



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ENDOSPOR OLUŞTURAN BAZI TERMOFİLİK
BAKTERİ İZOLATLARINDA ALFA-
GALAKTOSİDAZ VE BETA-GALAKTOSİDAZ
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ İLE KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Nazlı GÜMÜŞ

Tez Danışmanı :Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu :621.01.00

Sunuş Tarihi :12.10.2012

Bornova-İZMİR

2012

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ENDOSPOR OLUŞTURAN BAZI TERMOFİLİK
BAKTERİ İZOLATLARINDA
ALFA-GALAKTOSİDAZ VE BETA-GALAKTOSİDAZ
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ İLE KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Nazlı GÜMÜŞ

Tez Danışmanı :Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu :621.01.00

Sunuş Tarihi :12.10.2012

Bornova-İZMİR

2012

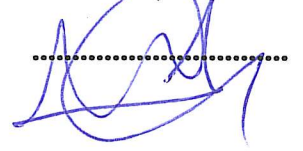
Nazlı GÜMÜŞ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Endospor Oluşturan Bazı Termofilik Bakteri İzolatlarında Alfa-Galaktosidaz ve Beta-Galaktosidaz Aktivitelerinin İncelenmesi ile Kısmi Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12 Ekim 2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Rengin ELTEM
Raportör Üye : Yrd. Doç. Dr. Sayit SARGIN
Üye : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

İmza


.....

.....

.....

ÖZET

ENDOSPOR OLUŞTURAN BAZI TERMOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARINDA ALFA-GALAKTOSİDAZ VE BETA- GALAKTOSİDAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ İLE KİSMİ KARAKTERİZASYONU

GÜMÜŞ, Nazlı

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Ekim 2012, 123 sayfa

Çalışmamızda “Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda yer alan 53 adet endospor oluşturan termofilik bakteri izolatında, α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin aktiviteleri taranmıştır. Termofilik izolatlar çalkalamalı inkübatörde enzim üretim ortamlarında 65°C’ de 150 rpm’de, 24 saat inkübe edildikten sonra aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre, taranan 53 adet termofilik izolatın %11,32’sinde intraselüler α -galaktosidaz, %5,66’sında ise intraselüler β -galaktosidaz aktivitesi belirlenmiştir. Aktivite gösteren izolatlarda sıcaklığın α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin stabilitesine etkisi belirlenmiştir. En yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesi α -galaktosidaz enzimi için **izolat-26**’da, β -galaktosidaz enzimi için ise **izolat-20**’de tespit edilmiştir. **İzolat-20**’ye ait β -galaktosidaz, 60°C’de 5 saat sonunda aktivitesinin tamamını korurken, 70°C’de aktivitesinin %73’ünü korumuştur. **İzolat-26**’ya ait α -galaktosidaz, 50°C ve 60°C’de 5 saat sonunda aktivitesinin tamamını korumuştur, ayrıca enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6,0-7,0 ve 65°C olarak belirlenmiştir.

Ölçek büyütülerek biyoreaktörde derin kültür fermentasyonu yöntemiyle üretilen hücre pelletinden α -galaktosidazın kısmi saflaştırması yapılmıştır. Enzim %41 verimle iki basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ayrıca, enzimin moleküler ağırlığının 55 kDa olduğu SDS-PAGE ile tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, endospor oluşturan termofilik izolat, enzim aktivitesi, kısmi saflaştırma ve karakterizasyon

ABSTRACT**DETERMINATION OF ALPHA-GALACTOSIDASE AND BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITIES OF SOME ENDOSPORE FORMING THERMOPHILIC BACTERIAL ISOLATES AND PARTIAL ENZYME CHARACTERIZATION**

GÜMÜŞ, Nazlı

Master Thesis, Bioengineering Department

Supervisor : Prof. Dr. Rengin ELTEM

October 2012, 123 pages

In this study, 53 thermophilic and endospore forming bacterial isolates, obtained from the Culture Collection of Ege University Bioengineering Department, were screened for their α -galactosidase and β -galactosidase enzyme activities. The isolates were firstly incubated in enzyme producing liquid media at 65°C with shaking at 150 rpm for 24 hours and then their intracellular enzyme activities were assayed. Of the cultivated 53 thermophilic isolates, 11.32% were found to have intracellular α -galactosidase activity while 5.66% were found to have intracellular β -galactosidase activity. When the effect of temperature on α -galactosidase and β -galactosidase enzyme stabilities were monitored, two isolates, **isolate-26** and **isolate-20**, were found to show the highest temperature stability together with the highest α -galactosidase and β -galactosidase activities. The β -galactosidase of the **isolate-20** could retain 100% of its activity at 60°C, and 73% of its activity at 70°C at the end of 5 hours. The α -galactosidase of the **isolate-26**, could retain its activity completely both at 60°C and at 50°C at the end of 5hours. The optimum temperature and pH of the enzyme were found at 65°C and pH 6.0-7.0.

Submerged fermentation method was used for the scaled up and the partial purification of α -galactosidase from the cell pellets was carried out in two steps with a yield of 41%. The molar mass of the enzyme, determined by SDS-PAGE, was 55 kDa.

Keywords: α -galactosidase, β -galactosidase, endospore forming thermophilic isolate, enzyme activity, partial purification and characterization

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince, bu imkânı bana tanıyan, akademik bilginin yanı sıra hayata dair tavsiyeleriyle yolumu aydınlatan başta tez danışmanım **Prof. Dr. Rengin ELTEM** olmak üzere, sonsuz sevgi ve sabırlarıyla beni destekleyen anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım, bana destek olan değerli hocam **Yrd. Doç. Dr. Sayit SARGIN**'a, **Dr. Yüksel GEZGİN**'e ve **Dr. Şevket KARAÇANCI**' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İhtiyaç duyduğum anlarda yanımda olan ve yardım istemekten çekinmediğim, güleryüzlü çalışma arkadaşım **Sibel ÖZTÜRK**'e, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen başta diğer laboratuvar arkadaşlarım olmak üzere ve tüm “**Biyomühendislik Bölümü Ailesi**”ne en içten dileklerle teşekkür ederim. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi’ kapsamında **11-Müh-004** nolu proje ile yüksek lisans tezimin gerçekleştirilmesinde mali desteği sağlayan **Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü**'ne ve **Mühendislik Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonları**'na teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Biyomedikal Enzimler	6
2.2 Terapötik Amaçlı Kullanılan Biyomedikal Enzimlerin Kullanımındaki Kısıtlamalar	13
2.3 Galaktosidazlar	14
2.3.1 α -Galaktosidaz	14
2.3.2 β -Galaktosidaz	18
2.4 <i>Bacillus</i> Genusu	23
2.5 <i>Geobacillus</i> Genusu.....	24
2.6 Enzim Stabilitesi ve Termostabil Enzimlerin Önemi	28
2.7 Reaktör Üretimi	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.8 Protein Saflaştırma.....	34
2.8.1 Parçalama (Homojenizasyon) yöntemleri.....	36
2.8.2 Liyofilizasyon	39
2.8.3 Çöktürme	39
2.8.4 FPLC.....	40
2.8.5 Denatüre Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	42
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1 Materyal	45
3.1.1 Çalışmada kullanılan endospor içeren termofilik bakteri izolatları.....	45
3.1.2 Kullanılan besiyerleri.....	46
3.1.3 Kullanılan solüsyon ve çözeltiler.....	47
3.1.4 Kullanılan cihazlar.....	57
3.2 Metot	60
3.2.1 Endospor oluşturan bazı termofilik bakteri izolatlarında α -galaktosiaz ve β -galaktosidaz aktivitesinin taranması	60
3.2.2 β -Galaktosidaz ve α -galaktosidaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu...	65
3.2.3 β -Galaktosidaz ve α -galaktosidaz enzimleri için seçilen izolatların aşı ortamında büyüme eğrilerinin çıkarılması	67

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.4 Çalkalamalı erlenlerde zamanın α -galaktosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi	67
3.2.5 Biyoreaktörde zamanın α -galaktosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi	68
3.2.6 Üretilen α -galaktosidaz enziminin kısmi saflaştırılması	68
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	74
4.1 Endospor Oluşturan Bazı Termofilik Bakteri İzolatlarında β -Galaktosidaz ve α -Galaktosidaz Aktivitesinin Taranması	74
4.2 β -Galaktosidaz ve α -Galaktosidaz Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu	78
4.2.1 β -Galaktosidaz aktivitesine sahip termofilik izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi	78
4.2.2 α -Galaktosidaz aktivitesine sahip termofilik izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi	83
4.3 Seçilen İzolat-26'da α -Galaktosidaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklık ve pH'nın Belirlenmesi	90
4.4 α -Galaktosidaz Enzimi İçin Seçilen İzolat-26'da pH'nın Enzim Stabilitesine Etkisi.....	92
4.5 β -Galaktosidaz ve α -Galaktosidaz Enzimleri İçin Seçilen İzolatların Aşı Ortamında Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması	94
4.6 Çalkalamalı Erlenlerde Zamanın α -Galaktosidaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	95
4.7 Biyoreaktörde Zamanın α -Galaktosidaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi....	97

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.8 Üretilen α -Galaktosidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	100
4.8.1 Santrifügasyonla ayırma	100
4.8.2 Liyofilizasyon ile konsantrasyon	100
4.8.3 Sonikasyon ile hücre parçalama	101
4.8.4 Amonyum sülfat ile protein çöktürme	101
4.8.5 FPLC-Jel Filtrasyon Kromatografisi	103
4.8.6 SDS-PAGE	105
4.9 Üretilen α -Galaktosidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Sonucu Elde Edilen Bulgular	107
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	111
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	115
ÖZGEÇMİŞ	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Genelleştirilmiş enzim üretim şeması, a) endüstriyel kullanıma yönelik, b) analitik ve c) terapötik enzimler	6
2.2 İnsan beslenmesinde besin takviyesi olarak kullanılan ticari olarak bulunan α - galaktosidaz ilaçları	18
2.3 β -galaktosidaz enziminin katalizörlüğünü yaptığı reaksiyon.....	19
2.4 Standart bir mekanik karıştırıcılı biyoreaktör sistemi. 1.Reaktör, 2. Karıştırıcı motor, 3.Oksijen probu, 4.pH probu, 5.Sıcaklık sensörü, 6. Kondensör, 7.Oksijen metre, 8.Karıştırma hızı kontrol ünitesi, 9.Sıcaklık kontrol Ünitesi, 10.pH metre.....	33
2.5 Protein üretimi ve alt akım işlemlerine ait genel basamaklar.	35
2.6 FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography).....	41
2.7 AKTA Amersham Bioscience firmasına ait FPLC cihazı ve kısımları	42
2.8 Bir proteinin SDS ile inkübasyonunda oluşan durum	43
2.9 SDS-PAGE sisteminin genel şeması.	44
3.1 p-Nitrofenol standart eğri grafiği.	64
3.2 Protein miktarı standart eğri grafiği.	71
4.1 İzolat-26'nın Gram boyama sonucundan elde edilen mikroskop görüntüsü.....	79
4.2 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 1.saat).....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 3.saat).....	79
4.4 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 5.saat).....	80
4.5 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin zamana bağlı değişimi (T=70°C).....	81
4.6 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin zamana bağlı değişimi (T=73°C).....	81
4.7 Termofilik izolatlara (izolat-7, 12, 17, 20, 26, 35) ait α -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 5.saat).....	83
4.8 İzolat-7'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.....	84
4.9 İzolat-12'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.....	84
4.10 İzolat-17'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.....	85
4.11 İzolat-20'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.....	85
4.12 İzolat-26'nın α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.....	86
4.13 İzolat-35'in α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 Termofilik izolatlara (izolat-7, 26, 35) ait α -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 5.saat)	88
4.15 Termofilik izolat-26 için, 0,01 M potasyum fosfat tamponu- pH 6,7’de farklı inkübasyon sıcaklıklarına ait enzim aktiviteleri	90
4.16 Termofilik izolat-26 için, pH 3,0-10,7 aralığına ait enzim aktiviteleri	91
4.17 Termofilik izolat-26 için, pH 3-10,7 aralığının α -galaktosidaz enzim stabilitesi üzerine olan etkisi ve buna ait kalan aktivite yüzdeleri	93
4.18 İzolat 26’nın LB broth aşısı ortamındaki üretim saatlerine bağlı OD değerleri.....	94
4.19 İzolat 20’nin LB broth aşısı ortamındaki üretim saatlerine bağlı OD değerleri.....	95
4.20 İzolat 26’nın çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen enzim aktivitelerinin grafiksel gösterimi.....	96
4.21 İzolat 26’nın çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık ve enzim aktivite değerlerinin tek bir grafikte gösterimi.....	96
4.22 İzolat 26’nın çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen pH değerlerinin grafiksel gösterimi.....	97
4.23 İzolat-26’nın biyoreaktördeki üretim saatlerine göre elde edilen enzim aktiviteleri.....	98
4.24 Dört litrelik üretimin yapıldığı biyoreaktör ve kontrol paneli.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.25 İzolat-26'nın biyoreaktördeki üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık ve enzim aktivite değerlerinin tek bir grafikte gösterimi	99
4.26 Çalışmada kullanılan Sigma 4K-15 nolu santrifüj (a) alan 6 bölmeli rotor kısmı (b) her biri 250 ml'lik santrifüj kabı (c)	100
4.27 BADELIN Marka Gerate-TypVW 2070 sonikatör.....	101
4.28 Amonyum sülfat ile protein çöktürme işlemi.....	102
4.29 Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC cihazı. a) HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR kolonu ile cihazın genel görünümü, b) otomatik fraksiyon toplayıcısı, c) sarı ok ile gösterilen örneğin verildiği kısım, kırmızı ok ile gösterilen örneğin tampona karışmak üzere beklediği enjeksiyon loop ve mor ok ile gösterilen kullanılan tamponlar.	103
4.30 Termofilik İzolat-26' ya ait FPLC sonunda elde edilen grafikler. (a) ve (b) kırmızı ok ile gösterilen aktif fraksiyon pikleri.	104
4.31 Termofilik İzolat-26' ya ait FPLC sonrası toplanan, pikin görüldüğü fraksiyonların enzim aktivitesi tayini yapıldıktan sonraki görünümleri	105
4.32 SDS-PAGE sisteminin görüntüleri.....	105

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.33 Termofilik İzolat-26'ya ait SDS-PAGE görüntüsü. (a) %6'lık jelde yürütme sonucu elde edilen SDS-PAGE görüntüsü; (1) enzim markerı, (2) 8 nolu, (3) 9 nolu , (4) 10 nolu , (5) 11 nolu , (6) 12 nolu, (7) 13 nolu FPLC sonrası elde edilen fraksiyonları göstermektedir. (8) ham enzim ekstraktına, (9) amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilip FPLC'ye yüklenen pellete, (10) ise amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilen süpernatanta ait SDS-PAGE görüntüleridir. (b) %10'luk jelde yürütme sonucu elde edilen SDS-PAGE görüntüsü; (1) enzim markerı, (2) 8 nolu, (3) 9 nolu , (4) 10 nolu , (5) 11 nolu , (6) 12 nolu, (8) 13 nolu FPLC sonrası elde edilen fraksiyonları göstermektedir. (7) amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilen süpernatanta, (9) ham enzim ekstraktına, (10) ise amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilip FPLC'ye yüklenen pellete ait SDS-PAGE görüntüleridir. (a) ve (b)' de ok ile gösterilen yerlerde α -galaktosidaz enzimine ait 55 kDa'luk bantlar gösterilmektedir 106
- 4.34 SDS-PAGE çalışmasında kullanılan PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder markera ait bantlar ve moleküler ağırlıkları 107

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Diagnostik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimler, elde edildiği organizmalar ve kullanım amaçları	7-8
2.2 Terapötik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimler ve kullanım amaçları.....	9-10
2.3 Vücutta çeşitli enzimlerin eksikliği hallerinde görülen klinik belirtileri.....	10-11
2.4 Terapötik amaçlı enzim replasman tedavisinde kullanılan ve halen üzerinde çalışmalar devam eden biyomedikal enzimler	11
2.5 Terapötik amaçlı sindirim yardımcısı olarak kullanılan biyomedikal enzimler.....	12
2.6 Terapötik amaçlı ilaç etken maddesi olarak kullanılan biyomedikal enzimler.....	12
2.7 Glikozil hidrolazlar familya-36'ya ait olan α -galaktosidazlar	15-16
2.8 β -Galaktosidaz enziminin mikrobiyal kaynakları	21
2.9 <i>Bacillaceae</i> familyasındaki genoslara ait isimlendirmelerin anlamları ve açıklamaları.	23-24
2.10 <i>Geobacillus</i> genusuna ait açıklamalar	25-26
3.1 α -Galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimleri için taranan endospor oluşturan termofilik izolatlar.	45
4.1 α -Galaktosidaz enzim üretim ortamında belirlenmiş enzim aktiviteleri	75
4.2 β -Galaktosidaz enzim üretim ortamında belirlenmiş enzim aktiviteleri	75

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 β -Galaktosidaz üreten bazı mikroorganizmalar ve enzimlerin aktivite değerleri.....	76
4.4 α -Galaktosidaz üreten bazı mikroorganizmalar ve enzimlerin aktivite değerleri.....	77
4.5 İzolat-20 ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimlerinin 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda inkübasyonu sonucu kalan aktivite yüzdeleri	80
4.6 Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen β -galaktosidaz enzimlerinin termostabilite özellikleri	82
4.7 İzolat-7, izolat-12, izolat-17, izolat-20, izolat-26 ve izolat-35'e ait α -galaktosidaz enzimlerinin 50, 60, 70°C sıcaklıklardaki stabiliteleri	87
4.8 Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen α -galaktosidaz enzimlerinin termostabilite özellikleri	88-89
4.9 α -Galaktosidaz enzimi için literatür çalışmalarına ait optimum sıcaklık değerleri.....	90-91
4.10 α -Galaktosidaz enzimi için literatür çalışmalarına ait optimum pH değerleri.....	92
4.11 Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen α -galaktosidaz enzimlerinin pH stabilite aralıkları	93-94
4.12 Termofilik İzolat-26 için amonyum sülfat ile çöktürme denemelerine ait veriler.	102
4.13 Termofilik İzolat-26 için %50'lik amonyum sülfat konsantrasyonu ile çöktürme denemesi ile belirlenmiş enzim aktivitesi	103

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 Termofilik İzolat-26' ya ait kısmi saflaştırma verileri.....	108
4.15 <i>Sulfolobus solfataricus</i> 'un α -galaktosidaz enzimine ait saflaştırma verileri	109
4.16 <i>Bacillus stearothermophilus</i> (NCIM 5146)'un α -galaktosidaz enzimine ait saflaştırma verileri.....	109
4.17 <i>Bacillus stearothermophilus</i> 'un α -galaktosidaz enzimine ait saflaştırma verileri	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
oNPG	o-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid
pNPG	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid
SDS-PAGE	Sosdyumdodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
Gal	Galaktoz
RPM	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
FPLC	Hızlı-Performans Sıvı Kromatografi (Fast-Performance Liquid Chromatography)
HPLC	Yüksek-Performans Sıvı Kromatografi (High-Performance Liquid Chromatography)
BSA	Bovine serum albumin

1. GİRİŞ

Günümüzde enzimler gıda, deri, deterjan, tekstil ve farmasötik gibi çeşitli endüstri dallarında geniş kullanım alanına sahiptirler. Enzim endüstrisinde son zamanlarda önemli ve hızlı bir gelişim gösteren pazar terapötik enzimlere aittir. Moleküler prensiplerin, birçok hastalığın neden ve sonuçlarının daha anlaşılır bir hale gelmesiyle çok sayıda protein, terapötik ajan olarak büyük bir potansiyele sahip olmuştur. Enzimlerin katalizör niteliği ve çoğunun hedef substratları için seçkin bir spesifite ve afinite göstermesi, çok sayıda enzimin uygulanabilir terapötikler olarak ön plana çıkmasını sağlamıştır. Terapötik enzimler günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta ve bazı hastalıkların da potansiyel tedavi aracı olarak görülmektedir.

Biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahip ekstremozimler arasında potansiyeli en yüksek olanlar termostabil enzimlerdir. Protein termostabilitesi, bilimsel ve endüstriyel alanlarda büyük öneme sahiptir. Protein termostabilitesi çalışmalarında, deterjan üretimi, gıda ve nişasta işlenmesi, yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi ve PCR uygulamaları gibi çeşitli endüstriyel uygulamalar için yararlı olmaları nedeniyle ekstremozimlerin kullanımı giderek artmaktadır (Coşkun, 2010). Yüksek termal dayanıklılık birçok endüstriyel enzimde istenen bir özelliktir. Çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genellikle yüksek sıcaklıklarda ($>50^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilir. Bu yüzden son yıllarda özellikle yeni keşfedilen ve sert şartlara iyi dayanım gösteren termofilik enzimlerin pratik uygulama alanları artmıştır (Demirjian ve ark., 2001).

Biyoteknolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmesi pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın arttırılması, organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanımı açısından son derece önemlidir. Artan sıcaklıkla beraber ortamın viskozitesi düşmekte ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısı artmaktadır. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı sağlanabilmektedir. Bunun yanı sıra termofilik enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanımı ile yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riski de azaltılmış olur. Kimi zaman protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılan bu enzimler biyolojik olarak oldukça güç bir şekilde parçalanabilen ve çözünmeyen çevresel kirleticilerin oluşumunu da engeller (Güven, 2011). Termofilik enzimlerin çoğu gıda, kağıt, pulpa gibi yerel endüstrilerde bulunan kompleks polisakkaritlerin modifikasyonu ile organik biyosentez için kullanılmaktadır.

Doğal enzimler gıda endüstrisi için yeterli miktarlarda mevcut değildir. Bu yüzden de enzimlerin mikrobiyel suşlardan izole edilerek ticari alanda kullanılacak miktarlarda spesifik olarak elde edilmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmayla hem mikrobiyal bir kaynaktan izole edilen, hem de biyomedikal alanda ve gıda alanında önem taşıyan, sıcaklık stabilitesinin de getirdiği avantajlara sahip α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerin üretimi sağlanabilmiştir.

α -galaktosidaz terapötik amaçlı enzim replasman tedavisinde (Fabry's Hastalığı) ve terapötik amaçlı sindirim yardımcısı olarak kullanılan biyomedikal enzimdir.

α -galaktosidaz, şeker pancarı endüstrisinde kullanışlı bir enzimdir. Şeker üretim prosesi boyunca da yüksek sıcaklıkların kullanılmasına bağlı olarak, yüksek sıcaklıklardaki stabilite ve aktivite, α -galaktosidazların önemli özellikleridir (Filho et al., 2007). Mikrobiyal α -galaktosidazlar şeker üretimi endüstrisinde rafinoz ve staktyoz gibi sukroz kristalizasyonunu negatif yönde etkileyen ürünlerin elimine edilmesinde kullanışlıdır. Baklagil temelli besinlerin besleyiciliğinin geliştirilmesinde bu enzim kritik rol oynar. Şişkinliğe yol açan rafinoz şeker ailesi gibi besleyici olmayan galaktoolisakkaritlerin azaltılması ve uzaklaştırılmasında bu enzimlere başvurulabilir. α -galaktosidazlar pulp ve kağıt endüstrisinde uygulama alanlarına sahiptir (Anisha et al., 2007).

β -galaktosidaz gıda sektörü başta olmak üzere biyoremediasyon, biyosensör tasarımı, hastalıkların teşhisi ve tedavisi gibi pek çok farklı alanda dikkat çeken ve kullanım potansiyeli yüksek olan bir enzimdir (Asraf ve Gunasekaran, 2010).

Bağırsaklardaki enzim miktarının düşüklüğü, populasyonların büyük kısmında laktoz intoleransı adı verilen rahatsızlığın ortaya çıkmasına neden olur. Yoksunluğun görüldüğü kimseler süt ve süt ürünlerinin tüketiminde sıkıntı yaşar (Song et al., 2011, Güven, 2011). Özellikle süt ve süt ürünlerinde laktoz içeriğinin düşürülmesi amacıyla yapılan β -galaktosidaz uygulaması, hem bu ürünlerin tüketim potansiyelini arttırmak hem de laktozun düşük çözünürlüğü ve tatlılığı ile ilgili problemlerin üstesinden gelmek için uygun bir metot gibi görünmektedir. Dahası bu muamele sütü, laktoz intoleransı olan çok sayıdaki çocuk ve yetişkin için tüketimi daha uygun bir gıda haline getirmektedir. β -galaktosidaz enzimi ile gerçekleştirilen laktoz hidrolizinden peynir altı suyu oluşumuna bağlı çevresel problemlerin çözümünde de faydalanılmaktadır. Öte yandan β -galaktosidaz kullanımı ile bu maddeden etanol, tek hücre proteini ya da hücre dışı polisakkarit

üretilebilmektedir (Asraf ve Gunasekaran, 2010). Ayrıca galaktooligosakkaritlerin (GOS) sentezi için laktozun transglukozilasyonunda ve transgalaktozilasyonunda da kullanılabilmektedir (Chakraborti et al., 2000; Song et al., 2011).

Çalışmamızın amacı, ülkemiz jeotermal su kaynaklarından izole edilmiş **“Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”**nda bulunan endospor oluşturan çeşitli termofilik bakteri izolatlarında ticari potansiyeli olan termostabil enzimlerin varlığının araştırılması ve özelliklerinin incelenmesidir.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle, “Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonun”da bulunan 53 adet termofilik bakteri izolatında biyomedikal önemi olan α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin aktiviteleri taranacaktır. Aktivite gösteren izolatlarda sıcaklığın α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin stabilitesine etkisi belirlendikten sonra her iki enzim için de en yüksek aktiviteye ve sıcaklık stabilitesine sahip izolatlar tespit edilecektir. α -galaktosidaz enzimi için aktivite ve sıcaklık stabilitesine göre seçilen izolatta, enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlendikten sonra pH’nın enzim stabilitesine olan etkisi incelenecektir. Daha sonra α -galaktosidaz enzimi için seçilen izolattan biyoreaktörde ölçek büyütülerek derin kültür fermentasyonu yöntemiyle üretilen hücre pelletinden enzimin santrifüjasyon, liyofilizasyon, sonikasyon, amonyum sülfat ile çöktürme, jel filtrasyon kromatografi yöntemleri ile kısmi saflaştırılması yapılarak her adımda enzim aktivitesi, total aktivite, protein miktarı, spesifik aktivite ve % verim hesaplanacaktır. α -galaktosidaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile belirlenecektir.

Ülkemiz jeotermal su kaynaklarından izole edilmiş termofilik bakteriler yeni gen kaynakları olduklarından bu durum çalışmamıza özgünlük kazandırmaktadır. Ayrıca bu kadar çok sayıda bakteri türünün α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzim aktivitesi bakımından tarandığı bir literatür çalışması bulunmamaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Enzimler mikroorganizma, hayvan ve bitki kaynaklarından elde edilmek üzere tabiatta geniş çaplı bulunmaktadır. İlaç sektöründe başarıyla kullanılmalarının yanı sıra endüstrinin birçok farklı alanında yer almaktadırlar. Enzimler canlı organizmalardaki sayısız biyolojik reaksiyonun başlatılmasını ve düzenlenmesini sağlayan spesifik özellikteki protein molekülleridir. Reaksiyonun başlangıç aşamasında enzimin etki ettiği madde substrat, reaksiyon sonucu miktarda artış görülen ve açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. Enzimler substratın dış yüzeyinden itibaren etki göstermeye başlayarak şeklini bozar ve ürünü açığa çıkarmaktadır. Enzimler çok yüksek sıcaklıklarda protein yapıları bozulduğu için etkilerini kaybetmektedirler (Ogawa and Shimizu, 2002; Chris et al., 2005).

Biyoteknoloji alanında, genetik mühendisliği ve protein mühendisliğindeki ilerlemelerle farklı orijinlere sahip çok çeşitli enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olabilmektedir. İnsülin bilinen ilk genetik mühendisliği ilacıdır. Bunu takiben 1987 yılında ilk rekombinant enzim ilaç olarak Activase® (rekombinant t-PA) ticari adıyla, Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bu pıhtı parçalayıcı enzim, pıhtı ile koroner atardamarın tıkanmasıyla oluşan kap krizlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır. Günümüzde medikal enzimler onkolitik, antikoagülant, trombolitik, anti-inflamatuar, fibrinolitik, mukolitik, antimikrobiyal ve sindirim yardımcıları olarak kullanılmaktadır (Wiseman, 1987; Vellard, 2003; Chris et al., 2005).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987).

Ekstrem çevrelerden biri olan yüksek sıcaklık derecelerindeki çevrelerde yaşama yeteneği olan canlılar biyoteknolojinin ilgi alanına girmektedir. Termofilik kaynaklı enzimlerin kullanımına yönelik pek çok uygulama vardır ve bu enzimlerin özellikle termal stabiliteleri dikkat çekmektedir. Halen termofilik mikroorganizmalardan bu enzimlerin saflaştırılması ve özelliklerinin araştırılması ile ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur. Termal stabilite bu proteinlerden beklenen doğal bir özelliktir, bununla beraber bu proteinler mezofilik nitelikteki

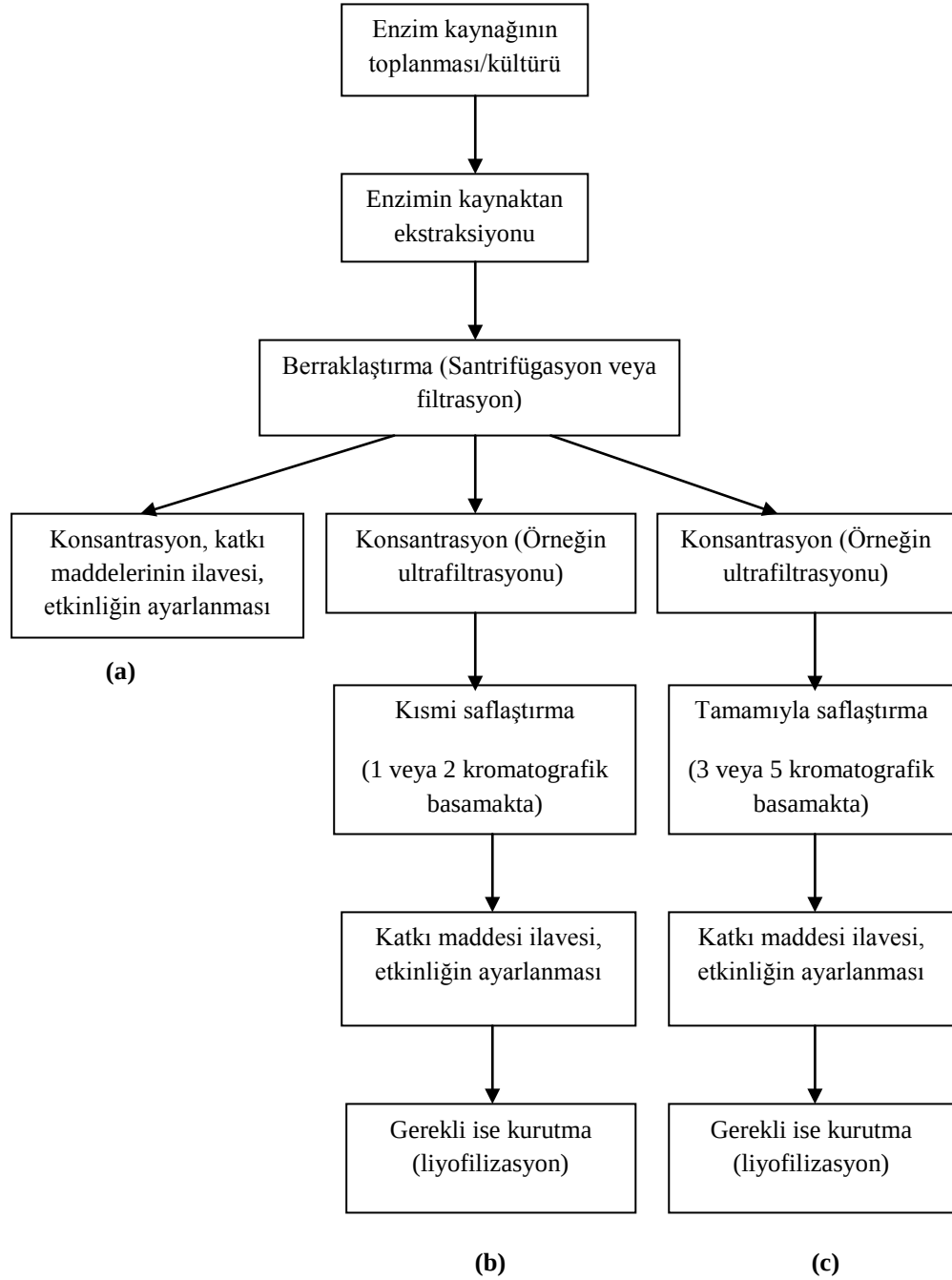
enzimlerle kıyaslandığında katotrofik ajanlara karşı daha dirençlidir (Kim et al., 2006b).

Sıcak su kaynakları gibi ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmaların sahip olduğu enzimler atıkların arıtımından, gıda sanayine kadar çok çeşitli uygulama alanı bulmaktadır. Potansiyel kullanım alanları nedeni ile ekstrem çevresel koşullarda yaşayabilen mikroorganizmalar son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Hough and Danson, 1999; Feitkenhauer et al., 2003).

Salgılanma şekillerine göre enzimler; intraselüler enzimler ve ekstraselüler enzimler olmak üzere ikiye ayrılır. İntraselüler enzimler, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, amino asitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneğinde olan moleküllerdir. Ekstraselüler enzimler ise, besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır. Ekstraselüler enzimlerin stabilitesi intraselüler enzimlere göre daha yüksektir ve çevre koşullarında aktivitelerini daha uzun süre koruyabilirler (Vilas, 2006).

Doğal bir kaynaktan elde edilen enzimin biyoreaktörde üretilmesi sonrasında geri kazanımını ve ekstraksiyonunu kapsayan alt akım işlemlerinin zorluk derecesi, istenilen son ürünün özelliklerine bağlıdır. Endüstriyel kullanıma yönelik enzimler minimal saflaştırmaya ihtiyaç duyar ya da saflaştırma yapılmaz ve genellikle son ürün katkı maddeleri ile konsantre edilmekte ve gerekirse kurutulmaktadır. Terapötik enzimler ise endüstriyel enzimlere göre çok daha düşük miktarda, yüksek saflık ve spesifiklikte istenmektedir bu yüzden son formülasyon öncesi homojenlik elde edilene kadar sürekli saflaştırılır ve bu işlem çok basamaklı (üç veya beş) yüksek çözünürlüklü kromatografik adımları içermektedir. Diğer taraftan analitik amaçlar için kullanılan enzimlerde bir veya iki basamaklı kromatografik adımdan geçerek kısmi saflaştırılır ve gerekirse terapötik enzimlerdeki gibi liyofilizasyon yapılır (Sizer, 1972; Walsh, 2006).

Üretim aşaması söz konusu olduğunda enzimler kullanılacakları yere bağlı olarak farklı proseslere ihtiyaç duyarlar. Şekil 2.1’de endüstriyel, analitik ve terapötik amaçlarda kullanılmak üzere enzimlere ait genelleştirilmiş üretim basamakları görülmektedir (Panke et al., 2002).



Şekil 2.1 Genelleştirilmiş enzim üretim şeması, a) endüstriyel kullanıma yönelik, b) analitik ve c) terapötik enzimler (Panke et al., 2002).

2.1 Biyomedikal Enzimler

Biyomedikal teknoloji sayesinde elde edilen enzimlere **biyomedikal enzimler** adı verilir. Biyomedikal enzimler kullanım amaçlarına göre diagnostik (analitik) ve terapötik enzimler olarak başlıca iki gruba ayrılmışlardır (Walsh, 2001). Diagnostik enzimler, klinik biyokimya alanında önemli bir yere sahiptir.

Klinik biyokimya, klinik biyolojik örneklerdeki geniş farklılıklara sahip olan marker (belirteç) maddelerin teşhis edilmesi, gösterilmesi ve miktarının ölçülmesi ile ilgili bir bilim dalıdır. Klinik biyokimya ve diagnostik enzimoloji alanındaki araştırma ve geliştirmenin yanı sıra bu aladaki hızlı ilerleyiş, hastalıkları teşhis eden çeşitli enzimlerin üretilmesinde artan bir kapasiteye ve hassaslığa neden olmuştur. Enzimlerin diagnostik aletleri daha hassas hale getirmesinin, klinik enzim ve test kitleri üreticileri tarafından ispatlanmasıyla birlikte analizleri standartlaştırmak için uluslararası çalışmalar durmaksızın sürdürülmektedir. Diagnostik enzimolojide enzimlerin katalitik aktivitesini analiz etmek için uygun olan birçok yöntem bulunmaktadır. Analizlerin duyarlılığı, çok sayıda substrat molekülünün reaksiyonunu katalizlemek için tek bir enzim molekülünün oluşturduğu bir yükseltme etkisi sayesinde artar. Enzim-kataliz reaksiyonları genellikle uygun bir spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemle kolayca gözlemlenebilir. Diagnostik amaçla kullanılan enzimler, direkt olarak substrat olan hedef analitin işleyişini spektrofotometrik yöntemler sayesinde ortaya çıkarır ve sonucunda ortaya çıkan sinyalin büyüklüğü hedef analitin konsantrasyonu ile direkt olarak orantılıdır. Çizelge 2.1’de diagnostik amaçlı kullanılan biyomedikal enzim örnekleri bulunmaktadır. (Kresse, 1995; Pandey et al., 2006).

Günümüzde de diagnostik enzimlerle antikor-antijen reaksiyonunun derecesini belirlemek için immünassay yöntemlerinde geniş ölçüde çalışılmaktadır (Pandey et al., 2006).

Çizelge 2.1 Diagnostik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimler, elde edildiği organizmalar ve kullanım amaçları (Kresse, 1995).

Enzim	Elde Edildiği Kaynak	Kullanım Amacı
Acetyl cholinesterase	Sığır eritrositleri	Pestisitler gibi organofosforlu bileşenlerin analizinde
Alcohol dehydrogenase	Saccharomyces cerevisiae	Biyolojik sıvılardaki alkol seviyesinin belirlenmesinde
Alkaline phosphatase	Buzağı bağırsağı ve böbreği, rekombinant (Picca spp.)	Antikorlarla konjuge olur, ELİSA da indikatör olarak

Çizelge 2.1 (devam)

Enzim	Elde Edildiği Kaynak	Kullanım Amacı
α -glukosidaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus</i> spp.	α -amilaz aktivitesinin tayininde
Arjinaz	Sığır karaciğeri	Plazma ve ürede L-arjinin seviyesinin belirlenmesinde
Askorbat oksidaz	<i>Cucurbita</i> spp.	Askorbik asit seviyesinin belirlenmesinde
β -galaktosidaz	<i>E.coli</i>	İmmünassay marker enzim
Kolesterol oksidaz	Domuz pankreası, <i>Pseudomonas</i> spp., rekombinant <i>Streptomyces</i> spp.	Serum kolesterol seviyesinin belirlenmesinde
Keratinaz	<i>Pseudomonas</i> spp.	Keratinin tayininde
Glukoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>	Biyolojik örneklerdeki glukoz miktarının tayininde, ELISA sistemleri için marker
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glukoz için indükator enzim, hegzokinaz ile birleşen ATP'nin belirlenmesinde
Glutamat dehidrogenaz	Sığır karaciğeri	Üreazla birleşen kan üre nitrojeninin kanda tespitinde
Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz	<i>Aerococcus viridans</i> , Tavşan kası	Triasilgliserol (Serum trigliseridleri) miktarının tayininde
Gliserol kinaz	<i>Candida mycoderma</i> , <i>Arthrobacter</i> spp.	Lipazla etkileşen trigliserid seviyesinin kanda tespitinde
Hekzokinaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vücut sıvılarında glukozun belirlenmesinde
Peroksidaz	<i>Armoracia lapathifolia</i>	İndikatör enzim ve immunoassay marker enzim
Piruvat oksidaz	<i>Pediococcus</i> spp.	Piruvat, transaminaz aktivitesinin belirlenmesinde
Sarkozin oksidaz	<i>Pseudomonas</i> spp.,	Keratinin tayininde
Ürat oksidaz (Ürikaz)	<i>Arthrobacter protophormise</i>	Ürik asitin belirlenmesinde
Üreaz	<i>Klebsiella aurogenes</i>	Ürenin tespitinde

Terapötik enzimler ise; pıhtı çözücü ajan olarak, enzim replasman tedavisinde, sindirim yardımcısı olarak, çeşitli kanserlerin ve pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Kresse, 1995).

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin aksine, terapötik amaçlar için kullanılan enzimlerin oldukça az miktarlarda, yüksek derecede saflık ve genellikle yüksek spesifiklikte olması istenmektedir. Bu tür enzimlerin üretileceği kaynak organizmalar herhangi bir olası uyumsuz materyal ile istenmeyen bir kontaminasyonun engellenmesi için titizlikle seçilir. Terapötik enzim üreticisi mikroorganizmalar GRAS (Genellikle Güvenli Kabul Edilen) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu mikroorganizmalar; patojenik değildirler, toksik özellikleri yoktur ve genel olarak antibiyotik üretmezler (Sizer, 1972; Walsh, 2001).

Terapötik enzimlerin klinik ve ticari başarısına rağmen güvenilirliğinin ve klinik profilinin gelişmesi genetik mühendisliğinden yararlanmasına bağlıdır. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi, klasik metodlarla terapötik ürünlerin mevcut üretimini yüksek saflıkta, daha güvenilir ve ekonomik hale getirmiştir (Panke and Wubbolts, 2002). Çizelge 2.2’de yer alan biyomedikal enzimlerin tamamı rekombinant DNA teknolojisi ile mikrobiyal yolla üretilerek piyasaya sürülmektedir.

Çizelge 2.2 Terapötik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimler ve kullanım amaçları (Kresse, 1995).

Enzim	Kullanım Amacı
Doku plazminojen aktivatörü (tPA)	Trombolitik ajan
Ürokinaz	Trombolitik ajan
Prokinaz/ürokinaz	Kalp krizlerinde pıhtı çözücü
Ancord	Antikoagülant (pıhtı çözücü)
Streptokinaz	Kan pıhtılaşmasında
Hiyaluronidaz	Miyokardial enfarktüs, kanser tedavisi ve göz cerrahisinde anestezi, tüp bebek tedavisinde
Kollajenaz	Deri ülserinde kollajen hidrolizinde
Tripsin	Yara iyileştirmesinde
α -amilaz	Nişasta sindirimine yardımcı
Sellülaz	Selülozun kısmi sindirimini indükler

Çizelge 2.2 (devam)

Enzim	Kullanım Amacı
α -galaktosidaz	Flatulence faktörlerinin degradasyonunu indükler
Laktaz (β -galaktosidaz)	Laktoz intoleransını giderir
Papain, Pepsin, Bromelain	Diyetle alınan proteinin degradasyonunu artırır
Pankreatin	Diyetle alınan karbonhidrat, yağ ve proteinin degradasyonunu artırır
L-Asparajinaz	Çocukluk çağı lösemi tedavisinde
Glutaminaz	Lösemi tedavisinde
Lizozim	Anti-inflamatuvar, antibiyotik
Aljinat liyaz	Kistik fibroz tedavisinde
Keratin kinaz	Kardiak ve iskelete ait bozuklukların tedavisinde
Rodanaz (tiyosülfat sülfürtransferaz)	Siyanür zehirlenmesi
Ribonükleaz	Antiviral (RNA hidrolizi) ajan
β -Laktamanaz	Penisilin alerjisinde
Superoksit dismutaz	Anti-inflamatuvar ajan
Papain	Anti-inflamatuvar ajan

Anahtar roldeki ürünlerin ya da substratların yetersizliği veya birikmesinden dolayı metabolik yol izlerindeki enzim aktivitelerinin eksik ya da anormal olması bazı klinik belirtiler ortaya çıkarır amaç bu semptomların oluşumunu kaynağında gidermektir. Çizelge 2.3'te vücutta çeşitli enzimlerin eksikliği hallerinde görülen klinik belirtiler yer almaktadır (Kopetzki, 1994).

Çizelge 2.3 Vücutta çeşitli enzimlerin eksikliği hallerinde görülen klinik belirtileri (Kopetzki, 1994).

Enzim	Klinik Belirtileri
Glukoz-6-fosfataz	Ciddi hipoglisemi, karaciğer ve böbrek büyümesi, kanda kolesterol, trigliserid ve ürik asidin artması
Glukoz-6-fosfat translokaz	Kanda nötrofil lökositlerin azalması
Adenosin deaminaz	Kombine bağışıklık yetersizlikleri
β -glukoserebrosidaz	Gaucher's hastalığı
α -galaktosidaz	Fabry's hastalığı
Asit α -galaktosidaz	Pompe hastalığı
Fosforilaz	Karaciğer büyümesi, kandaki yağ oranı artışı

Çizelge 2.3 (devam)

Enzim	Klinik Belirtileri
Glikojen sentetaz	Hipoglisemi ve ketozisin hızlanması, glikoz birikiminden sonra laktik asit ve hipoglisemi artışı
Laktat dehidrojenaz	Kas krampları, idrarda miyoglobulin, keratin kinaz artışı
Fruktoz 1,6 bifosfat aldolaz	Hemolitik anemi
Pirüvat kinaz	Kas krampları, kas zayıflığı
Fosforilaz kinaz	Kardiyomiyopati, kalp yetmezliği
Galaktoz 1-fosfat üridil transferaz	Galaktosemi (kanda şeker birikimi)
Galaktokinaz	Katarakt
Alkalın fosfataz	Hipofosfatazi (mineral inhibitörlerinin birikimi), fosfor yetersizliği

Enzim replasman tedavisi, vücutta üretimi yetersiz olan ya da hiç bulunmayan bir enzimin yerine koyulduğu tıbbi bir tedavidir. Düzenli aralıklarla (örneğin, ayda iki kez), yaşam boyu devam eden bir tedavi şeklidir (Walsh, 2002). Çizelge 2.4’te bu amaçla kullanılan bazı terapötik enzimler yer almaktadır.

Çizelge 2.4 Terapötik amaçlı enzim replasman tedavisinde kullanılan ve halen üzerinde çalışmalar devam eden biyomedikal enzimler (Walsh, 2002).

Enzim	Terapötik Kullanımı
β -glukoserebrosidaz	Gaucher’s hastalığı
α-galaktosidaz	Fabry’s hastalığı
Asit α -galaktosidaz	Pompe hastalığı
Ürat oksidaz (Ürikaz)	Hiperürisemi (Gut hastalığı)
α -L-iduronidaz	Mukopolisakkarodosis I (MPS I)
Asetilgalaktozamin-4-sülfataz	Mukopolisakkarodosis IV (MPS IV)
Laronidaz	Mukopolisakkarodosis II (MPS II)
α -L-fukosidaz	Fucosidosis hastalığı

Değişen beslenme alışkanlıklarının olumsuz getirisi sindirim sistemi rahatsızlıkları olarak ortaya çıkmaktadır. Biyomedikal enzim sektörü bu soruna “sindirime yardımcı enzimler” ile destek olmaktadır. Çizelge 2.5’de terapötik amaçlı sindirim yardımcısı enzimler yer almaktadır.

Çizelge 2.5 Terapötik amaçlı sindirim yardımcısı olarak kullanılan biyomedikal enzimler (Walsh, 2002).

Enzim	Terapötik Kullanımı
α -amilaz	Niştasta sindirimine yardımcı olur
Selüloz	Selülozun kısmi sindirimini indükler
α -galaktosidaz	Flatulance faktörlerinin degradasyonunu indükler
β -galaktosidaz (laktaz)	Laktoz intoleransını giderir
Papain, Pepsin, Bromelain	Diyetle alınan proteinin degradasyonunu artırır
Pankreatin	Diyetle alınan karbohidrat, yağ ve proteinin degradasyonunu artırır

Çeşitli ilaçların bileşenleri arasında ilacın etkinliğinin artmasına yardımcı ajanlar olarak çok çeşitli enzimler, ilaç preparasyonu olarak geliştirilmiştir. Çizelge 2.6’da bu enzimlere örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.6 Terapötik amaçlı ilaç etken maddesi olarak kullanılan biyomedikal enzimler (Walsh, 2002).

Enzim	Terapötik Kullanımı
Asparajinaz	Çocukluk çağı lösemi tedavisinde (Antikanser ajanı)
Glutaminaz	Lösemi tedavisinde
Lisozim	Anti-inflamatuvar, antibiyotik
Alginat liyaz	Kistik fibroz tedavisinde
Keratin kinaz	Kardiak ve iskelete ait bozuklukların tedavisinde
Rodanaz (tiyosülfat sülfürtransferaz)	Siyanür zehirlenmesi tedavisinde
Ribonükleaz	Antiviral (RNA hidrolizi) ajan
β -Laktamaz	Penisilin alerjisinde
Süperoksit dismutaz	Anti-inflamatuvar ajan, oksijen zehirlenmesi (<i>Paul Bert Etkisi</i>) tedavisinde
Papain	Anti-inflamatuvar ajan

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin aksine, terapötik amaçlar için kullanılan enzimlerin oldukça az miktarlarda, yüksek derecede saflık ve genellikle

yüksek spesifiklikte olması istenmektedir. Bu tür enzimlerin üretileceği kaynak organizmalar herhangi bir olası uyumsuz materyal ile istenmeyen bir kontaminasyonun engellenmesi için titizlikle seçilir. Terapötik enzim preparasyonları genellikle liyofilize halde, sadece biyouyumlu tampon tuzları ve mannitol ilaveli saf preparasyonlar olarak satılmaktadır. Bu tür enzim fiyatları hala oldukça yüksek olmalarına rağmen, diğer terapötik kimyasallar ve tedavilerle karşılaştırıldığında onlarla rekabet edebilmektedir (Walsh, 2002).

Günümüzde yüksek katma değerli protein ürünleri için rekombinant DNA teknolojisi, konvansiyonel metodlarla terapötik ürünlerin mevcut üretimini daha güvenilir, yüksek saflıkta ve çok daha ekonomik hale getirmiştir. Çizelge 2.6'da yer alan orjini mikrobiyal ya da memeli olan biyomedikal enzimlerin tamamı halihazırda **rekombinant DNA teknolojisi** ile mikrobiyal yolla üretilerek piyasaya sürülmektedir (Panke et al., 2002).

2.2 Terapötik Amaçlı Kullanılan Biyomedikal Enzimlerin Kullanımındaki Kısıtlamalar

Terapötik ajan olarak özellikle metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan spesifik biyokatalizörlerin bu alanda kullanımını kısıtlayan bir takım faktörler vardır. Bunlar:

a. Vücut hücrelerinin içinde kolayca dağılabilmek için oldukça büyüktürler. Bu durum, çok sayıdaki genetik hastalık için enzimlerin neden başarılı bir şekilde uygulanamadığının temel sebebidir. Bunun üstesinden gelmek için hedefe yönlendirilmiş enzimler üzerinde birçok çalışma halen devam etmektedir. Örneğin, β -galaktosidaz enziminin hedefe spesifik monoklonal antikorlar ile birleştirilerek verildiği, bu sayede hepatositlerin hedefi olmaktan kurtarıldığı rapor edilmiştir.

b. Genellikle vücuda yabancı olan proteinlerdir. Antijeniktirler ve devamlı kullanıldıklarında hayatı tehdit eden alerjik reaksiyonlara sebep olacak çeşitli immun yanıtlar doğurabilmektedirler. Bu durumun önüne geçmek için, bazı durumlarda enzim, protein yapısında olmayan bir molekülle kovalent modifikasyon ile gizlenir. Örneğin asparajinazın, polietilen glikolün kovalent ilavesi ile modifiye edildiğinde, hiçbir immunojenisite göstermeksizin anti-tümör etkisini koruduğu tespit edilmiştir. Bunun yanısıra, toksinlerin, pirojenlerin ve

diğer zararlı materyallerin terapötik enzim preparasyonunda yer alması yasaklanmıştır.

c. Dolaşımda iken etki süreleri bazen dakikalarla belirlenmektedir. Kovalent modifikasyonla gizlenerek bu sayede immunolojik problemle savaşmaları kolaylaştırılmaktadır. Ayrıca, enzimin yapay lipozomlar, sentetik mikroküreler ve hayalet kırmızı kan hücrelerinin içine hapsedilerek dolaşıma verildiği çalışmalar da yürütülmektedir. Bu metotlara rağmen uzun süre dolaşımda kalan enzim genellikle immunojenik yanıtı arttırmakta ve pıhtı oluşumuna sebep olmaktadır (Kopetzki, 1994).

2.3 Galaktosidazlar

Galaktozidik bağların hidrolizinden sorumlu enzimler galaktosidazlar olarak adlandırılır. Etki ettikleri substrat molekülündeki galaktozun anomerik karbon atomunun konumuna bağlı olarak adlandırılan, **α -galaktosidazlar** ve **β -galaktosidazlar** şeklinde iki tipi mevcuttur.

2.3.1 α -Galaktosidaz

Melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi oligosakkaritlerden, polimerik galaktomannan ve galaktolipidlerden α -1,6 bağlı terminal galaktoz birimlerinin hidrolizini gerçekleştirir (Fridjonsson et al., 2001).

α -Galaktosidazların hidroliz reaksiyonlarının yanında yanında transgalaktosil reaksiyonlarını da katalizleyebildiği ve *de novo* sentezini gerçekleştirdiği bilinmektedir. α -galaktosidaz hidroliz reaksiyonlarında sadece basit oligosakkaritleri ve polisakkaritleri değil aynı zamanda terminal α -D-galaktosid içeren çeşitli glikolipid ve glikoprotein gibi kompleks biyolojik moleküllerin de hidrolizini katalizler (Zaprometova and Ulezlo, 1988). α -galaktosidaz çok sayıda α -D-galaktopiranozid bağı içeren molekülleri hidrolizleyebilir, şöyle ki;

1. Metanol, fenol ve p-nitrofenol glikosidlerini

2. Disakkarit ve türevlerini (melibiyoz, epimelibiyoz, plantebiyoz ve melibiyonik asit gibi)

3. Trisakkaritleri (manninotrioz, umbelliferoz, rafinoz ve plantoz gibi)
4. Oligosakkaritleri (stakiyoz gibi)
5. Polisakkaritleri (galaktomannan gibi), (Courtois and Petek, 1966)

Kompleks biyolojik moleküllerin hidrolizini katalizleyebilen α -galaktosidaza incir α -galaktosidazı örnek verilebilir. Bu enzim globosid, seramid triheksosid, digalaktosil seramid ve glikopeptidlerdeki α -galaktosil bağlarını hidroliz edebilir. α -galaktosidazların hidroliz hızını etkileyen iki ana faktörden birincisi halka piranoid yapı, diğeri ise substratın karbon atomları üzerindeki $-OH$ ve $-H$ gruplarının konfigürasyonlarının α -galaktosidazın üzerindekiyle benzer olması durumudur (Dey and Pridham, 1972).

2.3.1.1 α -Galaktosidaz kaynakları

α -Galaktosidazlar doğada bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar arasında geniş bir yayılıma sahiptir (Gote et al., 2004).

Bilinen mikrobiyel α -galaktosidazların çoğu bir üst familya içeren (grup GH-D) GH27 ve GH36 ailesine aittir. Birkaç istisna hariç, çoğunlukla domain bacteria'ya ait olanlar familya 36 altında gruplandırılmıştır ve Çizelge 2.7'de gösterilmiştir (Söyler ve ark., 2004).

Çizelge 2.7 Glikozil hidrolazlar familya-36'ya ait olan α -galaktosidazlar.

Protein	Organizma
α -galaktosidaz	<i>Absidia corymbifera</i>
α -galaktosidaz Ag1C	<i>Aspergillus niger</i>
α -galaktosidaz	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
α -galaktosidaz	<i>Bifidobacterium breve</i> 203
α -galaktosidaz	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705
α -galaktosidaz (AgI1)	<i>Bifidobacterium longum</i> VMKB44
α -galaktosidaz	<i>Carnobacterium piscicola</i> BA
Aga	<i>Clostridium perfringens</i> 13
AgaN	<i>Clostridium perfringens</i> 13
α -galaktosidaz	<i>Clostridium stercorarium</i> F-9

Çizelge 2.7 (devam)

Protein	Organizma
alkalin α -galaktosidaz I	<i>Cucumis melo</i>
alkalin α -galaktosidaz II	<i>Cucumis melo</i>
α -galaktosidaz	<i>Escherichia coli</i> K12
α -galaktosidaz AgaA	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
α -galaktosidaz AgaB	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
α -galaktosidaz GaIA	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
α -galaktosidaz	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Aga	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
α -galaktosidaz (MelA)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
MelA	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1
α -galaktosidaz Aga	<i>Lactococcus raffinolactis</i> ATCC 43920
GaIA	<i>Leptospira interrogans</i> serovar lai str.
B1142B04.25-1	<i>Oryza sativa</i>
α -galaktosidaz 1 (AgaR)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
α -galaktosidaz 2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
α -galaktosidaz	<i>Streptococcus mutans</i>
α -galaktosidaz (AgaL)	<i>Streptococcus mutans</i> UA159
Aga	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
α -galaktosidaz (SP1898)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4
SAV1082 (AgaB1)	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
SAV1641 (AgaB3)	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
SCF85.02	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
α -galaktosidaz MelA	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
α -galaktosidaz	<i>Thermotoga maritima</i>
α -galaktosidaz	<i>Thermotoga neapolitana</i>
α -galaktosidaz AgaT	<i>Thermus brockianus</i> ITI360
α -galaktosidaz	<i>Thermus</i> sp. IB-21
α -galaktosidaz Aga1A	<i>Thermus</i> sp. T2
α -galaktosidaz	<i>Thermus thermophilus</i>
TDE1453	<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405
α -galaktosidaz 2	<i>Trichoderma reesi</i> RutC-30
VP1163	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633
VV12890	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6
VV21330	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6
VV1379	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016
VVA0166	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016
α -galaktosidaz (YPO1581)	<i>Yersinia pestis</i> CO92
Y2582	<i>Yersinia pestis</i> KIM

2.3.1.2 α -Galaktosidaz enziminin hücresel lokalizasyonu

Birçok maya, küf ve bakteriden elde edilen α - galaktosidaz batık kültür koşullarında genellikle intrasellüler olarak lokalize olmuştur (Frost and Moss, 1987).

B. stearrowthermophilus NRRL B- 5407' nin 16 saatlik fermantasyonunun 10. saatinde hücre içi enzim en yüksek düzeyde iken daha sonraki saatlerde bir düşüş olduğu ancak süpernatanttaki aktivitenin arttığı belirtilmiştir (Delente et al., 1974).

Saccharomyces carlsbergensis ile yapılan çalışmalarda α - galaktosidazın çoğunun hücreye dıştan bağlı olduğu belirlenmiştir(Frost and Moss, 1987).

Candida javaica'da ise α -galaktosidazın hem intrasellüler hem de ekstrasellüler olarak üretildiği belirtilmiştir(Cavazzoni et al., 1987).

2.3.1.3 α -Galaktosidaz enziminin uygulama alanları

α -Galaktosidaz enzimi terapötik amaçlı enzim replasman tedavisinde (Fabry's Hastalığı) ve terapötik amaçlı sindirim yardımcısı olarak kullanılan biyomedikal enzimdir.

α -Galaktosidaz'ın ticari üretimi için tercih edilen mikroorganizmalar *Circinella muscae*, *Absidia griseola*, *Absidia hyalospora* (Hokkaido Sugar Co. Ltd., Tokyo, Japonya), *Mortierella vinaceae* ve *Bacillus stearrowthermophilus* (Monsanto Company, St. Louis, Mo) ve son zamanlarda ticari olarak üretilmeye başlanan *Aspergillus niger* (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Danimarka)'dır. İnsan beslenmesinde besin takviyesi olarak kullanılan **Beano**, **Terrainzyme**, **Jarro-Zymes-Plus**, **EZ-Gest**, **Bean-Zyme** adlarında ticari olarak bulunan birçok α -galaktosidaz ilaçları vardır (Şekil 2.2). Son zamanlarda Genzyme Corporation (Cambridge, MA) tarafından FDA onaylı **Fabrazym** piyasaya sunulmuştur. Bu ilaç Fabry's hastalığında enzim replasman tedavisi için kullanılmaktadır (Gote et al., 2004).

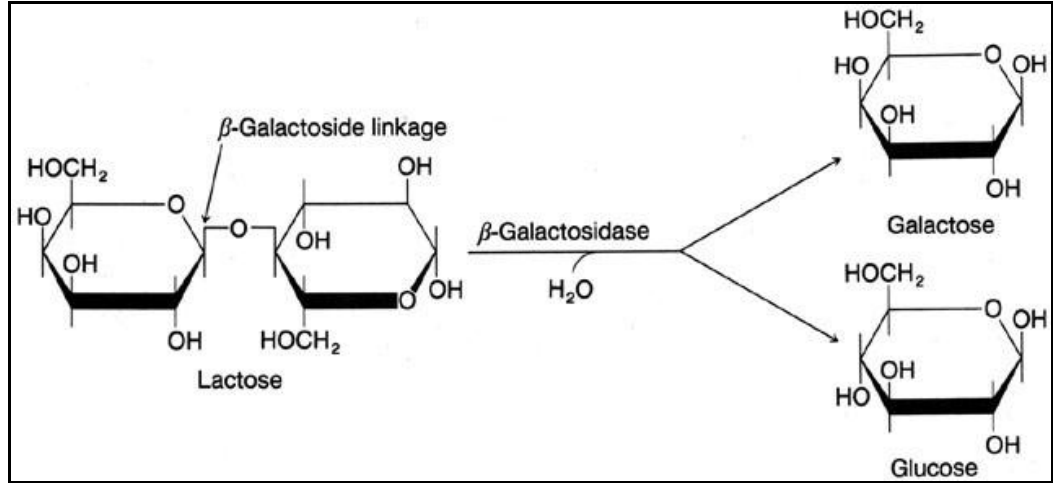


Şekil 2.2 İnsan beslenmesinde besin takviyesi olarak kullanılan ticari olarak bulunan α -galaktosidaz ilaçları (Gote et al., 2004).

α -Galaktosidaz, şeker pancarı endüstrisinde kullanışlı bir enzimdir. Pancar şekeri rafinoz içeriği %0,15'tir. Pancar melasındaki rafinoz konsantrasyonu şeker kristalizasyonu inhibisyonunu artırır. Eğer enzim, rafinozu galaktoz ve sukroza hidrolizlerse pancar şekeri verimi yükselmektedir (Jin et al., 2000). Diğer endüstriyel uygulamalarda olduğu gibi şeker üretim prosesi boyunca da yüksek sıcaklıkların kullanılmasına bağlı olarak, yüksek sıcaklıklardaki stablile ve aktivite, α -galaktosidazların önemli özellikleridir (Filho et al., 2007). Mikrobiyal α -galaktosidazlar şeker üretimi endüstrisinde rafinoz ve stakiyoz gibi sukroz kristalizasyonunu negatif yönde etkileyen ürünlerin elimine edilmesinde kullanışlıdır. Baklagil temelli besinlerin besleyiciliğinin geliştirilmesinde bu enzim kritik rol oynar. Şişkinliğe yol açan rafinoz şeker ailesi gibi besleyici olmayan galaktoolisakkaritlerin azaltılması ve uzaklaştırılmasında bu enzimlere başvurulabilir. Gıda teknolojisinde kullanımlarında soya sütündeki α -galaktosil oligosakkaritlerin hidrolizi en günceldir. Transglükosidaz aktivitesi de ayrıca bazı α -galaktosidlerde kanıtlanmıştır. α -Galaktosidazlar pulp ve kağıt endüstrisinde uygulama alanlarına sahiptir (Anisha et al., 2007).

2.3.2 β -Galaktosidaz

Termofilik mikroorganizmalarda sıkça çalışılan ve çoğunlukla laktaz olarak bilinen β -galaktosidaz (β -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23) enzimi β -1,4-D-glikozidik bağlarının yıkımını katalizleyerek laktozun monomerleri olan glukoz ve galaktoza hidrolizini sağlar (Şekil 2.3) (Panesar et al., 2010; Song et al., 2011; Güven, 2011).



Şekil 2.3 β -galaktosidaz enziminin katalizörlüğünü yaptığı reaksiyon
(<https://www.msu.edu/course/mmg/205/chap7exercise/galactosidasepage.htm>).

β -Galaktosidaz iki veya daha fazla karbonhidrat arasındaki ya da bir karbonhidrat ile diğer bir bileşik arasındaki glikozidik bağlarının yıkımından sorumlu enzim olarak bilinen glikozil hidrolazların (EC 3.2.1-3.2.3) bir üyesidir. Son yıllara kadar bu enzim grubu, fonksiyonel benzerlik baz alınarak geleneksel biçimde sınıflandırılmıştır. Son bulgular ışığında ise amino asit dizi benzerlikleri temel alınarak 106 glikozil hidrolaz (GH) ailesi tanımlanmıştır. Sistem hem glikozil hidrolazlar için evrimsel bağlantıları açıklayan veriler sunmakta hem de reaksiyon mekanizmalarını ortaya koymaktadır. Bu kriterler göz önüne alındığında β -galaktosidaz aktivitesi gösteren enzimler 4 farklı familyaya (GH-1, GH-2, GH-35 ve GH-42) ayrılmaktadır. Bunlardan GH-2 en yoğun çalışılan familya olup *Escherichia coli*, *Bacillus megatherium* ve *Sulfolobus solfataricus* β -galaktosidazlarını içerir. Oysa termofilik basiller dahil termofilik bakteriler ile psikrofilik ve halofilik mikroorganizmaların sahip olduğu β -galaktosidaz enzimleri GH-42 ailesine aittir (Güven, 2011).

β -Galaktosidaz enzimi pek çok farklı mikroorganizma türünün yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklardan da elde edilebilir. Ancak kaynağına bağlı olarak enzim özellikleri dikkate değer ölçüde farklılaşmaktadır. Bitki ve hayvan orijinli enzimler düşük ticari değere sahipken mikrobiyal kaynaklardan elde edilen çok çeşitli β -galaktosidaz enzimleri teknolojik açıdan dikkat çekicidir. β -Galaktosidaz enzimine duyulan ticari ilginin sonucu olarak, Çizelge 2.8’de görüldüğü gibi çok sayıda mikroorganizmanın bu enzim açısından potansiyel birer kaynak olduğu açığa çıkarılmıştır. Bu nedenle β -galaktosidaz üretimi için çok çeşitli bakteri, maya ve küf kültürleri ile çalışılmıştır. Elde edilen enzimler

uygulama esnasında ihtiyaç duydukları optimum koşullar (özellikle de pH aralığı) yönünden farklılıklar gösterirler:

- **Fungal β -galaktosidaz:** Optimum çalışma pH'ı genellikle 3-5 arasında olan fungal enzimler, bu özellikleri nedeniyle asidik peynir altı suyu ile onun ultrafiltrasyon sonucu açığa çıkan permeatının işlenmesinde kullanılabilir. Bu enzimler için optimum sıcaklık değerleri de yüksek olduğundan çoğunlukla 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda tercih edilirler. β -Galaktosidazın farklı fungal kaynaklardan saflaştırılması için günümüzde çok çeşitli saflaştırma tekniklerinden faydalanılmaktadır.
- **Bakteriyel β -galaktosidaz:** *Streptococcus thermophilus* ve *G. stearothermophilus* başta olmak üzere çok sayıda farklı tür bakteri vasıtasıyla üretilen bakteriyel β -galaktosidaz için optimum pH 6,0-7,0 civarındadır. *E. coli* bakterisinden izole edilen enzim, β -galaktosidazın katalitik metabolizmasını anlama yolunda bir model teşkil etmektedir; ancak tüketen bireyde yol açacağı toksisite problemlerinden ötürü gıdalarda kullanımı uygun değildir. Dolayısıyla *E.coli*'den elde edilen β -galaktosidaz çoğunlukla gıda endüstrisinde tercih edilmez.
- **Maya β -galaktosidazı:** Endüstriyel bakış açısına göre mayalar da önemli birer β -galaktosidaz kaynağıdır. Nötral optimum pH değerlerine sahip olmaları, süt içerisindeki laktozun hidrolizi için faydalı, enzimin gıdalar ile birlikte tüketimi açısından güvenlidir. Günümüze dek pek çok çalışmada potansiyel kullanım alanları da göz önünde bulundurularak farklı maya suşlarından β -galaktosidaz üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Ticari anlamda en sık çalışılan türler ise *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragilis*'dir (Ladero et al., 2002; Panesar et al., 2010).

Çizelge 2.8 β -Galaktosidaz enziminin mikrobiyal kaynakları (Panesar et al., 2010).

Mikrobiyal Kaynak		
Bakteri	Fungus	Maya
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. palmi</i>	<i>Bullera singularis</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Aspergillus foetidus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. oryzae</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterum</i> , <i>B. stearothermophilus</i>	<i>Auerobasidium pullulans</i>	<i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. fragilis</i>
<i>Bacterioides polypragmatus</i>	<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. thermosulfurogens</i>	<i>Fusarium monilliforme</i> , <i>F. oxysporum</i>	
<i>Corynebacterium murisepticum</i>	<i>Mucor meihei</i> , <i>M. pusillus</i>	
<i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>E. cloacae</i>	<i>Neurospora crassa</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Penicillium canescens</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranoferiens</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i>	<i>Scopulariopsis</i> sp	
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	<i>Streptomyces violaceus</i>	
<i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>P. pento</i>		
<i>Propionibacterium shermanii</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>		
<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>		
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.		
<i>Thermus rubus</i> , <i>T. aquaticus</i>		

Enzimin Kullanım Alanları: β -Galaktosidaz gıda sektörü başta olmak üzere biyoremediasyon, biyosensör tasarımı, hastalıkların teşhisi ve tedavisi gibi pek çok farklı alanda dikkat çeken ve kullanım potansiyeli yüksek olan bir enzimdir (Asraf ve Gunasekaran, 2010).

Bağırsaklardaki enzim miktarının düşüklüğü, populasyonların büyük kısmında laktoz intoleransı adı verilen rahatsızlığın ortaya çıkmasına neden olur. Yoksunluğun görüldüğü kimseler süt ve süt ürünlerinin tüketiminde sıkıntı yaşar (Song et al., 2011, Güven, 2011).

Laktoz nispeten düşük çözünürlüğe ve tatlılığa sahip olduğundan kalın bağırsaktaki aşırı laktoz, ozmotik etkilere bağlı olarak dokunun susuz kalmasına, düşük asidik özelliklere bağlı olarak az miktarda kalsiyum emilimine ve

mikrofloranın laktoz fermentasyonu sonucunda fermentasyona bağılı ishal, sulu ishal, şişkinlik, gaz, karın ağrısı, bulantı ve kusma gibi şikayetlere neden olabilir. Ayrıca laktoz suyu tutma eğilimi gösterdiğinden gıdalarda tat ile kokuların absorpsiyonuna ve hem üretim hem de tüketim aşamasında kristalizasyon kaynaklı sınırlamalara sebebiyet verebilmektedir. Özellikle süt ve süt ürünlerinde laktoz içeriğinin düşürülmesi amacıyla yapılan β -galaktosidaz uygulaması, hem bu ürünlerin tüketim potansiyelini arttırmak hem de laktozun düşük çözünürlüğü ve tatlılığı ile ilgili problemlerin üstesinden gelmek için uygun bir metot gibi görünmektedir. Dahası bu muamele sütü, laktoz intoleransı olan çok sayıdaki çocuk ve yetişkin için tüketimi daha uygun bir gıda haline getirmektedir. Peynir altı suyunun hidrolizi ise laktozu, tatlandırıcı şurup gibi, farklı gıda endüstrilerinde (süt ve süt ürünleri, şekerleme, ekmek ve pasta yapımı, gazlı içecek üretimi vb) faydalanılabilecek çok kullanışlı bir ürün haline dönüştürmektedir (Panesar et al., 2010).

β -Galaktosidaz enzimi ile gerçekleştirilen laktoz hidrolizinden yalnızca laktoz içeriği düşürülmüş gıda ürünlerinin üretiminde değil, aynı zamanda peynir altı suyu oluşumuna bağılı çevresel problemlerin çözümünde de faydalanılmaktadır. Peynir altı suyu peynir endüstrisinde alt akım işlemleri neticesinde açığa çıkan ve oluşumu engellenemeyen yan üründür. Öte yandan β -galaktosidaz kullanımı ile bu maddeden etanol, tek hücre proteini ya da hücre dışı polisakkarit üretilmektedir (Asraf ve Gunasekaran, 2010).

Tüm bunların yanı sıra β -galaktosidaz enzimi galaktooligosakkaritlerin (GOS) sentezi için laktozun transglikozilasyonunda ve transgalaktozilasyonunda kullanılabilmektedir. GOS'lar çoğunlukla sindirilemeyen oligosakkaritler olarak bilinirler, üst bağırsak yolu boyunca absorplanamaz ya da hidroliz edilemezler. Faydalı bağırsak bakterileri tarafından seçimli olarak fermente edildikleri kolona direk olarak geçerler. Prebiyotik olmalarının yanı sıra düşük kariyojenik etkiye, kalori değerlerine ve tatlılığına sahiptirler. Bu oligosakkaritler anne sütü ve inek sütünde, bal ile çeşitli meyve ve sebzelerin yapısında iz miktarda da olsa bulunmaktadır (Panesar et al., 2010). Sonuç olarak GOS'lar, bireyleri enfeksiyonlara karşı koruyan, zararlı bakteri ve toksik maddelerin birikimini azaltan ve bağırsağın normal fonksiyonunu kolaylaştıran faydalı bifidobakteriler ile laktobasillerin kolonda sayıca artmasını sağlayan önemli prebiyotikler olduklarından besinler içerisindeki miktarlarının artırılması faydalıdır (Chakraborti et al., 2000; Song et al., 2011).

2.4 *Bacillus* Genusu

‘*Vibrio subtilis*’ bilinen en eski bakterilerden biridir ve 1835 yılında Ehrenberg isimli araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. 1872 yılında da Cohn, bu bakteriye *Bacillus subtilis* adını vermiş ve bu organizmayı geniş *Bacillus* genusunun ayrıcalıklı bir üyesi olarak kabul etmiştir. *Bacillus* genusu, *Bacillaceae* familyasının bir üyesidir. Hücreleri çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli, tek bir endospora sahip, gram-pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bakterilerin oldukça geniş ve heterojen bir ailesidir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlı mezo-dinamo pimelik asitten oluşmaktadır. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleride bulunmaktadır (Gordon et al., 1973; Goto et al., 2000; Slepecky and Hemphill, 2006).

1990’larda *Bacillus* genusuna ait üyelerin 16s rDNA nükleotid dizilişleri üzerine geniş kapsamlı çalışmalar yapılmıştır ve elde edilen bulgular, içerisinde çeşitli *Bacillus* türlerini bulunduran bir çok yeni genusların tanımlanması ve sınıflandırılması için bir takım esaslar ortaya koymuştur (Ash et al., 1991; Farrow et al., 1992, 1994; Rainey and Stackebrandt, 1993; Rainey et al., 1994). Çizelge 2.9’da *Bacillaceae* familyasındaki genuslara ait isimlendirmeler ve açıklamalar yer almaktadır.

Çizelge 2.9 *Bacillaceae* familyasındaki genuslara ait isimlendirmelerin anlamları ve açıklamaları.

Genus	Kaynak (Literatür)	İsimlendirmenin Anlamı	Açıklama
<i>Bacillus</i>	Cohn (1872)	Küçük çubuk	Aerobik veya fakültatif anaerobik, endosporlu, çubuk şeklinde bakteri
<i>Amphibacillus</i>	<u>Njimura et al., 1990</u>	“Çok yönlü” <i>Bacillus</i>	Fakültatif anaerobik
<i>Alicyclobacillus</i>	<u>Wistzkey et al., 1992</u>	“sıklık yağ asidi” <i>Bacillus</i>	Asidofilik, ılımlı termofilik
<i>Paenibacillus</i>	<u>Ash et al., 1994</u>	<i>Bacillus</i> gibi	Fakültatif anaerobik, mezofilik
<i>Aneurinibacillus</i>	<u>Shida et al., 1996</u>	“Thiamine” <i>Bacillus</i>	Aerobik, mezofilik

Çizelge 2.9 (devam)

Genus	Kaynak (Literatür)	İsimlendirmenin Anlamı	Açıklama
<i>Brevibacillus</i>	<u>Shida et al., 1996</u>	“kısa” <i>Bacillus</i>	Aerobik, mezofilik
<i>Halobacillus</i>	<u>Shida et al., 1996</u>	“tuz” <i>Bacillus</i>	Ilımlı halofilik
<i>Virgibacillus</i>	<u>Heyndrickx et al., 1998</u>	“dallanmış” <i>Bacillus</i>	Mezofilik, ılımlı halotolerant
<i>Gracilibacillus</i>	<u>Waino et al., 1999</u>	“ince-uzun” <i>Bacillus</i>	Mezofilik, bazıları ekstrem halotolerant
<i>Salibacillus</i>	<u>Waino et al., 1999</u>	“tuz” <i>Bacillus</i>	Ilımlı halofilik
<i>Anoxybacillus</i>	<u>Pikuta et al., 2000</u>	“oksijensiz” <i>Bacillus</i>	Zorunlu ve fakültatif anaerobik, alkalifilik, ılımlı termofilik
<i>Thermobacillus</i>	<u>Touzel et al., 2000</u>	“sıcak” <i>Bacillus</i>	Anaerobik, termofilik
<i>Filobacillus</i>	<u>Schlesner et al., 2001</u>	“dizi” <i>Bacillus</i>	Anaerobik alkali tolerant ve halofilik
<i>Ureibacillus</i>	<u>Fortina et al., 2001</u>	“üre” <i>Bacillus</i>	Aerobik, termofilik
<i>Geobacillus</i>	Nazina et al., 2001	“dünya” <i>Bacillus</i>	Aerobik veya fakültatif anaerobik, termofilik

2.5 *Geobacillus* Genusu

Termofilik *Bacillus* suşlarının ilk sınıflandırma çalışmaları 1949’da Gordon ve Smith ile başlamıştır. Daha önceleri *Bacillus* olarak bilinen organizmalardan çeşitli yeni genuslar tanımlanmakta, eski morfolojik ve fizyolojik tanımlamaları baz alarak *Bacillus* olarak tayin edilen diğer genuslar da yeni izolatlar ile yeniden oluşturulmaktadır.

1990’larda mikrobiyologların dünyadaki ekstrem çevreleri keşfiyle, çok sayıda yeni endosporlu, halofil, asidofil, alkalifil ve termofiller ortaya çıkarılmıştır. ss rRNA sekanslama yapıldığında, bu ekstromofiliklerin, *Bacillus*’ların yakın akrabaları olduğunu ve halen çok yeni olan genusların çekirdeğini teşkil ettiklerini göstermektedir. Yeni taksonomik çalışma ile aerobik termofilik bacilli bir genusta toplanmıştır. Termofilik, psikrofilik, asidofilik,

alkalifilik ve halofilik özellikteki bir çok tür bu genusa dahil edilmiştir (Nazina et al., 2001).

Termofilik, aerobik, sporlu ve 45-700C aralığında yaşayabilen belirli bakteriler *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Sulfobacillus*, *Thermoactinomyces* ve *Thermobacillus* olarak genoslara ayrılmıştır. Yapılan moleküler analizler sayesinde bu tür termofilik bakterilerin çoğunlukla *Bacillus* 1 ve 5 genetik grubuna ait oldukları tespit edilmiştir (Rainey et al., 1994; Maugeri et al., 2001).

ss rRNA (16s rRNA)'ya göre 2001 yılında yapılan sınıflandırmaya göre *Bacillus* grup 5 (Thermophilic bacilli of pylogenetic group 5), termofilik *Bacillus* suşlarını kapsamaktadır. Bu grup “*Geobacillus*” olarak adlandırılan yeni bir genus başlığı altında toplanmıştır. Bu isim, “dünya” ve “toprak” *Bacillus*'u anlamına gelmektedir. *Geobacillus stearothermophilus* tip kültür olarak en çok bilinen üyesidir. Çizelge 2.10'da *Geobacillus* genusuna ait özellikler yer almaktadır. *Geobacilluslar*, fenotipik ve filogenetik olarak yüksek seviyede (% 96,5-99,2) 16s rRNA sekans benzerliği içeren termofilik *Bacillus*'lardan oluşmaktadır (Nazina et al., 2001).

Çizelge 2.10 *Geobacillus* genusuna ait açıklamalar (Nazina et al., 2001).

Morfoloji	
Vejetatif hücre	Çubuk şekilli hücreler, tek başına veya kısa zincirler halinde bulunur ve peritrik filajella ile hareket yeteneğine sahiptir. Hücre duvarı yapısı Gram pozitifdir fakat Gram reaksiyonu pozitif ve negatif arasında çeşitlilik gösterir.
Spor	Hücre başına elipsoidal veya silindirik endospor bulunur. Kısmen şişkin veya şişkin olmayan endospor uçta veya uca yakın yer alır.
Koloni	Çok çeşitli şekil ve boyutlara sahiptirler, belirli bir ortamda üretilebilirler.
Metabolizma	
Enerji	Kemoorganotrofik
Oksijen	Aerobik veya fakültatif anaerobik. O ₂ elektron akseptörüdür, bazı türlerde nitratla değişebilir.
Sıcaklık	Zorunlu termofilik. Büyüme sıcaklığı 37-75°C ve optimumu 55-65°C' tir.
pH	Büyüme 6,0-8,5 pH aralığında gerçekleşir, optimum pH aralığı 6,2-7,5' tir.

Çizelge 2.10 (devam)

Gereksinimleri	Büyüme faktörleri, vitaminler, NaCl ve KCl birçok türler için gerekli değildir.
Tanımlama Testleri	
Karbonhidrat	Glukozdan, fruktozdan, maltozdan, mannozdan ve sükrozdan asit üretilir fakat gaz oluşumu olmaz. Birçok türleri laktozdan asit üretir.
Enzimler	Birçok tür katalaz üretir. Fenilalanin deamine olmaz, tirozin degrede olmaz, indol oluşmaz, Voges- Proskauer reaksiyonu negatiftir. Oksidaz pozitif veya negatiftir.
Biyokimyasallar	Hücrel yağ asitleri toplamın % 60'ından daha fazlasını oluşturan izo-15:0, izo-16:0 ve izo-17:0' den oluşur.
DNA karakterizasyonu	
G-C içeriği	% mol 48,2 – 58 (termal denatürasyon metodu)
16S rRNA	Bu genusun türleri arasında % 96,5'den daha yüksek sekans benzerliği vardır.
Ekoloji	
Prevalans	Birçok türü doğada geniş bir alana yayılmıştır.

Geobacillus genusuna ait üyeler çok geniş bir alana yayılmış olup, tüm jeotermal alanlardan izole edilebilmektedir. Bunlar arasında, sığ denizsel sıcak su kaynakları, derin deniz hidrotermal ventleri, yüksek sıcaklıktaki petrol çıkarılan alanlar ve sıcak su boruları, ısı değiştiriciler, atık arıtma tesisleri, kömür atık depolama alanları, biyoremediyasyon yapılan bölgeler, kompostlama alanları, gibi yapay sıcak çevreler gibi termofilik ve mezofilik jeografik alanlar sayılabilmektedir (Nazina et al., 2001, Maugeri et al., 2001).

Bugüne kadar bu genusa ait tanımlanmış üyeler 35-78°C aralığında farklı büyüme sıcaklıklarına sahip olan “*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus uzenensis*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Geobacillus toebii*, *Geobacillus vulcani*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus tepidamans*, *Geobacillus gargensis*, *Geobacillus jurassicus*, *Geobacillus caldoproteolyticus*, *Geobacillus pallidus* ve *Geobacillus debilis*”tır (White et al., 1993; Manachini et al., 2000; Ahmad et al., 2000; Nazina et al., 2001, Fortina et al., 2001).

Henüz birçok termofilik bacilli (*Bacillus caldolyticus*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus coldovelox*), tanımlanmış türler arasına dahil edilmemiştir. *Geobacillus* genusunun üyeleri izo-dallanmış doymuş yağ asitleri (iso- C15:0, iso-C16:0, iso-C17:0) içermektedir. Bunlar temel yağ asitleri olup, 16s rRNA gen sekanslarında (%96,5-99,2) yüksek oranda intergenik benzerlik sergilemektedir (Nazina et al., 2001).

Termofilik *Bacillus* üyeleri biyoteknolojik uygulamalar içi önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu bakterilerin önemi, amilaz, selüloz, glikozizomeraz, lipaz, proteaz, pullulanaz, ksilanaz ve DNA restriksiyon endonükleaz gibi termostabil enzimlerin kaynağı olduklarının ortaya çıkarılması ile daha da artmıştır (Rainey ve ark., 1994; Demirjian ve ark., 2001; Maugeri ve ark., 2001). Günümüzde *Geobacillus*'lar ile büyük çapta ekzopolisakkarit ve bakteriosun üretimi araştırılmaktadır. Ayrıca genusa ait bazı türlerin hidrokarbonları, bazı türlerin ise herbisitleri metabolize edebilmesi çevresel ve tarımsal biyoteknoloji açısından umut vaat edici bulunmaktadır (Bustard et al., 2002).

Termal stabilite bu enzimlere, kimyasal denatürantların varlığında aktivite ve zorlu proses koşullarına karşı dayanıklılık kazandırmaktadır (Hough ve ark., 1999). Yüksek sıcaklık, viskoziteyi düşürerek organik bileşiklerin çözünürlüğünü ve bulunabilirliğini iyi yönde etkilemekte ve difüzyon katsayılarını yükseltmektedir. Bu olumlu özellikler endüstride çeşitli alanlarda termofilik enzimlerin önemini pekiştirmektedir (McMullan et al., 2004).

Geobacillus'lardan termofilik enzimlerin yanı sıra ekzopolisakkarit üretimi gibi endüstriyel ürün üretimi konusunda çalışmalar devam etmektedir. Buna ek olarak, *Geobacillus thermoleovorans*'ın iki suşunun büyük miktarda bakteriosin ürettiği tespit edilmiştir (Bustard et al., 2002). Çeşitli çevresel biyoteknolojik uygulamalar için *Geobacillus*'lar arasında hidrokarbonları metabolize eden türlerin olduğu belirlenmiştir. Çok yeni olmakla birlikte üzerinde çalışılan yeni bir konu da *Geobacillus*'ların herbisitleri metabolize edebilmesi üzerinedir. Tarımsal biyoteknolojide bu tür genler, potansiyel kaynak teşkil etmektedir (Bustard et al., 2002).

Bu genusa ait yürütülen ilginç çalışmalardan biri de belirli Gram negatif bakterilerde **quorum sensing**'i tahrip edebilen *Geobacillus*'lar üzerinedir. Quorum sensing, virulens ekspresyon, koagülasyon, biyofilm formülasyonu,

biyoluminesens gibi çeşitli biyolojik davranış ve fonksiyonların kontrolünü sağlamaktadır (McMullan et al., 2004).

2.6 Enzim Stabilitesi ve Termostabil Enzimlerin Önemi

Stabilitenin tanımı, ekstrem şartlarda belirlenen ve fonksiyonel bir durumun korunması olarak yapılmaktadır. Termostabilite kavramı ise bütün proteinlerde bulunan kanonikal (koordinatlardan bağımsız) kuvvetlerin modifikasyonu, örneğin elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle ve bazı aminoasitlerin değişimiyle elde edilen birçok küçük yapısal modifikasyonların kazandırdığı özellikler olarak tanımlanmaktadır. Enzimlerde de termostabilite özel bir amino asitin varlığına veya sentez sonrası modifikasyonuna bağlanamayan bir özellik olarak bilinmektedir (Scandurra et al., 1998; Jaenicke and Böhm, 1998; Jaenicke, 2000).

Enzim termostabilitesi, bilimsel ve endüstriyel alanlarda büyük öneme sahiptir. Teorik ve deneysel araştırmaların temelini oluşturmaya rağmen henüz tamamen aydınlatılamamıştır. Termal stabilitenin fizikokimyasal prensiplerinin aydınlatılmasının, protein katlanması ve protein etkileşim mekanizmalarının kavranılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir (Vogt et al., 1997).

Ekstremofillerde enzim stabilizasyon mekanizmaları çalışmalarının son zamanlarda arttığı gözlenmektedir. Ekstrem termofil organizmaların enzimlerinin çalışması termal denatürasyona karşı, enzim stabilizasyonu için yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Hidrofobik etkileşimler, paketlenme yoğunluğu, tuz köprüleri, hidrojen bağları, açılma entropisinin azaltılması, α -heliks stabilizasyonu, ilmik stabilizasyonu ve kovalent yıkıma direnç gibi birçok protein stabilizasyon mekanizmalarının anlaşılması 'model enzimler' kullanılarak yapılan stabilite çalışmaları sayesinde gerçekleştirilmiştir. Enzim termostabilitesi çalışmalarında, deterjan üretimi, gıda ve nişasta işlenmesi, yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi ve PCR uygulamaları gibi çeşitli endüstriyel uygulamalar için yararlı olabilmeleri nedeniyle ekstreozimler üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır (Vieille and Zeikus, 1996; Lee and Vasmatzis, 1997; Adams and Kelly, 1998; Kumar et al., 2000).

Enzimlerin sıcaklık stabilitesi iki önemli faktörden en az birine veya birleşimine bağlıdır. Bunlardan ilki, enzimin primer yapısıdır. Enzim molekülünün yüksek oranda hidrofobik amino asitleri içermesi, dış çevredeki bir

değişiklik tarafından kolayca denatüre edilemeyen kompakt bir yapının oluşmasını sağlar. Ayrıca disülfid köprüleri ve diğer bağlar, sıcaklığa karşı yüksek bir direnç sağlamaktadır. İkinci faktör ise, polisakkarit ve iki değerlikli katyonlar gibi spesifik bileşenlerdir. Bu bileşenler mevcutsa moleküllerin sıcaklığa karşı stabilitesi artar (Öztürk, 2001).

Biyoteknolojik açıdan büyük potansiyellere sahip olan ekstremozimler içerisindeki en önemli enzimler termostabil enzimlerdir ve bu enzimler protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır. Diğer bir önemli neden ise bu enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik işlemlerdeki avantajlarıdır. Organik çözücü içerisindeki kimyasal reaksiyonların hızlarındaki artışın nedeninin yüksek sıcaklıklarda ortam viskozitesindeki azalma ve difüzyon katsayısındaki artıştan kaynaklandığı yapılan araştırmalarda gözlenmiştir (Becker et al., 1997; Krahe et al., 1996).

Çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin olduğu çeşitli işlemlerde, sıcaklığın yükseltilerek çözünürlüğün artırılması ile reaksiyon hızının artması sağlanmaktadır. Ayrıca yüksek sıcaklık, biyolojik hidroliz reaksiyonlarının hızlarını arttırmakta ve kontaminasyon riskini de azaltmaktadır. Termofilik enzimlerin, etki mekanizmalarının mezofilik olanlarla benzer oldukları belirtilmiştir. Ait oldukları organizmanın optimum büyüme sıcaklığındaki birbirinin homologu olan termofilik ve mezofilik enzimler, aynı sıcaklık stabilitesine sahip olabilir (Adams, 1993; Danson and Hough, 1998; Kumar and Nussinov, 2001).

Farklı termozimlerde sıcaklık stabilitesinin genel bir evrensel strateji şeklinde değil, daha çok bireysel stratejilerin bir kombinasyonu ile başarıldığı görülmektedir. Örneğin; artan hidrojen sayısı ve tuz köprüleri, optimize biçimde paketlenen hidrofobik merkez, artan prolin amino asit sayısı ve artan gömülü amino asit sayısı gibi. Ayrıca protein esnekliği de termal adaptasyonun anahtar elamanlarından biri olarak düşünülmektedir (Güven, 2011).

Proteinlerin konformasyonel dayanıklılığı fleksibilite ve sertlik şeklinde nitelendirilen iki zıt faktörün sağladığı dengenin bir sonucudur. Termozimler mezofilik proteinlere nazaran oda sıcaklığında daha sert yapıdadır. Bu sertlik onları bozulmalardan korur ve katalitik olarak aktif yapıyı korumalarını sağlar. Bundan dolayı denatüre edici şartlar altında optimal olarak daha aktiftirler (Bruins et al., 2001).

Termostabil enzimlerden bazılarının mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termostabilitelerinin bozulmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğu belirtilmiştir. Termofillerden elde edilen termostabil enzimlerin, mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda bile stabil oldukları ve termofil enzimlerinin daha sağlam oldukları belirlenmiştir (Jaenicke and Böhm, 1998; Sabato et al., 1999; Niehaus et al., 1999).

Ekstrem termofilik ve hipertermofilik türlerden elde edilen ve biyoteknolojik açıdan önemli olması nedeniyle sıkça çalışılan termostabil enzimler amilaz, pullulanaz, ksilinaz, kitinaz, selüloz, proteaz, lipaz, DNA polimeraz ve β -galaktosidaz şeklinde sıralanabilir.(Haki and Rakshit, 2003).

Enzimlerin stabilitesini etkileyen faktörler:

Tersiyer Yapı

- a. Hidrojen Bağları
- b. Hidrofobik Bağlar
- c. İyonik interaksiyonlar
- d. Metallerin bağlanması
- e. Disülfit Köprüleri ile stabilize edilmektedir.

Yüksek sıcaklıklarda proteinlerin stabilitesini sağlayan mekanizmalar:

- Yapıdaki tek bir aminoasitin değiştirilmesi ile: Örnek; *Escherichia coli*'nin Triptofan sentetaz enziminin termostabilitesi bir glutamatın metioninle yer değiştirmesi ile artmaktadır.
- Büyüme sıcaklığı: Örnek; *Bacillus flavothermus*'da alanin dehidrogenazın ısıl stabilitesi büyüme sıcaklığına bağlı olarak artar.
- Internal iyonik bağların artması yüksek sıcaklıklarda proteinlerin stabilitesinin artmasını sağlar.

- Yüksek sıcaklıklarda sentezlenen enzimler birkaç saat için aktiftirler. Oysa termotoleransı yüksek olmayan türlerde termotoleransı oldukça yüksek olan enzimler bulunabilir. Örnek; *Bacillus licheniformis*'in maksimum büyüme sıcaklığı 55°C iken bu bakteriden izole edilen ve nişasta endüstrisinde kullanılan α -amilaz 90-95°C'de aktiftir.
- Bazı enzimler substrat ya da efektör moleküllerle stabil hale getirilebilir. Örnek; *Bacillus stearothermophilus*'dan izole edilen glutamat sintetaz normal şartlarda 65°C'de inaktif iken, amonyak, glutamat ve ATP varlığında bu sıcaklık derecesinde aktif hale gelir.
- Metaller genellikle yüksek sıcaklıklarda proteinleri stabilize eder ve pek çok durumda da aktivite için gereklidir.
- Pek çok fungusda polihidrik alkoller, proteinlerin termostabilitesini artırır.
- Polimerik materyallerle kovalent bağlanma ya da kimyasal ajanlarla protein yüzeyinin kimyasal modifikasyona uğratılması ile termostabilite sağlanabilir.
- Düşük su aktivitesi.
- Yüksek substrat spesifitesi ve yüksek Km değerlerine sahip olan termofilik bazı enzimler bu özellikleri ile mezofilik olanlardan ayrılırlar (Coolbear et al., 1992).

2.7 Reaktör Üretimi

Biyoreaktör endüstriyel biyoteknolojide, biyolojik kökenli materyallerin kullanılması ile gerçekleştirilen büyük ölçekli üretimlerin yapıldığı tanklar/fermentörlere verilen isimdir. Küçük ölçekli çalışmalarda cam erlenlerde yapılan mikrobiyal üretimlerin yetersiz kalması sonucu biyoreaktörlerin tasarlanmasına ihtiyaç duyulmuştur (Asenjo and Merchuk, 1995).

Biyoreaktörler substratlar, besinler ve mikrobiyal hücrelerin bulunduğu bir veya birden fazla önemli ürünün üretildiği kontrollü çevreler olarak belirtilmektedir. Biyoreaktör tasarımında amaç, laboratuvar ölçeğindeki biyoreaktörlerden büyük ölçekteki üretilere geçerek istenilen ürünü ekonomik ve güvenilir şekilde üretmektir. Mikroorganizmalar keşfedildikten sonra mikrobiyologlar ve mühendisler biyoreaktörler içinde meydana gelen biyotransformasyonları daha iyi anlamışlardır. Basit anaerobik fermentasyonlar olan etil alkol, aseton ve bütanol üretimi geliştirilmiştir. Atık su arıtımı için aerobik ve anaerobik arıtım yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Sanitasyon

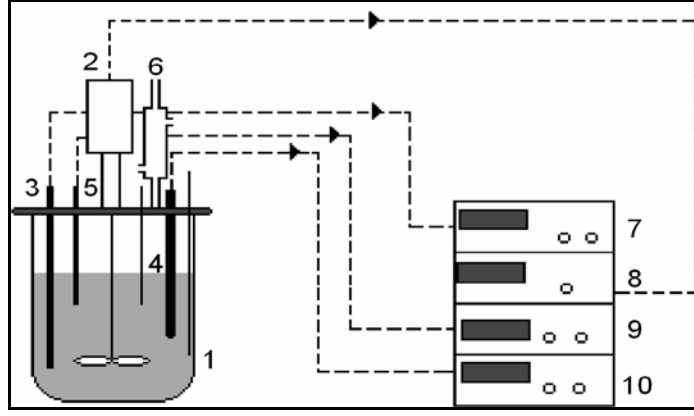
mühendisliği sivil mühendislik eğitiminin bir parçası haline gelmiştir (Ericson, 2009).

1940'larda biyokimya mühendisliği dalı ilaç endüstrisinde meydana gelen gelişmelere bağlı olarak ortaya çıkan ihtiyaçlardan belirmiştir. Sreptomisin, penisilin gibi ilaçların üretimi için büyük ölçekli biyoreaktörlerin kullanılması gerekmiştir. Biyoreaktör tasarımı ve kontrolündeki gelişmeler beraberinde oksijen transferi, hava, ortam sterilizasyonu ve pH kontrolü gibi parametrelerin çalışmalarıyla sonuçlanmıştır. İlk önceleri biyokimya mühendisleri biyokimyacı ve mikrobiyologların önerdiği mikroorganizmalara uygun fiziksel ve kimyasal koşulları sağlayan biyoreaktörler yapmaya çalışmışlardır. Laboratuvar ölçeğinden büyük ölçeğe geçme çalışmalarında sterilize edilebilen oksijen probu gibi enstrümanların geliştirilmesi gerekmiştir. (Ericson, 2009).

Reaktörlerde, homojenliğin sağlanması için iyi bir karıştırma düzeneği, aerobik solunum yapan canlılar için steril hava içinde çözünmüş oksijen (%21 oranında) veya gerekirse saf oksijen, üretim esnasında oluşan köpükler için gerektiğinde köpük kırıcılar, reaktörün içindeki fermentasyon sıvısının pH'sının ayarlanması için asit-baz problemleri, çözünmüş oksijeni görmek için oksijen probu ve sıcaklığı belirlemek için kullanılan sıcaklık sensörü bu sistem için gerekli olan temel aparatlardır (Riet and Tramper, 1991).

Bir reaktörden beklenen özellik, mikroorganizmalara uygun bir yer oluşturmaktır. Bu durumda bir reaktör, fiziksel ve kimyasal özellikleri sağlamalı ve biyolojik katalizörün kendi kapasitesini maksimum düzeyde gösterebilecek şartları oluşturmalıdır. Endüstride en çok mekanik karıştırıcılı sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemler elastiktir böylece bir sistemden diğerine geçişte ufak tefek modifikasyonlar ile kullanılabilir. Ayrıca, başkaları tarafından zaten kullanılan bir sistem olduğu için bu sistem tercih edilmektedir (Asenjo and Merchuk, 1995).

Şekil 2.4'de standart bir mekanik karıştırıcılı biyoreaktör sistemi görülmektedir.



Şekil 2.4 Standart bir mekanik karıştırıcılı biyoreaktör sistemi. 1.Reaktör, 2. Karıştırıcı motor, 3.Oksijen probu, 4.pH probu, 5.Sıcaklık sensörü, 6. Kondensör, 7.Oksijen metre, 8.Karıştırma hızı kontrol ünitesi, 9.Sıcaklık kontrol Ünitesi, 10.pH metre (Bulut, 2007).

Biyoreaktör sistemi geliştirmekteki amaç, optimize protein ekspresyon seviyeleriyle birlikte tekrarlanabilir üretim proseslerini yaratmaktır. Geliştirme stratejisi, teropötik proteinlerin klinik yönden ilerlemeleriyle paralel olarak uygulanır. Buna bağlı olarak ilk proses basamağı genellikle basittir ve optimizasyonun minimum eforlarla yapılmasını sağlayan standart teknolojilerin çalıştırma çabalarını kapsar. Sonraki proses basamağı, yüksek üretici organizmaların entegrasyonunu, isteğe göre uyarlanan ortam formülasyonunu ve üretim işlemlerinin optimizasyonunu kapsamaktadır (Smales and James, 2005).

Biyoreaktör kurulurken kültürle kontak halinde bulunan bütün materyaller ve biyoreaktör parçaları steril edilmektedir. İlk olarak üretici tavsiyelerini ve bioreaktör hazırlama hususlarını takip ederek biyoreaktör kurulmaktadır. Bunu takiben gaz girişi ve çıkışı, inokulasyon deliği, örnek alma hattı, takviye deliği, asit-baz ekleme hattı ve hasat deliğini kapsayan uygun bağlantı hatları hazırlanmaktadır. Satıcı talimatlarına göre pH ve oksijen probalı kalibre edilerek vidalama usulü ile dikkatlice biyoreaktör içerisine sokulmaktadır. Büyüme ortamı biyoreaktöre doldurulduktan sonra biyoreaktör otoklavlanır. Otoklavdan sonra biyoreaktör uygun iş gören aletsel bağlantılarla kontrol ünitesine bağlanmaktadır. Biyoreaktör kontrol sistemi açılarak farklı ayar noktaları (sıcaklık, havalandırma, pH ve karıştırma) belirlenmekte ve bütün ayar noktalarına ulaşılmaktadır (Gray, 2000).

Bir kültürün reaktör üretiminde kullanılabilmesi için öncelikle kültürün aktive edilmesi gereklidir. Bu nedenle, önce katı ortama ardından sıvı ortama aktarılırlar. Büyük ölçekli ideal bir üretimde, mikrobiyoloji laboratuvarının olması

şarttır. Reaktöre mikroorganizmanın aşılması %5-10 oranları arasında yapılmaktadır. Reaktör büyüklüğüne göre aşı miktarı artar. Burada, suşun istenilen özelliğinin kaybedilmemiş olması gerekmektedir. Bu nedenle gerekli kontroller yapılmaktadır. Katı kültürden sıvı kültür aşamasına geçiş 24 saat ile 2 hafta arasında değişebilen bir sürede gerçekleşmektedir. Bu süre; bakterilerde kısa, hayvan veya bitki hücrelerinde ise daha uzundur (Riet and Tramper, 1991).

Bir reaktör tasarlanırken her faktör aynı anda düşünülmelidir. Reaktör yalnız değildir çünkü arkasından ayırma saflaştırma işlemleri gelir. Hiçbir şekilde, üretim ortamında olup biten olaylar, ayırma işleminden ayrı düşünülmemelidir. Örneğin, eğer hücrelerin parçalanmasından sonra ürün alınırsa, bunun safsızlığını ayırmak çok pahalıdır (Gray, 2000).

2.8 Protein Saflaştırma

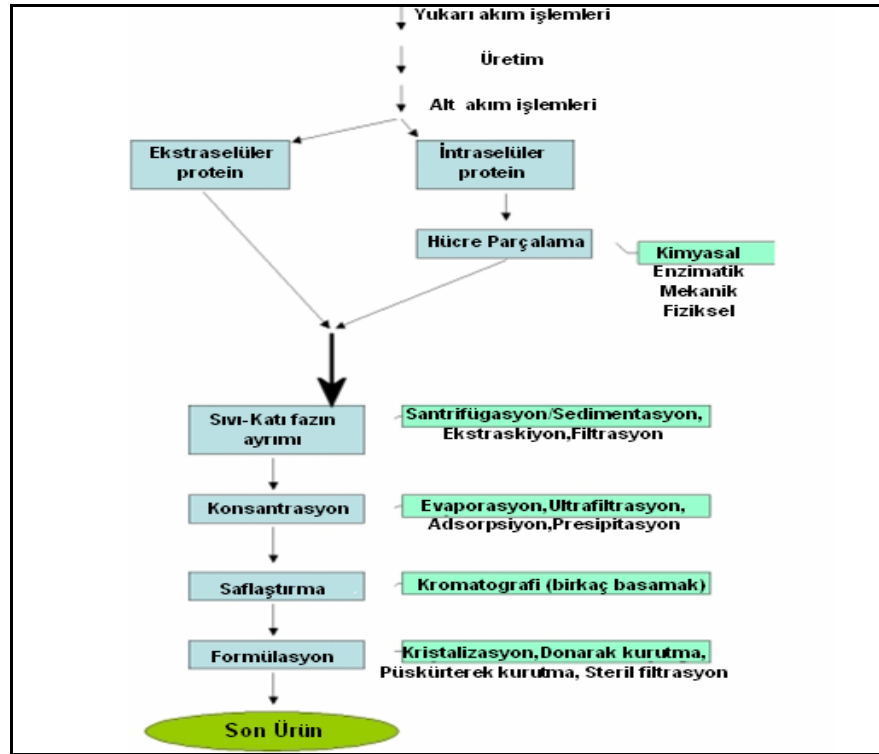
Günümüzde ilaç ve gıda sanayinde ve bunlara bağlı diğer kollarında protein saflaştırılması son yıllardaki en popüler çalışma konularından biridir. Protein saflaştırılması beraberinde birçok spesifik problem getirmektedir (Otoliz, denatürasyon, aktivite kaybı gibi). Zaman ve giderler ideal bir saflaştırma şeması oluşturmaya tam anlamı ile yetmemektedir.

Çalışmadaki ana hedeflerden ilki, saflaştırılacak moleküle en uygun metotları seçerek ideal bir prosedür geliştirmektir. Bu konuda dikkate alınması gereken iki temel özellik vardır:

- ✓ Saflığın derecesi
- ✓ Ürünün miktarı ve aktivitesi

Çalışmada seçilecek metotlar proteinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine bağlıdır (Temizkan ve Arda, 2008).

Üretilen enzimin hücre içi veya hücre dışı olması izolasyon yönteminin seçimini belirlemektedir. Hücre içi enzimlerin izolasyonu için önce hücrenin parçalanması gerekmektedir. Enzim üretimi ve alt akım işlemlerine ait genel basamaklar Şekil 2.5’de verilmiştir.



Şekil 2.5 Protein üretimi ve alt akım işlemlerine ait genel basamaklar
(http://www.jyu.fi/bio/bit/laitteet_files/downstream/dstream1.jpg).

Proteinlerin saflaştırılması amacıyla birçok yöntem ve araç geliştirilmiştir. Saflaştırma yöntemine karar vermeden önce, genelde iki farklı yaklaşımdan biri uygulanır. Bunlardan ilkinde, molekül havuzundan proteinler dışındaki moleküller ve yapılar tek tek uzaklaştırılır. İkinci yaklaşım da, ise önce çözülebilir proteinlerin tümü çöktürme yöntemiyle karışımdan ayrılır, daha sonra da istenen protein saflaştırılır. Protein saflaştırma işlemleri gerek süre gerekse maliyet bakımından değerlendirildiğinde birkaç seçenek söz konusudur. Yüksek saflıkta protein isteniyorsa maliyet ve sürede kısıtlama yapmaktan kaçınmak gerekir. Saflaştırma yönteminin ve sürenin aktivite kayıplarını en aza indirgeyecek şekilde olmasına dikkat edilir. Saflık derecesinin çok önemli olmadığı fazla miktarda endüstriyel üretimlerde ise maliyet ön plana geçebilmektedir. Dolayısıyla total protein özütü içinde, ilgilenilen proteinin yüzde cinsinden oranı olarak ifade edilen saflık derecesi her uygulama için farklı olabilmektedir. Örneğin, moleküler biyolojik araştırmalarda birçok proteinin saflık derecesi %80-90 olması yeterlidir. Buna karşılık yapı aydınlatılma ile ilgili çalışmalarda en az %95 saflıkta protein gerekirken, ilaç olarak kullanılanların mutlak saf (%100) olması istenir (Temizkan ve Arda, 2008). Her bir protein saflaştırma basamağı genellikle belli derecede ürün kaybı ile sonuçlanmaktadır. **İdeal protein saflaştırma stratejisi en az**

basamakla, en düşük maliyetle, en yüksek seviyede saflık ve aktiviteye ulaşılabilir.

2.8.1 Parçalama (Homojenizasyon) yöntemleri

Bu aşamada, çalışılacak molekül grubunu (nükleik asit ya da protein) içeren doku veya hücrelerin çeper ve zar yapıları parçalanıp yok edilir. Elde edilen karışımına **homojenat** adı verilir. Homojenatta, serbest ya da organeller içerisindeki hücre bileşenleri (membran parçaları ve bir miktar da parçalanmamış hücrelerle birlikte) parçalamanın yapıldığı ortamda dağılmış bir süspansiyon halinde bulunurlar.

Hücreleri parçalayarak fraksiyonlara ayırma yöntemleri, temelde hücre sınırlarının çeşitli fiziksel ya da kimyasal tekniklerle yok edilmesini kapsar. Hücre elemanlarının işlevlerini kaybetmeden parçalama sağlayan çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.1.1 Fiziksel yöntemler

Mekanik İşlemler. Bu tip tekniklerin en basit ve ilkel şekli materyali bir havan içerisinde kumla öğütmektir. Ezerek parçalama daha gelişmiş şekilde, doku veya hücrelerin sıvı azotta (-196°C) ya da -20°C ve -70°C arasında dondurulduktan sonra soğuk havanlarda yapılır. Donma sonucu kristal hale geçen yapılar toz haline gelene kadar kolaylıkla parçalanabilmektedir. Ezme sırasında alumina, kum ya da cam tozu katılacak olursa parçalamanın etkinliği artar.

Günümüzde mekanik olarak parçalamada daha çok homojenizatör adı verilen aletler kullanılmaktadır. Karıştırıcı, milli, pistonlu, balistik homojenizatörler ve Fransız basınç hücresi (French press) gibi çeşitli tipte homojenizatörler geliştirilmiştir.

Karıştırıcı tipinde olanlar evlerde kullanılan daha güçlü olanlarıdır. Metal ya da camdan yapılmış özel bir kap içinde bulunan, yüksek hızda dönen bıçaklar yardımıyla biyolojik materyaller kesilerek parçalanır. Bu tip aletler daha çok hayvan ve bitki doku veya organlarının parçalanması için kullanılmakta olup bakteri gibi küçük boyuttaki organizmalar için uygun değildir.

Milli homojenizatör ucunda özel dişleri bulunan metal bir milin çok yüksek devirde döndürülmesiyle parçalama yapar. Pistonlu homojenizatörler ise basınç etkisiyle parçalama yapan ve ucunda genellikle teflondan yapılmış bir pistonu bulunan aletlerdir. Basınç uygulaması elle veya motor gücüyle yapılabilir. Basınç yardımıyla parçalama yapmak üzere geliştirilmiş diğer bir homojenizatör tipi Fransız basınç hücresi olarak adlandırılır. Bu alet çelik silindir bir kap, piston ve silindir üzerindeki basıncın giderilmesi için kullanılan bir vanadan oluşur.

Balistik homojenizatörlerde dayanıklı cam veya metal bir kap içine konulan hücre süspansiyonu çapları 0,2-0,1 mm arasında değişen cam, plastik veya çelik kürecikler ile birlikte yüksek hızda (dakikada 2,000-4,000 salınım) çalkalanır. Çalkalama sırasında küreciklerin birbirine çarpması ile hücrelerin parçalanması gerçekleşir. Balistik parçalama yöntemi özellikle diğer parçalama yöntemlerine dirençli mikroorganizmaların (örneğin kok biçimindeki bakteriler, mayalar gibi) parçalanmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemin en basit uygulama şeklinde içerisine cam boncuklar eklenmiş hücre süspansiyonu bir tüp karıştırıcıda (örneğin Vortex) şiddetle çalkalanır (Temizkan ve Arda, 2008).

Ultrasonikasyon. İnsan duyma sınırının üzerindeki frekanslarda (18 kHz üstü) ses dalgaları (ultrases, ultrason) sıvı bir ortamdaki hücrelere uygulandığında parçalanmaya yol açar. Bu uygulama süspansiyondaki su moleküllerinin kinetik enerjilerini artırır, basınç farkları çok fazla sayıda mikro hava kabarcığının oluşumuna yol açar. Bu kabarcıklar hızla hareket edip bir süre sonra patlayarak yoğun şok dalgaları yaratırlar. Patlama sırasında ses enerjisinin mekanik parçalama enerjisine dönüşümüyle ortamdaki hücreler (özellikle bakteri hücreleri) parçalanır. Bu amaçla kullanılan ultrasonikatörler elektrik enerjisini kesikli karakterde mekanik enerjiye çevirerek, titanyumdan yapılmış bir sonda (prob) yardımıyla ultrases dalgalarını solüsyon içindeki materyale iletir. Mekanik yolla veya ultrasonikasyonla yapılan parçalama işlemleri sırasında sürtünme nedeniyle açığa çıkan ısıyı yok etmek üzere genellikle uygun şekilde (kabı buz içinde tutarak, sıvı azot yardımıyla vb) soğutma yapılması gereklidir (Temizkan ve Arda, 2008).

Ozmotik Şok. Hücrelerin yüksek ozmotik basınçlı bir çözeltiden (örneğin, %20'lik sukroz) hipotonik bir ortama (örneğin, su) geçirilmesi durumunda, suyun hücrelerin içine girmesi zarlarda patlamaya yol açar. Bu yöntem hücre duvarı bulunmayan ya da yol edilmiş hücreler için uygundur (Temizkan ve Arda, 2008).

Dondurma-Çözme. Hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda (örneğin, -20°C) tutulup sonra yeniden ısıtılarak çözündürülmesi ve bu işlemin birkaç kez tekrarlanması parçalanmaya yol açar. İşlemin temeli, donan su moleküllerinin hacminin genişlemesi ve hücrelerde oluşan buz kristallerinin hücre zarına zarar vererek parçalanmayı sağlamasıdır (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.1.2 Kimyasal yöntemler

Çözücülerin Kullanılması. Bu uygulamaların prensibi, hücre zarındaki bileşiklerin çözündüğü uygun bir çözücü (solvent) yardımıyla zar yapısının eritilmesidir. Bu amaçla kullanılan organik çözücüler (örneğin, etil asetat, toluen vb) zardaki lipidleri çözerek yapıyı bozarlar. Deterjanlar (örneğin, sodyum dodesil sülfat vb) ise uygun pH koşullarında zardaki protein ve lipoproteinlerle etkileşime girerek onları uzaklaştırırlar. Bazik çözeltilerin (pH 11,0-12,5) uygulanması ise hücre duvarının hidrolizine yol açar (Temizkan ve Arda, 2008).

Enzimlerin Kullanılması. Bu amaçla kullanılan litik enzimler özellikle mikroorganizmalar için uygundur. Örneğin en çok kullanılan enzimlerden biri olan lizozim bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasındaki β -1,4-glikozidik bağları hidroliz etmektedir. Bu enzim özellikle Gram (+) bakteriler üzerinde etkilidir. Gram (-) bakterilerin parçalanması için hücrelerin bir süre EDTA uygulamasında tutulması gerekir. EDTA lipopolisakkarid moleküllerini birbirine bağlayan Ca^{+2} iyonlarının ortamdan çekilmesini sağlamakta ve böylece lizozimin içteki peptidoglikan tabakasına ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca tripsin, proteinaz K gibi proteazlar (maya hücreleri için) ve zimoliyaz da amaçla kullanılan enzimlerdir. Enzimatik işlem genelde mekanik parçalamaya dayanıklı yapılar için uygulanmaktadır.

Kimyasal parçalama yöntemleri bazı bakımlardan (ısı, yüksek basınç, gürültü gibi olumsuz faktörlerin ortaya çıkmaması) fiziksel yöntemlere göre üstünlükler taşır. Bununla beraber endüstriyel boyutta yapılan parçalamalarda, ekonomik nedenlerle çoğunlukla mekanik yöntemler tercih edilmektedir.

Sonuç olarak kullanılacak parçalama yöntemi amaçlanan çalışmaya, kullanılan biyolojik materyalin tipine, izole edilecek molekül grubuna, eldeki olanaklara ve kabul edilebilir etkinliğe bağlıdır. Buna örne fiziksel ya da kimyasal yöntemlerden ya da iki tipi de içeren karma yöntemlerden yararlanılabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.2 Liyofilizasyon

Liyofilizasyon donmuş durumdaki bir çözücünün vakum altında doğrudan gaz haline geçmesini sağlayan süblimasyon temeline dayalı bir dondurma tekniğidir. Genellikle yüksek ısıya duyarlı materyallerin kurutulması ya da konsantre edilmesi için en etkili yöntemlerden biridir (Temizkan ve Arda, 2008).

Liyofilizasyon protein solüsyonlarının yoğunlaştırılması ve depolanması amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Liyofilizasyonda solüsyon sıvısının süblimleşerek ortamdan uzaklaştırılması ve böylece örnek materyalin yoğunlaştırılması sağlanmaktadır (Tunçer, 2008).

Dondurulmuş protein çözeltisi liyofilizatörde yüksek vakum altına bırakılır. Bu sırada donmuş haldeki su sıvı hale geçmeden buharlaşır (süblimasyon) ve geride konsantre halde toz örnek kalır. Bu tekniğin kullanımındaki bir tercih nedeni de biyolojik materyallerin saklanması ve taşınmasında sağladığı kolaylıktır. Bu şekilde dondurularak kurutulmuş biyolojik materyaller çok uzun süre stabil olarak kalırlar ve yıllarca canlılıklarını korurlar, sıvı içine konulduklarında yeniden çözünürler (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.3 Çöktürme

Bu yolla ayırma, su veya başka bir çözücü içeren bir ortamda istenilen ya da istenmeyen moleküllerin çöktürülerek katı halde ayrılması temeline göre yapılır.

Bu işlem genelde proteinleri bulundukları çözeltiden ayırmak ve konsantre etmek için kullanılır. Protein çökeltisinin az miktarda uygun bir sıvıda süspanse edilmesi ile başlangıçtakine göre daha yüksek konsantrasyonda bir protein çözeltisi elde edilmiş olur. Kullanılan kimyasalın tipine ve işlemin amacına göre iki farklı uygulama söz konusudur:

- ✓ Analitik amaçlı çöktürme için trikloroasetik asit (TCA) veya organik çözücüler (aseton, etanol, metanol) kullanılır.
- ✓ Preparatif amaçlı çöktürme için tuzlar (amonyum sülfat, sodyum sülfat), organik çözücüler (aseton, etanol, metanol) veya polietilen glikol (PEG) gibi organik polimerler kullanılır (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.3.1 Trikloroasetik Asit (TCA) ile çöktürme

Kuvvetli bir asit olan TCA, proteindeki amino asitlerin yan zincirlerindeki iyonik grupların yüklerini değiştirerek iç elektrostatik dengeyi bozar ve proteinin denatürasyonuna yol açar. Denatüre olan proteinler çözünürlükleri değişeceğinden dolayı çökerler. Eğer çalışmada denatürasyonun bir önemi yoksa TCA çöktürmesi uygulanır.

Birçok protein son konsantrasyonu %5 (v/v) olacak şekilde TCA ilavesiyle çökmektedir (Temizkan ve Arda, 2008). Molekül ağırlığı 20,000'in altında olan proteinler için yaklaşık %10 (v/v) TCA eklenmesi gerekebilir (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.3.2 Organik çözücülerle çöktürme

Aseton, etanol, metanol gibi organik çözücüler proteinlerin çözünürlüğünü azaltarak çökmelerine yol açarlar. 10°C'nin üzerinde hızla denatürasyona yol açacaklarından, işlem soğukta (0-4°C) gerçekleşir (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.3.3 Tuzla çöktürme

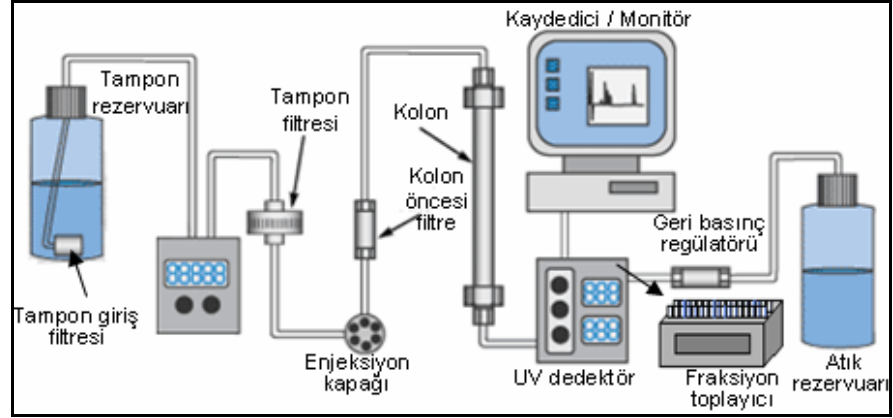
Tuzla çöktürme proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortalama eklenecek nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (bir araya gelmelerine) ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ kullanılır. Bu nedenle yöntem **amonyum sülfat çöktürmesi** adıyla da bilinmektedir.

Birçok protein %55 amonyum sülfat doygunluğunda çöker. %70 doygunluk genelde tümünün çökmesini sağlar (Temizkan ve Arda, 2008).

2.8.4 FPLC

Sıvı kromatografinin bir çeşidi olup, kompleks karışımlardan proteinleri ayırtmak veya saflaştırmak için kullanılan HPLC (high performance liquid

chromatography)’ye benzemektedir. FPLC sistemi, laboratuvar ölçeğinde proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin kromatografik ayrımı için geliştirilmiş bir sistemdir. Bu sistemde, solvent hızı, solventlerin sabit akış hızının kontrolü için pompalarla kontrol edilmektedir. Solventler tüpün içinden dışarıdaki rezervuara akmaktadır. Tercih edilen ayırma bağı olarak çeşitli kolonlar kullanılmaktadır (Sheehan, 2003). Şekil 2.6’da FPLC sisteminin şematik görüntüsü verilmiştir.

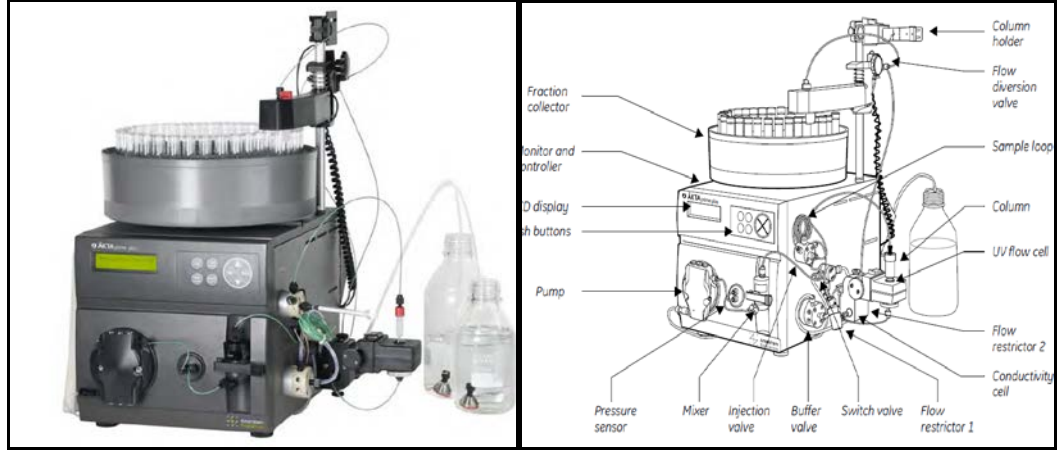


Şekil 2.6 FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)
(<http://www.appliedporous.com/images/chromatography/schematic.gif>).

FPLC genellikle biyokimya ve enzimolojide kullanılmaktadır. Bu sistem 1982’de Pharmacia tarafından geliştirilmiş ve halen pazarlanmaktadır. FPLC, HPLC’den maksimum 3-4 MPa basınçla kullanabilinen kolonları ile ayrılmaktadır. Bu nedenle eğer HPLC’de basınç sınırlanabilirse, tüm FPLC kolonları HPLC cihazında da kullanılabilir (Sheehan, 2003).

Standart bir FPLC cihazı, bir veya iki adet yüksek doğrulukta çalışan bir pompa, bir kontrol birimi, bir kolon, bir dedektör sistemi (UV spektrofotometre) ve bir fraksiyon toplayıcıdan oluşmaktadır (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7) (Sheehan, 2003).

Pompalar tampon veya örneği bir tüp (ince kılcal boru) içerisinde kolonun içine iletmektedir. Kolondan çıkan fraksiyonlar, örneğin protein konsantrasyonunun belirlenmesi için UV spektrofotometreye iletilerek ayrılmalrı sağlanmaktadır. UV spektrofotometre 280 nm’de ölçüm yaparak, proteinlerin deteksiyonunu gerçekleştirir. Şekil 2.7’de AKTA Amersham Bioscience firmasına ait FPLC cihazı ve kısımları yer almaktadır.



Şekil 2.7 AKTA Amersham Bioscience firmasına ait FPLC cihazı ve kısımları (<http://www.texasbiotech.org/docs/manuals/aktaprimeplus1part1.pdf>).

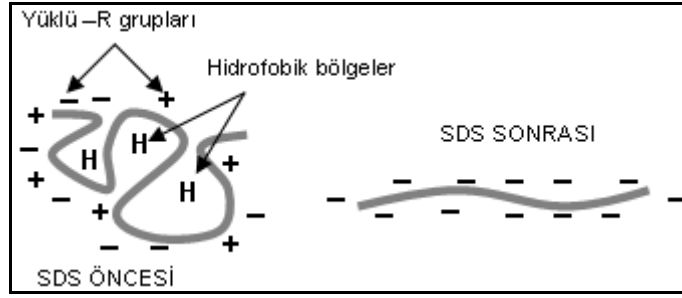
FPLC’de sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Ayırmaya etki eden değişkenlerden bir tanesi hareketli fazdır (tampon). İyi bir hareketli faz, sabit fazın özelliklerini değiştirmemeli, örnekteki bileşenlerin hepsini çözmeli, düşük viskozitede olmalı, gerektiğinde ayrılan bileşenlerden kolayca ayrılabilmesi (kolayca buharlaşabilmesi), kullanılan dedektöre uygun olmalı, ekonomik ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır.

Tampon sisteme verilmeden önce, içerisindeki çözünmüş gazlar uzaklaştırılmalıdır; aksi halde sistemin düşük basınçlı kısmı olan dedektörde, çözünmüş gazlar (özellikle hava) kabarcık oluşturur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına neden olur. Gaz uzaklaştırma işlemi, tamponun sonikasyona uğratılması ile gerçekleştirilir (Heftmann, 2004).

2.8.5 Denatüre Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Bu yöntemde, proteinlerin üç boyutlu yapıları ortadan kaldırılıp SDS (sodyumdodesil sülfat) ile kaplanmaları sağlanarak yük/kütle oranları sabitlenir (Şekil 2.8). Daha sonra değişik oranlarda (bu oranlar aranan proteinlerin molekül ağırlıklarına göre belirlenir) akrilamid ve bisakrilamid’in TEMED (N, N, N’, N’-Tetramethyl- 1-, 2-diaminomethane ya da Tetramethylethylenediamine) ve APS (ammonium persulfate) kullanılarak homojen bir şekilde polimerleşmesiyle elde edilen moleküllerin bir elek içinde elektrik akımı kullanılarak hareket ettirilmeleri

sağlanır. Böylece proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanır. Bu moleküler eleğe poliakrilamid jel denir (Temizkan ve Arda, 2008).



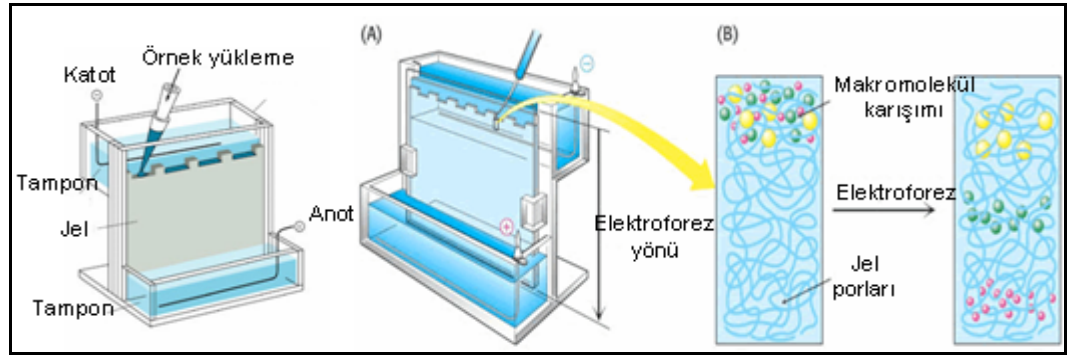
Şekil 2.8 Bir proteinin SDS ile inkübasyonunda oluşan durum (Dilgimen, 2006).

SDS anyonik bir deterjandır ve proteinlere sıkıca bağlanarak denatüre eder ve molekülün negatif yükünü artırır. Protein molekülleri negatif yüklü olduğundan SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç eder. Ayrıca biyomoleküllerin çoğu negatif yüklü olduğundan elektroforez sırasında anoda doğru hareket ederler bu yüzden elektroforez genellikle bazik pH’da (8,0-8,3) gerçekleşir. Analiz edilecek örnek, bir izleme boyası (Brom-Phenol Blue) ile birlikte jelin üst kısmında oluşturulan kuyucuklara uygulanır ve sistemden elektrik akımı geçirilir. Örnekteki bileşenlerden daha hızlı hareket eden izleme boyası jelin bitimine ulaştığında akım kesilir, jel protein boyama karakterindeki bir boya (Coomassie-Brilliant-Blue R 250, G-250, Silver Stain vb.) ile boyanır (Temizkan ve Arda, 2008).

Poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin polimerize formudur. Polimerleşme sonunda bir jel oluşur ki proteinler bu jelin içerisinde elektrik etkisi ile hareket eder. İşte bu tekniğe “**PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**” denir. Bu teknik, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrılmalarına yol açar, çünkü ayırım hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayanır. PAGE’in, jel geçirgenlik kromatografisinden farkı, poliakrilamid jelde küçük moleküllerin büyük moleküllerden daha hızlı hareket etmeleridir. Jel hazırlamak için kullanılan akrilamid’in miktarı genelde %5 - %25 arasında değişir. Akrilamid-Bis akrilamid oranı arttıkça poliakrilamid jeldeki por çapı da düşeceğinden büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerin ayrılması için düşük, küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerin ayrılması için ise yüksek konsantrasyonlar tercih edilmelidir (Dilgimen, 2006).

SDS-PAGE yöntemleri arasında en çok kullanılanı “kesintili SDS-PAGE”dir. Bu yöntemde üstte daha kısa, akrilamid oranı daha düşük ve protein

örneklerinin jele yüklenmesi için tarak kullanılarak kuyucuklar oluşturulmuş bir “staging” jel, altta ise daha uzun olan “resolving” jel yer alır. “Staging” jelde yer alan kurucuklara yüklenen protein örnekleri “running” (yürütme) tamponunda bulunan gliserinin de yardımıyla hızlı bir biçimde “resolving” jelin hemen üstünde ince bir hat oluşturacak şekilde sıralanırlar. Böylece proteinlerin “resolving” jel içindeki hareketlerine başlayacakları nokta sabitlenmiş olur. Akrilamid oranı daha yüksek olan alt jele giren proteinler buradaki por açıklığı daha düşük olduğundan, jel içinde elektrik akımının etkisiyle moleküler ağırlıklarına göre hareket ederek jelde bantlar halinde sıralanırlar. Moleküler ağırlık hesapları yapılacak uygulamalarda dikkat edilmesi gereken noktalardan biri de molekül ağırlıkların belirlenmesinde kullanılacak, molekül ağırlıkları bilinen “marker” (işaretçi) protein karışımlarının da her yürütmeye eklenmesidir. Marker proteinin jelde göç ettiği mesafe, örnekler ile kıyaslanarak moleküler ağırlık Da veya kDa olarak saptanır (Temizkan ve Arda, 2008). Şekil 2.9’da SDS-PAGE’e ait temsili şema verilmiştir.



Şekil 2.9 SDS-PAGE sisteminin genel şeması

([http://www.imb-jena.de/rake/Bioinformatics WEB/gifs/sds_page1.gif](http://www.imb-jena.de/rake/Bioinformatics_WEB/gifs/sds_page1.gif)).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan endospor içeren termofilik bakteri izolatları

Çalışmamızda ‘‘Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu’’nda yer alan çeşitli kaynaklardan izole edilmiş 53 adet endospor içeren termofilik bakteri izolatı kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan tüm izolatlar ve kodları aşağıdaki Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 α -Galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimleri için taranan endospor oluşturan termofilik izolatlar.

Endospor İçeren Termofilik İzolatlar			
1.	İzolat-1	28.	İzolat-9
2.	İzolat-5	29.	İzolat-13
3.	İzolat-7	30.	İzolat-26
4.	İzolat-10	31.	İzolat-27
5.	İzolat-11	32.	İzolat-33
6.	İzolat-16	33.	İzolat-35
7.	İzolat-17	34.	İzolat-37
8.	İzolat-21	35.	İzolat-40
9.	İzolat-22	36.	İzolat-41
10.	İzolat-25	37.	İzolat-60
11.	İzolat-28	38.	İzolat-2
12.	İzolat-29	39.	İzolat-19
13.	İzolat-32	40.	İzolat-18
14.	İzolat-4	41.	İzolat-23
15.	İzolat-36	42.	İzolat-24
16.	İzolat-42	43.	İzolat-30
17.	İzolat-44	44.	İzolat-38
18.	İzolat-46	45.	İzolat-45
19.	İzolat-48	46.	İzolat-49
20.	İzolat-51	47.	İzolat-54
21.	İzolat-52	48.	İzolat-55
22.	İzolat-53	49.	İzolat-63
23.	İzolat-56	50.	İzolat-68
24.	İzolat-59	51.	İzolat-6
25.	İzolat-61	52.	İzolat-20
26.	İzolat-62	53.	İzolat-15
27.	İzolat-8		

3.1.2 Kullanılan besiyerleri

Kullanılan tüm besiyerleri 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.1 Nutrient agar ve Luria-Bertani (LB) Broth

Bakteri izolatlarının üretiminde ve saklanması ticari olarak hazır halde satılan Nutrient Agar (*Merck*) ve LB Broth (*Merck*) ortamları kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar	20 g
Distile Su	1000 ml

Bileşenin Adı	Miktarı
LB Broth	25 g
Distile Su	1000 ml

3.1.2.2 α -Galaktosidaz enzim üretiminde kullanılan ortam

Enzim aktivitesinin taranması aşamasında aşağıda belirtilen oranlarda hazırlanan kompleks besiyeri 121°C’de, 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Bileşenin Adı	Miktarı
Galaktoz	2 g
Maya Ekstraktı	3 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Distile Su	1000 ml

pH 7,0’ye ayarlanmıştır (Gote et al., 2004).

3.1.2.3 β -Galaktosidaz enzim üretiminde kullanılan ortam

Enzim aktivitesinin taranması aşamasında aşağıda belirtilen oranlarda hazırlanan besiyeri 121°C’de, 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Bileşenin Adı	Miktarı
Laktoz	20 g
LB Broth	25 g
Distile Su	1000 ml

pH 7,0'ye ayarlanmıştır (Soliman et al., 2007).

3.1.3 Kullanılan solüsyon ve çözeltiler

3.1.3.1 Gram boyamada kullanılan çözeltiler

Gram boyamada kullanılan solüsyonlar Atlas et al., (1995)'e göre hazırlanmıştır.

➤ Kristal Viyoleto Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı	
Kristal Viyoleto (%90 boya içeren)	2 g	} A
Etanol (% 95 v/v)	20 ml	
Amonyum okzalat	0,8 g	} B
Distile Su	80 ml	
		Solüsyonu

Kullanılan kristal violet solüsyonu; Ayrı ayrı hazırlanan A ve B solüsyonlarının birleştirilip, iyice karıştırılıp ve 24 saat bekleme sonrasında filtre edilerek hazırlanmıştır (Atlas et al., 1995).

Bileşenin Adı	Miktarı
Potasyum iyodür	2 g
Iyot	1 g
Distile Su	300 ml

➤ Gram İyodür Solüsyonu

Kullanılan Gram iyodür solüsyonu; potasyum ve iyotun bir kap içerisinde ezilerek karıştırılarak ve yavaş yavaş su eklenerek hazırlanmıştır. Koyu renk şişelerde muhafaza edilerek kullanılmıştır (Atlas et al., 1995).

➤ **Safranin Solüsyonu**

Bileşenin Adı	Miktarı
Safranin	0,25 g
Etanol (% 95 v/v)	10 ml
Distile Su	100 ml

Safranin 10 ml etanol içerisinde iyice çözülmüş ve üzerine 100 ml distile su eklenmiştir, iyice karıştırılarak birkaç gün dinlenmesi sağlanmıştır. Kullanımdan önce filtreden geçirilerek boyama için hazır hale getirilmiştir (Atlas et al., 1995).

3.1.3.2 α -Galaktosidaz enzim aktivite tayininde kullanılan bileşenler

➤ **0,01 M Potasyum Fosfat Tamponu**

Kimyasallar	Miktar(g/l)
KH_2PO_4	87
K_2HPO_4	62,8

Yukarıda verilen miktarlara göre bileşenler 50 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. 50 ml tampondan 2 ml alınıp, son hacim distile su ile 200 ml' ye tamamlanarak 0,01 M potasyum fosfat tamponu (pH 6,7) elde edilmiştir.

➤ **Sodyum Borat Tamponu (Sonlandırma Tamponu)**

Kimyasallar	Miktar(g/l)
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	76

Yukarıda verilen miktarlara göre bileşenler 200 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti pH'sı 9,3'tür.

➤ **p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (pNPG) Çözeltisi**

Kimyasallar	Miktar (g/ml)
pNPG (<i>Fluka</i>)	0,004
Potasyum fosfat	1 ml

pNPG çözeltisinin derişimi 0,01 M olacak şekilde, yukarıda verilen miktarlara göre bileşenler 10 ml potasyum fosfat çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. 1'er ml hacimde eppendorf tüplerine paylaştırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.1.3.3 β -Galaktosidaz enzim aktivite tayininde kullanılan bileşenler

➤ **Z Buffer**

Kimyasallar	Miktar (g/ml)
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,01
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,006

Z Buffer için kullanılan solüsyonlar;

Kimyasallar	Miktar (ml/ml)
1 M KCl	0,01
1 M MgSO ₄	0,001
Beta-merkaptoetanol	0,0027

Z bufferdaki bileşenler ve solüsyonlar yukarıda verilen miktarlarda hazırlandıktan sonra, saf suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır ve pH'sı 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.

➤ **Fosfat Tamponu**

β -galaktosidaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan substratın hazırlandığı fosfat tamponunun içeriği aşağıda verilmiştir.

Kimyasallar	Miktar (g/l)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,69
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,2

Fosfat tamponu hazırlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.

➤ **1M Sodyum Karbonat Tamponu (Sonlandırma Tamponu)**

Kimyasallar	Miktar(g/ml)
Na_2CO_3	0,106

$$\text{MW}_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 105,99 \text{ g/mol}$$

100 ml 1M Na_2CO_3 tamponu hazırlamak için;

$$M = n/V$$

$$1 = n/0,1$$

$$n = 0,1 \text{ mol}$$

$$m = n \cdot \text{MW}$$

$$m = 0,1 \cdot 105,99$$

$$m = 10,599 \text{ g}$$

➤ **o-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (oNPG) Çözeltisi**

Kimyasallar	Miktar (g/ml)
oNPG (<i>Sigma</i>)	0,0045
Fosfat Tamponu	1 ml

oNPG çözeltisinin derişimi 0,015 M olacak şekilde, yukarıda verilen miktarlara göre bileşenler, 10 ml fosfat tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. 1'er ml hacimde eppendorf tüplerine paylaştırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.1.3.4 Hücre parçalama solüsyonları

β -galaktosidaz enzim aktivitesi tayini denemelerinde hücre parçalamak için kloroform ve % 0,1'lik sodyumdodesilsülfat (SDS) çözeltisi kullanılmıştır.

➤ Kloroform

Hücre membranını parçalamak için kloroform (CHCl_3) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

$$\text{MW}_{\text{CHCl}_3} = 119,39 \text{ g/mol}$$

➤ SDS Çözeltisi

%0,1'lik SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) çözeltisi için 100 ml saf su içinde 0,1 g SDS çözündürülür, çözelti homojen hale geldikten sonra oda sıcaklığında saklanabilir.

$$\text{MW}_{\text{SDS}} = 288,389 \text{ g/mol}$$

3.1.3.5 Protein tayininde kullanılan çözeltiler

Ticari olarak hazır halde satılan Bradford Reagent (Sigma, B6916) kullanılmıştır. İçeriğinde Coomassie blue, Etanol (%95 v/v), H_3PO_4 (%85) ve distile su mevcuttur (Bradford, 1976).

3.1.3.6 Amonyum sülfat ile protein çöktürme ve çözmede kullanılan bileşenler

Moleküler biyoloji çalışmalarına uygun olarak üretilmiş, yüksek saflıkta kristal yapıdaki amonyum sülfat (Sigma, A4418) kullanılmıştır.

3.1.3.7 SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler

➤ **Solüsyon-A: (Akrilamid Stok Solüsyonu)**

% 30 w/v akrilamid ve % 0,8 w/v bisakrilamid (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Akrilamid	29,2 g
Bisakrilamid	0,8 g
Distile Su	100 ml

Distile su ilave edildikten sonra akrilamid tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Çözelti hazırlanırken çeker ocakta çalışmak ve akrilamid bulunan şişenin ağzının parafilm ile kapalı olmasına dikkat etmek gerekir. Çözelti +4°C’de aylarca saklanabilir. Polimerize olmamış akrilamid deriyi irrite edici ve nörotoksik özelliğindedir. Daima eldivenle çalışmak gerekir.

➤ **Solüsyon-B (4X Separating Jel Tamponu, pH 8.8),** (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris (Trisma Base) (1,5 M)	18,15 g

3N HCl ile pH 8,8’e ayarlanmıştır. Distile su ile hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C’de aylarca saklanabilir.

➤ **Solüsyon-C (4X Stacking Jel Tamponu, pH 6.8),** (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris (Trisma Base)	6 g

5N HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Distile su ile hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de aylarca saklanabilir.

➤ **AMPA (%10 Amonyumpersulfat)**

Polimerizasyonu başlatıcı olarak kullanılmıştır (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Amonyum persülfat	0,5 g
Distile Su	5 ml

Çözelti 1 ml hacimlere bölünerek, - 20 °C'de aylarca saklanabilir.

➤ **SDS (% Sodyumdosesil sülfat)** (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
SDS	10 g
Distile Su	100 ml

➤ **Elektroforez tamponu (10X Tank Buffer, pH 8,3),** (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Sigma, T7777 ticari olarak satılan hazır tampon (10X), 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. İçeriğinde aşağıda yer alan bileşenler, belirtilen miktarlarda mevcuttur.

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris (Trisma Base), 25 mM	30 g
Glycine, 192 mM	144 g
SDS (% 0,1)	10 g
Distile su	1000 ml

Bu çözelti (pH 8,3) oda sıcaklığında stabil değildir.

- **Örnek Tamponu (2X Sample Buffer, pH 6,8)** (Dunbar 1990; Bollag et al., 1996)

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris (Trisma Base) (0,125 M)	2,5 ml
SDS (% 4)	4 ml
Gliserol (% 20)	2 ml
2-merkaptoetanol	1 ml
Bromfenol mavisi	0,02 g

Distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılacak hacimlere bölünerek, -20 °C'de aylarca saklanabilir. +4 °C'de birkaç hafta, -20 °C'de birkaç ay stabildir.

- **TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine)**

TEMED (Sigma, T9024) polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

- **SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Gel Stain, Coomassie Brilliant Blue-CBB R-250)**

Elektroforezden sonra protein fragmentlerinin (bantlarının) görünür hale gelmesini sağlamak için kullanılmıştır (Dunbar, 1990; Bollag et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Coomassie Blue R-250	1 g
Methanol	500 ml
Glasiyel (Asetik) Asit	100 ml
Distile Su	450 ml

Boya metanolde iyice çözüldükten sonra asetik asit ve su ilave edilir. Solüsyon hazırlandıktan sonra filtre edilerek, renkli, ağzı kapaklı bir şişede saklanmalıdır. Oda sıcaklığında altı ay saklanabilir. Çökelti olursa süzülerek kullanılır.

- **Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu** (Dunbar, 1990; Bollang et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Methanol	125 ml
Glasiyel (Asetik) Asit	175 ml
Distile Su	2200 ml
Oda sıcaklığında bir ay saklanabilir.	

- **İstenilen Konsantrasyonda (%X) Ayrıcı Jelin Hazırlanması** (Bollang et al., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Solüsyon-A	X/3 ml
Solüsyon-B	2,5 ml
Distile Su	7,5-X/3) ml
% 10 Amonyum Persülfat	50 µl
TEMED	5 µl (eğer $x < 8$ → 10 µl)

Toplam hacim 10 ml'dir.

Elektroforezde moleküler ağırlık tayini için, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa) kullanılmıştır. Bu marker, mavi, turuncu ve yeşil renkli dokuz adet protein bandından oluşmaktadır ve ilk olarak büyük kDa'lular daha sonrada küçük kDa'lular olmak üzere SDS-PAGE' de sırasıyla çıkmaktadır.

3.1.3.8 Jel Filtrasyon Kromatografi (FPLC)’de kullanılan çözeltiler

➤ Kolon Şartlandırma ve Dengeleme Tamponu

Bileşenin Adı	Miktarı
Trisodyum fosfat (Na_3PO_4)	8,197 g
NaCl	8,76 g
Distile su	1000 ml

5M NaOH ile pH 7,2’ye ayarlanmıştır.

➤ 10 mM Potasyum Fosfat tamponu (pH 7,0)

Bileşenin Adı	Miktarı	
K_2HPO_4	6,9672 g	} A
Distile Su	40 ml	
		Solüsyonu
KH_2PO_4	2,7218 g	} B
Distile Su	20 ml	
		Solüsyonu

pH 7,0 için, A solüsyonundan 30,75 ml, B solüsyonundan 19,25 ml karıştırılarak hacim 450 ml distile su ile 500 ml’ye tamamlanmıştır.

➤ 0,2 M NaOH çözeltisi

Kromatografi kolonunun temizliği için 0,2 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı	Molaritesi
NaOH	8 g	} 0,2 M
Distile Su	1000 ml	

➤ % 20’lik Etanol Çözeltisi

Kolonun kurumaması, kullanılmadığı süre zarfında zarar görmemesi için % 20’lik etanol çözeltisi kullanılmıştır.

Tüm çözeltiler 0,22 µm por çaplı Sartorius filtrelerden geçirilerek safsızlıklarından arındırılmış ardından gazsızlaştırma (degassing) işlemi için sonikatörde 15 dakika süre ile bekletilmiştir.

3.1.4 Kullanılan cihazlar

3.1.4.1 Otoklav

Hirayama Hiclave HVE-50 marka ve model numaralı otoklav ortamların sterilizasyonunun sağlanması amacı ile ve işlemler sonucunda ortaya çıkan mikrobiyolojik olarak bulaşık haldeki materyalin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi, ve tek kullanımlık materyallerin ise çöpe atılmadan önce tüm mikroorganizmalardan arındırılması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.4.2 Hassas terazi

Mettler Toledo AL204 hassas terazi, besiyeri ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.4.3 Hot plate ve manyetik karıştırıcı

Heidolph MR 3001 ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, kullanılan besiyeri ve diğer çözeltilerin istenilen koşullarda ve istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.4.4 pH metre

İnoLab WTW pH metre hazırlanan besiyeri ve diğer karışımların pH değerlerinin ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.4.5 Pastör fırını

Binder marka ısıtıcı fırın, 180°C'de 3 saat tutularak cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

3.1.4.6 Çalkalamalı inkübatör

Infors Multitron marka çalkalamalı inkübatörler 65°C’de sıvı kültürde hücrelerin gelişimin sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.4.7 İnkübatör

Nüve ES 110 marka inkübatör bakterilerin 65°C’de kültüvasyonu için kullanılmıştır.

3.1.4.8 Mikroskop

Olympus marka CX31RTSF model numaralı dijital fotoğraf makinası takılabilen trioküler mikroskop, mikroskobik incelemelerde kullanılmıştır.

3.1.4.9 FPLC

Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC 18-1140-45 cihazı, HiPrep 26/60 Sephacryl S200 HR Jel Filtrasyonu kolonu ile birlikte kullanılmıştır.

3.1.4.10 SDS-PAGE

Apelex Dikey Midi Jel Elektroforez (midi Vertigel 2), Model PS304 Lightning Volt Power Supply, Apelex Comb 1,5 mm 15 wells taraklar kullanılmıştır veya SDS-PAGE amacıyla, Sigma Aldrich Techware Dikey Mini Jel Elektroforez, Model OSP-300 Lightning Volt Power Supply, Sigma Comb 1,5mm x 12wells C-5300 taraklar kullanılmıştır.

3.1.4.11 Su banyosu

Memmert Marka su banyosu 65°C’de fibrinolitik enzimlerin aktivite tayininde ve 100°C’de SDS-PAGE için örneklerin denaturasyonu amacıyla kullanılmıştır.

3.1.4.12 Santrifüj

Universal Hettich Rotofix 32 marka ve model numaralı santrifüj, Sigma 4K15 marka ve model numaralı santrifüj 6x250 ml'lik 121256 kod numaralı rotor ile birlikte hücre hasatı için +4°C'de kullanılmıştır.

3.1.4.13 Spektrofotometre

Amersham Biosciences marka Ultrospec 1100 pro (UV/Visible) model numaralı spektrofotometre aşısı hazırlık aşamasında aşının absorbansının standardizasyonunda, enzim aktivite ölçümlerinde, mikroorganizma büyüme eğrisinin çıkartılmasında absorbans ölçümlerinde kullanılmıştır.

3.1.4.14 Sonikatör

BADELIN Marka Gerate-TypVW 2070 Sonikatör, hücreleri parçalamada kullanılmıştır.

3.1.4.15 Liyofilizatör

CHRIST Freeze Dryer Model BETA 2-8 LD Plus marka liyofilizatör pelletlerin liyofilizasyonu için kullanılmıştır.

3.1.4.16 Biyoreaktör

Sartorius Stedim Biotech marka Biosat® A plus model beş litre hacimli (G-11870) biyoreaktör α -galaktosidaz enzim üretiminde kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Endospor oluşturan bazı termofilik bakteri izolatlarında α -galaktosiaz ve β -galaktosidaz aktivitesinin taranması

3.2.1.1 İzolatların saflık kontrolü ve aktivasyonu

“Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda -20°C ’de yatık nutrient agar içeren tüplerde muhafaza edilen endospor oluşturan termofilik bakteri izolatlarının saflıklarının kontrolü için nutrient agar içeren petrilerde çizgi plaka yöntemi ile üretimleri gerçekleştirilmiştir. Ardından, mikroskopta incelenilebilmeleri için Gram boyamaları yapılmıştır.

Gram boyama için öncelikle petrilerdeki katı kültür ortamından öze ile alınıp lam üzerine ince bir tabaka halinde yayılan termofilik bakteri kültürlerinin havada kuruması sağlandıktan sonra, 3 defa alevden geçirilerek preparat tesbit edilmiştir. Preparat üzerine kristal viyoleto damlatılıp 1-2 dakika beklenmiştir. Preparat su ile yıkandıktan sonra lugol damlatılarak 1-2 dakika beklenmiştir. % 95’lik etil alkol ve su ile boya akmayıncaya kadar yıkama işlemi yapılmıştır. Bu işlemten sonra lam üzerine safranin damlatılarak 30 saniye beklenmiştir. Boya dökülüp lam su ile yıkanarak kurutma kağıdı ile hafifçe bastırılarak kurutulmuştur. Bir damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük büyütmele objektif ile mikroskopla incelenir. Objektif sahasında görülen mor renkli bakteriler Gram (+), pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak adlandırılır (Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 2009).

Daha sonra saf koloniler nutrient agar ortamından öze yardımıyla alınarak 10 ml LB broth sıvı besi ortamı içeren tüplere aktarılmıştır. 65°C sıcaklıkta 18 saat süre ile aktive edilmiştir.

3.2.1.2 İzolatların aşı ortamında üretilmesi

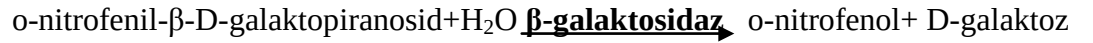
Sıvı besiyerinde aktifleştirilmiş izolatlardan aşı amaçlı kullanılacak 50 ml LB broth içrikli 250 ml’lik erlenlere %5 (v/v) oranında aşılama yapılmış ve 65°C ’de, 150 rpm dönüş hızındaki çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.1.3 β -Galaktosidaz üretim ortamında izolatların üretilmesi

LB broth ve %2 laktozdan oluşan 50 ml'lik enzim ortamını içeren 250 ml'lik erlenlere %5 (v/v) oranında aşılama yapıldıktan sonra, erlenler 65°C sıcaklık, 150 rpm dönüş hızındaki çalkalamalı inkübatörde 24-36 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Soliman et al., 2007).

3.2.1.4 β -Galaktosidaz aktivite tayini

Enzim aktivitesinin ölçülmesi için Miller yöntemi (Miller, 1972) kullanılmıştır. Enzim aktivitesi tayini için uygulanan yöntem, substrat olarak kullanılan o-nitrofenil- β -D-galaktopiranosid üzerindeki β -galaktosidik bağın β -galaktosidaz ile parçalanması ve oluşan o-nitrofenolün alkali pH'larda verdiği sarı renkli bileşiğin belirlenmesini esas almaktadır. Reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Üretim sonrası fermentasyon sıvısının, +4°C'de 5100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesiyle oluşan süpernatant ve pellet kısımları β -galaktosidaz enziminin hücresel lokalizasyonunu belirlemek amacıyla aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrılarak -20°C'ye kaldırılmıştır. Aktivite tayinine başlamadan önce hücreleri içeren pellet kısmı ve süpernatant, +4°C sıcaklık 11000 rpm dönüş hızında 5 dakika boyunca bir kez daha santrifüj edilmiştir. Pellet yeterli miktarda Z buffer ile süspanse edildikten sonra spektrofotometre ile 600 nm dalga boyunda süspansiyonun OD(optik yoğunluk)'si okunmuştur. Bu işlem sırasında kör olarak Z buffer kullanılmıştır. Resüspanse edilmiş pelletten 100 μ l alınarak üzerine 900 μ l Z buffer ilave edilmiştir. Kimyasal hücre parçalama amacıyla içerisine 100 μ l kloroform, 50 μ l %0,1'lik SDS eklenen karışım, vorteks yardımıyla iyice karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha önceden aktivite tayini için ayrılan süpernatanttan da 100 μ l alınarak üzerine 900 μ l Z buffer ilave edilmiştir. Bu aşamadan sonra 5 dakika süre sonunda su banyosundan çıkarılan parçalanmış hücreleri içeren örnek ve resüspanse edilen süpernatant üzerine, enzimatik reaksiyonunun substratı olarak 200 μ l o-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (ONPG) çözeltisi eklenmiş ve 65°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur.

Reaksiyonun tamamlanması için 30 dakika sonunda örnekler üzerine 500 μ l Na₂CO₃ sonlandırma tamponu ilave edildikten sonra çökeltiyi ve kloroformu

uzaklaştırmak için, karışım +4°C sıcaklık ve 11000 rpm dönüş hızındaki santrifüjde 5 dakika süreyle santrifügasyona tabi tutulmuştur. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatantların spektrofotometrede 420 ve 550 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Bu aşamada kör olarak içerisinde 100 µl resüspanse örnek dışında (hacmin korunması amacıyla 900 µl Z buffer yerine 1000 µl Z buffer'ın kullanıldığı) tüm bileşenleri bulunduran ve her bir inkübasyon basamağından geçirilmiş karışım kullanılmıştır (Price-Carter, 2000).

1 unit enzim, 1 µmol substratı, 1 dakikada hidroliz eden β-galaktosidaz miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Miller, 1972).

$$\text{Enzim aktivitesi (Unit)} = 1000 \times \frac{(Abs_{420} - (1.75 \times Abs_{550}))}{(t \times V \times Abs_{600})}$$

t: Enzimatik reaksiyon süresi (30 dakika)

V: İşlem başlangıcında Z buffer ile süspanse edilmiş örneğin kullanım hacmi (0,1 ml)

Abs₄₂₀, Abs₅₅₀: İşlem sonunda süpernatantın okunan absorbans değerleri

Abs₆₀₀: İşlem başlangıcında Z Buffer ile süspanse edilmiş pelletin 600 nm'de okunan OD'si

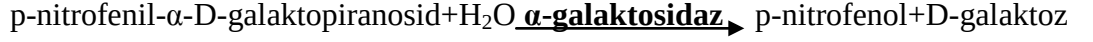
3.2.1.5 α-Galaktosidaz üretim ortamında izolatların üretilmesi

% 0,2 galaktoz, % 0,3 maya ekstraktı, % 0,3 K₂HPO₄ ve % 0,1 KH₂PO₄'dan oluşan 50 ml'lik α-galaktosidaz enzim üretim ortamını içeren 250 ml'lik erlenlere %5 (v/v) oranında aşılama yapıldıktan sonra, erlenler 65°C sıcaklık, 150 rpm dönüş hızındaki çalkalamalı inkübatörde 24-36 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (M.M. Gote et al., 2004).

3.2.1.6 α-Galaktosidaz aktivite tayini

Enzim aktivitesinin ölçülmesi için Miller yöntemi (Miller, 1972) kullanılmıştır. Enzim aktivitesi tayini için uygulanan yöntem, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil-α-D-galaktopiranosid üzerindeki α-galaktosidik bağın α-

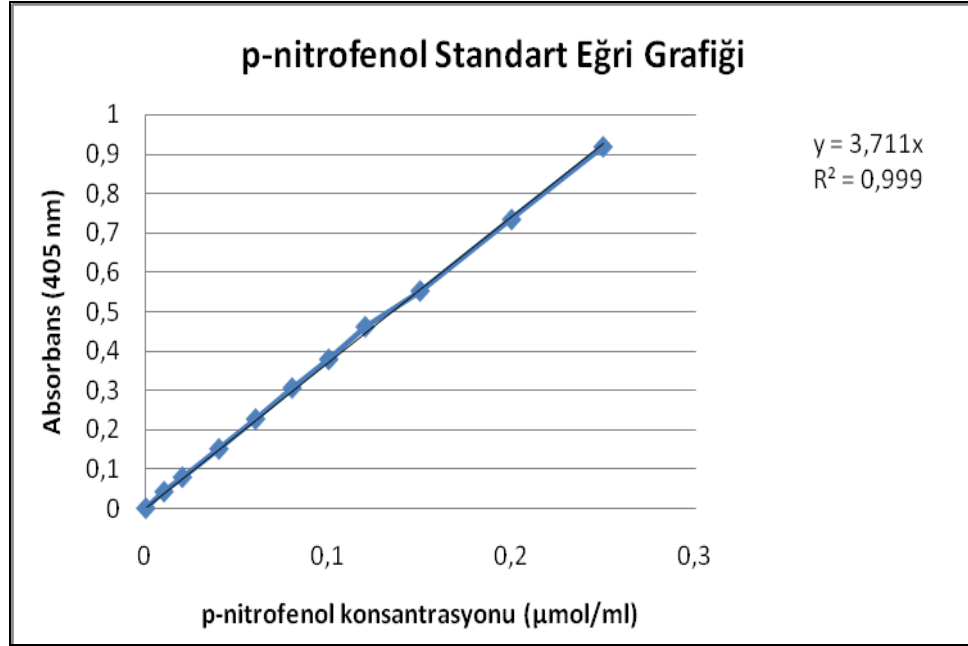
galaktosidaz ile parçalanması ve oluşan p-nitrofenolün alkali pH'larda verdiği sarı renkli bileşiğin belirlenmesini esas almaktadır. Reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Üretim sonrası fermentasyon sıvısının, +4°C'de 5100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesiyle oluşan süpernatant ve pellet kısımları α -galaktosidaz enziminin hücresel lokalizasyonunu belirlemek amacıyla aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrılarak -20°C'ye kaldırılmıştır. Aktivite tayinine başlamadan önce hücreleri içeren pellet kısmı ile süpernatant, +4°C'de 11000 rpm dönüş hızında, 5 dakika boyunca bir kez daha santrifüj edilmiştir. Daha sonra pellet yeterli miktardaki 0,01 M potasyum fosfat tamponu ile yeniden süspanse edilmiştir. Yapılan denemeler ile hücresel parçalama için yeterli olarak görülen 40 watt güç ve 2 dakika süre ile pelletteki hücreler sonifiye edilmiştir.

Sonikasyonla parçalanmış hücreler 6000 rpm dönüş hızında +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 250 μ l örnek alınıp üzerine 250 μ l pNPG çözeltisi ve 500 μ l potasyum fosfat tamponu ilave edilerek 65°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Spektrofotometre cihazının kalibrasyonu için kör olarak 250 μ l pNPG çözeltisi ve 750 μ l potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır ve örneklerle beraber 65°C sıcaklıktaki su banyosunda inkübe edilmiştir. 30 dakika sürenin sonunda üzerlerine 3500 μ l sodyum borat tamponu ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler alt üst etmek suretiyle homojen hale getirildikten sonra 2 ml'lik spektrofotometre küvetlerine alınmış ve 400, 405, 420 nm'de absorbans değerleri okunmuştur (http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/agalactosidasepnp.pdf).

Üretim ortamından hücrelerin ayrılmasıyla elde edilen süpernatantlardan da aynı yöntem ile enzim aktivitesi bakılmıştır.



Şekil 3.1 p-Nitrofenol standart eğri grafiği.

400, 405, 420 nm'deki absorbans değerleri ve p-nitrofenol konsantrasyonu ile standart eğriler oluşturularak, enzim aktivitesi tayininde ölçülen absorbans değerleri için en uygun olan ve R^2 bakımından en iyi sonucu veren eğriler arasından 405 nm için oluşturulan standart eğri seçilmiştir.

Standart eğriyi elde edebilmek için p-nitrofenol kullanılmıştır. Stok çözelti için 2 mM konsantrasyonuna sahip p-nitrofenol çözeltisi hazırlanmıştır. 0,01 M potasyum fosfat tamponu içinde p-nitrofenol konsantrasyonu 0,02-0,2 μmol arasında değişen bir seri tüp hazırlanarak enzim aktivitesi tayininde uygulanan işlemlerin aynısı yapılır. Örneklerden elde edilen absorbans değerleri ile p-nitrofenol konsantrasyonları arasındaki bağıntı standart eğri üzerinde değerlendirilir. Standart eğriden elde edilen formülde (Şekil 3.1), örneklerin absorbans değerleri yerine konularak izolatların α-galaktosidaz enzim miktarları hesaplanmıştır.

1 ünite enzim aktivitesi standart deney koşulları altında 1 dakikada, pNPG substrattan 1 μmol p-nitrofenol oluşturan α-galaktosidaz enzim miktarı olarak tanımlanır. Toplam enzim aktivitesi U/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.2 β -Galaktosidaz ve α -galaktosidaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu

3.2.2.1 β -Galaktosidaz aktivitesine sahip termofilik izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi

β -Galaktosidaz aktivitesi gösteren izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine olan etkisini belirleyebilmek için, öncelikle izolatlar β -galaktosidaz enzim üretim ortamına aşılandıktan ve 65°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra üretim sonlandırılmıştır. Enzim üretim ortamının santrifügasyonu sonucu pelletlerdeki hücrelerin kloroform ve SDS çözeltileri ile parçalanmasının ardından yapılan santrifügasyon ile elde edilen süpernatantlar, termostabilite denemesinin yapıldığı sıcaklıklarda 5 saat boyunca inkübe edilmiş (Hsu et al., 2005; Konsoula et al., 2005; Chen et al., 2008); 0.saat, 1.saat, 3.saat ve 5.saatte alınan örneklerin enzim aktivitesi tayininde Miller metodundan faydalanılmıştır (Miller, 1972). Aktiviteler 65°C'de ölçülmüştür.

İlk termostabilite denemesinde çalışılan sıcaklıklar 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C iken, ikinci denemede çalışılan sıcaklıklar 73°C, 75°C ve 78°C olmuştur.

3.2.2.2 α -Galaktosidaz aktivitesine sahip termofilik izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi

α -Galaktosidaz aktivitesi gösteren izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine olan etkisini belirleyebilmek için, öncelikle izolatlar α -galaktosidaz enzim üretim ortamına aşılandıktan ve 65°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra üretim sonlandırılmıştır. Enzim üretim ortamının santrifügasyonu sonucu pelletlerdeki hücrelerin sonikasyon ile parçalanmasının ardından yapılan santrifügasyon ile elde edilen süpernatantlar, termostabilite denemesinin yapıldığı sıcaklıklarda 5 saat boyunca inkübe edilmiş (Talbot et al., 1990; Gote et al., 2004; Lee et al., 2012); 0.saat, 1.saat, 3.saat ve 5.saatte alınan örneklerin enzim aktivitesi tayininde Miller metodundan faydalanılmıştır (Miller, 1972). Aktiviteler 65°C'de ölçülmüştür.

İlk termostabilite denemesinde çalışılan sıcaklıklar 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C iken, ikinci denemede 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 65°C ve 70°C ile çalışılmıştır.

3.2.2.3 α -Galaktosidaz enzimi için seçilen izolatta enzim üretimi bakımından optimum sıcaklık ve pH'nın belirlenmesi

Seçilen izolatın α -galaktosidaz enzim üretim ortamının santrifügasyonundan sonra, sonikasyon ile pelletteki hücrelerin parçalanmasının ardından yapılan santrifügasyon sonucu elde edilen süpernatant kullanılmıştır. Aktivite tayin yöntemindeki gibi 250 μ l süpernatant üzerine 500 μ l 0,01 M potasyum fosfat tampounu (pH 6,7) ve 250 μ l pNPG çözeltisi eklendikten sonra, inkübasyon sıcaklıkları olarak seçilen 30-90°C arasındaki su banyolarının (30, 40, 50, 60, 65, 70, 80, 90°C) her birinde 30 dakika bekletilmiştir. 30 dakika sonunda üzerlerine 3500 μ l sodyum borat tampounu ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur ve 405 nm'de absorbanslar ölçülmüştür (Gote et al., 2004; Lee et al., 2012). Böylece üretilen enzime ait optimum sıcaklık belirlenmiştir.

Ayrıca aktivite tayin yönteminde 250 μ l süpernatant ve 250 μ l pNPG çözeltisi üzerine 500 μ l potasyum fosfat tampounu yerine, aynı miktarda sitrat-fosfat (pH: 3,0-4,0-5,0), potasyum fosfat (pH: 6,0-6,7-7,0-8,0) ve karbonat-bikarbonat (pH: 9,0-10-10,7) tamponları ilave edildikten sonra 65°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika süren inkübasyonun ardından üzerlerine 3500 μ l sodyum borat tampounu ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur ve 405 nm'de absorbanslar ölçülmüştür (Talbot et al., 1990; Gote et al., 2004). Böylece üretilen enzime ait optimum pH belirlenmiştir.

3.2.2.4 α -Galaktosidaz enzimi için seçilen izolatta pH'nın enzim stabilitesine etkisi

pH'nın enzim stabilitesine olan etkisini belirleyebilmek için öncelikle seçilen izolat, α -galaktosidaz enzim üretim ortamına aşılandıktan ve 65°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra üretim sonlandırılmıştır. Enzim üretim ortamının santrifügasyonu sonucu pelletteki hücrelerin sonikasyon ile parçalanmasının ardından yapılan santrifügasyon ile elde edilen süpernatant kullanılmıştır. Bunun için, pH 3,0-10,7 (3,0-4,0-5,0-6,0-6,7-7,0-8,0-9,0-10-10,7) aralığında 200 μ l süpernatant 2500 μ l sitrat-fosfat (pH:3,0-4,0-5,0), potasyum fosfat (pH:6,0-6,7-7,0-8,0) ve karbonat-bikarbonat (pH:9,0-10-10,7) tamponları içerisinde oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmiştir (Gote et al., 2004). Örneklerin enzim aktivitesi tayininde Miller metodundan faydalanılmıştır (Miller, 1972). Aktiviteler 65°C'de ölçülmüştür.

3.2.3 β -Galaktosidaz ve α -galaktosidaz enzimleri için seçilen izolatların aşı ortamında büyüme eğrilerinin çıkarılması

β -Galaktosidaz enzimi bakımından en yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesine sahip bakteri izolatının ve α -galaktosidaz enzimi bakımından en yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesine sahip bakteri izolatının LB broth'dan oluşan 50 ml'lik büyüme ortamı içeren 250 ml'lik erlenlerde, 65°C'de 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde üretimleri gerçekleştirilmiştir. β -galaktosidaz aktivitesi bakımından seçilen izolatın 12 saatlik üretimi boyunca, α -galaktosidaz aktivitesi bakımından seçilen izolatın 20 saatlik üretimi boyunca, büyüme ortamlarından her iki saatte bir örnek alınarak, OD (optik yoğunluk) değerleri 600 nm dalga boyunda spektrometrede ölçülmüştür. Ölçülen OD değerleri ile zamana karşılık büyüme eğrileri çıkarılmıştır.

Bu aşamadan sonra çalışmamıza α -galaktosidaz enzimi için seçilen bakteri izolatıyla devam edilmiştir.

3.2.4 Çalkalamalı erlenlerde zamanın α -galaktosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi

α -Galaktosidaz enzim aktivitesi yönünden taranan izolatlar arasında en yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesine sahip termofilik bakteri izolatı 250 ml'lik erlenlerde 50 ml'lik enzim üretim ortamında, 65°C'de, 150 rpm hızda ve 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde üretilmiştir. Üretim boyunca her üç saatte bir örnek alınarak, üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık, enzim aktivite ve pH değerleri belirlenmiştir. Alınan örneklerin bir kısmı enzim aktivitesi tayininde kullanılmak için ayrılarak -20°C'de depolanmıştır.

Optik yoğunluk 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. pH ölçümleri ise alındığı saatte hemen yapılmıştır (Kim et al., 1996; Kim and Choi, 2000; Peng et al., 2003; Paik et al., 2004; Balaraman and Prabakaran, 2006; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b; Kim et al., 2006).

Kuru ağırlık tayini için önceden 105°C'lik etüvde 1 saat bekletilip daraları alınmış filtre kağıtları (0,22 μ m'lik) filtrasyon düzeneğine yerleştirilmiştir. Saf su ile ıslatılarak vakumdan geçirilmiştir. Daha sonra her üç saatte bir alınan örneklerin 5 ml'si filtreden süzölmüştür. Filtre kağıdı pens yardımıyla dikkatlice alüminyum folyo üzerine alınmıştır ve 103-105°C'lik etüvde 1 saat kurutulmuştur.

Desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Elde edilen değerler daralarından çıkartılarak hücrelerin kuru ağırlıkları saptanmıştır.

3.2.5 Biyoreaktörde zamanın α -galaktosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi

α -Galaktosidaz enzim aktivitesi yönünden taranan izolatlar arasında en yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesine sahip termofilik bakteri izolatının enzim üretim ortamında 65°C, pH 6,7 ve oksijen çözünürlüğü %30'un altına düşmeyecek şekilde ayarlanan kaskat programı ile 200-300 rpm karıştırma hızında 5 litre hacimli Sartorius Stedim Biotech marka Biosat® A plus model biyoreaktörde ölçek büyütülerek 4 litrelik derin kültür fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik biyoreaktör üretimi esnasında her üç saatte bir örnek alınarak, üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık, enzim aktivite değerleri belirlenmiştir. Optik yoğunluk 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Alınan örneklerin bir miktarı, enzim aktivitesi tayininde kullanılmak için ayrılarak -20°C'de depolanmıştır.

3.2.6 Üretilen α -galaktosidaz enziminin kısmi saflaştırılması

Seçilen izolatın, ölçek büyütülerek biyoreaktörde 4 litrelik derin kültür fermentasyonu ile elde edilen α -galaktosidaz enziminin kısmi saflaştırması amaçlanmıştır. Bunun için sırasıyla santrifügasyon, liyofilizasyon, sonikasyon, amonyum sülfatla protein çöktürme, FPLC ile jel filtrasyon kromatografi basamakları uygulanmıştır. Her bir saflaştırma basamağı ardından enzim aktivitesi (U/ml), total aktivite (U), protein miktarı (mg/ml), spesifik aktivite (U/mg), % saflaştırma verimi hesaplanmıştır.

3.2.6.1 Santrifügasyon ile ayırma

α -Galaktosidaz enzimi hücre içi bir enzim olduğundan, hücrelerin toplanması amacıyla, biyoreaktör üretimi sonrası elde edilen 4 litrelik enzim üretim ortamının santrifügasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Sigma 4K15 marka ve model numaralı santifüj ve 6×250 ml'lik 121256 kod numaralı rotor kullanılarak +4°C'de 5100 rpm'de 15 dakika süreyle üretim ortamları santrifüj edilmiştir.

3.2.6.2 Liyofilizasyon ile konsantrasyon

Liyofilizasyon protein solüsyonlarının yoğunlaştırılması ve depolanması amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Liyofilizasyonda solüsyon sıvısının süblümleşerek ortamdan uzaklaştırılması ve böylece örnek materyalin yoğunlaştırılması sağlanmaktadır (Tunçer, 2008). Bu amaçla santrifügasyon ile elde edilmiş ve -20°C'ye kaldırılmış pelletin, CHRIST Freeze Dryer Model BETA 2-8 LD Plus marka liyofilizatörde dondurularak vakumda kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.3 Sonikasyon ile hücre parçalama

Hücre içi bir enzim olan α -galaktosidazın aktivite tayininden önce, biyoreaktör üretimi sonrası enzim üretim ortamının santrifügasyonu ile elde edilen pelletteki hücreler BADELIN Marka Gerate-TypVW 2070 Sonikatör ile 40 watt güçte, 10 dakika parçalanmıştır. Daha sonra enzim aktivitesi tayini için 6000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir ve saf olmayan (ham) enzimi içeren süpernatant saflaştırma basamaklarında kullanılmıştır.

3.2.6.4 Amonyum sülfat ile çöktürme

Sonikasyon ile hücre parçalamasının ardından yapılan santrifüj ile elde edilen süpernatant sıvısı, içeriğindeki proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılması için kristal yapıdaki amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Bu işlem buz dolu bir kap içerisinde yaklaşık +4°C'de, manyetik karıştırıcı yardımıyla sıvıya kristal yapıdaki amonyum sülfatın yavaş yavaş ilave edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Enzimin hangi amonyum sülfat yüzdesinde çökeceği kesin olarak bilinmediğinden %0-40, %40-50, %50-60, %60-70 aralıkları denenmiştir. Aşağıda verilen formülle hesaplandıktan sonra ilave edilen kristal yapıdaki amonyum sülfatın yaklaşık 30 dakika karışmasının ardından 6000 rpm'de 45 dakika santrifügasyondan sonra FPLC basamağına geçilmiştir (Zhang et al., 1995; Maciunska et al., 1998). Her bir aralıkta elde edilen çökelti, en küçük hacimdeki tamponda çözülerek aktivite belirlenmiştir.

Amonyum sülfat belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan iki değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formülle tespit edilmiştir.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V_x (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V_x : Örnek hacmi

S_1 : 1' in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S_2 : 1' in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.2.6.5 FPLC- Jel Filtrasyon Kromatografi

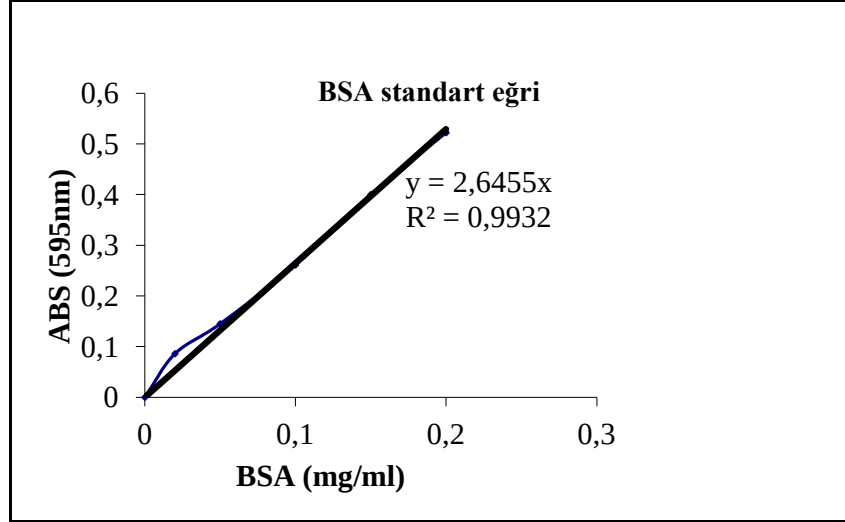
Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilen çökeltinin en küçük hacimdeki tamponda çözülmesinden sonra 6000 rpm'de 45 dakika santrifügasyonu ile elde edilen süpernatant, jel filtrasyon ile moleküler büyüklüklerine göre ayrılmak üzere Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC 18-1140-45 cihazı kullanılarak, HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR Jel Filtrasyonu kolonuna uygulanmıştır. Bu amaçla kolondan ilk dengeleme için, öncelikle 180 ml ultra saf su (kolonun 1,5 katı hacminde) 0,5 ml/dakika akış hızıyla geçirilmiş ve ardından kolon 1 ml/dakika akış hızı ile 240 ml (kolonun iki katı hacminde) 0,05 M Na_3PO_4 ve 0,15 M NaCl içeren (pH 7,2) başlangıç tamponu geçirilerek dengelenmiştir. Örnekler 450 ml 0,01 M potasyum fosfat tamponu ile 0,5 ml/dakika akış hızında 0,30 mPa basınçla kolondan akıtılmıştır. Kolondan fraksiyonlar 5'er ml'lik hacimlerde otomatik fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır. Kromatografi sonucu software ile takip edilerek, dijital çıktısı alınmıştır (Sheehan, 2003; Balaraman and Prabakaran, 2006).

Örneğin geçirilmesinin ardından, dört kolon hacmi (480 ml) 0,2 M NaOH 1 ml/dakika hızla geçirildikten sonra dört kolon hacmi (480 ml) ultra saf suyun 0,5 ml/dakika hızla geçirilmesiyle kolonun temizliği sağlanmıştır. Dolgu materyalinin kurumasını ve bakteri üremesini önlemek için kolon %20'lik etanolde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.6.6 Protein tayini

Kısmi saflaştırmanın her basamağından alınan örneklerin Bradford yöntemi ile protein tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Bradford stok solüsyonu beş kat seyreltilerek kullanılmıştır. Bradford yöntemi ile protein tayininde, 50 µl örnek üzerine 1,5 ml beş kat seyreltik Bradford solüsyonu ilave edilip yarım saat

bekletildikten sonra oluşan reaksiyona ait renk değişimi spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okunmuştur. Bovine Serum Albumine (BSA)'nin farklı konsantrasyonlarındaki (0,02mg/ml - 0,2mg/ml) absorbansların ölçülmesi ile elde edilen standart grafiğe ait denklemde ($y=2,645x$), absorbansların 'y' yerine konulmasıyla, protein miktarı "mg/ml" cinsinden tayin edilmiştir (Kim et al., 1997; Jeong et al., 2001; Kruger, 2002; Peng et al., 2003; Jeong et al., 2004; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b; Hwang et al., 2007).



Şekil 3.2 Protein miktarı standart eğri grafiği.

Spesifik enzim aktivitesi ise aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik} \cdot \text{enzim} \cdot \text{aktivitesi} = \frac{\text{toplaml.enzim.aktivitesi(U)}}{\text{toplaml.protein.miktarı(mg)}}$$

Kısmi saflaştırmaya ait tüm adımlarda; enzim aktivitesi (U/ml), total aktivite (U), total protein (mg), spesifik aktivite (U/mg), % saflaştırma verimi hesaplanmıştır. Şekil 3.2’de protein miktarı standart eğrisi görülmektedir.

3.2.6.7 SDS-PAGE

Kısmi saflaştırmanın her basamağından alınan örnekler SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenerek saflaştırılmasına çalışılan enzimin molekül ağırlığı belirlenmiş, her bir saflaştırma basamağında gerçekleştirilen ayırım ortaya konmuştur. Bu amaçla %6 ve %10’luk jeller denenmiştir.

%10'luk jel elde etmek üzere, birinci adımda ayırımı yapacak olan jel (separating gel) dökülmüştür. 10 ml ayırıcı jel için:

İçerik:

- Solüsyon B (Separating Gel Buffer); 2,5 ml
- Akrilamid karışımı (%30'luk); 3,3 ml
- Distile su; 4,1 ml
- APS (%10'luk); 0,15 ml
- TEMED; 0,005 ml

Birinci jel döküldükten sonra hava ile temasını kesmek üzere yeterli miktarda izopropanol, jelin üzerine eşit şekilde koyulmuştur. 1 saat bekledikten sonra %10'luk jelin üzerine %6'luk jel dökülmüştür. Diğer denemelerde ise sadece %10'luk ve sadece %6'luk ayırıcı jelde yürütmeler yapılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. %6'luk, 10 ml ayırıcı jel için:

İçerik:

- Solüsyon B (Separating Gel Buffer); 2,5 ml
- Akrilamid karışımı (%30'luk); 2 ml
- Distile su; 5,4 ml
- APS (%10'luk); 0,15 ml
- TEMED; 0,008 ml

Birinci jel döküldükten sonra hava ile temasını kesmek üzere yeterli miktarda izopropanol, jelin üzerine eşit şekilde koyulmuştur. 1 saat beklemenin ardından, yükleme kuyucuklarını oluşturmak üzere yürütücü (stacking) jel dökülmüştür. 10 ml jel için:

İçerik:

- Solüsyon C (Stacking Gel Buffer); 2,5 ml
- Akrilamid karışımı (%30'luk); 1,7 ml
- Distile su; 5,7 ml
- APS (%10'luk); 0,15 ml
- TEMED; 0,01 ml

Jelde yürütülecek örneklerin hazırlanması için çeşitli denemelerin ardından, en düşük miktarda protein içeriğine sahip olan örneğe göre, her bir kuyucuğa hangi miktarda örnek ve su yüklenebileceği hesaplanmıştır. Örnek tamponu, toplam hacmin (örnek ve su) dörtte biri kadar ilave edilmiştir. Belirlenen miktarlarda hazırlanan örnek, örnek tamponu ve su eppendorf tüplerine konularak, 95°C'de 5 dakika bekletilmiş ve böylece proteinlerin denatürasyonu gerçekleştirilmiştir.

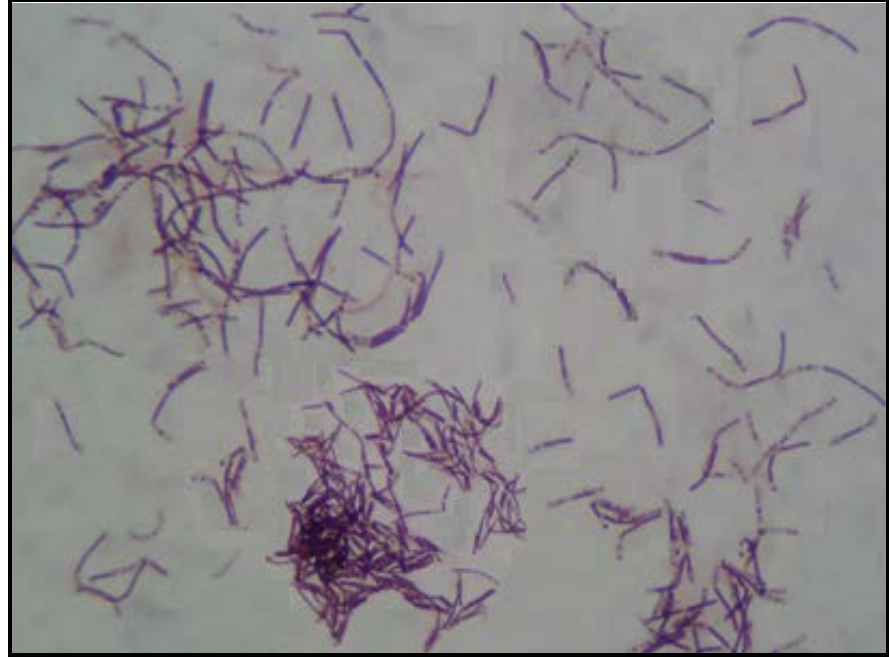
Örnek yüklemek amacıyla kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilerek, jelin donması için 1 saat beklenmiştir. Bu süre sonunda kuyucuklar akrilamid kalıntılarından temizlenmiş, marker ve örnekler yüklenerek, 80 volt elektrik akımında, tank buffer varlığında 4 saat yürütülmüştür. Boş kalan kuyucuklara jelin daha düzgün yürüyebilmesi için örnek tamponu yüklenmiştir.

Örneklerin yürütüldüğü jel, görüntülenmek üzere boyamaya alınmıştır. Bu amaçla hacminin 3-4 katı boya çözeltisinde resiprokal hareket eden çalkalayıcı üzerinde 20-40 rpm hızla yarım saat boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. Boyamanın sonuçlarını görebilmek için 2-3 kez boyayı geri alma solüsyonu ile boyanın giderilmesi sağlanmıştır. Ertesi gün boya yeterince giderildiğinde jelin fotoğrafları çekilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Endospor Oluşturan Bazı Termofilik Bakteri İzolatlarında β -Galaktosidaz ve α -Galaktosidaz Aktivitesinin Taranması

53 adet termofilik bakteri izolatının nutrient agar içeren petrilerde çizgi plaka yöntemiyle saflık kontrollerinin ardından Gram boyamaları yapılmıştır. Sonuç olarak, mikroskopla incelendiklerinde mor renkli ve çubuk şeklinde oldukları görülmüştür, bu durum izolatların Gram pozitif olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca boyanan hücrelerin iç kısmında boyanmayan endosporları da içerdiği gözlenmiştir. Şekil 4.1’de termofilik izotlardan izolat-26’nın Gram boyamasının ardından elde edilen mikroskop görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.1 İzolat-26’nın Gram boyama sonucundan elde edilen mikroskop görüntüsü.

İzolatların %5’lik (v/v) aşılamaıyla 250 ml’lik erlenlerdeki 50 ml’lik α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimleri için seçilen üretim ortamlarında 24 saat inkübasyonundan sonra, üretim sonlandırılmış ve enzimlerin hücresel lokalizasyonunu belirleyebilmek amacıyla enzim üretim ortamlarının santrifüjasyonu sonucu elde edilen pelletten ve süpernatanttan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Aktivitelerinin ölçülmesinde Miller yöntemi (Miller, 1972) kullanılmıştır. Sonuçlara göre α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin intraselüler enzimler olduğu tespit edilmiştir. İncelenen bakteri izolatlarının

yaklaşık %11,3'ünde intraselüler α -galaktosidaz aktivitesi, yaklaşık %5,7'sinde intraselüler β -galaktosidaz aktivitesi **pozitif** bulunmuştur.

α -galaktosidaz ile β -galaktosidaz aktivitesi gösteren izolatlar ve enzimlerin aktivite değerleri Çizelge 4.1'de ve 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 α -Galaktosidaz enzim üretim ortamında belirlenmiş enzim aktiviteleri.

İzolat numarası/kodu	Pelletin enzim aktivitesi (U/ml)	Süpernatantın enzim aktivitesi (U/ml)
İzolat-7	0,008	-
İzolat-12	0,06	-
İzolat-17	0,002	-
İzolat-20	0,017	-
İzolat-26	0,025	-
İzolat-35	0,005	-

Çizelge 4.2 β -Galaktosidaz enzim üretim ortamında belirlenmiş enzim aktiviteleri.

İzolat numarası/kodu	Pelletin enzim aktivitesi (Miller Unit)	Süpernatantın enzim aktivitesi (Miller Unit)
İzolat-20	192,2	-
İzolat-25	80	-
İzolat-30	184,5	-

Çizelgelerdeki verilere göre α -galaktosidaz enzimi için izolat-26 ve β -galaktosidaz enzimi için ise izolat-20, en yüksek aktiviteye sahip izolatlar olarak saptanmıştır. α -galaktosidaz için çalışmanın diğer aşamalarında izolat-26, β -galaktosidaz için ise bir sonraki aşama olan sıcaklık stabilitesi için izolat-20 ve izolat-30 kullanılmıştır. İzolat-25'in β -galaktosidaz aktivitesi diğerlerine kıyasla daha düşük olduğundan sıcaklık stabilitesi denemeleri için diğer izolatlar tercih edilmiştir.

Literatürdeki α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz üreten bazı mikroorganizmalar, enzimlerin hücresel lokalizasyonları ve aktivite değerleri Çizelge 4.3’de ve 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 β -Galaktosidaz üreten bazı mikroorganizmalar ve enzimlerin aktivite değerleri.

β -galaktosidaz kaynakları	Enzim lokasyonu	Karbon kaynağı	Aktivite (U)	Referans
<i>Bifidobacterium longum</i> CCRC 15708	Intraselüler	Glikoz	712,4	Hsu et al., 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	Intraselüler	Laktoz	133,35	Chen et al., 2008
<i>Thermus</i> sp. Strain T2	Intraselüler	Laktoz	1000 U/mg	Pessela et al., 2003
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Intraselüler	Laktoz	49	Grogan, 1991
<i>Bacillus subtilis</i>	Ekstraselüler	Çözünür nişasta	38 U/mg	Konsoula et al., 2005
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 77	Intraselüler	Laktoz	1,36 U/ml	Üstok, 2004
<i>Streptococcus thermophilus</i> 95/2	Intraselüler	Mısır şurubu	2,03 U/ml	Üstok, 2004
<i>Streptococcus thermophilus</i> 74	İntraselüler	Mısır şurubu	0,0189 U/ml	Tari ve ark., 2010
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 77	İntraselüler	Laktoz	0,0293 U/ml	Tari ve ark., 2010
<i>Streptomyces griseolalbus</i>	Intraselüler	Keçiyoynuzu tanesi zamlı	0,26 U/ml	Anisha et al., 2009
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 1193	Intraselüler	Glikoz	1,061 U/ml	Kara, 2004
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 20246			0,142 U/ml	
<i>Lactobacillus plantarum</i> E081			0,292 U/ml	

Çalışmamızda izolat-20'nin β -galaktosidaz aktivitesi (192,2 U), *Sulfolobus solfataricus* (49 U)'un ve *Bacillus subtilis* (133,35 U)'in β -galaktosidaz aktivitelerine göre daha yüksektir.

Çizelge 4.4 α -Galaktosidaz üreten bazı mikroorganizmalar ve enzimlerin aktivite değerleri.

α -galaktosidaz kaynakları	Enzim lokasyonu	Karbon kaynağı	Aktivite (U/ml)	Referans
<i>Bacillus</i> sp. LX-1	Ekstraselüler	Galaktoz	0,558 $\pm$ 0,014	Lee et al.,2012
<i>B. stearothermophilus</i> (NCIM-5146)	Ekstraselüler	Soya fasulyesi unu	2	Gote et al., 2003
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ekstraselüler	Soya fasülyesi unu	1,65	Cruz and Park, 1982
<i>Aspergillus foetidus</i> ZU-G1	Ekstraselüler	Soya fasülyesi unu+ buğday kepeği	64,75	Liu et al., 2007
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ekstraselüler	Galaktoz	35,68	De Rezende et al., 2005
<i>Humicola</i> sp.	Intraselüler	Buğday kepeği ekstraktı	5,54	Kotwal et al., 1995
AGP 42 AGP 47	Ekstraselüler	Keçiyoynuzu tanesi zamkı	17,4 0,6	Anisha et al., 2009
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 395.62/b	Intraselüler	Sükroz	90	Rezessy-Szabo et al., 2003
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	Ekstraselüler	Keçiyoynuzu tanesi zamkı + galaktoz	0,195	Zeilinger et al., 1993
<i>Bacillus</i> sp. JF2 strain	Ekstraselüler	Buğday unu + Soya fasülyesi tohumu unu	27,4	Jin et al., 2001
<i>Streptomyces erythrus</i>	Ekstraselüler	Galaktoz	9,94	Elshafei et al., 2001
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Ekstraselüler	Keçiyoynuzu tanesi zamkı	0,02	Talbot et al., 1990
<i>Bacillus stearothermophilus</i> AT-7	İntraselüler	Laktoz	0,03	Pederson et al., 1980

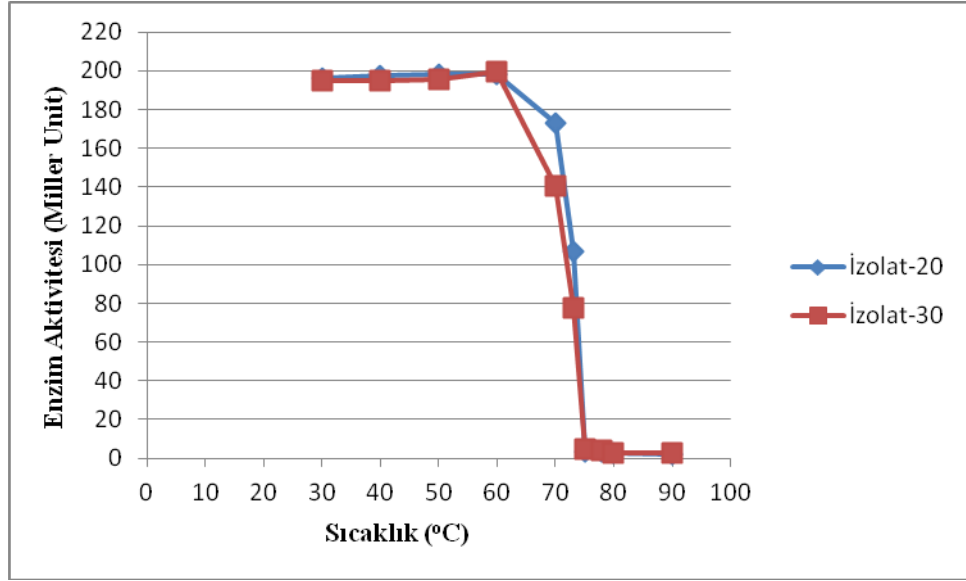
Çizelgede yer alan verilere göre izolat-26, birçok bakteri türüne göre daha yüksek α -galaktosidaz aktivitesi gösterirken, fungus türlerine göre genellikle daha düşük bir aktivite göstermiştir.

Çalışmadaki termofilik bakteri izolatlarının fermentasyon sıvısından ayrılması amacıyla yapılan ilk santrifügasyondaki dönüş hızı ve süresi 5100 rpm (6252 x g), 15 dakika ve ikinci santrifügasyonda 11000 rpm (29085 x g), 5 dakikadır. Çalışmamızda birinci santrifügasyon sonrası β -galaktosidaz enzimi hem pellet hem de supernatantta saptanırken, α -galaktosidaz enzimi sadece pellette saptanmıştır. Enzim lokalizasyonunu saptanmasında hücrelerin yüksek santrifüj hızlarında ayrılması gerektiği anlaşılmıştır. Literatürde yer alan, mikroorganizma hücrelerinin fermentasyon sıvısından ayrılması amacıyla yapılan santrifügasyondaki dönüş hızları ve süreleri α -galaktosidaz enzimi için; 10,000 x g, 20 dakika (Talbot et al., 1990); 10,000 x g, 20 dakika (Prashanth and Mulimani, 2004); 7000 x g, 10 dakika (Gote et al., 2004); 6000 x g, 10 dakika (Stan et al., 2006); 10,000 rpm 20 dakika (Anisha et al., 2009); 10,000 x g, 30 dakika (Lee et al., 2012) iken β -galaktosidaz enzimi için; 12000 rpm, 9 dakika (Kara, 2004); 4500 x g, 20 dakika (Konsolula et al., 2005); 10,000 x g, 10 dakika (Hsu et al., 2005); 18,522 x g, 20 dakika (Chen et al., 2008); 2800 x g, 15 dakika (Tari ve ark., 2010)'dır.

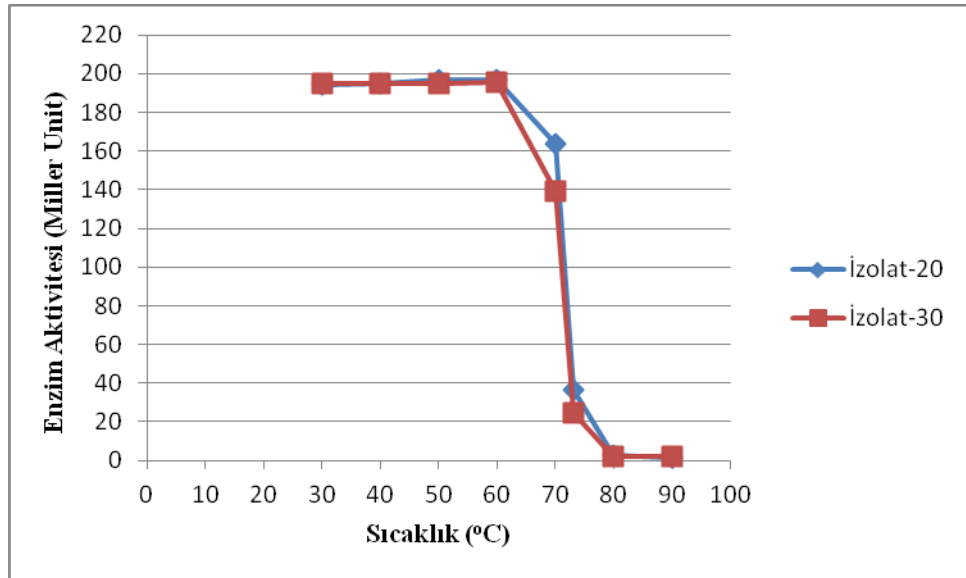
4.2 β -Galaktosidaz ve α -Galaktosidaz Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu

4.2.1 β -Galaktosidaz aktivitesine sahip termofilik izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi

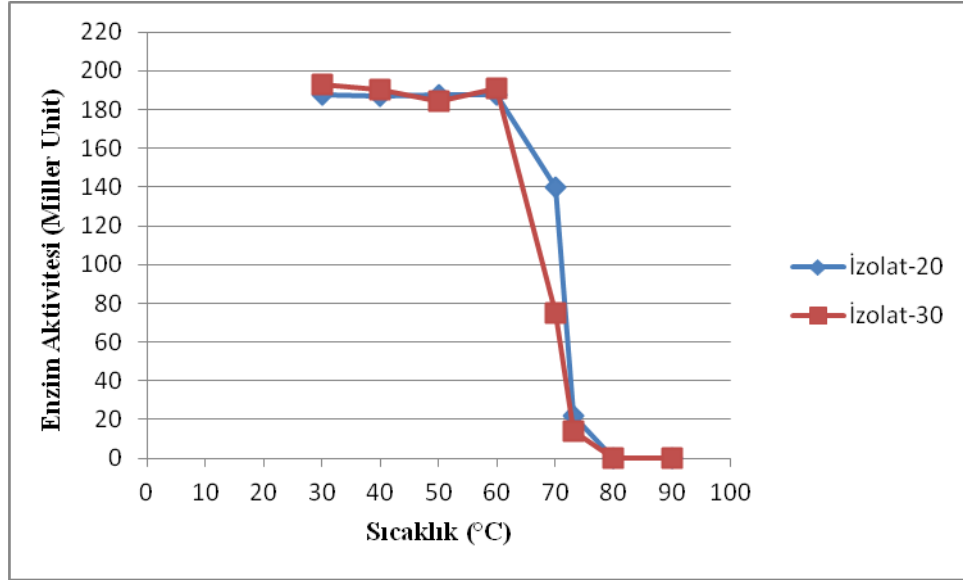
İzolat-20 ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için 3.2.2.1 numaralı bölümde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen termostabilite denemeleri sonucunda, izolat-20'ye ait β -galaktosidaz enziminin yüksek sıcaklıklardaki termostabilitesi daha yüksektir. İki β -galaktosidaz enzimi arasındaki aktivite farkının, her üç örnekleme zamanı (1.saat, 3. saat, 5.saat) için de 30-60°C sıcaklık aralığında ihmal edilebilir düzeyde, 70°C sıcaklıkta ise maksimum seviyede olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.2 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 1.saat).



Şekil 4.3 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 3.saat).



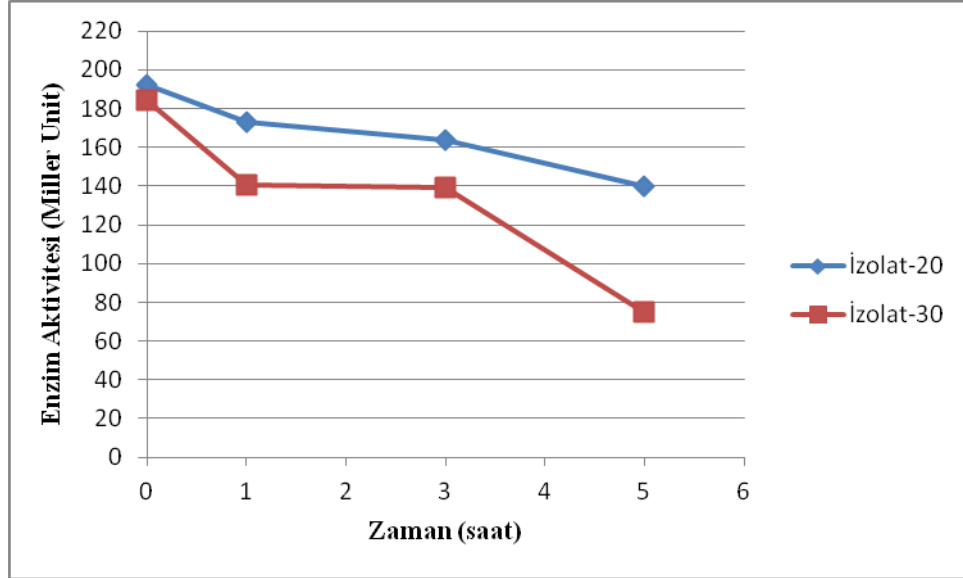
Şekil 4.4 Termofilik izolatlar izolat-20'ye ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 5.saat).

İzolat-20 ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimlerinin 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda 5 saat süren inkübasyonları boyunca kalan aktivite yüzdeleri Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi giderek azalmıştır. Her iki enzimin de 50°C ve 60°C'lerde aktivitelerinin tamamını korurken, 75°C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivite göstermediği saptanmıştır.

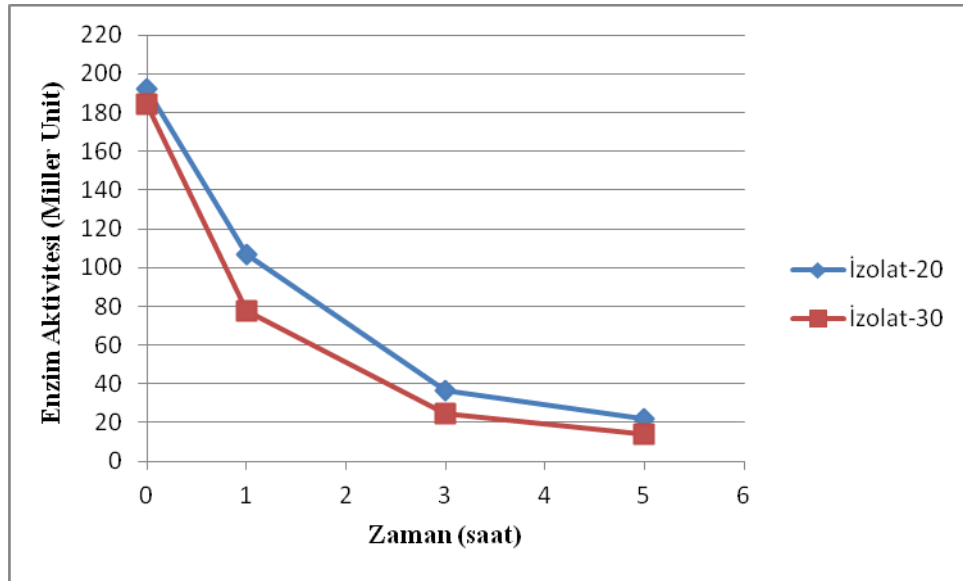
Çizelge 4.5 İzolat-20 ve izolat-30'a ait β -galaktosidaz enzimlerinin 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda inkübasyonu sonucu kalan aktivite yüzdeleri.

Sıcaklık (°C)	İzolat-20			İzolat-30		
	Kalan Aktivite (%)			Kalan Aktivite (%)		
	1. Saat	3. Saat	5. Saat	1. Saat	3. Saat	5. Saat
50	100	100	100	100	100	100
60	100	100	100	100	100	98
70	90,0	85,3	73	76,2	75,6	40,8
73	55,6	19,0	11,5	42,1	13,3	7,6
75	1,8	1,6	-	2,4	2,2	-
78	1,7	1,5	-	2,3	2,0	-
80	1,5	1,4	-	1,5	1,3	-
90	0,9	0,7	-	1,4	1,2	-

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da de görüldüğü üzere izolat-30’a ait β -galaktosidaz enzimi, izolat-20’ye ait β -galaktosidaza kıyasla yüksek sıcaklıklarda artan inkübasyon sürelerinden daha fazla etkilenmiştir.



Şekil 4.5 Termofilik izolatlar izolat-20’ye ve izolat-30’a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin zamana bağlı değişimi ($T=70^{\circ}\text{C}$).



Şekil 4.6 Termofilik izolatlar izolat-20’ye ve izolat-30’a ait β -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin zamana bağlı değişimi ($T=73^{\circ}\text{C}$).

İzolat-20’nin α -galaktosidaz aktivitesinin yanında β -galaktosidaz aktivitesine, ayrıca β -galaktosidaz enziminin yüksek sıcaklık stabilitesine sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.6’da farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen β -galaktosidaz enzimlerinin termostabilite özellikleri yer almaktadır.

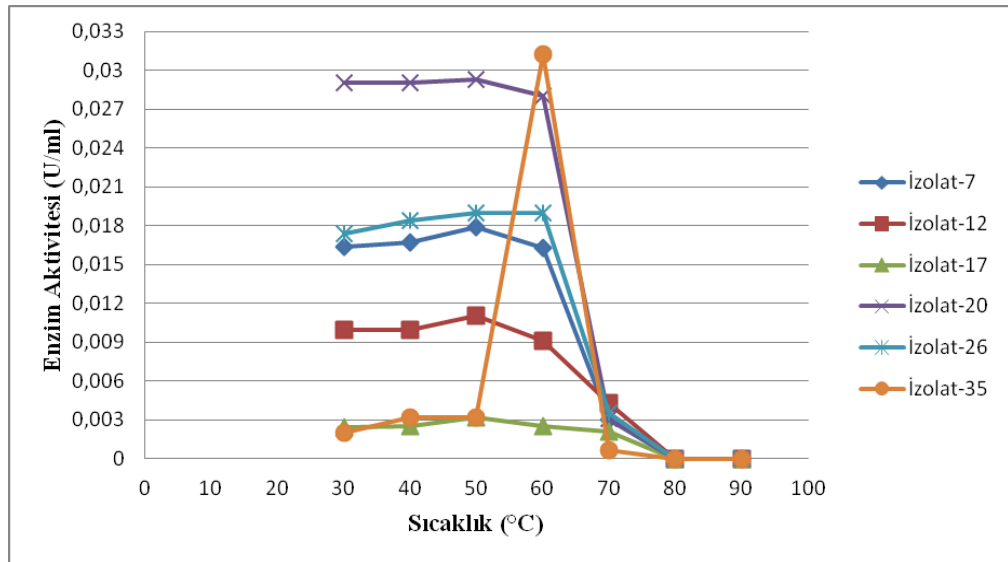
Çizelge 4.6 Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen β -galaktosidaz enzimlerinin termostabilite özellikleri.

Mikroorganizma	Sıcaklık stabilitesi	Referans
<i>Sterigmatomyces elviae</i> CBS8119	80°C – 1 saat (*KA: % 90) 85°C – 1 saat (*KA: % 62)	Onishi and Tanaka, 1995
<i>Bacillus</i> sp.	50°C – 408 saat (KA: % 50) 55°C – 94 dk (KA: % 50)	Sani et al., 1999
<i>Escherichia coli</i>	80°C – 16 saat (KA: % 50) 90°C – 16 dk (KA: % 50)	Kim et al., 2004
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 77	55°C – 30 dk (KA: % 54,53) 65°C – 30 dk (KA: % 5)	Üstok, 2004
<i>Streptococcus thermophilus</i> 95/2	55°C – 30 dk (KA: % 57,25) 65°C – 30 dk (KA: % 5)	Üstok, 2004
<i>Bacillus subtilis</i> WB600	65°C – 50 saat (KA: % 50) 70°C – 9 saat (KA: % 50)	Chen et al., 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	60°C – 15 dk (KA: % 50) 70°C – 120 dk (KA: % 50)	Konsoula et al., 2005
<i>Rhizomucor</i> sp.	60°C – 4 saat (KA: % 100) 70°C – 150 dk (KA: % 50)	Shaikh et al., 1999
<i>İzolat-20</i>	50°C – 5 saat (KA: % 100) 60°C – 5 saat (KA: % 100) 70°C – 5 saat (KA: % 73)	Bu çalışma

*KA: Kalan aktivite

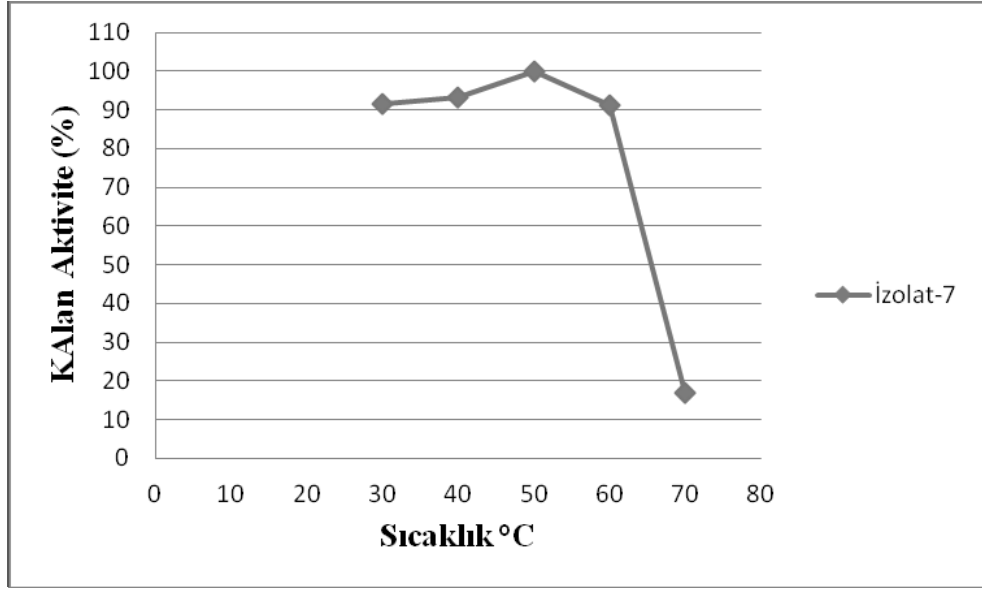
4.2.2 α -Galaktosidaz aktivitesine sahip termofilik izolatlarda sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi

Termofilik izolatlara (izolat-7,12,17,20,26,35) ait α -galaktosidaz enzimleri için 3.2.2.3 numaralı bölümde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen sıcaklık stabilitesi denemeleri sonucunda enzimlerde 80°C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivite göstermediği saptanmıştır. 30-50°C arası sıcaklıklarda 5 saat süren inkübasyon boyunca izolat-7'nin, izolat-12'nin, izolat-17'nin ve izolat-20'nin enzimlerinde giderek artan bir aktivite görülürken, 60°C ve 70°C'de aktivitede kayıplar meydana gelmiştir. İzolat-26'nin ve izolat-35'in enzimlerinde ise 30-60°C arası sıcaklıklarda giderek artan bir aktivite görülürken, 70°C'de aktivitede kayıplar meydana gelmiştir. İzolat-35'de 60°C'de 50°C'ye göre aktivitede hızlı bir artış olduğu halde, 70°C'de enzim aktivitesinde çok fazla düşüş görülmektedir (Şekil 4.7).

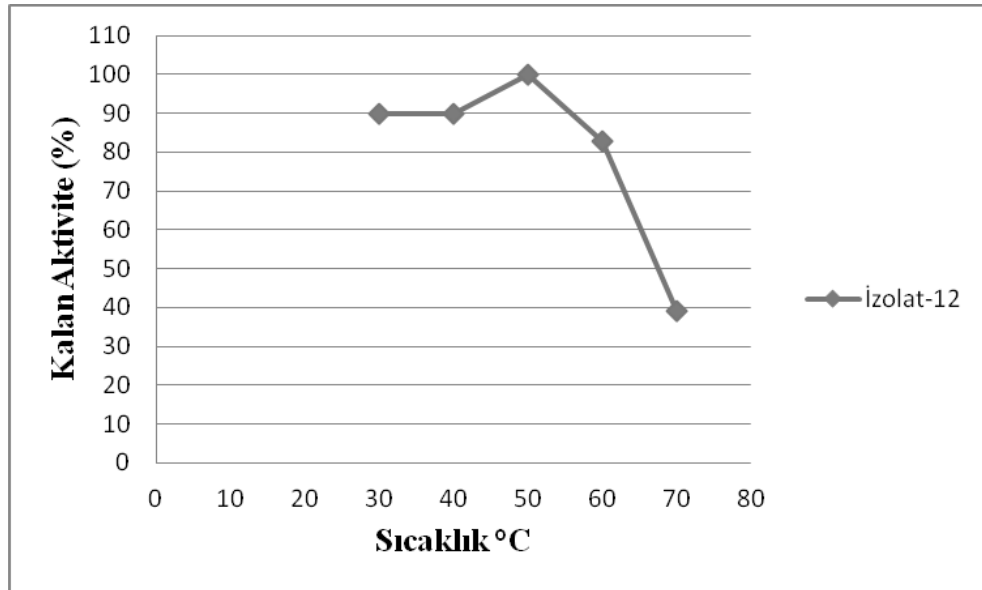


Şekil 4.7 Termofilik izolatlara (izolat-7, 12, 17, 20, 26, 35) ait α -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 5.saat).

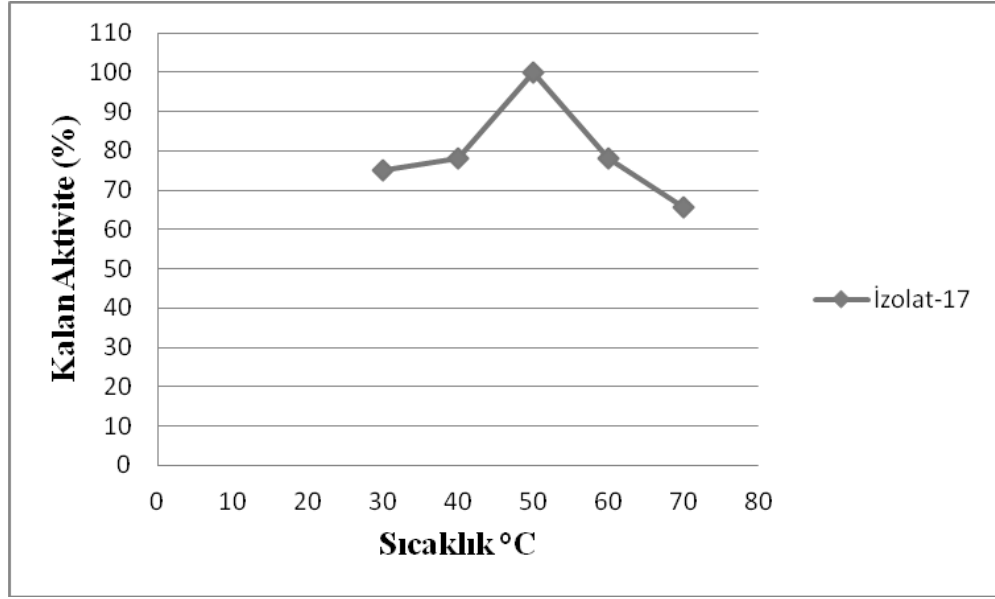
30, 40, 50, 60, 70°C'lerde 5 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen kalan aktivite değerleri her bir izolat için ayrı olarak aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13).



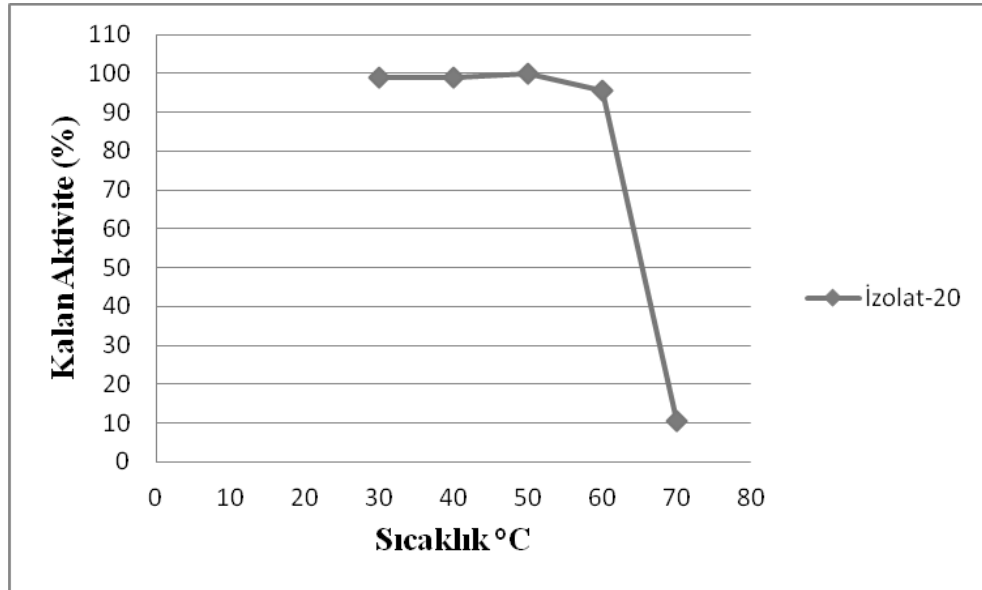
Şekil 4.8 İzolat-7'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.



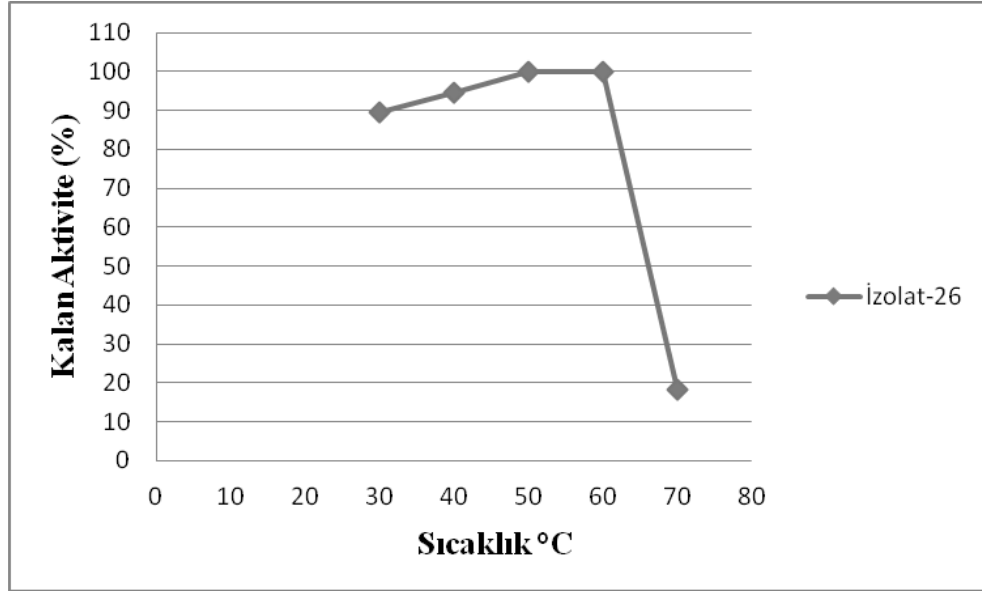
Şekil 4.9 İzolat-12'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.



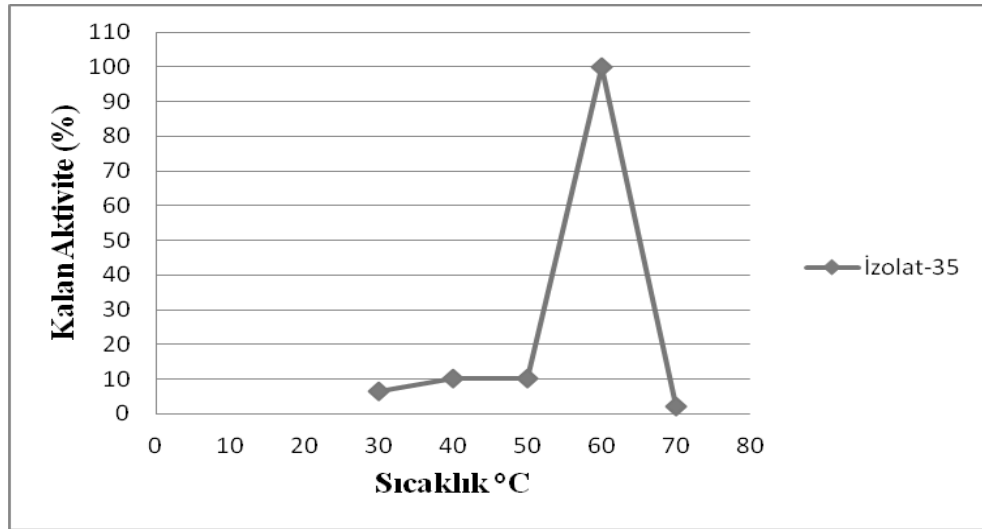
Şekil 4.10 İzolat-17'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.



Şekil 4.11 İzolat-20'nin α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.



Şekil 4.12 İzolat-26'nın α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.



Şekil 4.13 İzolat-35'in α -galaktosidaz enziminin farklı sıcaklıklarda 5 saat inkübasyonu sonunda elde edilen kalan aktivite (%) değerleri.

Yukarıdaki grafiklerden yola çıkarak, izolat-7, izolat-12, izolat-17, izolat-20, izolat-26 ve izolat-35'e ait α -galaktosidazların 5 saatlik inkübasyonları sonunda 50, 60, 70°C sıcaklıklardaki stabiliteyi Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

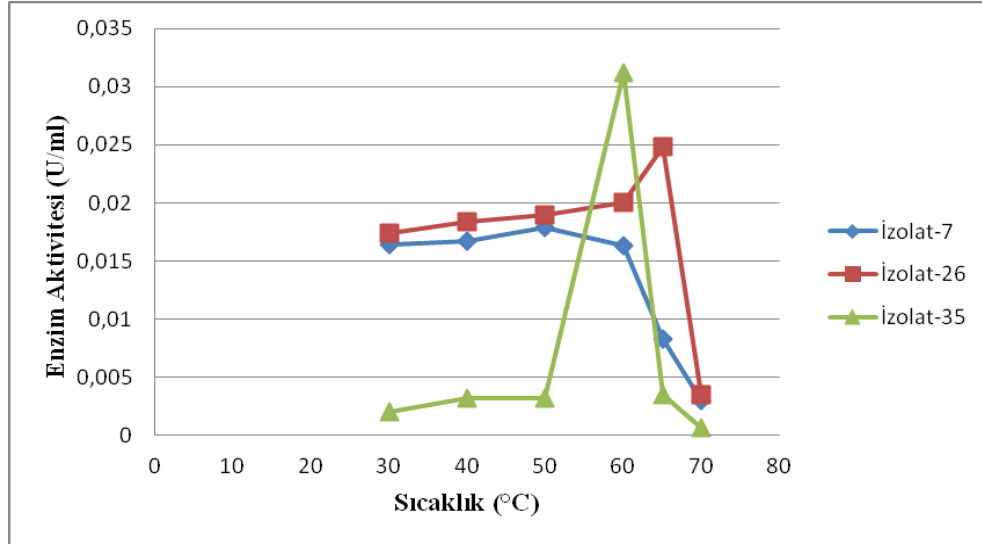
Çizelge 4.7 İzolat-7, izolat-12, izolat-17, izolat-20, izolat-26 ve izolat-35'e ait α - galaktosidaz enzimlerinin 50, 60, 70°C sıcaklıklardaki stabiliteleri.

Mikroorganizma	Sıcaklık stabilitesi
İzolat-7	50°C – 5 saat (*KA :% 100) , 60°C – 5 saat (*KA :% 90) 70°C – 5 saat (*KA :% 16)
İzolat-12	50°C – 5 saat (KA :% 16), 60°C – 5 saat (KA :% 83) 70°C – 5 saat (KA :% 39)
İzolat-17	50°C – 5 saat (KA :% 100), 60°C – 5 saat (KA :%78) 70°C – 5 saat (KA :% 65)
İzolat-20	50°C – 5 saat (KA :% 100), 60°C – 5 saat (KA :% 95) 70°C – 5 saat (KA :% 10)
İzolat-26	50°C – 5 saat (KA :% 100), 60°C – 5 saat (KA :% 100) 70°C – 5 saat (KA :% 18)
İzolat-35	50°C – 5 saat (KA :% 10), 60°C – 5 saat (KA :%100) 70°C – 5 saat (KA :% 2)

*KA: Kalan aktivite

Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'deki grafikler incelendiğinde; izolat-7, izolat-12, izolat-17 ve izolat-20'nin enzimlerinin 50°C'de, izolat-26 ve izolat-35'in enzimlerinin ise 60°C'de kalan aktivite yüzdelerinin en fazla olduğu anlaşılmaktadır. İzolat-17'ye ait enzimin kalan aktivitesi 70°C'de diğerlerine göre en fazladır ve en az aktivite kaybına uğrayan enzimdir. İzolat-26'ya ait enzim ise 60°C'ye kadar giderek artan bir aktivite göstermiştir.

Bu verilerden yola çıkarak izolat-7, izolat 26 ve izolat-35'in enzim stabilitelerinin, 60-70°C arasındaki bir sıcaklık değeri olan 65°C'de nasıl değiştiğini belirleyebilmek için 30, 40, 50, 60, 65 ve 70°C sıcaklıklarda 5 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 Termofilik izolatlara (izolat-7, 26, 35) ait α -galaktosidaz enzimleri için enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (t = 5.saat).

İzolat-7'ye ve izolat-35'e ait enzimlerde 60°C'den sonraki sıcaklıklarda aktivitede hızlı bir düşüş meydana gelirken izolat-26'nın α -galaktosidaz enzimi, 30-65°C arası sıcaklıklarda giderek artan bir aktiviteye sahip olmasından ve 70°C'de az da olsa aktivitesini koruyabilmesinden dolayı en iyi sıcaklık stabilitesini göstermiştir. Ayrıca izolat-26'nın α -galaktosidaz enziminin, diğer beş izolatın enzimlerine göre en yüksek α -galaktosidaz aktivitesine sahip olmasından dolayı, ölçek büyütme ve saflaştırma aşamalarında kullanılmak üzere **izolat-26** seçilmiştir. Çizelge 4.8'de farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen α -galaktosidaz enzimlerinin sıcaklık stabiliteyi gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen α -galaktosidaz enzimlerinin sıcaklık stabiliteyi.

Mikroorganizma	Sıcaklık stabilitesi	Referans
<i>Bacillus stearothermophilus</i> AT-7 α -Gal I α -Gal II	65°C – 2 saat (KA: % 50) 65°C – 3 dakika (KA: % 50)	Pederson et al., 1980
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	65°C – 2 saat (KA: % 70) 68°C – 90 dakika (KA: % 30)	Talbot et al., 1990
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (NCIM-5146)	65°C – 120 dakika (KA: % 80) 70°C – 80 dakika (KA: % 50)	Gote et al., 2003

Çizelge 4.8 (devam)

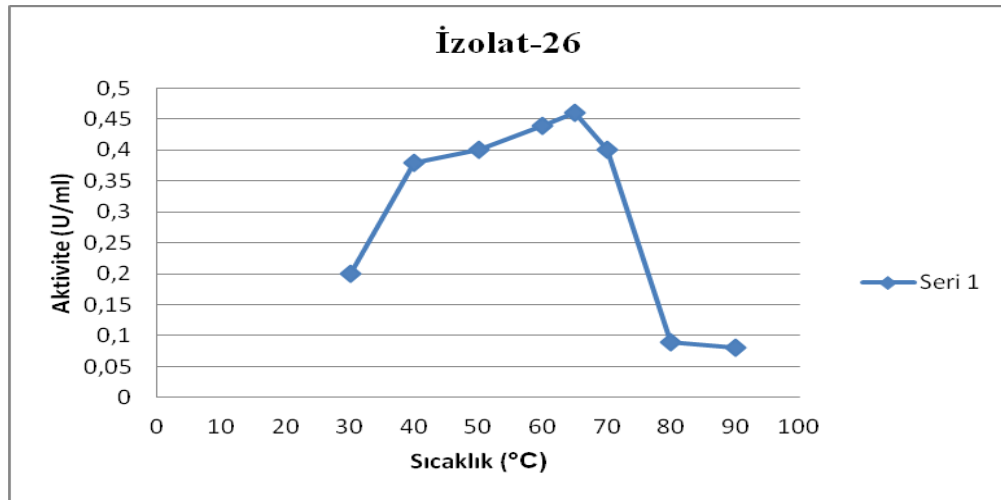
<i>Aspergillus oryzae</i>	50°C– 24 saat (KA: % 44) 50°C– 12 saat (KA: % 88) 50°C– 8 saat (KA: % 92)	Prashanth et al., 2004
<i>Bacillus</i> sp. LX-1	45°C – 30 dakika (KA: % 88) 50°C – 30 dakika (KA: % 0)	Lee et al., 2012
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	70°C ve 80°C – 2,5 saat (KA: %100) 90°C– 30 dakika (KA: % 50)	Stan et al., 2006
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NUB 3621	70°C – 19 saat (KA: % 50)	Fridjonsson et al., 1999
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100°C – 15 saat (KA: % 50)	Lieshout et al., 2003
<i>Streptomyces griseolobus</i> α -Gal I α -Gal II α -Gal III	50-65°C– 2 saat (KA: % 100), 75°C – 30 dakika (KA: % 50) 55°C – 2 saat (KA: % 100), 60°C – 30 dakika (KA: % 50) 55°C – 2 saat (KA: % 100), 60°C – 30 dakika (KA: % 50)	Anisha et al., 2009
<i>Thermotoga neapolitana</i>	85°C – 4 saat (KA: % 75)	King et al., 1998
<i>Thermotoga maritima</i>	85°C – 6 saat (KA: % 50)	Miiler et al., 2001
<i>Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum</i>	70°C – 36 saat (KA: %100)	King et al., 2002
<i>İzolat-26</i>	50°C – 5 saat (KA: % 100) 60°C – 5 saat (KA: % 100) 70°C – 5 saat (KA: % 18)	Bu çalışma

*KA: Kalan aktivite

α -Galaktosidazların trimerik ve tetramerik formları, monomerik ve dimerik formlarına kıyasla daha yüksek sıcaklık stabilitesine sahiptir (Gote et al., 2006).

4.3 Seçilen İzolat-26'da α -Galaktosidaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklık ve pH'nın Belirlenmesi

Üretilen enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğu sıcaklığın ortaya çıkarılması amacıyla aktivite tayin yönteminde 30-90°C arasında farklı sıcaklıklar denenmiştir. Aktivite tayini standart olarak 0,01 M potasyum fosfat tamponu (pH 6,7) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.15 Termofilik izolat-26 için, 0,01 M potasyum fosfat tamponu- pH 6,7'de farklı inkübasyon sıcaklıklarına ait enzim aktiviteleri

İzolat-26 için enzimin optimum sıcaklık değerinin 65°C olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi 80 ve 90°C'lerde inaktivasyona uğrayarak düşüş göstermiştir (Şekil 4.15). Yine de bu sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesine rastlanması sıcaklık stabilitesinin yüksek olduğuna işarettir. Çizelge 4.9'da α -galaktosidaz enzimi için literatür çalışmalarına ait optimum sıcaklık değerleri yer almaktadır.

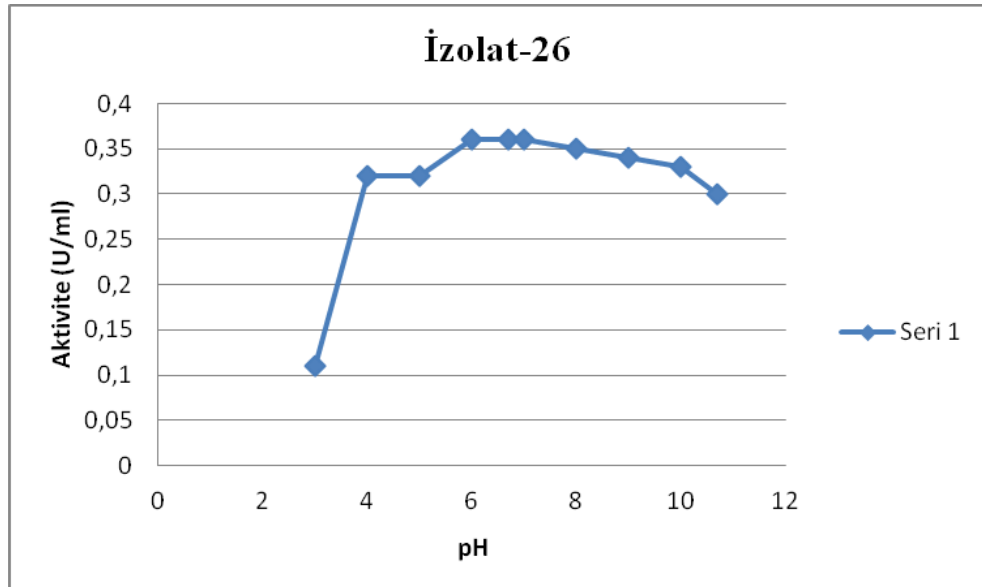
Çizelge 4.9 α -Galaktosidaz enzimi için literatür çalışmalarına ait optimum sıcaklık değerleri.

Mikroorganizma	Optimum sıcaklık (°C)
<i>Bacillus</i> sp. LX-1	40
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	90
<i>Lactobacillus fermentum</i>	45

Çizelge 4.9 (devam)

<i>Bacillus stearothermophilus</i> NUB 3621	75
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (NCIM-5146)	65
<i>Geobacillus</i> sp.	60-65
<i>Pyrococcus furiosus</i>	115
<i>Thermotoga neapolitana</i>	100-103
<i>Streptomyces griseolalbus</i> α -Gal I, α -Gal II, α -Gal III	65, 50, 55
<i>İzolat-26</i> (Bu çalışma)	65

İzolat-26 için enzim aktivitesi tayin yönteminde sitrat-fosfat (pH: 3, 4, 5), potasyum fosfat (pH: 6, 6.7, 7, 8) ve karbonat-bikarbonat (pH: 9, 10, 10.7) tamponlarının kullanılmasıyla, üretilen enzime ait optimum pH belirlenmiştir. Aktivite tayini standart olarak 65°C’de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16 Termofilik izolat-26 için, pH 3,0-10,7 aralığına ait enzim aktiviteleri.

Şekil 4.16’da yer alan grafikteki verilere göre, enzim için maksimum aktivite değerine pH 6-7’de ulaşmıştır. Genellikle bakteriyel α -galaktosidazların

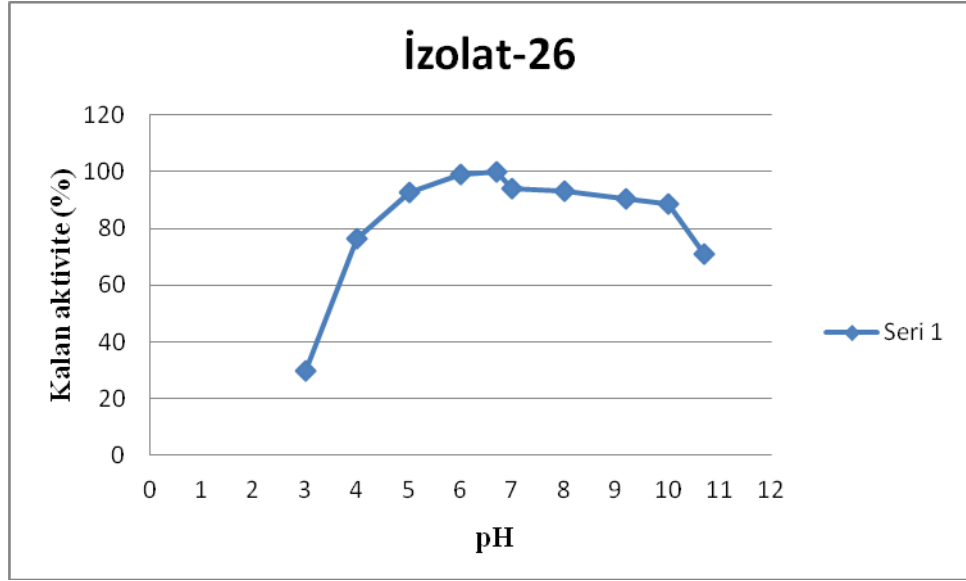
optimum pH aralığı 6,0-7,5 iken, fungus ve mayaların enzimlerinin asidik pH (3,0-5,0)' lardır (Patil et al., 2010). Çizelge 4.10'da α -galaktosidaz enzimi için literatür çalışmalarına ait optimum pH değerleri yer almaktadır.

Çizelge 4.10 α -Galaktosidaz enzimi için literatür çalışmalarına ait optimum pH değerleri.

Mikroorganizma	Optimum pH
<i>Bacillus sp. LX-1</i>	7,0
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	5,0
<i>Streptomyces griseoloalbus</i>	
α -Gal I	5,0
α -Gal II	6,5
α -Gal III	5,5
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	5,0-5,5
<i>Aspergillus niger</i>	2,5-4,5
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (NCIM-5146)	6,5-7,0
<i>Geobacillus sp.</i>	6-8
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7,0-7,5
<i>Bacillus stearothermophilus</i> AT-7	
α -Gal I	6,0
α -Gal II	7,0
<i>İzolat-26</i> (Bu çalışma)	6,0-7,0

4.4 α -Galaktosidaz Enzimi İçin Seçilen İzolat-26'da pH'nın Enzim Stabilitesine Etkisi

pH'nın enzim stabilitesine etkisini belirlemek için, süpernatant pH'sı 3,0-10,7 arası değişen tamponlarda oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra aktiviteler 65°C'de ölçülerek kalan aktivite değerleri (%) hesaplanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Termofilik izolat-26 için, pH 3-10,7 aralığının α -galaktosidaz enzim stabilitesi üzerine olan etkisi ve buna ait kalan aktivite yüzdeleri.

İzolat-26'nın α -galaktosidaz enzimi, pH 5-9 aralığında depolandığında önemli ölçüde (%90'dan fazlasını) stabilitesini ve aktivitesini korumuştur. pH 3'de yaklaşık %30'unu, pH 10,7'de ise yaklaşık %71'ini koruyabilmiştir. pH 6-6,7 arasında ise tamamen stabildir. Çizelge 4.11'de farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen α -galaktosidaz enzimlerinin pH stabilite aralıkları gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilen α -galaktosidaz enzimlerinin pH stabilite aralıkları.

Mikroorganizma	pH stabilite aralığı	Referans
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (NCIM-5146)	(3,0-10) 3,0– 12 saat (KA: % 70) 10 – 12 saat (KA: % 90)	Gote et al., 2003
<i>Streptomyces coelicolor</i>	7,0-9,5– 1 saat (KA: % 100)	Kondoh et al., 2005

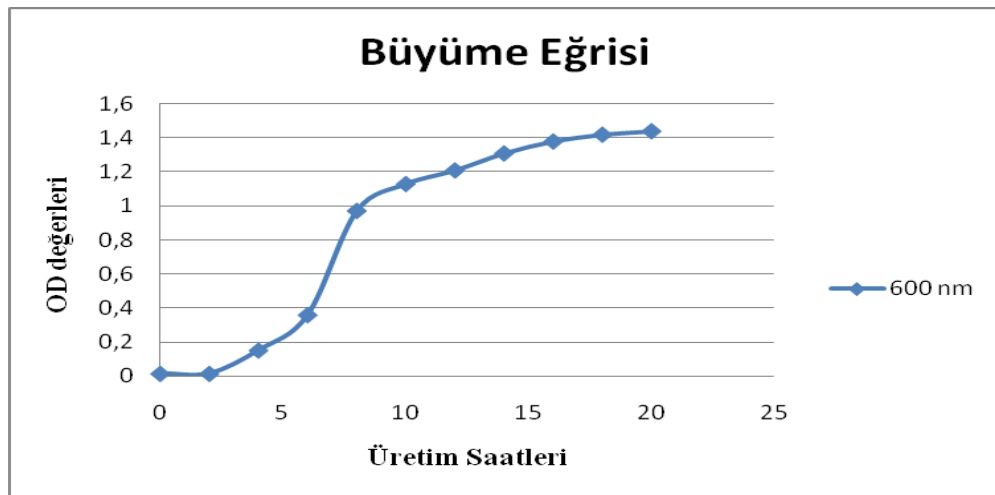
Çizelge 4.11(devam)

<i>Streptomyces griseolalbus</i>		Anisha et al., 2009
α -Gal I	4,0– 2 saat (KA: % 85), 5,0-7,0 (KA: %100), 8,0 (KA: %85)	
α -Gal II	5,0 – 2 saat (KA: % 40), 5,5-7,0 (KA: % 100), 8,0 (KA: %60)	
α -Gal III	5,5-7,0 – 2 saat (KA: % 100), 8,0 (KA: % 40)	
<i>İzolat-26</i>	(3,0-10,7) 3,0– 24 saat (KA: % 30), 5,0-9,0 (KA: % 100), 10,7 (KA: % 71)	Bu çalışma

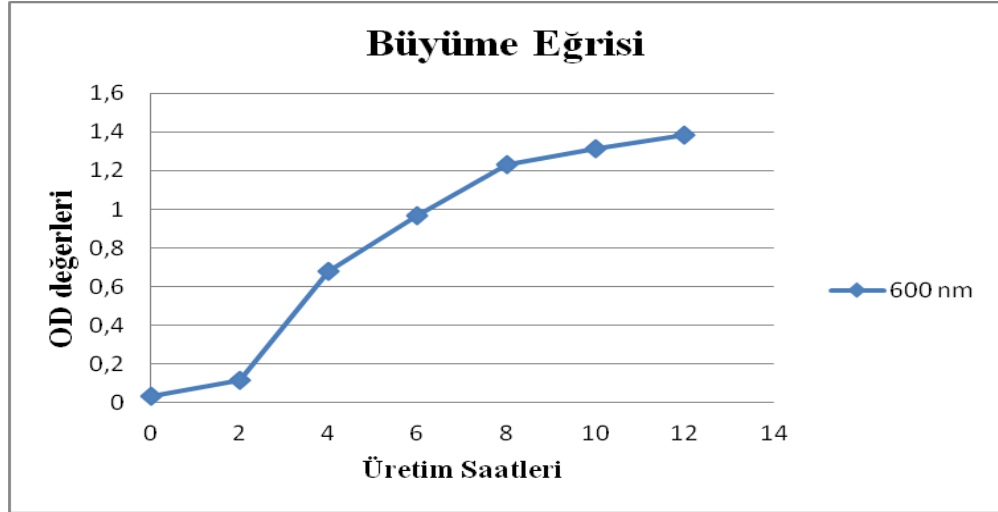
*KA: Kalan aktivite

4.5 β -Galaktosidaz ve α -Galaktosidaz Enzimleri İçin Seçilen İzolatların Aşı Ortamında Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması

α -Galaktosidaz enzimi için seçilen **izolat-26** ile β -galaktosidaz enzimi için seçilen **izolat-20**'nin LB broth içeren aşı ortamında zamana karşı absorbans değişimi izlenerek oluşturulan büyüme eğrileri (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19), üretim ortamına yapılacak inokülasyonlarda aşılama saatinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Şekillerde görüldüğü üzere her iki izolat için de 6 saatlik aşı kullanımının uygun olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.18 İzolat 26'nın LB broth aşı ortamındaki üretim saatlerine bağlı OD değerleri.



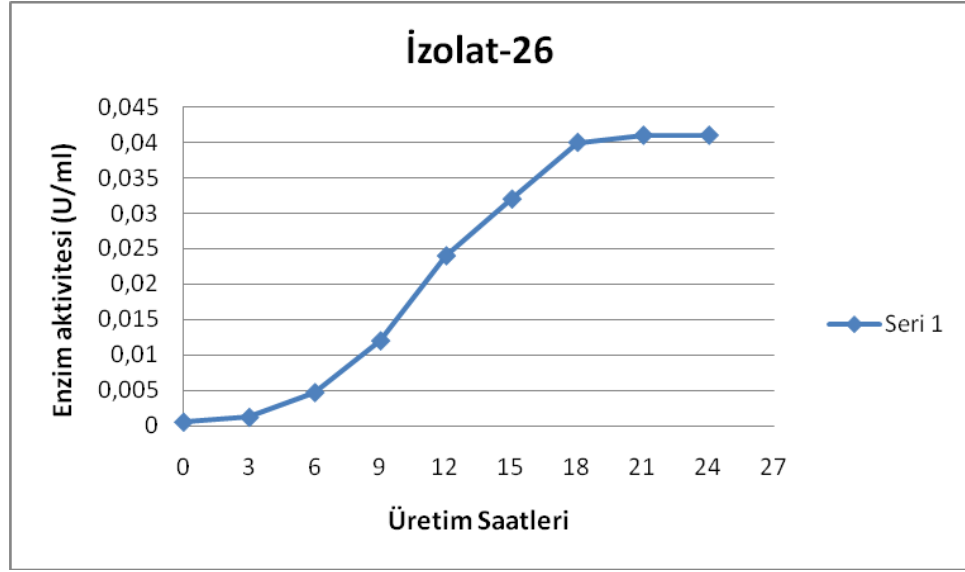
Şekil 4.19 İzolat 20'nin LB broth aşısı ortamındaki üretim saatlerine bağlı OD değerleri.

Organizmaya ait büyüme grafiği, organizmanın büyüme evreleri hakkında fikir edinmek için yapılmıştır. Aşı hazırlama, üretim esnasında fermentasyon kontrolü ve fermentasyon sonlandırma zamanı belirleme çalışmalarında ön fikir vermesi açısından kullanılmıştır.

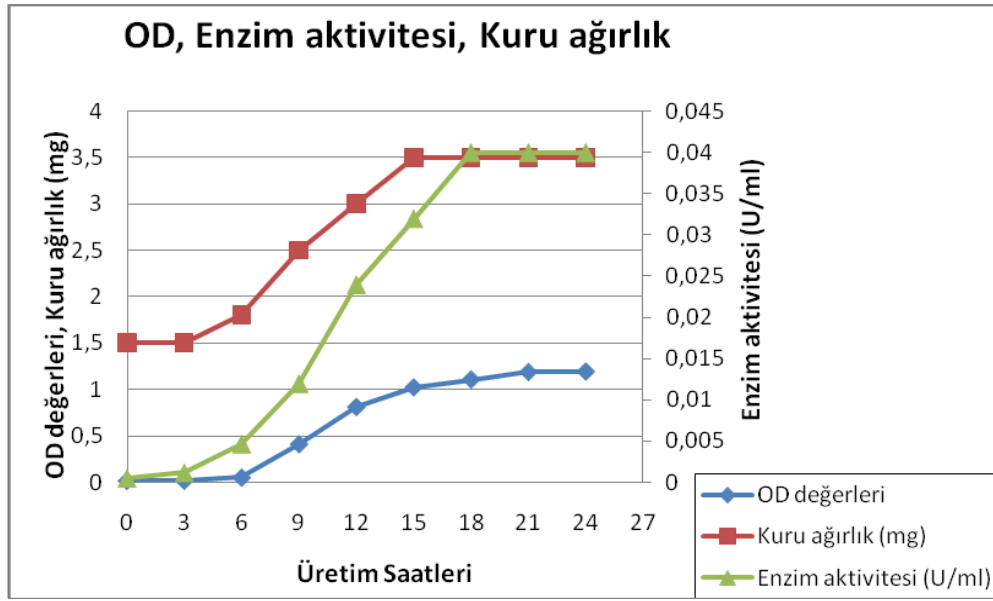
4.6 Çalkalamalı Erlenlerde Zamanın α -Galaktosidaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

İzolat-26, 250 ml'lik erlenlerdeki 50 ml'lik enzim üretim ortamında, 65°C'de, 150 rpm çalkalama hızında ve 24 saat boyunca üretilmiştir. Her üç saatte bir alınan örneklerde OD, kuru ağırlık, pH, enzim aktivite değerleri ölçülmüştür.

Şekil 4.20'deki grafikte çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen enzim aktivite değerleri gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde çalkalamalı erlenlerde **21. saatte** maksimum enzim aktivitesine **(0,041 U/ml)** ulaşıldığı görülmektedir.



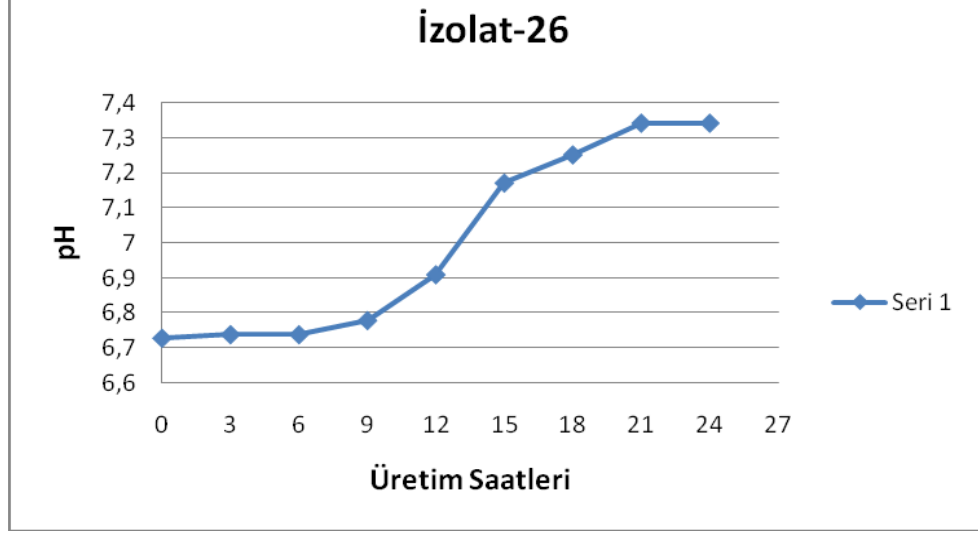
Şekil 4.20 İzolat-26'nın çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen enzim aktivitelerinin grafiksel gösterimi.



Şekil 4.21 İzolat-26'nın çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık ve enzim aktivite değerlerinin tek bir grafikte gösterimi.

Şekil 4.21'deki grafiklere göre, birbirine paralel sonuçlar elde edilmiştir. Büyüme eğrisi ve kuru ağırlık değerleri incelendiğinde yaklaşık 15. saatte durgun faz evresine ulaşıldığı görülmektedir. Belirgin ve uzun bir adaptasyon (lag) fazı görülmemektedir.

İzolat-26'nın LB broth ortamında aktifleştirilip aynı ortamda üretilmesi (aşı ortamında) adaptasyon süresini kısaltırken LB broth ortamında aktifleştirilip α -galaktosidaz enzimi üretim ortamında üretilmesi adaptasyon süresini uzatmıştır.



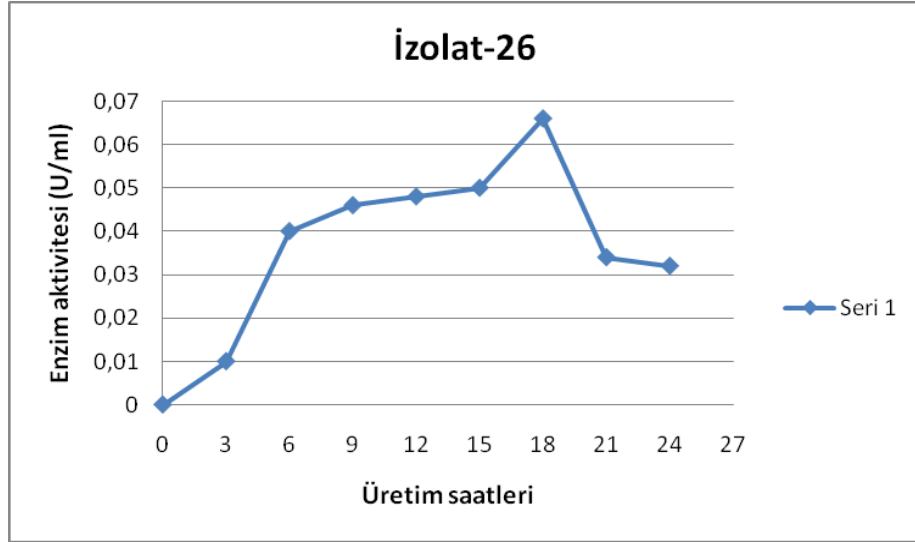
Şekil 4.22 İzolat-26'nın çalkalamalı erlenlerde üretim saatlerine göre elde edilen pH değerlerinin grafiksel gösterimi.

Üretim ortamının ilk pH'sı yaklaşık olarak 6,7'dir. Üretimin ilk saatlerindeki adaptasyon süreçlerinde bir düşüşle karşılaşılmemiştir. Üretim ortamı pH'sı 7,34'e kadar bir artış göstermiştir (Şekil 4.22).

4.7 Biyoreaktörde Zamanın α -Galaktosidaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

İzolat-26'nın beş litrelik biyoreaktörde ölçek büyütülerek dört litrede derin kültür fermentasyonu ile farklı üretim zamanlarındaki α -galaktosidaz aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda her üç saate bir biyoreaktörden örnek alınarak enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Ayrıca alınan örneklerdeki OD ve kuru ağırlık değerleri de ölçülmüştür.

Şekil 4.23'de biyoreaktördeki 24 saatlik üretim boyunca alınan örneklerdeki enzim aktivitelerinin zamana karşı değişimini gösteren grafik yer almaktadır.



Şekil 4.23 İzolat-26'nın biyoreaktördeki üretim saatlerine göre elde edilen enzim aktiviteleri.

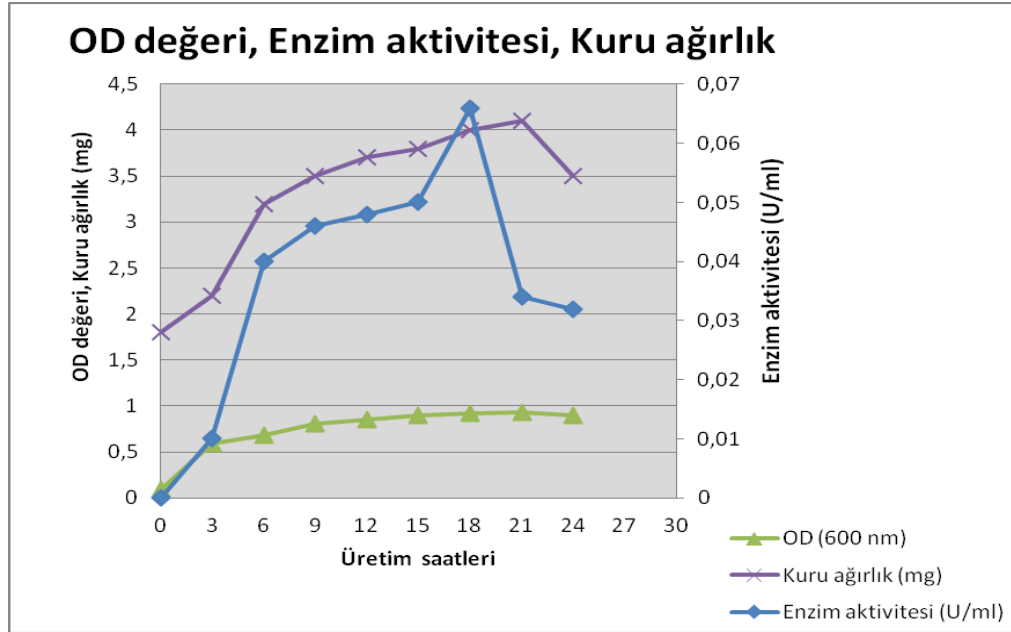
Sonuç olarak, biyoreaktörde 18. saatte en yüksek aktiviteye (**0,066 U/ml**) ulaşılmıştır. Biyoreaktör çalkalamalı erlene (**0,041 U/ml**) göre daha yüksek bir enzim aktivitesine ulaşmamıza olanak sağlamıştır. 24. saatte üretimi sonlandırmamızın nedeni ise enzim aktivitesinde bir düşüşün başlamasıdır.

İzolat-26'nın hem çalkalamalı erlende hem de biyoreaktör üretimi sırasında α -galaktosidaz enzim aktivitesinin en fazla olduğu saatler bulunarak üretimin zaman optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24, izolat-26'nın dört litrelik biyoreaktör üretimine aittir.



Şekil 4.24 Dört litrelik üretimin yapıldığı biyoreaktör ve kontrol paneli.

Şekil 4.25’de biyoreaktördeki üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık ve enzim aktivite değerleri tek bir grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.25 İzolat-26’nın biyoreaktördeki üretim saatlerine göre elde edilen OD, kuru ağırlık ve enzim aktivite değerlerinin tek bir grafikte gösterimi.

Şekil 4.21 ve 4.25’deki grafikler karşılaştırıldığında, çalkalamalı erlendeki üretime göre biyoreaktör üretiminde daha yüksek kuru ağırlık miktarı ve aktivite değeri elde edildiği görülmektedir. Bunun nedeni biyoreaktörde daha verimli bir karıştırmanın sağlanması ile oksijen transferinin daha iyi gerçekleşmesi olabilir.

Erlen ile biyoreaktör üretiminde genel olarak birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Maksimum kuru ağırlık değerleri birbirine çok yakındır. Enzim aktivitesinde de biyoreaktör üretimindeki 18. üretim saati haricinde sonuçlar birbirine yakındır.

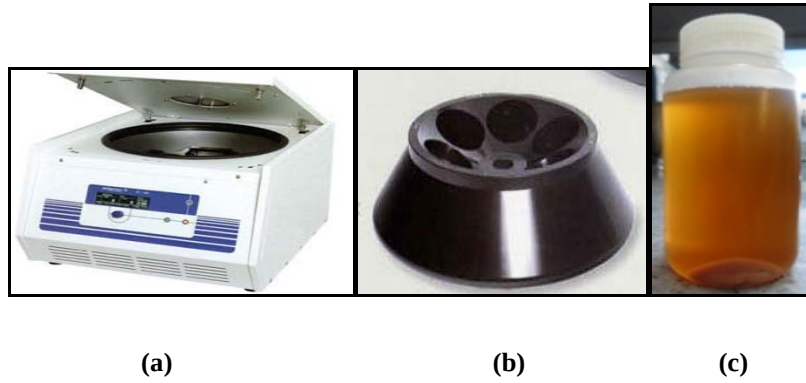
Biyoreaktör üretiminde belirgin bir durgun faz görülmemektedir. Bunun yanında belirgin bir adaptasyon (lag) fazı da görülmemektedir. Erlen üretiminde ise belirgin bir durgun faz ve adaptasyon (lag) fazı görülmektedir. Adaptasyon fazının biyoreaktörde daha kısa olması, biyoreaktörde üretim için koşulların daha iyi sağlanmış olmasından kaynaklanabilmektedir.

4.8 Üretilen α -Galaktosidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

İzolat-26'nın beş litrelik biyoreaktördeki dört litrelik enzim üretim ortamında derin kültür fermentasyonu ile üretilmesinden sonra kısmi saflaştırması amaçlanmıştır. Bunun için sırasıyla, santrifügasyon, liyofilizasyon, sonikasyon, amonyum sülfatla protein çöktürme, FPLC ile jel filtrasyon kromatografi basamakları uygulanmıştır.

4.8.1 Santrifügasyonla ayırma

İzolat-26'nın α -galaktosidaz enziminin biyoreaktör üretimi sonrası fermentasyon ortamından hücrelerin ayrılması amacıyla, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 5100 rpm'de, 15 dakika santrifüj yapılarak pelletler elde edilmiştir. Şekil 4.26'da santrifügasyon işlemi sırasında kullanılan cihaz ve gerekli parçaları görülmektedir.



Şekil 4.26 (a) Çalışmada kullanılan Sigma 4K-15 nolu santrifüj (b) 6 bölmeli rotor kısmı (c) her biri 250 ml'lik santrifüj kabı.

Santrifügasyon sonrası 250 ml'lik godelerdeki pelletler saflaştırmanın devamında kullanılmak üzere -20°C 'de depolanmıştır.

4.8.2 Liyofilizasyon ile konsantrasyon

Santrifügasyon ile elde edilmiş ve -20°C 'ye kaldırılmış pelletin miktarı az olduğundan daha konsantre halde elde edebilmek için CHRIST Freeze Dryer Model BETA 2-8 LD Plus marka liyofilizatörde yaklaşık 8 saat boyunca dondurularak kurutulmuştur.

4.8.3 Sonikasyon ile hücre parçalama

Liyofilizasyon ile konsantre edilen pelletteki hücreler uygun miktardaki potasyum fosfat tamponu (pH 6,7) ile yeniden süspanse edildikten sonra BADELIN Marka Gerate-TypVW 2070 Sonikatör ile 40 watt güçte, 10 dakika parçalanmıştır. Daha sonra enzim aktivitesi tayini için 6000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir ve saf olmayan (ham) enzimi içeren süpernatant, amonyum sülfat ile çöktürme için kullanılmıştır. Ham ekstraktın enzimin aktivitesi saflaştırma basamakları için başlangıç olarak kabul edilmiştir. Ham ekstraktın enzim aktivitesi **0,4 U/ml** olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.27'de sonikasyonda kullanılan BADELIN Marka Gerate-TypVW 2070 sonikatör gösterilmektedir.



Şekil 4.27 BADELIN Marka Gerate-TypVW 2070 sonikatör.

4.8.4 Amonyum sülfat ile protein çöktürme

Hücre parçalama basamağından gelen süpernatant sıvısı, içeriğindeki proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılmaları için kristal yapıda olan amonyum sülfat ile çöktürülmüştür (Şekil 4.28). Enzimin hangi amonyum sülfat yüzdesinde çökeceği kesin olarak bilinmediğinden %0-40, %40-50, %50-60, %60-70 aralıkları denenmiştir. 3.2.6.4 nolu bölümde verilen formüle göre çöktürme için gereken amonyum sülfat miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 4.28 Amonyum sülfat ile protein çöktürme işlemi.

Farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat miktarları ile enzim (protein) çöktürme (presipitasyon) denemeleri sırasında alınan örneklerden enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.12’de verilmektedir.

Çizelge 4.12 Termofilik izolat-26 için amonyum sülfat ile çöktürme denemelerine ait veriler.

Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu aktivite (U/ml)	İlave Edilen Amonyum Sülfat Yüzdeleri		
	% 40	% 50	% 60
AS çökeltisi ve tampon karışımı; Aktivite (U/ml)	0,44	0,33	0,032
AS çökmesinde üstte kalan sıvı; Aktivite (U/ml)	0,026	0,003	0,001

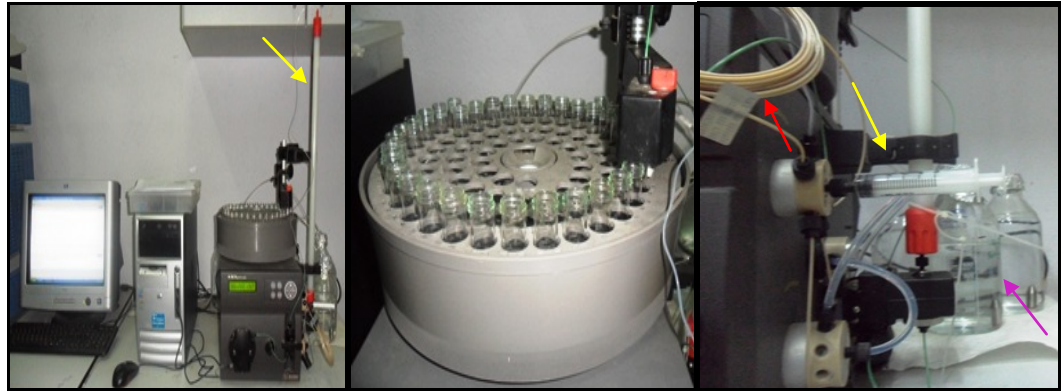
Yapılan denemeler sonucu %50’lik amonyum sülfat konsantrasyonunun çöktürme için uygun olduğu belirlenmiştir. %50’lik amonyum sülfat ile çöktürme yapıldıktan sonra 6000 rpm’de 45 dakika santrifüj ile elde edilen pellet FPLC basamağında kullanılmak üzere ayrılmıştır. Çizelge 4.13’de FPLC basamağında kullanılmak üzere %50’lik amonyum sülfat ile çöktürme sonucu hazırlanan örnekteki enzim aktivitesi gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 İzolat-26 için %50'lik amonyum sülfat konsantrasyonu ile çöktürme sonucu elde edilen enzim aktivitesi.

Amonyum sülfat (AS) ile çöktürme sonucu aktivite (U/ml)	İlave Edilen Amonyum Sülfat Yüzdesi
	%50
AS çökeltisi ve tampon karışımı; Aktivite (U/ml)	0,44
AS çökmesinde üstte kalan sıvı; Aktivite (U/ml)	0,09

4.8.5 FPLC-Jel Filtrasyon Kromatografisi

Amonyum sülfat ile çöktürme sonucunda çökeltinin en küçük hacimdeki tamponda çözülmesinden ve santrifügasyondan sonra elde edilen süpernatanttan 4 ml hacimde örnek FPLC'ye verilmiştir. Şekil 4.29'da çalışmada kullanılan FPLC düzeneği verilmiştir.



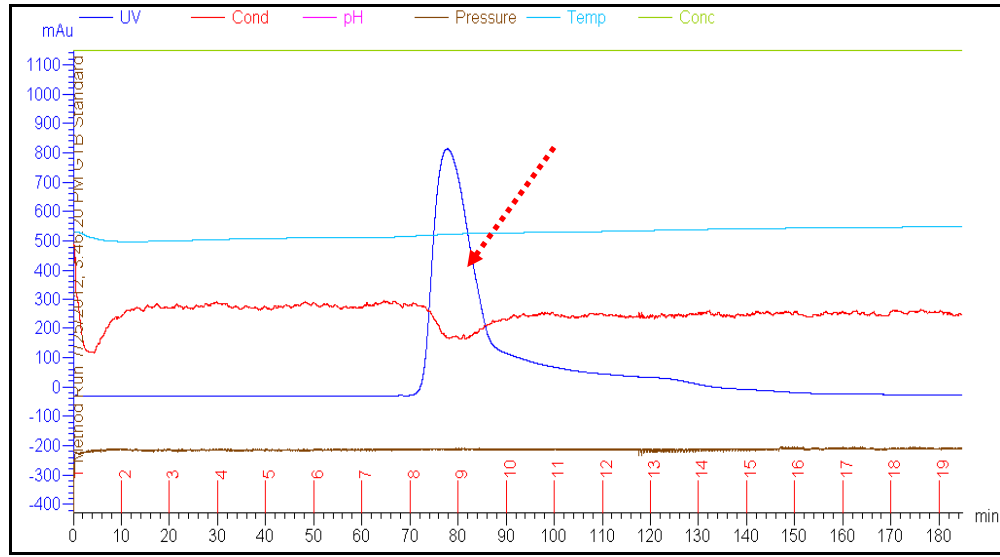
(a)

(b)

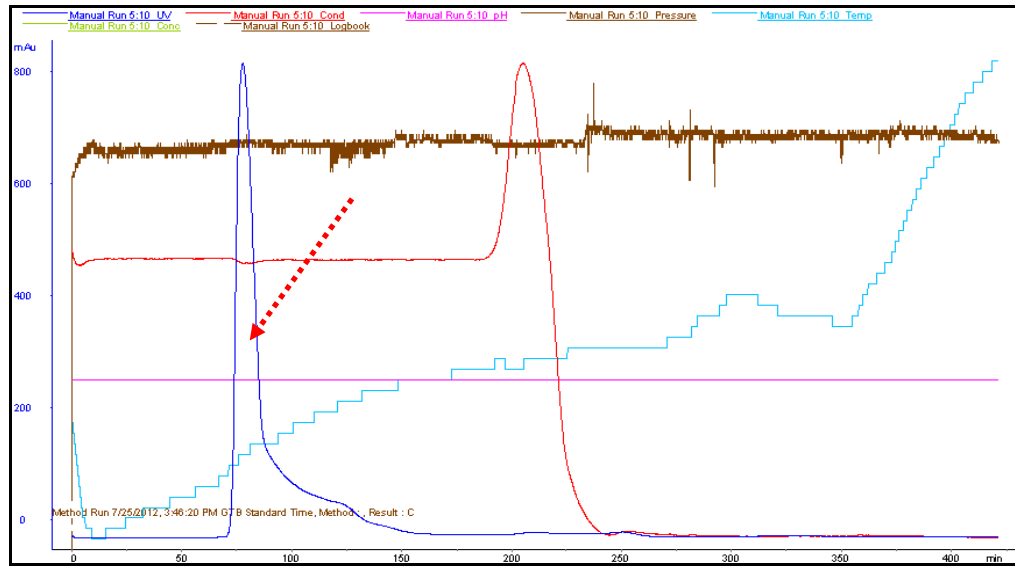
(c)

Şekil 4.29 Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC cihazı. a) HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR kolonu ile cihazın genel görünümü, b) otomatik fraksiyon toplayıcısı, c) sarı ok ile gösterilen örneğin verildiği kısım, kırmızı ok ile gösterilen örneğin tampona karışmak üzere beklediği enjeksiyon loop ve mor ok ile gösterilen kullanılan tamponlar.

Fraksiyonlar toplanırken yoğun ve yüksek absorbans değerinin görüldüğü piklerin elde edildiği fraksiyonların sarı renkli olduğu gözlemlenmiştir. Kromatografi sonucu software program ile takip edilerek, bu piklerin dijital çıktısı alınmıştır (Şekil 4.30).



(a)

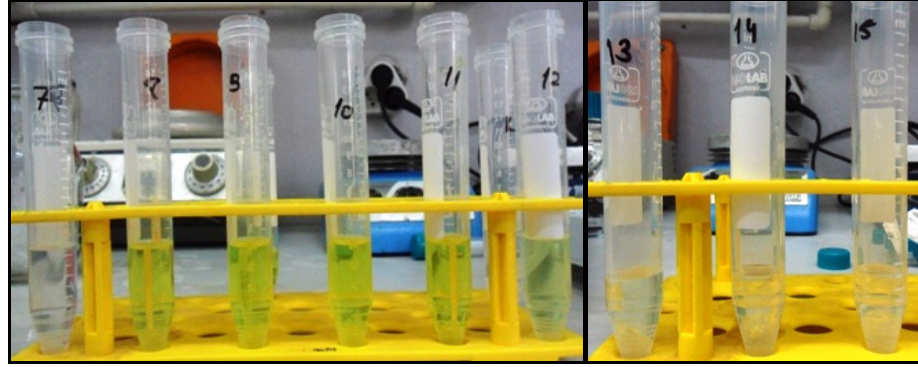


(b)

Şekil 4.30 Termofilik İzolat-26'ya ait FPLC sonunda elde edilen grafikler. (a) ve (b) kırmızı ok ile gösterilen aktif fraksiyon pikleri.

Grafikte ok ile işaret edilmiş, enzim aktivitesinin görüldüğü pikler 80-120. dakikalar arasında ortaya çıkmıştır. Termofilik izolata ait FPLC jel filtrasyon grafiği üzerindeki bu piklerden yola çıkarak; 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 nolu fraksiyonlarda ayrı ayrı enzim aktivitesi tayini yapılmıştır (Şekil 4.31) ve sonuç

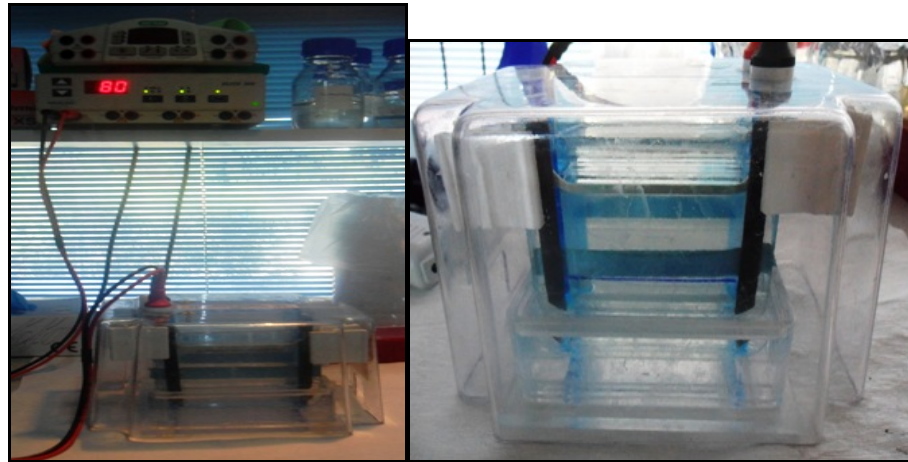
olarak 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 nolu fraksiyonlarda sırasıyla 8’de 0,27 U/ml, 9’da 0,32 U/ml, 10’da 0,56 U/ml, 11’de 0,62 U/ml, 12’de 0,033 U/ml, 13’de 0,007 U/ml ve 14’te 0,003 U/ml aktivite tespit edilmiştir. En yüksek aktivite 11’nolu fraksiyonda 0,62 U/ml olarak bulunmuştur.



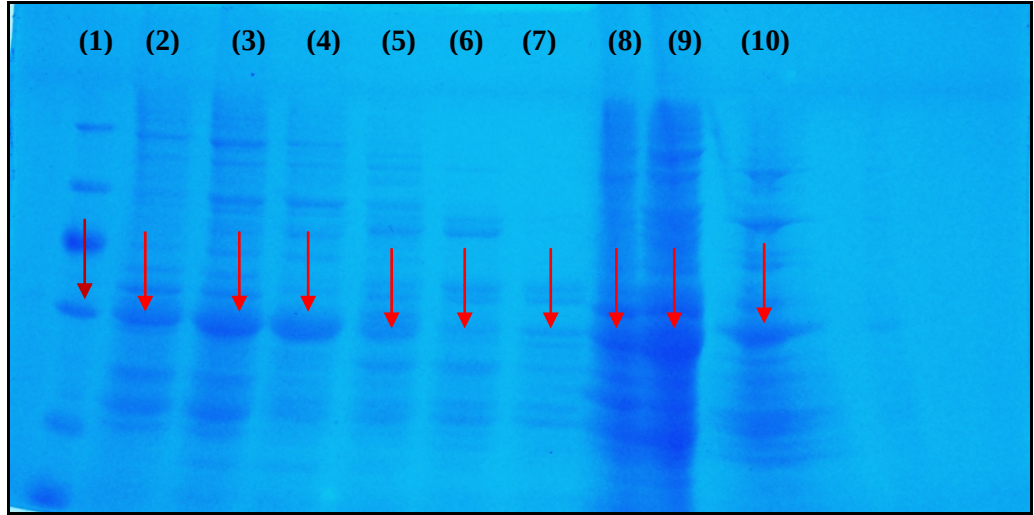
Şekil 4.31 Termofilik İzolat-26’ya ait FPLC sonrası toplanan, pikin görüldüğü fraksiyonların enzim aktivitesi tayini yapıldıktan sonraki görünüşleri.

4.8.6 SDS-PAGE

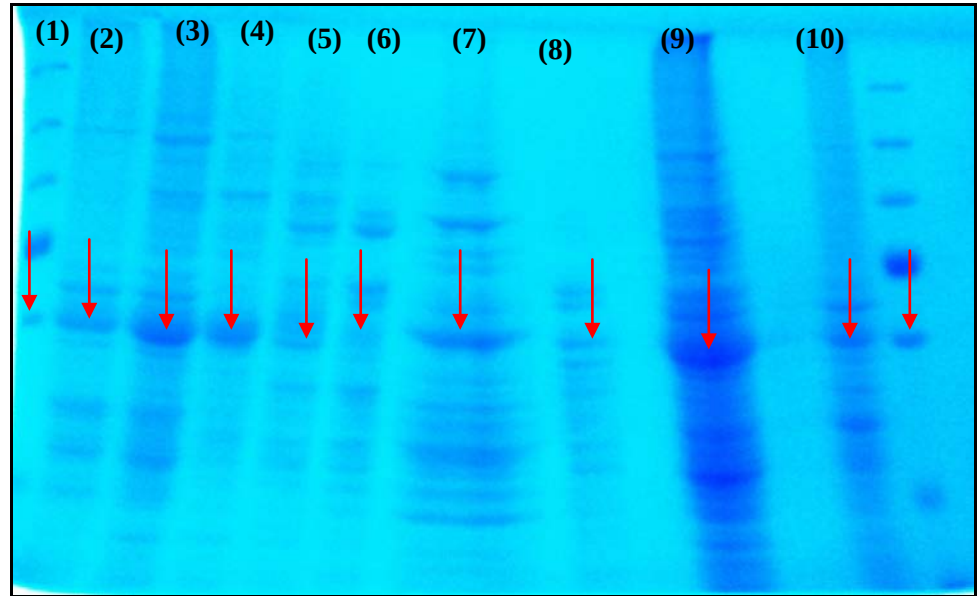
Kısmi saflaştırmanın her basamağından alınan örnekler SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenerek enzimin moleküler ağırlığı (kDa) ve gerçekleştirilen ayırımın etkinliği ortaya konmuştur. Bu amaçla çeşitli denemelerin ardından %10’luk jelde karar kılınmıştır. Şekil 4.32’de yüklemenin ardından elektrik kaynağına bağlanarak yürütülen örnekler görülmektedir.



Şekil 4.32 SDS-PAGE sisteminin görüntüleri.



(a)

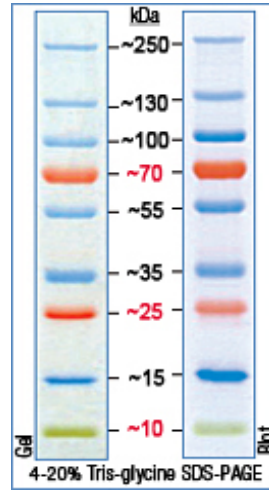


(b)

Şekil 4.33 Termofilik İzolat-26'ya ait SDS-PAGE görüntüsü. **(a)** %6'luk jelde yürütme sonucu elde edilen SDS-PAGE görüntüsü; **(1)** enzim markeri, **(2)** 8 nolu, **(3)** 9 nolu, **(4)** 10 nolu, **(5)** 11 nolu, **(6)** 12 nolu, **(7)** 13 nolu FPLC sonrası elde edilen fraksiyonları göstermektedir. **(8)** ham enzim ekstraktına, **(9)** amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilip FPLC'ye yüklenen pellete, **(10)** ise amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilen süpernatanta ait SDS-PAGE görüntüleridir. **(b)** %10'luk jelde yürütme sonucu elde edilen SDS-PAGE görüntüsü; **(1)** enzim markeri, **(2)** 8 nolu, **(3)** 9 nolu, **(4)** 10 nolu, **(5)** 11 nolu, **(6)** 12 nolu, **(8)** 13 nolu FPLC sonrası elde edilen fraksiyonları göstermektedir. **(7)** amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilen süpernatanta **(9)** ham enzim ekstraktına, **(10)** ise amonyum sülfat ile çöktürme sonucu elde edilip FPLC'ye yüklenen pellete ait SDS-PAGE görüntüleridir. **(a)** ve **(b)**' de ok ile gösterilen yerlerde α -galaktosidaz enzimine ait 55 kDa'luk bantlar gösterilmektedir.

Termofilik izolat-26 için, en sağda ve solda yer alan markere (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa) göre enzimin moleküler ağırlığı **55 kDa** olarak belirlenmiştir. Enzim, markerın 5. bandına karşılık gelmektedir (Şekil 4.33).

Moleküler ağırlıkların tespitinde kullanılan markerın içerdiği her biri farklı protein olan bantlar ve %4-20'lik Tris-Glisin jelde bu bantların moleküler ağırlıkları (kDa) Şekil 4.34'de verilmektedir.



Şekil 4.34 SDS-PAGE çalışmasında kullanılan PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder markera ait bantlar ve moleküler ağırlıkları.

Bakteriyel α -galaktosidazlar kompleks yapıdadırlar ve moleküler ağırlıkları **45 kDa** ile **400 kDa** arasında değişmektedir (Ishiguro et al., 2001). Fungal α -galaktosidazların çoğu monomerik yapıdadır ve moleküler ağırlıkları ortalama olarak **50 kDa** civarındadır (Puchart et al., 2001). Bunun yanında birçok fungus ve mayada multimerik yapıda α -galaktosidazlar olduğu tespit edilmiştir (Halstead et al., 2000).

4.9 Üretilen α -Galaktosidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Sonucu Elde Edilen Bulgular

Termofilik İzolat-26 için, her bir saflaştırma basamağı ardından enzim aktivitesi (U/ml), total aktivite (U), protein miktarı (mg/ml), spesifik aktivite (U/mg), % saflaştırma verimi hesaplanmıştır. Çizelge 4.14'de bu veriler yer almaktadır.

Çizelge 4.14 Termofilik izolat-26' ya ait kısmi saflaştırma verileri.

Saflaştırma Basamakları	Total aktivite (U)	Total protein ¹ (mg)	Spesifik aktivite ² (U/mg)	Verim ³ (%)	Saflaştırma katsayısı ⁴
Fermentasyon Sıvısı (Hücre Parçalama Sonrası Ham Ekstrakt)	6	7,2	0,83	100	1
%0-50 Amonyum Sülfat ile Çöktürme Sonrası	3,96	1,44	2,75	66	3,3
HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR (Jel Filtrasyon)	2,48	0,52	4,77	41	5,7

1 Bradford yöntemi kullanılarak çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

2 Spesifik Aktivite= Toplam aktivite / Toplam protein

3 Verim= (Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite / Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

4 Saflaştırma Katsayısı= Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite / Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

Termofilik izolat-26 için 4000 ml'lik gerçekleştirilen üretimin 20 ml'si ile yapılan saflaştırmada %41 verimle iki basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi saflaştırmanın ilerleyen basamaklarında enzim aktivitesi, stabilitenin ve diğer değişkenlerin de etkisi ile giderek düşerken, konsantre edilen enzim için spesifik aktivite giderek artmıştır. Çizelge 4.15, 4.16 ve 4.17'de literatür bilgilerine dayanarak hazırlanmış α -galaktosidaz enziminin saflaştırma verileri gösterilmektedir.

Çizelge 4.15 *Sulfolobus solfataricus*'un α -galaktosidaz enzimine ait saflaştırma verileri (Anisha et al., 2009).

Saflaştırma Basamağı	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham enzim ekstraktı	1114,7	1431,5	0,78	100	1
Ultrafiltrasyon	1090,4	356,1	3,1	97,8	3,9
Phenyl Sepharose CL 4B Sephadex G 100	860,5	20	43	77,2	55,1
α -Gal I	353,7	2	176,9	31,7	226,8
α -Gal II	184,8	1,1	168	16,6	215,4
α -Gal III	197,8	3,2	61,8	17,7	79,2

Çizelge 4.16 *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146)'un α -galaktosidaz enzimine ait saflaştırma verileri (Gote et al., 2006).

Saflaştırma Basamağı	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham enzim ekstraktı	1634	1582	1.03	100	0
Ultrafiltrasyon	1550	266.3	5.8	94.8	5.6
Alkol presipitasyonu	1085	57.25	18.9	66.5	18.4
Phenyl Sepharose CL 4B	721	1.8	400	44.1	388.8

Çizelge 4.17 *Bacillus stearothermophilus*'un α -galaktosidaz enzimine ait saflaştırma verileri (Talbot et al.,1990).

Saflaştırma Basamağı	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham enzim ekstraktı	52	1,38	0,04	100	1
%20-50 amonyum sülfat presipitasyonu	51,7	162	0,32	98	8,5
Sephacryl S-200	47	135	0,35	90	9,4
Mono Q (Anion exchange)	47	25	1,9	90	51
Mono P (Chromatofocusing)	30	7	4,4	58	117
HIC (phenyl-Superoose)	10,6	0,08	130	20	3,47
Superose 12 (Gel filtration)	5,9	0,037	160	12	4,275

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada ülkemiz jeotermal su kaynaklarından yapılan izolasyon çalışmaları sonunda oluşturulan “**Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu**”nda yer alan 53 adet endospor içeren termofilik bakteri izolatında, α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzim aktiviteleri, temel karbon kaynağı olarak sırasıyla galaktoz ve laktoz içeren sıvı kültür ortamlarında taranmıştır. İzole edilmiş termofilik bakteriler yeni gen kaynakları olduklarından bu durum çalışmamıza özgünlük kazandırmaktadır. Ayrıca bu kadar çok sayıda endospor içeren termofilik bakteri izolatının α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzim aktiviteleri bakımından tarandığı bir literatür çalışması bulunmamaktadır.

Çalışmamızda öncelikle termofilik izolatlarda α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzim aktivitelerinin taranmasının ardından, aktivite gösteren izolatlarda, enzimlerin sıcaklık stabiliteleri belirlenmiştir. Bu amaçla α -galaktosidaz enzim aktivitesine sahip izolatlar (izolat-7, 12, 17, 20, 26, 35) ile β -galaktosidaz enzim aktivitesine sahip izolatlar (izolat-20, 25, 30) sıcaklık stabilitesi bakımından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak α -galaktosidaz enzimi bakımından en iyi stabilize gösterenin izolat-26, β -galaktosidaz enzimi bakımından en iyi stabilizeye gösterenin ise izolat-20 olduğu belirlenmiştir.

α -Galaktosidaz enzimi için en yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesine sahip izolatın, **izolat-26** olduğu kanıtlanmıştır. Sıcaklık stabilitesi için 65°C’de beş saat bekletmenin sonucunda, başlangıç aktivitesinin tamamını koruduğu tespit edilmiştir.

α -Galaktosidaz enzimi için seçilen **izolat-26**’nın hem küçük ölçekte hem de biyoreaktör üretimi sırasında α -galaktosidaz aktivitesinin en fazla olduğu saatler bulunarak üretimin zaman optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

α -Galaktosidaz aktivitesinin en fazla olduğu üretim zamanı bulunduktan sonra enzimin kısmi saflaştırılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla, laboratuvar ölçeğinde biyoproses ekipmanları ile santrifügasyon, liyofilizasyon, sonikasyon, protein presipitasyonu, FPLC jel filtrasyon kromatografi yapılmıştır. Kullanılan tüm ekipmanlar ileri teknolojiye sahip olup, yapılan kısmi saflaştırma endüstriyel bir enzim için AR-GE çalışması niteliğindedir.

Medikal alanda kullanılan enzimler günümüzde çoğu hastalığın çaresi olabilmektedir. Bu durum çoğu hasta ve bilim adamına umut teşkil etmektedir. Bu yüzden araştırmacılar ilgilerini terapötik enzimlerin bulunmasına ve geliştirilmesine yöneltmiştir. Terapötik enzimlerin üretim prosesleri, diğer endüstrilere oranla daha yüksek saflık gerektirdiğinden bu enzimler ürün başına yüksek etiket fiyatlarına sahiptirler.

Medikal amaçlı kullanılacak α -galaktosidaz enziminde saflaştırmanın önemini benimseyerek çalışmamızda kısmi saflaştırmanın her basamağında enzime ait aktivite (U/ml), total aktivite (U), protein içeriği (mg/ml), spesifik aktivite (U/mg) tayin edilmiş olup, saflaştırmanın verimi ortaya konmuştur. Termofilik **izolat-26**'dan üretilen enzim, iki basamaklı saflaştırmada **%41** verimle saflaştırılmıştır.

Enzim stabilitesinin enzimin raf ömrüne etki etmesi ve depolama sırasında karşılaşılan büyük mali giderler, araştırmacıları olumsuz koşullarda bile aktivitelerini koruyabilen stabil enzimleri bulmaya yöneltmiştir. Bu yüzden sıcaklık stabilitesinin yanında, seçilen izolat-26 pH stabilitesi bakımından da incelenmiştir. Sonuç olarak; enzimin **3,0-10,7** pH aralığında 24 saat sonunda; pH 5,0-9,0 arasında aktivitesinin %90'ını ve fazlasını koruduğu, pH 3,0'de ise yaklaşık %70'ini kaybettiği tespit edilmiştir. Ayrıca pH **6-6,7**'de optimum olarak depolanabileceği kanıtlanmıştır.

α -Galaktosidaz enzimi için amaçlanan kısmi karakterizasyonda sıcaklık ve pH stabilitelerinin yanında, geniş bir sıcaklık (30-90°C) ve pH (3,0-10,7) aralığında üretilen enzimlerin maksimum aktivitelerinin gözlemlendiği optimum sıcaklık değerleri ile pH değerleri açığa çıkarılmıştır. α -galaktosidaz enzimi için optimum sıcaklığın **65°C**, optimum pH'nın ise **6,0-7,0** olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar literatürlerdeki değerlerle paralellik göstermektedir.

Son olarak enzimin her bir saflaştırma basamağından alınan örneklerle SDS-PAGE'de moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir. Bu sayede çalışmada hedeflendiği gibi özgün gen kaynaklarımız ile üretilen α -galaktosidaz enzimine ait özellikler kısmen ortaya konmuştur.

Çalışma kapsamında incelenen literatürler ve çeşitli denemeler medikal bir enzim için önemli bir bilgi birikimi oluşturmuştur. Araştırmada elde edilen bulgular doğrultusunda; aşağıda belirtilen konularda yapılacak çalışmaların önemli sonuçlar sağlayacağı düşünülmektedir.

- o Çalışmamızda α -galaktosidaz enzimi üretiminin maksimum olduğu belirlenen izolatta ortam seçimi ve enzim üretim zamanının belirlenmesi ile küçük ve büyük laboratuvar ölçeğinde optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları kapsamında maksimum verimi sağlayacak yeni karbon ve azot kaynaklarının bulunmasının ve oranlarının belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.
- o Sınırlı süre ve mali kısıtlar nedeniyle kısmi olarak gerçekleştirilen karakterizasyonun, terapötik kullanım potansiyeli olan bir enzim için önemi büyüktür. Enzim kinetiğinin çalışılması, çeşitli inhibitör ve aktivatör bileşiklerin enzim aktivitesine etkisinin tespiti gerekmektedir. Bu noktada, mikrobiyal enzimlerin memeli enzimlerine en yakın formlarının tespiti önemlidir.
- o α -Galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerin bakteriler, funguslar ve mayalardan elde edildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bu veri ışığında, mikrobiyal kaynaklı α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin farklı formları için yine Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu'nda yer alan mikroorganizmalarda bu enzimlerin aktiviteleri taranabilir.
- o Endospor içeren termofilik izolatların *Geobacillus* genusuna ait olduğu düşünülmektedir. Bunun doğrulanması için kullanılan izolatın moleküler olarak tanılanması gerekmektedir.
- o Gelecekte yapılması muhtemel çalışmalarda termofilik izolatlara ait α -galaktosidaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin saflaştırılarak immobilize edilmesi, enzim termostabilitesinin geliştirilmesi açısından faydalı olabilecektir.
- o β -Galaktosidaz enzimi gıda sektörü başta olmak üzere biyoremediasyon, biyosensör tasarımı, hastalıkların teşhisi ve tedavisi gibi pek çok farklı alanda kullanılabilmektedir (Asraf ve Gunasekaran, 2010). Bu sebeple ısı

kararlılığı yüksek β -galaktosidaz eldesi için yeni mikrobiyal kaynakların belirlenmesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda izolat-20 ve izolat-30'un istenen bir özellik olan termostabiliteye sahip β -galaktosidaz enzimini üretebilme yeteneğinde olduğu saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda burdan yola çıkarak, bu iki termofilik izolatın β -galaktosidaz enzimi için de kısmi karakterizasyonunun ve saflaştırmasının yapılması faydalı olacaktır.

- o α -Galaktosidaz enzim üretimini 5 litrelik biyoreaktörde 4 litrelik çalışma hacminde gerçekleştirmiş olmamıza rağmen ölçek büyütülmeye gidilmesi, 3-5 litrelik mini reaktörlerden aşılılarak 30-50 litrelik reaktörlerde pilot ölçekli üretimi ve optimizasyon çalışmalarının yapılması bir mühendisin amaçlarından olmalıdır.
- o Kısmi karakterizasyonunu yaptığımız bu enzime ait genin ortaya çıkarılmasının ardından özellikle büyük ölçekte ticari üretimlerde verim artışı sağlamak amacıyla enziminin rekombinant formunun oluşturulması da oldukça önemli bir konudur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, M.W. and Kelly, R.M.,** 1998, Finding and using hyperthermophilic enzymes, Trends Biotechnol. 16(8):329-332.
- Ahmad, S., Scopes, R.K., Rees, G.N. and Patel, B.K.C.,** 2000, *Saccharococcus caldoxylosilyticus* sp. nov., an obligately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50:517–523.
- Anisha, G. S.,** 2008, α -Galactosidase from *Streptomyces griseolalbus*: An enzyme with versatile applications, Doctor of Philosophy in Biotechnology, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, India, 218p.
- Asenjo, J.A. and Merchuk, J.C.,** 1995, Bioreactor System Desing, Marcel Dekker, New York, USA., 207:589-597.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D.,** 1991, Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* as revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Lett. Appl. Microbiol., 13:202.
- Asraf, S. S. and Gunasekaran, P.,** 2010, Current trends of β -galactosidase research and application, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 880-890p.
- Atlas, R.M., Parks, L.C. and Brown, A.E.,** 1995, Laboratory Manual of Experimental Microbiology, Mosby-Year Book, St. Louis, Missiori, 565p.
- Banat, I. M., Marchant, R. and Rahman, T. J.,** 2004, *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 2197-2201.
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. and Markl, H.,** 1997, Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48:184-190.
- Bollag, D.M., Edelstein, J. and Rozycki, M.D.,** 1996, Protein Methods, Villey-Liss Press, 68:107-128.
- Bradford, M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding, Anal. Biochem., 72:248-54.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burkhard-Kresse, G.**, 1995, Analytical Uses of Enzymes in Biotechnology, A Multi-Volume Treatise, VCH, Weinheim., 9:138-163.
- Bustard, M.T., Whiting, S., Cowan, D.A. and Wright, P.C.**, 2002, Biodegradation of high-concentration isopropanol by a solvent-tolerant thermophile, *Bacillus pallidus*., *Extremophiles*, 6(4):319–323.
- Chakraborti, S., Sani, R. K., Banerjee, U. C. and Sobti, R. C.**, 2000, Purification and characterization of a novel β -galactosidase from *Bacillus* sp MTCC 3088, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24:58-63.
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F. and Zhang, H.**, 2008, Production, purification, and characterization of a potential thermostable β -galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*, *J. Dairy Sci.*, 91(5):1751-1758.
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. P. and Zhang, H.**, 2008, Immobilization of recombinant thermostable β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk, *J. Dairy Sci.*, 92:491–498.
- Coolbear, T., Daniel, R. M. and Morgan, H. W.**, 1992, The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance, *Advance in Biochemical Engineering*, 45:58-90.
- Danson, M.J. and Hough, D.W.**, 1998, Structure, function and stability of enzymes from the Archaea, *Trends Microbiol.*, 6:307-314.
- Dilgimen, A.S.**, 2006, Enzim Saflaştırmada Elektroforetik Analizler, Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, 5:75-92.
- Dunbar, B.S.**, 1990, Two-Dimensional Electrophoresis And Immunological Techniques, 2:165-195.
- Farrow, J.A.E., Ash, C., Wallbanks, S. and Collins, M.D.**, 1992, Phylogenetic analysis of the genera *Planococcus*, *Marinococcus* and *Sporosarcina* and their relationships to members of the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 93:167.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Filho, M., Pessela, B., C., Mateo, C., Carrascosa, A., V., Fernandez-Lafuente R. and Guisan, J., M.,** 2008, Immobilization-stabilization of an α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy, *Enzyme Microb. Technol.*, 42(3):265-271.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.N.,** 1973, The Genus *Bacillus*. Agricultural Reserch Service, United States Department of Agriculture, Washington, D.C., 178-207p.
- Gote, M. M., Umalkar H., Khan M.I. and Khire J. M.,** 2003, Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk, *Process Biochem.*, 39:1723-1729.
- Gote, M.M., Khan, M.I., Gokhale, D.V., Bastawde, K.B. and Khire, J.M.,** 2006, Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146), *Process Biochemistry*, 41:1311–1317.
- Gray, D.R.,** 2000, Bioreactor operations-preparation, sterilization, charging, culture initiation and harvesting, in *Encyclopedia fo cell technology*, John Wiley & Sons, New York, NY., 138-174p.
- Grogan, D. W.,** 1991, Evidence that β -galactosidase of *Sulfolobus solfataricus* is only one of several activities of a thermostable β -D-glycosidase, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6):1644-1649.
- Güven, G. R.,** 2011, Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(1):1-10.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K.,** 2003, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology*, 89:17–34.
- Heftmann, E.,** 2004, *Chromatography: Fundamentals and Techniques*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 95-131p.
- Hough, W.D. and Danson, M.J.,** 1999, Extremozymes, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3:39-46.
- Jaenicke, R.,** 2000, Stability and stabilization of globular proteins in solution, *Journal of Biotechnology*, 79:193-203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jaenicke, R. and Böhm, G.,** 1998, The stability of proteins in extreme environments, *Current Opinion in Structural Biology*, 8:738-748.
- Kara, F.,** 2004, Release and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum*, Master Thesis, Biotechnology, Middle East Technical University, 122p (unpublished).
- Kim, C. S., Ji, E. S. and Oh, D. K.,** 2004, Characterization of a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*, *Journal of Applied Microbiology*, 97:1006-1014.
- Konsoula, Z., and Liakopoulou-Kyriakides, M.,** 2007, Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates, *Bioresource Technology*, 98:150–157.
- Kopetzki, E.,** 1994, Enzymes in diagnostics: Achievements and possibilities of recombinant DNA technology, *Clin. Chem.*, 40:688–704.
- Kumar, S. and Nussinov, R.,** 2001, “How do thermophilic proteins deal with heat?”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1216-1233.
- Kumar, S., Tsai, C.H. and Nussinov, R.,** 2000, Factor enhancing protein thermostability, *Protein Engineering*, 13(3):179-181.
- Lee, J., Park, I. and Cho, J.,** 2012, Production and partial characterization of α -galactosidase activity from an antarctic bacterial isolate, *Bacillus* sp. LX-1, *African Journal of Biotechnology*, 11(60):12396-12405.
- Manachini, P. L., Mora, D., Nicastro, G., Parini, C., Sackebrandt, E., Pukall, R. and Fortina, M.G.,** 2000, *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev., *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, 50:1331-1337.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. and Stackebrandt, E.,** 2001, A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents, *Systematic and Applied Microbiology*, 24:572-587.
- McMullan, G., Christie, J.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Ternan, N.G. and Marchant, R.,** 2004, Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*, *Biochemical Society Transactions*, 32(2):214-217.
- Miller, J. H.,** 1972, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 466p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nazina, T. N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. and Ivanov, M.V.,** 2001, Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51:433-446.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. and Antranikian, G.,** 1999, Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:711-29.
- Ogawa, J. and Shimizu, S.,** 2002, Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan, Current Opinion in Biotechnology, 13(4):367-375.
- Öztürk, B.,** 2001, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic and hydrophilic supports, M.S. Thesis, Izmir Institute of Technology, Biotech. Depart., 19p (unpublished).
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R. and Larroche, C.,** 2006, Enzyme Technology, Springer Science, Business Media, Inc. and Asiatech Publisher, Inc., NY, USA., 742p.
- Panesar, P. J., Kumari, S. and Panesar, R.,** 2010, Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries , SAGE-Hindawi Access to Research, Enzyme Research,16p.
- Panke, S. and Wubbolts, M.G.,** 2002, Enzyme technology and bioprocessengineering, Curr. Opin. Biotechnol., 13:111-116.
- Prashanth, S. J. and Mulimani, V. H.,** 2005, Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate, Process Biochemistry, 40:1199–1205.
- Price-Carter M.** 2000, “ β -Galactosidase Activity Assay”, <http://rothlab.ucdavis.edu/protocols/beta-galactosidase-3.html> (Erişim tarihi: 14 Ekim 2010)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rainey, F.A. and Stackebrandt, E.,** 1993, Phylogenetic evidence for the relationship of *Saccharococcus thermophilus* to *Bacillus thermoglucosidasius*, *Bacillus kaustophilus* and *Bacillus stearothermophilus*, Syst. Appl. Microbiol., 16:224-226.
- Riet, K.V. and Tramper, J.,** 1991, Basic Bioreactor Desing, Marcel Dekker, New York, USA., 3-27p.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Peliti, L. and Engel, P.C.,** 1998, Protein thermostability in extremophiles, Biochimie., 80:933-941.
- Sheehan, D.,** 2003, Fast Protein Liquid Chromatography, ISBN:10.1385/1-59259-655 X:253, 244- 253p.
- Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E.,** 2006, The Genus *Bacillus*- Nonmedical, The Prokaryotes, Biomedical and Life Sciences, 4:530-562.
- Smales, C.M. and James, D.C.,** 2005, Therapeutic Proteins: Methods and Protocols, Humana Press, New Jersey, USA., 107-120p.
- Soliman, N. A.,** 2008, Coproduction of thermostable amylase and β -galactosidase enzymes by *Geobacillus stearothermophilus* SAB-40: Application of Plackett-Burman design to evaluate culture requirements affecting enzyme production, J. Microbiol. Biotechnol., 18(4):695–703.
- Song, J., Abe, K., Imanaka, H., Imamura, K., Minoda, M., Yamaguchi, S., and Nakanishi, K.,** 2011, Causes of the production of multiple forms of β -galactosidase by *Bacillus circulans*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 75(2):268-278.
- Talbot, G. and Sygusch, J.,** 1990, Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, Applied and Environmental Microbiology, 56(11):3505-3510.
- Tari, C., Üstok I. F. and Harsa, Ş.,** 2010, Production of food grade β -galactosidase from artisanal yogurt strains, Food Biotechnology, 24:78–94.
- Temizkan, G. ve Arda, N.,** 2008, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma Uygulama Merkezi, 67-89s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Üstok, I. F.**, 2007, Production of β -galactosidase using lactic acid bacteria and optimisation of fermentation parameters, Master Thesis, Biotechnology, Izmir Institute of Technology, 120p (unpublished).
- Vieille, C. and Zeikus, J.G.**, 1996, Thermozyms; identifying molecular determinants of protein structural and functional stability, *Tibtech.*, 14:183-190.
- Vilas, A.**, 2006, Interdisciplinary applied enzyme and microbiol technology and applications, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1):1-3.
- Vogt, G., Woell, S. and Argos, P.**, 1997, Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs, *J. Mol. Biol.*, 269:631-643.
- Walsh, G.**, 2001, *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester, UK., 560p.
- Walsh, G.**, 2003, *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester, UK., 9:351-402.
- Walsh, G.**, 2006, *Directory of Therapeutic Enzymes*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2:17-54.
- White, D., Sharp, R. J. and Priest, F. G.**, 1993, A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area, *Antonie Leeuwenhoek*, 64:357-386.
- Wiseman, A.**, 1987, The Application of Enzymes in Industry, *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2(3):274-373.
- Zonguldak Karaelmas Üniversitesi**, “Çevre Mikrobiyolojisi Ders Notları”, http://www.cevre.karaelmas.edu.tr/dersnotu/cevremikrobiyolojisi/gramboya_ma.pdf (Erişim tarihi: 20 Ağustos 2012)

ÖZGEÇMİŞ

Nazlı GÜMÜŞ. 30 Eylül 1984’de İstanbul’da doğdu. 2003 yılında Özel Doğuş Lisesi’nden mezun oldu. 2008 yılında ‘Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimini tamamladıktan sonra, aynı yıl Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı ve 2012 yılında yüksek lisansını tamamladı.