



YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hypocrea Jec. Qm9414 Kült. Beta Gal. Kar. ve Kısmi Safı.

Yüksek Lisans Tezi

NİLAY ALTAŞ

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
KÜTÜPHANE VE DOKÜMANTASYON
DAİRE BAŞKANLIĞI

Yer No (DDC): R 361-547

Kayıt No

3974

Goldığı Yer

Pen Bilim Inst.

Tarih

13.05.08

Fiyat

3.751-

Fatura No

Ayniyat No

Ek

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

XI-67

**HYPOCREA JECORINA QM9414 KÜLTÜRLERİNDE
BETA GALAKTOZİDAZİN KARAKTERİZASYONU
VE KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI**

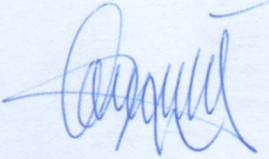
567

Kimyager Nilay ALTAŞ KIYMAZ

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

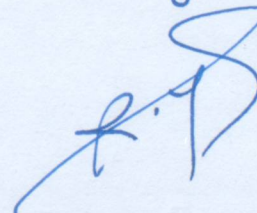
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Yard. Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL (YTÜ)

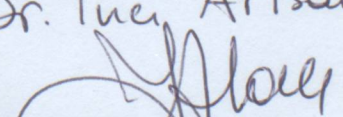


Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Peksel

Prof. Dr. Refiye Yanard



İSTANBUL, 2007

Prof. Dr. İnci Arısan - Ak


İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTIMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GALAKTOZİDAZLAR	5
2.1 α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22)	5
2.1.1 α -Galaktozidazın Etki Mekanizması.....	6
2.1.2 α -Galaktozidazın Kullanım Alanları.....	7
2.2 β -Galaktozidaz (EC 3.2.1.23)	8
2.2.1 β -Galaktozidazın Özellikleri.....	9
2.2.2 β -Galaktozidazın Etki Mekanizması.....	11
2.2.3 β -Galaktozidazın Endüstride Kullanımı	13
2.2.4 β -Galaktozidaz ile İlgili Çalışmalar	17
3. LAKTOZ	23
3.1 Laktoz Hidrolizi	23
3.2 Laktozun Kullanım Alanları	27
3.3 Laktoz Metabolizması.....	28
3.3.1 Laktoz Sentezi.....	28
3.3.2 Laktoz Sentezinin Hormonal Kontrolü.....	29
3.3.3 Galaktoz Metabolizması	29
3.3.3.1 Galaktozun Fosforilasyonu	29
3.3.3.2 UDP-Galaktoz Oluşumu	29
3.3.3.3 UDP-Glukoz Oluşumu.....	30
3.3.3.4 Galaktoz Metabolizması Bozuklukları	31
4. SUŞ	32
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
5.1 Kullanılan Materyaller	35
5.1.1 <i>Hypocrea jecorina</i> QM9414.....	35

5.1.2	Kullanılan Kimyasallar	35
5.1.3	Kullanılan Cihazlar	37
5.2	Metodlar	38
5.2.1	Kültür Ortamı	38
5.2.1.1	Saf Kültür Ortamı	38
5.2.1.2	Enzim Üretim Ortamı	39
5.2.2	Spor Çözeltilisinin Hazırlanması	39
5.2.3	β -Galaktozidaz Aktivitesinin Tayini.....	39
5.2.4	ONP Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi	41
5.2.5	Protein Tayini	41
5.2.6	Bovine Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi.....	42
5.2.7	Kültür Ortamında β -Galaktozidaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi	43
5.2.7.1	β -Galaktozidaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması	43
5.2.7.2	Laktozun Farklı Konsantrasyonlarının β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması	43
5.2.7.3	Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	43
5.2.7.4	pH'nın β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	43
5.2.7.5	Sıcaklığın β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	43
5.2.8	Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	43
5.2.8.1	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması.....	44
5.2.8.2	Protein Miktarının Hesaplanması	44
5.2.9	β -Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması	44
5.2.9.1	<i>H. jecorina</i> QM9414 Hücrelerinden Hücre içi β -galaktozidaz Eldesi.....	44
5.2.9.1.1	Kimyasal Yöntem	45
5.2.9.1.1.1	Toluenle Ekstraksiyon	45
5.2.9.1.1.2	Etanol-Kloroform (9:1; v/v) ile Ekstraksiyon.....	45
5.2.9.2	<i>H. jecorina</i> QM9414 Hücrelerinden Hücre Dışı β -galaktozidaz Eldesi	46
5.2.9.2.1	Aseton Çöktürmesi	46
5.2.9.2.2	Amonyum sülfat Çöktürmesi.....	46
5.2.9.2.2.1	<i>H. jecorina</i> QM9414 β -galaktozidazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması	46
5.2.9.2.2.2	<i>H. jecorina</i> β -galaktozidazının % 70 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi.....	47
5.2.9.2.3	Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi	47
6.	SONUÇLAR.....	49
6.1	Kültür Ortamında β -Galaktozidaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi	49
6.1.1	β -Galaktozidaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresi.....	49
6.1.3	Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının β -galaktozidaz Üretimine Etkisi	51
6.1.4	pH'nın β -galaktozidaz Üretimine Etkisi	53
6.1.5	Sıcaklığın β -galaktozidaz Üretimine Etkisi	54
6.2	β -Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması	56
6.2.1	<i>H. jecorina</i> QM9414 Hücrelerinden Hücre içi β -galaktozidaz Eldesi.....	56
6.2.2	<i>H. jecorina</i> QM9414 Hücrelerinden Hücre dışı β -galaktozidaz Eldesi.....	57
6.2.2.1	Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi	57
7.	TARTIŞMA	60

KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
μmol	mikromol
M	Molar
N	Normalite
nm	nanometre
A	Absorbans
U	Ünite
mg	miligram
R ²	Regrasyon katsayısı
C	Konsantrasyon
α	Alfa
β	Beta

KISALTIMA LİSTESİ

ORF	Open reading frame
Pki-1	Pirüvat kinaz
rBgIAp	Rekombinant β -galaktozidaz
EPSc	Ekzopolisakkarit
ONPG	O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
ONP	O-nitrofenil
BSA	Bovine serum albumin
GH	Glikohidrolaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 α -D-Galaktoz	5
Şekil 2.2 Rafinoz	5
Şekil 2.3 Melibiyozun hidroliz reaksiyonu.....	6
Şekil 2.4 Laktoz	8
Şekil 2.5 p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid	8
Şekil 2.6 β -Galaktozidazın etki mekanizması	11
Şekil 2.8 β -D-galaktopiranozidlerin alkollerinin oluşumu	12
Şekil 3.2 Galaktoz metabolizması	30
Şekil 4.1 <i>Trichoderma reesei</i> 'nin üreme döngüsü	32
Şekil 4.2 <i>H. jecorina</i> 'nın genel görünümü	33
Şekil 4.3 <i>H. jecorina</i> 'da D-galaktoz metabolizması.....	34
Şekil 5.1 ONPG'nin hidroliz reaksiyonu.....	40
Şekil 5.2 ONP standart eğri grafiği.....	41
Şekil 5.3 BSA standart eğri grafiği.....	42
Şekil 6.1 β -Galaktozidaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi	49
Şekil 6.2 İnkübasyon süresinin β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi	50
Şekil 6.3 β -Galaktozidaz aktivitesinin laktoz konsantrasyonuna göre değişimi	50
Şekil 6.4 Laktoz konsantrasyonunun β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi.....	51
Şekil 6.5 β -Galaktozidaz aktivitesinin statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarına göre değişimi	52
Şekil 6.6 Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi	52
Şekil 6.7 β -Galaktozidaz aktivitesinin pH'ya göre değişimi	53
Şekil 6.8 pH'nın β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi.....	54
Şekil 6.9. β -Galaktozidaz aktivitesinin sıcaklığa göre değişimi	55
Şekil 6.10 Sıcaklığın β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi	55
Şekil 6.11 Toluen ile ekstraksiyonun hücre içi β -galaktozidaz aktivitesine etkisi	56
Şekil 6.12 Etanol-kloroform ile ekstraksiyonun hücre içi β -galaktozidaz aktivitesine etkisi ..	56
Şekil 6.13 <i>H. jecorina</i> homojenatının % 70 amonyum sülfat kesitinin hidroksilapatit kolon kromatografisi elüsyon grafiği.	58

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1 Endüstride kullanılan bazı enzimler	4
Çizelge 2.1 Farklı kaynaklardan izole edilmiş β -galaktozidazın özellikleri.....	10
Çizelge 2.2 Yaygın olarak kullanılan β -galaktozidaz kaynakları	16
Çizelge 3.1 İmmobilize β -galaktozidaz sistemleri.....	26
Çizelge 5.1 Kullanılan Kimyasallar	35
Çizelge 5.1 (Devam)	36
Çizelge 6.1 <i>H. jecorina</i> QM9414 Kültürlerinden β -galaktozidazın elde edilme evrelerinin β -galaktozidaz aktivitesine göre incelenmesi	59

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında engin bilgisi ve yapmış olduğu değerlendirmeleri ile beni yönlendiren, yardım eden ve beni destekleyen değerli hocam tez danışmanım SayınYard. Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e;

Akademik kariyerime adım atmamı sağlayan, tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. İnci ARISAN'a;

Çalışmamda kullanmış olduğum hidroksilapatitin temin edilmesini sağlayan İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Refiye Yanardağ'a;

Gerek deneysel çalışmalarım gerekse özel yaşamımda bana destek veren sevgili çalışma arkadaşım ve hocam Arş. Gör. Nurdagül ORHAN'a;

Tezimin hazırlanması için maddi olanak sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tezimin hazırlanma aşamasındaki bu zorlu süreçte de ilgi ve desteklerini yanımda hissettiğim sevgili dostlarım Senem AKKUŞ ve İrem KULU'ya;

Tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek beni bugünlere getiren biricik annem Kadriye ALTAŞ ve babam Atilla ALTAŞ'a, bana her konuda yardımcı olarak desteğini her zaman hissettiren canım ağabeyim Ender ALTAŞ'a;

Ve bir ömrü paylaşmak için yaşamıma girerek hayatıma anlam katan, en kötü anlarımda dayanma gücü veren can yoldaşım, sevgili eşim Olcay KIYMAZ'a ;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Nilay ALTAŞ KIYMAZ

ÖZET

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve yaşayan tüm hücrelerde bulunan protein molekülleridir.

β -Galaktozidaz (β -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23), laktozu monosakkarit birimleri glukoz ve galaktoza hidrolizleyen enzimdir. β -Galaktozidaz, dondurulmuş konsantre tatlılardaki peyniraltı suyu atığı laktozun hidrolizinde ve dünya genelinde süt tüketimine bağlı olarak görülen laktoz intoleransının giderilmesinde kullanılmaktadır. β -Galaktozidaz eksikliği tüm popülasyonun yaklaşık %70'inde görülen bir problemdir. β -Galaktozidaz laktozu yan reaksiyonlar olmadan hidrolizlemektedir.

Ticari β -galaktozidazlar *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* ve *Eschericia coli*'den saflaştırılmıştır. Süt ve peyniraltı suyu gibi süt ürünlerindeki laktozun hidrolizi son yıllarda çok ilgi çekici bir konu haline gelmiştir. β -Galaktozidazlar, galaktozil transfer reaksiyonlarını katalizleyerek belli oligosakkaritlerin sentezini gerçekleştirmektedir.

Hypocrea jecorina QM9414 selülitik ve hemiselülitik enzimlerin üretimi için endüstriyel olarak kullanılan bir küfdür.

Bu çalışma ile *H. jecorina* QM9414'den β -galaktozidaz indüksiyonunun optimum koşullarının saptanması amaçlanmıştır. Mikroorganizmadan enzimin kısmi saflaştırılması gerçekleştirildi.

Anahtar kelimeler: *Hypocrea jecorina*, β -galaktozidaz, laktoz, kısmi saflaştırma

ABSTRACT

Enzymes are protein molecules that catalyse a biochemical reaction and found in all living cells. They are usually obtained from plants, animals and microorganisms.

β -Galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23, the enzyme that hydrolyzes lactose into its component monosaccharide units of glucose and galactose.

β -Galactosidase can be used in solving the problems associated with whey disposal lactose crystallization in frozen concentrated desserts and milk consumption by lactose-intolerant populations of the world. β -Galactosidase deficiency is a wide spread problem occurring in approximately 70% of the world's population. β -Galactosidases are able to hydrolyse lactose without side reactions.

Commercial β -galactosidases have been purified in particular from *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* or *Escherichia coli*. Its application to the hydrolysis of lactose in dairy products, such as milk and cheese whey, has received much attention in the last years. β -Galactosidases are capable of catalyzing synthesis of certain oligosaccharides via the galactosyl transfer reaction.

The *Hypocrea jecorina* QM9414 is a fungus and industrially applied for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes.

The objectives of this thesis are to determine the optimum conditions for β -galactosidase induction and partial purification of the enzyme from *H. Jecorina*.

Key words: *Hypocrea jecorina*, β -galactosidase, lactose, partial purification.

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörlerdir. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle enzimlere ilişkin tüm nicelik ve özellikleri bir bütün olarak inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizikokimya, bakteriyoloji ve mikrobiyoloji, genetik, botanik ve tarım, farmokoloji ve toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik, biyomühendislik gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük bir önem taşımaktadır.

Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden, ekmek, peynir, bira, şarap vb. Maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanmışlardır. Bu gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. Hücre dışı bir aktivitenin olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmacanın mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek kanıtlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi, enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir.

Payen ve Persoz'un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termobil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri olmuştur. Bugün amilaz olarak bilinen bu enzim o günlerde diastaz olarak adlandırılmış ve günümüzde enzimlere ilişkin pek çok geleneksel ve tüm sistematik adlandırmalardaki -ase eki kaynağını bu çalışmadan almıştır.

Enzimlerin keşfinin başladığı ilk yıllarda pek çok araştırmacı fermantasyon olaylarında mayalar ve etkilerini göz önüne aldıkları için enzimleri tanımlamaya yönelik olarak ferment terimini kullanmışlardır. Enzimler için "katalizör" sözcüğü ilk kez 1838 yılında Berzelius tarafından, "enzim" sözcüğü ise 1878 yılında Kühne tarafından kullanılmıştır.

Çağdaş enzim kimyası çalışmaları, enzimatik reaksiyonlarla ilgili, Michelis-Menten varsayımı ve Summer tarafından 1926 yılında üreazın izolasyonu ile başlamıştır. Proteinlerin saflaştırılması ve yapılarının aydınlatılması ile ilgili yeni kimyasal ve fiziksel teknikler geliştirildikten sonra 1953'de insülinin aminoasit dizisinin saptanması, bundan beş yıl sonra 124 aminoasitten oluşan ribonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması ve 1969'da

Merrifield ve çalışma arkadaşlarının biyolojik aktivite gösteren ribonükleazı kimyasal sentez yoluyla elde etmeyi başarmaları enzimolojinin gelişmesine büyük katkı sağlamıştır.

Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizliyor olmaları, onların ayrıntılı enzimolojik araştırmaların paralelinde, çeşitli pratik uygulamalarda da kullanımlarını gündeme getirmiştir.

Katalizör, aktivasyon enerjisini düşürerek geçiş haline varmayı kolaylaştırır ve geçiş halinin kararlılığını arttırarak reaksiyonu hızlandırır. Bir denge reaksiyonu söz konusu ise dengeye varmayı çabuklaştırır. Bir enzim de bunu substrat bağlama merkezlerinin spesifikliği ve katalitik grupların optimal düzenlenişi sayesinde başarır.

Endüstriyel katalizör olarak enzimlerin klasik kimyasal katalizörlere aşağıdaki üstünlükleri vardır.

- İleri derecede substrat spesifikliği, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu büyük ölçüde elimine etmekte ve sadece materyal maliyetini düşürmekle kalmayıp çevre sorunu da yaratmamaktadır.
- Bazı stereospesifik reaksiyonlar enzimlerin yardımı olmaksızın gerçekleştirilemezler.
- Operasyon koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır ve operasyonun korozyon etkilerini ve enerji gereksinmesini düşürür.
- Reaksiyon hızı yüksektir.

Bir enzimden herhangi bir alanda yararlanabilme imkanı büyük ölçüde ekonomik parametrelerle ilgilidir. Enzimler canlı materyallerden elde edilmek zorundadırlar. İzolasyon ve saflaştırma işlemleri çok emek gerektiren pahalı proseslerden oluşmaktadır. Bu nedenlerden dolayı enzimler genellikle pahalı materyallerdir.

Enzimlerin eldesinde genellikle bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler bilimsel ve ticari önemlerine karşın büyük miktarlarda elde edilemezler. Özellikle bitkisel kaynaklı enzim aktivitesinin çoğu kez mevsimlere bağımlı olması, ayrıca diğer ekonomik ve çevresel faktörler, bunların endüstriyel enzim üretiminde kullanılmalarını sınırlar. Bu nedenle enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanılması gittikçe artan önem kazanmaktadır. Mikroorganizmaların çok hızlı büyüme ve üreme güçleri dolayısıyla aktivitelerinin çok fazla olması, fermentasyonun kısa sürmesi ve fermentasyon ortamlarının hazırlanmasındaki maliyet düşüklüğü nedeniyle büyük ölçekteki fermentasyon işlemlerinin ekonomik olması, endüstriyel enzim üretiminde mikrobiyal kaynakların kullanılmasını arttırmıştır.

Son yıllarda biyoteknoloji uygulamalarındaki hızlı gelişmeler ve rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması ile enzimlerin daha ekonomik ve etkin tekniklerle üretilmesi mümkündür. Uygulanan modern teknikler ile seçilen mikroorganizmanın enzim üretim düzeyi artırılabilir. Bu amaçla ya enzimi kodlayan genin kopya sayısının artırılmasına ya da genin güçlü bir promotörün kontrolünde ekspresyonunun gerçekleşmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Enzimlerin ticari olarak kullanımlarında, kullanım alanlarına göre özellikleri, dolayısıyla miktar ve maliyetleri önemli değişiklikler gösterir. Her bir alanda kullanılan enzimlerin fiyatları beklenen özelliklerine göre birkaç dolardan birkaç bin dolara kadar değişebilmektedir. Genelde tonlar düzeyinde kullanılan endüstriyel enzimlerin saflık düzeyleri düşük olduğu için fiyatları da düşük olmaktadır. Bunun yanı sıra gram ve miligram düzeyinde kullanılan bilimsel ve analitik enzimler yüksek saflık düzeyinde oldukları için yüksek fiyatlarla pazarlanmaktadır.

Enzimlerin katalitik potansiyeli ve tabiatı anlaşıldıktan sonra, endüstri bu çok faydalı maddelerden geniş ölçüde yararlanmaya başlamıştır. Enzimlerin uygulama alanlarının her geçen gün artması enzimlerin daha ekonomik, daha etkin tekniklerle üretilmesini daha da önemli kılmıştır. Bu nedenle de büyük ölçekli enzim üretim tesislerinin kurulması ve optimizasyonu çalışmaları son yirmi yıldan beri gündemdedir. Enzimlerin aminoasitlerden kimyasal sentezleri teorik olarak mümkün olsa da, pratikte uygulanabilirliği çok sınırlı olup ekonomik değildir. Bugün ticari olarak satılan tüm enzimler biyolojik kaynaklardan, büyük ölçüde mikroorganizmalardan izole edilmektedir ve endüstriyel uygulama olanağı bulmuş mikrobiyal bu enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfındadır.

İzole edilmiş enzimler, kendilerini içeren mikroorganizmalara çoğu kez tercih edilmektedirler. Çünkü, izole enzimler daha spesifik olarak etki etmekte, potansiyelleri daha iyi standardize edilmekte, satış ve saklama için kolaylıklar sağlamaktadırlar. Çizelge 1.1'de endüstride yaygın olarak kullanılan bazı enzimler verilmiştir (Telefoncu A.,1997).

Çizelge 1.1 Endüstride kullanılan bazı enzimler

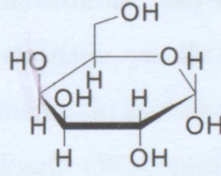
Enzim	Uygulama Alanı
Lipazlar	Yağların parçalanması ve interesterifikasyon
Rennin, pepsin	Peynir üretimi
Çeşitli proteazlar	Sindirime yardımcı, dericilik
Papain	Etin gevrekleştirilmesi
Papain, fisin, bromelain	Biranın soğuğa dayanıklılığının artırılması
Tripsin, papain, fisin, pepsin	Balık pres suyu vizkozitesinin düşürülmesi
Amilaz, pullulanaz	Nişasta hidrolizi
İnvertaz	Sakkaroz inversiyonu
Pektinazlar	Meyve suyu, sirke ve şarap berraklaştırılması
Nükleazlar	Lezzet kontrolü
Diğer hidrolitik enzimler	Besin maddesinden istenmeyen ve toksik bileşiklerin uzaklaştırılması
Oksidazlar	Oksidasyonun önlenmesi ve besin maddelerinde renk kontrolü
Pronoz, amino peptidaz	Amino asit üretimi
Laktaz (β-galaktozidaz)	Peynir atık suyu ve sütteki laktozun hidrolizi
Selülaz	Selüloz hidrolizi
Amiloglukozidaz	Dekstroz üretimi
Aminoaçılaz	Aminoasit rasemik karışımlarının ayrılması
Penisilin amidaz	Penisilin üretimi

2. GALAKTOZİDAZLAR

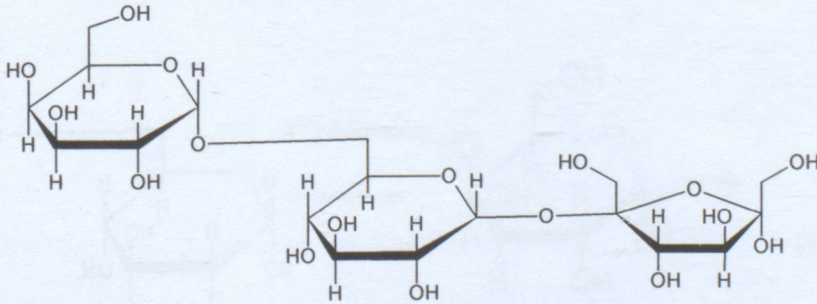
Galaktozidazlar, galaktoz ve galaktozdan farklı bir diğer şeker molekülü arasındaki glikozidik bağı koparan enzimlerin bir sınıfını oluştururlar. Hidrolazların glikozilazlar alt sınıfının glikozidazlar grubunda yer alırlar. Glikozidik bağın α - veya β - çeşidine etki etmelerine göre α -galaktozidazlar ve β -galaktozidazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar (1).

2.1 α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22)

α -Galaktozidaz (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, melibiyaz, α -D-galaktozidaz α -D-galaktozidaz A) α -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaridlerdeki indirgen olmayan terminal uçtaki α -(1 \rightarrow 6) bağlı α -D-galaktozil kalıntılarını katalizleyen bir ekzoglikozidazdır. Rafinoz ailesi şekerlerinden rafinoz, stakiyoz, melibiyoz, verbaskoz gibi oligosakkaritler ile galaktomannan, deve kemiği zankı ve B kan grubu polisakkaritleri gibi substratlar üzerinde etki göstermektedirler. Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de α -D-galaktoz ile α -D-galaktozil grubu içeren bir trisakkarit olan rafinozun Haworth görünümü gösterilmiştir.



Şekil 2.1 α -D-Galaktoz



Şekil 2.2 Rafinoz

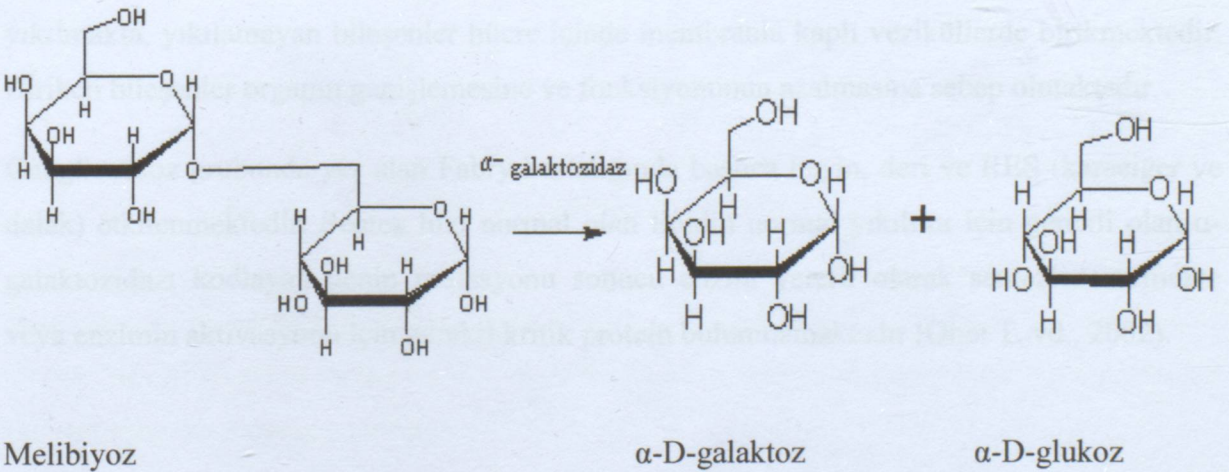
Ayrıca glikokonjugatlar, glikoproteinler ve glikosfingolipidler üzerinde de etkilidirler. Bazı α -galaktozidazlar yüksek substrat konsantrasyonlarında transgalaktozilasyon reaksiyonlarını da katalizlemektedirler (Christakopoulos vd., 1990; Gote vd., 2006).

α -Galaktozidaz, bir lizozomal glikozidazdır. Epididimis, seminal kabarcıklar, uterus, mesane, nefes borusu, bronşlar, tiroid bezi ve sinir hücrelerinde yüksek aktivite gösterir. Lizozomal α -galaktozidazın optimum pH değeri 5 olarak bilinir. α -Galaktozidaz, kompleks karbohidratların derecelerini düşürmede rol oynamaktadır. Bazen yüksek aktivite gösterdikleri organların lizozomları, örneğin uterus, beyin ve epididimis lizozomları sınırlandırmış olabilir. α -Galaktozidazın ekstralizozomal reaksiyonları enzimin dağılmasına neden olabilir. Aynı zamanda reaksiyon ürünlerinden veya hücre içindeki sitoplazma lizozomlarındaki diğer enzimlerden de dağılma olur.

2.1.1 α -Galaktozidazın Etki Mekanizması

α -Galaktozidazın etki tarzı ile ilgili farklı mekanizmalar ileri sürülmüştür. α -Galaktozidaz substrat molekülünün glikozidik bağıını hidroliz eder ve substratla aynı anomerik konfigürasyonu gösteren galaktozil kalıntılarını meydana getirir. Farklı kaynaklardan izole edilen α -galaktozidazların hidrolitik etkisinin ya aktif bölgesindeki karboksil ve imidazol gruplarından ya da aktif bölgesinde bulunan iki karboksil, birer tirozin ve triptofan gruplarının bulunmasından ileri geldiği açıklanmaktadır (Wallenfels ve Malhotra, 1961).

α -Galaktozidaz enziminin substrat olarak melibiyoz kullandığı genel reaksiyon Şekil 2.3'de gösterilmiştir (2).



Şekil 2.3 Melibiyozun hidroliz reaksiyonu

2.1.2 α -Galaktozidazın Kullanım Alanları

Biyoteknoloji ve tıpta kullanılabilirliğinin yüksek olması sebebiyle α -galaktozidazlara büyük ilgi duyulmaktadır. Endüstriyel alandaki en büyük uygulamaları şeker pancarından şeker üretimi, kağıt hamurunun işlenmesi ve kağıt endüstrisi, soya ürünlerinin üretimi ile hayvan yemi üretimidir (Gote vd., 2006).

Şeker pancarının işlenmesi sürecinde, kristalizasyon basamağında meydana gelen rafinoz inhibisyonunu önlemek amacıyla α -galaktozidaz tarafından katalizlenen rafinoz degradasyonundan yararlanılmaktadır.

Barsaklarda işlev bozukluğu, şişkinlik gibi sorunlara sebep olan, baklagillerde bulunan rafinoz ve stakioz oligosakkaritlerinin hidrolizi α -galaktozidazın bir başka uygulama alanıdır.

α -Galaktozidaz, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde ksilanaz ile birlikte ağartma işlemlerinde kullanılmaktadır.

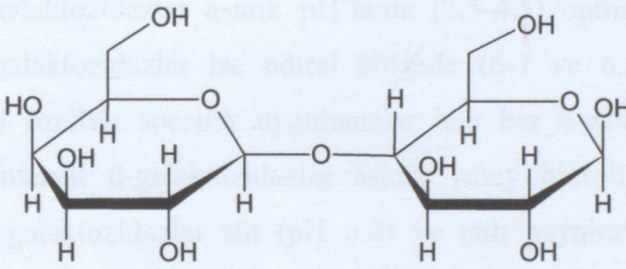
Ucuz jelleştirme ajanı olarak kullanılan guar zambını, deve kemiği zambını gibi daha etkin bir jelleştirici ajana dönüşümü, guar polisakkaritinden α -galaktozidazın katalizlediği bir reaksiyonla bazı galaktozil birimlerinin uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Shankar ve Mulimani, 2007).

Lizozomal glikozidaz olan α -galaktozidaz tıp alanında, matriks moleküllerinin yıkılımı ile ilgili lizozomal enzimlerin eksikliğinde ortaya çıkan bir depo hastalığı olan fabry hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalıkta proteoglikanlardan karbohidratlar kısmi olarak yıkılmakta, yıkılamayan bileşenler hücre içinde membranla kaplı veziküllerde birikmektedir. Biriken bileşenler organın genişlemesine ve fonksiyonunun azalmasına sebep olmaktadır.

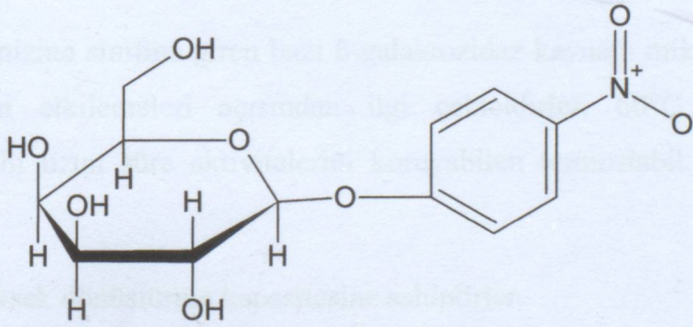
Gangliozidoz grubunda yer alan Fabry hastalığında başlıca beyin, deri ve RES (karaciğer ve dalak) etkilenmektedir. Sentez hızı normal olan lipidin normal yıkılımı için gerekli olan α -galaktozidazı kodlayan genin mutasyonu sonucu enzim yeterli olarak sentezlenememekte veya enzimin aktivasyonu için gerekli kritik protein bulunmamaktadır (Onat T. vd., 2002).

2.2 β -Galaktozidaz (EC 3.2.1.23)

β -galaktozidaz (β -D-galaktozid galaktohidrolaz, laktaz, β -laktosidaz) β -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebildiği gibi galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösteren bir glikozidazdır. Laktozim, trilaktaz, β -D-galaktanaz, orizatim, sumiklat, maksilat ve hidrolat β -galaktozidazın ticari isimleridir. β -Galaktozidaz birçok doğal (laktoz) ve sentetik (p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) substrat üzerinde etki gösterir (1). Şekil 2.4 ve şekil 2.5’de laktoz ve p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidin molekül şekilleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Laktoz



Şekil 2.5 p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid

Substratın piranoz halkasına sahip olması ve C-1, C-2, C-3 ve C-4 sayılı karbon atomlarındaki H- ve OH- gruplarının konfigürasyonunun β -galaktozidazın etki edebileceği β -D-galaktozid konfigürasyonuna uyması gerekir.

Bu enzim, glikolipidler, glikoproteinler, polisakkaritler ve laktoz gibi disakkaritlerdeki β -galaktozil zincirinin koparılmasıyla görevlidirler (Mahoney, 1998).

2.2.1 β -Galaktozidazın Özellikleri

β -Galaktozidazın muhtemel kaynakları bitkiler, hayvan doku ve organları, mayalar (intraselüler enzim) ve mantar (ekstraselüler enzim)lardır. Enzimin özellikleri kaynağına göre farklılık göstermektedir. En yüksek molekül ağırlığına 520000 ile 850000 Dalton arasında değişen değerlerde *E. coli* β -galaktozidazı sahipken, *S. fragilis* ve *A. oryzae* için bu değerler sırasıyla 201000 ve 90000 Dalton'dur.

Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri de izole edilme ve indüksiyon koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Enzimin immobilizasyonu, immobilizasyon metodu ve taşıyıcının tipi de optimum koşulları etkileyen diğer faktörlerdir. Genel olarak mantar kaynaklı β -galaktozidazlar asidik pH'larda (2.5-4.5) optimum verirken, maya ve bakteri kaynaklı β -galaktozidazlar ise nötral bölgede (6-7 ve 6.5-7.5) optimum gösterirler. Bu optimum pH özelliği spesifik uygulamalar için her β -galaktozidaza özgünlük kazandırır. Örneğin mantarsal β -galaktozidazlar asidik whey hidrolizi için uygunken, mayasal ve bakteriyel β -galaktozidazlar süt (pH 6.6) ve tatlı peyniraltı suyu (pH 6.1) hidrolizi için kullanılırlar.

Ürün inhibisyonu yine enzimin kaynağına bağlı olan bir başka özelliktir. *A. niger* β -galaktozidazı galaktoz tarafından, *A. oryzae* β -galaktozidazına göre daha kuvvetle inhibe edilir.

Termofilik organizma sınıfına giren bazı β -galaktozidaz kaynağı mikroorganizmalar enzimin termostabilitesini etkilemeleri açısından ilgi çekicidirler. 60°C ve üstündeki yüksek sıcaklıklarda dahi uzun süre aktivitelerini koruyabilen termostabil enzimlerin iki avantajı bulunmaktadır:

- Daha yüksek dönüştürme kapasitesine sahiptirler.
- Mikrobiyel kontaminasyona uğrama olasılıkları daha düşüktür

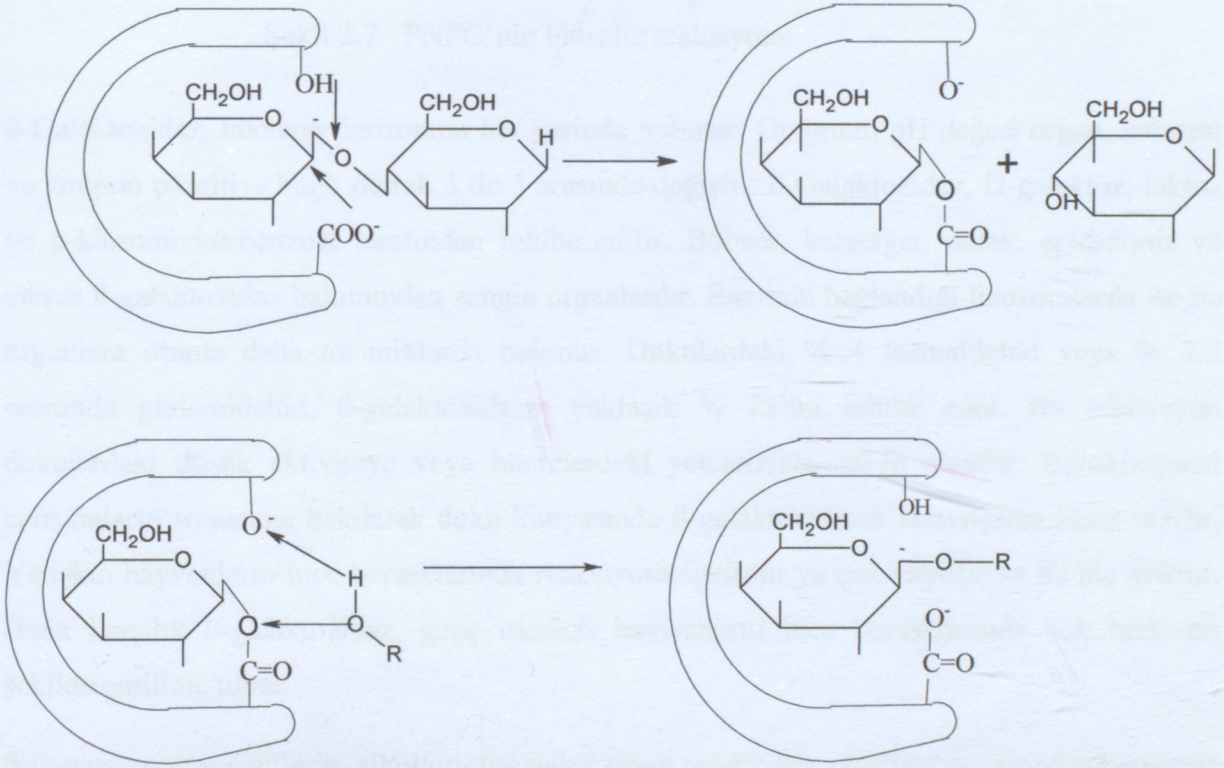
Çizelge 2.1'de farklı kaynaklardan izole edilmiş β -galaktozidazların özellikleri gösterilmiştir (Gekas ve López-Leiva,1985; Onishi ve Tanaka, 1997; Casteren vd., 2000; Tanrıseven ve Doğan, 2002; Hsu vd., 2005; Nakagawa vd., 2007).

Çizelge 2.1 Farklı kaynaklardan izole edilmiş β -galaktozidazın özellikleri

Kaynak	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Molekül Ağırlığı (kDa)	Aktifleştirici İyonlar
<i>A. psychrolactophilus</i>	8.0	10	-	-
<i>A. niger</i>	3.0-4.0	55-60	124	-
<i>A. oryzae</i>	4.5	50	-	-
<i>A. aculeatus</i>	5.4	55-60	120	-
<i>B. longum</i>	37	6.5	-	-
<i>K. fragilis</i>	6.6	37	201	Mn ²⁺ , K ⁺
<i>K.lactis</i>	6.9-7.3	35	135	Mn ²⁺ , Na ⁺
<i>E. coli</i>	7.2	55-57	540	Na ⁺ , K ⁺
<i>S. thermophilus</i>	6.5-7.5	55	500-600	-
<i>B. stearothermophilus</i>	6.0-6.4	65	215	-
<i>S. magnum</i>	4.5-5.5	65	135	-
<i>L. bulgaricus</i>	7.0	42-45	-	-
<i>Mucor pucillus</i>	4.5-6.0	60	-	-
<i>Alternaria alternara</i>	4.5-5.5	50-70	-	-
<i>Thermus aquaticus</i>	4.5-5.5	80	570	-

2.2.2 β -Galaktozidazın Etki Mekanizması

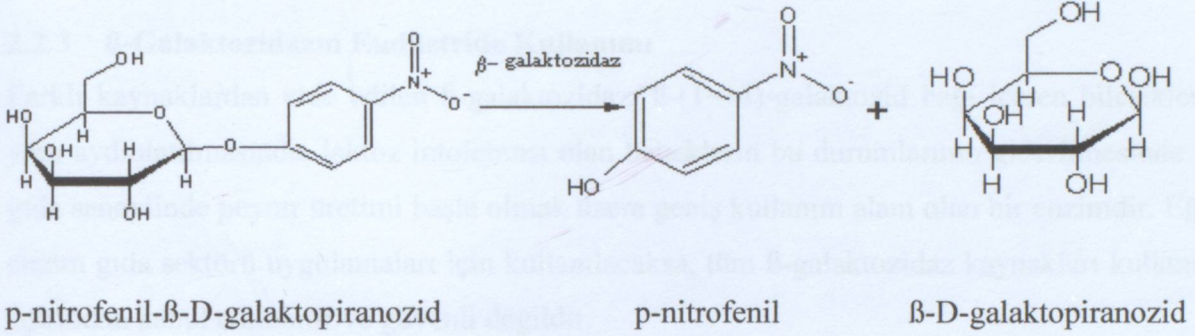
Laktozun glikozidik bağının enzimatik hidrolizi, iki önemli kalıntıya gereksinim olduğu bilinen genel asit katalizi yolu ile gerçekleşir. Bu iki önemli kalıntı, bir proton verici grup ve akseptör olarak bir nükleofil ya da bir baz grubu gibi davranır. İlk olarak Wallenfels tarafından tanımlanan laktoz hidrolizinin önerilen mekanizmasında, sistein kalıntısı proton vericisi olarak, histidin kalıntısı ise nükleofil olarak etki eder. Fakat son yıllarda açıklık kazanan önemli bir gelişme, çok çeşitli mikrobiyal kaynaklardan izole edilen β -galaktozidazların iki glutamik asit kalıntısına (Glu⁴⁸² ve Glu⁵⁵¹) sahip olduğunu gösterir. Enzimatik reaksiyonda bu iki glutamik asit kalıntısı proton verici ve nükleofilik baz olarak aynı zamanda etki eder. Şekil 2.6'da β -galaktozidazın etki mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.6 β -Galaktozidazın etki mekanizması

İki basamaklı mekanizmanın, ilk basamağında enzim-galaktozil kompleksi oluşur ve glukoz, glikozid bağının kopması ile ayrılır. İkinci basamakta enzim-galaktozil kompleksi, hidroksil grubu içeren bir alıcıya transfer edilir. Seyreltik bir laktoz çözeltisinde su veya glukoz gibi diğer şekerler alıcı molekül (R-OH) olarak reaksiyona girer ve son ürün oluşur. Alıcı olarak laktoz, daha fazla rekabet halindedir. Böylece galaktoz oluşturulur ve aktif bölgeden serbest bırakılır. Diğer taraftan, derişik laktoz çözeltilerinde, laktoz molekülü alıcı olarak daha fazla etki etme hakkına sahiptir (Mahoney, 1998; Huh vd.,1990; Sheu vd., 1998).

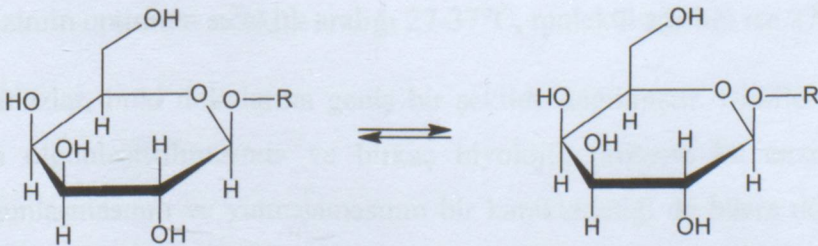
β -Galaktozidazın substrat olarak p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid kullandığı reaksiyon denklemi şekil 2.7'de gösterilmiştir (2).



Şekil 2.7 PNPg'nin hidroliz reaksiyonu

β -Galaktozidaz, hücrede lizozomun her yerinde bulunur. Optimum pH değeri organ, substrat ve tampon çözeltiye bağlı olarak 3 ile 5 arasında değişir. β -Galaktozidaz, D-galaktoz, laktoz ve p-kloromerkübenzoat tarafından inhibe edilir. Böbrek, karaciğer, dalak, epididimis ve uterus β -galaktozidaz bakımından zengin organlardır. Enzimin bağlandığı lizozomlarda ise bu organlara oranla daha az miktarda bulunur. Dokulardaki % 4 formaldehid veya % 2,5 oranında glutaraldehid, β -galaktozidazın yaklaşık % 75'ini inhibe eder. Bu inhibisyon dokulardaki düşük aktiviteye veya hücrelerdeki yetersizliğe sebep olabilir. Biyokimyasal çalışmaların sonucuna bakılarak doku kimyasında β -galaktozidazın aktivitesine karar verilir. Yetişkin hayvanların ince barsaklarında reaksiyona katılımı ya çok zayıftır ya da hiç yoktur. Buna karşılık β -galaktozidaz, genç memeli hayvanların ince barsaklarında çok hızlı bir şekilde emilime uğrar.

β -D-galaktopiranozidlerin alkollerini β -galaktozidaz tarafından oluşturulur. Konfigürasyonun oluşumu C_1 üzerinden gerçekleşir. Bu kural basit biyomoleküler kuralların gerçekleştiği (S_N2) reaksiyonlarla meydana gelir. Organik kimyada sıkça karşılaştığımız bu reaksiyonlar, geri dönüşüm reaksiyonları olarak bilinir.



Şekil 2.8 β -D-galaktopiranozidlerin alkollerinin oluşumu

Eğer iki tane döndürülmüş karbon varsa veya arada bulunan karbonyum iyonları nükleofilin bir yanına atak yapmışsa konfigürasyonun korunması gerçekleşmiş olur. Konfigürasyonun yol açtığı bir durumdur (Wallenfels ve Malhotra, 1961).

2.2.3 β -Galaktozidazın Endüstride Kullanımı

Farklı kaynaklardan elde edilen β -galaktozidaz; β -(1 \rightarrow 4)-galaktozid bağı içeren bileşiklerin yapı aydınlatılmasında, laktoz intoleransı olan bebeklerin bu durumlarının giderilmesinde ve gıda sanayiinde peynir üretimi başta olmak üzere geniş kullanım alanı olan bir enzimdir. Eğer enzim gıda sektörü uygulamaları için kullanılacaksa, tüm β -galaktozidaz kaynakları kullanım açısından kabul edilebilir ve güvenli değildir.

A. niger, *A. oryzae* ve *K. sp* (lactis ya da fragilis) güvenilir kabul edilir çünkü bu kaynaklar daha önce pek çok testlerden geçirilmiş ve bu sektörde kullanımı mevcut olan kaynaklardır.

β -Galaktozidazın, *E.coli*'den kolaylıkla elde edilebilmesine, *E. coli* β -galaktozidazının, en iyi şekilde karakterize edilen ve en yaygın olarak tanımlanmış galaktozidaz olmasına karşılık, yüksek maliyeti ve koliform ekstraktlarının sebep olduğu toksisite sorunları sebebiyle gıda sektöründe kullanımı bulunmamaktadır.

Endüstride kullanılan β -galaktozidazlar başlıca *S. lactis*, *S. fragilis* gibi mayalardan ve *A. niger* gibi küflerden üretilir. Son yıllarda β -galaktozidazlar, *B. stereothermophilis*, *B. bifidum* ve *B. infantis* bakterilerinden de saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Değişik mikroorganizmalardan türevlendirilen β -galaktozidazlar farklı özelliklere sahiptir. Bu özellikler, molekül ağırlığı, protein zincirinin uzunluğu ve aktif bölgenin pozisyonudur (Gekas ve López-Leiva,1985).

Endüstriyel penisilin üretiminde kullanılan *Penicillium chrysogenum* fermantasyonunda laktoz karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Penisilin biyosentezinde önemli olan laktozun kullanılması, β -galaktozidazların bu *Penicillium* türü küflerden de saflaştırılmasına neden olmuştur. Saflaştırılan enzim pH 3.0'da %15, pH 4-5 aralığında %95 aktif, pH 7.0'd %30 aktiftir. Enzimin optimum sıcaklık aralığı 27-37°C, molekül ağırlığı ise 270 kDa'dır.

β -galaktozidazlar, bitki dokularına geniş bir şekilde dağılmıştır. Bitkilerin yetiştirilmesinde, meyvelerin olgunlaştırılmasında ve birkaç biyolojik proste bu enzimin katkısı vardır. Meyve olgunlaşmasının ve yumuşamasının bir karakteristiği de hücre duvarları içeriklerinin mobilize olmasıdır. Meyvelerin hücre duvarlarındaki monomerik galaktozun artması elma,

domates, avokado, kavun, kivi ve mango üzerinde yapılan çalışmalar ile açıklanmıştır (Wallenfels ve Malhotra, 1961).

İnsan organizmasında ince barsaklarda bulunan β -galaktozidaz, laktozdaki β -galaktozid bağının hidrolizini sağlayarak süt ve süt ürünlerinden organizmanın yararlanması olanak verir. Bununla birlikte dünya popülasyonunun %70'inde intestinal β -galaktozidaz eksikliği olduğu tahmin edilmektedir. Amerika'da yapılan bir araştırmaya göre Amerika'da yaşayan Afrikalılar'ın %45-81'i, Meksikalılar'ın %47-74'ü, Asyalılar'ın %65-100'ü, yerli Amerikalılar'ın %50-75'inde β -galaktozidaz eksikliği yüzünden laktozun malabsorpsiyonu görülür. Bu gibi durumlarda sadece intestinal distress, diyare gibi patolojik olaylar görülmekle kalmaz, bu enzimin absorpsiyonunu arttıran Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} gibi minerallerin de malabsorpsiyonu sonucunda osteoporozun gelişimi hızlanabilir. Ayrıca irritable kolon sendromu ve abdominal ağrı gibi patolojik olaylar da ortaya çıkabilir.

Sadece süt ve süt ürünleriyle beslenen bebekler için, intestinal β -galaktozidazın varlığı büyük önem taşır. Bu enzimin eksikliğinde bebeklerde laktoz hidroliz edilemediğinden glukoz ve galaktozun emilmesi olanaksız hale gelir. β -galaktozidaz eksikliği bulunan bebeklerin beslenme bozukluğunu gidermek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla çeşitli kaynaklardan elde edilen β -galaktozidaz sıvı halde süte katılmış ve kapsül veya enterik tablet halinde verilerek laktoz intoleransı önlenerek süttten yararlanım sağlanmıştır (3).

Çeşitli yöntemlerle elde edilen β -galaktozidaz sadece laktoz intoleransı olan bebeklerin süt ürünlerinden yararlanmasını sağlamak amacıyla kullanılmaz, peynir üretiminde de üretim hızını ve lezzet kalitesini arttırmak amacıyla kullanılır. Bu amaçla Amerika Birleşik Devletlerinde bir bilim adamı, peynir yapımında sıkça karşılaşılan ve en eski sorunlardan biri olan acılaşmayı engelleyecek, çözümü β -galaktozidaza bağlı olan ve tüm dünyada peynir üreticilerinin maliyetlerini oldukça düşüren yeni bir teknoloji geliştirmiştir.

Peynir yapımındaki en önemli sorun, peynirlerin olgunlaşma ve aromalarının gelişmesi için, depolanmasıdır. Örneğin Cheddar peynirlerinin olgunlaşması 6-12 ay, Parmesan'ın olgunlaşması ise 12 ay sürmektedir. Bu süre zarfında, istenmeyen aromalar ve acılık gelişebilmektedir. Bu sorunu çözmek için, peynir yapımı kaynatılmış ve ılık hale getirilmiş süte başlatıcı kültürün katılmasıyla başlatılmaktadır. Kültürler, çeşitli bakteri suşlarını ihtiva ederler. Bunlar sütteki proteini parçalayarak hem peynirin aromasını verirler hem de daha çabuk olgunlaşmasına yardımcı olurlar. Çoğu zaman β -galaktozidaz kaynağı ilave kültür olarak *Lactobacillus bulgaricus* kullanılır. Bunun amacı acılığı azaltarak aromayı

zenginleştirmektir. Yapılan çalışmalara göre, β -galaktozidazı üreten genler başlatıcı kültürdeki bakterinin bir parçası olduğundan, gelecekte üreticilerin ek kültür ilavesine gereksinim kalmayacaktır (4). Çizelge 2.2'de yaygın olarak kullanılan β -galaktozidaz kaynakları gösterilmiştir (Gekas ve López-Leiva,1985; Onishi ve Tanaka, 1997; Montanari vd., 2000; Casteren vd., 2000; Ilyes vd., 2004; Hsu ve Chou, 2005; Kim vd., 2006; Panesar vd., 2007).

Çizelge 2.2 Yaygın olarak kullanılan β -galaktozidaz kaynakları

BİTKİ	ORGAN	MAYA	BAKTERİ	MANTAR
Şeftali	Barsak	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Kayısı	Beyin Dokusu	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Yabani gül	Deri Dokusu	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Kahve taneleri	-	<i>Kluyveromyces cereviside</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
Kefir taneleri	-	<i>Wingea roberstsii</i>	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Badem	-	<i>Sirobasidium magnum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Aspergillus phoenicis</i>
Kabayonca çekirdeği	-	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
-	-	<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Mucor miehei</i>
-	-		<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Mucor pucillus</i>
-	-		<i>Bacillus circulans</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
-	-		<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Alternaria palmi</i>
-	-	-	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Alternaria alternara</i>
-	-	-	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Curvularia inaequalis</i>
-	-	-	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>

2.2.4 β -Galaktozidaz ile İlgili Çalışmalar

Biyoteknolojinin son yıllarda hızla gelişmesi, enzimlerin çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmesine ve enzim elde etme yöntemlerine yenilerinin eklenmesine olanak sağlamış, endüstride kullanılan enzimler için optimum koşulların belirlenmesi birçok araştırmacının ilgisini çeken bir konu haline gelmiştir.

Yapılan literatür çalışması sonrasında β -galaktozidaz ile ilgili elde edilen bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Gamauf vd., (2007) tarafından yapılan çalışmada; *H. jecorina* Bga-1 kodlanmış ekstraselüler β -galaktozidazının saflaştırılması amacıyla, ORF'si pki-1 kodlayan genin promotör bölgesine aktarılmış ve oluşan rekombinant kültür, D-glukoz varlığında kültüve edilmiştir. Elde edilen filtrata SDS/PAGE analizi uygulanarak 110kDA dolayında tekli protein bandı verdiği gözlenmiş, jel-filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık olarak aynı değerde moleküler ağırlığı gözlenen doğal enzim ile karşılaştırılarak enzimin glikoprotein yapıda bir monomer olduğu sonucuna varılmış, izoelektrik noktası 6.6, saflaştırma oranı 9.9, saflaştırma verimi ise 12.8 olarak tespit edilmiştir. Saflaştırılan *H. jecorina* bga-1'in substrat spesifikliğı; ONPG, metil- β -D-galaktozid ve çeşitli disakkaritlere karşı ölçülmüş ve kinetik sabitleri hesaplanmıştır. Bga-1'in laktoz, laktuloz ve galaktobiyoz gibi disakkaritlerle ayrıca aril ve alkil- β -D-galaktozidlerle aktif olduğu tespit edilmiştir. Katalitik özelliklerine göre laktitol ve laktobiyonik asitin en zayıf, o-nitrofenil- β -D-galaktozid ve laktulozun ise en güçlü substratları olduğu bulunmuştur. Galaktozidlerin hidrolizi için optimum pH 5.0 iken optimum sıcaklık 60°C olarak gözlenmiştir. Bu çalışmada GH35 ailesine mensup *H. jecorina* β -galaktozidazı karakterize edilmiştir. Her ne kadar daha önce yapılan çalışmalarda β -galaktozidaz pekçok farklı kaynaktan saflaştırılmış ve karakterize edilmiş olsa da, GH ailesi ile olan ilişkisi bilinmemektedir ve bu durum elde edilen verilerin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, β -galaktozidaz ın enzimolojik özelliğini GH35 ailesinin bir üyesi olarak tanımlayan ilk çalışma olarak bilinen bu çalışmanın önemi büyüktür.

Staniszewski vd., (2007) tarafından yapılan çalışmada; peyniraltı suyu varlığında *Saccharomyces cerevisiae* ve β -galaktozidaz ile etanol fermantasyonu için matematiksel bir model geliştirilmiştir. Biyokütle artışının kinetik parametreleri, glukoz içeren ortamda büyüyen maya hücrelerinden ve immobilize edilmiş enzim ile laktoz içeren ortamda büyüyen maya hücrelerinden elde edilen verilere göre, en küçük kareler metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, şekerden yararlanma derecesi, biyoreaktördeki etanol konsantrasyonu, istenilen miktarda son ürün oluşumunu meydana getirecek etanol

ayrışması için gerekli olan zamanın da bu metod kullanılarak hesaplanabileceği açıklanmıştır.

Nakagawa vd., (2007) tarafından yapılan çalışmada; *Arthrobacter psychrolactophilus* F2 kültüründen elde edilen soğuk aktif β -galaktozidaz kodlayıcı gen, soğuk aktif ekspresyon sistemi ile *Escherichia coli* hücrelerine aktarılmış ve rekombinant enzim rBgIAp karakterize edilmiştir. Saflaştırılan rBgIAp doğal enzim ile benzer özellik göstermiştir. Rekombinant enzim 0°C'de yüksek aktivite göstermiş, optimum sıcaklığı 10°C, optimum pH'sı 8.0 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca rBgIAp'nın 5 dakikalık kısa bir inkübasyon süresinde, 50°C'de inaktif olduğu gözlenmiştir. Bunun ötesinde rBgIAp 2.7 ve 42.1 mM K_m değerleriyle hem ONPG'yi hem de laktozu hidrolizleyebilmiştir. Bir ünite rBgIAp 24 saatte 1 mL süt içindeki laktozun %70'ini hidrolizlemiştir. Sonuç olarak rBgIAp'nın yüksek sıcaklıklarda kararsız olan, soğuk aktif bir enzim olduğu ve meyve suyu, dondurma üretimi gibi gıda uygulamalarında kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Panesar vd., (2007) tarafından yapılan çalışmada; enzim ekstraksiyonu ve hücre membranının laktoza olan zayıf geçirgenliğinin giderilmesi amacıyla, hidrolize süt laktozu üretimi için geçirgen *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3465 hücreleri kullanılmıştır. Biyokütle yüklemeleri, sıcaklık, karıştırma ve reaksiyon süresi gibi farklı işlem parametreleri, yağsız sütteki maksimum laktoz hidrolizi için bu hücrelerin kullanımı ile optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında etanol-geçirgen maya hücreleri süt laktozunu %89 oranında hidrolizlemişlerdir.

Ladero vd., (2006) tarafından yapılan çalışmada; *Thermus sp.* T2 kültüründen üretilen immobilize edilmiş ve edilmemiş β -galaktozidazın termal ve pH inaktivasyonu incelenmiştir. Termal inaktivasyon deneyleri 50g/L laktoz içeren laktoz tampon çözeltisinde, pH inaktivasyon denemeleri ise 50 mM(pH 7.2) fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Termal inaktivasyon için sıcaklık aralığı 60-90°C; pH inaktivasyonu için ise asidik pH 3-5 ve bazik pH 10-13 olarak seçilmiştir. Termal inaktivasyon kinetiği enzimin formuna bağlı olarak farklılık göstermiştir: 60-90°C arasında serbest enzim iki kademeli birinci derece reaksiyon gösterirken, immobilize enzim 80-90°C arasında aynı eğilimi göstermiştir. Daha düşük sıcaklıklarda, sadece tek kademeli reaksiyon gerçekleşmiştir. Her iki durumda da, enzim kararlılığını korumasına rağmen, immobilize enzim 60°C'den 70°C'ye aktivitesini daha az yitirmiştir. Asidik pH için, tek kademeli birinci dereceden reaksiyon eğilimi göstermiş, her iki durumda da inaktivasyon sağlanmıştır. Basit durumda, iki kademeli birinci dereceden basit bir model seçilmiştir. Asidik koşullarda, endüstriyel uygulamalar için önemli olan peyniraltı suyu, immobilizasyon ile sağlanan kararlılık ile kinetik parametrelerini etkilemiştir. pH

inaktivasyonu için kinetik parametrelerin değişimi incelenmiş ve çok değişkenli lineer olmayan regresyon teknikleri kullanılarak en iyi kinetik denklem seçilmiştir.

Hsu vd., (2005) tarafından yapılan çalışmada; *Bifidobacterium longum* CCRC 15708, *Bifidobacterium longum* B6 ve *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 kültürleri tarafından β -galaktozidaz üretimi, en yüksek β -galaktozidaz üretimini ve en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren *B. longum* CCRC 15708 ile karşılaştırılarak incelenmiştir. *B. longum* CCRC 15708 ile yapılan ileri çalışmalarda, en yüksek β -galaktozidaz üretiminin, karbon ve azot kaynağı olarak laktoz ile maya ekstraktının kullanıldığı besi ortamlarında elde edildiği saptanmıştır. İdeal enzim retimi, 37°C'de ve pH 6.5 değerlerinde gözlenmiştir. Bu optimum koşullar altında, 18.6 U/mL'lik en yüksek β -galaktozidaz aktivitesi, %4 laktoz, %3.5 maya ekstraktı, %0.3 K₂HPO₄, %0.1 KH₂PO₄, %0.05 MgSO₄·7H₂O ve %0.03 L-sistein içeriğinde, 16 saat fermantasyondan sonra elde edilmiştir. En yüksek transgalaktozilasyon aktivitesi, bu besi ortamı içinde 14-16 saat fermantasyondan sonra gerçekleşmiştir.

Seiboth vd., (2005) tarafından yapılan çalışmada; laktoz metabolizması ve selüloz indüksiyonunda *H. jecorina* β -galaktozidazının rolü araştırılmıştır. Bga-1 geninin genomik kopyası klonlanmıştır. Bu proteinin 109.3 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu, glikozil hidrolaz 35 ailesi yesi olduğu ve laktoz varlığında indüklenen başlıca ekstraselüler β -galaktozidaz olduğu tespit edilmiştir. L-arabinititol ve L-arabinoz varlığında transkripsiyonunun çok fazla olmakla birlikte, organizmanın laktoz, D-galaktoz, galaktitol D-ksiloz ve ksilitol varlığındaki büyümesine oranla daha az yaygın olduğu gözlenmiştir. Bga-1 kültürlerinin laktoz varlığında daha yavaş büyüdüğü ve biyokütle artışlarının daha az olduğu gözlenmiştir.

Burin vd., (2004) tarafından yapılan çalışmada; *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galaktozidazının peyniraltı suyundaki aktivitesi, renk koyulaşması ve matrisindeki fiziksel değişimlere bakılarak analiz edilmiştir. Amorf sistemler, β -galaktozidaz ve peyniraltı suyu içeren ancak maltodekstrin içermeyen çözeltilerin soğutularak kurutulması yöntemiyle elde edilmiştir. Numuneler (gözenekli ya da önceden sıkıştırılmış) %0, %22 ve %44 relatif nem içeren atmosferlere maruz bırakılarak 70° C'de saklanmıştır. Kalan enzim aktivitesi ve renk gelişimi, seçilen zaman aralıklarında analiz edilmiştir. Enzim aktivitesindeki düşüşün kahverengi renk oluşumuyla ters orantılı olduğu ve az gözenekli sistemlerde daha belirgin olarak gözlemlendiği belirtilmiştir. Maltodekstrin ilavesi ile enzim aktivitesindeki düşüşü yavaşlatılmış, renk gelişimi ve laktoz kristallenmesi geciktirilmiştir.

Jurado vd., (2004) tarafından yapılan çalışmada; Lactozym ve Maksilat adlı iki ticari β -galaktozidazın aktivitesi üzerine pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+ ve K^+ gibi iyonların konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Enzimin bir ya da iki protonunun disosiyasyonu ile enzim aktivitesinin davranışının açıklanabilmesi için iki ayrı kinetik model ortaya konmuştur. β -galaktozidazın sıcaklıkla deaktivasyonu kinetik bir modele oturtulmuş ve kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, ortaya konan kinetik modellemelerin, diğer araştırmacılar tarafından çalışılan farklı kaynaklardan elde edilmiş β -galaktozidazlar için de kullanılabileceği görülmüştür.

Ladero vd., (2002) tarafından yapılan çalışmada; *Thermus sp* T2 ve *Kluyveromyces fragilis* kaynaklı β -galaktozidazın kararlılığı ve aktivitesi karşılaştırılmıştır. Her iki enzim de jel geçirgenlik kromatografisi ile kısmen saflaştırılmış ve moleküler ağırlıkları bulunmuştur. Metal katyonlarının ve bazı tamponların enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi tespit edilmiştir. Enzimlerin galaktozil parçacıkları ve β - bağları için seçiciliği, disakkaritler ve sentetik kromojenik substratlar üzerindeki aktiviteleri belirlenmiştir. Her iki enzimin de yüksek laktoz konsantrasyonunda kayda değer bir hidrolitik aktivite ve zayıf transgalaktozilasyon aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Her iki enzimin ılımlı ve aşırı pH ile sıcaklık koşulları ve aktif kimyasal (organik çözücü, oksijen peroksit, üre) varlığındaki kararlılıkları çalışılmıştır. Termofilik enzim, hidrofobik ajanlara karşı daha yüksek dayanıklılık gösterirken, farklı sıcaklık, pH ve kimyasal şartlarda ise daha yüksek kararlılık göstermiştir. Her iki enzimle gerçekleştirilen ONPG hidrolizi üzerindeki kinetik çalışmalarda, geniş bir sıcaklık aralığı, substrat ve ürün konsantrasyonu denenmiştir. Tüm sıcaklık değerlerinde elde edilen veriler lineer olmayan bir teknikle kinetik modellere uydurulmuş ve bunlardan ikisi enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonları tarif etmek amacıyla seçilmiştir. *K. fragilis* kaynaklı enzim kuvvetli bir şekilde akompetitif yolla o-nitrofenol ile inhibe edilmiştir. Termofilik enzim, mezofilik kısmına kıyasla galaktoz ile daha kuvvetli bir biçimde inhibe edilmiştir. Ancak enzim inhibisyonu sıcaklıktan etkilenmemiştir.

Tanrıseven ve Doğan, (2002) tarafından yapılan çalışmada; *Aspergillus oryzae* β -galaktozidazı, glutraldehit ile katılaştırılmış jelatin ve aljinattan meydana gelen fiber içinde immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonucunda bağlı aktivite, herhangi bir azalma gözlenmeden %56 oranında sabit tutulmuştur. Optimum koşullar immobilizasyondan etkilenmemiş, serbest ve immobilize enzim için optimum pH 4.5, optimum sıcaklık ise 50°C olarak tespit edilmiştir. Immobilize β -galaktozidazın yüksek sıcaklık ve pH'da daha kararlı

olduğu belirlenmiştir. Çözünebilir ve immobilize edilmiş enzimin kinetik parametreleri de incelenmiştir.

Montanari vd., (2000) tarafından yapılan çalışmada; *Lactobacillus brevis* hücrelerinin ortama intraselüler galaktozidaz salgıladığı gözlenmiştir. Enzim salgılanmasının hücre bölünmesinin hemen ardından gerçekleştiği tespit edilmiş, bunun hücre otolizi ve hücre duvarı yıkılımla bağlantılı olduğu bildirilmiştir. *Lactobacillus plantarum* hücrelerinin, otolizin farklı bir yolla gerçekleşmesi sebebiyle enzimi salıvermediği tespit edilmiştir.

Casteren vd., (2000) tarafından yapılan çalışmada; ekzopolisakkaritlere karşı gösterdiği hidrolitik aktiviteden dolayı ticari olarak kullanılan *Lactococcus lactis subsp. cremoris* B39 ve B891 kültürleri tarafından üretilen β -galaktozidaz, *Aspergillus aculeatus*'tan saflaştırılmıştır. Rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 120 kDa, izoelektrik noktası 5.3-5.7 arasında, saflaştırma verimi ise %13 olarak tespit edilmiştir. Optimum sıcaklığı 55-60°C arasında, pH değeri ise 5.4 olarak bulunmuştur. N-terminal amino asit zinciri temel alındığında enzimin muhtemelen glikozil hidrolazların 35. ailesine ait olabileceği bildirilmiştir. Katalitik mekanizma transglikozilasyon ürünlerinin substrat olarak laktoz kullandığını göstermiştir. β -galaktozidaz ayrıca farklı iskelet yapılarına bağlanmış laktozil zincirlerine sahip iki EPSs üzerindeki aktivitesi kullanılarak da karakterize edilmiştir. Enzimin, O-deasetillenmiş EPS B891'i B39'a göre daha hızlı parçaladığı gözlenmiştir. Sonuç olarak EPS B891'deki asetil gruplarının hidroliz oranını düşürdüğü, ancak enzimin uçlara bağlı tüm galaktozu serbest bırakabildiği tespit edilmiştir.

Zarate vd., (2000) tarafından yapılan çalışmada; süt ürünlerinde bulunan *Propionibacteria*'da bulunan safranın büyüme, hücre membran geçirgenliği ve β -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Oksijal içeren ortamda farklı davranış gösteren, safra tolereli ve safra toleretsiz olarak adlandırılan iki grup kültür gözlenmiştir. Safra tolereli kültürlerde %0.15 ve % 0.30 oksijal içeren büyüme ortamında, β -galaktozidaz aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Oksijal içeren fosfat tamponunda inkübe edilen tüm kültürlerde β -galaktozidaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu kültürlerin membran geçirgenlikleri, daha fazla substratın hücre içine girerek, β -galaktozidaz tarafından hidrolizlenmelerine olanak sağlayan safra tarafınca artırılmıştır. Safra varlığında artan enzim sentezi gösteren oksigalli ortam içindeki kültürlerden elde edilen, hücre içermeyen ekstraktlarda daha yüksek spesifik aktiviteye rastlanmıştır. Ayrıca enzim aktivitesi Na taurokolat ve NaCl ile artırılmıştır. Tüm bu çalışmalar ışığında *Propionibacteria*'nın safra tolereli kültürlerinin, membran geçirgenliğini artırarak yüksek enzim aktivitesi gösterdiği ve büyüme süresince enzim sentezini arttırdıkları

gözenmiş, safra toleransız kültürlerin ise safra içeren ortamda büyüme göstermeyerek geçirmen olmadıkları sonucuna ulaşılmıştır. Safra toleransız kültürler uzun süre safraya maruz kaldıklarında ise β -galaktozidazın inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Onishi ve Tanaka, (1997) tarafından yapılan çalışmada; *Sirobasidium magnum* CBS6803 β -galaktozidazı, DEAE-toyopearl, butil-toyopearl, p-aminobenzil-1-tiyo- β -D-galaktopyranozid-agaroz ve konkanavalin A-agaroz kolonlarına verilen çözünür hücre duvarı preparatları ile %60 verimle homojen olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin izoelektriknoktası pI 3.8, SDS jel elektroforezi ile bulunan bağlı molekül ağırlığı 67000, jel filtrasyon ile bulunan molekül ağırlığı ise 135000 Dalton olarak belirtilmiştir. Optimum enzim aktivitesi, 65°C sıcaklık, pH 4.5-5.5 değerlerinde tayin edilmiştir. O-nitrofenil- β -D-galaktopyranozid ve laktoz için K_m değerleri 14.3 ve 5.5 mmol L⁻¹, V_{max} değerleri ise 33.4 ve 94.5 μ mol min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bu enzimin yüksek transgalaktozilasyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiş ve 200 mg mL⁻¹ laktozdan 72 mg mL⁻¹ galaktooligosakkarit ürettiği bildirilmiştir.

3. LAKTOZ

Laktoz (1,4-O- β -D-galaktopiranozil-D-glukoz), doğada yalnızca sütte bulunan, 6 karbonlu monosakkaritler glukoz ve galaktozun β -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşmuş 12 karbonlu bir disakkarittir. Laktoz molekülünün yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Ticari ismi süt şekeridir ve yalnızca memeli canlılar tarafından sentezlenmektedir.

3.1 Laktoz Hidrolizi

Karbon kaynağı olarak laktozu direkt kullanabilen çok az sayıdaki mikroorganizmaya kıyasla galaktoz ve glukozu metabolize eden mikroorganizmaların ticari önemi daha fazladır. Bu sebeple, disakkaritlerin monosakkaritelere öncelikli hidrolizi, içeriğinde laktoz bulunduran peyniraltı suyundan elde edilen biyoürünlerin sayısını önemli oranda arttırmaktadır. Hidroliz işleminden sonra, laktozun tatlılığı ve çözünürlüğünün artması, peyniraltı suyunun kullanımını desteklemektedir.

Laktoz hidrolizi için iki metod bulunmaktadır:

1. Asidik (Katalitik) hidroliz
2. Enzimatik hidroliz

İlk metod, ılıman olmayan pH (1-2) ve sıcaklık(100-150°C) değerlerinde karakterize edilmekteyken, ikinci metod kullanılan enzimin özelliklerine bağlı olarak daha ılıman koşullarda gerçekleştirilmektedir.

Asidik hidroliz; asidin çözelti içinde serbest olduğu homojen reaksiyonla ya da katyon değiştirici reçine içinde bulunan asitteki hidrojen iyonları tarafından katalizlenen heterojen reaksiyonla gerçekleştirilmektedir. Daha önce bahsedilmiş olan ılıman olmayan pH ve sıcaklık koşullarında, kısa periyotlu reaksiyon süresinde, yüksek dereceli hidroliz elde edilmiştir. Tipik bir örnek olarak üç dakikalık reaksiyon sonucunda pH 1.2, 150°C sıcaklıkta %80 oranında gerçekleşen hidroliz verilebilir. Asidik hidrolizin uygulaması kolaydır ve pahalı enzimler kullanmayı gerektirmemektedir. Ancak bazı dezavantajları bulunmaktadır:

1. Yüksek sıcaklık ve düşük pH koşullarında proteinlerin denatüre olması sebebiyle, süt ve

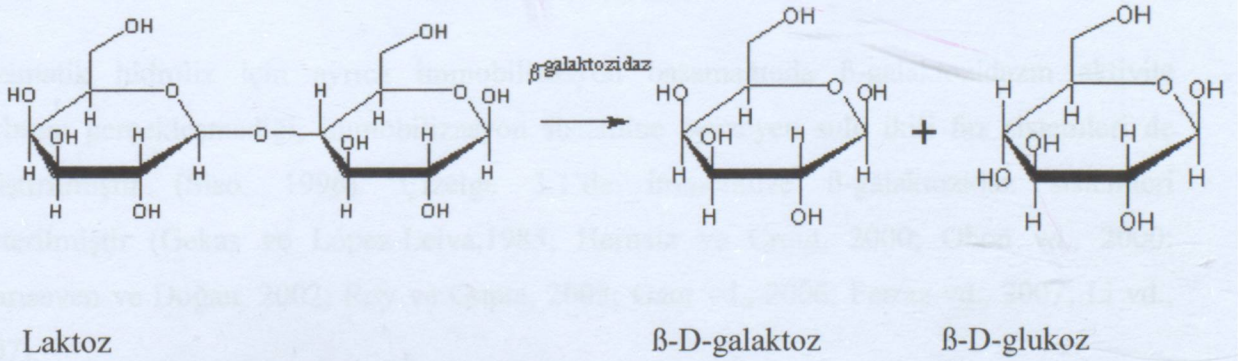
peyniraltı suyu gibi protein içerikli laktoz çözeltilerinde uygulanamaz.

2. Peyniraltı suyunda bulunan tuz, asidin inhibe olmasına sebep olur.

3. Reaksiyon süresi içinde meydana gelen kahverengi renk oluşumu, genellikle karbonun aktive edilmesiyle gerçekleştirilen renksizleştirme basamağını zorunlu kılar.

4. Asitler, proteinler ve yağlar arasında istenmeyen ikincil reaksiyonlar meydana gelir (Gekas ve López-Leiva, 1985).

Enzimatik hidroliz; hayvan, bitki, bakteri, maya ve mantarlarda bulunan β -galaktozidaz ile gerçekleştirilmektedir. Endüstride, sadece mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın elde edilen son ürünlerin bozulmadan kalması ve besin içeriğinde herhangi bir kayıp olmaması nedeni ile enzimatik hidroliz teknik açıdan daha uygundur. Laktozun enzimatik yolla hidrolizi şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Laktozun enzimatik hidrolizi

Küfler, enzimi hücre dışı olarak salgılar ve böylece kültür ortamından geri kazanım kolaylaşmış olur. Bununla birlikte genel olarak mantarlar mayalara göre daha düşük enzim aktivitesi göstermektedirler. Laktoz hidrolizi için mikrofungus β -galaktozidaz kullanımı asidik peyniraltı suyu tarafından sınırlandırılmıştır. Ancak, maya β -galaktozidazının optimum pH değeri, süt ve tatlı peyniraltı suyunun sakarifikasyonunu mümkün kılan nötral pH aralığındadır.

Peyniraltı suyu çözeltisi içinde serbest enzim içeren homojen fazdaki laktoz hidrolizi, laktozun geri kazanımının olmaması sebebiyle ekonomik değildir. Ayrıca enzim maliyetlerinin yüksek ve üretkenliğin az olması enzimatik hidrolizlemede karşılaşılan diğer problemlerdir. Bu nedenle immobilize edilmiş veya polimerizasyonla çözilemeyen enzim içeren heterojen fazdaki yöntemler geliştirilerek kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler sürekli olarak kullanılabilen ve enzimin tekrar tekrar kullanımına olanak sağlamaktadır.

İmmobilize β -galaktozidaz ilk olarak 1968'de hazırlanmıştır. O tarihten bu yana immobilize β -galaktozidazın pekçok çeşidi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu immobilize β -galaktozidazların çoğu *Aspergillus sp.* kaynaklıdır. İmmobilizasyon için en çok tercih edilen metod, oluşan son ürünlerin gıdalarda kullanımını engellemeyen glutaraldehit kopolimerizasyonudur.

Enzimatik hidroliz için ayrıca immobilizasyon basamağında β -galaktozidazın aktivite kaybının gerçekleşmediği, immobilizasyon sistemine benzeyen sulu ikili faz sistemleri geliştirilmiştir (Siso, 1996). Çizelge 3.1'de immobilize β -galaktozidaz sistemleri gösterilmiştir (Gekas ve López-Leiva,1985; Hernaiz ve Crout, 2000; Obon vd., 2000; Tanrıseven ve Doğan, 2002; Roy ve Gupta, 2003; Gaur vd., 2006; Ferraz vd., 2007; Li vd., 2007).

Çizelge 3.1 İmmobilize β -galaktozidaz sistemleri

Kaynak	Taşıyıcı	Metod/İmmobilizasyon ajanı
<i>A. niger</i>	Fenolformaldehit reçine	Adsorpsiyon/Glutaraldehitle çapraz bağlanma
<i>A. niger</i>	Kitosan	Glutaraldehitle kovalent bağlanma
<i>A. oryzae</i>	Aljinat-Jelatin	Çapraz bağlanma
<i>A. oryzae</i>	Celite	Adsorpsiyon
<i>A. oryzae</i>	İyon değiştirici reçine	Glutaraldehitle kovalent bağlanma
<i>E. coli</i>	Agaroz	Hidrofobik Bağlanma
<i>E. coli</i>	Na-Mg poliakrilamid	Tutuklanma
<i>K. fragilis</i>	Epiklorohidrin selüloz	Kovalent bağlanma
<i>K. lactis</i>	Aminoetil sepharoz	Kovalent bağlanma/Diazo metodu
<i>K. lactis</i>	Poliyetenimin	Glutaraldehitle çapraz bağlanma
<i>K. lactis</i>	Pamuıklu dokuma	Glutaraldehitle çapraz bağlanma
<i>B. bulgaricus</i>	Agar jel	Tutuklanma
<i>B. circulans</i>	Fenolformaldehit reçine Duolite ES 762	Adsorpsiyon/Glutaraldehitle çapraz bağlanma
<i>B. circulans</i>	Eupergit C	Kovalent bağlanma

3.2 Laktozun Kullanım Alanları

Laktoz, gıda endüstrisi başta olmak üzere tıpta ve ilaç sektöründe kullanımı oldukça fazla olan bir disakkarittir. Teknolojik olarak laktoz kolaylıkla kristallendirilebilir ancak bu süt ürünleri endüstrisinde bazı kısıtlamalara sebep olmaktadır. Bu sebeple laktozdan genellikle hidrolizlendikten sonra yararlanılmaktadır. Örneğin hidrolizlenmiş süttten imal edilmiş olan peynirler, normal süttten üretilen peynirlere göre daha çabuk yenilebilir hale gelmektedir. Peyniraltı suyunda bulunan laktozun sebep olduğu problem ise, süt ürünlerinde yan ürün olarak oluşan yüksek miktardaki peyniraltı suyunun atık olarak çevre kirliliğine sebep olmasıdır. Bu da laktoz hidrolizini gerekli kılan bir başka önemli unsurdur.

Peyniraltı suyundan yararlanmanın en etkili yolu, glukoz ve galaktoz içeren tatlı bir şurup karışımı meydana getiren laktoz hidrolizidir. Tatlılık derecesi %100 olarak kabul edilen sakkaroz ile karşılaştırıldığında, hidroliz sonucu oluşan glukoz-galaktoz karışımı şurubun tatlılığı %70 olarak değerlendirilmektedir. Görüldüğü gibi tatlılık derecesi %40 olarak değerlendirilen laktozun tatlılık derecesi, hidrolizden sonra artmaktadır.

Laktoz hidrolizi ile peyniraltı suyundan elde edilen glukoz-galaktoz karışımı şurup, unlu mamüller, dondurma ve meyve suyu yapımı başta olmak üzere, toz çorba, şekerleme, bazı fermente süt ürünlerinde şeker kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kurabiye gibi bazı unlu mamüllerin yapımında kullanıldığında, bu ürünlerde yer alan proteinlerle tepkimeye girerek, istenilen sarı-kahverengi rengin oluşumunu sağlamaktadır.

Başka ürünlerle farklı konsantrasyon ve karıştırma oranları ile hazırlanmış, laktozu hidrolizlenmiş süt ürünleri mevcuttur. Buna en iyi örnek olarak vanilyalı dondurma yapımında kullanılan, proteinsizleştirme ve renksizleştirme işlemlerinden geçirilerek %80 oranında katı ürünle birleştirilmiş hidrolize peyniraltı suyu verilebilir. Hidrolize edilmiş ve proteinlerinden uzaklaştırılmış peyniraltı suyu ayrıca yüksek enerji harcayan sporcuların kullanımına yönelik olarak üretilen enerji içeceklerinin üretiminde de kullanılmaktadır (Gekas ve López-Leiva,1985; Demirhan,2007).

Laktoz, tat, koku ve renk maddelerini kolaylıkla absorbe edebilme özelliğinden ötürü gıda endüstrisinde taşıyıcı ajan olarak da kullanılmaktadır (Panesar vd., 2007).

Laktoz, antibiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizma kültürleri için karbon kaynağı olarak değerlendirilmekte ve ilaç endüstrisinde bazı farmakolojik preparatların hazırlanmasında dolgu maddesi olarak, ya da tablet halindeki bazı ilaçlar için kapsül yapımında kullanılmaktadır (Demirhan, 2007).

Kefir ve kıymız bakterileri yapılarında buldukları β -galaktozidaz ile laktozu kullanarak bir alkol fermentasyonu meydana getirmektedirler. Bunun için ekşi süt mamülleri olan kefir ve kıymız bir miktar alkol içermektedirler. Asıl olarak süt laktozu, süt asidi bakterileri tarafından fermentasyona uğratarak süt asidine dönüştürülmektedir. Sütün ekşimesinin ve yoğurt yapımının esasını bu husus teşkil etmektedir. Bu şekilde, laktozun alkole mayalanmaya diğer şekerler kadar kolay uğramaması çocuk beslenmesinde daha az barsak bozuklukları olmasına yardımcı olması açısından önemlidir.

Bebek mamalarının ve bazı özel diyet gıdalarının hazırlanmasında, inek sütünün anne sütüne benzetilmesinde de laktoza geniş ölçüde yer verilmektedir. Anne sütü inek sütünden önemli ölçüde yüksek oranda laktoz içermektedir ve bu sebeple çocuğa verilecek olan adapte edilmiş inek sütünün laktozca zenginleştirilmesi gerekmektedir. Çünkü laktoz, diyetetik etki bağlamında, yağ metabolizmasında rol oynayarak karaciğerde yağ birikimini önleyici etki yapmakta ve çok sayıda B vitamininin sentezlenmesini kolaylaştırmaktadır (Demirhan, 2007) (3).

3.3 Laktoz Metabolizması

3.3.1 Laktoz Sentezi

Laktoz, galaktozu UDP galaktozdan glukozu aktaran laktoz sentetaz (UDP-galaktoz-glukoz galaktoziltransferaz) tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim protein A ve B olmak üzere iki proteinden oluşmaktadır. Protein A bir β -D-galaktozil transferazdır ve bazı dokularda bulunmaktadır. Meme bezleri bu dokulara dahil değildir ve buralarda (laktozda olduğu gibi) β -(1→4) bağıyla yapısal önemi olan N-bağlı glikoproteinlerin bileşeni olan N-asetilgalaktozamin sentezlenmektedir. Protein B ise sadece meme bezlerinde bulunmaktadır ve bir α -laktalbumindir. Sütte bol miktarda bulunmaktadır.

3.3.2 Laktöz Sentezinin Hormonal Kontrolü

Gebelikten önce ve gebelik süresince meme bezlerinde N-asetillaktözamin sentezlenmektedir. Gebelik boyunca steroid yapısında olan progesteron, protein B sentezini baskılamaktadır. Doğumla beraber progesteron düzeylerinde yüksek oranda düşüş gözlenmektedir ve peptid yapısında olan prolaktin hormonunun sentezi uyarılmaktadır, bu da α -laktalbumin(protein B) sentezini uyarmaktadır. Düzenleyici olan protein B, protein A ile kompleks oluşturur ve transferazın özgünlüğünü değiştirerek asetillaktözamin yerine laktöz sentezi gerçekleşmektedir (Champe ve Harvey, 1997).

3.3.3 Galaktöz Metabolizması

Galaktözün en büyük besinsel kaynağı süt ve süt ürünlerinde bulunan laktözdür ve yeni doğan memeliler için en büyük enerji kaynağıdır. Yenidoğanlarda intestinal β -galaktözidaz tarafından laktözün hidrolizi ile elde edilen glukoz ve galaktöz, barsaklardan emildikten sonra kan dolaşımı ile taşınmaktadır. Galaktöz hücre zarının önemli bileşenleri olan glikoprotein ve glikolipidlerin lizozomal yıkılımla elde edilebilir. Galaktözün hücre içine girişi de fruktoz da olduğu gibi insülininden bağımsızdır.

3.3.3.1 Galaktözün Fosforilasyonu

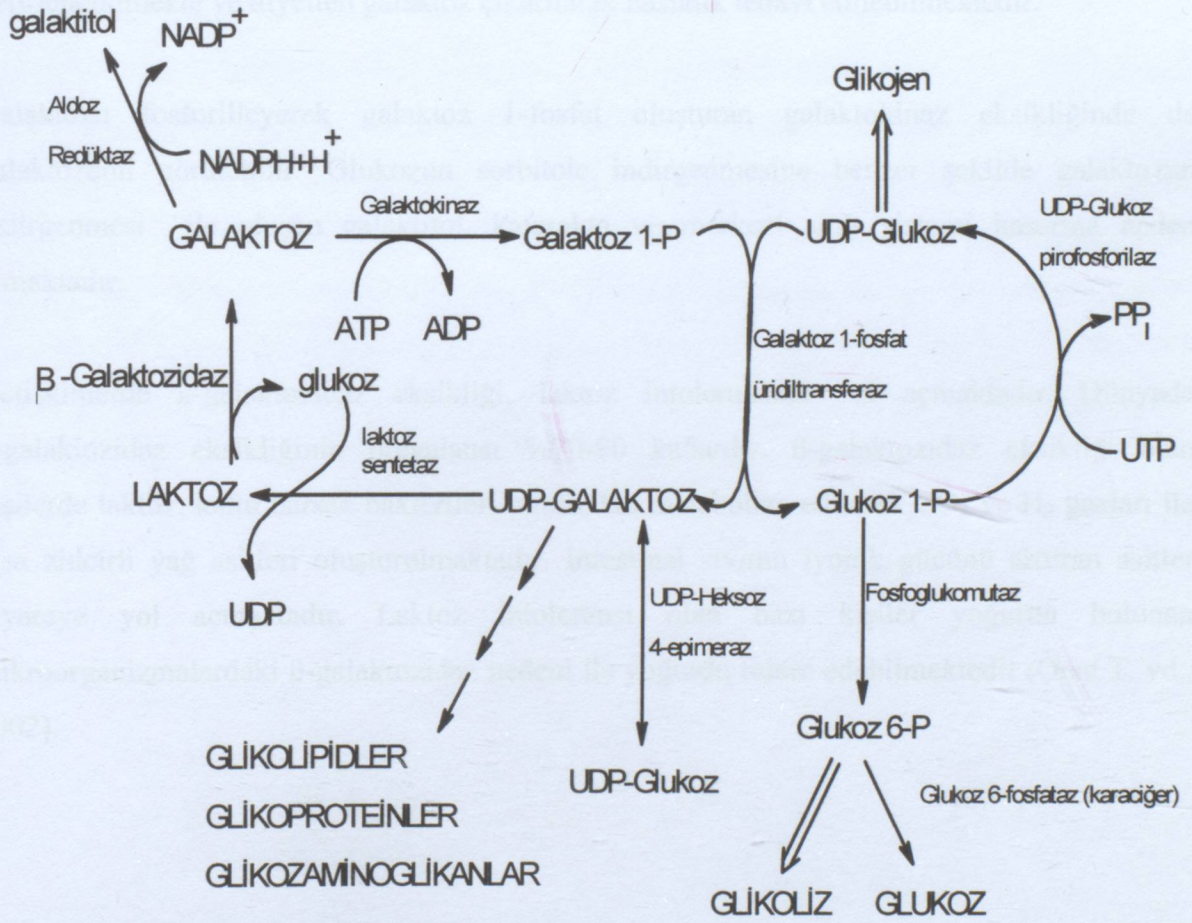
Glukoz ve fruktozda olduğu gibi bir molekül galaktözün iki mol pirüvata çevrilmesi sonunda iki molekül ATP ile iki molekül NADH elde edilmektedir. D-galaktözün metabolize edilebilmesi için fosforile edilmesi gerekmektedir. Barsaklarda süt şekeri laktözün hidrolizlenmesiyle elde edilen galaktözün, karaciğerde galaktokinaz ile ATP kullanılarak fosforlanması sonucunda galaktöz-1-fosfat oluşmaktadır.

3.3.3.2 UDP-Galaktöz Oluşumu

Galaktöz-1-fosfat UDP-glukoz ve galaktaz-1-fosfatın, galaktöz-1-fosfat üridiltransferaz etkisiyle galaktöze çevrilmeden glikolitik yola giremez. Bu ise glukoz-1-fosfat-galaktöz-1-fosfat-üridiltransferaz enziminin etkisiyle UDP glukozdan UMP'nin ayrılıp galaktöz-1-fosfata aktarılmasıyla sağlanır. Geride kalan glukoz-1-fosfat ise fosfoglukomutaz ile glukoz-6-fosfata çevrildikten sonra glikolize katılmaktadır.

3.3.3.3 UDP-Glukoz Oluşumu

Oluşan UDP-galaktoz, UDP-glukoz 4'-epimeraz ile UDP-glukoza çevrilmektedir. Glikojen ve glikoprotein sentezinde kullanılan ve bir nükleotid-şeker olan UDP-glukoz, glukoz 1-fosfat ile üridin trifosfattan(UTP), UDP-glukozpirofosforilazın katalizlediği bir tepkimeyle oluşmaktadır. Nükleotid şekerlerin oluşmasında heksoz-1-fosfat ile nükleozid trifosfat kullanılmakta ve pirofosforilaz tepkimeyi katalizlemektedir. NAD bağımlı bir enzim olan galaktoz-4'-epimeraz ile UDP-galaktoz tersinir olarak UDP-glukoza çevrilmektedir. Şekil 3.2'de galaktoz metabolizması gösterilmiştir (Onat T. vd., 2002).



Şekil 3.2 Galaktoz metabolizması

3.3.3.4 Galaktoz Metabolizması Bozuklukları

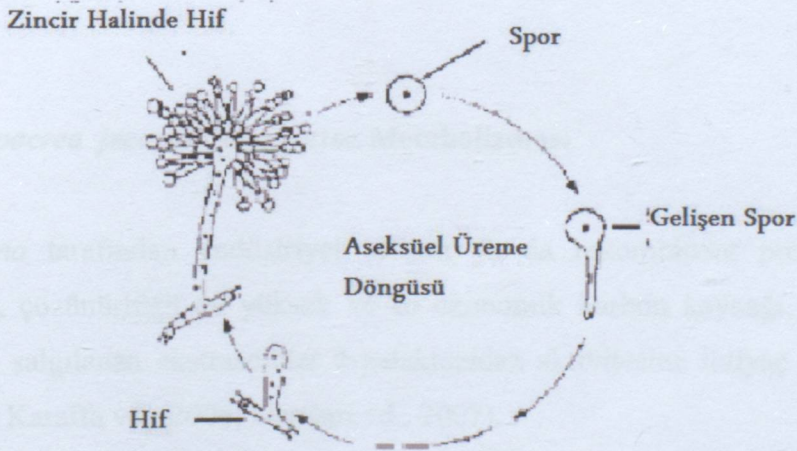
Normal süt diyeti ile beslenen bebekler galaktoz metabolizmasına bağımlıdırlar. Galaktozun yeterince metobolize edilememesine bağlı olarak görülen genetik bozukluk galaktozemi olarak tanımlanmaktadır. Galaktozemi, galaktoz-1-fosfat ridililtransferazın genetik eksikliğine bağlıdır. Bu hastalarda süt Şekeri olan laktozdan elde edilen galaktoz, glukoz metabolitlerine evrilememektedir. Bu olgularda, galaktoz-1-fosfat, hücrelerde birikmektedir. Katarakt, büyümenin yavaŐlaması ve karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına bağlı olarak sarılık görülmektedir. Karaciğer hasarı genel olarak ölümcüldür. Doğum sırasında göbek kordonundan alınan eritrositlerde galaktoz-1-fosfat tayini yapılarak genetik eksikliği belirlenebilmekte ve diyetten galaktoz çıkarılarak hastalık tedavi edilebilmektedir.

Galaktozu fosforilleyerek galaktoz 1-fosfat oluŐturan galaktokinaz eksikliğinde de galaktozemi görülebilir. Glukozun sorbitole indirgenmesine benzer Şekilde galaktozun indirgenmesi ile oluşan galaktitol, katarakta ve merkezi sinir sistemi hasarına neden olmaktadır.

YetiŐkinlerde β -galaktozidaz eksikliği, laktoz intoleransına yol açmaktadır. Dünyada β -galaktozidaz eksikliğinin prevalansı %70-90 kadardır. β -galaktozidaz eksikliği olan kiŐilerde laktoz, kalın barsak bakterileri tarafından metabolize edilerek CO_2 ve H_2 gazları ile kısa zincirli yağ asitleri oluŐturulmaktadır. İntestinal sıvının iyonik gücünü arttıran asitler diyareye yol açmaktadır. Laktoz intoleransı olan bazı kiŐiler yoğurtta bulunan mikroorganizmalardaki β -galaktozidaz nedeni ile yoğurdu tolere edebilmektedir (Onat T. vd., 2002).

4. SUŞ

Trichoderma reesei anamorfı olarak bilinen filamentli, tropikal bir küf olan *Hypocrea jecorina*, en az beş endoglukanaz (EG; EC 3.2.1.4) ve iki ekzoglukanaz veya sellobiyohidrolaz (CBH; EC 3.2.1.91) içeren en etkili selülitik enzim karışımını yüksek miktarda salgılayan, kristal yapılu selülozun parçalanması için bilinen en iyi organizmadır. *H. jecorina*, ilk olarak 2. Dünya Savaşı sırasında Solomon adalarında Amerikan Ordusu tarafından, çadır ve paraşüt gibi pamuklu materyallerin yol açtığı sorunların sebeplerinin araştırılması sırasında izole edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan orjinal QM6a kültürü *T. viride* olarak isimlendirilmiş, ancak QM6a kültürünün morfolojik olarak diğer *T. viride* yapılarından farklı olduğu bulununca isim *T. reesei* olarak değiştirilmiştir. Bu, bilim adamları tarafından yeni bir mantarsı yapı olarak kabul edilmiş ve kültürü ilk olarak saflaştıran Elwyen T. Reese'den esinlenilerek isimlendirilmiştir. İlerleyen çalışmalarda, QM6a kültürünün başka bir *Trichoderma* türü olan *T. longibrachiatum*'dan ayrı tutulamayacağı belirtilmiştir. Son yapılan çalışmalarla *T. reesei*'nin, iyi tanımlanmış bir üreme döngüsüne sahip olan *H. jecorina*'nın klonal bir türevi olduğu kanıtlanmıştır. Doğada bitki liflerinde ve toprakta bulunur (Desmet vd., 2007; Sandgren vd., 2005). Şekil 4.1'de *T. reesei*'nin üreme döngüsü, şekil 4.2'de ise *H. jecorina*'nın katı besiyerindeki genel görünümü gösterilmiştir.



Şekil 4.1 *Trichoderma reesei*'nin üreme döngüsü



Şekil 4.2 *H. jecorina*'nın genel görünümü

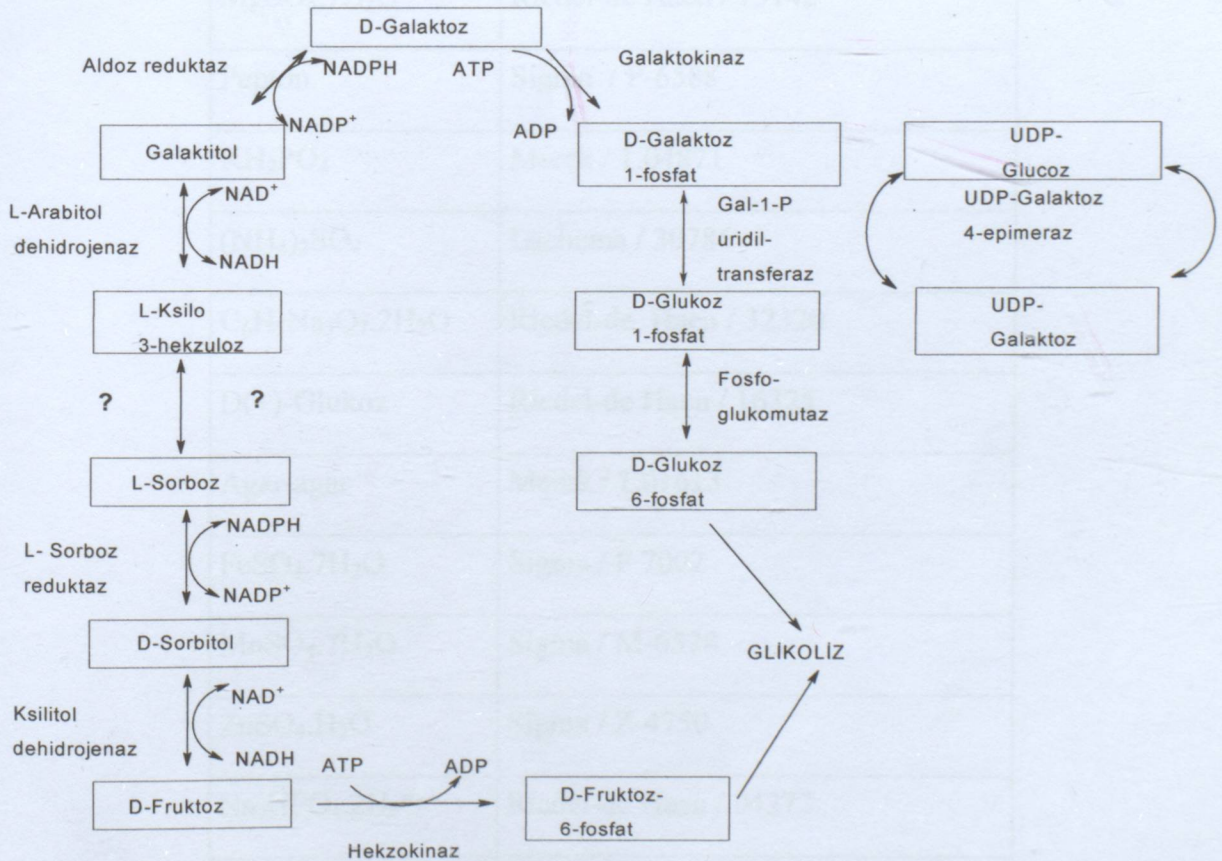
4.1 *Hypocrea jecorina*'da Laktoz Metabolizması

H. jecorina tarafından endüstriyel selüloz ya da rekombinant proteinlerin üretimi için kullanılan, çözünürlüğü en yüksek ve en ekonomik karbon kaynağı, aynı mikroorganizma tarafından salgılanan ekstraselüler β -galaktozidaz aktivitesine ihtiyaç duyan laktozdur (Pail vd., 2004; Karaffa vd., 2006; Gamauf vd., 2007).

Süt şekeri olan laktozun, *H. jecorina*'nın doğal habitatında bulunmamasına rağmen, küfün laktoz varlığında büyümesi ve laktozu metabolize etmesi ilgi çekicidir. Laktozun selüloz

indüksiyonuna sebep olan mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak β -galaktozidaz kodlayıcı gen olan *bga-1*'in D-glukoz ve L-arabinoz tarafından indüklendiğinin bulunması β -galaktozidazın rizosfer bileşenli ve endofitik mantar olan *Trichoderma*'nın doğal habitatında bulunan bitki poli- ve oligosakkaritlerinin degradasyonunda rol almasının sebebini açıklamaktadır (Gamauf vd., 2007).

H. jecorina'da laktoz metabolizmasından hücre dışı β -galaktozidaz sorumludur. Hidroliz ürünü olan D-glukoz, direkt olarak glikolitik yola katılırken, D-galaktoz ise ya galaktokinaz tarafından fosforlanarak galaktoz-1-fosfata dönüştürülür ve Leloir yoluna katılır yada aldoz redüktaz tarafından galaktitola indirgenmektedir. Galaktokinaz kodlayıcı gen *gal-1*'in eksikliği, laktoz varlığında selüloz ekspresyonunu azaltırken, Leloir yolunda bir sonraki basamaktan sorumlu olan galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz kodlayıcı gen *gal7*'nin eksikliği selüloz indüksiyonunda herhangi bir soruna yol açmamaktadır. Bu sonuçlar galaktokinaza bağlı D-galaktozun ve galaktoz-1-fosfatın da indüksiyon için gerekli olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Şekil 4.3'de *H. jecorina*'da D-galaktoz metabolizması gösterilmiştir.



Şekil 4.3 *H. jecorina*'da D-galaktoz metabolizması

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1 Kullanılan Materyaller

5.1.1 *Hypocrea jecorina* QM9414

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* QM9414, Temmuz 2005 tarihinde Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü tarafından temin edildi.

5.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 Kullanılan Kimyasallar

KİMYASAL	FİRMA/NO
MgSO ₄ .7H ₂ O	Riedel-de Haen / 13142
Pepton	Sigma / P-6588
KH ₂ PO ₄	Merck / 1.04871
(NH ₄) ₂ SO ₄	Lachema / 30786
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	Riedel-de Haen / 32320
D(+)-Glukoz	Riedel-de Haen / 16325
Agar-agar	Merck / 1.01613
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma / F 7002
MnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma / M-6528
ZnSO ₄ .H ₂ O	Sigma / Z-4750
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haen / 04272
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Riedel-de Haen / 04269

Çizelge 5.1 (Devam)

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Riedel-de / Haen 12022
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Sigma / U-0631
Üre	Sigma / P-7949
TW 20	Merck / 1.067657
Laktoz	Acros / 128820010
ONPG	Acros / 128745000
ONP	Sigma / S-4132
$Na_2CO_3 \cdot H_2O$	Sigma / A-9647)
BSA	Fluka / 27815
Coomassie Blue	Merck / 1.00201
Etanol	Merck / 1.00573.2500
H_3PO_4	Sigma / T4428
Toluen	Sigma / C-2432
Kloroform	Sigma / A-4206
Aseton	Aldrich / D-9777-100FT
Dializ kesesi	Aldrich / D-9777-100FT
Hidroksilapatit	İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı

5.1.3 Kullanılan Cihazlar

➤ Sterilizasyon işlemi için:

Fissler marka 10L hacimli düdüklü tencere

➤ Enzim indüksiyonunu sağlamak için:

Sartorius marka çalkalamalı inkübatör

➤ Enzim aktivite ve protein tayini için:

Philips PU8740 UV/VIS spektrofotometre

➤ Kullanılan tampon ve çözeltilerin pH kontrolü için:

CyberScan pH 500 pH metre

➤ Santrifüj için:

SIGMA 3K 30 santrifüj

➤ Hücre içi β -galaktozidaz elde edilmesi çalışmasında hücre duvarını yıkmak ve zar bariyerini aşmak için:

GFL 1086 çalkalamalı su banyosu

➤ Amonyum sülfat çöktürmesi için:

Chiltern Hotplate HS31 manyetik karıştırıcı

➤ Kullanılan tampon, çözelti ve kültürlerin saklanması için:

Bosch marka buzdolabı kullanılmıştır.

5.2 Metodlar

5.2.1 Kültür Ortamı

5.2.1.1 Saf Kültür Ortamı

Hypocrea jecorina QM9414 suşlarının üretim ortamı için kullanılan katı besi yerinin bileşimi (g/L):

MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
KH ₂ PO ₄	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	3g
C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O	10g
Agar-agar	20g

şeklindedir. Tüm kimyasal maddeler çözülerek distile su ile 980 mL'ye tamamlandı. 20 mL pH 2.0 olan eser element çözeltisi eklenerek 1000 mL hacme tamamlandı. Eser element çözeltisinin bileşimi (mg/L):

FeSO ₄ .7H ₂ O	250 mg
MnSO ₄ .7H ₂ O	80 mg
ZnSO ₄ .H ₂ O	70 mg

şeklindedir.

Hazırlanan katı besi ortamı 20 dakika 121°C'de steril edildi. Daha sonra steril petri kaplarının 2/3'sini kaplayacak şekilde petrilere döküldü ve soğumaya bırakıldı. Katılaştıran besi ortamlarını içeren petri kâğıtları kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Katı besi yerlerine saf kültürden ekim yapıldı. Bunun için saf kültürden alınan küçük miktarlar petrideki katı besi ortamının ortasına bırakıldı ve 30°C'de, 5 gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, besi yeri yüzeyi tamamen sporlarla kaplandı. Saf kültürden bu yol ile çoğaltılan mikroorganizma, spor çözeltisi hazırlamak ve enzim üretim ortamına aşılama amacıyla kullanıldı. Bu yol ile hazırlanan mikroorganizma +4°C'de 3 ay boyunca canlılığını

devam ettirebilir. Ancak daha uzun bir süre kullanılacaksa bu sürenin sonunda kültürün yenilenmesi gerekmektedir.

5.2.1.2 Enzim Üretim Ortamı

Çalışmada kullanılan enzim üretim ortamı Mandels ve Andreotti (1978) tarafından önerilen fermantasyon ortamının modifiye edilmiş şeklidir. Enzim üretim ortamının bileşimi (g/L):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.8 g
KH_2PO_4	4.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6 g
CaCl_2	0.8 g

şeklindedir. Bu kimyasallar 480 mL 100mM pH 5 sitrat tamponunda çözüldü. Elde edilen çözeltiye (g/L) olacak şekilde

Üre	0.3 g
TW 20	0.5 g
Pepton	1-2 g
Laktoz	10 g
Eser element çözeltisi	20 mL

eklendi. Tüm kimyasal maddeler çözülerek 1000mL hacme tamamlandı. pH 10N NaOH ile 5'e ayarlandı. 20 dakika 121°C'de steril edildi.

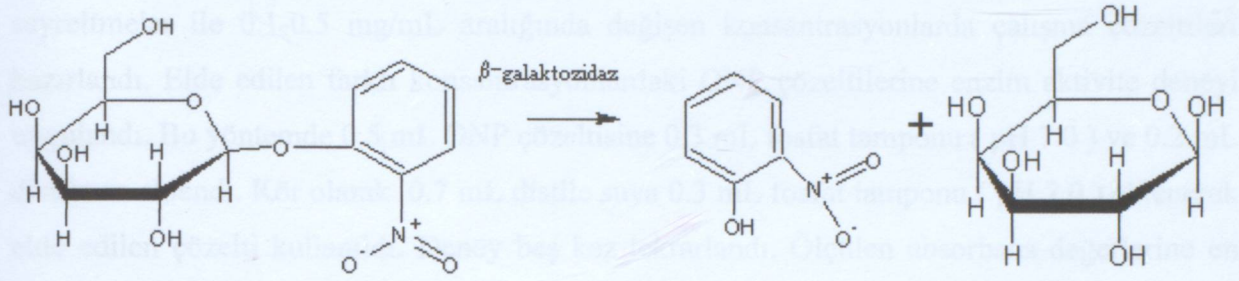
5.2.2 Spor Çözeltisinin Hazırlanması

Katı besiyerinde üreyen mikroorganizmaları çözelti içine almak ve aşılama işleminde kullanmak için, sporlar ekim iğnesi yardımıyla yüzeyden kazınarak 5 mL steril distile su ilave edilerek çözeltiye alındı. Bu şekilde mililitrede 5×10^8 spor içeren süspansiyon hazırlandı.

5.2.3 β -Galaktozidaz Aktivitesinin Tayini

β -galaktozidaz aktivitesi, Fekete ve diğerleri tarafından önerilen (2002) metoda göre substrat olarak o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin

edildi. ONPG'nin hidroliz reaksiyonu şekil 5.1'de gösterilmiştir.



o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid

o-nitrofenil

β -D-galaktopiranozid

Şekil 5.1 ONPG'nin hidroliz reaksiyonu

Çözeltiler

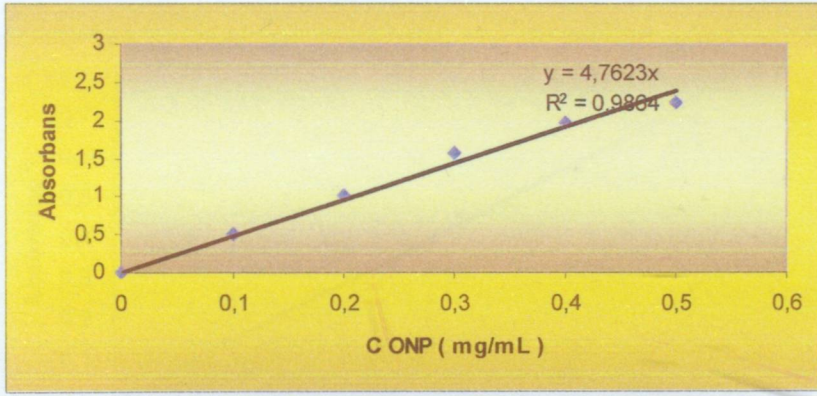
- 0.1M Fosfat Tamponu (pH 7.0): 0.889g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0.78g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ destile suda çözülerek balon jofede 100 mL'ye tamamlandı. 1N NaOH ile pH 7.0'e ayarlandı.
- 0.01M ONPG Çözeltisi: 0.03013g ONPG fosfat tamponu (pH 7.0) içinde çözülerek balon jofede 10 mL'ye tamamlanarak her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.
- 1M Na_2CO_3 Çözeltisi: 12.4g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ distile suda çözülerek balon jofede 100 mL'ye tamamlandı.

Bu yöntemde 0.5 mL örnek üzerine 0.3 mL substrat çözeltisi ve 0.2 ml distile su ilave edildi. Karışım 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. 2 mL Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Absorbans değerleri, 410 nm'de 1 mL kuvars küvet içinde spektrofotometrik olarak köre karşı okundu. Kör, 0.7 mL distile su içerisinde 0.3 mL ONPG çözeltisinin ilave edilmesi ile hazırlandı. Bu absorpsiyon değerinin o-nitrofenil (ONP) regresyon denklemine uygulanmasıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkarılan ONP miktarı $\mu\text{mol/dakika}$ olarak belirlendi.

Bir ünite enzim aktivitesi; standart koşullar altında bir dakikada ONPG'den 1 μmol ONP oluşmasını sağlayan enzim miktarıdır.

5.2.4 ONP Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

mg/mL konsantrasyonda stok ONP çözeltisi hazırlanarak bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler ile 0.1-0.5 mg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen farklı konsantrasyonlardaki ONP çözeltilerine enzim aktivite deneyi uygulandı. Bu yöntemde 0.5 mL ONP çözeltisine 0.3 mL fosfat tamponu (pH 7.0) ve 0.2 mL distile su eklendi. Kör olarak 0.7 mL distile suya 0.3 mL fosfat tamponu (pH 7.0) eklenerek elde edilen çözelti kullanıldı. Deney beş kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak ONP regresyon denklemi hesaplandı ve standart eğri grafiği çizildi. Şekil 5.2'de ONP standart eğri grafiği verilmiştir.



Şekil 5.2 ONP standart eğri grafiği

5.2.5 Protein Tayini

Protein tayini Bradford (1976) yöntemine göre yapıldı. Sığır serum albumini (BSA) standart olarak kullanıldı.

Çözeltiler

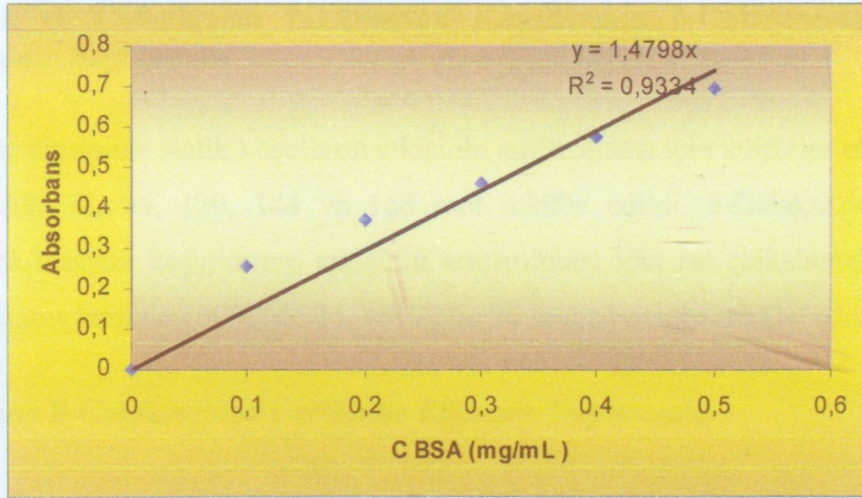
Renk Reaktifi: 100 mg Coomassie Blue G- 250, 50 mL %96 (v/v) etanolde çözüldükten sonra 100 mL %85 (v/v) o-fosforik asit eklendi. Destile su ile balon jojede 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan bu renk reaktifi koyu renkli cam bir şişede +4°C'de saklandı.

Bu yöntemde, 0.8 mL protein miktarı tayin edilecek örnek üzerine 0.2 mL renk reaktifi eklendi ve köre karşı 5 dakika – 1 saat aralığında 595 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.

Kör, 0.8 mL distile su ve 0.2mL renk reaktifinin karıştırılması ile hazırlandı. Elde edilen absorbands değerlerinin BSA ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı mg/mL olarak hesaplandı.

5.2.6 Bovine Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

mg/mL konsantrasyonda stok BSA çözeltisi hazırlanarak bu stok çözültiden uygun seyreltmeler yapılarak 0.1-0.5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki çalışma çözülteleri hazırlandı. Elde edilen standart çözültelere Bradford deneyi uygulandı. Deney beş kez tekrarlandı. Ölçülen absorbands değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak serum albumini regresyon denklemi hesaplandı ve grafik çizildi. Şekil 5.3'de BSA standart eğri grafiği gösterilmiştir.



Şekil 5.3 BSA standart eğri grafiği

5.2.7 Kültür Ortamında β -Galaktozidaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

5.2.7.1 β -Galaktozidaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

İnkübasyon süresinin β -galaktozidaz üretimine etkisinin saptanması amacıyla enzim üretim ortamına *H. jecorina* QM9414 sporlarının ekimi yapıldı. Kültürler 30°C'de etüvde 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sürelerde inkübasyona bırakıldı.

5.2.7.2 Laktozun Farklı Konsantrasyonlarının β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmalarda kullanılan enzim indüksiyon ortamında substrat olarak laktoz kullanıldı. Laktoz %1, %5 ve %10 konsantrasyonlarda olmak üzere enzim indüksiyon ortamına ilave edildi.

5.2.7.3 Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması

β -Galaktozidaz üretimine statik koşulların etkisinin araştırılması için kültürler etüvde 30°C'de sırasıyla 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat inkübe edildi. β -Galaktozidaz üretimine çalkalamalı inkübasyon koşullarının etkisinin araştırılması için ise çalkalamalı inkübatörde 160 rpm çalkalama hızında, 30°C'de 24, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

5.2.7.4 pH'nın β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Enzim indüksiyon ortamında *H. jecorina*'nın β -galaktozidaz üretimine pH'nın etkisini saptamak amacıyla ortamlar 0.1N HCl ve 0.1N NaOH kullanılarak 3 ile 8 arasındaki farklı pH değerlerine ayarlandı. Kültürler 160 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 96 saat inkübasyona bırakıldı.

5.2.7.5 Sıcaklığın β -Galaktozidaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Enzim indüksiyon ortamında *H. jecorina*'nın β -galaktozidaz üretimine sıcaklığın etkisini saptamak amacı ile ortamlar 20, 25, 30, 35, 40 ve 45°C'de 160 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 96 saat süresince inkübe edildi.

5.2.8 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite β -galaktozidaz aktivitesi (U); standart koşullar altında bir dakikada ONPG' den bir

$\mu\text{mol ONP}$ oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı ve enzim aktivitesi total ünite olarak U/mL cinsinden ifade edildi.

Şekil 5.2'deki standart ONP eğrisi kullanılarak bulunan ONP konsantrasyonları aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite (U/mL) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = [(\text{mg ONP} / \text{mL} \times 1000) / (t \times M_G)]$$

$\text{mg ONP} / \text{mL}$: örneklerin absorbanslarına karşılık gelen ONP miktarı
t	: inkübasyon zamanı (30 dk)
M_G	: serbest bırakılan ONP'nin (139,11) molekül ağırlığı (g / mol)

5.2.8.1 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünite değerleri mL 'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

5.2.8.2 Protein Miktarının Hesaplanması

Şekil 5.3'deki BSA standart eğrisi kullanılarak mL 'deki protein miktarları hesaplandı.

5.2.9 β -Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması

5.2.9.1 *H. jecorina* QM9414 Hücrelerinden Hücre İçi β -galaktozidaz Eldesi

Hücre içinde bulunan enzimi serbest haler geçirmek için, hücre duvarı ve zar bariyerini aşmak gerekir. Bu nedenle çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemler uygulanır.

Hücre içi β -galaktozidaz eldesinde, *H. jecorina* kültür örnekleri sıvı besiyerinde Bölüm anlatıldığı şekilde hazırlandı ve 25°C 'de 96 saat inkübe edildi. Elde edilen kültür örnekleri

10000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek ayrıldı ve 2 kere bidistile su ile yıkanıp tekrar santrifüjlendi. Elde edilen hücre paketi üzerine başlangıçta alınan toplam hacime eşit olacak kadar 0.1M fosfat tamponu (pH 7.3) ilave edilerek hücre çözeltisi elde edildi. Hücre çözeltisi *H. jecorina* hücrelerinden, hücre içi β -galaktozidaz elde edilmesi çalışmalarında kullanıldı. Hücre duvarı ve zar bariyerini aşarak enzimi serbest hale geçirmek için kimyasal yöntem kullanıldı.

5.2.9.1.1 Kimyasal Yöntem

H. jecorina QM9414 hücrelerinden kimyasal yöntemle hücre içi β -galaktozidaz elde edilmesi için iki ayrı organik çözücü sistemiyle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bunlar; toluenle ekstraksiyon ve etanol-kloroform (9:1) ile ekstraksiyondur.

5.2.9.1.1.1 Toluenle Ekstraksiyon

Ekstraksiyon Süresi: Ekstraksiyon süresi ile *H. jecorina* QM9414 hücre içi β -galaktozidaz enzim aktivitesi ilişkisi araştırıldı. Hücre çözeltisi Bölüm 5.2.9.1'de verilen metoda göre hazırlanarak 25°C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada örneklere 0-60 dakika aralığında değişen sürelerde ekstraksiyon işlemi uygulandı ve 0.1 mL örnekler alınarak β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı.

Toluen Miktarı: Hücre parçalanması üzerine toluen miktarının etkisini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada; Bölüm 5.2.9.1'de belirtilen yönteme göre hazırlanan *H. jecorina* QM9414 hücre çözeltisi (1 mL) ile 0.05-0.2 mL arasında değişen miktarlarda toluen çözücü sistemi ile 60 dakika çalkalamalı su banyosunda sabit hızda ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen örneklerin hücre içi β -galaktozidaz enzim aktiviteleri tayin edildi.

5.2.9.1.1.2 Etanol-Kloroform (9:1; v/v) ile Ekstraksiyon

Ekstraksiyon Süresi: Ekstraksiyon süresi ile *H. jecorina* QM9414 hücre β -galaktozidaz enzim aktivitesi ilişkisinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmada; Bölüm 5.2.9.1'de verilen metoda göre hazırlanan hücre çözeltisi (1 mL) üzerine etanol-kloroform (9:1; v/v) ilave edilerek 25°C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda sabit çalkalama hızı uygulanarak gerçekleştirildi. Çalışmada örneklere 0-60 dakika aralığında değişen sürelerde ekstraksiyon

işlemi uygulandı ve 15 dakikada bir 0.1 mL örnek alınarak hücre içi β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı.

Etanol-Kloroform Miktarı: Bu çalışmada etanol-kloroform (9:1; v/v) miktarının hücre parçalanması üzerine etkisi incelendi. Bölüm 5.2.9.1’de belirtilen yönteme göre hazırlanan *H. jecorina* QM9414 hücre çözeltilisi (1 mL) üzerine 0.05-0.2 mL arasında değişen miktarlarda etanol-kloroform çözücü sistemi kullanılarak ekstrakte edildi. Çalışmada ekstraksiyon işlemi 0-60 dakika süre ile çalkalamalı su banyosunda 25°C sıcaklıkta sabit çalkalama hızında gerçekleştirildi. Değişik miktarlarda çözücü sistem ile ekstraksiyon sonucunda 15 dakikada bir alınan 0,1 mL örneklerde β -galaktozidaz aktiviteleri tayin edildi.

5.2.9.2 *H. jecorina* QM9414 Hücrelerinden Hücre Dışı β -galaktozidaz Eldesi

Bölüm 5.2.1.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan enzim üretim ortamı 500 mL’lik erlenlere 150 mL’lik kısımlar halinde aktarılarak, spor çözeltiliden bu ortama ekim yapıldı. Optimum koşullar olan pH 5 ve 25°C’de 96 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültür örnekleri + 4°C sıcaklıkta 10000 rpm’de 1 saat santrifüj edildi. Elde edilen **süpernatantta** enzim aktivitesi ve protein miktar tayini uygulandı. Ortamdaki tuzları uzaklaştırmak amacıyla bir gün süreyle + 4°C’de distile suya karşı selüloz dializ kesesi (**Aldrich / D-9777**) içinde dializ edilerek **homojenat (I. Dializat)** elde edildi.

5.2.9.2.1 Aseton Çöktürmesi

Diyaliz membranından alınan 5 mL homojenata 2.5 mL soğuk aseton, yavaş yavaş ilave edilerek +4°C’de, 2.5 saat boyunca karıştırıldı. Karışım bir gece süreyle +4°C’de bekletildikten sonra aynı sıcaklıkta 10000 rpm’de 1 saat santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, aseton çöktürmesi uygulanan homojenatta çökelti oluşumu gözlenmedi.

5.2.9.2.2 Amonyum sülfat Çöktürmesi

5.2.9.2.2.1 *H. jecorina* QM9414 β -galaktozidazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

H. jecorina β -galaktozidazını çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 25 mL’lik 10 adet behere, 5’er mL homojenat konuldu. İlk behere ortamdaki konsantrasyonu % 10 olacak şekilde toz amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilerek

karıştırıldı. Her beherde konsantrasyon % 10 arttırılarak, % 100'e kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Homojenatlar içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 45 dakika daha karıştırılarak, ağızları kapatıldı ve soğuk dolapta bir gece bekletildi. Bir gece soğuk dolapta bekletilen her beherdeki homojenat +4°C'de 10000 rpm'de, 1 saat santrifüj edildi. Oluşan çökelti ve süpernatantlar ayrıldı. En uygun konsantrasyonun saptanması amacıyla oluşan çökelti 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisine alındı, protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlardan *Hypocrea jecorina* β -galaktozidazı için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 70 olduğu saptandı.

5.2.9.2.2.2 *H. jecorina* β -galaktozidazının % 70 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

H. jecorina β -galaktozidazını çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 70 olduğu saptandıktan sonra, homojenata ortamdaki konsantrasyonu % 70 olacak şekilde, toz amonyum sülfat azar azar ilave edildi. +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 45 dakika karıştırıldıktan sonra ağız kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün +4°C'de 10000 rpm'de, 1 saat, santrifüj edildi. Oluşan çökelti ve süpernatant ayrıldıktan sonra süpernatant atıldı. Oluşan çökelti 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisine alınarak oluşan çözelti **% 70 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı. Oluşan çözeltide β -galaktozidaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı. Amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla % 70 amonyum sülfat kesiti dializ kesesine (Aldrich / D-9777) konuldu. +4°C'de, destile su ile çözelti sık sık değiştirilerek, manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve çözeltide sülfat iyonu kalmayınca kadar dializ işlemine devam edildi. Dializ işlemi tamamlandıktan sonra, dializ kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla çözelti, +4°C'de 10000 rpm'de, 1 saat, santrifüj edildi. İşem sonrasında üstte kalan berrak çözelti alındı ve **II. Dializat** olarak adlandırılan bu çözeltide β -galaktozidaz aktivitesi ve protein miktar tayini uygulandıktan sonra uygun hacimlerde derin dondurucuda saklandı.

5.2.9.2.3 Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi

Çalışmamızda kullanılan hidroksilapatit İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Hidroksilapatit, alt ucu ince cam pamuğu ile kapatılmış, 1.27 cm çapında, alt kısmı musluklu cam kolona, kolon yüksekliği 9 cm olacak şekilde dolduruldu. Kolon, hacminin üç katı kadar pH 6.8 1 mM potasyum fosfat

tamponu geçirilerek dengelendi. Kolona yaklaşık olarak 200 mg protein içeren, % 70 amonyum sülfat klesiti uygulandı. Kolondan sırasıyla 1 mM, 5 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM ve 1000 mM potasyum fosfat tamponları (pH 6.8) geçirildi. 3mL'lik hacimler halinde toplanan eluatların absorbanları elüe edilen tampona karşı spektrofotometrede 280 nm'de (Warburg ve Christian, 1931) okundu ve elüsyon grafiği çizildi. Elüsyonlardaki β -galaktozidaz aktivitesi tayin edilerek aktivite değerleri de aynı grafikte gösterildi.

N. jectorum'dan β -galaktozidaz hastalığına sebep olan bakteriyel enzimlerin aktivite tayini yapılmıştır. Bunun için sporları ekim yapılan ortamda 24-168 saat arasında değişen sürelerde inkübe edildi. 25 ml'lik bir ortam örneğiyle total elüe (Şekil 6.1), protein tayini yapılarak spesifik aktivite (Şekil 6.2) hesaplandı.

İkinci bölümde 144. saatte *N. jectorum*'nın β -galaktozidaz aktivitesinin en yüksek olduğu görüldü.

Şekil 6.1 *N. jectorum*'dan β -galaktozidaz aktivitesinin tayini için elüe edilen örneklerin absorbanları

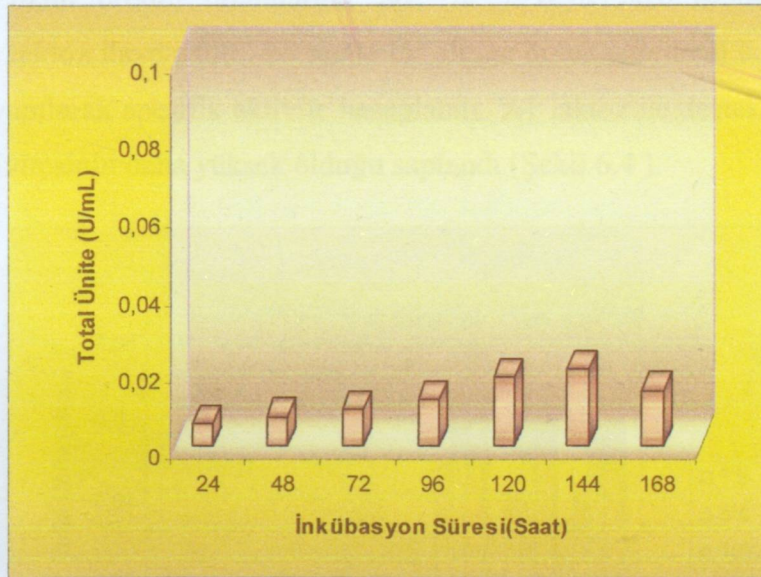
6. SONUÇLAR

6.1 Kültür Ortamında β -Galaktozidaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

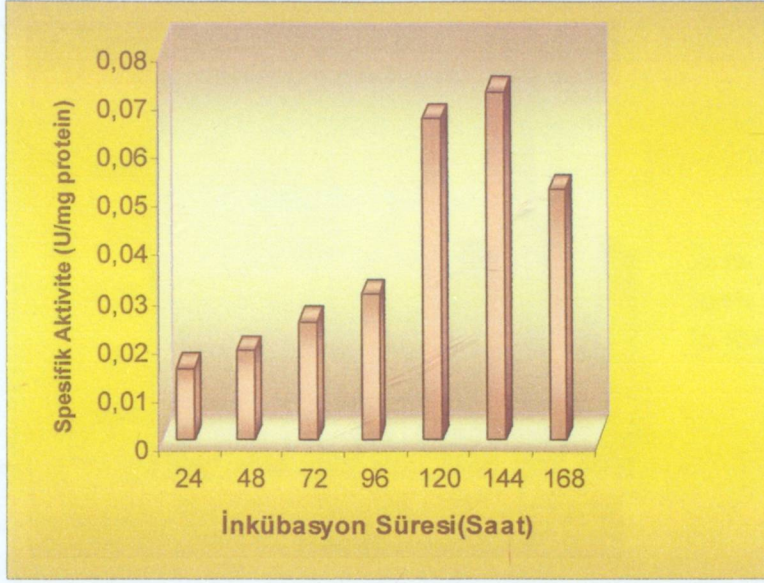
6.1.1 β -Galaktozidaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresi

H. jecorina'dan β -galaktozidaz üretimine inkübasyon süresinin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, mantar sporları ekim yapılan enzim üretim ortamında 24-168 saat arasında değişen sürelerde inkübe edildi. 24 saatte bir alınan örneklerde total ünite (Şekil 6.1), protein ölçümleri yapılarak spesifik aktivite (Şekil 6.2) hesaplandı.

İnkübasyonun 144. saatinde *H. jecorina*'nın β -galaktozidaz aktivitesinin en yüksek olduğu saptandı.



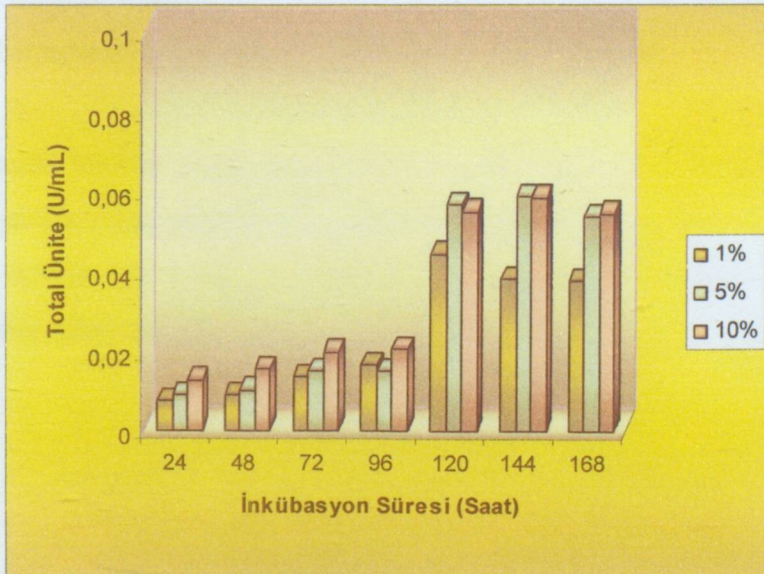
Şekil 6.1 β -Galaktozidaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi



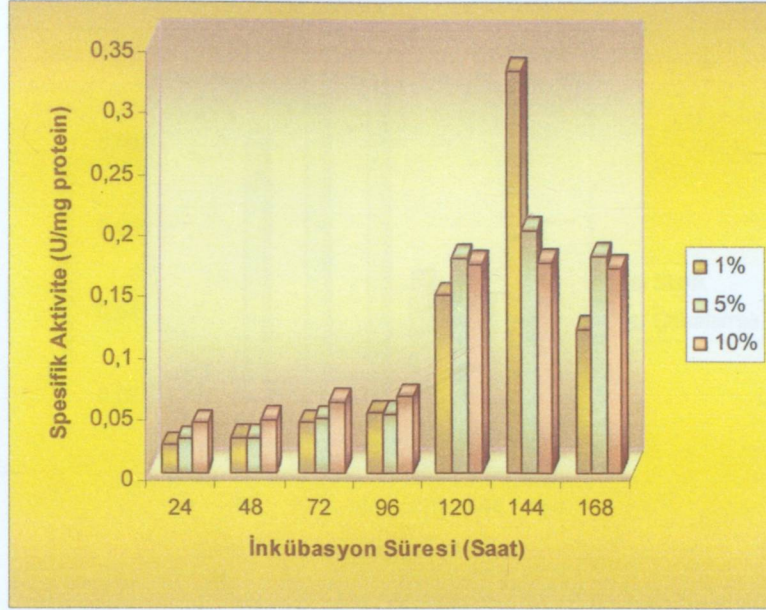
Şekil 6.2 İnkübasyon süresinin β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi

6.1.2 Laktozun Farklı Konsantrasyonlarının β -Galaktozidaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı laktozun farklı konsantrasyonlarının β -galaktozidaz üretimine etkisini saptamak için enzim üretim ortamlarına %1, % 5 veya %10 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda laktoz ilave edildi. 24 saatte bir alınan örneklerde total ünite (Şekil 6.3) ve protein ölçümü yapılarak spesifik aktivite hesaplandı. %1 laktoz ile desteklenen ortamdaki β -galaktozidaz aktivitesinin daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 6.4).



Şekil 6.3 β -Galaktozidaz aktivitesinin laktoz konsantrasyonuna göre değişimi

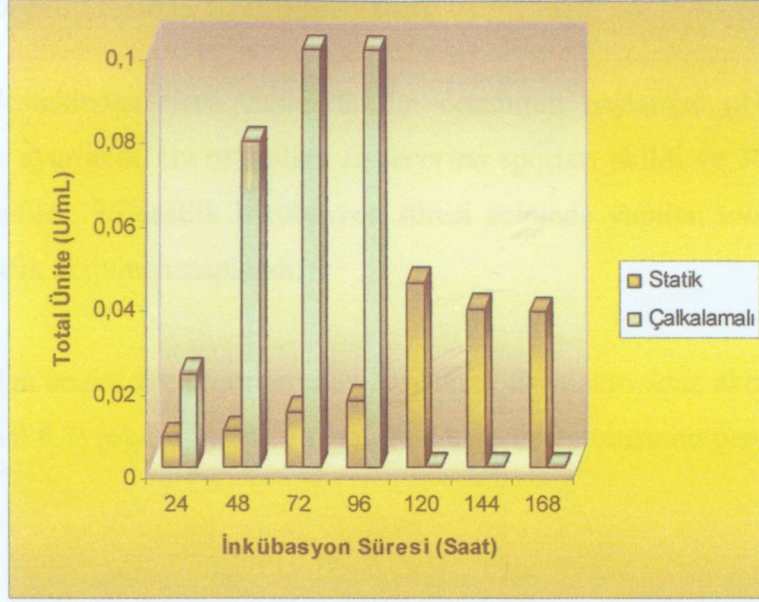


Şekil 6.4 Laktöz konsantrasyonunun β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi

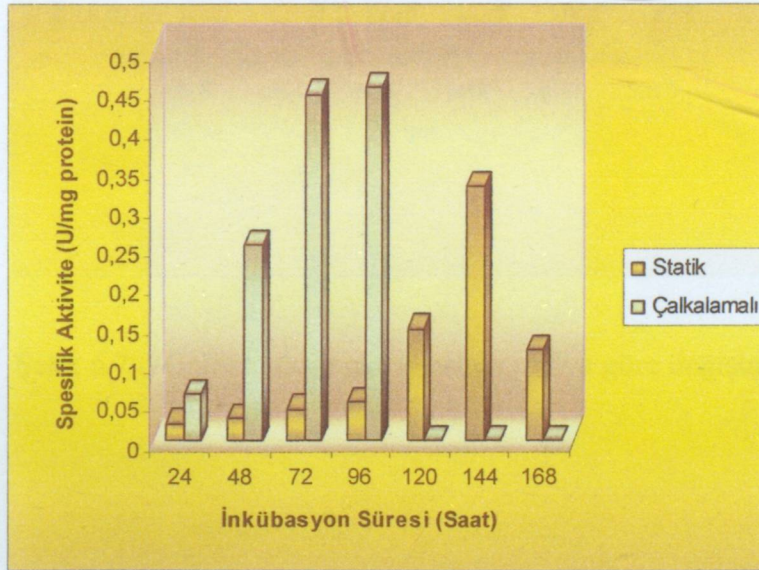
6.1.3 Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının β -galaktozidaz Üretimine Etkisi

H. jecorina sporları enzim üretim ortamına aktarıldıktan sonra, statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının β -galaktozidaz üretimine etkisini saptamak amacıyla bir kısmı statik koşulda etüvde, bir kısmı ise çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.

Çalkalamalı koşulda inkübe edilen besi yerlerinde 96. saatte en yüksek aktiviteye ulaşıldı. Şekil 6.5'de β -galaktozidaz aktivitesinin statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarına göre değişimi, şekil 6.6'da ise statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 6.5 β -Galaktozidaz aktivitesinin statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarına göre değişimi

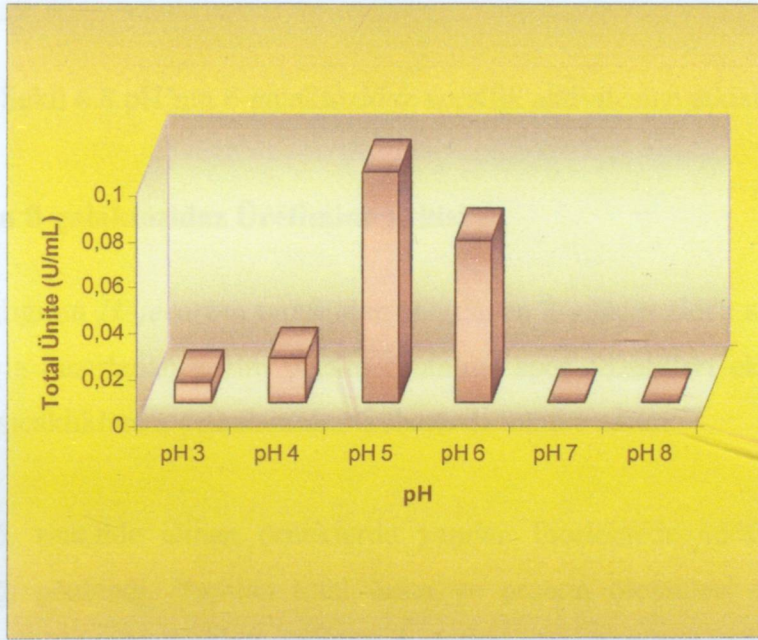


Şekil 6.6 Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi

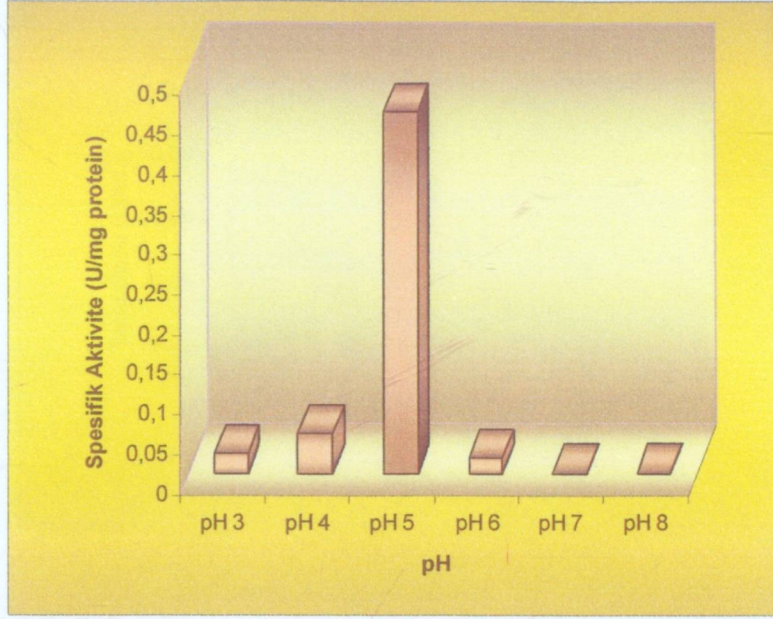
6.1.4 pH'nın β -galaktozidaz Üretimine Etkisi

%1 laktoz ile desteklenen steril enzim üretim ortamının başlangıç pH'ları 3-8 arasında değişen değerlere ayarlandı. Bu ortamlara *H. jecorina* sporları ekildi ve 30°C'de çalkalamalı koşulda inkübe edildi. 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda yapılan total ünite ve protein ölçümler ile spesifik aktivite hesaplandı.

Ortam pH'sı 5 olan enzim üretim ortamında en yüksek β -galaktozidaz aktivitesi elde edildiği gözlenirken (Şekil 6.7; şekil 6.8), pH 7.0 ve pH 8.0'de misel oluşumu gerçekleşmediği tespit edildi.



Şekil 6.7 β -Galaktozidaz aktivitesinin pH'ya göre değişimi

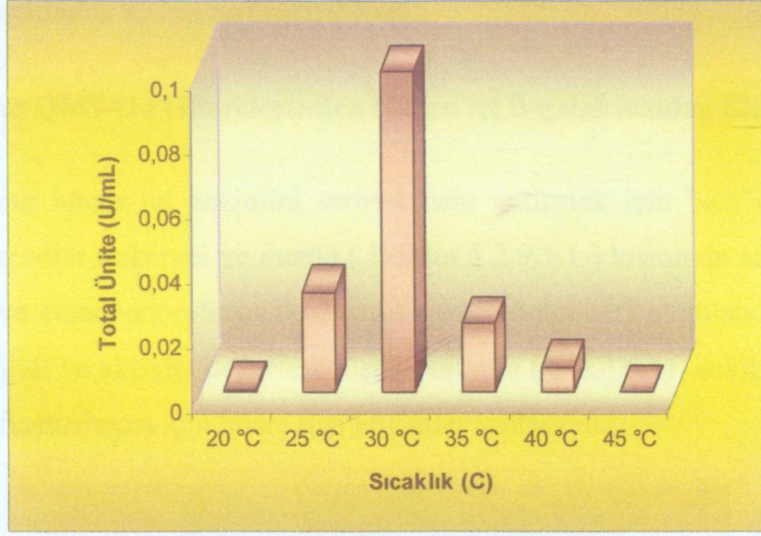


Şekil 6.8 pH'nın β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi

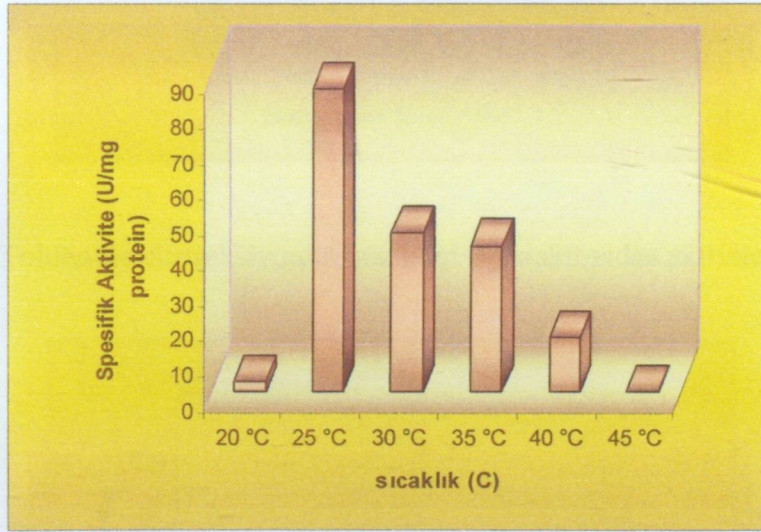
6.1.5 Sıcaklığın β -galaktozidaz Üretimine Etkisi

İnkübasyon sıcaklığının *H. jecorina* tarafından salgılanan β -galaktozidaz aktivitesine etkisini saptamak amacıyla hazırlanan enzim üretim ortamına spor çözeltileri ekildi. 20°C - 45°C arasında değişen sıcaklıklarda, çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.

İnkübasyonun 96. saatinde alınan örneklerde yapılan incelemede 45°C sıcaklıkta misel oluşumu olmadığı gözlemlendi. Yapılan total ünite ve protein ölçümleri sonunda ise 25°C sıcaklıkta β -galaktozidaz aktivitesinin en yüksek değere ulaştığı tespit edildi. β -Galaktozidaz aktivitesinin sıcaklığa göre değişim grafiği ve sıcaklığın β -galaktozidaz spesifik aktivitesine etkisi şekil 6.9 ve şekil 6.10'da gösterilmiştir.



Şekil 6.9. β-Galaktosidaz aktivitesinin sıcaklığa göre değişimi

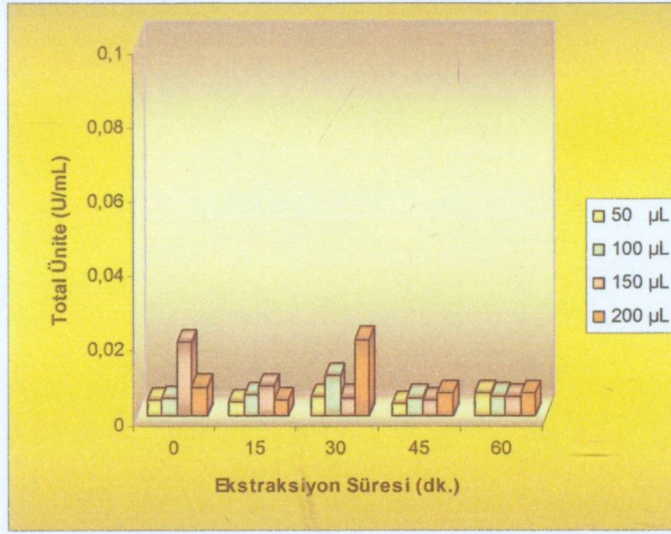


Şekil 6.10 Sıcaklığın β-galaktosidaz spesifik aktivitesine etkisi

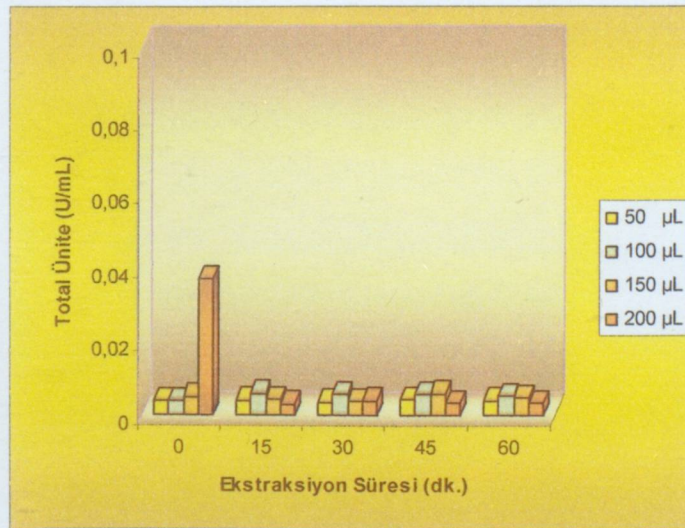
6.2 β -Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması

6.2.1 *H. jecorina* QM9414 Hücrelerinden Hücre İçi β -galaktozidaz Eldesi

Mikroorganizmanın hücre içi enzimini serbest hale getirmek için bazı kimyasal metodlar uygulandı. Bu metodlar materyal ve metod (Bölüm 5.2.9.1.1) kısmında anlatılmıştır. Toluen ile ekstraksiyon ve etanol-kloroform ile ekstraksiyon yöntemleri uygulandıktan sonra enzim aktivitesi tayin edildi ve aktivite değerleri düşük bulundu (Şekil 6.11; şekil 6.12). Bu nedenle enzimin kısmi saflaştırılması için hücre dışı enzimler kullanıldı.



Şekil 6.11 Toluen ile ekstraksiyonun hücre içi β -galaktozidaz aktivitesine etkisi



Şekil 6.12 Etanol-kloroform ile ekstraksiyonun hücre içi β -galaktozidaz aktivitesine etkisi

6.2.2 *H. jecorina* QM9414 Hücrelerinden Hücre dışı β -galaktozidaz Eldesi

6.2.2.1 Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi

H. jecorina QM9414 β -galaktozidaz homojenatının % 70 amonyum sülfat kesitinin hidroksilapatit kolonuna uygulanması ve 1 mM, 5 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM ve 1000 mM'a kadar farklı konsantrasyonlardaki potasyum fosfat tamponları (pH 6.8) ile elüsyonu sonucunda, 1 mM, 5 mM, 20 mM ve 50 mM'lık elüatlarda β -galaktozidaz aktivitesi görüldü. En yüksek β -galaktozidaz aktivitesi 5 mM potasyum fosfat tamponu ile elde edilen elüatlarda bulundu (Şekil 6.13). *H. jecorina* QM9414 kültürlerinden elde edilen β -galaktozidaz hidroksilapatit kolon kromatografisi ile 6.67 kez saflaştırıldı. (Çizelge 6.1).

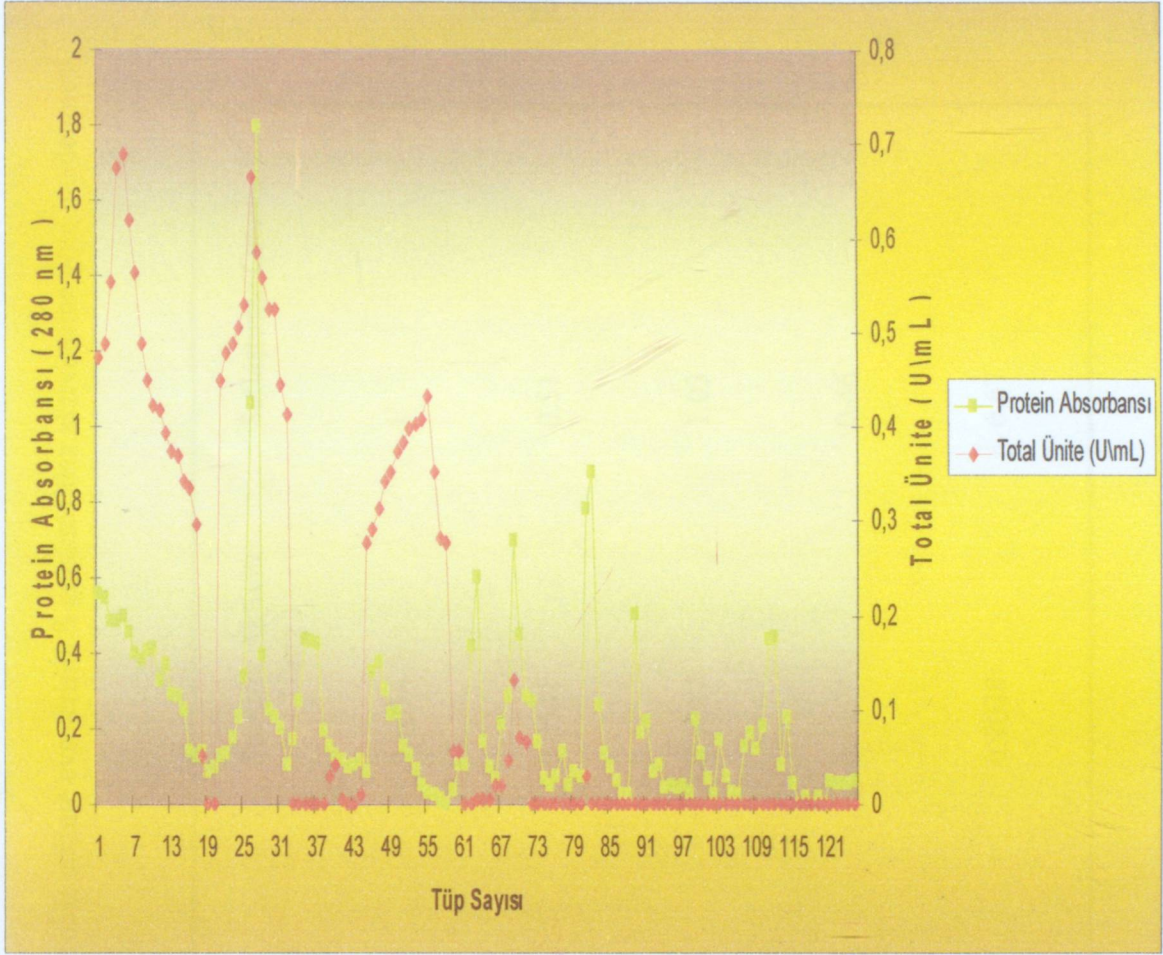
Şekil 6.13 *H. jecorina* homojenatının % 70 amonyum sülfat kesitinin hidroksilapatit kolon kromatografisi elüasyon grafiği.

Kolon boyutu: 1,27 x 9 cm

Kolonuna uygulanan protein: 200 μ g/ml

Akış hızı: 9ml/dak

Elüasyon tamponları: pH 6.8 olan 1 mM, 5 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM ve 1000mM potasyum fosfat tamponu.



Şekil 6.13 *H. jecorina* homojenatının % 70 amonyum sülfat kesitinin hidroksilapatit kolon kromatografisi elüsyon grafiği.

Kolon boyutu: 1.27 x 9 cm

Kolona uygulanan protein: 200 mg/mL

Akış hızı: 9mL/saat

Elüsyon tamponları: pH'sı 6.8 olan 1 mM, 5 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 100 mM 500 mM ve 1000mM potasyum fosfat tamponu.

Çizelge 6.1 *Hypocrea jecorina* QM9414 Kültürlerinden β -galaktozidazın elde edilme evrelerinin β -galaktozidaz aktivitesine göre incelenmesi

İşlem Evreleri	Total Protein (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı
1- Süpernatant	30.2067	3.1849	0.1054	1
2- Homojenat (I. Dializat)	26.5576	1.4390	0.0541	0.51
3- % 70 Amonyum Sülfat Kesiti	40.3432	4.3880	0.1087	1.03
4- II. Dializat	30.9501	1.5195	0.0490	0.46
5- Hidroksilapait Kolon Kromatografisi	0.7433	0.5232	0.7038	6.67

7. TARTIŞMA

Enzimlerin eldesinde genellikle bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan yararlanılır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler bilimsel ve ticari önemlerine karşın büyük miktarlarda elde edilemezler. Özellikle bitkisel kaynaklı enzim aktivitesinin çoğu kez mevsimlere bağımlı olması, ayrıca diğer ekonomik ve çevresel faktörler, bunların endüstriyel enzim üretiminde kullanılmasını sınırlar. Bu nedenle enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanılması gittikçe artan önem kazanmaktadır. Mikroorganizmaların çok hızlı büyüme ve üreme güçleri dolayısıyla aktivitelerinin çok fazla olması, fermentasyonun kısa sürmesi ve fermentasyon ortamlarının hazırlanmasındaki maliyet düşüklüğü nedeniyle büyük ölçekteki fermentasyon işlemlerinin ekonomik olması, endüstriyel enzim üretiminde mikrobiyal kaynakların kullanılmasını arttırmıştır. Bugün ticari olarak satılan tüm enzimler biyolojik kaynaklardan, büyük ölçüde mikroorganizmalardan izole edilmektedir.

β -galaktozidaz (β -D-galaktozid galaktohidrolaz, laktaz, β -laktozidaz) β -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebildiği gibi galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösteren bir glikozidazdır. Farklı kaynaklardan elde edilen β -galaktozidazlar; β -(1 \rightarrow 4)-galaktozid bağı içeren bileşiklerin yapı aydınlatılmasında, laktoz intoleransı olan bebeklerin bu durumlarının giderilmesinde ve gıda sanayiinde peynir üretimi başta olmak üzere geniş kullanım alanı olan bir enzimdir. Endüstride kullanılan β -galaktozidazlar başlıca *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* gibi mayalardan ve *Aspergillus niger* gibi küflerden üretilir. Son yıllarda β -galaktozidazlar, *Bacillus stercophilis*, *B. bifidum* ve *B. infantis* bakterilerinden de saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Gekas ve López-Leiva,1985; Hsu vd., 2005). β -galaktozidazın *Trichoderma reesei* anamorfı olarak bilinen filamentli bir küf olan *Hypocrea jecorina*' dan saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, öncelikle *H. jecorina* 'da β -galaktozidaz indüksiyonu için optimum üreme koşulları ilk kez tarafımızdan incelenmiştir. Optimum üreme koşulları belirlendikten sonra *H. jecorina* 'dan β -galaktozidazın kısmi saflaştırılması çalışmamızın ikinci bölümünü oluşturarak denenmiştir.

Fermentasyon işlemlerinde mümkün olan en kısa sürede ve en az hammadde kullanılarak en fazla ürün elde edilmesi istenir. Kullanılan mikroorganizma ve indüklenen enzime bağlı olarak besi yeri bileşenleri, substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, optimum pH ve optimum sıcaklık gibi parametreler farklılık gösterir. Bu çalışmada besi yerinde indükleyici ajan olarak laktoz kullanılmıştır. Laktozun farklı konsantrasyonlarının β -galaktozidaz

üretimine etkisini saptamak için enzim üretim ortamlarına %1, % 5 veya %10 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda laktoz ilave edildi. 24 saat aralıklarla alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümü yapılarak spesifik aktivite hesaplandı. Üç farklı konsantrasyon değeri için bulunan enzim aktiviteleri arasında, konsantrasyona bağlı bir artış olduğu gözlemlendi. Ancak artış oranının çok yüksek olmadığı ve spesifik aktivite değerlerinin de %1 laktoz konsantrasyonu için en yüksek olduğu görüldü. %5 ve %10 laktoz konsantrasyonları hiper osmotik etkiye neden olabilir. Spesifik aktivite değerlerinin bu iki konsantrasyon için düşük olmasının nedeni budur. Bu nedenle tüm çalışma %1 laktoz içeren besi ortamlarında gerçekleştirildi.

Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının β -galaktozidaz üretimine etkisini saptamak amacıyla besi ortamları, statik koşulda etüvde veya çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Çalkalamalı inkübatörde inkübe edilen besi yerlerinde 96. saatte en yüksek aktiviteye ulaşıldı. Statik koşullarda etüvde gerçekleştirilen fermentasyonda oldukça uzun sürenin sonunda optimum aktivite sağlandı. Aerobik küf olan *H. jecorina*, çalkalamalı koşullarda havanın oksijenini daha iyi kullanarak uygun oksijen dağılımı ve misellerin dairesel hareketi nedeniyle laktozu daha kısa sürede metabolize etmiştir. Bu nedenle, çalışmanın tamamı çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi.

Enzim üretimine pH etkisini incelemek amacıyla besi ortamlarının başlangıç pH'ları 3-8 arasında değişen değerlere ayarlandı. İnkübasyon süresi sonunda ortam pH'sı 5 olan enzim üretim ortamında en yüksek β -galaktozidaz aktivitesi elde edildi. Enzim üretim ortamına sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla besi ortamları 20-45°C arasında değişen sıcaklıklarda inkübe edildi ve 25°C sıcaklıkta β -galaktozidaz aktivitesinin en yüksek değere ulaştığı bulundu.

H. jecorina'da laktoz metabolizmasından hücre dışı β -galaktozidaz sorumludur. Ancak hücre içi β -galaktozidazın durumunu belirlemek ve hücre içinde bulunan enzimi serbest hale geçirmek için iki ayrı organik çözücü sistemiyle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bunlar; toluenle ekstraksiyon ve etanol-kloroform (9:1) ile ekstraksiyondur. Ancak her iki yöntemde de enzim aktivitesinin hücre dışı enzime göre daha az olduğu bulundu.

Bu nedenle enzimin kısmi saflaştırılmasında, hücre dışı enzim indüksiyonu kullanıldı. En yüksek enzim aktivitesi %1 laktoz konsantrasyonunda, pH 5.0 olan besi ortamında, 25 °C sıcaklıkta, çalkalamalı inkübatörde, 96 saat inkübasyon süresi sonunda elde edildi. Optimum koşullarda enzim aktivitesi 3.1849 U/mL, spesifik aktivite ise 0.1054 U/mg protein olarak

bulundu. *H. jecorina* QM9414 kültürlerinden elde edilen β -galaktozidaz hidroksilapatit kolon kromatografisi ile 6.67 kez saflaştırıldı.

Yapılan çalışmaların sonucunda, gıda endüstrisinde kullanılan ve oldukça pahalı bir enzim olan β -galaktozidazın, *Hypocrea jecorina*'dan yüksek oranda saflaştırılabilir ve başta süt ve süt ürünleri endüstrisi olmak üzere endüstriyel alanlarda güvenle kullanılabilir olduğu saptanmıştır.

Uppilla, K., Hoss, Y.H., Kanas, J. ve Buzza, M.P., (2004), "Inhibition of β -Galactosidase activity as related to milkfat denaturation, lactose crystallization, collapse and glass transition in low moisture whey systems", *International Dairy Journal*, 14(6):517-523

Cameron, W.H.M., Jurnemann, M., Brock, E., A.M., Vlasak, J.P., Scholz, H.A. ve Voragen A.G.J., (1990), "Purification and characterization of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards β -D-2-galactopyranosides from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* B39 and 1891", *Carbohydrate Research*, 220:79-85

Champs, P.O. ve Harvey, R.A., (1997), *Lipinler*. Illustrated reviews, Nobel Tip Kütüphanesi, İstanbul

Christakopoulos, P., Meeus B.J. ve Kikva, D., (1990), "Exceptionally Thermostable α - and β -Galactosidases from *Aspergillus niger* separated in One Step", *Process Biochemistry International*, 211-213.

Demirhan, E., (2000), *Feyzullah sayundaz Etiler Edici, Laktozun Fermentik Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellemesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul*

Desmet, T., Camuet, T., Guafenni, P., Nermajer, W., Gross, L., Balthazard, C. ve Peyru, K., (2007), "An investigation of the substrate specificity of the xylogalacturonidase Cel76A from *Hypocrea jecorina*", *FEBS Journal*, 274:356-363.

Fekete, E., Kocsis, J., Sándor, E., Seiboth, B., Blom, S., Szendrői, A. ve Fehér, C.P., (2002), "Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*", *Arch. Microbiol.*, 178:7-14

Ferre, R.M., Arts, H., Gombosi, G., Saitta-Lopez, J., Vilhauer, A. ve Allano, G., (2007), "Allosteric molecular cloning of anti-HIV antibodies by an immobilized engineered β -galactosidase", *Enzyme and Microbial Technology*, 41:297-303

Gamauf, C., Macherat, M., Kallio, J., Penttinen, T., Vainionperä, J., Allardier, G., Kubicek, C.P. ve Seiboth, B., (2007), "Characterization of the β -galactosidase of glycoside hydrolase family 35 β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galactose- β -D-galactosamine activity", *FEBS Journal*, 274:1691-1700

Gami, B., Puri, H., Jain, K. ve Khosla, N.K., (2005), "Cloning, heterologous production and purification of a novel β -galactosidase", *Food Biotechnology*, 37:420-426

Geisler, V. ve Lauer, G., (1985), "Hydrolysis of Lactose: A Literature Review", *Process Biochemistry*, 211

KAYNAKLAR

- Bradford, M. M., (1976), "A Rapid And Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-Binding", *Analytical Biochemistry*, 72:248-254
- Burin, L., Jouppila, K., Roos, Y.H., Kansikas, J. Ve Buera, M.P., (2004), "Retention of β -Galactosidase activity as related to maillard reaction, lactose crystallization, collapse end glass transition in low moisture whey systems", *International Dairy Journal*, 14(6):517-525
- Casteren, W.H.M., Eirmermann, M., Broek, L., A.M., Vincken, J.P., Schols, H.A. ve Voragen A.G.J., (2000), "Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards(modified) exopolysaccharides from *Latococcus lactis* subsp. *Cremoris* B39 and B891", *Carbohydrate Research*, 329:75-85.
- Champe, P.C. ve Harvey, R.A., (1997), *Lipincotts' Illustrated reviews*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul
- Christakopoulos, P., Macris B.J. ve Kekos, D., (1990), "Exceptionally Thermostable α - and β -Galactosidases from *Aspergillus niger* separated in One Step", *Process Biochemistry International*, 211-213.
- Demirhan, E., (2007), *Peyniraltı suyundan Elde Edilen Laktozun Enzimatik Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Desmet, T., Cantaert, T., Gualfetti, P., Nerinckx, W., Gross, L., Mitchinson, C. ve Piens, K., (2007), "An investigation of the substrate specificity of the xyloglucanase Cel74A from *Hypocrea jecorina*", *FEBS Journal*, 274:356-363.
- Fekete, E., Karaffa, L., Sandor, E., Seiboth, B., Biro, S., Szentirmai, A. ve Kubicek, C.P., (2002), "Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*", *Arch. Microbiol*, 179:7-14
- Ferraz, R.M., Aris, A., Ganzalea, G., Santin-Lopez, J., Villaverde, A. ve Alvaro, G., (2007), "Allosteric molecular sensing of anti-HIV antibodies by an immobilized engineered β -galactosidase", *Enzyme and Microbial Technology*, 41:492-497.
- Gamauf, C., Marchetti, M., Kallio, J., Puranen, T., Vehmaanpera, J., Allmaier, G., Kubicek, C.P. ve Seiboth B., (2007), "Characterization of the bgal1-encoded glycoside hydrolase family 35 β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- β -D-galactanase activity", *FEBS Journal*, 274:1691-1700.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R. ve Khare, S.K., (2006), "Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase", *Food chemistry*, 97:426-430.
- Gekas, V. ve López-Leiva, M., (1985), "Hydrolysis of Lactose: A Literature Review", *Process Biochemistry*, 2-11.

Gote, M.M., Khan, M.I., Gökhale, D.V., Bastawde, K.B. ve Khire, J.M., (2006), "Purification, characterization and substrat specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146)", *Process Biochemistry*, 41:1311-1317.

Hernaiz, M.J. ve Crout D:H.G., (2000), "Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. Circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*", *Enzyme and Microbial Technology*, 27:26-32

Huh, K.T., Toba, T. Ve Aachi, S., (1990), "Oligosaccharide formation during the hydrolysis of lactose with hydrochloric acid and cation Exchange resin", *Food Chemistry*, 38:305-314.

Hsu, C.A., Yu, R.C. ve Chou, C.C., (2005), "Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions", *International Journal of Food Microbiology*, 104:197-206.

Ilyes, H., Fekete, E., Karafa, L., Fekete, E., Sandor, E., Szentirmai, A. ve Kubicek, C.P., (2004), "CreA-mediated carbon catabolite repression of β -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent", *FEMS Microbiology Letters*, 235(1):147-151.

Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G. ve Vicaria, J.M., (2004), "Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature", *Enzyme and Microbial Technology*, 34:33-40.

Karaffa, L., Fekete, E., Gamauf, C., Szentirmai, A., Kubicek, C.P. ve Seiboth, B., (2006), "D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates", *Microbiology*, 152:1507-1514.

Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A. ve Garcia-Ochoa, F., (2006), "Thermal and inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus sp.* Strain T2: Comparison to the free enzyme", *Biochemical Engineering Journal*, 31:14-24.

Ladero, M., Santos, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Pessela, B.C.C ve Garcia-Ochoa, F., (2002), "Studies on the activity and the stability of β -galactosidase from *Thermus sp* strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*", *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3):392-405.

Mahoney, R.R., (1998), "Galactosyl-oligosaccharide formation during lactase hydrolysis", *Food Chemistry*, 63(2):147-154

Mandels, M.M. ve Andreotti, R.E.,(1978), "The cellulose to cellulase fermentation", *Process Biochemistry*, 13:6-13

Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Benevelli, M. Ve Chiavari, C., (2000), "Release of β -galactosidase from *Lactobacilli*", *Food technology biotechnology*, 38(2):129-133

Nakagawa, T., Ikehata, R., Myoda, T., Miyaji, T. ve Tomizuka, N., (2007), "Overexpression and functional analysis of cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2", *Protein expression and Purification*, 54:295-299.

Obon, J.M., Castellar, M.R., Iborra, J.L. ve Mangon, A.,(2000), " β -Galactosidase immobilization form ilk lactose hydrolysis: a simpleexperimental and modelling study of batch and continuous reactors", *Biochemical Education*, 28:164-168.

Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, ., Emerk, K. ve Sözmen, E.Y., (2002), İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.

Onishi, N. ve Tanaka T., (1997), "Purification and characterization of galactooligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*", Letters in Applied Microbiology, 24:82-86.

Pail, M., Peterbauer, T., Seiboth, B., Hametner, C., Druzhinina, I. ve Kubicek, C.P., (2004), "The metabolic role and evolution of L-arabinitol 4-dehydrogenase of *Hypocrea jecorina*", FEBS Journal, 271:1864-1872

Panesar, R., Panesar, P.S., Singh, R.S., Kennedy, J.F. ve Bera, M.B., (2007), "Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells", Food Chemistry, 101:786-790.

Roy, I. ve Gupta, M.N., (2003), "Lactose hydrolysis by Lactozym immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes", Process Biochemistry, 39:325-332.

Seiboth, B., Hartl, L., Salovuori, N., Lanthaler, K., Robson, G.D., Vehmaanpera, J., Penttila, M.E. ve Kubicek, C.P., (2005), "Role of the bga1-Encoded Extracellular β -Galactosidase of *Hypocrea jecorina* in Cellulase Induction by Lactose", Applied and Environmental Microbiology, 71(2):851-857.

Shankar, S.K. ve Mulimani, V.H., (2007), " α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation", Bioresource Technology, 98:958-961.

Sheu, D.C., Li, S.Y., Duan, K.J. ve Chen, C.W.,—(1998), "Production of galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads", Biotechnology Techniques, 12(4):273-276

Siso, M.I.G., (1996), "The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A review", Bioresource Technology, 57:1-11.

Staniszewski, M., Kujawski, W. ve Lewandowska, M., (2007), "Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product-Kinetic model predictions", Journal of Food Engineering, 82:618-625.

Tanrıseven, A. ve Doğan, Ş., (2002), "A novel method for the immobilization of β -galactosidase", Process Biochemistry, 38:27-30.

Telefoncu, A., (1997), Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir

Wallenfels, K. Ve Malhotra, O.P., (1961), "Galactosidases", Advances in Carbohydrate Chemistry, 16:239-298.

Warburg, O. ve Christian, W., (1931), "Activation of carbohydrate in the red blood cells", Biochemische Zeitschrift, 238:131-134.

Zarate, G., Gonzalez, S., Chaia, A.P. ve Oliver, G., (2000), "Effect of bile on the β -galactosidase activity of dairy *Propionibacteria*", Dairy Science and Technology, 80:267-276

İNTERNET KAYNAKLARI

1. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>
2. <http://www.brenda.uni-koeln.de>
3. <http://www.food-info.net/tr/intol/lact.htm>
4. <http://www.biyotek.com.tr>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 10.01.1983

Doğum yeri İstanbul/Türkiye

Lise 1997-2000 Beyoğlu Anadolu Lisesi (English High School)

Lisans 2000-2004 Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 2004- Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum(lar)

2005-Devam ediyor Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı,
Araştırma Görevlisi

