

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**



**$\beta$ -GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN FARKLI BİR YÖNTEM İLE  
SAFLAŞTIRILMASI**

**ÖZGE ALKAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri:**      **Prof. Dr. Oktay ARSLAN**      **(Tez Danışmanı)**  
                         **Prof. Dr. Nahit GENÇER**  
                         **Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2021**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “ $\beta$ -Galaktosidaz Enziminin Farklı Bir Yöntem İle Saflaştırılması” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Özge ALKAYA



**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2019/024 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**β-GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN FARKLI BİR YÖNTEM İLE  
SAFLAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ÖZGE ALKAYA  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI:PROF.DR. OKTAY ARSLAN)  
(EŞ DANIŞMAN:DR. ADEM ERGÜN)  
BALIKESİR, ŞUBAT - 2021**

β-Galaktosidaz (β-D-galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23 βGal), birçok oligosakkaritlerden, D-galaktosil rezidülerinin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. βGal'ın, hidrolitik aktivitesi başta süt teknolojisi olmak üzere gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca βGal, transgalaktozilasyon aktivitesi ile prebiyotik üretim proseslerinde uygulama alanı bulmuştur.

Bu çalışmada, *Aspergillus niger*'den Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim jeli kullanılarak β-Galaktosidaz, ilk defa saflaştırılmıştır. Bu amaçla söz konusu jel, ilgili yöntemlere göre sentezlenmiştir. *Aspergillus niger*'de üretilen β-Galaktosidaz, %90 Amonyum sülfat ile çöktürme işleminden sonra, direkt dengelenmiş hidrofobik etkileşim kolonuna yüklenmiştir. 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8 ) ve 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8,0) elüsyon tamponu ile enzim, %53,8 verim ve 234,7 derece ile saflaştırılmıştır. Bu değerlerin literatür verileriyle karşılaştırıldığında yüksek olduğu görülmektedir. β-Galaktosidaz saflaştırılmasında kullanılan hidrofobik jel, uygun koşullarda muhafaza edilmesi ile uzun süre kullanılabilir olması elde edilen enzimin maliyetini önemli ölçüde düşürecektir.

Söz konusu çalışmanın yerli enzim üretimi için farkındalık oluşturacağı ve çalışmadan elde edilecek sonuçların gerek temel bilimlerde gerekse gıda mühendisliği alanında yaygın etki göstereceği kanaatindeyiz.

**ANAHTAR KELİMELELER:** β-Galaktosidaz, *Aspergillus niger*, Hidrofobik etkileşim kromatografisi, Saflaştırma.

## ABSTRACT

### PURIFICATION OF $\beta$ -GALACTOCIDOSE ENZYME WITH A DIFFERENT METHOD

MSC THESIS

ÖZGE ALKAYA

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF.DR. OKTAY ARSLAN)

(CO-SUPERVISOR: DR. ADEM ERGÜN)

BALIKESİR, FEBRUARY- 2021

$\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactohydrolase, EC 3.2.1.23  $\beta$ Gal) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of D-galactosyl residues from many oligosaccharides. The hydrolytic activity of  $\beta$ Gal is widely used in the food industry, especially in dairy technology. In addition,  $\beta$ Gal has found application area in prebiotic production processes with its transgalactosylation activity.

In this study,  $\beta$ -Galactosidase was purified for the first time using a hydrophobic interaction gel with the chemical structure of Sepharose 4B-L-tyrosine-1-naphthylamine from *Aspergillus niger*. For this purpose, the gel was synthesized according to the relevant methods.  $\beta$ -Galactosidase produced in *Aspergillus niger* was loaded directly into the equilibrated hydrophobic interaction column after precipitation with 90% Ammonium sulphate. The enzyme was purified with an elution buffer of 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) and 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.0) containing 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and obtained with 53.8% yield and 234.7 degrees. It is seen that these values are higher than the data reported in the literature. The hydrophobic gel used in the purification of  $\beta$ -galactosidase will significantly reduce the cost of the obtained enzyme, as it has a longer shelf life when kept under suitable conditions.

We believe that the study in question will raise awareness for domestic enzyme production and the results obtained from the study will have a widespread effect on both basic sciences and food engineering.

**KEYWORDS:**  $\beta$ -Galactosidase, *Aspergillus niger*, hydrophobic interaction chromatography, purification.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enzimler .....	1
1.2 Endüstriyel Enzimler .....	3
1.3 Enzimlerin Gıda Endüstrisinde Kullanımı .....	5
1.4 Endüstriyel Enzimlerin Üretimi.....	6
1.5 $\beta$ Gal Enzimi.....	8
1.5.1 $\beta$ Gal'ın Kaynakları .....	9
1.5.2 Gıda Endüstrisinde $\beta$ Gal.....	10
1.5.3 $\beta$ Gal'ın Substratı Laktoz.....	10
1.5.4 $\beta$ Gal'ın Saflaştırılması .....	12
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>14</b>
2.1 Materyal.....	14
2.1.1 <i>Aspergillus niger</i> .....	14
2.1.2 Kullanılan Cihazlar ve Aletler .....	14
2.1.3 Araştırma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	15
2.1.3.1 $\alpha$ Gal'ın Üretimi İçin Katı Besi Yeri Ortamının Hazırlanması.....	15
2.1.3.2 Sıvı Besi Yeri Ortamının Hazırlanması (pH 5) .....	15
2.1.3.3 $\alpha$ Gal Aktivite Tayini İçin Çözeltiler .....	16
2.1.3.4 $\alpha$ Gal Enziminin Saflaştırılması İçin Kullanılan Çözeltiler .....	16
2.1.3.5 Kantitatif Protein Tayini Yapmak Amacıyla Hazırlanan Çözelti.....	17
2.1.3.6 Hidrofobik Etkileşim Tekniğiyle Saflaştırılan Enzimin Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler .....	17
2.2 Kullanılan Yöntemler .....	19
2.2.1 Katı Besi Yerinde <i>Aspergillus niger</i> 'in Geliştirilmesi.....	19
2.2.2 Sıvı Besi Yeri Ortamında $\alpha$ Gal Üretimi.....	19
2.2.3 $\alpha$ Gal Aktivite Tayini .....	20
2.2.4 Kantitatif Protein Tayini.....	21
2.2.5 $\alpha$ Gal'ın Amonyum Sülfatla Çöktürülmesi .....	22
2.2.6 $\alpha$ Gal Enziminin Hidrofobik Etkileşim Tekniği ile Saflaştırılması .....	22
2.2.6.1 Hidrofobik Etkileşim Tekniğinde Kullanılan Jel Sentezi .....	22
2.2.6.2 $\alpha$ Gal Enzimi Saflaştırma Basamağı .....	24
2.2.7 $\alpha$ Gal Enziminin Elektrofrezini .....	25
<b>3. SONUÇLAR</b> .....	<b>27</b>
3.1 Katı Besi Yerinde Küf Üretimi.....	27
3.2 Sıvı Besi Yeri Ortamında Üretim .....	28
3.3 Farklı Laktoz Konsantrasyonlarında $\alpha$ Gal'ın Aktiviteleri .....	29
3.4 $\alpha$ Gal'ın Aktivite Takibi.....	31
3.5 Kantitatif Protein Tayini .....	32

3.6 aβGal'ın Saflaştırılması .....	33
3.6.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	33
3.6.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi .....	33
3.7 SDS-PAGE İle aβGal Saflık Kontrolü .....	34
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>36</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>40</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>48</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1: Ekim yapılmış besi yeri ortamı .....	19
Şekil 2.2: Sıvı besi yerine ekim yapma hazırlık aşaması .....	20
Şekil 2.3: Comassie brilliant blue G-250- protein kompleksleri.....	21
Şekil 2.4: Sepharose 4B aktiveleştirme basamağı .....	22
Şekil 2.5: Aktif Matrikse L-Tirozin bağlanması .....	23
Şekil 2.6: 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması.....	24
Şekil 2.7: Kolona paketlenmiş jel .....	25
Şekil 3.1: Petri kabında inkübasyon sonucu oluşan küf kültürü .....	27
Şekil 3.2: Deney tüpünde inkübasyon sonucu oluşan küf kültürü .....	28
Şekil 3.3: aβGal enzimini içeren sıvı besi yeri ortamı .....	28
Şekil 3.4: Farklı konsantrasyonlarda laktoz içeren sıvı besi yeri ortamındaki enzim aktiviteler .....	29
Şekil 3.5: Değişik düzeylerde laktoz içeren sıvı besi yeri ortamındaki enzim aktivitelerin toplu olarak gösterimi .....	32
Şekil 3.6: Haftalık Aktivite Takip Sonuçları.....	32
Şekil 3.7: Numunelerdeki protein tayini için kullanılan standart eğri .....	33
Şekil 3.8: aβGal'ın HEK ile saflaştırılması.....	34
Şekil 3.9: SDS-PAGE işlemi ile elde edilen aβGal bantları .....	35



## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1:</b> Gen teknolojisi kullanılarak üretilen ve pazarlanan bazı enzimler ve kullanım alanları .....	8
<b>Tablo 2.1:</b> Deneysel çalışmada kullanılan cihazlar ve aletler.....	14
<b>Tablo 2.2:</b> SDS-PAGE' de kullanılan numune tamponunda yer alan maddeler ve miktarları.....	17
<b>Tablo 2.3:</b> SDS-PAGE' de kullanılan yürütme tamponunda yer alan maddeler ve miktarları.....	17
<b>Tablo 2.4:</b> Elektroforezde kullanılan jeller .....	18
<b>Tablo 2.5:</b> $\beta$ Gal enziminin aktivite tayini.....	20
<b>Tablo 3.1:</b> a $\beta$ Gal'ın saflaştırma tablosu.....	33

## SEMBOL LİSTESİ

<b>a<math>\beta</math>Gal</b>	: Aspergillus $\beta$ -Galaktosidaz
<b><math>\beta</math>Gal</b>	: $\beta$ -Galaktosidaz
<b>EC</b>	: Enzim kodu
<b>EU</b>	: Enzim ünitesi
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>ONP</b>	: o-nitrofenil
<b>ONPG</b>	: o-nitrofenil $\beta$ -D-galaktopiranosit
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>TEMED</b>	: N, N, N, N, -tetrametil etilendiamin

## **ÖNSÖZ**

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, çalışmalarına yön veren ve her daim destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a,

Çalışmalarım boyunca bana destek olan Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Prof. Dr. Nahit GENÇER, Doç. Dr. Semra IŞIK, Dr. Adem ERGÜN'e,

Tez çalışması için gerekli olan ana kültürün temin edilmesini sağlayan ve bu konudaki tecrübelerini bizimle paylaşan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL hocamıza,

Tüm eğitim öğretim hayatım boyunca benim yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili annem Hanife ALKAYA' ya ve babam Kadri ALKAYA' ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiç esirgemeyen sevgili nişanlım Anıl İNCE'ye teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir-2021**

**Özge ALKAYA**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Enzimler

Tüm canlı hücreler, metabolizma adı verilen olağan üstü biyokimyasal aktivitenin cereyan ettiği bölgelerdir. Canlı bir organizmada sürekli olarak devam eden kimyasal ve fiziksel değişim sürecine metabolizma denilmiştir. Yeni doku oluşumu, eski dokuların yıkımı, besinlerin enerjiye dönüştürülmesi, atık malzemelerin imhası, yeniden üretim, kısacası 'yaşam' olarak nitelendirdiğimiz tüm faaliyetler, söz konusu biyokimyasal reaksiyonların sonuçlarıdır. Bununla birlikte, bu biyokimyasal reaksiyonların neredeyse hiçbiri kendiliğinden gerçekleşmez. Hücre için gerekli bileşikler uygun miktarda ve zamanda oluşturmak için enzimatik kataliz denen olağan üstü bir sistem tasarlanmıştır. Bu nedenle canlı organizmalardaki tüm kimyasal reaksiyonların meydana gelmesinden enzimlerin sorumlu olduğu bilinmektedir [1].

Enzimler; spesifikliği, ılıman koşullarda olağanüstü katalitik güçleri ve aktivitelerinin kontrol edilebilir olması gibi özellikleri ile diğer klasik katalizörlerden ayrılmaktadır. Çoğu protein yapısında olan enzimler, söz konusu olağan üstü özelliklerin aydınlatılması ile bu moleküllerin farklı amaçlar için endüstride kullanma düşüncesi, oldukça heyecan verici yeni çalışma alanlarının doğmasına sebep olmuştur [2].

İnsanoğlu, neredeyse tarihin başlangıcından bu yana enzimleri farkında olmadan ekmek ve peynir yapımı gibi çeşitli amaçlar için kullanmıştır. Enzimlerin bilinçli olarak endüstride ilk uygulanması, buzağı midesinde izole edilen rennin enziminin peynir yapımında kullanılmasıdır. Almanya'da bulunan özel bir firmada, 1914 yılında hayvanlardan izole edilen tripsin enziminden, temizlik endüstrisi için ilk ticari enzim preparatı hazırlanmıştır. 1930 yılının ortalarında peynir üretimine ek olarak, enzimlerin gıda endüstrisinde kullanılması biraz daha genişlemiştir. Mikrobiyal enzimlerin gıda endüstrisinde başlıca kullanımı, nişasta endüstrisinde 1960'lı yıllarda başlamıştır. Günümüzde birçok endüstriyel enzim şirketleri, çeşitli uygulamalar için farklı enzimler üretmektedir. Günümüzde dünyada milyar dolarla ifade edilen katma değeri yüksek bir enzim pazarı oluşmuştur [1].

Endüstriyel enzimler, hayvan veya bitki dokularından ekstrakte edilmesine rağmen birçoğu büyük reaktörlerde spesifik mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılmak amacı ile enzim kaynağı seçilirken, en önemli kriter, ilgili

organizmanın GRAS-statüsüne sahip olması gereklidir. Diğer bir ifade ile Genel Olarak Güvenli Kabul Edilebilir olmalıdır. Ayrıca seçilecek organizmanın makul bir süre içinde yüksek miktarlarda istenilen enzimi üretebilmelidir. Endüstriyel organizmalardan, tipik olarak litre başına 50 gramdan fazla hücre dışı enzim üretmesi beklenir. Bu nedenlerle günümüzde endüstriyel enzimlerin çoğu, *Aspergillus* ve *Trichoderma*, organizmaları kullanılarak üretilmektedir [3].

Enzimlerin endüstride kullanılması için farklı düzeylerde saflaştırılması gerekmektedir. Özellikle gıda endüstrisinde kullanılacak enzimlerin yüksek düzeyde saflaştırılması oldukça önemlidir. Bu nedenle enzimlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için teknik ve yöntemlerin geliştirilmesi, biyoteknoloji alanındaki gelişmelerin çoğu için belirleyici olmuştur. Bir enzimin saflığı, yapı-fonksiyon ilişkileri veya potansiyel endüstriyel uygulamalar için bir ön koşuldur.

Günümüzde enzimleri saflaştırmak için, proteinin biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Moleküler boyut, net yük, biyospesiflik ve hidrofobisite gibi proteinin özelliklerine bağlı olarak sırası ile Jel filtrasyon, iyon değişim, afinite ve hidrofobik etkileşim kromatografisi en sık kullanılan yöntemlerdir. Protein saflaştırma stratejisi belirlenirken, hedef molekülün yapı ve özellikleri ile söz konusu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları dikkate alınmalıdır [4].

Süt, yaklaşık 6 milyar insanın diyetinin önemli bir bileşenidir. Memelilere verilen süt üretme yeteneği ile hem yavrularını beslemek hemde dünyanın birçok yerinde insanlara yaşamları boyunca süt sağlamaya devam etmektedirler. Ancak süt şekeri olarak da bilinen laktoz, süt ürünlerinde ve gıda endüstrisinde büyük bir sorun olmuş ve olmaya devam etmektedir. Laktoz intoleransının tüm dünyada yaygın olması, dünya nüfusunun büyük bir kısmının sütün bilinen faydalarından yararlanamayacağı anlamına gelmektedir [5]. Ayrıca konsantre süt ürünleri ve donmuş gıda maddelerinde laktozun, kumlu doku oluşturması önemli problemlerdendir. Süt ürünleri atığının, "biyolojik-oksijen-ihtiyacı" yüküne önemli bir katkı sağladığı da bilinmektedir. Laktozun hidrolizi, laktoz içermeyen gıdalar geliştirilerek laktoz intoleransı ile mücadele etmek için umut verici bir süreçtir. Ayrıca söz konusu molekülün hidrolizi, laktozun sebep olduğu diğer problemlerin çözümü içinde son derece önemli olacağı düşünülmektedir [6].

$\beta$ -Galaktosidaz ( $\beta$ -D-galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23  $\beta$ Gal), başta laktoz olmak üzere birçok oligosakkaritlerden, D-galaktozil kalıntılarının hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Enzim, söz konusu hidrolitik aktivitesinin yanında, transgalaktozilasyon aktivitesi ile de dikkat çekmektedir. Bu şekilde farklı kimyasal yapılara sahip prebiyotik üretiminde  $\beta$ Gal enzimlerinin kullanılabilmesi fikri, bu enzim üzerinde çok yoğun çalışmaların yapılmasına sebep olmuştur [7].

Yüksek Lisans tezi kapsamında,  $\beta$ Gal, *Aspergillus niger* organizması kullanılarak üretilmiş ve tarafımızdan sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli kullanılarak saflaştırılmıştır.

Global enzim pazarının 2019 yılında yaklaşık 7 milyar dolar olduğu ve 2024 de bu değer 10 milyar dolar olacağı düşünülmektedir. Ayrıca değer bazında %6,7 yıllık bileşik büyüme oranı kaydedileceği düşünülmektedir [8-12]. Ancak ülkemizde enzim üretimi kesinlikle arzu edilir düzeyde değildir. Saf enzimlerin çok büyük paralar verilerek ithal edilmesi, ülkemizde gıda endüstrisinde enzimlerin kullanılmasını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızın bu alanda büyük farkındalık oluşturacağı düşüncesindeyiz.

## **12 Endüstriyel Enzimler**

Yüzyıllar boyunca enzimler, bira ve peynir üretimi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır. Hem geçmişte hem de günümüzde enzimler, bitki ve hayvan dokuları gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Bununla birlikte, yıllar geçtikçe, biyoteknolojideki gelişmeler daha farklı ve daha yüksek verimli enzim çeşitlerinin elde edilmesini sağlamıştır. Enzimlerin endüstriyel uygulamadaki çekiciliği, diğer kimyasal katalizörlere kıyasla sunduğu bazı temel faydalara bağlanabilir. Katalitik fonksiyon, spesifiklik ve ılıman koşullarda çalışma kabiliyetleri gibi özellikleri, enzimleri çeşitli uygulamalarda tercih edilen bir katalizör yapmaktadır [1, 4, 5].

Endüstriyel enzimler, analitik veya tanısal kullanım için yüksek derecede saflaştırılmış enzimlerin aksine, kısmen saflaştırılmış veya enzim toplulukları olarak hazırlanır ve ticarileştirilir. Endüstriyel enzimler çok çeşitli bitki, hayvan veya mikrobiyal kaynaklardan üretilir. Ancak çoğu durumlarda mikrobiyal kaynaklar tercih edilir. Mikrobiyal enzimler,

proteazlar ve karbonhidratazlar gibi hücre dışı olabilirler ki bu toplam satışların büyük bir bölümünü oluşturur. Ayrıca glikoz oksidaz gibi hücre içinde görev yapan enzimler de endüstride önemli kullanım alanı bulmuştur. Mikroorganizmaların kendisi katalizör olarak kullanılmadığı durumlarda hücre içi enzimlerin farklı yöntemlerle hücreden ayrılması gerekmektedir [6, 8].

Enzimlerin gerçek anlamda endüstride kullanımları, mikrobiyal proteazların yıkama tozlarına eklenmesiyle başarılmıştır. Bu amaçla ilk ticari enzim olan *Bacillus* proteaz 1959'da pazarlandı ve ilk büyük deterjan üreticisi onu 1963 yıllarında kullanmaya başladı. Endüstriyel enzim üreticileri çok çeşitli uygulamalar için farklı enzimleri pazarlamaktadırlar. Dünya enzim pazarında yaklaşık olarak 2,2 milyar ABD dolarlık bir cirodan söz edilmektedir. Deterjanlar (% 30), tekstil ürünleri (% 12), nişasta (% 12), fırıncılık (% 11), biyoyakıt (% 9) ve hayvan yemi (% 8), endüstriyel olarak yaklaşık% 80'i oluşturmaktadır [2, 3].

Endüstriyel enzimler, biyoteknolojinin kalbidir. Biyoteknoloji ve genomikteki gelişmeler, ticarileştirme için taze enzim kaynaklarının ve üretim suşlarının keşfedilmesine yardımcı olmuştur. Enzimlerin çalışma koşulları ve performansı, istenen değere göre ayarlanabilmektedir [1, 4, 5].

Enzimler sadece kimyasal işlemler için değil, aynı zamanda mekanik ve fiziksel işlemler için de kullanılabilir. Nişastanın hidrolizinde asidi değiştirmek için amilazların kullanılması kimyasal işlemler için iyi bir örnektir. Kotların aşındırmasında süngertaşı yerine selüloz parçalayıcı veya değiştirici enzimlerin kullanılması, mekanik bir işlemin yerini alan enzimlerin mükemmel bir örneğidir. Proteaz enzimleri kullanılarak, çamaşır temizliği için yüksek sıcaklık direnci gibi fiziksel işlemler yerine kolaylıkla uygulanabilir [1, 9, 10].

Biyoteknolojideki gelişmelerle enzim uygulamalarının ufku her geçen gün genişlemektedir. Enzimler artık daha önce ticari olarak uygun olmayan sentetik işlemlerle rekabet edebilecek daha yeni işlemlerde kullanılmaktadır. Örneğin, günümüzde birçok şirket, selülozik biyokütleyi yakıtlarda kullanılmak üzere etanole dönüştürebilen daha farklı enzimler üzerinde çalışmaktadırlar. Bir diğer örnek ise nişastadan şeker eldesin de

enzim teknolojisinin kullanılmasıdır. Bu şekilde yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi milyar dolarlık bir endüstriye dönüştürmektedir [10, 11].

### **13 Enzimlerin Gıda Endüstrisinde Kullanımı**

Gıda endüstrisi, üretim süreçlerinde temel olarak çok çeşitli bitkisel ve hayvansal ürünleri kullanmaktadır. Bu durum daha geniş ürün çeşitliliğinin tüketiciye sunulmasını sağlamaktadır. 8000 yılı aşkın süredir gıda ürünleri üretmek için kullanılan biyoteknoloji, gıda hammaddelerinin nihai ürünlere dönüştürülmesinde kullanılan yöntemlerin geliştirilmesini sağlamaktadır. Ekmek, alkollü içecekler, sirke, peynir, yoğurt ve diğer birçok gıda, çeşitli mikroorganizmalarda bulunan enzimler kullanılarak yapılmıştır. Günümüzde biyoteknoloji, yeni ürünler sunarak, maliyetleri düşürerek ve gıda üreticilerinin uzun süredir güvendiği süreçleri iyileştirerek gıda endüstrisinde büyük farkındalık oluşturmaktadır. Şüphesiz, bu farkındalık gelecekte de artarak devam edecektir [1,5,9].

Biyoteknoloji, enzimler, emülgatörler ve başlangıç kültürleri gibi yeni materyaller kullanılarak, işlevsellik, besin değeri, tat ve doku gibi duyuşal özelliklerde birçok iyileştirmeler sağlamıştır. Ayrıca biyoteknoloji, atık, gıda güvenliği, paketleme ve benzeri sorunlar ile başa çıkmak için farklı yöntemler sunmaktadır. Biyoteknolojide enzimler, bileşenlerin ve ürünlerin işlevsel, besleyici ve duyuşal özelliklerini değiştirebilir ve iyileştirebilir ve bu nedenle söz konusu moleküller, her türlü gıda ürününün işlenmesinde ve üretiminde yaygın uygulama alanı bulmuşlardır [4,5].

Gıda üretiminde enzimlerin birçok avantajı vardır. Birincisi ve en önemlisi, enzimlerin geleneksel kimyasal bazlı teknolojiye alternatif olarak kullanılmasıdır. Enzimler bu nedenle çok çeşitli işlemlerde sentetik kimyasalların yerini alabilir. Bu, enerji tüketim seviyelerini ve ürünlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini düşürerek proseslerin çevresel performansında avantaj sağlar. Dahası, enzimler eylemlerinde klasik kimyasal katalizörlerden daha spesifik olduklarından, enzimle katalize edilen süreçlerde, daha az yan ürün oluşur. Sonuçta, enzimlerle katalize olan ürünler daha kaliteli ve daha az kirliliğe sahiptir. Enzimler, ılıman koşullarda reaksiyonları katalize ederek, yiyeceklerin ve gıda bileşenlerinin önemli özelliklerine ( antioksidant gibi ) zarar vermeyen operasyon



koşullarının uygulanmasına izin verir. Son olarak enzimler, gerçekleşmesi çok güç gibi görünen işlemlerin de kolayca ilerlemesini sağlarlar [11, 12].

Biyoteknoloji ile üretilen ilk ticari ürün, peynir yapımında kullanılan bir enzimdir. Biyoteknolojik gelişmelerden önce, söz konusu enzimin buzağuların, kuzuların ve yavru keçilerin midesinden çıkarılması gerekiyordu, ancak günümüzde bu enzimi şifreleyen gen mikroorganizmalara aktararak oldukça ucuz ve güvenli bir şekilde üretilmektedir [1, 8].

Gıda endüstrisinde, farklı amaçlar için çok sayıda enzim ürünü kullanılmaktadır. Mikrobiyal dünyanın olağanüstü çeşitliliğinden nasıl yararlanılacağını ve gıda işlemede önemli olacak yeni enzimlerin nasıl elde edileceği araştırıldıkça bu sayının daha da artacağı düşünülmektedir [9, 12].

1980'lerin başından beri, enzim üreten şirketler, üretim verimliliğini ve kalitesini artırmak ve yeni ürünler geliştirmek için genetik mühendisliği tekniklerini kullanmaktadırlar. Burada hem endüstri hem de tüketiciler için, daha iyi ürünler ve süreçler elde etmek için yeni yöntemlerin geliştirilmesi büyük avantajlar sağlayacaktır [9, 10].

Enzimlerin gıda endüstrisinde kullanılması enzim kalıntısı sorununu beraberinde getirmektedir. Ancak bugüne kadar, gıdalardaki enzim kalıntılarına karşı tüketici alerjisi olduğuna dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Endüstride kullanılan enzimlerin ya immobilize formda ya da çok az miktarda kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle gıdalarda görülen enzim kalıntılarının seviyeleri alerjiye neden olmayacak kadar düşük olduğu tahmin edilmektedir. Buna rağmen, olası alerjik reaksiyonlara karşı üreticiler, kullanılan enzimleri sıvı, granül, kapsül veya immobilize formda üreterek çeşitli koruyucu önlem alırlar [1, 7, 11].

#### **14 Endüstriyel Enzimlerin Üretimi**

Geçmişte, enzimler esas olarak bitki ve hayvan kaynaklarından izole edilmekteydi. Bu nedenle, daha sınırlı sayıda ve yüksek bir maliyetle enzimler üretilmekteydi. Günümüzde bakteri ve mantarlar, çeşitli enzimlerin ticari üretimi için kullanılmaktadır [13,14]. Enzimlerin verimliliğini artırmak için çeşitli mikroorganizma türleri seçilmiş veya genetik olarak değiştirilmiştir. Çoğu durumda, değiştirilmiş genler mikrobiyal kökenlidir, ancak farklı soydan da gelebilirler. Örneğin, buzağuların midesinde bulunan ve peynir üretimi sırasında sütün kesilmesine neden olan bir enzim olan kimozini kodlayan DNA, mayalara

(*Kluyveromyces lactis*), bakterilere (*Escherichia coli*) ve küflere (*Aspergillus niger*) başarıyla klonlanmıştır. Bu rekombinant mikroorganizmalar tarafından ekspre edilen kimoziñ Őu anda ticari olarak üretilmektedir ve peynir yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır [13,15].

Mikroorganizmalardan enzim üretimi, söz konusu organizma için gerekli metabolitlerin olduğu dev tanklarda gerçekleştirilir. Bu Şekilde üretilen enzimler uygun yöntemlerle ekstrakte edilir, saflaştırılır ve gıda endüstrisinde farklı proseslerde kullanılır. Saflaştırılmış enzimler hücre içermediklerinden DNA ve diğer makromolekülleri içermemesi çoğu durumda büyük bir avantajdır [13,14].

Genetik teknolojiler sadece enzimlerin üretim verimliliğini artırmakla kalmamış, aynı zamanda kullanılabilirliklerini, maliyetlerini ve kalitelerini de olumlu yönde değiştirmiştir. Bu durum, enzimlerin gıda endüstrisinde verimli ve kontrollü bir Şekilde kullanılmasına önemli katkılar sağlamıştır [13,15].

Tüm bunlara ilaveten, enzim mühendisliği ile, yüksek aktivite, termostabilite, substrat spesifikliği ve optimum pH gibi arzu edilen özellikleri veren modifiye enzimler üretmek mümkün görölmektedir. Enzim mühendisliğinde ilgili genlerdeki baz dizilişleri değiştirilerek hedef proteinin amino asit yapısı modifiye edilmektedir. Bu modifikasyonlar enzimin üç boyutlu yapısı incelenerek planlı bir Şekilde gerçekleştirilir. Ancak elde edilen enzimin aktivitesi ve ilgili koşullardaki stabilitesi beklenildiği Şekilde çoğu zaman gerçekleşmemektedir. Bu nedenle söz konusu mühendislik işlemlerinin defalarca yapılması gerekmektedir. Bu Şekilde üretilen bazı enzimler ve kullanım alanları Tablo 1.1'de verilmiştir [13,16].

**Tablo 1.1:** Gen teknolojisi kullanılarak üretilen ve pazarlanan bazı enzimler ve kullanım alanları [13,14].

Enzim	Uygulama Alanı
$\alpha$ -Amilaz	Bira yapımı, mayalama
Katalaz	Piştirme, demleme, damıtma, nişasta
Kimozin	Mayonez
$\beta$ -Glukanaz	Peynir
$\alpha$ -Glukotransferaz	Bira yapımı, mayalama
Glukoz izomeraz	Nişasta
Glukoz oksidaz	Nişasta
Hemiselülaz	Piştirme, yumurta, mayonez
Lipaz	Piştirme
Maltojenik amilaz	Doymuş ve doymamış yağlar
Mikrobiyal peynir mayası	Peynir, nişasta, piştirme
Fitaz	Mandıra
Proteaz	Nişasta
Pullunaz	Piştirme, mandıra, damıtma, balık, et, nişasta, sebze
Ksilanaz	Piştirme, nişasta

## 15 $\beta$ Gal Enzimi

Laktozun hidroliz reaksiyonunu katalizleyen  $\beta$ Gal, süt ürünleri, gıda işleme ve ilaç endüstrilerinde önemli bir bileşen olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir.  $\beta$ Gal'ın hidrolaz aktivitesinin yanında, galaktozil birimlerini spesifik şekerlere farklı şekilde (örn., Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  3) Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  4) Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  6)) transfer reaksiyonunu katalizlediği bilinmektedir.  $\beta$ Gal'ın bu aktivitesi, galatooligosakkarit (GOS) sentezinde önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. [7, 17, 18].

1970 yılında, ilk olarak *E. coli*  $\beta$ Gal enziminin primer yapısı saptanmıştır (1024 amino asit) [7, 19]. 24 yıl sonra, proteinin dört zincirden oluşan bir tetramer sahip olduğu keşfedilmiştir. Laktozun hidrolizinin,  $\beta$ Gal enziminin aktif bölgesinde gerçekleştiği tespit

edilmiştir. Substratın  $\beta$ -glikozit bağı, aktif bölgede bulunan glutamat rezidüsünün terminal karboksil grubu tarafından parçalandığı bulunmuştur [7, 20].

### 1.5.1 $\beta$ Gal'in Kaynakları

$\beta$ Gal'lar, mikroorganizmalarda (bakteriler, mantarlar, mayalar), bitkil-erde (özellikle badem, şeftali, kayısı, elma) ve hayvan organlarında bulunur [3, 21, 22]. *Aspergillus sp.* ve *Kluyveromyces sp.* *Kluyveromyces lactis* kaynaklı  $\beta$ Gal'lar, en yaygın olarak endüstride kullanılırlar [3, 23, 24].

Fungal  $\beta$ Gal enzimlerinin optimum pH değerleri 2.5-5.4 aralığında oldukları için, peynir altı suyu gibi asidik ürünlerde bulunan laktozun hidrolizi için en etkilidirler. Fungal  $\beta$ Gal termostabil olmalarına rağmen galaktoz konsantrasyonunun artmasıyla ürün inhibisyonuna uğramaları büyük bir handikaptır [3, 25].

*Aspergillus oryzae* kültüründen 2-propanol fraksiyonasyonu ile DEAE-Sephadex A-50 ve Sephadex G-200'de kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Söz konusu enzimin, o-nitrofenil  $\beta$ -D-galaktopiranosit (ONPG) ve laktoz substratları için optimum pH değerleri sırası ile 4.5 ve 4.8 olarak bulunmuştur. Ayrıca ilgili enzimin stabil olduğu pH aralığı 4.0-9.0 olduğu saptanmıştır. Optimum sıcaklık ise 46 ° C olduğu bildirilmektedir. Enzimin molekül ağırlığı, Sephadex jel filtrasyon kromatografisi ve sukroz yoğunluk gradyant santrifüjleme metodları kullanılarak molekül ağırlığının yaklaşık 105 kDa olduğu belirlenmiştir. ONPG ve laktoz substratları kullanılarak enzimin Michaelis sabitleri sırasıyla  $7.2 \times 10^{-4}$  M ve  $1.8 \times 10^{-2}$  M olarak bulunmuştur [3, 26].

Bakteriyel kaynaklı  $\beta$ Gal, uygulama kolaylığı, enzimin katalitik aktivitesinin yüksek olması ve nispeten stabil olması gibi nedenlerle laktozun hidrolizi için yaygın olarak kullanılmaktadır [3, 27]. Laktokok, streptokok ve lactobasil'in çeşitli bir grubunu oluşturan laktik asit bakterileri (LAB), aşağıdaki nedenlerden dolayı bilimsel çalışmaların odağı haline gelmiştir. Bunlardan en önemlisi söz konusu organizmaların patojen olmamasından dolayı yüksek saflaştırma işlemleri yapmadan proseslerde kullanılabilir olmasıdır. Bazı suşların probiyotik aktiviteye sahip olması bir diğer avantaj olduğu söylenebilir [3, 28, 29].

Doğal yaşam alanı süt ürünleri ortamı olduğu için *Kluyveromyces lactis* mayası, önemli bir ticari  $\beta$ Gal kaynağıdır [3, 30, 31]. Maya  $\beta$ Gal enzimi üretiminin ilgi çekici olmasının en

önemli sebebi çok sayıda insan tarafından tüketilen laktozsuz süt üretiminde kullanılmasındır [3, 32, 33].

$\beta$ Gal enzimlerinin birçok bitki dokusunda bulunduğu saptanmıştır. Bu enzimlerin bitki büyümesi, meyve olgunlaşması ve laktoz hidrolizini içeren bir dizi biyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir.

### 1.5.2 Gıda Endüstrisinde $\beta$ Gal

Süt ve peynir altı suyundaki laktozun enzimatik hidrolizi, farklı sıcaklık ve pH çalışma koşullarında, farklı konfigürasyonlara sahip çeşitli reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Enzimin maliyeti, prosesin ekonomisini belirleyen en önemli faktörlerden biri olduğundan, enzimin sürekli sistemlerde çalışılması daha fazla tercih edilmiştir [7, 34]. Teknik olarak uygulanabilir prosesler arasında, serbest enzimin doğrudan ilavesi ile işlem sonucunda membran prosesleriyle enzimin geri kazanılması şeklinde olduğu gibi immobilize enzimlerin kullanımı tarzında da uygulamalar vardır. Ham enzim preparatlarının maliyetinin yüksek olmaması ve kısmen stabil olması çok küçük işletmelerin bile laktozsuz süt üretmek amacıyla kullanılmasına imkan sağlamaktadır [7, 35, 36]. Ancak immobilize  $\beta$ Gal'ların, sürekli proseslerde kullanılması, kontrollü ürün oluşumunda, reaksiyon karışımından enzim geri kazanılmasında büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bu nedenle immobilize  $\beta$ Gal'lar çeşitli mühendislik tasarımlarında kullanılmaktadır [7, 37, 38, 39].

### 1.5.3 $\beta$ Gal'ın Substratı Laktoz

Laktoz, D-galaktozil  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) D-glikozdan oluşan bir disakkarittir. Suda kısmen çözünür (15 ° C'de 170 g L<sup>-1</sup>), yalnızca memelilerin sütünde bulunur ve sukrozdan altı kat daha az tatlı bir şekerdir [40, 41].

Laktoz, süt serumundan ultrafiltrasyon, buharlaştırma ve kristalleştirme yoluyla elde edilmektedir. Bu molekül ilk defa 1633'te İtalyan Fabrizio Bartoletti tarafından izole edilmiştir [40, 42].

Sütteki laktoz, çözünürlük, kristalleşme, erime sıcaklığı ve optik rotasyon özelliklerindeki farklılıklardan dolayı  $\alpha$ -laktoz ve  $\beta$ -laktoz (sırasıyla  $\alpha$  ve  $\beta$  konumundaki galaktozun C4 hidroksil grubu) olmak üzere iki izomere sahiptir. Laktoz ayrıca susuz veya hidratlanmış formda bulunabilir. Hidratlanmış  $\alpha$ -laktoz, 93.5 ° C'nin altındaki bir sıcaklıkta

kristalizasyonla elde edilirken, susuz  $\beta$ -laktoz daha yüksek sıcaklıklarda elde edilmektedir [40, 43].

Laktoz, yüksek sıcaklıklarda süt proteinlerinin amino gruplarına katılarak, sütün kararmasına (Maillard reaksiyonu) ve laktoz moleküllerinin karamelleşmesine neden olabilir [40, 44]. Isıl işlemler aynı zamanda az miktarda da olsa laktuloz (galaktozil-fruktoz) moleküllerinin oluşmasına sebep olurlar [40, 43].

Laktoz, laktoz sentetaz enziminin etkisiyle meme bezinde glikoz ve galaktozdan sentezlenir. Laktoz sentetaz, galaktosiltransferaz aktivitesine ve düzenleyici etkilere sahip başka bir alt üniteden oluşmuştur ( $\alpha$ -laktalbümin). İlki, bir galaktozil grubunun, N-asetillaktozamin oluşturmak için UDP-galaktozdan N-asetilglukozamin transferini katalize eder. Alfa-laktalbümin, birinci alt birim ile kombinasyon halinde, disakkariti oluşturmak için UDP-galaktoz ve glikoz birleşimini katalize eder. Gebelik döneminde fetüsün bağırsağındaki enzim konsantrasyonu artar [40, 45].

Laktoz, memelilerin sütündeki kuru maddenin ana bileşenidir. Bu molekülün miktarı, yağ ve proteinlerle ters orantılı olduğu saptanmıştır. Laktoz miktarı, insan, inek, koyun ve keçi sütlerindeki ortalama değerleri sırasıyla  $70 \text{ g L}^{-1}$ ,  $48 \text{ g L}^{-1}$ ,  $41 \text{ g L}^{-1}$  ve  $46 \text{ g L}^{-1}$  şeklinde değiştiği belirlenmiştir [40, 46].

Laktoz, kıvam ve yapışkan gibi fizikokimyasal özellikleri nedeniyle işlenmiş etler, margarinler, kahvaltılık gevrekler, hazır yemekler ve gıda takviyeleri gibi pek çok gıdada bileşen olarak kullanılmaktadır [40, 47].

İnsan vücudundaki fizyolojik kullanımı için laktoz, bağırsakta laktaz enzimi tarafından önceden hidrolize edilmelidir. Laktoz ince bağırsağa ulaştığında, glikoz ve galaktoza parçalanır. Her iki monosakkarit, membran proteinlerinin aracılığıyla aktif taşıma yoluyla absorbe olurlar. Söz konusu absorpsiyon, SGLUT 1 (Sodyum-Glikoz Bağlantılı Taşıyıcı 1) taşıyıcısı ile aktif transportla gerçekleşir. Monosakkaritler daha sonra GLUT 2 (Glukoz Taşıyıcı 2) ile kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla kanda taşınırlar. Glikoz bir enerji kaynağı olarak kullanılırken, galaktoz hem enerji hem de glikolipidlerin ve glikoproteinlerin bir bileşeni olarak kullanılabilir [40, 48, 49].

Emilmeyen laktoz, ozmotik aktiviteye sahiptir. Sıvıyı ve elektrolitleri bağırsak lümenine çeker. H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gibi gazlar üreten bağırsak bakterileri tarafından fermente edilir. Sonuçta çok sayıda molekül bağırsaklarda oluşarak büyük bir ozmotik basınca sebep olur [40, 50].

#### 1.5.4 βGal'ın Saflaştırılması

βGal, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, affinite kromatografisi, çinko klorür, protamin sülfat ve amonyum sülfat çöktürme gibi farklı ayırma teknikleri ile farklı kaynaklardan saflaştırılmıştır [7].

Chakraborti ve ark., *Bacillus sp* MTCC 3088 kaynağından βGal enzimini 36,2 kat saflaştırmıştır. Bu amaçla sırasıyla ZnCl<sub>2</sub> çöktürmesi, iyon değişimi, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılmıştır. İşlem sonunda % 12,7'lik saflaştırma verimi elde edilmiştir [51]. Juajun ve ark., *Bacillus licheniformis* DSM 13 organizmasını kaynak olarak kullanıp, βGal enzimini saflaştırmıştır. Saflaştırma işlemini affinite kromatografisi kullanarak yapmıştır. Çalışmalar sonucunda βGal enzimini 5,3 kat ve %73'lük verim ile saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [52]. Ayrıca, Karan ve ark., βGal enzimini jel filtrasyon ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzim kaynağı olarak *Halorubrum lacusprofundi* organizmasını kullanmışlardır. Saflaştırma katsayısını 29,47 ve % 17,82'lik bir verim elde ettikleri saptanmıştır [53]. Steers ve ark., *Escherichia coli* kaynağını kullanarak βGal enzimini affinite kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırma işleminin sonucunda % 95 verim elde etmişlerdir [54]. Pisani ve ark., iyon değişim ve affinite kromatografi yöntemleri ile βGal enzimini *Sulfolobus solfataricus* kaynağından saflaştırmışlardır. Çalışmalar sonucunda söz konusu enzimi 966 kat ve % 28'lik verim ile saflaştırdıkları rapor edilmiştir [55]. Ayrıca Distler ve ark., βGal enzimini affinite kromatografisi ile sığır testislerinden 600 kat saflaştırmıştır [56]. Hung ve ark., *Bifidobacterium infantis* HL96 organizması kaynak olarak kullanılarak rekombinant βGal enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi için iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Sonuçta 15.5 kat enzim saflaştırılmıştır [57]. Fisher ve ark., βGal enzimini termofilik mantar olan *Thermomyces lanuginosus*'dan sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimi 1212,1 kat saflaştırabilmiş ve %12'lik verim elde etmişlerdir [58]. Pal ve ark., önce amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle badem (*Amygdalus communis*)'den βGal enzimini

50,9 kat saflaştırmışlardır. Hesaplanan verim %33'tür [59]. Kang ve ark., Trabzon hurması meyvesinden  $\beta$ Gal enzimi 114 kat ve %15 verimle jel filtrasyon ve iyon değişim kromotografisi kullanılarak saflaştırmışlardır [60]. Rao ve ark., *Streptococcus thermophilus* kaynağından  $\beta$ Gal enzimini jel filtrasyon ve iyon değişim kromotografisiyle 56 kat %25 verimle saflaştırmışlardır [61].



## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 *Aspergillus niger*

Tez çalışmasında ana kültür olarak kullanılmış olan *Aspergillus niger*, Nisan 2019 tarihinde Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'den temin edilmiştir.

#### 2.1.2 Kullanılan Cihazlar ve Aletler

**Tablo 2.1:** Deneysel çalışmada kullanılan cihazlar ve aletler.

Hassas Terazı	WeightLab WL-603 Hassas Terazı
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart Isıtıcı
U.V Spektrofotometresi	HACH DR 6000
pH Metre	MettlerToledo
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Soğutmalı Santrifuj	SIGMA 2-16PK
Elektroforez Sistemi	BIORAD
Otoklav	HİRAYAMA
Vorteks	HEIDOLPH Reax Control Vortex
Kromotografi kolonu	Sigma (1,5x10 cm)

### 2.1.3 Araştırma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

**0,5 M HCl çözeltisi:** 0,5 M (0,125 mol) HCl' den 400 mL distile su üzerine 20,88 mL ilave edilip son hacmi 500 mL' ye getirildi.

**1 M NaOH çözeltisinin:** 1 M (0,25 mol) NaOH' dan 20 g tartılıp bir miktar saf su ile çözülür. Çözeltinin son hacmi 250 mL' ye getirilir.

#### 2.1.3.1 aßGal'ın Üretimi İçin Katı Besi Yeri Ortamının Hazırlanması

%3'lük Malt ve %2'lik Agar olacak şekilde sırasıyla 6 g ve 4 g ilgili maddeler tartılarak 200 mL' ye saf su ile tamamlanarak çözelti hazırlandı.

#### 2.1.3.2 Sıvı Besi Yeri Ortamının Hazırlanması (pH 5)

aßGal'ın üretimi için kullanılan sıvı besi yeri ortamının içeriği ve miktarları aşağıda verilmiştir.

5,6 g amonyum sülfat, 8 g potasyum dihidrojen fosfat, 1,2 g magnezyum sülfat heptahidrat, 0,6 g kalsiyum klorür tartılır ve ilgili maddelerin tamamı 960 mL 100 mM pH 5 olan sitrat tamponunda çözülür. Daha sonra çözeltiliye 0,6 g üre, 1 g TW20, 3 g pepton ve 20 g laktoz ilave edilir. Son olarak aşağıdaki şekilde hazırlanan gerekli eser element çözeltisinden 40 mL ilave edilerek son hacim 2 L' ye tamamlanır.

Sıvı besi yeri ortamında gerekli olan eser elementler ve çözeltileri ise aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Eser elemen çözeltisi, 0,50 g demir (II) sülfat, 0,16 g mangan sülfat heptahidrat ve 0,14 g çinko sülfat monohidrat tartılarak son hacmi 2 L olacak şekilde hazırlanır.

### 2.1.3.3 $\beta$ Gal Aktivite Tayini İçin Çözeltiler

**0,1 M Fosfat Tamponu (pH 7):** 2,22 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 1,95 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  distile suda çözülerek 250mL' ye tamamlanır. Çözeltinin pH değeri 1M NaOH kullanılarak ayarlanır (pH 7).

**0.01M ONPG çözeltisi:** 0,030 g ONPG, fosfat tamponu (pH 7) içinde çözülerek son hacim 10mL ' ye aynı tampon kullanılarak tamamlandı. Söz konusu çözelti her kullanımdan önce taze hazırlandı.

**1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  Çözeltisi:** 31 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  distile suda çözülerek son hacim 250 mL' ye tamamlandı.

### 2.1.3.4 $\beta$ Gal Enziminin Saflaştırılması İçin Kullanılan Çözeltiler

**0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  Tamponu:** 4,20 g (0,1 mol)  $\text{NaHCO}_3$  450 mL saf su içinde çözüldü. 1M NaOH vasıtasıyla pH 10.00' a ayarlandı ve çözeltinin son hacmi 500 mL yapıldı.

**0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  Tamponu:** 4,20 g (0,1 mol)  $\text{NaHCO}_3$  225 mL saf su içinde çözüldü. 1M NaOH vasıtasıyla pH 8,8'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 250 mL yapıldı.

**0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Tamponu:** 0,88995 g (0,01 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  450 mL saf su içinde çözüldü. 1M HCl ile pH 6' ya ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 500 mL' ye tamamlandı.

**Hidrofobik özellikte olan jeli dengeleme tamponu:** 14,196 g (0,05 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 132,14 g (1 mol)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  950 mL saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 8,0' e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 1000 ml' ye tamamlandı.

**Hidrofobik jele tutunan  $\beta$ Gal enziminin elüsyon işlemi için kullanılan tampon:** 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu; 7,1 g (0,1 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  450 mL saf su ile çözüldü. 1M HCl kullanılarak pH 8,0' de sabitlendi. Tampon çözeltinin son hacmi 500 mL yapıldı.

**Çökelek Tamponu:** 0,1 M sitrik asit (pH5,2), 4,3545 g (0.01 mol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ve 8,925 g (0.01 mol)  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  tartılır. 200 mL saf su içinde çözülür. Son pH 5,2' de sabitlenip son hacim 250mL' ye tamamlanır.

### 2.1.3.5 Kantitatif Protein Tayini Yapmak Amacıyla Hazırlanan Çözelti

**Coomassie brilliant blue çözeltisi;** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi 62,5 mL %95' lik etil alkol içinde çözüldü. Devamında çözeltinin içerisine 125mL fosforik asit katıldı. Hazırlanan çözeltinin son hacmi saf su ile 250 mL' ye tamamlandı.

### 2.1.3.6 Hidrofobik Etkileşim Tekniğiyle Saflaştırılan Enzimin Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

aßGal enziminin saflığının kontrolünde SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla kullanılan numune ve yürütme tamponu Tablo 2.2 ve 2.3' te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 2.2:** SDS-PAGE' de kullanılan numune tamponunda yer alan maddeler ve miktarları.

<b>Madde</b>	<b>Miktar</b>
Gliserol	4,0 mL
%10'luk SDS	8,0 mL
Bromofenol mavisi	0,02 mL
B-merkaptotanol	2 mL
Saf su	1 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6,8)	5 mL

**Tablo 2.3:** SDS-PAGE' de kullanılan yürütme tamponunda yer alan maddeler ve miktarları.

<b>Madde</b>	<b>Miktar</b>
Tris-Baz	3 g
Glisin	14,4 g
SDS	10 g

**Elektroforez işlemindeki yığma ve ayırma jelleri:** Enzimin saflığının kontrolü, %10 ve %3 akrilamid konsantrasyonlarında kesikli SDS-PAGE uygulanmıştır. Söz konusu konsantrasyonlar Tablo 2.4' te verildiği şekilde ayarlanmıştır.

**Elektroforez işleminde kullanılan renk reaktifi:** 0,8 g Coomassie brilliant blue G-250, 145,44 mL metil alkol içinde çözüldü. Hazırlanan çözeltinin içine 29,08 mL saf asetik asit ve 145,44 mL distile su eklendi.

**Elektroforez işleminde renk açma reaktifi:** Bu çözelti %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 distile sudan meydana gelmektedir ve sırasıyla maddelerin ölçülen miktarları 37,5 mL, 25 mL ve son olarak 437,5 mL'dir.

**Tablo 2.4:** Elektroforezde kullanılan jeller.

	<b>Ayırma Jeli (%10)</b>	<b>Yığma Jeli (%3)</b>
<b>Akrilamid/Bis(%30)</b>	3,5 mL	0,54 µL
<b>Distile su</b>	4 mL	2,5 mL
<b>1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)</b>	2,5 mL	-
<b>%10'luk SDS</b>	100 µL	40 µL
<b>TEMED</b>	5 µL	4 µL
<b>%10'luk amonyum persülfat</b>	500 µL	266 µL

## 2.2 Kullanılan Yöntemler

### 2.2.1 Katı Besi Yerinde *Aspergillus niger*'in Geliştirilmesi

%3'lük Malt ve %2'lik Agar çözeltisi, tercihe göre petri kaplarına veya deney tüplerine yaklaşık 15'er mL olacak şekilde döküldü. Daha sonra çözeltiler, 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edildi. Sterilizasyon işleminin ardından makul sıcaklığa inen besi yeri steril bir ortamda katılaştır ve *Aspergillus niger* küfünün katı besi yerine zarar vermeyecek şekilde ekimi yapıldı (Şekil 2.1). 30°C' de 1 hafta inkübasyona bırakıldı [62].



Şekil 2.1: Ekim yapılmış besi yeri ortamı.

### 2.2.2 Sıvı Besi Yeri Ortamında aβGal Üretimi

Materyal kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan sıvı besi yeri, 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edildi. Steril olan katı besi yerinde bulunan *Aspergillus niger* saf steril su ile çözelti ortamına alınarak sıvı besi yerine ekimler gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). Daha sonra çalkalamalı inkübatörde 30°C' de 3gün inkübasyona maruz bırakıldı [62].



**Şekil 2.2:** Sıvı besi yerine ekim yapma hazırlık aşaması.

Ekim yapıldıktan sonra, inkübasyon süresi boyunca 24 saatte bir olmak üzere  $\alpha$ Gal aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3 $\alpha$ Gal Aktivite Tayini

$\alpha$ Gal aktivite ölçümünün temel prensibi, substrat olarak kullanılan ONPG' nin enzimatik parçalanması sonucu oluşan renkli bileşiğin (ONP) 410 nm' de spektrofotometrik ölçümüne dayanır [62]. Bu amaçla kullanılan maddeler ve miktarları Tablo 2.5' te verilmiştir.

**Tablo 2.5:**  $\beta$ Gal enziminin aktivite tayini.

	<b>Numune</b>	<b>Kör</b>
Enzim ( $\alpha$ $\beta$ G)	1 mL	-
Substrat (ONPG)	0,6 mL	0,6 mL
Saf Su	0,4 mL	1,4 mL
	*	
1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4 mL	-

\*37°C' de 30 dakika inkübasyon

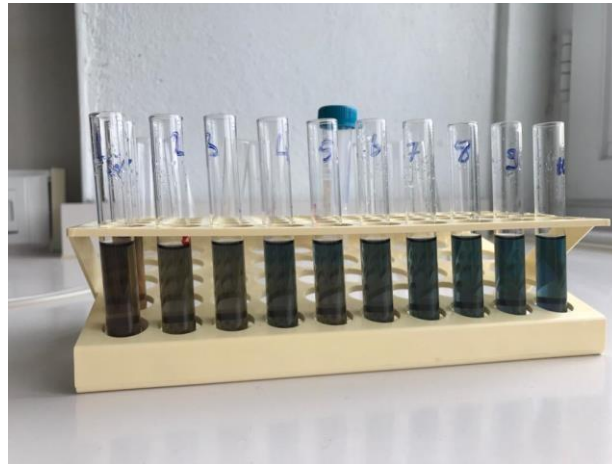
Reaksiyonu durdurmak amacıyla 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edildikten sonra 410 nm' de spektrofotometrede köre karşı ölçüm yapıldı.  $\alpha$ Gal aktivitesi sonucu oluşan ONP' nin miktarı, 410nm 'de ve ilgili koşullarda  $4,5 \cdot 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstraksiyon katsayısı

kullanılarak hesaplandı. Bir enzim ünitesi (EU), yukarıda anlatılan koşullar altında ONPG' den açığa çıkan 1 µmol ONP miktarı olarak tanımlandı [63].

#### 2.2.4 Kantitatif Protein Tayini

Numunelerdeki protein tayini Bradford metoduna göre yapılmıştır. Bu metodun temel prensibi asitli ortamda proteinlerin Coomassie brilliant blue G-250 ile kompleks vermesi esasına dayanır [64]. Protein tayini için öncelikle standart eğri oluşturuldu. Bu amaçla 1 mg/mL serum albümin çözeltileri standart olarak kullanılmıştır. Serum albümin stok çözeltisinden 10 farklı deney tüplerine farklı miktarlarda pipetlemeler yapıldı (0-100 µL). Daha sonra 5mM Fosfat tamponu ile hacimler 0,1 mL'ye tamamladı. Son olarak, her bir tüpe 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifinden eklenerek 10 dakika vortekste karıştırıldı. Elde edilen boya-protein kompleksleri 595 nm' de spektrofotometrede absorbans değerleri belirlenerek standart grafik oluşturuldu. Söz konusu grafik Şekil 3.13' te verilmiştir.

Her bir numunedeki protein-boya kompleksleri, yukarıda belirtilen yöntemler kullanılarak, elde edilmiş ve absorbans değerleri saptanmıştır. Her bir numune için elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları standart eğri kullanılarak belirlenmiştir. İlgili boya-protein kompleksi Şekil 2.3' te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Coomassie brilliant blue G-250- protein kompleksleri.



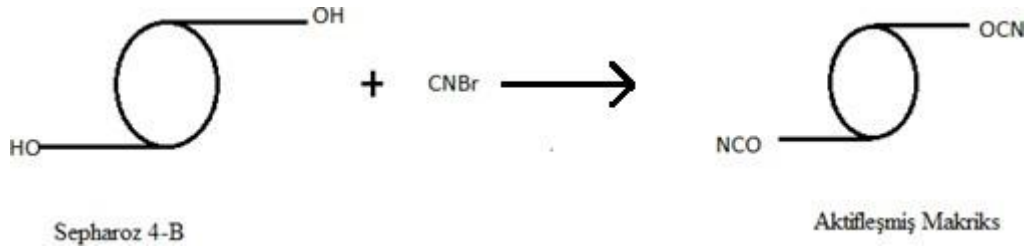
## 2.2.5 aβGal'ın Amonyum Sülfatla Çöktürülmesi

aβGal, hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılmadan önce salting out işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonları (%0-100) elde etmek için katı amonyum sülfat kullanılmıştır. Tartılan amonyum sülfat öncelikle toz haline getirilerek, +4°C ' de örnek içerisine yavaş yavaş karıştırılarak eklendi. Söz konusu şekilde eklenen amonyum sülfatın örnek içinde tamamen çözüldüğü kontrol edildikten sonra, bir gece +4°C' de bekletildi. Daha sonra 10.000 rpm' de +4°C' te 1 saat santrifüj edilerek oluşan çökelek süpernatantdan ayrıldı. Son olarak hedef enzim içerdiği düşünülen çökelek, 0,1 M sodyum fosfat tamponu içinde çözüldü. Bu işlemlerden sonra hem süpernatantta hem de fosfat tamponu içine alınan çökelekte aβGal aktivitesi gerçekleştirildi.

## 2.2.6 aβGal Enziminin Hidrofobik Etkileşim Tekniği ile Saflaştırılması

### 2.2.6.1 Hidrofobik Etkileşim Tekniğinde Kullanılan Jel Sentezi

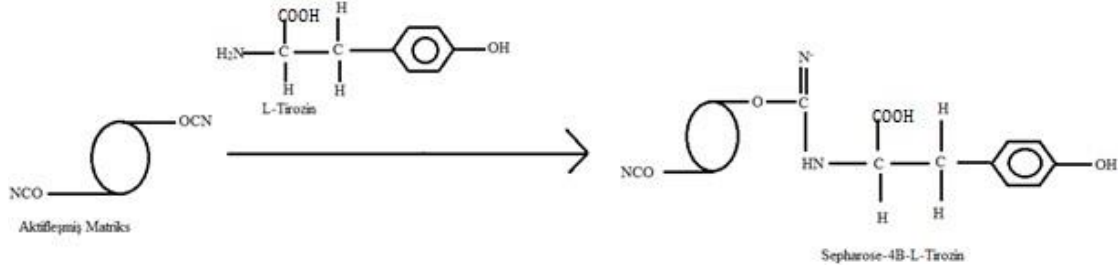
aβGal enziminin saflaştırılmasında kullanılan jelin sentezi için Sinan ve ark. tarafından geliştirilen metot uygulanmıştır [65]. Hidrofobik karakterde ligantın Sepharose 4B' ye bağlanması için aktifleştirme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem Sepharose 4B, CNBr ile muamele edilerek gerçekleştirildi. İlk olarak 50 mL Sepharose 4B saf su ile iyice yıkandıktan sonra üzerine 80 mL CNBr eklendi. Yavaş tempoda karıştırılan örneğin pH değeri 11' e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH değerinde muhafaza edildi. İlgili aktivasyon reaksiyonu şekil 2.4' te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Sepharose 4B aktifleştirme basamağı.

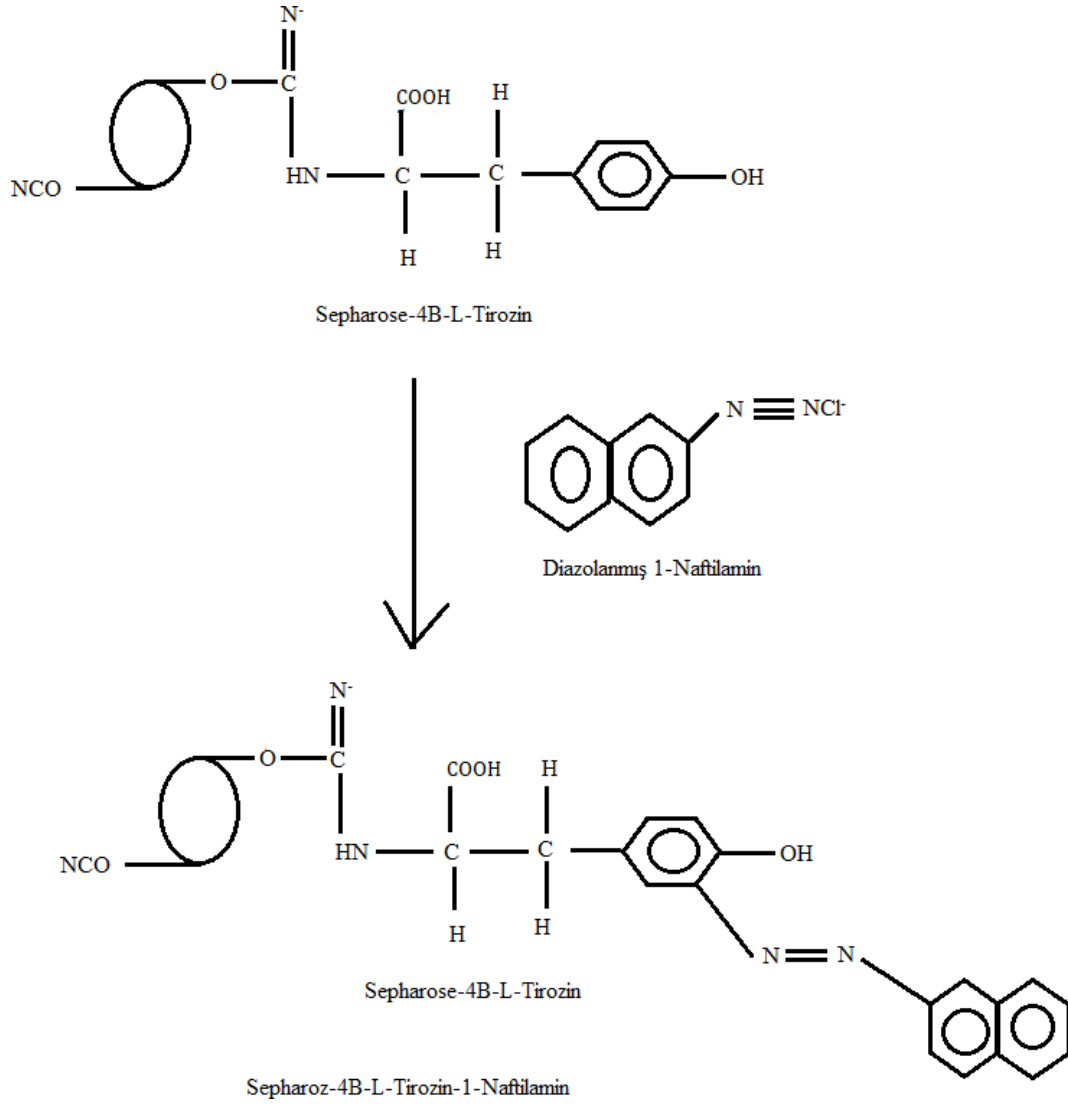
Hazırlanan aktifleşmiş matriks üzerine 50mL'sinde 0,0375 g tirozin içeren soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH:10) tamponu ilave edildi. Elde edilen süspansiyon 1,5 saat boyunca

karıştırıldı. Daha sonra karışım 1 gece +4°C’ de bekletildi ve jel, reaksiyona girmeyen L-tirozin moleküllerini uzaklaştırmak için bol su ile yıkandı. Yıkama işlemine 0,2M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.8) tamponu ile devam edildi. Bu işleme, yıkama çözeltisinin 280nm ‘de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. L-tirozin bağlı matriks 0,2M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.8) tamponu içine alındı (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5:** Aktif Matrikse L-Tirozin bağlanması.

Hidrofobik jelin sentezinin son aşamasında, ligant olarak kullanılan 1-naftilamin bileşiğinin L-tirozine bağlanma işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla 0,12 g 1- naftilamin, ortalama 0 °C sıcaklıkta 40 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 0,375 g NaNO<sub>2</sub> içeren 0°C ‘ deki çözelti, 1-naftilamin karışımına oldukça yavaş tempoda ilave edildi. Bu işleme yaklaşık olarak 11-13 dakika devam edildi. İşlem sonucunda söz konusu ligant, diazolanarak L-tirozine bağlanmaya hazır hale getirildi. Daha sonra diazolanmış naftilamin süspansiyona yavaş yavaş eklenerek, yaklaşık 3,5 saat karıştırıldı. Bu işlemler soğuk ortamda ve pH 9,5’ ta gerçekleştirildi. Karıştırma işlemi bittikten sonra hidrofobik karakterdeki jel, bol soğuk su ile yıkandıktan sonra ardından 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6) ile yıkama işlemine devam edildi ve jel aynı tamponda muhafaza edildi. Saflaştırma işleminde kullanılan jelin kimyasal yapısı ve kenetlenme reaksiyonu Şekil 2.6’ da verilmiştir.



**Şekil 2.6:** 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması.

### 2.2.6.2 aβGal Enzimi Safılaştırma Basamağı

Tarafımızca sentezlenen hidrofobik karakterdeki jel, boyutları 1,5 x10 cm olan kolona uygun bir şekilde paketlenmiştir (Şekil 2.7). Daha sonra 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) tamponu ile kolonun dengeleme işlemi gerçekleştirildi.



**Şekil 2.7:** Kolona paketlenmiş jel.

%90 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örnek yaklaşık 5 mL dengeleme tamponu içinde çözüldü ve kolona yüklendi. Daha sonra yıkama işlemi aynı tampon kullanılarak gerçekleştirildi.

Elüsyon işlemi,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gradienti oluşturularak gerçekleştirildi. Bu amaçla 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8 ) ve 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tamponları kullanılmıştır. Ortamdaki tuz konsantrasyonu yavaş yavaş tuzsuz tampon aracılığıyla azaltılarak jele tutunmuş enzimin jelden uzaklaşması sağlandı. Saflaştırma basamakları sırasında örnekler 2 mL fraksiyonlar halinde toplandı. Toplanan örneklerin tamamında 280 nm’ de protein tayinleri yapılmıştır. Protein içeren fraksiyonlarda a $\beta$ Gal aktivite işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.7 a $\beta$ Gal Enziminin Elektrofrez**

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan a $\beta$ Gal enziminin elektrofrez işlemi farklı akrilamid konsantrasyonlarında (ayırma jeli %10, yığma jeli %3) gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez işlemine başlamadan önce kullanılan cam plakalar saf su ve ardından etanol ile iyice yıkandı. Söz konusu cam plakalar uygun şekilde sabitlendikten sonra önce ayırma jeli daha sonra yığma jeli elde edildi. Örnekleri uygulamak için yığma jeli polimerleşmeden önce tarak sabitlenerek kuyucuklar oluşturuldu [66].

Elektroforez işlemi uygulanacak örnekler, numune tamponuna alınarak 90°C' de 5 dakika ısıtıldı. Bu sayede denatüre olan örnekler soğutulduktan sonra düzenekteki kuyucuklara uygun şekilde yüklendi. Sistem tamamen kapatıldıktan sonra ilk olarak 80V'ta 60 dakika yürütüldü bu süre sonunda örnekler yığma jelinde konsantre edilmiş oldu. Bu noktadan sonra akım 120 V olacak şekilde ayarlanarak elektroforez işlemine 2 saat boyunca devam edildi. Örneklerin yürütüldüğü jel cam plakalardan dikkatlice alınarak boyama çözeltisi içerisine yerleştirildi ve 60 dakika boyunca karıştırıldı. Son olarak jel, renk açma işlemi için uygun çözeltiliye alınarak bantlar görüntülendi.

### 3. SONUÇLAR

#### 3.1 Katı Besi Yerinde Küf Üretimi

Katı besi yeri olarak malt ve agar, materyal yöntem bölümünde belirtilen oranlarda kullanılarak, *Aspergillus niger* hem petri kabında hem de deney tüpünde üretilmiştir. Bu amaçla steril ortamda ekim yapılmış ve 30°C’ de bir hafta sonra sonuçlar gözlemlenmiştir. Elde edilen bulguların görüntüleri Şekil 3.1 ve 3.2’ de verilmiştir.



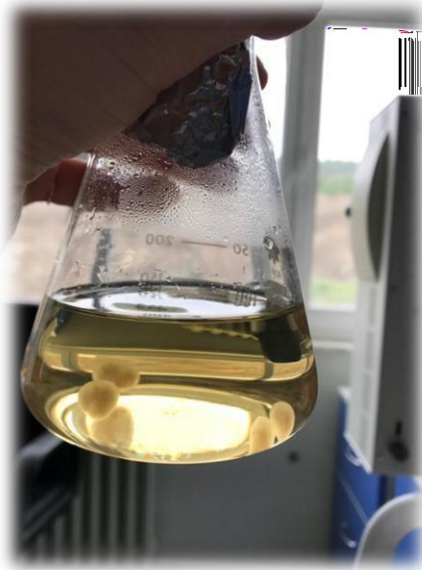
**Şekil 3.1:** Petri kabında inkübasyon sonucu oluşan küf kültürü.



**Şekil 3.2:** Deney tüpünde inkübasyon sonucu oluşan küf kültürü.

### 3.2 Sıvı Besi Yeri Ortamında Üretim

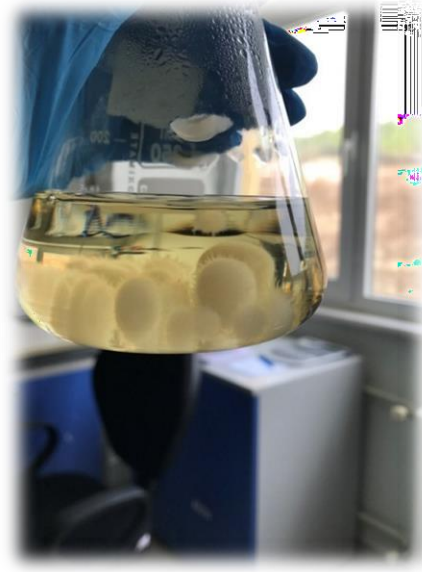
Sıvı besi yeri ortamı ilgili maddelerin yöntemler kısmında belirtilen miktarlarda hazırlanıp otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra *Aspergillus niger*, katı besi yerinden alınarak gerekli ekimler yapılmıştır. Son olarak örnekler, gerekli inkübasyonlardan sonra a $\beta$ Gal enzimi üretilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.3:** a $\beta$ Gal enzimini içeren sıvı besi yeri ortamı. a) 24 saat.



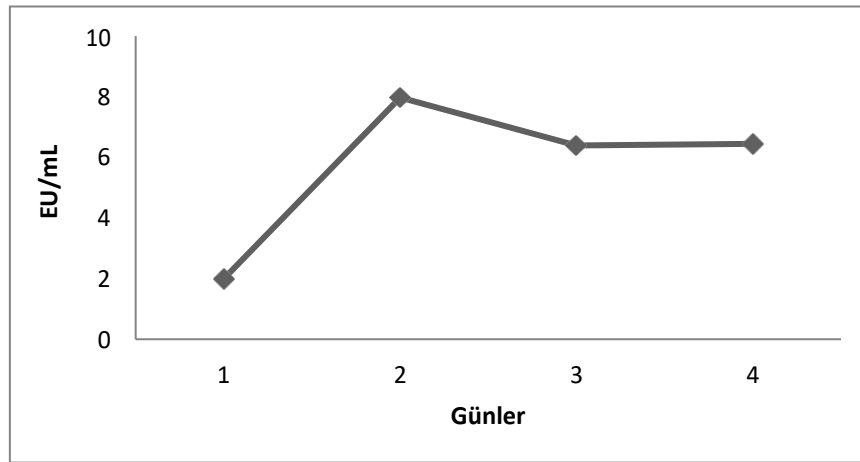
Şekil 3.3 (devam) b) 48 saat.



c) 72 saat.

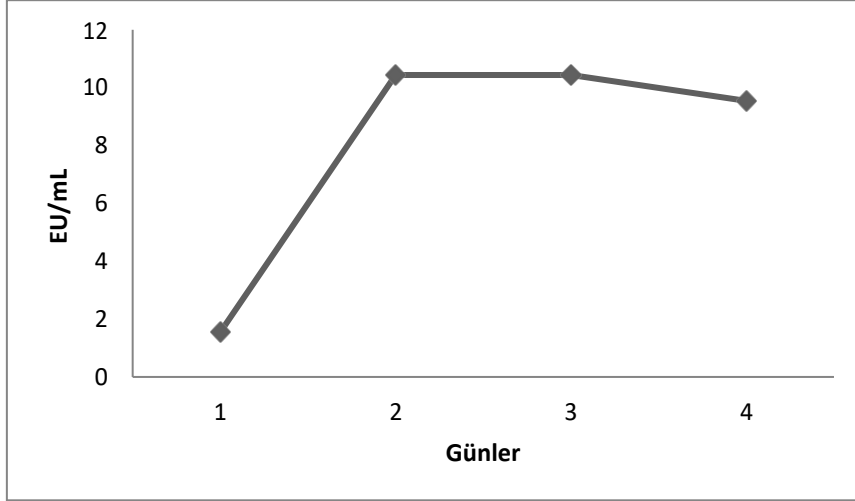
### 33 Farklı Laktoz Konsantrasyonlarında a $\beta$ Gal'in Aktiviteleri

a $\beta$ Gal'in doğal substratı olan farklı konsantrasyonlarda laktoz içeren sıvı besi yeri ortamları hazırlanarak, substratın enzim üretimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla sıvı besi yeri ortamında belirli periyotlarda enzim aktivitesi yapılarak a $\beta$ Gal'in üretimi takip edilmiştir. Bu işleme dört gün boyunca devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 3.4).

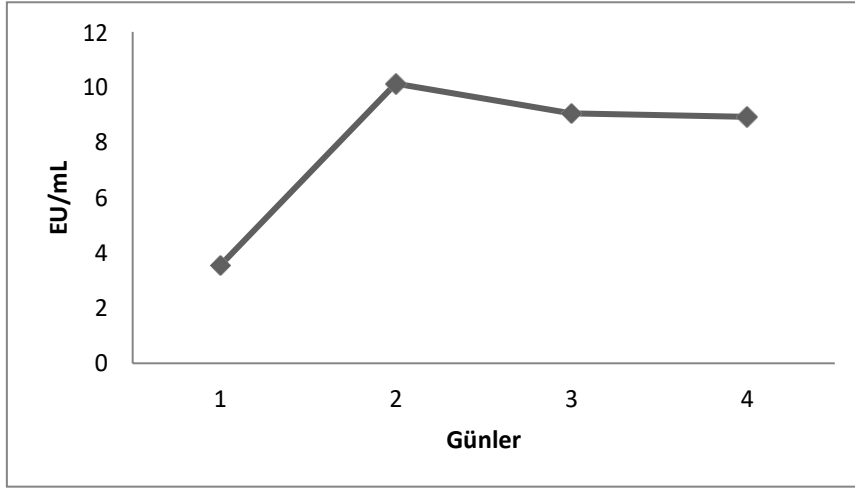


Şekil 3.4: Farklı konsantrasyonlarda laktoz içeren sıvı besi yeri ortamındaki enzim aktiviteleri. a) 0,01 M.

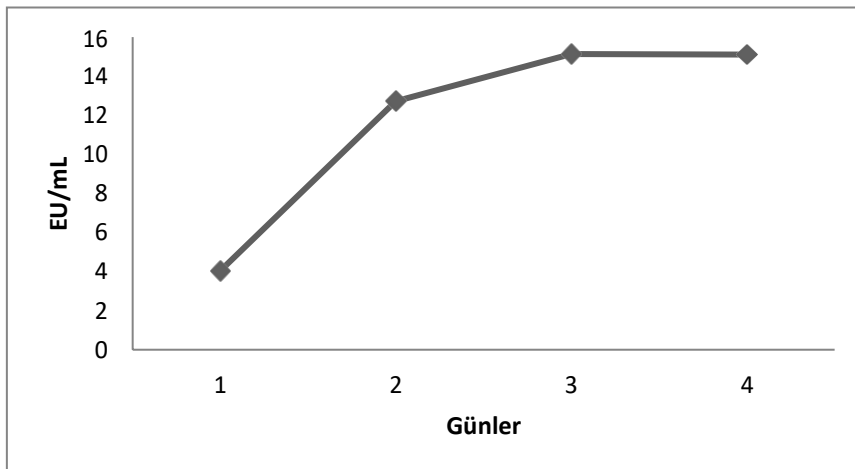




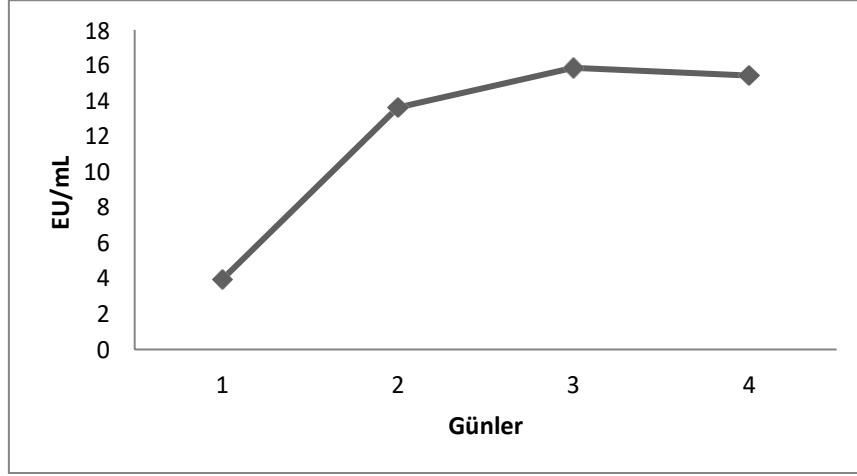
b) 0,023M.



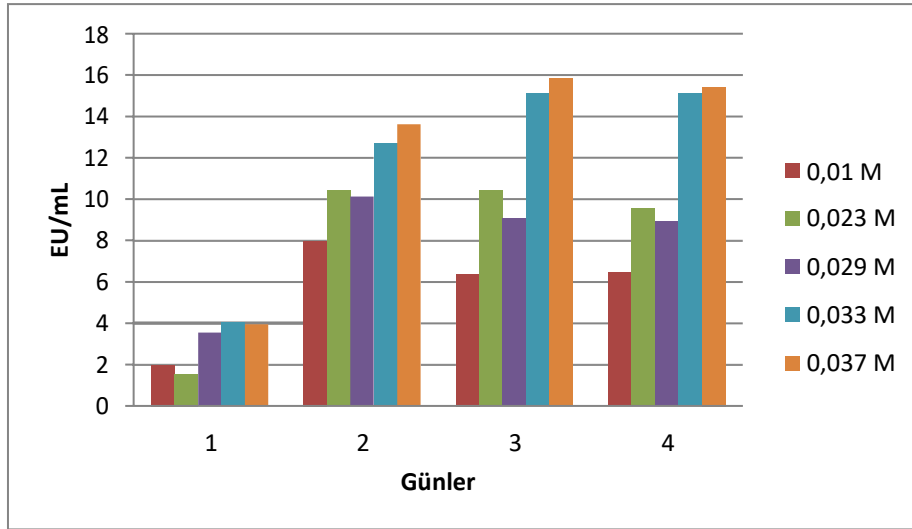
c) 0,029M.



Şekil 3.4 (devam) d) 0,033M.



Şekil 3.4 (devam) e) 0,037M.



Şekil 3.5: Değişik düzeylerde laktoz içeren sıvı besi yeri ortamındaki enzim aktivitelerin toplu olarak gösterimi.

### 34 aβGal'ın Aktivite Takibi

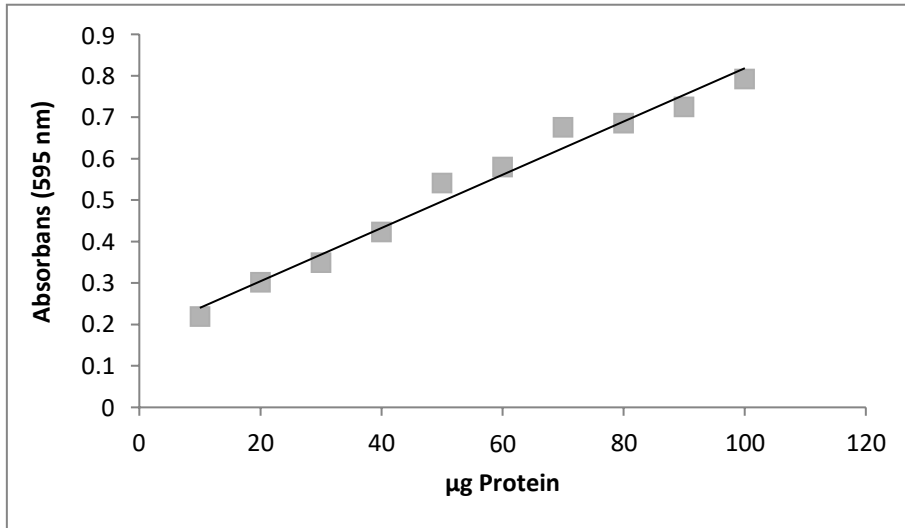
aβGal'ın, ONPG substratı kullanılarak sekiz hafta boyunca aktivite tayinleri yapılmıştır. Söz konusu analizler yedi günde bir tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6'da verilmiştir.



**Şekil 3.6:** Haftalık Aktivite Takip Sonuçları.

### 35 Kantitatif Protein Tayini

Ham ekstraktta ve HEK sonrası elde edilen fraksiyonlarda kantitatif protein tayini yapılmıştır. Bu amaçla, Comassie brilliant blue G-250 proteinlerin asitli ortamda oluşturdukları kompleksin renk şiddetinin ölçülmesine dayanan Bradford yöntemi kullanılmıştır. Standart eğrinin oluşturulması için serum albümin proteini kullanılmıştır. Elde edilen standart eğri grafiği Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.7:** Numunelerdeki protein tayini için kullanılan standart eğri.

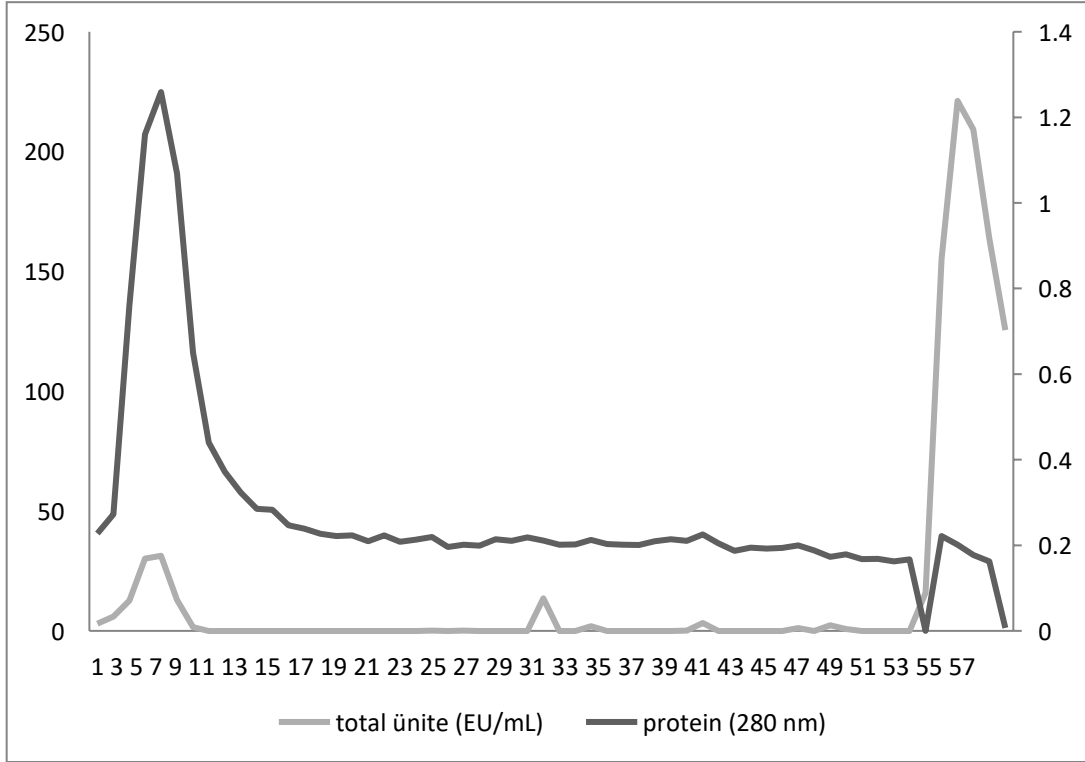
## **3.6 aβGal'ın Saflaştırılması**

### **3.6.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Üretilen besi ortamından alınan örnekler amonyum sülfat çöktürmesi ile derişik hale getirilmiştir. Bu amaçla farklı doygunluk oluşturacak şekilde amonyum sülfat kullanıldı. En uygun amonyum sülfat yüzdesi 90 olarak tespit edilmiştir. Bu yöntemle aβGal'ın konsantre edilmesi sağlanırken daha da önemlisi HEK için hazır hale getirilmiştir.

### **3.6.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel ile paketlenmiş ve dengelenmiş kolona, amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılan aβGal yüklenmiştir. Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde yıkama elüsyon işlemleri ilgili çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm fraksiyonlarda kalitatif protein tayinleri yapılmıştır. Protein içeren fraksiyonlarda ise ONPG substratı kullanılarak enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Hem ham ekstrakta hem de amonyum sülfat çöktürmesi ve HEK'ten elde edilen fraksiyonlarda enzim aktivitesi ve protein tayini gerçekleştirilmiştir. Her bir numune için spesifik aktiviteler ayrı ayrı hesaplanmıştır. Son olarak saflaştırma dereceleri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8 ve Tablo 3.1'de verilmiştir.



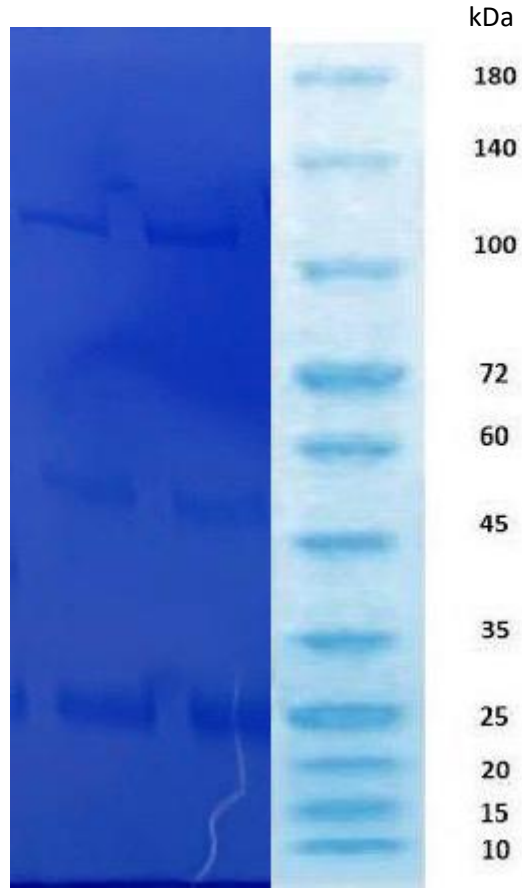
Şekil 3.8: aGal'ın HEK ile saflaştırılması.

Tablo 3.1: aGal'ın Saflaştırma Tablosu.

Saflaştırma Basamağı	Total Hacim (mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	37	0,01961	0,72557	22,22	822,21	1141,96	100	-
Hidrofobik Etkileşim Kromotografisi	2	0,00083	0,00165	221,17	442,35	268091	53,8	234,76

### 3.7 SDS-PAGE İle aGal Saflık Kontrolü

aGal'ın saflık kontrolü için Bölüm 2.2.7'de anlatıldığı biçimde deney yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.9:** SDS-PAGE işlemi ile elde edilen a $\beta$ Gal bantları.

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Aspergillus niger*'den Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim jeli kullanılarak  $\beta$ Gal, ilk defa tarafımızca saflaştırılmıştır.  $\beta$ Gal, özellikle süt endüstrisinde büyük oranda kullanım alanı bulmuştur. Süt, besleyici bir gıdadır ve sağlıklı beslenmenin en önemli parçasıdır. Ne yazık ki birçok tüketici laktoz intoleransı nedeniyle sütün faydalarından yararlanamamaktadır [3].  $\beta$ Gal enzimi kullanılarak laktozsuz süt üretimi gerçekleştirilmektedir. Ancak maliyetinin yüksek olması birçok tüketiciyi olumsuz etkilemektedir [13]. Bunun en önemli nedeni laktozsuz süt üretiminde kullanılan  $\beta$ Gal'in saflaştırılmasının zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olmasıdır. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi  $\beta$ Gal sadece laktoz intoleransına sahip kişiler için laktozsuz süt üretmek değil aynı zamanda sütün tatlılık derecesini de arttırmaktadır [8, 15]. Ayrıca enzimin transgalaktozilasyon aktivitesiyle prebiyotik sentezinde oldukça önemli olduğu bilinmektedir.

Araştırmamızda  $\beta$ Gal enziminin saflaştırılması için kaynak olarak *Aspergillus niger* seçilmiştir. Söz konusu enzim insanları da kapsayan birçok canlıda bulunmasına rağmen genellikle mikrobiyal kaynaklar tercih edilmiştir [3, 7]. Bunun en önemli nedeni ilgili organizmaların üretiminin ucuz ve replikasyonunun kısa sürede gerçekleşmesidir. *Aspergillus niger* organizmasının enzim kaynağı olarak seçilmesinde, ucuz, üretiminin kolay olmasına ilaveten patojen olmaması da önemli rol oynamıştır.

Enzim üretiminde daha önceden standartize edilen metod kullanılmıştır. Bu nedenle enzim üretimi üzerine pH, sıcaklık ve iyonik şiddet gibi parametrelerin etkisini belirleme gereği duyulmamıştır [62]. Ayrıca enzimin kinetik özellerinin saptanması konusunda da benzer nedenlerden dolayı çalışmalar yapılmamıştır. Literatürde bu konuda pek çok çalışma vardır. Söz konusu çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında önemli bir çelişki yoktur [3, 7, 21, 37, 62].

$\beta$ Gal'in hidrolitik aktivitesi, spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Literatürde daha çok substrat olarak laktoz ve ONPG kullanılmasına rağmen araştırmamızda ONPG substratının kullanılması düşünülmüştür. Bunun en önemli nedeni  $\beta$ Gal'in ONPG substratına karşı ilgisinin doğal substratına göre daha yüksek olmasıdır. ONPG için bulunan  $K_m$  değeri 54 mM iken laktoz için aynı değer 99 mM olarak saptanmıştır [74]. Ayrıca, ONPG'nin enzimatik parçalanması sonucu oluşan bileşiğin (ONP) hem renkli hem de belirli ölçüde

kararlı olması substrat tercihinde önemli ölçüde etkili olmuştur. ONPG substratının bir diğer avantajı ise hidroliz ürününün (ONP) fenolik ve fenolat yapısının yaklaşık aynı absorbansa sahip olmasıdır [62].

Araştırmamızın en önemli hedefi, maliyeti düşük ve pratik bir yöntemle  $\beta$ Gal enzimini saflaştırmaktır. Bu amaçla araştırma ekibimiz tarafından daha önce sentezlenen Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel, tarafımızca tekrar sentezlenmiştir. Söz konusu jel kullanılarak, farklı kaynaklardan Paroksanaz enzimi yüksek düzeylerde saflaştırılmıştır [68-77]. Aynı jelle farklı bir enzimin saflaştırılmasının maliyeti önemli ölçüde düşüreceği kanaatindeyiz.

Araştırmamızda  $\beta$ Gal'ın, tarafımızca sentezlenen jel ile %53,8 verim ve 234,76 derece ile saflaştırılması başarılmıştır. Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli 1,5 x 10 cm ölçülerine sahip kolona paketlenmiştir. 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) çözeltisi ile kolon dengelenmiştir. Kullanılan yıkama çözeltisi 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) olarak tercih edilmiştir. Elüsyon işlemi ise 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8 ) ve 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. HEK kolonuna yüklemeye önce enzim çözeltisinin tuz konsantrasyonunun yüksek olması gerektiğinden öncelikle Amonyum Sülfat çöktürme işlemi uygulanmıştır. Bu işlem ile enzimin saflaştırılmasından daha ziyade hem derişik hem de HEK için uygun hale getirmek hedeflenmiştir. Bu nedenle bu basamakta elde edilen saflaştırma derecesi dikkate alınmamıştır. Literatürde  $\beta$ Gal enzimi farklı yöntemlerle saflaştırılmıştır. Kullanılan yöntemlere göre çok farklı yüzde verimler ve dereceler elde edilmiştir.

Chakraborti ve ark., *Bacillus sp* MTCC 3088 kaynağından  $\beta$ Gal enzimini saflaştırma çalışması yapmıştır. Bu amaç için sırasıyla  $\text{ZnCl}_2$  çöktürmesi, iyon değışimi, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılması sonucu enzim 36,2 kat saflaştırılmıştır. İşlem sonunda % 12,7'lik saflaştırma verimi elde edilmiştir [51]. Ayrıca Juajun ve ark., *Bacillus licheniformis* DSM 13 organizmasını kaynak olarak kullanıp,  $\beta$ Gal enzimini saflaştırmıştır. Saflaştırma işlemini affinite kromografisi kullanarak yapmıştır. Yaptığı çalışmalar sonucunda  $\beta$ Gal enzimini 5,3 kat ve %73'lük verim ile saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [52]. Tarafımızca elde edilen saflaştırma derecelerinin bu çalışmalara göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir.



Karan ve ark.,  $\beta$ Gal enzimini jel filtrasyon ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzim kaynağı olarak *Halorubrum lacusprofundi* organizmasını kullanmışlardır. Saflaştırma katsayısını 29,47 ve % 17,82'lik bir verim elde ettikleri saptanmıştır [53]. Steers ve ark., *Escherichia coli* kaynağını kullanarak  $\beta$ Gal enzimini affinite kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırma işleminin sonucunda % 95 verim elde etmişlerdir [54]. Hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırdığımız  $\alpha\beta$ Gal %53,8'lük değeri söz konusu araştırmaya göre daha düşük olmasına rağmen saflaştırma derecesinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Pisani ve ark., iyon değişim ve affinite kromatografi yöntemleri ile  $\beta$ Gal enzimini *Sulfolobus solfataricus* kaynağından saflaştırmışlardır. Çalışmalar sonucunda söz konusu enzimi 966 kat ve % 28'lik verim ile saflaştırdıkları rapor edilmiştir [55]. Ayrıca Distler ve ark.,  $\beta$ Gal enzimini affinite kromatografisi ile sığır testislerinden 600 kat saflaştırmıştır [56]. Söz konusu saflaştırma derecelerinin çalışmamız sonucunda elde edilen değere göre yüksek olduğu görülmektedir. Ancak çalışmamızda elde edilen verimin yüksek olduğu açıkça görülmektedir.

Bunların dışında farklı kaynaklardan  $\beta$ Gal enzimi değişik yöntemlerle saflaştırılmış ve saflaştırılma dereceleri rapor edilmiştir [59, 61, 78-81.] . Bu sonuçlarla kıyaslandığı zaman tarafımızca sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile elde ettiğimiz saflaştırma derecesinin yüksek olması oldukça önemlidir.

Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak saflaştırılan  $\alpha\beta$ Gal için SDS-PAGE uygulanmıştır. Şekil 3.9'da görüldüğü gibi 3 farklı noktada belirgin bantlar elde edilmiştir. Tarafımızca yapılan elektroforezde elde edilen görüntülerin literatürle benzerlik gösterdiğini söylemek mümkündür [57, 58].

Yüksek lisans tezi olarak planlanan bu çalışmada endüstriyel öneme sahip  $\beta$ Gal enziminin *A. niger*'den HEK ile oldukça pratik ve kısa sürede yüksek verim ve saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir. Bu amaçla kullanılan Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jelin uygun koşullarda muhafaza edilmesi ile uzun süre kullanılabilir olması elde edilen enzimin maliyetini önemli ölçüde düşürecektir. Nitekim, söz konusu kimyasal yapıya sahip jel, araştırma ekibimiz tarafından yıllarca sorunsuz diğer enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Saflaştırma prosedürü üzerinde daha fazla araştırma yapılarak maliyetin düşürüleceği ve saflaştırma derecelerinin daha da artırılacağı

kanaatindeyiz. Ayrıca tarafımızca sentezlenen jelin, belirli hidrofobisiteye sahip bir çok enzimin saflaştırılmasında kullanılabilir potansiyele sahip olması saflaştırma maliyetinin düşmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

Ülkemizde biyomoleküllerin endüstride kullanımı arzu edilir ölçüde değildir. Bu eksikliğin en önemli nedeninin söz konusu moleküllerin tamamına yakının büyük paralar ödenerek ithal edilme yoluna gidilmesidir. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi dünyada milyar dolarlarla ifade edilen büyük bir enzim pazarı oluşmuştur. Yüzde yüz dışa bağımlı olduğumuz enzim ithalatını engellemek için enzim saflaştırılması konusunda daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir. Çünkü yerli enzim üretimi, hem milyonlarca doların ülkede kalmasının hem de enzimlerin endüstride kullanılmasının yaygınlaşmasına sebep olacaktır. Bu nedenle söz konusu çalışmanın yerli enzim üretimi için farkındalık oluşturacağı ve çalışmadan elde edilecek sonuçların gerek temel bilimlerde gerekse gıda mühendisliği alanında yaygın etki göstereceği kanaatindeyiz.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] R. Whitehurst, J. & Van Oort, M. (Eds.), “*Enzymes in food technology*”. John Wiley & Sons, 2009.
- [2] J. Atalah, P. Cáceres-Moreno, G. Espina, & Blamey, J. M., “Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts”. *Bioresource technology*, 280, 478-488, 2019.
- [3] Q. Husain, “ $\beta$  Galactosidases and their potential applications: a review”. *Critical reviews in biotechnology*, 30(1), 41-62, 2010.
- [4] A. J. Queiroz, C. T. Tomaz, & J. M. S. Cabral, “Hydrophobic interaction chromatography of proteins”. *Journal of biotechnology*, 87(2), 143-159, 2001.
- [5] Y. Itan, A. Powell, M. A. Beaumont, J. Burger, & M. G. Thomas, “The origins of lactase persistence in Europe”. *PLoS Comput Biol*, 5(8), e1000491, 2009.
- [6] M. A. A. Gasmala, H. A. Teesema, A. Salaheldin, H. H. Kamal-Alahmad, & W. Aboshora, “Health benefits of milk and functional dairy products”. *MOJ Food Process Technol*, 4(4), 00099, 2017.
- [7] A. Nath, S. Mondal, S. Chakraborty, C. Bhattacharjee, & R. Chowdhury, “Production, purification, characterization, immobilization, and application of  $\beta$ -galactosidase: a review”. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 9(3), 330-348, 2014.
- [8] E. M. Abdelraheem, H. Busch, U. Hanefeld, & F. Tonin, “Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production”. *Reaction Chemistry & Engineering*, 4(11), 1878-1894, 2019.
- [9] C. Türkeş, “Inhibition effects of phenolic compounds on human serum paraoxonase-1 enzyme”. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 1013-1022, 2019.
- [10] T. Hunter, “Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling”. *Cell*, 80(2), 225-236, 1995.
- [11] J. S. Berg, B. C. Powell, & R. E. Cheney, “A millennial myosin census”. *Molecular biology of the cell*, 12(4), 780-794, 2001.
- [12] R. I. Mackie, & B. A. White, “Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output”. *Journal of dairy*

- science*, 73(10), 2971-2995, 1990.
- [13] B. M. Maryam, M. S. S. Datsugwai, & I. Shehu, “The role of biotechnology in food production and processing”. *Industrial engineering*, 1(1), 24-35, 2007.
- [14] Z. S. Olempska-Bier, R. I. Merker, M. D. Ditto, & M. J. DiNovi, “Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review”. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144-158, 2006.
- [15] M. Teuber, “Genetic engineering techniques in food microbiology and enzymology”. *Food Reviews International*, 9(3), 389-409, 1993.
- [16] J. Sawyer, et al., “The application of DNA based techniques for the determination of food authenticity”. *SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*, 272, 220-224, 2001.
- [17] M. L. Sanz, G. R. Gibson, & R. A. Rastall, “Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro”. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5192-5199, 2005.
- [18] C. E. Rycroft, M. R. Jones, G. R. Gibson, & R. A. Rastall, “A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides”. *Journal of applied microbiology*, 91(5), 878-887, 2001.
- [19] A. V. Fowler, & I. Zabin, “The amino acid sequence of  $\beta$ -Galactosidase I. Isolation and composition of tryptic peptides”. *Journal of Biological Chemistry*, 245(19), 5032-5041, 1970.
- [20] G. K. Shoemaker, D. H. Juers, J. M. Coombs, B. W. Matthews, & D. B. Craig, “Crystallization of  $\beta$ -galactosidase does not reduce the range of activity of individual molecules”. *Biochemistry*, 42(6), 1707-1710, 2003.
- [21] Z. Nagy, T. Kiss, A. Szentirmai, & S. Biró, “ $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme”. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 24-29, 2001.
- [22] M. T. Flood, & M. Kondo, “Toxicity evaluation of a  $\beta$ -galactosidase preparation produced by *Penicillium multicolor*”. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 40(3), 281-292, 2004.
- [23] R. Klewicki, “Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with  $\beta$ -galactosidase”. *Food Chemistry*, 100(3), 1196-1201, 2007.
- [24] D. H. Lee, S. G. Kang, S. G. Suh, & J. K. Byun, “Purification and

- characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*)". *Molecules and cells*, 15(1), 68-74, 2003.
- [25] M. A. Boon, A. E. M. Janssen, & K. Van't Riet, "Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides". *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 271-281, 2000.
- [26] Y. Tanaka, A. Kagamiishi, A. Kiuchi, & T. Horiuchi, "Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*". *The Journal of Biochemistry*, 77(1), 241-247, 1975.
- [27] C. Picard, J. Fioramonti, A. Francois, T. Robinson, F. Neant, & C. Matuchansky, "Bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits". *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512, 2005.
- [28] T. Vasiljevic, & P. Jelen, "Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude  $\beta$ -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 175-184, 2002.
- [29] C. G. Vinderola, & J. A. Reinheimer, "Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance". *Food Research International*, 36(9-10), 895-904, 2003.
- [30] C. S. Kim, E. S. Ji, & D. K. Oh, "A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions". *Biochemical and biophysical research communications*, 316(3), 738-743, 2004.
- [31] S. R. Tello-Solís, et al., "Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase by Circular Dichroism and Its Structure–Activity Relationship as a Function of the pH". *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 10200-10204, 2005.
- [32] L. F. Pivarnik, A. G. Senecal, & A. G. Rand, "Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial  $\beta$ -galactosidase (lactase) in food processing". In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 38, pp. 1-102). Academic Press, 1995.
- [33] R. Rech, & M. A. Z. Ayub, "Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey". *Process*

- Biochemistry*, 42(5), 873-877, 2007.
- [34] N. Albayrak, & S. T. Yang, “Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase on tosylated cotton cloth”. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 371-383, 2002.
- [35] T. Vasiljevic, & P. Jelen, “Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2), 75-85, 2001.
- [36] T. Haider, & Q. Husain, “Preparation of lactose-free milk by using salt-fractionated almond (*Amygdalus communis*)  $\beta$ -galactosidase”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1278-1283, 2007.
- [37] G. Matioli, F. F. De Moraes, & G. M. Zanin, “Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*”. *Acta Scientiarum*, 25(1), 7-12, 2003.
- [38] X. Li, Q. Z. Zhou, & X. D. Chen, “Pilot-scale lactose hydrolysis using  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton fabric”. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 497-500, 2007.
- [39] T. Haider, & Q. Husain, “Hydrolysis of milk/whey lactose by  $\beta$  galactosidase: a comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme”. *Chemical engineering and processing: process intensification*, 48(1), 576-580, 2009.
- [40] S. Ugidos-Rodríguez, M. C. Matallana-González, & M. C. Sánchez-Mata, “Lactose malabsorption and intolerance: a review”. *Food & function*, 9(8), 4056-4068, 2018.
- [41] F. Alliende, “Intolerancia a la lactosa y otros disacáridos”. *Gastr Latinoam*, 18(supl 2), 152-156, 2007.
- [42] M. C. Rebollar, “La Ciencia y la Tecnología de los Alimentos. Algunas notas sobre su desarrollo histórico”. *Alimentaria*, (350), 19-34, 2004.
- [43] R. R. del Castillo Shelly, & J. M. Lagarriga, *Productos lácteos. Tecnología* (Vol. 161). Univ. Politèc. de Catalunya, 2004.
- [44] A. Varnam, & J. P. Sutherland, “*Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology* (Vol. 1)”. Springer Science & Business Media, 2001.
- [45] T. Palmer, & P. L. Bonner, “*Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical*

- chemistry*". Elsevier, 2007.
- [46] R. G. Jensen, "*Handbook of milk composition*". Academic press, 1995.
- [47] J. L. Herrman, & N. Nakashima, "Conference on International Food Trade Beyond 2000: Science-Based Decisions, Harmonization, Equivalence and Mutual Recognition Melbourne, Australia, Assuring Science-Based Decisions: Expert Advice and Risk Analysis–Validity of the Process and Dealing with Uncertainty". Oct. 1999.
- [48] M. C. Lomer, G. C. Parkes, & J. D. Sanderson, "Lactose intolerance in clinical practice—myths and realities". *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(2), 93-103, 2008.
- [49] M. Amiri, L. Diekmann, V. Köckritz-Blickwede, & H. Y. Naim, "The diverse forms of lactose intolerance and the putative linkage to several cancers". *Nutrients*, 7(9), 7209-7230, 2015.
- [50] I. Labayen, & J. A. Martínez, "Prebióticos y probióticos: Mecanismos de acción y sus aplicaciones clínicas". *Gastroenterol. Hepatol*, 26, 64, 2003.
- [51] S. Chakraborti, R. K. Sani, U. C. Banerjee, & R. C. Sobti, "Purification and characterization of a novel  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus* sp MTCC 3088". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 58-63, 2000.
- [52] O. Juajun, T. H. Nguyen, T. Maischberger, S. Iqbal, D. Haltrich, & M. Yamabhai, "Cloning, purification, and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13". *Applied microbiology and biotechnology*, 89(3), 645-654, 2011.
- [53] R. Karan, M. D. Capes, P. DasSarma, & S. DasSarma, "Cloning, overexpression, purification, and characterization of a polyextremophilic  $\beta$ -galactosidase from the Antarctic haloarchaeon *Halorubrum lacusprofundi*". *Bmc Biotechnology*, 13(1), 3, 2013.
- [54] E. Steers, P. Cuatrecasas, & H. B. Pollard, "The purification of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography". *Journal of Biological Chemistry*, 246(1), 196-200, 1971.
- [55] F. M. Pisani, et al., "Thermostable  $\beta$ -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* Purification and properties". *European Journal of*

- Biochemistry*, 187(2), 321-328, 1990.
- [56] J. J. Distler, & G. W. Jourdian, "The purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from bovine testes". *Journal of Biological Chemistry*, 248(19), 6772-6780, 1973.
- [57] M. N. Hung, & B. Lee, "Purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 439-445, 2002.
- [58] L. Fischer, C. Scheckermann, & F. Wagner, "Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*". *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1497-1501, 1995.
- [59] A. Pal, M. Lobo, & F. Khanum, "Extraction, Purification and Thermodynamic Characterization of Almond (*Amygdalus communis*)[Beta]-Galactosidase for the Preparation of Delactosed Milk". *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 53, 2013.
- [60] I. K. Kang, S. G. Suh, K. C. Gross, & J. K. Byun, "N-terminal amino acid sequence of persimmon fruit [beta]-galactosidase". *Plant physiology*, 105(3), 975-979, 1994.
- [61] M. R. Rao, & S. M. Dutta, "Purification and Properties of Beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*". *Journal of Food Science*, 46(5), 1419-1423, 1981.
- [62] N. A. Kıymaz, "Hypocrea jecorina qm9414 kültürlerinde beta galaktozidazın karakterizasyonu ve kısmi saflaştırılması". 2007.
- [63] M. Becerra, E. Cerdan, & M. G. Siso, "Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification". *Biological procedures online*, 1(1), 48-58, 1998.
- [64] J. Kohn, & M. Wilchek, "A Colorimetric Method For Monitoring Activation Of Sepharose By Cyanogen Bromide" , *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 84(1), 7-14, 1978.
- [65] O. Arslan, M. Erzenin, S. Sinan ve O. Ozensoy, "Purification of mulberry (*Morusalba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties", *Food Chemistry*, 88, 479-484, Dec. 2004.



- [66] L. Saulnier, J. M. Brillouet, and J. P. Joseleau, Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Research*, 182(1), 63-78, Oct. 1988.
- [67] T. H. Nguyen, et al., "Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4989-4998, 2006.
- [68] D. Sayın, D. T. Çakır, N. Gençer, & O. Arslan, "Effects of some metals on paraoxonase activity from shark *Scyliorhinus canicula*". *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 27(4), 595-598, 2012.
- [69] K. Erol, N. Gençer, M. Arslan, & O. Arslan, "Purification, characterization, and investigation of in vitro inhibition by metals of paraoxonase from different sheep breeds". *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 41(2), 125-130, 2013.
- [70] S. Kiranoglu, S. Sinan, N. Gencer, F. Köçkar, & O. Arslan, "In vivo effects of oral contraceptives on paraoxonase, catalase and carbonic anhydrase enzyme activities on Mouse". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), 1048-1051, 2007.
- [71] S. Sinan, F. Kockar, & O. Arslan, "Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics". *Biochimie*, 88(5), 565-574, 2006.
- [72] M. O. Kaya, S. Sinan, Ö. Ö. Güler, & O. Arslan, "Is there a relation between genetic susceptibility with cancer? A study about paraoxanase (PON1) enzyme activity in breast cancer cases". *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1349-1355, 2016.
- [73] N. Gençer, & O. Arslan, "Purification human PON1Q192 and PON1R192 isoenzymes by hydrophobic interaction chromatography and investigation of the inhibition by metals". *Journal of Chromatography B*, 877(3), 134-140, 2009.
- [74] M. O. Karataş et al., "Functionalized imidazolium and benzimidazolium salts as paraoxonase 1 inhibitors: Synthesis, characterization and molecular docking studies". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(6), 1392-1401, 2016.
- [75] Ç. Bilen, S. Beyaztaş, O. Arslan, O., & Ö. Ö. Güler, "Investigation of heavy metal effects on immobilized paraoxanase by glutaraldehyde". *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(3), 440-446, 2013.

- [76] S. Sinan, F. Kockar, N. Gencer, H. Yildirim, & O. Arslan, "Amphenicol and macrolide derived antibiotics inhibit paraoxonase enzyme activity in human serum and human hepatoma cells (HepG2) in vitro". *Biochemistry (Moscow)*, 71(1), 46-50, 2006.
- [77] S. Sinan, F. Kockar, N. Gencer, H. Yildirim, & O. Arslan, "Effects of some antibiotics on paraoxonase from human serum in vitro and from mouse serum and liver in vivo". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(8), 1559-1563, 2006.
- [78] R. R. Saad, "Purification and some properties of beta-galactosidase from *Aspergillus japonicus*". *Annals of microbiology*, 54, 299-306, 2004.
- [79] Z. Nagy, T. Kiss, A. Szentirmai, & S. Biró, "β-Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme". *Protein Expression and Purification*, 21(1), 24-29, 2001.
- [80] J. Y. Lee, M. S. Kwak, J. B. Roh, K. Kim, & M. H. Sung, "Microbial β-galactosidase of *Pediococcus pentosaceus* ID-7: Isolation, cloning, and molecular characterization". *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(3), 598-609, 2017.
- [81] N. A. Greenberg, & R. R. Mahoney, "Rapid Purification of β-Galactosidase (*Aspergillus Niger*) from a Commercial Preparation". *Journal of Food Science*, 46(3), 684-687, 1981.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı** : Özge ALKAYA  
**Doğum Tarihi / Yeri** : 26.02.1996 / Üsküdar  
**e-posta** : [ozgealkaya26@gmail.com](mailto:ozgealkaya26@gmail.com)

### Öğrenim Bilgileri

#### Yüksek Lisans

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (2018-2021)

#### Lisans

Balıkesir Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği (2014-2018)

#### Lise

Atatürk Anadolu Lisesi / BALIKESİR – Karesi ( 2010-2014)