T.C

DİCLE ÜNİVERİSTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇERMİK KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK *GEOBACİLLUS VULCANİ* 2Çx'te BETA-GALAKTOSİDAZ ENZİM KARAKTERİZASYONU

Nazlı POLAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Temmuz-2021

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Nazlı POLAT tarafından yapılan "Çermik Kaplıcalarından İzole Edilen Termofilik *Geobacillus vulcani* 2Çx'te Beta-Galaktosidaz Enzim Karakterizasyonu" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Fatma MATPAN BEKLER

Üye : Dr. Ögr. Üyesi Ömer ACER

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 09/07/21

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../21

Prof. Dr Neslihan DALKILIÇ

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Hayatımın her evresinde bana destek olan, beni yetiştiren, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve sonsuz sevgi ve saygıyla beni destekleyip yanımda olan canım annem, babam ve kardeşlerime sonsuz ve en içten şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilginin yanı sıra anlayışını, sabrını, tez çalışmasının her aşamasında destek ve hiçbir yardımını esirgemeyen ve Dicle Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü danışman hocam sayın Prof. Dr. Kemal GÜVEN'e emekleri ve yol göstericiliğinden dolayı teşşekürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar teknik ve pratik tavsiyeleriyle bana yardımları dokunan ve çalışmamda kullanmam için izole ettiği *Geobacillus vulcani* 2Çx suşunu temin ettiğim sevgili hocam Doç. Dr. Fatma MATPAN BEKLER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım da yardımlarını eksik etmeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Yüksek lisans arkadaşım Firdevs Rozan TUŞAR'a teşekkür ederim.

Nazlı POLAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR ..... **I**

İÇİNDEKİLER ..... **II**

ÖZET ..... **V**

ABSTRACT ..... **VI**

ÇİZELGE LİSTESİ ..... **VII**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **VIIIX**

KISALTMA VE SİMGELER ..... **IX**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**

2.1. Biyoteknoloji 3

2.2. Enzim ve Enzim Teknolojisi 4

2.3. β-Galaktosidaz 7

2.3.1. β-Galaktosidaz'ın Kullanım Alanları 9

2.3.2. β-Galaktosidaz Üreten Kaynaklar 10

2.3.3. Mikrobiyal β-Galaktosidaz 10

2.3.3.1. Termofilik Mikrobiyal β-Galaktosidaz 11

2.4. Termofilik Bakteriler 12

2.4.1. *Geobacillus* ve *Geobacillus vulcani* 13

2.5. β-Galaktosidaz İle İlgili Önceki Çalışmalar 15

3. MATERYAL VE METOT **21**

3.1. Kullanılan Kimyasallar 21

3.2. Kullanılan Aletler 21

3.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma 22

3.4. Metot 22

3.4.1. Bakterinin Kültüre Alınması 22

3.4.2. β-Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti 22

3.4.2.1.β-Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi 23

3.4.3. Farklı Laktoz Konsantrasyonların Enzim Üretimi Üzerine Etkisi 24

3.4.4. Farklı Zaman Aralıklarında Laktozlu ve Laktozsuz Koşullarda Enzim Üretiminin Araştırılması 24

3.4.5. Enzimin Saflaştırılması 25

3.4.5.1.Bakterinin Kültüre Alınması ve Enzim Eldesi 25

3.4.5.2.Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz 25

3.4.5.3.Jel Filtrasyon 26

3.4.6. Enzim Karakterizasyonu 27

3.4.6.1.Optimum Sıcaklık Tayini 27

3.4.6.2.Optimum pH Tayini 27

3.4.6.3.Termal Stabilitenin Belirlenmesi 27

3.4.6.4.pH stabilitenin Belirlenmesi 27

3.4.6.5.Elektroforez 28

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 31

4.1. Bakteri Büyüme Ortamı 31

4.2. β-Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti 31

4.3. Laktozlu ve Laktozsuz Ortamda Zamana Bağlı Bakteri Çoğalması 33

4.3.1. Bakteri Üretimi Üzerine Laktoz Etkisi 33

4.3.2. Ekstraselüler ve İntraselüler β-galaktosidaz Üretimine Laktoz Etkisi 34

4.4. Enzimin Saflaştırılması 36

-Jel Filtrasyon 37

4.5. Sıcaklığın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 38

4.6. pH'ın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 39

4.7. Termal Stabilitenin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 40

4.8. pH Stabilitenin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 41

4.9. Elektroforez 41

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 45

6. KAYNAKLAR 51

ÖZGEÇMİŞ 61

ÖZET

ÇERMİK KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK *GEOBACİLLUS VULCANİ* 2Çx'te BETA-GALAKTOSİDAZ ENZİM KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazlı POLAT

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

2021

Bu çalışmada Diyarbakır ili Çermik sıcak su kaynağından izole edilen *Geobacillus vulcani* 2Çx suşunun β-galaktosidazı bol miktarlarda üretmesi ve enzimin termostabil olması sebebiyle saflaştırma amaçlanmıştır. Bunun için, farklı besin ortamlarında intrasellüler ve ekstrasellüler enzim üretimi araştırılmıştır. Ekstraselüler β-galaktosidaz elde etmek için çöktürme ve jel filtrasyon gibi çeşitli saflaştırma adımları uygulanmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan β-galaktosidazın saflaştırma kat sayısı 206.6, verim % 4.17 ve spesifik aktivite 8651,4 U/mg bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS PAGE ile ~104 kDa olarak belirlenmiştir. Kısmı saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığı 55 ºC olarak belirlenmiş ve 55 ºC'de ilk bir saate kadar %73.93 oranında stabiliteyi koruduğu tespit edildi. Enzimin optimum pH'sı ve stabilitesinin 7.0 olduğu belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılan enzim biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir özelliktedir.

Anahtar kelimeler: β-Galaktosidaz, *Geobacillus vulcani* 2Çx, termofilik, saflaştırma, ekstrasellüler

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF BETA-GALACTOSIDASE ENZYME FROM THERMOPHILIC *GEOBACILLUS VULCANI* 2Çx IN ÇERMİK HOT SPRING

MASTER THESIS

Nazlı POLAT

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

2021

In this study, it was aimed to purify the *Geobacillus vulcani* 2Çx strain isolated from the Çermik hot water spring in Diyarbakır province, since it produces β-galactosidase in large quantities and the enzyme is thermostable. For this, intracellular and extracellular enzyme production was investigated in different nutrient media. Various purification steps such as precipitation and gel filtration were applied to obtain extracellular β-galactosidase. Partially purified β-galactosidase had a purification coefficient of 206.6, a yield of 4.17% and a specific activity of 8651.4 U/mg. The molecular weight of the purified enzyme was determined as ~104 kDa by SDS PAGE. The optimum temperature of the partially purified enzyme was determined as 55 ºC and it was determined that it maintained its stability at a rate of 73.93% until the first hour at 55 ºC. It was determined that the optimum pH and pH stability of the enzyme was 7.0. Partially purified enzyme can be used in biotechnological applications.

Key words Extracellular β-galactosidase, *Geobacillus vulcani* 2Çx, thermophilic, purification

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Enzim teknolojisinin farklı endüstrilerde kullanım alanları	6
Çizelge 2.2.	β-galaktosidaz'ın üç enzimatik aktivite reaksiyon basamakları	9
Çizelge 2.3.	β-galaktosidaz enziminin kullanım alanları ve bu alanda yararlanan endüstriler	10
Çizelge 2.4.	β-galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar	11
Çizelge 2.5.	*Geobacillus*'un türleri	14
Çizelge 4.1.	*G.vulcani* 2Çx'e ait β-galaktosidaz saflaştırma adımları	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	Laktozun β-galaktosidaz ile hidrolizi	7
Şekil 2.2.	Kriyo-elektron mikroskopisi ile türetilen β-galaktosidaz tetramer için atom modeli	8
Şekil 3.1.	β-Galaktosidazın saflaştırma aşamaları	26
Şekil 4.1.	*G. vulcani* 2Çx suşu katı ve sıvı kültürü	31
Şekil 4.2.	β-Galaktosidaz enziminin varlığının tespiti	32
Şekil 4.3.	Lowry için BSA standart grafiği	33
Şekil 4.4.	Laktozun bakteri üretimine etkisi	34
Şekil 4.5.	Laktozun zamana bağlı enzim üretimine etkisi	34
Şekil 4.6.	Laktozun zamana bağlı ekstraselüler β-galaktosidaz enzimi üzerine etkisi	35
Şekil 4.7.	Laktozun zamana bağlı intraselüler β-galaktosidaz enzimi üzerine etkisi	36
Şekil 4.8.	Amonyum sülfat ile çöktürme işlemi	37
Şekil 4.9.	Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar	38
Şekil 4.10.	Kısmi saflaştırılan β-galaktosidaz üzerine sıcaklığın etkisi	39
Şekil 4.11.	Kısmi saflaştırılan β-galaktosidaz üzerine pH'nın etkisi	39
Şekil 4.12.	Sıcaklığın β-galaktosidaz'ın termal stabilitesine etkisi	40
Şekil 4.13.	Kısmi saflaştırılan β-galaktosidaz sıcaklık stabilitesi	40
Şekil 4.14.	Kısmi saflaştırılan β-galaktosidaz pH stabilitesi	41
Şekil 4.15.	Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıkları	42
Şekil 4.16.	Non-denatüre ve denatüre SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını tespit etme	43

KISALTMA VE SİMGELER

APS	:Amonyum persülfat
β	:Beta
BFB	: Brom-fenol-blue
BNG	: 6-Bromo-2 naftil- β-D-galaktopiranosid
BSA	: Bovin serum albümin
$CaCl_2$	: Kalsiyum klorür
ºC	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
$CuSO_4$	: Bakır sülfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EM	: Elektron mikroskobu
FCR	: Folin reaktifi (Folin–Ciocalteu reagent)
g/L	: Gram/litre
Gly	: Glisin
HCl	: Hidroklorik asit
H2O	: Su
IPTG	: İzopropil β-D-1-thio-galaktopiranosid
KH_2PO_4	: potasyum fosfat
L	: Litre
M	: Molarite
mA	: Miliamper
mb	: Megabaz
mg	: Miligram
mg/mL	: Miligram/mililitre
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
mL/dk	: Mililitre/dakika
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram

ng/µL	: Nonogram/mikrolitre
Nm	: Nanometre
Na_2HPO_4	: Sodyum fosfat
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
NaCl	: Sodyum klorür
*o*NP	: *ortho*-Nitrofenil
*o*NPG	: *ortho*-Nitrofenil-β-galaktosid
pH	: Hidrojenin gücü (Power of Hydrogene)
RNA	: Ribonükleikasit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Rotation per minute)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
sn	: Saniye
TEMED	: Tetrametiletilenediamine
U	: Ünite
U/ µL	: Ünite/mikrolitre
UV	: Ultra viyole
V	: Volt
v/v	: Hacim/Hacim (volume/volume)
w/v	: Ağırlık/Hacim(weight/volume)
µg	: Mikrogram
µg/mL	: Mikrogram/mililitre
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
%	: Yüzde
>	: Büyük
<	:Küçük

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, insan uygarlığının mayaları alkol yapmak için kullanmaya başladığı binlerce yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Biyoteknoloji kavramının ilk basamağı olarak gıda endüstrisinde başlanıp: ilaç geliştirmesinden, doğa ve sosyal bilimlere ve kirletici atıkların arıtılmasına kadar gelişmektedir.

Biyoteknoloji, yaşayan organizmaların ürettikleri maddelerin veya doğrudan bazı organizmaların, insanlığın faydası için genetik müdahalede bulunarak ürün geliştirmek veya manipüle etmek için kullanılmasıdır (Kayıhan 2018).

Biyoteknoloji uygulama alanları: DNA teknolojisi; rekombinant aşı yapımı, genetik hastalıklarda tanı ve tedavi, enzim teknolojisi, farklı canlılar arası gen transferi yolu ile transgenik hayvan ve bitki soyları elde edilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2017). Biyoteknolojinin günümüze kadar hala gelişmekte olmasının bir nedeni de yeni ürün elde etme isteğidir. Endüstride biyokatalizör olarak kullanılan enzimler; özgüllük, katalitik aktivite ve stabilite gibi özelliklere sahiptir. Bundan dolayı enzimi kodlayan gende genetik müdahale yapılarak; daha geniş ve stabil pH ve sıcaklık aralıklarında aktivite gösteren ve tepkime sonrasında yüksek verim elde eden, reaksiyon sonunda enzim kaybının önlenmesi ve enzimlerin endüstriye kazandırılması gibi yapılan modifikasyonlarla enzimin yapısı ve diğer özellikleri istenilen özellikler ile değiştirilebilir (Coşgunaras 2019).

Enzimler düşük maliyetlerinden dolayı çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır ve bu da biyoteknoloji çalışmalarında enzimleri önemli kılmaktadır. (Van Beilen ve ark. 2002). Biyoteknolojinin bir alt alanı olan enzim teknolojisinde gıda, kimyasallar, farmasötik gibi ihtiyaçları karşılamak için biyokatalizör olarak enzimler kullanarak hem daha çok hem de yüksek verimli ürünler üretmek için yeni süreçler geliştirilmektedir.

Enzimler 20. yüzyılda mikroorganizmalardan keşfedilmiş olsa da izolasyonu, karakterizasyonu, deneme ölçeğinde üretim ve biyo-endüstride uygulamaları ile ilgili çalışmalar sürekli ilerlemiş ve bu bilgiler düzenli olarak güncellenmiştir. Mikroorganizmalardan elde edilen birçok enzim yüksek katalitik aktiviteye sahip olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve yüksek miktarlarda elde edilmelerinden dolayı çeşitli ticari işlemlerde kullanılmaktadır (Nigam 2013**).**

β-Galaktosidaz laktozun galaktoz ve glukoza hidrolizini kataliz ederek glikoz ve galaktoz monomerlerini oluşturan biyokatalizördür. Hidroliz işleminde oluşan galaktoz ve glikoz laktozdan daha küçük olduğu için tatlılığı ve suda çözünürlüğü daha yüksektir. Bu özellik bu enzime ticari bir önem katmaktadır (Dağbağlı 2009).

Gıda endüstrilerinde sık kullanılan laktoza intoleranslı kişiler için laktozun galaktozile ürünlerin üretimi ve süt ürünlerinden uzaklaştırılması nedeniyle önem taşıyan β-galaktosidazlar, bakteriler, mantarlar, maya, sebzeler ve rekombinant kaynaklar gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir (Kılıç ve ark. 2014, Saqib ve ark. 2017).

Bu çalışmada, süt ve süt endüstrisi, endüstriyel üretim çalışmaları, süt ürünlerinden kaynaklı rahatsızlıkların giderilmesinde, probiyotik besin üretiminde biyoteknolojik uygulama sahasında aktif olarak kullanılan β-galaktosidaz enzimi konusunda araştırma amaçlanmıştır. Bu çalışmada, Çermik kaplıcasından izole edilen *Geobacillus vulcani* 2Çx suşundan β-galaktosidaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, insanların yaşam kalitesini iyileştirmek için biyolojiyi kullanan teknolojileri içermektedir. Geniş tanımıyla biyoteknoloji, ürünleri yapmak veya değiştirmek, bitkileri veya hayvanları iyileştirmek veya özel kullanım için mikroorganizmalar geliştirmek için canlı organizmaları veya organizmaların parçalarını kullanan teknolojileri ve teknolojik ürünleri içine almaktadır. Geleneksel biyoteknolojiden en gelişmiş modern biyoteknolojiye kadar uzanır.

Biyoteknoloji ayrı bir bilim değil; kimya mühendisliği, bilgi teknolojisi ve robotik gibi pratik disiplinlerle bağlantı kurarak üretken süreçlere dönüştürülen disiplinlerin (genetik, moleküler biyoloji, biyokimya, protein mühendisliği, embriyoloji ve hücre biyolojisi) bir karışımıdır (Akkaya 2012). Biyoteknolojinin önemli katkı sağladığı alanlardan bazıları, tarım, ilaç, hastalıkların tanı ve tedavisinde, protein-antikor çalışmaları, rekombinant aşı üretimi, ormancılık, balıkçılık, madencilik, enerji ve çevre, süt ürünleri, gıda işleme, hayvancılık, suç tespiti vb. biyoteknoloji çalışmaları temel olarak insan yaşam kalitesini iyileştirmeyi ve onu tehlikeli hastalıklardan korumayı amaçlamaktadır.

Biyoteknolojinin gelişmeleri üç farklı aşamaya ayrılmaktadır:

1) Geleneksel Biyoteknoloji: Doğal organizmaların (bakteri, maya, mantar) insanlar tarafından yiyecekleri veya diğer yararlı ürünleri yaratmak veya değiştirmek için kullanılmasıdır. Geleneksel biyoteknolojinin örnekleri, genellikle bira, şarap, sirke, ekmek, yoğurt üretiminde kullanılmıştır.

2) Klasik Dönem: Bu aşama 1800'den neredeyse yirminci yüzyılın ortalarına kadar sürdü (Verma ve ark. 2011). 1857'de Louis Pasteur tarafından, fermantasyonun mikroorganizmaların etkisinden kaynaklandığının keşfinden yararlanarak, protein, enzim, antibiyotik, organik asitler, karbonhidrat, alkol vb. maddelerin üretimine yol açtı (Zilinskas ve ark. 1993).

3)Modern Dönem: Modern biyoteknoloji, rekombinant DNA, fonksiyonel ve yapısal genomik, DNA teşhis probları ve diğer genetik modifikasyon yöntemleri gibi genetik editleme tekniklerinin kullanılmasını içermektedir.

Biyoteknoloji sektörünün dünya çapında ekonomisini artıran; teknolojik gelişmeler, birçok biyofarmasötik ve aşı, teşhis için yeni ve özel yollar, tarımsal ürünlerdeki üretkenliği ve kalite özelliklerinin tanıtılmasını, sürdürülebilir çevre uygulamaları, adli tıp uzmanlarına DNA parmak izi ve profilleme gibi muazzam ilerlemeler endüstriyel açıdan önemli ürünlerin üretimine yardımcı olmaktadır (Gupta ve ark. 2017).

Biyoteknoloji açısında önem arz eden dört sektörel alan bulunmaktadır;

- ☆ Tıbbi Biyoteknoloji
- ☆ Tarımsal Biyoteknoloji
- ☆ Endüstriyel Biyoteknoloji
- ☆ Çevresel Biyoteknoloji

2.2. Enzim ve Enzim Teknolojisi

Enzim kelimesi ilk olarak 1878 yılında Wilhelm Kühne tarafından kullanıldı. Enzimlerin tüm organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve hücrelerden izole edilebilen ve bu amaçla çok çeşitli ticari açıdan önemli reaksiyonlarda kullanılan biyolojik katalizörlerdir. Bu reaksiyonlar, tüm canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluşturur ve endüstriye zarif, verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümler gerçekleştirmesi için muazzam fırsatlar sağlar (Van Beilen ve ark. 2002, Akkaya 2012).

Enzimatik bir reaksiyonun aktivitesine etki eden faktörler bazıları şunlardır:

- ☆ Enzim konsantrasyonu
- ☆ pH
- ☆ Substrat konsantrasyonu
- ☆ Zaman
- ☆ Isı veya sıcaklık
- ☆ İyonların konsantrasyonu
- ☆ Işık ve diğer fiziksel faktörler

Enzimler, reaksiyon özgüllüğü ve substrat özgülüğü son derece özgün olmasından dolayı seçici katalizörlerdir. Aynı zamanda yüksek oranda katalitik aktivite göstermeleri, yüksek miktarlarda üretilebilmeleri ve ticari açıdan önemli prosedürleri yerine getirme gibi özelliklerinden dolayı birçok avantaja sahiptir (Çelik 2006).

Enzimler substratla çok spesifiktir ve enzimler etki edecek doğru substrata sahipse, süreç çok daha hızlı hale gelir. Bu sistem bir kilit (enzim) ve anahtar (substrat) modeli ile tanımlanmıştır

Ana sınıflandırmada 6 grup mevcuttur: Oksidoredüktazlar, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar (Sentazlar), İzomerazlar ve Ligazlar'(Sentetazlar) dır.

Enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanılmaları enzim teknolojisini teşkil eder. Bugün, endüstriyel enzimler için küresel pazar hızla büyüyor ve şu anda en potansiyel sektörlerin deterjan, nişasta işleme, gıda ve yem endüstrileri ve petrol ve gazın geri kazanımı gibi birçok endüstride önemli yer tutmaktadır. Son olarak, enzim kullanımı çok verimli, en uygun maliyetli, daha az zaman alan veya sektördeki en hızlı süreçtir ve dahası, şimdiye kadar yeşil veya çevre dostu teknoloji olarak kabul edilmektedir (Nandy 2016, Chapman ve ark. 2018). Enzimler ayrıca, genetik mühendisliği, yüksek verimli tarama ve diğer yerleşik veya gelişen teknolojilerdeki hızlı gelişmeler ile mevcut süreçlerin ekonomisini iyileştirir ve yeni uygulama alanları açar (Van Beilen ve ark. 2002).

Geçen yüzyılın sonlarında özellikle enzimlerin seçilmiş üretim suşları kullanılarak üretilmesini amaçlayan fermantasyon süreçlerinin geliştirilmesi, enzimlerin saflaştırılmış, iyi karakterize edilmiş preparatlar olarak büyük ölçekte üretilmesini mümkün kılmıştır. Rekombinant gen teknolojisinin kullanımı, üretim süreçlerini daha da geliştirdi ve daha önce üretilemeyen enzimlerin ticarileştirilmesini sağladı (Kirk ve ark. 2002, Akkaya 2012).

Endüstriyel enzimlere olan talep, daha seçici, verimli ve önemli ölçüde daha az tehlikeli oldukları için her geçen gün artmaktadır. Özellikle 50 °C ile 80 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişen organizmalar olan termofillerden elde edilen enzimler, endüstriyel biyokatalizde bulunan çeşitli engellerin ortadan kalkmasına alternatif sunmaktadır (Coolbear ve ark. 1992, Turner ve ark. 2007).

Çizelge 2.1.'de enzimlerin kullanıldığı endüstrilerden bahsedilmektedir. Endüstriyel işlemlerde daha yüksek sıcaklıkların kullanılması ayrıca substrat ve ürün çözünürlüğünü artırır, hidroliz süresini azaltır ve mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirir. Bu nedenlerden dolayı, termostabil enzimler biyokatalizörler olarak özellikle tercih edilir (Dönmez 1987, Han ve ark. 2019).

Çizelge 2.1. Enzim teknolojisinin farklı endüstrilerde kullanım alanları (Kirkve ark. 2002)

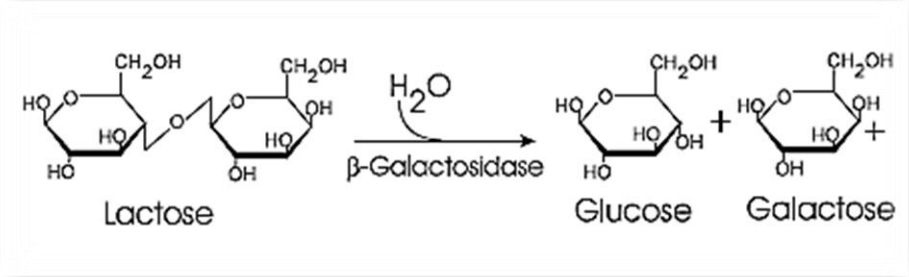
Endüstri	**Enzim**	**Kullanım alanları**
Süt ürünleri.	Hayvansal renin Mikrobiyal renin	Peynir üretimi
	β-Galaktosidaz	Laktozun glikoz ve galaktoza yıkımı Mayanın geliştirilmesi Fermente süt ürünlerin üretilmesi
	Lipaz	Peynir üretiminde Yağ yıkımı
Bira endüstrisinde	Amilaz	Nişasta, şeker, protein ve aminoasitlerin parçalanması
	B-Gukanaz	Maya hücre duvarının parçalanması ve biranın şeffaflaştırılması
	Proteaz	Mayanın yıkımı ve biranın şeffaflaştırılması
Ekmek ve Pasta endüstrisi	Proteaz	Düşük proetinli un üretimi
	α –Amilazı	Undaki nişastanın momsakkaritlere parçalanması ve mayanın hazır hale getirilmesi
Deterjan	Proteazlar	Organik lekelerin uzaklaştırılması
Şekerleme	α-Amilazı	Tatlandırıcı olarak glikoz şurubu eldesi
Tekstil	Bakteriyel Amilaz	Dokuma işleminde kumaştan nişastanın ayrıştırılması.
Deri.	Tripsin	Deriden tüy veya kılların ayrıştırılması
Tıp	Tripsin	Kan pıhtılarının uzaklaştırılması ve yaraların dezenfeksiyonu
	Çeşitli enzimler	Laboratuvar tanı kitlerinde

Termofilik enzimler (genellikle termozimler olarak adlandırılır) daha sağlamdır ve aynı anda termostabil ve termoaktiftir ve yüksek sıcaklıkta biyoproseslerde en iyi şekilde performans göstermelerine olanak tanır. Ayrıca, birçok endüstriyel uygulamada bulunan koşullar olan yüksek basınca ve proteinlerin denatüre edici çözücülere genellikle toleranslıdır. Bu özellikler, onları mezofilik enzimlerde daha üstün kılar (Atalah ve ark. 2019).

Termofilik mikroorganizmalarda bulunan ve mezofilik homologlarına kıyasla daha yüksek termal kararlılıkları nedeniyle yaygın olarak yüksek sıcaklık biyoteknoloji işlemlerinde kullanılan enzimlerin örnekleri arasında selülazlar, amilazlar, ksilanazlar, lipazlar, proteazlar, pektinazlar ve esterazlar bulunur (Rigoldi ve ark. 2018).

2.3. β-Galaktosidaz

Moleküler biyolojinin hem tarihinde hem de uygulamada önemli yere sahip olan β-galaktosidaz aynı zamanda laktaz olarak da adlandırılır. β-Galaktosidaz disakkarit olan laktozun vücut tarafından absorbsiyonu için monosakkaritlerine parçalanmasını gerçekleştiren ayrıca galaktooligosakkaritlerin (GOS) üretiminde görev alan bir enzimdir (Juers ve ark. 2012, Kılıç ve ark. 2014).

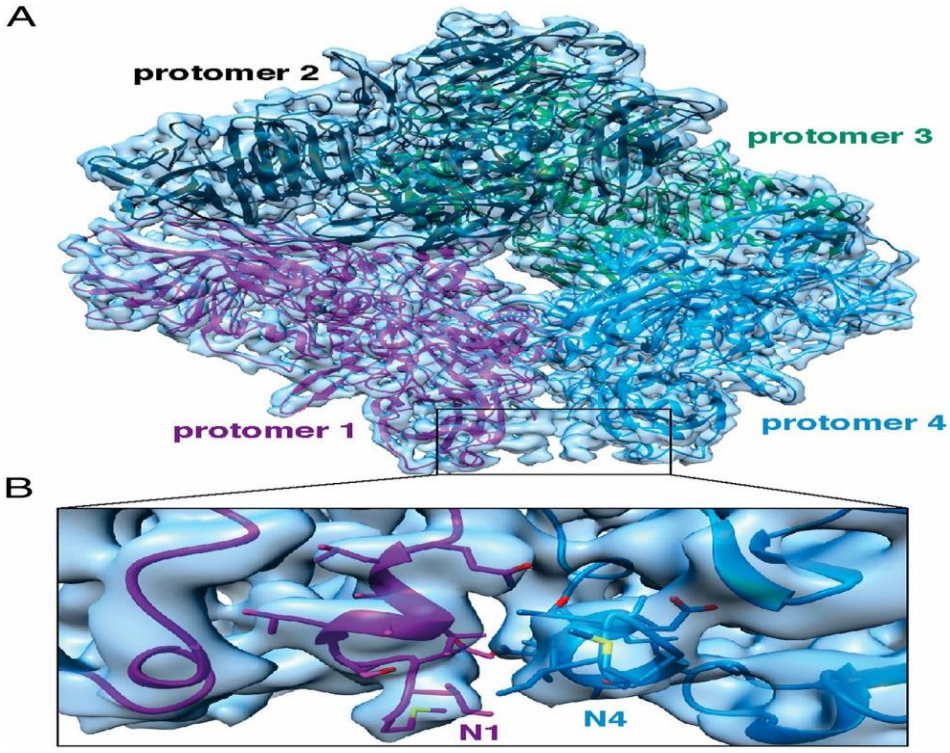


Şekil 2.1. Laktozun β-galaktosidaz ile hidrolizi (Held 2001)

Şekil 2.1'de gösterildiği üzere β-galaktosidaz'ın laktozda bulunan β-glikozidik bağın hidrolizini sağlayarak, sütteki ürünlerin tatlı hale gelmesi, çözünür olmasını, lezzetini ve sindirilebilirliğini gerçekleştirmek için gıda sanayisinde çok yaygın kullanıma sahiptir (Richmond ve ark. 1981, Grosova ve ark. 2008).

β-Galaktosidaz, amorf matrislerdeki aktivitesini incelemek için bir model olarak kullanılmıştır (Burin ve ark. 2002). β-Galaktosidazlar, çoğunlukla mikroorganizmalar olmak üzere hayvanlar ve bitkiler gibi çok farklı kaynaklardan sağlabilmektedir. Enzim *lacZ* operonun ürünüdür ve ilk çalışma *Escherichia coli*'den üretilen β-galaktosidaz üzerinde yapılmıştır. (Cruz ve ark. 1999, Grosova ve ark. 2008). Şekil 2.2.'de *E. coli*'den elde edilen β-galaktosidaz'ın kriyo elektron mikroskopisi ile dört tetramer yapısı gösterilmektedir. Şekil (A)'da β-galaktosidazın uygun atomik modeli ile yüzey temsilinde gösterilen Cryo-EM haritasına gör; dört etiketli protomer sırasıyla macenta, siyah, yeşil ve mavi renklidir. (B) A'da vurgulanan dimer arayüzünün yakınlaştırılmış bölgesi deneysel yoğunluk haritasından de novo türetilen kriyo- EM'den türetilen atom modelinin bir süper pozisyonunu göstermektedir (Bartesaghi 2014). Jacob ve Monod'un gen ifadesinin düzenlenmesi için operon modelini geliştirmesinde temel bir rol oynadı.

β-Galaktosidazlar glikozit hidrolazların GH-A süper ailesinin 1, 2, 35 ve 42 alt ailelerine aittir. *E. coli* β-galaktosidazı A – D olarak etiketlenmiş dört özdeş 1023 amino asit zincirinden oluşan bir tetramerdir (Maksimainen ve ark. 2012, Özarslan 2018).



Şekil 2.2. Kriyo-elektron mikroskopisi ile türetilen β-galaktosidaz tetramer için atom modeli (Bartesaghi 2014)

β-Galaktosidazlar nispeten geniş bir pH aralığında çalışır: mantarlardan elde edilen enzimler pH 2,5-5,4 arasında etki eder, maya ve bakteriyel enzimler pH 6.0-7.0 arasında etki eder (Husain 2010). Metaloenzim olan β-galaktosidazın tamamen aktivite olabilmesi için kofaktör olarak hem Mg^{2+} hem de Na^{+} gereklidir (Aytaç 2012). Ancak mantarlardan elde edilen β-galaktosidazlar kofaktör olmadan da aktivite göstermektedir (Juers ve ark. 2012, Nath ve ark. 2014).

β-Galaktosidaz hidrolitik ve transgalaktozilasyon reaksiyonlarını katalize eden iyi bilinen bir biyokatalizördür. Çizelge 2.2'de β-galaktosidaz'ın enzimatik aktivite basamakları gösterilmektedir. Kolayca tanınabilir bir mavi reaksiyon ürünü üreterek, onu klonlamada ve diğer moleküler biyoloji prosedürlerinde varlığını işaret etme kabiliyetine sahiptir. Bu incelemenin amacı, β-galaktosidazın enzim işlevi, enzimatik mekanizması, biyoteknoloji endüstrisindeki uygulamaları, avantajları ve dezavantajları

ve modifikasyon stratejisine genel bir bakış sağlamaktır (Juers ve ark. 2000, Sedzro ve ark. 2018).

Çizelge 2.2. β-Galaktosidaz üç enzimatik aktivite reaksiyon basamakları

1.Disakkarit laktozu parçalayarak glikoz ve galaktoz oluşturur ve daha sonra glikolize reaksiyonuna katılabilir.	Enzim + Laktoz → Enzim – Laktoz kompleksi
2.Enzim, laktozun allolaktoza transgalaktozilasyonunu katalize eder.	β-Galaktosidaz- Laktoz birleşimi →Galaktosil–β-Galaktosidaz + Glikoz
3.Allolaktoz monosakkaritlere parçalanır.	Galaktosil – β-Galaktosidaz + H_2O → Galaktoz + Enzim

2.3.1. β-Galaktosidaz'ın Kullanım Alanları

Endüstriyel olarak β-galaktosidazın çeşitli uygulamaları vardır. Laktoz toleransı olmayan bireyler için laktozsuz ürünler üretmenin yanı sıra, β-galaktosidazlar aynı zamanda ticari ölçekte peynir altı suyunun sebep olduğu çevre sorunlarını çözmek için de kullanılır. Laktoz bağırsaktan emilmediğinden hidrolize hale getirilmesi gerekmektedir. Hidroliz işlemini gerçekleştiren β-galaktosidaz enzimi veya probiyotiklerdir (Kılıç 2013).

Laktoz higroskopiktir ve amorf yapıdadır bu nedenle gıda ürünlerinde kristalleşmeye neden olur; bu nedenle β-galaktosidazlar, dondurulmuş, konsantre tatlılarda laktozla ilişkili kristalleşmeyi çözmek için laktozu hidrolize etmek için kullanılır (Yetişemiyen ve ark. 2009, Saqib ve ark. 2017).

β-Galaktosidaz peynir altı suyunu, şekerleme, fırıncılık ve diğer endüstrilerde daha geniş uygulama alanına sahip olan fermente ürünlerin oluşmasında ve tatlı şurup gibi yararlı ürünlere dönüştürmek için işlemek için kullanılır (Saqib ve ark. 2017).

Çizelge 2.3. β-galaktosidaz enziminin kullanım alanları ve bundan yararlanan endüstriler (Okumuş ve Yılmaz 2018)

β-Galaktosidazdan yararlanan endüstriler	**β-Galaktosidaz'ın uyguluma alanları**
Süt Endüstrisi	Sütün hidrolizi
	Laktozsuz süt ürünlerinin eldesi
	Peynir altı suyunun hidrolizi
	Dondurma üretiminde
İçecek Endüstrisi	Fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde mayanın gelişmesi ve fermantasyon ürününün oluşmasında
Fırıncılık	Ekmek yapımında mayanın gelişmesi için
	Şekerleme üretiminde
Tıp	ELISA testi

2.3.2. β-Galaktosidaz Üreten Kaynaklar

β-Galaktosidazların kaynakları mikroorganizmalar, mantarlar, bitkiler ve hayvanlardır. (Aytaç 2012). Bununla birlikte, ticari ve endüstriyel ölçekte, en yaygın olarak kullanılan β-galaktosidaz kaynakları *Aspergillus* ve *Kluyveromyces*'tir (Husain 2010). β-Galaktozidazın, *E. coli*'de en iyi şekilde karakterize edilen ve en yaygın olarak tanımlanmış galaktosidaz olmasına rağmen, çok pahalı olması ve toksisite sorunlarından dolayı gıda alanında kullanılmamamaktadır (Aytaç 2012, Matpan Bekler 2012).

2.3.3. Mikrobiyal β-Galaktosidaz

β-Galaktosidazlar, bakteriler, mayalar ve filamentli mantarlar gibi mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir. Bununla birlikte, genellikle yüksek verimlilik göstermesi kararlı bir yapı göstermesi ve bununda maliyet düşüklüğüne neden olmasından dolayı mikrobiyal kaynaklı β-galaktosidazlar daha çok rağbet edilmektedir (Saqib ve ark. 2017, Okumuş ve Yılmaz 2018).

Bitkisel ve hayvansal enzimlerin ticari değeri mikrobiyal enzimlere kıyasla daha düşüktür. Mayalar ve küfler mikrobiyal kaynaklı yapılar olarak gösterilmektedir

(Okumuş ve Yılmaz 2018). Çizelge 2.4.'de β-galaktosidaz enziminin elde edildiği kaynaklar üzerinde yapılan çalışmalar gösterilmiştir.

Çizelge2.4. β-galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar (Uyanık 2008'den modifiye edilmiştir)

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kahve, Kaba yonca çekirdeği
Hayvan Organları	İnce bağırsak, Beyin ve deri dokusu
Mayalar	*Kluyveromyces lactis*,
Bakteriler	*E. coli, Thermus aquaticis, Bacillusmegaterium streptococus lactis, Bacillus circulans, Bacillus stearotherrphilus*
Mantarlar	*Neurospora crassa, Asperigillus foetudut, Asperigillus niger, Fusorium moniliforme, Alternaria alternara, Asperigillus oryzeae, Asperigillus phoenicis*

Mikroorganizmalar'ın enzim teknolojisinde kullanılma sebepleri:

☆ Hızlı üremeye sahiptirler.

☆ Diğer birçok canlılara kıyasla kütle bazında ele alındığında daha fazla enzim molekülü üretme potansiyeline sahiptirler.

☆ Yüksek aktivite ile fazla ürün elde etme.

☆ Genetik olarak değiştirilme yoluyla istenmeyen yan ürünleri engellemek.

☆ Mikroorganizma enzimleri farklı pH ve sıcaklık aralıklarında aktivite gösterebilirler.

☆ Üreme ihtiyaçları basit olup kültür ortamlarında kontrol leri kolaydır.

☆ Tarımsal atıklar gibi atık maddeleri substrat olarak kullanabilirler.

2.3.3.1. Termofilik Mikrobiyal β-Galaktosidaz

Ekstremofil organizmalar, enzimlerin üretimi ve çeşitli biyoteknolojik süreçlerin geliştirilmesi için değerli kaynaklardır. Glikozit hidrolaz ailesi 42 (GH42), optimum sıcaklık ve stabilitelerinde önemli varyasyonlar sergileyen termostabil β-galaktosidazlardan oluşur. Böylelikle çeşitli mezofilik, psikrofilik ve termofilik kaynaklardan elde edilen β-galaktosidazlar ve bunların biyoteknoloji endüstrisindeki potansiyel uygulamaları artmıştır. Aslında termofilik enzimler doğal olarak mezofilik olanlardan daha yüksek termal stabiliteye sahiptir ve bu stabilite enzimin birincil yapısından kaynaklanmaktadır (Sarıgül 2007, Xavier ve ark. 2018).

Mikrobiyal enzimlerin özel karakteristikleri arasında, özellikle sıcaklık ve pH ekstrem şartlardaki kabiliyetleri ve yüksek aktivitede bulunmaları istenilen özelliklerdendir. Bu nedenle, termofilik, asidofilik veya alkalofilik gibi mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir (Singh ve ark. 2019).

Termostabil enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar arasında yaygın olarak bulunur. 60 °C-125 °C arasında optimal olarak aktiftirler. Bu enzimler protein yapılarından dolayı; sıcaklık, pH ve kimyasallara karşı stabiliteleri açısından benzersizdir. Termostabil enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar arasında geniş bir şekilde yayılmıştır. 60 ve 125 °C arasında optimal olarak aktiftirler. Bu enzimler, protein yapıları ve sıcaklık, pH ve kimyasallara karşı kararlılıkları açısından benzersizdir. Termozimler ağırlıklı olarak termofilik mikroorganizmalarda bulunmasına rağmen, büyüme sıcaklıkları 60-80°C aralığındadır, örneğin gıda bozulması psikotrofik bakterilerin bazıları termostabil proteazlarla bulunur. Biyoprosesleri daha verimli hale getirmek için yeni termostabil enzimler araştırılmaktadır. Genel olarak termostabil enzimler, daha yüksek bir optimum sıcaklığa ek olarak çeşitli kimyasallara ve çözücülere karşı dirençlidir; bu, daha düşük hidrojen değişim hızına ve proteolitik bozunmaya karşı daha düşük duyarlılığa atfedilen katı protein konformasyonlarını gösterir. Moleküler klonlama, *E. coli* gibi mezofilik bakterilerde termofilik ve hiper termofilik genlerin ekspresyonunu mümkün kılmıştır. Rekombinant vektörlerden ve protein mühendisliği yaklaşımıyla türetilen yeni β-galaktosidazlar, verimli rekombinant mikrobiyal üretim sistemleri ve dolayısıyla biyoteknolojide ilgili sentetik bir araç olarak rekombinant enzimlerin uygulamaları için önemlidir. Biyomoleküllerin katalitik özelliklerinin spesifik tanınması ile rekombinant proteinlerin spesifik fiziksel ve kimyasal özelliklerinin birleşimi, sayısız yeni biyoteknolojik uygulamalarda görünmelerine yol açmıştır. (Nigam 2013, Xavier ve ark. 2018)

2.4. Termofilik Bakteriler

Mikroorganizmalar -34 °C ila 100 °C arası geniş bir sıcaklık skalsında yaşarlar. Sıcaklık isteklerine göre mikroorganizmalar: psikrofiller (20 ºC altında), mezofiller (20-55 ºC), termofiller (55 ºC üzeri) olmak üzere gruplandırılır. Bunun yanı sıra termofiiler ılımlı termofiller (45-65 °C) ekstremofiller (60-80 ºC) ve hipertermofiller ise (80 ºC'nin üzerinde) gelişim göstermektedirler (Pirinççioğlu 2015, Gül Güven 2011).

Ekstrem şartlarda yaşayan termofilik bakterilerin günümüzde dikkat çekme nedeni yaşaması imkânsız olan sıcaklıklarda bile yaşamaları ve bu sıcaklıklarda aktif enzimlere sahip olmaları ve birçok araştırmaya konu teşkil etmiştir. Dünyada sıcak su kaplıcaları gibi değişik jeotermal bölgelerden termofilik bakterilerin izolasyon çalışmaları yapılmaktadır (Akkaya 2009, Abdollahi ve ark. 2021).

Termofilik mikroorganizmalar, termostabil enzimleri (selülazlar, proteazlar, amilazlar, pektinazlar, kitinazlar, ksilanazlar, lipaz ve DNA polimerazlar gibi) üretme potansiyelleri nedeniyle biyoteknolojik süreçlerde benzersiz özellikler gösterir. Ayrıca, birçok kimyasala, deterjana ve asidik ve alkali pH'ya karşı daha stabil özeliklere sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Adrio ve ark. 2014, Mohammad ve ark. 2017).

Yüksek sıcaklıkta yaşayan ekstremofillik termofiller sıcaklığa dayanaklı biyokatalizör özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedir. Birçok ekstremofil mikroorganizma, Arkea türleri içinde yer almakta olan ekstrem termofillerdir (Rothschild ve ark. 2001).

Normalden yüksek reaksiyon sıcaklıklarında çalışabilen termostabil enzim sistemlerine sahip mikroorganizmalar, uzun süreli büyük ölçekli endüstriyel reaksiyonlarda mikrobiyal kontaminasyon olasılığını azaltacaktır.

2.4.1. Geobacillus ve Geobacillus vulcani

Geobacillus cinsi, 35–75 ° C sıcaklık aralığında üreyebilen zorunlu olarak termofilik bakteriler tarafından temsil edilir. İlk başlarda *Bacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılan *Geobacillus* türleri, 2001 yılında yeni bir cins olarak değerlendirildi**.** Bu cins fakültatif anaerobik veya aerobik çubuk şeklinde, endospor oluşturan, Gram-pozitif hücre duvarına sahip (fakat bu durum değişiklik gösterebilmekte) hücrelerdir (Nazina ve ark. 2001). Genellikle pH 6.0-8.5 aralığında büyüyen bakterilerdir. Büyüme faktörleri, vitaminler, NaCl ve KCl gerekli değildir; Böylece suşların çoğu, besleyici agar gibi rutin besi yerinde büyür. Karbonhidratlar, organik asitler, pepton, tripton ve maya ekstraktı dâhil olmak üzere çok çeşitli substratı kullanılır. Hidrokarbonları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneği, cins içinde yaygın olarak dağıtılan bir özelliktir (Coorevits ve ark. 2012).

Bu cins dâhilindeki türler 16S rRNA dizilerine göre kendi aralarında %96,5-99,5 oranında benzerlik gösterirler. Yine de bu cinsin üyelerinde G+C içeriği % 45 ila 69 oranında değişmektedir (Pirinççioğlu 2015, Novik ve ark. 2018). *Geobacillus* topraklardan, soğuk okyanus çökeltilerinden, petrol rezervlerinden, sıcak su kaynaklarından bile çok sayıda yerde izole edilmektedir (Novik ve ark. 2018).

Çizelge 2.5. *Geobacillus*'un türleri (Matpan Bekler 2017)

Geobacillus sterothermophilus DSM 22T
Geobacillus thermocatenulatus DSM 730T
Geobacillus thermoleovorans DSM 5366T
Geobacillus thermoglucosidasius DSM 2542T
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465T,
Geobacillus subterranaus DSM 13552T
Geobacillus kaustaphilus DSM 7263T
Geobacillus uzensis DSM 13551
Geobacillus caldoxylosilyticus DSM 12041T
Geobacillus toebii DSM 13551
Geobacillus gargensis DSM 15378
Geobacillus vulcani DSM 13174
Geobacillus debilis DSM 16016T
Geobacillus palidus
Geobacillus lituanicus DSM 15325T
Geobacillus tepidamans
Geobacillus jurassicus DSM 15726T
Geobacillus zalihae DSM 18318T
Geobacillus kaue,
Geobacillus anatolicus
Geobacillus bogazici
Geobacillus galactosidasius DSM 18751
Geobacillus thermoantarcticus DSM 9572T
Geobacillus icigianus

Geobacillus vulcani; *Geobacillus* cinsine ait türlerdendir. *G. vulcani* suşunun fizyolojik özellikleri, filogenetik pozisyonu ve DNA-DNA hibridizasyonu bu türün *Geobacillus* cinsine ait olduğunu belirlemiştir. *Geobacillus* cinsinin sistematiğinde *rec*N

geni kullanılmış; *G. thermoleoverans, G. lituanicus, G. thermocatenulatus, G.kaustophilus ve G. vulcani* bakterilerinin *recN* benzerliklerinin % 96'dan fazla olduğunu gösterilmiştir (İnan 2011). *G. vulcani*'yi cinsin diğer türlerinden ayıran temel özellikler, gliserol, laktoz ve ribozdan asit üretme kabiliyetidir (Nazina 2004).

Çizelge 2.5'te *Geobacillus* cinsine ait türler gösterilmektedir. Endüstriyel açıdan önemli termostabil enzimlerden; proteazlar, lipazlar, amilazlar, ksilanlar, pullulanazlar, peroksidaz, glukozizomerazlar ve DNAazlar gibi termostabil enzimlerin termofilik basillerinden elde edilme potansiyeli daha yüksek olduğu için enzimolojide önemi artmıştır. *Geobacillus*, tekstil endüstrisi, gıda, hemiselülozdan etanol elde etme ve atık arıtımı gibi pek çok endüstri alanında yaygın kullanıma sahiptir (Bektaş 2017, Karaca 2018).

2.5. β-Galaktosidaz ile İlgili Önceki Çalışmalar

Son yıllarda araştırmacılar, enzimatik sistemlerinin benzersiz özellikleri nedeniyle termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmaların araştırılmasına dahil oldular. Bu tür araştırmalar, nişasta hidrolizi, amino asit biyosentezi, protein hidrolizi, laktoz hidrolizi vb. ile ilgili enzimleri kodlayan çok çeşitli genlerin klonlanması ve endüstriyel uygulamalarının gelecekteki perspektifleri, biyoteknolojik yöntemlere dikkat çekmektedir.

Cowan ve ark. (1984), son derece termofilik bir organizma olan *Thermus* suşu 4−1A'dan indüklenebilir bir β-galaktosidaz izole etmiş ve kısmen saflaştırmıştır. Elde ettikleri bulgulara göre pH 8'de 90 ºC'ye kadar çok stabil olduğunu gözlemlemişlerdir.

Levin ve ark. (1985), *B. coagulans* suşu L4'ten elde edilen β-galaktosidazın optimum sıcaklığını 55 °C olduğunu tespit etmişler. 30 °C'de optimal pH 6.0 iken 55 °C'de optimal pH 6.5 olarak tespit etmişlerdir.

Maciuńska ve ark. (1998), *Thermus thermophilus* hücrelerinde en yüksek β-galaktosidaz aktivitesini; %0.8 pepton, %0.4 maya özü ve %0.2 NaCl içeren bir ortamda 70 °C'de 40 saatlik kültivasyon sonrasında elde etmişlerdir. Ortama %2 laktoz ve galaktoz ilavesinden sonra, hücrelerdeki enzim sentezi, sırasıyla değerinin yaklaşık %33'ü ve %61'i kadar artmıştır. Termostabil β-galaktosidaz izolasyonu ve kısmi saflaştırma, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sephadex G-200 jel filtrasyonu veya

liyofilizasyon aşamalarını içermektedir. Elde edilen ham enzim, pH 6.6 ve 87°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Chakraborti ve ark. (2000) *Bacillus* sp. MTCC 3088'den saflaştırılarak elde edilmiş β-galaktosidazı karakterize etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığını, bir Sephadex G-200 jel filtrasyonu ile yaklaşık 484 kDa olduğu belirlemişler. SDS-PAGE ile alt birimlerin moleküler ağırlıklarının 115, 86.5, 72.5, 45.7 ve 41.2 kDa olduğunu tahmin etmişlerdir.

Gül Güven ve ark. (2011), termoasidofilik *Alicyclobacillus acidocaldarius rittmannii*'den elde edilen intraselüler β-galaktosidaz, amonyum sülfat ile çöktürme, jel geçirgenliği, iyon değişimi ve afinite kromatografisini içeren prosedürlerle saflaştırmışlardır ve son olarak elektroforez ile molekül ağırlığını belirlemişlerdir. 163 kat saflaştırma ve %8 verim ile saflaştırılan enzimin 113 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip olduğunu hesaplamışlardır. FPLC ve SDS-PAGE üzerinde jel filtrasyonu ile belirlenen saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi sırasıyla 165 ve 76 kDa olarak bulnmuş, büyük olasılıkla GH ailesi 42'ye ait olduğunu belirtmişlerdir.

Gezgin (2012), *Thermus oshimai* DSMZ 12092'ye ait β-galaktosidaz enziminin kısmi karakterize edilmiş ve transferaz aktivitesi olup olmadığı incelenmiş. Kismi saflaştırlan enzimin optimal sıcaklık 75 °C ve pH 7.0 olarak belirlenmiştir

Gümüş (2012), 53 adet endospor oluşturan termofilik bakteri izolatında, α-galaktosidaz ve β-galaktosidaz enzimlerinin aktiviteleri değerlendirmişlerdir. 53 adet izolatın %11,32'sinde intraselüler α-galaktosidaz, %5,66'sında ise intraselüler β-galaktosidaz aktivitesi belirlenmişlerdir. En yüksek aktivite ve sıcaklık stabilitesi β-galaktosidaz enzimi için ise izolat-20'de tespit edilmiştir. İzolat-20'ye ait β-galaktosidaz, 60 ºC'de 5 saat sonunda aktivitesinin tamamını korurken, 70 ºC'de aktivitesinin %73'ünü korunduğunu belirlemişlerdir.

Matpan Bekler (2012) ve (2015) çalışmalarında, termofilik *Bacillus licheniformis* KG9 suşuna ait β-galaktosidaz üzerine çalışma yapmıştır. Bu çalışmada *B. licheniformis* KG9 ve rekombinant *E. coli*'den elde edilen β-galaktosidaz, DEAE-selüloz, Sephadex G-75 ve p-aminobenzil-1-thio-b-D-galaktopiranosid (PABTG-agarose) kromatografi yöntemleriyle saflaştırılarak saflaştırma kat sayısı 9.4 ve verim

%85 olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı non-denatüre PAGE ile yaklaşık 90 kDa olarak tespit etmişlerdir. 2015 çalışmasında ise aynı bakteri üzerinde çalışma yapmıştır; hesaplanan moleküler ağırlıklar β-galaktosidaz I, II, III ve IV'ün dizileme verileri kullanılarak sırasıyla 30, 79, 74 ve 79 kDa olarak belirlenmiş. Genler bir ekspresyon vektörüne yerleştirilerek rekombinant β-galaktosidaz, *Escherichia coli*'de üretilmiş. KG9 suşunda tanımlanan dört β-galaktosidaz geninden üçü aktif olarak ifade edilmiş, *E. coli*'deki hücre içi enzimler. Rekombinant enzimlerden biri olan β-galaktosidaz III saflaştırılıp ve karakterize etmişler. Optimum sıcaklık 60 ºC ve pH 6.0'da olarak belirlemişlerdir.

Obeidat ve ark. (2012) Ürdün kaplıcasından izole edilen termofilik *Geobacillus* türlerine ait izolatların büyümesi için optimal sıcaklığını 60 ila 65 °C ve optimal pH'sını 6 ila 8 olduğunu belirlemişler ve izolatların fenotipik karakterizasyonu, genotipik yöntemle belirlemişlerdir. Sekiz izolatın hepsinin cinse maksimum homolojisi *Geobacillus* olarak gözlendiği ve izolatların β-galaktosidaz enzimi ürettiği de gözlemlemişlerdir.

Boudjema ve ark. (2016), β-galaktosidaz üreten yeni bir maya *Kluyveromyces* cinsine ait *Kluyveromyces marxianus* DIV13-247 suşu izole edip ve fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlamışlardır. Daha sonra β-galaktosidaz üretimi için bazı çevresel ve beslenme koşulları incelenmiştir. Bu suş için maya kullanılarak büyümesi ve β-galaktosidaz üretimi için en uygun kültür koşulları pH 5.0 ve sıcaklık 30 ºC olarak belirlemişlerdir. En iyi enzim sentezi için hem peynir altı suyu hem de laktoz çözeltisi (%5 a/h) üzerinde ham β-galaktosidaz kullanılarak pH 7.0 ve sıcaklık 30 ºC olarak belirlemişlerdir.

Matpan Bekler ve ark. (2017), Termofilik *Anoxybacillus* sp. KP1'den termostabil β-galaktosidazı, sırasıyla 14.4 kat saflaştırma ve %11.8 verimle Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisiyle kısmen saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış β-galaktosidazın optimal aktivitesini pH 9.0'da ve sıcaklığını ise 60 ºC derecede arttığını ve enzim pH 9.0'da termostabilitesi 60 ºC'de stabil olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 68 kDa olarak hesaplanmıştır.

Chanalia ve ark. (2018), probiyotik *Pediococcus acidilactici*'den elde edilen β-galaktosidaz sonikasyon kullanılarak hücrelerden özütlemiş ve ardından amonyum

sülfat fraksiyonasyonu ve Sephadex G-100 ve Q-Sepharose üzerinde ardışık kromatografiler kullanılarak saflaştırmışlar. Enzim, 0.883 U/mg spesifik aktivite ve %28.26 verim ile elektroforetik homojenliğe kadar 3.06 kat saflaştırılmış. SDS-PAGE ve MALDI-TOF ile tahmin edilen β-galaktosidazın moleküler kütlesi 39.07 kDa olarak tespit etmişler. Enzim, alt birim kütlesi 15.55 ve 19.58 kDa olan bir heterodimer olduğu belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzim optimum olarak pH 6.0'da aktif ve %97'den fazla aktivite ile 5.8-7.0 pH aralığında stabil olduğunu ve saflaştırılmış β-galaktosidaz, 50 °C'de optimal olarak aktif olduğunu belirlemişlerdir.

Matpan Bekler ve ark. (2018), *Anoxybacillus ayderensis*'ten termostabil β-galaktosidazı, sırasıyla 14.4 kat saflaştırma ve %13.4 verim ile Sephadex G-75 ile kısmen saflaştırılmış. β-galaktosidazın pH'sı 9.0 ve optimal sıcaklığı 60 ºC olarak bulmuşlardır. Alt birimlerin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile 90 kDa olarak tahmin edilmiş.

Liu ve ark. (2019) *E. coli*'de *Bacillus coagulans* NL01'den eksprese edilen yeni bir termostabil β-galaktosidaz'ın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6.0 ve 55 ila 60 °C olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılmış enzimin, 60 °C'de 3.5 saatlik bir yarı ömre sahip olduğunu değerlendirilmiştir.

Murphy ve ark. (2020), termoasidofil *Alicyclobacillus vulcanalis* DSM 16176'dan hücre içi bir β-galaktosidazın saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu değerlendirmişlerdir. Enzim, %5.89 verimle 110 kat saflaştırılmış. Denatüre (83.7 kDa) ve non-denatüre (179 kDa) moleküler kütleler, sırasıyla SDS-PAGE ve jel filtrasyonu ile belirlenmiş ve enzimin bir homodimer olarak fonksiyonlarını ortaya koyduğunu belirlemişler. En yüksek aktivite 70 °C'de ve pH 6.0'da ölçülmüştür. *o*NPG ve laktoz substratları üzerindeki Km, sırasıyla 5 ve 258 mM belirlemişlerdir. 70 °C'de sırasıyla 30, 60 ve 120 dakika sonra %76, 50 ve %42 nispi aktiviteyi korunduğunu ve bu enzimin termostabil oduğunu göstermişlerdir.

Shaikhan ve ark. (2020), bir petrol istasyonundan izole edilen *Enterobacter* sp. 3TP2A'nın, 76.5 U mg^{-1}'e kadar laktoz varlığında yeni, yüksek oranda indüklenebilir mezofilik hücre içi β-galaktosidaz ürettiği bulunmuştur. Enzim, jel geçirgenlik kromatografisinden sonra yaklaşık %11 verimle 17.3 kat saflaştırılmış. Saflaştırılan enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 8.0–9.0 ve 35 °C olarak

bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı hem SDS-PAGE hem de doğal-PAGE ile tek bir bant ile 60 kDa olduğu tahmin edilmiştir

Tunç ve ark. (2021), *Bacillus subtilis* 4NK ve *Bacillus paralicheniformis* 5NK Bingöl Binkap kaplıcasından izole etmişler. Hücre içi β-galaktosidazları kısmen saflaştırıp karakterize etmişlerdir Saflaştırma sonucunda, *B. subtilis* 4NK enziminin verimi, % 85.2 ve saflaştırma katı 2.8 olarak, *B.paralicheniformis* 5NK için verim %76.8 ve saflaştırma katı 2.0'olarak bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığı, *B. subtilis* 4NK için 45 ºC ve *B. paralicheniformis* 5NK için 55 ºC olarak belirlenmiş ve her ikisi için de optimum pH 6.0 olaral belirlenmiş. Termal stabilitesi her iki enzim de 50 ºC 'de 120 dakika sonunda stabil olduğu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada besiyeri hazırlamak için kullanılan kimyasallar Nutrient Broth (NB) Merck/Germany'ten, Agar agar Fluka/USA'dan kullanılmıştır. Tampon için kullanılan kimyasallar; potasyum fosfat (KH_2PO_4), sodyum fosfat (Na_2HPO_4), sodyum karbonat (Na_2CO_3), glasiyal asetik asit, *o*NPG ve gliserol Sigma/Germany'den Tris-base Amresco/USA ve Tris HCl Roche/Switzerland'dan kullanılmıştır. Lowry metodu için kullanılan kimyasallar; Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FCR), Na-K Tartarat, bakır sülfat ($CuSO_4$) ve sodyum sitrat Merck'ten, Bovine serum albümin (BSA) ve NaOH Sigma'dan kullanılmıştır. Elektroforez için kullanılan kimyasallar; Akrilamid, N-N-Metilen bisakrilanid, N-N-N`-N`-Tetrametiletilen diamin (TEMED), amonyum persülfat (APS), glisin, diazoblue ve 6-Bromo-2 napthly- β-D-galactopyranoside (BNG) boya ve standart proteinler Sigma'dan, Commasie Brillant Blue R-250 (Bio-Rad), Brom Fenol Blue (BFB), sodyum dodesil sülfat (SDS) Merck'ten kullanılmıştır. Saflaştırmada kullanılan kimyasallar; sephadex G-75, etanol, metanol, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) Sigma'dan, diyaliz hortumu Bio-Rad/USA'dan temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden inkübatör Mipro/Çin'den, Steril Kabin Biobase/Çin'den, spektrofotometre Libra Biochrom/İngiltere'den, soğutmalı santrifüj Nuve/Türkiye'den, vorteks Grant-bio/İngiltere'den, manyetik karıştırıcı Libra Biochrom'dan, sıcak su banyosu Jencons/İngiltere'den, dijital göstergeli hassas terazi Daihan Biomedical/Güney Kore'den, pH metre Hanna Instruments/Rusya'dan, otoklav Hirayama/Japonya'dan, ultrasonikatör Sanyo/japonya'dan, otomatik pipetler Ependorf/Almanya'dan, jel filtrasyon ve fraksiyon kollektör ve preseltatik pompa Bio-Rad/ABD'den, ultrafiltrasyon aleti Amicon/Almanya'dan, elektroforez Bio-Rad Protean IIxi Cell model'den, derin dondurucu Antech/Türkiye'den tedarik edilerek kullanıldı.

3.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışmada, Diyarbakır ili Çermik sıcak su kaynağından izole edilen *Bacillus licheniformis* 3ÇA2 (GenBank erişim kodu: MT350123), *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA (GenBank erişim kodu: MT350124), *Bacillus licheniformis* 3ÇA (GenBank erişim kodu: MT350128), *Bacillus licheniformis* 2ÇS (GenBank erişim kodu: MT350130) ve *Geobacillus vulcani* 2Çx suşları üzerinde yapılan enzim taraması sonucunda bu bakteriler arasında termofilik *G. vulcani* 2Çx (Gen Bank erişim kodu: MT3501312) suşunun iyi bir β-galaktosidaz üreticisi olduğundan araştırmamızda kullanılmıştır (Matpan Bekler ve ark. 2020).

3.4.Metot

3.4.1. Bakterinin Kültüre Alınması

Bu çalışmada Nutrient Broth (NB) sıvı besiyeri ve Nutrient Agar besiyeri kullanıldı. NB sıvı besiyeri hazırlanması için 1 litre saf suya 8 gram NB homojen olarak karıştırıldıktan sonra 121 ºC'de 1 saat otoklavlandı. NA besiyeri hazırlanması için de 1 litre saf suya 8 gram NB ve 15 gram agar eklenip homojen olarak karıştırıldı. 121 ºC'de 1 saat otoklavlanarak, steril petri kaplarına 25 mL olacak şekilde aktarıldı.

Çalışmada, stoktan alınan *G. vulcani* 2Çx suşu NB sıvı besiyerine, 1'er mL bakteri inoküle edilerek 50 °C'de 120 rpm'de 24 saatte üretildi. Katı kültür elde etmek için sıvı kültürden üreyen bakterilerden steril öze ile örnek alınarak NA besiyerine çizgi ekim yapıldı ve 50 °C'de 24 saatte inkübatörde üretildi.

3.4.2. β-Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti

Suşların üremelerini sağlamak ve taze kültür elde etmek için NB besi ortamına 1 gün öncesinde ekimi yapılarak 50 °C'de 120 rpm'de 48 saat bakterilerin çoğaltılması yapıldı. Ekimi yapılan sıvı kültürler 600 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen kültürler 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek pelette intraselüler ve süpernatantta ekstraselüler enzim aktivitesine bakıldı. İntraselüler enzim aktivitesi için pelet kısmı buz üzerinde 20 sn. ultrasonikasyon işlemine tabi tutulup daha sonra 2 dk buz üzerinde bekletildi. Bu işlem dört defa tekrarlanarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Ultrasonikasyondan sonra elde edilen hücre özütü 9000 rpm'de 10 dk santrifüj

edildi. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı alınarak enzim aktivitesine ve protein miktar tayinine bakıldı.

3.4.2.1. β-Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β-Galaktosidaz aktivite tayini, *o*NPG substratı kullanılarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmesi sağlandı. 60 mM *o*NPG 0.1 M sodyum-fosfat (pH 7.0) tamponunda hazırlanarak enzim substratı için kullanıldı. 25 µL substrat, 100 µL enzim solüsyonu ve 875 µL Tris-HCl (pH 7.0) tampon eklenerek 15 dk 50 °C'de su banyosu içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyonun durdurulması amacıyla 0.1 M 500 µL Na_2CO_3 eklenilerek β-galaktosidaz aktivitesi 405 nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

Protein miktar tayini Lowry ve ark. göre (1951) göre yapıldı. Lowry deneyi konsantrasyonu bilinen standart protein çözeltisi (1mg/mL BSA) kullanılarak konsantrasyonu bilmediğimiz örneklerdeki protein miktarını belirlemek için yapıldı. Temiz cam tüplere artan konsantrasyonlarda (0.1-1.0 mg/mL) BSA standardından eklendi ayrıca konsantrasyonunu bulmak istediğimiz örneklerden 50 µL alındı tüm örneklerin hacmi 500 µL'ye tamamlandı, daha sonra tüm tüplere 2 mL alkalin çözeltisi eklenerek ve 40 ºC'de etüvde 10 dk inkübe edildi. Daha sonra tüplerin içine 1:1 oranında seyreltilen 500 µL Folin reaktifi (FCR) eklenerek 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrede OD değerleri ölçüldü.

Alkalin çözeltisi:

A: % 4 Na_2CO_3

B: % 4 Na-K tartarat

C: % 2 $CuSO_4.5H_2O$

100 mL saf su içine 4 gr Na_2CO_3 eklenip homojen olacak şekilde karıştırıldı. 10 mL saf su içine 0.4 gr Na-K tartarat eklenip homojen şekilde karıştırıldı. 10 mL saf su içine 0.2 gr $CuSO_4.5H_2O$ eklenip karıştırılarak üç ayrı çözelti hazırlandı. A çözeltisinden 100 mL B ve C çözeltilerinden ise 1'er mL alınıp alkalin çözeltisi hazırlandı.

Ünite enzim şu şekilde tanımlanır: Belirli şartlar altında (50 °C, 0.1 M Tris HCl pH 7.0) 1 μM *o*NPG'den 1 dakikada *o*-nitrophenol salınmasını sağlayan enzim miktarıdır.

3.4.3. Farklı Laktoz Konsantrasyonların Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Laktozun β-galaktosidaz enzim üretimine etkisini ölçmek amacıyla *G. vulcani* 2Çx bakterisi gecelik kültüre alınıp üretildi. 24 saat sonunda bakteri kültüründe absorbans değeri 0.5-0.1 olacak şekilde ayarlanarak tekrar sıvı besiyerinde aynı koşullarda hazırlandı. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda (%0.5, %1, %2 ve %3) laktoz miktarı tartılıp, steril kabin içerisinde 10 dk UV'ye tutularak steril edildi. Daha sonra belirtilen orandaki laktozlar sırasıyla ayrı ayrı besiyerlerine eklenip 50 °C'de 120 rpm'de çalkalayıcı su banyosunda 48 saat inkübe edildi.

Elde edilen kültürler 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant ve pelet kısmı ayrıldı. Yukarıda bahsedildiği şekilde ekstraselüler ve intraseluler enzim aktivitesine bakıldı. Pelet kısmı yukarda bahsedildiği şekilde ultrasonikasyon işlemine alınıp, sonikasyon işleminden sonra tekrar aynı santrifüj koşullarında santrifüj edilip üst sıvı ve süpernatant kısmında β-galaktosidaz aktivite tayinine bakıldı.

3.4.4. Farklı Zaman Aralıklarında Laktozlu ve Laktozsuz Koşullarda Enzim Üretiminin Araştırılması

Termofilik, *G. vulcani* suşu NB besi yerinde, 50 °C'de120 rpm'de üretildi. Optimum enzim üretim zamanını tespit etmek için 100 mL erlenmayer içine NB besiyeri laktozlu ve laktozsuz için ayrı ayrı hazırlandı. Besiyerlerine *G. vulcani* ayrı ayrı aktarılarak absorbans değeri 0.5-0.1 olacak şekilde ayarlanarak ekildi. Daha sonra steril kabin içerisinde UV altında 10 dk steril edilen %2 laktoz da eklenip 50°C'de, 120 rpm'de shakerda 4-96 saatler arasında inkübe edildi ve 4 saatlik periyotlarla örnek alınarak arası bakteri çoğalması 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her inkübasyon süresinde 8'er mL kültürden alınıp -40 °C'de saklandı. Laktozlu ve laktozsuz ortamdan alınan bakteri kültürleri 9 000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjlendi. Yukarıda bahsedildiği şekilde ekstraselüler ve intraselüler enzim aktivitesine bakıldı. Pelet kısmı yukarda bahsedildiği şekilde ultrasonikasyon işlemine alınıp, sonikasyon işleminden sonra tekrar aynı santrifüj koşullarında santrifüj edilip üst

sıvısı alındı. Süpernatant ve pelet alınarak β-galaktosidaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

Bundan sonraki çalışmalarda laktozsuz ortamda 72-84 saat arası inkübasyon süresinde enzim saflaştırma için üretim sağlandı.

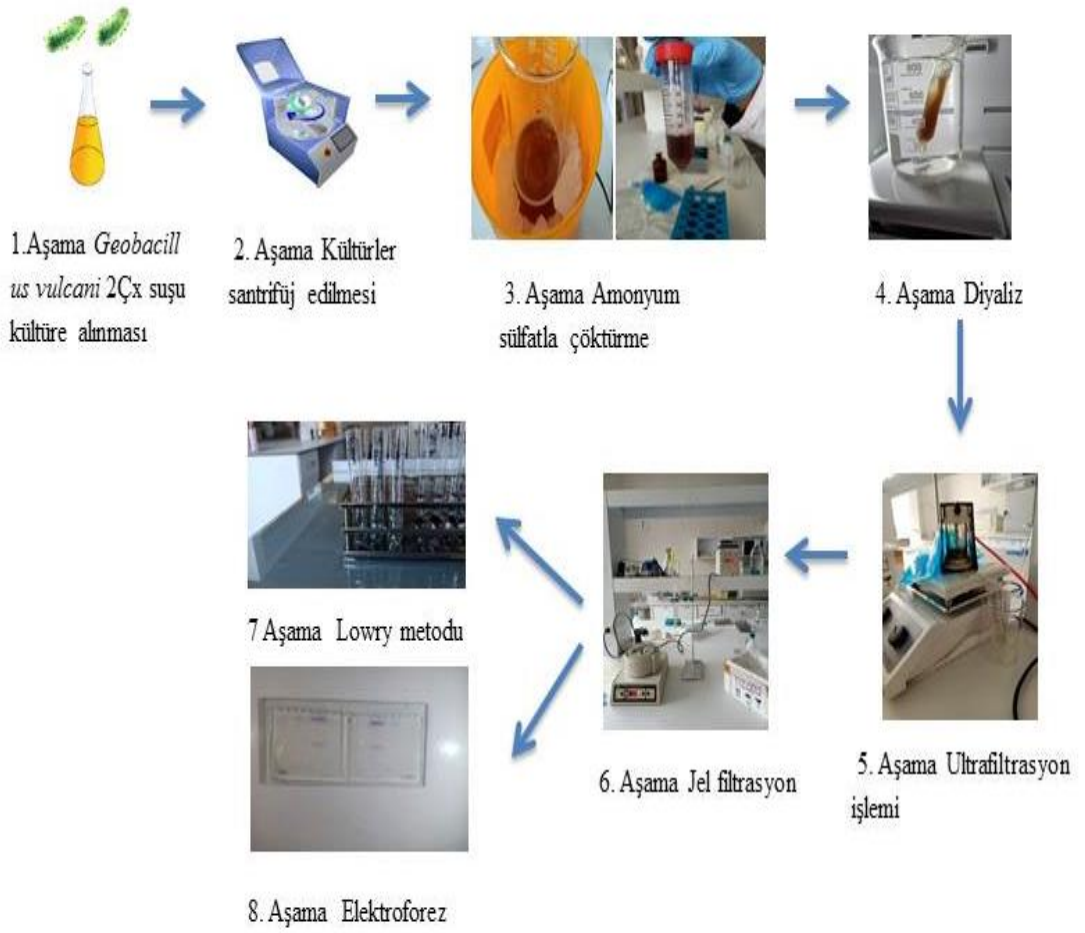
3.4.5. Enzimin Saflaştırılması

3.4.5.1. Bakterinin Kültüre Alınması ve Enzim Eldesi

G. vulcani bakterisi, 300 mL Nutrient Broth (NB) besi yerinde 50°C'de 75 saat 120 rpm'de shakerda üretildi. Bu süre sonunda bakteri kültürü 15 dk. 10 000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, üst sıvı alınarak enzim kaynağı için kullanıldı. 2 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak -40°C'ye bırakıldı. Şekil 3.1.'de saflaştırma aşamaları gösterilmektedir.

3.4.5.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

G. vulcani bakterisin'den yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen kültür üst sıvısı saflaştırma adımının ilk basamağı olan çöktürme işlemine tabi tutuldu. Bunun için soğuk ortamda nihai konsantrasyon %70 olacak şekilde amonyum sülfat eklendi. Bu işlem sonunda karışım 9 000 rpm'de 20 dk. Soğutmalı santrifüj ile ayrıldı. Elde edilen pelet tamponla [0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)] çözüldü. Tuzdan uzaklaştırma işlemi için çözünen pelet diyalize tabi tutuldu. Bu işlem için, diyaliz tüpü önce 1 mM EDTA içinde 10 dk kaynatılıp ardından saf su ile 10 dk kaynatıldı. Tuzdan arındırılmak istenen örnek diyaliz tüpüne aktarıldı ve Tris-HCl (pH 7.0) tamponuna karşı 24 saat +4 °C'de diyalize tabi turuldu. Bu işlem sonunda hacim ölçülerek örnekten 1 mL alınıp steril mikro santrifüj tüplerine aktarıldı ve -40 ºC'ye bırakıldı. Diyaliz işleminden sonra örneğin konsantre edilmesi için azot gazı kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi yapıldı. Bunun için PBGC membran (millipore) kullanılarak örnek membrandan geçen küçük proteinlerden arındırıldı. Ultrafiltrasyon sonundaki hacim ölçüldü ve örnekten 1 mL alınıp steril mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve -40 ºC'ye bırakıldı.



Şekil 3.1. β-Galaktosidazın saflaştırma aşamaları

3.4.5.3. Jel Filtrasyon

Çöktürmeden sonra, diyalize edilmiş ve konsantre edilmiş numune, jel geçirgenlik kromatografisi için 0.1 M Tis-HCl tamponu (pH 7.0) ile önceden dengelenmiş bir Sephadex G75 kolonuna (1.5 X 30 cm) uygulandı ve daha sonra aynı tampon ile bir 3 mL/dk akış hızında elüte edildi. Her fraksiyondan sonra A280'de protein miktar tayini yapıldı ve β-galaktosidaz enzim aktivitesi belirlendi. Kolondan elde edilen aktif enzim fraksiyonları birleştirilip ultrafiltrasyon ile konsantre edildi.

3.4.6. Enzim Karakterizasyonu

3.4.6.1. Optimum Sıcaklık Tayini

300 mL NB besiyeri hazırlandı, 10 mL bakteri ekimi yapıldıktan sonra 48 saat inkübe edildi. Örnek santrifüj edilip, süpernatant kısmı amonyum sülfatla çöktürme, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon basamaklarından geçtikten sonra jel filtrasyon aşamasındaki numuneden 1 mL alınıp 1:1 oranında seyreltildikten sonra optimum sıcaklığını bulmak için kullanıldı.

30-35-40-45-50-55-60-65-70 °C'de inkübatörlerin sıckalıkları ayrı ayrı ayarlanarak 25 µL substrat, 10 µL enzim(saflaştırılmış β-galaktosidaz) ve 875 µL Tris-HCl Tamponu eklenip 15 dk inkübe edildikten sonra 500 µL Na_2CO_3 reaksiyonu durdurmak için kullanıldı. 405 nm'de spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

3.4.6.2. Optimum pH Tayini

pH 4-5-6-7-8-9-10-11 olacak şekilde sodyum sitrat (pH 4.0-5.0-6.0), Tris –HCl (pH 7.0-8.0-9.0) ve glisin-NaOH (pH 10.0-11.0) 3 farklı tampon hazırlandı. 25 µL substrat, 10 µL enzim (saflaştırılmış β-galaktosidaz) ve 875 µL istenilen pH'da ki tamponlar eklenip 15 dk inkübe edildikten sonra 500 µL Na_2CO_3 reaksiyonu durdurmak için kullanıldı. 405 nm'de spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

3.4.6.3. Termal Stabilitenin Belirlenmesi

Farklı sıcaklıklarda 10 µL enzim(saflaştırılmış β-galaktosidaz) ve 875µL Tris-HCl tamponu 15-30-60-90-120 dk 55 °C'de inkübatörde bekletildi, süresi tamamlanmış olanlara 25 µL substrat eklenerek 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 500 µL Na_2CO_3 reaksiyonu durdurmak için kullanıldı. 405 nm'de spektrofotometre ile ölçümü yapıldı.

3.4.6.4. pH Stabilitenin Belirlenmesi

Farklı pH değerlerinde tamponda 10 µL enzim (saflaştırılmış β-galaktosidaz) 1 saat 55°C'de inkübatörde bekletildi, daha sonra 25 µL substrat eklenerek 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 500 µL Na_2CO_3 reaksiyonu durdurmak için kullanıldı. 405 nm'de spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

3.4.6.5. Elektroforez

Non-denatüre ve denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve jelin hazırlanması:

Çalışmamızda %7'lik jel kullanıldı. Alt jel için 3.5 mL akrilamid/bisakrilamid, 3.75 mL pH 8.8 Tris-HCl, 7.75 mL saf su, 75 µL Amonyum persülfat (APS) 7.5 µL SDS ve 10 µL TEMED eklenip manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı. İki cam levha arasına 4 mL hazırlanan jel eklendi 10- 15 dk katılaşması beklendi. Alt jelin üstüne hava ile temasına engellemek için izobütül katıldı. Üst jel için 520 µL akrilamid/bisakrilamid, 1 mL pH 6.8 Tris-HCl tamponu, 20 µL APS (Amonyum per sülfat) 4 µL SDS, 4 µL TEMED ve 2.44 mL saf su karıştırılarak hazırlandı. Tamamen katılaşan alt jel izobütülden arındırılıp saf su ile yıkandıktan sonra hazırlanan üst jel eklendi. Daha sonra tarak yerleştirildi ve alt jel ile üst jelin birbirine bağlanıp katılaşması için bekletildi.

Elektroforez İşlemi

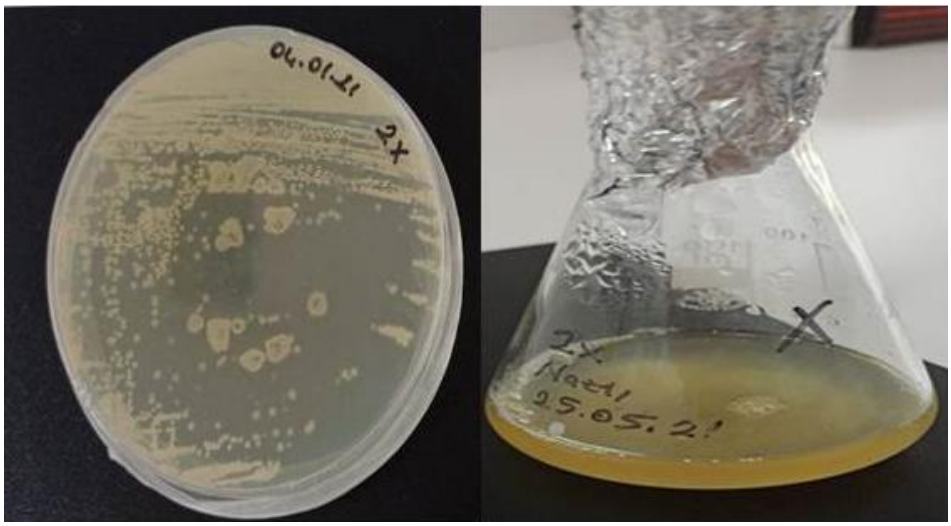
Elektroforez yürütme işlemi için % 7'lik 4 tane jel hazırlandı. Jellerden 2 tanesi non-denatüre için 6-Bromo-2 naftil- β-D-galaktopiranosid (BNG) boyama, diğer 2 tanesi ise denatüre Commasie Brillant Blue boyama için kullanıldı. İki jel için, standart protein [Sigma SDS7B2: triozofosfat izomeraz (26.6 kDa), fumaraz (48.5 kDa), pirüvat kinaz (58 kDa), laktoferrin (90 kDa), β-galaktosidaz (116 kDa), a2-makroglobulin (180 kDa)] 15 µL olarak kullanıldı. Jele örneklerin yüklemesi yapılırken eşit konsantrasyonda olmalarına dikkat edildi. Jel yüklemesi için ham özütten 70 µL, çöktürme ve diyaliz işlemi sonucu elde edilen çözeltiden 30 µL, saflaştırma sonucu elde edilen saf enzimden 70 µL alınarak farklı ependorf tüplerine konuldu ve üzerlerine 10 µL iz boya eklendi. Denatüre ve non-denatüre jel elektroforezi ayrı olarak yapıldı ve denatüre jeldeki örnekler 10 dk kaynatma işlemi yapılarak denatüre edildi. Jeldeki kuyucuklara örnekler sırasıyla yüklendi ve 150 V (25 mA) akım verilerek elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Jellerden non- denatüre olan jel; BNG boyama için %10 metanol içeren 0.1 M Tris-HCl pH 7.0'de %0.025 BNG'de 55 °C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonunda jel, distile suda hazırlanan %0.125'lik Diazo-blue çözeltisinde 2-5 dk süre ile bekletildi. Aktif enzimin mevcudiyeti jelde mor bir bandın oluşmasıyla

tespit edildi. Fikse etmek için jel %75'lik asetik asit içine alındı. Denatüre jel ise 2 gr Commasie Brillant Blue R-250 500 mL % 50'lik metanol, % 10'luk glasiyal asetik asit ve 400 mL saf sudan oluşan solüsyonda 24 saat inkübe edildi. Daha sonra 50 mL metanol (%5'lik), 70 mL glasiyal asetik ait (%7'lik), ve 880 ml saf sudan oluşan boya yıkama solüsyonunda boya çıkıncaya kadar yıkandı. Enzim saflaştırıldıktan sonra proteine ait molekül ağırlığı standart protein marker kullanılarak hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri Büyüme Ortamı

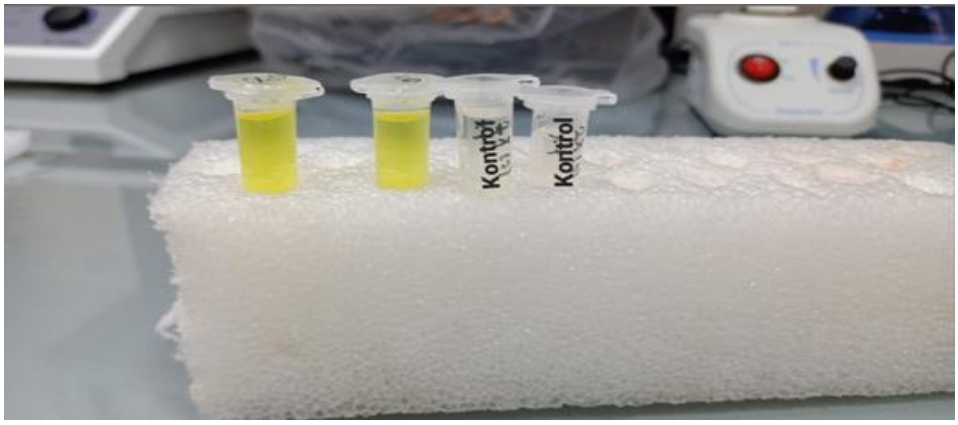
Bu çalışmada Çermik sıcak su kaynağından önceden izole edilen ve tanımlanan termofilik *G. vulcani* 2Çx suşuna ait β-galaktosidazın termostabil olması, bu enzimin bol miktarda üretilmesinden dolayı kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *G. vulcani* 2Çx suşu katı ve sıvı kültürü

4.2. β-Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti

Termofilik *G. vulcani* 2Çx suşu hem intraselüler hem de ekstraselüler β-galaktosidaz enzimin varlığını tespit etmek için 50 °C'de 48 saat üretildi. β-galaktosidaz aktivite tayini, *o*NPG substratı kullanılarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. β-Galaktosidaz enzimi *o*NPG (*o*-nitrofenil-beta-D-galaktosid) substratına etki ederek sarı renkli *o*NP (ortonitrofenol) ürününün açığa çıkmasını sağlamıştır. Reaksiyon tüplerinde sarı renk oluşumu Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Bir Ünite β-galaktosidaz enzim aktivitesi, materyal ve metot kısmında açıklandığı gibi belirli pH ve sıcaklık baz alınarak bir dakikada gösterilen aktivite olarak hesaplanmıştır. *G. vulcani* 2Çx suşunun intraselüler ve ekstraselüler özütüne *o*NPG (substrat) eklenerek reaksiyon sunucunda *o*NP'nin (ürün) açığa çıkması ile sarı renk oluşan tüp ve *o*NPG eklenmeyen tüp (kontrol) Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. β-Galaktosidaz enziminin varlığının tespiti

Enzim aktiviteleri 420 nm'de okunarak, elde edilen absorbans değerlerini o-nitrofenol (ürün) konsantrasyonlarına dönüştürmek için, *o*NPG için elde edilen 4.376 mM^{-1} cm^{-1} değerindeki Ekstinsin sabiti (ε) kullanıldı. Aşağıdaki formül spesifik aktiviteyi hesaplamak için kullanılmıştır.

$$u = \frac{A420x\ SF}{\varepsilon\ x\ t}\ x10^3$$

U : Ünite enzim

A420: 420 nm'deki absorbans

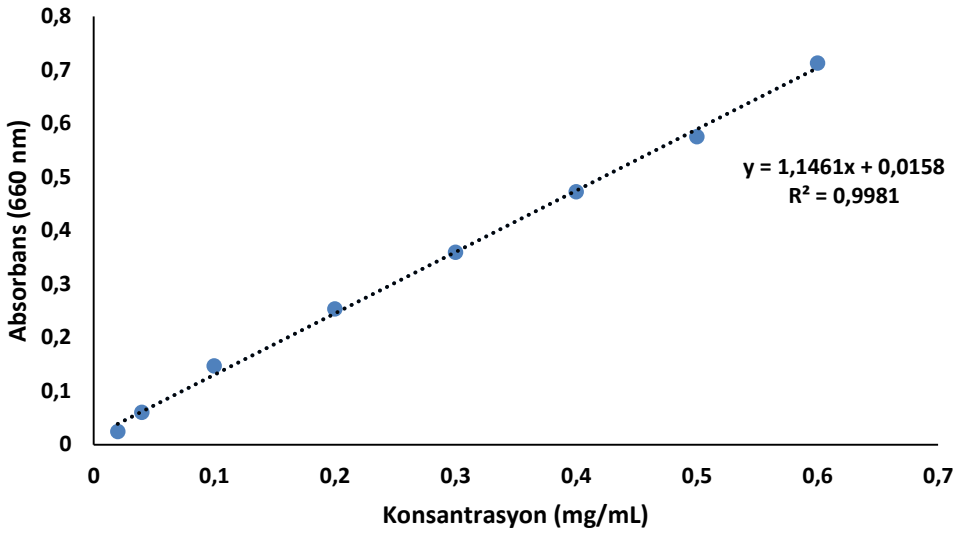
SF : Seyretme faktörü

E : Ekstinsin sabiti

t : Enzim aktivitesi için geçen inkübasyon zamanı(dakika cinsinden)

Bir miligram (mg) proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilmektedir

Spesifik aktivite= U/mg protein olarak hesaplandı.



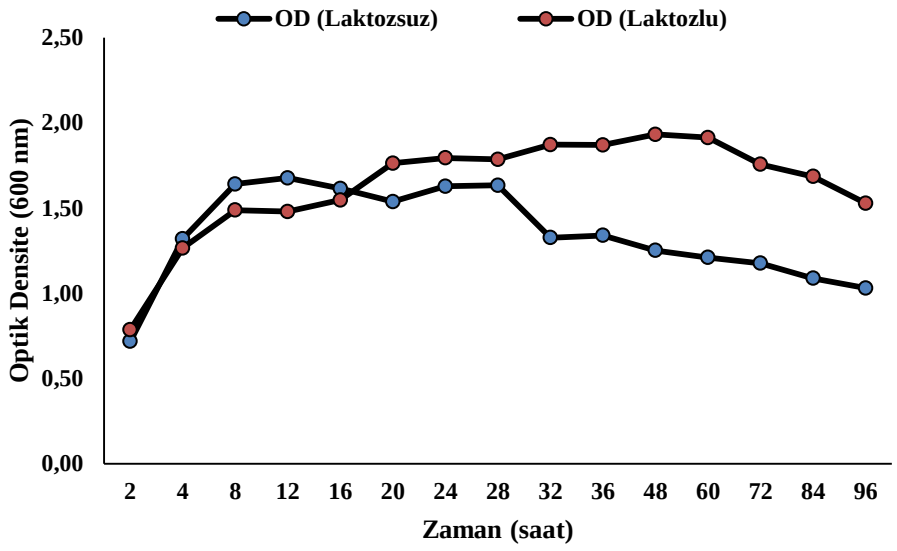
Şekil 4.3 Lowry için BSA standart grafiği

Şekil 4.3.'de Protein miktar tayini için Lowry metoduna göre BSA standart grafiği oluşturulmuş. Şekil 4.3.2 de görüldüğü gibi grafik eğiminde çıkan denklem y = 1,1461x + 0,0158 ve R^2 değeri ise 0,9981 bulunmuştur. Konsatrasyonunu bilmediğimiz örneğin konsantrasyonu bilinen çözeltiden elde edilen grafikle konsantrasyonu hesaplandı.

4.3.Laktozlu ve Laktozsuz Ortamda Zamana Bağlı Bakteri Çoğalması

4.3.1. Bakteri Üretimi Üzerine Laktoz Etkisi

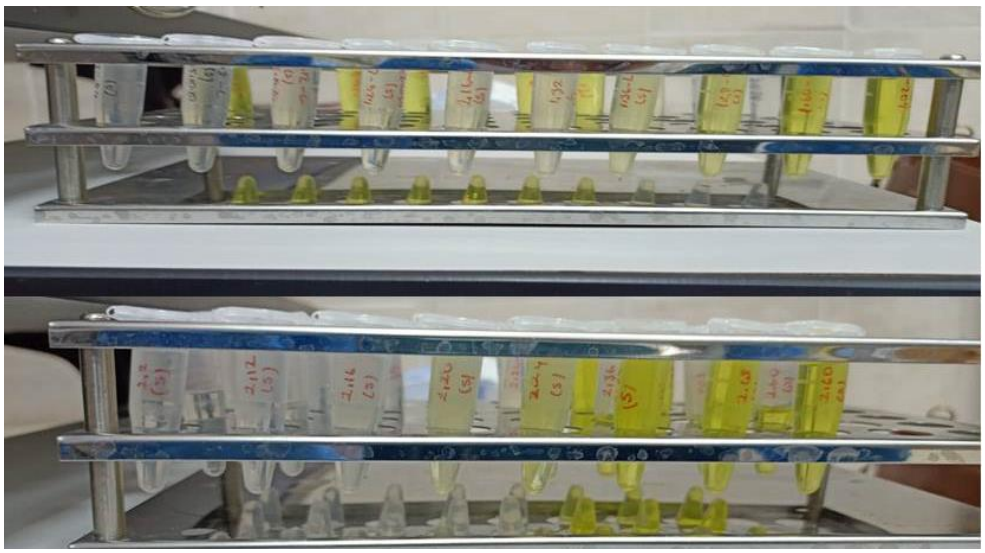
G. vulcani 2Çx suşu laktozun bakteri üremesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla (%2'lik) laktozlu ve laktozsuz besiyerlerinde 4-96 saat inkübasyon sürelerinde şekil 4.4'de görüldüğü gibi laktozsuz ortamda bakteri üremesi 8. saatten itibaren başlamış, 12. saate kadar artış gözlemlendi 12. saatten sonra azalış eğilimi göstermektedir. Laktozlu ortamda ise 20. saatten itibaren bakteri üremesi 60. saatte kadar devam etmektedir. 48. saatte maksimuma ulaşmıştır. 48. saatten sonra azalma eğilimi göstermektedir.



Şekil 4.4. Laktozun bakteri üretimine etkisi

4.3.2. Ekstraselüler ve İntraselüler β-galaktosidaz Üretimine Laktoz Etkisi

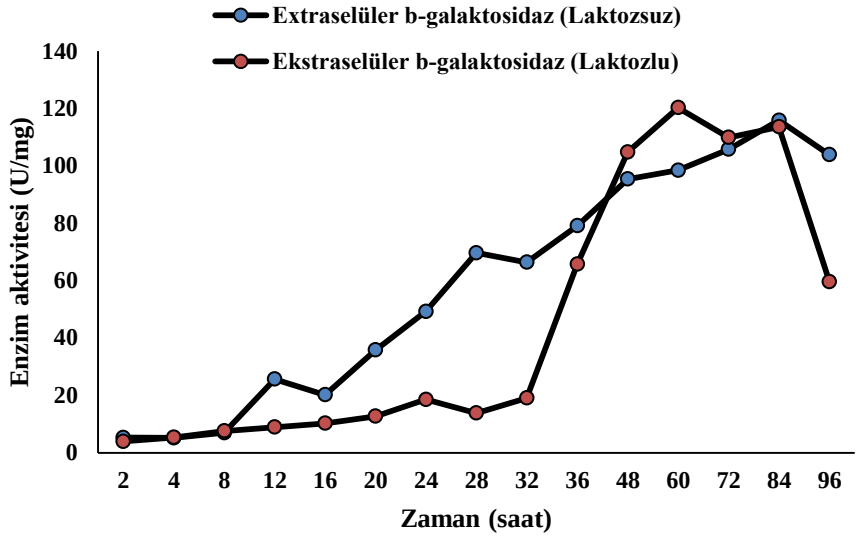
G. vulcani 2Çx suşu β-galaktosidaz aktivitesi için laktozlu (%2'lik) ve laktozsuz ortamda 4-96 saat inkübasyon sürelerinde üretimi gerçekleştirildi.



Şekil 4.5. Laktozun zamana bağlı enzim üretimine etkisi

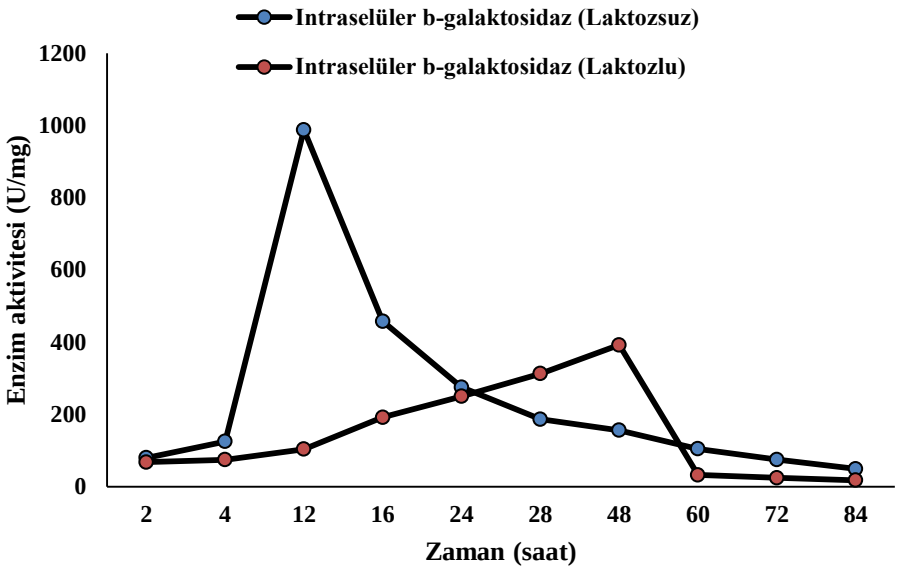
Laktozlu ve laktozsuz ortamda ekstraselüler β-galaktosidazın spesifik aktivitesi zamana bağlı (4-96 saat) olarak değerlendirildi (Şekil 4.5.). Laktozsuz ortamda enzimin aktivitesi 20. saatten itibaren artış göstermiştir ve 84. saatte kadar artış devam

etmektedir. 84. saatte en yüksek değere (113.5 U/mg) ulaşmış ve sonra düşüş eğiliminde olduğu gözlemlendi. Laktozlu ortamda 32. – 60. saat aralığına kadar artış devam etmekte ve 60. saatte en yüksek değeri (120.2 U/mg) kaydedildi. 96. saatte kadar da azalış eğilimine girdiği gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Laktozun zamana bağlı ekstraselüler β-galaktosidaz enzimi üzerine etkisi

Şekil 4.7'de 2.-84. Saat aralığında yapılan zamana bağlı laktozlu ve laktozsuz inraselüler β-galaktosidaz enzimin spesifik aktivitesi grafikte görüldüğü üzere laktozsuz besi yerinde aktivitesi 12. saatte en yüksek değere (987.6 U/mg) ulaşmakta ve 12. saatten sonra dereceli olarak 84. saate kadar düşüş gerçekleştiği gözlemlendi. Laktozlu ortamda ise 2-48. saat aralığında dereceli bir artış göstermekte ve enzim üretimi 48. saate maksimum değere (392.2 U/mg) ulaşdı. 48. saatten sonra enzim üretiminde düşüş gerçekleştiği gözlemlendi.



Şekil 4.7. Laktozun zamana bağlı intraselüler β-galaktosidaz enzimi üzerine etkisi

4.4. Enzimin Saflaştırılması

G. vulcani 2Çx bakterisi 50 ºC'de 48 saat inkübe edilip süre sonunda santrifüj edilerek süpernatant kısmı elde edilerek saflaştırma aşamalrı için kullanıldı. Enzim saflaştırma adımları şu sırasıyla yapılmıştır: amonyum sülfatla çöktürme, jel geçirgenlik (filtrasyon) kromatografisi ve elektroforez.

Amonyum Sülfatla Çöktürme ve Diyaliz Sonrasında Enzim Spesifik Aktivitesi ve Verimlilik

Şekil 4.8'de santrifüj sonrası ham ekstraktta total protein total aktivitesi 882.6 mg/mL, total enzim aktivitesi 36957.6 U, spesifik aktivite 41.87 U/mg ve saflaştırma katsayısı 1 olarak hesaplanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi adımında total protein total aktivite 7.0 mg/mL, total enzim aktivitesi 7191.3U, spesifik aktivite 1033.6 U/mg ve saflaştırma katsayısı 24.6 olarak bulunmuştur. Jel filtrasyon kromatografisi sonunda total protein total aktivite 0.2 mg/mL, total enzim aktivitesi 1539.9 U, spesifik aktivitesi 8651.4 U/mg ve saflaştırma katsayısı 8.37 olarak hesaplandı (Tablo 4.1).



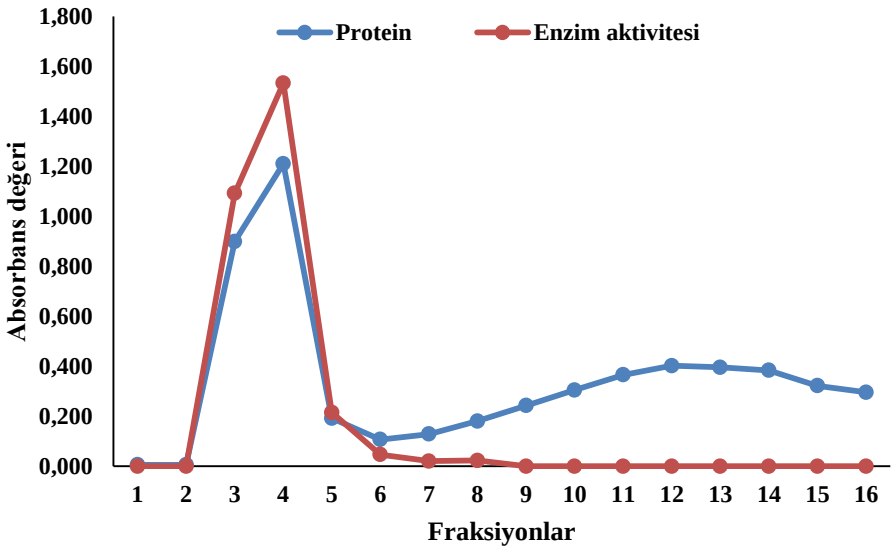
Şekil 4.8.Amonyum sülfat ile çöktürme işlemi

Çizelge 4.1. *G.vulcani* 2Çx'e ait β-galaktosidaz saflaştırma adımları

Saflaştırma adımları	Total protein total aktivite (mg/mL)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham ekstrakt	882.6	36957.6	41.87	1	100
Çöktürme&Diyaliz	7.0	7191.3	1033.6	24.6	19.46
Jel filtrasyon (sephadex G-75)	0.2	1539.9	8651.4	206.6	4.17

Jel Filtrasyon

G. vulcani 2Çx'e ait doğal ekstraselüler β-galaktosidazın jel geçirgenlik kromatografisiyle (Sephadex G-75) elde edilen fraksiyonların protein miktarı sonuçları A_{280}'de ölçülerek, enzim aktivite sonuçları ise ile A_{405}'de ölçülerek sonuçlar Şekil 4.9.'de gösterilmektedir.



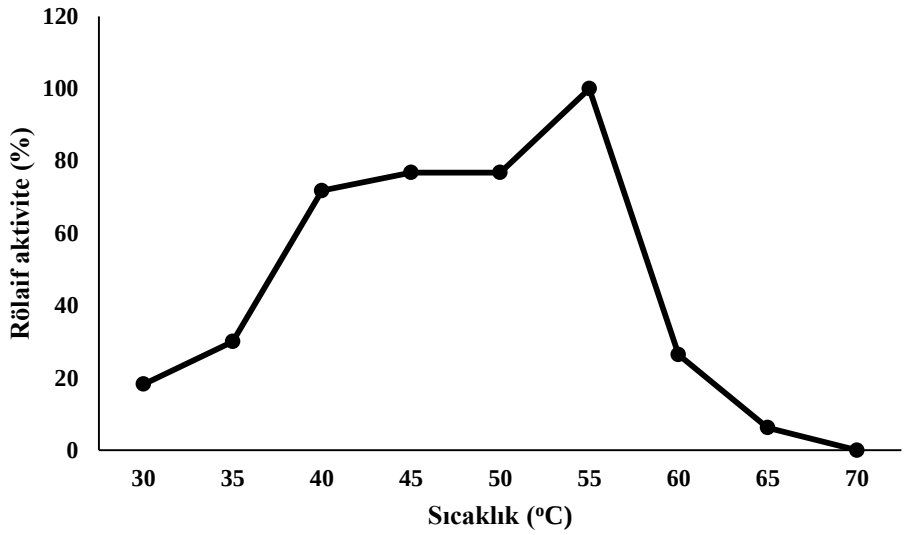
Şekil 4.9. Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar

Şekil 4.9'da ki grafikte görüldüğü gibi *G. vulcani* 2 Çx suşundan elde edilen ekstraselüler β-galaktosidazın jel geçirgenlik kromatografisinde A_{280}'de ölçülen protein miktarları mavi çizgi gösterilmiştir. A_{405}'de ölçülen enzim aktivitesi ise kırmızı renkle gösterilmiştir. Fraksiyon tüplerinden 3. 4. ve 5.no'lu tüplere proteinlerin fraksiyonlara düştüğü görülmektedir. En yüksek aktivite 4. fraksiyonda görülmektedir. β-Galaktosidaz aktivitesinin yüksek olduğu fraksiyonlarda birleştirildi.

4.5. Sıcaklığın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 30-70 ºC sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilen çalışmada saflaştırma sonrası elde edilen β-galaktosidaz aktivitesinin sıcaklık etkisi değerlendirildiğinde 35-60 ºC arasında aktivite gösterdiği ve enziminin optimum sıcaklığı 55 °C olarak tespit edildi.

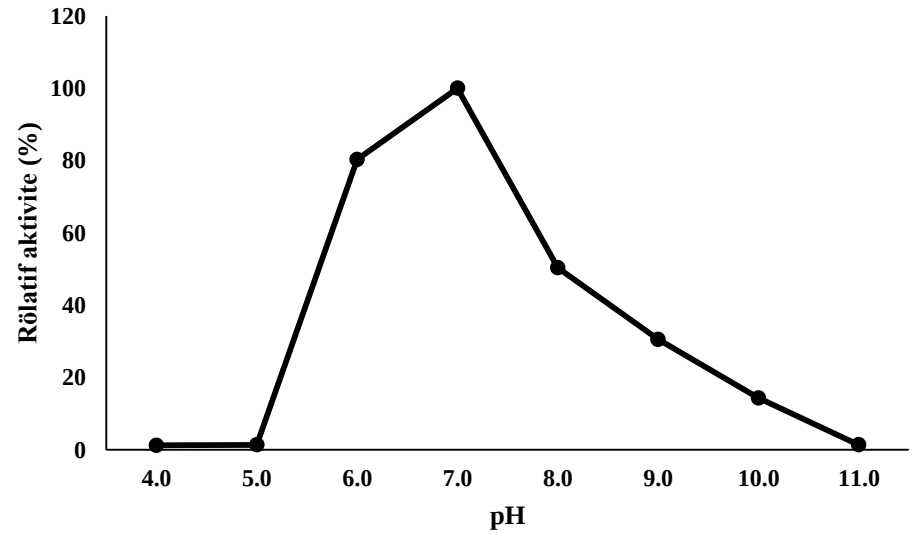
.



Şekil 4.10. Kısmı saflaştırılan β-galaktosidaz üzerine sıcaklık etkisi

4.6. pH'ın β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

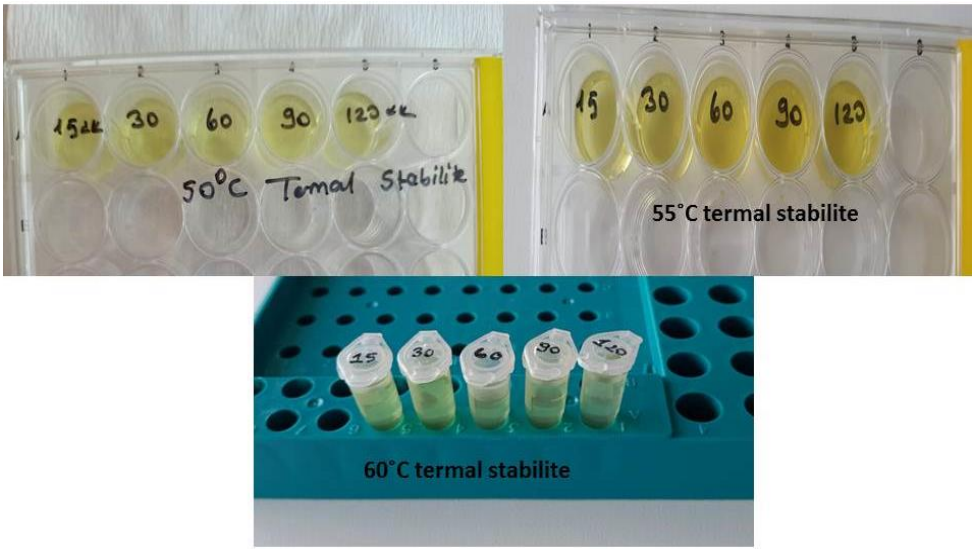
Şekil 4.11'de görüldüğü gibi farklı pH (4.0-11.0) aralıklarında gerçekleştirilen çalışmada saflaştırma sonrası elde edilen β-galaktosidaz optimum sıcaklıkta enzim aktivitesi gerçekleştirildi. Saflaştırılan β-galaktosidaz aktivitesi üzerine pH etkisi değerlendirildiğinde enzimin pH 6.0-10.0 aralığında aktivite gösterdiğini ve optimum pH değeri 7.0 olarak tespit edildi.



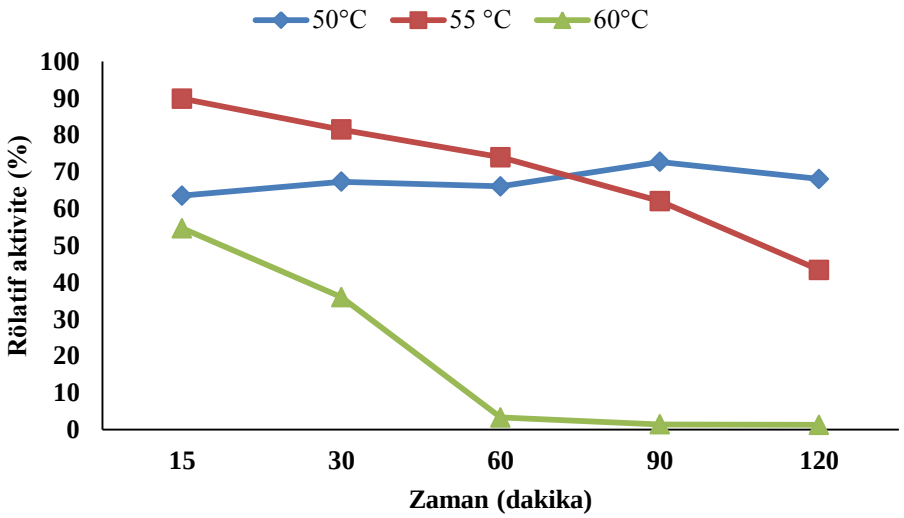
Şekil 4.11. Kısmı saflaştırılan β-galaktosidaz üzerine pH etkisi

4.7. Termal Stabilitenin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de görüldüğü gibi saflaştırma sonrası elde edilen β-galaktosidaz enzim aktivitesinin termal stabilitesi 50-60 ºC arasında 15-120 dakika aralığında incelenmiştir.



Şekil 4.12. Sıcaklığın β-galaktosidaz'ın termal stabilitesine etkisi



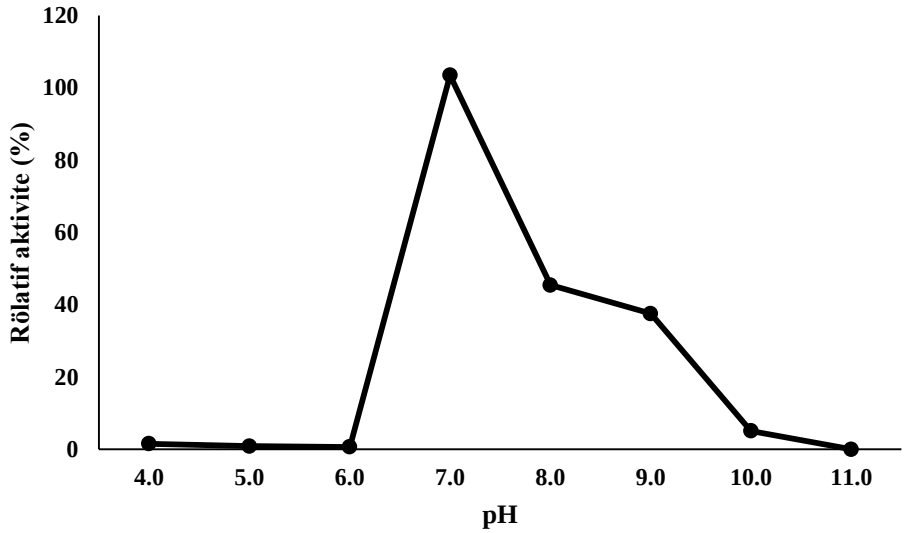
Şekil 4.13. Kısmı saflaştırılan β-galaktosidaz'ın sıcaklık stabilitesi

Şekil 4.13'de 50-60 ºC aralığında enzimin sıcaklık stabilitesini belirlemek üzere 15-120 dk. aralığında farklı sıcaklıklarda bekletilen enzim ve tampon çözeltisine

süreleri tamamlandıktan sonra *o*NPG substratı eklenerek enzim aktivite sonuçları grafikte gösterilmektedir. 50 ºC'de ilk bir saatte aktivitenin %60'larda olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra 90. ve 120. dakikalarda aktivitenin %70 civarına çıktığı tespit edilmiştir. 55 ºC'de ilk bir saate kadar enzim aktivitenin yüksek oranda korunduğu (%73.93), 1 saatten sonra aktivitenin dereceli olarak azaldığı, 120. dk'da ise aktivitenin % 43 oranına düştüğü görülmüştür. 60 ºC'de ise 15. dk'da bekletilen enzimin büyük oranda aktiviteyi kaybettiği (%54,6), 60. dk'da ise tamama yakın kaybettiği görülmüştür.

4.8. pH Stabilitenin β-Galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.14'de görüldüğü gibi saflaştırma sonrası elde edilen β-galaktosidaz enzim aktivitesinin pH stabilitesini belirlemek üzere belli miktarda enzim (10μL) 1 saat süreyle pH 4.0-11.0 aralıklarında bekletildi. Bekletilen enzimlerin aktivitesi ölçüldüğünde pH 4.0-6.0 arasında enzim aktivitesinin 1 saat sonra kaybolduğu, pH 7.0'de aktivitenin korunduğu, pH 8'de aktivitenin %45'nin korunduğu pH 9'da ise %37.5 oranında korunduğu tespit edilmiştir. pH 10.0-11.0'da ise aktivitenin sıfırlandığı gözlemlenmiştir.

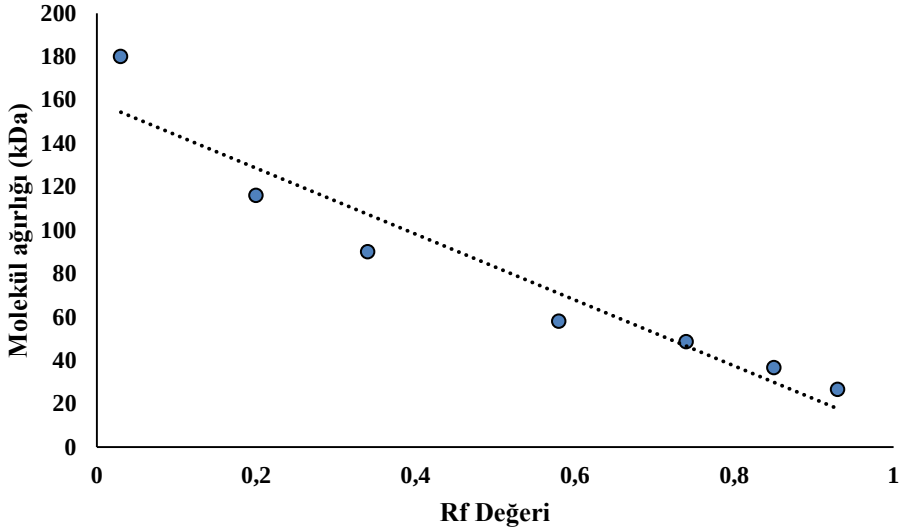


Şekil 4.14. Kısmı saflaştırılan β-galaktosidaz'ın pH stabilitesi

4.9. Elektroforez

Saflaştırmanın her basamağından alınan örneklerin (ham ekstrakt, amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz ve jel geçirgenlik kromatografisi) molekül ağırlığı non-

denatüre ve denatüre PAGE ile belirlendi. β-galaktosidazın moleküler kütle analizi, tek bir protein bandı gösterdi ve moleküler kütlesinin yaklaşık ~104 kDa olduğu bulundu (Şekil 4.16(a)) non-denatüre PAGE (Şekil 4.6b) de aynı yerde görünen tek bir bant gösterdi.

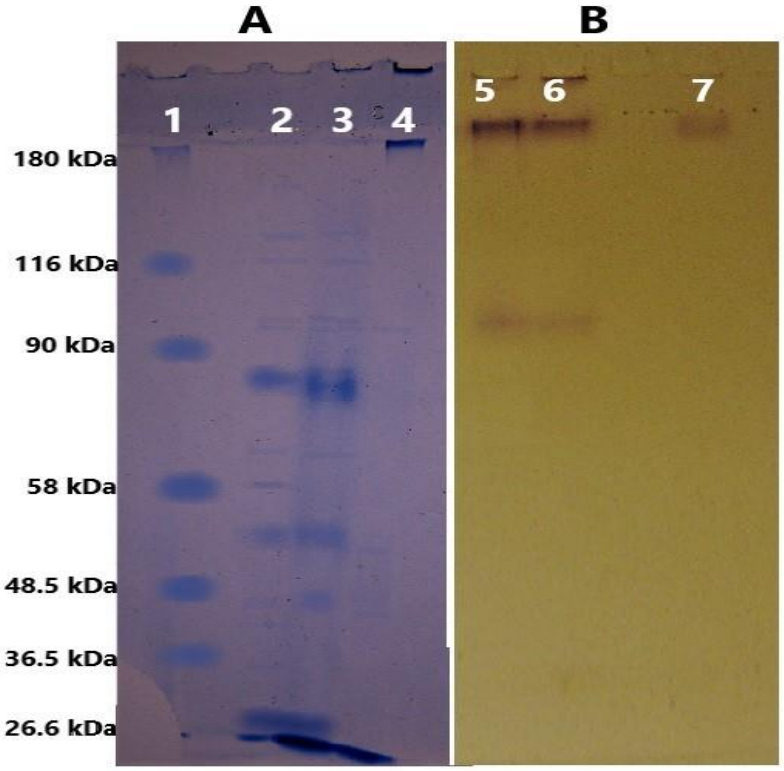


Şekil 4.15. Standart proteinlerin Rf değerleri ve moleküler ağırlıkları

SDS-PAGE elektroforez deneyinde molekül ağırlıkları bilinen standart protein kullanılarak molekül ağırlığını bilmediğimiz saflaştırdığımız proteinin moleküler ağırlığı Şekil 4.15. grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Rf = \frac{proteinin\ aldığı\ yol}{iz\ boyanın\ aldığı\ yol}$$

Yukarıdaki formüle göre molekül ağırlığını hesaplamak için her bir protein için standart protein baz alınarak Rf değerleri hesaplanır. Daha sonra molekül ağırlığı için yarı logaritmik kâğıda çizilip hesaplandı.



Şekil 4.16. Non-denatüre ve denatüre SDS-PAGE ile molekül ağırlığını tespit etme A: Denatüre Jel Elektroforezi 1: [Sigma SDS7B2: a2-macroglobulin (180 kDa), β-galactosidase (116 kDa), lactoferrin (90 kDa), pyruvate kinase (58 kDa), fumarase (48.5 kDa), triosephospate isomerase (26.6 kDa)]; 2: ham ekstrakt, 3: amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz, 4: Sephadex G75, B: Non-denatüre Jel Elektroforezi 5: ham ekstrakt, 6: amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz, 7: Sephadex G75

Molekül ağırlığı standart proteinlerin jel üzerindeki hareketlerine bakılarak molekül ağırlığını bilmediğimiz saflaştırılmış proteinin BNG boya ile elde edilen bant ile SDS-PAGE'de aynı yere denk gelen banttın molekül ağırlığı ~104 kDa olarak hesaplandı ve enzimin iki alt birimden oluştuğu gözlemlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

β-Galaktosidaz laktozun hidrolizini katalizleyen ayrıca polimerler, oligosakkaritler ve ikincil metabolitlerdeki D-galaktosil kalıntılarını hidrolize eden bir enzimdir. Bu enzim eksikliğine bağlı gelişen süt ve süt ürünlerinden kaynaklı rahatsızlıkları düzeltmek için gıda sektöründe potansiyel bir öneme sahiptir. β-Galaktosidaz; sağlık başta olmak üzere gıda endüstrisi, çevre, biyoteknolojik uygulamalar ve biyosensör uygulamaları gibi geniş kullanıma alanına sahip bir enzimdir (Nivetha ve ark. 2017). Özellikle biyoteknolojik yöntemlerde ekonomik açıdan daha avantajlı olan mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

Bu çalışmada Diyarbakır ili Çermik ilçesinden sıcak su kaynaklarında daha önceden izole edilen *G. vulcani* 2Çx suşu β-galaktosidaz'ı fazla miktarda üretmesinden dolayı kullanıldı. Ayrıca literatürde *G. vulcani* 2Çx bakterisiyle β-galaktosidaz'ın saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili bir çalışma olmadığı için önem arz etmektedir. Daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan elde edilen β-galaktosidaz'ın saflaştırma ve karakterizasyonu çalışmaları mevcuttur.

Çalışmada, laktozlu ve laktozsuz ortamda bakteri üremesi ve laktozun enzim üzerine etkisi değerlendirmek için %2'lik laktoz kullanılmıştır ve 4-96 saat zaman aralıklarında gerçekleşmiştir. Çalışmada laktoz varlığında bakteri çoğalması ile enzimin indüklenmesi arasında bir ilişki belirlenmemiştir. Daha önceki çalışmalarda Maciuńska ve ark. (1998), *Thermus thermophilus* hücrelerinde en yüksek β-galaktosidaz aktivitesi için ortama %2 laktoz eklendiğinde aktivitenin %33 arttığını, Gül Güven ve ark. (2011), termoasidofilik *Alicyclobacillus acidocaldariusrittmannii* ait β-galaktosidazı 6-40 saat boyunca laktoz varlığında ve yokluğunda büyütülen bakteri hücrelerinden elde edilen ham özütlerin β-galaktosidaza spesifik aktiviteleri yaklaşık %85'i kadar bir artış olduğu hesaplanmıştır. Shaikhan (2020), *Enterobacter* sp. 3TP2A suşunda %1'lik ve %2'lik laktozun 3-72 saat aralıklarında bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini hesaplamıştır. Laktozun bakteri üremesi ve β-galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla kullanılmıştır.

Çeşitli mikroorganizmalardan termofilik β-galaktosidaz enzimi saflaştırması üzerine daha önceden de yapılmış çalışmalar mevcuttur. Harada ve ark. (1994)

Saccharopolyspora rectivirgula suşu V2-2 hücre dışı β-galaktosidazını, Gül Güven (2007*) Alicyclobacillus acidocaldariusrittmanni*i'den elde edilen hücre içi bir β-galaktosidazı, Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus* WB600 suşuna ait β-galaktosidazı, Matpan Bekler (2012) *Bacillus licheniformis* KG9 suşuna ait β-galaktosidazı, Obedidat ve ark. (2014) termofilik *Geobacillus* türlerinden elde edilen β-galaktosidazı, Coşgunaras (2019) *Bacillus licheniformis'*e ait β-galaktosidazı saflaştırıp çalışmalarında kullanmışlardır. Termal kaynaklardan elde edilen β-galaktosidaz'ın ticari açıdan daha geniş alanlarda uygulanabilmesinden dolayı tercih edilmektedir. *G. vulcani* 2Çx suşundan ekstraselüler elde edilen termofilik β-galaktosidaz yüksek aktiviteye sahip olmasından ve mikrobiyal kontaminasyon riskinin düşük olmasından dolayı tercih edilmiştir. Bakterinin optimum üreme zamanı laktozlu ortamda 48.saat olarak tespit edilirken laktozsuz ortamda 12. saate olarak gözlemlendi (Şekil 4.5.). Ekstraselüler enzim aktivitesi laktozlu ortamda 60. saatte, laktozsuz ortamda ise 84. saatte en yüksek aktiviteye (Şekil 4.6.), intraselüler enzim aktivitesinin ise laktozlu ortamda 48. saatte, laktozsuz ortamda ise 12. saatte en yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.7.). Ekstraselüler β-galaktosidaz'ın laktozlu ve laktozsuz ortamlarda aktiviteleri karşılaştırıldığında laktozun enzim aktivitesi üzerine yüksek oranda bir artışı olmamasından ve ekonomik açıdan avantaj sağlayacağını düşünerek laktozsuz ortamda çalışmalara devam edilmiştir.

G. vulcani 2Çx suşunun termofilik, ekstraselüler, β-galaktosidaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ve jel filtrasyon (Sephadex G-75) saflaştırma adımları ile kısmen saflaştırıldı. Saflaştırılan β-galaktosidaz'ın saflaştırma kat sayısı 206.6, verim %4.17, total aktivite 1539.9 U, total protein 0.2 mg/mL ve spesifik aktivite 8651.4 U/mg olarak belirlendi.

Gül Güven ve ark. (2011), termoasidofilik *Alicyclobacillus acidocaldariusrittmannii*'den elde edilen hücre içi bir β-galaktosidaz'ın, 163 kat saflaştırma ve %8 verim ile 113 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Matpan Bekler (2012) amanyum sülfatla çöktürme, jel filtrasyon ve affinite kromotografi kullanarak; *B. licheniformis* KG9'a ait β-galaktosidazın saflaştırma kat sayısını 9.4, verimini %85 ve saf enzimin spesifik aktivitesinin 1230 U/mg, olduğunu belirtmiştir. Chanalia ve ark. (2018), probiyotik *Pediococcus acidilactici*'den elde ettikleri β-galaktosidaz'ı amonyum sülfat fraksiyonasyonu ve

Sephadex G-100 ve Q-Sepharose üzerinde ardışık kromatografiler kullanılarak saflaştırarak, 0.883 U/mg spesifik aktivite ve %28.26 verim ile 3.06 kat saflaştırmışlardır. *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus'tan elde edilen β-galaktosidazın spesifik aktivitesi 592 U/mg, verimi %46 olarak elde edilmiştir. (Chang ve Mahoney, 1989). Chakraborti ve ark. (2000), *Bacillus* sp. MTCC 3088'den elde ettikleri β-galaktosidazın saflaştırma kat sayısını 36.2, verimi %12.7 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamız da β-galaktosidazı 206.6 kat saflaştırlarıldı.

Çalışmamızda *G. vulcani* 2Çx suşuna ait saflaştırılan β-galaktosidazın optimum sıcaklığı 55 ºC olarak belirlendi (Şkeil 4.10). Termal stabilitenin 50 ºC'de 60 dk.'ya kadar aktivitenin %60'larda olduğu 90. ve 120. dakikalarda aktivitenin %70 civarınaçıktığı belirlendi. 55 ºC'de 15-60 dk aralıklarında enzim aktivitenin yüksek oranda (%73,93) korunduğu 60. dk'dan sonra ise aktivitenin kademeli olarak azaldığı tespit edildi. 60 ºC'de ise ilk 15.dk içinde aktivitesini azaldığı (%54,6) kaybettiği, 60.dk'da ise tamama yakın kaybettiği tespit edildi (Şekil 4.13). Önceki çalışmalar ile kıyaslandığında enzimin genel olarak 40-65 ˚C ve pH 6.0-8.0 aralığında optimum olarak çalıştığı belirlenmiştir. Çalışmamızda da bu değerler içinde olduğu belirlenmiştir.

Levin ve ark. (1985), *B. coagulans* suşu L4'e ait β-galaktosidazın optimum sıcaklığını 55 °C olarak tespit etmişlerdir. Torres ve ark. (1995*) B. Subtilis* ait β-galaktosidaz enziminin optimum sıcaklığını 50 ºC olarak belirtmişler. Li ve ark. (2009) *Bacillus megaterium* 2–37–4–1 suşuna ait β-galaktosidaz'ın optimum sıcaklığını 55 ºC bulmuşturlar. Gezgin (2012), *Thermus oshimai* DSMZ 12092'ye ait β-galaktosidazınoptimum sıcaklığını 75 ºC bulunmuştur. Chanalia ve ark. (2018) probiyotik *Pediococcus acidilactici*'ye ait β-galaktosidaz enzimini optimum sıcaklığını 50 ºC değerlendirmişler. Liu ve ark. (2019) *E. coli'*de *Bacillus coagulans* NL01'den eksprese edilen bir termostabil β-galaktosidaz'ın optimum sıcaklığını 55 ila 60 °C olarak gözlemlemiş ve 60 °C'de 3.5 saatlik bir yarı ömre sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Gıda proseslerde ve süt endüstrilerinde enzimlerin yüksek sıcaklıklarda dirençlilik göstermesi biyoteknoloji de aranan özelliklerindedir.

Çalışmamızda *G. vulcani* 2Çx suşuna ait saflaştırılan β-galaktosidazın optimum pH'sı 7.0 olarak tespit edilmiş olup (Şekil 4.14), 15-60 dk aralığında pH stabilitenin pH 7.0 da yüksek oranda korunduğunu gözlemledik (Şkeil 4.14). Alkali ortamda laktozun

hidrolizi asit ortama oranla çok daha kolay ve hızlı olur ancak pH'nın asla 7.0'ın üzerine çıkmamasına özen gösterilmelidir. Yapılan çalışmalarda süt ürünlerinde (pH 5.5-7.0) nötral pH 'nın laktozun parçalanmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada elde edilen pH 7.0 değerinde olduğu için süt ve süt ürünleri endüstrisinde ve laktoz hidrolizi gibi işlemlerde kullanılabilmektedir.

Chakraborti ve ark. (2003) termofilik *Bacillus polymxia*'ait β-galaktosidaz optimum pH 7.0, Chen ve ark. (2008) *Bacillus stearothermophilus'*a ait termostabil β-galaktosidaz'ın optimum pH'sını 7.0, Li ve ark. (2009) *Bacillus megaterium* 2–37–4–1 suşuna ait β-galaktosidaz'ın optimum pH'sını 7.5-8.0 olarak rapor etmişlerdir. Xu ve ark. (2021) *Bacillus coagulans* T242 suşuna ait termostabil β-galaktosidaz'ın optimum pH'sını 6.8 olarak tespit etmişlerdir. Maciuńska ve ark. (1998), *Thermus thermophilus* hücrelerinde elde edilen β-galaktosidaz optimum pH'sını 6.6 olarak belirtmişlerdir. Boudjema ve ark. (2016), *Kluyveromyces marxianus* DIV13-247 ait β-galaktosidaz'ın optimum pH'sını 5.0 olarak belirtmiş. Matpan Bekler ve ark. (2017), *Anoxybacillus* sp. KP1 ait termostabil β-galaktosidaz'ın optimum pH''sını ve stabilitesini pH 9.0 olarak tespit etmişler.

Yaptığımız çalışmada *G. vulcani* 2 Çx suşuna ait saflaştırılan ekstraselüler termofilik β-galaktosidazın moleküler ağırlığı denatüre ve non-denatüre PAGE ile yaklaşık 104 kDa olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

Matpan Bekler (2012) *B. licheniformis* KG9'a ait β-galaktosidazın molekül ağırlığı non-denatüre PAGE ile yaklaşık 90 kDa, Murphy ve ark. (2020), termoasidofil *Alicyclobacillus vulcanalis* DSM 161762'dan saflaştırılan β-galaktosidazın moleküler ağırlığını SDS-PAGE denatüre (83.7 kDa) ve non-denatüre (179 kDa) olarak, Chanalia ve ark. (2018), probiyotik *Pediococcus acidilactici*'den saflaştırılan β-galaktosidaz'ın moleküler ağırlığını SDS-PAGE ve MALDI-TOF ile yaklaşık 39.07 kDa olarak tespit etmişlerdir. Shaikhan ve ark. (2020), *Enterobacter* sp. 3TP2A elde edilen β-galaktosidazın molekül ağırlığı non-denatüre PAGE ile tek bir bant ile 60 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Chakraborti ve ark. (2000) *Bacillus* sp. MTCC 3088'den elde edilen β-galaktosidazın molekül ağırlığını Sephadex G-200 dolgulu kolon üzerinde jel filtrasyonu ile ~484 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmada *Geobacillus* türüne ait bir suş kullanıldığı için bu türe ait bakterilerin molekül ağırlığını değerlendirmek için Uniport data banka (https://www.uniprot.org/) girdiğimizde değişik *Geobacillus*ların: *Geobacillus kaustophilus* (gen erişim numarası: P19668) *bgaB* geni çalışılarak molekül ağırlığını ~78 bulunmuştur. Diğer çalışmada *Geobacillus stearothermophilu*s (*Bacillus stearothermophilus*) (gen erişim numarası: F8TRX0) *ganB* geni çalışmışlar ve molekül ağırlığını ~80 bulunmuştur. *Geobacillus termodenitrificans* (gen erişim numarası: A0A291I5N3) *bgaA* geni çalışılmış ve molekül ağırlığı 78.821 olarak bulunmuştur. *Geobacillus termoleovorans* B23 (gen erişim numarası: A0A098L4U9) B23_3033 geni çalışılmış ve molekül ağırlığı 81.057 olarak bulunmuştur. *Geobacillus thermocatenulatus* (gen erişim numarası: Q5I201) molekül ağırlığı 78.052 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda *G. vulcani* 2Çx suşundan elde edilen ekstraselüler termofilik β-galaktosidaz amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz ve ultrafiltrasyon ve sephadex G-75 saflaştırma aşamalarından sırasıyla geçilerek ham enzim eld edildi. *G. vulcani* 2Çx ait β-galaktosidaz'ın 50-60 ºC'de aktivite gösterdiği en yüksek aktiviteyi ise 55 ºC'de gösterdiği ve 55 ºC'de ilk bir saate kadar aktivitesini %73 oranında koruduğu tespit edildi. Optimum ve stabil pH 7.0 olarak tespit edildi. Saflaştırılan ekstraselüler β-galaktosidaz'ın moleküler ağırlığını tespit etmek için denatüre ve non-denatüre SDS PAGE kullanılarak moleküler ağırlığı ~104 kDa olarak tespit edildi. Elde ettiğimiz enzimin yüksek sıcaklıkta ve geniş pH aralıklarında aktivite göstermesi ve yüksek oranda stabil olmasından dolayı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir. Sıcaklığa dirençli olması, mikrobiyal kontaminasyon riskinin olmaması ve nötral pH'da çalışması farklı enzim endüstrilerinde *Geobacillus* türlerine ait biyoteknolojik uygulamalarda endüstriyel olarak geliştirilebilir.

Elde edilen sonuçlara göre aşağıda verilen çalışmalar önerilebilir:

1- *G. vulcani*'e ait termofilik β-galaktosidaz *E. coli'*ye aktarılıp gen klonlama çalışmaları yapılabilir.

2- Farklı metaller üzerine etkisi ve substrat kinetiği çalışılabilir.

6. KAYNAKLAR

Abdollahi, P., Ghane, M., & Babaeekhou, L. (2021). Isolation and characterization of Thermophilic bacteria from Gavmesh Goli hot spring in Sabalan geothermal field, Iran: Thermomonas hydrothermalis and Bacillus altitudinis isolates as a potential source of Thermostable Protease. ***Geomicrobiology Journal***, *38*(1), 87-95.

Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. ***Biomolecules,*** *4*(1), 117-139.

Akkaya, A., & Pazarlıoğlu, N. (2012). 21. yüzyılın anahtar teknolojisi: Beyaz biyoteknoloji. ***Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi***, *1*(1), 22-33.

Akkaya, S. E., & Kıvanç, M. (2009). Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram Negatif Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri1. ***Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*** *TR*, *7*, 1-01.

Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. ***Bioresource technology***, *280*, 478-488.

Aytaç, F. 2012. ß-galaktozidazın farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Bartesaghi, A., Matthies, D., Banerjee, S., Merk, A., & Subramaniam, S. (2014). Structure of β-galactosidase at 3.2-Å resolution obtained by cryo-electron microscopy. ***Proceedings of the National Academy of Sciences,*** *111*(32), 11709-11714.

Bektaş, K. İ. Glikoz İzomeraz Üreticisi Dört Geobacillus Suşunun İzolasyonu ve Moleküler Metotlar Kullanarak Tanımlanması. ***Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, *8*(2), 299-308.

Burin, L., Buera, M. P., Hough, G., & Chirife, J. (2002). Thermal resistance of β-galactosidase in dehydrated dairy model systems as affected by physical and chemical changes. ***Food chemistry,*** *76*(4), 423-430.

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 and Biotechnology,*** *24*(1), 58-63.

Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., & Dhanda, S. (2018). Purification and characterization of β-galactosidase from probiotic Pediococcus acidilactici and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. ***Bioorganic chemistry***, *77*, 176-189.

Chang, B. S., & Mahoney, R. R. (1989). Purification and thermostability of β-galactosidase (lactase) from an autolytic strain of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus. ***Journal of dairy research,*** *56*(1), 117-127.

Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. ***Catalysts,*** *8*(6), 238.

Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., & Zhang, H. (2008). Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from Bacillus stearothermophilus. ***Journal of Dairy Science***, *91*(5), 1751-1758.

Coolbear, T., Daniel, R. M., & Morgan, H. W. (1992). The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. ***Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells,*** 57-98.

Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., & Logan, N. A. (2012). Taxonomic revision of the genus Geobacillus: emendation of Geobacillus, G. stearothermophilus, G. jurassicus, G. toebii, G. thermodenitrificans and G. thermoglucosidans (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of Bacillus thermantarcticus to the genus as G. thermantarcticus comb. nov.; proposal of Caldibacillus debilis gen. nov., comb. nov.; transfer of G. tepidamans to Anoxybacillus as A. tepidamans comb. nov.; and proposal of Anoxybacillus caldiproteolyticus sp. nov. ***International journal of systematic and evolutionary microbiology***, *62*(7), 1470-1485.

Coşgunaras, E. 2019. Termofilik Bacillus licheniformis bakterisinden β-galaktosidaz enzim üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

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***, *26*(10), 1141-1145.

Cruz, R., Cruz, V. D. A., Belote, J. G., de Oliveira Khenayfes, M., Dorta, C., dos Santos Oliveira, L. H., ... & Galli, A. (1999). Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from Penicillium simplicissimum. ***Bioresource technology***, *70*(2), 165-171.

Çelik, N. 2006. Bacillus clausii GMBAE 42'den saflaştırılan 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 saflaştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Dönmez, S. (1987). Ekstrem Termofilik Mikroorganizmalar ve Biyoteknolojide Uygulama Olanakları. ***Gıda***, *12*(6).

Gezgin, Y. 2012. Thermus oshimai DSMZ 12092'ye ait β-galaktosidazın kısmi karakterizasyonu ile transferaz aktivitesinin belirlenmesi ve β-galaktosidaz geninin E.coli'de klonlanması. Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Grosova, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised β-galactosidase in food industry–a review. ***Czech Journal of Food Sciences***, *26*(1), 1.

Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2017). An introduction to biotechnology. In ***Basic and Applied Aspects of Biotechnology*** (pp. 1-21). Springer, Singapore.

Gül Guven, R., Kaplan, A., Guven, K., Matpan, F., & Dogru, M. (2011). Effects of various inhibitors on β-galactosidase purified from the thermoacidophilic Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. Rittmannii isolated from Antarctica. ***Biotechnology and Bioprocess Engineering***, *16*(1), 114-119.

Gül Güven, R. 2007. Sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, Tanımlanması ve alıcyclobacıllus acıdocaldarıus Subsp. Rıttmanıı'nın b-galaktozidaz enziminin saflaştırılması Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü

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

Gümüş, N. 2012. Endospor oluşturan bazı termofilik bakteri izolatlarında alfa-galaktosidaz ve beta-galaktosidaz aktivitelerinin incelenmesi ile kısmi karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Han, H., Ling, Z., Khan, A., Virk, A. K., Kulshrestha, S., & Li, X. (2019). Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. ***Bioresource technology***, *279*, 350-361.

Harada, M., Inohara, M., Nakao, M., Nakayama, T., Kakudo, A., Shibano, Y., & Amachi, T. (1994). Divalent metal ion requirements of a thermostable multimetal beta-galactosidase from Saccharopolyspora rectivirgula. ***Journal of Biological Chemistry***, *269*(35), 22021-22026.

Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: a review. ***Critical reviews in biotechnology***, *30*(1), 41-62.

Juers, D. H., Jacobson, R. H., Wigley, D., Zhang, X. J., Huber, R. E., Tronrud, D. E., & Matthews, B. W. (2000). High resolution refinement of β-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for α-complementation. ***Protein Science***, *9*(9), 1685-1699.

Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ β-galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. ***Protein Science***, *21*(12), 1792-1807.

Karaca, B. 2018. Farklı çevresel koşulların süt ürünleri endüstrisinde sorun teşkil eden geobacillus ve anoxybacillus biyofilmleri üzerine olan etkilerinin ve biyogiderim mekanizmalarının belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Kayıhan, C. Biyoteknoloji: on bin yıllık serüven.

Khaled, B., Fethia, F. N., Kemal, G., Matpan, B. F., Omer, A., & Amina, H. (2016). Production of intracellular β-galactosidase using a novel Kluyveromyces marxianus DIV13-247 isolated from an Algerian dairy product. ***Research Journal of Biotechnology Vol***, *11*, 6.

Kılıç, Y. 2013. Lactobacillus ve bifidobacterium cinsi bakterilerin beta galaktosidaz enzim aktiviteleri. Yüksek lisan tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kılıç, Y., Yüksekdağ, Z. N., & Yüksekdağ, H. (2014). Lactobacillus ve Bifidobacterium Cinsi Bakterilerin Beta Galaktosidaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. ***Gıda***, *39*(4), 211-218.

Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., & Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. ***Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi 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*(4), 345-351.

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. ***Applied biochemistry and biotechnology,*** *158*(1), 192-199.

Liu, P., Xie, J., Liu, J., & Ouyang, J. (2019). A novel thermostable β-galactosidase from Bacillus coagulans with excellent hydrolysis ability for lactose in whey. ***Journal of dairy science***, *102*(11), 9740-9748.

Maciuńska, J., Czyz, B., & Synowiecki, J. (1998). Isolation and some properties of β-galactosidase from the thermophilic bacterium Thermus thermophilus. ***Food chemistry***, *63*(4), 441-445..

Maksimainen, M., Paavilainen, S., Hakulinen, N., & Rouvinen, J. (2012). Structural analysis, enzymatic characterization, and catalytic mechanisms of β-galactosidase from Bacillus circulans sp. alkalophilus. ***The FEBS journal***, *279*(10), 1788-1798.

Matpan Bekler F., Güven K., Yalaz S., Gül Güven R. 2020. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from hot spring in Çermik, Diyarbakır

Matpan Bekler, F. (2017). Türkiye'deki Dibekli Sıcak Su Kaynağından Termoflik Geobacillus sp. DB2 Suşunun Fizyo-Biyokimyasal Karakterizasyonu ve 16S rRNA Sekanslaması. ***Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, *7*(1), 63-71.

Matpan Bekler, F. 2012. Termofilik Bacillus licheniformis KG9'a ait ß-galaktosidaz geninin Escherichia coli'ye aktarılması ve enzimin karakterizasyonu. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Matpan Bekler, F., Stougaard, P., Güven, K., Güven, R. G., & Acer, Ö. (2015). Cloning, purification and characterization of a thermostable β-galactosidase from Bacillus licheniformis strain KG9. ***Cellular and Molecular Biology***, *61*(3), 71-78.

Matpan Bekler, F., Yalaz, S., Acer, O., & Guven, K. (2017). Purification of thermostable β-galactosidase from Anoxybacillus sp. KP1 and estimation of combined effect of some chemicals on enzyme activity using semiparametric errors in variables model. ***Fresenius Environ Bull***, *26*, 2251-2259.

Matpan Bekler, F., Yalaz, S., Güven, R. G., Acer, O., & Güven, K. (2018). characterızatıon of thermostable ***β***-galactosıdase from anoxybacillus ayderensis and optımal desıgn for enzyme ınhıbıtıon usıng semıparametrıc eıv models. ***The Online Journal of Science and Technology-April***, *8*(2).

Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: Bacillus licheniformis and Thermomonas hydrothermalis isolates as potential producers of thermostable enzymes. ***International journal of microbiology***, *2017*.

Murphy, J., Ryan, M. P., & Walsh, G. (2020). Purification and characterization of a novel β-galactosidase from the thermoacidophile Alicyclobacillus vulcanalis. ***Applied biochemistry and biotechnology***, *191*(3), 1190-1206.

Nandy, S. K. (2016). Bioprocess technology governs enzyme use and production in industrial biotechnology: an overview. ***Enz Eng***, *5*(144), 2.

Nath, A., Mondal, S., Chakraborty, S., Bhattacharjee, C., & Chowdhury, R. (2014). Production, purification, characterization, immobilization, and application of β-galactosidase: a review. ***Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering***, *9*(3), 330-348.

Nazina, T. N., Lebedeva, E. V., Poltaraus, A. B., Tourova, T. P., Grigoryan, A. A., Sokolova, D. S., ... & Osipov, G. A. (2004). Geobacillus gargensis sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of Bacillus vulcani as Geobacillus vulcani comb. nov. ***International journal of systematic and evolutionary microbiology***, *54*(6), 2019-2024.

Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltaraus, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov. and Geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans to Geobacillus as the new combinations G. stearothermophilus, G. th. ***International journal of systematic and evolutionary microbiology***, *51*(2), 433-446.

Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. ***Biomolecules***, *3*(3), 597-611.

Nivetha, A., & Mohanasrinivasan, V. (2017, November). Mini review on role of β-galactosidase in lactose intolerance. In ***IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*** (Vol. 263, No. 2, p. 022046). IOP Publishing.

Novik, G., Savich, V., & Meerovskaya, O. (2018). Geobacillus Bacteria: potential commercial applications in industry, bioremediation, and bioenergy production. In ***Growing and Handling of Bacterial Cultures***. IntechOpen.

Obeidat, M., Khyami-Horani, H., Al-Zoubi, A., & Otri, I. (2012). Isolation, characterization, and hydrolytic activities of Geobacillus species from Jordanian hot springs. ***African Journal of Biotechnology,*** *11*(25), 6763-6768.

Okumuş, V., & Yılmaz, E. (2018). Bitlis budaklı kaplıcasından izole edilen Bacillus licheniformis vo2 ve Bacillus licheniformis vo9'dan katı faz fermantasyon yöntemiyle β-galaktosidaz üretiminin araştırılması (Master's thesis, Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Özarslan, S. 2018. Kefir danesinden izole edilen Kluyveromyces marxianus'dan üretilen β-galaktosidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Pirinççioğlu, H. (2015). Dargeçit ve Güçlükonak sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri izolasyonu ve tanımlanması. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Richmond, M. L., Gray, J. I., & Stine, C. M. (1981). Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. ***Journal of dairy science***, *64*(9), 1759-1771.

Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. ***APL bioengineering***, *2*(1), 011501.

Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. ***Nature,*** *409*(6823), 1092-1101.

Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β-galactosidase and its applications in food industry. ***3 Biotech***, *7*(1), 79.

Sarıgül N. 2007. Ege bölgesi'ndeki çeşitli sıcak su kaynaklarından Thermus genusu bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle identifikasyonu ve b-galaktosidaz aktivitesinin saptanması. Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Sedzro, D. M., Bellah, S. M. F., Akbar, H., & Billah, S. M. S. (2018). Structure, Function, Application and Modification Strategy of β–Galactosidase. ***J Multidis Res Rev***, *1*, 10-16.

Shaikhan, B. A., Güven, K., Bekler, F. M., Acer, Ö., & Güven, R. G. (2020). A highly inducible β-galactosidase from Enterobacter sp. ***Journal of the Serbian Chemical Society***, *85*(5), 609-622.

Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial enzymes—an overview. ***Advances in Enzyme Technology***, 1-40.

Torres, M. J., & Lee, B. H. (1995). Cloning and expression of β-galactosidase from psychotrophic Bacillus subtilis KL88 into Escherichia coli. ***Biotechnology letters***, *17*(2), 123-128.

Tunç, Ş, Matpan Bekler, F, Güven, K. (2021). Characterization of intracellular β-galactosidase from Bacillus Subtilis 4NK and Bacillus paralicheniformis 5NK isolated from a hot water spring and effects of various inhibitors on enzyme activity. ***Biotech Studies***, 30 (2), 11-27. Retrieved from

Turner, P., Mamo, G., & Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. ***Microbial cell factories***, *6*(1), 1-23.

UYANIK, A. Y., ÖKTEMER, A. T. D., & LOĞOĞLU, E. T. D. Beta-galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı).

van Beilen, J. B., & Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. ***Current Opinion in biotechnology,*** *13*(4), 338-344.

Verma, A. S., Agrahari, S., Rastogi, S., & Singh, A. (2011). Biotechnology in the realm of history. ***Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences***, *3*(3), 321.

Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. (2018). β-galactosidase: Biotechnological applications in food processing. ***Journal of Food Biochemistry***, *42*(5), e12564.

Xu, Y., Wu, Q., Bai, L., Mu, G., Tuo, Y., Jiang, S., ... & Qian, F. (2021). Cloning, expression, and bioinformatics analysis and characterization of a β-galactosidase from Bacillus coagulans T242. ***Journal of Dairy Science***, *104*(3), 2735-2747.

Yetişemiyen, A., & Eren, S. Ö. (2009). Laktoz kristalleşmesinin fizikokimyası. ***Gıda,*** *34*(4), 231-237.

Zilinskas, R. A., & Lundin, C. G. (1993). ***Marine biotechnology and developing countries***. The World Bank

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nazlı POLAT

Yabancı Dili : İngilizce(B1) /Fransızca (A1)

Yayın

Güven, K., MATPAN BEKLER, F., Yalaz, S., GÜL GÜVEN, R., DEMİRTAŞ AKSU, M., İPEKÇİ, M., ... & Polat, N. (2020). Evaluation of antibacterial effects of some traditional plants against pathogen microorganisms. *Banat's Journal of Biotechnology*, *10*(21).

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Nazlı POLAT
ÖĞRENCİ NO	19820004
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2019-2021
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Moleküler Biyoloji ve Genetik
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	ÇERMİK KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK *GEOBACİLLUS VULCANİ* 2Çx'TE BETA-GALAKTOZİDAZ ENZİM KARAKTERİZASYONU
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	63
BENZERLİK ORANI	%11
RAPORLAMA TARİHİ	04/08/ 2021

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 04/08/2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %11'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 Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında 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.

Öğrencinin
Adı ve Soyadı: Nazlı POLAT
Tarih: 04/08/2021
İmza:

Tez Danışmanı	Moleküler Biyoloji ve Genetik **Anabilim Dalı Başkanı**
Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Kemal GÜVEN Tarih: 04/08/2021 İmza:	Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Veysel TOLAN Tarih: 04/08/2021 İmza: