KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURUTULMUŞ NOHUT GRANÜLLERİNDEN (*Cicer arietinum*) β-GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ERDEM KAYA

KOCAELİ 2014

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURUTULMUŞ NOHUT GRANÜLLERİNDEN (*Cicer arietinum*) β-GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ERDEM KAYA

Yrd.Doç.Dr. Yonca DUMAN
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Prof.Dr. Altan ERARSLAN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Prof.Dr. Dilek KAZAN
Jüri Üyesi, Marmara Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 27.06.2014

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Mesleğimin öğrenilmesinde ara kademelerden biri olan yüksek lisans eğitimim sonlanırken mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek ve bu yolda daha çok aşmam gereken engel olduğunun farkında olarak;

Tez konumu belirlemede, deneysel çalışmalarımda aktardığı fikirleriyle, bilgi birikimini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bu tezi yazmamda büyük desteği bulunan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Yonca Duman'a (Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü) emeği ve sabrı için teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, maddi-manevi desteğini esirgemeyen aileme ve dostlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Haziran – 2014 Erdem KAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ ve KISALTMALAR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1.GENEL BİLGİLER 2
1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri 2
1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması 3
1.3. β-Galaktosidaz (Laktaz) Enzimi 4
1.3.1. β-Galaktosidazın bulunduğu başlıca kaynaklar 5
1.4. Laktoz İntoleransı 5
1.5. β-Galaktosidazın Endüstriyel Uygulamaları 6
1.6. Enzim Saflaştırmada Strateji 7
1.7. Enzim Saflaştırmadaki Temel Yöntemler 8
1.7.1. Enzim kaynağından enzimin izole edilmesi: 8
1.7.2. Santrifüjleme 9
1.7.3. Amonyum sülfat çöktürmesi 10
1.7.4. Diyaliz 10
1.7.5. Isıtma 11
1.7.6. İzoelektrik noktasına göre çöktürme 12
1.7.7. Kromatografik yöntemler 13
1.8. Elektroforez 14
1.8.1. SDS – PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi) 14
1.9. TPP (Three Phase Partitioning/ Üç Fazlı Ayırma) Yöntemi 14
2. MALZEME VE YÖNTEM 18
2.1. Malzeme 18
2.2. Yöntem 18
2.2.1. Enzim aktivite ölçümü 18
2.2.2. Protein miktarı ölçümü 19
2.2.3. β-Galaktosidazın ham ekstratının hazırlanması 20
2.2.4. TPP işlemi ve saflaştırma 21
2.2.5. Ekstrat ve saflaştırılan enzim için elektroforez çalışması 22
2.2.6. Zimogram hazırlanışı ve uygulaması 22
2.3. Saflaştırılan β-Galaktosidazın Karakterizasyonu 23
2.3.1. β-Galaktosidaz aktivitesinde pH etkisi 23
2.3.2. β-Galaktosidaz aktivitesinde sıcaklık etkisi 24
2.3.3. Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması 24
2.3.4. Kinetik parametrelerin (K_m, V_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m) belirlenmesi 25

2.3.5. Saflaştırılmış β-galaktosidazın termodinamik parametrelerinin belirlenmesi 27
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 29
3.1. β-Galaktosidazın TPP İle Saflaştırılması ve Aktivite Kazanımı 29
3.1.1. Ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılması üzerine etkisi 29
3.1.2. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılması üzerine etkisi 30
3.1.3. pH'nın TPP üzerine etkisi 31
3.2. Saflaştırma ve Aktivite Kazanımı Sonuçları 32
3.3. TPP Oluşumu İle Saflaştırılan β-Galaktosidazın Karakterizasyonu 33
3.3.1. Saflaştırılmış β-galaktosidaza pH etkisi 33
3.3.2. Saflaştırılmış β-galaktosidaza sıcaklığın etkisi 34
3.3.3. Saflaştırılmış β-galaktosidazın Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması 35
3.3.4. Kinetik sabitlerin hesaplanması 36
3.3.5. Saflaştırılmış β-galaktosidazın termodinamik parametrelerinin belirlenmesi 38
3.4. Sonuç 39
KAYNAKLAR 40
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 46
ÖZGEÇMİŞ 47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Laktozun hidrolizi 4
Şekil 1.2. ONPG'in β-galaktosidaz ile hidrolizi 5
Şekil 1.3. Homojenizasyonda kullanılan aletler. a) ultrasonikatör b) teflon başlıklı homojenizatör c) yüksek devirli bıçaklı homojenizatör 9
Şekil 1.4. Amonyum sülfat çöktürmesi örnek gösterimi 10
Şekil 1.5. Örnek diyaliz uygulaması 10
Şekil 1.6. Örnek protein denatürasyon grafiği 12
Şekil 1.7. TPP'nin uygulanmasıyla oluşan fazların gösterimi 16
Şekil 2.1. ONP standart grafiği 19
Şekil 2.2. Sığır serum albümin standart grafiği 20
Şekil 2.3. v-[S] grafiği 26
Şekil 2.4. 1/v-1/[S] grafiği 26
Şekil 2.5. β-Galaktosidaz ile ONPG hidroliz reaksiyonunda serbest enerji düzeyi diyagramı 28
Şekil 3.1. Farklı ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranlarının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılmasının üzerine etkisi 30
Şekil 3.2. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılmasının üzerine etkisi 31
Şekil 3.3. pH'nın TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılması üzerine etkisi 32
Şekil 3.4. TPP oluşumu ile saflaştırılan β-galaktosidazın elektroforetik analizi 33
Şekil 3.5. ONPG pH'sının aktiviteye olan etkisi 34
Şekil 3.6. Aktivite ve stabiliteye sıcaklığın etkisi 35
Şekil 3.7. Arrhenius grafiği 36
Şekil 3.8. v-[S] grafiği 36
Şekil 3.9. Lineweaver-Burk grafiği 38

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. β-Galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar 5
Tablo 1.2. Dünya'daki β-galaktosidaz yetersizliği 6
Tablo 1.3. Şekerlerin tatlılık oranları 7
Tablo 3.1. Nohuttan TPP ile β-galaktosidaz saflaştırılması sonuçları 32
Tablo 3.2. Nohuttan saflaştırılan β-galaktosidazla 37^{o}C ve pH 2,8'de ONPG hidrolizi için elde edilen kinetik ve termodinamik parametreler 39

SİMGELER DİZİNİ ve KISALTMALAR

R	: Çap, (mm)
V	: Aktivite, (U/ml)

Kısaltmalar

APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenosine Triphosphate (Adenozin trifosfat)
DMF	: N,N-Dimetilformamid
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ONP	: Ortho-Nitrophenol (Orto-Nitrofenol)
ONPG	: Orto-Nitrofenil-β-Galaktopiranosit
PNPG	: Para-Nitrofenil-α-L-arabinopiranosit
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Tuzlu Fosfat Tamponu)
SDS	: Sodium Dodecyl Sulphate (Sodyum Dodesil Sülfat)
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophresis (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
TEMED	: Tetra Etil Metilen Diamin
TPP	: Three Phase Partitioning (Üç Fazlı Ayırma)
X-Gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil β-D-galaktopiranosit

KURUTULMUŞ NOHUT GRANÜLLERİNDEN (*Cicer arietinum*) β-GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

β-D-Galaktosidaz (EC 3.2.1.23, laktaz) laktozu, glikoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen enzimdir. Doğada yaygın olarak bulunur ve bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilir. Bu çalışmada, nohuttan β-galaktosidaz saflaştırılması üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi kullanılarak ilk defa uygulandı. pH 6,8'de, 1:0,5 ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı ve %60 doygun amonyum sülfat kullanarak uygulanan TPP yöntemi sonucunda enzim, %133 verim ile 10,1 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin, SDS-PAGE analizi ile molekül ağırlıkları 48 ve 38 kDa olan iki alt birim içerdiğini gösterdi. Native-PAGE ve zimogram analizi ile enzimin molekül ağırlığı 85 kDa olarak bulundu. Saflaştırılan enzimin optimal pH ve sıcaklığı, sırasıyla 2,8 ve 50^{o}C olarak bulundu. Arrheius aktivasyon enerjisi (Ea) 28,63 kJ/mol olarak hesaplandı. Saflaştırılan enzim, 45^{o}C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin %60'ını korurken, bununla birlikte, 60^{o}C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin %80'ini kaybettiği gözlemlendi. 37^{o}C'de pH 2,8'de enzimin, Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hızı sırasıyla 1,1 mM ONPG ve 0,90 U/ml/dk olarak bulundu. Saflaştırılan enzimin turnover sayısı (k_{cat}) ve katalitik performansı (k_{cat}/K_m) sırasıyla 212,26 dk^{-1} ve 193 $dk^{-1}mM^{-1}$ olarak bulundu. Enzimin termodinamik parametreleri; $\Delta G^{\#}$, 62,21 kJ/mol; $\Delta^{\#}_{E-T}$, -13,56 kJ/mol; $\Delta^{\#}_{E-S}$, 0,25 kJ/mol; $\Delta H^{\#}$, 26,06 kJ/mol; $\Delta S^{\#}$, -0,12 kJ/mol.K olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: β-Galaktosidaz, Enzim, Nohut, Saflaştırma, Üç fazlı ayırma.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β-GALACTOSIDASE ENZYME FROM DRY CHICK PEA GRANULES (*Cicer arietinum*)

ABSTRACT

β-Galactosidase (Lactase, E:C 3.2.1.23) is an enzyme which catalyze the hydrolysis of lactose to glucose and galactose. The enzyme is widespread in nature and can be isolated from herbal, animal and microbial sources. In this study, the purification of β-galactosidase from chick pea (*Cicer arietinum*) was carried out first time by three phase partitioning method (TPP). Enzyme was 10.1 fold purified with 133% activity recovery by the method of TPP obtained by using 60% saturated ammonium sulphate and crude enzyme extract:t-butanol in 1:0.5 ratio at pH 6.8. SDS-PAGE analysis of purified enzyme showed that enzyme has consisted two subunits in 48 and 38 kDa molecular weight. The molecular weight of native enzyme was found to be 85 kDa as results of Native-PAGE and zymogram analysis. Optimal pH and temperature of purified enzyme were found to be 2.8 and 50^{o}C, respectively. Arrhenius activation energy (E_a) was determined as 28.63 kJ/mol. Purified enzyme is retained the 60% of its activity after 30 minutes incubation at 45^{o}C, however, 80% activity loss was observed at 60^{o}C. Michaelis-Menten constant (K_m) and maximal velocity of enzyme were found to be 1.1 mM ONPG and 0.90 U/ml/min at 37^{o}C and pH 2.8. Turnover coefficient (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of purified enzyme were found to be 212.26 min^{-1} and 193 $min^{-1}mM^{-1}$ in order. Thermodynamic parameters of enzyme were calculated as $\Delta G^{\#}$, 62.21 kJ/mol; $\Delta^{\#}_{E-T}$, -13.56 kJ/mol; $\Delta^{\#}_{E-S}$, 0.25 kj/mol; $\Delta H^{\#}$, 26.06 kj/mol; $\Delta S^{\#}$, -0.12 kJ/mol K.

Keywords: β-Galactosidase, Enzyme, Chick Pea, Purification, Three Phase Partitioning.

GİRİŞ

Doğal katalizör görevi üstlenen enzimler, protein yapılı biyokatalizörlerdir. Bu yüzden proteinlerin saflaştırılması endüstriyel ve analitik araştırma amaçlı çalışmalarda oldukça önemlidir. β-galaktosidaz enziminin yaygınlığı doğada yüksek olmasına karşın saflaştırılması için uygulanan klasik saflaştırma yöntemleri, bu işlemin tekrarlanabilirliğini, maliyetini ve sürecini olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Geleneksel protein saflaştırma yöntemlerinin aksine, uygulanması daha kısa süren, maliyetten ve zamandan tasarruf edilmesini sağlayan TPP (Three phase partitioning) yöntemini kullanarak çalışmamda saflaştırdığım gıda endüstrisinde önemi büyük olan β-galaktosidaz enzimi [1] dışında; lakkaz [2], ksilanaz [3], α-galaktosidaz [4], fosfolipaz [5], pektinaz [6] gibi endüstriyel enzimlerin de TPP yöntemi ile saflaştırıldığı rapor edilmiştir.

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Biyokimyasal katalizör olan enzimlerin reaksiyonları yüksek verimle gerçekleşir. Enzimlerin etki ettikleri maddeler tek ve belirlidir. Enzimlerle reaksiyon veren bu maddelere "substrat" denir [7]. Enzimler, katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürür ve dengeye daha çabuk ulaşmasını sağladıkları gibi cansız ortamlarda da görevini yaparlar.

Enzimler, bu katalizör faaliyetini gerçekleştirdiği sırada bazı faktörlerin etkisi altında kalırlar. Bunlar;

Sıcaklık: Enzim tepkimelerinde sıcaklığın her 10°C artışıyla tepkime hızı 1-3 kat artar. Bazı enzimlerde bu artış daha fazla olabilir. Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle optimum sıcaklık ancak 40-50°C arasında, bitkisel kaynaklı enzimler ise genellikle 50-60°C arasında erişirler.

pH: Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı adı verilmektedir. Optimum pH'nın altında ve üzerinde enzim reaksiyonu yavaşlamaktadır. Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum pH değeri enzimden enzime farklılık göstermektedir.

Enzim konsantrasyonu: Ortamda yeteri kadar substrat olduğu varsayıldığında, ortamda enzim miktarı ne kadar çok olursa reaksiyon o kadar hızlı ilerleyeceğinden tepkime hızı enzim konsantrasyonu ile doğrusal bir artış sergiler.

Substrat konsantrasyonu: Substrat yoğunluğu, tepkime hızını etkileyen etmenlerden biridir. Substrat yoğunluğu artırıldığında tepkimenin hızı bir süre artar. Ortamda bulunan enzimler substrata doyduktan sonra substrat konsantrasyonunun artması reaksiyon hızını daha fazla arttırmayacaktır.

Substrat yüzeyi: Substrat yüzeyinde artış, belirli bir seviyeye kadar, gerçekleşmesi enzimlerle olan etkileşimi kolaylaştıracağından reaksiyon hızı da buna bağlı olarak artar.

İnhibitör ve aktivatör: Enzimlere ya da substratın aktif bölgesine bağlanarak substrat-enzim ilişkisini keserek enzimin işlevini yerine getirmesini engelleyen kimyasal maddelere inhibitör denir. Bunun aksine yine enzim ya da substratın aktif bölgelerine bağlanarak reaksiyon hızını arttırıcı etki gösteren kimyasal maddelere de aktivatör denir [8].

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Her enzimin 4 rakamlı bir E.C. (Enzyme Commission) numarası vardır, örneğin, katalazda (1.11.1.6) birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir. Buna göre enzim sınıfları şunlardır:

Oksidoredüktazlar: İngirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzimler bu sınıfa girer.

Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir.

Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

Liyazlar: Reaksiyon sonunda su molekülü çıkarmadan C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla yıkarlar.

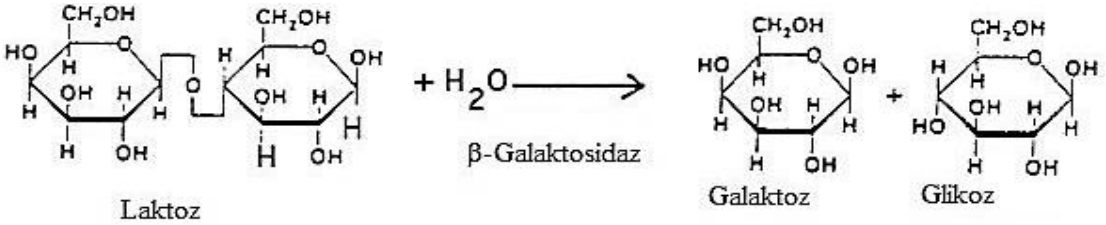
İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yaparak onun geometrik dizilişini değiştiren reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

Ligazlar: Enerji harcanmasıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşmasını sağlayan kondenzasyon tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.

1.3. β-Galaktosidaz (Laktaz) Enzimi

β-Galaktosidaz (E.C. 3.2.1.23), Şekil 1.1'de gösterildiği gibi laktozu, glikoza ve galaktoza hidrolizleyen reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Hidrolazlar sınıfına girer. Dört eşit aminoasit zincirinden oluşan homotetramer β-galaktosidaz enzimi mevcuttur. Doğada yaygın olarak bulunan bu enzim mikrobiyal [9-17] bitkisel [18,19] ve hayvansal [20,21] kaynaklardan izole edilebilmektedir.

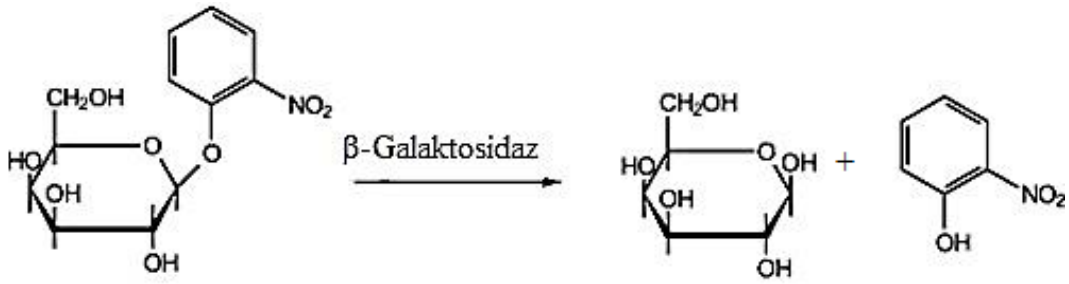
β-Galaktosidaz enziminin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intoleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı, sütün baskın şekeri laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklanır. Dünyada laktoz intoleransının fazla olması sebebiyle endüstride düşük laktozlu veya laktozu hidrolizlenmiş süt ve süt ürünlerinin üretilmesi önem kazanmıştır.



Şekil 1.1. Laktozun hidrolizi

Ca^{+2}, β-galaktosidazın bilinen bir inhibitörüdür [22]. Fakat sütteki kalsiyum iyonları kazeine bağlı olduğundan, β-galaktosidazı inhibe etmez [23].

β-Galaktosidaz enzimi laktozun dışında ayrıca sentetik substratlar olan orto-nitrofenil-β-D-Galaktopiranosit (ONPG) ve para-Nitrofenil-α-L-arabinopiranosit (PNPG) hidrolizini de katalizlemektedir. β-Galaktosidaz enzimi, ONPG'nin hidrolizini katalizlediğinde substrat, galaktoz ve orto-nitrofenol (ONP) bileşenlerine ayrılmaktadır (Şekil 1.2). Renksiz bir bileşik olan ONPG, bu reaksiyon sonucunda oluşan ve çözeltini rengini sarı yapan ONP ile enzim aktivite tayinlerinde kullanılmaktadır [24].



Şekil 1.2. ONPG'in β-galaktosidaz ile hidrolizi

1.3.1. β-Galaktosidazın bulunduğu başlıca kaynaklar

Tablo 1.1. β-Galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar [25]

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü, kahve...
Hayvan organları	İnce bağırsak, beyin ve deri dokusu...
Mayalar	*Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fraglis, Candida pseudotropical, Brettanomyces anomolus, Wingea robersii...*
Bakteriler	*Escherichia coli, Thermus aquaticis, Bacillus sp., Bacillusmegaterium streptococus lactis, Streptococus thermophillus, Lactobacillus bulgaricus, Lactabasillus helvenous, Bacillus circulans, Bacillus steorotherrphilus lactobacillus Sporogenes...*
Mantarlar	*Neurospora crassa, Mucur pucillus, Alternaria palmi, Asperigillus foetudut, Mucur mieheri curvularia inoegualis, Asperigillus niger, Fusorium moniliforme, Asperigillus flovus, Alternaria alternara, Asperigillus oryzeae, Asperigillus phoenicis...*

Tablo 1.1'de belirtilen enzimin başlıca kaynakları dışında β-galaktosidaz enzimi kivi, mango, barbunya, fasulye gibi kaynaklardan da saflaştırılmıştır [26-30].

1.4. Laktoz İntoleransı

Laktoz intoleransı, bir başka deyişle laktozu sindirememek dünya nüfusunun yarısından fazlasında görünen bir sağlık problemidir [31]. Bu soruna β-galaktosidaz

enziminin yetersizliği neden olur. Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalar sonucu β-galaktosidaz yetersizliği çeken insanların oranı Tablo 1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 1.2. Dünya'daki β-galaktosidaz yetersizliği [32]

Etnik Grup	Nüfustaki β-galaktosidaz yetersizliği (%)
Kuzey Avrupalı	<10
Orta ve Güney Avrupalı	70
Doğu Asyalı	100
Amerika Yerlisi	80-100
Meksikalı	53
Güney Afrikalı	13-90

β-galaktosidaz yetersizliği genellikle genetik miras yoluyla ya da yaşla ilgili olarak β-galaktosidazın yaşlandıkça azalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Çocukluğun erken dönemlerinde sorun ortaya çıkar ve yaş ilerledikçe sorun da ilerler [33]. Nadir olarak herhangi bir yaşta da β-galaktosidaz yetersizliği durumu gerçekleşebilir. β-galaktosidazın üretildiği ince bağırsak mukozasının zarar görmesi bu enzimin yetersizliğine yol açar. Bunun sonucunda kişi; mide-bağırsak iltihabı, beslenme bozukluğu, çölyak hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kanser olabilir [34].

1.5. β-Galaktosidazın Endüstriyel Uygulamaları

β-Galaktosidaz enzimi gıda endüstrisinde laktozun hidrolizini gerçekleştiren en önemli enzimlerden biridir. Endüstriyel uygulamalardaki teknolojik ve çevresel avantajları aşağıdaki listede belirtilmiştir [35,36]:

1.Laktoz intoleransının giderilmesiyle, laktozun enerji kaynağı olarak kullanılması,

2.Laktoz hidrolizi sırasında düşen pH'da gelişimi zor olan *Bifidobacterium* türlerine, galakto-oligosakkaritlerin substrat olarak etki göstermesi ve bağırsaktaki *Bifidobacterium* türlerinin gelişimine yardımcı olması [37],

3.Süt ya da peynir altı suyundaki laktozun hidroliziyle, gıda içeriğinin teknolojik ve karakteristik özelliklerinin gelişimi: çözünürlüğü arttırma, tatlandırma gücünün artışı, yoğurt gibi ürünlerin fermantasyonunu kolaylaştırma,

4.Peynir altı suyunun biyolojik parçalanabilirliğinin artışı.

Düşük laktozlu süt üretiminde, pastörize edilmeden önce sütün içerisine eklenen sıvı enzim 24 saat boyunca bekletilir ve daha sonra laktoz hidrolizini durdurmak için süt pastörize edilir. Bunun sonucunda elde edilen %70-100 hidroliz edilmiş laktozlu süt ile Tablo 1.3'te belirtildiği gibi tatlılık oranlarında artış yaşanır ayrıca; süzme peynir, eritme peynir ve dondurma üretimi gerçekleşir [36].

Tablo 1.3. Şekerlerin tatlılık oranları

Şekerin Adı	Tatlılık Oranı (%)
Sakkaroz	100
Glikoz	75
Galaktoz	70
Laktoz	40

1.6. Enzim Saflaştırmada Strateji

Bir proteinin özelliklerini ve aminoasit dizilimini tanımlayabilmek için önce o proteinin saf olarak elde edilmesi gereklidir. Hücrelerde binlerce farklı çeşit protein içeriği vardır ve bunlardan sadece birinin saflaştırılması o proteinin diğer proteinlerden farklı özelliklerinin olmasıyla gerçekleşebilir.

Enzim saflaştırmanın temel stratejisi, en düşük maliyetle en yüksek saflık oranına ulaşmaktır.

Saflaştırılacak enzim öncelikli olarak tespit edilmelidir. Analitik amaçlı çalışmalarda az miktarda enzim ama mümkün olan en yüksek saflık oranı istenirken endüstriyel kullanım için ise bu durum tam tersidir. Bu strateji belirlenirken önemli hususlardan birisi de enzim kaynağının bulunabilirliğidir. Çünkü saflaştırma stratejisinde maliyet ve zaman oldukça önemlidir.

Enzim saflaştırma süreci içerisinde dikkat edilmesi gereken bir husus da enzim aktivitesinin korunması ve mümkünse artmasıdır. Enzim aktivitesinin korunmasını sağlamak adına yapılan işlemler ve enzimin muhafazası her zaman $+4^{o}C$'de yapılmalıdır [38,39].

1.7. Enzim Saflaştırmadaki Temel Yöntemler

1.7.1. Enzim kaynağından enzimin izole edilmesi:

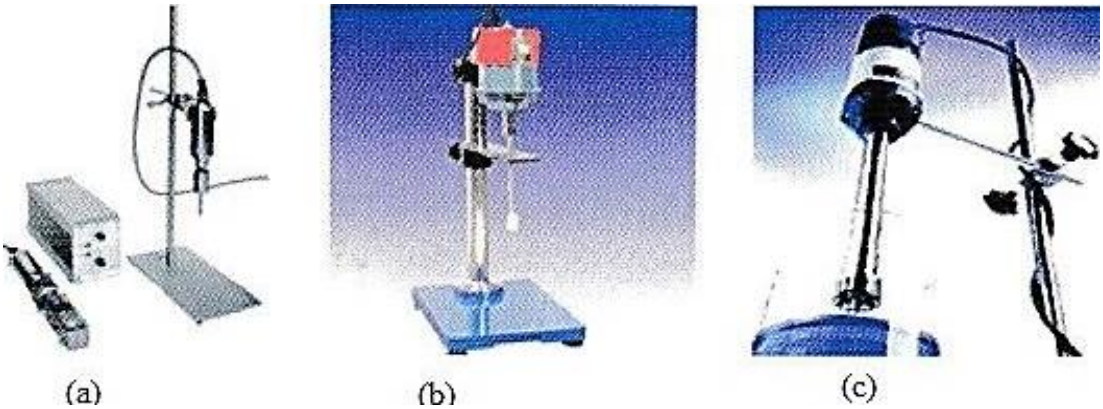
Kaynak türüne göre farklı yöntemler seçilebilir. Bakteriler için sonikasyon kullanılırken bitkiler için ezme yöntemi kullanılabilir. Hücre dışında bulunan enzimlerin izole edilmesi ek bir işlem gerektirmezken, hücre içinde bulunan enzimler için hücre duvarı ve zarının yıkımı sağlanmalıdır. Bu yıkımı sağlamak için kimyasal ya da fiziksel işlemler yapılabilir [40].

Kimyasal işlemler: Uygun tampon çözeltiler içindeki hücre çözeltisi ile organik çözücüler, enzimler ve deterjanlarla muamele edilerek hücre duvarının yıkımı sağlanır.

Fiziksel işlemler: Tampon çözeltisi içerisinde bulunan hücre çözeltilerine mekanik parçalama teknikleriyle yapılmasıdır. Ozmotik şok, ses dalgaları, homojenizasyon, cam bilyelerle parçalama teknikleriyle uygulanabilir [40].

a) Osmotik şok: Osmotik basınçtaki ani değişiklik sonucunda hücrenin dış zarı parçalanır. Bu metot özellikle bakteri periplazmasına yerleşmiş olan proteinlerin kazanılması için seçici bir işlemdir.

b) Ses dalgaları (sonikasyon): Şiddetli ultrasonik dalgalar hücre süspansiyonunda şok kabarcıkları oluşumunu arttırır, bu kabarcıkların patlamasıyla oluşan şok dalgaları hücre duvarı ve zarının parçalanmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda hücre süspansiyonunun viskozluğunda azalma ve köpürme görülür. Şekil 1.3'te örnek sonikatörler gösterilmektedir. İşlem sırasında proteolitik bozunma ve proteinlerin denatürasyonuna yol açacak önemli miktarda ısı açığa çıkmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla proteinlerin denatüre olmaması için işlem +4°C'de ya da buz banyosu içerisinde uygulanmalıdır.



Şekil 1.3. Homojenizasyonda kullanılan aletler. a) ultrasonikatör b) teflon başlıklı homojenizatör c) yüksek devirli bıçaklı homojenizatör [41]

c) Homojenizasyon: Homojenizatörde yüksek basınç altında, sürekli olarak dönen metal içine hücre pompalanması ile gerçekleştirilen parçalama işlemidir. Basıncın şiddeti ve aniden düşmesi hücre zarının parçalanmasına neden olur. İşlem sonunda hücre çözeltisinin vizkozitesinde azalma görülmektedir. Mekanik enerjinin büyük miktarının dağılmasından dolayı sıcaklık 15^{o}C'ye kadar çıkabilmekte ve proteinlerin denatürasyonuna sebep olabileceğinden işlem +4^{o}C'de ya da buz banyosu içerisinde uygulanmalıdır.

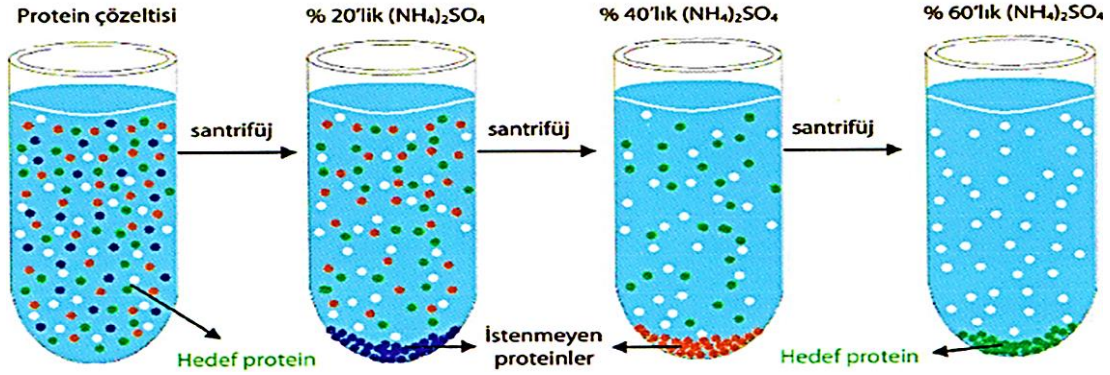
d) Cam bilyelerle parçalama: Küçük cam bilyelerin (R: 0,3-0,4 mm) bulunduğu bilye değirmeninde hücre süspansiyonu yüksek hızda çalkalanır. Optimum hücre konsantrasyonu mikroorganizmaya göre değişmektedir. Homojenizasyondan önemli bir farkı, hücre konsantrasyonu parçalama verimini etkilerken, çalkalama hızındaki artışın parçalama üzerindeki etkisi daha azdır. İşlem sonucunda ısı enerjisindeki artış soğutma ceketleri ile düşürülmektedir. Proteinlerin denatürasyonunun önüne geçebilmek için sıcaklık 0-4^{o}C arasında tutulmalıdır. Bu metot ipliksi mikroorganizmaların parçalanması için de kullanılmaktadır [40].

1.7.2. Santrifüjleme

Değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. 1. Basamaktan sonra hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. Bunun yanı sıra amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra da yapılır. Çok defa başvurulabilecek bir işlemdir. Denatürasyonu önlemek için bu işlem de +4^{o}C'de yapılmalıdır.

1.7.3. Amonyum sülfat çöktürmesi

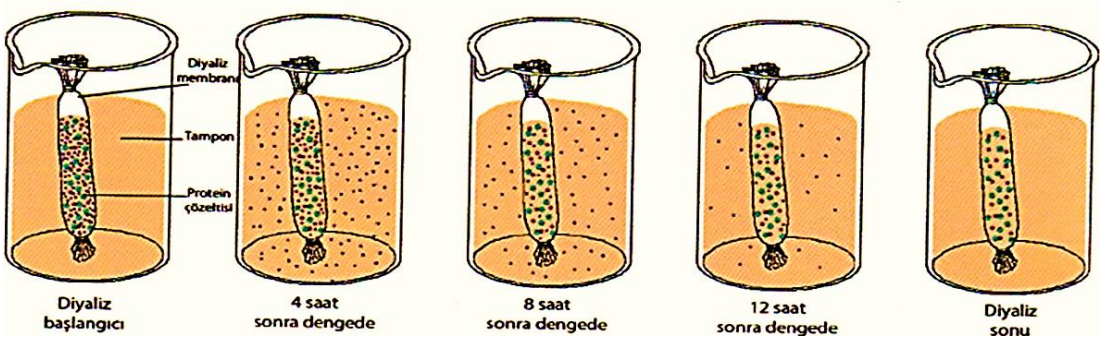
Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Şekil 1.4'te gösterildiği gibi çöktürme işlemlerindeki istediğimiz aralığı bulduğumuz zaman diğer proteinlerden kurtulmuş oluruz.



Şekil 1.4. Amonyum sülfat çöktürmesi örnek gösterimi [41]

1.7.4. Diyaliz

Tuz çöktürmesinden sonra enzimde bulunan tuzdan ve istenmeyen diğer küçük moleküllerden uzaklaşmak için diyaliz işlemi yapılır. Şekil 1.5'te örnek diyaliz işlemi gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Örnek diyaliz uygulaması [41]

Protein çözeltisi, küçük molekülleri geçiren fakat büyük moleküllerin geçişini engelleyen yarı geçirgen bir membran olan diyaliz torbasına konur ve uygun tampon çözelti içerisine bırakılır Diyaliz membranları için selüloz asetat, polisülfon, polietilen gibi farklı yapılara sahip membran türleri mevcuttur. 1-1000000 kDa aralıklı membranlar ticari firmalar tarafından üretilmektedir. Genellikle 10 kDa'luk membranların kullanımı yaygındır. Selüloz asetat membranları, üniform gözenek

büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için kullanılmadan önce distile su ile hazırlanmış 10 mM sodyum bikarbonat ve 1 mM EDTA içerisinde 30 dakika kaynatmak gerekmektedir. Kaynatma işleminden sonra membran distile su ile iyice yıkanmalı ve mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için 1 mM EDTA çözeltisi ya da etanol içerisinde +4^{o}C'de muhafaza edilmelidir. 15 kDa'luk por çapına sahip membranlarla yaklaşık 3 saat içerisinde dengeye ulaşılır. Daha küçük por çaplı membranlarda, daha uzun sürelerde dengeye ulaşılır. Diyaliz işlemi genellikle +4^{o}C'de gece boyu sürecek şekilde yapılır. Böylece aktivite kayıpları minimuma indirilir [38].

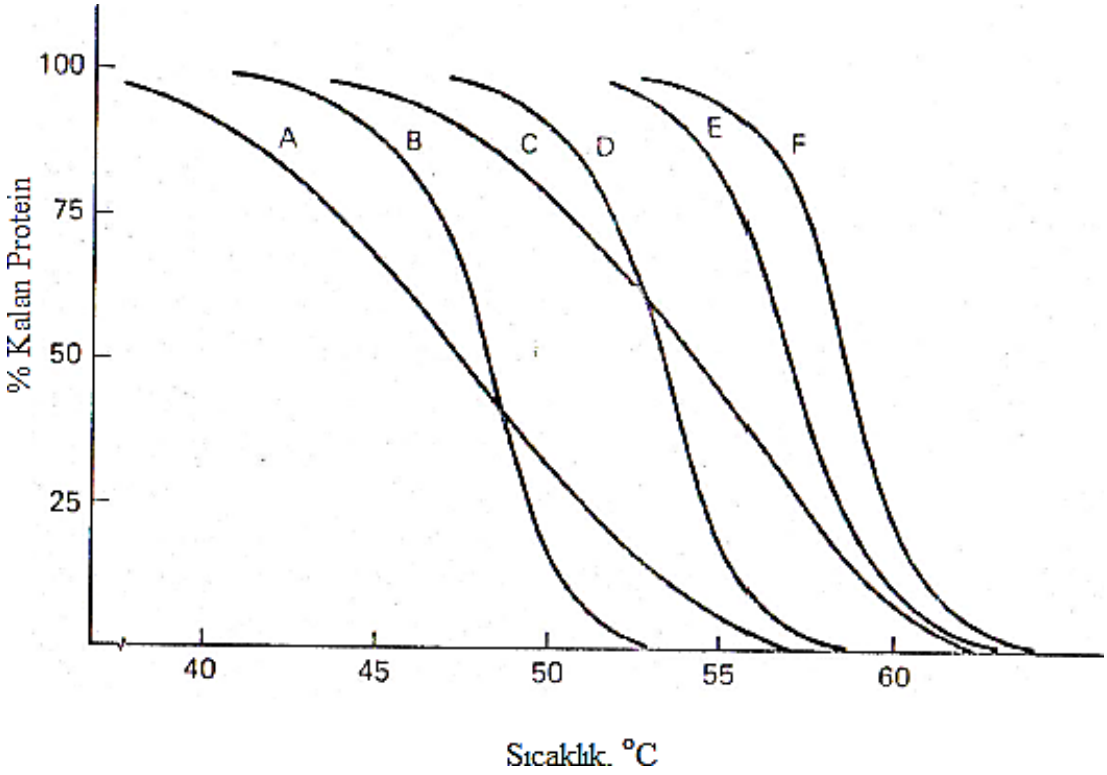
1.7.5. Isıtma

Proteinlerin ısıtma işlemi ile denatürasyonu, termodinamik kurallarına uygun olarak tek basamaklı hız sabitiyle tanımlanabilir. Bu durumda hız sabiti k_d'nin sıcaklıkla ilişkisi;

$$\frac{dlnk_d}{dT} = \frac{E_{a,d}}{RT^2} \tag{1.1}$$

formülüyle ifade edilir. $E_{a,d}$, proteinin temel denatürasyonunun aktivasyon enerjisini; k_d, proteinin temel denatürasyon hız sabitini; R, gaz sabitini ve T ise sıcaklığı ifade etmektedir. Formülden de anlaşıldığı gibi sıcaklık değişimi $E_{a,d}$'yı etkilemekte ve bu da protein denatürasyonuna sebep olmaktadır. Her proteinin farklı $E_{a,d}$ değeri olduğundan, protein denatürasyon-sıcaklık grafik eğrisi de farklı olacaktır.

Aranılan proteinin özelliklerini göz önünde bulundurularak, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan proteinler olan termotolerant proteinler için yapılan 15 dakikalık ısıtma ile birlikte diğer istenmeyen proteinler denatüre edilmiş olacaktır.



Şekil 1.6. Örnek protein denatürasyon grafiği [43]

Örneğin Şekil 1.6'da, farklı proteinler içeren çözeltide bulunan A, B, C, D ve E proteinleri içinden uzaklaştırmak istenilen A, B, C ve D proteinleri için 55^{o}C'de yapılacak bir ısıtma işlemi ile denatürasyon sıcaklığı daha düşük olan proteinler denatüre edilmiş olur. Ardından yapılan buzlu soğutma ve santrifüj işlemi ile denatüre edilen proteinler çöktürülerek uzaklaştırılmaktadır [42,43].

1.7.6. İzoelektrik noktasına göre çöktürme

Her proteinin net yükünün sıfır olduğu bir pH değeri vardır buna izolelektrik (pI) noktası denir. İzoelektrik noktasında net yükün sıfır olması yüklü yapıların olmadığı anlamına gelmemektedir, negatif ve pozitif yüklü yapılar yine protein yapısında bulunmaktadır. Bu pI değerinin altında protein pozitif yüklü iken, pI değerinin üzerindeki pH'larda negatif yüklüdür. Protein çözeltisinin izoelektrik noktasına yakın ya da eşit olarak ayarlanan pH ile yapılan çöktürme işlemidir. İzoelektrik noktasında o proteinin çözünürlüğü en düşük düzeydedir, proteinin yükler arası etkileşimi ve van der Waals etkileşimleriyle çöker. İzoelektrik çöktürme, genellikle hedef proteinden çok istenmeyen proteinleri çöktürmek için kullanılmaktadır. Bunun nedeni, izoelektrik noktasına yakın değerde olan proteinin elektrostatik kuvvetlerle

proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasıdır. Hedeflenen proteinin pI değerinden daha düşük pH ayarlanarak istenmeyen proteinlerin bir kısmını santrifüj işlemiyle çöktürerek uzaklaştırmış oluruz [43].

1.7.7. Kromatografik yöntemler

Saflaştırma yöntemleri arasında en yüksek saflaştırma oranı veren yöntem kromatografik yöntemdir. Kolon içerisindeki durgun faz ile hareketli örnek bileşeni arasında yapılan bir ayırma işlemidir. Protein çözeltisi, proteinlerin molekül büyüklükleri, elektriksel yük, afinite gibi özelliklerinden yararlanarak hazırlanan kolonlardan geçirildiğinde yüksek saflık oranına erişilir. Kolonda yürütülecek çözeltinin hacmi, verimi düşürmemesi için kolon hacminin %10'unu geçmemesi gerekmektedir.

Jel ayırma kromatografisinde, dekstran temelli materyallerden oluşan ticari olarak satılan jeller, makromolekülleri boyutlarına göre ayırır. Çapraz bağlı dekstran dolgularıyla proteinleri ayırmada ve proteinlerin molekül ağırlıklarının tayininde oldukça kullanılan bir yöntemdir. Jellerin geliştirilmesiyle daha hızlı ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlerle çalışılması mümkün kılınmıştır. Kolon içerisinde çapraz bağlı ağ yapısına sahip olan jel dolgusu üzerine eklenen protein çözeltisinde, küçük molekül ağırlığına sahip proteinler bu porlara takılır. Büyük molekül ağırlığına sahip proteinler ise bu porlara girmez ve yoluna devam eder ve kollektörden toplanır.

İyon değiştirme kromatografisinde, kolon dolgu materyali 0,5 M yüklü gruplar bulundurmaktadır. Bu yüklü gruplar metal iyonları, klor iyonları ve bazen tampon iyonları ile dengelenmiştir. Proteinlerin yükleri yan zincirlerinde bulunan yüklü grupların varlığında pH ile değişir. Bu sayede nötralleşen protein çözeltisinde, kolon materyali ile zıt yüklü olan proteinler kolona adsorblanırken, aynı yüklü proteinler kolonu çabuk terk eder. Absorbant DEAE (Dietilaminoetil) anyon değiştirici olarak, CM (karboksimetil) katyon değiştirici olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisi: Kolon içerisindeki afinite adsorbanı protein dışındaki yapılarla bağ oluşturarak spesifik proteinlerin kolon içerisinde hareket ederek ayrılmasını sağlar. Bunun yanı sıra ticari olarak hazır da satılan substratlar kolon

içerisine ligand olarak bulunduğunda spesifik proteinlerle kovalent bağ oluşturarak bağlanırlar bu sayede protein çözeltisi içerisindeki belli proteinler uzaklaştırılmış olur [38,43].

1.8. Elektroforez

Elektroforez, proteinlerin görüntülenmesini sağlayan analitik bir yöntemdir. Proteinlerin saflık derecesi ölçümüne, izoelektrik noktalarının tayinine ve yaklaşık molekül ağırlığı tayinine olanak sağlar.

Elektroforezde proteinler genellikle çapraz bağlı polimer olan poliakrilamidden yapılmış jeller ile yapılır. Akrilamidin, N,N metilen-bis akrilamit ile polimerizasyonu sonucunda oluşturulan jelde metilen, çapraz bağlanmayı sağlar. Jeller elektroforez kaplarına dökülerek oluşturulur. Elektriksel potansiyelden (E) aldığı güç ve poliakrilamit jelin elek görevi yapması ile proteinler yük/kütle oranına göre hareketini gerçekleştirir [39].

1.8.1 SDS – PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) kabaca her iki aminoasit kalıntısına bir molekül SDS olacak şekilde bağlanır. Bağlı SDS'ler negatif yükü arttırırken, proteinin iç yükü maskelenir ve bu durumda her proteinin yük/kütle oranı benzer olur. Ayrıca proteinlerin doğal şeklinin de SDS ile bağlanması sonucu benzer duruma gelmesiyle SDS varlığında yapılan elektroforezde ayrışma tamamen molekül ağırlıklarına göre gerçekleşir. Elektroforez sonunda, jeli boyamayan sadece proteinleri boyayan Coomassie Blue, gümüş nitrat gibi boyalarla görüntülenir. SDS'de eğer protein iki ya da daha fazla alt birim barındırıyorsa, her bir alt birim için bir bant gözlenecektir [44].

1.9. TPP (Three Phase Partitioning/ Üç Fazlı Ayırma) Yöntemi

TPP, proteinleri saflaştırmada uygulanan hızlı ve etkili bir yöntemdir. Yöntemin temeli, ham enzim çözeltisine yüksek konsantrasyonda amonyum sülfatın (0,8-2,4M) ve suda çözünürlüğü kısıtlı alifatik bir alkolün (genellikle t-bütanol) ilavesiyle yapılır. Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ve t-bütanol gibi alkoller suda

çözünmelerine karşın kozmotrop tuzları çözmemektedir bu yüzden iki ayrı sıvı faz (alkol fazı üstte ve tuzlu sulu faz altta olmak üzere) oluşur.

Biyolojik ve kimyasal proseslerde çözeltideki bazı iyon etkileri o iyonlara özgüdür. Bu özgün iyon etkileri Hofmeister olayı olarak adlandırılmıştır. Aşağıda Hofmeister serisi olarak tanımlanan anyon ve katyon sıralamaları verilmiştir. Sıralama proteini çöktürme kapasitelerine göre yapılmıştır [45].

$SO_4^{2-} > H_2PO_4^- > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^-$

$Mg^{+2} > Li^+ > Na^+ = K^+ > NH_4^+$

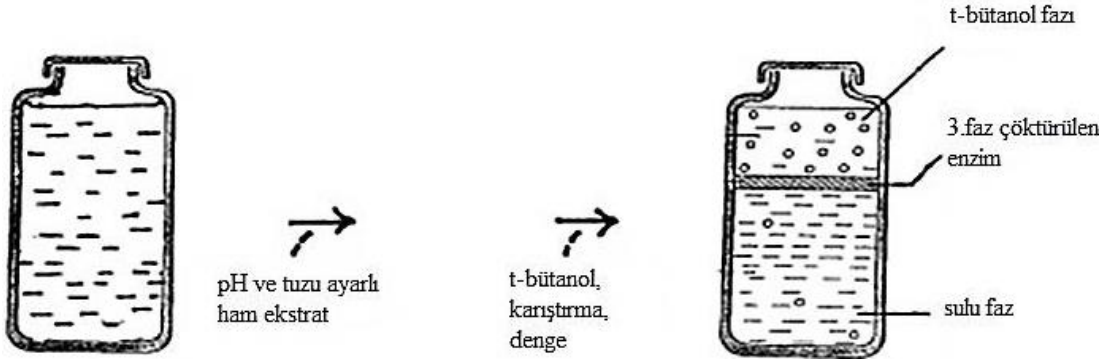
Liyotropik (su çekme gücü) seride, klordan önceki anyonlar kozmotrop, klordan sonrakiler ise kaotrop olarak adlandırılır [46]. Kozmotrop ifadesi "konumlayıcı" anlamıyla çözeltiyi dengeleme görevi yapar. Kaotrop ifadesi ise "konum bozucu" olarak proteinlerin yapısını düzleştirerek hidrofobik kısımları etkisiz hale getirir ve çözünürlüğünü arttırır.

Tuz içeren çözeltiler, içerdiği tuzun kozmotropik ya da kaotropik olmasına bağlı olarak; kozmotrop etki gösteren tuz, çözeltinin iyonik kudretini yükselteceğinden oluşan hidrofobik etkileşimlerle proteinlerin sudan uzaklaşarak, kümeleşmesini sağlayıp çökmesine (salting-out) neden olur. Eğer tuz kaotrop etkiye sahip ise, iyonik kudretin düşük olmasıyla birlikte proteinlerin hidrofobik yüzeyinin düzleşmesine ve hidrofilik etkileşime girerek çözünürlüğünü arttırıcı (salting-in) etki göstermesine neden olur. Çöktürmenin (salting-out) mekanizması NaCl ve t-bütanol varlığında şu şekilde açıklanmıştır: düşük konsantrasyondaki t-bütanol moleküllerinin çevresine 20 su molekülü kafes gibi yerleşerek sıkıştırır. Bunun sonucunda t-bütanolde bulunan alkol grubu ile metil grubu arasındaki dimer yapının hidrofobik etkileşimler sonucunda gevşemesine neden olur [47,48]. NaCl ilavesiyle, bütanolün alkol grupları anyona (Cl^-) ilgi gösterir ve amfifil kümeleşme eğilimini arttırır. Böylece faz ayrımı gerçekleşir.

TPP ile t-bütanol ilişkisi şu şekilde açıklanabilir: t-bütanol, TPP sırasında çöken proteinlere batmama özelliği kazandırır. Ara fazın tamponda tekrar çözünmesiyle spesifik ve toplam aktivite geri kazanılır ve bazen bunda artış olabilir. Sülfat

iyonunun yüksek konsantrasyonu, kozmotrop davrandığı gibi t-bütanol de oda sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıklarda kozmotrop davranır. Fakat geleneksel yöntem olan tuzla çöktürme gibi kozmotropi de TPP'nin mekanizmasının tamamını oluşturmaz. Elektrostatik kuvvetler, protein konformasyon sıkışıklığından oluşan kuvvet, protein hidrasyon kaymaları da önemli faktörlerdendir [49].

TPP tekniğinin önemli bir avantajı büyük ve küçük ölçekli çalışmalara uygulanabilmesidir. Düşük hızda uygulanan santrifüj ile proteinler pelet (ara) faza geçer. Oluşan üst fazda genellikle organik solventlerde çözünebilen kontamine yapılar vardır. TPP'nin önemli olmasının bir başka sebebi, düşük molekül ağırlıklı yapıların; lipidlerin ve fenollü yapıların uzaklaştırılmasıdır. Şekil 1.7'de TPP ile faz oluşumları gösterilmiştir. Orta faz genellikle birkaç dakikadan sonra oluşmaya başlar. Üst ve alt fazlardaki hidrasyon kaymaları, eklenen amonyum sülfat ve t-bütanol miktarlarına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Genellikle başlangıç çözeltisinin mL başına 0,2-0,5 mL t-bütanol oranı yeterli olmaktadır.



Şekil 1.7. TPP'nin uygulanmasıyla oluşan fazların gösterimi [49]

TPP, maliyet açısından değerlendirilecek olursa diğer yöntemlerle kıyaslandığında; harcanan amonyum sülfat miktarı, protein saflaştırmada ara işlemlerden biri olan tuzla çöktürme işlemine göre çok düşük olacağından ve geri kazanımının da mümkün olduğu düşünülürse oldukça makul bir maliyet tablosu ortaya çıkmaktadır.

Uygulamanın bir önemli artısı da optimal pH ve sıcaklık gibi deneysel çalışmaları kolaylaştıran bir uygulama olmasıdır.

TPP uygulamasını optimize ederken denenen t-bütanol ve amonyum sülfat oranları için ara fazın haricinde alt ve üst fazlarda da analizler yapılır. Böylece hedeflenen

protein, istenmeyen proteinler ve yapıların hangi fazlara dağıldığını gözlemlemek mümkün olur [49].

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzeme

Nohut, lokal marketten paket halinde satın alındı. Tampon çözelti için gerekli kimyasalların hepsi, t-bütanol, amonyum sülfat, Coomassie Brillant Blue R-250, ONPG, Bradford belirteci ve elektroforez kimyasalları Merck AG (Almanya) ve Sigma Chemical Ltd. (ABD) firmalarından temin edildi. Elektroforez ünitesi için Biorad Mini Protean kullanıldı. Diğer tüm kimyasallar ve belirteçler analitik saflıkta satın alındı.

2.2. Yöntem

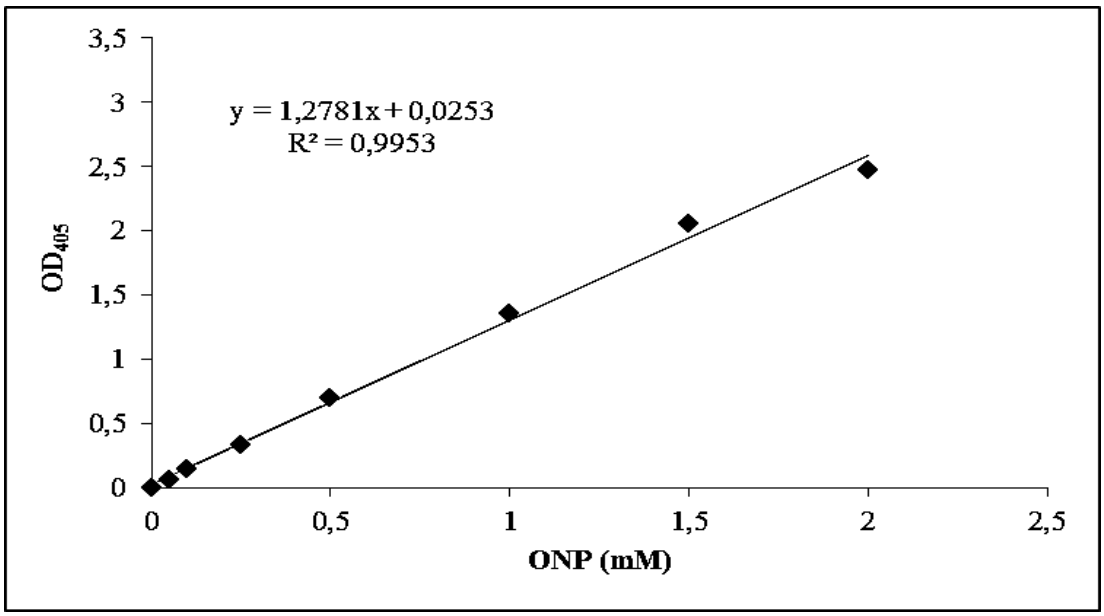
2.2.1. Enzim aktivite ölçümü

β-Galaktosidaz enzim aktivitesi, ONPG (orto-Nitrofenil-β-D-galaktopiranosit) substratı [30] kullanılarak ölçüldü. Enzimatik aktivite, 20 mM 450 µL ONPG substratının (50 mM pH 2,8 glisin-HCl tampon çözeltisi içerisinde) uygun oranlarda seyreltilmiş 50 µL enzim ile 37^{o}C'de 10 dakika inkübe edilerek belirlendi. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL sodyum karbonat (distile suda, 1 mM) eklendi. Ardından spektrofotometrik olarak 405 nm'de ölçümü yapıldı;

$$\text{Aktivite (U/dk)} = \frac{\frac{OD_{405}}{\text{Eğim}} \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)}}{\text{Enzim hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon süresi (dk)}} \qquad (2.1)$$

formülü ile hesaplanan β-galaktosidaz enzimi için aktivite birimi; 37^{o}C'de pH 2,8'de 1 dakikada 1 µg orto-nitrofenol (ONP) oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Formülde kullanılan eğim; Şekil 2.1'de gösterilen, ONP standart grafiğinden elde edilen eğimdir. ONP standart grafiğini oluşturmak için, farklı konsantrasyonlardaki 500 µL ONP'ye ilave olarak 500 µL Na_2CO_3 eklendi. Oluşan sarı renkli çözeltilerin 405 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen veriler

Şekil 2.1'de yerleştirildi ve elde edilen eğim, aktivite hesaplama formülünde yer alan eğim olarak kabul edildi.



Şekil 2.1. ONP standart grafiği

2.2.2. Protein miktarı ölçümü

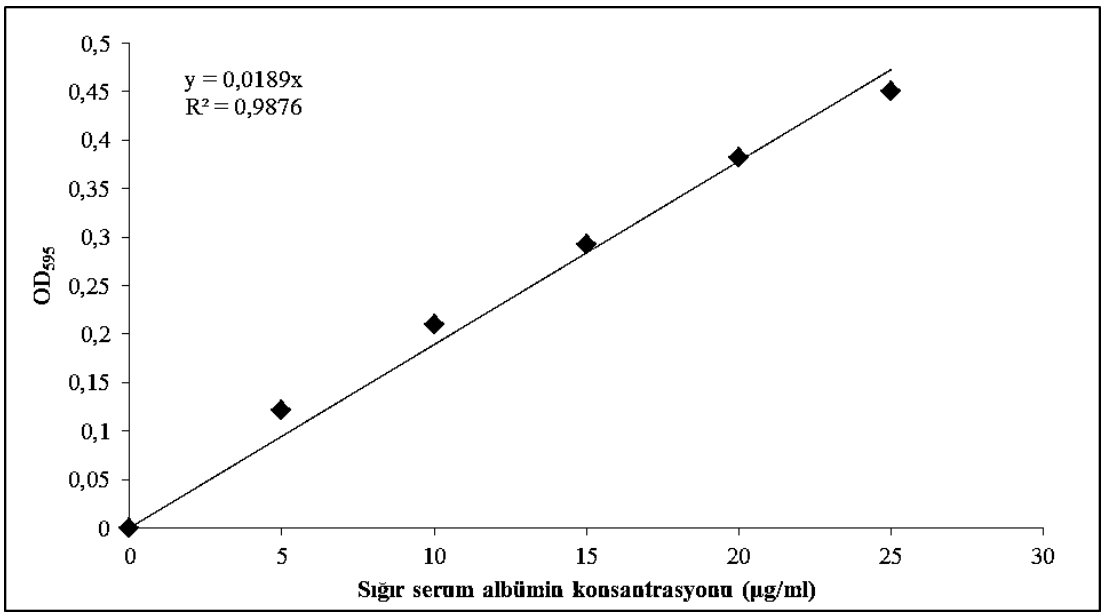
Protein miktarı, Bradford metodu [50] sığır serum albümin standardı ve Coomassie Brillant Blue G-250 boyası eşliğinde 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü yapılarak belirlendi;

$$\text{Protein Miktarı (mg/ml)} = \left(\frac{\frac{OD_{595}}{\text{Eğim}}}{1000} \right) \times \text{seyreltme faktörü} \qquad (2.2)$$

formülünü kullanarak protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı. Spesifik aktivite ünite/miligram protein olarak hesaplandı.

Boyama çözeltisi hazırlanışı: 0,6 gram Coomassie Brillant Blue G-250, 1 litre %2'lik (v/v) perklorik asit içerisinde çözündü. Süzgeç kağıdıyla süzülen çözelti, muhafaza edilmek üzere karanlık şişeye aktarıldı. Bu boyama çözeltisinin analizlerde kullanılabilmesi için, çözeltiden alınan örneğin 469 nm'de spektrofotometrik değerine bakılır. Değer 1,3-1,5 aralığında çıkmalı aksi halde kullanılmaz.

Formülde yer alan eğim değerini tespit etmek için farklı konsantrasyonlardaki sığır serum albümin 595 nm'deki spektrofotometrik ölçümleriyle Şekil 2.2'deki standart grafiği oluşturuldu. Burada hesaplanan eğim formül üzerine aktarılarak hesaplamalar yapıldı.



Şekil 2.2. Sığır serum albümin standart grafiği

2.2.3. β-Galaktosidazın ham ekstratının hazırlanması

Nohuttan 30 gram tartıldı, mikrobiyal floranın azaltılması için %2'lik (v/v) hidrojen peroksit (H_2O_2) içerisinde +4^oC'de 10 dakika bekletildi ve ardından distile su ile yıkandı. Üzerine 120 ml ekstraksiyon tampon çözeltisi (1 mM EDTA, 1 mM merkaptoetanol, 1 mM PMSF içeren 25 mM pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi) eklenerek +4^oC'de 24 saat boyunca bekletildi. Bekletilen nohuttan 10 gram tartıldı, 40 mL 25 mM pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi eklenerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenizat 4 kat tülbentten süzüldü ve 14000 rpm'de +4^oC'de 30 dakika santrifüj edildi. Çöken hücre atıkları uzaklaştırılırken, süpernatant bir sonraki aşama için toplandı. Süpernatantın pH'sı 0,5 mM HCl ile pH 5'e düşürüldü ve 14000 rpm'de +4^oC'de 30 dakika santrifüj edildi. Pelet atılırken, berrak süpernatantın pH'sı 0,5 mM NaOH kullanarak pH 6,8'e ayarlandı [30]. Bu çözelti ham enzim çözeltisi olarak adlandırılıp TPP işlemi için kullanıldı.

2.2.4. TPP işlemi ve saflaştırma

TPP işlemi için öncelikle %30 doygun amonyum sülfat varlığında farklı t-bütanol oranları (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2) denendi. Karışım hafifçe karıştırıldıktan sonra 37^{o}C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra karışım 5000 rpm'de +4^{o}C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Oluşan 3 faz pastör pipet ile birbirinden ayrıldı, organik faz olarak adlandırılan üst faz uzaklaştırıldı, proteinin çöktüğü β-galaktosidaz içeren ara faz 2 ml, 25 mM pH 6,8 fosfat tampon çözeltisiyle çözündü, ara faz ve alt fazın aktivite ve protein analizleri yapıldı.

En iyi ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı belirlendikten sonra; en iyi tuz çöktürme oranını belirlemek için ham enzim çözeltisi farklı doygunluk oranlarına amonyum sülfat tuzu (%20, %30, %40, %50, %60, %70, %80) ile çöktürüldü. Çöktürmenin ardından belirlenen en iyi oran olan 1:0,5 ham enzim çözeltisi:t-bütanol ilavesi ile TPP işlemi gerçekleştirildi. Fazlar dikkatle ayrılarak orta ve alt fazın aktivite ve protein analizleri yapıldı.

İşlemde eklenecek amonyum sülfat miktarları,

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2} \qquad (2.3)$$

formülüne göre belirlendi.

S_2: Çözeltinin ayarlanacak doygun amonyum sülfat doygunluğunu,

S_1: Çözeltinin başlangıç doygun amonyum sülfat doygunluğunu ifade etmektedir.

pH'nın TPP üzerine etkisini incelemek için ham enzim çözeltisinin pH'sı 0,5 mM HCl ve 0,5 mM NaOH ile 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlandı. pH'sı ayarlanmış ham enzim çözeltilerine %60 doygun amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Ardından her pH denemesine 1:0,5 oranında t-bütanol eklenerek TPP işlemi gerçekleştirildi. Fazlar dikkatle ayrıldıktan sonra aktivite ve protein analizlerinin ardından TPP uygulamasında β-galaktosidaz için en uygun olan pH değeri tespit edildi.

2.2.5. Ekstrat ve saflaştırılan enzim için elektroforez çalışması

β-Galaktosidazın moleküler ağırlığı Laemmli metoduyla [51] SDS-PAGE yapılarak belirlendi. Alt jel %12'lik, üst jel %5'lik hazırlandı. Alt jel için; 5,25 ml distile su, 6 ml akrilamid-bisakrilamid (%30'luk), 3,75 ml % 0,4 SDS içeren pH 8,8 1,5 M Tris-HCl, 200 µl %10'luk amonyum persülfat (APS) ve 20 µl TEMED karışımı hazırlandıktan sonra jel döküldü. Kurumasına izin vermeden üzerine izopropil alkol ilave edildi. Jel oluştuktan sonra izopropil alkol temizlendi. Üst jel için hazırlanan; 3,06 ml distile su, 6,7 ml akrilamid-bisakrilamid (%30'luk), 1,225 ml % 0,4 SDS içeren pH 6,8 0,5 M Tris-HCl, 80 µl %10'luk APS ve 8 µl TEMED karışımından alt jel üzerine ilave edildi ve taraklar yerleştirildi. Jel oluştuktan sonra taraklar çıkarıldı ve SDS içeren elektroforez tampon çözeltisinin bulunduğu elektroforez tankına yerleştirildi. Taraklarla oluşturulan kuyulara marker proteini ve yükleme boyası ile 95°C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edilmiş saflaştırılmış enzimden 15 µl yüklendi. Güç kaynağı, ilk 10 dakika için 100 Volt; sonrasında 120 Volt olacak şekilde ayarlanarak proteinlerin yürütülmesi başlatıldı. Elektroforezde proteinlerin yürütülmesi bittikten sonra jeller, 0,1 gram Coomassie Brillant Blue R-250, 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml distile su ile hazırlanan boya çözeltisinde 2 saat bekletildi. Boyama işleminden sonra %10 metanol, %7 asetik asit ve %83 distile su içeren boya çıkarmak için hazırlanan solüsyonda 2 gün bekletildikten sonra bantlar belirginleşti.

Native-PAGE işleminde, SDS-PAGE'de kullanılan tüm çözeltiler aynı kompozisyonda hazırlandı. Farklı olarak bu elektroforez işleminde, çözeltiler SDS içermez iken; saflaştırılan enzim de denatüre edilmeden yüklendi ve elektroforez işlemi +4^{o}C'de gerçekleştirildi. Elektroforez sonucu jel, Coomassie Brillant Blue R-250 ile 2 saat boyunca boyandı ve %10 metanol, %7 asetik asit ve %83 distile su içeren boya çıkarmak için hazırlanan solüsyonda 2 gün bekletildi.

2.2.6. Zimogram hazırlanışı ve uygulaması

Zimogram işlemi Native-PAGE koşullarında Biswas yöntemine [28] göre gerçekleştirildi. Native-PAGE eleketroforez işleminden sonra jel, 10 dakika boyunca 50 mM pH 7,4 tuzlu fosfat tamponunda (Phosphate Buffer Saline, PBS) bekletildi. Tuzlu fosfat tamponu şu protokole göre hazırlandı: 800 mL distile su içinde, 8 gram

NaCl, 0,2 gram KCl, 1,44 gram Na_2HPO_4, 0,25 gram KH_2PO_4 çözündü ve pH, 1 M HCl ile 7,4'e ayarlanarak distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. Ardından jel saf su ile yıkanarak PBS tamponundan uzaklaştırıldı. PBS tamponundan uzaklaştırılan jel, X-Gal çözeltisi ile gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. X-Gal çözeltisinin hazırlama protokolü: 10 mg X-Gal 0,25 ml DMF ile çözündü ve kullanılana kadar -20°C'de ışıktan korunarak muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman 30 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_3[Fe(CN)_6]$ ve $MgSO_4.7H_2O$ içeren 50 mM pH 2,8 glisin–HCl tampon ile 1:40 oranında seyreltme yapıldı. Oluşan bantlar SDS içermeyen Coomassie Brillant Blue R-250 boyası ile görünür hale getirildi.

2.3. Saflaştırılan β-Galaktosidazın Karakterizasyonu

2.3.1. β-Galaktosidaz aktivitesinde pH etkisi

Enzimatik kataliz üzerine pH etkisini incelemek için, 20 mM ONPG substratı; farklı pH'lara sahip tampon çözeltiler içerisinde hazırlandı. Kullanılan tampon çözeltiler aşağıdaki gibidir:

pH 2 ve pH 3 için 50 mM glisin-HCl tampon çözeltisi: Glisin ve HCl için ayrı ayrı 50 mM'lık çözeltileri hazırlandıktan sonra, pH metre yardımıyla çözeltileri birbirine katarak pH 2 ve pH 3'e ayarlanmış tampon çözeltiler hazırlandı.

pH 4, pH 5 ve pH 6 için 50 mM asetat tampon çözeltisi: Sodyum asetat ve asetik asitin 50 mM'lık çözeltileri hazırlandıktan sonra bu iki çözelti karıştırılarak istenilen pH'larda tampon çözelti hazırlandı.

pH 7 ve pH 8 için 50 mM fosfat tampon çözeltisi: Sodyum dihidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfatın 50 mM'lık çözeltileri hazırlandıktan sonra pH ölçümü altında belirtilen pH'larda iki çözelti birbirine karıştırılarak hazırlandı.

pH 9 ve pH 10 için 50 mM glisin-NaOH tampon çözeltisi: NaOH ve Glisin'in 50 mM'lık çözeltileri hazırlandı daha sonra bu iki çözelti birbirine karıştırılarak pH metre yardımıyla pH'ları ayarlanarak istenilen pH'daki tampon çözeltiler hazırlandı.

Farklı pH'lara sahip tampon çözeltilerde hazırlanan substratlar ile aktivite analizleri yapıldı. En yüksek aktiviteye sahip pH değerine (%100) bağlı olarak diğer pH aralığındaki sonuçların bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı.

2.3.2. β-Galaktosidaz aktivitesinde sıcaklık etkisi

50 mM pH 2,8 glisin-HCl tamponu ile hazırlanan 20 mM ONPG'nin katalizi için maksimum enzim aktivitesini gösteren sıcaklığı belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (25^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C, 45^{o}C, 50^{o}C, 55^{o}C, 60^{o}C) aktivite tayinleri yapıldı. 450 µl ONPG üzerine 50 µl enzim ilave edilerek yukarıda belirtilen sıcaklıklarda 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 1 M 0,5 ml Na_2CO_3 ilavesinin ardından yapılan spektrofotometrik ölçümlerin sonucunda en yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklığın değerine (%100) bağlı olarak, diğer sıcaklıkların bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı.

Enzimin termal stabilitesini belirlemek için, yukarıda belirtilen sıcaklıklarda enzim önce 30 dakika ön inkübasyona tutuldu ardından aktivite belirleme protokolüne göre 37^{o}C'deki (%) kalan aktivitelerine bakıldı.

2.3.3. Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması

Sıcaklıkla reaksiyon hız ilişkisini, Boltzmann dağılım yasasıyla birleştiren Svante Arrhenius'un elde ettiği Arrhenius denklemi;

$$k = A.e^{-E_a/RT} \tag{2.4}$$

şeklinde ifade edilmiştir. Üstel olmayan yazımı ve grafik üzerindeki yorumu daha kullanışlı olduğundan eşitliğin her iki tarafının logaritmasının alınmasıyla;

$$\ln k_{cat} = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT}\right) \tag{2.5}$$

formülü türetilmiştir. $V = k_{cat}.[E]_t$ olduğundan, $k_{cat} = V/[E]_t$ olur. $[E]_t$ deney boyunca sabit olduğundan $\ln k_{cat} \cong \ln V$ alınabilir. Böylece çizilen lnk-1/T grafiğinin eğimi, (-) E_a/R'ye eşit olacaktır. Bundan faydalanarak aktivasyon enerjisi (E_a) hesaplanmaktadır [52].

Reaksiyonun başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisinin hesaplanması için farklı sıcaklıklarda (25^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C, 45^{o}C, 50^{o}C, 55^{o}C, 60^{o}C) aktivite ölçümleri (20 mM pH 2,8 ONPG ile) yapıldı. Arrhenius formülüyle aktivasyon enerjisinin hesaplanması için, ln k – 1/T grafiği çizildi.

2.3.4. Kinetik parametrelerin (K_m, V_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m) belirlenmesi

β-Galaktosidaz enziminin ONPG hidrolizi için K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi başlangıç hız koşullarında yatışkın hal yaklaşımına göre türetilmiş Michaelis-Menten denklemi ve onun resiprokal formu kullanılmıştır;

$$V_0 = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \tag{2.6}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} x \frac{1}{[S]} \tag{2.7}$$

formüllerdeki parametreler;

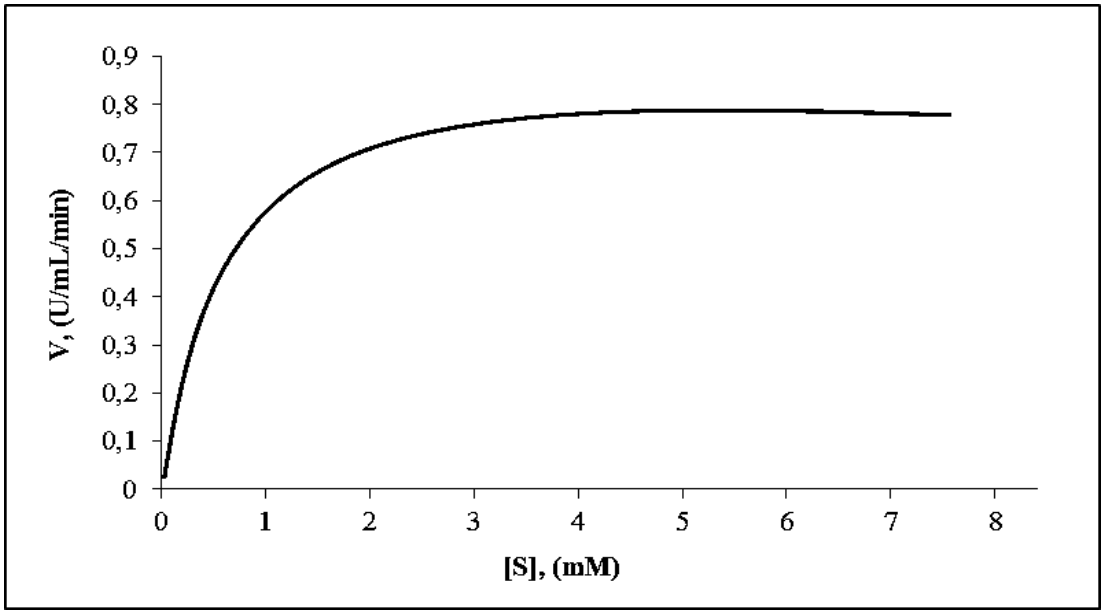
V, 37^{o}C'de pH 2,8'de ONPG hidrolizinin başlangıç hızını (U/ml/dk);

[S], 50 mM pH 2,8 glisin-HCl tamponunda hazırlanmış ONPG konsantrasyonunu (mM);

K_m, ONPG hidrolizi için belirlenen koşullarda enzimin Michaelis-Menten sabitini (mM);

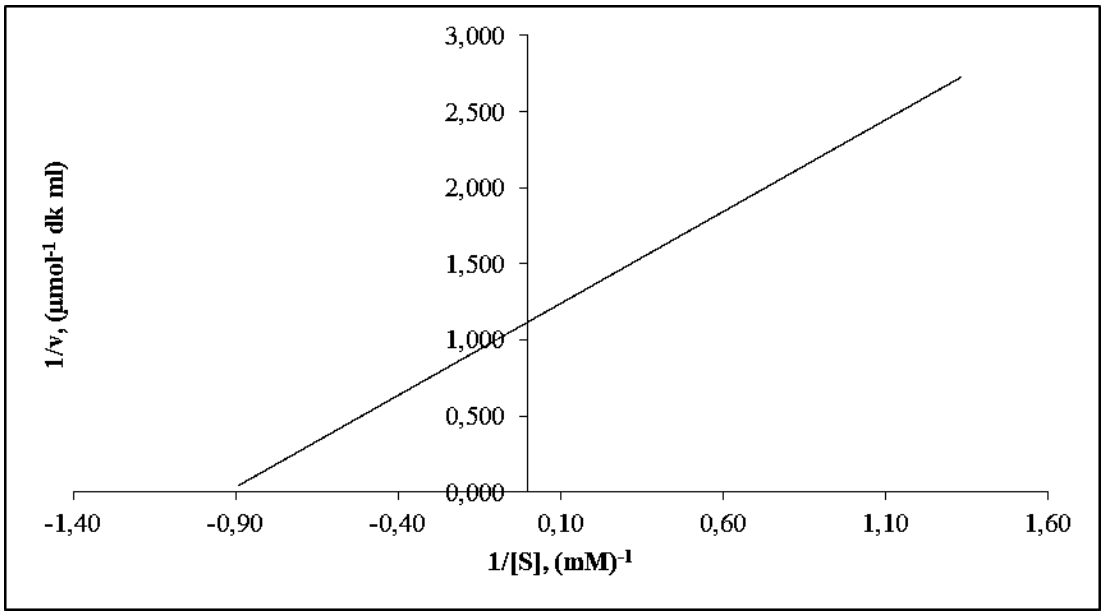
V_m, ONPG hidrolizi ile ulaşılabilecek maksimum başlangıç hızını (U/ml/dk) göstermektedir.

Denklem (2.5)'e göre v-[S] grafiği çizildiğinde Şekil 2.3'te görülen hiperbol elde edilir.



Şekil 2.3. v-[S] grafiği

Denklem (2.7) yardımıyla 1/v-1/[S] grafiği çizildiğinde ise Şekil 2.4'te görülen doğrusal grafik elde edilir. Bu grafiğin eğiminden K_m/V_m hesaplanırken, grafiğin y eksenini kestiği noktadan $1/V_m$, x eksenini kestiği noktadan ise $-1/K_m$ elde edilir.



Şekil 2.4. 1/v-1/[S] grafiği

Enzimin kinetik parametrelerini belirlemek üzere yapılan çalışmamızda, spesifik aktivitesi 1,82 U/mg protein miktarı 0,36 mg/ml olan enzim kullanılarak 0-10 mM aralığındaki ONPG konsantrasyonlarında 3 dakika inkübasyon süresi ile yapıldı.

Enzim konsantrasyonunun, V_m ile ilişkisi;

$$V_m = k_{cat}.E_{(t)} \tag{2.8}$$

formülüyle ifade edilir. Burada;

k_{cat}: turnover sayısıdır, enzimin substratına doygun olduğu durumlarda, bir molekül enzimin birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarı olarak ifade edilir.

$[E]_t$, toplam enzim konsantrasyonunu ifade eder (μmol/ml) [44,53]. Bunun dışında kinetik değerlendirmede, enzimin katalitik performansını ifade eden k_{cat}/K_m oranı hesaplandı.

2.3.5. Saflaştırılmış β-galaktosidazın termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Termodinamik parametrelerin hesaplanması;

$$\Delta G^{\#} = -RT\ln\left(\frac{k_{cat}.h}{k_b.T}\right) \qquad \text{(kJ/mol)} \tag{2.9}$$

$\Delta G^{\#}$: ONPG hidrolizine ilişkin aktivasyon serbest enerjisi,

$$\Delta G^{\#}_{E-T} = -RT\ln\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right) \qquad \text{(kJ/mol)} \tag{2.10}$$

$\Delta G^{\#}_{E-T}$: Tranzisyon (geçiş) hali bağlanma serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-S} = -RT\ln\left(\frac{1}{K_m}\right) \qquad \text{(kJ/mol)} \tag{2.11}$$

ΔG_{E-S}: Substrat bağlanma enerjisi,

$$\Delta H^{\#} = E_a - RT \qquad \text{(kJ/mol)} \tag{2.12}$$

$\Delta H^{\#}$: Entalpi değişimi,

$$\Delta S^{\#} = \left(\frac{\Delta H^{\#} - \Delta G^{\#}}{T}\right) \qquad \text{(kJ/mol.K)} \tag{2.13}$$

$\Delta S^{\#}$: Entropi değişimi,

formüllerini kullanarak yapıldı. Formüllerde yer alan,

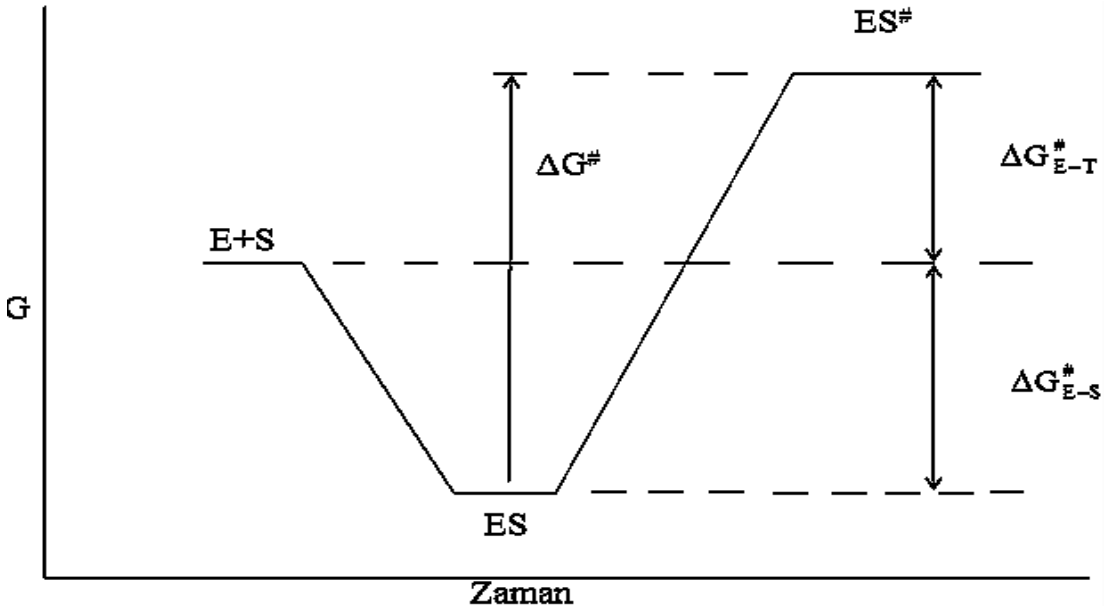
k_b, Boltzman sabitini ($1{,}38x10^{-23}$) ($J.K^{-1}$);

h, Plank sabitini ($6{,}63x10^{-34}$) (J.s);

R, gaz sabitini ($8{,}314\ J.K^{-1}mol^{-1}$);

k_{cat}, turnover katsayısını ifade etmektedir (dk^{-1}) [54].

Nohut granüllerinden saflaştırılan β-galaktosidazla katalizlenen ONPG hidrolizi reaksiyonun, termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzey diyagramı Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. β-Galaktosidaz ile ONPG hidroliz reaksiyonunda serbest enerji düzeyi diyagramı [54]

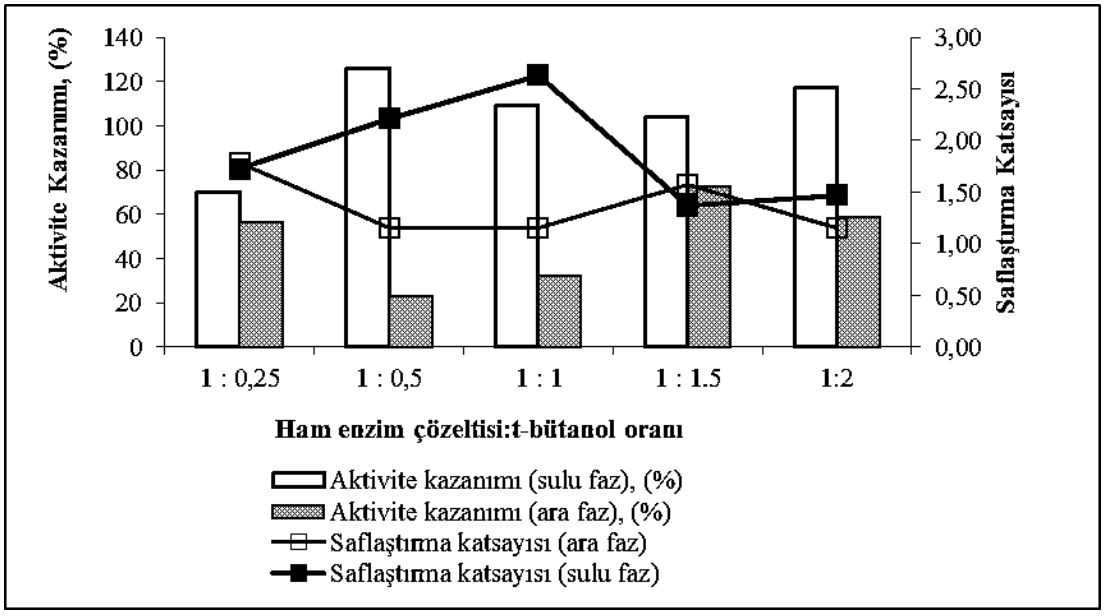
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. β-Galaktosidazın TPP İle Saflaştırılması ve Aktivite Kazanımı

TPP, tuz konsantrasyonu, alkol oranı ve pH gibi çeşitli durumlardan etkilenmektedir [49]. Bu yüzden çalışmamızda farklı ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranları, farklı tuz konsantrasyonları ve farklı pH'ların saflaştırma ve aktivitenin geri kazanımı üzerine etkileri incelenmiştir.

3.1.1. Ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılması üzerine etkisi

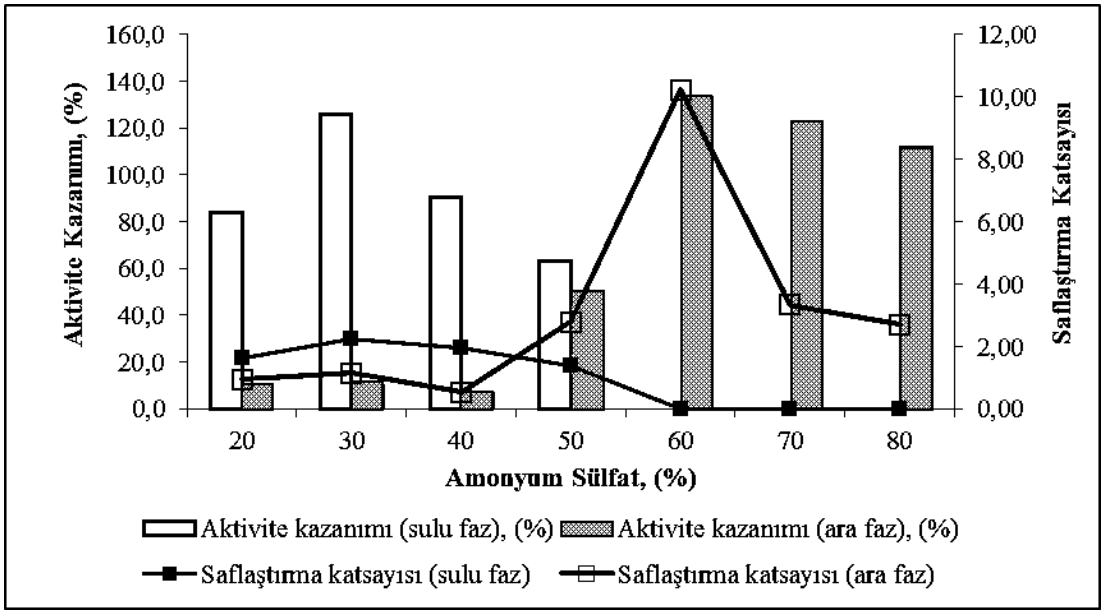
Sabit doygun amonyum sülfat çöktürmesi ile (%30) farklı ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranlarının TPP üzerime etkisi Şekil 3.1'de gösterilmiştir. En yüksek enzim geri kazanım (%126) ve saflaştırma katsayısı (2,24) için 1:0,5 t-bütanol oranı belirlendi. Artan t-bütanol konsantrasyon varlığında her iki fazda saflaştırma katsayılarında bir düşüş gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak, ortamda artan t-bütanol konsantrasyonuyla amonyum sülfat doygunluğundaki azalma olabilir. Genelde TPP işleminde en iyi sonuç için ham enzim çözeltisinin ml başına 0,2-0,5 ml t-bütanole gereksinim duyulmaktadır [49]. Bizim çalışmamızda da bu oran 1:0,5 ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı olarak bulunarak literatür ile uyumludur. Ayrıca t-bütanol dallanmış yapıya sahip bir alkol olduğu için proteinini katlanmış üç boyutlu yapısından içeriye difüzlenemediği ancak, ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranının 1'in üzerine çıktığı durumlarda t-bütanolün enzimi denatüre etme olasılığının olduğu literatürde bildirilmiştir [4,55].



Şekil 3.1. Farklı ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranlarının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılmasının üzerine etkisi

3.1.2. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılması üzerine etkisi

Şekil 3.1'deki sonuçlara göre ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı, 1:0,5 sabit olacak şekilde yapılan farklı doygunluk konsantrasyonlarındaki amonyum sülfat çalışmasında tuz oranının yükseldikçe enzimin ara faza geçtiği gözlemlendi. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi, β-galaktosidaz aktivitesi %60 doygun amonyum sülfat konsantrasyonundan itibaren tamamıyla ara fazda kalmıştır. β-Galaktosidazdaki aktivite geri kazanımı (%133) ve saflaştırma katsayısı (10,1) sonuçlarına göre en iyi sonuç %60 doygun amonyum sülfat oranında ara fazda gözlenmiştir. %60 doygun tuz konsantrasyonunun üzerinde, aktivite geri kazanımındaki ve saflaştırma katsayısındaki düşüşün proteinin çökmesinden ve geri dönüşümsüz denatürasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [56].

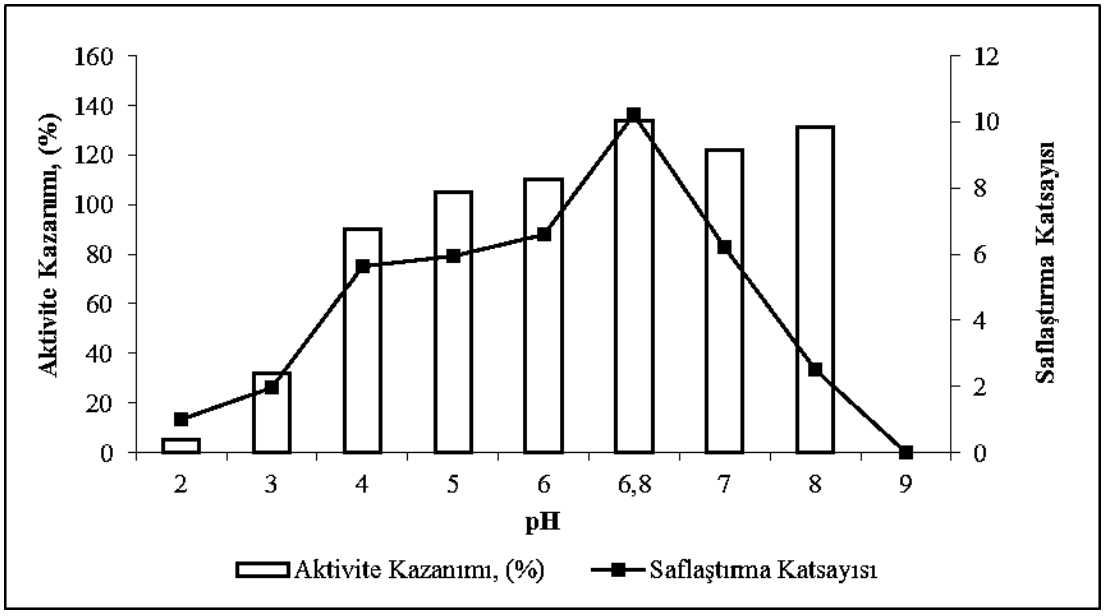


Şekil 3.2. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılmasının üzerine etkisi

TPP işleminde enzimatik aktivitedeki artış, yöntemin enzimin esnekliğini arttırarak enzim substrat kompleksi oluşumunun artmasına sebep olduğu şeklinde açıklanabilir [49,57,58].

3.1.3. pH'nın TPP üzerine etkisi

pH değişimleri, protein molekülündeki elektrostatik etkileşimleri ve protein molekülünün bütünündeki lizin, glutamat ve aspartat kalıntılarının yüklerini değiştirir. Değişen elektrostatik etkileşimler, faz ayrımındaki düzeni etkilemektedir [30]. TPP'nin pH değeri pI değerinden daha düşük olduğunda aminoasitler, dolayısıyla protein pozitif yüklü hale gelir ve molekül ara faza geçebilir [2,49,59]. Nohuttan elde edilen β-galaktosidazın pI değeri literatürde 8,63 olarak rapor edilmiştir [60]. Şekil 3.3'te farklı pH değerlerinin TPP ile β-galaktosidazın saflaştırılması ve geri kazanımı üzerine etkisi verilmektedir. En yüksek aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranı (%133 aktivite kazanımı ve 10,1 saflaştırma katsayısı) %60 doygun amonyum sülfat konsantrasyonu ve 1:0,5 t-bütanol oranıyla pH 6,8'de bulundu. Bu sonuç hedef enzimin literatürde verilen pI değerinden aşağıdadır. Dolayısıyla enzimin pI değerinden daha düşük pH'da TPP'de birikmesi literatür bilgileriyle uyuşmaktadır [2,49,59].



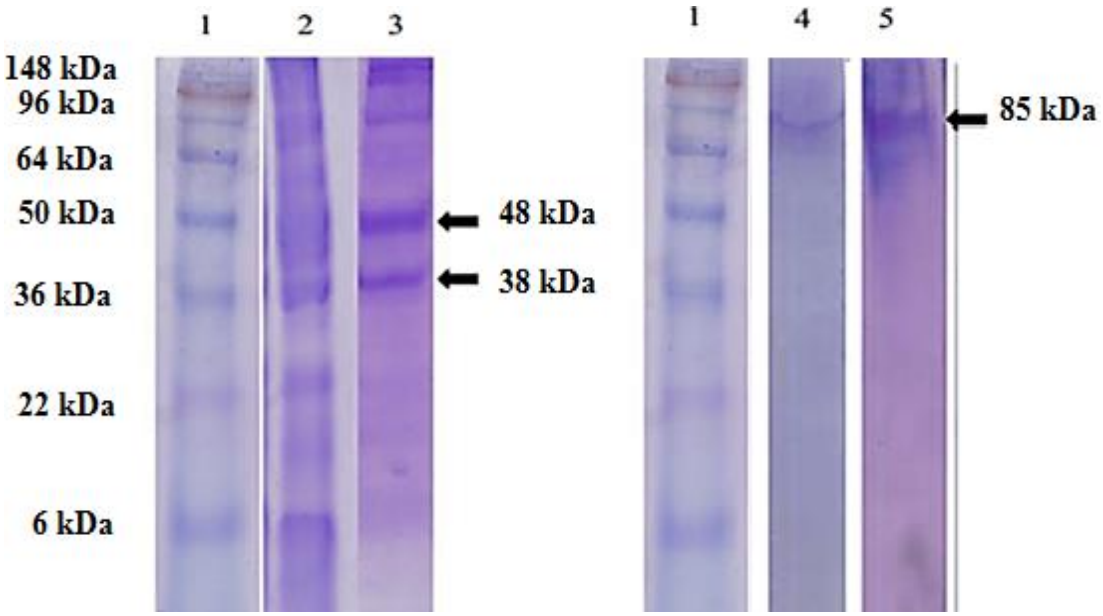
Şekil 3.3. pH'nın TPP oluşumu ile β-galaktosidaz saflaştırılması üzerine etkisi

3.2. Saflaştırma ve Aktivite Kazanımı Sonuçları

Nohuttan TPP ile yapılan β-galaktosidaz saflaştırma profili, Tablo 3.1'de gösterilmektedir. Tabloya göre, %133 aktivite kazanımı ve 10,1 kat saflaştırma elde edilmiştir. Şekil 3.4'te görüldüğü gibi, SDS-PAGE protein bantları yaklaşık olarak 96, 60, 45, 22, 16 ve 6 kDa'dur. Bu bantların bir kısmı saflaştırılan enzimde görülmemekte bir kısmı da daha silik olarak görülmektedir. SDS-PAGE analizinden saflaştırılan enzimin 48 ve 38 kDa ağırlıklarında iki alt birim içerdiği görülmüştür. Bu sonuçlar, Native-PAGE ve zimogram analizleriyle de desteklenmiştir. Zira zimogram ve Native-PAGE analizleri sonucu proteinin molekül ağırlığı 85 kDa olarak bulunmuştur. Literatürde de Kishore ve Kayastha tarafından gerçekleştirilen; geleneksel yöntemler ile nohut granüllerinden saflaştırılmış β-galaktosidaz enziminin aynı molekül ağırlığına sahip iki alt birim içerdiği rapor edilmiştir [60].

Tablo 3.1. Nohuttan TPP ile β-galaktosidaz saflaştırılması sonuçları

Basamak	Hacim (mL)	Protein Kons. (mg/mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Aktivite Kazancı (%)
Ham çözelti	2	2,71	0,49	0,98	5,42	0,18	1	100
Ara faz (TPP Fazı)	2	0,36	0,66	1,31	0,72	1,81	10,1	133

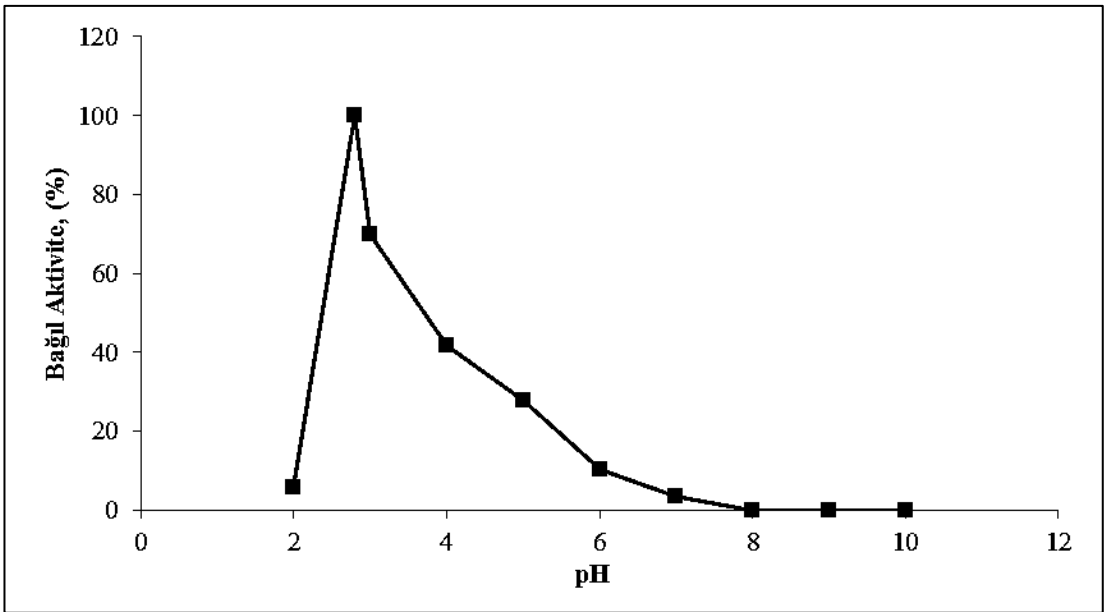


Şekil 3.4. TPP oluşumu ile saflaştırılan β-galaktosidazın elektroforetik analizi (1: marker, 2: ekstrat, 3: saf enzim, 4: zimogram, 5: native-PAGE)

3.3. TPP Oluşumu İle Saflaştırılan β-Galaktosidazın Karakterizasyonu

3.3.1. Saflaştırılmış β-galaktosidaza pH etkisi

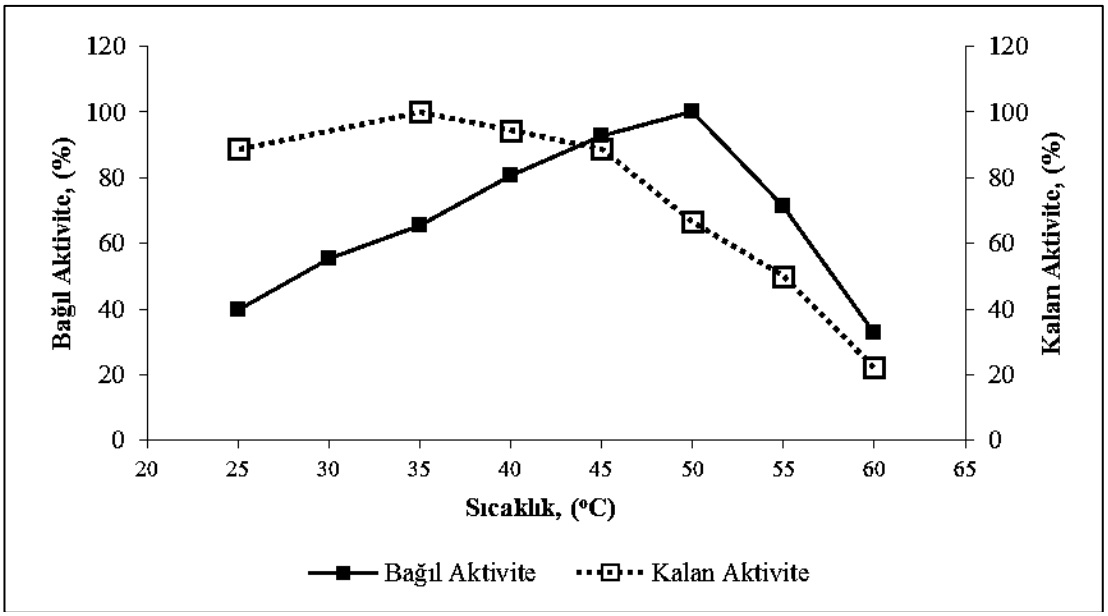
Literatürde bitkisel β-galaktosidazların optimal pH'ları asidik aralıkta bildirilmektedir [60]. Farklı pH'lardaki (2-10) tampon çözeltilerde hazırlanan 20 mM ONPG'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi; çalışmada optimal pH değeri de bu genellemeye uygun olarak 2,8 (Şekil 3.5) bulundu. Kishore ve ark. tarafından kurutulmuş nohuttan elde edilen β-galaktosidaz üzerine yapılan bir çalışmada enzimin ONPG hidrolizi için optimal pH değeri 2,8 olarak ifade edilmiştir. Kishore ve Kayastha tarafından yapılan bir başka çalışmada β-galaktosidaz enzimi geleneksel saflaştırma yöntemleriyle altı farklı basamakta saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin ONPG hidrolizi için optimal pH değeri 2,8 olarak belirlenmiştir [30,60].



Şekil 3.5. ONPG pH'sının aktiviteye olan etkisi

3.3.2. Saflaştırılmış β-galaktosidaza sıcaklığın etkisi

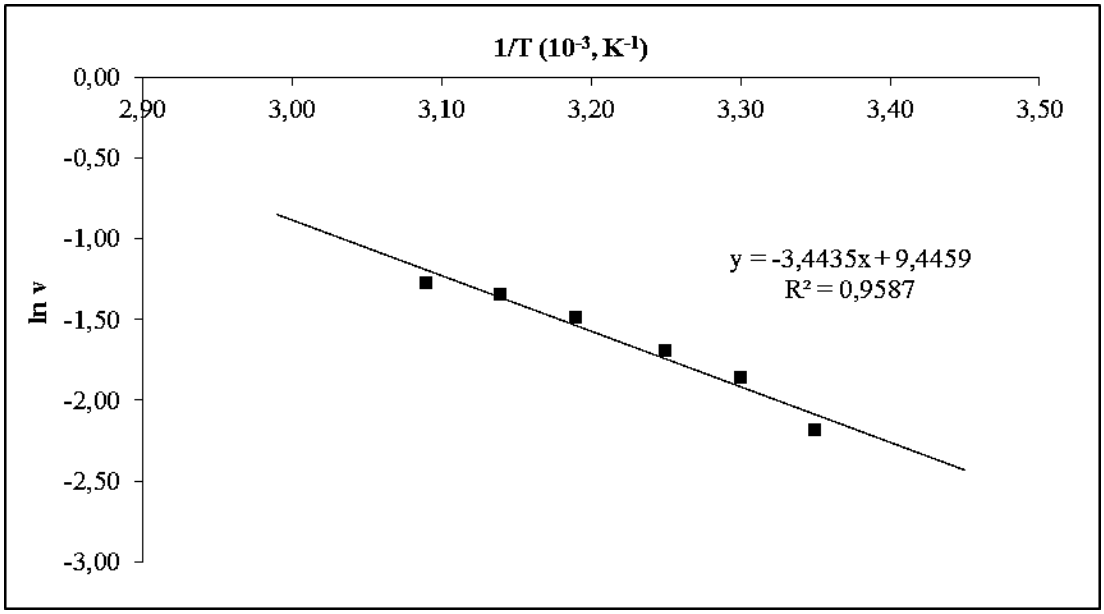
25-60^{o}C aralığında yapılan çalışmada nohuttan saflaştırılan β-galaktosidaz için optimal sıcaklık 50^{o}C olarak bulundu (Şekil 3.6.) Nohuttan elde edilen başka β-galaktosidaz çalışmalarında bu sıcaklık 60^{o}C olarak bulunmuştur [29,30,60]. TPP yöntemi enzim aktivasyonuna esnekliğini arttırarak sebep olabilmektedir. Ancak artan esneklik enzimin optimal sıcaklığının da düşmesine neden olabilir [61]. Enzimin termostabilitesinin 25-45^{o}C arasında oldukça iyi olduğu gözlenmiştir. 25^{o}C'de enzimin % kalan aktivitesi %89 olarak hesaplanırken; 35, 40 ve 45^{o}C'lerdeki % kalan aktivitesi sırayla %100, %94 ve %89 olarak belirlenmiştir. Enzimin sıcaklık stabilitesi endüstriyel uygulama için oldukça önemlidir. Farklı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir [29,30,60].



Şekil 3.6. Aktivite ve stabiliteye sıcaklığın etkisi

3.3.3. Saflaştırılmış β-galaktosidazın Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması

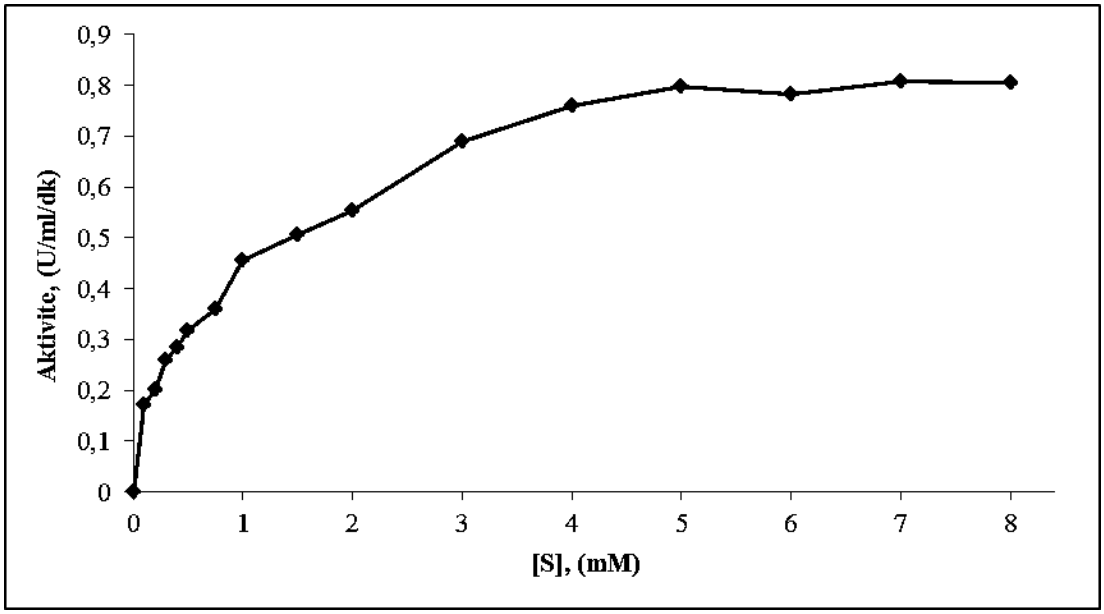
Arrhenius eşitliğinden yararlanarak çizilen Şekil 3.7'de gösterilen lnv-1/T grafiğinde eğim, $-E_a/R$'ye eşit olduğundan [53]; aktivasyon enerjisi (E_a) 28,63 (kJ/mol) olarak hesaplandı. Geleneksel saflaştırma metotlarıyla nohuttan saflaştırılan β-galaktosidazla ONPG hidroliz çalışmalarında aktivasyon enerjisi 47,4 kJ/mol [60] ve 43,96 kJ/mol [30] olarak bulunmuştur. Reaksiyonun başlaması için gerekli olan enerji olan aktivasyon enerjisinin, diğer yöntemlerle saflaştırılan β-galaktosidaz çalışmalarına göre daha düşük bulunması yöntemin avantajını göstermektedir.



Şekil 3.7. Arrhenius grafiği

3.3.4. Kinetik sabitlerin hesaplanması

Enzimin K_m ve V_m değerlerini hesaplamak üzere Michaelis-Menten eşitliğinden yararlanılarak çizilen grafik Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

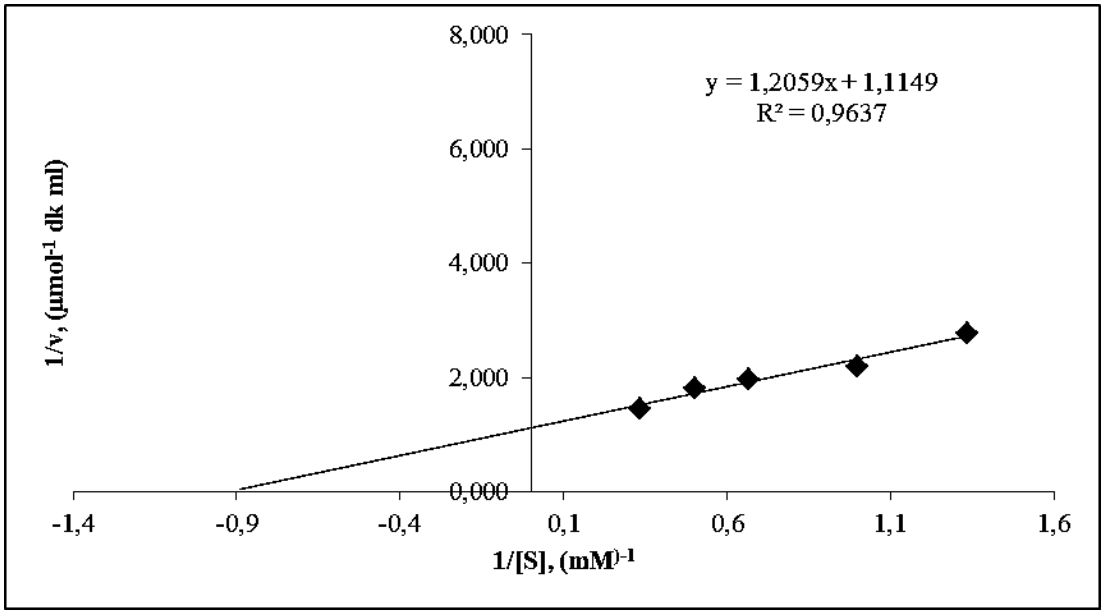


Şekil 3.8. v-[S] grafiği

Bu grafikten yararlanılarak ONPG konsantrasyon aralığı 0.75-3 mM olarak belirlenmiştir ve bu konsantrasyonlar için çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.9'da gösterilmiştir. ONPG substratı için β-galaktosidaz'ın hesaplanan Michaelis-

Menten sabiti (K_m) 1,1 mM, maksimum hız, (V_m) 0,90 U/ml/dk olarak bulunmuştur. Nohuttan elde edilen β-galaktosidaz ile yapılan bir çalışmada ONPG hidrolizinin katalizi için K_m değeri 1,73 mM olarak bulunmuştur [60]. TPP ile yapılan çalışmaların K_m değerlerini olumlu yönde geliştirdikleri daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu durum enzimin esnekliğinin artmasına bağlıdır. Proteinaz K enzimi ile yapılan X-ray çalışmaları sonucuna göre TPP işlemi gören enzimin esnekliğinin arttığı ve TPP işlemi gören enzimin aynı işlemiş görmeyen enzime göre aktif bölgesine erişimin arttığı bildirilmiştir. Kromatografik ve TPP yöntemiyle yapılan bir çalışmada, TPP yöntemi ile elde edilen K_m değerinin daha düşük olduğu bulunmuştur [62,63].

Denklem (2.8)'den yararlanarak k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 212,26 dk^{-1} ve 193 $mM^{-1}dk^{-1}$ olarak hesaplandı. Bu kinetik parametreler Tablo 3.2'de ayrıca gösterilmiştir. Kotake ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, geleneksel yöntemle turptan saflaştırılan β-galaktosidaz enziminin ONPG için kinetik değerleri sırasıyla; K_m, 0,3 mM; k_{cat}, 2,05 dk^{-1}; k_{cat}/K_m, 6,83 $mM^{-1}dk^{-1}$ olarak bulunmuştur [64]. Sinnott ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada *Escherichia coli'*den elde edilen β-galaktosidazın ONPG hidrolizi için için K_m değeri 0,7 mM, k_{cat} değeri 2 dk^{-1}, k_{cat}/K_m değeri 2,86 $mM^{-1}dk^{-1}$ olarak bulunmuştur [65]. Yine Sinnott ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada *Escherichia coli'*den elde edilen β-galaktosidaz ve ONPG substratı için K_m değeri 0,1 mM, k_{cat} değeri 16,7 dk^{-1}, k_{cat}/K_m değeri 167 $mM^{-1}dk^{-1}$ olarak bulunmuştur [66]. Yapılan bu üç çalışmayla, çalışmamda bulunan değerler kıyaslandığında, çalışmamdaki k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri oldukça yüksek kalmaktadır. Bu değerlerin yüksek olması bu çalışmada TPP yöntemiyle saflaştırdığımız enzimin K_m değerinin daha yüksek olmasına rağmen katalitik performansının daha fazla olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.9. Lineweaver-Burk grafiği

3.3.5. Saflaştırılmış β-galaktosidazın termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Kurutulmuş nohut granüllerinden saflaştırılan β-galaktosidaz ile ONPG hidrolizi için bulunan termodinamik parametreler ($\Delta G^{\#}$, $\Delta H^{\#}$, $\Delta S^{\#}$, $\Delta G_{E\text{-}S}, \Delta G^{\#}_{E-T}$), (2.9-2.13) numaralı eşitliklerden yararlanılarak hesaplanmış ve Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Hoyoux ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudoalteromonas haloplanktis* ve *Escherichia coli'*den saflaştırılan β-galaktosidazın ONPG substratı kullanarak yapılan termodinamik parametreleri *P. haloplanktis* için E_a 20,8 kJ/mol, $\Delta G^{\#}$ 58,7 kJ/mol, $\Delta H^{\#}$ 18,3 kJ/mol, $\Delta S^{\#}$ -0,14 kJ/mol.K; *E. coli* için E_a 26 kJ/mol, $\Delta G^{\#}$ 60,5 kJ/mol, $\Delta H^{\#}$ 23,6 kJ/mol, $\Delta S^{\#}$ -0,13 kJ/mol.K olarak bulunmuştur [67]. Tablo 3.2'de belirtilen sonuçlarla, her iki bakteriden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında sonuçların benzerlik gösterdiği görülmektedir. Pal ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, bademden geleneksel yöntemlerle saflaştırılan β-galaktosidazın ONPG substratı kullanarak bulunan termodinamik parametreleri; E_a 42,86 kJ/mol, $\Delta G^{\#}$ 104,96 kJ/mol, $\Delta H^{\#}$ 121,93 kJ/mol, $\Delta S^{\#}$ 0,05 kJ/mol.K olarak bulunmuştur [68]. Daha yüksek $\Delta G^{\#}$ değeri destabilize $ES^{\#}$ kompleksinin ifade etmektedir ki; destabilize $ES^{\#}$ kompleksi durumunda hidrolitik reaksiyonun aktivasyon enerjisi artmaktadır [54]. Aynı zamanda tez çalışmamızda hesapladığımız daha düşük $\Delta H^{\#}$ değeri ONPG'nin hidrolitik katalizi için gerekli olan

enerjinin daha az olduğunu göstermektedir. Bu durum hesaplanan $\Delta S^{\#}$ değeri ile de desteklenmektedir. Yüksek $\Delta S^{\#}$ değerlerinin kataliz reaksiyonları üzerindeki etkisi negatif yöndedir [68]. Tez çalışmamda hesapladığım daha düşük $\Delta S^{\#}$ değerin nohut granüllerinden saflaştırılan β-galaktosidaz enziminin ONPG substratını katalizleme yeteneğinin daha fazla olduğunun termodinamik göstergesidir.

Tablo 3.2. Nohuttan saflaştırılan β-galaktosidazla 37^{o}C ve pH 2,8'de ONPG hidrolizi için elde edilen kinetik ve termodinamik parametreler

Parametreler	Sonuç	Birim
E_t	$4{,}24x10^{-3}$	μmol/mL
V_m	0,9	U/ml/dk
K_m	1,1	mM
k_{cat}	212,26	dk^{-1}
k_{cat}/K_m	193	$dk^{-1}mM^{-1}$
E_a	28,63	kJ/mol
$\Delta G^{\#}$	62,21	kJ/mol
$\Delta H^{\#}$	26,06	kJ/mol
$\Delta S^{\#}$	-0,12	kJ/mol.K
ΔG_{E-S}	0,25	kJ/mol
$\Delta G^{\#}_{E-T}$	-13,56	kJ/mol

3.4. Sonuç

TPP yöntemi kullanılarak, nohuttan β-galaktosidaz enzimi saflaştırıldı. Enzimin aktivite geri kazanımı, diğer bitki kökenli β-galaktosidaz çalışmalarından daha yüksek bulundu. Saflaştırılan enzim +4^{o}C'de uzun süre stabil olarak saklanabilmektedir. Saflaştırma sürecinin, özellikle yüksek aktivite kazancının yanında hızlı, ucuz ve tek basamakta yapılabilir olması bu sürecin potansiyelini endüstriyel ölçekteki enzim saflaştırma uygulamaları için yüksek tutmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Mlichova Z., Rosenberg M., Current trends of β - galactosidase application in food technology, *Food Nutr. Res.*, 2006, **45**, 47-54.

[2] Rajeeva S., Lele S. S., Three- phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp. WR-1, Biochem. Eng. J.*, 2011, **54**, 103-110.

[3] Gupta M. N., Sharma A., Macroaffinity ligand - facilitated three - phase partitioning (MLFTPP) for purification of xylanase, *Biotechnol. And Bioengineering*, 2002, **80**, 228-232.

[4] Dhananjay S. K., Mulimani V. H., Purification of α - galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnol. Lett*., 2008, **30**, 1565-1569.

[5] Gupta M. N., Sharma S., Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization, *Protein Expression and Purification*, 2001, **21**, 310-316.

[6] Gupta M. N., Sharma A., Purification of pectinases by three-phase partitioning, *Biotechnol. Lett*., 2001, **23**, 1625-1627.

[7] Tüzün C., *Biyokimya*, Palme Yayınevi, Ankara, 1991.

[8] Uyanık A., Beta - galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu., Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008, 233615.

[9] Puri M., Gupta S., Pahuja P., Kaur A., Kanwar J. E., Kennedy J. F., Cell Disruption Optimization and Covalent Immobilization of β-D-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for Lactose Hydrolysis in Milk, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, **160**, 98-108.

[10] Panesar R., Panesar P. S., Singh R. S., Kennedy J. F., Puri M., Hydrolysis of milk lactose in a packed bed reactor system using immobilised yeast cells *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2011, **86**, 42-46.

[11] Vermaa M. L., Barrowa C. J., Kennedy J. K., Puri M., Immobilization of β-D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalised silicon dioxide nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, **50**, 432-437.

[12] Wang H., Luo H., Bai Y., Wang Y., Yang P., Shi P., Zhang W., Fan Y., Yao B., An acidophilic β-galactosidase from *Bispora* sp. MEY-1 with high lactose hydrolytic activity under simulated gastric conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 5535–5541

[13] Lee J. H., Kim Y. S., Yeom S. J., Oh D. K., Characterization of a glycoside hydrolase family 42 β-galactosidase from *Deinococcus geothermalis*, *Biotechnol. Lett.*, 2011, **33**, 577-583.

[14] Chen W., Chen H., Xia Y., Zhao J., Tian F., Production purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*, *J. of Dairy Science*, 2008, **91**, 1751-1758.

[15] Hildebrandt P., Wanarska M., Kur J., A new cold-adapted β-D-galactosidase from the *Antarctic Arthrobacter* sp. 32c–gene cloning, overexpression, purification and properties, *BMC Microbiology*, DOI: 10.1186/1471-2180-9-151.

[16] Di Lauro B., Strazzulli A., Perugino G., La Cara F., Bedini E., Corsaro M. M., Rossi M., Moracci M., Isolation and characterization of a new family 42 β-galactosidase from the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*: Identification of the active site residues, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2008, **1784**, 292-301.

[17] Lu L., Xiao M., Li Z., Li Y., Wang F., A novel transglycosylating β-galactosidase from *Enterobacter cloacae* B5, *Process Biochemistry*, 2009, **44**, 232-236.

[18] Lee D. H., Kang S. G., Suh S. G., Byun J. K., Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*), *Molecules and Cells*, 2003, **15**, 68-74.

[19] Kang I. K., Suh S. G., Gross K. C., Byun J. K., N – terminal amino acid sequence of persimmon fruit beta-Galactosidase, *Plant Physiol*., 1994, **105**, 975-979.

[20] Okada S., O'Brien J. S., Generalized gangliosidosis: Beta - galactosidase deficiency, *Science*, 1968, **160**, 1002-1004.

[21] Altman - Hamamdzic S., Groseclose C., Ma J. X., Hamamdzic D., Vrinda vanam N. S., Middaugh L. D., Parratto N. P., Salle F. R., Expression of beta-galactosidase in mouse brain: utilization of a novel nonreplicative Sindbis virus vector as a neuronal gene delivery system, *Gene Therapy*, 1997, **4**, 815-822.

[22] Greenberg N. A., Mahoney R. R., Production and characterization of β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*, *J. Food Sci.*, 1982, **47**, 1824-1828.

[23] Garman J., Coolbear T., Smart J., The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol.Biotechnol.*, 1996, **46**, 22-37.

[24] Chandler V., Donovan S., Goodwin W., Sprague S., Stiefbold F., Enzyme kinetics, *Proceeding of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE),* 1998, **19**, 81-97.

[25] Gekas V., Lopez-Leiva M., Hydrolysis of lactose, *Process Biochem.*, 1985, **2**, 2-12.

[26] Ross G. S., Redgwell R. J., MacRea E. A., Kiwifruit β-galactosidase–isolation and activity against spesific fruit cell-wall polysaccharides, *Planta*, 1993, **189**, 499-506.

[27] Ali Z. M., Armugam S., Lazan H., β-Galactosidase and its significance in ripening mango fruit, *Phytochemistry,* 1995, **38**, 1109-1114.

[28] Biswas S., Kayastha A. M., Seckler R., Purification and characterization of a thermostable β-galactosidase from kidney beans (*Phaseoulus vulgaris L.)* cv. PDR14, *Plant Phys.*, 2003, **160**, 327-337.

[29] Dwavedi A., Kayastha A. M., A β-galactosidase from pea seeds purification, stabilization, catalytic energetics, conformational heterogeneity and its significiance, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 7086-7096.

[30] Kishore D., Talat M., Srivastava O. N., Kayastha A. M., Immobilization of β-galactosidase onto functionalized graphene nano-sheets using response surface methodology and its analytical applications, *Plos One*, 2012, **7**.

[31] Vasiljevic T., Jelen P., Production of β-galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using *Thermophilic lactic asid bacteria, Innovative Food Sci. & Emerg. Technol.*, 2001, **2**, 75-85.

[32] Vesa T. H., Marteau P., Korpela R., Lactose intolerance, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2000, **19**, 165-175.

[33] Miller G., Jarvis J., McBean L. D., Lactose Intolerance, *Handbook of Dairy Foods and Nutrition,* CRC Press, Boca Raton., FL., 187-220, 1995.

[34] Savaiano D. A., Levitt M. D., Milk intolerance and microbe-containing dairy foods, *J. Dairy Sci.*, 1987, **70**, 397-406.

[35] Jurado E., Camacho F., Luzon G., Vicaria J. M., A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis,* 2002, **31**, 300-309.

[36] McBean L. D., Miller G. D., Allaying fears and fallacies about lactose intolerance, *Journal of the American Dietetic Association,* 1998, **98**, 671-676.

[37] Macfarlane G. T., Steed H., Macfarlane S., Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics, *J. Appl. Microbiology*, 2008, **104**, 305-344.

[38] Erarslan A., Kazan D., Denizci A. A., Öztürk D. C., Karahan N., *Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler VIII. Uygulamalı Eğitim Kursu Kitabı*, Kocaeli, 2008.

[39] Bollag D. M., Rozycki M. D., Edelstein S. J., *Protein Methods,* 2nd ed., Wiley-Liss, New York, 1994.

[40] Angal S., Harris E., *Protein Purification Applications,* IRL Pres at Oxford University Pres, UK, 1990.

[41] Ay T., Bingöl G., Binici M. S., Diler S. B., Cansaran A., Demirağ M. K., Dere E., Doğan N., Doğan B., Ekici N., Gülnaz O., Kanlı A., Olguner E., Polat F., Sözbilen M., Şimşekli Y., Yıldırım C., *Biyolojide Özel Konular*, Pegem Akademi, ISBN: 9786053640608, 2010.

[42] Olichon A., Schweizer D., Muyldermans S., Marco A., Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains, *BMC Biotechnol.*, DOI: 10.1186/1472-6750-7-7.

[43] Scopes R. K., *Protein Purification*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 1984.

[44] Lehninger, *Biyokimyanın İlkeleri,* Palme Yayıncılık, 2005.

[45] Nostro P. Lo., Ninham B. W., Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology, *Chem. Rev*, 2012, **112**, 2286-2322.

[46] Atav R., Yurdakul A., Arabacı A., Tekstil boyacılığında kullanılan tuzların özellikleri ve kullanım amaçları, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2009, **3**, 71-80.

[47] Bowron D. T., Finney J. L., Structure of a salt - amphiphile - water solution and the mechanism of salting out, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 8357-8372.

[48] Palombo F., Paolantoni M., Sassi P., Morresi A., Cataliotti R. S., Spectroscopic studies of the "free" OH stretching bands in liquid alcohols, *J. Mol. Liq*., 2006, **125**, 139-146.

[49] Dennison C., Lovrein R., Three phase partitioning: concentration and purification of proteins, *Protein Exp. Purif.*, 1997, **11**, 149-161.

[50] Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.

[51] Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.

[52] http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Modeling_ Reaction _Kinetics/Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/The_Arrhenius_Law/ Arrhenius_Equation (Ziyaret tarihi: 4 Temmuz 2014).

[53] Segel J. H., *Enzyme Kinetics*, 1st ed., John Wiley and Sons, New York, 1975.

[54] Duman Y. A., *Bacillus clausii* alkalen proteazının su ile karışabilen organik çözücüler varlığında kinetik ve termodinamik özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2008, 233247.

[55] Rawdkuen S., Vanabun A., Benjakul S., Recovery of protease from the viscera farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three phase partitioning, *Process. Biochem.*, 2012, **47**, 2566-2569.

[56] Narayan A. V., Madhusudhan M. C., Raghavarao K. S. M., Extraction and purification of *Ipomea* peroxidase employing three-phase partitioning. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2008, **151**, 263-272.

[57] Özer B., Akardere E., Çelem E. B., Önal S., Three phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, *Biochem. Eng.*, 2010, **50**, 110-115.

[58] Rather G. M., Mukherjee J., Halling P.J., Gupta M. N., Activation of alpha chymotrypsin by three phase partitioning is accompanied by aggregation, *PLos One*, 2012, **7**, 1-10.

[59] Wang H. H., Chen C. L., Jeng T. L., Sung J. M., Comparisons of a-amylase inhibitors from seeds of common bean mutants extracted through three phase partitioning, *Food Chem.*, 2011, **128**, 1066-1071.

[60] Kishore D., Kayastha A. M., A β-galactosidase from chick pea (*Cicer Arietinum*) seeds: its purification, biochemical properties and industrial applications, *Food Chem.*, 2012, **134**, 1113-1122

[61] Duman Y. D., Kaya E., Purification, recovery, and characterization of chick pea (Cicer arietinum) β-galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique, *Protein Expression and Purification*, 2013, **91**, 155-160.

[62] Sharma A., Mondal K., Gupta M. N., Seperation of enzymes by sequential macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning, *J. Chromatogr. A*, 2003, **995**, 127-134.

[63] Singh R. K., Gourinath S., Sharma S., Roy I., Gupta M. N., Betzel C., Srinivasan A., Singh T. P., Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a modified serine proteinase at 1.5 Å resolution, *Protein Engineering*, 2001, **14**, 307-313.

[64] Kotake T., Dina S., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M., Watanabe Y., Kimura K., Tsumuraya Y., Molecular cloning of a β-

galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β-(1-3)- and b-(1-6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein, *Plant Physiol*., 2005, **138**, 1563-1576.

[65] Sinnott M. L., Withers G., Viratelle O. M., The necessity of magnesium cation for acid assistance of aglycone departure in catalysis by *Escherichia coli* (lacZ) β-Galactosidase, *Biochem. J.*,1978, **175**, 539-546.

[66] Sinnott M. L., Souchard I. J. L., The mechanism of action of β-galactosidase, *Biochem. J*., 1972, **133**, 89-98.

[67] Hoyoux A., Jennes I., Dubois P., Genicot S., Dubail F., François J. M., Baise E., Feller G., Gerday C., Cold-Adapted β-Galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 1529-1535.

[68] Pal A., Lobo M., Khanum F., Extraction, Purification and thermodynamic characterization of almond (*Amygdalus communis*) β-galactosidase for the preparation of delactosed milk, *Food Technol. Biotechnol*., 2013, **51**, 53-61.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

[1] Duman Y. D., **Kaya E**., Purification, recovery and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*) β- galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique, *Protein Expression and Purification*, 2013, **91**, 155-160.

[2] Duman Y. D., **Kaya E**., Three- phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (Solanum tuberosum), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s12010-013-0260-9.

[3] Duman Y. D., **Kaya E**., Purification and Recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme, *Turkish Journal of Biochemistry*, 2014, (kabul edildi, basım aşamasında).

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Tokat'ta dünyaya geldi. İlk, orta ve lise öğrenimini Anadolu'nun çeşitli illerinde tamamladı. 2006 yılında Kocaeli Üniversitesi Kimya Bölümü'nde başladığı üniversite eğitimini 2012 yılında Kimyager olarak tamamladı. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında başladığı lisansüstü eğitimine halen devam etmektedir.