

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* BAKTERİSİNDEN
β - GALAKTOSİDAZ ENZİM ÜRETİMİ**

Elif Gizem COŞGUNARAS

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

KARS-2019



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI



TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* BAKTERİSİNDEN
 β -GALAKTOSİDAZ ENZİM ÜRETİMİ

Elif Gizem COŞGUNARAS
YÜKSEK LİSANS TEZİ




DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

Bu tez çalışması 2018-FM-70 nolu proje ile Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

TEMMUZ / 2019
KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı YL14/020 numaralı öğrencisi Elif Gizem COŞGUNARAS'ın Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* BAKTERİSİNDEN β - GALAKTOSİDAZ ENZİM ÜRETİMİ” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

05/07/2019

	Adı ve soyadı	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Evren KOÇ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Abdülmelik ARAS	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... gün ve
.../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fikret AKDENİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Elif Gizem COŞGUNARAS

2019

ÖZET

TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* BAKTERİSİNDEN β-GALAKTOSİDAZ ENZİM ÜRETİMİ (Yüksek Lisans Tezi)

Elif Gizem COŞGUNARAS

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

Bu çalışmada; Bölgemizde bulunan sıcak su kaynaklarından toplanan *Bacillus Licheniformis* bakterisinden, β - Galaktozidazın termal kaynaklı olmasının ticari olarak daha geniş uygulama alanları sağlayabileceğinden, özellikle termofilik olarak üretilmesi hedeflenmiştir. Çalışma yapılırken bölgede bulunan su kaynaklarından alınan termofilik bakteriler izole edilerek karakteristik özellikleri belirlenmiştir Su kaynaklarından termofilik bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen örneklerin çeşitli karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Saflaştırılan DNA'lardan 16s rDNA bölgeleri PCR ile saflaştırılmış ve sekans analizleri yapılmıştır. *Bacillus Licheniformis* bakterisine ait β – Galaktozidaz enzimini ifade eden gen bölgeleri biyoinformatik analiz yöntemleri ile saptanmıştır. Nikel affinitesi ile 6X-His takısına sahip rekombinant proteinlerin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, termal kaynaklardan elde edilen Termofilik *Bacillus Licheniformis* bakterisinden β-Galaktozidaz enzimin, *E.coli*'ye klonlanarak rekombinant olarak üretilmesi ve saflaştırılması sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus Licheniformis*, Termofilik organizma, β – Galaktozidaz

2019, 93 Sayfa

ABSTRACT

PRODUCTION OF β -GALACTIOSIDASE ENZYME FROM THERMOPHILIC

Bacillus licheniformis BACTERIA

(M.Sc. Thesis)

Elif Gizem COŞGUNARAS

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Bioengineering

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

In this study; Since the thermal source of β - galactosidase from *Bacillus licheniformis* bacteria collected from the hot water springs in our region can provide commercially wider application areas, it is aimed to be produced as thermophilic. Thermophilic bacteria were isolated from water sources. Various characteristics of isolated samples were determined. The 16s rDNA regions from the purified DNA were purified by PCR and sequenced. Purification of recombinant proteins having the 6X-His tag with nickel affinity was performed. For this reason, β -Galactosidase enzyme from Thermophilic *Bacillus Licheniformis* bacterium obtained from thermal sources has been cloned into *E. coli* to produce recombinant production and purification.

Key Words: *Bacillus licheniformis*, Thermophilic organism, β -Galactosidase

2019, 93 pages

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında her türlü fikir, öneri ve deneyimleri ile çalışmamı destekleyen, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez ve Laboratuvar çalışmalarım da her zaman yanımda olan, benim için hem bir öğretmen hem bir abi kadar değerli olan, her aşamada yardımlarını esirgemyen, bana hep çözüm önerileri sunan çok kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Orhan ULUÇAY'a, yine laboratuvar çalışmalarım da yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ ve öğrencilerine, Kafkas Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'ndaki tüm saygıdeğer Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım. İş ve okul arasındaki koşurmalarım da bana imkân sağlayan çalışma arkadaşım Sayın Cenk Kürşat AKSU'ya, vaktini ve sabrını benden esirgemeyen değerli arkadaşım Murat İNCE'ye, beni her alanda destekleyen kıymetli hocalarım Prof.Dr. Yavuz ÖZTÜRKLER'e, öğretmenim Murat ATALAY'a ve kıymetli dostum Gamze ILGAR'a teşekkür ederim.

Bana inandığın şeyler uğruna, her zorlukta mücadele etmekten asla vazgeçmemeyi, her düştüğümde yeniden doğrulmam gerektiğini ve ne yaparsam yapayım severek yapmam gerektiğini öğreten aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif Gizem COŞGUNARAS

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyoteknolojinin Gelişimi ve Endüstriyel Uygulamaları.....	4
1.2. Enzimler	8
1.2.1. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	9
1.2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	9
1.2.3. Enzim Kaynakları.....	10
1.2.4. İntraselüler ve Ekstraselular Enzim	11
1.2.5. Enzimlerin Endüstriyel Proseslerde Kullanılması	12
1.2.6. Gıda Endüstrisinde Enzim Uygulamaları.....	15
1.2.7. Ticari Mikrobiyal Enzim Üretimi	16
1.3. Laktoz.....	19
1.4.1. Laktoz Hidrolizi	20
1.4.2. Laktoz İntoleransı.....	21
1.5. α -Galaktozidaz ve β -Galaktozidaz	23
1.5.1. B- Galaktozidaz (EC 3.2.1.23).....	24
1.5.2. β - Galaktozidazın Genel Özellikleri	25
1.5.3. β – Galaktozidaz Kaynakları.....	26
1.5.4. β - Galaktozidaz Etki Mekanizması	27
1.5.5. β – Galaktozidazın Endüstrisinde Uygulamaları	29
1.6. Termofilik Mikroorganizmalar	30
1.6.1. Ekstrem Koşullarda Gelişen Mikroorganizmalardan Elde Edilen Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı.....	34
1.7. Bacillus Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	36
1.7.1. Bacillus Cinsi Bakterilerin Endüstriyel Uygulamaları.....	40

1.7.2. Bacillus licheniformis' in Genel Özellikleri	41
1.8. Amaç	43
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	44
2.1. Materyal	44
2.1.1. Çalışma Organizması	44
2.1.2. Çalışmada Kullanılan cihazlar	44
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	45
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Primer Setleri.....	45
2.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	45
2.1.6. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	46
2.2. Yöntem.....	46
2.2.1. Organizmanın Elde Edilmesi	46
2.2.2. Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu	47
2.2.3. Genomik DNAnın Spektrofotometrik Ölçümü.....	49
2.2.4. PCR Reaksiyonu	49
2.2.5. DNA Örneklerinin Jel Elektroforezi ve UV Görüntüleme	50
2.2.6. Klonlanacak Olan Genomik DNA'nın Plazmite Ligasyonu.....	51
2.2.7. Genomik DNAnın Kompetent Hücreye Transformasyonu	52
2.2.8. Plazmit İzolasyonu	53
2.2.9. DNA Dizi Bilgilerinin Belirlenmesi	54
2.2.10. β – Galaktozidaz Proteinine Ait Genlerin Klonlanması.....	55
2.2.11. β – Galaktozidaz Enzimine Ait Proteinin E.coli'de Heterolog Olarak Üretilmesi ve Saflaştırılması	60
2.2.12. SDS Page Jeline Yükleme.....	62
3. BULGULAR	63
3.1. Genomik DNA Eldesi	63
3.2. DNA Dizi Analiz Sonuçları	63
3.3 β – Galaktozidaz geninin Bacillus licheniformis'ten Klonlanması.....	63
3.4 Rekombinant Olarak Elde Edilen β – Galaktozidazın Ekspresyonu.....	65
4. TARTIŞMA	66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	70
6. KAYNAKLAR	71

ÖZGEÇMİŞ.....79



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1: Haloenzim Yapısı [63].	9
Şekil 1. 2: Enzimlerin endüstride kullanımının %' lik oranları [67, 68].	13
Şekil 1. 3: Enzimlerin endüstriyel sektörel dağılımı [69].	14
Şekil 1. 4: Laktoz molekülü [59].	19
Şekil 1. 5: Laktozun enzimatik hidrolizi [59].	21
Şekil 1. 6: İnce bağırsakta laktoz metabolizması; (1) Laktoz ince bağırsağa girer. (2) Laktoz konağa ait laktaz enzimi ile veya (3) probiyotikler tarafından değişikliğe uğratılır. (4) Fazla miktarda laktoz kolona geçer [19].	22
Şekil 1. 7: Kolonik laktoz metabolizması; Laktoz kolona girer ve mikrobiyota tarafından glikoz ve galaktoza fermente edilir. (2) Örneğin, hidrojen, metan ve karbondioksit gibi gazlar oluşturulmuştur. (3,4) Aynı zamanda laktat oluşturulmuş ve kısa zincirli yağ asitlerine (SCFA) dönüştürülmüştür, (5) ayrıca bu aşamada gazlar da oluşturulmaktadır. SCFA epitelyum hücreleri tarafından içeri alınabilir veya mikrobiota tarafından kullanılabilir ya da dışkı ile atılır [19].	23
Şekil 1. 8: <i>E. coli</i> bakterisine ait β -galaktozidaz enziminin üç boyutlu yapısı [19].	25
Şekil 1. 9: β -Galaktozidaz molekülünün çift sarmal yapıdaki görünümü [59].	26
Şekil 1. 10: Beta-Galaktozidaz tarafından laktozun hidrolizi [19];	28
Şekil 1. 11: Beta-Galaktozidaz tarafından katalizlenen galaktooligosakkarit oluşumu [19];	29
Şekil 1. 12: <i>Bacillus</i> 'ların vejetatif formu [61].	37
Şekil 1. 13: <i>Bacillus licheniformis</i> 'in 24 saat inkübasyonu sonrası koloni görünümü [60].	37
Şekil 1. 14: endospor oluşturmuş <i>Bacillus Subtilis</i> [62].	38
Şekil 1. 15: <i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 kromozomunun dairesel temsili [36].	42
Şekil 2. 1: LB Broth sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılan örnekler.	47
Şekil 2. 2: pGEMT-Easy vektörü (Promega)	51
Şekil 2. 3: pQE 40 vektörünün şekli (SnapGene).	57
Şekil 3. 1: DNA izolatlarının PCR sonrası jel elektroforezi sonucu	63
Şekil 3. 2 : β – Galaktozidaz gen bölgeleri jel elektroforezi sonucu	64
Şekil 3. 3: β – Galaktozidaz geni içeren plazmidin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Lambda DNA/EcoRI /Hind III Marker.	64

Şekil 3. 4: Ni-NTA saflaştırılması sonucu elde edilen β – Galaktozidaz enzimine ait jelin görüntüsü..... 65



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. 1: Prokaryotlardaki balıca metabolik grupların maksimum büyüme sıcaklıkları [45].	32
Tablo 2. 1: DNA örneklerinin NanoDrop ile Spektrofotometrik ölçümleri.	49
Tablo 2. 2: Genomik DNA örneklerinin PCR reaksiyon koşulları.	49
Tablo 2. 3: pGEMT-Easy vektörüyle ligasyon reaksiyonu bileşenleri	52
Tablo 2. 4: Biyoinformatik analizler sonucu belirlenerek PCR analizinde kullanılan primer DNA dizileri (sarı renkle işaretlenmiş bölgeler restriksiyon tanıma bölgelerini belirtmektedir).	56



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
Mg	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
μ mol	: Mikromol
$^{\circ}$ C	: Celsius
g	: Gram
IU	: Uluslararası Enzim Birimi
L	: Litre
M	: Molarite
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
pH	: $-\log[H^+]$
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poli Akrilamid Gel Elektroforez
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Gel Elektroforez
UHT	: Ultra Yüksek Sıcaklık
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Kütle
μ L	: Mikrolitre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
LB	: Luria Bertani
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Tris	: 2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol
Tris-HCl	: Tris Hidroklorik asit

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji kaynağını fizik, kimya biyoloji gibi temel bilimlerden alan; genetik, moleküler biyoloji, fizyoloji, biyokimya, mühendislik sistemleri gibi farklı disiplinlerin komplike bir şekilde çalıştığı, mevcut organizmaların ihtiyacı karşılayabilecek yeterlilik ve nitelikte elde edilebilmeleri için kullanılan teknolojidir. Biyoteknolojinin insanlık açısından kullanımını milattan öncelere dayanmaktadır.

Nüfus artışı ve sanayileşmenin beraberinde getirdiği tüketim çevre kirliliğininide beraberinde getirmiştir. Çevre kirliliğinin önlenmesi hususunda her ne kadar yasal düzenlemeler yapılsada bu düzenlemeler yeterli kalmamış ve çevre kirliliği artarak devam etmektedir. Kaynakların verimli kullanılması ve yenilenebilir olması çevre kirliliğini azaltarak bir kaynaktan elde edilen verimi artıracığından dolayı biyoteknolojiye olan ihtiyaç artmıştır. Biyoteknoloji kaynakların yenilenebilir olmasına ve geri dönüşüm teknolojilerinin gelişmesi ile endüstriyel atıkların azalmasına imkan sağlamıştır.

Biyoteknoloji varoluşun her aşamasında insan sağlığı, toprak, tarım, çevre, ekolojik yaşam, sanayii ve enerji üretimine kadar her alanda karşımıza çıkmaktadır. Doğal kaynakların giderek tükenmesi ve kullanılabilir sağlıklı niteliklerini koruyamayacak duruma gelmeleri biyoteknolojinin önemini arttırmıştır. En yaygın kullanılan enerji kaynaklarından biri olan petrolün bile azalıyor olması, araştırmacıları alternatif enerji kaynaklarına yönlendirmektedir. Mikroorganizmalardan faydalanılarak ve karbon kaynaklı bileşenlerin kullanılmasıyla elde edilen biyoyakıtlar ve yenilenebilir enerjiler önem arz etmektedir.

Dünya nüfusunun artmasıyla gıda tüketimi de artmakta, farklı coğrafyalarda aynı kalitede ve standartlarda, ürün çeşitliliğinin maksimum olmasını talepten bir tüketici topluluğu oluşmaktadır. Bu talebin karşılanması mevcut coğrafyada ve geleneksel yöntemlerle mümkün değildir. Mevcut hammadde kaynaklarının önümüzdeki yüzyılda artan dünya nüfusunu karşılayamayacağı endişesi, işlenmiş hazır gıda tüketiminin artması yeni teknolojileri kullanımını zorunlu hale getirmiştir.

Genetik biliminin de kullanılması ile modifiye mikroorganizmalar ve enzimatik biyo katalizörler ile zararlı atıklar zararsız yan ürünlere dönüştürülebilmektedir. Atık suların yeniden kullanılabilir nitelik kazanması geri dönüşüm ve yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelik bir farkındalık oluşturmuştur.

Biyoteknoloji canlı organizmaların genetik yapısının belirlenmesinde de rol olarak birçok hastalığın tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Genetik yapının belirlenmesiyle, belirli özellikleri spesifik kodlar olarak barındıran gen grupları ve bu kodların açıklanması ile rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak; istenilen genin izolasyonu veya belirli bir hedefe aktarılmasıyla mevcut durumda üretilmeyen yeni kullanılabilir ürünler elde edilmekte veya daha dayanıklı türler oluşturulabilmektedir.

Biyoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanımı M.Ö. ye dayanmakta olup, günümüzde özellikle fermente gıda ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Gıda sektöründe enzimlerin bilinçli ve teknolojik gelişmelere bağlı kullanımı artmış, mikrobiyal enzim kaynaklarının keşfedilmesi; bu enzimlerin immobilizasyonu ve saflaştırılmaları ile endüstriyel kullanımı daha da mümkün hale gelmiştir.

Endüstriyel proseslerde işlemlerin spesifik ve daha az zaman alacak şekilde gerçekleşmesi istenir. Bu amaçla biyolojik sistemlerden faydalanılarak biyokatalizörler ve kimyasal maddeler elde edilmektedir.

Enzimler; doğal olarak canlı organizmalarda bulunan, protein yapısında ve spesifik reaksiyonlar için belirli optimum koşullarda aktivite gösterebilen biyolojik katalizörlerdir. Enzimler endüstride tekstil, gıda, ilaç, enerji, tıp, kimya, tarım, hayvancılık, matbaa gibi daha birçok alanda kullanılmaktadır.

Enzimler sentezlendikleri hücre içerisine aktivite gösteriyorsa intraselüler, sentezlendikleri hücrenin dışına salınıp burada aktivite gösteriyorsa ekstraselüler enzim olarak adlandırılırlar. Enzimlerin üretildikleri ortam dışında da reaksiyonları katalize edebilmeleri enzimlerin yararlanılabilirliğini kolaylaştırmaktadır. Enzimler bir çok kaynaktan elde edilebilmektedir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan enzim elde etmek; mikroorganizmalardan elde edilen enzimlere kıyasla daha yüksek maliyet gerektirir ve ihtiyacı karşılayabilecek düzeyde üretilmemektedir. Endüstriyel olarak kullanılan

enzimler daha çok mikrobiyal kaynaklı olmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması ve kısa sürede yüksek miktarlarda üretilme potansiyeli nedeni ile tercih sebebi olmaktadır.

Ticari enzimlerin endüstriyel ve ekonomik değerlerinin yüksek olması nedeniyle bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmıştır. Son yıllarda rekombinant DNA teknolojilerinin de kullanılması ile ekstrem koşullarda da aktivite gösterebilen yeni modifiye mikroorganizmalarla da elde edilen daha stabil ve dayanıklı enzimler endüstriyel enzimlerin kullanımını daha da arttırmıştır.

Enzimlerin mevcut yapılarında modifikasyonlar sağlanarak; daha geniş pH aralıklarında aktif olabilen, termostabil, uzun süre ve ekstrem koşullarda dahi aktif olabilen ve reaksiyon sonrasında maksimum verim elde edip, proses sonunda minimum kayıpla geri kazanılabilen enzimlerin endüstriye kazandırılması yönünde biyoteknolojik çalışmalar yapılmaktadır.

B-galaktozidaz süt şekeri olarak bilinen süt ve süt ürünlerinde doğal olarak bulunan laktoz karbonhidratını hidrolize ederek glikoz ve galaktoz monomerlerini oluşturan biyokatalizördür. Glikoz ve galaktoz molekülleri laktozdan daha küçük yapıda olup, çözünürlükleri ve tatlılığı daha yüksektir. Laktoz hidrolizi hem enzimatik yolla hemde asidik ajanlarla gerçekleştirilebilir. İdeal süt pH'sı 6,5 - 6,8 aralığında olup, asidik ajanlarla hidrolize edilmesi durumunda pH'ını düşürecek dolayısıyla son ürünün renk, koku ve tekstüründe istenmeyen değişiklikler ortaya çıkacaktır. Bu sebeple asitle hidroliz tercih edilmemektedir. Enzimatik hidrolizde ise glikozun serbest hale geçmesiyle sadece sütün tatlılığında artma meydana gelecektir.

Laktoza alerjisi olan yani bünyesinde doğal olarak laktozu parçalayacak enzime yeteri düzeyde sahip olmayan veya bu enzimin bağırsakta aktif olmaması durumunda sindirim sorunları yaşayan bireyler için özel üretilen yiyecek ve içeceklerde B-galaktozidaz enzimi ile laktozun hidrolizi sağlanarak tüketime sunulmaktadır. Laktoz intoleransı olan bireylerde bu problemin çözülmemesi durumunda gaz sancıları, ağrı ve ishal gibi şikâyetler görülmektedir.

Süt ürünleri teknolojisinin ülkemizde ve dünya genelinde geniş bir yer kapladığı düşünüldüğünde, atık olarak çıkan peynir altı suyunu potansiyelinin de endüstriyel atıklar içerisinde büyük bir yer kapladığı anlaşılmaktadır. Peynir altı suyu gibi karbon değeri yüksek bir bileşenin çevreye salınımı çevre dengesi açısından oldukça sakıncalı olmakla birlikte, istenilen düzeyde geri dönüşümü sağlanamamaktadır. Peynir altı suyu sütteki laktozun büyük bir çoğunluğunu içermesi, serum proteinlerince zengin ve mineral değeri yüksek bir ürün olup değerlendirilmesi; hem ekolojik açıdan, hem de ekonomik açıdan büyük bir kazanımdır. Peynir altı suyu gıda sektöründe alkollü ve alkolsüz içecek üretimi, Powder Whey (Peynir altı suyu protein tozu) gıda takviyesi, aroma verici, düzenleyici katkı maddesi, stabilizatör olarak bir çok üründe kullanılmaktadır. Mineralce zengin olması bakımından; kozmetik ürünlerinde, kolon kanseri, bağırsak hastalıkları, cilt hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisi için tıpta kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra peynir altı suyundaki laktozun çeşitli filtrasyon yöntemleriyle uzaklaştırılması veya saflaştırılması sonucu geriye kalan protein whey protein olarak ekonomik değeri yüksek bir takviye edici gıdaya dönüşürken; arta kalan laktozdan biyoteknolojik metotlar, klasik fermantasyon veya enzimatik reaksiyonlarla etanol üretimi ile biyo yakıt üretimine katkı sağlanabilmektedir. Süt teknolojisinin atık ürünü olan peynir altı suyundan; ekonomik değeri süttten çok daha yüksek olan yeni yan ürünler oluşturulabilmektedir. Özellikle enerjide, yenilenebilir kaynakların kullanımına yönelerek, dış kaynaklı hammaddeye bağımlılık azaldıkça, ithalat da azalacak böylece milli sanayii ve ekonominin kendine yeterli olmasına katkı sağlanabilecektir

Bacillus türleri izolasyonu kolay olduğu için endüstride en yaygın kullanılan bakterilerdir. Bacillusların ekstrem koşullara dayanımı bu mikroorganizmaların genetik adaptasyonlarından ileri gelmektedir. Bacillus türleri endospor oluşturabilen türlerdir. Ortamda ihtiyaç duyulan besinlerin bulunmaması veya optimum inkübasyon koşullarının dışına çıkılması halinde spor oluşturabilirler.

1.1. Biyoteknolojinin Gelişimi ve Endüstriyel Uygulamaları

Biyoteknolojinin tanımı ilk kez 1919 da; “biyolojik sistemlerin yardımıyla hammaddelerin yeni ürünlere dönüştürüldüğü işlemler” olarak Karl Ershy tarafından yapılmıştır [1].

Biyoteknoloji, hücre ve doku biyolojisi, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji, biyokimya ve mühendislik bilimlerinden yararlanarak, mevcut canlı organizmaları geliştirmek, doğal etkilerinin yanında, çağın getirdiği yeni ihtiyaçları ve tükenmekte olan maddeleri inavatif yöntemlerle elde etmeye çalışan kompozif bir teknolojidir [4].

Nüfus artışı, sanayileşme ve teknolojik gelişmeler sonucunda atıkların ortaya çıkması ve yenilenemeyen kaynakların tükenip azalması, ekolojik dengenin giderek bozulması gibi problemler biyoteknolojiye yönelimi arttırmış ve gelişmesine ön ayak olmuştur. İnsanlık açısından kullanımı milattan öncelere dayanan biyoteknoloji zaman içinde gelişmiş ve kendisine geniş uygulama alanları yaratmıştır [1,14]. Yenilenebilir kaynakların kullanımına olanak sağlaması ve geri dönüşüm teknolojilerinin gelişmesiyle endüstriyel atıkların azalmasına fayda ve imkân sağlamıştır.

Özellikle son yıllarda stratejik öneme sahip olan rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak yüksek miktarda ve kaliteli ürün almak amacıyla geleneksel kültürler ve doğal habitatta var olan organizmaların genetik yapıları değiştirilebilmektedir. [72, 4]

Biyoteknoloji tarımda klasik ıslah yöntemleriyle çözümlenemeyen problemlere rekombinant DNA teknolojisi sayesinde yeni mutant organizmalar ile soğuğa, sıcağa, kuraklığa ve fazla tuza dayanıklı bitkiler ile üretim kayıplarını minimuma düşüren kaliteli ürünler üretilmiştir [1,4]. Tarımsal uygulamalarda pestisit ve herbisit dayanıklılık, meyve olgunlaşma süresinin kontrol altına alınması mümkündür [4]. Genetik modifikasyonlarla elde edilen mikroorganizmalar ile ürün verimi arttırılmıştır. Bunların gıdalara uygulanması ile raf ömrünün uzatılması, aroma artırılması, tekstür verici, koruyucu, antioksidan, emülsifiye edici, sürfaktan veya fonksiyonel gıda bileşenleri üretilmiş, böylelikle sanayii ürünlerinin pazar payı artmıştır [1, 21]. Son yıllarda üç boyutlu yazıcılar ve doku mühendisliği kullanılarak yapay ortamda hayvan hücrelerinden in vitro et üretilmektedir [72].

Nanoteknoloji ve biyoteknolojinin birlikte çalışmalarıyla yüksek hassasiyetle çalışabilen biyosensörler üretilmiş ve birçok alanda kullanılmaktadır. Gıdaların ambalaj materyaline yerleştirilerek ambalaj ürünün tüketimine kadar çen sürede içerisinde gelişen patojenleri, toksik ürünleri ve diğer kontaminantları tespit eden ve kalitesini

takip eden nanosensörler geliştirilmiştir [21]. Organizmaların genetik yapılarının çözümlenmesiyle de genetik hastalıklar ve kanserin, önceden tanı ve teşhisini mümkün olup, uygun tedavi yöntemleri belirlenmektedir [4].

Dokumacılıkta doğal kaynaklardan elde edilen pamuk yerine sentetik liflerle üretilen giysiler yaygınlaşmıştır. Özellikle enzimatik biyokatalizörlerin ağartma, apreleme, yıkama ve taşlama gibi işlemlerde kullanılması tekstil sektöründe iş gücünü azaltmıştır [4].

Ekolojik dengenin korunması için canlı organizmalardan elde edilen ürünlerin; istenmeyen atıkların arıtılmasında çevre biyoteknolojisi kavramını ortaya çıkarmıştır. Sanayi devriminin peşi sıra kimyasalların kullanımı ile sanayii atıkları artmıştır. Doğada tüketildiği zaman yeniden oluşamayan ve zararlı atıklar oluşturan kömür, petrol, doğalgaz, uranyum ve toryum (nükleer enerji kaynağı) gibi yenilenemez ham enerji kaynaklarının zamanla tükeneceğinin öngörülmesi sebebiyle enerji kaynaklarına alternatif arayışı gündeme getirmiştir [4, 14]. Ekolojide doğal olarak mevcut olup, tüketilmesi halinde zararlı çıktılar oluşmayan ve geri kazanılabilen enerji kaynaklarına yenilenebilir enerji kaynakları denilmektedir [14]. Özellikle tarımsal hammaddenin sağladığı bileşenleri karbon-hidrat bileşikleri olan biyokütlenin kullanılması ile elde edilen biyokütle enerjisi yenilenemez enerji kaynaklarına bağılılığı azaltabilir, dolayısıyla petrol gibi hammaddelerin ithalatı da azalarak ülke ekonomisi ve sanayisine katkı sağlanabilir [4, 14].

Endüstriyel biyoteknolojinin canlı organizmaları, enzimleri ve doğal kaynakları kullanması ile daha önceki geleneksel veya tamamen kimyasal kaynaklı endüstriyel yöntemlere kıyasla daha az atık veya kullanılabilir yeni yan ürünler elde edilebilmekte ve hatta endüstriyel yeni enerji kaynakları oluşturulmaktadır. Böylece daha verimli çevre dostu ve enerji tasarrufu sağlayan; mevcut kaynakların gereksiz tüketiminin sınırlandırılmasını öngören faaliyetler oluşturulmaktadır.

Türkiye biyokütle potansiyeli, su kaynakları, iklim koşulları, güneşlenme ve alan kullanılabilirliği gibi özellikleri ile biyokütle enerjisi üretimine en uygun olan ülkelerdendir. Atıklardan hesaplanan toplam enerji potansiyelinde OECD ülkeleri

arasında Türkiye; 110.200.000 MWh ile baştan dördüncü sırada yer almıştır [14]. Öyleki dünya enerji üretiminin % 15 i biyokütle kaynaklıdır [55].

1970'li yıllarda dünyada yaşanan petrol krizi birçok ülkeyi etanol gibi benzine ilave edilen takviye yakıtların üretimine yönlendirmiştir. Petrol kaybının önüne geçmek için özellikle biyoproseslerden faydalanılarak şeker kamışı ve mısır melasından etanol üretimi yapılmıştır. Biyoethanol üretiminde, özellikle gıda sanayii atıklarından üretimi konusunda Brezilya ve ABD önde gelen ülkelerdir [4,11]. Halen bu ülkelerde arabaların yaklaşık % 90'ı alkolle çalışmaktadır [11]. Ülkemizde de 7 Temmuz 2012 tarihli 28346 sayılı resmi gazetede yayınlanan tebliğe göre de benzin türevi yakıtların en az %3 oranında etanol içermesi zorunlu hale getirilmiştir [54].

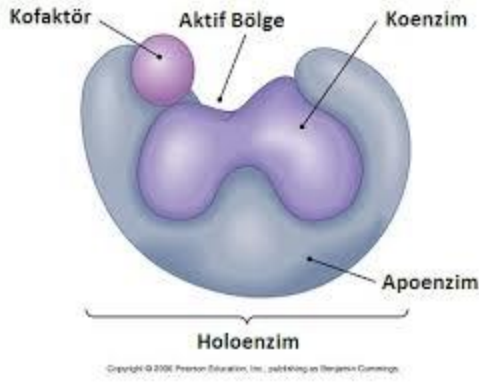
Gıda sektörünün en geniş sanayii alanını oluşturan süt ürünleri teknolojisinin ülkemizde ve dünya genelinde geniş bir yer kapladığı düşünüldüğünde, atık olarak çıkan peynir altı suyunu potansiyelinin de endüstriyel atıklar içerisinde büyük bir yer kapladığı anlaşılmaktadır. Peynir altı suyu gibi karbon değeri yüksek bir bileşenin çevreye salınımı çevre dengesi açısından oldukça sakıncalıdır. Fakat hala istenilen düzeyde geri dönüşümü sağlanamamaktadır. Peynir altı suyu sütteki laktozun büyük bir çoğunluğunu içermesi, serum proteinlerince zengin ve mineral değeri yüksek bir ürün olup değerlendirilmesi; hem ekolojik açıdan, hem de ekonomik açıdan büyük bir kazanımdır. Peynir altı suyu gıda sektöründe alkollü ve alkolsüz içecek üretimi, Powder Whey gıda takviyesi, aroma verici, düzenleyici katkı maddesi, stabilizatör olarak bir çok üründe kullanılmaktadır. Mineralce zengin olması bakımından; kozmetik ürünlerinde, kolon kanseri, bağırsak hastalıkları, cilt hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisi için tıpta kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra peynir altı suyundaki laktozun çeşitli filtrasyon yöntemleriyle uzaklaştırılması veya saflaştırılması sonucu geriye kalan protein whey protein olarak ekonomik değeri yüksek bir takviye edici gıdaya dönüşürken; arta kalan laktozdan biyoteknolojik metotlar, klasik fermantasyon veya enzimatik reaksiyonlarla etanol üretimi ile biyo yakıt üretimine katkı sağlanabilmektedir. Süt teknolojisinin atık ürünü olan peynir altı suyundan; ekonomik değeri sütün çok daha yüksek olan yeni yan ürünler oluşturulabilmektedir. Özellikle enerjide, yenilenebilir kaynakların kullanımına yönelerek, dış kaynaklı hammaddeye bağımlılık azaldıkça, ithalat da azalacak böylece milli sanayii ve ekonominin kendine yeterli olmasına katkı sağlanabilecektir

1.2. Enzimler

Enzimler; doğal olarak canlı organizmalarda bulunan, canlılığın devamı için gerekli; yapım-yıkım, hidroliz, DNA sensezi, elektron ve protein aktarımı gibi reaksiyonlar için spesifik olarak, belirli optimum koşullarda aktivite gösterebilen, katalitik RNA molekülü hariç, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir.[4,13,30]

Enzimlerin spesifik olarak katalize ettiği yapılara substrat denir. Enzimin reaksiyonu gerçekleştiren protein yapıdaki aktif bölgesi sadece kendi üç boyutlu yapısına uygunluk gösteren substratla bir anahtar kilit bağlanması oluşturarak veya uyumluluk göstererek birleşir. Reaksiyon sonunda substrat katlıze olur ve ürün oluşur. Enzimin protein yapısı aminoasit bileşenlerine parçalanırsa enzim tamamen denatüre olur [4]. Enzim tepkime sonrası değişmeden çıkar ve tekrar kullanılabilir. Bir tepkimenin ürünü başka bir enzimatik tepkimen substratı olabilir. Aynı enzim dönüşümlü olarak hem yıkım hem sentezde görev alabilir. Nadiren de olsa bir enzim iki farklı substrata etki edebilir [35]. Molekül ağırlıkları 12kDa ile 1000 kDa aralığındadır [4].

Enzimlerin yalnızca proteinden oluşan bölümüne Apoenzim denir. apoenzim enzimin spesifik yapısını belirleyen bölge olup aktivite için tek başına yeterlidir. Bazı enzimler ise reaksiyonu gerçekleştirebilmek için bu protein yapı ile birlikte birden non-protein, organik veya inorganik yapıdan oluşan koenzim-kofaktör denilen ikinci bir kısım içerirler. Koenzim-kofaktör kısmı enzime kolaylıkla bağlanıp-ayrılacak şekilde bağlı olup, apoenzimle komplike olarak işlev görür. Enzime sıkı kovalent bağ ile bağlı olan koenzim grubuna prostetik grup, non-kovalent bağlı olanları ise kosbstrat olarak da adlandırılırlar. Apoenzim ile koenzimin birlikte bulunduğu tam bir enzim Haloenzim adını alır [4,35]. Haloenzimin kofaktör kısmı Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ihtiva ederken bazı enzimlerde ise koenzim denen organik ya da metaloorganik kompleks bir moleküldür[4].



Şekil 1. 1: Haloenzim Yapısı [63].

1.2.1. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler hassas moleküller olduklarından aktiviteleri çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bunlar [35]:

1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. Sıcaklık
5. Su aktivitesi
6. Reaksiyon süresi
7. Reaksiyon ürünleri
8. Enzim inhibitörleri
9. Aktivatörler (K^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , F^- , I^- vb.)
10. Işık ve radyoaktif faktörler
11. Basınç
12. Hormonlar.

1.2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Önceleri her enzim substratının veya katalitik etki gösterdikleri bileşiğin adının sonuna 'az' eki getirilerek, sonralarıda reaksiyon tipine göre adlandırma yapılmıştır. Gün geçtikçe çok sayıda enzimin tespit edilmesi ile Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB)

Enzim Komisyonu (EC) tarafından katalizledikleri reaksiyon tipi ve mekanizmalarına göre enzimlerin sistematik sınıflandırılması yapıldı [13]. Her enzim için önünde EC kodu bulunan, aralarında nokta bulunan 4 sayı enzimin türüne özgü sayısal bir kodla adlandırılır [13]. Buna göre [32, 35];

- Birinci numara, enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını
- Numara, etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu alt sınıfını
- Numara, alıcı grubu (akseptör) grubunu
- Numara da, o serideki özgül sıra numarasını ifade eder.

1961 yılında Enzim Komisyonu tarafından yayınlanan rapora göre enzimler katalizledikleri tepkimelere göre 6 sınıfa ayrılırlar [4, 12, 13];

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar (Sentetazlar)

Proteazlar, lipazlar, laktazlar gibi su molekülünün bulunduğu ortamlarda katalitik reaksiyon gösteren enzimlerde hidrolazlardandır.

1.2.3. Enzim Kaynakları

Enzimler bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir [54].

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle tavuk yumurtalarının beyazı, domuz midesi, pankreas, geviş getirenlerin karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilebildiği için çok eskiden beri kullanılmaktadır [55]. Bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimler de yenilebilir, toksik etkisi olmayan bitkilerden elde edilebilmektedir [55].

Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi hem maliyetli hemde ihtiyacı karşılayamaması açısından tercih edilmemektedir. Bitkisel kaynaklı enzimler ise hayvansal kaynaklı

enzimlere oranla nispeten daha kolay elde edilebilmesine rağmen endüstriyel hammadde olarak kullanılmaları ve daha uzun süreçlere ihtiyaç duyması gibi nedenlerle tercih edilmez [12]. Bunun rağmen bazı enzimler hayvan dokularından (rennin, tripsin, saymotripsin, pepsin) ve bitkilerden (papain, bromelain, fişin) elde edilebilmektedir [16]. Mikrobiyal enzimler ise geniş biyolojik çeşitliliği, genetik modifikasyonlara uygunluğu ve kısa sürede, bol miktarda üretimi mümkün olduğundan enzimlerin pazar ihtiyacını karşılamaktadır [12, 55].

1.2.3.1. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler

Endüstriyel ihtiyaçları karşılayacak enzim kaynağının büyük bölümü mikrobiyolojik kaynaklardan sağlanmaktadır. Mikroorganizmalar; bitkisel ve hayvansal enzim kaynaklarına kıyasla; reaksiyonu gerçekleştirmek için gerekli olan enzim moleküllerini daha hızlı üretebilmektedirler. Mikrobiyal kaynaklı enzimler; daha sıtabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri nedeni endüstride öncelikli olarak tercih edilirler [4, 6, 7].

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, Amilaz %18, Renin %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) %10, tripsin %3, lipaz %3; şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır [64].

Teknolojide sıklıkla kullanılan mikroorganizmalar (E.coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum vb.): genlerinin çoğaltılması, gen mutasyonlarının kolay uygulanabilir olması, yüksek verimlilikte çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmesi, ucuz azot ve karbon kaynaklarında inkübasyonunun hızlı olması, GRAS (genellikle güvenilir olarak kabul edilen) statüsünde olması, bakteriyofajlara dayanıklılığı, enzimleri hücre dışına kolaylıkla taşıyabilmesi ve endüstriyel alanda üretilebilmesi gibi özellikleri nedeni ile tercih sebebidirler [21].

1.2.4. İntraselüler ve Ekstraselular Enzim

Mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimler salgılandıkları ve aktif oldukları yere göre ekstraselüler ve intraselüler enzimler olarak 2 gruba ayrılmıştır. İlk kez 1897 de

alkol fermantasyonu sırasında, Canlı hücreden ayrı olarak enzimin aktif olabileceği Buchner tarafından tespit edilmiştir [34].

İntraselüler (hücre içi/ endoenzim) enzimler hücre içinde sentezlenir ve hücre zarından geçebilecek derecede küçük olan molekülleri substrat olarak kullanarak, hücre içinde aktivite gösterirler [4, 65].

Ekstraselular (hücre dışı/ ekzoenzim) enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınım yapar ve hücre dışında aktivite gösterirler. Sentezledikleri hücreden bağımsız çalışırlar [34].

1.2.5. Enzimlerin Endüstriyel Proseslerde Kullanılması

Bira, şarap ve peynir yapımının 4.yy'dan daha eskiye dayanması, enzimatik işlemlerin çok eski tarihlerden beri günlük yaşamın bir parçası olduğunu göstermektedir [11]. İlerleyen süreçte dericilikte, deri yumuşatma işlemi için köpek veya güvercin dışısının proteaz aktivitesinden faydalanılmış, bu dönemde Alman kimyacı "Otto Röhm" proteaz enzimin hayvansal organlardan elde edilerek köpek dışısı yerine kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Mikrobiyal kaynaklı olarak üretilen enzimler ilk defa 20. yüzyılın başlarında ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır [64].

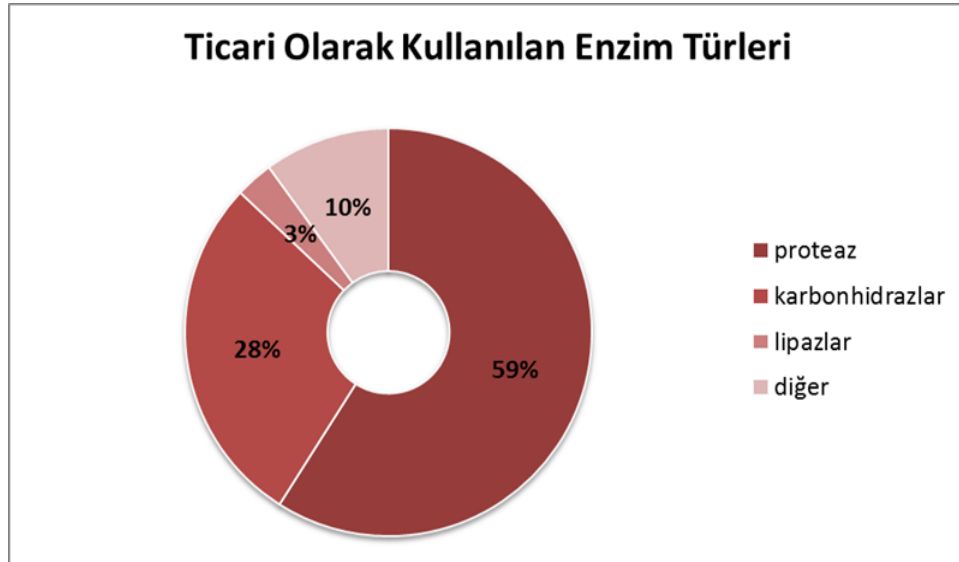
Enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanılmaları işlemlerine "enzim teknolojisi" denir [54]. Endüstride kullanılan kimyasal katalizörler yüksek yatırım ve yüksek enerji sarfiyatı gerektirirler. Kimyasal girdiler proses sonunda istenmeyen yan ürünler veya zararlı atıklar veya ortaya çıkmadığı için daha fazla enerji ve ilave prosesler gerektirir. Endüstriyel biyoteknolojinin canlı organizmaları, enzimleri ve doğal kaynakları kullanması ile daha önceki geleneksel veya tamamen kimyasal kaynaklı endüstriyel yöntemlere kıyasla daha az atık veya kullanılabilir yeni yan ürünler elde edilebilmekte ve hatta endüstriyel yeni enerji kaynakları oluşturulmaktadır. Böylece daha verimli çevre dostu ve enerji tasarrufu sağlayan; mevcut kaynakların gereksiz tüketiminin sınırlandırılmasını öngören faaliyetler oluşturulmaktadır [4, 9]. Enzimlerin biyobozunur olabilmeleri, reaksiyonunun kontrol edilebilir olması ve reaksiyonlarla istenilen ürün oluşumu sonrası durdurulabilir olması da sağladığı diğer avantajlardandır [12]. Enzimlerin üretildikleri ortam dışında da reaksiyonları katalize edebilmeleri enzimlerin

yararlanıla bilirliğini kolaylaştırmaktadır. Enzimlerin tepkimeleri özgül olarak sürdürleri son üründe neredeyse %100 verim sağlamaktadır [9].

Enzim Teknolojisi:

- ✓ Enzimi üretecek mikrobiyal suşların seçimi ve geliştirilmesi işlemleri,
- ✓ Enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri,
- ✓ Reaksiyon etkinliğini arttırmak için enzimin protein yapısında değişiklikler yapılması,
- ✓ Enzimin izolasyonu ve immobilizasyon çalışmalarını kapsar [67].

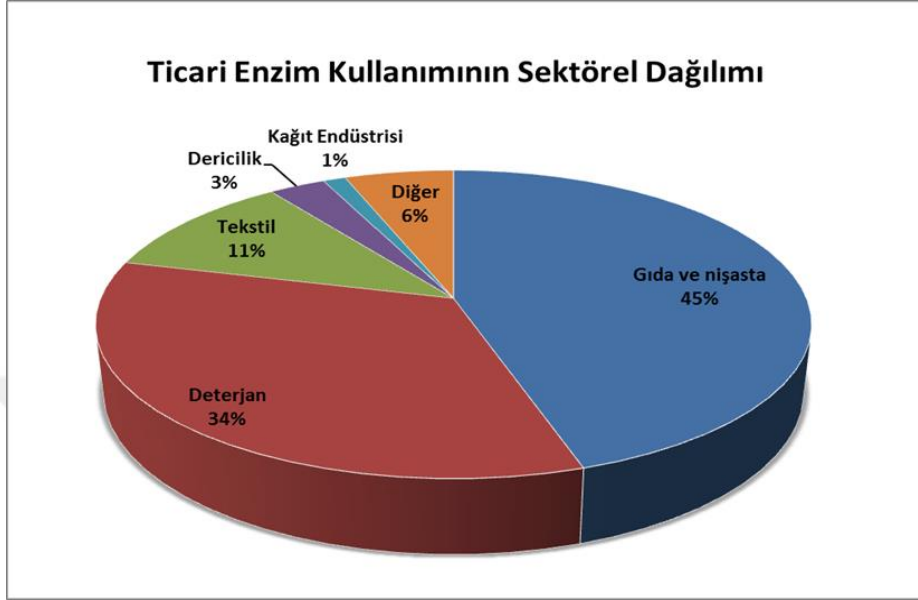
Endüstriyel amaçlı üretilen ilk enzimlerden olan amilaz, halen ticari enzim potansiyelinin %25'ini oluştırmaktadır. Karbohidrazlardan olan amilaz üretimi ise bu dilimin %13 lük kısmına hâkimdir [7]. Karbohidrazların çoğu hidrolitik ekzoenzimlerdir. Hidrolitik enzimler endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'ini oluştırmaktadır [64]. Ticari enzim kullanımı açısından karbohidrazlar; proteazlardan sonra en çok kullanılan 2. Sıradadır.



Şekil 1. 2: Enzimlerin endüstride kullanımının %' lik oranları [67, 68].

Enzimler endüstride tekstil, gıda, ilaç, enerji, tıp, kimya, tarım, ziraat, hayvancılık, matbaa, biyoyakıt, biyolojik silah üretimi gibi daha birçok alanda kullanılmaktadır [13].

Dünya pazarı incelendiğinde ticari enzimlerin % 45'i gıda ve nişasta işlenmesinde, %34'ü deterjanlarda, % 11'i tekstilde % 3'ü dericilikte ve % 1,2'si kâğıt endüstrisinde uygulama bulmaktadır [69].



Şekil 1. 3: Enzimlerin endüstriyel sektörel dağılımı [69].

Bu güne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış olup, sadece %5 i ticari olarak kullanılabilir nitelikte olduğu belirlenmiştir. Ticari önemi olan enzimler çoğunlukla mikrobiyal kökenli ve ekstraselüler olarak elde edilen hidrolazlardır. Günümüzde, bu enzimlerin %60'ı gen teknolojisi ile elde edilen rekombinant organizma ürünleridir [69]. Mikroorganizmalar kullanılarak üretilen saf enzim miktarı yıllık 500 ton civarındadır. 2000 yılında ticari enzimlerin pazardaki toplam değeri yaklaşık 2 milyar dolar olup, büyüme hızı yılda % 5-10'dur [67].

Endüstride enzim kullanımına örnek olarak; novamil, unlu mamullerin tazeliğini koruma; a-amilaz, beyaz şeker, maltodekstrinlerin ve karbohidrat tatlandırıcıların üretimi; lipazlar, selülozlar, proteazlar deterjanlarda; ligninaz, selüloz bazlı atıklardaki lignoselülozik yapıdaki selülozun hayvanların kullanmasını sağlamak ve endüstriyel organik substrat olarak kullanmak; amilaz, Tekstilde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilerek haşılama işlemi sonrası haşıl alma uygulaması, posa ve kâğıdın ağartılması, vücut bakım ürünlerinde lipaz kullanımı ve soya yağında gamsı materyallerin

giderilmesi için fosfolipazların kullanımı örnek verilebilir [4, 7, 21]. Çözücü ekstraksiyon sistemine biyoaktif madde ekstraksiyonu; pektinaz, selüloz ve hemiselüloz gibi enzimlerin meyve suyu ve birada hücre duvarlarını parçalayarak berraklaştırma işleminde kullanılması ekstraksiyon sürecini hızlandırmakta hem de polisakkarit, yağ, pigmentler ve fenolik maddeler gibi bileşenlerin hücre duvarından ürüne geçmesini ve ürünün kalitesi de artmaktadır [21].

Ülkemizde araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucu tasarlanmış gıda ve tekstil sektörü için amilaz enzimini üretmi yapan ORBA Biyokimya San. ve Tic. A.Ş. i enzim üretim tesislerimizdendir. İşletme son yıllarda deri ve deterjan sektörü için alkale fosfataz üretimi de yapmaktadır. Bunun dışında immobilize enzim teknolojisini kullanan Fako A.Ş. ve Unifar A.Ş. olmak üzere iki işletmemiz daha vardır. Bu iki işletme immobilize penisilin asilaz enzimini yurt dışından ithal edip bunu semisentetik penisilinlerin sentezinde kullanmaktadırlar [12].

1.2.6. Gıda Endüstrisinde Enzim Uygulamaları

Milattan önceki yüzyıllardan beri farkında olmadan faydalanılan enzimler peynir ve şarap gibi fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktaydı. Günümüzde ise artık birçok sektörde ve özellikle gıda sektöründe geniş çapta enzimlerden yararlanılmaktadır [4].

Enzimler endüstriyel alanda ilk olarak 1914 mikroorganizm kaynaklı olarak elde edilmiş ve deterjanlarda kullanılmıştır. Mikrobiyal enzimlerin ilk büyük ölçekli üretimi ise 1960'lı yıllarda Glukoamilaz kullanımı ile başlamıştır [9, 21].

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojilerinin de kullanılması ile kaynağı dışında ilgili genin farklı organizmalara aktarımı ile veya ekstrem koşullarda da aktivite gösterebilen yeni modifiye mikroorganizmalarla da elde edilen daha stabil ve dayanıklı enzimler endüstriyel enzimlerin kullanımını daha da arttırmıştır.

Peynir yapımında sütün phtılaştırılması amacıyla kullanılan rennet enzimi normalde hayvansal kaynaklı, buzağının midesinden saflaştırılan bir enzimdir. Asıl kaynağı sebebiyle sanayii boyutunda üretimi mümkün olmadığından yeni teknolojilerle

mikroorganizmalardan da aynı enzim üretilebilmekte ve büyük ölçekte üretime sunulmaktadır [4, 9].

Meyve suyu ve şarap gibi içecek endüstrisinde daha kaliteli, iyi renk ve aroma ve daha berrak bir ürün eldesi için ekstraksiyon enzimleri kullanılmaktadır [9]. Fırıncılıkta; nişastanın hidrolizi, ekmeğin; tazelik ve raf ömrünün uzatılması, hacim ve iyi bir tekstür oluşturması ve etilalkol fermantasyonu için, bira fabrikalarında; prosesin kontrolü ve ürün kalitesinin sağlanabilmesi yine çeşitli enzimler kullanılır [9, 35].

Laktaz enzimi; dondurmacılıkta kumlu veya taneli ürün oluşumunu önlemek, peynir altı suyunun hayvan yemi olarak değerlendirilmesi, ekmeçilikte ve laktoz oranı azaltılmış veya laktoz içermeyen süt ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Buğday unundaki glütenin hidrolize edilmesi, süt kazeinin çöktürülmesi, endüstrisinde jelatin, pepton ve aspartam (tatlandırıcı) eldesi, et endüstrisinde et yumuşatma amacıyla et proteinlerinin kısmi hidrolizinde birçok proteazlarından yararlanır. Tereyağı, peynir yoğurt gibi süt ürünlerinde tat koku ve aroma geliştirmek için lipazlar kullanılır. Yumurta tozunun elde edilmesinde ve meyve suları, bira, şarap veya mayonez gibi gıdalarda enzimatik esmerleşme ve oksidatif acılaşmaları önlemek için de oksidazlar kullanılmaktadır. Likör, yapay bal ve dondurulmuş tatlı gibi üretimlerde invert şeker eldesi ve kristalleşmeyi önlemek invertaz enzimi kullanılmaktadır [35].

1.2.7. Ticari Mikrobiyal Enzim Üretimi

Ticari enzim üretim, enzimin mikroorganizma kaynağından izolasyonu ve saflaştırılması olmak üzere iki temel aşamayla gerçekleştirilir. İlk aşamada kullanılacak mikroorganizmanın seçimi önemlidir [33]. Kullanılacak mikroorganizma belirlenirken;

- Enzim üretim kapasitelerine
- Toksik ve patojen olmamasına
- İzolasyon ve saflaştırma işlemleri sırasında istenmeyen ürünler oluşturmamalıdır.
- Kültürler saf suşlar halinde olmalı,
- Çok iyi şartlarda saklanmış olması dikkate alınır [54, 64].

Endüstriyel enzim kullanımında en çok istenilen aynı enzimin uzun süre ve birkaç katalitik reaksiyonda tekrar tekrar kullanılabilmesidir.

Proses sonrası enzimin ürünle birlikte uzaklaşması ekonomik kayıplara neden olabileceğinden enzimin kararlı formda olması istenir. Enzimler endüstriyel kullanımda serbest formda olması durumunda; diğer bileşenler enzimin moleküler yapısına zarar vermesi veya enzimin çözünerek ürüne kontamine olabilmesi halinde ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu kayıpları önlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Serbest enzimlerin stabilitesinin sağlanması için uygulanan yöntemler [33]:

- Dayanıklı ve kararlı yapıda enzim üretebilen doğru mikroorganizmanın seçimi
- Kararlılığı sağlayıcı maddelerle muamele edilmesi
- Kimyasal madde ile stabilizasyon
- Enzim molekülünde modifikasyon
- İmmobilizasyondur.

Endüstriyel olarak kullanılacak enzimde istenilen özellikler [4];

- Uzun ömürlü ve dayanıklı olması
- Ortamdaki etken diğer maddelere karşı kararlı yapısını koruyabilmesi
- Hücre içi ortamdan farklı koşullarda da aktivite gösterebilmelidir.
- Ekstrem koşullarda bile çalışabilmesidir.

Fakat enzimlerin tüm bu özellikleri bir arada sağlaması her zaman mümkün olmadığından, enzimlerin; kinetik sabitleri, sıcaklık ve pH stabilitesi, susuz çözümlere karşı direnci, Substrat ve reaksiyon özgüllüğü, kofaktör gereksinimi, uygulanabilir optimum pH'sı, moleküler ağırlığı, altbirim yapısı ve fiziksel direnci gibi özellikleri değiştirilmek istenmektedir. Bu özelliklerin değiştirilebilmesi için genetik modifikasyonlardan, ıslah çalışmaları veya ilave ajanların kullanılmaktadır [4].

Endüstriyel olarak kullanılacak enzim inaktive olması önlenerek ekonomik kayıpların da önüne geçilmelidir. Enzimler genel olarak hassas spesifik polimerlerdir. Sıcaklık, pH, denatüre edebilen maddeler, ortamın oksidasyon redüksiyon potansiyeli gibi birçok inhibe edici faktörle tehdit altında olabilirler. Ayrıca enzimin depolanması ve stabilitesini koruyor olması da önemli parametrelerdendir.

Her kültürün ayrı bir çevre optimumu bulunduğu bilinmektedir. Maksimum ürün alabilmek için saflık kontrolleri yapılarak seçilen organizmaya uygun optimum çevresel ortam sağlanmalıdır. En önemli çevresel faktör olarak ortamın besin maddesi bakımından ayarlanıp düzenlenmesi gerekir [70]. Besi ortamının mineral madde ve karbonhidrat bakımından yeterli olmasının yanında indüksiyon gibi iç faktörleri ile pH ve oksijen temini gibi dış faktörler de enzim verimi için öbüyük önem taşımaktadır [54].

1.2.7.1. Enzim Saflaştırma

Ticari olarak kullanılan enzimlerin genellikle kullanılacakları süreçte herhangi bir yan etki ve reaksiyona sebebiyet vermeyecek şekilde tüm kontaminantlardan uzak, belli bir saflıkta elde edilmesi istenir. Saflaştırılmış enzimin reaksiyon verimliliği de yüksek olur. Bazı uygulamalarda ise birkaç enzimin birlikte kullanıldığı karışımlar tercih edilmektedir [24, 48].

Enzim üretimi; kaynağından izole edilmesi ve saflaştırma olmak üzere iki aşamadan gerçekleştirilir. Saflaştırma da enzim solüsyonunun ortamdaki materyalin ihtiva ettiği partiküllerden ve mikroorganizma hücrelerinden ayrılması için çeşitli maddeler kullanılarak yapılır. Bu saflaştırma maddeleri ortama konulduktan sonra ekstraktın temizlenmesi filtrasyon veya santrifüj ile yapılır [70].

Saflaştırma işleminde enzimin kullanıldığı ortamda enzim ile kuvvetli veya kompleks bağlanmalar yapabilecek bişenler bulunmamalı ve saflaştırma için kullanılan ortamın enzimden kolay ayrılabilir özellikte olmasına dikkat edilmelidir [34]. Saflaştırma yöntemleri [48];

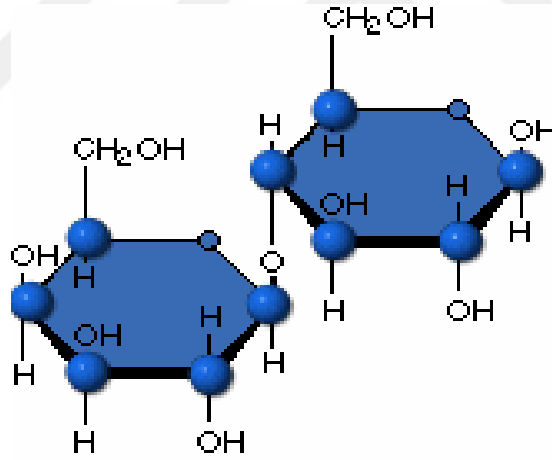
- Adsorpsiyon kromatografisi:
Biyokimyasal maddelerin Van der Waals kuvvetleri veya sterik/moleküler ile kolon dolgu maddesi arasındaki etkileşimleri sonucu alıkonulması ile ayrıştırılmasına dayanır.
- İyon değıştirici kromatografi:
İyon yüklü moleküller ile kovalent olarak bağlanmış olan zıt yüklü moleküllerin iki faz arasında ayrışması prensibine dayanan saflaştırma tekniğidir.
- Jel filtrasyonu:

Belirli gözenekli yapıya sahip jel kullanılarak hazırlanan düzenekte, kolon dolgu maddesinin gözenelerine girebilen moleküller, seçimli olarak diğerlerinden daha uzun süre kolonda alıkonurken daha büyük moleküller daha erken uzaklaşır.

Saflaştırmada az ürün eldesi ve ekstra prosesler gerektirmesi nedeniyle fazla zaman harcanması gibi problemlerle de karşılaşabilmektedir [24].

1.3. Laktoz

Süt şekeri olarak bilinen doğada yalnızca memeli canlılar tarafından sentezlenen sütte bulunan karbonhidrattır. 6 karbonlu monosakkaritler olan glukoz ve galaktozun β -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşmuş 12 karbonlu bir disakkarittir [12]. Anne sütünde %7, inek sütünde ise yaklaşık %4,7-4,8 oranında laktoz bulunur ve toplam kuru maddenin ortalama %37'sini oluşturur. Laktoz hidroskopik bir karbonhidrat olduğu için; koku ve aroma tutucu özellik gösterir[12, 58].



Şekil 1. 4: Laktoz molekülü [59].

Laktoz; karbonhidrat yapısı, galaktozun beyindeki glikolipitlerin sentezine katılması, bağırsakta kalsiyum ve fosfor emilimini artırması nedeniyle beslenmede büyük öneme sahiptir. Süt ve süt ürünleri doğal olarak laktoz içeren gıdalardandır. Laktoz, yapısal özellikleri nedeniyle ekmek, bisküvi, kek, gıda karışımları ve işlenmiş et ürünleri gibi süt ürünü olmayan gıdalarda da kullanılmaktadır [1,355]. Laktoz, yağ metabolizmasında rol almasıyla karacigerde yağ birikimini önleyerek vitaminin sentezlenmesini kolaylaştırır. Laktoz, antibiyotik üretiminde mikroorganizma

kültürlerine karbon kaynağı sağlayarak çeşitli kimyasalların hazırlanmasında ve ilaç sanayiinde kullanılmaktadır [58].

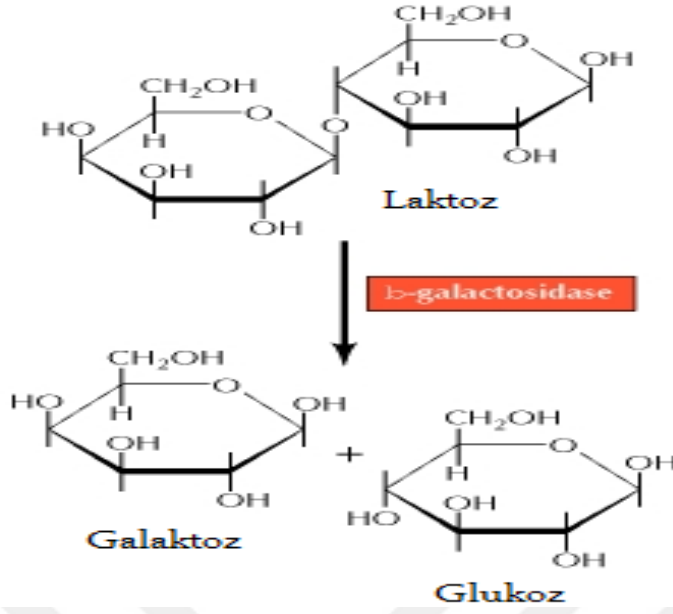
1.4.1. Laktoz Hidrolizi

Laktozun istenmediği durumlarda laktoz içermeyen yeni ürünlerin elde edilmesi için laktozun hidrolizi yapılmaktadır. Laktozun monomerleri olarak; Glikoz ve galaktoz kristalleşme eğilimi göstermeyen, kolay çözünebilen ve tatlandırıcı olarak kullanılabilen şekerlerdir [12]. Laktozun hidrolizi ile hem sindirilebilirliği kolaylaştırılır hemde laktozsuz yeni ürünler geliştirilebilir. Laktozun hidrolizi için iki yöntem kullanılmaktadır [12,58].

1. Asidik (Katalitik) hidroliz
2. Enzimatik hidroliz

Asidik laktoz hidroliz, kolaydır, pahalı enzimler kullanmayı gerektirmez. Bununla beraber yüksek sıcaklıklarda, düşük pH larda (150 °C/pH 1-2) ve çok hızlı gerçekleşir, istenmeyen ikincil reaksiyonlar gerçekleşebilir. Fakat yüksek ısı ve kimyasal kullanılması son ürünün besin değerinin düşmesine, koku ve aroma değişikliğine neden olur. Bu sebeple, reaksiyonun ürüne zarar vermeyecek koşullarda, daha az enerji ile gerçekleşmesi için asitle hidroliz yerine enzimatik hidroliz tercih edilir. Enzimatik hidrolizin dezavantajı ise enzim maliyetinin yüksek olmasıdır [58].

Enzimatik hidroliz canlı organizmalarda doğal olarak sentezlenebilen β -galaktoz ile gerçekleşmektedir. Laktoz hidrolizi insanda ince bağırsağın iç yüzeyinde salgılanan β -galaktozidaz enzimiyle veya bazı probiyotiklerce sağlanır. Endüstriyel uygulamalarda ise özellikle mikrobiyal kaynaklı β - galaktozidaz tercih edilmektedir [19,59].



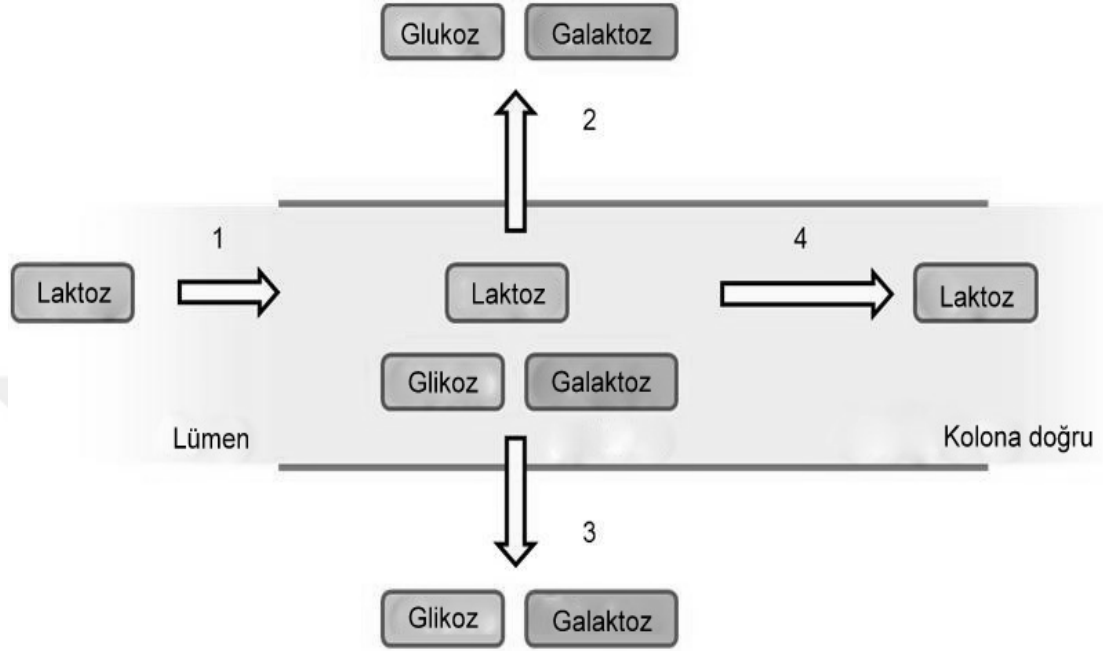
Şekil 1. 5: Laktozun enzimatik hidrolizi [59].

1.4.2. Laktoz İntoleransı

Laktoz, glikoz ve galaktozun glikozidik bağı ile bir araya gelmesiyle oluşan disakkarittir. Laktozun insan vücudunda sindirilebilmesi için ince bağırsakta β -galaktosidaz ile galaktoz ve glukozu hidrolize olması, ardından da kolondan aktif olarak absorbe edilmesi gerekmektedir. β -galaktosidaz (laktaz) enzimi, insanda ince bağırsak duvarında entorisitlerin fırçamsı kenarlarında ve ince bağırsağın jejunum bölgesinde bulunur. Glikoz ve galaktoz bağırsak lümeninden emilerek, galaktoz metabolize edilirken, glikoz; glikolize giderek vücutta enerji kaynağı olarak kullanılır. Bağırsakta β -galaktosidaz (laktaz) eksikliği durumunda laktoz parçalanamaz ve emilimi gerçekleşemez. Sindirilemeyen laktoz bağırsak kolonundabirikerek bakteriler tarafından kısa zincirli yağ asitleri, su ve gaz (CO_2 , H_2) oluşturacak şekilde parçalanır ve bağırsak duvarı boyunca ozmotik basınç oluşturur. Bu durum karın ağrısı, gaz, şişkinlik, ishal gibi rahatsızlıklara neden olur. Laktaz enzimi eksikliği nedeniyle yaşanan bu hastalığa 'Laktoz İntoleransı' denir [1, 19].

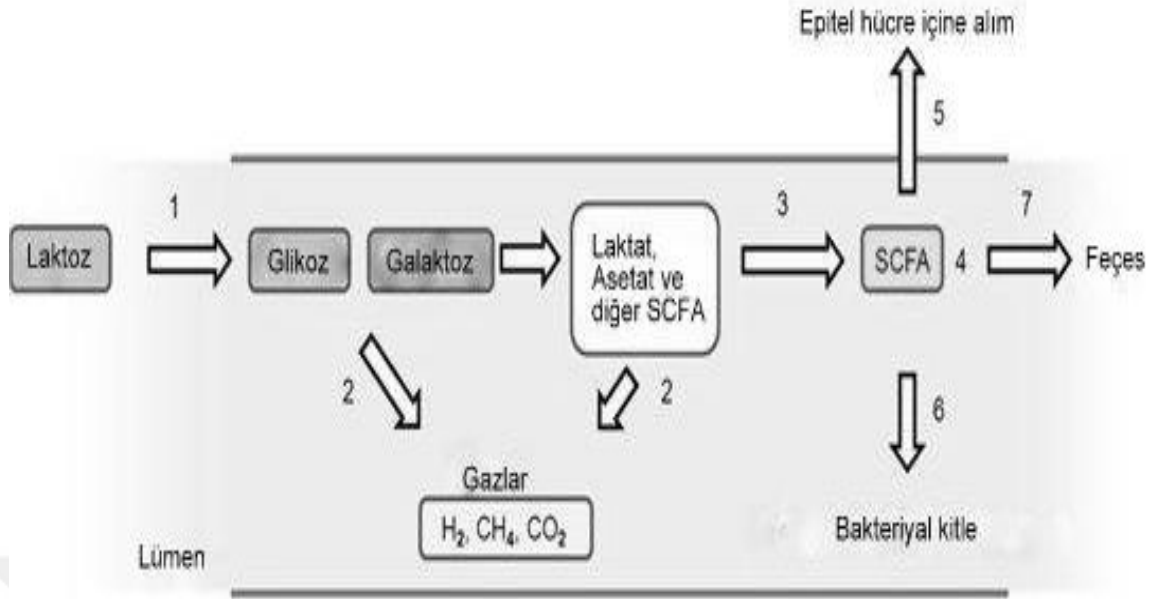
Laktozun sindirilememesi veya kısmen sindirilmesi; insanlarda doğuştan kalıtsal nedenlerle olabileceği gibi sonradan; enfeksiyon, beslenme alışkanlıkları ya da bağırsak mukozasında emilimin güçleştiği hastalık veya müdahaleler nedeniyle ortaya çıkabilir

[12]. Yapılan çalışmalar laktozun hidrolize olamamasının nedenlerini; genetik yapıya, beslenme alışkanlıklarına ve süt tüketimine eğilim olup olmaması ile bağlı olduğunu ortaya koymuştur [19].



Şekil 1. 6: İnce bağırsakta laktoz metabolizması; (1) Laktoz ince bağırsağa girer. (2) Laktoz konağa ait laktaz enzimi ile veya (3) probiyotikler tarafından değişikliğe uğratılır. (4) Fazla miktarda laktoz kolona geçer [19].

Laktozun, B-galaktozidaz salgılanması halinde hidrolizi ile açığa çıkan glikoz ile kan şekerinde yükselme gözlenir böylece laktoz tüketimi sonrası kan şekeri ölçümü veya b-galaktozun eksikliği halinde laktozun parçalanmayıp açığa çıkan H₂ gazının üfleme ile ölçümü yapılarak teşhis edilir.[19]



Şekil 1.7: Kolonik laktoz metabolizması; Laktoz kolona girer ve mikrobiyota tarafından glikoz ve galaktoza fermente edilir. (2) Örneğin, hidrojen, metan ve karbondioksit gibi gazlar oluşturulmuştur. (3,4) Aynı zamanda laktat oluşturulmuş ve kısa zincirli yağ asitlerine (SCFA) dönüştürülmüştür, (5) ayrıca bu aşamada gazlar da oluşturulmaktadır. SCFA epitelyum hücreleri tarafından içeri alınabilir veya mikrobiota tarafından kullanılabilir ya da dışkı ile atılır [19].

Laktoz intolerans rahatsızlığı bulunan kişiler laktoz disakkaritini içeren süt ve süt ürünlerini tüketmekten kaçınmalıdırlar. Dünya nüfusunun %70'inde birincil laktaz eksikliği görüldüğü ve yaklaşık %50'sinin laktoz intoleransın neden olduğu sağlık sorunlarını yaşadıkları bildirilmektedir [1]. Laktoz intolerans olarak nitelenen kişilerin oranı Amerika ve Afrika zencileri arasında %70, Asya'da ise %95'dir. Yetersiz beslenen insanlarda, süt içme alışkanlığı olmayan toplumlarda daha sık görülmektedir. [19]. Laktoz intoleransına çözüm olarak, bu kişilerin laktozsuz ürünleri tüketmeleri, dışardan laktaz enzimini hazır olarak alınması veya beta galaktozidaz üreten probiyotiklerle takviye edilerek laktozun sindirilmesi sağlanmalıdır [19].

1.5. α -Galaktozidaz ve β -Galaktozidaz

Galaktozidazlar, galaktoz ve bundan farklı bir diğer şeker molekülü arasındaki glikozidik bağı hidrolize eden enzimlerdir. Galaktozidazlar, glikoprotein ve

glikolipidlerdeki karbonhidrat yapısı üzerine etki eden ekzoglikozidazların bir çeşididir. Glikozidik bağın α - veya β - çeşidine etki etmelerine göre α - ve β - galaktozidazlar olarak iki gruptan oluşurlar [12].

1. α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, melibiyaz);

α -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaridlerin indirgen olmayan uçlarına α -(1 \rightarrow 6) bağı ile bağlı, α -D-galaktozil gruplarını katalizleyen ekzoglikozidazdır. Şeker pancarının melasındaki rafinozu hidrolize ederek kristalize şeker verimini arttırmak amacıyla kullanılırlar [12]. α -Galaktozidazlar biyoteknoloji ve tıpta kullanımı yaygın olup, endüstriyel alanda; şeker pancarından şeker üretimi, kâğıt hamurunun işlenmesi, soya ürünlerinin ve hayvan yemi üretiminde kullanılmaktadır [12].

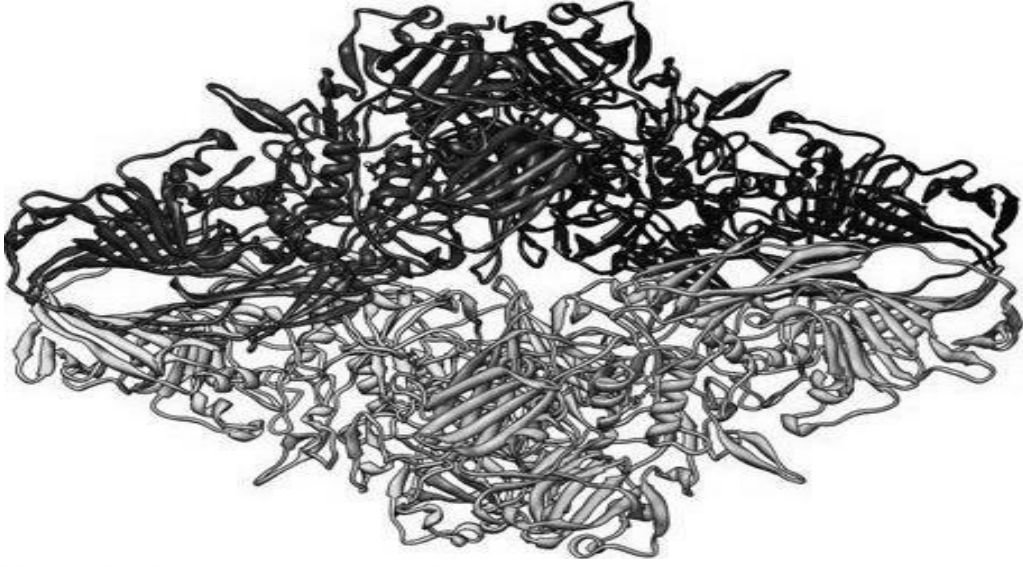
2. β -galaktozidaz (EC 3.2.1.23) (β -D-galaktozid galaktohidrolaz, laktaz, β -laktozidaz);

β -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebilen glikozidazlardır. Galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösterirler [12].

1.5.1. B- Galaktozidaz (EC 3.2.1.23)

β -Galaktozidaz; birden fazla karbonhidrat arasında veya bir karbonhidrat ile başka bir bileşik arasındaki glikozidik bağlarını kıran hidrolaz grubu (EC 3.2.1 - 3.2.3) enzimlerin bir üyesidir [19].

Araştırmacılar β -galaktozidaz ile hidroliz edildiğinde renkli bir ürüne dönüşen bileşiklerin absorblanmasına dayanan belirleyici yöntemlerle, belirli substrat konsantrasyonunun da galaktoz ve galaktooligosakkaritler (ONPG) lerin oluşumunda enzimin aktivitesini ölçen çalışmalar yapmışlardır [25].

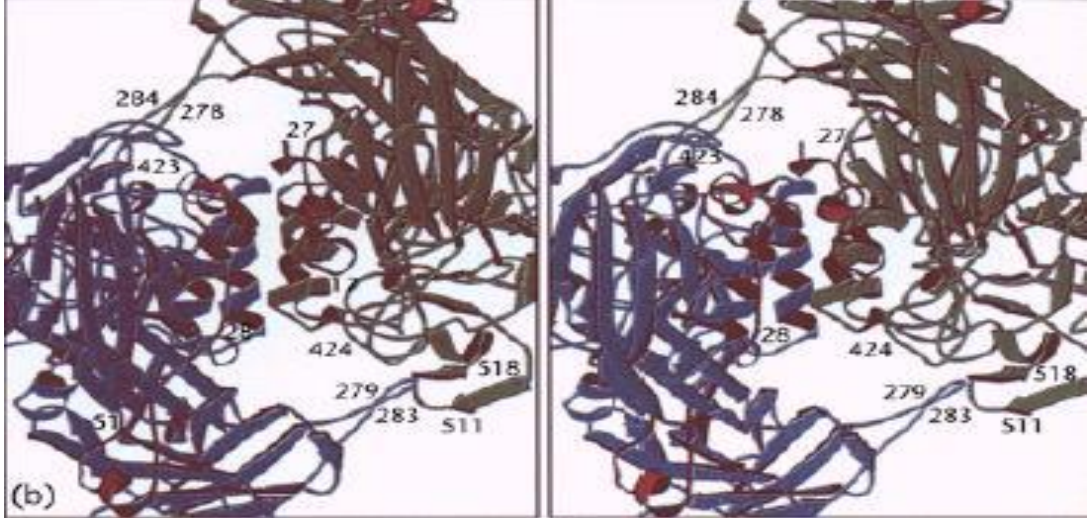


Şekil 1.8: *E. coli* bakterisine ait β -galaktozidaz enziminin üç boyutlu yapısı [19].

1.5.2. β - Galaktozidazın Genel Özellikleri

β -galaktozidaz, laktozdaki β -glikozidik bağı hidrolize ederek, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü daha fazla olan glukoz ve galaktozun oluşmasını sağlayan enzimdir. Hidrolitik bir enzim olduğundan suda çözünür [12]. 2,5 Å çözünürlükte kristal yapıda ve çift sarmal olarak görülür [59].

β -galaktosidazın görevi, bir disakkarit olan laktozu onun monosakkarit bileşenleri olan glukoz ve galaktoza hidroliz etmektir [12]. β -galaktozidaz dört eşdeğer alt birimden oluşmaktadır. β -galaktozidazın her alt birimi, yaklaşık 1021-1170 amino asit içerir. Molekül ağırlıkları yaklaşık 120-135 kDa dır. Bu enzim rengi sarıdan açık kahverengiye doğru tonlarda olan viskoz bir sıvı şeklinde bulunur. Yapısında kurşun, arsenik, civa, kadmiyum gibi birçok metal iyonu bulundurduğundan metalo enzim niteliğindedir [12, 19]. β -galaktozidaz'ın maksimum aktivite gösterebilmesi özellikle Mg^{+2} ve Na^{+} iyonlarının varlığına bağlıdır. Aktif merkezde bir Mg iyonunun ve enzimin kristal formlarında Mg^{+2} bağlanma bölgelerinin olduğu belirlenmiştir [48]. Ca^{+2} iyonu ise β -Galactosidaz enzimini inhibe edici aktivite gösterir, fakat sütün bileşiminde kazeine bağlı halde bulunduğu için enzim aktivitesini inhibe etmez [59].



Şekil 1. 9: β -Galaktozidaz molekülünün çift sarmal yapıdaki görünümü [59].

1.5.3. β – Galaktozidaz Kaynakları

β -Galaktozidaz genel olarak bitkiler, hayvan doku ve organları, mayalar, mantar ve bakteri kaynaklarından izole edilebilmektedirler. Her enzim elde edildiği kaynağa göre çeşitli farklılıklar gösterebilmektedir [12].

β -galaktozidaz; bitkilerde; şeftali, kayısı, badem, yaban gülü, kahvede bulunurken, hayvansal organizmalarda; beyin, ince bağırsak ve deri dokusunda bulunur. Mantar türlerinden, *Neurospora crassa*, , *Alternaria palmi*, *Asperigillus foetidus*, *Asperigillus niger*, *Mucur mieheri*, *Mucur pucillus* *Curvularia inoegualis*, *Fusorium moniliforme*, *Asperigillus flovus*, *Asperigillus oryzae*, *Alternaria alternara*, *Asperigillus phoenicis* çeşitli β -galaktozidaz kaynaklarındandır. Mayalardan; *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida pseudotropical*, *Brettanomyces anomolus*, *Wingea robersii* ve bakterilerden ; *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium*, *Thermus aquaticis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helvenous*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sporogenes* *Bacillus circulans*, *Bacillus steorotherphilus*'de çeşitli β -galaktozidaz kaynaklarındandır [12].

Endüstride kullanılan β -galaktozidazlar genellikle *S. lactis*, *S. fragilis* gibi mayalardan ve *A. niger* gibi küflerden üretilir. β - galaktozidaz eğer gıda sektöründe uygulanacaksa bu kaynaklarından tümünden kullanılamaz. Gıdaya uygun ve güvenilir GRAS

statüsünde olan kaynaklar tercih edilmelidir. *A. niger*, *A. oryzae* ve *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragilis* daha önce çok kez test edilmiş ve bu alanda kullanımı ile güvenli olarak belirlenmişlerdir. En yaygın olarak tanımlanmış ve en iyi karakterize edilen galaktozidaz kaynağı *E.coli* olmasına rağmen; yüksek maliyeti ve koliform ekstraktlarının sebep olduğu toksisite sorunları sebebiyle gıda sektöründe kullanımı bulunmamaktadır. β -galaktozidazlar termofil mikroorganizmalarda en çok çalışılan enzimlerdendir. Son dönemde β -galaktozidazlar, *B. stereothermophilis*, *B. bifidum* ve *B. infantis* bakterilerinden de saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir [12, 19].

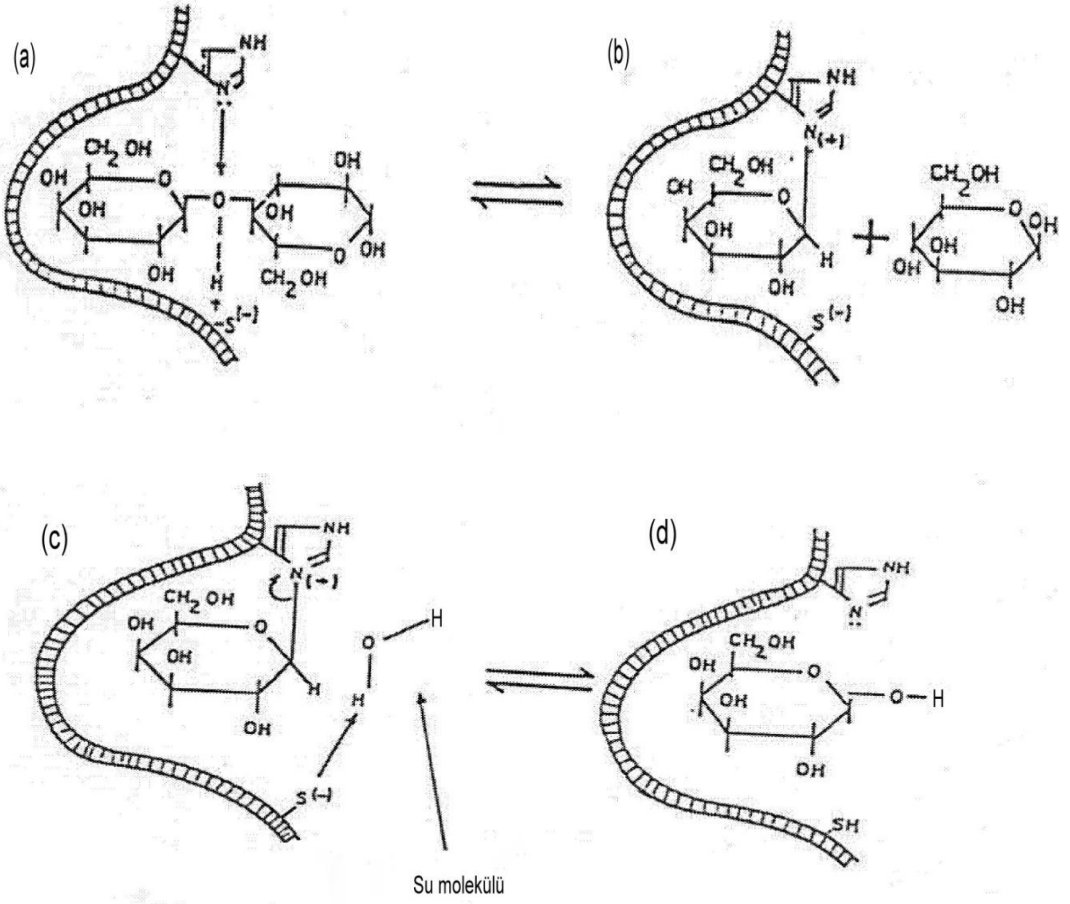
β -Galaktozidaz üreten termofiller 37 °C' de çoğalamadığından patojenik özellik göstermemekte ve geniş uygulama alanı bulmaktadır. Termofil mikroorganizmalar 60°C ve üstündeki yüksek sıcaklıklarda dahi uzun süre aktivitelerini koruyabilen termostabil enzimler üretebildiklerinden; reaksiyonları hızlı katalize ederler ve kontaminasyon riskleri düşüktür. Ayrıca β -Galaktozidaz sentezi için substrat olarak en çok peynir altı suyu ve şeker kamışı küspesinden yararlanılmaktadır [12,7].

1.5.4. β - Galaktozidaz Etki Mekanizması

β -galaktozidazın etkin olduğu reaksiyonlardan ilki laktozun enzimatik hidrolizidir. β -galaktozidazların yapısal olarak sahip olduğu Glu482 ve Glu551 glutamik asit kalıntıları proton verici ve nükleofilik baz olarak aynı zamanda etki eder. Laktoz substratı reaksiyonunda [12, 19].

1. Transfer suya olursa enzim-galaktozil kompleksi oluşur ve glikozid bağının kopması ile glukoz ve galaktoz ayrılır.
2. Enzim-galaktozil kompleksi, hidroksil grubu içeren bir alıcıya transfer edilirse daha büyük galaktooligosakkarit molekülleri (GOS'ler) oluşmaktadır. Laktoz çözeltisi seyreltik halde olduğunda, su veya glukoz gibi şekerler, alıcı molekül (R-OH) olarak reaksiyona girer ve son ürün oluştururlar.

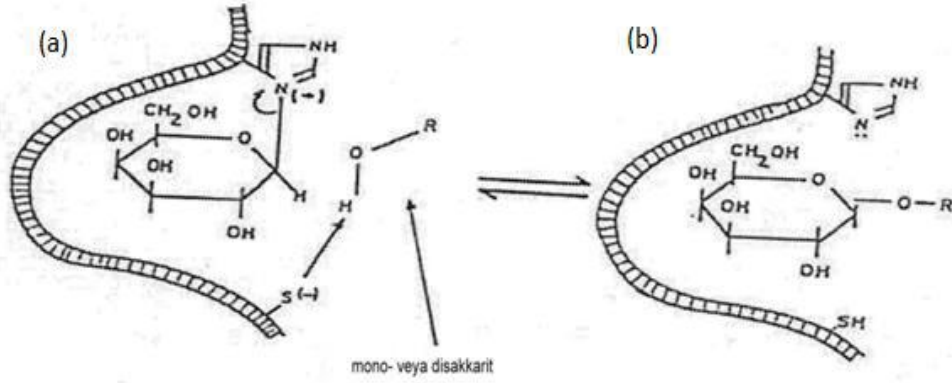
Laktoz derişiminin yüksek olduğunda, transgalaktosidasyon reaksiyonu gerçekleşir. Bu reaksiyonda, laktoz molekülü alıcı özellik göstereceğinden, glukoz ve galaktozdan disakkarit ve trisakkaritler oluşacaktır [12, 59].



Şekil 1. 10: Beta-Galaktozidaz tarafından laktozun hidrolizi [19];

- Beta galaktozidazın aktif bölgesinde laktoz
- Beta galaktozidaz kompleks + glikoz
- Beta galaktozidaz-galaktoz molekülü
- Beta galaktozidazın aktif bölgesinde galaktoz.

Laktoz konsantrasyonunun yüksek olup, sıcaklık ve su miktarının düşük olduğu raksiyonda, β -galaktozidaz, transgalaktozilasyon (geri dönüşüm) reaksiyonu ile bağırsakta probiyotik bakterilerin gelişmesini sağlayan galaktooligosakkaritlerin (GOS) oluşumunu katalizlemektedir[19].



Şekil 1. 11: Beta-Galaktozidaz tarafından katalizlenen galaktooligosakkarit oluşumu [19];

- Beta galaktozidaz-galaktoz molekülü
- Beta galaktozidazın aktif bölgesinde oligosakkarit.

Ortamda yüksek miktarda su bulunduğunda, hidrolitik yön daha baskın olur ve bundan dolayı GOS üretimi ve verimi düşük olur. GOS üretimini arttırmak için su içeriği azaltılmalı veya substrat (laktoz) konsantrasyonu artırılmalıdır. GOS'ler kimyasal veya enzimatik hidrolizle ya da sentezle mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler [19].

1.5.5. β – Galaktozidazın Endüstrisinde Uygulamaları

β -galaktozidazın bazı uygulama alanları;

- Sütün hidrolizi;

Laktik asit fermantasyonun gerçekleştiği yoğurt ve kefir gibi fermente süt ürünlerinde laktozun büyük bir kısmı laktik aside dönüşür ve az miktarda laktoz kalmaktadır. Peynirin olgunlaşması ve aromanın gelişmesi için peynir yapımı sırasında süte β -galaktozidaz aktivitesi olan kültür ilavesi ile sütün hidrolizi sağlanır. Laktozu hidrolizlenen süttten üretilen peynir, normal süttten yapılan peynirden daha hızlı olgunlaşır [12].

- Laktozsuz süt ürünlerinin eldesi;

Laktoz intolerans rahatsızlığı bulunan kişilerin de süt ve süt ürünlerini tüketebilmeleri için laktozu azaltılmış veya laktozsuz süt ve laktozu azaltılmış yoğurt gibi ürünler ile besin takviyesi olarak β -galaktosidaz enzim tabletleri

üretilmektedir [1, 7]. β -galaktozidaz sıvı halde, kapsül veya enterik tablet halinde üretilerek laktoz intoleransı semptomlarının önlenerek süttten yararlanılması sağlanılmıştır [12].

c) Dondurma üretimi:

Laktoz kolay kristalize olan bir yapıya sahip olduğundan dondurma gibi süt kullanılan donmuş gıdalarda laktozun kristalleşmesini önlemek amacıyla β -galaktosidaz kullanılır [19].

d) Şekerleme üretiminde:

Tatlılık oranını arttırmak için laktoz, β -galaktosidaz enzimi ile tatlılık oranı daha fazla olan, glikoz ve galaktoza hidroliz edilmektedir [19].

e) İçecek sektöründe:

Fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde mayanın gelişmesi ve fermantasyon ürününün oluşması için β -galaktozidaz enziminden faydalanılmaktadır [19].

f) Fırıncılıkta:

Ekmek yapımında mayanın gelişmesi için ve yapılan bir araştırmada peynir altı suyunda mevcut laktoz hidrolize edilerek alternatif bir tatlandırıcı olarak ekmek formülasyonunda kullanılmış ve ekmeğin normal ekmekten daha iyi kalite parametrelerine sahip olduğu belirtilmiştir [16, 19].

g) Peynir altı suyunun hidrolizi:

β – Galaktozidazın peynir altı suyu ve ürünlerine uygulanması; daha tatlı şuruplar, alkollü içecekler ve hayvan yemi yapımında kullanılmaktadır. Peynir altı suyunda yüksek oranda bulunan laktoz, bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba ve şarküteri ürünlerinin üretiminde süt tozuna alternatif bir ürün olarak kullanılabilir [7, 12].

h) Hayvansal besin uygulamaları'dır.

1.6. Termofilik Mikroorganizmalar

Her organizmanın yaşamını sürdürebileceği optimum çevre koşulları ve optimum sıcaklık seviyeleri vardır. Mikroorganizmalar sıcaklığa olan toleranslarına göre psikrofil (optimum $T \leq 15^{\circ}\text{C}$), mezofil ($25-45^{\circ}\text{C}$) ve termofil (optimum $T \geq 45^{\circ}\text{C}$) olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup; $45-65^{\circ}\text{C}$ lerde yaşayanlar ılımlı termofiller, $65-85^{\circ}\text{C}$ civarında yaşayanlar

hipertermofiller ve 85 °C'den yukarıdaki sıcaklık derecelerinde yaşayabilenler ekstrem termofilik olarak ayrılırlar [7, 45]

Termofilik mikroorganizmalar ilk kez 1879 yılında, Miquel tarafından toprak, çöp, akarsu çamurları, drenaj ve kirlerde, 72 °C 'de çoğalabilen bakteriler olarak tespit edilmiş, 1982 yılında da Stetter tarafından sıcak su kaynaklarından izole edilebileceği ortaya konulmuştur [7, 13].



Tablo 1. 1: Prokaryotlardaki balıca metabolik grupların maksimum büyüme sıcaklıkları [45].

Organizma	Tmax (0C)
Bakteriler	
Actinomisetler	
Fotosentetik	
Oksijenik Siyanobakteriler	73
Anoksijenik yeil bakteriler	70
Aerobik	
Kemolitotrofik	
*Hidrojen Okside Edenler	80
*Kükürt Okside Edenler	80
*Azot Okside Edenler	<60
*Demir Okside Edenler	55
Heterotrofik	85
Anaerobik	
Nitrat Redükleyici	80
Denitrifiye Edici	80
Sülfat Redükleyici	85
Demir Redükleyici	100
Fermente Edici	
*Clostridia	80
*Thermotoga	90
Arkealar	
Halofilik	55
Metanojenik	97
Kükürt Metabolize Edenler	
Aerobik	
*Kemolitotrofikler	96
*Heterotrofikler	90
Anaerobik	
*Kemolitotrofikler	113-121
*Heterotrofikler	105

Termofillerin bu sıcaklıklarda yaşamlarını sürdürebilmelerinin nedeni hücre membranlarının doymuş yağ asitlerinden oluşan yapısından kaynaklanmaktadır. Bu yağ asitlerinin oluşturduğu hidrofobik ortam hücreyi sıkı ve sert tutarak mikroorganizmanın yüksek sıcaklıkta yaşamasını sağlar. Termofiller elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimler sayesinde yüksek sıcaklıklara adapte olabilirler. DNA'larında pozitif sarmallar oluşturan ve DNA'nın geri dönüşümü sağlayarak erime noktasını

organizmanın optimum gelişme sıcaklığına çıkararak DNA giraz bulundurlar [13]. Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve hücre bileşenleri ekstrem derecede asidik ve alkali şartlar gibi denatüre edici ortamlara ve deproteolize dayanıklıdır. Termofilik organizmalar; ATP, GTP, NAD ve FAD gibi yüksek sıcaklıklarda denatüre olan molekülleri kullanacakları zaman üretirler [7,13].

Mikroorganizmaların sıcaklık dayanımları protein dizilerine bağlı farklılık gösterir. Termofil proteinlerinde, zayıf iyon çiftlerinin, ekstrem termofil proteinlerinde ise güçlü iyon çiftlerinin sayılarının yüksek olduğu tespit edilmiştir [15].

Ekstrem termofiller veya ekstremofiller; yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30), düşük sıcaklıklarda, yüksek basınçta, yüksek pH değerlerinde yaşayabilen mikroorganizmalardır [13, 15]. Protein termostabilitesi, fiziksel ve kimyasal koşullar altında, 3 boyutlu yapının korunabilmesiyle ve yüklü ve nötral yan zincirler arasında oluşan hidrojen bağlarının miktarıyla alakalıdır. Tuz köprüleri ve yan zincir- yan zincir hidrojen bağları, termofil proteinlerinde fazladır. Termofil proteinlerde α - heliks, ekstrem termofillerde ise proteinlerin β yapısı daha yüksektir [15].

Ekstrem termofil proteinlerinin yüksek termostabilitesinde rol alan fizikokimyasal faktörler [15];

- Hidrojen bağlarının artışı
- Hidrofobik iç paketlerin artışı
- Sekonder yapı oluşumunda artış
- Heliks dipol stabilizasyonu
- Gömülü hidrofobik alan artışı
- Elektrostatik etkileşimlerin düzeltilmesi
- Tuz köprülerinin optimizasyonu
- Van der Waals etkileşimlerinin artışı
- Kalsiyuma olan ilginin artışı
- Yer değiştirmeye entalpinin düzenlenmesi
- Sekonder yapıların stabilitesinin artırılması
- Heliks yapının ve polar dış yüzey alanının artması

- İlmiklerde prolinlerin artışı ve glisin azalması
- Daha kısa ilmikler
- Disülfid çapraz bağ ilavesi
- İç boşlukların azalması
- Aromatik etkileşimlerdeki artış
- Sekonder yapıların içerisindeki ve dışarısındaki aminoasitlerin yer değiştirmesidir.

Mikroorganizmaların hücresel yapılarının yüksek sıcaklığa toleransı, stabilitesi ve ekstrem şartlara dayanıklı enzimler sentezlemeleri, termofilik bakterilerin farklı biyoteknolojik uygulamalarda yaygın kullanımına neden olmuştur [7, 26].

Termofilik bakterilerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu dünya üzerindeki birçok jeotermal sıcak su kaynaklarından yapılmaktadır [26]. Doğal jeotermal alanlar yeryüzünde tektonik aktivitenin olduğu tüm alanlara dağılmıştır, ancak genellikle belirli bölgelerde yoğunlaşmıştır. En çok çalışılan jeotermal alanlar Batı Amerika, Orta Afrika, Yeni Zelanda, Endonezya, Kuzey Amerika'da (Yellowstone National Park), Japonya, İtalya ve Rusya'da bulunmaktadır. Türkiye ise jeotermal kaynaklar bakımından sıcaklığı 40 °C'nin üzerinde olan 133 adet sıcak su kaynağı ile birlikte dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer alır [7, 45].

1.6.1. Ekstrem Koşullarda Gelişen Mikroorganizmalardan Elde Edilen Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik mikro organizmalardan elde edilen enzimler, termostabilite, organik çözücülere, ekstrem pH koşullarına karşı dayanım gösterdikleri için özellikle endüstriyel uygulamalarda tercih edilmektedirler [15, 39].

Termofil mikroorganizmaların bir kısmı yavaş gelişmeleri ve genellikle patojen olmamaları nedeni ile güvenilir olmama riski taşıdığı için bunlardan enzim üretimi her zaman tercih edilmemektedir. Bu nedenle termofil mikroorganizmalardan elde edilen termofilik genler, büyüme koşulları daha ılımlı ve daha güvenli olan mezofil mikroorganizmalara rekombinant teknikler kullanarak klonlanmaktadır. Böylece mezofil mikroorganizmaların ekstrem şartlarda inkübasyonu ve bunlardan elde edilen

stabil ürünlerin kullanımı mümkün olmaktadır [15, 33, 39]. Ekstremofilik mikroorganizmaların yüksek volkanik sıcaklıklarda, kutupların düşük sıcaklıklarında çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) gelişmeye adapte oldukları bilinmektedir [7].

Enzimlerin kullanıldığı proseslerin birçoğu genelde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği için enzimlerin yüksek sıcaklıklara dayanımı özellikler tercih edilmektedir. Bu amaçla özellikle termostabil mikroorganizmalardan enzim karakterizasyonu ve izolasyonu ile ilgili çalışmalar ivme kazanmış ve ticari kullanımda yaygınlaşmıştır. Büyük molekül yapıya sahip bileşiklerin çözüne bilmesi için genellikle proseslerde yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tür yüksek sıcaklık uygulamaları kontaminasyon riskini azalması nedeniyle de biyoteknolojide ve endüstride termofilik organizmaların kullanımını arttırmıştır [7]. Protein termostabilitesi yüksek olan ekstremozimler; deterjan üretimi, gıda ve nişasta işlenmesi, yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi ve PCR uygulamaları gibi bir çok alanda rahatça kullanılabilir [15].

Termostabil proteinler denatüre edici ekstrem şartlara karşı yüksek direnç gösterirler. mezofilik proteinlerden daha yüksek α heliks ve β tabakasına sahip olup, proteinleri çok yavaş katlanma yaparlar [7]. Ekstrem şartlarda inkübe olan mikroorganizmaların veya enzimlerin keşfiyle, kimyasal süreçten, biyoteknolojik sürece geçilmiş; proseslerin hem maliyet hem de çevre açısından kolay ilerleyebilmesi mümkün hale gelmiştir [4].

Termostabil enzim uygulamalarında, sıcaklık artışıyla, viskozite düşer ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısı artar. Böylece küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilebilmektedir. Bu da yüksek biomass veya ürün üretilen aerobik prosesler için bir avantaj iken anaerobik prosesler de havalandırma için daha yüksek enerji ihtiyaçları gerektireceğinden bir dezavantajdır [7, 45].

Enzimlerin Stabilitesini Etkileyen Faktörler [45]:

- Tersiyer Yapı
- Hidrojen Bağları
- Hidrofobik Bağlar

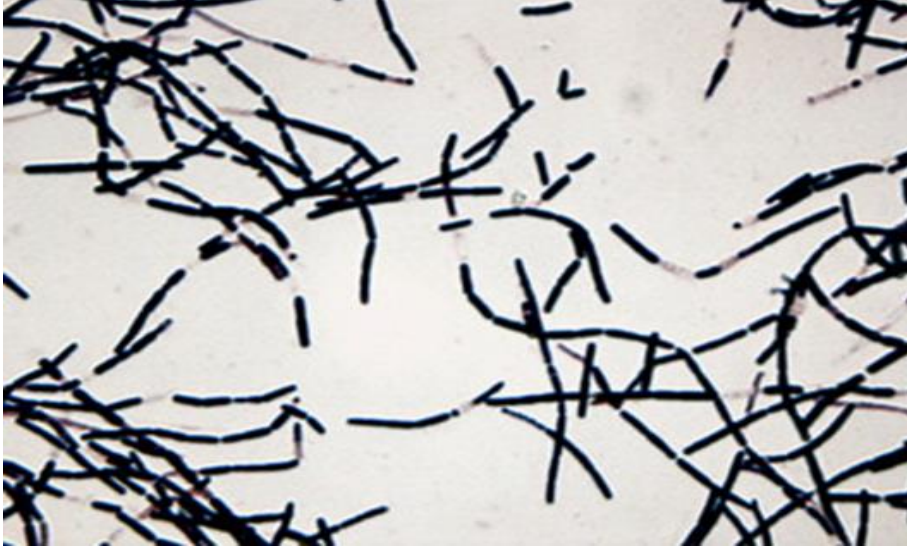
- İyonik interaksiyonlar
- Metallerin bağlanması (Metaller genellikle yüksek sıcaklıklarda proteinleri stabilize eder)
- Disülfid Köprüleri

Galaktozidaz, amilaz, pullulanaz, selüloz, kitinaz, ksilinaz ve pektinaz özellikle biyoteknolojik açıdan öneme sahip termostabil enzimlerdir. Yüksek sıcaklıkta denatüre olmadan aktivite gösterebilen β -galaktozidaz pastörize düşük laktozlu süt üretiminde kullanılabilir [7, 45].

Ege Bölgesi'ndeki sıcaklıkları 55-95 °C ve pH değerleri 6,0-9,5 arasında değişen 6 ildeki 11 sıcak su kaynağından izole edilen 69 bakteri suşundan çeşitli analizlerle tanımlanan bazı *Thermus* suşlarının β -galaktosidaz aktivitelerini incelemiştir. Sonuçta en yüksek enzim aktivitesi 70 °C' de 81082 Unit/g kuru hücre ve en düşük enzim aktivitesi *Thermus oshimai* Ege TB 9 suşlarında 1128 Unit/g kuru hücre olduğu belirlenmiştir [45].

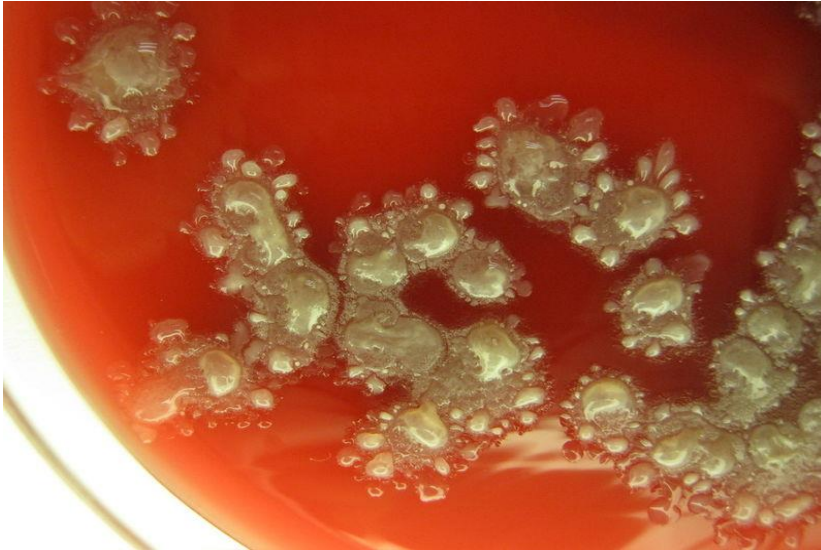
1.7. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacillus adı, ilk kez 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından kullanılmıştır. Bacilluslar *Bacillaceae* familyasındadırlar. Genellikle gram pozitif, aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde ve flagellalıları hareketli olan bakterilerdir. Vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya künt biten, 0,5-1,2 μ m eninde 2,5-10 μ m boyunda, tek veya uzun zincirler şeklinde görülen basillerdir [61].



Şekil 1. 12: *Bacillus* 'ların vejetatif formu [61].

Mezofilik, psikrotrof ve termofilik suşları mevcuttur. Çeşitli morfolojilerde koloniler oluşturabilirler [31, 31]. Katalaz pozitif olup hidrolitik enzim senteslerler. Katı agarda inkübasyonlarında tüm yüzeye yayılarak koloni oluştururlar üzerinde üredikleri ve koloni oluşturduklarında bir bütün halinde agar yüzeyinde yayılırlar [10]. Bazı *Bacillus* türleri (*B. anthracis*, *B.subtilis*, *B.licheniformis* ve *B.megaterium*; polipeptit kapsül) polipeptit veya karbonhidrat kapsüller oluştururlar [10].



Şekil 1. 13: *Bacillus licheniformis*'in 24 saat inkübasyonu sonrası koloni görünümü [60].

Bacilluslar endospor oluştururlar. Sporları vejetatif hücreden daha dar veya geniş de olabilir. Bacillus türlerinin tamamı ısıya dayanıklı spor oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Sporları silindirik, elipsoidal veya oval olabilir. Sporları santral (ortada) veya subterminal (kenara yakın) olarak bulunabilirler [10, 32].



Şekil 1. 14: endospor oluşturmuş *Bacillus Subtilis* [62].

Bacillus türü bakteriler bazı kaynaklarda iki gruba ayrılarak incelenmektedir. Buna göre [31];

1. Grup: Gram pozitif, sporları elips veya silindirik Őekilli ve uç uca eklenmeli biçimde olup kendi içinde sporlarını oluşturdukları bölümlerin büyüklüğüne göre iki alt grup olarak incelenir;
 - A. Hücre genişliği 1 μm 'den küçük olanlar (*B. cereus*, *B. Megaterium*).
 - B. Hücre genişliği 1 μm 'den büyük olanlar (*B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. Coagulans*).
2. Grup: Sporları elips, santral ve uç uca eklenmeli biçimde olup sporangiaları Őiřkindir (*B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. Brevis*).

Spor oluşumunu etkileyen faktörler ise;

- Besin yetersizliği

- Aşırı yüksek ya da aşırı düşük sıcaklıklar
- Mineral madde, tuz ve şeker gibi hipertonic ortam koşullarıdır [22].

Bacillus türlerinin tamamı Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde kolayca gelişebilirler. Besin bileşiminde organik asit, şeker; karbon kaynağı olarak yer alırken ve nitrojen kaynağı olarak kaynağı olarak da amonyum içeren ortamlar gelişimleri için uygundur [31]. Besi ortamında karbon, azot ve fosfor kaynağı olmadığında *Bacillus* türlerinin büyüyen hücreleri sporlaşırlar. *Bacillus* sporları hareketsiz halde olup ısı, UV radyasyon, kurutma, ekstrem pH koşulları ve toksik kimyasallara karşı dayanıklılık gösterirler. Ayrıca dayanıklılıkları sayesinde ilave bir işlem gerektirmeksizin yüksek asitli mide ortamında ve safra tuzları varlığında canlılıklarını sürdürebilirler; bu sayede probiyotik olarak değerlendirilmektedirler [22]. *Bacillus*ların UV ortam ve düşük basınç gibi ekstrem koşullara dirençli olduğundan uzayda yaşama ilgili deneme çalışmalarında da kullanılmalarına olanak sağlamıştır [3].

Bacillus cinsi mikroorganizmalar çeşitli substratları katalize eden birçok hidrolitik enzim üretmektedirler. Endüstriyel uygulamalar için yaygın olarak α -amilaz, proteaz, glukonaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz enzimlerinin üretiminde bu mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır [28].

Hidrolitik enzimler sentezleyen bazı *Bacilluslar*, bazıları aerobik ortamda proteinleri ve karbonhidratları parçalayarak kokuşmaya sebep olurlar. Bir *Bacillus* türü olan *B.cereus* kontamine olduğu gıdanın tüketimi ile gıda kaynaklı intoksikasyonlara ve gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir [10]. Ayrıca *Bacillus* sporları şekeri fermente ederek gaz oluşmaksızın asit üretebilir ve proteinleri parçalayarak kokuşmaya neden olacak amonyak oluşmasına neden olabilirler [31].

Bacillus türlerinin bir kısmı sütün doğal mikroflorasını oluştururlar. Doğal kaynak olarak çiğ süttten izole edilebilen *B. licheniformis* ve *B. cereus* türlerine ait sporların sadece bir kısmı pastörizasyon sıcaklığında zarar görse de sterilizasyon ve UHT işlemlerinde yaşamlarını sürdüremezler. Ayrıca vejetatif formlarının ürettiği ekstraselüler enzimler sütte üretim kayıplarına neden olur [31].

Genellikle glikoz, maltoz ve sükrözü, nadiren de olsa laktozu da fermente edebilme kabiliyetine sahiptirler. Glikoz fermentasyonunun son ürünleri çok çeşitlidir. Glikozu fermente ettiklerinde bazı türleri laktik asit; *B.subtilis*, *B.licheniformis* ve *B.cereus* 2,3butandiol ve gliserol; *B.polymyxa* 2,3-butandiol, ehnol ve hidrojen; *B. macerans* ehnol, aseton, aseük ve formik asit oluşturur [10].

1.7.1. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Endüstriyel Uygulamaları

Bacillus cinsi bakteriler ekstrasellüler enzim üretebilmeleri, çoğunlukla patojen olmamaları, hücre dışına enzim salınımı yapabilmeleri, diğer kaynaklara kıyasla daha az yan ürün oluşturmaları, daha düşük maliyetli ve genetik mutasyonlara yatkınlık göstermelerinden dolayı endüstriyel enzim uygulamalarında en sık tercih edilen mikroorganizma grubunu oluştururlar. Özellikle *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B.licheniformis* ve *B. Amyloliuefaciens*'in enzim kaynağı olarak en iyi suşlar olarak belirlenmiştir [6].

B. subtilis, *B. amyloliquefaciens*, *B. caldolytcus* *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* var. *Amylosacchariticus* kaynaklı amilaz enzimi; fırıncılık, tekstil ve kağıt endüstrisinde, nisastanın sıvılaştırılmasında, glikoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretimi, alkol fermentasyonu uygulamalarında kullanılmaktadır [7].

Bacillus licheniformis ve *B. Suptilis*'dan elde edilen Ksilanaz; gıda, yem, kâğıt sanayi ve atık arıtıma proseslerinde kullanılmaktadır. Bu kaynaklardan elde edilen ksilanazın kâğıt endüstrisinde uygulaması agartma işlemi için klor kullanımını sınırlandırmıştır [7].

Bacillus sphaericus'dan fermentasyon ile üretilen biotin ve *Bacillus mocerens*'dan amilazın katalizlediği reaksiyon ile üretilen eyelodextrln kozmetik sanayiide kullanılmaktadır [11].

Bacillus türlerinin metabolik olarak bakteriyosinler, K2 vitamini, enzimler ve bazı peptit grupları gibi çeşitli antimikrobiyal bileşenler sentezlemeleri, bu mikroorganizmalara tıbbi önem kazandırmıştır. *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*,

Bacillus cereus, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus* türleri tıbbi destek elemanı olarak tercih edilmektedir.[22]

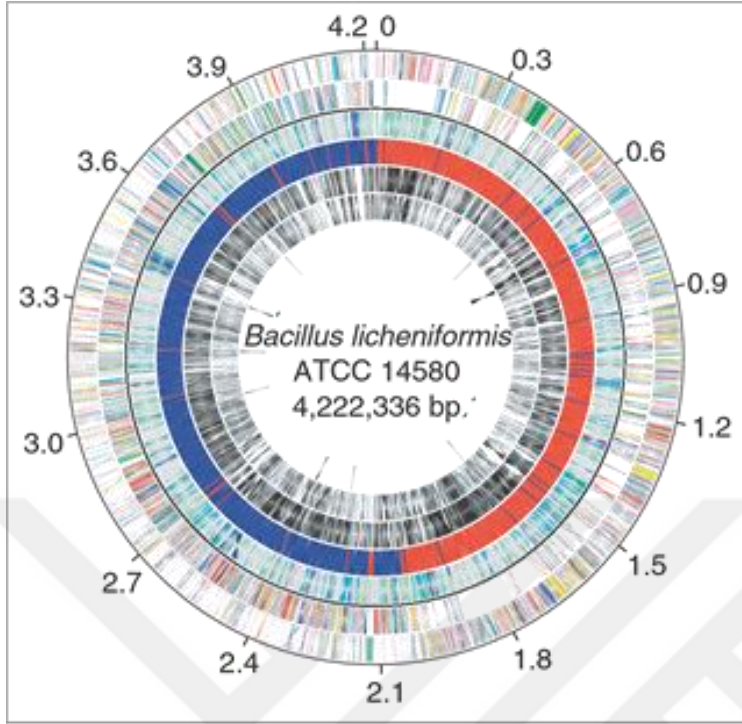
Bacillus sporları mide koşullarına dayanabildiklerinden, bu türlerden üretilen karotenoidlerin de sindirim sırasında midede parçalanmadan korunabileceği ve böylece bu türlere ait sporların gıda takviyesi olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür [22].

1960'lı yıllarda, *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen bir proteaz örneğinin alkali pH'larda kararlı ve aktif olduğu tespit edilip, Novo Industry A/S tarafından 'Alkalase' ticari ismiyle piyasaya sunulmuştur [24].

1.7.2. *Bacillus licheniformis*' in Genel Özellikleri

B.licheniformis; genellikle aerob *Bacillus* türlerinin birçoğundan farklı olarak fakültatif anaerobtur. Bu nedenle farklı ekolojik koşullarda gelişebilir. Endospor oluşturma yeteneği nedeni ile farklı çevre koşullarında da canlılığını sürdürebilmektedir. *B. licheniformis*'in maksimum büyüme sıcaklığı 55 C dir fakat ürettikleri enzimlerin (a-amilaz 90-95 C) termal aktiviteleri daha yüksek sıcaklıklarda da görülebilmektedir. *B. licheniformis* türleri çok yoğun ortamlarda, ortamın yüzey gerilimini düşürebilen yüzey aktif madde (likenisin) üretirler [17]. Bazı *B. licheniformis* izolatları denitrifikasyon yeteneğine sahiptir fakat bu türler genellikle toprakta endosporlar olarak bulunduğu için bu bağlamda etkinliği çokça gözlenmemektedir [36, 45].

Lapidus ve arkadaşları bir PCR yaklaşımı kullanarak *B. licheniformis* kromozomunun fizyolojik haritasını çıkarmışlardır [36]. Rey ve arkadaşları (2004) ise *B. licheniformis*'in, Gram-pozitif bakterileri içinde en çok *B. subtilis* ile taksonomik benzerliklerinden ilham alarak *B. Licheniformis* (ATCC 14580) suşunun tam nükleotid dizinini çözümleyerek, *B subtilis* ile yakın akrabalığını ortaya koymuştur. Genom dizilimlerinin açıklanması ile bu mikroorganizmanın endüstriyel ve mutant mikroorganizma olarak kullanılabilmesinin önünü açmıştır. Yapılan çalışma ile *Bacillus licheniformis* genomundaki 4,208 genin 689'unun SignalP modellemesi yöntemiyle peptid sinyallerine ulaşılmıştır. Bu peptidlerden en az 82'sinin salgılanan proteinleri ve enzimleri kodladığı varsayılmış ve *B. licheniformis* ATCC 14580 genomu tarafından kodlandığı tahmin edilen 27 hücre dışı protein varlığı da tespit edilmiştir.[36]



Şekil 1. 15: *B. licheniformis* ATCC 14580 kromozomunun dairesel temsili [36].

B. licheniformis ve sentezledikleri hücre dışı ürünlerin birçok sayıda ticari kullanım alanları vardır. Endüstriyel bir organizma olan *B. licheniformis* birkaç proteaz, α -amilaz, penisilazaz, pentosanaz, sikloglukosiltransferaz, β -mananaz ve birkaç pektinolitik enzimin üretilmesinde kullanılmaktadır. Belirli *B. licheniformis* suşları, sitrik asit, inozin, inosinik asit ve poli-glutamik asit gibi bir takım özel kimyasallara ek olarak, basitrasin ve protikin gibi peptid antibiyotikleri üretmek için de kullanılmaktadır [36].

B. licheniformis'ten elde edilen proteazlar; hem deterjan endüstrisinde, hem de deri endüstrisinde derideki kılların giderilmesi ve derinin katlanması için de kullanılmaktadır [2,3]. *B. licheniformis*'ten elde edilen amilazlar, nişastanın hidrolize edilmesi, tekstil kalıntılarının desizasyonu ve kâğıdın boyutlandırılması için kullanılmaktadır. Bazı *B. licheniformis* izolatları da fungal patojenlerin mısır, çimen ve sebze mahsulleri üzerindeki etkilerini hafifletebilmektedir [36].

1.8. Amaç

Çalışmamızın temeli β - Galaktozidazın termal kaynaklı olmasının ticari olarak daha geniş uygulama alanları sağlayabileceğinden, özellikle termofilik olarak üretilmesine dayanmaktadır. Bu sebeple, termal kaynaklardan elde edilen Termofilik *Bacillus Licheniformis* bakterisinden β -Galaktozidaz enzimin, *E.coli*'ye klonlanarak recombinant olarak üretilmesi ve saflaştırılması amaçlanmıştır.



2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Organizması

Tez çalışmamızda kullandığımız mikroorganizma Pasinler (Erzurum) termal kaynaklardan toplanan su ve çamur örneklerinden izole edilen *Bacillus licheniformis* MH101322' dir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan cihazlar

- **Otoklav** (Nüve- OT 40)
- **Etüv** (Nüve- FN 500)
- **Distile Su Cihazı** (Nüve ND 4L)
- **Santrifüj-1** (Hanil-smart15- micro centrifuge 1544-6906)
- **Santrifüj-2** (Nüve- NF 800R Bench-top centrifuge)
- **Hassas terazi** (Goold Vibra - RS232C)
- **Vortex** (Benchmark BV1000 vortex mixer)
- **Isıtmalı manyetik karıştırıcı** (VELP Scientifica Inc.)
- **Sıcak su banyosu** (Labo BMS 5200)
- **Spektrofotometre** (UVS-99 nanodrop spektrofotometre)
- **PCR cihazı** (BIOER GenePro ThermalnCyler TC-E-96G)
- **Jel elektrofezi** (Wealtec ELİTE 300 PLUS)
- **UV jel görüntüleme** (DNR Bio-imaging Systems MiniLumi S/N 9000332 Cat. no. 30-1-22)
- **pH metre** (HANNA-HI 2211 pH/Orp meter)
- **eppendorf pipetleri**
- **Bunzen Beki**
- **İğne öze**
- **Yayma çubuğu**
- **Tek kullanımlık petri kapları**

- **Cam malzemeler; erlen, beher, mezür, pipet**

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

- **QIAquick Gel Extraction Kit (50)** (Cat. No. 28704, lot No: 148039191)
- **QIAGEN plazmid kiti** (Plasmid Midi Kit - Katalog No. 12143)
- **Proteo Qwest kiti** (Sigma - LC6070)
- **pGEMTeasy vektörü** (1,2 µg pGEM-T Vektör (50ng/µL, 2µL Kontrol Insert DNA (4ng/µL, 100u T4 DNA Ligaz, 200µL 2X Rapid Ligasyon Solüsyonu, T4 DNA Ligaz (Promega)
- **pQE 40 vektörü** (SnapGene)

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Primer Setleri

- 27 Forverd (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA-3')
- 1385 Reverse (5'-CGGTGTGT[A/G]CAAGGCC-3')
- F- β-galaktozidaz (**GTCGAC**GCAAGCTTCGCTCCATATGCCA)
- R- β-galaktozidaz (**AAGCTT**GTGGTCGACAGATCTCTCGAGCTCTTTTG)

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- **TAE buffer (50X)** (Acetic acid glacial- EDTA Na₂ 2H₂O Lot :4L015872)
- **EDTA (0,5 M)**
- **Etanol (%96 'lık)**
- **Etidyum bromür [TE]** (10 mg/ml olarak hazırlandı Kod: 802511)
- **Phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture** (Sigma, Lot:BCBN8008V)
- **Gliserol** (MERC % 85'lik giserol, EC Number 200-289-5)
- **0,5 M NaCl**
- **%20 lik SDS** (Sodyum dodesil Sülfat)
- **Water** (Nucleas free Lot: 000675809)
- **Agarose RA** (AMRESCO, Lot: 1734C049)
- **SNP MgCl₂ 25mM** (Lot : 1307S12)

- **Sigma PCR Buffer 10x** (100 mM Tris HCl, pH:8,3 ; 500mM KCl, %0,01 gelatin, 15mM MgCl₂, lot: 055K6024)
- **SNP 10X BufferB** (25mM MgCl₂ 'li Lot: 1307S11)
- **Taq DNA Polymerase** (SNP, 500U, Lot:1401S5)
- **Taq Buf. + KCl-MgCL₂** (Lot : 00131426)
- **MgCl₂** (Biolab, Lot: 011306)
- **Bromophenolblue** (6x DNA loading Dye Lot:N00506)
- **SNP dNTP Mix** (10mM, Lot: 1405S1)
- **Plus DNA Leader** (Gene Ruler 100bp Plus, Lot: 00409355)
- **İzopropanol** (Sigma EC no: 200-661-7)

2.1.6. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

- **LB Broth (Miller):** 25 gr LB Broth (peptone from casein 10,0, Yeast Extract 5,0 g/L, Sodium Chloride 10,0 g/L) tartılıp 1 litre distile su (dH₂O) ile çözdürülerek, otoklav şişesinde, 121C^o de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.
- **LB Agar (Miller):** 10 gr LB Agar (LAB 168- Tryptone 10,0 g/L, Yeast Extract 5,0 g/L, Sodium Chloride 10,0 g/L, Agar 15,0 g/L) tartılıp 1L distile su (dH₂O) ile çözdürülerek, otoklav şişesinde, 121C^o de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Ardından sıcaklığı 45-50 C^o ye düşünce, steril tek kullanımlık besiyerlerine dökülüp soğumaya bırakılır. Kullanıma hazır olan besiyerleri üst üste paketlenerek +4 C^o de muhafaza edilir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Organizmanın Elde Edilmesi

Bacillus licheniformis MH101322 bakteri kültürü otoklavlanarak hazırlanmış LB Broth (MILLER) sıvı besiyerine öze yardımıyla inokülüm edilerek; 65C^o de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2. 1). İnkübasyon sonrası gelişimi gözlenen

mikroorganizma örnekleri petri kaplarında hazırladığımız LB Agar besiyerine 100 µl inokülüm ekilerek, yine etüvde 65C^o de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası çalışmada kullanılacak saf kültür çoğaltılmıştır.



Şekil 2. 1: LB Broth sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılan örnekler.

Bakterilerin stoklanması amacıyla; 500 µl Gliserol (%30'luk) ve 500 µl LB Broth besiyeri ile 1,5 ml'lik eppendorf tüplerinde %15 lik gliserol çözeltisi hazırlandı. Çalışma sonucu elde edilen izolattan bu çözelti içerisine bir öze dolusu mikroroganizma konularak vorteks yapıldı. 37X ve 37Y olarak numaralandırılan eppendosf tüpleri stoklanmak üzere -80C^oye alındı.

2.2.2. Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu

Bacillus licheniformis MH101322 bakterisinin genomik DNAsını elde etmek için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- 1- Bakteri örneğinden 5 ml alınıp LB Broth besiyeri içeren ortama alınarak 65C^ode 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 2- İnkübasyon sonrası, 37X ve 37Y olarak adlandırılan 2 tane 15ml'lik falcon Tüpüne 10 ar ml örnek konulup 4100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 3- Santrifüj sonrası falkondaki süpertant kısım dikkatlice atılıp, altta kalan pelletten 1,5 ml eppendorf tüpüne alınarak, 7000rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, sıvı kısım atılarak pellet üzerine;

- 200µl dH₂O
 - 50µl 0,5M EDTA
 - 10µl %20 lik SDS
 - 10µl Proteinaz K (10mg/ml)
 - 10µl 1M Tris-HCl (pH:8)
 - 5µl 5M NaCl ilave edilen süspansiyon 5 dakika vortekslenmiştir.
- 4- Örnekler 10 dakika arayla birer dakika vortekslenerek, toplam 30 dakika boyunca, 65C^o'deki su banyosunda bekletilmiştir.
 - 5- Süre sonunda her bir süspansiyon üzerine kendi hacmi kadar fenol: kloroform: izoailalkol (25: 24: 1) eklenip yavaşça ters düz edilmiştir.
 - 6- Ardından 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilerek faz ayrımı gözlemlenmiştir. Süpertant kısım faz ayrımının görüldüğü yere kadar mikropipetle dikkatlice alınıp temiz ve yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
 - 7- Tekrar süpertant kısım mikropipet yardımıyla dikkatlice yeni ve temiz bir tüpe aktarılıp 5. ve 6. made de belirtilen fenol: kloroform: izoailalkol (25: 24: 1) ekleme işlemi 3 kez aynen tekrar edilmiştir. Bu işlemlerin herbir yapılışında santrifüj sonrası eppendorf tüpündeki süpertant kısım yeni bir eppendorf tüpüne aktarılarak işlem tamamlanmıştır.
 - 8- 7. Aşama tamamlandıktan sonra yeni bir eppendorf tüpüne ayrılan süpertant kısmın üzerine hacminin 1/10'u kadar 3M NaOAc ile hacminin iki katı kadar absolu ethanol eklenip hafifçe ters düz edildikten sonra -20C^o'de bir gece bekletilmiştir.
 - 9- Bir gece inkübasyon sonunda örnekler -20C^o'den alınıp 10 dakika 1300 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpertant kısım atılarak, eppendorf tüpünde kalan pellet (beyaz çökelti) kurutma kâğıdı üzerine konularak kurutulur.
 - 10- Kurutulan pellet in üzerine 200µl dH₂O eklenerel çözünmesi sağlanmıştır. Bu çözeltinin üzerine hacmin 1/10'u kadar 0,3 M NaOAc ve 440µl absolu ethanol eklenip örnekler bir gece -20C^o'de inkübasyona bırakılmıştır.
 - 11- Bir gece inkübasyon sonunda örnekler 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilip, tekrar süpertant kısım atılarak pelletin bulunduğu tüp kurutma kâğıdı üzerinde kurutulmuştur.

12- Kurutulmuş pellet 100µl dH₂O ile çözdürülüp elde edilen bu genomik DNA'nın kalitesinin ve saflığını tespit edebilmek için sırasıyla spektrofotometrik ölçüm ve agaroz jelde yürütme işlemleri gerçekleştirilmiştir [72].

2.2.3. Genomik DNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü

Gen klonlama çalışmasını için elde ettiğimiz DNA'nın oldukça saf olması önemlidir. DNA derişimi ve saflığı UV absorbans spektrofotometre ile ölçülebilmektedir. Saf bir DNA örneğinin 260nm ve 280 nm' deki absorbanslarının oranı 1,8 standart değerinin çok altında veya üstünde olması, DNA da kirlilik, protein veya fenol bulaşığı olabileceğini gösterir [73]. Elde ettiğimiz DNA'nın 260nm ve 280nm dalga boylarında absorbanslarının oranı ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümlerde kör olarak dH₂O kullanıldı.

Tablo 2. 1: DNA örneklerinin NanoDrop ile Spektrofotometrik ölçümleri.

Sample ID	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	concentration(ng/ul)	Sample Type
37X	2.533	1.375	5.833	1,84	0,43	126,6	dsDNA
37Y	2,32	1.302	2.968	1,78	0,78	116	dsDNA

2.2.4. PCR Reaksiyonu

Elde edilen saf DNA örneklerinde 16s rRNA bölgelerinin çoğaltılması için tablo 2. 2'de belirtilen PCR koşullarında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu PCR reaksiyonu 27 Forward (25 pmol/µl) ve 1385 Reverse (25pmol/µl) primerleriyle kurulmuştur. Her bir PCR tüpü için; 2,5 µl 27F, 2,5 µl 1385R, 2,5 µl 10X PCR Buffer, 0,25 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl), 2 µl 25mM MgCl₂, 1,5 µl 25mM dNTP Mix, 1µl genomik DNA; 12,75 µl dH₂O ile toplam 25 µl'lik hacme tamamlanarak mix hazırlanmıştır.

Tablo 2. 2: Genomik DNA örneklerinin PCR reaksiyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Süre (Dakika)	5 dk	1 dk	1dk	1dk	5 dk	∞
	40 Döngü					

2.2.5. DNA Örneklerinin Jel Elektroforezi ve UV Görüntüleme

PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler; 90 Volt'da, %1'lik Agaroz jelde, 60 dakika yürütülmüş ve UV görüntüleme cihazıyla görüntüleri kayıt altına alınmıştır.

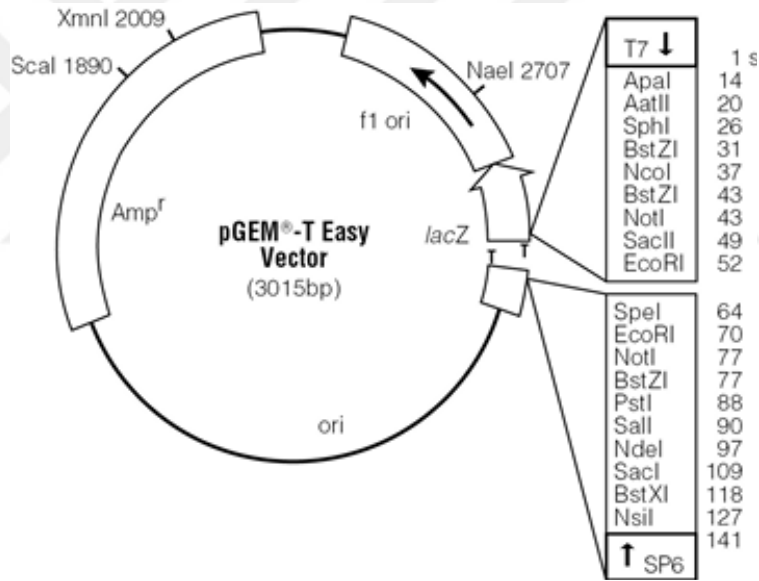
- 2ml TAE Buffer (50X), 100 ml'lik ölçüye distile su ile tamamlanmış, içerisine 1gr Agaroz ilave edilip, ısıtmalı manyetik karıştırıcıda jen oluşuncaya kadar karıştırılmıştır.
- Homojen olarak çözünen bu agaroz jel çözeltisine, elektrolizsonrası yüklenen genomik DNA'ların ultraviyole ışın altında açık bir şekilde görüntülenebilmesi için, son konsantrasyonu 0,3µl/ml olacak şekilde 5µl Etidyumbromür eklenmiştir.
- Hazırlanan jel düz bir zeminde jel tablasına dökülüp jelin katılaşması için 60 dakika kadar beklenmiştir.
- Jel iyice katılaştıktan sonra, kuyucukların oluşması için takılan tarak jele zarar vermeden çıkarılarak, jel tablası elektroforez tankına yerleştirilmiştir.
- Elektroforez tankına, jelin üzerini yaklaşık 1cm kadar kapatacak şekilde TAE Tampon çözelti dökülür. 50X TAE Buffer ile distile su yardımıyla hazırlanan 1X TAE Buffer tampon çözeltisi kullanılır.
- Jelin ilk kuyucuğuna; 2µl bromophenolblue boyası, 4µl dH₂O ve 1µl marker pipetlenerek yükleme yapılır.
- Diğer kuyucuklara ise her birine; 2µl bromophenolblue boyası ve 10µl belirlenen PCR ürünü pipetlenerek yükleme yapılır.
- Yükleme tamamlanıp, 90 volt da 60 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

60 dakika sonrasında yükleme yaptığımız jel kalıbı UV görüntüleme cihazına yerleştirilip oluşan bantlaşma fotoğraflanarak cihaza kaydedilmiştir.

2.2.6. Klonlanacak Olan Genomik DNA'nın Plazmite Ligasyonu

PCR ürünleri önce taşıyıcı DNA molekülleri ile bitleştirilerek rekombinant DNA molekülü oluşturulup, ardından önceden stoklanıp hazırlanmış E.coli kompetent hücrelerine aktarılmıştır.

PCR ürününe A ekleme reaksiyonu: plazmitdeki T nükleotidi ile PCR ürünün uçlarına eklenen A nükleotidinin T4 DNA Ligaz enzimi ile birleşmesiyle PCR ürününün ligasyonu sağlanmıştır. Bu ligasyon işlemi için; 0,5 µl 2,5 µM dATP, 1 µl 10X tampon, 1 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl Taq DNA Polimeraz ve 6,5 µl PCR ürünü karışımı hazırlanmıştır. Karışım 70 C°'de 30 dakika bekletilmiştir. Klonlama reaksiyonunda pGEMTEasy (Promega) vektörü kullanılmıştır.



Şekil 2. 2: pGEMT-Easy vektörü (Promega)

Vektörün elde edildiği firma tarafından belirlenen protokol uygulanmıştır. Buna göre aşağıda miktarlarda reaksiyon gerçekleştirilmiş ve 16°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 2. 3: pGEMT-Easy vektörüyle ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	
2X Rapid Ligation Buffer,	5µl
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl
PCR ürünü (insert)	Xµl*
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl
Deiyonize su	10µl'ye tamamlanır

Reaksiyona girecek insert miktarı aşağıdaki formülü ile belirlenmiştir;

$$\frac{\text{vectör (ng)} \times \text{insert (kb)}}{\text{Vektör (kb)}} \times \frac{\text{insert (mol)}}{\text{plazmid (mol)}} = \text{kullanılması gereken insert miktarı (ng)}$$

2.2.7. Genomik DNA'nın Kompetent Hücreye Transformasyonu

Klasik transformasyon prosedürü uygulanmıştır. Buna göre:

- CaCl₂ yöntemiyle kompetan hale getirilip -80°C'de stoklanmış kompetent hücrelerden 100µL alınıp buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir.
- Ligasyon sonrası elde ettiğimiz ürün buz üzerinde kompetent hücreye eklenip 30 dakika beklemeye bırakılmıştır.
- Kompetan hücrelere DNA'nın girişini uyarmak için; süre sonunda buzdan alınan örnekler 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 1 dakika ısı şoku muamelesi yapılmıştır.
- Daha sonra örnekler ısı bloğundan alınıp tekrardan 3 dakika buz üzerinde tutulmuştur.

- Süre sonunda üzerine 500 µL LB eklenip ve 37°C'de 35 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında 2 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Bu sırada ekip yapılacak petri kaplarına 40'ar µL XGal eklenmiştir.
- Santrifüj edilen örnekler, tüp içerisinde 50 µL süpernatant kalacak şekilde, süpernatant kısmın geri kalanı dökülmüş ve pelet bu 50 µL süpernatant içerisinde çözdürülmüştür.
- Ardından bu çözelti petri kapındaki LB Agar-Amfisilin-XGal yüzeyine yayılmış ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir.

Bu transformasyon yöntemiyle inkübasyon sonrasında oluşan mavi ve beyaz kolonilerden transforme olan beyaz koloniler seçilerek numaralandırılmıştır. Numaralandırılan kolonilerden özeyle alınarak aseptik koşullarda 50 µL X-Gal ve LB Agar Amfisilin (100 µg/µL) içeren petrilere çizgi ekimleri yapılmıştır. Öze uçlarında kalan amfisilinli kısım içerisinde 10 ml'lik LB broth besiyeri olan erlene aktarılmıştır. LB Agar amfisilin X-Gal içeren petrilere ile LB besiyerleri 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.8. Plazmit İzolasyonu

- Bakterinin geliştirilmesi: Seçilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu için koloniler LB agar ampisilin (100 µg/µl) içinde, 120 rpm ve 37°C'de bir gece büyümeye bırakılmıştır. Ardından besiyerleri falkon tüplerine aktarılmış ve 5 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 1000 µl 50 mM Tris-HCl (pH:8,0) eklenip vortekslenmiştir. pipetleme yardımı ile de pelet çözülmüş ve eppendor tüplerine alınmıştır. Eppendorflar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Bakteri çökeltisinin parçalanması: 150 µl Lizozim-Tris ile 8,0 pH'da ki 20 µl 0,5 M EDTA karıştırılarak pelet üzerine aktarılarak bu solüsyonda çözdürülmüştür. Çözelti 30 dakika buzda bekletilmiştir.

- Plazmit DNA'sının çöktürülmesi ve saflaştırılması: Buzda bekletilmiş olan her bir eppendorf tüpüne 400µl 0,2 M NaOH- %1 SDS (1: 1) eklenip, tüpler hafifçe ters düz edilmiştir. Beş dakika buzda bekletilmiştir. Ardından üzerlerine 300µl 7,5M amonyum asetat eklenmiştir. Tüpler yavaşça ters düz edildikten sonra 10 dakika buzda bekletilmiştir. Süre sonunda çöken plazmitin saflaştırılması gerekmektedir. Bu yüzden buzdan alınan tüpler 15 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni temiz eppendorflara aktarılmıştır.
- Fenol-kloroform uygulaması: Süpernatantların üzerine 800 µl fenol+ kloroform: izoamilalkol (25:24:1) eklenmiştir. Tüpler 5 dakika boyunca iyice karıştırılıp, 2 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde 3 faz ayrımı görülmüş ve en üstte ki plazmit içeren faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerlerine her bir süpernatantın hacminin 0,6 katı olacak miktarda 2-Propanol eklenmiştir. Tüpler ters düz edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant uzaklaştırılmış ve kalan pelet kurutulmuştur. Pelet üzerine 200 µl 0,3 M NaOAc eklenerek çözdürülmüştür. Bu çözelti üzerine 400µl absolut etanol eklenerek -20C° de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bir gece bekletilen tüpler 10 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra 30µl TE ile çözdürülerek -20C°de muhafaza edilmiştir.

2.2.9. DNA Dizi Bilgilerinin Belirlenmesi

Plazmite yerleştirilen genlerin DNA dizi verilerini belirlemek için, bakterilere özgü olan ve evrensel kabul edilen primerler [Primer 1: 27 F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA-3') ve Primer 2: (1385R) (5'-CGGTGTGT[A/G]CAAGGCC-3')] ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası istenilen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığı teyid etmek için elde edilen ürün, %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Klonlanmış örneklerden PCR sonucu elde edilen ürün sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden BLAST analizi edilmiştir.

- Bakteri izolatlarının protein aktivitesinin belirlenmesi: Bakteri izolatlarının enzim aktivitelerini belirlemek için öncelikle, sıvı besiyerinde inkübe edilen kültürlerden ependorf tüplerine 1,5 mL alınarak 5 dakika 12000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Ependorf tüplerinin süpernatant kısmından 0,5 ml alınarak, aynı miktarda % 1’lik ksilan çözeltisiyle tüpte karışması sağlanmıştır. Karışım 1 saat boyunca 65°C’de bekletilmiştir. Süre sonunda reaksiyon durdurmak için tüp üzerine 1 ml DNS çözeltisi eklenmiştir. Tüp 5 dakika boyunca sıcak su banyosunda tutulur. Üzerine 5 ml distile su ilave edilip, ters düz edilerek karıştırılmıştır. Nanodrop cihazı ile spektrofotometrik ölçümleri yapılan örneklerden saflığı en yüksek olan rekombinant olarak üretilmiştir.

2.2.10. β – Galaktozidaz Proteinine Ait Genlerin Klonlanması

2.2.10.1. Biyoinformatik Analizler

Çalışmada rekombinant protein olarak üretilecek β -galaktozidaz geninin *Bacillus licheniformis* bakteri genomunda belirlenmesi ve *E.coli*’den heterolog protein olarak elde edilmesi için klonlama çalışmalarında kullanılmak istenen primer DNA dizileri ve β -galaktozidaz enzimini kodlayan proteinlerin belirlenebilmesi için NCBI Genbank veri tabanı ile WebCutter, ClustalW, BLAST gibi biyoinformatik araçlar kullanılmıştır. Primer DNA’ların tasarımı için aday gen dizileri Webcutter ile restriksiyon kesim analizi yapıp, gen bölgesini kesemeyen restriksiyon enzimleri belirlenmiştir. Belirlenen bu restriksiyon enzimlerden pQE 40 vektörünün çoklu klonlama bölgesinde bulunanlar primer dizilerine eklenip, primer dizilerin tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan Primerler BLAST ile analiz edilmiştir.

Tablo 2. 4: Biyoinformatik analizler sonucu belirlenerek PCR analizinde kullanılan primer DNA dizileri (sarı renkle işaretlenmiş bölgeler restriksiyon tanıma bölgelerini belirtmektedir).

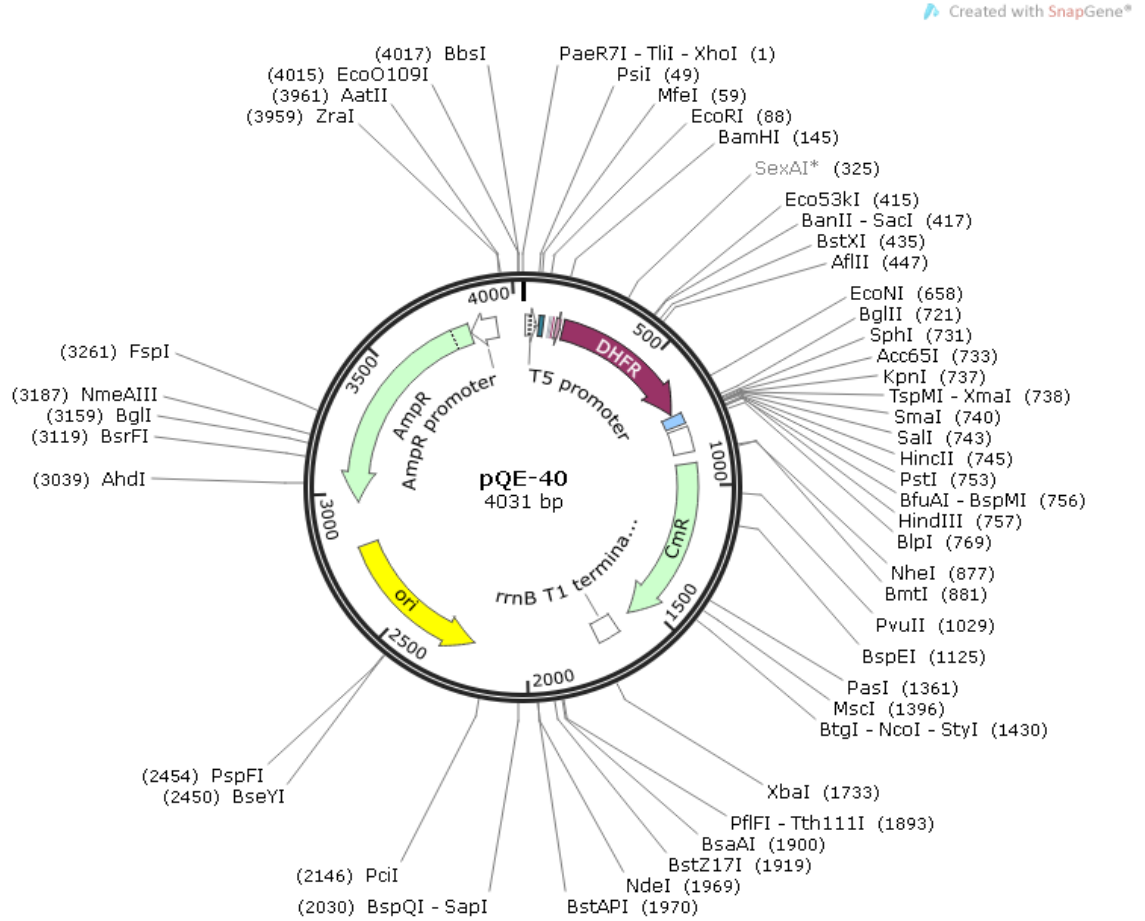
Gen	Primer Adı	Primer DNA dizisi	Restriksiyon Enzimi
β-galaktozidaz	F- β-galaktozidaz	GTCGACGCAAGCTTC GCTCCATATGCCA	XbaI
	R- β-galaktozidaz	AAGCTTGTGGTCGAC AGATCTCTCGAGCTCT TTTG	KpnI

2.2.10.2. β-Galaktozidaz'ın *E.coli*'de Rekombinant Olarak Üretilmesi

Tablo 2. 4'de belirlenmiş olan genler PCR ile çoğaltılıp taşıyıcı vektöre, sonra da *E.coli*'ye aktarılmıştır. Öncelikle genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılmıştır. Aday genlerin amplifikasyonu Tablo 2. 4'de belirtilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülüp, ilgili gene ait istenen büyüklükteki DNA bantları gözlemlenmiş ve jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Jelden saflaştırılan ürünler önce TA klonlama ile pGEMT-Easy vektörüne, ardından *E.coli* DH5- α konakçısına ısı şoku ile aktarılmıştır. Pozitif klonlardan saflaştırılan plazmit DNAları XbaI, KpnI enzimleri ve primer DNA üzerindeki tanıma dizileri bulunan uygun restriksiyon yerlerinden kesim reaksiyonuna alınmış ve saflaştırılmıştır.

- Kullanılan vektörler: *Bacillus Licheniformis* bakterisinden β-galaktosidaz genini klonlayabilmek için pGEMT-Easy vektörü (Promega) kullanılmıştır. Rekombinant protein ifadesi için ise pQE 40 vektörü (SnapGene) kullanılmıştır (Şekil 2. 3). β-galaktozidaz proteininin vektör üzerine yerleşebilmesi için bölüm 2.2.10.1.'de bahsi geçen enzimler ile yağışkan uçların oluşturulması gerekmektedir. Bu sebeple tasarlanmış olan primerler kullanılarak; β-galaktozidaz pQE 40 vektörüne transformasyonu sağlanmıştır. Transformasyon

olanlar amfisilinli agar üzerinden seçilmiştir. Transforme olan pozitif kolonilerden protein izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 2. 3: pQE 40 vektörünün şekli (SnapGene).

- **Ligasyon:** plazmitte bulunan Timin nükleotitleri ile PCR ürününün çoğaltılması sırasında Taq polimeraz enziminin ürününün uçlarına eklediği Adenin nükleotidinin biraraya gelmesi T-A klonlanması prensibi ile gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü ligasyon aşaması için hazırlanırken;
- 1 µL 10X tampon,
- 1 µL 25 mM MgCl₂,
- 0,5 µL 2,5 µM dATP,
- 6,5 µL PCR ürünü,
- 1 µL Taq DNA Polimeraz karışımı hazırlanmış,

- 70C°'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
Reaksiyon sırasında pGEMT-Easy vektörü (Promega) kullanılmıştır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için; 5 µL 2x Rapid Ligation Bufer, 1 µL pGEM-T Easy Vektör, X µL İnsert (insert miktarı kullanılan kullanılan vektörün alındığı firma tarafından belirtilen protokole göre hesaplanmıştır), 1 µL T4 DNA Ligaz (5u/µL) deiyonize su ile 10µL'ye tamamlanıp, 24 saat 16C°'de inkübe edilmiştir.
- Transformasyon: -80°C'de stoklanan kompetent hücreler buz üzerine konulup 5 dakika bekletilmiştir. Ligasyon sonrası elde ettiğimiz ürün buz üzerinde kompetent hücreye eklenip 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. Kompetan hücrelere 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 1 dakika ısı şoku muamelesi yapılmıştır. Daha sonra örnekler ısı bloğundan alınıp tekrar 3 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda üzerine 500 µL LB eklenip ve 37°C'de 35 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Bu sırada ekip yapılacak petri kaplarına 40'ar µL XGal eklenmiştir. Santrifüj edilen örnekler, tüp içerisinde 50 µL süpernant kalacak şekilde, süpernant kısmın geri kalanı dökülmüş ve pelet bu 50 µL süpernant içerisinde çözdürülmüştür. Ardından bu çözelti petri kapındaki LB Agar-Amfisilin-XGal yüzeyine yayılmış ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu transformasyon yöntemiyle inkübasyon sonrasında beyaz kolonilerden özeyle alınarak aseptik koşullarda 50 µL X-Gal ve LB Agar Amfisilin (100 µg/µL) içeren petrilere çizgi ekimleri yapılmıştır. Öze uçlarında kalan artıklar amfisilinli kısım 10 ml'lik LB besiyeri içeren erlene alınmıştır. XGal içeren LB Agar amfisilin petrilere ile LB besiyerleri 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- Plazmit izolasyonu: Seçilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu için koloniler LB agar ampisilin (100 µg/µl) içinde, 120 rpm ve 37C°'de bir gece büyümeye bırakılmıştır. Ardından besiyerleri falkon tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 5 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilip, süpernant uzaklaştırılmıştır. Geride kalan pellet üzerine 1000 µl 50 mM Tris-HCl (pH:8,0) eklenip vortekslenmiştir. Pipetleme yardımı ile de pellet çözülmüş ve eppendor tüplerine alınmıştır. Eppendorf tüpleri 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernant

uzaklaştırılmıştır. Bakteri peletini parçalamak için pelet üzerine üzere 150 µl Lizozim-Tris ile 8,0 pH'da ki 20 µl 0,5 M EDTA çözeltisi aktarılarak pellet bu ortamda çözdürülmüştür. Çözelti 30 dakika buzda bekletilmiştir. Plazmit DNA'sının çöktürülmesi için buzda bekletilen eppendorf tüplerine 400 µl 0,2 M NaOH- %1 SDS (1: 1) eklenerek, tüpler birkaç kez ters düz edilmiştir. Tüpler 5 dakika buzda bekletilmiştir. Ardından üzerlerine 300 µl 7,5 M amonyum asetat eklenip tüpler yavaşça ters düz edilmiş ve 10 dakika buzda beklemeye alınmıştır. Süre sonunda dibe çöken plazmiti saflaştırmak için 8000 rpm'de 15 dakika santrifüjedilmiştir. Süpernant yeni temiz eppendorflara aktarılmıştır. Süpernantların üzerine 800 µl fenol+kloroform: izoamilalkol (25:24:1) eklenerek tüpler çalkalanmış ve 5 dakika boyunca iyice karışması sağlanmıştır. Ardından 2 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilip ve tüplerde 3 faz ayrımı görülmüş ve en üst faz plazmit içerdiği içi yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerlerine her bir süpernantın hacminin 0,6 katı kadar 2-Propanol eklenmiştir. Tüpler ters düz edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernant uzaklaştırılmış ve pelet kurutulmuştur. Pelet üzerine 200 µl 0,3 M NaOAc eklenerek çözdürülmüştür. Bu çözelti üzerine 400 µl absolut etanol eklenerek -20C°'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernant uzaklaştırılmış ve pelet kurutulmuştur. Kuruduktan sonra 30 µl TE ile çözdürülerek -20C°'de muhafaza edilmiştir.

- **Plazmitin restriksiyon enzimleriyle kesimi:** izole edilen plazmitin istenilen DNA parçasını içerip içermediğini belirlemek için belirlenen bölge restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Bir tüp içerisinde; 1 µL restriksiyon enzimi, 1 µL 10X enzim tamponu, 1 µL Plazmit (1.380 ng/µL) ve 7 µL dH₂O karışımı eklenerek ile 37C°'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası içerisinde klonlanmış DNA parçası içerdiği belirlenen koloniler 'pozitif koloni' olarak adlandırılmıştır [72].
- **PCR ve jelden saflaştırma:** Klonlanmış DNA parçası içeren pozitif kolonilerin PCR ve jel elektrofesi ile klonlanmış DNA parçalarının bant büyüklükleri (bç) gözlemlenmiştir. Jelnelektroforezi yapılan PCR ürünlerinin oluşturduğu bant büyüklükleri tespit edilip oluşturdukları bant UV ışık altında dikkatlice

kesilmiştir. DNA parçaları jelden, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ile kesilmiştir. Kesim sırasındaki işlem basamakları kit üzerinde belirtilen protokole göre uygulanmıştır.

2.2.11. β – Galaktozidaz Enzimine Ait Proteinin E.coli’de Heterolog Olarak Üretilmesi ve Saflaştırılması

Elde ettiğimiz pozitif klonlardan β -galaktozidaz enzimi üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Bu pozitif klonlardan enzimi saflaştırmak için klonlar Amfisilin-LB içeren besi ortamda 37C°’de inkübe edilmiştir. Ardından IPTG ile indüklenerek protein ifadesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası bu hücrelerden total protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen proteinlerden 6X-His takısına sahip rekombinant proteinler Nikel afinitesi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrasında elde edilen proteinlerin doğru biçimde ifade edildiklerini teyid etmek ve saflaştırılan proteinin moleküler ağırlığını tespit etmek için SDS-PAGE ile analizi uygulanmıştır [74].

2.2.11.1. β – Galaktozidaz Proteininin E.coli’de Rekombinant Olarak Üretilmesi

Rekombinant protein üretilmesi için β -Galaktozidaz proteini ekspresyon plazmitine aktarılmış; proteinin izolasyonu, saflaştırması ve SDS Page aşamaları gerçekleştirilmiştir. β -Galaktozidazın rekombinant olarak ifade edilebilmesi için pQE40 vektörü sayesinde yüksek miktarda protein ifadesi oluşması sağlanmıştır. pQE 40 vektörü çoklu klonlama bölgesinde birçok restriksiyon enziminin tanıma dizilerini ve bununla beraber amfisilin direnç bölgesi içermektedir.

2.2.11.2. β – Galaktozidaz Proteininin İzolasyonu

Klonlanmış DNA parçası içeren pozitif beyaz kolonilerden istenilen protein izole edilmiştir;

- Pozitif kolonilerden 10 ml’lik kültür alınıp amfisilinli LB besi yerinde 16 saat inkübe edilmiştir.

- 16 saat sonunda ortama 0,1 M IPTG (izopropil-beta-D-thiogalaktopiranosit)'den 100 µL eklenmiş ve 3 saat boyunca, birer saat aralıkla hücreler alınmıştır.
- Alınan hücreler 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında 1 ml TES (100 mM Tris HCL pH: 7,5, 100 mM EDTA ve 100 mM NaCl ile 50 ml) ile yıkanmışlardır.
- Yine aynı santrifüj koşullarında ve 180 µL TES ile çözdürülmüştür.
- Elde edilen çözeltiliye 0,02 gr lizozim (10 mg/ml) ve 50 mM TrisHCL (pH:8) ile muamele edilmiş ve distile su eklenerek hacmi 2 ml'ye tamamlanmıştır.
- Ardından 2 µL ve 10 µL deterjan kokteyli (150 µL Tween 20 ve 150 µL Triton x100) eklenerek 20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
- Sonrasında 50 µL 50 mM Tris HCL, 0,8 µL Endonükleaz ve 1,5 µL 1 M MgCl₂ eklenip 20 dakika oda koşullarında inkübe edilmiştir.
- Karışım oda koşullarından alınıp 20 dakikalığına - 80°C'ye bırakılmıştır. 20 dakika sonra tekrar oda sıcaklığına alınıp çözdürülmüştür. Bu soğutma çözdürme işlemi iki kez tekrarlanmıştır.
- Son olarak karışım +4 C°'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde yaklaşık 15 dakika boyunca 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım yeni bir eppendorf tüpüne alınıp saflaştırma işlemine geçilmiştir [72].

2.2.11.3. Saflaştırma

Saflaştırma aşaması için Histidin affinitesi göstererek bunları tutan Ni-NTA agarose (QIAGEN Kat. No: 30230) boncukları kullanılmıştır. Saflaştırma aşamaları Ni-NTA agarose kitinde belirtildiği gibi uygulanmıştır:

- Ni-NTA agarose boncuklarından 120 µl alınmış ve soğutmalı santrifüjde (+4°C), 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Ni-NTA agarozları Buffer C; 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄ ve 10 mM Tris HCl ile pH:6,3 olacak şekilde hacmi 1000 ml'ye (dH₂O ile) tamamlanıp 3 dakika karıştırılmıştır. Ardından 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve Bu aşama 3 kez tekrarlanmıştır.

- İşlem sonrasında protein içeren sıvı Ni-NTA agarose boncukları ile karıştırılmıştır. Karıştırıcı tabla üzerinde gece boyunca +4°C’de bekletilmiştir.
- Bir gece sonunda örnekler +4°C’de 5 dakika 3000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen pelet 500 µL Buffer C (Ni-NTA için) ve 1X PBS ile yıkanmıştır. 3 dakika karıştırıcı tabla üzerinde karıştırıldıktan sonra 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem 5 kez tekrar edilmiştir.
- 5. Kez santrifüj yapıp süperant kısım atıldıktan sonra pellet üzerine 100 µL Leamli buffer (250 µL 0.5 M Tris HCl (pH:6.8), 200 µL % 20 SDS, 200 µL Gliserol, 100 µL β-merkaptoetanol ve çok az Bromfenol blue eklenip dH₂O ile 1ml’ye tamamlanarak 10 dakika kaynatılmıştır.
- Son olarak kaynatma işleminden sonra örenklerden 10 µL alınıp SDS-Page jeline yükleme yapılmıştır.

2.2.12. SDS Page Jeline Yükleme

SDS-Page jele yükleme yöntemi prensip olarak; proteinlerin molekül ağılıklarına göre ayırımı sağlamak için akrilamid jelde elektrik akımıyla yürütülmesine ve bunların tespit edilmesine dayanır. Bio-RAD firmasından temin edilen jel sistemi kullanılmıştır. SDS-Page saflaştırma işleminde ayırma ve yürütme tamponu birlikte kullanılmıştır. Ayırma tamponu olarak; 1,7 ml %30 Bis-akrilamid, 2,5 ml 0,5 M Tris HCl (pH:6,8), 0,1 ml %10 SDS, 5,7 ml dH₂O, 10 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile %10 luk olarak hazırlanmış tampon kullanılmıştır. Yürütme tamponu olarak da %10 luk olarak; 3,3 ml %30 Bis-akrilamid, 2,5 ml 1,5 M Tris HCl (pH:6,8), 0,1 ml %10 SDS, 4,1 ml dH₂O, 5µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmış tampon kullanılmıştır.

Ayırma ve yürütme tamponlarıyla hazırlanmış olan jele 10ar µl saflaştırılmış örneklerden ve marker olarakta Kaleidoscope prestained standards (Bio-RAD, Kat. No:161-0324) markırı yüklenip, 80V’ta 2 saat yürütülmüştür. Süre sonunda SDS jel görüntüsü alınıp markera göre okuma yapılmıştır.

3. BULGULAR

Bakterilerin moleküler türünün belirlenmesi için 16S rRNA gen bölgesi saflaştırılmıştır. Bu bölgenin saflaştırılması ile beraber baz dizisi Dizi analizi ile hedeflenmiştir. Bu amaçla önce örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Sonrasında 16S rRNA bölgeleri PCR'la belirlenerek istenilen gen bölgelerinin klonlaması ve sekans analizi yapılarak türler tanımlanmıştır.

3.1. Genomik DNA Eldesi

Tez çalışmamızda bakterilerin genomik DNA'ları izole edilip DNA'larının konsantrasyonları spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar 16S rRNA gen bölgeleri için spesifik olan primerler ile PCR ile amplifiye edilmiştir. Bu PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve UV görüntüleri elde edilmiştir. Beklenen büyüklük olan 1700 baz çifti 16S rRNA ait ürünleri olduğu görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: DNA izolatlarının PCR sonrası jel elektroforezi sonucu

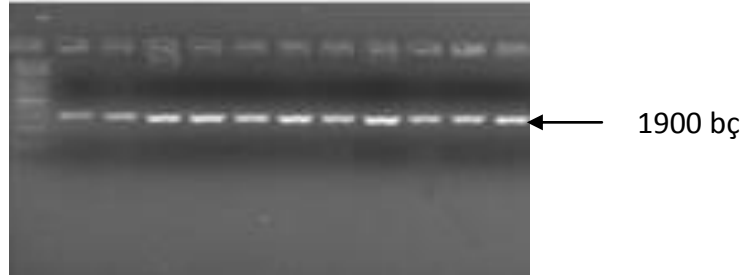
3.2. DNA Dizi Analiz Sonuçları

PCR ürünleri klonlanarak sekans analizleri yapılmıştır. Sekans analizleri sonucu elde edilen verilere dayanarak türün *Bacillus licheniformis* olduğu belirlenmiştir.

3.3 β – Galaktozidaz geninin *Bacillus licheniformis*'ten Klonlanması

β – Galaktozidaz geninin *Bacillus licheniformis*'ten üretilmesi için sırasıyla; gDNA' lardan β – galaktozidaz genine ait bölgenin PCR ile saflaştırılması, ligasyon, transformasyon, plazmit izolasyonu, restriksiyon enzimleri ile geni taşıyıp taşımadığının

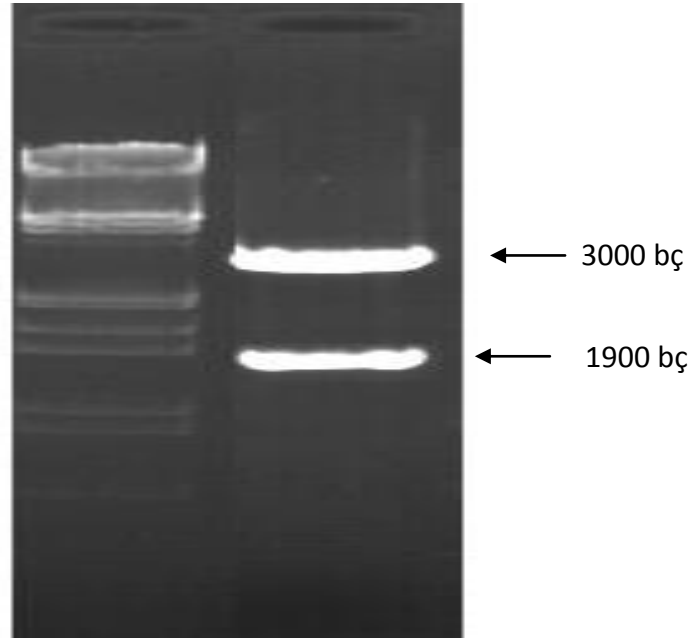
belirlenmesi ve genin dizi analizi yapılarak klonlamanın tamamlanması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikli olarak gDNA'lerden β – Galaktozidaz geni primerleri kullanılarak β – Galaktozidaz gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 3. 2).



Şekil 3. 2 : β – Galaktozidaz gen bölgeleri jel elektroforezi sonucu

İzolasyonda PGEMTeasy vektörünün, β -galaktozidaz genini taşıyıp taşımadığını belirlemek için XbaI ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesim yapılmıştır. Restriksiyon enzimleriyle kesimi gerçekleştirilen ürünlerden yaklaşık 3000 bç. PGEMTeasy vektörüne ve 1900 bç. β -galaktozidaz genine ait bölgeler görülmüştür (Şekil 3.3). Bu sonuçlar β -galaktozidaz geninin başarılı bir şekilde klonlandığını göstermiştir.

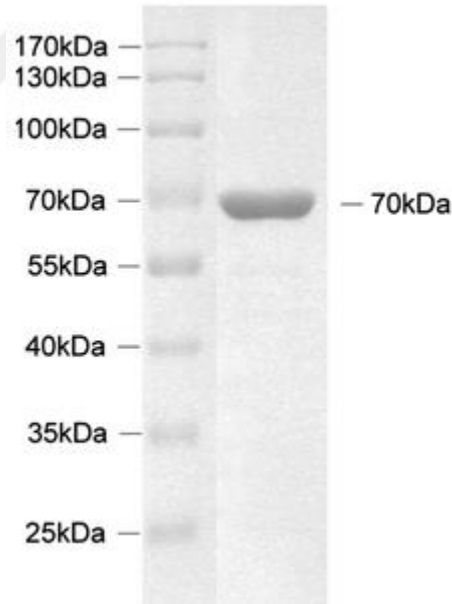
M



Şekil 3. 3: β – Galaktozidaz geni içeren plazmidin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Lambda DNA/EcoRI /Hind III Marker.

3.4 Rekombinant Olarak Elde Edilen β – Galaktozidazın Ekspresyonu

6x Histidin takısı bulunan pET16b vektörü protein ekspresyonu vektörü olarak kullanılmıştır. β – Galaktozidaz genini taşıyan insört; pET16b vektörüne yerleştirilmiştir. Daha sonra ilgili vektör *E. coli* Rosetta'ya aktarılmış ve protein izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen protein izolatları histidin affinitesi gösteren ve Nikel NTA bocukları bulunan agaroz jelde saflaştırılmıştır. Protein önce 6x His histidin takılarını tutan Ni-NTA boncukları yardımı ile filtrede tutulmuş, sonra da kit solüsyonları ile enzim saflaştırılmıştır. Ardından Anti-His antikoruyla Western blot analizi yapılmış ve SDS-PAGE sonucu doğrulanmıştır. Saflaştırılan proteinin *B. licheniformis*'e ait β -galaktozidaz olduğu belirlenmiştir. Ni-NTA boncukları ile saflaştırılan enzim belirlenmiştir. Şekil 3. 4'de görüldüğü üzere jelde protein bantlaşması gözlenmiştir (Şekil 3. 4). Tüm bu işlemler sonucunda proteinin yaklaşık 70 kDa büyüklüğünde olduğu tespit edilmiştir. Bu da ekspresyonun başarılı bir şekilde olduğunu göstermiştir. Böylece rekombinat β -galaktozidaz proteinin başarılı bir şekilde üretildiği görülmüştür.



Şekil 3. 4: Ni-NTA saflaştırılması sonucu elde edilen β – Galaktozidaz enzimine ait jelin görüntüsü.

4. TARTIŞMA

İnsan nüfusunun hızla artmasını takiben yeni ihtiyaçların oluşması ve bunların karşılanabilmesi için hızlı ve talebi karşılayabilecek kadar büyük miktarlarda, sürdürülebilir, yüksek kapasiteli ve hızlı çözümler sağlayacak proseslere ihtiyaç duyulmuştur. Bu ihtiyaç araştırmacıları ve bilim insanlarını biyoteknolojiye yönlendirmiştir. Kimyasal çözümlerin aksine biyolojik kaynaklı kendi kendine yetebilen çözümler daha cazip hale gelmiştir. bu kapsamda biyolojik kaynaklı endüstriyel enzimlerin kullanılması; süreci hızlandırması, tekrar tekrar kullanılabilir olmaları, yüksek verim sağlamaları ve ekstrem koşullarda bile çalışabilmeleri nedeniyle biyoteknolojiye her alanda ivme kazandırmıştır. Endüstriyel enzimlerin büyük bir çoğunluğunu mikrobiyal kaynaklı enzimler oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar arasındaki spesifik farklılıklar, ürettikleri enzimlerin de ekstrem koşullarda bile çalışabilmesine olanak sağlamıştır [76]. Yapılan araştırmalar termal kaynaklardan izole edilen mikroorganizmalardan termostabil ürünler elde edilebildiğini göstermektedir. Ayrıca bir çok patojen mikroorganizma bu ekstrem koşullarda yaşamını sürdüremediği için termofilik mikroorganizmaların kullanıldığı proseslerde patojenite riski ortadan kalmaktadır. Tüm bu özellikler termofilik mikroorganizmalardan elde edilen galaktozidaz, amilaz, pullulanaz, selüloz, kitinaz, ksilinaz ve pektinaz enzimleri; gıda, kimya, ilaç sanayii, tekstil, deterjan üretimi ve çevre biyoteknolojisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Literatür incelendiğinde ticari enzim üretiminde kaynak mikroorganizmaların çoğunlukla Bacillus türlerinden seçildiği görülmüştür. Bacillus türlerinin izlasyonunun kolay olmasında öncelikli tercih olma sebeplerinden biridir.

Ülkemizde büyük bir ekonomik değere sahip olan enzim teknolojisi konusunda inovatif ürünler ve üretimler yapması ülke ekonomisine büyük katkı sağlayacaktır. Ülkemizin termal kaynaklarca zengin olması bu açıdan kullanılabilir biyolojik kaynaklar oluşturabilmektedir. Adıgüzel ve arkadaşları (2011); Erzurum pasinler bölgesindeki termal kaplıçalardan izole ettikleri bakterilerin genotip ve fenotip karakterizasyonlarını belirlemek için yağ asidi, BOX PCR profillemeye metodları ve 16S rDNA dizileme verileri kullanarak toplam 9 bakteri suşunu karakterize etmişlerdir. Bunlardan dört suş Bacillus licheniformis, diğer beş suş ise Aeribacillus pallidus olarak tanılanmıştır [26]. Genetik olarak 16S rRNA dizileri arasında oldukça fazla benzerlik

bulunan (% 98,5-99,2) termofilik basiller fenotipik ve filogenetik olarak oldukça uyumlu bir yapı gösterirler [77]. Rey ve arkadaşları (2004) , yaptıkları araştırmada *Bacillus subtilus* ile *Bacillus licheniformis* türlerinin genomik yapılarının oldukça yakınlık gösterdiğini ortaya koymuşlardır. *B. licheniformis* ATCC 14580 genomunun 4,222,336 baz çiftli (bp) dairesel bir kromozom içeren tam nükleotit sekansını belirleyip gen diziliminin *Bacillus subtilus* ile % 80 oranında benzer olduğunu tespit etmişlerdir[77]. Çalışmamızda kullandığımız mikroorganizmamız yerli termal kaynaklardan izole edilerek; 16S rRNA dizi analizi ve sekans analizi sonucunda, termofilik *Bacillus Licheniformis* MH101322 olarak tanımlanmıştır.

Kendi coğrafyamızdaki termal kaynaklardan elde edilen türlerle yapılan bir diğerk araştırmada; Kaplan ve arkadaşlarının (2013), Batman-Taşlıdere de ki sıcak su kaynaklarından izole ettikleri gram pozitif, fakültatif, anaerobik mikroorganizma olan *Bacillus Licheniformis* KG9 bakterisinden; termostabil, ekstraselüler, β -galaktosidaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmen saflaştırmayla elde etmişlerdir. Enzimin spesifik aktivitesinin Amonyum sülfat çöktürme ile kısmi artış gösterdiğini otaya koymuşlardır.

Akcan ve Baysal (2010), substrat olarak pirinç kabuklarından, β -galaktosidaz üretim kaynağı olarak *Bacillus licheniformis*'in yabani suşunu kullanarak, Katı Substrat Fermantasyonu yöntemiyle, farklı azot (amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorür, yeast extract, pepton, tripton) ve karbon kaynaklarında (glukoz, galaktoz, sukroz, fruktoz ve laktoz) enzim üretimi için optimum süre belirlenmeye çalışılmışlar. 72 saat inkübasyona bırakılan örneklerden, her 24 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüştür. optimum inkübasyon süretinin 48. saat olduğu, ilerleyen saatlerde ortama eklenen azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimini baskıladığı tespit edilmiştir. Bu çalışma uygun koşullarda *Bacillus Licheniformis*' den β -galaktosidaz enzimi sentezinin farklı substratlar kullanırakta mümkün olabileceğini göstermektedir.

Laktozun hidrolizi sonrası işlenmesi β - galaktozidazın gıda sektörünce çokça kullanılmasına sebep olmuştur. Laktozun hidrolizi ile oluşan glikoz ve kalaktoz; laktoza göre daha kolay absorblanabilir, atlılıkları daha yüksektir ve kristalleşmeye yatkın değillerdir. Günümüzde laktozun enzimatik hidrolizi ile elde edilen ürünler yiyecek ve içecek sektörünün yanı sıra arıtma, geridönüşüm ve yenilebilir ürün üretiminde de

kullanılmaktadır. Enzimin kullanılacağı prosese göre farklı sıcaklıklarda stabilite gösterebilir olması önemlidir. Öyle ki termofilik ve mezofilik olarak yaygın olarak izole edilebilen bir enzim olduğu gibi enzimin izole edildiği kaynağa göre psikrofil özellikte gösterebilmektedir. Karasova ve arkadaşları (2002); Antarticadan izole ettikleri 21 laktik asit bakterisi arasından, psikrofil ve soğuk aktif β -galaktosidazın mikrobiyal kaynağını bulmaya çalışmışlardır. Bunlar laktozu hidroliz edebilme ve transglukosilasyon reaksiyonlarını katalize etme yeteneği açısından test edilmiştir. Laktik asit suşlar, % 0.01 X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid) ve indükleyici olarak 0,1 mM IPTG (izopropil-tiyo- β -D-galaktopiranosid) içeren besiyerinde 15 °C'de 3 gün inkübe edilip; β -galaktosidaz üreten kolonilerden protein izole edilmişler. β -galaktosidaz aktivitesini saptamak için HPCL (High Performance Liquid Chromatography) ile β -galaktosidazın transglukosilasyon aktivitesi üzerine deneyler gerçekleştirilmiştir. Belirlenen düşük sıcaklık (15°C) koşullarda test edilen örneklerden; 2 tanesi hiç gelişme göstermemiş, 1 tanesi çok yavaş gelişme göstermiş ve 13'ü X-gal'i hidrolize edememiştir. X-gal'i hidrolize edebilen 8 suş için, optimum sıcaklık ve düşük sıcaklıkta β -galaktosidaz aktivitesi test edilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* substratlarının, CH07, C2-2 ve C1-2a suşlarının düşük sıcaklıkta en yüksek β -galaktosidaz aktivitesini gösterdiği ve yüksek laktoz oranının aktiviteyi arttırdığını belirlemişlerdir.

Rekombinant DNA teknolojisi ve gen ekspresyonu yöntemleri ile spesifik olarak bir mikroorganizmada bulunan gen gölgesini klonlayarak taşıyıcı bir vektörde çok sayıda çoğaltabilmekteyiz. Ticari enzim üretimi yaparken hem kaynak mikroorganizmadan elde edilmek istenen enzimin protein olarak ifade edilebilmesi hemde belirlenen gen bölgelerinin moleküler düzeyde tanımlanabilmesi için çeşitli çeşitli vektörlere ve biyoinformatika araçlara ihtiyaç duymaktayız. Bu amaçla özellikle *E.coli* bakterisine ait suşlar büyük ölçüde genetik dizileri tanımlandığı, kolay temin edilebilir olması ve hızlı çoğalabildikleri için sıklıkla tercih edilebilmektedir. Bizde çalışmamızda *E.coli* pGEMT-Easy ve klonlama için de pQE40 vektöründen yararlandık.

SDS PAGE; proteinlerin saflık kontrolü, çeşitli protein konsantrasyonları ve molekül ağırlıklarının saptanması amacıyla birçok araştırmacının tercih ettiği denatüre edici bir jel elektroliz yöntemidir. Protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmasını

sağlamak için farklı jel konsantrasyonlarında elektroliz yapılabilmektedir. Bizim çalışmamızda da saflaştırma için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. %10 luk yürütme tamponu , %10'luk ayırma tamponu ve 50 µL amonyom persülfat ile süspanse edilerek hazırlanmıştır. Hung ve lee (2002); *Bifidobacterium infantis* HL96'dan β-galaktosidaz izoenzimini *Escherichia coli*'de rekombinant protein olarak sentezlemişlerdir. Klonlamada plazmit olarak *E. coli* ER2566. ER2566 (pEBIG1), ER2566 (pET24), ve JM109 (pBIG1)u kullanmışlar ve elde edilen proteinin SDS-PAGE analizine almışlardır. Bu ürünlerden Rekombinant plazmid olarak pEBIG1 kullanıldığında protein ifadesi daha belirgin olduğu için tamamen saflaştırma yapılmış ve saflaştırılmış β-Galaktozun spesifik aktivitesinin ham üründen 15,5 kat daha yüksek ve 568.7 U / mg olarak tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan literatür taraması gösteriyorki, mikrobiyal kaynaklı ve ekonomik değere sahip olan enzimlerin biyoteknolojiye kazandırılması yönünde oldukça fazla çalışma yapılmakta ve güngeçtikçe bunlara bir yenisi eklenmektedir. Farklı prosesler için farklı arayışlar içerisinde olan araştırmacılar özellikle her koşulda dayanabilen kendisi dışında aktive edici çok fazla ajan veya materyal gerektirmeyen geniş spektrumlarda aktivite gösterebilen kararlı yapıda ve geri kazanılabilen enzimlere ulaşmak istemektedirler. Yaptığımız çalışma ve buna paralel olan yayınlardan da anlaşılacağı gibi Termofilik kaynaklardan izole edilen B- galaktozidaz enzimi, elde edildiği mikrobiyal kaynağada bağlı olarak; geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı bir yapı göstererek aktivitesini sürdürebilmektedir. Kullanılan *Bacillus licheniformis* bakterisi de bu enzim için en uygun mikrobiyal kaynaklardan biri olarak görülmektedir. İlerleyen süreçte bu enzimin ticari olarak üretilmesi desteklenmeli ve bu ve bunun gibi ticari enzimler için ülke içerisinde bir pazar oluşturmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- [1.] Demir, M., Ergin, F., Küçükçetin, A., (2017), β -Galaktozidazın Süt Ürünleri Üretiminde Kullanımı, 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi, 10 – 11 Mart 2017, Ankara, 355-360
- [2.] Karasova, P., Spiwok, V., Mala, S., Kralova, B. and Russell, N. J., [2002): Beta-Galactosidase Activity in Psychrotrophic Microorganisms and Their Potential Use in Food Industry, Czech J. Food Sci., 20 (2), 43–47.
- [3.] Buluç, B., Yamaç, M., Altan, M., (2012), Dünya Dışı Ortamların Mikrobiyal Yaşanabilirlik Açısından Değerlendirilmesi, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi (Life Sciences and Biotechnology), 2 (2), 119-142.
- [4.] Akkaya, A., Pazarlıoğlu, N., Alper AKKAYA ve Nurdan PAZARLIOĞLU, 21.Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, Bornova-İZMİR
- [5.] Matsui, M., Matsufuji, M., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, Y. And Osajima, M., (1992), Inhibition of Angiotensin I-Converting Enzyme By Bacillus Licheniformis Alkaline Protease Hydrolizates Derived From Sardine Muscle, Biosci. Biotech. Biochem., 57 (6), 922-925.
- [6.] Karcıoğlu Batur, L., Aygan A., (2015), Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen Bacillus sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu, Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 5(2), 68-74.
- [7.] Gül Güven, R., (2011), Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi), 09 (1), 1-10.
- [8.] Akcan N., Baysal, Z., Pirinç Kabuğu Kullanılarak Katı Faz Fermantasyon Tekniği (KSF) İle Yabani Suş Bacillus licheniformis'ten β -Galaktosidaz Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresi, Azot ve Karbon Kaynaklarının Etkisi, 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak

- [9.] Deveci, R., (2006), Glikoz İzomeraz Enziminin Sıkıştırılmış Yatak Reaktörlerde Çalışma Kinetiklerinin İncelenmesi ve Karşılaştırılması ve Reaktörler Boyunca Fruktosa Dönüşüm Profillerinin Çıkarılması, Yüksek Lizans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [10.] Bingöl, A., (1998), Dondurulmuş Gıdaların Mikrobiyolojik Yönden İncelenmesi, Yüksek Lizans Tezi, İstanbul, İstanbul üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
- [11.] Çakıroğlu, B., (1985), Biyoteknolojideki Gelişmelerin Sanayiye Uygulamaları ve Türkiyedeki Durumu, Bİyoteknoloji Alanında Türkiye Araştırma Geliştirme Politikası, 47-51.
- [12.] Aytaç, F., (2012), β -Galaktozidazın Çeşitli Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lizans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [13.] Yıldırım, V., (2014), *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [14.] Torunoğlu Gedik, Ö., (2015), Türkiye'de Yenilenebilir Enerji Kaynakları ve Çevresel Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [15.] Karaağaç, S., Dönmez, S., (2004), Ekstrem Termofil Bakterilerin Protein Yapıları ve Termostabilizasyon Mekanizmaları , *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2 (4), 19-33.
- [16.] Fadiloğlu, S., Erkmen, O., (2004), Gıda Sanayiinde Enzimlerin Önemi, *GIDA*, 29 (5), 393-400.
- [17.] Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V. And Fredrickson, H.L., (1995), Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* Bas 50, *Applied And Environmental Microbiology*, 61 (5), 1706–1713.
- [18.] Turhan Bilgi, G., Meriçli Yapıcı, B. ve Bilgi, S. T., (2016), Phylogenetic indentification Of Two Extremely Halophilic Archeon Isolated Form Raw Hide

- And Investigation Of Their Lipolytic Activities, *Leather and Footwear Journal*,16 (4), 275-288.
- [19.] Kılıç, Y., (2013), *Laktobacillus ve Bifidobakterium Cinsi Bakterilerin Beta-Galaktozidaz enzim Aktiviteleri*, Yüksek lisans Tezi, Gazi üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [20.] Cruz, R., Cruz, V. D., Belote, J. G., Khenayfes, M. D. O., Dorta, M. D. O., Oliveira, H. L. S., (1999), *Properties Of A New Fungal β - Galactosidase With Potential Application In The Dairy Industry*, *Revista de Microbiologia*, 30, 265-271.
- [21.] Karasu, S., Durak, M. Z., Toker, Ö. S., (2015), *Gıda Biyoteknolojisi ve Biyoproseslerinde Yeni Gelişmeler*, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* , 2 (5), 161-164.
- [22.] Erem, F., Küçükçetin, A., Certel, M., (2013), *Bacillus Türlerinin Probiyotik Olarak Değerlendirilmesi*, *GIDA* 38 (4), 247-254.
- [23.] Eren(Kıran), Ö., Arıkan, B., *Bacillus sp. Suşlarında Antibiyotik, Selülaz ve Amilaz Üretiminden Sorumlu Genlerin Protoplast Transformasyon Tekniği ile Gr (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeninin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [24.] Şengel, B.Ş., (2007), *Deterjan Katkı Maddesi Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Lipaz Üretim koşullarının Araştırılması*, yüksek lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [25.] Held, P., (2007), *Kinetic Analysis of β -Galactosidase Activity Using the PowerWave™ HT and Gen5™ Data Analysis Software*, BioTek Instruments, Highland Park, Winooski, Vermont 05404-0998 USA.
- [26.] Adıgüzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce, M., Beldüz, A. O. And Barış, Ö., (2011), *Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey)*, *Turk J Biol*, 35, 267-274.
- [27.] Tanyolac, B., Kaya, H.B., Akkale, C., Soya, S., (2012), 16, *Bölüm Biyoteknoloji ve Biyoinformatik*, Ege Üniversitesi, 600- 655.

- [28.] Gözükara, F., Arıkan, B., (2012), Termofil Bacillus sp. Bakterisinden Lichenaz (β -1,3 VE 1,4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği, Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 27(5), 121-127.
- [29.] Haliskaranfil, S., Arıkan, B., (2012), Termoalkalifik Amilaz ve Selülaz Enzim (Multienzim) Üreticisi Bacillus Sp. İzolasyonu, Enzimlerin Karakterizasyonu, ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği, Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 28 (3), 37-46.
- [30.] Ömerosmanoğu, D., (2017), Protein Alerjisine Neden Olmayan İnek Sütü Üretimi İçin Bacillus Licheniformis Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Siirt üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Siirt.
- [31.] Kalkan, S., (2006), Çiğ Sütte Bacillus Cereus Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [32.] Kuzu, S. B., (2008), Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [33.] Şener, A., Ünal, M. Ü., (2006), Enzim Stabilizasyonu, Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 81-84.
- [34.] Topal, Ş., (1985), Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri, GIDA, 10 (1), 25-37.
- [35.] MEGEP, (2011) Enzimlerin Özellikleri (Gıda Teknolojisi), Ankara.
- [36.] Rey, M., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpın, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, J. M., Leon, A. L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, G., Ehrlich, S.D., and Berka, R. M., (2004), Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species, Published, Genome Biology, 5:R77, USA.

- [37.] Ateş,S., (1993), İmmobilize Enzimler ve Besin Endüstrisinde Kullanılması, GIDA, 18 (2),129-130.
- [38.] Golden, K. J., And Bernlohr R. W., (1985), Nitrogen Catabolite Repression of the L-Asparaginase of *Bacillus licheniformis*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 164 (2), 938-940.
- [39.] C.S. Kim, E.-S. Ji and D.-K. Oh, Characterization of a thermostable recombinant b-galactosidase from *Thermotoga maritima*, Journal of Applied Microbiology, 97, 1006–1014.
- [40.] Otieno, D. O., (2010), Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010 (9), 471-482.
- [41.] Karakoç, D. S., (2006),Küflerden Katı Faz Fermantasyon Yöntemi İle Lipaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [42.] Koç, M., (2013), *Geobacillus* Türlerinde Termotabil Lipaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [43.] Podlessek, Z., And Grabnar, M., (1987), Genetic Mapping of the Bacitracin Synthetase Gene(s) in *Bacillus licheniformis*, Journal of General Microbiology, Printed in Great Britain, 133, 3093-3097.
- [44.] Yılmaz, M., (2013), Prebiyotikler, Prebiyotikler ve İnsan Sağlığı açısından Kullanım Alanları, Lisans Tezi,Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
- [45.] Sarigül, N., (2007), Ege Bölgesindeki Çeşitli Sıcak su Kaynaklarından *Thermus* Genusu Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler yöntemlerle Dentrifikasyonu ve β -Galaktozidaz Aktivitesinin Saptanması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [46.] Kahraman, Ö., (2008), Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, Dentrifikasyonu ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Ekstraselüler Enzimlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- [47.] Ayyıldız, A., (1999), Characterization of Catalytic Phenotype of b- Galactosidase From LacI Mutant, E. Coli CSH-36, as a Tool For The Management of Lactose Intolerance, Tr. J. of Medical Sciences, 29 (1999), 521–527.
- [48.] Dağbaşı, S., (2009), Beta- Galaktozidaz Enzim Üretimini Optimizasyonu ve Saflaştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [49.] Ramos-Valle, M., (2013), GRAS Exemption Claim for BbgIV Beta-galactosidase Enzyme Preparation, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, Pittsburgh-United States.
- [50.] Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., Cansaran-Duman D., (2015), Lakkaz Enziminin Endüstriyel ve Biyoteknoloji Alanında Kullanımı, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72(4), 351-368.
- [51.] Er, B., Sarımehtemloğlu, B., (2009), Süt Endüstrisinde Mikrobiyal enzim Kullanımı, Veteriner Hekim Derleme Dergisi, 80(1), 25-30.
- [52.] Ferrero, M. A., Castro, G. R., Sineriz, F., (1996), Thermostable alkaline proteases of Bacillus licheniformis MIR 29: isolation, production and characterization, Appl Microbiol Biotechnol, 45(1996), 327-332.
- [53.] Aytan, T., (2011), İnsülinin Biyoteknolojik Üretimi, Lisans Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
- [54.] Tosun, H., www2.bayar.edu.tr/muhendislik/gida/docs/databank/biyotek1. (Erişim tarihi: Kasım 2015)
- [55.] Özşahin, A.D., (2006), Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan Bacillus Sp. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Maraş.
- [56.] Gürsoy, A., (2015), Süt Kimyası ve Biyokimyası, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [57.] Tarakçı, Z., Küçüköner, E., (2005) , Laktoz, Laktoz Türevleri ve Gıda Sanayiinde Kullanımı, GIDA , 30 (4), 261-267

- [58.] Demirhan, E., (2007), Preynir Altı Suyundan Elde Edilen Laktozun Enzimatik Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellenmesi, yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [59.] Akgül, F. B., (2010), β - Galakzidaz Enzimi ile Yağsız sütte Laktoz Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.İstanbul.
- [60.] <https://www.flickr.com/photos/2> (Date Taken: 2014-08-29), http://zipcodezoo.com/index.php/File:Bacillus_licheniformis_0.jpg (Erişim Tarihi; 2017)
- [61.] <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Bacillus.jpg>,(Erişim Tarihi; 2017)
- [62.] Kemp, Andre., Oxford Scientific, Getty Images <http://biyologlar.com/bakteriler-hakkinda-bilmedigimiz-seyler?page=1>, (Erişim Tarihi; 2017).
- [63.] <http://www.biyolojidersnotlari.com/holoenzim>, (Erişim Tarihi; 2017).
- [64.] Kuduğ, H., Mikrobiyal Kaynaklı Selüloz E.coli’de Rekombinant Olarak üretilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- [65.] Tatar, S., ‘ Termofil Moderately Halofilik Bacillus Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması’, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- [66.] Sümengen, M., ‘Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları’, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- [67.] Fadiloğlu, S., Erkmen, O., ‘Gıda Sanayiinde Enzimlerin Önemi’, Gaziantep Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, GIDA (2004) 29 (5) 393-400, 2004.
- [68.] Eren Kıran, Ö., vd. , ‘Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları’ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi ,Biyoloji Bölümü, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1), 2006.

- [69.] Özcengiz, G., ‘Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri’, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Avrasya Dosyası, Özel Cilt: 8, Sayı: 3, s. 104-119, 2002
- [70.] Topal, Ş., ‘Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknoloji de Rennin’in Yeri’, TUBİTAK Marmara Araştırma Enstitüsü, Gebze – Kocaeli, 1985.
- [71.] Yılmaz, F., (2017), Bitkisel Üretimde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalara Yönelik Türkiye İçin Politika Öncelikleri ve Tedbirler, , 1. Tarım ve gıda etiği kongresi, 10 – 11 Mart 2017, Ankara, 299-305.
- [72.] Öziç, C., (2012). Bazı Orthrias (Çöpçü Balığı) Türlerinin Biyoinformatik ve Deneysel karakterizasyonu. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [73.] Brown, T.A., (2013). Gene Cloning and DNA Analysis. Fifth Edition, Blackwell Publishing, Manchester, 37-80.
- [74.] Uluçay, O., (2018). Termal Kaynaklardan izole Edilen Çeşitli Bacillus Türlerinden 1,4-β-Endo Ksilenz Enziminin Üretilmesi, Saflaştırılması ve Ticari Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Doktora Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [75.] Kaplan, A., Güven, G.R., Güven, K. (2013). Yeni İzole Edilen Bacillus licheniformis KG9’den β-Galaktozidazın Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi, 3 (2), 39-51.
- [76.] Güven, R.G. (2011). Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi). 9 (1), 1-10.
- [77.] Bıyık, H. ve Başbülbul, G., (2001). Aydın Yöresi Jeotermal Sularındaki Termofilik Bakterilerin İncelenmesi. <http://194.27.38.21/web/catalog/info.php?idx=32898702&idt=1>, (12.05.2019).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif Gizem COŞGUNARAS
Doğum Yeri ve Tarihi : KARS-11.08.1991
Yabancı Dili : İntermediate
İletişim (e-posta) : elifgizemcosgunaras@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kars Cumhuriyet Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi - 2008
Lisans : Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri
Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü - 2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

SER-SÜT San. Tic. A.Ş. Peynir altı Suyu Arıtma Tesisi; 2013-2016

- Peynir altı suyundan WPC Protein Tozu (WPC 70) ve Bioethanol Üretimi Ar-Ge ve laboratuvar çalışmalarını yaptım. Ayrıca eski kaşar, gravyer ve lor Peyniri üretim tesisinin kalite kontrol sorumlusu olarak çalıştım.

Haydar Aliyev Teknik ve Anadolu Meslek Lisesi -Gıda Teknolojisi Bölümü; 2015-2016

- Gıda Kimyası, Gıda Mikrobiyolojisi ve Gıda İşleme Teknolojileri Dersi öğretmenliği yaptım.

Kafkas Üniversitesi Merkezi Kafeteryası; 2017-devam ediyor

- Gıda Mühendisi olarak gıda kalite kontrolü ve uygulanmasını sağlamak için çalışıyorum.

Bunlara ilave olarak 2017 yılından beri serbest olarak, şimdiye kadar 8 firmanın olmak üzere, BRC Food Ver.8 ve ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemlerinin danışmanlığını yapmaktayım.

Yayınları (SCI ve diğer) :