T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BASİL TÜRLERİNİN β-GALAKTOSİDAZ GEN VE ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Şaban TUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Temmuz-2017

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Şaban TUNÇ tarafından yapılan "Bazı Basil Türlerinin β-Galaktosidaz Gen ve Enzimi Üzerine Çalışmalar" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	İmza
Başkan: Prof. Dr.	Kemal GÜVEN	
Üye : Doç. Dr.	İhsan EKİN	
Üye : Yrd. Doç. Dr.	İbrahim Halil YILDIRIM	

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 19/ 07/ 2017

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam esnasında her zaman bana yardımcı olan, akademik bilgisini benim ile paylaşan ve hiçbir yardımı esirgemeyen Dicle Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı ve danışman hocam sayın Prof.Dr. Kemal GÜVEN'e;

Labaratuar çalışmalarımda bana sürekli yardımcı olan ve çalışmamda kullanmam için izole ettiği *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 suşunu temin ettiğim sayın Dr. Fatma MATPAN BEKLER'e;

Bu çalışmada kullandığım *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterilerini sıcak su kaplıcasından izole eden çalışma arkadaşım Zindar ASLAN'a;

Çalışmalarım esnasında bana destek olan Doç.Dr. Selahattin TEKEŞ hocama, çalışma arkadaşlarım Ramazan ÜZEN'e, Mizgin ESMER'e, Gülten EKMEN'e, Emel DEĞER'e Mahir BİNİCİ'ye ve Hüsamettin DEMİR'e;

Tez çalışmamı maddi yönden destekleyen Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü 'ne (DÜBAP proje no: FEN.17.009) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **II**
ÖZET ..... **IV**
ABSTRACT ..... **VI**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **VIII**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **IX**
KISALTMA VE SİMGELER ..... **XI**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1. Biyoteknoloji 3
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 3
2.3. Enzim ve Enzim Teknolojileri 5
2.4. *Bacillus* 6
2.4.1. *Bacillus subtilis* 7
2.4.2. *Bacillus paralicheniformis* 7
2.5. *Anoxybacillus* 7
2.6. β-Galaktosidaz 8
2.6.1. β-Galaktosidaz'ın Moleküler Yapısı 9
2.6.2. β-Galaktosidaz'ın Kullanım Alanları 10
2.6.3. β-Galaktosidaz ile İlgili Kapsam 11
3. MATERYAL ve METOT **17**
3.1. Biyolojik Materyal 17
3.2. Kimyasallar 17
3.3. Aletler 17
3.4. Besiyerleri 18
3.4.1. Sıvı Besiyeri 18
3.4.2. Katı Besiyeri 18
3.5. Tamponlar 18
3.6. Bakterilerin Kültüre Alınması 18
3.7. β-Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti 18
3.8. β-Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi 19

3.9. *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 Bakterilerinden Kromozom DNA'sının İzolasyonu ve RNA'nın Uzaklaştırılması 20
3.9.1. Kromozom DNA'sının İzolasyonu 20
3.10. β-Galaktosidaz Genin PCR ile Amplifikasyonu 21
3.10.1. Kullanılacak Primerler: 22
3.10.2. β-Galaktosidaz Geni İçin Kullanılan PCR Programı 23
3.11. Agaroz Jel Elektroforezi 24
3.12. Farklı Zaman Aralıklarında Laktozlu ve Laktozsuz Koşullarda Enzimin Üretim Araştırması 25
3.13. Optimum Sıcaklığın Araştırılması 25
3.14. Optimum pH'nın Araştırılması 25
3.15. Termal Stabilite'nin Belirlenmesi 25
3.16. Enzimin Kısmi Saflaştırılması: Çöktürme ve Diyaliz 26
3.17. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması 26
3.18. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Şelatörlerin Etkilerinin Araştırılması 27
3.19. β-Galaktosidaz Enzim Kinetiği İçin Parametre Belirlenmesi 28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 29
4.1. Sıcaklığın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 29
4.2. pH'ın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 30
4.3. Termal Stabilitenin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 31
4.4. Bazı Kimyasalların β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 33
4.5. Bazı Metal ve Şelatörlerin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 34
4.6. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamda Zamana Bağlı Bakteri Çoğalması 35
4.7. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamda Zamana Bağlı Enzim Üretimi Üzerine Etkisi 37
4.8. Enzimin Kısmi Saflaştırılması 38
4.9. *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 bakterilerinin β-Galaktosidaz Genlerinin PCR Amplifikasyonu 40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 43
6. KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ **..... 57**

ÖZET

BAZI BASİL TÜRLERİNİN β-GALAKTOSİDAZ GEN VE ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

YÜKSEKS LİSANS TEZİ

Şaban TUNÇ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2017

Çalışmamızda Bingöl Binkap sıcak su kaplıcasından izole edilen *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK'nın intrasellüler β-Galaktosidaz gen ve enzimi üzerine çalışmalar yapılmıştır. β-Galaktosidaz geni için tasarlanan bazı spesifik primerler kullanılarak PCR yardımıyla bu genin amplifikasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

Her üç bakterinin β-galaktosidaz gen varlığının tayini için farklı primerler kullanarak yapılan PCR ürünleri incelendiğinde üç genin ürününün de ~2.4 kb olduğu tespit edildi.

Enzim üzerine yapılan sıcaklık ve pH'nın etkisi 25-65˚C ve pH 4.0-11.0 aralığında incelendi. *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK için optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 45˚C, pH 6.0 ve 55˚C, pH 6.0 olarak bulundu.

Bacillus subtilis 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK enzimi için termal stabiliteler sırasıyla 40-50˚C ve 45-60˚C aralıklarında 30-120dk. da incelendi. *Bacillus subtilis* 4NK'nın termal stabiliteye sahip olduğu bulundu. *Bacillus paralicheniformis* 5NK termal stabiliteye sahip olduğu ancak 55˚C de aktiviteyi kısmen koruduğu 60˚C de ise koruyamadığı bulundu.

Bacillus subtilis 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yoluyla kısmi olarak saflaştırma işlemi uygulandı. Bu saflaştırma sonucunda *Bacillus subtilis* 4NK diyaliz sonrasında enzimin verimi %85.2, saflaştırma katsayısı da 2.8 olarak bulundu. *Bacillus paralicheniformis* 5NK verimi %76.8, saflaştırma katsayısı 2.0 olarak bulundu.

Enzim üzerine bazı kimyasal, metal ve şelatörlerin etkisi denendi. *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidazı için bu kimyasallardan PCMB (4-kloro civa benzoik asid)'in çok yüksek oranda, DTT, PMSF ve NEM'in düşük oranda inhibisyona yol açtığı, iodoasetamid' in ise enzim üzerine ciddi etkisi olmadığı bulundu. *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidazı için bu kimyasallardan iodoasetamid ve PCMB'in yüksek oranda inhibisyona neden olduğu, PMSF'nin 10 mM da yüksek düzeyde inhibisyonuna neden olduğu ve NEM'in 5 ve 10 mM' da kısmı inhibisyonuna neden olduğu bulundu. DTT'nin ise enzim üzerine önemli oranda etkisi olmadı. *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidazı için yapılan incelemeler sonucunda düşük konsantrasyonlarda $CoCl_2$ ve $MnCl_2$'ün (1ve 2.5 mM) yüksek oranlarda enzimi aktive ettiği bulundu. $CuCl_2$ ve $CdCl_2$ yüksek konsantrasyonlarda (10 ve 20 mM) inhibisyona neden oldu. EDTA'nın ise tüm konsantrasyonlarda enzimi aktive ettiği bulundu. *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidazı için yapılan incelemeler sonucunda birçok konsantrasyonda $CuCl_2$ ve $CdCl_2$'ün yüksek oranlarda enzimi inhibe ettiği bulundu. EDTA'nın ise enzimi

aktivasyonunda ciddi anlamda etki etmediği bulundu.

NB besiyerinde %1 laktozlu ve laktozsuz besiyerleri kullanılarak 6-48 saat aralığında kültüre alınan *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterilerinin çoğalması ve enzim üretimi üzerine laktozun etkisi incelendi. 4NK bakteri varyetesinde laktozlu ortamda 24. saatten sonra bakteri çoğalmasında artış olduğu bulundu. Fakat 5NK bakteri çoğalması açısından laktozlu ortamda laktozsuz ortama göre değişiklik olmadı. Her iki bakteri için de laktozlu ortam enzim üretimini arttırdığı bulundu.

Enzimin K_m ve V_{max} değerlerini bulmak için farklı *o*NPG konsantrasyonları kullanıldı. K_m ve V_{max} değerleri 4NK ve 5NK için sırasıyla; 23.80 mM, 1.978 abs/dk. ve 5.61 mM, 1.869 abs/dk olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK, *Anoxybacillus ayderensis* FMB1, β-galaktosidaz karakterizasyonu, PCR

ABSTRACT

STUDIES ON THE β-GALACTOSIDASE GENE AND ENZYME OF SOME BACILLI STRAINS

MASTER THESIS

Şaban TUNÇ

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2017

In our study, intracellular β-Galactosidase gene and enzyme of *Bacillus subtilis* 4NK and *Bacillus paralicheniformis* 5NK isolated from Bingol Binkap hot spring water, as well as the enzyme gene of *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 have been studied. In addition, PCR amplification of β-galactosidase gene was performed by using some specific primers of the gene. β-Galactosidase gene presence of all three bacteria were detected by using using different primers and PCR products obtained were ~2.4kb.

The effect of temperature and pH on the enzyme was investigated at temperatures of 25-65˚C and at pH 4.0-11.0. The optimal temperature and pH values for *Bacillus subtilis* 4NK and *Bacillus paralicheniformis* 5NK were 45˚C, pH 6.0 and 55˚C, pH 6.0, respectively.

Thermal stability for enzymes of *Bacillus subtilis* 4NK and *Bacillus paralicheniformis* 5NK was examined at 40-50˚C and 45-60˚C for 30-120 min, respectively. β-Galactosidase of *Bacillus subtilis* 4NK was found to posses thermal stability. The enzyme of *Bacillus paralicheniformis* was found to have thermal stability at lower temperature, partially at 55˚C activity but the activity was not protected at 60˚C. *Bacillus subtilis* 4NK and *Bacillus paralicheniformis* 5NK were partially purified by ammonium sulfate precipitation and dialysis. As a result of this partial purification, the yield of enzyme was 85.2% and the purification fold was 2.8 for enzyme of *Bacillus subtilis* 4NK. The yield of *Bacillus paralicheniformis* 5NK enzyme was 76.8% and the purification fold was 2.0.

Some chemicals, metals and chelators were tested on the enzyme activity. It was found that PCMB (4-chloro mercuric benzoic acid) caused very high inhibition on *Bacillus subtilis* 4NK β-galactosidase, while inhibition was very low by DTT, PMSF and NEM, but iodoacetamide did not seriously affect enzyme activity. For *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galactosidase, it was found that iodoacetamide and PCMB caused high inhibition, PMSF caused high inhibition at 10 mM, and partial inhibition was observed by NEM at 5 and 10 mM. DTT had no significant effect on the enzyme.

Studies on *Bacillus subtilis* 4NK β-galactosidase revealed that $CoCl_2$ and $MnCl_2$ highly activated the enzyme at low concentrations (1, 2.5 mM). $CuCl_2$ and $CdCl_2$ caused inhibition at high concentrations (10 and 20 mM). Whereas EDTA was found to activate the enzyme at all concentrations. Studies on *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galactosidase revealed that $CuCl_2$ and $CdCl_2$ inhibited the enzyme at high ratios at several concentrations. However, EDTA had no significant effect on enzyme activation.

Bacillus subtilis 4NK and *Bacillus paralicheniformis* 5NK bacteria cultured on a NB medium with lactose and lactose-free media for 6-48 h were examined for bacterial growth and enzyme production. The strain 4NK showed an increase in bacterial growth after 24 hours in the medium with lactose. However, bacterial growth in the lactose medium for the strain 5NK did not change compared to lactose free medium. It was found that lactose increased enzyme production for both bacteria.

Different *o*NPG concentrations were used to find the K_m and V_{max} values of the enzyme. K_m and V_{max} values for the strains 4NK and 5NK were 23.80 mM, 1.978 abs / min. and 5.61 mM, 1.869 abs / min, respectively.

Key Words: *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK, *Anoxybacillus ayderensis* FMB1, β-Galactosidase characterisation, PCR.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 3.1.	β-galaktosidaz geni için kullanılan PCR programı	23
Çizelge 3.2.	PCR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları	24
Çizelge 4.1.	Bazı kimyasalların *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	33
Çizelge 4.2.	Bazı kimyasalların *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	33
Çizelge 4.3.	*Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatör etkisinin incelenmesi	34
Çizelge 4.4.	*Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisi için β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatör etkisinin incelenmesi	35
Çizelge 4.5.	*Bacillus subtilis* 4NK 'a ait β-galaktosidazın saflaştırma basamakları	38
Çizelge 4.6.	*Bacillus paralicheniformis* 5NK'a ait β-galaktosidazın saflaştırma basamakları	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	PCR döngü aşamaları	4
Şekil 2.2.	Laktozun glikoz ve galaktoza parçalanması	8
Şekil 2.3.	*Escherichia coli'*e ait β-galaktosidaz tetramer yapısının üstten görünümü	9
Şekil 3.1	ONPG'nin parçalanması sonucu oluşan o-Nitrofenol	19
Şekil 3.2.	β-galaktosidaz geninin PCR'ı için yararlanılan primer dizi ve T_m değeri	23
Şekil 4.1.	*Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	29
Şekil 4.2.	*Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	30
Şekil 4.3.	*Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi	30
Şekil 4.4.	*Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi	31
Şekil 4.5.	*Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidazın termal stabilitesi	32
Şekil 4.6.	*Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz'ın termal stabilitesi	32
Şekil 4.7.	*Bacillus subtilis* 4NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda çoğalması	36
Şekil 4.8.	*Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda çoğalması	36
Şekil 4.9.	*Bacillus subtilis* 4NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda zamana bağlı enzim üretimi	37

Şekil 4.10. *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda enzim üretimi 38

Şekil 4.11 *Basillus subtilis* 4NK enzimi için Lineweaver-Burk grafiği 39

Şekil 4.12 *Basillus paralicheniformis* 5NK enzimi için Lineweaver-Burk grafiği 40

Şekil 4.13. *Bacillus paralicheniformis* 5NK, *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 ve *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz genlerinin PCR sonucu 41

KISALTMA VE SİMGELER

%	: Yüzde
bç	: Baz çifti
kb	: Kilo baz
gr	: Gram
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
*o*NPG	: *o*-Nitro-fenil-β-galactopyranoside
NB	: Nutrient Broth
PMSF	: Phenylmethylsulfonylfluoride
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediamintetraaceticacide
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
mM	: Milimolar
M	: Molar
^{o}C	: Santigrat derece
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rpm	: Revolutions Per Minutes (Dakikada dönüş sayısı)
dk	: Dakika
K_m	: Michaelis-Menten hız sabiti (mM)
V_{max}	: Maksimum hız(µmol/dk)
U/mg	: Ünite/miligram
OD	: Optik density
FCR	: Folin Reaktifi
PCMB	: para-cloro-mercurie benzoic aside
NEM	: N-ethylmaleimide

1.GİRİŞ

Biyoteknoloji, biyolojik organizmalar yardımıyla bilimsel ve mühendislik çalışmalarını kullanarak, yeniden düzenlenmiş ürünleri üretebilmek için kullanılmaktadır. Modern biyoteknoloji; birçok farklı alanları içeren çok yönlü bir teknolojidir: Genetik mühendisliği, rekombinant organizmalar, hibridoma teknolojisi bitki ve hayvan hücreleri, protein mühendisliği, transgenik bitki ve hayvanlar, nanobiyoteknoloji, doku ve organ mühendisliği bu alanlardan bazılarıdır (Gavrilescu ve Chisti 2005).

Gelişen enzim teknolojileri sayesinde; enzim kullanım alanlarının, ekonomik değerinden ve çeşitliliğinden dolayı biyoteknolojideki endüstriyel enzimler üzerindeki çalışma ve araştırmalar gittikçe önemli hale gelmektedir (Kıran ve ark. 2003). Özellikle bu teknojilerden en çok ilgiyi çeken ise endüstriyel enzimlerdir.

Gelişen endüstriyel enzim teknolojisi ve fermantasyon metodları sayesinde, mikrobiyal kaynaklı olan enzim üretiminin çevre koşullarından bağımsız olarak üretim potansiyelinin artması sağlanmaktadır (Topal 1998).

Dünya genelinde kullanılan endüstriyel enzimler, 1995'li yıllarda 1 milyar dolara ulaşırken, 2000'li yıllarda bu rakam 1,5 miyar dolara yükseldiği bilinmektedir (Kirk 2002). Bu da enzim endüstrisindeki gelişimin çok hızlı olduğunu göstermektedir. Endüstriyel olarak üretilen enzimler; %29 oranında gıda sektöründe, %15 oranında hayvan yemi sektöründe ve %56'sı ise genel alanlarda kullanılmaktadır (Schallmey ve ark 2004).

Enzim teknolojisinin gelişim sebepleri arasındaki en önemli özellikler; ekonomi ve biyoteknolojik tekniklere olan ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır. Biyoteknoloji aracılığıyla yeni türde enzimlerin çok büyük ölçüde ve ekonomik olarak üretilebilme imkanı meydana gelmiştir. Bu özelliklerden dolayı herhangi bir enzimin endüstride kullanımı, maliyetinin ucuz, farklı alanlarda kullanılabilme özelliğene sahip olması ve alerjik veya toksik etkisinin olmaması gerekmektedir (Wiseman 1987).

Endüstrinin birçok alanda kullanılan enzimler, genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedirler. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimler, diğer kaynaklara göre

katalitik aktiviteleri çok daha fazladır. İstenmeyen yan ürün oluşturmazlar ve yüksek oranda elde edilmeleri mümkündür. Günümüzde endüstri alanında kullanılmakta olan enzimlerin çoğunluğu mikrobiyal kaynaklı olduğu için mikroorganizma kullanımı artmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

β-galaktosidaz, proteaz, lipaz, katalaz ve transglutaminaz gibi enzimler süt ve süt ürünlerinin üretiminde veya kalitelerinin arttırılma çalışmalarında mikrobiyal kaynaklı olarak kullanılan enzimlerin başlıcalarıdır (Er ve Sarıahmetoğlu 2009).

Son yıllarda birçok çalışma, mikrobiyal kaynaklı olan termofilik enzimler üzerinde yoğunlaşmıştır. Termofil olanlardan saflaştırılan termostabil enzimler, mikroorganizmanın geliştiği sıcaklığı aşan yüksek sıcaklıklarda dahi stabilitelerini korudukları için bu enzimler daha çok tercih edilmektedirler (D'Auria ve ark 1999).

β-galaktosidaz, laktozda bulunan β-glikozidik bağını enzimatik olarak hidrolizler, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü daha fazla olan glukoz ve galaktozu meydana getirir (Panesar 2006).

Bu çalışmada, gelişmekte olan süt ve süt endüstrisi, endüstriyel üretim çalışmaları ve üretim sonrasında meydana gelen atık suların süreçlerinde, insanlar tarafından tüketilen süt ürünlerinden dolayı meydana gelen problemlerin giderilmesinde, prebiyotik besin üretiminde biyoteknoji açısından faydalı ve önemli alanlarda kullanılan β-galaktosidaz enzimi üzerine çalışmalar yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada *Bacillus paralicheniformis* 5NK, *Bacillus subtilis* 4NK bakterilerinden izole edilen β-galaktosidaz gen ve enzimi üzerine çalışmalar yapılması hedeflenmiş ve ayrıca *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 β-glaktozidaz geninin varlığı PCR ile tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyoteknoloji

Günümüzde en yaygın ve en etkin olan teknolojilerin başında olan biyoteknoloji; canlı organizmaların moleküler yapısını oluşturan işleyiş ve kavram yasalarının kullanımı yoluyla geliştirilmiş teknolojileri ve teknolojik ürünleri içine almaktadır. Toplum tarihiyle ciddi bir ilişkiye sahip olan geleneksel biyoteknoloji, son elli yılda moleküler biyoloji ve genetik gibi alanlardaki bilimsel gelişmeler sayesinde önemi artmış ve önemi daha da artmaktadır. Sağlık, tarım, gıda, enerji ve çevre uygulamalarında yoğun şekilde kullanımı ve sağladığı faydalardan dolayı modern biyoteknoloji 21. yüzyıl içerisinde sadece ekonomik olarak değil, ayrıca bütün alanlarda ciddi bir şekilde köklü olan değişimler meydana getirmektedir. Biyoteknoloji, bu değişimi genetik bilgi ve malzemeyi çok iyi bir şekilde kullanarak gerçekleştirmektedir (Karademir 2007). OECD tarafından 1982 yılında biyoteknolojinin tarifi şu şekilde yapılmıştır. "Biyoteknoloji; temel bilimlerin ve mühendislik ilkelerin, ham maddeleri biyolojik araçlar yardımıyla ürünlere dönüştürme süreçlerine uygulanan bir teknolojidir (Ekinci 2005). "

Bu teknolojinin ilgilendiği alanlardaki örnekler; protein üretimi, değerli olan hammadde ve enerji stoklarını uygun bir şekilde değerlendirme, insan ve hayvan sağlığını koruma amaçlı bileşiklerin üretilmesi, bitkilerin korunması, salgın ve bulaşıcı hastalıklarla savaşma, atık su arıtımı, çevre korunması ve atık maddelerin değerlendirilmesi verilebilir. Son zamanlarda biyoteknolojinin yöneldiği alanlar ise; genellikle sağlık, tarım, gıda sektörü ve zararlı kimyasalların çevreye verdiği zararları elimine etmeye çalışmasıdır (Özdemir 2004).

2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, hedef bir DNA molekülünün seçici olarak hedeflenmiş bir bölgesinin bazı aşamalardan geçirilerek çoğaltılması işlemidir. Yöntem 1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından bulunup geliştirilmesinden bu yana araştırmalarda ve klinik labaratuvarlarda çok yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Birçok biyolojik ve tıbbi araştırma çalışmalarında fayda sağlamıştır (Atasoy Ulusoy ve Görgül 2006).

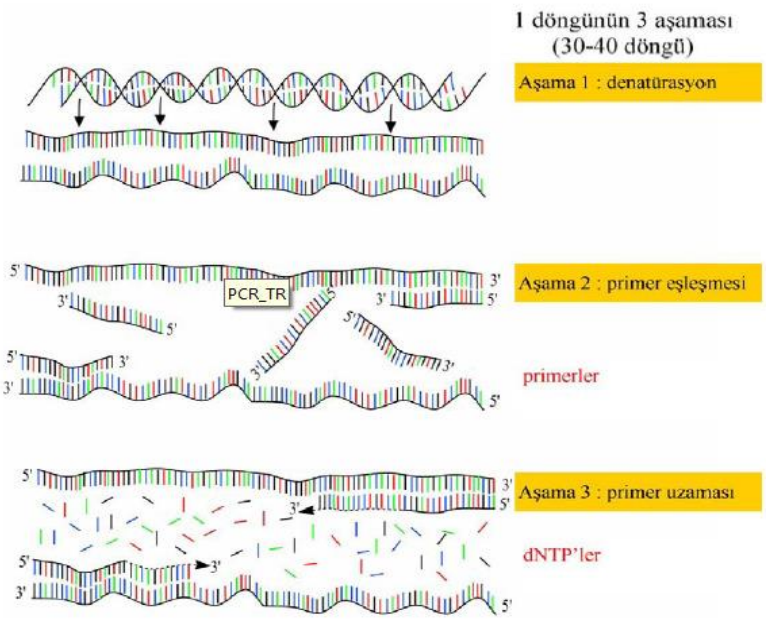
Bir PCR genel itibariyle üç aşamadan oluşmaktadır(Şekil 2.1):

1. Denatürasyon aşaması: Bu aşamada amaç DNA zincirinin yüksek sıcaklık yardımıyla iki ayrı iplik haline getirilmesidir. (94°C-98°C)

2. Primer bağlanma aşaması: Hedeflenen DNA bölgesini tanımak amacıyla tasarlanmış olan sentetik oligonükleotidler kullanılarak bağlanma işlemi gerçekleştirilmesidir. (37°C-65°C)

3. Primer uzama aşaması: Bağlanan primerler yardımıyla çift iplikli DNA'ların sentezi gerçekleştirilmesidir. (72°C)

Bu üç aşamadan meydana gelen işlem genel olarak 25-40 döngü tekrarlanarak hedeflenen DNA dizisinden milyonlarca kopya elde edilmiş olur (Yılmaz ve Devran 2003).



Şekil 2.1 PCR döngü aşamaları (Vierstraete 1999)

2.3. Enzim ve Enzim Teknolojileri

Enzimler, canlı olan hücrelerde sentezi gerçekleştirilen ve kimyasal reaksiyonları katalizleme özelliğinde olan, genellikle protein yapıdaki maddelerdir. Bu genelleme dışında kalan ve protein yapıda olmayan enzimler ise ribozimlerdir (Şener ve Ünal 2006).

Enzimler, katalizleme işlemine sahip olduklarından dolayı katalizleme işlemini gerçekleştiremeyen enzimlere oranla 10^{7}-10^{16} kat daha hızlı çalışırlar. Enzim reaksiyonlarının uygun koşullarda çok hızlı ve spesifik olarak katalizleme yapmaları enzimlerden sadece doğal ortamlarında değil, ayrıca pek çok alanda yararlanılabilme imkanı bulunmuştur. Bu sayede enzimler tıpta, kimya endüstrisinde, gıda süreçlerinde, ziraat ve tarım gibi alanlarda çok geniş çapta kullanıma sahiptir (Telefoncu 1997).

Enzimler, endüstriyel alanda kullanılmak amacıyla in vitro şartlar altında katalitik aktivitiye sahip olan mikroorganizmaların bol bir şekilde üretilmeleri sağlanarak kullanılabilir (Çelik 2006). Enzimleri farklı alanlarda kullanılabilmek için saf bir şekilde elde etmek gerekmektedir. Bu aşamada fayda sağlayacak en önemli etkenler, enzimlerin elde edileceği organizmaların kolay üremeleri ve ürettikleri enzimlerin kolay bir şekilde saflaştırılabilme işlemleridir (Öztürk 2007).

Enzimlerin çeşitli alanlarda farklı amaçlar için kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri ekonomik ve daha kullanışlı hale getirme çalışmaları artmaktadır (Alagöz 2007).

Termofilik ve hipertermofilik enzimler ekstremozim ailesinin üyeleri içinde yer almaktadır. Bu ailedeki enzimler; basınç, yüksek tuz, yüksek sıcaklık, yüksek alkali ve yüksek asidite gibi koşullarda işlev görmektedir (Arıkan 2008, Corderio 2002).

Son dönemlerde termofil enzimlerin, yüksek sıcaklığa dayanıklığı ve daha geç bozulmasından dolayı, termostabil olan enzimler üzerindeki araştırmalar artmaktadır (Sabato ve ark. 1999).

2.4. *Bacillus*

Bacillaceae familyasında bulunan *Bacillus* suşları aerob veya fakültatif anaerob şartlarda bölünme yeteneğine sahip, çomak şekilli ve endospor oluşunu sağlayan bakteri türleridir. Bu bakterilerin özel olarak seçilme nedeni ise patojen olmamaları ve endospor oluşturmalarıdır (Rey ve ark. 2004, Weith 2004, Ayhan 2000,Özcan ve Özcan 2001). İzole edildiği kaynaklar itibariyle çok geniş bir alana sahiptir. Genellikle bulundukları topraklarda saprofit olarak ve bitki döküntüsünün bulunduğu alanlarda bulunurlar. Ancak sıcak su kaynakları, tatlı su, deniz suyu, kaplıca, kutup bölgesi ve çöl topraklarında bunlara rastlamak mümkündür (Maugeri ve ark. 2001). Bu bakteriler 25-27^{o}C'deki sıcaklıklarda optimum gelişim göstermektediler. Ancak buna karşın termofilik ve psikofilik bakteriler ise 75 ^{o}C'nin üzerinde ve 3 ^{o}C' nin altındaki sıcaklıkta gelişebilirler. Bazıları ise çok düşük ve yüksek pH' larda (pH:2 ve pH:10) gelişim gösterebilmektedirler (Drobnıewski 1993).

Bacillus suşlarından, enzim çalışmaları yönünden birçok farklı alanda yararlanılmaktadır. Bünyelerinde barındırdıkları fizyolojik özellik ve metabolitler sayesinde özel işlemlerde fayda sağlamaktadırlar. Bu bakteri türleri mikrobiyal fermantasyon proseslerinde yaygın bir şekilde kullanılmaya devam edilen bir araçtır. Birçok farklı *Bacillus* türü ekstrem yaşam koşulları ve istenilen dayanıklılıktaki enzim gelişimine katkı sağladıklarından dolayı, bu türler üzerindeki araştırmalara ve gelişmelere yardımcı olmaktadır (Schallmey ve ark. 2004).

Bacillus türleri bazı avantajlarından dolayı endüstriyel alanlarda α-amilaz, proteaz, glukanaz, izomeraz ve endonükleaz enzim üretimi amacıyla kullanılmaktadır. Bu türler karmaşık substratlara karşı aktivite gösterip, farklı türlerde hidrolitik enzim sentezlemekte ve ortama salgılamaktadırlar (Uhlig 1998). Endüstride çok yaygın bir şekilde kullanılmakta olan bakterilerden bir tanesi *Bacillus subtilis'*tir (Sani ve ark. 1999).

2.4.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, topraktaki yaygın olarak bulunan gram pozitif ve çubuk şeklindeki bir bakteridir. *Bacillus subtilis,* aerob olarak kabul edilir ve zorunludur, ancak nitratlar veya glukoz varlığında anaerobik olarak da işlev görebilir. *Bacillus subtilis* patojenik veya toksik olarak kabul edilmez ve hastalık oluşturan bir ajan değildir. *Bacillus subtilis*, endospor oluşturan bakteridir ve oluşturduğu endospor, aşırı sıcaklıklara ve kuru ortamlara dayanıklı olmasını sağlar. *Bacillus subtilis* ve ürettiği enzimler için çeşitli kullanımlar vardır. Bundan dolayı çalışmamızda bu bakteri kullanılmıştır.

2.4.2. *Bacillus paralicheniformis*

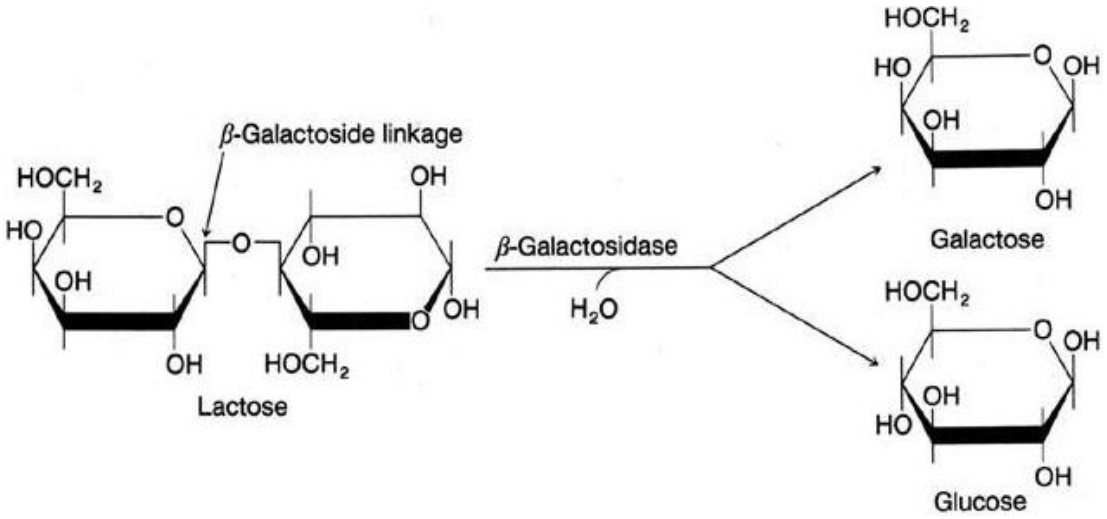
Bacillus paralicheniformis; gram pozitif, fakültatif anaerob, hareketli, çubuk şeklinde ve endospor oluşturan bir bakteridir. Bu bakeri soya fasulyesi temelli fermantasyon hamurundan elde edilmiştir. Bacillus licheniformis DSM 13T (% 99.4) ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. Cheonggukjang inokülümünün bakteri çeşitliliğine, daha önce tanımlanmış olan *Bacillus* cinsi üyeler (örneğin, *Bacillus subtilis*) tarafından hakim olduğu bilinmektedir; oysa diğer bakteriler resmi olarak tarif edilmemiştir. Yeni bulunan bu bakteri türüne *Bacillus paralicheniformis* ismi verilmiştir (Dunlap 2015).

2.5. *Anoxybacillus*

Anoxybacillus cinsi Pikuta ve ark. tarafından 2000 yılında *Bacillus*'tan farklı olduğunu tanımlamışlardır. Bu bakteri türü ilk izole edildiğinde anaerob olduğu düşüncesiyle "*Anoxy*" ön eki kullanılmıştır. Fakat daha sonra yapılan düzenlemelerle bu türün oksijenli ortamda da ürediği bulunmuştur. Sonradan bu bakteri zorunlu anaerob aeorotolerant veye fakültatif anaerob olarak değiştirilmiştir (Pikuta ve ark. 2003). Bu cinse ait bakteriler gram pozitif, endospor oluşturan, hareketli veya hareketsiz, orta düzeyde alkalotolerant veya alkalifilik özelliklere sahip termofilikler olduğunu bildirmişlerdir.

2.6. β- Galaktosidaz

β-galaktosidaz, laktozun glikoz ve galaktoz gibi daha küçük moleküllere hidrolize olmasını sağlayan galaktosidaz enzimidir. β-galaktosidaz son yıllarda çalışma alanı genişleyen ve ticari açıdan da önemi artmakta olan enzimlerden biridir (Domingues ve ark. 2005).



Şekil 2.2. Laktozun glikoz ve galaktoza parçalanması(Ussery 2000)

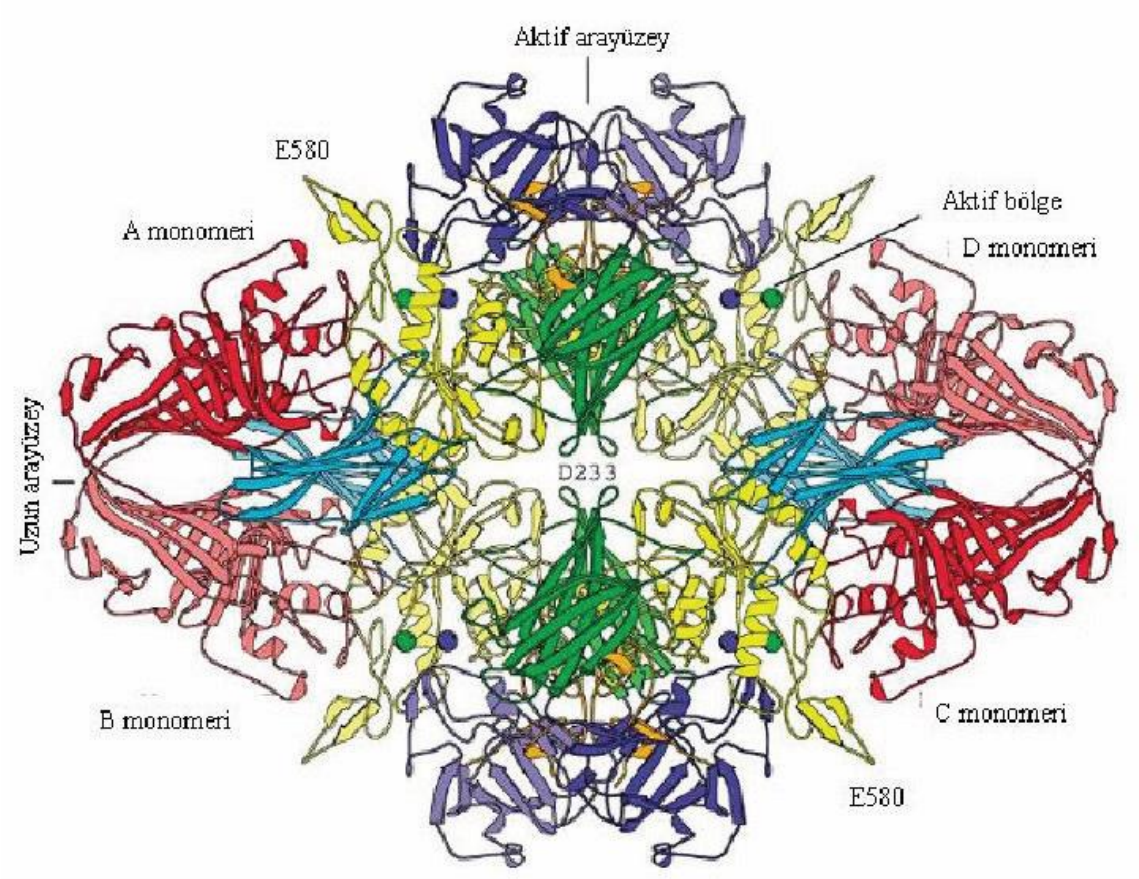
Gıda endüstri alanında, β-galaktosidaz kullanımı açısından insanların tüketebileceği ürünler üretmekle sınırlı değildir. Laktoz, farklı şekerlerle karşılaştırıldığında daha az çözünürlüğe sahip bileşendir. Bundan dolayı yoğunlaştırılmış ve dondurulmuş olan süt üretimi esnasında katı maddenin yoğun olması durumunda kristallenme oluşmaktadır. Bu problemden kurtulabilmek amacıyla sütteki laktozun, enzim aracılığıyla hidroliz edilmesi gerekir. Buna ek olarak, laktozun parçalanma ürünleri olan glikoz ve galaktoz, laktoza oranla daha tatlıdır. Bundan dolayı laktozun parçalanması sonucu aromalı süt ürünlerine benzeyen sakkarozun kullanıldığı ürünlerde, sakkarozun kullanım ihtiyacının %20-40 oranda azaltılması sağlanır. Laktozun parçalanma ürünleri olan glukoz ve galaktoz, fermentasyonda mikroorganizmalar tarafından daha kolay kullanılmaktadır (Göğüş ve Fadıloğlu 2006).

β-galaktosidaz, doğada çeşitli mikroorganizma, bitki ve hayvan dokularında bulunmaktadır. Bu enzimin üretimi kolay kontol edilebildiğinden ve yüksek üretim verimliliğine sahip olduğundan diğer farklı kaynaklara göre mikrobiyal β-

galaktosidazların ticari önemi daha fazladır. Mikrobiyal yöntem ile enzim üretiminde, üretimi etkileyen faktörler fazladır. Bu faktörlerin ve etkilerinin belirlenmesi, üretilmek istenen enzimin verimi açısından oldukça önemlidir (Dağbağlı 2009).

2.6.1. β-Galaktosidaz'ın Moleküler Yapısı

β-galaktosidaz enzimi ilk defa *Escherichia coli'*den elde edilmiş ve bu enzimin yapısı incelenmiş ve enzim yapısının dört bağımsız tetramerden oluşan asimetrik kristal şekle sahip olduğu belirtilmiştir (Jacobson ve ark. 1994). Bu tetramer yapısı şekil 2.2. de gösterildiği gibi A-B-C-D ile işaratlenmiş olan ve herbiri de 1023 aminoasitten oluşan 4 adet polipeptit zincirinden meydana gelmektedir (Sezgintürk 2007).



Şekil 2.3. *Escherichia coli'*e ait β-galaktosidaz tetramer yapısının üstten görünümü (Şekil'deki renklendirmeler bölgelere göre yapılmıştır. Tamamlayıcı peptit: turuncu, 1.bölge: mavi, 2.bölge: yeşil, 3.bölge: sarı, 4.bölge: açık mavi, 5.bölge:kırmızı renklerle gösterilmiştir. Bu renklerden ayrı olarak daha açık veya daha koyu gölgelendirmeleri farklı alt birimlerdeki aynı bölgeleri ayırmak için kullanılmıştır. Her 4 aktif bölgedeki metal katyonlar küre şeklinde gösterilmiştir (Na^{+}: yeşil, Mg^{++}: mavi.) (Sezgintürk 2007).

β-galaktosidaz üreten bakterilerde, primer indüktör olarak laktoz kullanılmaktadır (Furlan ve ark 2000). Bundan dolayı β-galaktosidaz enziminin üretimi üzerine yapılan araştırmalarda genellikle sentetik laktozu barındıran veya endüstriyel atık maddesi olan peyniraltı suyu kullanılarak üretim sağlanmaktadır (Ornelas ve ark 2008, Pinheiro 2003, Chen ve ark 1992).

2.6.2. β-Galaktosidaz'ın Kullanım Alanları

Gıda endüstrisindeki β-galaktosidaz; süt ürünlerindeki tatlılığı, çözünebilirliği ve sindirilebilirliğini artırmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Grosova ve ark. 2008). Bu enzimin kullanımı; laktoz tahammülsüzlüğüne sahip olan insanların tüketebileceği ürünler üretmekle sınırlı olmayıp, bunun yanısıra fermente ve alkolsüz içecek üretimi ve fırıncılıkta maya gelişiminde de kullanılmaktadır (Uyanık 2008).

Laktoz hidrolizinin yapılamamasından dolayı laktoz tahammülsüzlüğüne neden olan ve dünya nüfusunun %70'ini etkileyen laktoz intolerans problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu problem laktoz içeren süt ve süt ürünlerinin tüketimi esnasında ince bağırsaklarda galaktosidaz aktivitesinin yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır. Bu problemden dolayı süt endüstrisinde laktozun hidrolizi büyük öneme sahiptir (Nogales ve Lopez 2006, Lee ve Krasinski 1998).

Laktoz hidrolizi enzimatik reaksiyon ya da asit yardımıyla olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Asidin kullanıldığı süreçlerde sütte bulunan laktoz hidrolizi esnasında sütte ve süt ürünlerinin koku, renk ve tadında bozulma olmaktadır. Bunun yanısıra laktozun hidrolizi enzimatik olarak gerçekleştirildiğinde sadece sütün tatlılığında değişiklik meydana gelmektedir ve sütün tatlılık oranı dört kat artmaktadır (Uyanık 2008).

Bakteri, mantar, maya, bitki, hayvan hücreleri ve rekombinant kaynaklardan β-galaktosidaz elde edilebilmektedir. Bu kaynaklar içerisinden mikroorganizmalardan elde edilmekte olan enzimlerin farklı özelllikleri bulunmaktadır. Bu yüzden birçok farklı uygulama alanda kullanılmaktadırlar (Ustok ve ark 2010). Endüstri de kullanılan enzimler genellikle yüksek sıcaklıkta kullandıklarından dolayı, yüksek sıcaklığa dayanıklı olan enzimler tercih edilmektedir. Ekstremofilik organizmalardan elde edilen ekstremofilik enzimler, endüstriyel avantajlarından dolayı bu enzimlerin daha yoğun

olarak çalışılmasını sağlamaktadır. Termofillerden elde edilmekte olan enzimler yüksek sıcaklıklara dayanabildiklerinden dolayı ticari olarak kullanım alanı fazladır (Gül Güven 2011).

2.6.3. β-Galaktosidaz ile İlgili Kapsam

Ülkemizde farklı yerlerde olmak üzere çok çeşitli sıcak su kaynakları bulunmaktadır. Bu kaynaklar genellikle 40^{o}C'den daha sıcak olan ve yaklaşık 133 adet olarak belirtilmiştir. Bu kaynaklardan elde edilen termofilik bakteriler ve bu bakteriler üzerinde kapsamlı olarak çalışmalar yapılmaktadır (Ercan-Akkaya 2009).

Di Laura ve ark. (2008) *Alicylobacillus acidocaldarius*'de β-Galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterize etmişler ve daha sonra bu enzim geninin klonlanmasını, klonlanan genin ekspresyonu ve yeni enzimin karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu enzim için optimum sıcaklığın 65^{o}C olduğu tespit etmişlerdir. Enzimin galaktozilat hidrolaz 42 (GH42) ailesine ait olduğu saptamışlardır.

Chakraborti ve ark. (2003) Termofil *Bacillus polymxia*'nın β-galaktosidaz üzerinde araştırma yapıp, bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 60^{o}C ve 7.0 olarak tespit etmişlerdir.

Kara (2004) Sonikasyon yöntemiyle elde edilen β-galaktosidaz *Lactobacillus plantarum* NCIMB 1193, *L. plantarum* DSM 20246 ve *L. plantarum* E08 suşlarından elde edilmiştir. Sonikasyon yapılıp *L. Plantanrum* NCIMB 1193' ten elde edilen özüt β-galaktosidaz karakterizasyonu için kullanılmıştır. Enzimin sıcaklık aralığı ve pH'sı sırasıyla 35-40^{o}C ve 7.2 olarak tespit edilmiştir.

Gül-Güven (2007) *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* bakterisinden β-galaktosidaz enzimi saflaştırılıp karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 65^{o}C ve 6.0 olarak bulunmuştur.

Chakraborti ve ark.(2000) *Bacillus sp*. MTCC 3088' den β-galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzim 60^{o}C sıcaklıkta ve pH 8.0 de aktivite göstermektedir. Enzim üzerinde denenen kimyasal maddeler ve metallerin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda Mg^{+2}'un iyi bir aktivatör olduğu tespit edilmiştir.

Choi ve ark. (1995) termofilik *Bacillus* sp. TA–11'den β- galaktosidaz izole ederek karakterizasyon çalışmasını yapmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 6.0, sıcaklığını ise 40^{o}C olarak tespit etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığı 200kDa olarak saptanmıştır. Enzimi inhibe eden +2 değerlikli metaller (Zn^{+2},Hg^{+2} ve Cd^{+2}) ,EDTA ve galaktoz olduğu rapor edilmiştir.

Hidaka ve ark. (2002) Termofil *Thermus thermophilus* A4'e ait olan β-galaktosidaz üzerine çalışmalar yapılıp, β- galaktosidaz'ın termostabil olduğu ve galaktozil hidrolaz ailesine ait olan GH-42'ye ait olduğu bulunmuştur.

Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus* bakterisinden elde edilen termostabil β-galaktosidaz *bga*B genini, klonlayarak *Bacillus subtilis* WB600 bakterisinde ekspresyonu gerçekleştirilmişlerdir. Elde edilen bu enzimi saflaştırıp enzim molekül ağırlığı 70kDa olarak belirtip, en uygun sıcaklık ve pH'sını ise sırasıyla 70^{o}C ve 7.0 olarak bulmuşlardır.

Chakraborti ve ark. (2003) Hindistandaki Manikaran'dan elde edilen termofilik *Bacillus polymxia'*nın β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda, bu enzimin termal stabilitesini 50˚C'de koruduğunu ancak daha yüksek sıcaklıklarda termal stabilitesini korumayı başaramadığı bulunmuştur.

Cowan ve ark. (1984) Termofil *Thermus* 4-1A'nın β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda, bu enzimin 90˚C'de oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır.

Levin ve ark. (1981) *Bacillus coagulans* L4'ün β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda, bu enzimin 55˚C'de 30. dakika da enzim aktivitesinin %70 oranında kaybettiğini bulmuşlardır.

Somkuti ve ark. (1979) *Streptococcus thermophilus'*dan β-galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterize etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerinde DTT ve PCMB gibi kimyasalların etkilerini incelemişlerdir. DTT'nin enzimi aktive ettiğini, PCMB'nin ise inhibe ettiğini bulmuşlardır. Enzim üzerinde çalıştıkları metallerden Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin enzim inhibisyonuna yol açtığı, Ca^{+2}'un ise yüksek konsantrasyonlarda kısmi inhibisyona neden olduğu bulunmuştur.

Itoh ve ark. (1993) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1'deki β- galaktosidaz enzim karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzim üzerine β-merkaptoetanol'ün aktivasyona yol açtığı ama iodoasetamide' in ise enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. Enzim üzerinde metallerin incelenmesi sonucunda $MgCl_2$'ün enzime etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus*'tan izole edilen termostabil β-galaktosidaz *bga*B geni klonlanarak, *Bacillus subtilis* WB600'de ekspresyonu gerçekleştirilmişlerdir. Eksprese ettikleri bu rekombinant enzim üzerinde DTT, PCMB, iodoasetamid ve β-merkaptoetanol'ün etkisini incelemişlerdir. DTT ve β-merkaptoetanol'ün enzim aktivitesini etkilemediğini ancak PCMB ve iodoasetamid'in enzim aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Işık-Ustok ve ark. (2010) *Streptococcus thermophilus* 95/2(St 95/2) ve *Lactobacillus delbueckii spp bulgaricus* 77(Lb 77) her iki bakteriden sentezlenen β-galaktosidaz enzim çalışması yapmışlardır. Bu enzim üzerine denedikleri metallerden Mg^{+2}'un iki enzim için de aktive edici olduğunu bulmuşlardır. Fakat Ca^{+2}, Fe^{+2} ve Zn^{+2}'nin ise enzimi inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Khalid ve ark. (1991) Psikotropik *Bacillus subtilis* KL88'e ait olan β-galaktosidaz enzimi üzerine çalışma yaparak, enzimin Fe^{+3}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2} gibi metaller tarafından yarışmalı bir şekilde inhibe edildiğini bulmuşlardır. Glukoz, galaktoz ve Ca^{+2}'un yüksek konsantrasyonlarında, enzimin inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanısıra alkali metal iyonları olan Na^+, K^+ ve Li^+'un bu enzimi aktive ettiğini ifade etmişlerdir.

Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus*'tan izole edilen termostabil β-galaktosidaz *bga*B geni klonlanarak, *Bacillus subtilis* WB600'de ekspresyonu gerçekleştirilmişlerdir. K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2.96 mM ve 6.62µmol olarak bulmuşlardır.

Li ve ark. (2009) *Bacillus megaterium* 2–37–4–1'den izole edilen β-galaktosidaz enziminin saflaştırılmasını yapıp, enzime ait olan *bga*BM geninin analiz ve ekspresyonunu yapmışlardır. Bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH aralığını sırasıyla

55^{o}C ve 7.5-8.0 olarak tespit etmişlerdir. Enzimin 40^{o}C'nin altındaki sıcaklıklarda ise pH'nın 6.0-9.0 arasında stabil olduğu belirtmişlerdir. *o*NPG için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 9.5 mM ve 16,6 mM/dk, laktozlu ise sırasıyla 12.6 mM ve 54.4 mM/dk olarak tespit etmişlerdir.

Song ve ark. (2010) Psikotolerant *Guehomyces pullulans*17-1 mayasına ait olan ekstrasellüler β-galaktosidaz enzimi üzerine çalışma yapmışlar, bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 50^{o}C ve 4.0 olarak tespit etmişlerdir. *o*NPG için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 3.3 mM ve 9.2 μmol/dk olduğunu belirtmişler ve enzimin moleküler ağırlığını da 335 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Levin ve ark. (1981) *Bacillus coagulans* L4' ün β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırma sonucunda, bu enzim için K_m değerini 4.2-5.6 mM olarak bulmuşlardır.

Hirata ve ark. (1985) *Bacillus stearothermophilus* bakterisinin sahip olduğu β-galaktosidaz genini *B. subtilis'*e aktarmışlardır. Bu rekombinant enzim laktozlu ortamda çoğaltılıp enzim aktivitesi incelendiğinde, laktozun bu enzim için indükleyici özelliği olduğunu bulmuşlardır.

Chakraborti ve ark. (2000) *Bacillus sp*. MTCC 3088' den β-galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu enzim için en elverişli saatin 16.saat olduğunu bulmuşlardır.

Gül-Güven (2007) *A. acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* bakterisinden β-galaktosidaz enzimi saflaştırılıp, karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu enzim için %1 laktozlu ve laktozsuz besiyerleri kullanılarak enzim üzerindeki etkinin 24.saatte %1 laktozlu ortamda en yüksek β-galaktosidaz enzim aktivitesine sahip olduğunu bulmuştur. Laktozsuz ortam için ise bu etkinin 40.saate kadar arttığını bulmuştur.

Chen ve ark. (1992) *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109 ile β-galaktosidaz üretiminde optimizasyonu sağlamak için laktoz, mısır ıslatma suyu, glukoz ve gliserol bileşenlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda optimum seviye olarak belirledikleri 80.6 g/l laktoz, 107.7 g/l mısır ıslatma suyu, 4.1 g/l glukoz ve 9.6 g/l gliserol kullanarak

yaptıkları üretimde en yüksek cevabı 6.551 U/ml düzeyinde enzim aktivitesini bulmuşlardır.

Torres ve Lee (1995) *Bacillus subtilis* KL88'den kazanılan β-galaktozidaz geni *Escherichia coli*' ye aktarılarak klonlanmıştır ve bu gen ürünü süt endüstrisindeki potansiyel kullanımı için karakterize edilmiştir. *Escherichia coli*' ye aktarılan genin 2.3 kb olduğunu belirtmişlerdir.

Yuan ve ark. (2008) *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009'dan β-galaktozidaz geninin klonlamasını yaparak ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. β-galaktozidazı kodlayan genin 2067 bç olduğunu belirtmişlerdir.

Juajun ve ark. (2010) *Bacillus licheniformis*' den elde edilen β-galaktozidaz geni *Escherichia coli*' ye aktarılarak klonlanmış, saflaştırılmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu genin 2055 bç olduğu ifade edilmiştir.

Nguyen ve ark. (2007) *Lactobacillus reuteri*'den β-galaktozidaz genlerinin *Escherichia coli*' ye aktarılmasını ve ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Birbirleriyle çakışan *lacL ve lacM* genlerinin boyutlarını sırasıyla 1887 bç ve 960 bç olarak belirtmişlerdir.

Phan Tran ve ark. (1998) *Bacillus licheniformis*' den elde edilen intrasellüler β-galaktozidaz geni *Escherichia coli*' ye aktarılarak klonlanmış, saflaştırılmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmalarında buldukları LacBl genin boyutunun yaklaşık olarak 2.1 kb olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Biyolojik Materyal

Bu çalışmada, Zindar ASLAN tarafından Bingöl Binkap sıcak su kaynağından izole edilen *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan FMB1 varyetesi Fatma MATPAN BEKLER tarafından Yozgat Sorgun sıcak su kaplıcasından izole edilmişitir.

3.2. Kimyasallar

Nutrient Broth ve Agar Merck Darmstatd'dan, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için bileşenler Invitrogen'den, *o*-nitrofenil-beta-D-galaktosid (*o*NPG) Sigma'dan, PCR tüpleri İnvitrogen'den temin edilmiştir. Dithiothreitol (DTT), N-Ethylenemaleimide(NEM), Iodoacetamide (IAA), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) Sigma'dan temin edilmiştir. Elektroforez için gerekli malzemeler Invitrogen'den temin edilmiştir.

$CaCI_2$, EDTA, $CuCI_2$ Merck Darmstatd'dan; $MgCI_2$ Kimetsan'dan $ZnCI_2$ LACHEMA'dan alınmıştır.

3.3. Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj Nüve NF 815, mikrosantrifüj 5430 R Ependorf, PCR aleti Life by Technologies'dan, DNA izolasyon kiti ZYMO Researh'ten, DNA jel elektroforez aleti İnvitrogen'den, güç kaynağı Bio-Rad'dan, jeldeki bantları görmek için BioRad mini translüminatör, Sonikatör Sanyo'dan, inkübatör Heraeus'dan, Grant LTD6G, (-20 +100 ºC)'den su banyosu, spektroftometre Varia'dan, steril kabin Teistar AV-100'denn, çalkalayıcı Memmert'ten, otomatik pipetler Eppendorf'tan, pH metre MP220 METTLER TOLEDO'dan, otoklav HMC HİRAMAYA'dan, -20 ºC dolap HARRİS'ten temin edilerek kullanılmıştır.

3.4. Besiyerleri

3.4.1. Sıvı Besiyeri

Nutrient Broth besiyerinden 1 litre için 8 gr tartılıp otoklavlanmıştır.

3.4.2. Katı Besiyeri

8 gr Nutrient Broth besiyerine 15 gr agar eklenip 1 litre distile su eklenip otoklavlanmıştır.

3.5. Tamponlar

0.1 Molar Sitrik Asit Tamponu: pH:4.0-6.0 hazırlandı.

0.1 Molar Tris-HCl Tamponu: pH:7.0-8.0 hazırlandı.

0.1 Molar Glisin-NaOH Tamponu: pH:9.0-11.0 hazırlandı.

3.6. Bakterilerin Kültüre Alınması

Çalışmada *Bacillus paralicheniformis* 5NK, *Bacillus subtilis* 4NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 bakterileri NB sıvı besiyerine eklendi. 100 ml'lik erlenlere 25 ml sıvı besiyeri eklenip, 1'er ml bakteri inoküle edildi. *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri 45°C'de ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 bakterisi ise 55°C'de çalkalayıcı su banyosu kullanılarak 120rpm'de bakteri çoğaltılması yapıldı.

Elde edilen besiyerleri 10 000 rpm de 10 dk. santrifüj edilerek, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri sonikasyon işlemine alınıp sonikasyon işleminden sonra tekrar aynı santrifüj koşullarında santrifüj edilip üst sıvı(süpernatant) β-galaktosidaz aktivite tayini için kullanılmıştır. *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 bakterisi ise DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

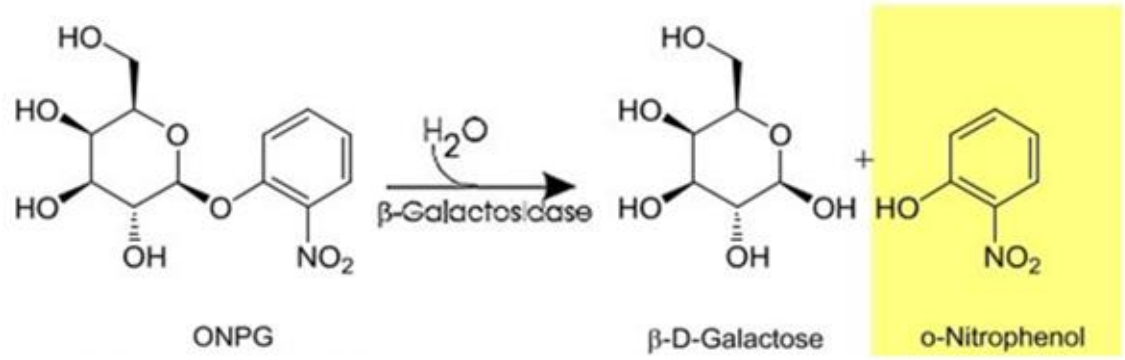
3.7. β-Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti

Bacillus paralicheniformis 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri NB ortamında, 45°C ve aerobik koşullarda çoğaltıldı. Enzim aktivite tayini için optimum süreyi bulmak amacıyla, 250 ml erlen içine 50 ml %1 laktozlu NB ve laktozsuz NB ortamlarında 121°C'de 20 dk otoklavlanmış ve sterilize edilmiş olan %1 laktozlu NB ve laktozsuz NB besiyerlerine *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri eklenerek 45°C'de, çalkalamalı su banyosu aracılığıyla 160 rpm'de

çoğaltıldı ve 6-48. saatlerinde çoğaltılan bakteriler 600 nm'de spektrofotometrik olarak okuma gerçekleştirildi. Elde edilen kültürler 10 000 rpm'de soğutmalı santrifüj yardımıyla 10 dk. santrifüjleme yapıldı ve sonikasyon işlemine alınıp sonikasyon işleminden sonra tekrar aynı santrifüj koşullarında santrifüj edilip üst sıvı β-galaktosidaz aktivite tayini ve protein miktar tayini için kullanıldı.

3.8. β-Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β-galaktosidaz aktivite tayini, *o*NPG kullanılarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmesi sağlandı. 60 mM *o*NPG 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponu, 10 ml içinde çözündürülerek enzim substratı olarak kullanıldı. 50 µL substrat, 50 µL enzim solüsyonu (*Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK'dan elde edilen) ve 900 µL tampon eklenerek sırasıyla 10'ar dk 45°C ve 55°C'de su banyosu içerisinde inkübe edilmesi sağlandı. İnkübasyon sonrasında reaksiyonun durdurulması amacıyla 1 M Na_2CO_3 eklenilerek β-galaktosidaz aktivitesi o-Nitrofenol'ün 420 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. ONPG'nin parçalanması sonucu oluşan o-Nitrofenol (Acharya 2015)

Protein miktarının belirlenmesi ise Lowry yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Lowry 1951). Standart eğrisinin belirlenmesi amacıyla önceden konsantrasyonu 1 mg/mL olarak belirlenen Bovine Serum Albumin(BSA) kullanıldı**.** Bu standart çözeltiden faydalanarak konsantrasyonunu bilmediğimiz çözeltideki protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı. Herbir örnek ölçümünü yapabilmek için 50 µL enzim solüsyonu alındı. Herbir örneğin üzerine 5 mL alkalin çözeltisi eklendi. 15 dk 40°C'de bekletilip herbir örneğin üzerine %50 sulandırılarak hazırlanmış olan 500 µL

Folin reaktifi (FCR) eklenip ve 30 dk karanlık ortamda bırakıldı. Daha sonrasında ise 660 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değerlerinin ölçümü gerçekleştirildi.

Alkalin Çözeltisini Hazırlanışı

200 ml 0,1 N NaOH hazırlanıp içine %2'lik Na_2CO_3 eklendi.

10 ml % 1 lik Na-K tartarat hazırlandı içine %0.5'lik $CuSO_4.5H_2O$ eklendi.

200ml lik karışım içine yavaş yavaş 1'er ml Na-K-tartarat ile $CuSO_4.5H_2O$ karışımı eklenerek manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. Karışım erlene aktarıldı. Karışım folyo yardımıyla ışık almayacak şekilde sarılıp bu karışım 25˚C de kullanılmak için hazırlandı.

3.9. *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 Bakterilerinden Kromozom DNA'sının İzolasyonu ve RNA'nın Uzaklaştırılması

Bacillus subtilis 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterileri NB ortamında aerobik koşullar altında 45°C'de çoğaltıldı. Çoğaltılan bakterilerin kromozom DNA'ları Zymo Research kiti kullanılarak izolasyonu gerçekleştirildi.

Anoxybacillus ayderensis FMB1 bakterisi NB ortamında aerobik koşullar altında 55°C'de çoğaltıldı. Çoğaltılan bakterilerin kromozom DNA'sı Zymo Research kiti kullanılarak izolasyonu gerçekleştirildi.

3.9.1. Kromozom DNA'sının İzolasyonu

Bol miktarda elde edilen *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 kültürleri oluşturuldu.

- Elde edilen kültürler 10 000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Pelletler alındı. Pelletler ultra pure su yardımıyla artıklardan uzaklaştırıldı. (Pelet dondurucuda -20°C'de saklanabilir.) Pelete uygun miktarda ultra pure su eklendi.
- 1.5 ml lik ependorfa 200 mikrolitre örnek alındı ve üzerine
  200 mikrolitre BioFluid& Cell buffer
  20 mikrolitre Proteinaz K eklendi.
- Karışım vortekslenip 55°C'de 10 dk. inkübe edildi.

- Karışım üzerine 420 mikrolitre Gemoic Binding Buffer eklenip vortekslendi.
- Elde edilen karışım Zymo-Spin™ IIC-XL Column'a aktarıldı. (>12 000 xg) 1dakika santrifüj edildi.
- Alttaki Collection tüp atılıp yerine yeni Collection tüp eklendi ve üzerine 400 mikrolitre DNA Pre-Wash Buffer eklenip (>12 000 xg) 1dakika santrifüj edildi.
- Alttaki Collection tüp atılıp yerine yeni Collection tüp eklendi ve üzerine 700 mikrolitre g-DNA Wash Buffer eklenip (>12 000 xg) 1dakika santrifüj edildi.
- Alttaki Collection tüp atılıp yerine yeni Collection tüp eklendi ve üzerine 200 mikrolitre g-DNA Wash Buffer eklenip (>12 000 xg) 1dakika santrifüj edildi.
- DNA saklamak için önceden hazırlanmış olan 1.5 ml'lik tüp içerisine Zymo-Spin™ IIC-XL Column içerisindeki ürün bırakılır ve üzerine >50 DNA Elution Buffer eklenip 5dk. beklenir.
- (>12 000 xg) 1 dakika santrifüj edildi.
- 5 μL RNAaz eklendi ve 1 gün + 4˚C' de beklemeye bırakıldı.

3.10. β-Galaktosidaz Genin PCR ile Amplifikasyonu

Bacillus subtilis 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1'in kromozom DNA'sında bulunan β-galaktosidaz geni Matpan Bekler (2012)' in tasarlamış olduğu primerler ve PCR koşulları aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Kullanılacak Primerler:

A:

p-1 β-gal2

(5′-CCCGG*GGATCC*GATG*GTTAAACCGTATCCCCCG*-3′) T_m = >75 ºC ve

BamHI dizisi — Çoğalmayı sağlayıp, DNA'yı tanıyacak primer dizisi

p-2 β-gal2

(3′-GCATGC*CTGCAG*CTATGCCTTATGGCTTCTC′) T_m = 79.8 ºC'dir.

PstI dizisi — Çoğalmayı sağlayıp, DNA'yı tanıyacak primer dizisi

B:

p-1 β-gal3

(5′-CCCGG*GGATCC*GATG*AAGATGGAACGGAAAGC*-3′) T_m = >72.1 ºC ve

BamHI dizisi — Çoğalmayı sağlayıp, DNA'yı tanıyacak primer dizisi

p-2 β-gal3

(3′-GCATGC*CTGCAG*TCATTTATTCTCTGATAACA-5′) T_m = 65.6 ºC'dir.

PstI dizisi — Çoğalmayı sağlayıp, DNA'yı tanıyacak primer dizisi

C:

p-1 β-gal4

(5´-CCCGG*GGATCC*GATG*CCAAAAATTTATACGAC*-3´) T_m = 69.5 ºC ve

BamHI dizisi — Çoğalmayı sağlayıp, DNA'yı tanıyacak primer dizisi

p-2 β-gal4

(3´-GCATGC*CTGCAG**CTATTCTTTTGCTTTTAC*-5´) T_m = 65.4 ºC'dir.

PstI dizisi — Çoğalmayı sağlayıp, DNA'yı tanıyacak primer dizisi

Şekil 3.2. β- galaktosidaz geninin PCR'ı için yararlanılan primer dizi ve T_m değeri

3.10.2. β-Galaktosidaz Geni İçin Kullanılan PCR Programı

Çizelge 3.1. β- galaktosidaz geni için kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık(ºC)	Süre	Döngü sayısı
1	94	4 dk	1
2	94	30 sn	35
3	50	1 dk	35
4	72	1 dk	35
5	72	7 dk	1
6	4	sınırsız	1

Çizelge 3.2. PCR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları

Miktar	(X6)	Kimyasal
2.5 µL	15 µL	10X PCR tamponu
0.75 µL	4.5 µL	15 mM $MgCl_2$
2.5 µL	15 µL	10 mM dNTP
1.25 µL	7.5 µL	Primer 1
1.25 µL	7.5 µL	Primer 2
0.25 µL	1.5 µL	Taq DNA polimeraz
16.25 µL	97.5 µL	H_2O

Çizelge 3.2. de hazırlanan bileşenlerden her bir PCR örneği için 0.2 mL'lik PCR tüpüne 24 µL karışım hazırlandı. Her tüpe 1'er mikrolitre izole edilmiş olan kromozom DNA'sı eklenerek, önceden PCR cihazında koşulları ayarlanmış olan program seçilerek PCR cihazına yerleştirilip, cihaz çalıştırıldı.

3.11. Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 50 ml'lik tanka 0.5 gr ultra pure agaroz tartıldı. 10X TBE tamponu 10 kat sulandırılarak agaroz eklemek için bu tampondan 50 ml alındı. Agarozun çözündürülmesi için mikrodalga fırın kullanıldı. Agaroz içindeki tampon mikrodalga fırınından çıkarıldıktan sonra soğuması için beklenildi. Soğuma gerçekleştikten sonra içine 0.5 µl etidyum bromür eklendi. Jel, tanka dökülüp tarak yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için 25 dk beklenildi. Jelin tarağı çıkarılıp jel üzerine 1X TBE tamponu döküldü. DNA'nın jelde yürümesini gözlemleyebilmek için 6X'lik yükleme boyası ile DNA boyandı. DNA boyutunu belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine DNA ladder eklendi. Jel, elektroforez tankında yaklaşık 45 dk yürütüldü ve jel, Ultra Viole (UV) altında görüntülendi.

3.12. Farklı Zaman Aralıklarında Laktozlu ve Laktozsuz Koşullarda Enzimin Üretim Araştırması

6, 12, 24, 36 ve 48 saatlerinde %1'lik laktozlu NB ve laktozsuz NB besiyeri içinde *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri inkübasyona bırakıldı. Her inkübasyon süresinde 3'er ml alınıp β-galaktosidaz aktivite tayini ve protein miktar tayini gerçekleştirildi.

3.13. Optimum Sıcaklığın Araştırılması

β-galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırabilmek için *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri sonike edilip üst sıvıları alındıktan sonra, enzime ait olan optimum sıcaklığı belirleyebilmek için 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ve 65°C sıcaklıklarında 0.1M Tris-HCl tamponu içerinde *o*NPG yardımıyla optimum sıcaklık belirlendi. Her sıcaklık deneyi için deneyde kullanılan tampon preinkübasyona bırakıldı.

3.14. Optimum pH'nın Araştırılması

β-galaktosidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini araştırabilmek için *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri sonike edilip üst sıvıları alındıktan sonra enzime ait olan optimum pH'ı belirleyebilmek için 0.1M sitrik asit (pH 4.0-6.0), 0.1M Tris-HCl (pH 7.0-8.0), 0.1 M glisin NaOH tamponları(9.0-11.0) kullanılarak araştırma yapıldı. *o*NPG için 60mM'lık stok solüsyonü kullanıldı.

3.15. Termal Stabilite'nin Belirlenmesi

Bacillus paralicheniformis 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri NB ortamında çoğaltılarak 24. saatte alınıp 10 000 rpm'de 10dk. santrifüj edilip sonikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra tekrar 10 000 rpm'de 10dk. santrifüj edilip üst sıvı alındı.

β-galaktosidaz aktivitesi üzerine termal stabilite etkisini araştırabilmek için *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisi için 45-60°C sıcalık sıcalık aralığında deneyler yapıldı. Enzim solüsyonu her deney için 30-120 dk. aralığında bu sıcaklıklara

maruz bırakıldı. Daha sonrasında ise 50 µl *o*NPG eklenip her bir sıcaklık için farklı olmak üzere 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 µl 1M Na_2CO_3 eklenerek durduruldu. Enzimin substratı parçalama ürünü olan o-nitrofenol 420 nm'de spektrofotometri aleti aracılığıyla ölçüldü.

β-galaktosidaz aktivitesi üzerine termal stabilite etkisini araştırabilmek için *Bacillus subtilis* 4NK bakterisi, 40-50°C sıcalık aralığında deneyler yapıldı. Enzim solüsyonu her deney için 30-120 dk. aralığında bu sıcaklıklara maruz bırakıldı. Daha sonrasında ise 50 µl *o*NPG eklenip her bir sıcaklık için farklı olmak üzere 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 µl 1M Na_2CO_3 eklenerek durduruldu. Enzimin substratı parçalama ürünü olan o-nitrofenol 420 nm'de spektrofotometri aleti aracılığıyla ölçüldü.

3.16. Enzimin Kısmi Saflaştırılması: Çöktürme ve Diyaliz

NB besiyerine *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakteri ekimleri yapılarak 45°C, 120 rpm'de 24 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk 10 000 rpm'de santrifüjlendi. Sonikasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra üst sıvılar alınarak *Bacillus paralicheniformis* 5NK için %80 lik ve *Bacillus subtilis* 4NK için %70 lik amonyum sülfat azar azar eklenerek, manyetik karıştırıcı yardımıyla buz altında çözündürüldü. Çöktürme sonrasında her bir sıvı 15ml'lik falkon tüplerine konularak25 dk. 10 000 rpm'de santrifüjlendi. Üst sıvı atılıp her bir örneğe 4 ml 0.1 M'lık Tris-HCl pH 7.0 tamponu eklenerek çözülmesi sağlandı. Diyaliz hortumuna çöktürmenin ardından elde edilmiş olan örnekler boşaltıldı. 1000 mL 0.1 M'lık Tris-HCl pH 7.0 tamponunda 1 gün +4°C'de manyetik karıştırıcıyla birlikte amonyum sülfat çözeltisinden uzaklaştırmak amacıyla bekletildi. Diyaliz sonucunda her bir örneğin son hacmi hesaplandı. Ham ekstrakttan ve diyaliz sonrası elde edilen enzimler için β-galaktosidaz aktivite tayini ve Lowry metoduyla protein miktar tayini gerçekleştirildi.

3.17. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması

Bacillus paralicheniformis 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri NB ortamında çoğaltılarak 24. saatte alınıp 10 000 rpm 10dk. santrifüj edilip sonikasyon

işlemine tabi tutulduktan sonra tekrar 10 000 rpm'de 10dk. santrifüj edilip üst sıvıdan kısmi saflaştırma gerçekleştirildi.

Bazı kimyasalların; DTT, PMSF, Iodoacetamide, NEM ve PKMB β-galaktosidaz üzerine etkileri araştırıldı. Bu araştırma için PMSF etanolde, diğer bileşenler ise saf suda çözündürüldü. Her bir örnek için 1-10 mM konsantrasyonlarda enzim üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışma da 0.1 M sitrik asit pH 6.0 tamponu kullanılmıştır. Enzim, her bir örnek için farklı konsantrasyonlarda bu kimyasal maddeler ile 15 dk. tampon ile birlikte öninkübasyona bırakılmıştır. 15 dk. sonrasında her bir örneğe 50 µl *o*NPG eklenip 10 dakika *Bacillus paralicheniformis* 5NK için 55°C ve *Bacillus subtilis* 4NK için 45°C inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 µl 1M Na_2CO_3 eklenerek durduruldu. Enzimin substratı parçalama ürünü olan o-nitrofenol 420 nm'de spektrofotometri aleti aracılığıyla ölçüldü.

3.18. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Şelatörlerin Etkilerinin Araştırılması

Bacillus paralicheniformis 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri NB ortamında çoğaltılarak 24. saatte alınıp 10 000 rpm 10dk. santrifüj edilip sonikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra tekrar 10 000 rpm'de 10dk. santrifüj edilip üst sıvıdan kısmi saflaştırma gerçekleştirildi.

Kısmi saflaştırma sonrasında β-galaktosidaz aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatörlerin etkilerini belirlemek için EDTA, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$, $CdCl_2$ ve $CuCl_2$ için stok solüsyonlar hazırlandı. Her bir örnek için 1-20 mM konsantrasyonlarda enzim üzerine etkileri incelendi. Bu çalışma da 0.1 M sitrik asit pH 6.0 tamponu kullanıldı. Enzim, her bir örnek için farklı konsantrasyonlarda bu metaller ve şelatörler ile 15 dk. tampon ile birlikte öninkübasyona bırakıldı. 15 dk. sonrasında her bir örneğe 50 µl *o*NPG eklenip 10 dakika *Bacillus paralicheniformis* 5NK için 55°C ve *Bacillus subtilis* 4NK için 45°C inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 µl 1M Na_2CO_3 eklenerek durduruldu. Enzimin substratı parçalama ürünü olan o-nitrofenol 420 nm'de spektrofotometri aleti aracılığıyla ölçüldü.

3.19. β-Galaktosidaz Enzim Kinetiği İçin Parametre Belirlenmesi

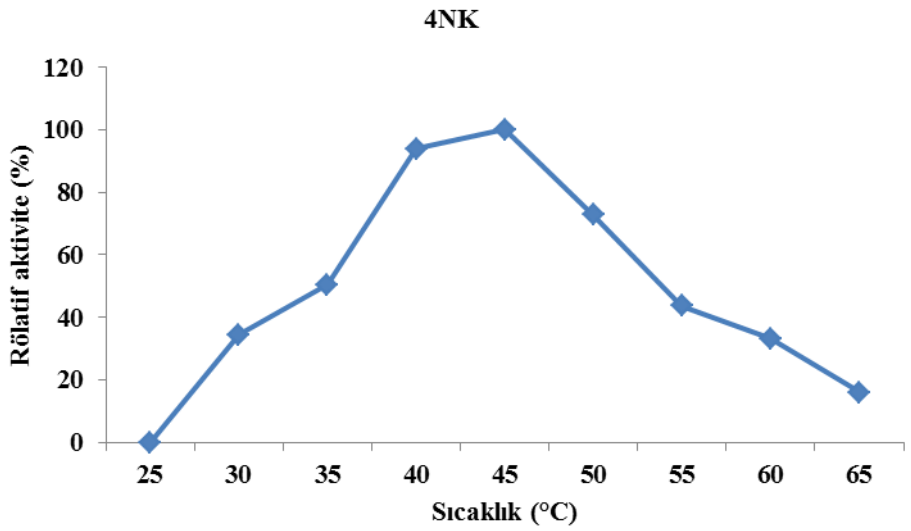
Bacillus paralicheniformis 5NK ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterileri NB ortamında çoğaltılarak 24. saatte alınıp 10 000 rpm 10 dk. santrifüj edilip sonikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra tekrar 10 000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip üst sıvıdan kısmi saflaştırma gerçekleştirildi.

Elde edilen bu enzim solüsyonunda 0.1 M sitrik asit pH 6.0 tamponu 0.1-50mM konsantrasyonlarında *o*NPG kullanılarak 50 µl enzim eklenerek aktiviteleri ölçüldü. *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisi için 55°C de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. *Bacillus subtilis* 4NK bakterisi için ise 45°C de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 500 µl 1M Na_2CO_3 eklenerek durduruldu. Enzimin substratı parçalama ürünü olan o-nitrofenol 420 nm'de spektrofotometri aleti aracılığıyla ölçüldü. Elde edilen değerler aracılığıyla Lineweaver-Burk grafiğinin çizimi yapıldı. Bu grafikten yaralanılarak *o*NPG için K_m ile V_{max} sonuçları belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

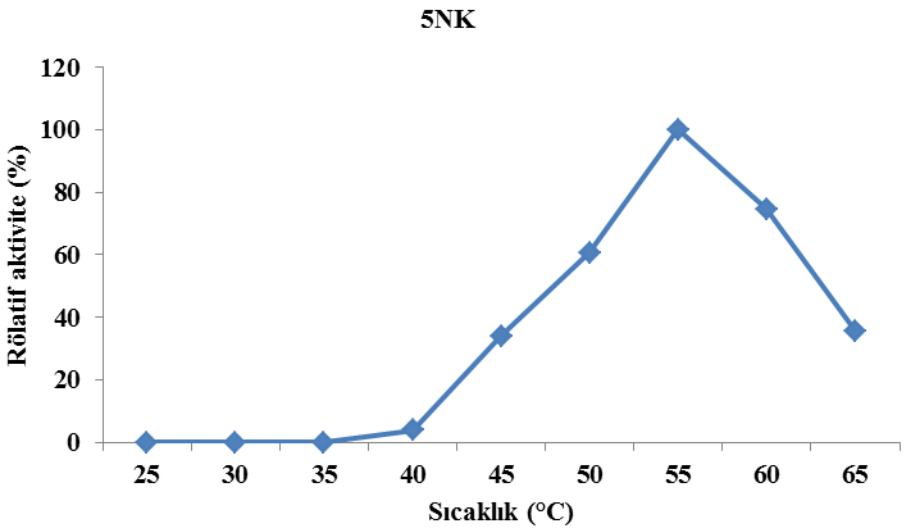
4.1. Sıcaklığın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere 25-65˚C arasında yapılan sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz aktivitesinin sıcaklık etkisi değerlendirildiğinde 35-55˚C arasında aktivite gösterdiği ve optimum sıcaklığın 45˚C olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

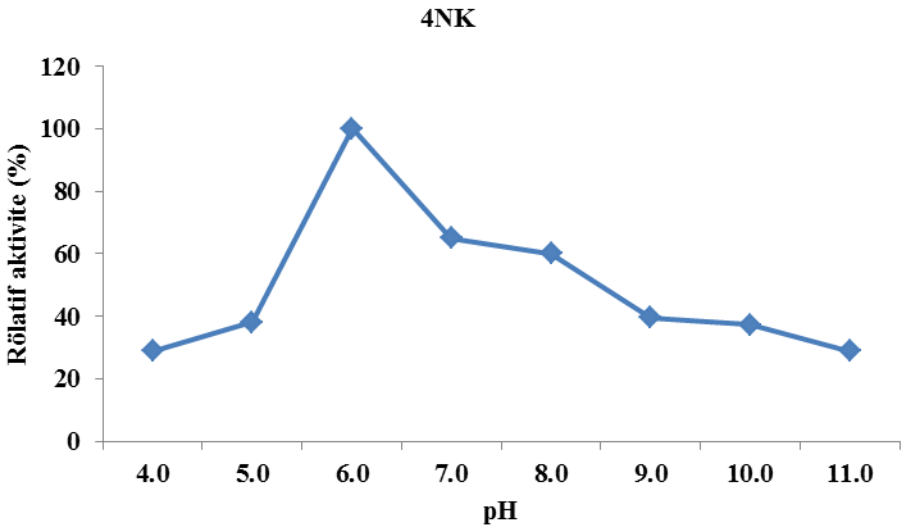
Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 25-65˚C arasında yapılan sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz aktivitesinin sıcaklık etkisi değerlendirildiğinde 50-60˚C arasında aktivite gösterdiği ve optimum sıcaklığın 55˚C olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.2. *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

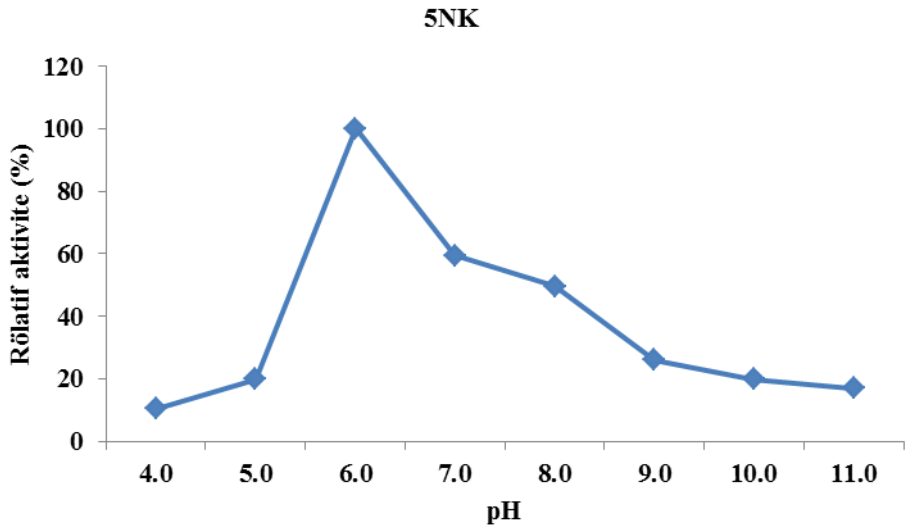
4.2. pH'ın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.3'te görüldüğü üzere pH'ın *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve test edilen 4.0-11.0 arasındaki pH aralığında β-galaktosidaz aktivitesi için optimum pH 6.0 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

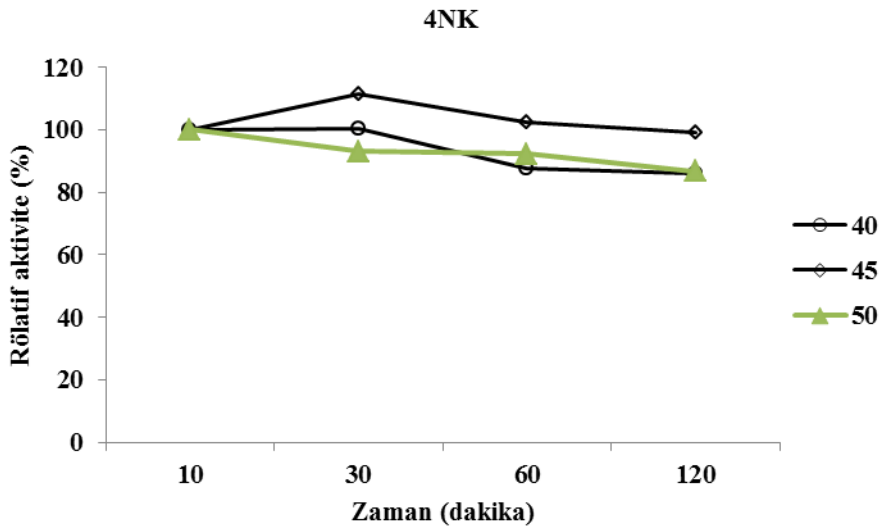
Şekil 4.4'te görüldüğü üzere pH'ın *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve test edilen 4.0-11.0 arasındaki pH aralığında β-galaktosidaz aktivitesi için optimum pH 6.0 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.4. *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

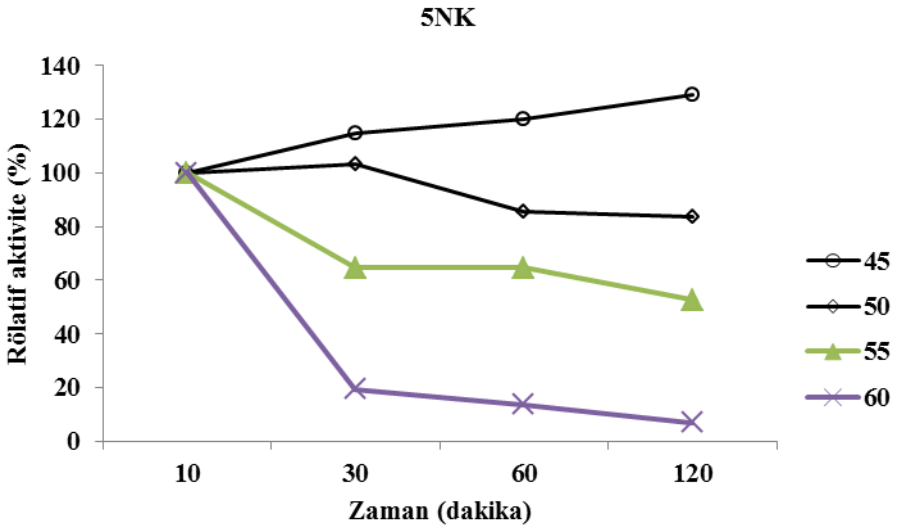
4.3. Termal Stabilitenin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.5'de *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz enzim aktivitesinin termal stabilitesi 40-50˚C arasında 30-120 dakika aralığında incelenmiş ve bu bakteri enziminin termal stabiliteye sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.5. *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidazın termal stabilitesi

Şekil 4.6'da *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz enzim aktivitesinin termal stabilitesi 45-60˚C arasında 30-120 dakika aralığında incelenmiş ve bu bakteri enziminin termal stabiliteyi 45-50˚C de koruduğu, 55˚C de ise kısmen koruduğu bulunmuştur.



Şekil 4.6. *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidazın termal stabilitesi

4.4. Bazı Kimyasalların β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere bazı kimyasalların *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu bakteri enziminin DTT, PMSF ve NEM'in düşük oranda inhibisyona yol açtığı ancak PCMB'nin ise çok yüksek oranda inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Iodoasetamid'in ise enzim üzerine önemli oranda etkisi olmamıştır.

KİMYASALLAR	**1 mM**	**5 mM**	**10 mM**
IODOACETAMİDE	113	103	79
DTT	89	72	68
PMSF	88	102	78
N-ETİL MALEİMİDE	82	91	80
4-KLORO MERCURİE BENZOİK ASİT(PCMB)	17	14	14

Çizelge 4.1. Bazı kimyasalların *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere bazı kimyasalların *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu bakteri enziminin iodoasetamid ve PCMB tarafından yüksek oranda inhibisyona neden olduğu, PMSF'nin 10 mM da yüksek inhibisyonuna neden olduğu ve NEM'in 5 ve 10 mM'da kısmı inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. DTT'nin ise enzim üzerine ciddi oranda etkisi olmamıştır.

KİMYASALLAR	**1 mM**	**5 mM**	**10 mM**
IODOACETAMİDE	73	25	14
DTT	111	117	118
PMSF	82	101	35
N-ETİL MALEİMİDE	103	64	61
4-KLORO MERCURİE BENZOİK ASİT(PCMB)	9	8	7

Çizelge 4.2. Bazı kimyasalların *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.5. Bazı Metal ve Şelatörlerin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere *Bacillus subtilis* 4NK bakterisi için β-galaktosidaz enzim aktivitesinin bazı metal ve şelatör üzerine incelenmesi yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda $MgCl_2$ 5mM'da, $CaCl_2$' ün 5,10 ve 20 mM'da, EDTA'nın tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. $CuCl_2$'ün 1, 2.5 ve 5 mM'da enzim aktivitesini arttırdığı ancak 20 mM'da aktiviteyi yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur. $ZnCl_2$ 5 mM'da enzim aktivitesini kısmi olarak arttırdığı 10 ve 20 mM'larda ise inhibe ettiği bulunmuştur. En yüksek aktivitenin $MnCl_2$ tarafından 1, 2.5 ve 5 mM'da gözlendiği ancak 20 mM'da %50'ye yakın inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. $CoCl_2$ ve $NiCl_2$'ün tüm konsantrasyonlarında enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. $CdCl_2$'ün ise 10 ve 20 mM'larda yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur.

METALLER	1 mM	2.5 mM	5 mM	10 mM	20 mM
$MgCl_2$	113	115	135	113	-
$CaCl_2$	119	116	148	142	149
EDTA	143	153	-	151	162
$CuCl_2$	143	171	141	116	24
$ZnCl_2$	112	117	124	63	34
$MnCl_2$	189	193	152	94	49
$CoCl_2$	156	151	154	144	162
$NiCl_2$	123	148	170	179	165
$CdCl_2$	-	-	109	39	29

Çizelge 4.3 *Bacillus subtilis* 4NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatörlerin etkisinin incelenmesi

Çizelge 4.4. de görüldüğü üzere *Bacillus paralicheniformis* 5NK β- galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatörlerin etkisi araştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda $MgCl_2$ 5mM'da, EDTA 1mM'da enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. $CuCl_2$'ün enzimi tüm konsantrasyonlarda tamamen inhibe ettiği, $CdCl_2$'ün ise 1 ve 2.5 mM'da enzimi kısmen, 5 ve 10 mM'da ise tamamına yakınını inhibe ettiği bulunmuştur. $ZnCl_2$, $CoCl_2$ ve $NiCl_2$'ün düşük konsantrasyonlarda enzimi kısmi olarak

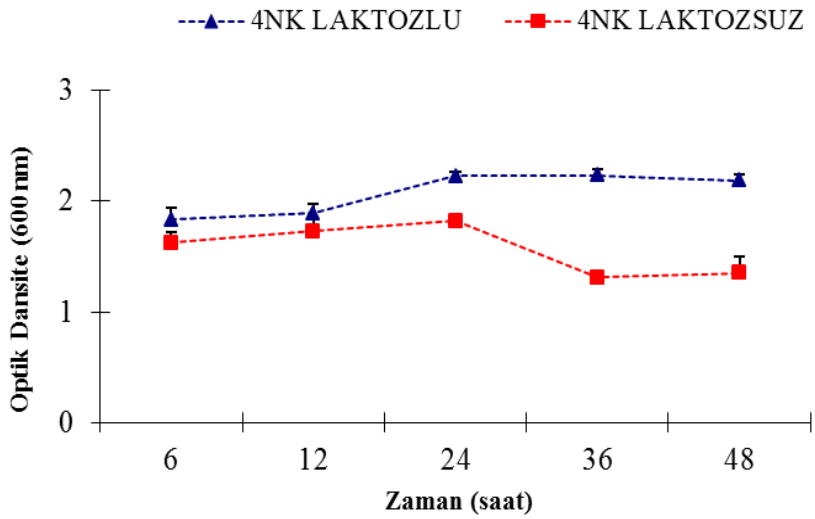
aktive ettikleri, 20 mM'da $ZnCl_2$ ve $CoCl_2$, enzimi inhibe ettikleri bulunmuştur. $CaCl_2$'ün hiçbir konsantrasyonunda ciddi bir etki olmadığı bulunmuştur. $MnCl_2$ ise bu enzim için en iyi aktifleştirici özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Her konsantrasyonda enzim aktivitesini arttırdığı saptanmıştır.

METALLER	**1 mM**	**2.5 mM**	**5 mM**	**10 mM**	**20 mM**
$MgCl_2$	122	119	136	129	112
$CaCl_2$	119	126	104	103	-
EDTA	145	124	124	120	-
$CuCl_2$	15	14	13	15	-
$ZnCl_2$	128	106	110	92	60
$MnCl_2$	150	160	165	162	123
$CoCl_2$	132	127	128	121	22
$NiCl_2$	129	114	108	50	-
$CdCl_2$	94	58	18	18	-

Çizelge 4.4. *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatörlerin etkisinin incelenmesi

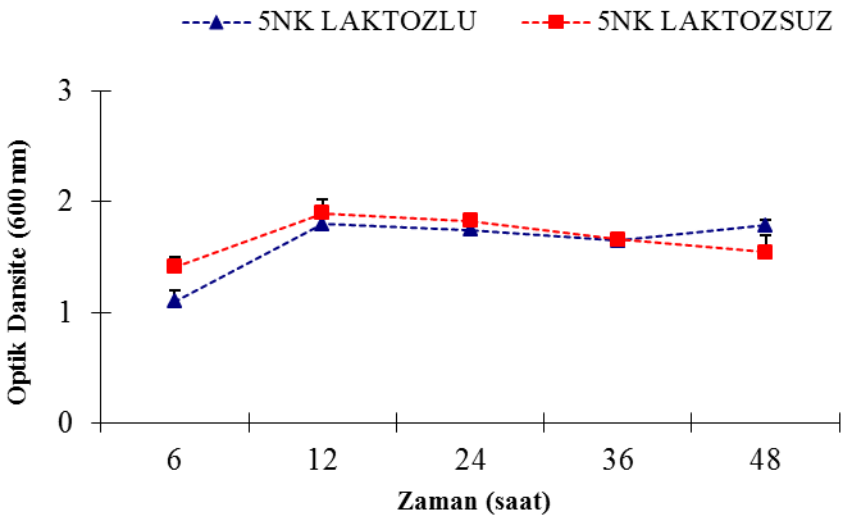
4.6. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamda Zamana Bağlı Bakteri Çoğalması

Laktozlu ve laktozsuz ortamda 6-48 saat zaman aralığında laktozun bakteri çoğalmasını arttırıp arttırmadığı incelenmiştir. *Bacillus subtilis* 4NK bakterisinin laktozlu ortamda 24. saatten sonra daha iyi çoğaldığı bulunmuştur.(Şekil 4.7.)



Şekil 4.7. *Bacillus subtilis* 4NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda çoğalması

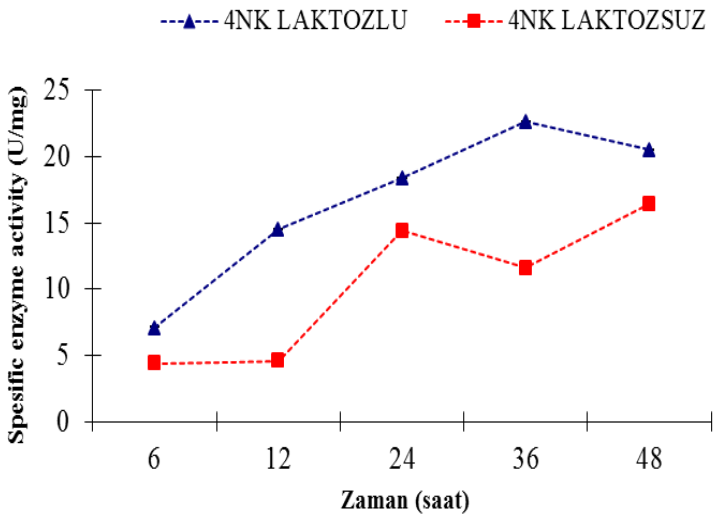
Laktozlu ve laktozsuz ortamda 6-48 saat zaman aralığında laktozun bakteri çoğalmasını arttırıp arttırmadığı incelenmiştir. *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisinde laktozun çoğalma üzerine etki etmediği bulunmuştur.(Şekil 4.8.)



Şekil 4.8. *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda çoğalması

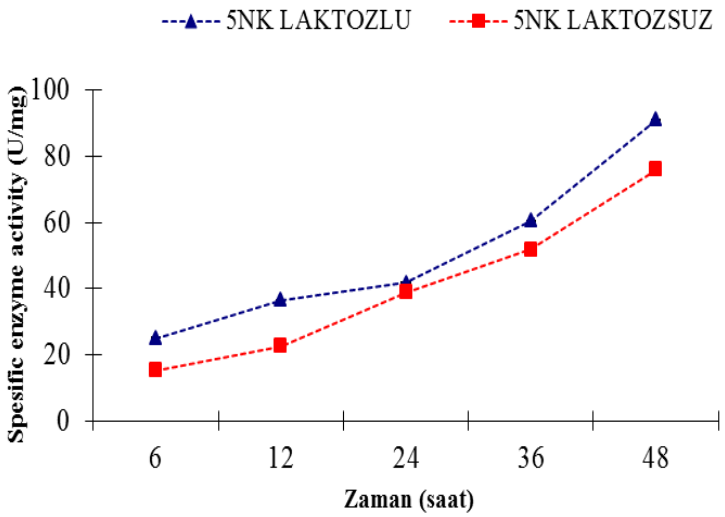
4.7. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamda Zamana Bağlı Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Laktozlu ve laktozsuz ortamda 6-48 saat zaman aralığında laktozun enzim üretimini arttırıp arttırmadığı incelenmiştir. *Bacillus subtilis* 4NK bakterisinde laktozun enzim üretimini bütün zaman aralıklarında arttırdığı bulunmuştur.(Şekil 4.9.)



Şekil 4.9. *Bacillus subtilis* 4NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda zamana bağlı enzim üretimi

Laktozlu ve laktozsuz ortamda 6-48 saat zaman aralığında laktozun enzim üretimini arttırıp arttırmadığı incelenmiştir. *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisinde laktozun enzim üretimini bütün zaman aralıklarında arttırdığı bulunmuştur.(Şekil 4.10.)



Şekil 4.10. *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterisinin laktozlu ve laktozsuz ortamda zamana bağlı enzim üretimi

4.8. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Bacillus subtilis 4NK enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu saflaştırma sonucunda bu bakteri için saflaştırma katsayısı 2.8 ve verim % 85 olarak bulunmuştur.(Çizelge 4.5.)

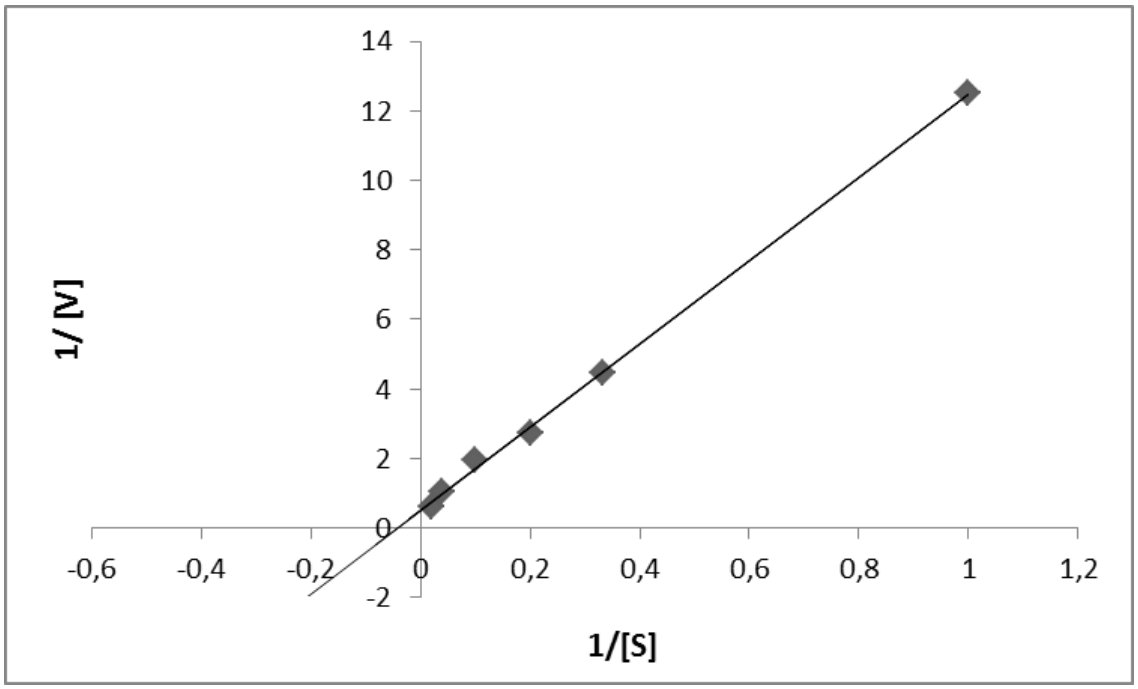
Çizelge 4.5. *Bacillus subtilis* 4NK'a ait β-galaktosidaz saflaştırma adımları

Saflaştırma Adımları	Total Protein (mg/ml)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim(%)
Ham özüt	73.3	5328.1	72.7	1	100
Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz	22.7	4540.1	200.1	2.8	85.2

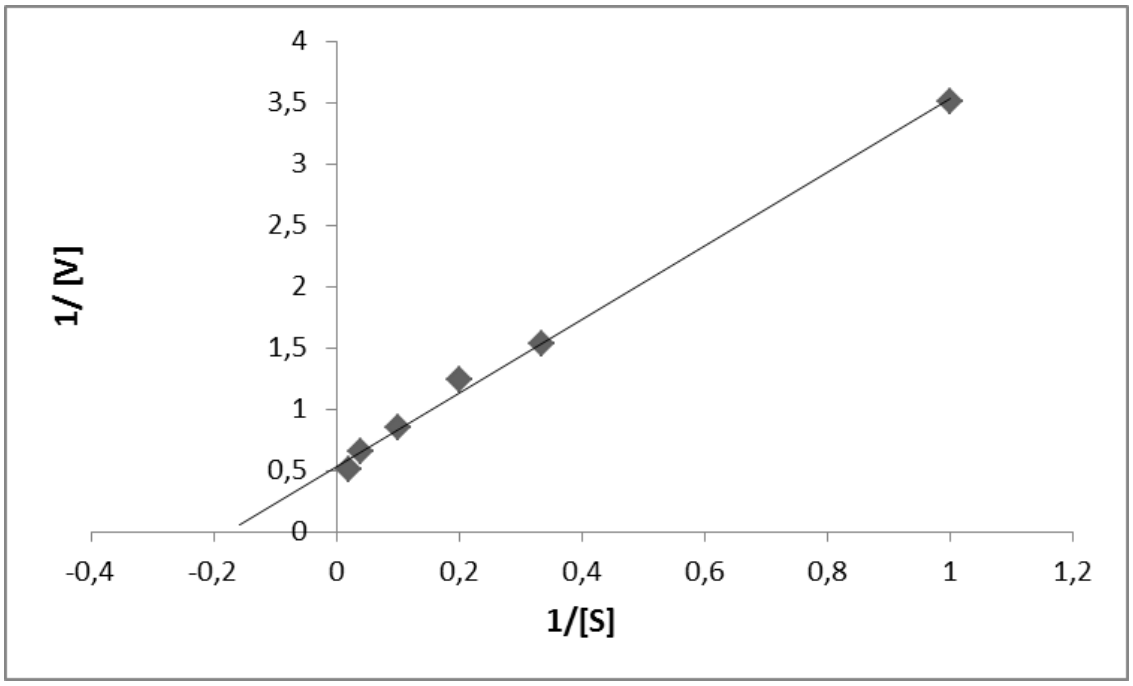
Bacillus paralicheniformis 5NK enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu saflaştırma sonucunda bu bakteri için saflaştırma katsayısı 2 ve verim % 76.8 olarak bulunmuştur.(Çizelge 4.6.)

Çizelge 4.6. *Bacillus paralicheniformis* 5NK'a ait β-galaktosidaz saflaştırma adımları

Saflaştırma Adımları	Total Protein (mg/ml)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim(%)
Ham özüt	184.7	11399.9	61.7	1	100
Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz	72.4	8756.9	121.0	2.0	76.8



Şekil 4.11. *Bacillus subtilis* 4NK enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

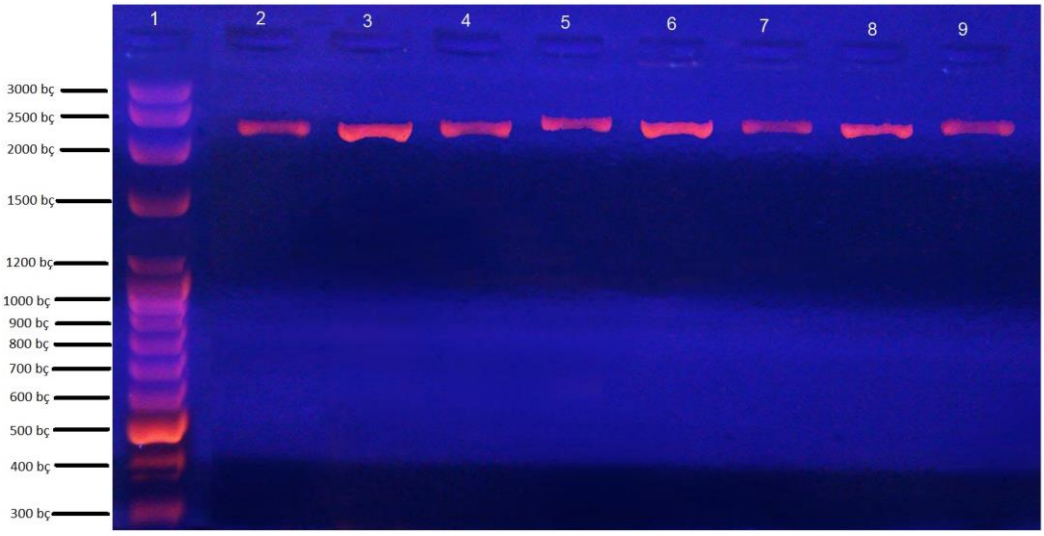


Şekil 4.12. *Bacillus paralicheniformis* 5NK enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'deki Lineweaver-Burk grafikleri farklı *o*NPG konsantrasyonlarda enzim aktivitesi 420 nm'de ölçülerek elde edilen veriler aracılığıyla çizilmiştir. Bu grafik kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

4.9. *Bacillus subtilis* 4NK, *Bacillus paralicheniformis* 5NK ve *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 Bakterilerinin β-Galaktosidaz Genlerinin PCR Amplifikasyonu

Elde edilen bakteri DNA'larından β-galaktosidaz gen amplifikasyonu yapılmıştır. Yapılan bu amplifikasyon sonucu şekil 4.13'de görüldüğü üzere sırasıyla ilk 3 PCR ürünü *Bacillus paralicheniformis* 5NK, sonraki 3 PCR ürünü *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 ve son 2 PCR ürünü ise *Bacillus subtilis* 4NK bakterisine aittir. Elde edilen PCR ürünlerinin boyutları ~2.4kb boyutunda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13. *Bacillus paralicheniformis* 5NK, *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 ve *Bacillus subtilis* 4NK bakterilerinin β-galaktosidaz genlerinin PCR amplifikasyonu (**1**: DNA Ladder: Vivantis'ten 3kb, **2**: 5NK *β gal 3* PCR ürünü, **3**: 5NK *β gal 2* PCR ürünü, **4**: 5NK *β gal 4* PCR ürünü, **5**: FMB1 *β gal 3* PCR ürünü, **6**: FMB1 *β gal 2* PCR ürünü, **7**: FMB1 *β gal 4* PCR ürünü, **8**: 4NK *β gal 2* PCR ürünü, **9**: 4NK *β gal 3* PCR ürünü)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterilerindeki intrasellüler β-galaktosidaz geni ve enzimi üzerine çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular daha önceki çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterilerinin optimum enzim sıcaklıkları ve pH'ları sırasıyla 45˚C (Şekil 4.1) ve pH 6.0(Şekil 4.3) ile 55˚C(Şekil 4.2) ve pH 6.0(Şekil 4.4) olarak bulunmuştur. Bu sıcaklıklar göz önüne alındığında *Bacillus subtilis* 4NK enziminin ılımlı termofil, *Bacillus paralicheniformis* 5NK enziminin ise termofil olduğu bulunmuştur. Daha önceden yapılmış olan çalışmalar ile karşılaştırılıdığında bu enzimin genel olarak 40-65 ˚C ve pH 6.0-8.0 aralığında optimum olarak çalıştığı tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmanın da bu değerler aralığında olduğunu göstermektedir(Choi ve ark.(1995), Chakraborti ve ark. (2000), Gül-Güven (2007)).

Choi ve ark. (1995) alkolofilik ve termofilik *Bacillus* sp. TA–11'den β-galaktosidaz enzimini elde ederek karaktrizasyon çalışmasını yapmışlardır. Enzimin optimum pH'sının 6.0, sıcaklığının ise 40^{o}C olduğunu tespit etmişlerdir. Chakraborti ve ark. (2000) *Bacillus sp*. MTCC 3088'den β-galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin 60^{o}C sıcaklıkta ve pH 8.0 de aktivite gösterdiği bulmuşlardır. Chakraborti ve ark. (2003) Hindistan'daki Manikaran'dan elde edilen termofilik *Bacillus polymxia'*nın β-galaktosidaz enzimi üzerinde yaptıkları araştırmada bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 60^{o}C ve 7.0 olarak tespit etmişlerdir.

Gül-Güven (2007) *A. acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* bakterisinden β-galaktosidaz enzimini saflaştırarak karakterizasyon çalışmalarını yapmıştır. Bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 65^{o}C ve 6.0 olarak tespit etmiştir.

Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus*'tan elde ettikleri termostabil β-galaktosidaz genini klonlayarak, *Bacillus subtilis* WB600'de ekspresyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH'yı ise sırasıyla 70^{o}C ve 7.0 olarak bulmuşlardır. Li ve ark.(2009) *Bacillus megaterium* 2–37–4–1'den elde ettikleri

β-galaktosidaz enzimini saflaştırılmış, enzime ait olan bgaBM geninin analizini ve ekspresyonunu çalışmışlardır. Bu enzim için en uygun sıcaklık ve pH aralığını sırasıyla 55^{o}C ve 7.5-8.0 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidazı için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yoluyla kısmi olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. *Bacillus subtilis* 4NK enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu saflaştırma sonucunda bu bakteri için saflaştırma katsayısı 2.8 ve verim % 85 olarak bulunmuştur. *Bacillus paralicheniformis* 5NK enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu saflaştırma sonucunda bu bakteri için saflaştırma katsayısı 2 ve verim % 76.8 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz β-galaktosidaz enzimleri üzerine gerçekleştirdiğimiz faklı sıcaklıklarda ve zamanlarda enzimin termal stabilite ölçümleri, *Bacillus subtilis* 4NK enziminin 40-50˚C arasında ve 30-120 dk. aralığında termal stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.). *Bacillus paralicheniformis* 5NK enziminin 45 ve 50˚C sıcaklıklarda tüm zaman aralığında termal stabilitesini koruduğu, ama 55˚C ise bu stabiliteyi kısmen koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil4.6). Bu enzim üzerinde yapılan termal sıcaklık deneyleri önceden yapılmış olan deneylerle paralellik gösterdiği enzimin uzun süre sıcaklığa maruz kalması sonucu yapısının bozulduğu bulunmuştur. Ama bazı durumlarda yüksek sıcaklıklarda bile enzimin aktivitesini koruduğu belirtilmektedir (Cowan ve ark. (1984)). Çalışmamızdaki 4NK bakteri enziminin de sıcaklığa bağlı olarak uzun süre aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir.

Chakraborti ve ark. (2003) Hindistan'daki Manikaran'dan elde edilen termofilik *Bacillus polymxia* 'nın β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda bu enzimin termal stabilitesini 50˚C de koruduğunu ancak daha yüksek sıcaklıklarda termal stabilitesini koruyamadığı bulunmuştur. Levin ve ark. (1981) *Bacillus coagulans* L4' ün β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda, bu enzimin 55˚C'de 30. dakikada enzim aktivitesini %70 oranında kaybettiğini bulmuşlardır.

Cowan ve ark. (1984) ekstrem bir termofilik olan *Thermus* 4-1A'nın nın β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda, bu enzimin 90˚C'de oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda kısmen saflaştırdığımız β-galaktosidaz enzimleri üzerine gerçekleştirdiğimiz bazı kimyasaların her iki bakteri türünün enzimleri üzerine etkisi incelenmiştir. *Bacillus subtilis* 4NK bakterisi için bu kimyasallardan DTT, PMSF ve NEM'in düşük oranda inhibisyona yol açtığı, iodoasetamid' in ise enzim üzerine ciddi etkisi olmadığı ancak 4-kloro mercurie benzoik asidin (PCMB) ise çok yüksek oranda inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Bu bilgiler göz önüne alındığında PCMB'in enzimin aktif bölgesinde yer alan sülfidril grubunu bloke ettiğini düşündürmektedir (Çizelge 4.1.). Bu enzimin genel olarak çalışıldığı çalışmalarda PCMB'nin enzimin aktivitesini bozduğu tespit edilmiş ve yaptığımız çalışma ile de paralel olduğu tespit edilmiştir (Gül-Güven ve ark. (2011)).

Çalışmamızda ayrıca *Bacillus paralicheniformis* 5NK β-galaktosidaz enzimi üzerine bazı kimyasaların etkisi incelenmiştir. Bu kimyasallardan iodoasetamid ve PCMB nin yüksek oranda inhibisyona neden olduğu, PMSF'nin 10 mM da yüksek düzeyde inhibisyonuna neden olduğu ve NEM'in ise 5 ve 10 mM' da kısmı inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, DTT'nin enzim üzerine önemli oranda etkisi olmamıştır. Iodoasetamid ve PCMB'nin enzimde yol açtığı inhibisyondan dolayı enzim aktif merkezinde sülfidril gruplarının bulunabileceğini göstermektedir. PMSF 10 mM konsantrasyonunda yüksek oranda inhibisyona neden olduğu için, enzim aktivitesinde serin aminoasidinin rol aldığı söylenebilir(Çizelge 4.2.).

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* 4NK enzimi için yapılan incelemeler sonucunda düşük konsantrasyonlarda $CoCl_2$ ve $MnCl_2$ (1 ve 2.5 mM) yüksek oranlarda enzimi aktive ettiği bulunmuştur. $CuCl_2$ ve $CdCl_2$ yüksek konsantrasyonlarda (10 ve 20 mM) inhibisyona neden olmuştur. EDTA'nın ise tüm konsantrasyonlarda enzimi aktive ettiği görülmüştür(Çizelge 4.3.). Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında bu enzim için genel olarak $CuCl_2$ enzimi inhibe ettiği çalışmamızla paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında $CaCl_2$ enzimi inhibe ederken 4NK bakteri enzimi için çalışılan konsantrasyonlarda enzimi aktive ettiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *Bacillus paralicheniformis* 5NK için yapılan incelemeler sonucunda birçok konsantrasyonda $CuCl_2$ ve $CdCl_2$'ün yüksek oranlarda enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. EDTA'nın ise enzim aktivasyonunda ciddi anlamda etki etmediği görülmüştür. Bundan dolayı bu enzimin metalo enzim olmadığı söylenebilir(Çizelge 4.4.). Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında bu enzim için genel olarak $CuCl_2$ 'ün, enzimi inhibe ettiği çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Gül-Güven ve ark. (2011) *A. Acidocaldarius* Subsp. *Rittmannii* bakterisinin β-galaktosidaz enzimi üzerine çeşitli inhibitörlerin etkileriniincelemişlerdir. Çalışmalarında EDTA'nın enzim aktivitesini etkilemediğini bu yüzden metalo enzim olmadığını belirtmişlerdir. PCMB'nin ise enzimi çok yüksek oranda inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu yüzden enzim aktif bölgesinde en az bir tane sistein olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Somkuti ve ark. (1979) *Streptococcus thermophilus'*dan β-galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterize etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerinde DTT ve PCMB gibi kimyasalların etkilerini incelemişlerdir. DTT'nin enzimi aktive ettiğini, PCMB'nin ise inhibe ettiğini bulmuşlardır. Enzim üzerinde çalıştıkları metallerden Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin enzim inhibe ettiği, Ca^{+2}'un yüksek konsantrasyonlarda kısmen inhibisyona neden olduğu bulunmuştur.

Itoh ve ark. (1993) *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1'deki β-galaktosidaz enzim karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzim üzerine β-merkaptoetanol'ün aktivasyona yol açtığı ama iodoasetamide' in ise enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. Enzim üzerinde metallerin incelenmesi sonucunda $MgCl_2$'ün enzime etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus*'tan elde ettikleri termostabil β-galaktosidaz *bga*B genini klonlayarak *Bacillus subtilis* WB600'de ekspresyonu gerçekleştirilmişlerdir. Eksprese ettikleri bu rekombinant enzim üzerinde DTT, PCMB, iodoasetamid ve β-merkaptoetanol'ün etkisini incelemişlerdir. DTT ve β-merkaptoetanol'ün enzim aktivitesini etkilemediği ancak PCMB ve iodoasetamid'in enzim aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Khalid ve ark. (1991) Psikotropik *Bacillus subtilis* KL88'e ait olan β-galaktosidaz enzimi üzerine çalışma yaparak, enzimin Cu^{+2}, Zn^{+2} gibi metaller tarafından inhibe edildiğini bulmuşlardır. Ca^{+2}'un yüksek konsantrasyonlarında enzimi inhibe ettiği tespit etmişlerdir.

Choi ve ark. (1995) termofilik *Bacillus* sp. TA–11'den β-galaktosidaz enzimini elde ederek karakterizasyon çalışmasını yapmışlardır. Enzim aktivitesini Zn^{+2} ve EDTA'nın yüksek oranda inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Işık-Ustok ve ark. (2010) *Streptococcus thermophilus* 95/2(St 95/2) ve *Lactobacillus delbueckii spp bulgaricus* 77(Lb 77) dan sentezlenen β-galaktosidaz üzerinde çalışma yapmışlardır. Bu enzim üzerine denedikleri metallerden Mg^{+2}'un iki enzim için de aktive edici olduğunu, fakat Ca^{+2}, Fe^{+2} ve Zn^{+2}'nin ise enzimi inhibe ettiği bulmuşlardır.

Çalışmamızda enzimin substratına olan ilgisini ve hızını değerlendirmek için K_m ve V_{max} değerlerini bulmak için farklı *o*NPG konsantrasyonları kullanılmıştır. K_m ve V_{max} değerleri 4NK ve 5NK için sırasıyla; 23.80mM, 1.978 abs/dk. ve 5.61 mM, 1.869 abs/dk olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında 4NK bakterisi enziminin K_m değerinin yüksek olmasından dolayı substrata olan ilgisinin az olduğu, fakat 5NK bakteri enziminin substrata olan ilgisinin fazla olduğu tespit edilmiştir.

Chakarboti ve ark. (2000) β-galaktosidazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 6.34 mM ve 9351IU ml^{-1} olduğunu bulmuşlardır.

Chen ve ark.(2008) *Bacillus stearothermophilus*'tan elde ettikleri rekombinant termostabil β-galaktosidazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2.96 mM ve 6.62µmol olarak bulmuşlardır.

Levin ve ark. (1981) *Bacillus coagulans* L4'ün β-galaktosidaz enzimi üzerindeki araştırmaları sonucunda bu enzim için K_m değeri 4.2-5.6 mM olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda %1 laktozlu ve laktozsuz besiyerleri kullanılarak 6-48 saat aralığında kültüre alınan *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterileri laktozlu ve laktozsuz ortamın bakteri çoğalması ve enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. 4NK bakterisinde laktozlu ortamda 24.saatten sonra bakteri

çoğalmasında artma gözlenmiştir. Fakat 5NK'da laktozlu ortamda bakteri çoğalması laktozsuz ortama göre değişiklik göstermemiştir. Her iki bakteri için de laktozlu ortam enzim üretimini arttırdığı bulunmuştur. Bu da laktozun her iki bakteri enzimi için indükleyici özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Gül-Güven (2007) *A. acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* bakterisinden β-galaktosidaz enzimini saflaştırmış, karakterizasyon çalışmalarını yapmıştır. Bu enzim için %1 laktozlu ve laktozsuz besiyerleri kullanılarak enzim üzerindeki etkinin 24. saatte %1 laktozlu ortamda en yüksek β-galaktosidaz enzim aktivitesine sahip olduğunu bulmuştur. Laktozsuz ortam için ise bu etkinin 40. saate kadar arttığını bulmuştur.

Chakraborti ve ark.(2000) *Bacillus sp*. MTCC 3088'den β-galaktosidaz enzimini saflaştırıp, karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu enzim için en elverişli üretim saatinin 16. saat olduğunu bulmuşlardır. Hirata ve ark. (1985) *Bacillus stearothermophilus*'a ait olan β-galaktosidaz genini *Bacillus subtilis'*e klonlamışlardır. Bu rekombinant enzim laktozlu ortamda çoğaltılıp enzim aktivitesi incelendiğinde, laktozun bu enzim için indükleyici özelliği sahip olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız *Anoxybacillus ayderensis* FMB1, *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK bakterilerinin β-galaktozidaz geninin PCR ürünleri yaklaşık olarak 2.4 kb değerinde olduğu bulunmuştur(Şekil 4.13). Çalışmamızda bulduğumuz bu PCR ürünlerinin boyutları, diğer *Bacillus* cinsleriyle karşılaştırıldığında gen boyutlarının yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir.

Torres ve Lee (1995) *Bacillus subtilis* KL88'den elde edilmş olan β-galaktozidaz genini *Escherichia coli*' ye aktararak klonlanmışlar ve bu gen ürününü süt endüstrisindeki potansiyel kullanımı için karakterize edilmiştir. *Escherichia coli*' ye aktarılan genin 2.3 kb olduğunu belirtmişlerdir.

Yuan ve ark. (2008) *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009'dan β-galaktozidaz geninin klonlamasını yaparak ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. β-galaktozidazı kodlayan genin 2067 bç olduğunu belirtmişlerdir.

Juajun ve ark. (2010) *Bacillus licheniformis*' den elde edilen β-galaktozidaz geni *Escherichia coli*' ye aktarılarak klonlanmış, saflaştırılmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu genin 2055 bç olduğu ifade edilmiştir.

Nguyen ve ark. (2007) *Lactobacillus reuteri*'den β-galaktozidaz genlerinin *Escherichia coli*' ye aktarılmasını ve ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Birbirleriyle çakışan *lacL ve lacM* genlerinin boyutlarını sırasıyla 1887 bç ve 960 bç olarak belirtmişlerdir.

Phan Tran ve ark. (1998) *Bacillus licheniformis*' den elde edilen intrasellüler β-galaktozidaz geni *Escherichia coli*' ye aktarılarak klonlanmış, saflaştırılmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmalarında buldukları LacBl genin boyutunun yaklaşık olarak 2.1 kb olduğunu belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile birlikte ileriki aşamalarda PCR ile amplifiye edilen genlerin uygun vektörler aracılığı ile *E. coli*'de klonlama işleminden sonra saflaştırılıp ileri derecede karakterize edilmesi söz konusu olabilecektir. Ayrıca, sekans analizi yardımıyla enzim yapısı ve diğer benzer enzimlerle olan yakınlık ilişkisi de incelenebilecektir.

6. KAYNAKLAR

Acharya, T. 2015. ONPG Test(for β-galactosidase): Prenciple, procedure and results. Erişim [https://microbeonline.com/onpg-test-%CE%B2-galactosidase-principle-procedure-results/]. Erişim Tarihi 21.06.207

Alagöz, D. 2007. *β*-Galaktosidaz ve glukoz izomerazın eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin laktoz hidrolizi ve glukoz izomerizasyonunda kullanılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 72.

Arıkan, B. 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. ***Bioresource Technology***, 99: 3071-3076.

Atasoy Ulusoy, Ö.İ., Görgül G. 2006. Polimeraz zincir reaksiyonu (pcr) ve endodontik mikrobiyoloji. ***Atatürk Üniv. Dis Hek. Fak. Derg.,*** 16(2):61-65.

Ayhan, K. 2000. *Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını,* 43- 44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.

Chakraborti, S., Sani, R.K,, Banerjee, U.C., Sobti, R.C. 2000. Purification and characterization of a novel *β* -galactosidase from *Bacillus sp*. MTCC 3088. ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, 24: 58-63.

Chakraborti, S., Sani, R. K., Banerjee, U.C., Sobti, R.C. 2003. Production and partial characterization of a novel β-galactosidase from a newly isolated *Bacillus polymxia.* ***Scienctia Iranica,*** 10(3):279–286.

Chen, K.C., Lee, T.C., Houng, J.Y**.,** 1992, Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragillis. Enzyme and Microbial Technology*, 14: 659-64.

Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao J., Tian, F and Zhang, H. 2008. *Production, Purification, and Characterization of a Potential Thermostable Galactosidase for Milk Lactose Hydrolysis from Bacillus stearothermophilus,* ***J. Dairy Sci****,* 91,1751–1758.

Choi, Y.J., Kim, I.H., Lee, B.H., Lee, J.S. 1995. *Purification and characterization of Beta-Galactosidase from Alkalophilic and Thermophilic Bacillus sp. TA–1, Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol.22, No.2, pp. 191 -201.

Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., 2002. Production and properties of α-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. ***Brazilian Journal of Microbiology***. 33: 57-61.

Cowan, D. A., Daniel, R. M., Martin, A. M., Morgan, H. W. 1984.*Some properties of a β-galactosidase from an extremely thermophilic bacterium, Biotechnology and Bioengineering*., Vol. XXVI, Pp. 1141–1 145.

Çelik, N. 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflastırılan alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu+2 iyonları ile termostabilizasyonu. Yüksek lisans tezi. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli. 92.

Dağbağlı, S., 2009. Beta-galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonu ve saflastırılması. Doktora tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.192.

D'Auria, S., Nucci, R., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., & Lakowicz, J. R. (1999). The β-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 C. *Biophysical chemistry*, *81*(1), 23-31.

Di Laura, B., Strazzulli, A., Perugino, G., La Cara, F., Bedini, E., Corsaro, M. M., Rossi, M., Moracci, M. 2008. Isolation and characterization of a new family 42 β-galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius:* identification of the active site residues. ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1784: 292-301.

Domingues, L., Lima, N., Teixeira, J.A., 2005, *Aspergillus niger β* - galactosidase production by yeast in a continous high cell density reactor, *Process Biochemistry*, 40:1151-1154.

Drobnıewski, F.A. 1993. *Bacillus cereus and Related Species, Clinical Microbiology Reviews,* oct. ,p. 324–338.

Dunlap, C. A., Kwon, S. W., Rooney, A. P., & Kim, S. J. 2015. Bacillus paralicheniformis sp. nov., isolated from fermented soybean paste. ***International journal of systematic and evolutionary microbiology***, *65*(10), 3487-3492.

Ekinci, S.M., Akyol İ., Karaman, M., Özköse, E. 2005. *Hayvansal Biyoteknoloji Uygulamalarında Güncel Gelişmeler*, ***KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi***, 8(2).

Er, B., Sarıahmetoğlu, 2009. B. *Süt endüstrisinde mikrobiyel enzim kullanımı, Vet Hekim Der Derg*. 80(1): 25 -30.

Ercan-Akkaya, S. 2005. Sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu. Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskisehir. 152.

Furlan, S.A., Schenier, A.L.S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M.F., Jonas, R., 2000, Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of ß-D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, 22: 589-593.

Gavrilescu, M., Chisti, 2005. Y. *Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry*, *Biotechnology Advances,* 23, 471–499

Göğüş, F. and Fadıloğlu, S., 2006, Food Chemistry, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 344s

Grosova, Z., Rosenberg, M., Rebros, M. 2008. Perspectives and applications of immobilized β-galactosidase in food industry: a review. ***Czech Journal of Food Science,*** 26: 1–14.

Gül Güven, R., 2007. sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* Subsp. *Rittmanii*'nin β-galaktosidaz enziminin saflastırılması, Doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. 198.

Gül Güven, R. 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. ***Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR***, 9(1): 1-10.

Hidaka, M., Fushinobu, S., Ohtsu, N., Motoshima, H., Matsuzawa, H., Shoun, H., Wakagi. T. 2002. *Trimeric Crystal Structure of the Glycoside Hydrolase Family 42 β-Galactosidase from*

*Thermus thermophilus A4 and the Structure of its Complex with Galactose, **J. Mol. B.,*** 322, 79–91.

Hirata, H., Negoro, S. and Okada, H. 1985. *High Production of Thermostable β-Galactosidase of Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis, Appl. Environ.Microbiol. ,* pp.1547 -1549.

Itoh, K., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S. 1993. *Properties of β-galactosidase of Lactobacillus kefiranofaciens K–1 isolated from kefir grains, Letters in Applied Microbiology,* 15,232–234.

Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F., Matthews, B.W., 1994, Threedimensional structure of *β* -galactosidase from *E. coli*, Nature, 369: 761–766.

Juajun, O., Nguyen, T., Maischberger, T., Iqbal, S., Haltrich, D., Yamabhai, M., 2010. Cloning, purification, and characterization of β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13, ***Applied Microbiology and Biotechnology***, DOI 10.1007/s00253-010-2862-2.

Kara, F. 2004. Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. Yüksek tisans tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 122.

Karademir, R.G.. 2007. *Biyoteknoloji, Türkiye Kalkınma Bankası A.Ş. Teknoloji İzleme ve Araştırma Müdürlüğü* , Ankara. TR15, syf. 1.

Khalid, A.A.R. and Byong, H.L. 1991., *Specificity, Inhibitory Studies, and Oligosaccharide Formation by P-Galactosidase from Psychrotrophic Bacillus subtilis KL88, J Dairy Sci**,*** 74: 1773 -1778.

Kıran E.Ö., Çömlekçioğlu U. 2003. Zeytin Ilıcası (Kahramanmaras)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp*. Suslarının Đzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. ***KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi***, 6(2):41-48.

Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. ***KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi***, 9(1):12-19.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. ***Current Opinion in Biotechnology***, 13:345–351.

Lee, M.F., Krasinski, S.D. 1998. Human adult-onset lactase decline: an update. ***Nutrition Reviews***., 56: 1-8.

Levin, R. E., Mahoney, R. R. 1981.*Purification and characterization of β- galactosidase from a strain of Bacillus coagulans, Antonie van Leeuwenhoek,* 47(1), 53 -64.

Li, Y., Wang, H., Lu, L., Li, Z., Xu, X., Xiao, M. 2009. *Purification and Characterization of a Novel β-Galactosidase with Transglycosylation Activity from Bacillus megaterium 2–37–4–1,* ***Appl Biochem Biotechnol****,* 158:192–199**.**

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. ***J biol Chem***, *193*(1), 265-275.

Matpan Bekler, F., 2012. Termofilik *bacillus licheniformis* KG9'a ait β-galaktosidaz geninin *escherichia coli*'ye aktarılması ve enzimin karakterizasyonu, Doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Diyarbakır.25.

Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. 2001. Polyphasic taxonomic study of thermophilic *Bacilli* from Shallow, marine vents system. ***Applied Microbiology***. 24: 572–587.

Nguyen, T-H., Splechtna, B., Yamabhai, M., Haltrich, D., Peterbauer, C. 2007. Cloning and expression of the β-galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. ***Journal of Biotechnology***, In Pres.,

Nogales, J.M.R., Lopez, A.D. 2006. A novel approach to develop β-galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. ***International Dairy Journal,*** 16:354-360.

Ornelas, A.P., Silveira, W.B., Sampaio, F.C., Passos, F.M.L.**,** 2008, The activity of *β* - galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate, *Journal of Applied Microbiology*, 104:1008-1013.

Özcan, B.D., Özcan, N. 2001. *Bacillus subtilis* RSKK243'e ait bifonksiyonel ksilanaz geninin *E. Coli* ve *B. subtilis*'te klonlanması ve enzim karakterizasyonu. ***Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi***, 25: 881-885.

Özdemir, S. 2004. *Musa textilis Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermantasyon Tekniği ile* (SSF) *Bacillus sp'de α- Amilaz Üretilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dicle üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 1s,

Öztürk S. 2007. Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den elde edilen alkalen proteaz enzimimin saflastırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.76.

Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H. 2006. Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase. ***Journal of Chemical Technology & Biotechnology,*** 81: 530-543.

Phan Trân, L.S.P., Szabo, L., Fülüp, L., Orosz, L., Sık, T., Holczinger A., 1998. Isolation of β-galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: Purification and characterization of the recombinant enzyme expresed in *Echerichia coli*. ***Current Microbiology,*** 37: 39-43.

Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., ... & Laurinavichius, K. 2000. Anoxybacillus pushchinensis gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of Anoxybacillus flavitherms comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(6), 2109-2117.

Pikuta, E., Cleland, D., & Tang, J. 2003. Aerobic growth of Anoxybacillus pushchinoensis K1T: emended descriptions of A. pushchinoensis and the genus Anoxybacillus. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(5), 1561-1562.

Pinheiro, R., Belo, I., Mota, M., 2003, Growth and beta-galactosidase activity of *Kluyveromyces marxsianus* under increased air pressure, *Letters in Applied Microbiology*, 37: 438-422.

Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson Shari, B.A., Brody-Karpin, D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P. B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. ***Genome Biology,*** 5(10): Article R77.

Sabato, D., Nucci, R., Rossi, M., Gorczynski, I., Gorczynski , Z. And Lakowicz, 1999**.** J. *The β-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. Biophys. Chem*., 81: 23–31.

Sani, R.K., Chakraborti, S., Sobti, R.C., Patnaik, P.R., Banerjee, U.C. 1999. Chracterization and some reaction–engineering aspects of thermostable extracellular *β* -galactosidase from a new *Bacillus* species. ***Folia Microbiologica,*** 44 (4): 367-371.

Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. ***Canadian Journal of Microbiology***, 50: 1-17.

Sezgintürk, M.K., 2007, *β* -galaktosidaz aktivitesinin belirlenmesinde biyosensör temelli ölçüm sistemlerinin geli_tirilmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Bornova, İzmir, 265s.

Somkuti, G. A., Steinberg, D. H. 1979. *Beta-D- Galactoside galactohydrolase of Streptococcus thermophilus: induction, purification, and properties, J. Appl. Biochem.,* 1,357-368.

Song, C., Guang-Lei, L., Jin-Li, Xu., Zhen-Ming, C. 2010, *Purification and characterization of extracellular β-galactosidase from the psychrotolerant yeast Guehomyces pullulans 17–1 isolated from sea sediment in Antarctica, Process Biochemistry*, doi: 10,1016./j.procbio.2010.02.025

Şener, A., Ünal, M.Ü. 2006. *Enzim Stabilizasyonu, Türkiye 9. Gıda Kongresi* 24- 26 Mayıs, Bolu.

Telefoncu, A. , Enzimoloji, Yüksek Lisans Yazokulu, 1997**,** 21–27 Eylül. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446s.

Topal, Ş. 1988. *Mikrobiyal Enzimler ve Biyoteknolojik Yolla Rennin Üretimindeki Gelişmeler, Gıda Dergisi*, 13 (3), 183 -190.

Torres, M.J., Lee, B.H. 1997. Cloning and expression of β-galactosidase from psychotrophic *Bacillus subtilis KL88* into *Escherichia coli*. ***Biotechnology Letters***, 17(2):123-128.

Uhlig, H. 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications***,** Wiley, New York.

Ussery, D. Control of Gene Expression in Bacteria. Erişim [http://www.cbs.dtu.dk/courses/genomics_course/roanoke/genetics980330f.html]. Erişim Tarihi 21.06.2017

Ustok-Isık, F., Tari, C., Harsa, S. 2010. Biochemical and thermal properties of b-galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. ***Food Chemistry***, 119: 1114-1120.

Uyanık, A. 2008. Beta-galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.72.

Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM 13, an organism with great industrial potential. ***Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology***, 7:204-211.

Vierstraete, A. 1999. Principle of the PCR. Erisim:[http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html]. Erisim Tarihi: 05.04.2017

Yılmaz, S., Devran Z. 2003. Polimeraz zincir reaksiyonu (pzr) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. ***Derim***, 20:31-42.

Yuan, T., Yang, P., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y., Yao, B. 2008. Heterologous expression of a gene encoding a thermostable β-galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. ***Biotechnology Letters,*** 30: 343-348.

Wiseman, A. 1987. *The application of enzymes in undustry, Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition,* Chapter 3. P. 274-373

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Şaban TUNÇ

Doğum Yeri ve Yılı: Hazro - 05.03.1990

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Van Atatürk Anadolu Lisesi, 2005–2009

Lisans: İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik, 2011-2015

Yüksek Lisans: Dicle Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2015 – Devam

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Şaban TUNÇ
ÖĞRENCİ NO	15801011
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2016-2017
YARIYIL	☐ Güz☒Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Bazı Basil Türlerinin β-Galaktosidaz Gen ve Enzimi Üzerine Çalışmalar
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma SınavıSonrası
SAYFA SAYISI	52
BENZERLİK ORANI	% 8
RAPORLAMA TARİHİ	26/07/2017

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 52 sayfalık kısmına ilişkin, 26/07/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

☒ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)

Şaban TUNÇ

(İmza) 26/07/2017 Prof.Dr. Kemal GÜVEN **Tez Danışmanı**	(İmza) 26/07/2017 Prof.Dr. Yüksel COŞKUN (V.) **Anabilim Dalı Başkanı**