirdiğini göstermektedir. pH 6.5'te maksimum GOS2 üretimi 300. dakikada %15.26 olarak yine GOS3 üretimi de aynı



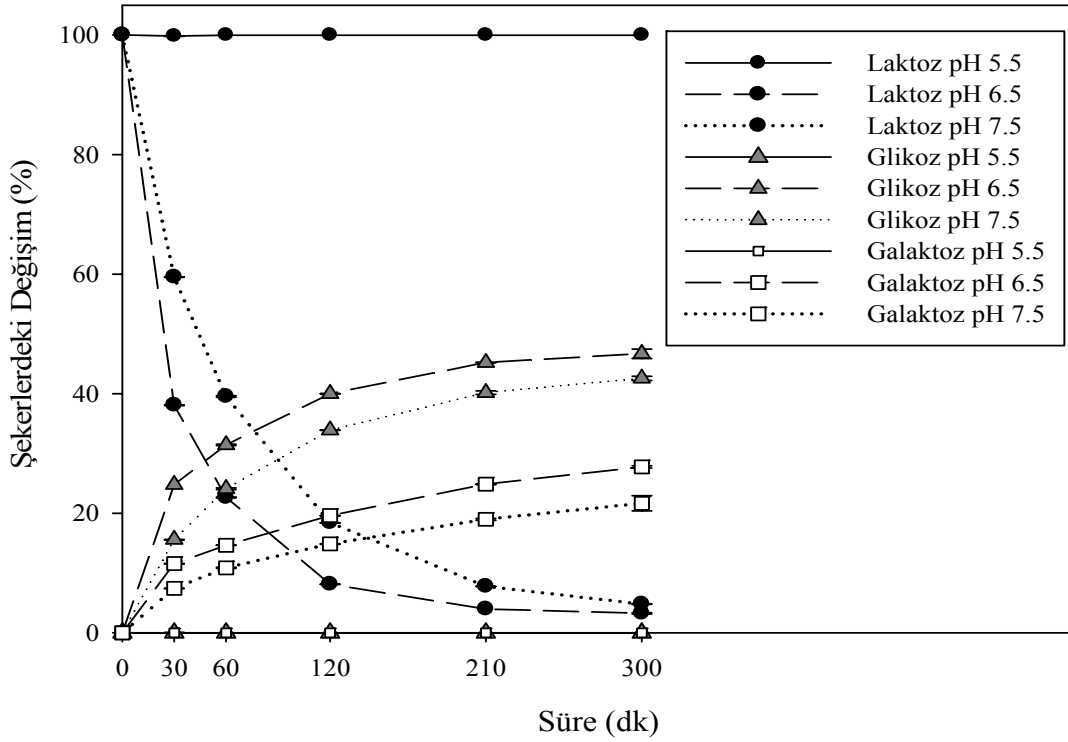
Şekil 4.36. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)

sürede %10.93 olarak tespit edilmiştir. pH 7.5'e çıktığında GOS2 %14.1, GOS3 ise %11.39 olarak saptanmıştır. Serbest enziminkine benzer şekilde pH 6.5'de GOS2, pH 7.5'de ise GOS3 daha fazla üretilmiştir.

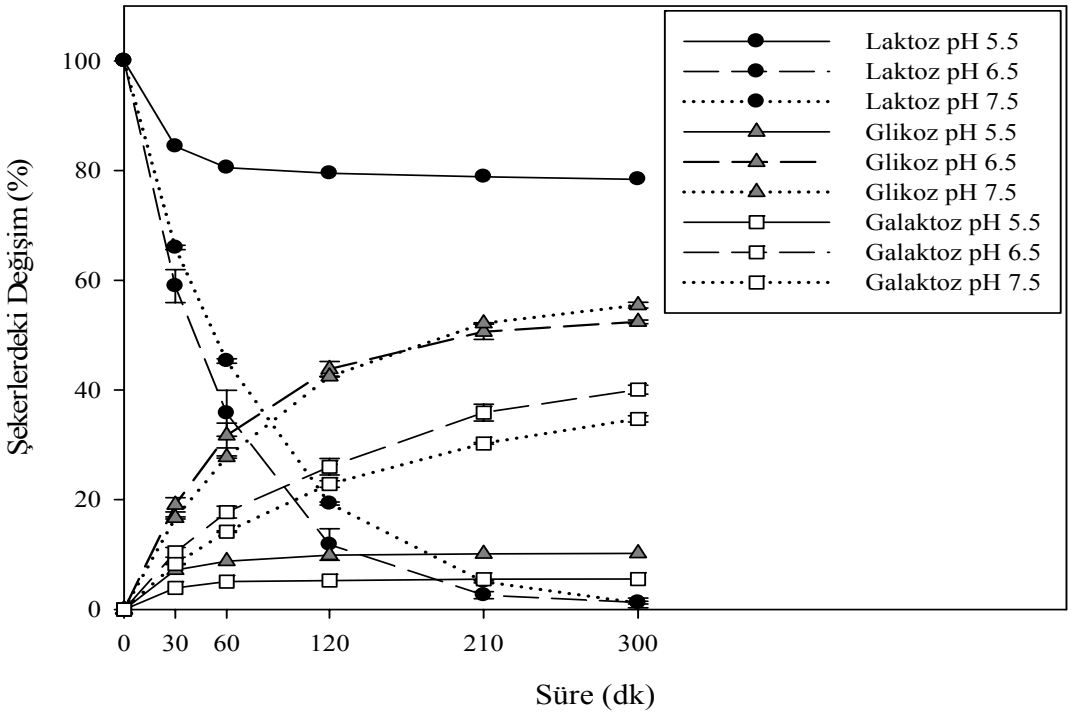
Serbest ve immobilize enzimlerde GOS2/GOS3 oranlarına pH'ın etkisi açısından bakıldığında serbest enzim için bu oranın ortalama 1.34, Duolite XAD761'e adsorbe enzim için ortalama 1.35 ve çapraz bağlı enzim için ise ortalama 2.73 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar laktoz konsantrasyonuna göre elde edilen sonuçlarla benzer çıkmıştır. Çapraz bağlı enzimin diğerlerine göre GOS3'ü daha az miktarda ürettiği belirlenmiştir.

Şekil 4.37'de serbest enzim ortamında pH'ya göre reaksiyon boyunca laktoz miktarları ve oluşan glikoz, galaktoz miktarları görülmektedir. pH'nın 5.5 olduğu durumda β -Gal'in inaktive olması sebebiyle laktoz miktarında değişim olmamış, bunun yanında glikoz ve galaktoz da oluşmamıştır. Ortam pH'nın 6.5'e çıkmasıyla ilk 30 dakikada laktoz miktarı %40'ın altına inmiştir. pH 7.5 iken reaksiyon hızı daha yavaş seyretmiş ve reaksiyonun 60. dakikasında laktoz miktarı %40'ın altına inmiştir. Reaksiyonun bitirildiği 300. dakikada laktoz miktarları pH 6.5 için %3.26, pH 7.5 için %4.8 olmuştur. Yine aynı noktadaki glikoz miktarları pH 6.5 için %46.69, pH 7.5 için %42.57, galaktoz miktarları pH 6.5 için %27.77, pH 7.5 için ise %21.66'dır. Laktozun parçalanması açısından 6.5 pH'lı ortamın daha etkin olduğu görülmüştür.

Çapraz bağlı enzimde laktoz miktarı, glikoz ve galaktoz oluşumu açısından pH'nın etkisi incelendiğinde β -Gal'in immobilizasyonu ile gelişen pH dayanımı ve çalışma aralığı etkisiyle çalışmada seçilen tüm pH değerlerinde laktozun hidroliz edildiği saptanmıştır (Şekil 4.38.). pH 5.5'de az olan laktoz hidrolizi (%78.42 300. dakikada) pH değerinin yükselmesiyle artış göstermiştir. Reaksiyonun 300. dakikasında pH 6.5'de %1.27 laktoz kalmışken, pH 7.5'de reaksiyon ortamında %1.18 laktoz bulunmuştur. Reaksiyon sonunda pH 6.5'de galaktoz miktarının (%40.07) pH 7.5'de ise glikoz miktarının (%50) fazla olduğu belirlenmiştir. Glikoz oluşum hızı 120. dakikaya kadar sabit bir hızla devam etmiş ve sonrasında yavaşlamaya başlamıştır.

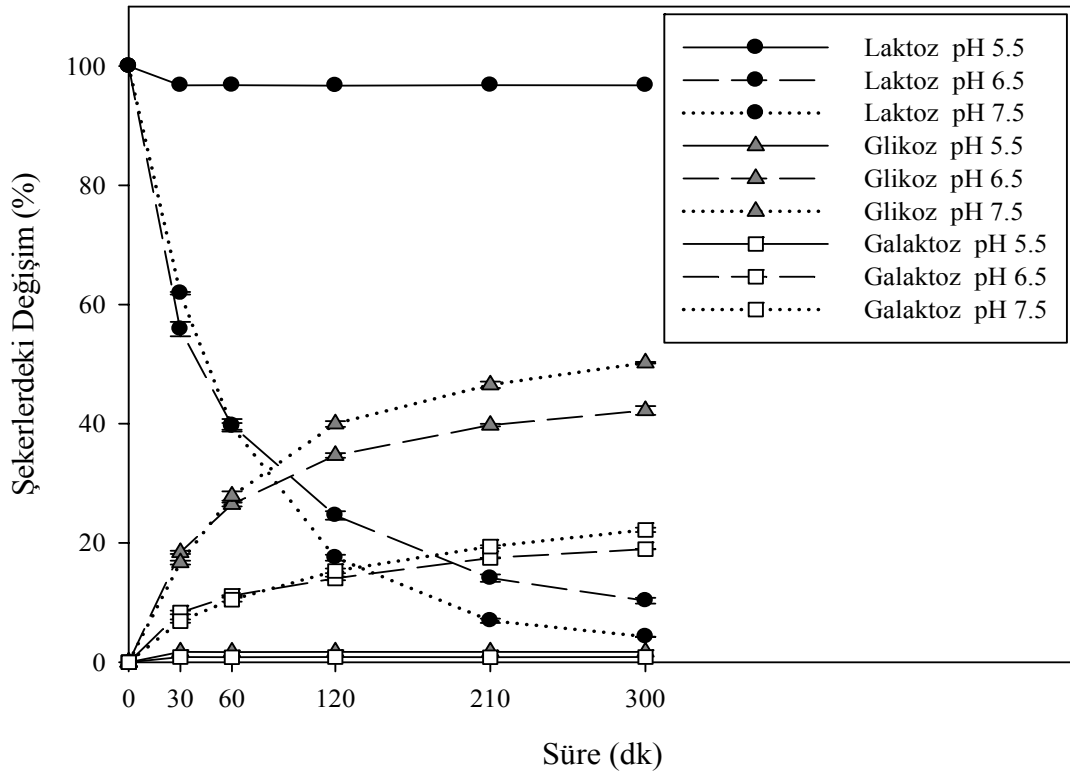


Şekil 4.37. Serbest enzim ortamında pH'nın laktöz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (%35 laktöz ve 50 °C sıcaklıkta)



Şekil 4.38. Çapraz bağlı enzim ortamında pH'nın laktöz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (%35 laktöz ve 50 °C sıcaklıkta)

Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi Şekil 4.39.'da görülmektedir. İmmobilize β -Gal'ın 5.5 pH'daki laktoz hidrolizi serbest enzime göre bir miktar fazla olsa da enzim inaktivasyonu olduğu gözlenmiş ve hidroliz 30. dakikadan sonra durmuştur. Reaksiyonun 30. dakikasında pH 5.5'de ortamda %96.75 laktoz bulunmuştur. İlk 120 dakikada pH 6.5 ve 7.5 için glikoz oluşum hızının yüksek olduğu bu noktadan sonra reaksiyon hızının yavaşlamaya başladığı tespit edilmiştir. Reaksiyon sonunda ortamda pH 6.5 için %42.22 glikoz, %18.94 galaktoz ve % 10.31 laktoz, pH 7.5 için ise %50 glikoz, %22.19 galaktoz ve %4.26 laktoz saptanmıştır.



Şekil 4.39. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında pH'nın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve 50 °C sıcaklıkta)

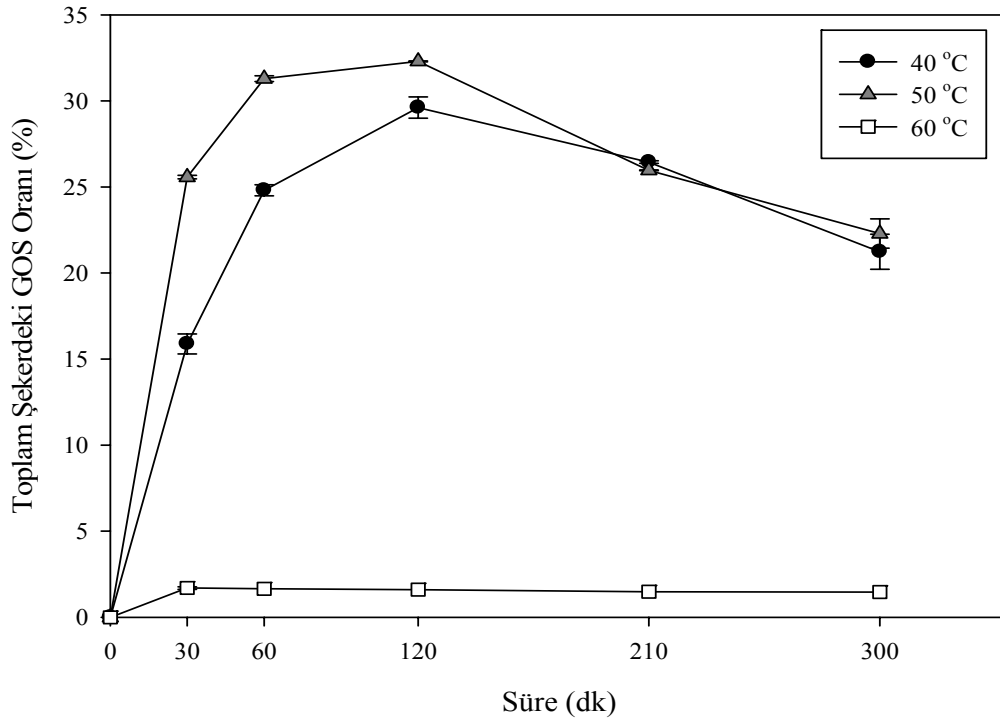
Ortam pH'sının laktoz hidrolizine yönelik etkisi incelendiğinde muhtemel inaktivasyon ve enzim konformasyonunu zorlaması nedeniyle pH 5.5'in serbest ve immobilize enzimlerde hidroliz düzeyinin düşük olmasına yol açtığı görülmektedir. Serbest enzimde 6.5 pH'nın, bunun tam aksine Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 7.5 pH'nın, hidroliz miktarı ve oluşan glikoz, galaktoz miktarlarını yükselttiği dikkati

çekmiştir. Çapraz bağlı enzimde ise pH 6.5’de galaktoz miktarının, pH 7.5’de ise glikoz miktarının yüksek olduğu saptanmıştır.

Tüm bu pH’ya bağlı sonuçlar incelendiğinde en yüksek GOS üretimini sağlayan pH değerleri GOS reaksiyonları için kullanılacaktır. Böylece serbest enzim için pH 7.5, çapraz bağlı enzim ve Duolite XAD761’e adsorbe enzimde ise pH 6.5 değerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

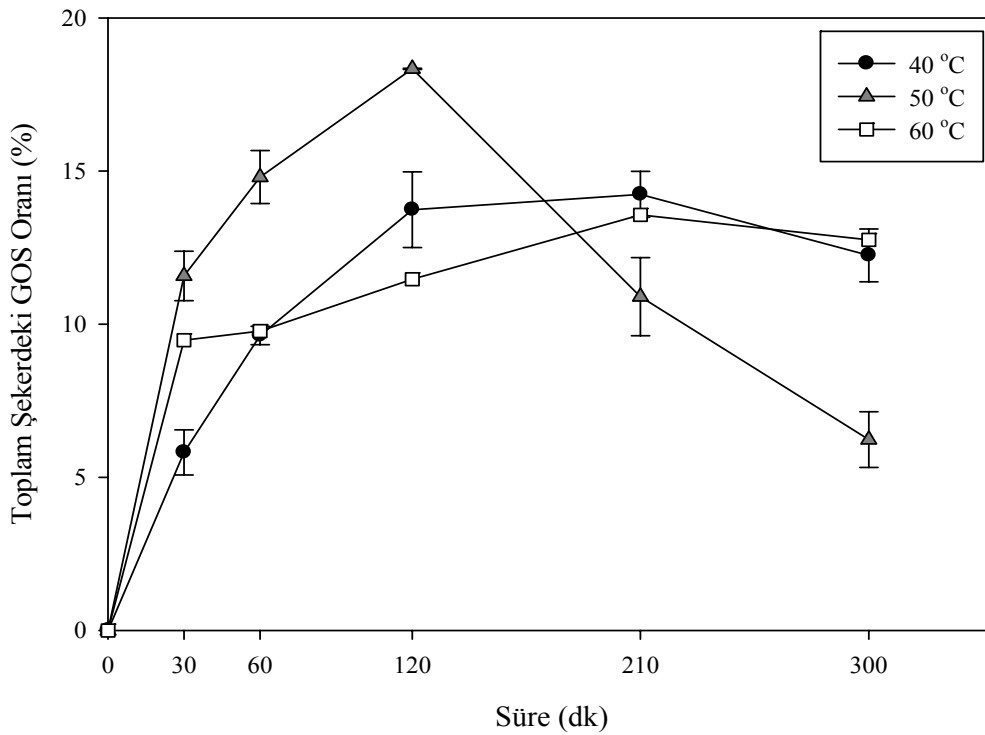
4.3.3. Sıcaklığın GOS Üretimine Etkisi

Sıcaklığın GOS üretimi üzerine etkisini incelemek için 6.5 pH’lı 50 mM fosfat tamponuyla hazırlanmış %35’lik laktoz çözeltileri kullanılarak 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda kesikli tip karıştırılmalı tank reaktöründe reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Serbest enzimin farklı sıcaklık şartlarında meydana getirdiği GOS miktarları Şekil 4.40.’da görülmektedir. Sıcaklığın 40 ve 50 °C olduğu durumda 120. dakikaya kadar GOS üretim miktarlarının arttığı görülmektedir. Maksimum GOS üretimi 50 °C’de %32.3 olarak elde edilmiş, bunu 40 °C sıcaklıkta %29.62’lik üretim takip etmiştir. Serbest enzimin 60 °C’de sıcaklıkta denaturasyona uğraması nedeniyle ilk 30 dakika içinde sadece %1.7’lik GOS üretimi gerçekleşmiş ve 300. dakikada GOS miktarı %1.47 olarak saptanmıştır.



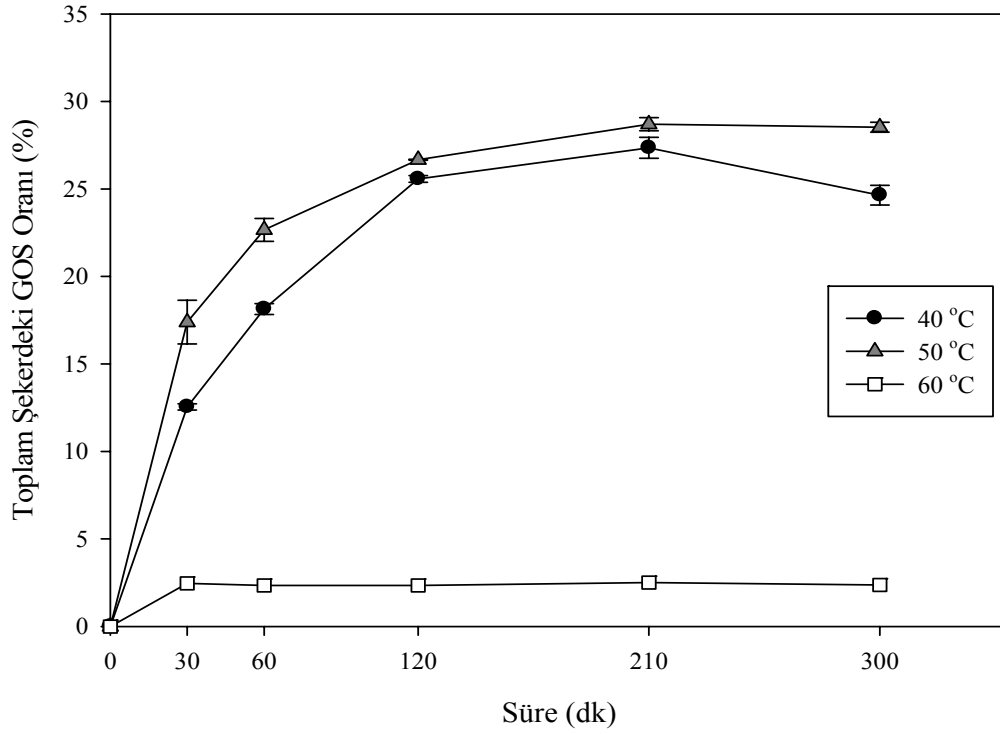
Şekil 4.40. Serbest enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5’de)

Çapraz bağlı enzim kullanılarak gerçekleştirilen sıcaklığa bağımlı GOS üretim miktarları Şekil 4.41.'de verilmiştir. Burada immobilizasyon sonucunda enzimde meydana gelen ısıl dayanımdaki artışın etkisi görülmüş ve kullanılan bütün sıcaklık şartlarında GOS oluşumu gözlenmiştir. İlk 30 dakikada 50 ve 60 °C sıcaklıklarda GOS üretim hızı oldukça yüksek olmasına karşın bu süreden sonra 60 °C sıcaklık uygulamasında reaksiyon hızında azalma göze çarpmıştır. Sıcaklıklara göre maksimum GOS üretimleri sıralanacak olursa 40 °C için %14.24, 50 °C için %18.34 ve 60 °C için ise %13.57 GOS elde edilmiştir. Rehidrolizasyon 50 °C için 120. dakikadan sonra, 40 ve 60 °C'ler için ise 210. dakikadan sonra başlamıştır.



Şekil 4.41. Çapraz bağlı enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

Şekil 4.42.'de Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi görülmektedir. Sıcaklık 40 °C iken reaksiyonun 210. dakikasında %27.35 GOS üretimi elde edilmiştir. Laktoz çözeltisinin sıcaklığı 50 °C'ye çıktığında yine 210. dakikada %28.7'lik GOS üretimi elde edilmiştir. Sıcaklık 60 °C'ye çıktığında ise serbest enzimde olduğu gibi muhtemelen denaturasyon etkisi nedeniyle 30. dakikaya kadar elde edilen %2.46'lık GOS üretimi reaksiyon süresince sabit kalmıştır.

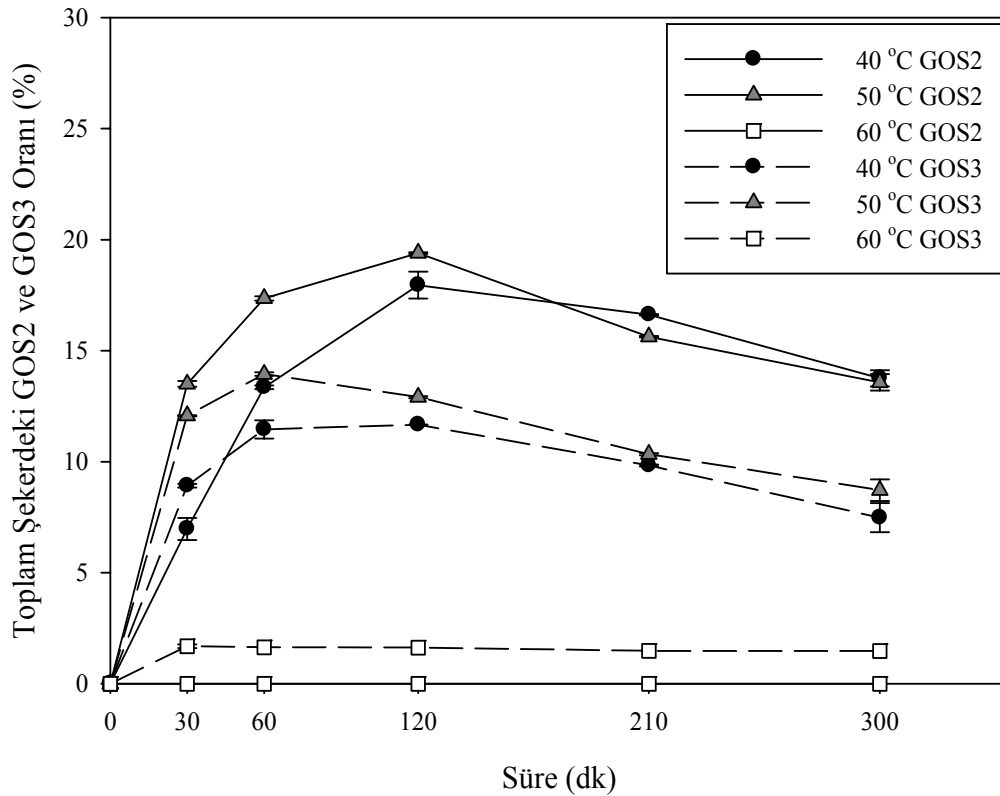


Şekil 4.42. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın GOS oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

Serbest ve immobilize β -Gal'lar ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda sıcaklıkların 40 °C'den 50 °C'ye çıkmasıyla GOS üretiminin arttığı ve sıcaklığın 60 °C olduğu durumda ise GOS üretiminin çok düştüğü görülmüştür. Tüm enzim formlarında GOS üretiminin sıcaklıktan etkilendiği görülmektedir. *Kluyveromyces spp.* kaynaklı olmayan serbest β -Gal'lar ile yapılan bazı araştırmalarda reaksiyon sıcaklığının değişimiyle GOS üretiminin etkilenmediği bildirilmiştir (Boon ve ark., 2000; Chen ve ark., 2003; Splechtna ve ark., 2006). Immobilize β -Gal'ların kullanıldığı benzer bazı araştırmalarda sıcaklık değişiminden GOS üretiminin etkilenmediği, fakat reaksiyon hızlarının etkilendiği belirtilmiştir (Albayrak ve Yang, 2002a; Neri ve ark., 2009). Bunların aksine Hsu ve ark. (2007), *Bifidobacterium longum* kaynaklı β -Gal'ın serbest formunu kullanarak GOS üretmişler ve farklı sıcaklıklardaki (25, 35, 45, 55, 65 °C) GOS üretimlerini değerlendirmişlerdir. Reaksiyon sıcaklığının 25 °C'den 45 °C'ye çıkmasıyla GOS üretiminin %13'den %32.5'e yükseldiğini ve 55 ve 65 °C'lerde GOS üretiminde büyük bir düşüş olduğunu saptamışlardır. Zheng ve ark. (2006), *Aspergillus candidus* kaynaklı rekombinant β -Gal'ı immobilize ederek GOS üretimi gerçekleştirmişler ve sıcaklık değişiminin GOS üretimine etkisini 5 °C'lik artışlar olacak şekilde 25-45 °C

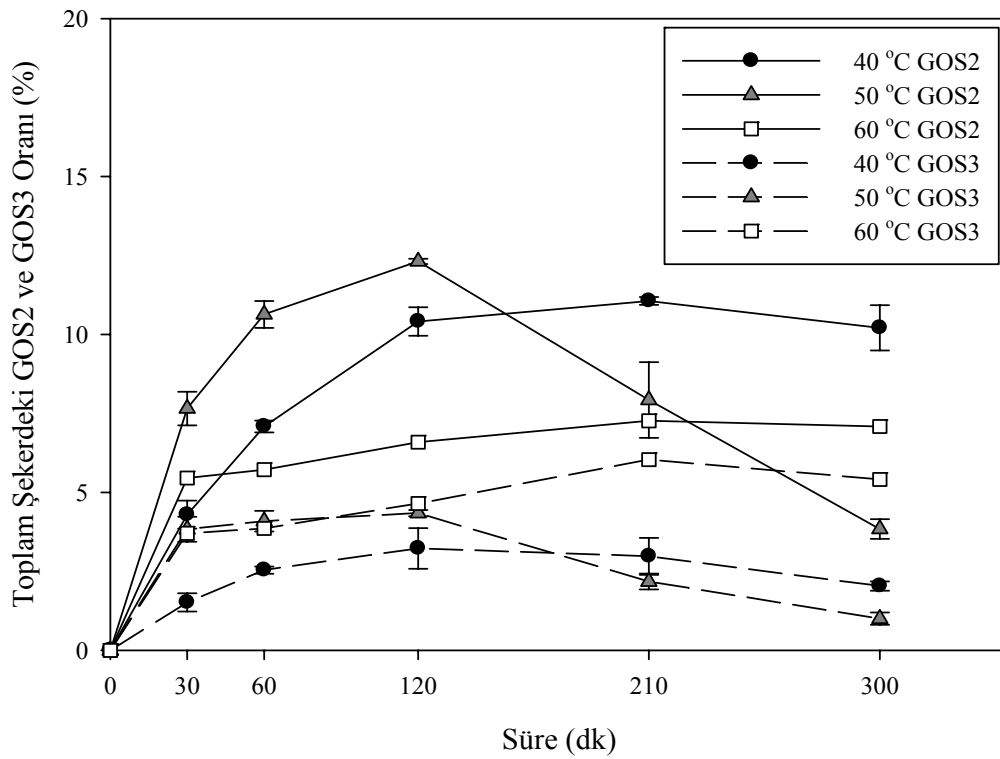
sıcaklıklar arasında denemişlerdir. Sıcaklık artışıyla GOS üretiminin yavaş bir şekilde artış gösterdiğini, GOS üretimi için optimum sıcaklığın 35-45 °C'ler arasında olduğunu ve bu aralıkta yaklaşık %16.5 GOS üretiminin elde edildiğini bildirmişlerdir. Yine bu çalışmalara ve çalışmamıza benzer olarak belirli bir sıcaklık artışına kadar GOS üretiminin arttığı ve daha yüksek sıcaklıklarda GOS üretiminin azaldığı pek çok araştırmada belirlenmiştir (Rustom ve ark., 1998; Cruz ve ark., 1999a; Hansson ve Adlercreutz, 2001; Cruz-Guerrero ve ark., 2006).

Şekil 4.43.'de serbest enzim ile oluşturulan reaksiyonda sıcaklığın, oluşan GOS2 ve GOS3 miktarlarına etkisi görülmektedir. Sıcaklık 60 °C iken sadece GOS3 oluştuğu tespit edilmiş ve ilk 30 dakikada oluşan %1.69'luk GOS3 miktarı bu süreden sonra sabit kalmıştır. Bu sıcaklıkta serbest β -Gal denature olmuştur. Reaksiyon ortamının sıcaklığı 50 °C'ye düştüğünde 120. dakikada %19.4 GOS2, 60. dakikada ise %13.95 GOS3 üretildiği tespit edilmiştir. Sıcaklık 40 °C'ye düştüğünde reaksiyonun 120. dakikasında %17.95 GOS2, %11.67 GOS3 oluştuğu görülmüştür. Reaksiyon ortamı sıcaklığının 60 °C olduğu durum hariç olmak üzere diğer sıcaklıklarda maksimum GOS2 ve GOS3 elde edilen sürelerden sonra rehidrolizasyon hızlarının benzer olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 4.43. Serbest enzim ortamında sıcaklığın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

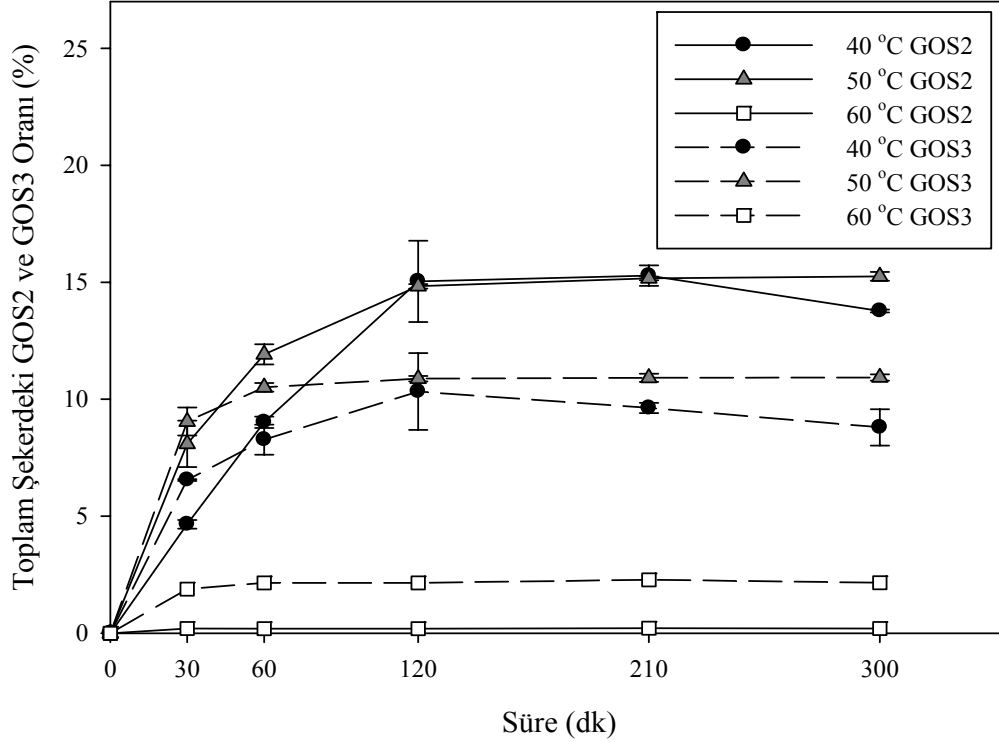
Çapraz bağlı β -Gal ile reaksiyon sonucu oluşan GOS2 ve GOS3 miktarları üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.44.'de görülmektedir. Isıl dayanımı yüksek olan bu immobilize β -Gal ile 60 °C sıcaklıkta 210. dakikada %7.27 GOS2, %6.04 GOS3 üretimine ulaşılmıştır. Reaksiyon sıcaklığı 50 °C iken maksimum GOS2 ve GOS3 üretimleri sırasıyla %12.31 ve %4.34 olarak 120. dakikada elde edilmiştir. Reaksiyonun 120. dakikasından sonra GOS2'nin rehidrolizasyon hızının çok arttığı görülmektedir. Ortam sıcaklığı 40 °C'ye indiğinde 210. dakikada %11.06 GOS2, 120. dakikada da %3.23 GOS3 üretimi görülmüştür.



Şekil 4.44. Çapraz bağlı enzim ortamında sıcaklığın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

Diğer immobilizasyon yönteminde Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal ile üretilen GOS2 ve GOS3 miktarları üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.45.'de verilmiştir. Sıcaklığın 40 °C olduğu reaksiyon koşullarında üretilen maksimum GOS2 ve GOS3 miktarları sırasıyla %15.29 ve %10.33 olmuştur. Sıcaklık 50 °C'ye çıktığında maksimum GOS2 miktarının (%15.26) 40 °C'ninkine çok yakın olduğu saptanmıştır. Maksimum GOS3 miktarı ise 300. dakikada %10.93 olarak tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamının sıcaklığı 60 °C'ye çıktığında immobilize enzimin özellikle ilk 30 dakika içinde

aktivite vererek %0.2 GOS2 ürettiği, ayrıca 60. dakikada %2.15 GOS3 oluşturduğu belirlenmiştir. Bu sürelerden sonra GOS2 ve GOS3 miktarlarında pek fazla bir değişim olmamıştır.

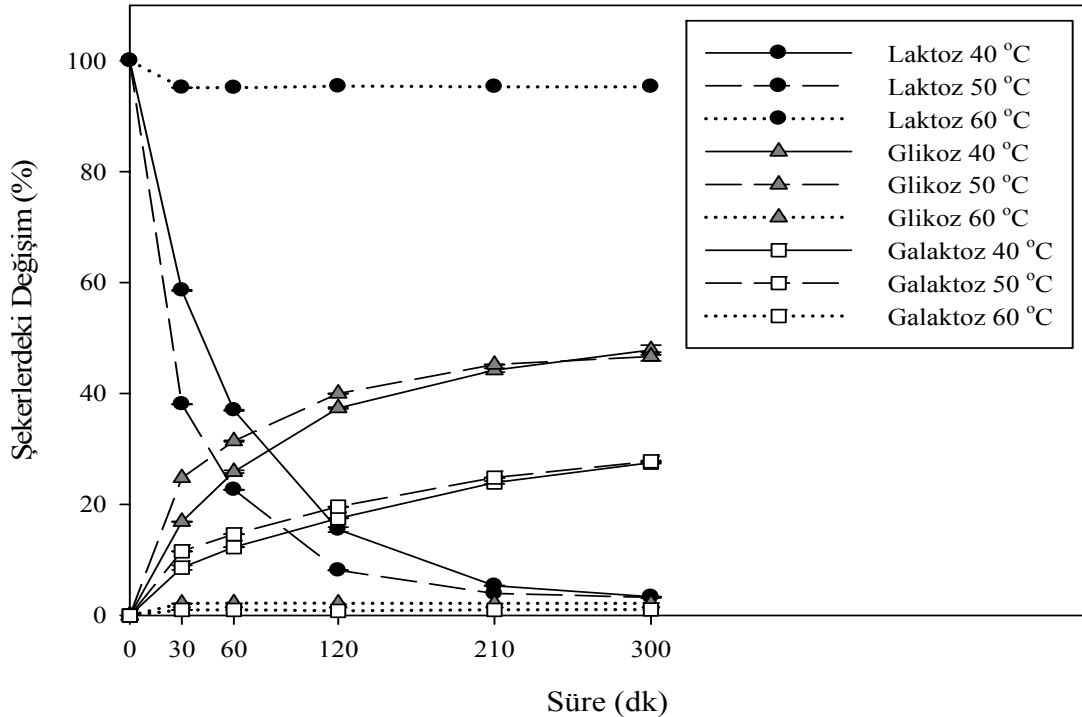


Şekil 4.45. Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın GOS2 ve GOS3 oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

Serbest ve immobilize enzimlerde sıcaklığın GOS2 ve GOS3 üretimi üzerine etkisi incelendiğinde yüksek sıcaklıkta GOS3 üretiminin arttığı gözlemlenmektedir. Cruz-Guerrero ve ark. (2006), hipertermofilik β -Glikosidazla organik çözücü ortamında oluşturdukları model sistemlerde GOS sentezlemiştir. Reaksiyon sıcaklığının 50 °C'den 90 °C'ye çıkmasıyla GOS3 üretiminin arttığını gözlemlemiştir. Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Lactozym kullanarak yaptıkları GOS üretiminde sıcaklığın etkisini de incelemiştir. Sıcaklık 40 ve 50 °C iken 6'-galaktosil laktoz (GOS3) miktarının yaklaşık %16 civarında birbirine çok yakın çıktığını tespit etmişlerdir. Galaktobioz + allolaktoz (GOS2) üretiminin 40 °C de yaklaşık %12, 50 °C'de ise yaklaşık %14 olduğunu saptamışlardır. Sıcaklık 60 °C'ye çıktığında %6 civarında GOS3 üretimi gerçekleştiğini, GOS2 üretiminin ise görülmediğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar serbest enzim sonuçlarımıza benzerlik göstermekte, fakat GOS3 üretim

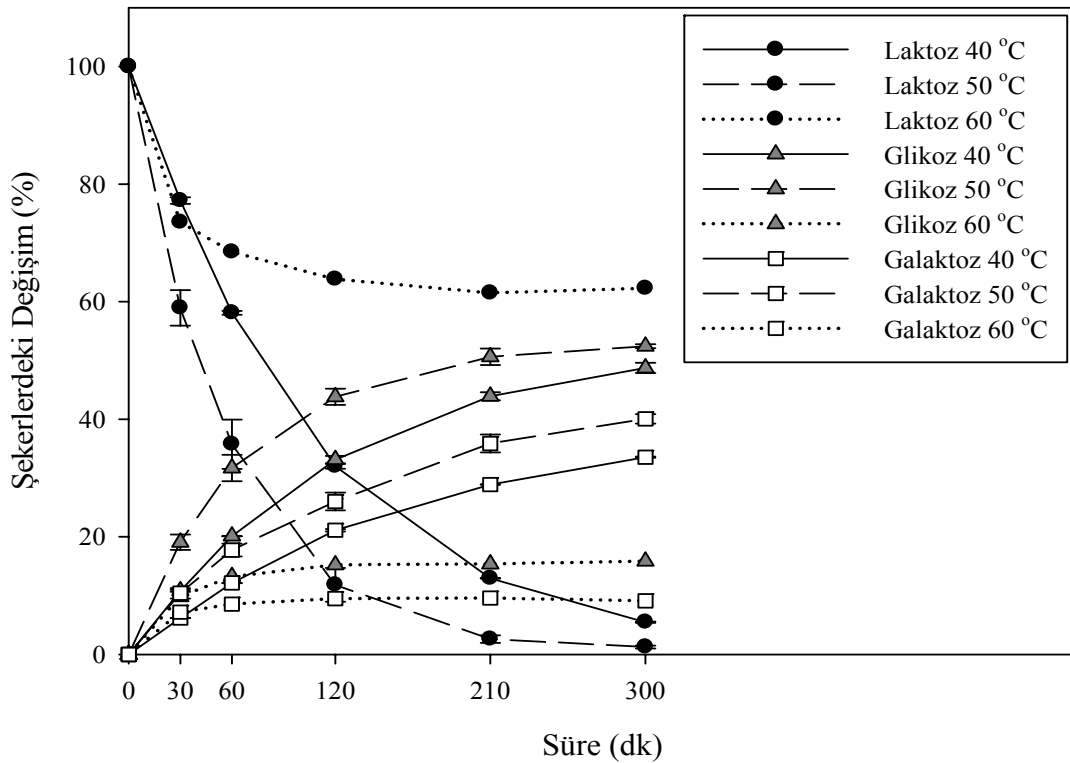
miktarımız (%1.69) bu değerin altında kalmıştır. Ayrıca çalışmamızda GOS2 üretim miktarının GOS3 üretiminden fazla olduğu tespit edilmiştir. Diğer araştırmacılardan farklı olarak Chen ve ark. (2003), *E. coli* kaynaklı β -Gal ile gerçekleştirdiği çalışmada sıcaklığın 37 °C'den 45 °C'ye çıkmasıyla toplam GOS sentezinin değişmediğini fakat allolaktöz (GOS2) üretiminin %31'den %45'e çıktığını görmüşlerdir.

GOS reaksiyonlarında sıcaklığa bağlı olarak reaksiyon boyunca ortamda bulunan laktoz miktarları, oluşan glikoz ve galaktoz miktarları da incelenmiştir. Serbest β -Gal için elde edilen laktoz, glikoz ve galaktoz miktarları Şekil 4.46.'da görülmektedir. Serbest enzimde 60 °C'lik sıcaklık uygulamasıyla ilk 30 dakikada ortamda bulunan laktoz miktarı %100'den %95.15'e düşmüş ve bu noktadan itibaren denaturasyon sebebiyle laktoz miktarında değişim olmamıştır. Bu esnada reaksiyon ortamındaki glikoz miktarı %2.2, galaktoz miktarı ise %1 civarında kalmıştır. Sıcaklığın 40 ve 50 °C olduğu durumda ise reaksiyon hızları farklı olsa da 300 dakikalık reaksiyon sonucunda hemen hemen birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ortamda bulunan laktoz miktarları 40 °C'de %3.37, 50 °C'de %3.26 iken, glikoz miktarları 40 °C'de %47.85, 50 °C'de %46.69 ve galaktoz miktarları da 40 °C'de %27.56, 50 °C'de %27.77 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.46. Serbest enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

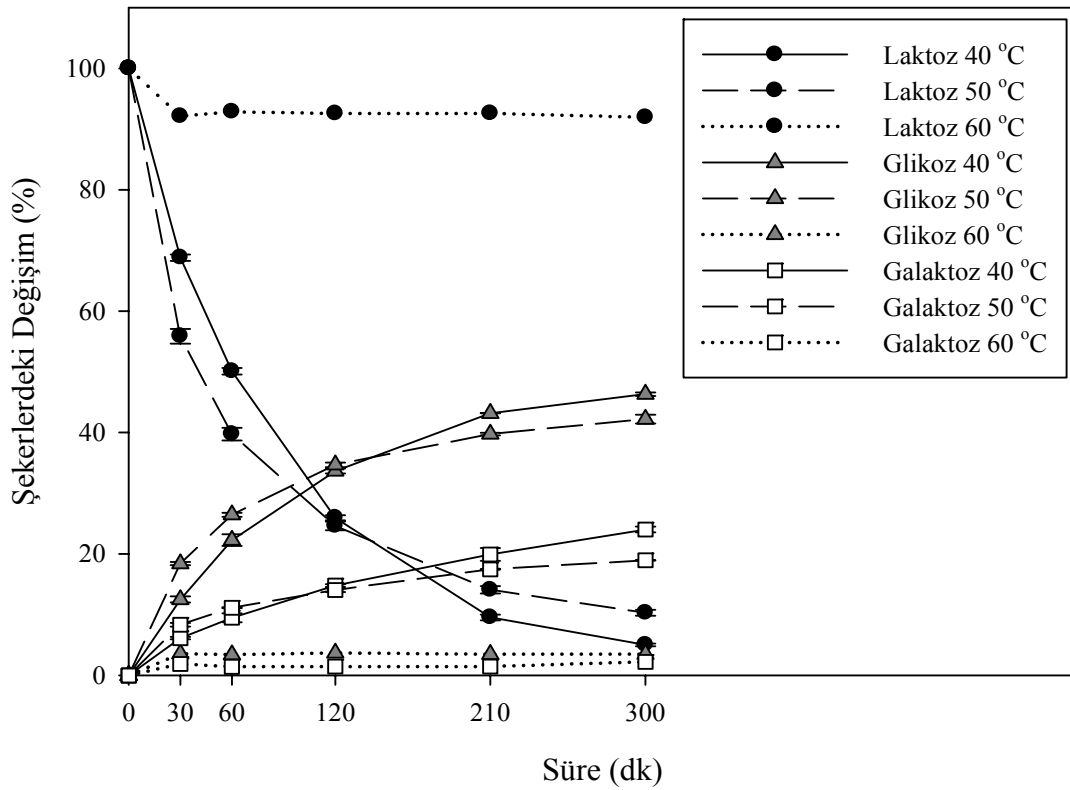
GOS reaksiyonunda çapraz bağlı β -Gal kullanıldığında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi Şekil 4.47.'de verilmiştir. Reaksiyon sıcaklığı 40 °C iken laktozun hidroliz hızının yavaş olduğu gözlenmiştir. Reaksiyonun sonunda (300. dakikada) ortamdaki laktoz miktarı %5.47, oluşan glikoz ve galaktoz miktarları ise sırasıyla %48.73 ve %33.55 olmuştur. Sıcaklık 50 °C'ye çıktığında hidroliz hızının arttığı reaksiyonun sonunda ortamda %1.27 laktoz, %50 glikoz ve %40.1 galaktoz olduğu belirlenmiştir. Çapraz bağlı β -Gal'in diğer β -Gal formlarına göre ısıl dayanımının fazla olması nedeniyle 60 °C sıcaklıkta da laktozun hidrolizi gerçekleşmiştir. İmmobilize enzimin, reaksiyonun 120. dakikasına kadar aktivite gösterdiği saptanmış ve 120. dakikada ortamdaki laktoz miktarını %63.82 seviyesine indirdiği, %15.24 glikoz, %9.47 galaktoz oluşturduğu görülmüştür. Bu noktadan sonra ise elde edilen değerler denaturasyon sebebiyle sabit seyretmiştir.



Şekil 4.47. Çapraz bağlı enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5'de)

Şekil 4.48.'de Duolite XAD761'e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi görülmektedir. Reaksiyonun 120. dakikasına kadar laktoz hidrolizi, glikoz ve galaktoz oluşum hızı bakımından 50 °C

sıcaklık uygulamasının önde olduğu bu noktadan sonra ise 40 °C sıcaklık uygulamasının öne geçtiği görülmektedir. Reaksiyonun bittiği 300. dakika itibariyle 40 °C sıcaklıkta %5 laktoz, %46.33 glikoz ve %24.03 galaktoz tespit edilmişken, 50 °C’de %10.31 laktoz, %42.22 glikoz ve %18.94 galaktoz bulunmuştur. Sıcaklık 60 °C iken ilk 30 dakikada denaturasyon görülmüş ve %92 civarında laktoz, %3.5 civarında glikoz ve %2 civarında galaktoz üretmiştir.



Şekil 4.48. Duolite XAD761’e adsorbe enzim ortamında sıcaklığın laktoz miktarına, glikoz ve galaktoz oluşumuna etkisi (%35 laktoz ve pH 6.5’de)

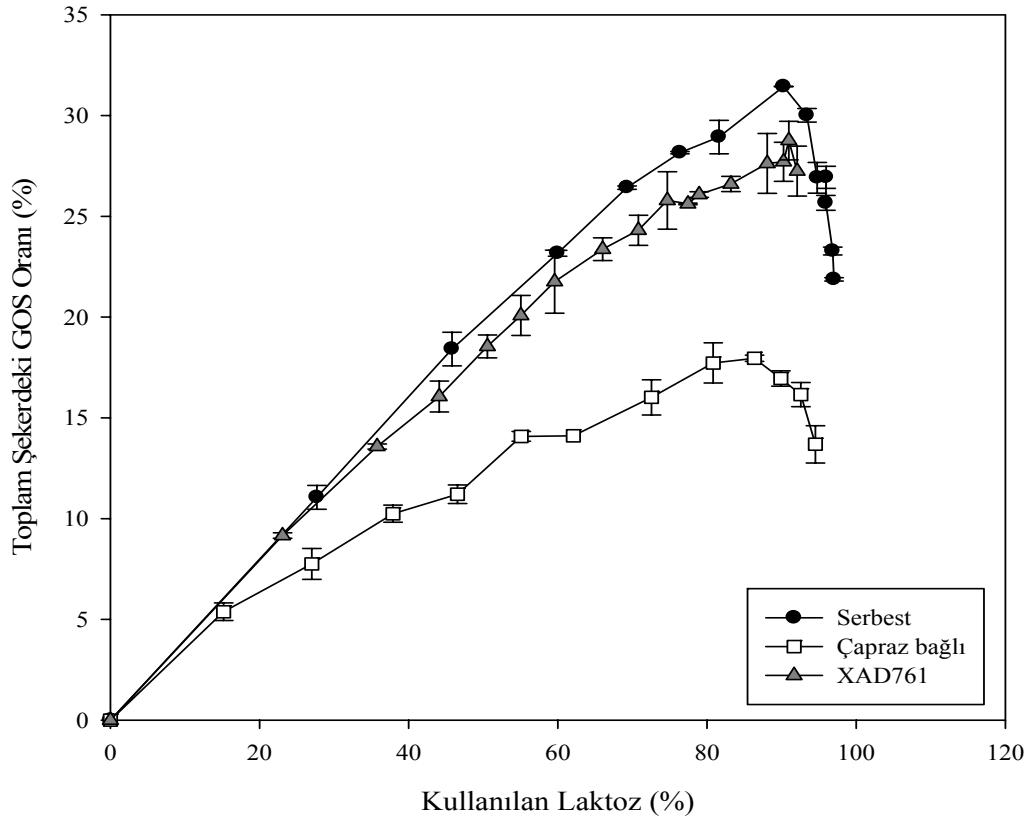
Serbest ve immobilize β -Gal’ların maksimum GOS ürettiği sıcaklık değerlerinin 50 °C olduğu görülmüştür. Bu sıcaklık değerinde ısıl stabilitenin düşük olduğu bilinmesine rağmen (Şekil 4.19.) laktoz çözeltilerinde elde edilen reaksiyon sonuçlarına göre 50 °C sıcaklığın GOS üretimi denemelerinde kullanılmasına karar verilmiştir. Bu bölümde GOS2 üretiminin yine baskın şekilde gerçekleştiği fakat yüksek sıcaklıklarda GOS3 üretiminin arttığı gözlenmiştir.

4.3.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin GOS Üretim ve Verimlerinin Karşılaştırılması

Serbest ve immobilize β -Gal'ların en yüksek GOS üretimlerini sağladığı laktoz konsantrasyonları, pH değerleri ve sıcaklıklar bölüm 4.3.1., bölüm 4.3.2. ve bölüm 4.3.3.'de elde edilmiş olan sonuçlara göre belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre tüm β -Gal formları için %35 laktoz konsantrasyonu ve 50 °C sıcaklığın uygun olduğu, pH değerleri için ise çapraz bağlı β -Gal ve Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'da pH 6.5, serbest β -Gal için ise pH 7.5 olacak şekilde reaksiyon koşulları hazırlanmıştır.

Şekil 4.49.'da serbest ve immobilize enzimlerin laktoz çözeltilerinden ürettikleri GOS miktarları görülmektedir. Serbest enzim için 360 dakikada gerçekleşen reaksiyonda 13 noktada alınan örneklerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde süre sonunda başlangıçta reaksiyon ortamında bulunan laktozun %97'sinin kullanıldığı belirlenmiştir. Serbest β -Gal ile maksimum GOS üretimine %90.27 laktoz dönüşümü noktasında ulaşılmış ve üretim miktarı %31.44 olmuştur. Bu noktadan sonra meydana gelen rehidrolizasyon (degradasyon) nedeniyle %97.07'lik laktoz dönüşüm noktasında ortamdaki GOS miktarı %22.54'e düşmüştür. Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal da ise 600 dakika süren reaksiyonda 16 noktadan örnek alınmış ve sonuçlar bu şekilde elde edilmiştir. Fakat geçen uzun süreye nazaran kullanılan laktoz miktarı %92.09'da kalmıştır. Kullanılan laktoz miktarı %23'e kadar serbest enzimin GOS üretim hızına yakın olan, immobilize enzimin GOS üretim hızı bu noktadan sonra biraz yavaşlamıştır. İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalinin difüzyon sınırlaması nedeniyle olduğu düşünülen reaksiyon hızındaki azalma Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'ın maksimum GOS üretiminin %28.76'ya kadar çıkmasına izin vermiştir. Maksimum GOS üretimine %90.96'lık laktoz kullanım miktarında ulaşılmış ve bu noktadan sonra rehidrolizasyon başlamıştır. Çapraz bağlı β -Gal ile gerçekleştirilen reaksiyon 300 dakika sürmüş ve 12 noktadan alınan örneklerle elde edilen sonuçlar incelenmiştir. Reaksiyon sonunda %94.54'lük laktoz kullanımı söz konusudur. Maksimum GOS üretimi %86.36'lık laktoz kullanımında %17.95 olarak belirlenmiştir. Kullanılan laktoz miktarı %86.36'dan %94.54'e çıktığında rehidrolizasyon sonucunda reaksiyon ortamındaki GOS miktarı %13.69'a düşmüştür. Çapraz bağlı β -Gal'ın GOS üretim hızı %15 laktoz kullanımı seviyesine kadar, serbest enzim ve Duolite XAD761' adsorbe enzim ile hemen hemen paralellik göstermiş, fakat bu noktadan itibaren gözle görülür bir şekilde reaksiyon hızında azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın immobilizasyon esnasında oluşan

çapraz bağlı polimer yapı içerisine laktoz molekülleri girişinin güçlüğü, çapraz bağlamayla enzim konformasyonunun stabil hale gelmesi ve çapraz bağlamayla β -Gal'in aktif bölgesinin bağlanması gibi sorunlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.49. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS üretimleri (50 °C sıcaklık, %35 laktoz ve serbest enzim için pH 7.5, immobilize enzimler için pH 6.5)

Farklı mikroorganizma kaynaklı β -Gal'lar ile elde edilen GOS üretim miktarları Çizelge 2.10'da verilmiş ve üretilen GOS miktarları %10-55 arasında değişim göstermiştir. Çalışmamızdaki sonuçların irdelenmesi bakımından *Kluyveromyces spp.* kaynaklı β -Gal'lar ile yapılan araştırma sonuçlarının göz önüne alınması gerekmektedir.

Serbest β -Gal'ların kullanıldığı çalışmalarda şu sonuçlar alınmıştır. Boon ve ark. (2000), *B. circulans*, *A. oryzae*, *K. lactis* ve *K. fragilis* kaynaklı β -Gal'lar ile yaptıkları çalışmada GOS üretimlerinin *B. circulans* kaynaklı enzimde yüksek olduğunu, *A. oryzae* kaynaklı enzimde daha düşük, *K. lactis* ve *K. fragilis* kaynaklı β -Gal'larda ise en düşük GOS üretimlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadan farklı şekilde Cheng ve ark. (2006a), yaptıkları çalışmada *Bacillus spp.*, *A. oryzae*, ve *K. lactis* kaynaklı enzimler kullanmışlar ve ürettikleri maksimum GOS miktarlarını sırasıyla %34, %21 ve %35 olarak bulmuşlardır. Valero (2009) da yaptığı çalışmada enzimleri

serbest şekilde kullanmış ve *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile %31, *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile %27, *B. circulans* kaynaklı β -Gal ile %40 GOS üretmiştir. Rustom ve ark. (1998), benzer bir araştırmada peynir altı suyu tozu ile oluşturdukları %14 ve %23 laktoz içeren çözeltileri ultrafiltrasyon sistemlerinde *A. oryzae*, *K. lactis* ve *K. fragilis* kaynaklı β -Gal'lar ile reaksiyona sokarak GOS üretimi gerçekleştirmişlerdir. *A. oryzae* kaynaklı β -Gal'in %14 laktoz konsantrasyonunda %17.9 GOS ürettiğini, *K. lactis* ve *K. fragilis* kaynaklı β -Gal'lar için %23 laktoz konsantrasyonunda sırasıyla %22.2 ve %23.5 GOS sentezlediklerini bildirmişlerdir. Chockchaisawasdee ve ark. (2005), *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile kesikli karıştırmalı tank reaktöründe model laktoz çözeltisinden yaklaşık %26 GOS ürettiklerini bildirmişlerdir. Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), serbest formda Lactozym 3000 L HPG ile gerçekleştirdikleri GOS reaksiyonlarında 40 °C'de, 7.5 pH'da, 250 mg/mL laktoz konsantrasyonunda ve 3 U/mL enzim konsantrasyonunda %30 GOS üretimi gerçekleştirmişlerdir. Serbest enzimle elde ettiğimiz GOS sonuçları bir çok araştırmanın sonuçlarından yüksek ıkmiş sadece Cheng ve ark. (2006a)'nın GOS sonucundan düşük bulunmuştur.

β -Gal'ların immobilize edilerek çalışıldığı araştırmalarda ise şu sonuçlar elde edilmiştir. Güleç (2009), Lactozym ile gerçekleştirdiğı GOS sentezi çalışmasında erlende çalkalamalı düzenekte serbest enzimin %50 laktoz kullanım oranında %12 GOS, serbest formdaki enzimin plazma modifiye membranla kullanılması durumunda %70 laktoz kullanım düzeyindeyken %19 GOS, doğıal membran ile serbest enzim kullanıldığında %60 laktoz kullanım düzeyinde yaklaşık %3 GOS ve modifiye membrana immobilize edilen enzimle ise %1.75 GOS ürettiğini bildirmiştir. Modifiye membrana immobilizasyon işleminde kullanılan polietileniminin enzimin aktif bölgesini bloke etmesi nedeniyle GOS üretiminin düşük olduğunu bildirmiştir. Foda ve Lopez-Leiva (2000), Maxilact 2000 L kullanarak membran reaktörde GOS üretimi gerçekleştirmişlerdir. Kesikli sitemde %23 laktoz konsantrasyonu, pH 7.0 ve 45 °C sıcaklık şartlarında %22.2 GOS, pilot işletmede sürekli sistemde ise %20 laktoz konsantrasyonu, pH 7.0 ve 45 °C sıcaklık şartlarında %31 GOS üretimi elde etmişlerdir. Maugard ve ark. (2003), Lactozym'i Duolite A568'e adsorbe ederek %70 v/v konsantrasyonda çözücüler ile hazırlanmış laktoz çözeltileriyle (159 g/L konsantrasyonunda) GOS sentezlemişlerdir. Çözücü kullanılmadığı durumda %22, hekzanol kullanıldığında %21, hekzadienol kullanıldığında %2, dietilen glikol dietileter (DEGDE) kullanıldığında %26 ve gliserol kullanıldığında ise %2 GOS üretimi elde

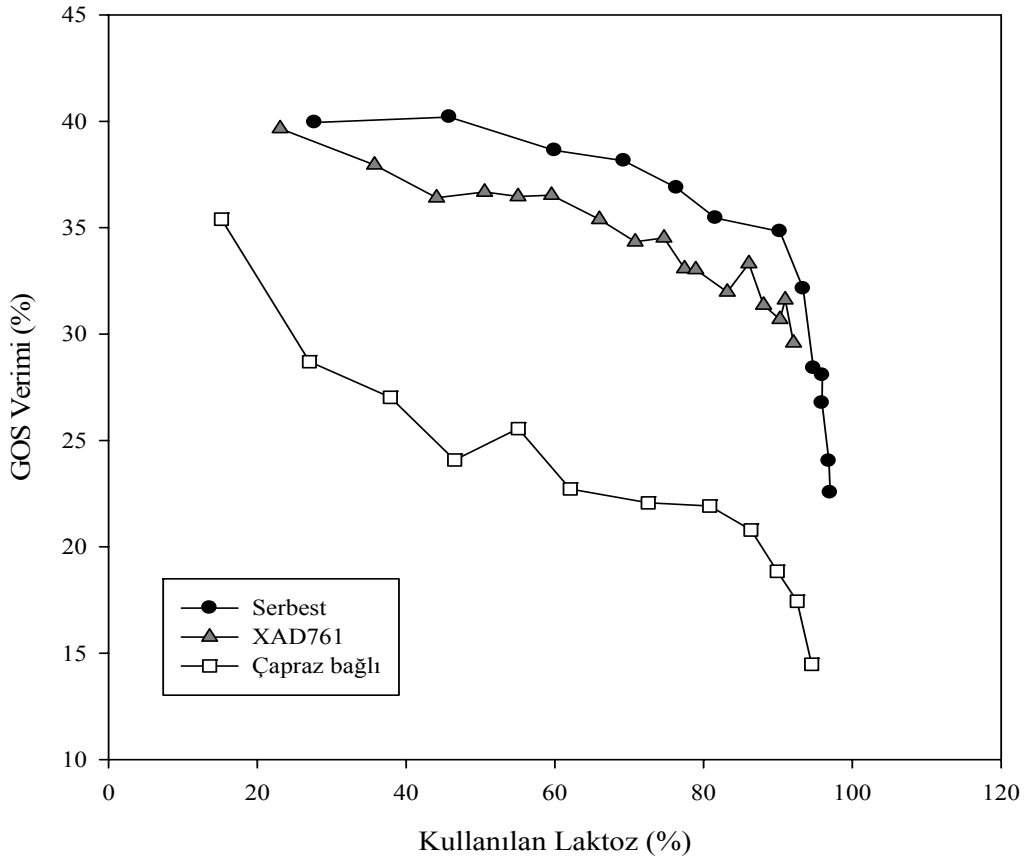
etmişlerdir. Çalışmamızda özellikle Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal için elde ettiğimiz GOS üretimi Foda ve Lopez-Leiva (2000)'ninki hariç diğer araştırma sonuçlarından yüksek çıkmıştır. Çapraz bağlı β -Gal da ise GOS üretimi literatüre uygunluk göstermektedir.

İmmobilize β -Gal'larla (*Kluyveromyces spp.* kaynağı dışındaki) elde edilen GOS miktarlarının aynı enzimlerin serbest formlarına göre daha düşük miktarda GOS ürettiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Cheng ve ark., 2006b; Nakkharat ve Haltrich, 2007). Gaur ve ark. (2006) ise bunların aksine immobilizasyonla GOS üretiminde artış saptamışlardır.

GOS verimleri açısından serbest ve immobilize β -Gal'lar karşılaştırıldığında serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'ların GOS verimlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.50.).

Serbest β -Gal için kullanılan laktoz miktarı %45.8 iken %40.2'lik verim, Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal için kullanılan laktoz miktarı %23.05 iken %39.66 verim elde edilmiştir. Çapraz bağlı β -Gal için ise kullanılan laktoz miktarı %15.19 iken % 35.4'lük GOS verimine ulaşılmıştır. Tüm bu β -Gal formlarında, kullanılan laktoz miktarı artışı karşısında GOS verimlerinin düştüğü gözlenmiştir. Bu durum, GOS oluşum hızının laktoz hidroliz hızından düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmaların çoğunda verimin düştüğü gözlenmiştir (Albayrak ve Yang, 2002a; Güleç, 2009; Neri ve ark., 2009). Sadece Valero (2009)'nun yaptığı çalışmada *A. oryzae* ve *K. lactis* kaynaklı β -Gal'lar için GOS veriminin düşüş gösterdiği fakat *B. circulans* kaynaklı β -Gal için %10-60 laktoz kullanımı seviyelerinde GOS veriminin %65-70 bandında yatay seyrettiği bildirilmiştir.

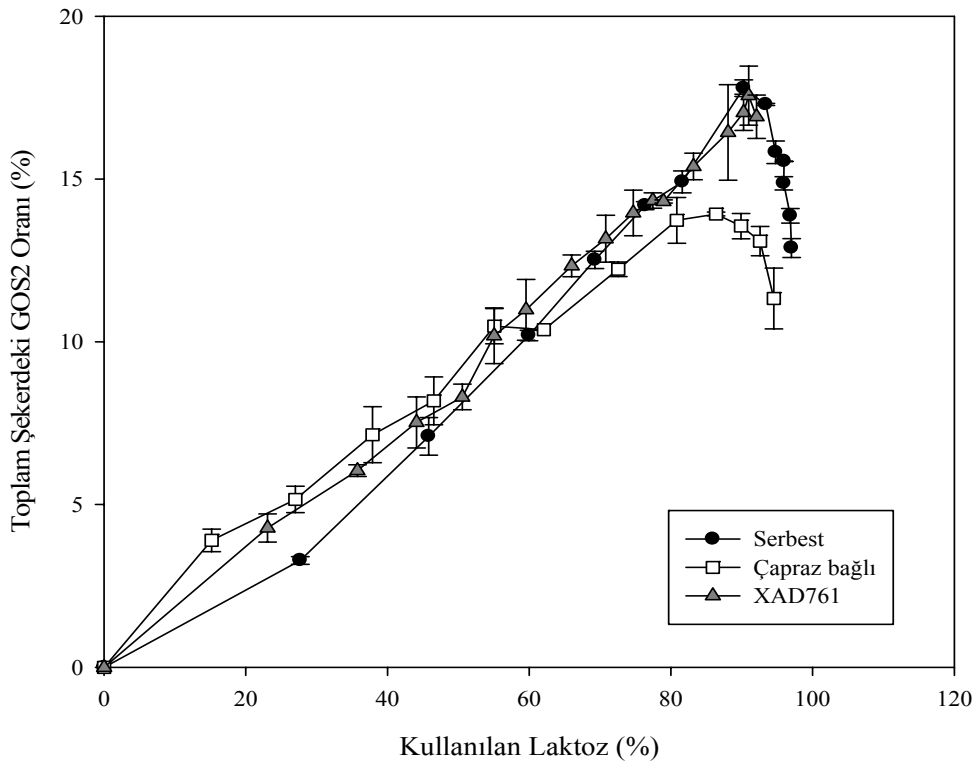
Çalışmamızda üretilen GOS miktarlarının maksimum olduğu noktalarda GOS verimleri serbest enzimde %34.83, Duolite XAD761'e adsorbe enzimde %31.62 ve çapraz bağlı enzimde ise %20.79 olmuştur.



Şekil 4.50. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS verimleri (50 °C sıcaklık, %35 laktoz ve serbest enzim için pH 7.5, immobilize enzimler için pH 6.5)

Valero (2009), yaptığı çalışmada üç farklı mikroorganizma kaynaklı β -Gal ile GOS sentezlemiş ve GOS verimlerini enzim kaynaklarına göre şu şekilde elde etmiştir. *A. oryzae* kaynaklı β -Gal için %60.36, *B. circulans* kaynaklı β -Gal için %68.54 ve *K. lactis* kaynaklı β -Gal için ise %50.98 GOS verimine ulaşmıştır. Güleç (2009) ise Lactozym ile gerçekleştirdiği araştırmada serbest enzim ile %39-40 civarında, UF sitemindeki serbest enzimde %7, modifiye membran ile serbest formda ise %34-35 civarında GOS verimi elde etmiştir. Albayrak ve Yang (2002a), *A. oryzae* kaynaklı β -Gal'ı pamuklu beze immobilize ettikleri çalışmada GOS veriminin %65 civarında olduğunu saptamışlardır. Neri ve ark. (2009), serbest ve manyetik polisiloksan-polivinil alkol üzerine bağlanmış *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -Gal ile GOS sentezlemişler ve GOS verimini serbest enzim için %64.1, immobilize enzim için %62.6 olarak bulmuşlardır. Burada olduğu gibi çalışmamızda da serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'ların GOS verimleri birbirine yakın bulunmuştur.

Serbest ve immobilize β -Gal'lar kullanılarak laktoz çözeltileriyle gerçekleştirilen reaksiyonlarda laktoz dışında meydana gelen disakkaritler GOS2 olarak adlandırılmıştır. Bunlar TD (transgalaktosile disakkarit) olarak bildirilmiştir (Sako ve ark., 1999). Serbest ve immobilize enzimlerle laktozdan elde edilen GOS2 miktarları Şekil 4.51.'de verilmiştir. Kullanılan laktoz miktarı %80 civarına kadar tüm enzim formlarında GOS2 miktarları birbirine yakın seyretmiştir. Bu noktada (%80 kullanılan laktoz) yaklaşık %14 civarında GOS2 üretimi sağlandığı görülmektedir. Kullanılan laktoz miktarı %80'i geçtikten sonra çapraz bağlı enzimin GOS2 üretim hızı yavaşlamış ve ardından düşüşe geçmiştir. Çapraz bağlı enzimin maksimum GOS2 üretimine (%13.92) %86.36 laktoz kullanım miktarında ulaşılmıştır. Serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde maksimum GOS2 üretimlerinin birbirine çok yakın olduğu saptanmış ve kullanılan laktoz miktarı %90.27 iken serbest enzimde %17.79 GOS2, kullanılan laktoz miktarı %90.96 iken Duolite XAD761'e adsorbe enzim için %17.56 GOS2 üretimi elde edilmiştir.

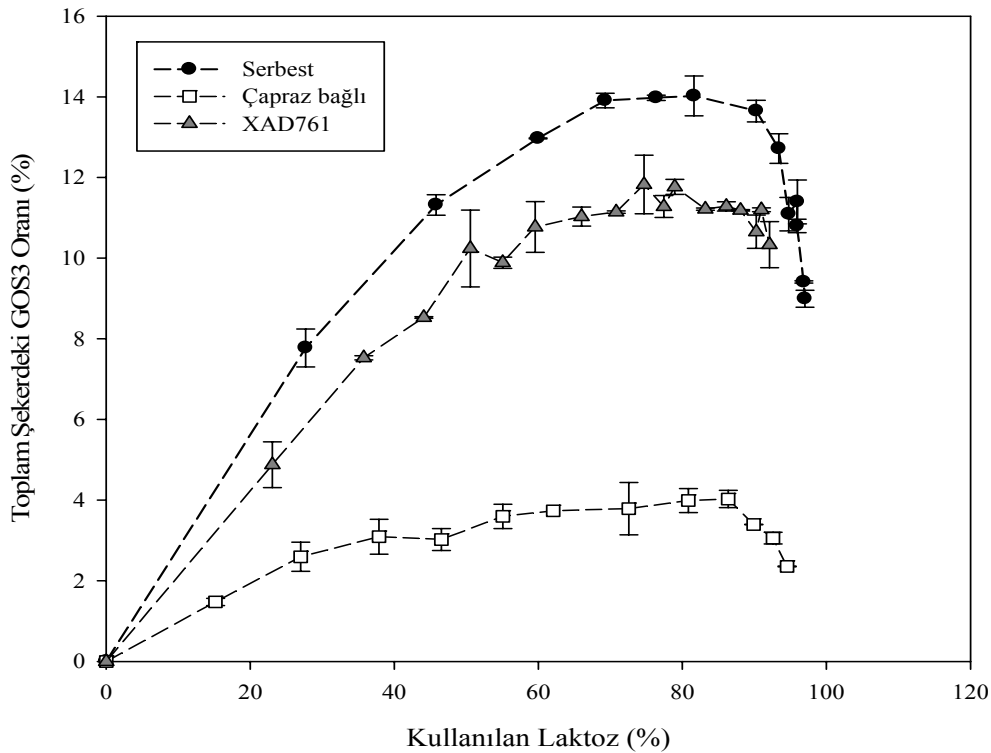


Şekil 4.51. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS2 üretimleri (50 °C sıcaklık, %35 laktoz ve serbest enzim için pH 7.5, immobilize enzimler için pH 6.5)

Laktoz hidrolizi ile oluşan monosakkaritler kullanılarak GOS2'ler elde edilmektedir. Molekül boyutu küçük olan monosakkaritlerin difüzyon sınırlamasından daha az etkilendiği, serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzim sonuçlarından anlaşılmaktadır. Çapraz bağlı enzimde de GOS2 miktarının diğer enzim formlarıninkine yakın çıkması difüzyon sınırlaması etkisinin azaldığını ama çapraz bağla oluşan yapı içinde enzim konformasyonu kısıtlaması nedeniyle benzer miktarda GOS2 üretilmediğini düşündürmektedir.

Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Laztozym ile yaptıkları araştırmada maksimum GOS2 üretimini 50 °C sıcaklıkta, 250 mg/mL laktoz konsantrasyonunda, pH 6.5'de ve 3 U/mL enzim konsantrasyonunda 300 dakikalık reaksiyon sonucunda %15.5 olarak saptamışlardır. Bu sonuç serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'larla elde ettiğimiz GOS2 sonuçlardan düşüktür. Bunun dışında Cheng ve ark. (2006a) da *K. lactis* kaynaklı β -Gal kullanarak gerçekleştirdikleri 50 °C'de, 330 g/L laktoz konsantrasyonunda, 3 saatlik GOS reaksiyonda %22.48 GOS2 elde etmişlerdir.

Oluşturulan reaksiyon şartlarında serbest, çapraz bağlı ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerle GOS3 oluşumları Şekil 4.52.'de görülmektedir.



Şekil 4.52. Serbest ve immobilize enzimlerin GOS3 üretimleri (50 °C sıcaklık, %35 laktoz ve serbest enzim için pH 7.5, immobilize enzimler için pH 6.5)

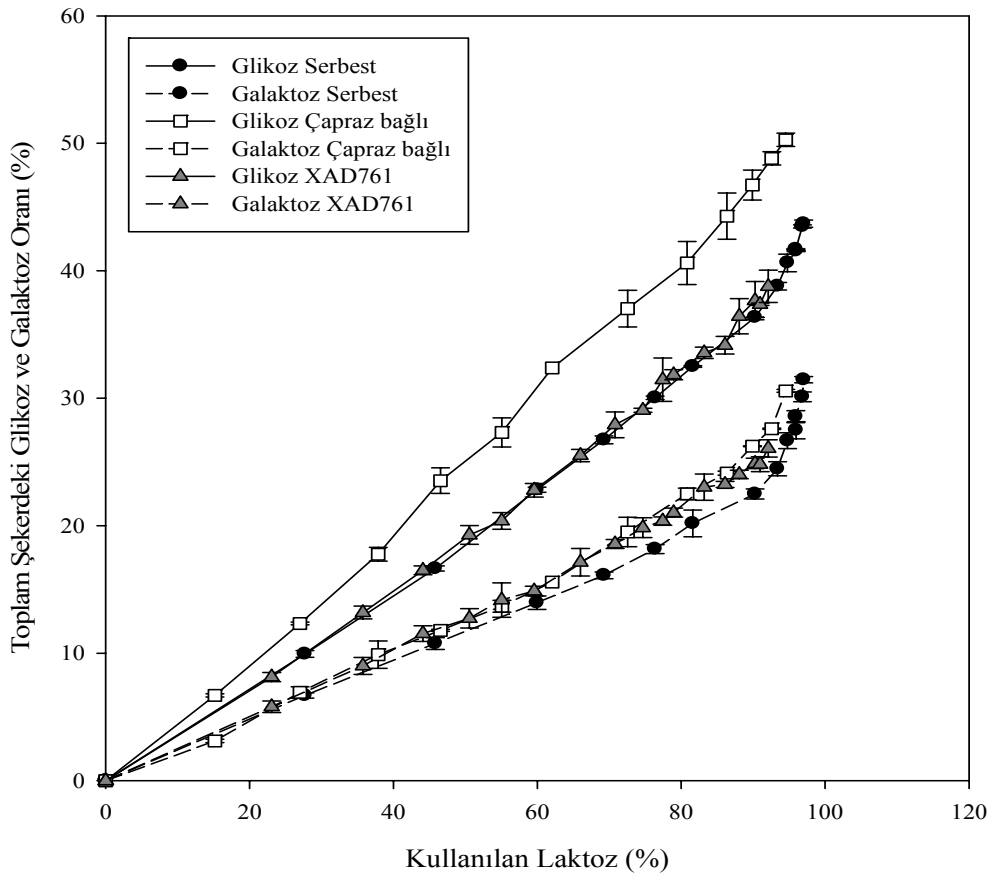
GOS3 sentezleme yeteneği bakımından serbest enzimin önde olduğu belirlenmiştir. Serbest enzimde %75-90 laktoz kullanım değerleri arası, GOS3 miktarlarının en yüksek olduğu bölgedir. Laktoz kullanımı %81.61 iken serbest enzim %14.02 GOS3 üretmiştir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimin %60-90 laktoz kullanımı seviyelerinde GOS3 üretiminin yatay seyrettiği görülmektedir. Maksimum GOS3 üretimi laktoz kullanımı %74.69 iken %11.83 olarak gerçekleşmiştir. Çapraz bağlı enzimde kullanılan laktoz miktarı %60-85 aralığında iken GOS3 üretiminin sabit kaldığı ve en yüksek GOS3 üretimini (%4.03) %86.36 laktoz kullanım miktarında oluşturduğu görülmüştür.

Reaksiyon ortamında serbest olarak bulunan β -Gal'in daha etkin şekilde büyük GOS molekülleri oluşturması laktozun enzime kolay ulaşmasıyla sağlanmaktadır. İmmobilize enzimlerde laktozun Duolite XAD761'de iç kesimlere difüzyonunun zorluğu GOS3 üretiminde azalmaya sebep olmuştur. Çapraz bağlı enzimde çapraz bağlanmada kullanılan BSA'nın da etkisiyle, oluşan ağ yapısı hem difüzyonu hem de enzim konformasyonunu etkileyerek GOS3 oluşumunda çok büyük düşüşe neden olmuştur. Difüzyon açısından Duolite XAD761'in çapraz bağla oluşan ağ yapısına göre daha rahat substrat geçişi sağladığı görülmüştür. Ayrıca Duolite XAD761'e adsorbe enzimde GOS3 üretiminin çapraz bağlı enziminkinden fazla olması yüzeye tutunan enzim konformasyonunun serbest enzime yakın olduğunu göstermektedir. Difüzyon sınırlaması rehidrolizasyon hızlarının farklılığından da anlaşılmaktadır. Serbest enzimde kullanılan laktoz miktarı %90'ı geçtikten sonra rehidrolizasyon hızının çok fazla arttığı görülmektedir. İmmobilize enzimlerde rehidrolizasyonun daha yavaş gerçekleştiği görülmektedir.

Martinez-Villaluenga ve ark. (2008), Lactozym'in serbest formuyla gerçekleştirdikleri GOS reaksiyonunda 40 °C, 7.5 pH, 250 mg/mL laktoz konsantrasyonu ve 3 U/mL enzim konsantrasyonu şartlarında maksimum GOS3 (6'-galaktosil laktoz) miktarına (%17) ulaşmışlardır. Cheng ve ark. (2006a) da *K. lactis* kaynaklı β -Gal ile GOS3 üretimini %12.49 olarak gerçekleştirmişlerdir. Serbest enzim ve Duolite XAD761'e adsorbe enzim sonuçlarımız bu çalışmaların sonuçlarına uygunluk gösterirken çapraz bağlı enzim sonuçlarımız ise bu sonuçlardan düşük çıkmıştır. Gaur ve ark. (2006), *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile çalışmışlardır. Enzimi, Kitosan'a kovalent bağlı ve glutaraldehitle çapraz bağlı agregat şeklinde immobilize etmişler ve serbest formda da kullanmışlardır. Oluşturdukları GOS reaksiyonlarında

serbest, Kitosan'a kovalent bağı ve glutaraldehitte çapraz bağı enzimlerin GOS3 üretimlerini 2 saatlik reaksiyon sonunda sırasıyla %10.0, %17.3 ve %4.6, 12 saatlik reaksiyon sonucunda ise sırasıyla %22.6, %25.5 ve %1.4 olarak tespit etmişlerdir. Burada serbest enzime göre çapraz bağlamayla GOS3 üretiminin bizim çalışmamıza benzer şekilde (çapraz bağı enzim için) düştüğü belirtilmektedir.

Şekil 4.53.'de serbest ve immobilize β -Gal'ların laktozdan ürettikleri glikoz ve galaktoz miktarlarına ait grafik görülmektedir.



Şekil 4.53. Serbest ve immobilize enzimlerin glikoz ve galaktoz üretimleri (50 °C sıcaklık, %35 laktoz ve serbest enzim için pH 7.5, immobilize enzimler için pH 6.5)

Grafiğe bakıldığında galaktoz miktarlarının glikoz miktarlarından düşük olduğu görülmektedir. β -Gal enziminin laktoz hidrolizi reaksiyonunda (Şekil 2.4.) enzimin laktozla birleşmesinden sonra oluşan enzim-galaktoz-glikoz kompleksinden öncelikle glikoz ayrılıp reaksiyon ortamına geçmektedir. Geriye kalan enzim-galaktosil kompleksi hidroksil grup içeren alıcı moleküle aktarılmaktadır. Bu molekül su olursa sonuçta galaktoz, karbonhidrat olursa bir GOS oluşmaktadır (Mahoney, 1998).

Galaktozun bu reaksiyonda GOS oluşumu için kullanılmasından dolayı ortamdaki serbest galaktoz miktarı glikoz miktarından daha düşük olmaktadır.

Kullanılan laktoz miktarındaki artışla beraber serbest ve immobilize β -Gal'ların oluşturduğu galaktoz miktarları birbirine yakın olmakla beraber serbest β -Gal için bu değerlerin (%60-90 kullanılan laktoz miktarları arasında) biraz düşük olduğu görülmektedir. Bu da serbest enzimin GOS üretim miktarlarının diğerlerine nazaran yüksek olmasını teyit etmektedir. Galaktoz miktarları serbest enzimde kullanılan laktoz oranı %97.02 iken %31.46, Duolite XAD761'e adsorbe enzimde kullanılan laktoz miktarı %92.09 iken %26.06 ve çapraz bağlı enzimde ise kullanılan laktoz miktarı %94.54 iken %30.58 olarak belirlenmiştir.

Glikoz miktarları açısından serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerde benzer bir artış görülmektedir. Çapraz bağlı enzim de ise glikoz miktarının yüksekliği dikkati çekmektedir. GOS2'ler içinde glikozun ve galaktozun birleşmesiyle oluşan allolaktoz gibi şekerler bulunabilmekte, bunun yanında sadece galaktoz birimlerinden oluşan galaktobioz gibi şekerler de oluşmaktadır. Burada da glikoz miktarının yüksek olması GOS2 oluşumunda glikoz yerine galaktozun baskın şekilde kullanıldığını düşündürmektedir. Gaur ve ark. (2006), *A. oryzae* kaynaklı β -Gal ile serbest ve immobilize formlarda gerçekleştirdiği GOS reaksiyonlarında oluşan toplam monosakkarit miktarlarını 2 saatlik reaksiyon sonunda serbest enzim için %4.9, Kitosan'a kovalent bağlı enzim için %7.7 ve glutaraldehitte çapraz bağlı enzim için %50.3 olarak, 12 saatlik reaksiyon sonunda ise sırasıyla %6.9, %15.9 ve %78 olarak bulmuşlardır. Çapraz bağlı enzimin diğer enzim formlarına göre daha fazla monosakkarit oluşturduğunu yani çapraz bağlı enzimin laktoz hidrolizine yatkın olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızdaki çapraz bağlı enzim sonuçları bu sonuçlara benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın ilk aşamasında enzim immobilizasyon parametrelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için çapraz bağlama ve adsorbsiyona yönelik etkili parametreler denenerek sonuçlar elde edilmiştir.

β -Gal'in çapraz bağlanması için yapılan deneylerde elde edilen immobilizasyon parametreleri %20 BSA, %1.2 glutaraldehit, 1100 EU/mL enzim konsantrasyonu, 4 cm² pamuklu bez yüzey alanı ve pH 7.0 olarak belirlenmiştir.

Duolite XAD761'e adsorbsiyon uygulamasında β -Gal'in etkin aktivite ve bağlanma sağladığı immobilizasyon parametreleri de pH 8.0, 30 °C sıcaklık, 110 EU/mL enzim konsantrasyonu ve 60 dakika immobilizasyon süresi olarak tespit edilmiştir. Bu şekilde β -Gal'in immobilizasyon uygulamaları için uygun şartlar belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında serbest ve immobilize enzimlerin çalışma koşulları ve kinetikleri belirlenmiştir. Bu amaçla ONPG kullanılmıştır. Ayrıca laktoz kullanılarak GOS üretiminde etkili olan laktoz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık gibi çeşitli karakteristiklerin GOS üretimini nasıl etkilediği çalışılmıştır.

Karakterizasyon deneylerine öncelikle tampon konsantrasyonunun belirlenmesiyle başlanmıştır. Bu amaçla serbest β -Gal ile potasyum fosfat tamponunun çeşitli konsantrasyonları denenmiş ve en yüksek aktivitenin elde edildiği tampon konsantrasyonu 50 mM olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada kullandığımız β -Gal *Kluyveromyces lactis* kaynaklı olduğundan Mg²⁺ iyon isteği bulunmaktadır. Bu nedenle Mg²⁺ ihtiyacının karşılanması için çeşitli konsantrasyonlarda MgCl₂ reaksiyon ortamına ilave edilerek, uygun MgCl₂ konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Çözeltide MgCl₂ bulunmadığı durumda enzimin aktivitesinde çok fazla kayıp meydana geldiği (%5.41 relatif aktivite) belirlenmiş, 1-2 mM konsantrasyonları arasındaki MgCl₂'ün β -Gal'in relatif aktivitesini %90'ın üstüne çıkardığı görülmüştür. Reaksiyonlarda kullanmak üzere 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir.

İmmobilizasyonla birlikte enzimin çeşitli özelliklerinde değişikliklerin olması beklenmektedir. Bu yüzden öncelikle serbest ve immobilize β -Gal'ların optimum pH'larındaki değişim incelenmiştir. Serbest β -Gal için 6.6 olan optimum pH değeri, Duolite XAD761'e adsorbe ve çapraz bağlı β -Gal'da 7.0 pH'ya kaymıştır. İzoelektrik

noktaya yaklaşan pH değerinde (pH 5.5) serbest enzimin inaktif olduğu, fakat immobilize enzimlerin bu pH değerinde ve hatta daha düşük pH'da (pH 5.0) bile aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Özellikle çapraz bağlı enzimin pH'ya bağlı çalışma aralığı diğer enzim formlarından iyi çıkmıştır.

Enzim karakterizasyonunda, reaksiyon hızına ve enzim aktivitesine etki eden sıcaklığın, serbest ve immobilize β -Gal'lar üzerine davranışı incelenmiştir. Serbest β -Gal için optimum çalışma sıcaklığının 40-45 °C arasında olduğu saptanmıştır. Duolite XAD761'e adsorbe edilen β -Gal için optimum çalışma sıcaklığı serbest β -Gal'inki ile aynı bulunmuştur. Çapraz bağlı enzimde ise optimum çalışma sıcaklığının 5 °C yükselerek 50 °C'ye çıktığı gözlenmiştir. İmmobilizasyon ile enzimlerin E_a 'leri de değişim göstermiştir. Serbest enzimde 39 kJ/mol olan E_a değeri, immobilizasyon uygulamasıyla düşmüş ve Duolite XAD761'e adsorbe enzim için 24.27 kJ/mol, çapraz bağlı enzim için 11.94 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Kinetik katsayılar enzimlerde reaksiyon hızlarının nasıl şekillendiği konusunda fikir veren önemli parametrelerdir. Genellikle immobilizasyon işlemlerinden sonra enzimlerin kinetik katsayılarında değişimler meydana gelmektedir. Kinetik katsayıların belirlenmesinde serbest ve immobilize β -Gal'ların en yüksek aktivite verdikleri reaksiyon şartları belirlenmiş ve her bir β -Gal formu için bu şartlarda deneyler gerçekleştirilmiştir. ONPG kullanarak elde edilen sonuçlarda K_m değerinin immobilizasyonla arttığı, V_{max} değerinin ise düştüğü saptanmıştır. Serbest β -Gal için V_{max} değeri 97.08 μ mol ONP/dk/mg enzim, K_m değeri 3.15 mM, Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal için V_{max} değeri 9.04 μ mol ONP/dk/mg enzim, K_m değeri 19.83 mM ve çapraz bağlı β -Gal için V_{max} değeri 9.46 μ mol ONP/dk/mg enzim, K_m değeri 32.07 mM olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize β -Gal'ların pH stabiliteleri incelendiğinde bazik ortamlarda immobilize β -Gal'ların daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'ların nötr pH'ya kadar olan aralıkta benzer stabilite gösterdikleri belirlenmiştir. Serbest ve çapraz bağlı β -Gal'lar için maksimum pH stabilitesinin 7.0 pH'da, Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal için ise 8.0 pH'da sağlandığı görülmüştür.

Enzimlerde optimum sıcaklık yanında enzimin farklı sıcaklıklarda aktivitelerini ne kadar koruduğu da önem arz etmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen ısıl stabilite sonuçlarına bakıldığında serbest enzimin 40 °C'de, 50 ve 60 °C'lerde ise çapraz bağlı

enzimin ısı stabilitesinin iyi olduğu tespit edilmiştir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimin 50 ve 60 °C sıcaklıklarda stabilitesinin diğer enzim formlarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

GOS üretiminde en etkili parametrelerden biri olan laktoz konsantrasyonu serbest ve immobilize enzimlerde %25-45 laktoz konsantrasyonu aralığında denenmiş ve serbest enzim için maksimum GOS üretimi %35 laktoz konsantrasyonunda %32.3, çapraz bağlı enzim için %35 laktoz konsantrasyonunda %18.34 ve Duolite XAD761'e adsorbe enzim için ise yine %35 laktoz konsantrasyonunda %28.7 olarak belirlenmiştir. Daha yüksek laktoz konsantrasyonuna çıkıldığında immobilize enzimlerde GOS üretim hızının düştüğü görülmüştür. GOS'ler GOS2 (disakkaritler) ve GOS3 (trisakkaritler) olarak ayrı ayrı incelendiğinde tüm enzim formları için %35 laktoz konsantrasyonunda maksimum GOS2 ve GOS3 üretimlerinin gerçekleştiği, sadece Duolite XAD761'e adsorbe enzimde maksimum GOS3 üretiminin %25 laktoz konsantrasyonunda oluştuğu belirlenmiştir. Burada GOS2/GOS3 oranlarına bakıldığında serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde bu oranların sırasıyla 1.30 ve 1.38, çapraz bağlı enzimde ise 2.72 olduğu belirlenmiştir. Bu da çapraz bağlı enzimin toplam GOS üretimi içinde GOS2 üretiminin daha baskın olduğunu göstermektedir. Laktoz hidrolizi incelendiğinde serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde laktoz konsantrasyonu artışının hidroliz hızını artırdığı, bunun aksine çapraz bağlı enzimde ise hidroliz hızını azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek GOS üretimi için tüm β -Gal formlarında uygun laktoz konsantrasyonunun %35 olması gerektiği belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize β -Gal'larla GOS üretimi üzerine pH'nın etkisi de belirlenmiştir. Tüm β -Gal formlarında 5.5 pH değerinde GOS üretiminin düştüğü, hatta serbest enzimde hızlı gelişen inaktivasyon nedeniyle hiç GOS üretilmediği görülmüştür. Bu pH değerinde en yüksek GOS üretimi (%5.62) çapraz bağlı enzimde elde edilmiştir. Nötr bölgeye yakın pH değerlerinde tüm β -Gal formlarında yüksek GOS üretimi sağlanmıştır. Serbest enzimde 6.5 ve 7.5 pH değerlerinde GOS sonuçları birbirine yakın bulunmuş, fakat pH 6.5'de GOS üretim hızının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte maksimum GOS üretimine (%33.11) pH 7.5'de ulaşılmıştır. Çapraz bağlı enzimde ise pH 6.5'de %18.34 ile maksimum GOS üretimi elde edilmiştir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimin ise 6.5 pH'da %28.7 GOS ürettiği görülmüştür. Serbest β -Gal'in 6.5 pH'da GOS2'yi (%19.4), 7.5 pH'da ise GOS3'ü (%14.88) fazla miktarda sentezlediği tespit edilmiştir. Çapraz bağlı enzimde 6.5 pH'da

maksimum GOS2 ve GOS3 üretimleri elde edilmiş ve üretim miktarları sırasıyla %12.31 ve %4.34 olmuştur. Duolite XAD761'e adsorbe enzimde 5.5 pH'da oluşan GOS'lerin GOS3 olduğu ve enzimin ilk 30 dakikada inaktive olması sebebiyle GOS3 miktarının %0.68'de kaldığı belirlenmiştir. Serbest enzimde olduğu gibi Duolite XAD761'e adsorbe enzimde de pH 6.5'de GOS2 (%15.26), pH 7.5'de ise GOS3 (%11.39) daha fazla miktarda üretilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerde 5.5 pH'da hidroliz düzeyinin düşük olduğu ve hatta serbest enzimde reaksiyonun başında enzimin inaktivasyonu nedeniyle laktoz hidrolizinin gerçekleşmediği görülmüştür. Serbest enzimde 6.5 pH'nın, Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 7.5 pH'nın, hidroliz miktarını ve oluşan glikoz, galaktoz miktarlarını arttırdığı saptanmıştır. Çapraz bağlı enzimde ise pH 6.5'de galaktoz miktarının, pH 7.5'de ise glikoz miktarının fazla olduğu görülmüştür. pH'nın etkisine yönelik yapılan çalışmalarda serbest enzim için 7.5 pH, çapraz bağlı ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerde ise 6.5 pH en yüksek GOS üretimi parametresi olarak belirlenmiştir.

Sıcaklığın GOS üretimine etkisi incelendiğinde serbest enzimde maksimum GOS üretiminin (%32.3) 50 °C'de gerçekleştiği belirlenmiştir. Çapraz bağlı enzimde 50 °C'de %18.34 GOS elde edilmiştir. Ayrıca 60 °C'de ise %13.57 GOS üretimi gerçekleşmiştir. Tüm β -Gal formları içinde 60 °C'de en yüksek GOS üretim miktarı çapraz bağlı enzimde kaydedilmiştir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimde ise 50 °C'de %28.7'lik GOS üretimine ulaşılmıştır. GOS2 ve GOS3 sonuçlarına bakıldığında 60 °C'de gerçekleşen reaksiyonlarda serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimde denaturasyon sebebiyle çok fazla ürün oluşmamıştır. Fakat az miktarda oluşan GOS'in de GOS3 olması, ayrıca çapraz bağlı enziminde bu sıcaklıkta diğer enzim formlarına göre oldukça yüksek miktarda GOS2 ve GOS3 sentezlenmesi ve GOS2/GOS3 oranının 1.20 olması yani toplam GOS üretimi içinde GOS3 oranının artması, yüksek sıcaklıkta GOS3 üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir. Fakat bu sıcaklıkta meydana gelen denaturasyon ürün miktarının az olmasına neden olmuştur. Serbest enzim için maksimum GOS2 ve GOS3 miktarları sırasıyla %19.4 ve %13.95 olarak 50 °C sıcaklıkta elde edilmiştir. Çapraz bağlı enzimde 60 °C sıcaklıkta %7.27 GOS2, %6.04 GOS3 üretimine ulaşılmış fakat maksimum GOS2 ve GOS3 üretimleri 50 °C sıcaklıkta sırasıyla %12.31 ve %4.34 olarak tespit edilmiştir. Duolite XAD761'e adsorbe enzimde maksimum GOS2 miktarı 40 °C'de %15.29, maksimum GOS3 miktarı ise 50 °C'de %10.93 olarak bulunmuştur. Serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerde yüksek

sıcaklıklarda oluşan denaturasyon laktoz hidrolizinin durmasıyla da belirlenmiştir. Tüm β -Gal formları için maksimum GOS üretimi sağlayan sıcaklığın 50 °C olduğu görülmüş ve bu sıcaklık değeri GOS üretiminde kullanılmıştır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında, elde edilmiş olan en iyi reaksiyon parametrelerine göre GOS üretimleri belirlenmiştir.

Serbest, Duolite XAD761'e adsorbe ve çapraz bağlı β -Gal'lar ile elde edilen maksimum GOS miktarları sırasıyla %31.44, %28.76 ve %17.95 olmuştur. GOS verimlerinin serbest (%40.2) ve Duolite XAD761'e adsorbe enzim (%39.66) için reaksiyon başlangıcında birbirine yakın oldukları ve benzer bir eğilim gösterdikleri saptanmıştır. Çapraz bağlı enzimde ise GOS veriminin daha düşük olduğu (%35.4) belirlenmiştir. En iyi koşullarda oluşan GOS2 miktarları serbest enzim için %17.79, Duolite XAD761'e adsorbe enzim için %17.56 ve çapraz bağlı enzim için ise %13.92 olarak elde edilmiştir. Serbest, Duolite XAD761'e adsorbe ve çapraz bağlı enzim için elde edilen GOS3 miktarları sırasıyla %14.02, % 11.83 ve % 4.03 olarak bulunmuştur. Laktoz hidroliziyle oluşan glikoz ve galaktoz miktarları incelendiğinde galaktozun GOS oluşumunda kullanılması sebebiyle oluşan galaktoz miktarları glikoz miktarlarından düşük bulunmuştur. Tüm enzim formlarında galaktoz miktarlarının birbirine yakın olduğu fakat serbest enzimin ürettiği galaktoz miktarlarının %60-90 laktoz kullanım miktarı aralığında biraz düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum serbest enzimin çalışmadaki maksimum GOS üretimini açıklamaktadır. Glikoz miktarları açısından serbest ve Duolite XAD761'e adsorbe enzimlerin benzer miktarda üretim yaptıkları saptanmış, fakat çapraz bağlı enzimde glikoz üretiminin fazla olduğu görülmüştür.

Bütün bu sonuçlar incelendiğinde GRAS statüsünde olan *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -Gal'in serbest formundan elde edilen %31.44'lük GOS üretim miktarıyla öne çıktığı görülmektedir. Fakat GOS reaksiyonlarında serbest enzim kullanımı her işlemden yeniden enzim harcanmasına neden olacağından GOS üretim maliyetine artış getirecektir. Bu çalışmada kullanılan laktoz çözeltileri model olarak belirli şartlarda oluşturulmaktadır, fakat endüstriyel üretimde ise laktoz kaynağı olarak peyniraltı suyu tercih edilmektedir. Serbest β -Gal'in pH'ya bağlı çalışma aralığının dar olması ve 5.5 pH değerinde inaktive olması, asidik karakterli peyniraltı suyu ile GOS üretiminde problem yaratması ya da pH ayarlamasında kullanılacak kimyasal sarfiyatının yükselmesiyle yine üretim maliyetini arttırması söz konusu olacaktır. Bu nedenle β -

Gal'in kolay ve düşük maliyetli immobilizasyon yöntemleriyle immobilize edilerek kullanılması GOS üretim maliyetini düşürecektir.

GOS üretim miktarı açısından karşılaştırma yapıldığında Duolite XAD761'e adsorbe enzimin çapraz bağlı enzimden yaklaşık %11 civarında fazla GOS ürettiği ve bu konuda etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca Duolite XAD761'e adsorbe enzimde immobilizasyon işleminin çapraz bağlı enzime göre daha kolay gerçekleştirilebilmesi de avantaj yaratmaktadır. Çapraz bağlı enzimin ise daha geniş pH bandında çalışabilmesi, yüksek çalışma sıcaklığına sahip olması, ısıl stabilite açısından daha dayanıklı olması gibi olumlu özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Fakat çapraz bağlı enzimin toplam GOS üretiminin az olması yanında GOS üretimi içinde GOS3 oranının düşük olması gibi dezavantajlar barındırmaktadır. Bu çalışmada hedefin yüksek GOS üretimi olması nedeniyle Duolite XAD761'e adsorbe enzimin bu görevi yerine getirdiği görülmektedir. Fakat bu immobilizasyon yöntemi çalışma koşullarına dayanıklılık açısından iyi sonuçlar ortaya koymamıştır.

Duolite XAD761'e adsorbe β -Gal'in 40 ve 50 °C'lerdeki GOS üretim miktarlarının birbirine yakın olması nedeniyle GOS üretiminde çalışma sıcaklığının düşürülmesi ve ısıl stabilite sorununa karşı böylece önlem alınması gerekmektedir. Bunun immobilize β -Gal'dan daha fazla yararlanmak için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Çapraz bağlı β -Gal'da ise çalışma şartlarına karşı dayanıklılığı ve yüksek laktoz hidroliz yeteneği nedeniyle GOS üretimi yerine laktozsuz süt üretimi için denenmesi önerilebilir.

Çalışmada β -Gal'in immobilizasyonu ile GOS üretiminde meydana gelen düşüşün genellikle difüzyon sınırlamasından kaynaklandığı görülmüştür. Bu yüzden β -Gal immobilizasyonunda difüzyon sınırlaması yaratmayan yöntemlerin (porozitesi az olan taşıyıcıların dış yüzeyine bağlama, ultrafiltrasyon membranları gibi uygulamalarla çözünen formda immobilizasyon vb.) tercih edilmesi önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Alagöz, D., 2007. β -Galaktosidaz ve glukoz izomeraz'ın eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin laktoz hidrolizi ve glukoz izomerizasyonunda kullanılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 73s.
- Albayrak, N., Yang, S.T., 2002a. Production of Galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77 (1), 8-19.
- Albayrak, N., Yang, S.T., 2002b. Immobilization of β - galactosidase on fibrous matrix by polyethylenimine for production of galacto- oligosaccharides from lactose. *Biotechnology Progress*, 18, 240-251.
- Arica, M.Y., Baran, T., Denizli, A., 1999. β -Galactosidase immobilization into poly(hydroxyethylmethacrylate) membrane and performance in a continuous system. *Journal of Applied Polymer Science*, 72, 1367–1373.
- Asp, N.G., Burvall, A., Dahlqvist, A., Hallgren, P., Lundblad, A., 1980. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®): Part 2--Oligosaccharide structures. *Food Chemistry*, 5, 147-153.
- Ateş, S., Mehmetoğlu, Ü., 1997. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. *Process Biochemistry*, 32 (5), 433-436.
- Batra, N., Singh, J., Joshi, A., Solti, R.C., 2005. Improved properties of *Bacillus coagulans* β -galactosidase through immobilization. *Engineering in Life Science*, 5 (6), 581-584.
- Bayramoğlu, G., Tunali, Y., Arica, M.Y., 2007. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8, 1094-1101.
- Bielecki, S., 2004. Enzymatic conversions of carbohydrates. In *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*, (Editörler: P. Tomasik), Chapter 10, CRC Pres Boca Raton, London, New York, Washington DC.
- Biswas, S., Kayastha, A.M., Seckler, R., 2003. Purification and characterization of thermostable β -galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. *J. Plant Physiol.*, 160, 327-337.
- Boon, M.A., Janssen, A.E.M., Van't Riet, K., 2000. Effect of temperature and enzyme origin on the synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technonology*, 26, 271-281.
- Boyacı, İ.H., 2001. Dolgulu kolon entegre edilmiş enzim elektrot sistemleri ile gıda örneklerinde glukoz, sukroz ve laktoz miktarlarının saptanması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 120s.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bruins, M.E., Thewessen, A.J.H., Janssen, A.E.M., Boom, R.M., 2003a. Enzyme inactivation due to maillard reactions during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase: influence of enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, 21, 31-34.

- Bruins, M.E., Strubel, M., Van Lieshout, J.F.T., Janssen, A.E.M., Boom, R.M., 2003b. Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: kinetics and modelling. *Enzyme and Microbial Tehnology*, 33, 3-11.
- Cao, L., 2005. *Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Aplication and Design*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 563 p, Weinheim.
- Cardelle-Cobas, A., Martínez-Villaluenga, C., Sanz, M.L., Montilla, A., 2009. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different β -galactosidases. *Food Chemistry*, 114, 1099–1105.
- Casteren, W.H.M., Eimermann, M., Broek, L.A.M., Vincken, J.P., Schols, H.A., Vorogen, A.G.J., 2000. Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. *Carbohydrate Research*, 329, 75-85.
- Cavaille, D., Combes, D., 1995. Characterization of β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology and. Applied Biochemistry*, 22, 55-64.
- Chen, C.W., Ou-Yang, C.C., Yeh, C.W., 2003. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 497–507.
- Cheng, C.C., Yu, M., Cheng T.C., Sheu, D.C., Duan, K.J., Tai, W.L., 2006a. Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28, 793-797.
- Cheng, T.C., Duan, K.J., Sheu, D.C., 2006b. Application of tris(hydroxymethyl)phosphine as a coupling agent for β -galactosidase immobilized on chitosan to produce galactooligosaccharides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 233–236.
- Cho, Y.J., Shin, H.J., Bucke, C., 2003. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters*, 25, 2107-2111.
- Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V.I., Niranjana, K., Rastall, R.A., 2005. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology And Bioengineering*, 89 (4), 434-443.
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. John Wiley & Inc., 390 p, New York.
- Craven, G.R., Steers, E., Anfinsen, C.B., 1965. Prufication, composition, and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K12. *The Journal of Biological Chemistry*, 240 (6), 2468-2476.
- Cruz, R., Cruz, V.D., Belote, J.G., Khenayfes, M.O., Dorta, C., Santos Oliveira, L.H., Ardiles, E., Galli, A., 1999a. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicilium simplicissimum*. *Bioresource Technology*, 70, 165-171.
- Cruz, R., Cruz, V.D.A., Belote, J.G., Khenayfes, M.O., Dorta, C., Oliveira, L.H.S., 1999b. Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Revista de Microbiologia*, 30, 265-271.

- Cruz-Guerrero, A.E., Gómez-Ruiz, L., Viniegra-González, G., Bárzana, E., García-Garibay, M., 2006. Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic β -glycosidase in an organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 93 (6), 1123-1128.
- Dickson, R.C., Dickson L.R., Markin J.R., 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 137 (11), 51-61.
- Enzyme immobilization. <http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/enzymes.htm> (03.07.2010).
- Foda, M.I., Lopez-Leiva, M., 2000. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochemistry*, 35, 581-587.
- Fraser, N.L., Mahuran, D., Freeman, S.J., Callahan, J.W., 1983. Improved purification of beta-galactosidase from rabbit brain: two separable fractions share kinetic and structural properties. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 61 (5), 313-22.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, S.K., 2006. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, 97, 426-430.
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Franguas, L., Batista-Viera, F., 1998. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, 313-327.
- Giacomini, C., Irazoqui, G., Batista-Viera, F., Brena, B.M., 2001. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 597-606.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125,1401-1412.
- Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R., Kentish, S.E., Gras, S.L., 2010. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121, 307-318.
- Grosavá, Z., Rosenberg, M., Rebroš, M., 2008. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 1 -14.
- Guidini, C.Z., Fischer, J., Soares Santana, L.N., Cardoso, V.L., Ribeiro, E.J., 2010. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 137–143.
- Güleç, H.A., 2009. Enzimatik oligosakkarit üretiminde plazma modifiye membran seperasyonun etkisi. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 294 s.
- Halder, J., Bhaduri, A., 1997. Glycosidase from tea-leaf (*Camellia sinensis*) and characterization of β -galactosidase. *Nutritional Biochemistry*, 8, 378-384.
- Hansson, T., Adlercreutz, P., 2001. Optimization of galactooligosaccharide production from lactose using β -glycosidases from hyperthermophiles. *Food Biotechnology*, 15 (2), 79–97.
- Hellerova, K., Curda, L., 2009. Influence of type of substrate and enzyme concentration on formation of galacto-oligosaccharides. *Czech Journal of Food Science*, 27, 372-374.

- Holmes, M.L., Scopes, R.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Englert, C., Pfeifer, F., Dyall-Smith, M.L., 1997. Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337, 276-286.
- Hsu, C.A., Lee, S.L., Chou, C.C., 2007. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2225-2230.
- Jeon, I.J., Mantha, V.R., 1985. High performance liquid chromatography analysis of oligosaccharides formed during β -galactosidase action on lactose. *Journal of Dairy Science*, 68, 581-588.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J.M., 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 300-309.
- Karasová-Lipovová, P., Strnad, H., Spiwok, V., Malá, S., Králová, B., Russell, N.J., 2003. The cloning, purification and characterisation of a cold-active β -galactosidase from the psychrotolerant antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 836-844.
- Kim, S.H., Lim, K.P., Kim, H.S., 1997. Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Science*, 80, 2264-2269.
- Kim, C.S., Ji, E.S., Oh, D.K., 2004. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316, 738-743.
- Li, S.C., Han, J.W., Chen, K.C., Chen, C.S., 2001. Purification and characterization of isoforms β -galactosidase in mung bean seedlings. *Phytochemistry*, 57, 349-359.
- Maciuńska, J., Czyż, B., Synowiecki, J., 1998. Isolation and some properties of β -galactosidase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Food Chemistry*, 63 (4), 441-445.
- Mahoney, R.R., 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63 (2), 147-154.
- Manning, T.S., Gibson, G.R., 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2), 287-298.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Villamiel, M., 2008. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 107, 258-264.
- Matella, N.J., Dolan, K.D., Lee, Y.S., 2006. Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. *Journal of Food Science*, 71 (7), 363-368.
- Mateo, C., Monti, R., Pessela, B.C.C., Fuentes, M., Torres, R., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2004. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnology Progress*, 20, 1259-1262.
- Matioli, G., Farias de Moraes, F., Zanin, G.M., 2001. Hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. *Acta Scientiarum Maringá*, 23 (3), 655-659.

- Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M.D., Besson, T., 2003. Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25, 623-629.
- Migneult, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37, 790-802.
- Mlichová, Z., Rosenberg, M., 2006. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45 (2), 47-54.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., Biró, S., 2001. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of enzyme. *Protein Expression and Purification*, 21, 24-29.
- Nakkharat, P., Haltrich, D., 2006. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, 4169, 1-10.
- Nakkharat, P., Haltrich, D., 2007. β -Galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized on to Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in batch and packed-bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 759-764.
- Neri, D.F.M., Balcao, V.M., Carneiro-da-Cunha, M.G., Carvalho Jr, L.B., Teixeira, J.A., 2008. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, 9, 2334-2339.
- Neri, D.F.M., Balcão, V.M., Costa, R.S., Rocha, I.C.A.P., Ferreira, E.M.F.C., Torres, D.P.M., Rodrigues, L.R.M., Carvalho Jr., L.B., Teixeira, J.A., 2009. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115, 92-99.
- Özkan, M., Cemeroglu, B., Kirca Toklucu, A., 2010. *Gıda Mühendisliğinde Reaksiyon Kinetiği*. Bizim Grup Basımevi, 174 s, Ankara.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H., 2006. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530-543.
- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R., 2010. Potential Applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, Volume 2010, Article ID 473137, 16 pages.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente, R., 2003. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 199-205.
- Playne, M.J., Crittenden, R.G., 2004. Prebiotics from lactose, sucrose, starch, and plant polysaccharides. In *Bioprocess and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals*, JR Neeser and JB German (eds), pp. Chapter 6. Marcel Dekker Inc, Newyork.
- Rastall, R.A., Maitin, V., 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 490-496.

- Reuter, S., Nygaard, A.R., Zimmermann, W., 1999. β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 509–516.
- Rivero-Urgell, M., Santamaria-Orleans, A., 2001. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development*, 65, 43–52.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830-837.
- Roy, I., Gupta, M.N., 2003. Lactose hydrolysis by Lactozym immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, 39, 325-332.
- Rustom, I.Y.S., Foda, M.I., Lopez-Leiva, M.H., 1998. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors. *Food Chemistry*, 62 (2), 141-147.
- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R., 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9, 69-80.
- Saldamlı, İ., 1998. *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Basımevi, 527 s, Ankara.
- Samoshina, N.M., Samoshin V.V., 2005. The Michealis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 239-251.
- Santos, A., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 1998. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 558-567.
- Shah, S., Sharma, A., Gupta, M.N., 2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochemistry*, 351 (2), 207-213.
- Shin, H.J., Park, J.M., Yang, J.W., 1998. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry*, 33 (8), 787-792.
- Silva, C.J.S.M., Sousa, F., Gübitz, G., Cavaco-Paulo, A., 2004. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. *Food Technology and Biotechnology*, 42 (1), 51–56.
- Splechtna, B., Nguyen, T.H., Steinböck, M., Kulbe, K.D., Lorenz, W., Haltrich, D., 2006. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4999-5006.
- Taniguchi, H., 2005. Carbohydrate active enzymes for the production of oligosaccharides. In *Handbook of Industrial Biocatalysis*. C. T. Hou (eds), pp. 20-1-20-25, CRC Pres Taylor and Francis Group., Boca Raton.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları. In *Enzimoloji*. (Editör: A Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi. s: 249-306. Lisansüstü yaz okulu 21-27 Eylül 1997 Kuşadası, Aydın Türkiye.
- Tello-Solís, S.R., Jimínaz-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez-Ruíz, L., Cruz-Guerrero, A.E., Rodríguez-Serrano, G.M., García-Garibay, M., 2005. Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase by circular dichroism and structure-activity relationship as a function of the pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10200-10204.

- Topçular, C., Ayhan, H., 2008. Carrier free cross-linked peroxidase aggregates: synthesis and characterization. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 36 (3), 255-261.
- Tu, W., Sun, S., Nu, S., Li, X., 1999. Immobilization of β -galactosidase from *Cicer arietinum* (gram chicken bean) and its catalytic actions. Food Chemistry, 64, 495-500.
- Tzortzis, G., Goulas, A.K., Gibson, G.R., 2005. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 412-416.
- Uwajima, T., Yagi, H., Terada, O., 1972. Purification, Crystallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. Agricultural and Biological Chemistry, 36 (4), 570-577.
- Valero, J.I.S., 2009. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation. Doctora Thesis, The Ohio State University, Chemical and Biomolecular Engineering Graduate Program, Ohio USA, 249 p.
- Vetere, A., Paoletti, S., 1998. Separation and characterization of three β -galactosidase from *Bacillus circulans*. Biochimica et Biophysica Acta, 1380, 223-231.
- Wanarska, M., Kur, J., Pladzyk, R., Turkiewicz, M., 2005. Thermostable *Pyrococcus woesei* β -D-galactosidase - high level expression, purification and biochemical properties. Acta Biochimica Polonica, 52(4), 781-787.
- Wang, Y., 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. Food Research International, 42, 8-12.
- Zhang, J., Zhang, S., Wang, Y., Gao, S., 2008. Stability of β -galactosidase immobilized on composite microspheres of Artemisia seed gum and chitosan. Polymer Composites, DOI 10.1002/pc.20337, 9-14.
- Zheng, P, Yu, H., Sun, Z., Ni, Y., Zhang, W., Fan, Y., Xu, Y., 2006. Production of galacto-oligosaccharides by immobilized recombinant β -galactosidase from *Aspergillus candidus*. Biotechnology Journal, 1, 1464-1470.
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D., 2001a. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. Journal of Food Engineering, 48, 69-74.
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D., 2001b. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biochemical Engineering Journal, 9, 33-40.
- Zhou, Q.Z.K., Chen X.D., Li, X., 2003. Kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric. Biotechnology and Bioengineering, 81 (2), 127-133.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı	Umut AYKUT
Doğum Yeri	Samsun-1977
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
Eğitim Durumu	
Lise	Namık Kemal Lisesi-SAMSUN 1991-1993
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 1994-1998
Yüksek Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği A.B.D. 1998-2003
Çalıştığı Kurum	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
İletişim Bilgileri	uaykut@omu.edu.tr 0 362 312 19 19 - 1509