

**Süt Ürünlerimizden İzole Edilen Mikroorganizmalardan Laktaz  
Enzimi Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu**

**Proje No: TOVAG-COST-928 (104 O 270)**

Prof.Dr. H. Şebnem HARSA  
Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
Prof. Dr. Haluk HAMAMCI  
Doç. Dr. Candan GÜRAKAN  
Doç. Dr. M. Yekta GÖKSUNGUR  
Doç. Dr. Canan TARI  
Aysun Cebeci AYDIN  
Fatma Işık ÜSTOK

OCAK 2009  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Süt, içerdiği protein miktarı ve kalitesi, vitaminler ve kalsiyum açısından oldukça önemli bir besin grubudur. Türkiye'nin süt ürünleri tüketimi yıllık kişi başına 25 litredir. Bu rakam Avrupa ülkelerinde 100-150 litre arasında değişmektedir. Ülkemizdeki süt tüketimi ekonomik nedenler ve muhtemelen laktoz tahammülsüzlüğü nedeniyle oldukça düşüktür. Süt tüketiminin az olması kemik erimesi, kolon kanseri vb. ciddi sağlık problemlerini beraberinde getirmektedir.

Laktozun basit şekere parçalanması ile süt ve süt ürünlerinin, laktoz tahammülsüzlüğü problemi olan bireyler tarafından kolaylıkla sindirilmesi sağlanır. Sütteki laktozun laktaz ( $\beta$ -galaktosidaz) enzimi ile hidrolizi, aynı zamanda dondurulmuş ve yoğunlaştırılmış süt ürünlerindeki laktoz kristallenmesinin önlenmesinde, peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Süt ürünleri ihracatımız genelde bir artış eğiliminde olup 2002 yılı ihracatı 27 milyon dolardır; bunun 23 milyon dolarlık kısmını fermente ürünler, peynir ve yoğurt oluşturmuştur. Laktoz tahammülsüzlüğünü aşmanın bir yolu da süt ve ürünlerine laktaz enzimi katılmasıdır. Laktaz enzimi sanayi tarafından sütteki laktoz şekerini parçalamakta kullanıldığı gibi bireyler tarafından toz ya da tablet olarak alınabilmektedir. Batı Avrupa ülkelerinde tahammülsüzlük çok daha az olmasına rağmen tüketiciye bu amaçlı birçok ürün sunulmaktadır. Türkiye'de ise bu türde çok sınırlı (iki adet) ürün üretilmektedir. Türkiye'de laktoz tahammülsüzlüğünün nüfusun % 30'unu aştığı tahmin edilmekte, laktozsuz süt toplam süt üretimin ancak % 1'i civarında pazar bulmaktadır. Bunun nedeni halkımızın henüz bu konuda yeteri kadar bilgilendirilmemiş olmasıdır. Bu bilginin yaygınlaşması ile, tüm dünyada 70 milyon dolar olan laktaz tüketiminin ülkemizde de Avrupa ölçülerine yaklaştığında 600 milyar TL/yıl civarında bir pazar payına sahip olacağı hesaplanmaktadır.

Laktaz enzimi ticari olarak daha çok küf ve mayalardan elde edilmekte olup, son yıllarda bakteriler ile yapılan araştırmalar da artmıştır. Projenin amaçları arasında  $\beta$ -galaktosidaz üreticisi maya ve laktik asit bakterilerinin geleneksel süt ürünlerimizden izolasyonu ve tanımlanmasının yanısıra değişik küflerden üretimi de yer almaktadır. Çalışmalar, optimum fermentasyon koşullarının bulunması ile çöktürme ve kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırma işlemlerini kapsamaktadır. Yeni hazırlanmış bir destek materyali kullanılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve enzim preparatlarının karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu projenin özgün değerleri arasında, ülkemiz süt ürünlerinden elde edilen ve endüstriyel açıdan büyük öneme sahip laktaz enzim üreticisi mikroorganizma biyoçeşitliliğinin korunarak envantere alınması yer almaktadır. Ayrıca projenin bu mikroorganizmalar ile diğer bazı maya ve küflerin de değişik özellikteki laktaz enzim üretim yeteneklerinin taranarak endüstriyel üretimler için kullanım olasılıklarına ışık tutacak olan bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma, TOVAG-COST-928 (104 O 270) nolu TÜBİTAK projesi olarak desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TABLO DİZİNİ.....	X
ŞEKİL DİZİNİ.....	XII
ÖZET .....	XVI
ABSTRACT .....	XVII
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>6</b>
2.1. Laktaz Enzimi ve Endüstriyel Önemi .....	6
2.2. Mayalar.....	7
2.2.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> 'in Genetik Yapısı, Özellikleri ve Laktaz Enzim Biyosentezinin Genetik Kontrolü.....	7
2.2.2. İnvertaz Enzimi ve Biyoteknolojide Kullanım Alanları .....	10
2.2.3. <i>Metchnikowia pulcherrima</i> Türü Mayaların Özellikleri ve Gıda Sektörü için Önemi .....	11
2.3. Bakteriler.....	11
2.3.1. Bakterilerde $\beta$ -galaktosidaz Gen Dizilimleri Farklılıkları .....	12
2.3.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tiplendirilmesi .....	12
2.4. Küfler .....	13
2.5. Laktaz Enziminin İmmobilizasyonu .....	15
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>16</b>
3.1. Gereç .....	16
3.2. Yöntemler.....	18
3.2.1. Çeşitli Süt Ürünlerinden Laktaz Enzimi Üreticisi Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması .....	18
3.2.1.1. Maya Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması .....	18
3.2.1.1.1. Laktaz ve İnvertaz Aktivitelerinin Ölçülmesi .....	19
3.2.1.1.2. <i>Kluyveromyces lactis</i> Suşlarının Üreme Değerlerinin Ölçülmesi .....	22
3.2.1.1.3. <i>Metchnikowia</i> Türü Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması .....	22
3.2.1.1.4. Pulcherrimin'in Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	23

3.2.1.1.5. Maya Türlerinden Genomik DNA'ların Saflaştırılması.....	24
3.2.1.1.6. Maya Türlerinin rDNA Dizilerinin Belirlenmesi ve RFLP Analizleri .....	25
3.2.1.2. Çeşitli Süt Ürünlerinden Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Bakteri Suşlarının β-Galaktosidaz Genlerinin Karakterizasyonu .....	26
3.2.1.2.1. Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyon .....	26
3.2.1.2.2. β-galaktosidaz Geni ile İlgili Çalışma Yöntemi .....	27
3.2.1.2.3. RAPD-PZR Çalışma Yöntemi .....	28
3.2.3. Laktaz Enziminin Mikroorganizmalardan Fermentasyonla Üretimi .....	29
3.2.3.1. Mayadan ( <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279) β-Galaktosidaz Enzim Üretimi ..	29
3.2.3.1.1. Hücre Parçalama Yöntemleri .....	30
3.2.3.1.2. Biyokütle Tayini.....	30
3.2.3.1.3. Laktaz Enzim Aktivite Tayini .....	31
3.2.3.1.4. Kalan Şeker Miktarı .....	32
3.2.3.1.5. Protein Miktarı .....	32
3.2.3.1.6. Deneysel Tasarım ve İstatistiksel Analiz .....	32
3.2.3.2. Bakterilerden β-Galaktosidaz Enzim Üretimi .....	33
3.2.3.2.1. Fermentasyon .....	33
3.2.3.2.1.1. Erlen Denemeleri.....	33
3.2.3.2.1.2. Fermentör Denemeleri.....	34
3.2.3.2.2. Enzim Ekstraksiyonu.....	35
3.2.3.2.2.1. Lizozim ile Enzim Ekstraksiyonu .....	36
3.2.3.2.2.2. Cam Bilyalar ile Enzim Ekstraksiyonu .....	36
3.2.3.2.2.3. Homojenizatör ile Enzim Ekstraksiyonu.....	36
3.2.3.2.3. Enzim Aktivite Tayini.....	36
3.2.3.2.4. Biyokütle Tayini.....	37
3.2.3.2.5. Laktoz ve Laktik Asit Tayini .....	37
3.2.3.2.6. İstatistiksel Deney Tasarımı .....	37
3.2.3.3. Küflerden β-Galaktosidaz Enzim Üretimi.....	37
3.2.3.3.1. Kültür Gelişimi ve Tohum İnokülümü.....	37
3.2.3.3.2. Katı Kültür Fermentasyonu.....	38
3.2.3.3.3. Enzim Ekstraksiyonu.....	40

3.2.3.3.4. Enzim Aktivite Testi .....	40
3.2.3.3.5. Biyokütle ve Spor Sayımı .....	40
3.2.3.3.6. Deneysel Tasarım ve İstatistiksel Analiz .....	41
3.2.4. Laktaz Enziminin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması .....	41
3.2.4.1. Mayadan ( <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279) Elde Edilen β-galaktosidaz'ın Karakterizasyonu .....	41
3.2.4.1.1. pH Değerinin β-galaktosidaz'ın Aktivite ve Stabilitesi Üzerine Etkisi .....	42
3.2.4.1.2. Aktivite ve Stabilite Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	42
3.2.4.1.3. Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi.....	43
3.2.4.2. Maya Enziminin Saflaştırılması .....	43
3.2.4.3. Bakterilerden Elde Edilen β-galaktosidaz Enziminin Karakterizasyonu .....	44
3.2.4.3.1. pH'nın β-galaktosidaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	44
3.2.4.3.2. Sıcaklığın β-galaktosidaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	44
3.2.4.3.3. Metal İyonlarının β-galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	44
3.2.4.3.4. Termal İnaktivasyon Kinetiği ve İnaktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi .....	44
3.2.4.3.5. Kinetik Sabitlerin ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Belirlenmesi .....	45
3.2.4.4. Bakteriden ( <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ) Elde Edilen β-galaktosidaz'ın Saflaştırılması.....	45
3.2.4.5. Küfden ( <i>Rhizomucor meihei</i> ) Elde Edilen β-galaktosidaz'ın Karakterizasyonu ..	45
3.2.4.5.1. pH Değerinin β-galaktosidaz'ın Aktivite ve Stabilitesi Üzerine Etkisi .....	45
3.2.4.5.2. Aktivite ve Stabilite Üzerine Sıcaklık Etkisi.....	46
3.2.4.5.3. Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi.....	46
3.2.4.6. Küfden ( <i>Rhizomucor meihei</i> ) Elde Edilen β-galaktosidaz'ın Saflaştırılması.....	46
3.2.5. Laktaz Enziminin Immobilizasyonu .....	47
3.2.5.1. β-galaktosidaz Aktivite Tayini .....	47
3.2.5.2 Protein Tayini .....	48
3.2.5.3. Enzim Immobilizasyonu .....	48
3.2.5.3.1 Immobilizasyonda Gluteraldehit Konsantrasyonunun Etkisi.....	48
3.2.5.3.2. Immobilizasyonda Sıcaklığın Etkisi.....	48
3.2.5.3.3. Immobilizasyonda Ortam pH' sının Etkisi.....	49

3.2.5.3.4. İmmobilizasyonda Enzim Konsantrasyonunun Etkisi .....	49
3.2.5.3.5. İmmobilizasyonda Katı-Sıvı Oranının (Vk/Vs) Etkisi.....	49
3.2.5.3.6. İmmobilizasyonda Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Etkisi .....	49
3.2.5.3.7. İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi .....	49
3.2.5.3.8. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanabilirliği.....	50
3.2.5.3.9. İmmobilize Enzimin Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi .....	50
3.2.5.4. İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Karakterizasyonu .....	50
3.2.5.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktifliğine ve Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi.....	50
3.2.5.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Aktifliğine ve Stabilitesine pH'nın Etkisi .....	50
3.2.5.4.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi .....	51
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>52</b>
4.1. Çeşitli Süt Ürünlerinden Maya Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması .....	52
4.1.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması .....	52
4.1.2. <i>Kluyveromyces lactis</i> ve <i>Kluyveromyces. marxianus</i> Türlerinde Laktaz Aktivitelerinin Ölçülmesi .....	61
4.1.3. <i>Kluyveromyces lactis</i> Türlerinde İnvvertaz Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	66
4.1.4. <i>Kluyveromyces lactis</i> Suşlarının Üreme Değerlerinin Ölçülmesi .....	67
4.1.5. <i>Metschnikowia</i> Türü Mayaların İzolasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Tanımlanması .....	68
4.1.6. Maya Türlerinin rDNA Dizilerinin Belirlenmesi ve RFLP Analizleri .....	70
4.2. Mayalardan ( <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279) β-Galaktosidaz Enzimi Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu .....	71
4.2.1. Farklı Mayaların Enzim Aktivite Değerleri .....	71
4.2.2. Hücre Parçalama Yöntemlerinin Spesifik Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	72
4.2.3. β-galaktosidaz Enzim Üretiminin Kinetiği .....	74
4.2.4. Çalkalamalı İnkübatörde Optimizasyon.....	75
4.2.5. Karıştırmalı Tank Tipi Biyoreaktörde Gerçekleştirilen Ön Denemeler.....	81

4.2.6. Karıştırılmalı Tank Tipi Biyoreaktörde $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretiminin Optimizasyonu .....	84
4.2.7. <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279'den Elde Edilen $\beta$ -Galaktosidaz'ın Karakterizasyonu.....	91
4.2.7.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	91
4.2.7.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi .....	92
4.2.7.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması.....	93
4.2.8. <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279'den Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu .....	94
4.2.9. <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279'den Elde Edilen İmmobilize $\beta$ -galaktosidaz'ın Karakterizasyonu.....	97
4.2.9.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	97
4.2.9.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	98
4.2.9.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması.....	98
4.3. <i>Kluyveromyces lactis</i> Ticari $\beta$ -Galaktosidaz Enziminin Kitosan-Hidroksiapatit Kompleksine İmmobilizasyonu.....	99
4.3.1. İmmobilizasyonda Gluteraldehit Konsantrasyonunun Etkisi.....	99
4.3.2. İmmobilizasyonda Sıcaklığın Etkisi .....	101
4.3.3. İmmobilizasyonda Ortam pH' sının Etkisi.....	102
4.3.4. İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi .....	103
4.3.5. İmmobilizasyonda Enzim Konsantrasyonunun Etkisi .....	104
4.3.6. İmmobilizasyonda Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Etkisi .....	108
4.3.7. İmmobilizasyonda Katı-Sıvı Oranının (Vk/Vs) Etkisi .....	109
4.3.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu .....	111
4.3.8.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktifliğine ve Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi.....	111
4.3.8.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Aktifliğine ve Stabilitesine pH'nın Etkisi ....	113
4.3.8.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi .....	114
4.3.9. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanabilirliği.....	115
4.3.10. İmmobilize Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi .....	116
4.4. Çeşitli Süt Ürünlerinden Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Bakteri Suşlarının $\beta$ -Galaktosidaz Genlerinin Karakterizasyonu .....	117



4.4.1. $\beta$ -galaktosidaz Geni .....	118
4.4.1.1. $\beta$ -galaktosidaz Geni PZR Sonuçları .....	118
4.4.1.2. $\beta$ -galaktosidaz Gen Dizilimi sonuçları .....	119
4.4.2. RAPD-PZR Sonuçları .....	125
4.5. Bakterilerden $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu .....	127
4.5.1. Enzim Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması .....	128
4.5.2. Merkezi Karma Deney Tasarımı .....	130
4.5.2.1. <i>Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus</i> 77 Suşu için Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu .....	130
4.5.2.2. <i>Streptococcus thermophilus</i> 95/2 Suşu için Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu .....	131
4.5.2.3. <i>Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus</i> 77 ve <i>Streptococcus thermophilus</i> 95/2 Suşları için Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu .....	133
4.5.3. Fermentör Denemeleri .....	135
4.5.3.1. <i>Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus</i> 77 .....	135
4.5.3.2. <i>Streptococcus thermophilus</i> 95/2 .....	136
4.5.3.3. <i>Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus</i> 77 ve <i>Streptococcus thermophilus</i> 95/2 .....	136
4.5.4. Enzim Karakterizasyonu Sonuçları .....	138
4.5.4.1. pH'nın $\beta$ -galaktosidaz Enzim Aktivitesi ve Stabilite Üzerine Etkisi .....	138
4.5.4.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz Enzim Aktivitesi ve Stabilite Üzerine Etkisi .....	139
4.5.4.3. Metal İyonlarının $\beta$ -galaktosidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	140
4.5.4.4. Termal İnaktivasyon Kinetiği ve İnaktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi .....	141
4.5.4.5. Kinetik Sabitlerin ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Belirlenmesi .....	142
4.5.5. Bakterilerden Elde Edilen $\beta$ -galaktozidaz'ın Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu ....	142
4.5.5.1. Bakterilerden Elde Edilen İmmobilize $\beta$ -galaktosidaz'ın Karakterizasyonu .....	145
4.5.5.1.1 pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	145
4.5.5.1.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	146
4.5.5.1.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması .....	146
4.6. Küflerden $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu .....	147

4.6.1. <i>Rhizomucor meihei</i> 'den Elde Edilen $\beta$ -Galaktosidaz'ın Saflaştırma ve İmmobilizasyon Sonuçları.....	148
4.6.2. <i>Rhizomucor meihei</i> 'den Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Karakterizasyonu .....	150
4.6.2.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	150
4.6.2.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi .....	151
4.6.2.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması.....	153
<b>5. SONUÇLAR .....</b>	<b>154</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>158</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>169</b>
<b>PROJE ÖZET BİLGİ FORMU .....</b>	<b>176</b>

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Çalışmada kullanılan <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> suşları .....	17
<b>Tablo 2.</b> Üretim Ortamı Bileşenleri .....	30
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan besiyerleri ve kompozisyonları (%) (w/v) .....	34
<b>Tablo 4.</b> Farklı koşullardaki fermentör denemeleri .....	35
<b>Tablo 5.</b> Sıvı besiyeri kompozisyonları .....	38
<b>Tablo 6.</b> Deneysel tasarım sonuçları .....	39
<b>Tablo 7.</b> Araştırmada kullanılan bazı süt ve peynir örneklerinin alındığı yerler ve maya konsantrasyonları .....	52
<b>Tablo 8.</b> Karbonhidrat assimilasyon test sonuçları .....	53
<b>Tablo 9.</b> Azot kullanımı, ozmotik tolerans ve sıcaklığa duyarlık testleri sonuçları .....	55
<b>Tablo 10.</b> Saflaştırılan maya örneklerinin API 32c kit'i ile belirlenen tür adları .....	58
<b>Tablo 11.</b> Süt örneklerinden saflaştırılan maya türleri ve bulunma frekansları .....	60
<b>Tablo 12.</b> Saflaştırılan MY (Milk Yeast) suşlarının logaritmik ve durağan fazdaki laktaz aktiviteleri (üreme ortamı YP+2% laktoz) .....	63
<b>Tablo 13.</b> Laktaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkileri .....	64
<b>Tablo 14.</b> Laktaz biyosentezinin laktoz ile aktivasyonu .....	65
<b>Tablo 15.</b> Peynir altı suyunda üretilen (%2 Whey+0.5% Amonyum sülfat) MY (Milk Yeast) suşlarının logaritmik ve durağan fazdaki $\beta$ -galaktosidaz aktiviteleri .....	65
<b>Tablo 16.</b> Saflaştırılan <i>K. lactis</i> suşlarında invertaz aktiviteleri (üreme ortamı YP+ % karbon kaynağı) .....	66
<b>Tablo 17.</b> YP+ %2 Glukoz ortamında üretilen <i>Kluyveromyces lactis</i> (MY 22-29) maya suşlarının ikilenme süreleri .....	67
<b>Tablo 18.</b> <i>M. pulcherrima</i> suşlarının farklı maya ve bakterilere antagonistik etkileri .....	69
<b>Tablo 19.</b> <i>M. pulcherrima</i> suşlarının farklı küflerde spor gelişimine antagonistik etkileri .....	69
<b>Tablo 20.</b> Çalkalamalı inkübatör ortamında incelenen parametreler ve seviyeleri .....	75
<b>Tablo 21.</b> Çalkalamalı inkübatör ortamında kullanılan deneysel tasarım ve cevaplar .....	76
<b>Tablo 22.</b> İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi .....	77
<b>Tablo 23.</b> Spesifik enzim aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları .....	77

<b>Tablo 24.</b> Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörde incelenen parametreler ve seviyeleri .....	85
<b>Tablo 25.</b> Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktör denemelerindeki deneysel tasarım ve cevaplar .....	86
<b>Tablo 26.</b> İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi .....	87
<b>Tablo 27.</b> Spesifik enzim aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları .....	88
<b>Tablo 28.</b> Mayadan elde edilen $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırma basamakları ve sonuçları .....	95
<b>Tablo 29.</b> Laktaz/kitosan-hidroksiapatit kompleksi için izoterm sabitleri .....	108
<b>Tablo 30.</b> <i>Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus 77</i> için farklı deney koşulları ve sonuçları .....	135
<b>Tablo 31.</b> <i>Streptococcus thermophilus 95/2</i> için farklı deney koşulları ve sonuçları .....	136
<b>Tablo 32.</b> <i>Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus 77</i> ve <i>Streptococcus thermophilus 95/2</i> arasındaki simbiyotik ilişki için farklı deney koşulları ve sonuçları .....	137
<b>Tablo 33.</b> Metal İyonlarının bakteri $\beta$ -galaktosidazının enzim aktivitesi üzerine etkisi	141
<b>Tablo 34.</b> Tüm bakteri enzim ekstraktlarının $K_d$ sabitleri ve yarı ömürleri .....	141
<b>Tablo 35.</b> Bakteri enzimleri için kinetik sabitler .....	142
<b>Tablo 36.</b> Bakteri $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırma basamakları ve sonuçları .....	143
<b>Tablo 37.</b> Küf enzim aktivitesi için Varyans Analizi sonuçları .....	147
<b>Tablo 38.</b> Biyokütle için Varyans Analizi sonuçları .....	148
<b>Tablo 39.</b> Toplam spor için Varyans Analizi sonuçları .....	148

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Polimorfik dizilimlerin rastgele çoğaltılması .....	13
Şekil 2. <i>M. pulcherrima</i> suşları UMY12, UMY14 ve UNY15'in farklı mikroorganizmalara karşı antagonistik etkileri .....	70
Şekil 3. <i>K. lactis</i> suşlarının ITS-5.8 rDNA RFLP analizi .....	71
Şekil 4. Çalışmada kullanılan mayalar ve bunların enzim aktivite sonuçları .....	72
Şekil 5. Farklı hücre parçalama yöntemlerinin enzim aktivitesine etkisi .....	73
Şekil 6. <i>K.lactis</i> suşunun gelişme ve $\beta$ -galaktosidaz üretim kinetiği .....	75
Şekil 7. Çalkalamalı kültürde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri .....	78
Şekil 8. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279 ile $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi üzerine havalandırma hızının etkisi .....	82
Şekil 9. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279 ile biyomas üretimi üzerine havalandırma hızının etkisi .....	82
Şekil 10. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279 ile $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi üzerine karıştırma hızının etkisi .....	83
Şekil 11. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-8279 ile biyomas üretimi üzerine karıştırma hızının etkisi .....	84
Şekil 12. Karıştırmalı tank tipi reaktörde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri .....	88
Şekil 13. Maya $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi .....	91
Şekil 14. Maya $\beta$ -galaktosidazının stabilitesi üzerine pH değerinin etkisi .....	92
Şekil 15. Maya $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	93
Şekil 16. Maya $\beta$ -galaktozidazının stabilitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	93
Şekil 17. Maya enziminin Sephadex DEAE-A25 kolonundan geçişindeki fraksiyonların protein ve enzim aktivitesi grafiği .....	94
Şekil 18. Mayadan elde edilen $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri .....	96
Şekil 19. Ortam pH' sının immobilize maya $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi .....	97
Şekil 20. Sıcaklığın immobilize maya $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi .....	98

<b>Şekil 21.</b> İmmobilize maya $\beta$ -galaktosidazının substratı (ONPG) hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik .....	98
<b>Şekil 22.</b> Gluteraldehit Konsantrasyonunun $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi .....	100
<b>Şekil 23.</b> Gluteraldehit konsantrasyonunun immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	100
<b>Şekil 24.</b> Ortam sıcaklığının $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi .....	101
<b>Şekil 25.</b> Ortam sıcaklığının immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	102
<b>Şekil 26.</b> Ortam pH' sının $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi .....	102
<b>Şekil 27.</b> Ortam pH'sının immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	103
<b>Şekil 28.</b> $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğinin zamanla değişimi .....	103
<b>Şekil 29.</b> İmmobilizasyon işleminin $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	104
<b>Şekil 30.</b> Enzim konsantrasyonunun $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi .....	105
<b>Şekil 31.</b> Enzim konsantrasyonunun immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	105
<b>Şekil 32.</b> Enzim konsantrasyonunun immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	106
<b>Şekil 33.</b> Kitosan-Hidroksiapatit/ $\beta$ -galaktosidaz enzim immobilizasyon sistemi için Langmuir isotermi .....	107
<b>Şekil 34.</b> Kitosan-Hidroksiapatit/ $\beta$ -galaktosidaz enzim immobilizasyon sistemi için Lineer Langmuir isotermi .....	107
<b>Şekil 35.</b> Tuz konsantrasyonunun $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi ...	109
<b>Şekil 36.</b> Tuz konsantrasyonunun immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi ...	109
<b>Şekil 37.</b> Katı-Sıvı Oranının ( $V_k/V_s$ ) $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi .....	110
<b>Şekil 38.</b> Katı-Sıvı oranının immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	110
<b>Şekil 39.</b> Katı-Sıvı oranının immobilize $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	111
<b>Şekil 40.</b> Sıcaklığın serbest ve immobilize $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine etkisi .....	112
<b>Şekil 41.</b> Sıcaklığın serbest ve immobilize $\beta$ -galaktosidazın stabilitesine etkisi .....	112
<b>Şekil 42.</b> Ortam pH' sının serbest ve immobilize $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine etkisi .....	113

<b>Şekil 43.</b> Ortam pH' sının serbest ve immobilize $\beta$ -galaktosidazın stabilitesine etkisi ....	114
<b>Şekil 44.</b> Serbest $\beta$ -galaktosidaz enziminin substrat ONPG hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik .....	115
<b>Şekil 45.</b> İmmobilize $\beta$ -galaktosidazın substratı (ONPG) hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik .....	115
<b>Şekil 46.</b> İmmobilize $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine tekrar kullanımın etkisi .....	116
<b>Şekil 47.</b> İmmobilize $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine depolama süresinin etkisi .....	116
<b>Şekil 48.</b> Basil ve kok izolatlarının Taramalı Elektron Mikroskopi görüntüleri.....	117
<b>Şekil 49.</b> M: 100bp DNA ladder plus (Fermentas), 1: <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> DSM20081, 2: <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> Visby1000-1, 3: <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> Visby1000-2, 4: M2-16, 5:M2-14, 6: K2-3, 7: N2-5, 8: Negatif kontrol .....	118
<b>Şekil 50.</b> <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> suşlarında $\beta$ -galaktosidaz geni dizileme sonuçlarının ClustalW ile sıralanması .....	123
<b>Şekil 51.</b> <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> suşlarında $\beta$ -galaktosidaz gen dizilimlerinden NJ kullanılarak çizilen dendrogram .....	124
<b>Şekil 52.</b> M13 primeriyle <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> suşlarında RAPD-PZR analizi .....	125
<b>Şekil 53.</b> M13 primeriyle ticari <i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> suşlarında RAPD-PZR analizi .....	126
<b>Şekil 54.</b> M13 primeriyle yapılan RAPD-PZR analizi sonucunda oluşturulan UPGMA dendrogramı .....	127
<b>Şekil 55.</b> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> türleri için enzim ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması .....	128
<b>Şekil 56.</b> <i>Streptococcus thermophilus</i> türleri için enzim ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması .....	129
<b>Şekil 57.</b> Lb 77 suşu için elde edilen optimizasyon sonuçları .....	131
<b>Şekil 58.</b> St 95/2 suşu için elde edilen optimizasyon sonuçları .....	132
<b>Şekil 59.</b> Lb 77 ve St 95/2 suşlarını bir arada kullanımı ile elde edilen optimizasyon sonuçları .....	134
<b>Şekil 60.</b> pH'nın bakteri $\beta$ -galaktosidazının aktivitesi üzerine etkisi .....	138

<b>Şekil 61.</b> pH'nın bakteri $\beta$ -galaktosidazının stabilitesi üzerine etkisi .....	139
<b>Şekil 62.</b> Sıcaklığın bakteri $\beta$ -galaktosidazının aktivitesi üzerine etkisi .....	139
<b>Şekil 63.</b> Sıcaklığın bakteri $\beta$ -galaktosidazının stabilitesi üzerine etkisi .....	140
<b>Şekil 64.</b> Bakteri enziminin Sephadex DEAE-A25 kolonundan geçişindeki fraksiyonların protein ve enzim aktivitesi grafiği .....	143
<b>Şekil 65.</b> Bakteri $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri .....	144
<b>Şekil 66.</b> Ortam pH' sının immobilize bakteri $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi .....	145
<b>Şekil 67.</b> Sıcaklığın immobilize bakteri $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi .....	146
<b>Şekil 68.</b> Immobilize bakteri $\beta$ -galaktosidazın substratı (ONPG) hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için liner grafik .....	147
<b>Şekil 69.</b> Küf $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri .....	149
<b>Şekil 70.</b> Küf $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi .....	150
<b>Şekil 71.</b> Küf $\beta$ -galaktozidazının stabilitesi üzerine pH değerinin etkisi .....	151
<b>Şekil 72.</b> Küf $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	152
<b>Şekil 73.</b> Küf $\beta$ -galaktozidazının stabilitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	152



## ÖZET

Süt, içerdiği protein miktarı ve kalitesi, vitaminler ve kalsiyum açısından oldukça önemli bir besin grubudur. Ülkemizde süt tüketimi ekonomik nedenler ve muhtemelen laktoz tahammülsüzlüğü nedeniyle oldukça düşüktür. Süt tüketiminin az olması kemik erimesi, kolon kanseri vb. ciddi sağlık problemlerini beraberinde getirmektedir.

Laktozun basit şekerlere parçalanması ile süt ve süt ürünlerinin, laktoz tahammülsüzlüğü problemi olan bireyler tarafından kolaylıkla sindirilmesi sağlanır. Sütteki laktozun laktaz ( $\beta$  - galaktosidaz) enzimi ile hidrolizi, aynı zamanda dondurulmuş ve yoğunlaştırılmış süt ürünlerindeki laktoz kristallenmesinin önlenmesinde, peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Laktaz enzimi ticari olarak daha çok küf ve mayalardan elde edilmekte olup, son yıllarda bakteriler ile yapılan araştırmalar da artmıştır. Projenin amaçları arasında  $\beta$ -galaktosidaz üreticisi maya ve laktik asit bakterilerinin geleneksel süt ürünlerimizden izolasyonu ve tanımlanmasının yanısıra değişik küflerden üretimi de yer almaktadır. Çalışmalar, optimum fermentasyon koşulları (inokulum, substrat,  $O_2$  konsantrasyonları, pH ve sıcaklık vb.) ile kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırma işlemlerini kapsamaktadır. Kitosan-Hidroksiapatit destek materyali kullanılarak enzimin immobilizasyonu gerçekleştirilerek serbest ve immobilize enzim karakteristikleri karşılaştırılarak dayanıklı, aktif ve tekrar kullanılabilir ticari laktaz preparatları araştırılmıştır.

### Anahtar Sözcükler

$\beta$ -galaktosidaz (laktaz), laktoz tahammülsüzlüğü, laktik asit bakterileri, maya, küf, genotipik karakterizasyon, fermentasyon, saflaştırma, immobilizasyon, karakterizasyon.

## ABSTRACT

Milk and dairy products are very important food groups because of the presence of high quality and quantity of proteins, vitamins and calcium. The consumption of dairy products in Turkey is quite low due to economic reasons and probable lactose intolerance. Low dairy product consumption is likely to result in serious health problems such as osteoporosis and colon cancer. Degradation of lactose into simple sugars increases availability of certain milk product and makes their consumption possible even by person with lactose intolerance.

The symptoms of lactose intolerance is reduced when lactose in milk is hydrolyzed with the enzyme lactase ( $\beta$ -galactosidase). This enzyme is of great industrial interest, since it can be used to solve problems associated with whey utilization and disposal, and can also be used to avoid lactose crystallization in sweetened, condensed and frozen dairy products.

The commercially available  $\beta$ -galactosidases have been mainly obtained from yeast and fungi; bacterial sources have also attracted attention of recent research. The aim of this project is screening of good  $\beta$ -galactosidase producing yeasts and lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditional dairy products. The production of lactases using different fungal sources are also within the scope of the project. Studies include to investigate optimum fermentation conditions (inoculum, substrate, O<sub>2</sub> concentrations, pH and temperature etc.) and purification using chromatographic techniques. Enzyme immobilization studies by using Chitosan/Hydroxyapatite support material have been also performed; characteristics of free and immobilized enzymes have been compared to seek stable, active and reusable lactase preparations for commercial purposes.

### Keywords

$\beta$ -galactosidase (lactase), lactose intolerance, lactic acid bacteria (LAB), yeast, fungi, genotypic characterization, fermentation, purification, immobilization, characterization.

## 1. GİRİŞ

Laktaz ( $\beta$ -D-galactosidase galactohydrolase; E.C.3.2.1.23 süt ve süt ürünlerindeki laktozun hidrolizi için gerekli olan bir enzimdir. Bu enzimin yaşlılık ve genetik nedenlerle vücudumuzda sentez edilememesi laktoz tahammülsüzlüğü olarak bilinen intestinal bozukluğun oluşumuna neden olmaktadır. Laktoz tahammülsüzlüğünün bireylerde yarattığı sorunlar, beslenme için vazgeçilmez vitaminlerin tümünü içeren, proteince zengin ve günlük kalsiyum gereksiniminin karşılanmasında da önemli kaynak olan süt ve süt ürünlerinin tüketiminden kaçınılmasına sebep olmaktadır. Kalsiyumun yeterli düzeyde alınamaması kemik oluşumunu etkiler, kemik yoğunluğunun azalmasıyla birlikte osteoporoz riski de artar. Sağlıkla ilgili bu tip sorunların önlenmesine yönelik olarak beslenmede yoğurt gibi fermente ürünlere yer verilmesi, laktoz hidrolizi yapılmış süt tüketimi, süt ve sütlü gıdalarla birlikte laktaz enzim preparatlarının (toz veya tablet) kullanımı önem kazanmaktadır.

Gıda endüstrisinde laktaz enziminin kullanımı ve önemi laktoz tahammülsüzlüğü olan insanların tüketebileceği ürünler hazırlamakla sınırlı değildir. Sütteki laktozun enzimsel hidrolizi, aynı zamanda dondurulmuş ve yoğunlaştırılmış süt ürünlerindeki laktoz kristallenmesinin önlenmesinde, sükröz kullanım ihtiyacını % 20-40 oranında düşürmek amacı ile aromalı süt ürünlerinin yapımında, asitlenmeyi hızlandırdığından yoğurt ve peynir yapımında da kullanılmaktadır. Laktaz enzimi peyniraltı suyundaki (BOD) 40 000-60 000 ppm) laktozun hidrolizinde de kullanılarak hem çevresel kirlenmenin önüne geçilmesini hem de değerli hidroliz ürünlerinin gıda endüstrisinde alternatif bir tatlandırıcı olarak kullanılmak üzere geri kazanılmasını sağlamaktadır (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985).

Laktaz enziminin bir diğer önemli uygulaması ise galakto oligosakkarit üretimidir. Galakto oligosakkaritler bifidobakterilerin bağırsakta gelişimini stimüle eder. Bifidobakterilerin bağırsakta gelişimi ise clostridia gibi potansiyel olarak zararlı bakterilerin gelişimini baskılar. Literatürde bifidobacteria gibi bağırsak florasının insan sağlığına etkisinin çok önemli olduğu belirtilmekte ve bu floranın kontrolü ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Genel olarak bağırsak florasındaki yararlı bakterilerin sayısının artırılması için; ortama hakim olması istenilen bakterilerin kullanabileceği seçici bir karbon kaynağı (prebiotikler) veya bu bakterilerin kendisinin bağırsağa verilmesi (probiyotikler) olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. Prebiyotik bir maddede olması istenilen en önemli özellik insan bağırsağına sindirilmemiş halde ulaşması ve burada gelişmesi istenen bakteriler için spesifik bir substrat vazifesi görmesidir. Galakto oligosakkaritler bu tipte prebiyotik maddelerdir. Laktaz enzimi

oligosakkaritleri hidroliz eden bir enzim olmasına rağmen, belirli şartlarda aynı enzim transgalaktozilasyonu katalize ederek oligosakkaritlerin üretimini sağlamaktadır. Laktaz enzimi ile laktozun substrat olarak kullanıldığı ve transgalaktozilasyon reaksiyonu ile galakto oligosakkarit üretimi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır ve halen yapılmaktadır.

Laktaz enzimi endüstriyel olarak maya ve küflerden elde edilmektedir. Bu amaçla kullanılan en önemli mikroorganizmalar, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'dir. Küf enzimleri peyniraltı suyu gibi düşük pH'lı çözeltilerin laktoz hidrolizinde ve laktaz tabletleri yapımında kullanılmaktadır. Maya enzimleri de süt gibi nötr pH'lı gıdaların laktoz hidrolizinde ve gıdalara eklenmek üzere hazırlanan laktaz üretiminde kullanılır. Alternatif laktaz enzim kaynakları laktik asit bakterileri (LAB) ile yüksek sıcaklığa karşı dayanıklılığı olan ve süt pH'sında optimum aktivite gösterebilen enzim üreten diğer termofilik bakterilerdir (Maciunska ve ark., 1998; Vetere ve Paoletti, 1998; Lin ve ark., 1993). Laktik asit bakterileri birçok gıdada yüzyıllardır koruma (preservation) amaçlı kullanılmaktadır. Bu bakteriler aynı zamanda GRAS (Generally-Regarded-As-Safe-genellikle güvenli tanınan) statüsüne sahiptirler.

Laktaz enzimi üretiminde mayaların küf ve bakterilere göre detaylı olarak incelenmiş bir genetik sistemleri olmaları, patojen olmamaları ve büyük ölçekte kolaylıkla üretilibilmeleri gibi bazı avantajları vardır. Bunlardan *Kluyveromyces lactis* çok çeşitli amaçlar için kullanılabilen önemli bir ticari maya türüdür. *K. lactis* hem laboratuvar hem de endüstriyel amaçlar için kullanılan üreme ortamlarında üretilmesi kolay ve ekonomik olan bir mayadır. Ayrıca, süt ve süt ürünlerinde doğal olarak bulunduğu endüstriyel amaçlar için kullanılmasında GRAS (Generally Recognized as Safe) mikroorganizma grubuna dahil edilmiştir, bilinen herhangi bir toksik veya patojenik etkisi yoktur (Wolf, 1996). En yaygın kullanım alanı laktaz enzimi üretimi olmakla birlikte galaktooligosakkaritler gibi önemli metabolitlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Laktozun enzimsel hidrolizinde serbest enzim yaygın olarak kullanılmakta olup, tutuklanmış enzim de giderek önem kazanmaktadır.

Şu anda dünyada düşük laktozlu süt üretimi çoğunlukla serbest enzim kullanarak yapılmaktadır. Türkiye'de bu konuda üretim yapan iki firma da serbest enzim yöntemini kullanmaktadır. Bunun nedeni immobilize enzim sistemlerinin temizlik ve sterilizasyon işlemlerinin güçlüğü ve maliyetidir. Literatürde laktaz enzimi immobilizasyonu için çok çeşitli tutuklama madde ve yöntemleri ile gerçekleştirilmiş çalışmalar bulunmakla birlikte, bu konuda daha tam bir verim alınmadığından çalışmalar devam etmektedir. FDA yönetmelikleri incelendiğinde ise "21CFR173.357 Enzim Preparatlarının

İmmobilizasyonunda Sabitleyici Olarak Kullanılan Maddeler” başlıklı yönetmelikte laktaz immobilizasyonu için izin verilen tek maddenin -İtalya’da immobilize enzim ile laktozu düşürülmüş süt üretimi yapmış SNAM Progetti Fabrikası tarafından kullanılmış olan- selüloz triasetat olduğu görülmektedir.

Genel olarak literatür bilgilerinden görüleceği üzere, laktaz enziminin çeşitli mikroorganizmalardan üretimi konusunda oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak ülkemize özgü mikrofloradan laktaz enzimi üreticisi mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Literatürdeki çalışmalar laktik asit bakterilerinde sınırlı olup daha çok küf ve mayalar ile yürütülmüştür. Endüstriyel kirlenmenin henüz az olduğu ülkemizde biyoçeşitliliğinin diğer ülkelere nazaran daha fazla olduğunu varsayarsak, laktik asit bakterileri de laktaz enzimi için önemli kaynaklar olacaktır. Bu projede mikrofloramızın korunmasına yönelik çalışmaların yanısıra katma değeri olan laktaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve immobilizasyonu hedeflenmiştir. Bu çalışmada ülkemize özgü mikrofloradan üretilen farklı özelliklere sahip laktaz enzimlerinin de özgün olduğu düşünülmektedir. Ayrıca literatürdeki saflaştırma işlemleri çok basamaklı, immobilizasyon prosesleri de sanitasyon ve tekrar kullanılabilirlik açısından geliştirilmeye açıktır. Bu nedenle bu projede saflaştırılmış enzimin immobilizasyonu yeni bir destek materyali ile gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda projenin temel amaçları aşağıda özetlenmiştir :

1. Çeşitli süt ürünlerinden maya suşlarının izolasyonu ve maya suşlarının tanımlanması başlıklı bölümün amacı ülkemizdeki doğal habitatlardan yeni *K. lactis* türleri saflaştırıp enzimatik ve genetik özelliklerini belirlemektir. *K. lactis*’de invertaz enziminin biyokimyasal özellikleri hakkında da detaylı literatür bilgisi bulunmamaktadır. İvertaz aktivitesi yüksek olan *K. lactis* suşları endüstriyel amaçlar için *K. lactis*’in yüksek oranda sukroz içeren melas ortamlarında üretilmesi için istenilen bir özelliktir. Bu nedenle proje kapsamında süt ve süt ürünlerinden saflaştırılmış farklı laktaz ve invertaz enzimatik özellikleri olan yeni *K. lactis* suşları saflaştırılıp türleri belirlenmiştir.

Araştırmamızın bir diğer amacı da ülkemizdeki değişik habitatlardan *K. lactis*’e ek olarak farklı endüstriyel kullanım alanları olan yeni maya türlerinin örneğin *M. pulcherrima* türlerini izole edip saflaştırarak türlerinin belirlenmesi ve bu mayaların gıda maddelerinde bakteri, maya ve küflere karşı biyokontrol amaçlı olarak kullanılabilirliğini test etmektir.

2. Maya hücreleri kullanılarak  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretiminde ise *Kluyveromyces* cinsi mayalar kullanılmıştır. Bu amaçla *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces marxianus*

türü mayalar kullanarak  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretimine değişik parametrelerin etkisi incelenmiş, Cevap Yüzey Yöntemi ile matematiksel bir model oluşturarak proses parametrelerinin optimum değerleri belirlenmiş ve optimum şartlarda elde edilen enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda elde edilen enzim uygun koşullarda kitosan-hidroksiapatit kompleksine immobilize edilip, enzimin immobilizasyon sonrası karakteristiği gözlenmiştir.

3.  $\beta$ -Galaktosidaz enziminin Kitosan-Hidroksiapatit kompleksine immobilizasyonun incelenmesi aşamasında model enzim olarak *Kluyveromyces lactis* (Sigma) Beta-galaktosidaz enzimi kullanılmıştır. Öncelikle serbest enzimin karakterizasyonu yapılarak özellikleri belirlenmiş, daha sonra immobilizasyon materyali olarak hazırlanan Hidroksiapatit (HA)-Kitosan'a immobilize edilme koşulları incelenmiştir. HA-Kitosan materyalini aktive etmek amacıyla kullanılan glutraldehit konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve katı/sıvı oranının laktaz enziminin adı geçen desteğe immobilizasyon işlemi üzerine etkileri çalışılmıştır. Ayrıca immobilizasyon materyalinin adsorpsiyon kapasitesi ile enzim immobilizasyonunun zamana göre değişimi incelenmiş; immobilize enzim karakterize edilmiştir.

4. Çeşitli süt ürünlerinden bakteri suşlarının izolasyonu bakteri suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz genlerinin karakterizasyonu başlıklı bölümde farklı *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz genlerinin dizilimleri arasında fark bulunup bulunmadığını saptayabilmek ve eğer varsa bu farklılıkların suşlar arasında ayırım yapıp yapamadığını araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmamızda  $\beta$ -galaktosidaz geni PZR ile çoğaltılmış ve bütün suşlardaki gen dizilimleri arasındaki farklılıklar saptanmıştır.

5. Bakterilerden  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi, saflaştırılması ve immobilizasyonu çalışmasının amacı, Toros bölgesinden toplanan, tamamen doğal yöntemlerle üretilen yoğurt örneklerinden izole edilmiş yoğurt kültürlerinden *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz kaynağı olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu kültürler içinden laktozu kullanma ve laktik asit üretimine bağlı olarak her bir türe ait en iyi 3 kültür bir sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. İstatistiksel deney tasarımı ile besi ortamı, çalkalama hızı ve kültürün  $\beta$ -galaktosidaz ve laktik asit üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca farklı enzim ekstraksiyon yöntemlerinin uygulanması ile ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması ve sonraki çalışmalarda hangi yöntemin kullanılacağına karar verilmesi sağlanmıştır. Belirlenen en yüksek  $\beta$ -galaktosidaz üreten *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşları bir sonraki optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca bu iki suş arasındaki simbiyotik ilişkinin

enzim üretimi üzerine olan etkisi de incelenmiştir. Elde edilen optimizasyon sonuçları kullanılarak fermentör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Böylece elde edilen sonuçların ölçek büyütüldüğündeki değişimi incelenmiştir. Son olarak optimum koşullarda üretilen enzimlerin karakterizasyonu yapılmıştır.

6. Projenin küflerden  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi ile ilgili bölümün amacı; katı kültür yöntemi ile enzim üretimi ve üretimin optimizasyonudur. Enzim üretiminde sıvı tip fermentasyon yaygın olarak kullanılmasına karşın son yıllarda yüksek verimde enzim üretimi sağlayan katı kültür fermentasyon tekniğine olan ilgi artmıştır. Ayrıca bu teknikle endüstriyel sıvı tip fermentasyonlarda kullanılacak olan spor üretimi de gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında katı ortam, şeker çeşidi, aşılama oranı ve kültür çeşidinin enzim üretimi ve spor oluşumu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Küflerden üretilen enzimin daha sonra saflaştırma ve immobilizasyonu çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Laktaz Enzimi ve Endüstriyel Önemi

Laktaz, diğer bir deyişle  $\beta$ -galaktosidaz (EC 3.2.1.23) laktozu glukoz ve galaktoza parçalayan bir enzimdir. Başta süt endüstrisi olmak üzere gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır (Domingues ve ark. 2005, Montanari ve ark. 2000, Voget ve ark. 1994). Laktaz enziminin günümüzde en yaygın kullanım alanı disakkarit olan laktozun hidrolizidir. Fakat son yıllarda laktazın çok önemli bir enzimatik özelliği daha bulunmuştur. Laktaz farklı enzimatik koşullarda transgalaktozilasyon reaksiyonları ile farklı bir şeker gurubu olan galaktooligo sakkaritleri (GOS) de oluşturabilmektedir (Szilagyi, 2002; Lee ve ark. 2004). Bu galaktoz türevlerinin çok önemli prebiyotik özellikleri olduğu bulunmuştur (McFarlane ve ark. 2008).

Laktozun enzimatik hidrolizi, dünya nüfusunun %50'sini oluşturan laktoz intolerant kişilerin laktoz içeren gıdaların tüketimine olanak sağlayacaktır. Ayrıca endüstriyel uygulamalarda çözünürlüğü artırarak gıdaların teknolojik ve duysal özelliklerinin iyileştirilmesi, galaktooligosakkaritlerin oluşumu (Jurado ve ark. 2002) ve peynir altı suyu tozunun farklı ürünlere dönüşümü gibi yararlar sağlamaktadır (Linko ve ark. 1998).

Çiğ süt ile starter kültür kullanılmadan üretilen geleneksel süt ürünlerimizde bulunan çeşitli mikroorganizmalar (özellikle laktik asit bakterileri ve mayalar), laktozun hidrolizinde kullanılan laktaz enziminin üretimi için en önemli kaynaklardır. Örneğin çiğ süt çok geniş bir laktik asit bakteri çeşitliliği içerirken, kefir daneleri üzerinde yapılan çalışmalar bunlarda birbirinden farklı mikroorganizmalar bulunabileceğini göstermiştir. Danelerin hepsinde *S. lactis*, *L. casei*, *L. brevis* bakterileri ile *K. lactis* veya *K. fragilis* 'in mevcut olduğu; bazılarında da *Saccharomyces faecalis*, *Saccharomyces cremoris* bulunduğu anlaşılmıştır. Literatürde kımızda da *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus*, *K. marxianus* ve *Saccharomyces lactis* olduğundan da yoğun olarak bahsedilmektedir. Ayrıca geleneksel metodlarla üretilen yoğurt, peynir ve lor çeşitlerimizde de farklı laktik asit bakterileri, küf ve mayaların bulunduğu tahmin edilmektedir.

Ticari  $\beta$ -galaktosidaz üretimi amacıyla bakteri, küf, maya gibi birçok mikrobiyolojik kaynak kullanılmaktadır (Vasiljevic ve Jelen 2001). Bakteri ve mayalardan elde edilen enzim hücre içi bir enzim olup küflerden üretilen enzim hücre dışıdır. Literatürde mezofilik küf



kullanılarak gerçekleştirilmiş birçok çalışma olmasına karşı termofilik küflerin kullanımına ilişkin fazla bilgi yer almamaktadır. Enzim üretiminde sıvı tip fermentasyon yaygın olarak kullanılmasına karşın son yıllarda yüksek verimde enzim üretimi sağlayan katı kültür fermentasyon tekniğine olan ilgi artmıştır. Ayrıca bu teknikle endüstriyel sıvı tip fermentasyonlarda kullanılacak olan spor üretimi de gerçekleştirilmektedir.

## 2.2. Mayalar

### 2.2.1. *Kluyveromyces lactis*'in Genetik Yapısı, Özellikleri ve Laktaz Enzim Biosentezinin Genetik Kontrolü

Laktaz üretiminde kullanılan en önemli mikroorganizma *Kluyveromyces lactis*'dir (Adam ve ark. 2004; Rubio-Teixeira, 2006). Bu maya süt ve süt ürünlerinde yaygın olarak bulunan önemli bir endüstriyel türdür. Basit üreme ortamlarında hızlı bir şekilde üretilebilmesi, bilinen herhangi bir toksik veya patojenik özelliğinin olmaması *K. lactis*'in temel ve uygulamalı araştırmalarda önemli bir model sistem olarak geliştirilmesini sağlamıştır (Schaffrath ve Breunig 2000).

*K. lactis*'e gen aktarımı ve heterolog gen ekspresyonu için uygun vektör sistemleri, seçilebilir marker genleri ve aktiviteleri kontrol edilebilen promotor sistemleri de bulunmaktadır (van Ooyen ve ark. 2006). Bu avantajlarına ek olarak *K. lactis*'te ekspres edilen proteinlerin bir çoğu doğru bir şekilde modifiye edilebilmektedirler. *K. lactis*'in sekresyon sistemi de oldukça etkin olup gerektiğinde heterolog ekspresyonu yapılan proteinlerin üreme ortamına salgılanması da sağlanmaktadır. Bu özellik özellikle endüstriyel uygulamalarda önemli avantajlar sağlamaktadır.

*K. lactis* klasik olarak askomycetes gurubunda yer alan ve laktoz kullanımı ile karakterize edilmiş bir maya türüdür. İlk tanımlandığında yanlış olarak *Saccharomyces lactis* olarak tanımlanmıştır fakat daha sonra moleküler taksonomi yöntemleri kullanılarak farklı bir tür olduğu belirlenerek *Kluyveromyces lactis* olarak yeniden adlandırılmıştır (Kurtzman ve Robnett, 1998; Kurtzman ve Fell, 2000; Lachance 2007). *Kluyveromyces* genusunda çok sayıda tür tanımlanmamıştır ve bu genusta iyi tanımlanmış tür sayısı 6'dır (Lachance 2007). Bu genustaki bazı türlerin laktoz negatif olması ayrı bir özelliktir. *K. lactis* morfolojik olarak sferik veya oval'e yakın bir şekilde bulunur ve hücreleri de *S. cerevisiae*'dan biraz küçüktür.

*K. lactis*'in genom yapısı Fransa'da farklı üniversitelerin araştırıcılarından oluşturulan Genolevures konsorsiyumu tarafından belirlenmiştir. Elektroforetik olarak çok iyi ayrıştırılabilen 6 kromozomdan oluşur. Kromozom büyüklükleri 1-3 Megabaz arasında değişmekte olup toplam genomunun da 10.6 Megabaz olduğu belirlenmiştir (Bolotin-Fukuhara, ve ark. 2000; Fukuhara, 2006). Toplam protein kodlayan toplam gene sayısı da 5300'dr. *K. lactis* genomunda bulunan protein kodlayan genlerin büyük bir bölümünün (yaklaşık 2500 ORF) *S. cerevisiae* ile önemli homoloji gösterdiği bulunmuştur. *K. lactis* nükleusunda kromozomal DNA'ya ek olarak halkasal plazmit de bulunmaktadır. pKD1 olarak adlandırılan bu nükleer plazmit yapısı olarak *S. cerevisiae*'da bulunan 2-mikron plazmitlerine benzemektedir (Schaffrath ve Breunig 2000). Plazmit pKD1'in diğer *Kluyveromyces* türlerinde de stabil olarak bulunabildiği gösterilmiştir. Nükleer plazmit pKD1'e ek olarak bazı *Kluyveromyces* türlerinde killer toksin kodlayan sitoplazmik plazmitler de bulunabilmektedir (Schaffrath ve Breunig 2000). Bu sitoplazmik plazmitlerden anti-yeast killer toksin özelliği olan Zymocin kompleksi proteinleri kodlanmaktadır. Endüstriyel amaçlar için kullanılacak mayaların killer toksinlere dirençli olması aranan bir özelliktir.

Laktaz enziminin üretiminde en önemli kaynak olan *Kluyveromyces* cinsine ait maya türlerinden en yaygını *K. lactis* ve buna yakın suşlardır. Laktaz enzimi *K. lactis*'de LAC4 geni tarafından kodlanmakta olup bu genin transkripsiyonu glikoz baskılaması ile kontrol edilmektedir. *K. lactis* reme ortamında yüksek miktarlarda serbest glikozun bulunması LAC4 geni transkripsiyonunu baskılamakta ve bunun sonucu olarak da laktaz enzimi biyosentezi yapılamamaktadır (Breunig, 1989).

Laktaz enzimi biyosentezi *K. lactis*'de çok kompleks bir düzenlenme sistemi ile kontrol edilmektedir. Laktoz hidrolizi için gerekli olan laktaz enzimi LAC4 geni tarafından kodlanmaktadır. Laktozun *K. lactis* hücrelerine transportu için gerekli olan membran proteini olan laktoz permeaz ise LAC12 geni tarafından kodlanmaktadır. LAC4 ve LAC12 genleri *K. lactis*'de B kromozomu üzerinde 2,6 Kbp'lik bir bölgede bulunurlar ve zıt yönlere doğru ortak promotor bölgelerinden transkribe edilirler (Gdecke ve ark. 1991). LAC4 ve LAC12 genlerinin ekspresyonu transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir. Her iki genin de başlıca aktivatörü LAC9 geni tarafından kodlanan ve *S. cerevisiae* Gal4p faktörüne yapısal ve işlevsel olarak çok benzeyen aktivator proteindir. LAC9 geni daha sonra K1GAL4 olarak adlandırılmıştır (Witte ve Dickson, 1990; Zenke ve ark. 1993). K1GAL4'n negatif regolatr de K1GAL80 olarak adlandırılan transkripsiyon faktörüdür. LAC genleri transkripsiyonu glukoz varlığında transkripsiyonel seviyede baskılanmaktadır. Bu genetik olay glukoz

baskılması olarak adlandırılmakta olup birçok mikroorganizmada da görülmektedir. Bu baskılama K1Gal80p'nin K1Gal4p'yi inaktive etmesi ile sağlanmaktadır (Zacharie ve Breunig, 1993; Zenke ve ark. 1993).

*K. lactis*'in üreme ortamında laktoz veya galaktoz bulunması LAC/GAL genlerinin hızlı bir şekilde aktive edilmesine neden olur. Bu aktivasyon bazı *K. lactis* suşlarında bazal seviyelerin 250 katı kadar olabilir (Dickson ve Markin, 1980). LAC/GAL genleri aktivasyonu sırasında K1Gal80p'nin K1Gal4p üzerine olan baskılayıcı veya engelleyici etkisi bozulmaktadır. Bu şekilde K1Gal80p'nin negatif etkisinden kurtulan K1Gal4p'de laktoz metabolizması için gerekli olan LAC ve GAL genleri transkripsiyonlarını aktive etmektedir.

*K. lactis*'in farklı suşlarında glukoz baskılamasının çok farklı seviyelerde olduğu rapor edilmektedir. Bu farklılıklar kısmen transkripsiyon faktörü K1Gal4'ün LAC4 geni promotor bölgesine bağlanma afinitesi ile ilgilidir. Fakat *K. lactis* de glukoz transporterlerin aktivitesinin de glukoz baskılamasında etken faktörler olduğu rapor edilmiştir (Schaffrath ve Breunig, 2000). Bu faktörlere ek olarak sitoplazmik protein kinaz olan ve glukoz sinyal iletiminde önemli bir sitoplazmik sensör protein olan K1Snf1p'nin glukoz baskılanmasında etkin olduğu bilinmektedir (Dong ve Dickson, 1997; Rubio-Teixeira, 2006).

*K. lactis* ve buna yakın türlerde laktaz enziminin bazı özellikleri analiz edilmiştir (Furlan ve ark., 2001; Brady ve ark., 1995). Glikoz baskılamasına ek olarak, laktaz enzimi biyosentezine etki eden üreme ortamı fiziksel özelliklerinden bazıları belirlenmiştir. Üreme ortamına 6 bar kadar basınç uygulanmasının laktaz enzimi biyosentezini önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir (Pinheiro ve ark., 2003). Üreme ortamı pH değeri, ısı, aşılama oranı gibi faktörlerin *Kluyveromyces* genusuna cinsine ait diğer bir tür olan *K. marxianus*'da laktaz biyosentezine etkileri de ölçülmüştür (Furlan ve ark., 2001). Endüstriyel amaçlar için maya üretiminde kullanılan melas, peyniraltı suyu gibi üreme ortamlarında fazla miktarda bulunan NaCl ve sükrozun bazı fungal enzimlerin biyosentezini negatif olarak etkilediği daha önce rapor edilmiştir (Attfield, 1997; Türkel, 2000).

*K. marxianus*'dan laktaz üretimi için substrat olarak şeker kamışı melası ve azot kaynağı olarak mısır ıslatma suyu kullanıldığında, peyniraltı suyu ile yapılan çalışmalara nazaran daha yüksek verimlilikler elde edilmiştir. Ayrıca bu mikroorganizmanın laktaz sentezinde metabolizmasına çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının etkisi incelendiğinde havalandırma hızının kontrollü ve yüksek olması gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Furlan ve ark., 2000; Furlan ve ark., 2001; Cortes ve ark., 2005).

Ek olarak *K. lactis* tedavi amaçlı kullanılan çeşitli enzim, yapısal protein ve peptid yapılı hormonların üretiminde de yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu uygulama alanlarına ek olarak *K. lactis*'in peynir altı suyunun laktoz içeriğinin azaltılmasında da biyoremediasyon amaçlı olarak kullanımı son yıllarda oldukça önem kazanmaktadır. *K. lactis*'in doğal olarak en fazla bulunduğu habitat süt ve süt ürünleridir. Bu ortamlardan farklı enzimatik özellikleri olan yeni *K. lactis* türlerinin saflaştırılıp enzimatik ve genetik özelliklerinin karakterize edilmesi önem kazanmıştır. *K. lactis*'in farklı suşları laktaz enzimi aktiviteleri kıyaslandığında tür içi varyasyonlar gösterdiği rapor edilmektedir.

### 2.2.2. İnvvertaz Enzimi ve Biyoteknolojide Kullanım Alanları

İnvvertaz ( $\beta$ -D-Fruktofuranosid Fruktohidrolaz; E.C. 3.2.1.26) enzimi gıda sanayinde kullanılan diğer önemli bir enzimdir. İnvvertaz daha çok *Saccharomyces cerevisiae*'dan saflaştırılmaktadır. *S. cerevisiae*'da invvertaz enziminin kodlandığı gen *SUC2* olup ekspresyonu glukoz baskılanması ile transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir (Sarokin ve Carlson, 1985). İnvvertaz *S. cerevisiae*'da iki farklı formda bulunmaktadır. Bunlar glikozillenmiş periplazmik form ile glikozillenmemiş formdaki sitoplazmik formdur. İnvvertazın her iki formu da aynı *SUC2* geninden transkribe edilmektedir (Carlson ve Botstein 1982). *S. cerevisiae* *SUC2* geni maya hücrelerinde glukoz baskılamasının analizi için model sistem olarak da kullanılmaktadır (Trumbly, 1992; Calson 1999). İnvvertaz enzimi maya hücrelerinin endüstriyel ortam olan melasta üretilmeleri için gereklidir. Yüksek invvertaz aktivitesi olan *S. cerevisiae* hücreleri melas içeren prosesler için tercih edilmektedir. Ekmek mayası olarak üretilen endüstriyel *S. cerevisiae* suşlarında *SUC2* geninde çok sayıda duplikasyonlar olduğu da gösterilmiştir (Codon ve ark., 1998).

*Kluyveromyces cerevisiae*'da da invvertaz aktivitesi karakterize edilmiştir (Goffrini ve ark., 1995). Yapılan bu ilk araştırmada invvertaz enziminin *KIINV1* olarak adlandırılan tek genden kodlandığı bulunmuştur (Goffrini ve ark., 1995). *K. lactis* genomunun tamamlanması sonucu olarak *KIINV1* geninin A kromozomunda yer aldığı belirlenmiştir. *K. lactis*'de de invvertaz aktivitesinin glukoz baskılanması ile kontrol edildiği, üreme ortamında glukoz bulunduğunda *KIINV1* geninden invvertaz ekspresyonu yapılmadığı gösterilmiştir (Georis ve ark., 1999).

### 2.2.3. *Metschnikowia pulcherrima* Türü Mayaların Özellikleri ve Gıda Sektörü için Önemi

Bazı mikroorganizmaların buldukları ortamdaki diğer mikroorganizmaların üremelerini baskıladıkları uzun süredir bilinmektedir. Bu baskılama bir türün üreme ortamına killer toksin olarak bilinen bazı maddeleri salgılaması, besin için rekabette bir türün diğerine baskın gelmesi veya bir mikroorganizma türünün salgıladığı bir organik bileşik ile diğer türlerin üremelerini engellemesi şeklinde olabilir. Mikroorganizmaların bu özellikleri bilindiğinden bunun biyokontrol amaçlı olarak kullanımı önerilmiştir. Mikrobiyal hastalıkların önlenmesinde kimyasal maddelerin kullanılması kısa sürede kullanılan kimyasala karşı hedef mikroorganizmalarda direnç oluşumuna neden olmaktadır (Espinell-Ingroff, 2008). Özellikle bitki veya bitkisel ürün patojeni olan maya, küf ve bakterilerin kimyasallar ile yok edilmesi işlemi sırasında kullanılan kimyasalların çevre kirliliğine de neden olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal patojenlerle mücadelede kimyasallara karşı en iyi alternatif biyokontrol amaçlı olarak doğal habitatlarda bulunan bazı antagonistik mayalardır (Droby ve Chalutz, 1994).

*Metschnikowia pulcherrima* türü mayaların biyokontrol mayası olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Qin ve ark, 2004). *M. pulcherrima* türü mayaların doğal habitatı üzüm gibi tatlı meyvelerdir (Mills ve ark., 2002). *M. pulcherrima* üreme ortamına kırmızı renkli pigment olan Pulşerimin (Pulcherrimin) salgılamaktadır (Kluyver ve ark. 1953). Pulşerimin pigmentinin ortamdaki demiri bağlayarak şelat oluşturduğu ve diğer mikroorganizmaların demir kullanımını engellediği, bu nedenle de ortamdaki diğer mikroorganizmalara karşı antagonistic etkisi olduğu gösterilmiştir (Sipiczki, 2006).

### 2.3. Bakteriler

Termofilik laktik asit bakterileri yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde de diğer mikrobiyal kaynaklar gibi yaygın olarak kullanılan kültürlerdir (Nancip ve ark. 1999). Fermente süt ürünlerin tüketimi, sağlık üzerine olan önemli etkileri dikkate alındığında giderek artmaktadır.

Yoğurt, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürlerinin kullanılmasıyla üretilmektedir (Kristo ve ark., 2003). *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*, bazı fermente süt ürünlerinin üretim prosesinde önemli bir yere

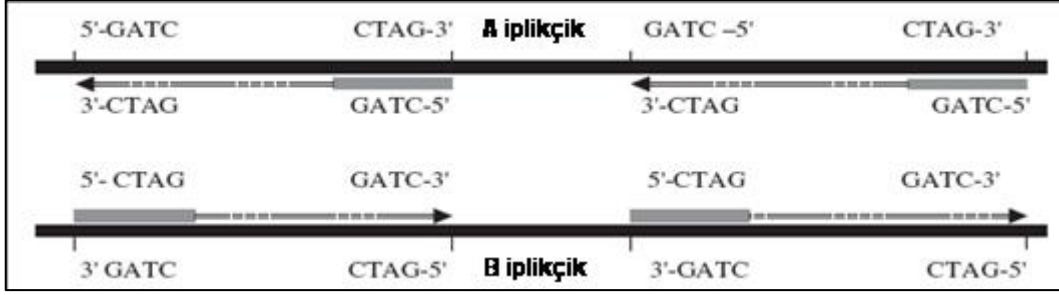
sahip olan, ekonomik açıdan çok önemli mikroorganizmalardır. Bunun yanı sıra, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* önemli bir  $\beta$ -galaktosidaz üreticisi olarak da bilinmektedir. Bu kültürlerden üretilen  $\beta$ -galaktosidaz'ın nötral pH'da aktif ve *Kluyveromyces lactis*'in ürettiği  $\beta$ -galaktosidaz enzimine oranla sıcaklığa daha stabil olduğu bildirilmektedir (Greenberg ve Mahoney, 1982).

### **2.3.1. Bakterilerde $\beta$ -galaktosidaz Gen Dizimleri Farklılıkları**

$\beta$ -galaktosidaz geni laktik asit bakterileri alanında yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir gendir. Giraffa ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları araştırmada  $\beta$ -galaktosidaz geni kullanılarak *L. delbrueckii* alttürlerinde ve bu alttürlerin suşlarında farklılıklar saptanabilmiştir. Bu çalışmada PZR-RFLP yöntemi kullanılarak  $\beta$ -galaktosidaz geni ve diğer iki gen (laktoz permeaz ve proteaz) PZR ile çoğaltılmış ve seçilen kesim enzimleri ile kesilmişlerdir. Bu işlem sonucunda oluşan parmakizleri ise alttürlerin ve suşların ayırımında başarılı olmuşlardır. Bu örnekten yola çıkılarak çalışmamızda farklı *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz genlerinin dizimleri arasında fark bulunup bulunmadığını saptayabilmek ve eğer varsa bu farklılıkların suşlar arasında ayırım yapım yapamadığını araştırmak amaçlanmıştır. Projemizde  $\beta$ -galaktosidaz geni PZR ile çoğaltılmış ve bütün suşlardaki gen dizimleri arasındaki farklılıklar saptanmıştır.

### **2.3.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tiplendirilmesi**

RAPD-PZR laktik asit bakterilerinin tiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ayrıca AP-PZR (arbitrarily primed PCR) olarak da adlandırılmaktadır. RAPD-PZR yöntemi fungi, bitkiler ve hayvanlar gibi ökaryotlarda özellikle popülasyon genetiği alanında kullanılmaktadır (Perez ve ark., 1998). RAPD-PZR yönteminde genellikle 10 bazdan oluşan rastgele primerler kullanılarak değişik büyüklüklerde genomik DNA parçaları çoğaltılmaktadır. Primerler genomik DNA üzerindeki spesifik bir bölgeye bağlanırlar ve bu spesifik bölge üzerindeki nükleotid farklılıklarını ya da primerler arasındaki bölgede meydana gelen uzunluk farklılıklarını ortaya çıkarırlar (Şekil 1).



**Şekil 1.** Polimorfik dizilimlerin rastgele çoğaltılması (Levin, 2003)

Çoğaltılan DNA parçalarının büyüklükleri jel elektroforez ile yürütülür ve görüntülenir. Elde edilen parmakizleri birbirleri ile karşılaştırılarak değişik örnekler arasındaki farklılıklar gözlenebilir.

RAPD-PZR metodu kolay, basit ve hassas bir methodur ve en önemli özelliği çalışılan organizma hakkında önceden bilgi sahibi olma gereksinimi yoktur. Bu metodun en önemli dezavantajı ise standardize edilmek zorunda olmasıdır, zira aynı organizma ve aynı primerlerle çalışılmasına rağmen farklı laboratuvarlar arasında farklı parmakizleri üretilmesine sıklıkla rastlanılmaktadır. Yüksek standartlarla çalışıldığında RAPD-PZR metodu parmakizi kütüphanelerinin oluşturulmasında ve daha sonraki çalışmalarda referans olarak kullanılabilir (Rosetti ve Giraffa, 2005). Levin (2003), *Listeria monocytogenes* tiplendirilmesinde RAPD-PZR yöntemini PFGE ile kıyaslamıştır. Bu çalışma sonucunda Levin iki yada daha fazla primer kullanılması durumunda RAPD-PZR yönteminin PFGE yöntemiyle eşit farklılaştırma gücüne sahip olduğunu göstermiştir.

RAPD-PZR yöntemi birçok araştırmacı tarafından süt ürünlerinden izole edilen organizmaların tiplendirilmesinde kullanılmıştır. Coppola ve ark., (2006) fior di latte di agerola peynirinin üretimindeki mikrobiyal çeşitliliği, Kenny ve ark., (2005) cheddar peynirinin mikrobiyal çeşitliliğini, ve Sanchez ve ark., (2005) keçi sütündeki mikrobiyal çeşitliliği RAPD-PZR metodunu kullanarak çalışmışlardır. Bu çalışmalarda çalışılan oragnizmalar önce fenotipik metodlar kullanılarak tanımlanmış ve ardında RAPD-PZR ile tiplendirilmeleri yapılmıştır.

#### 2.4. Küfler

Küflerde  $\beta$ -galaktosidaz üretim metabolizması bakteri ve mayalardan farklıdır, örneğin küflerin optimum pH değerleri daha düşük değerlerdedir. Bakteri ve mayalarda  $\beta$ -

galaktosidaz laktozlu ortamlarda üretilirken, küflerde enzim üretiminin laktozun yanı sıra ksiloz, galaktoz, arabinoz gibi hücre duvarı yapı taşlarında bulunan monosakkaritler tarafından da tetiklendiği görülmüştür (de Vries, 2003; Fekete ve ark., 2002). Bu da  $\beta$ -galaktosidaz enziminin küflerde bitkilerin hücre duvarı polisakkaritlerini parçalamak üzere salgılanan bir seri enzimin bir parçası olarak üretildiği kanısını güçlendirmektedir (De Vries, 2003).

$\beta$ -Galaktosidaz için endüstriyel küfler olan *A. oryzae* ve *A. niger* dışında literatürde bu enzim için çalışılan diğer küfler arasında *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus foetidus*, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium multicolor*, *Alternaria tenuis* sayılabilir. Bu küflerden elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz enzimlerinin optimum pH'sı 4,0 ile 5,5; optimum sıcaklığı 50 ile 65 arasında değişmektedir. Bu enzimlerin bazıları hücre dışı (öneğin *Penicillium multicolor*, *Penicillium notatum*), bazıları ise hücre içi (öneğin *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium chrysogenum*) enzimler olarak ifade edilmiştir (Samoshina ve Samoshin, 2004; Fekete ve ark., 2002; Fischer ve ark., 1995; Nagy ve ark., 2001; Szczodrak ve Wiater, 1998).

$\beta$ -Galaktosidaz üretebilen küfler literatürde taranırken, ürettiği diğer ara ürünler ve gıdaya uygulanabilirliği de göz önüne alındığında, tutuklamalı sistemlerde kullanılabilirliği sağlayan termofilik özelliklerinden dolayı *Rhizomucor pusillus* ve *Rhizomucor meihei* türleri potansiyel enzim kaynakları olarak değerlendirilebilecek küfler arasında öne çıkmışlardır.

*Rhizomucor* toprakta ve çürüyen meyve ve sebzelerde bulunan yaygın bir küf cinsidir. Mantarlar aleminde *Zygomycota* filumuna ait *Mucorales* takımının *Mucoraceae* ailesi içinde yer alan bir cinstir. *Rhizomucor* cinsi üç türe ayrılır. Bunlardan *Rhizomucor pusillus* ve *Rhizomucor miehei* kesin olarak tanımlanmış olmakla birlikte üçüncü tür için literatürde *Rhizomucor tauricus* ya da *Rhizomucor variabilis* gibi farklı isimler yer almaktadır. Burada sözü edilen *Rhizomucor* türlerinin hepsi başlangıçta *Mucor* cinsine ait olarak tanımlanmış, fakat daha sonraları termofilik özellik gösterdikleri ve stolon ile rizoidlere sahip oldukları keşfedilerek *Mucor*'dan farklı bir cins olarak tanımlanmışlardır.

*R. pusillus* ve *R. meihei* daha çok literatürde lipaz ve proteaz üreticileri olarak tanınmak ve sanayide renin üreten mikroorganizmalar olarak bilinmektedirler. Ancak son zamanlarda bu cinsin  $\beta$ -galaktosidaz üretme potansiyeli üzerinde de durulmaktadır. Bununla ilgili iki grubun çalışması vardır. İsmail ve arkadaşları (1997) *Mucor (Rhizomucor) pusillus* türünden ürettikleri  $\beta$ -galaktosidaz enzimini sırası ile aseton çöktürmesi, jel filtrasyonu ve



iyon değiştirme kromatografisi yöntemleri ile saflaştırmışlardır. SDS PAGE yöntemi ile enzimin molekl ağırlığının 129 kDa olduğu bulunmuştur. pI değerini de 4,55 pI değerine sahip olan enzimin optimum aktivite sıcaklık ve pH'sı sırası ile 4,0 ve 65 °C olarak belirlenmiştir. Üretilen enzime galaktoz ve galaktono 1-4 laktonun engelleyici etkisi olduğu grlmştir. 37 °C'de laktoz için  $K_m$  değeri 22 mM olarak bulunmuştur. Shaikh ve arkadaşları (1997) ise *Rhizomucor* cinsine ait olan ancak türünü belirtmedikleri bir kfle çalışmışlar ve hücre dışı olarak elde ettikleri  $\beta$ -galaktosidaz enziminin optimum aktiviteyi pH 4,5'da ve 60 °C'de verdiğini belirlemişlerdir. Aynı ekip (1999) enzimin bu kf tarafından katı ortamdaki üretiminin sıvı ortamdakine oranla dokuz kat daha yüksek aktivite verdiği belirtmektedir. Ancak bu çalışmalarda *Rhizomucor* cinsine ait bu küfün katı ve sıvı ortamlardaki enzim miktarları sağlıklı bir karşılaştırma ve yorum yapılabilecek şekilde ifade edilmemiştir.

## 2.5. Laktaz Enziminin İmmobilizasyonu

Laktaz enziminin immobilizasyonunda şimdiye kadar kullanılan metodlar aljinat ve selüloz asetat içeren desteklerde ve titanyumisoprosite enkapsülasyonu; kitosan, poliüretan köpük, aljinat, jelatin ve kemik tozuna kovalent bağlama ile fenol-formaldehit reçineleri ve kemik tozu üzerine fiziksel adsorpsiyonu kapsamaktadır. Bir diğer çalışmada *A. niger*'den elde edilen laktaz, glutraldehitte muamele edilmiş olan aljinat ve jelatin karışımından oluşan fiberlere immobilize edilmiştir. Tutuklanan laktaz enziminin pH ve sıcaklık stabilitelerinin serbest enzime göre daha artmış olduğu bulgulanmıştır (Tanrıseven ve Doğan, 2002).

Mikrobiyal laktazların arasında *Aspergillus niger*'den üretilenler immobilizasyon için en uygun enzimlerdir. Düşük pH ve yüksek sıcaklık optimasındaki bu enzimlerin immobilizasyonu asidik peynir suyunun hidrolizinde avantajlar sağlamaktadır. İmmobilizasyon için inorganik destek materyallerinin kullanılması son yıllarda önem kazanmaktadır. Organik desteklere immobilize edilen enzimlere göre depolama ve işlem sırasında daha stabildirler. Bu nedenle yapılan çalışmalarda silika-alumina, seramik monolit gibi inorganik materyallere laktaz enziminin fiziksel adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri ile immobilizasyonu araştırılmıştır. Tutuklanmış enzimin termal stabilitesinin geliştiği ve destekten enzim sızıntısının engellendiği ve aktivitenin uzun süre korunduğu bulgulanmıştır (Papayannakos ve Markas, 1993). *K. fragilis*'den elde edilen nötral laktaz, glutraldehit ile muamele edilmiş silanize poroz cama immobilize edilmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

*Kluyveromyces lactis* suşlarının izolasyonu ve tanımlanması için, Bursa ilinde 5 farklı bölgede bulunan inek sütü üreticilerinden steril şartlarda 50 ml taze süt ve starter kültür kullanılmadan üretilen beyaz peynir örnekleri (250-500 gram) alınmıştır.

$\beta$ -galaktosidaz enzimi üretimine değişik parametrelerin etkisinin incelenmesi için, Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilen *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279, *Kluyveromyces marxianus* Y-8281 ve Industrial Yeast Collection (Perugia, Italy)'dan temin edilen *Kluyveromyces lactis* hücreleri kullanılmıştır. Mikroorganizmalar, maya-malt ekstrakt agar besiyerinde saklanmış ve ayda bir tazelenmiştir. Ayrıca katı kültür fermentasyonu ile laktaz enzimi üretiminde kullanılan küfler olan *Rhizomucor meihei* ve *Rhizomucor pusillus* Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden sağlanmıştır.

Ticari olarak sağlanan  $\beta$ -galaktosidaz (*Kluyveromyces lactis*) enziminin immobilizasyonu amacıyla kitosan-hidroksiapatit kompleks küreleri kullanılmıştır. Proje önerisinde farklı destek materyallerinin kullanılacağı belirtilmesine karşın, literatürde laktaz enziminin immobilizasyonu amacıyla çok çeşitli destek materyalleri kullanımı ile karşılaşılmıştır. Projede immobilizasyon amacıyla laktaz enzimi için daha önce kullanılmamış ve dolayısıyla özgün olabileceği düşünülen kitosan-hidroksiapatit kompozit materyali hazırlanarak tüm immobilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

Farklı *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz genlerinin dizilimleri arasında fark bulunup bulunmadığını saptayabilmek ve eğer varsa bu farklılıkların suşlar arasında ayırım yapıp yapamadığını araştırmak amacıyla, *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlardan harf ve takip eden numarası (Tablo 1) aynı olanlar aynı yoğurt örneğinden izole edilmişlerdir.

Yoğurt örneklerinden izole edilen, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlanmış olan *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarından *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* 77 (Lb 77), *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* 16 (Lb 16), *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* 22b (Lb 22b) ve *Streptococcus thermophilus* suşlarından *Streptococcus thermophilus* 74 (St 74), *Streptococcus thermophilus* 95/2 (St 95/2), *Streptococcus*

*thermophilus* 77a (St 77a) kullanılmıştır. Yapılan ön tarama çalışmalarında belirtilen bu suşların yüksek laktaz üreticisi olduğu tespit edilmiş olup yapılan çalışmalara bu suşlarla devam edilmiştir. Bu kültürler, %20'lik gliserol stokta kullanılına kadar -80 °C'de saklanmıştır. Kültür aktivasyonu stok kültürden *Streptococcus thermophilus* suşları için 10 ml'lik steril M17, *Lactobacillus bulgaricus* suşları için 10 ml steril MRS besiyerine 1 lupun öze ile aktarılıp, 43 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

*Rhizomucor meihei* ve *Rhizomucor pusillus* kültürleri, 100 µl donmuş stok kültürün Potato Dextrose Agar (PDA) üzerine aşılması ve 45 °C'de 5 gün inkübe edilmesiyle geliştirilmiş ve sonra sporlar yatık PDA besiyerine aktarılıp 45 °C'de 5 gün boyunca iyi bir sporlanma elde edilene kadar inkübe edilmiştir. Bu kültürlerin stokları % 20' lik gliserollü su ile hazırlanmış ve -80 °C'de saklanmıştır. İnkübasyon sonunda sporların yatık besiyerinden hasatı 5 ml steril Tween80-su süspansiyonu (0,02 %) ile yapılmıştır. Spor solüsyonu steril falkon tüpte toplanmış ve 4 °C'de esas çalışma yapılana kadar saklanmıştır. Başlangıç spor sayımı ve canlılık sayımı kaydedilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşları

Tür/alttür	Suş	Kaynak
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	DSM20081	DSMZ*
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	B1000-1	Visby**
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	B1000-2	Visby
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	B1000-3	Visby
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	410-1	Danisco Yo-mix**
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-5	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-14	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-18	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-10	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-16	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-29	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-33	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-38	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-43	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K1-44	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M23-1	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M23-2	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M23-3	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M23-4	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M23-13	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	N2-2	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	N2-4	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	N2-5	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	N3-2	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	N4-3	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	N6-2	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K2-1	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K2-2	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K2-3	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K2-4	Geleneksel yoğurt izolatu

<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	K2-5	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M21-3	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M21-4	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-8	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-12	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-16	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-17	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-20	Geleneksel yoğurt izolatu
<i>L. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	M2-21	Geleneksel yoğurt izolatu

\*Alman Kültür Koleksiyonları Merkezi, \*\*Ticari suş

## 3.2. Yöntemler

Projede laktaz enzim üretimi için çeşitli mikroorganizmalar kullanılmış olup bunların izolatları, standart suşlar ve endüstriyel suşlar için gerçekleştirilen yöntemler izolasyon ve tanımlama, enzim üretimi, saflaştırma ve immobilizasyon alt başlıkları altında verilmiş ve düzenlenmiştir. Maya, bakteri ve küflerden üretilen laktaz enzimlerinin aktiviteleri farklı optimum koşullara sahip olduğu için farklı yöntemler olarak ayrı ayrı açıklanmıştır.

### 3.2.1. Çeşitli Süt Ürünlerinden Laktaz Enzimi Üreticisi Suşların İzolasyonu ve Tanımlanması

#### 3.2.1.1. Maya Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Maya örneklerinin analizinde standart mikrobiyolojik teknikler kullanılmıştır. Bursa ilinde 5 farklı bölgede bulunan inek sütü üreticilerinden steril şartlarda 50 ml taze süt ve starter kültür kullanılmadan üretilen beyaz peynir örnekleri (250-500 gram) alınmıştır. Süt örneklerinden direkt olarak 100 µl alınarak daha önce tanımlandığı şekilde sodyum propiyonat (% 0,1 v/w) eklenmiş YGC (Yeast extract, glucose, chloram phenicol, agar) petrilere yayma ekimi yapılmıştır (Lopandic ve ark. 2006., Fadda ve ark. 2001). Peynir örneklerinden ise iç kısımlardan 1 g alınarak 25 ml steril % 2 (w/v) sodyum sitrat çözeltisinde homojenize edilerek elde edilen homojenattan 100 µl alınarak sodyum propiyonatlı YGC petrilere yayma ekimi uygulanmıştır (Fadda ve ark. 2004) (Ek 1). Her bir süt ve peynir örneğinden aynı şartlarda en az iki farklı ekim yapılmıştır. Ekim yapılan YGC petrilere 30 °C etüvde 3 gün bekletildikten sonra maya kolonileri sayılarak kayıt edilmiş ve örneklerin kob değerleri belirlenmiştir. Maya kolonilerinden rastgele seçilen 150 örnek tekrar YGC petrilere ekilerek oluşabilecek bakteri kontaminasyonu önlenmiştir. Kolonilerin mikroskopik analizleri de yapılarak araştırmalarımızda kontrol suş olarak kullanılan *K. lactis*

ATCC8585 suşuna olan morfolojik benzerlikleri analiz edilmiştir. Elde edilen saf maya kültürleri bu kez karbon kaynağı olarak %2 laktoz veya %2 sukroz içeren YP petrilere ekilmiş ve 30 °C’de 2 gün bekletilerek laktoz ve sukroz pozitif koloniler ayırtdilmiştir (Ek 1). Test edilen 150 maya suşundan 73 suşun laktoz ve sukroz pozitif oldukları belirlenmiştir. Fakat bu suşlardan 37 tanesinde özellikle laktoz petrilinde hızlı/fazla üreme görüldüğünden bu aşamadan sonraki analizlerde sadece seçilen 37 suş kullanılmış ve seçilen suşlar MY (milk yeast) kodu verilerek MY1-MY37 olacak şekilde numaralandırılmıştır. MY1-MY37 suşları YPD ekilmiş ve 30 °C’de 2 gün üretilmiş ve bu suşlardan 1 ml’lik steril %20 gliserol içeren mikrofij tüplerine örnek alınarak -70 °C’lik derin dondurucuda saklanmıştır.

Seçilen MY suşların türlerinin belirlenebilmesi için daha önce tanımlandığı şekilde farklı karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme özellikleri, ozmotik strese dirençlilikleri ve sıcaklığa duyarlılıkları test edilmiştir (Kurtzman ve Fell 2000). Herbir suşun karbon ve azot kullanım özellikleri sonuçlar bölümünde tablo olarak verilmiştir. Seçilen laktoz pozitif MY suşlarının fermentasyon özelliklerine göre türlerinin belirlenebilmesi için API ID 32c test kit’i (Bio Meroux) kullanılmıştır. Saflaştırılan maya örneklerinin API sonuçlarına göre yaklaşık olarak belirlenen türleri sonuçlar bölümünde verilmiştir.

### **3.2.1.1.1. Laktaz ve İvertaz Aktivitelerinin Ölçülmesi**

API test sistemi ve diğer fermentasyon testleri ile *K. lactis* ve *K. marxianus* olarak belirlenen maya suşlarının laktaz ( $\beta$ -galaktosidaz) aktiviteleri kantitatif olarak da belirlenmiştir. *Kluyveromyces* türlerinde laktaz aktivitelerinin belirlenmesinde Zachariae ve Breunig (1989, 1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için önce maya suşları farklı niteliklerde ve farklı konsantrasyonlarda laktoz, glukoz, veya gliserol laktat içeren 5 ml’lik YP (%1 maya ekstraktı (yeast extract), %2 pepton) ortamında durağan faza kadar 30 °C de 120 dönüş/dakika hızda çalkalamalı inkübatörde üretilmiştir. Durağan aşamadaki bu maya kültürleri sonuçlar bölümünde açıklandığı şekilde farklı karbohidratları içeren YP besiyerlerine başlangıç OD<sub>600</sub> değerleri 0,2 olacak şekilde seyreltilerek ekim yapılmış ve 30 °C’ de 120 dönüş/dakika hızda çalkalamalı inkübatörde logaritmik aşamaya kadar üretilmiştir. Aynı maya suşlarının laktaz aktiviteleri endüstriyel üreme ortamı olan peynir altı suyunda üretilerek de hem logaritmik faz ve hem de durağan faz için belirlenmiştir. Peynir altı suyu liyofilize toz olarak bir endüstriyel süt üreticisinden sağlanmıştır. Peynir altı suyu %2’lik sıvı çözelti olarak hazırlanıp standart şartlarda otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyondan

sonra 10 000 rpm de santrifüj edilerek protein çöktürmeleri ayrıştırılmış ve ondan sonra direkt üreme ortamı olarak kullanılmıştır (Siso 1994., Becerra ve Siso, 1996).

Üreme süreleri sonunda maya hücreleri soğutmalı masa üstü santrifüjde +4 °C' de 5000 g de 5 dakika çöktürülmüştür. Çöktürülen maya hücreleri 10 ml soğuk steril distile suda süspansiyon edilerek tekrar aynı şartlarda çöktürülmüştür. Daha sonra çöktürülen maya hücreleri 200 µl'lik laktaz tampon çözeltisinde süspansiyon edilerek steril 1,7 ml'lik mikrofüj tüplerine transfer edilmiş, ve -70 °C'deki derin dondurucuda laktaz aktiviteleri ölçülünceye kadar saklanmıştır (Zachariae ve ark. 1993., Breunig 1989). Laktaz aktivitelerinin ölçümü için dondurulan *Kluyveromyces* örnekleri buz içinde bekletilerek yavaş çözünmeleri sağlanmıştır. Çözünen hücrelere 20 ml % 0.1'lik SDS ve 20 ml kloroform ilave edilerek 10 saniye süresince en hızlı devirde vortekslenerek permeabilize edilmiştir (Flores ve ark. 1994). Permeabilize edilen *Kluyveromyces* örneklerinin laktaz aktiviteleri 30 °C'de O-nitro-phenyl-β-D-galactoside (ONPG) kullanılarak aşağıda açıklandığı şekilde belirlenmiştir (Zachariae ve ark. 1993., Guarante 1983).

Her bir *Kluyveromyces* örneği için üçlü olarak hazırlanmış 10x100 mm'lik cam tüplere 980 µl'lik laktaz tampon çözeltisi (Z-Buffer) konulmuş ve bu tampon çözelti içine kloroform ve SDS ile permeabilize edilen *Kluyveromyces* süspansiyonlarından 20 µl'lik karışım ilave edilmiştir. Daha sonra bu deney çözeltisinin optimum sıcaklığa ulaşabilmesi için 30 °C'de su banyosunda 2 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda da permeabilize edilmiş hücre karışımına 200 µl ONPG eklenerek 30 °C'de açık sarı renk oluşuncaya kadar beklenmiştir. Reaksiyon tüplerinde açık sarı renk oluştuğunda süresi sonunda ONPG-Laktaz reaksiyonları 500 µl 1M sodyum karbonat ilave edilerek durdurulmuştur. Bunun için geçen süre de kayıt edilmiştir. Reaksiyon tüpleri masa üstü santrifüjde 1500 g'de 5 dakika süresince santrifüj edilip, hücreler çöktürülmüş, çözeltilerin absorbansları 420 nm'de Shimadzu Mini 1240 model spektrofotometrede ölçülmüştür. Deneyler aynı *Kluyveromyces* suşu için üçlü olarak yapıldı ve en az üç kez tekrarlandı. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen tablolardaki laktaz aktiviteleri en az 18 farklı deneyin ortalamasını göstermiştir. Laktaz aktiviteleri Miller Ünitesi (MU) olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda standart sapmanın % 20'nin altında olduğu bulunmuştur.

*Kluyveromyces* suşlarının laktaz enzim aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edilmiştir.

Aktivite: Miller Ünitesi, MÜ:  $(OD_{420} \times 1000) / (t \times V \times OD_{600})$

$OD_{420}$ : Laktaz reaksiyonunda oluşan sarı rengin 420 nm'deki absorbansı

t: Laktaz reaksiyon süresi (Dakika cinsinden verilmelidir)

V:  $v_h \times$  Konsantrasyon faktörü

$v_h$ : Laktaz reaksiyonunda kullanılan hücre süspansiyonu hacmi (genellikle 0.02 ml)

Konsantrasyon faktörü: 5 ml hücre çöktürülüp 0,2 ml maya lizis çözeltisinde çözüldüğünden konsantrasyon faktörü 25 olacaktır. Deneylerde kullanılan hücre hacmine göre değişebilir.

OD<sub>600</sub>: Laktaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan 1 ml *Kluyveromyces* hücrelerinin 600 nm'deki ölçüm değeri.

*Kluyveromyces* suşlarının invertaz aktivitelerinin ölçümünde de benzer şartlar kullanılmıştır. Glukoz repressed ve derepressed *Kluyveromyces* hücreleri daha önce tanımlandığı şekilde hazırlanmıştır (Celenza ve Carlson 1984). Bunun için *Kluyveromyces* suşları glukoz baskılaması sağlayan üreme koşulları olan YPD üreme ortamında (%1 yeast extract, %2 peptone, %2 glukoz) durağan faza kadar karıştırmalı etüvde (120 devir/dakika) 25-28 °C'de üretilmiştir. Bu maya kültürlerinden taze YPD ortamına (10-15 ml) OD<sub>600</sub>: 0,2-0,3 olacak şekilde ekim yapılarak logaritmik aşamaya kadar aynı şartlarda üremeleri sağlanmıştır. Maya hücreleri santrifuj ile çöktürülüp 15 ml'lik steril soğuk saf su ile yıkayıp tekrar santrifujle çöktürülmüştür. Bu kez 10 ml YP besi yeri içinde süspanse edilen *Kluyveromyces* suşları 5'er ml'lik 2 kısma ayrılmıştır. Bunlardan birincisi glukoz baskılaması (%2 glukoz) diğeri de glukoz baskılamasının olmadığı şartlarda üreme için %0,05 glukoz eklenmiştir. *Kluyveromyces* suşları bu şartlarda 2 saat daha üretilmiş, üreme periyodu sonunda çöktürülerek daha önce tanımlandığı şekilde invertaz aktiviteleri sukroz substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir (Rothe ve Lehle 1998., Goldstein ve Lampen 1975). *Kluyveromyces* suşlarının invertaz aktiviteleri sonucu açığa çıkan glukoz konsantrasyonları ikişerli olarak ve enzimatik yöntem (glukoz oksidaz-peroksidaz sistemi) kullanılıp spektroskopik olarak belirlenmiştir. Bu araştırmada kullanılan *Kluyveromyces* suşlarının hücre dışı invertaz aktiviteleri açığa çıkan  $\mu\text{mol}$  glukoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak verilmiştir. *Kluyveromyces* suşlarının kuru ağırlığı OD<sub>600</sub>:1 için 0,5 mg olarak alınmıştır. Deneyler her suş için en az iki kez tekrarlandığından verilen invertaz aktiviteleri 4-6 farklı deneyin ortalamaları olarak verilmiştir. Aynı *Kluyveromyces* suşu için belirlenen invertaz aktiviteleri arasındaki standart sapmanın da % 5'den daha az olduğu görülmüştür.

*Kluyveromyces* suşlarının invertaz enzim aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edilmiştir.

$$\text{İnvertaz Aktivitesi} = (\Delta_A \text{Örnek} / \Delta_A \text{Standart}) \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

$\Delta_A$ Örnek: Örneklerin OD546'daki absorbansı

$\Delta_A$ Standart: Standart glukoz çözeltisini OD546'daki absorbansı

Standart konsantrasyonu: Standard glukoz konsantrasyonu (5,55 mmol/l) olarak kullanıldı. Glukoz konsantrasyonlarının ölçümünde Biocon glukoz tayin kiti kullanılmıştır.

İnvertaz aktivitesi: Bir ünite invertaz enzimi, 1  $\mu$ mol glikoz/dakika/100mg kuru ağırlığa eşittir.

### 3.2.1.1.2. *Kluyveromyces lactis* Suşlarının Üreme Değerlerinin Ölçülmesi

API testi ile yaklaşık türleri *K. lactis* olarak belirlenen 6 farklı maya suşlarından her biri taze kültür başlatmak amacıyla, %2 glukoz içeren 5 ml YP besi yerine ekilmiş ve 30 °C de karıştırmalı etüve konularak bir gece süreyle beklenilmiştir. Bu stok kültürlerden 150  $\mu$ l alınarak %2 glukoz içeren 20ml YP besi yerine ekimler yapılmış ve başlangıç OD<sub>600</sub> değerleri kayıt edilmiştir. Ekimler her bir maya suşu için ikili olarak gerçekleştirilmiştir. Maya kültürlerinden 90 dakika aralıklarla 1 ml örnek alınarak OD<sub>600</sub> değerleri ölçülmüştür. Aynı maya suşlarının peynir altı suyu içeren üreme ortamında ikilenme sürelerinin hesaplanması amacıyla deneyler peyniraltı suyu ile de tekrarlanmıştır. Elde edilen OD<sub>600</sub> değerleri zaman aralıklarına karşı grafiğe aktarılmıştır. Grafikten ikilenme süreleri bulunarak dakika olarak sonuçlar bölümünde tablo olarak verilmiştir.

### 3.2.1.1.3. *Metschnikowia* Türü Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması

Gıda sanayinde kullanılabilen farklı enzimatik özellikleri olan maya türlerinin izole edilip tanımlanması için siyah üzümler üzerinde üreyebilen mayalardan *Metschnikowia* türü mayalar izole edilmiştir. Bunun için Düzce ilinde yerel üreticilerce üretilmekte olan siyah üzümler kullanılmıştır. Üzümler aseptik şartlarda üretilen arazilerden alınarak laboratuvar ortamına taşınmıştır. Bunlardan 10 g tam olgun siyah üzüm taneleri alınarak 100 ml steril saf suda steril spatül ile kısmen homojenize edildi ve daha sonra vortex ile en yüksek hızda 30 saniye süresince karıştırılmıştır. Elde edilen homojenat'tan 100  $\mu$ l alınarak sodyum propiyonat içeren YGC agar petrilere yayma şeklinde ekim yapılmıştır. Petriler 30 °C'de etüvde 3 gün bekletilerek maya kolonilerinin üremeleri sağlanmıştır. Maya kolonilerinden pulcherrimin pigmenti içerdiği için kırmızımsı halo içerenler seçilerek YNB minimal petrilere tekrar ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir. Saflaştırılan mayaların türleri



fermentasyon özelliklerine göre üretici firma tarafından önerildiği şekilde API ID32c maya tayin sistemi (Bio Merieux, France) kullanılarak belirlenmiştir ve *Metschnikowia* (*Metschnikowia pulcherrima*) olup, pulcherrimin pigmenti ürettikleri anlaşıldıktan sonra bu suşların biyokontrol amaçlı olarak gıdaların korunmasında kullanılıp kullanılmayacağı test edilmiştir ve çok olumlu sonuç alınması üzerine projeye dahil edilmiştir. Bu maya suşlarına sırasıyla UMY12, UMY14 ve UMY15 kodları verilmiştir. Saflaştırılıp türleri belirlenen *M. Pulcherrima* suşları UMY12, UMY14, ve UMY 15 YPD petrilere ekilerek 30 °C’de 2 gün üretilmiş ve bu suşlardan 1 ml’lik steril %20 gliserol içeren mikrofuj tüplerine örnek alınarak uzun süreli stoklama için -70 °C’lik derin dondurucuda saklanmıştır.

#### **3.2.1.1.4. Pulcherrimin’in Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

*Metschnikowia pulcherrima* türleri saflaştırıldıktan sonra bu mayaların yaygın olarak bilinen bazı bakteri maya ve küflere karşı antagonistik etkilerinin olup olmadığı daha önce açıklanan yöntem uygulanarak petri testleri ile araştırılmıştır (Amberg ve ark. 2005).

Bunun için *M. Pulcherrima* suşları YPD üreme ortamında logaritmik faza kadar 30 °C de 120 devir /dakika hızda çalkalamalı etüvde üretilmiştir. *E. coli* DH5, *Proteus vulgaris* ATCC13315 bakterileri ise 10 ml’lik nutrient broth kültür ortamında (Oxoid) 37 °C de 120 devir/dakika hızda logaritmik faza kadar üretilmiştir. Bakteri kültürleri steril saf suda 1/100 oranında seyreltilmiş ve bu seyreltilmiş stok çözeltilerden 100 µl alınarak üç farklı % 2 glukoz içeren nutrient agar petrilere yayma ekimi yapılmıştır. Bakteri petrilерinin yüzeylerinin kuruması için beklenmiştir. Daha sonra bakteri petrilere *M. Pulcherrima* suşlarından bakteri petrilere 4 µl damla ekimi yapılmıştır. Petriler 37 °C’de etüvde 2 gün bekletilmiş ve inkübasyon periyodu sonunda maya kolonilerinin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür (Amberg ve ark. 2005). İnhibisyon zonları mm cinsinden tablo olarak sonuçlar bölümünde verilmiştir.

*M. Pulcherrima* suşlarının farklı maya türleri üzerine olan antagonistik etkileri de benzer yöntem ile ölçülmüştür. Bu araştırmada *S. cerevisiae* H251, *Debaryomyces occidentalis* DBVPG-6722, *Kluyveromyces marxianus* CBS4857, *Candida albicans* ATCC24433, *Candida albicans* ATCC10231, *Candida albicans* CBS2730, *Candida albicans* Glasgow2346, *Candida albicans* Glasgow682, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida krusei* ATCC6258, *Candida dupliniensis* CD36, *Tricosporon mucoides* H295, *Candida tropicalis* ATCC1021 maya türleri kullanılmıştır. Bunun için bu maya türleri önce YPD

üreme ortamında logaritmik faza kadar üretilmiş ve steril saf suda 1/100 oranında seyreltilerek stok ekim çözeltileri hazırlanmıştır. Maya stok kültürlerinden 100'er µl alınarak YNB glukoz minimal petrilere yayma ekimi yapılmıştır. Maya ekimi yapılan petrilere yüzeylerinin kurumaması için beklenmiştir. Daha sonra *M. Pulcherrima* suşlarından 4 µl örnek alınarak petri yüzeylerine damla ekimi yapılmıştır. Maya petrilere 30 °C'de etüvde 2 gün inkübe edildikten sonra maya kolonileri etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçüldü ve mm olarak sonuçlar bölümünde tablo şeklinde verilmiştir. Ayrıca petrilere fotoğrafları da çekilerek sonuçlar bölümüne eklenmiştir.

*M. pulcherrima* suşlarının bazı küflere karşı olan antagonistik etkileri de petri testleri ile araştırılmıştır. Bunun için *Aspergillus niger* ATCC16604, *Aspergillus flavus* ATCC 22293, *Aspergillus terreus* 22535, *Aspergillus fumigatus* 22626, *Mucor spp*, *Trichodema Spp*, *Bipolaris spp*. Türlerine ait küflerin sporları kullanılmıştır. Bu küflerin sporulasyon petrilere steril öze ile alınan sporlar 1 ml steril saf suda suspense edilmiştir. Daha sonra 100 µl spor örneği alınarak YNB glukoz petrilere yayma ekimi yapılmıştır. Spor ekimi yapılan petri yüzeyleri kuruduktan sonra *M. pulcherrima* örneklerinden bu petrilere yüzeylerine 4 µl damla ekimi yapılmıştır. Petrilere 30 °C'de etüvde 2-3 gün bekletilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda maya kolonileri etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüş ve mm olarak tablo şeklinde sonuçlar bölümünde verilmiştir. Antagonistik etki deneyleri 3'lü olarak yapılmış ve farklı zamanda aynı şartlarda tekrarlanmıştır. İnkübasyon zonu ölçümleri milimetrik cetvel kullanılarak yapıldığından aynı maya suşunun test edilen aynı bakteri, maya veya küf suşlarında oluşturduğu inhibisyon zonları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. *M. pulcherrima* suşlarının bazı bakteri, maya veya küf petrilere oluşturduğu inhibisyon zonu fotoğrafları sonuçlar bölümünde de verilmiştir.

### 3.2.1.1.5. Maya Türlerinden Genomik DNA'ların Saflaştırılması

Araştırmamızda farklı kaynaklardan saflaştırılarak fermentasyon özelliklerine göre ve API tayin sistemi kullanılarak türleri % 99 olasılıkla belirlenen mayaların, türlerinin genetik özelliklerine göre de kesin olarak belirlenmesi için ITS1-5.8s rDNA-ITS2 bölgelerinin rDNA dizileri de belirlenmiştir. DNA sekanslarına ek olarak aynı DNA bölgesinin tek enzim kullanılarak RFLP analizi de yapılmıştır. Bu analizler için *Kluyveromyces* ve *Metschnikowia* örneklerinden daha önce açıklanan yöntem izlenerek genomik DNA saflaştırılmıştır (Amberg ve ark. 2005).

Genomik DNA'sı saflaştırılacak olan *Metschnikowia* ve *K. lactis* suşları 5 ml'lik YPD besi yerinde 30 °C'de ve 120 devir/dakika hızda çalkalamalı etüvde 16-18 üretilmiştir. Maya suşları masa üstü santrifüjde +4 °C'de 5000 g de 5 dakika çöktürülmüştür. Çöktürülen maya hücreleri 500 µl'lik sorbitol- EDTA (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA) çözeltisinde süspansiyon edilerek steril 1,7 ml'lik mikrofüj tüplerine alınmıştır. Maya karışımlarına Sorbitol-EDTA çözeltisinde 2,5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış Zymolyase'dan 20 µl ilave edilerek vortex ile karıştırılmış ve karışım 37 °C'de 60 dakika bekletilmiştir. Bundan sonra maya hücreleri mikrosantrifüjde 10 000 g 'de oda sıcaklığında 5 dakika çöktürülerek sıvı kısım atılarak maya çöktürmelerine Tris-EDTA çözeltisinden (50 mM Tris/HCl pH: 7,4., 20 mM EDTA pH:7,4) 500 µl eklenerek pipet ile süspansiyon edilmiştir. Bu aşamada maya karışımlarına %10'luk SDS çözeltisinden 50 µl eklendi ve karışımlar 65 °C'lik sıcak su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. SDS ile lizis edilen maya karışımları sıcak su banyosundan alınarak karışımlara 200 µl soğuk 5 M potasyum asetat çözeltisi ilave edilmiş ve mikrofüj tüpleri buz içine yerleştirilerek 60 dakika beklenmiştir. Daha sonra örnekler mikrofüjde 10 000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım (üst faz) taze mikrofüj tüplerine alınmıştır. Genomik DNA'yı içeren bu sıvı fazdan DNA'yı çöktürmek için 1 hacim (yaklaşık olarak 600 ml) % 100 izopropanol ilave edilmiş ve karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika beklenmiştir. Karışımlar 15 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'lar çöktürülmüştür. Sıvı kısım atılarak çöken DNA'lar oda sıcaklığında kurumaları için 5 dakika bekletilerek 250 ml'lik 1xTE'de (pH 7,4) çözülmüştür.

### **3.2.1.1.6. Maya Türlerinin rDNA Dizilerinin Belirlenmesi ve RFLP Analizleri**

*Kluyveromyces lactis* ve *Metschnikowia pulcherrima* türlerinden saflaştırılan genomik DNA örneklerinden PCR reaksiyonları için 100 ng alınmıştır. Mayaların ITS1- 5.8s rDNA-ITS2 bölgeleri için universal primer olarak kullanılan primerlerden ITS1 primerinin nükleotid dizisi (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')'dir. ITS4 primerinin nükleotid dizisi ise (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')'dir. Bu primerler forward ve reverse primer olarak kullanılarak White ve ark. (1990) tarafından önerilen reaksiyon şartlarında PCR reaksiyonları yapılmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA'lar PCR saflaştırma kit'i kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA'lardan 10 µl alınarak RFLP analizleri için HinfI enzimi ile Standard şartlarda kesilerek % 2'lik agaroz elektroforezi ile ayrıştırılmış ve SYBR Green ile görüntülenerek sonuçlar bölümünde verilen jel fotoğrafları elde edilmiştir.

*Kluyveromyces lactis* ve *Mechnikowia pulcherrima* türlerinin genomik DNA'larından ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılan ve saflaştırılan DNA bölgesinin nükleotid dizisi de aynı primerleri kullanarak DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit'i (Amersham) ve ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazı (Iontek, İstanbul) kullanılarak belirlenmiştir. Nükleotid dizilerinin analizleri NCBI'nin sağladığı BLAST servisi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen DNA dizilerinin daha önce tanımlanan ve gen bankasında bulunan maya suşlarının rDNA dizilerine olan benzerlikleri sonuçlar bölümünde verilmiştir.

### **3.2.1.2. Çeşitli Süt Ürünlerinden Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Bakteri Suşlarının $\beta$ -Galaktosidaz Genlerinin Karakterizasyonu**

#### **3.2.1.2.1. Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyon**

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu aşamasında ilk olarak cins düzeyinde, değişik sıcaklıklar, tuz konsantrasyonları ve pH'larda gelişme, morfoloji ve homofermentatif veya heterofermentatif karakterlerine göre ayırt edilmişlerdir. Fakat tür düzeyindeki identifikasyon için çeşitli şeker fermentasyon testleri, arginin hidrolizi, eskulin parçalanması, litmus sütünde gelişme gibi özelliklerin tayin edilmesi gerekmiştir. Bu nedenlerle izolatlar; kültür geliştirme besi yeri ve identifikasyon besi yerleri hazırlanarak, 30 °C'den izole edilen kok, arginin hidrolizi, sitrattan gaz oluşturma, 10 °C, 40 °C, 45 °C'de, % 2 % 4 ve % 6,5 NaCl konsantrasyonlarında, pH 9,2'de üreme ve maltoz, sakkaroz, salisin şekerlerini fermente edebilme özellikleri açısından test edilmişlerdir (Garvie, 1984; Teuber, 1995).

Biyokimyasal olarak tanımlanan bu izolatlara moleküler tanımlama testleri uygulanmıştır. Bu amaçla ilk olarak tüm izolatların DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonunda öncelikle hücreler liziz edilip proteniaz K ile proteinlerinden uzaklaştırılıp, isopropanol ile DNA çöktürülmüş ve kloroform ekstraksiyonu ile hücre artıklarından temizlenmiştir. Daha sonra Rnaz ile RNA'dan arındırılıp ve fenol-kloroform ekstaksiyonu ile izole edilen DNA temizlenmiş ve 1XTE içinde çözünerek saklanmıştır. DNA izolasyonundan sonraki aşama ise polimeraz zincir reaksiyonu ile 16S-ITS bölgesinin çoğaltılması aşamasıdır. Bunun için EGEI ve LI adı verilen primerler kullanılmaktadır. Bu primerler yaklaşık olarak 1500-2000 bp'lik bir bölgeyi amplifiye ederler ve tanımlamada kullanılırlar. Tüm izolatların

DNA izolasyonları tamamlanarak 16S-ITS bölgelerinin çoğaltılması sağlanmıştır. Daha sonra çoğaltılan bölge HaeIII ve TaqI endonükleazları ile kesilip dendogramları yapılmıştır.

### 3.2.1.2.2. $\beta$ -galaktosidaz Geni ile İlgili Çalışma Yöntemi

Laktik asit bakterilerinde  $\beta$ -galaktosidaz geninin karakterizasyonu için PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem türe özel genleri (house-keeping genes) kullanmaktadır. Sözü edilen genler arasında  $\beta$ -galaktosidaz genine ek olarak permeaz geni de bulunmaktadır. Yöntemin esası farklı mikroorganizmaların bu özel genleri farklı miktar ve gen bölgelerinde kullanmasına dayanır. Örneğin  $\beta$ -galaktosidaz geni laktik asit bakterilerinde sıklıkla kullanılan bir gendir. PZR-RFLP deneyinin amacı farklı organizmaların ürettiği  $\beta$ -galaktosidaz genlerinin genetik karakterizasyonunu yapmaktır. Bu yöntemde öncelikle primer tasarımı yapılmıştır. Bu primerler seçilen laktik asit bakterilerinin  $\beta$ -galaktosidaz genlerini hedef alacak şekilde tasarlanmışlardır. PZR yöntemi kullanılarak kullanılacak mikroorganizmaların istenen gen bölgesi çoğaltılmıştır. Ayrıca önemli suşlarda  $\beta$ -galaktosidaz geninin gen dizilimi çıkarılmıştır. Sekanslama işlemi herbir mikroorganizma için ayrı ayrı yapılmış ve bu sayede  $\beta$ -galaktosidaz genleri arasındaki dizilim farklılıkları saptanabilmiştir. Buna ek olarak,  $\beta$ -galaktosidaz genleri arasındaki farklılıkların saptanması ile laktik asit bakterilerinin tanımlanması da yapılabilmektedir. Gen diziliminin ortaya çıkmasıyla türe ve suşlara özel primerlerin tasarlanması mümkün olabilmektedir. Bu primerler PZR-RFLP yöntemi kullanılarak tür, alttür ve suşların tanımlanması ve birbirinden ayırılması amacıyla kullanılabilir. Giraffa ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları araştırmada bu proteini kodlayan geni kullanarak alttür ve suş seviyesinde ayırım yapılmıştır. Torriani ve ark., (1999), ve Fortina ve ark., (2001) aynı metodu kullanarak tür ve alttür seviyesinde tanımlama ve ayırım yapabilmişlerdir. Böylelikle süt endüstrisi için önemli starter kültürler arası  $\beta$ -galaktosidaz farklılıkları ortaya konularak karakterizasyon yapılmakta ve bu yöntem ayrıca bu suşların tanısında da kullanılabilir.

$\beta$ -galaktosidaz geni bgalac2 primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır (bgalac2-f: GATTGAAAGCCGGATGTATG, bgalac2-r: CAAAACGGAGTCTTCCTTGA).  $\beta$ -galaktosidaz geni için kullanılan reaksiyon miksi ve PZR koşulları aşağıdaki gibidir:

Reaksiyon miski	1 reaksiyon için (50µl)
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
dNTP	10nmol
f-primer	10pmol
r-primer	10pmol
Taq DNA polimeraz	0,5U
DNA	500ng

PZR koşulları ise aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır:

	Devir sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu		95	2 dak
Denatürasyon	35	95	1 dak
Primer yapışma sıcaklığı (annealing)		56	1 dak
Uzatma		72	1 dak
Final uzatma		72	10 dak

Çoğaltma sonucunda β-galaktosidaz geni agaroz jel elektroforezinde koşturulmuş ve EtBr ile boyama yapıldıktan sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir.

β-galaktosidaz geni başarıyla çoğaltıldıktan sonra spesifik olmayan bant içeren PZR sonuçları DNA ekstrasyon kiti (Fermentas, Litvanya) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda temizlenmiştir.

PZR ürünlerinin saflaştırılmasının ardından dizileme işlemine geçilmiştir. Dizileme işlemleri İontek-İstanbul tarafından herbir örnek için en az ikişer kez yapılmıştır. Dizileme sonuçları ClustalW programında çoklu sıralama (multiple alignment) yapılarak bütün *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşları sıralanmıştır.

### 3.2.1.2.3. RAPD-PZR Çalışma Yöntemi

Yöresel yoğurtlardan elde edilen veya ticari starter *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* izolatlarında M13 (GAGGGTGGCGGTTC) primeri kullanılarak RAPD-PZR deneyleri yapılmıştır.

Reaksiyon koşulları;

	1 reaksiyon için (50µl)
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM
dNTP	10nmol
Primer	100µmol
Taq DNA polimeraz	0,5U
DNA	500ng

PZR koşulları;

	Devir sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu		95	2 dak
Denatürasyon	40	95	1 dak
Primer yapışma sıcaklığı (annealing)		56	20 sn
Uzatma		72	90 sn
Final uzatma		72	10 dak

### 3.2.3. Laktaz Enziminin Mikroorganizmalardan Fermentasyonla Üretimi

#### 3.2.3.1. Mayadan (*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279) β-Galaktosidaz Enzim Üretimi

Erlenlerdeki steril üretim ortamı (Tablo 2) içine mikroorganizma aşılandıktan sonra çalkalamalı inkübatörde (B.Braun Certomat) fermentasyona tabi tutulmuş ve zamana bağlı olarak örnekler alınarak biyokütle, enzim aktivitesi, ve kalan substrat miktarları ölçülmüştür. Bu sistemde ortam pH'sı, besi ortam bileşimi ve konsantrasyonları ve çalkalama hızı incelenmiştir. Yüksek spesifik aktiviteli β-galaktosidaz sentezleyen mikroorganizma, daha büyük çapta ve kontrollü bir fermentasyon çalışması için seçilmiş yine çalkalamalı kültürde çoğaltılmış ve fermentörde aşı kültürü olarak kullanılmıştır.

Çalkalamalı sistemde elde edilen optimum parametreler daha kontrollü koşulları olan biyoreaktör sistemine taşınarak tekrar denenmiştir. Biyoreaktör denemeleri 3 litrelik BioFlo® 110 (New Brunswick Scientific) laboratuvar tipi fermentörde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda substrat olarak Tablo 2'de verilen üretimin ortam bileşenleri ve bu bileşenlerin farklı oranları kullanılmıştır. Biyoreaktör çalkalamalı sistemde hazırlanmış inokülasyon sıvısı ile aşılanmıştır. Bu sistemde incelenen parametreler, ortam pH'sı, karbon kaynağı konsantrasyonu, karıştırma ve havalandırma hızlarıdır. Bütün veriler zamana karşı kinetik

parametrelerce ifade edilmiştir. Biyoreaktör çalışmaları sonucu elde edilen deneysel veriler kullanılarak cevap yüzey yöntemi ile en yüksek laktaz enzim konsantrasyonunu elde edebilmek için bir matematiksel model oluşturulmuş ve proses için optimum koşullar belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Üretim Ortamı Bileşenleri (pH 7,0; Fiedurek ve Szczodrak, 1994)

Ortam Bileşenleri	Miktarları (g/l)
Laktoz	30
Maya ekstraktı	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1

### 3.2.3.1.1. Hücre Parçalama Yöntemleri

Mayalarda  $\beta$ -galaktosidaz hücre içi enzim olduğundan, enzim aktivite tayininden önce hücre geçirgenliğini artırmak ve/veya hücreleri parçalamak amacıyla kullanılan bazı mekanik ve mekanik olmayan işlemler şunlardır:

- Mekanik işlemler: Cam bilye değirmeni (Song ve Jacques, 1997), ultrasonik homojenizatör (Geciova ve ark. 2002)
- Mekanik olmayan İşlemler: Triton X-100 (Fiedurek ve Szczodrak, 1994), Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Geciova ve ark. 2002), isoamil alkol (Barberis ve Segovia, 2002), sıvı azot (Liu ve ark. 2001 )

### 3.2.3.1.2. Biyokütle Tayini

Fermentasyon sonrası alınan 20 ml ortam, 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilecek ve elde edilen biyokütle sabit tartıma kadar 80 °C’de kurutularak, biyokütle miktarı g/l cinsinden hesaplanmıştır.



### 3.2.3.1.3. Laktaz Enzim Aktivite Tayini

Bu çalışmada  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesi, Gıda Kimya Kodeksi'nin (Anon., 1993) maya laktazı için önerdiği enzim aktivite tayin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.

Fermentasyon ortamı  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilecek ve elde edilen hücrelere uygun hücre parçalama işlemi uygulandıktan sonra elde edilen enzim preparatında enzim aktivite tayini yapılmıştır.

Bir (1) ünite laktaz enzim aktivitesi pH 6,5'de ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, dakikada 1  $\mu\text{mol}$  o-nitrofenol oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi ise, bir gram kuru hücre başına düşen enzim aktivite miktarı olarak tanımlanmıştır.

Örnekler fosfat tamponunda (pH 6,5) uygun miktarda seyreltilerek,  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiş 4ml ONPG çözeltisi içerisine 1ml seyreltilmiş örnek konularak ve 15 dakika su banyosunda hidrolizin gerçekleşmesi için beklenmiştir. Bu sürenin sonunda ONPG ve enzim içeren örnekten 1 ml alınarak 1ml %10'luk sodyum karbonat çözeltisi ile reaksiyon durdurularak ve 8 ml deiyonize su ilave edilip 420 nm'de absorbans değeri okunmuştur. Kör örnek ise, su banyosunda 15 dakikalık bekletme yapılmaksızın örnekteki gibi hazırlanmıştır.

Molar soğurum katsayısı ( $\epsilon$ ), o-nitrofenolün standart çözeltilerine ait kalibrasyon grafiğinden bulunmuştur.

Enzim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{FCCLac-U/g} = \frac{\Delta A \times 5 \times 10}{\epsilon \times 15 \times W}$$

$\Delta A$ : Örneğin absorbansı – Kör örneğin absorbansı

$\epsilon$ : Molar soğurum katsayısı

W: bir ml'deki reaksiyona giren kuru hücre miktarının ağırlığı (g)

#### 3.2.3.1.4. Kalan Şeker Miktarı

Biyokütle ayrıldıktan sonra kalan fermentasyon sıvısı uygun oranda seyreltilerek dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemine göre kullanılmadan kalan laktoz miktarı tayin edilmiştir (Ghose, 1984).

#### 3.2.3.1.5. Protein Miktarı

Protein tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır (Bradford, 1976) Bu yöntemde sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin) standartları kullanılmıştır.

#### 3.2.3.1.6. Deneysel Tasarım ve İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde Minitab Statistical Software (Release 13.20) kullanılmıştır. Laktaz üretiminin optimizasyonu için deneysel tasarımda kullanılan parametreler (bağımsız değişkenler) ve bu parametrelerin seviyeleri ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir.

Çalkalamalı kültürde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında, 31 deneysel noktadan (24 farklı kombinasyona sahip ve merkezde yedi tekrarlı) oluşan ve dört değişken ile oluşturulan merkez tümleşik tasarım (central composite rotatable design) kullanılmıştır.

Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde optimizasyon çalışmasında ise, 31 deneysel noktadan (24 farklı kombinasyona sahip ve merkezde yedi tekrarlı) oluşan ve dört değişken ile oluşturulan yüzey merkezli istatistiksel dizayn (face central statistical design,  $\alpha=1$ ) kullanılmıştır.

Her deneme paralel yapılmış ve denemelerin standart sapması hesaplanmıştır. Seviyeler, 0 merkez noktası olmak üzere, -1, 0, +1'dir. Her faktörün merkez noktasındaki gerçek seviyesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kodlanmış değer} = \frac{\text{Gerçek seviye} - (\text{yüksek seviye} + \text{düşük seviye}) / 2}{(\text{yüksek seviye} - \text{düşük seviye}) / 2}$$

Proses değişkenlerinin spesifik enzim aktivitesine etkisini tahminleyen ikinci derece polinomial denklem aşağıda verilmiştir. Burada,  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{34}$  regresyon katsayılarını,  $X_1, X_2, X_3, X_4$  bağımsız değişkenleri ifade etmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri % 95 güvenlik seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak bulunmuştur. Her bir etki için hesaplanan  $F_{cal}$  ile tablo  $F_{tab}$  değerleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelden çıkarılmıştır. Bir model sistemin gerçek cevaba uygun bir yaklaşım olup olmadığına uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun % 95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiştir.

### **3.2.3.2. Bakterilerden $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimi**

#### **3.2.3.2.1. Fermentasyon**

Fermentasyon önce erlenlerde gerçekteştirilmiş, daha sonra fermentasyon koşullarının optimizasyonu ile ölçek büyütülerek fermentörde gerçekteştirilmiştir.

##### **3.2.3.2.1.1. Erlen Denemeleri**

Fermentasyon, tam faktoriyel istatistiksel deney dizaynı kullanılarak 2,5 ml aktive edilmiş kültürün steril 100 ml'lik Tablo 3'de belirtilen besi ortamlarından birisini içeren erlenlere aşılanması ve 43 °C'de 8 saat inkübasyona bırakılmasıyla, çalkalamalı ya da çalkalamasız olarak gerçekteştirilmiştir (Tablo E2.1, Tablo E2.2). Fermentasyon sonunda enzim ekstraksiyonu 3 farklı yöntemin kullanılmasıyla gerçekteştirilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan koşullar Ek2'de (Tablo E2.3, E2.4 ve E2.5) verilmiştir ve optimizasyon çalışmalarının tümünde enzim ekstraksiyonu lizozim kullanılarak yapılmıştır.

**Tablo 3.** Kullanılan besiyerleri ve kompozisyonları (%) (w/v)

<b>Kullanılan Besiyeri ve Kompozisyonları (% , w/v)</b>
<b><i>Lactobacillus delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i> türleri</b>
% 12 Süt tozu (S)
% 6 Peyniraltı suyu tozu (W)
% 6 Peyniraltı suyu tozu + % 0,2 maya ekstraktı (WYE)
% 6 Peyniraltı suyu tozu + % 1,2 MRS (W MRS)
<b><i>Streptococcus thermophilus</i> türleri</b>
% 2 Peyniraltı suyu tozu + % 3 mısır şurubu şırası + % 2 pepton (M1)
% 2 Peyniraltı suyu tozu + % 3 mısır şurubu şırası + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat (M2)
% 7 Peyniraltı suyu tozu + % 3 mısır şurubu şırası + % 2 pepton (M3)
% 7 Peyniraltı suyu tozu + % 3 mısır şurubu şırası + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat (M4)

\* Süt tozu ve Peyniraltı suyu tozu Pınar Süt A.Ş'den temin edilmiş olup bileşimleri belirtilen şekildedir. Peyniraltı suyu tozu: Su ( %93-94), kuru madde (%6-6,5), laktoz (%4,5-5), laktik asit (iz miktarda), toplam protein (%0,8-1), peyniraltı suyu proteini (%0,6-0,65), sitrik asit (%0,1), mineraller (%0,5-0,6). Süt tozu: Protein (%36), yağ (%1,25), karbonhidrat (%52), kalsiyum (%1,25)

### **3.2.3.2.1.2. Fermentör Denemeleri**

Erlen denemelerinde Yüzey Cevap Yöntemi kullanılarak optimum koşullar belirlendikten sonra bu koşullarda fermentör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Fermentör denemelerinde kullanılan koşullar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 4.** Farklı koşullardaki fermentör denemeleri

Kültür	Aşılama oranı (%)	Besi ortamı	Sıcaklık	pH	Fermentasyon modu
Lb 77	4	% 8 Süt tozu	43		Kesikli
St 95/2	3,9	% 5 Peyniraltı suyu tozu + % 5 mısır şırası şurubu + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat	43		Kesikli
Lb 77 ve St 95/2	Lb: 3 St 2,6	% 5 Peyniraltı suyu tozu + % 5 mısır şırası şurubu + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat	43		Kesikli
Lb 77	4	% 8 Süt tozu	43	6,2	Kesikli
St 95/2	3,9	% 5 Peyniraltı suyu tozu + % 5 mısır şırası şurubu + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat	43	6,2	Kesikli
Lb 77 ve St 95/2	Lb: 3 St 2,6	% 5 Peyniraltı suyu tozu + % 5 mısır şırası şurubu + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat	43	6,2	Kesikli
Lb 77 ve St 95/2	Lb: 3 St 2,6	% 5 Peyniraltı suyu tozu + % 5 mısır şırası şurubu + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat	43		Yarı Kesikli

\* Kullanılan Lb 77 ve St 95/2 suşları için başlangıç hücre sayımları sırasıyla  $6 \times 10^7$  kob/ml ve  $7 \times 10^7$  kob/ml olarak belirlenmiştir ve ekimlerde bu sayılar dikkate alınmıştır ve kültür ekimleri aynı partiden gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.2.2. Enzim Ekstraksiyonu

Laktik asit bakterilerinden üretilen  $\beta$ -galaktosidaz enzimi hücreiçi bir enzimdir. Bu nedenle 3 farklı enzim ekstraksiyon yöntemi kullanılarak enzimin hücre dışına alınması sağlanmıştır. Ayrıca bu yöntemlerin karşılaştırılması sağlanmıştır.

### **3.2.3.2.2.1. Lizozim ile Enzim Ekstraksiyonu**

Fermentasyon sonunda elde edilen 10 ml'lik fermentasyon sıvısı santrifüj edilip 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takip eden santrifüj sonunda elde edilen pelet 4,5 ml tampon ile iyice çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra 100 mg lizozim (Sigma L6876) ilave edilerek 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda santrifüj edilerek sıvı kısım ayrılarak enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Kara 2004).

### **3.2.3.2.2.2. Cam Bilyalar ile Enzim Ekstraksiyonu**

Fermentasyon sonunda elde edilen 10 ml'lik fermentasyon sıvısı santrifüj edilip 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takip eden santrifüj sonunda elde edilen pelet 5 ml tampon ile iyice çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra 5 gr 1mm çapındaki cam bilyeler ilave edilerek vortekslenmiştir. Bu aşamada 1 döngü: 1 dk vorteksleme (2700 rpm)+ 30 sn buzda soğutma şeklinde gerçekleşmiştir. 8 döngü sonunda santrifüj edilerek sıvı kısım ayrılarak enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Bury ve ark. 2001).

### **3.2.3.2.2.3. Homojenizatör ile Enzim Ekstraksiyonu**

Fermentasyon sonunda elde edilen 30 ml'lik fermentasyon sıvısı santrifüj edilip 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takip eden santrifüj sonunda elde edilen pelet 15 ml tampon ile iyice çözünene kadar karıştırılmıştır. Hücre parçalaması homojenizatör kullanılarak yapılmıştır. Bu aşamada 1 döngü: 45 sn homojenizasyon (14 000 rpm)+ 30 sn buzda soğutma şeklinde gerçekleşmiştir. 4 döngü sonunda santrifüj edilerek sıvı kısım ayrılarak enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Bury ve ark. 2001).

### **3.2.3.2.3. Enzim Aktivite Tayini**

Enzim aktivite tayini Ulusal Bilimler Akademisi, Gıda Kimyasalları Kodeksi'nde (Food Chemical Codex- National Academy of Sciences) belirtilen prosedür doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.3.2.4. Biyokütle Tayini

Fermentasyon sonunda santrifüjleme ile elde edilen pelletin 43 °C de sabit tartıma gelene kadar kurutulması ile elde edilmiştir (Kara, 2004).

#### 3.2.3.2.5. Laktoz ve Laktik Asit Tayini

Laktoz ve Laktik asit tayini Perkin Elmer HPLC sistemi ile yapılmıştır. Tayinde Aminex HPX-87 H kolonu kullanılmıştır ve piklerin ayırımı refraktif indeks dedektörü kullanılarak sağlanmıştır. Analiz koşulları 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mobil faz, 0,6 ml/dk akış hızı olarak belirtilmiştir (Büyükkileci ve Harsa, 2004).

#### 3.2.3.2.6. İstatistiksel Deney Tasarımı

Kültür, besi ortamı ve çalkalama hızının biyokütle, β-galaktosidaz ve laktik asit üretimi üzerine olan etkileri tam faktoriyel istatistiksel deney dizaynı kullanılarak *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürleri için ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu amaçla Design Expert 7 (Trial) istatistiksel yazılımı kullanılmıştır.

Faktörlerin etkisi varyans analizi yardımıyla değerlendirilmiştir. Tam faktoriyel istatistiksel deney tasarımı ile en iyi β-galaktosidaz üreticisi kültürler belirlenmiştir. Bu kültürler, optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürleri için fermentasyon parametrelerinin optimizasyonu için yüzey tepki yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kültürler arasındaki simbiyotik ilişki de incelenmiştir.

#### 3.2.3.3. Küflerden β-Galaktosidaz Enzim Üretimi

##### 3.2.3.3.1. Kültür Gelişimi ve Tohum İnokülümü

*Rhizomucor meihei* ve *Rhizomucor pusillus* kültürleri, 100 µl donmuş stok kültürün Potato Dextrose Agar (PDA) üzerine aşılması ve 45 °C'de 5 gün inkübe edilmesiyle geliştirilmiş ve sonra sporlar yatık PDA besiyerine aktarılıp 45 °C'de 5 gün boyunca iyi bir sporlanma elde edilene kadar inkübe edilmiştir. Bu kültürlerin stokları % 20'lik gliserollü su

ile hazırlanmış ve -80 °C’de saklanmıştır. İnkübasyon sonunda sporların yatık besiyerinden hasatı 5 ml steril Tween80/su süspansiyonu (0,02 %) ile yapılmıştır. Spor solüsyonu steril falkon tüpte toplanmış ve 4 °C’de esas çalışma yapılana kadar saklanmıştır. Başlangıç spor sayımı ve canlılık sayımı kaydedilmiştir.

Katı kültür fermentasyonu için gerekli aşılama oranı,  $5 \times 10^5$  -  $10 \times 10^5$  aralığında değişen toplam spor (D- optimal deney tasarımı için) miktarına karşılık gelen spor solüsyonlarının önceden belirlenmiş miktarlarının 25 ml steril sıvı besiyeri içeren (sıvı besiyerlerinin kompozisyonları Tablo 5’ de açıklanmıştır) 250 ml’lik erlenlere transfer edilmesiyle hazırlanmıştır.

**Tablo 5.** Sıvı besiyeri kompozisyonları

	Glukoz	Laktoz	K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>
Ortam 1 (100ml)	5g	-	2g	2g
Ortam 2 (100ml)	-	5g	2g	2g

### 3.2.3.3.2. Katı Kültür Fermentasyonu

Katı kültür fermentasyonunda kullanılan mısır kırığı ve mısırözü küspesi besi ortamları Sunar Mısır Ltd. Şti.’den sağlanmıştır. Bu besi ortamları 250 ml’lik erlenlere 25 g konularak 121 °C /15 dk steril edilmiş ve fermentasyonda kullanılmıştır. Kullanılan katı besi ortamı çeşidi, aşılama oranı, şeker çeşidi ve kültür tipi Tablo 6’da gösterilmiştir. Fermentasyon 45 °C’ de 5 gün boyunca devam etmiştir. İnkübatörün nemini kontrol etmek için su dolu beher inkübatör içine yerleştirilmiştir.



**Tablo 6.** Deneysel Tasarım Sonuçları

<b>İşlem No</b>	<b>Faktör 1 A:Aşılama oranı</b>	<b>Faktör 2 B:Kültür</b>	<b>Faktör 3 C:Katı Ortam</b>	<b>Faktör 4: D: Şeker</b>	<b>Tepki 1 Aktivite (U/ml)</b>	<b>Tepki 2 Aktivite (U/g katı ortam)</b>	<b>Tepki 3 Biyokütle</b>	<b>Tepki 4 Toplam Spor</b>
1	500000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Küspesi	Glukoz	0,4559	1,6322	4,5	27300000
2	500000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Kırığı	Glukoz	0,3569	1,2062	4,3	22100000
3	1000000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Kırığı	Laktoz	0,3102	1,0114	4,8	63250000
4	500000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Küspesi	Glukoz	2,4056	6,9281	5,3	17650000
5	1000000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Kırığı	Glukoz	0,3878	1,0703	3,35	33900000
6	1000000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Küspesi	Glukoz	1,7804	5,3769	4,75	36900000
7	750000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Kırığı	Laktoz	0,3726	1,2296	8,5	22900000
8	1000000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Kırığı	Glukoz	0,4093	1,1869	2,5	16600000
9	750000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Kırığı	Glukoz	0,2154	0,6720	4,75	62000000
10	750000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Küspesi	Laktoz	3,0384	9,0544	5,1	24850000
11	1000000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Küspesi	Glukoz	1,4186	3,4613	4,75	42200000
12	750000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Kırığı	Laktoz	0,4205	1,3710	5,35	53750000
13	1000000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Küspesi	Laktoz	3,3125	6,4924	6,85	26400000
14	500000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Kırığı	Glukoz	0,3710	1,1724	3,1	50150000
15	1000000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Kırığı	Laktoz	0,5329	1,6628	4,3	50600000
16	875000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Küspesi	Glukoz	2,4520	6,9636	6,65	29400000
17	500000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Kırığı	Glukoz	0,5738	1,9740	4,35	24950000
18	500000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Kırığı	Laktoz	0,3553	1,1370	6,4	71450000
19	500000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Küspesi	Laktoz	3,8378	8,2897	6,25	19800000
20	750000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Küspesi	Laktoz	2,0383	4,8103	7,5	72650000
21	500000	<i>R.pusillus</i>	Mısır Küspesi	Laktoz	2,9121	8,5033	7,8	193000000
22	1000000	<i>R.mehiei</i>	Mısır Küspesi	Laktoz	2,9404	8,0567	4,6	15700000

### 3.2.3.3.3. Enzim Ekstraksiyonu

Fermentasyon sonunda, 100 ml steril Tween 80-su süspansiyonu (% 0,02) her bir erlenmeyere eklenmiş ve bir çalkalayıcıda 150 rpm'de 90 dk. çalkalanmıştır. Bu sürecin ardından, erlen içerikleri steril tülbenkten süzölmüş ve 4 °C, 6000 rpm' de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı ve pellet sırasıyla, enzim aktivite deneyi ve biyokötle tespiti için kullanılmıştır.

### 3.2.3.3.4. Enzim Aktivite Testi

$\beta$ -galaktosidaz aktivitesi, Ulusal Bilimler Akademisi - Gıda Kimyasalları Kodeksi'nde tanımlanan prosedüre göre test edilmiştir. 0,1 M sitrat- fosfat tampon çözeltisinde (pH 4,8) çözülmüş kromojenik substrat o-nitrofenol-beta-D-galaktopiranozid (ONPG) ( $10 \times 10^{-3}$  M) kullanılmıştır. Kullanılmış olan substrat ve enzim miktarı sırasıyla 2 ml ve 0,5 ml'dir. Başlangıç anında 0,5 ml enzim solüsyonu ONPG solüsyonuna eklenmiş ve 15 dk. inkübe edilmiştir.

Deney, 0,5 ml % 10'luk sodyum karbonat eklenmesiyle sonlandırılmış ve 420 nm'de absorbans okumasıyla devam etmiştir. Bir ünite, deney koşullarında her bir dakikada ONPG'den 1 mM o-nitrofenol oluşumunu sağlayacak enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Üniteler aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ünite/ml} = A \times \text{dilüsyon faktörü} / (\epsilon \times \text{zaman} \times \text{enzim solüsyonu miktarı})$$

A; 420 nm'deki absorbansı gösterir, dilüsyon faktörü enzim solüsyonunun seyreltme katsayısıdır,  $\epsilon$  (o-nitrophenol standart eğrisinden belirlenen) ekstinksiyon katsayısına eşittir ve zaman inkübasyon süresidir (15 dk.). Enzim aktivitesi, U/ml enzim aktivitesini kullanılan katı substrat konsantrasyonuna (g/ml) böldükten sonra U/g katı substrat olarak da ifade edilmiştir.

### 3.2.3.3.5. Biyokötle ve Spor Sayımı

Biyokötle (g/l) kesin olarak belirlemek zor olmasına rağmen, fermentasyon sonunda elde edilen pelet kullanılarak gravimetrik olarak tayin edilmiştir. Pelet, sabit bir ağırlığa

ulaşana kadar 45°C’ de kurutulmuştur. Spor sayımları (spor/ml) Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Marienfield, Germany) (Ustok ve ark. 2007).

### 3.2.3.3.6. Deneysel Tasarım ve İstatistiksel Analiz

Aşılama oranının (X1), kültürün (X2), katı besi ortamının (X3) ve şekerin (X4);  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi, şeker, spor sayısı ve biyokütle üzerine etkisi katı kültür fermentasyonunda Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) kullanılarak araştırılmıştır. Dört faktörlü bir D- optimal istatistiksel deney tasarımı kullanılmıştır. D-optimal deney tasarımında toplam 22 işlem kombinasyonu oluşturulmuş ve çalışılmıştır. Verilerin analizi ve tepki yüzey grafikleri Design Expert 7.0.0 Trial Version (Stat-Ease Inc.) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Deneylerin yapılmasından ve tepki değişkenlerinin ölçülmesinden sonra, çoklu regresyon işlemi ile etkileşimleri içeren ikinci dereceden bir polinom denklemi kullanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

Y; tahmin edilen tepki, k; faktör değişkenlerinin sayısı,  $\beta_0$ ; model sabiti,  $\beta_i$ ; doğrusal katsayı,  $X_i$ ; kodlanmış haldeki faktör değişkeni,  $\beta_{ii}$ ; ikinci dereceden katsayı,  $\beta_{ij}$ ; etkileşim katsayısı ve  $\epsilon$ ; hata faktörüdür. Aşağıdaki denklem, faktörlerin gerçek deneysel değerlerini [-1 +1] aralığında kodlamak için kullanılır:

$$x = [\text{esas değer} - (\text{düşük değer} + \text{yüksek değer})/2] / (\text{yüksek değer} - \text{düşük değer})/2$$

Varyans analizi (ANOVA) tabloları oluşturulmuş ve doğrusal terim, ikinci dereceden terim ve etkileşim terimlerinin etki ve regresyon katsayıları belirlenmiştir. Polinomial denklemdeki tüm terimlerin önemliliği, p-değerlerine göre istatistiksel olarak tayin edilmiştir.

### 3.2.4. Laktaz Enziminin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması

#### 3.2.4.1. Mayadan (*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279) Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Karakterizasyonu ve Saflaştırılması

DeneySEL tasarımdan elde edilen sonuçlara göre, enzim optimum koşullarda üretilmiştir. Karakterizasyon deneylerinde, pH ve sıcaklığın aktivite ve stabilite üzerine etkisi belirlenmiş ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri hesaplanmıştır.

##### 3.2.4.1.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivite ve Stabilitesi Üzerine Etkisi

pH değerinin  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesine etkisi, enzim aktivitesinin 4,0'dan 9,0'a kadar değişen farklı pH değerlerinde test edilmesiyle belirlenmiştir. Kullanılan tampon sistemleri: sodyum asetat (4,0; 5,0), potasyum-fosfat (pH 6,0; 6,5; 7,0 ve 7,5) ve tris-HCl (pH 8,0; 9,0)'dir. Bağıl aktiviteler, belirli bir pH değerinde elde edilen aktivitenin, o aralıkta elde edilen maksimum aktiviteye oranlanmasına dayanır ve yüzdellik olarak ifade edilir.  $\beta$ -galaktosidaz'ın pH stabilitesi 4,0–9,0 pH aralığında araştırılmıştır. Kullanılan tampon sistemleri: sodyum asetat (4,0; 5,0), potasyum-fosfat (pH 6,0; 6,5; 7,0 ve 7,5) ve tris-HCl (pH 8,0; 9,0)'dir. Enzim solüsyonları yukarıda bahsedilen tampon çözeltileriyle (1:1 oranında) karıştırılmış ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışımlar, standart deney koşullarında kontrole göre arta kalan  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesini (%) ölçmek üzere alınmıştır.

##### 3.2.4.1.2. Aktivite ve Stabilite Üzerine Sıcaklık Etkisi

$\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi, 25 °C'den 55 °C'e değişen farklı sıcaklıklarda standart deney koşullarının uygulanmasıyla belirlenmiştir. Substrat (o-nitrofenol) reaksiyon öncesi sırayla tüm sıcaklıklarda 10 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Bağıl aktiviteler (yüzdellik olarak) belli bir sıcaklıkta elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin verilen sıcaklık aralığında elde edilen en yüksek aktiviteye oranlanmasıyla ifade edilmiştir. Ham enzimin sıcaklık stabilitesi, enzimin 25 °C'den 55 °C'e kadar değişen çeşitli sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyonundan sonra arta kalan aktivitesinin ölçülmesi ile incelenmiştir.

### 3.2.4.1.3. Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

Kinetik sabitler ( $V_{max}$  ve  $K_m$ ), pH 6,5'de ve 37 °C'de farklı substrat konsantrasyonlarında (0,5-12,5 mM) Lineweaver–Burk (1/V'e karşı 1/S) grafiği (Shuler ve Kargi 2002) kullanılarak bulunmuştur.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$$

Eşitliğin eğiminden  $K_m/V_m$  değeri ve kesim noktasından  $1/V_m$  değeri hesaplanmıştır.

### 3.2.4.2. Maya Enziminin Saflaştırılması

Mayadan üretilen  $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasının ilk basamağında, ham enzim ekstraktı %60 amonyum sülfat ile çöktürölmüş ve daha sonra soğutmalı santrifüjde +4°C'de 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılmış ve pelet, tampon çözelti (fosfat tamponu, pH 6,5) ile çözündürölmüştür. Elde edilen enzim örneği daha sonra fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir.

Elde edilen diyalizat Sephadex DEAE-A25 kolona beslenerek adsorbe edilmiştir. Adsorbe edilen enzim kesikli olarak NaCl (0-2,0 M) içeren fosfat tamponu (pH 6,5) ile yıkanmış ve 5'er ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda protein içeriği 280 nm'deki absorbansla takip edilmiş ve enzim aktiviteleri ölçölmüştür.

Fermentasyon sıvısı ve saflaştırılan enzim profilleri SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile (Laemmli, 1970) karşılaştırılarak saflığı nitel olarak belirlenmiş, yine aynı yöntemle saf enzimin moleköl ağırlığı tayin edilmiştir. SDS-PAGE elektroforez yöntemi için enzim örnekleri, uygun miktardaki örnek tamponlarıyla karıştırılmış (Laemmli, 1970) ve 95 °C'deki su banyosunda 4 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Örnekler jele, 15µl olacak şekilde yüklenmiştir.

### **3.2.4.3. Bakterilerden Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz Enziminin Karakterizasyonu**

#### **3.2.4.3.1. pH'nın $\beta$ -galaktosidaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi**

pH'nın  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi enzim aktivitesinin pH değerleri 4,5-9,0 arasında değişen tamponların kullanılması ile belirlenmiştir. pH'nın  $\beta$ -galaktosidaz enzim stabilitesi üzerine etkisi de yukarıda bahsedilen aynı tamponlarda enzimin 37 °C' de 30 dakika bekletilmesi sonunda kalan aktivitenin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.3.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi**

Sıcaklığın  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi enzim aktivitesinin farklı sıcaklık değerlerinde (20-65 °C) ölçülmesi ile belirlenmiştir. Sıcaklığın  $\beta$ -galaktosidaz enzim stabilitesi üzerine etkisi de yukarıda bahsedilen aynı sıcaklıklarda enzimin 30 dakika bekletilmesi sonunda kalan aktivitenin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.3.3. Metal İyonlarının $\beta$ -galaktosidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Metal iyonlarının ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  and  $Fe^{+2}$ )  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, enzimin farklı konsantrasyonlarda metal iyonlarını içeren (1-10 mM) 0,05 M sodyum fosfat tamponunda 37 °C' de 30 dakika bekletilmesiyle tespit edilmiştir.

#### **3.2.4.3.4. Termal İnaktivasyon Kinetiği ve İnaktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi**

$\beta$ -galaktosidaz enziminin termal inaktivasyon kinetiği, enzimin farklı sıcaklıklarda (45, 50, 55 ve 60 °C) substrat yokluğunda bekletilmesiyle elde edilmiştir. Ayrıca enzimin yarı ömrü hesaplanmıştır ve Arrhenius eşitliği kullanılarak enzimin inaktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

### 3.2.4.3.5. Kinetik Sabitlerin ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Belirlenmesi

Kinetik sabitler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak Lineweaver-Burk double reciprocal plot kullanılarak belirlenmiştir

### 3.2.4.4. Bakteriden (*Lactobacillus bulgaricus*) Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Saflaştırılması

$\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasında ilk basamağında, ham enzim ekstraktı % 50 amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve daha sonra soğutmalı santrifüjde +4°C'de 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılmış ve pelet, tampon çözelti (fosfat tamponu, pH 7) ile çözündürülmüştür. Elde edilen enzim örneği daha sonra fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen enzim örneğinde protein ve aktivite tayinleri yapılmıştır.

Fermentasyon sıvısı ve saflaştırılan enzim profilleri SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile (Laemmli, 1970) karşılaştırılarak saflığı nitel olarak belirlenmiş, yine aynı yöntemle saf enzimin molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

### 3.2.4.5. Küfden (*Rhizomucor meihei*) Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Karakterizasyonu

Deneyel tasarımdan elde edilen sonuçlara göre, *Rhizomucor meihei* karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Enzim optimum koşullarda üretilmiştir. Bu çalışmada mısırözü küspesi katı besiyeri olarak kullanılmıştır. Fermentasyonda kullanılan aşılama oranı  $7.5 \times 10^5$  toplam spordur. Karakterizasyon deneylerinde, pH ve sıcaklığın aktivite ve stabilite üzerine etkisi belirlenmiş ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri hesaplanmıştır.

#### 3.2.4.5.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivite ve Stabilitesi Üzerine Etkisi

pH değerinin  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesine etkisi, enzim aktivitesinin 3,0'dan 9,0'a kadar değişen farklı pH değerlerinde test edilmesiyle belirlenmiştir. Kullanılan tampon sistemleri: 1M sitrat-fosfat (3,0; 4,0; 4,5; 5,0, ve 5,5), 1M sodyum-fosfat (pH 6,0; 7,0) ve 1M tris-HCl (pH 8,0; 9,0)'dir. Bağıl aktiviteler, belirli bir pH değerinde elde edilen aktivitenin, o aralıkta elde edilen maksimum aktiviteye oranlanmasına dayanır ve yüzdelik olarak ifade edilir.  $\beta$ -

galaktosidaz'ın pH stabilitesi 3.0-9.0 pH aralığında araştırılmıştır. Kullanılan tampon sistemleri: 1M sitrat-fosfat (3,0; 4,0; 4,5; 5,0 ve 5,5), 1M sodyum-fosfat (pH 6,0; 7,0) ve 1M tris-HCl (pH 8,0; 9,0)'dir. Enzim solüsyonları yukarıda bahsedilen tampon çözeltileriyle (1:1 oranında) karıştırılmış ve 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışımlar, standart deney koşullarında kontrole göre arta kalan β-galaktosidaz aktivitesini (%) ölçmek üzere alınmıştır.

### 3.2.4.5.2. Aktivite ve Stabilite Üzerine Sıcaklık Etkisi

β-galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi, 20 °C'den 70 °C'e değişen farklı sıcaklıklarda standart deney koşullarının uygulanmasıyla belirlenmiştir. Substrat (o-nitrofenol) reaksiyon öncesi sırayla tüm sıcaklıklarda 10 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Bağıl aktiviteler (yüzdeler olarak) belli bir sıcaklıkta elde edilen β-galaktosidaz aktivitesinin verilen sıcaklık aralığında elde edilen en yüksek aktiviteye oranlanmasıyla ifade edilmiştir. Ham enzimin sıcaklık stabilitesi, enzimin 20 °C'den 70 °C'e kadar değişen çeşitli sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyonundan sonra arta kalan aktivitesinin ölçülmesi ile incelenmiştir.

### 3.2.4.5.3. Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

Kinetik sabitler ( $V_{max}$  ve  $K_m$ ), pH 4.8'de ve 60 °C'de farklı substrat konsantrasyonlarında (0,25-3,33 mM) Lineweaver –Burk (1/V'e karşı 1/S) grafiği (Shuler ve Kargi, 2002) kullanılarak bulunmuştur.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$$

Eşitliğin eğiminden  $K_m/V_m$  değeri ve kesim noktasından  $1/V_m$  değeri hesaplanmıştır.

### 3.2.4.6. Küfden (*Rhizomucor meheie*) Elde Edilen β-galaktosidaz'ın Saflaştırılması

β-galaktosidaz enziminin saflaştırılması için elde edilen ham enzim ekstraktı %90 amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve fosfat tamponuna (pH 4,8) karşı diyaliz edilmiştir. Elde



edilen diyalizat Sephadex A25 kolona beslenerek adsorbe edilmiştir. Adsorbe edilen enzim kesikli olarak NaCl (0-2 M) içeren fosfat tamponu (pH 4,8) ile yıkanmış ve 5'er ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda protein içeriği 280 nm'deki absorbansla takip edilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür .

Fermentasyon sıvısı ve saflaştırılan enzim profilleri SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile (Laemmli, 1970) karşılaştırılarak saflığı nitel olarak belirlenmiş, yine aynı yöntemle saf enzimin molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

### **3.2.5. Laktaz Enziminin İmmobilizasyonu**

İmmobilizasyon işlemi kitosan-hidroksiapatit küreciklerine laktaz enziminin tutuklanmasıyla gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işleminin optimizasyonu, çeşitli işlem parametrelerinin etkileri ve mekanizmanın incelenmesi amacıyla model enzim olarak ticari *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galaktosidaz enzimi kullanılmıştır. Ayrıca saflaştırılan ve/veya kısmi saflaştırılan maya, bakteri ve küflerden üretilmiş laktaz enzimleri de belirlenen bu optimum koşullar altında kitosan-hidroksiapatit materyaline immobilize edilmiştir.

#### **3.2.5.1. $\beta$ -galaktosidaz Aktivite Tayini**

$\beta$ -Galaktosidaz'ın aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemde 37 °C'de 15 dakika bekletilen reaksiyon karışımında o-nitrophenol- $\beta$ -D-galaktopronisidin hidrolizi sonucu oluşan o-nitrophenol miktarı belirlenmiştir. Uygun pH ve 0,02 M derişimdeki tampon çözelti içerisinde 8,3 mM ONPG içerecek şekilde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Enzimin aktivatörü olarak kullanılan  $MgCl_2$ 'ün substrat çözeltisi içerisindeki derişimi 1,5 mM 'dır. 4 mL substrat çözeltisi üzerine uygun derişimindeki 1 ml enzim çözeltisinden eklendikten sonra 37 °C'de 15 dakika bekletilmiş ve reaksiyon tüplerinden 1 ml reaksiyon sıvısı alınarak, içerisinde 1 ml % 10 sodyum karbonat çözeltisi bulunan tüplere reaksiyonu durdurmak amacıyla konulmuştur. Bu karışımın üzerine 8 ml su ilave edilerek okuma için uygun seyreltme sağlanmıştır. Reaksiyon sonucu 420 nm' de okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart aktivite kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak hesaplanmıştır.

İmmobilize enzim aktivitesi tayini serbest enzimle aynı olup, 1 ml enzim çözeltisi yerine gerekli miktarda 1ml tampon çözeltisi içerisinde immobilize bilyalar kullanılmıştır.

### 3.2.5.2. Protein Tayini

Protein miktarı tayini Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılarak Bradford yöntemine göre yapılmıştır (Bradford, 1976).

### 3.2.5.3. Enzim İmmobilizasyonu

Kitosan (% 1,5 w/v) ve hidroksiapatit (% 1,5 w/v) 1 M asetik asit çözeltisi içerisinde (100 ml) çözündürüldükten sonra bilye formunun oluşturulması amacıyla sodyumtripolifosfat (150 ml) çözeltisine şırınga yardımıyla damlatılmıştır. Nötr pH değerine kadar saf suyla yıkandıktan sonra deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında 4 °C' de tampon çözelti içerisinde saklanmıştır (pH 6,86).

Gluteraldehit ile aktivasyon işleminden sonra aktifleştirilmiş 1,5 g kitosan-hidroksiapatit boncukları üzerine 5,0 mL enzim çözeltisi ilave edilerek orbital karıştırıcı ile 20°C sıcaklıkta 24 saat süreyle immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra immobilize enzim tampon çözelti ile süzüntüde protein kalmayınca dek yıkanmıştır. Toplam süzüntüde protein tayini yapılarak g destek başına tutuklanan mg enzim miktarı hesaplanmıştır.

#### 3.2.5.3.1. İmmobilizasyonda Gluteraldehit Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum gluteraldehit konsantrasyonunu belirlemek üzere sabit ortam koşullarında ve değişen gluteraldehit konsantrasyonlarında (% 0,1-0,7) her bir konsantrasyon için protein tayini ve aktivite tayini yukarıda anlatılan yöntemlere göre yapılmıştır.

#### 3.2.5.3.2. İmmobilizasyonda Sıcaklığın Etkisi

Optimum immobilizasyon sıcaklığını belirlemek üzere sıcaklığın etkisi (15 °C-35 °C) araştırılmıştır. Her bir sıcaklık için aktivite ve protein tayinleri Bölüm 3.2.5.1 ve Bölüm 3.2.5.2'de anlatılan yöntemlere göre yapılmıştır. Tepkime süresince, pH (6,86), enzim konsantrasyonu ( $0,46 \times 10^3$  mg/g bilye) ve karıştırma hızı (150 rpm) sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.3.3. İmmobilizasyonda Ortam pH' sının Etkisi**

İmmobilizasyona ortam pH' sının etkisini belirlemek için farklı pH derecelerindeki (4,0-5,0 sodyum asetat, 6,0-7,5 potasyum fosfat ve 8,0-9,0 Tris-HCl) tampon çözeltiler içerisinde immobilizasyon gerçekleştirilerek immobilize protein miktarı ve aktiviteler hesaplanmıştır. Tepkime süresince, sıcaklık (20 °C), enzim konsantrasyonu ( $0,46 \times 10^3$  mg/g bilye) ve karıştırma hızı (150 rpm) sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.3.4. İmmobilizasyonda Enzim Konsantrasyonunun Etkisi**

Enzim derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisini incelemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda enzimi çözeltileri hazırlanmıştır ( $0,23-1,86 \times 10^3$  mg enzim/g bilye). Tepkime süresince, sıcaklık (20 °C), pH (7.5) ve karıştırma hızı (150 rpm) sabit tutulmuştur. Tepkime hızının enzim derişimiyle değişimi incelenmiş olup protein miktarları belirlenmiştir.

### **3.2.5.3.5. İmmobilizasyonda Katı-Sıvı Oranının (Vk/Vs) Etkisi**

Bu denemede tutuklama maddesinin miktarı (1,5 g bilye) ve enzim konsantrasyonu ( $0,23 \times 10^3$  mg enzim/g bilye) sabit tutulup, enzim çözeltilisinin hacmi değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Tepkime sabit sıcaklık (20 °C), pH (7,5) ve karıştırma hızı (150 rpm) ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.5.3.6. İmmobilizasyonda Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Etkisi**

İmmobilizasyon ortamı için en uygun tuz konsantrasyonunu, dolayısıyla iyon kuvvetini bulmak amacıyla 0,25-1,5 M aralığında NaCl içeren tampon çözeltiler içerisinde immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Tepkime süresince, sıcaklık (20 °C), pH (7,5), enzim konsantrasyonu ( $0,23 \times 10^3$  mg enzim/g bilye) ve karıştırma hızı (150 rpm) sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.3.7. İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi**

İmmobilizasyon süresini belirlemek amacıyla, immobilizasyon işlemi boyunca farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak protein ve aktivite analizleri yapılmıştır. Analizler sabit

sıcaklık (20 °C), pH (7,5), enzim konsantrasyonu ( $0,23 \times 10^3$  mg enzim/g bilye) ve karıştırma hızında (150 rpm) gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.5.3.8. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanabilirliği**

İmmobilize laktazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 8 defa ardışık olarak kullanıldığında substrat (ONPG) üzerinde gösterdiği aktivitesi belirlenmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi her kullanılıştta optimum koşullar altında tayin edilmiştir.

#### **3.2.5.3.9. İmmobilize Enzimin Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi**

Gluteraldehit ile aktifleştirilen immobilize enzimin aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, buzdolabında 4 °C' de saklanan immobilize boncuklarından belirli aralıklarla (3., 5., 7., 9., 12., ve 15. gün) örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir.

#### **3.2.5.4. İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Karakterizasyonu**

##### **3.2.5.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktifliğine ve Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi**

Serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklık derecelerinde (20 °C -25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C) araştırılmıştır. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 3.2.5.1'de belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Tepkime süresince, pH (6,5) sabit tutulmuştur.

##### **3.2.5.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Aktifliğine ve Stabilitesine pH'nın Etkisi**

Serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi farklı pH'larda (4,0-5,0 sodyum asetat, 6,0-7,5 potasyum fosfat ve 8,0-9,0 Tris-HCl) 0,02 M tampon içinde 15 dakika sonunda 37 °C oluşan fruktoz miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar % maksimum aktivite ve % relatif aktivite olarak pH ile ilişkilendirilmek üzere grafiğe geçirilmiştir.

### **3.2.5.4.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi**

Serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktozidaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 0,5-12,5 mM derişim aralığında substrat çözeltileri hazırlandıktan sonra enzim aktivitesi tayini, Bölüm 3.2.5.1'deki yöntemine göre yapılmıştır. Tepkime süresince pH (6,5), ve sıcaklık (37 °C) sabit tutulmuştur.

## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Çeşitli Süt Ürünlerinden Maya Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

#### 4.1.1. *Kluyveromyces lactis* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Süt ve süt ürünleri laktoz metabolize eden farklı maya türleri için doğal bir habitat'tır. Araştırmamızın amaçlarından biri yüksek oranda laktaz enzimi sentez edebilen *Kluyveromyces lactis* türü mayaları doğal habitatlarından saflaştırarak türlerinin belirlenmesidir. Bu nedenle Bursa ilinde 5 farklı bölgeden seçilen süt ve süt ürünleri üreticilerinden süt ve peynir örnekleri alınmıştır. Süt örnekleri seçici besiyeri olan YGC agar ortamına ekilerek toplam maya konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 7). Süt örneklerindeki toplam maya konsantrasyonunun 2000 kob/ml ile 8000 kob/ml arasında değişebildiği görülmüştür (Tablo 7). Peynir örneklerindeki maya konsantrasyonlarının ise daha yüksek olduğu bulunmuş ve genellikle 15 000- 20 000 kob/ g peynir olduğu görülmüştür.

Saflaştırılan maya örneklerinden laktaz aktivitesi olan dolayısıyla da karbon kaynağı olarak sadece laktoz içeren mayaları seçmek ve laktoz pozitif mayaların türlerini belirlemek için daha önce tanımlandığı şekilde farklı karbonhidratları kullanabilme özellikleri araştırılmıştır.

**Tablo 7.** Araştırmada kullanılan bazı süt ve peynir örneklerinin alındığı yerler ve maya konsantrasyonları.

Örneğin Alındığı Yer	Örnek Türü	Maya Konsantrasyonu <sup>a</sup>	Örnekten Laktoz pozitif olarak seçilen maya suşu kodları
Tahtalı Köyü-Bursa	Beyaz peynir	21717	MY1-MY6, MY30-MY34
Minareli Çavuş Köyü-Bursa	Beyaz peynir	16250	MY7-MY14, MY17, MY24
Yunuseli Köyü-Bursa	Taze süt	8060	MY15, MY16, MY26-MY29
Minareli Çavuş Köyü-Bursa	Taze süt	2120	MY18-MY21, MY35-MY37
Doğanbey Köyü-Bursa	Taze süt	3540	MY22, MY23, MY25

<sup>a</sup>Maya konsantrasyonları (colony forming units) 1 g beyaz peynirden veya 1 ml taze süttten YGC agar petrilerinde üreyen toplam maya kolonisi sayısını göstermiştir.

**Tablo 8.** Karbonhidrat asimilasyon test sonuçları

Maya Örneği Kod No:	Glukoz	Laktoz	Galaktoz	Sukroz	Maltoz	GliseroL	DL Lactete	İnulin
MY1	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY2	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY3	+	+	Z	+	+	Z	-	-
MY4 (pembe)	+	-	+	+	+	Z	+	-
MY5	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY6	+	-	Z	+	Z	+	-	-
MY7	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY8	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY9	+	-	+	+	+	+	Z	+
MY10	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY11	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY12	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY13	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY14	+	+	+	+	Z	Z	Z	+
MY15	+	+	+	+	Z	Z	+	+
MY16	+	-	+	+	Z	+	+	+
MY17	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY18	+	-	+	+	Z	+	+	-
MY19	+	-	+	+	Z	+	+	-
MY20	+	-	+	+	Z	+	+	-
MY21	+	-	+	+	+	+	+	-

**Tablo 8 devamı**

Maya Örneği Kod No:	Glukoz	Laktoz	Galaktoz	Sukroz	Maltoz	GliseroL	DL Lactete	İnulin
MY22	+	+	+	+	+	+	+	-
MY23	+	+	+	+	+	+	+	-
MY24	+	+	+	+	+	+	+	-
MY25	+	+	+	+	+	+	+	-
MY26	+	-	+	+	+	-	-	-
MY27	+	-	+	+	+	-	-	-
MY28	+	+	+	+	+	+	+	-
MY29	+	+	+	+	+	+	+	-
MY30	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY31	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY32	+	-	+	+	Z	Z	+	Z
MY33	+	-	+	+	Z	Z	+	Z
MY34 (Pembe)	+	-	+	+	+	Z	-	Z
MY35	+	-	+	+	Z	Z	+	Z
MY36	+	-	+	+	Z	+	+	Z
MY37	+	-	+	+	Z	+	Z	Z
Ref K l. Var lactis	+	+	+	+	D	D	D	D

Değerlendirmeler Petrilerdeki 28 C'de 2 gün sonucunda koloni oluşum sürecine göre yapılmıştır. + : İyi ve hızlı üreme. -: Üreme yok. Z: Zayıf üreme. D: Değişken, maya suşuna göre değişen özellik



**Tablo 9.** Azot kullanımı, ozmotik tolerans ve sıcaklığa duyarlılık testleri sonuçları

Maya Örneği Kod No	Amonyum Sülfat	Sodyum Nitrat	Potasyum Nitrat	Lizin	10% NaCl 5% Glukoz	28 C'de Üreme	37 C'de Üreme	6 C'de Üreme (7 Gün)
MY1	+	-	-	+	-	+	-	-
MY2	+	-	-	+	-	+	-	-
MY3	+	-	-	+	-	+	-	-
MY4 (pembe)	+	-	-	-	Z	+	-	-
MY5	+	-	-	+	-	+	-	-
MY6	+	-	-	+	-	+	-	+
MY7	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY8	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY9	+	-	-	+	+	+	+	+
MY10	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY11	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY12	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY13	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY14	+	-	-	+	-	+	+	-
MY15	+	-	-	+	-	+	+	-
MY16	+	-	-	+	Z/+	+	+	-
MY17	+	-	-	+	-	+	+	-
MY18	+	-	-	+	-	+	+	+
MY19	+	-	-	+	-	+	+	+
MY20	+	-	-	+	-	+	+	+
MY21	+	-	-	+	-	+	+	+

**Tablo 9 devamı**

Maya Örneği Kod No	Amonyum Sülfat	Sodyum Nitrat	Potasyum Nitrat	Lizin	10% NaCl 5% Glukoz	28 C'de Üreme	37 C'de Üreme	6 C'de Üreme (7 Gün)
MY22	+	-	-	+	Z/-	+	+	-
MY23	+	-	-	Z	Z/-	+	-	-
MY24	+	-	-	Z	Z/-	+	-	-
MY25	+	-	-	+	Z/-	+	-	-
MY26	+	-	-	-	Z	+	+	-
MY27	+	-	-	-	Z	+	+	-
MY28	+	-	-	+	Z	+	Z	-
MY29	+	-	-	+	Z	+	Z	-
MY30	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY31	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY32	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY33	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY34 (Pembe)	+	-	-	-	Z	+	-	-
MY35	+	-	-	+	-	+	Z	+
MY36	+	-	-	+	-	+	Z	+
MY37	+	-	-	+	-	+	Z	+
Ref K l. var lactis	+	-	-	D	-	+	D	-

Değerlendirmeler Petrilerdeki 28 °C'de (37 C ve 6 C testleri hariç) 3 gün sonucunda koloni oluşum sürecine göre yapılmıştır. + : İyi ve hızlı üreme., - : Üreme yok., Z: Zayıf üreme.D: maya suşuna göre değişen özellik.

Karbonhidrat asimilasyon özelliklerini araştırabilmek için YGC agar petrilerinden iyi izole olmuş ve iyi büyüme gösteren maya örnekleri seçilerek önce minimal üreme ortamı olan ve karbonhidrat kaynağı olarak glukoz içeren YNB petrilerine ekim yapılmıştır. Bu petrilerde üretilen maya örnekleri tekrar farklı karbonhidratlar içeren YNB petrilerine aktarılarak her bir petrideki üreme özellikleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir. İlk taramada laktoz

petrilerinde zayıf üreme gösteren maya örneklerinin ikinci kez laktoz petrilerinde üreme göstermediklerinden bu maya örnekleri laktoz ortamında üreyemeyen örnekler olarak kabul edilmiştir (Tablo 8). Maya suşlarının karbonhidrat asimilasyon testleri sonuçları daha önce tanımlanmış standart *K. lactis* suşu olarak kullanılan *Kluyveromyces lactis* ATCC8585 suşunun karbonhidrat asimilasyon sonuçları ile de kıyaslanmıştır.

Mayaların azot içeren farklı bileşikleri azot kaynağı olarak kullanabilmeleri ve farklı sıcaklıklarda üremeleri de önemli bir taksonomik kriter olarak kullanılmıştır (Kurtzman ve Fell 2000). Bu nedenle maya örneklerinin türlerinin belirlenmesinde ek bir kriter olarak kullanılmak üzere saflaştırılan 37 maya örneğinin farklı azot kaynakları içeren minimal petrilerde üreme özellikleri de araştırılmıştır. Ayrıca karbonhidrat kaynağı olarak % 2 glukoz içeren YNB minimal besi yerine ekilen maya örneklerinin farklı sıcaklıklarda üreme özellikleri de belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 9’da özet olarak verildi. Farklı azot kaynaklarını kullanabilme ve farklı sıcaklıklarda üreme özelliklerine göre standart *K. lactis* suşu ile kıyaslanan maya örneklerinin bazılarının asimilasyon özelliklerine göre standart suşa benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 9).

Temel asimilasyon özelliklerine göre guruplandırılan maya suşlarının türlerinin daha kesin olarak belirlenebilmesi için saflaştırılan maya suşlarına API testi uygulanmıştır. Araştırmalarımızda özellikle saf kültür halindeki maya örnekleri türlerinin % 99’a varan doğruluk oranı ile belirlenmesi için kullanılan API ID 32c sistemi tercih edilmiştir (BioMerieux-Fransa). Üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanan test sonuçları Tablo 10’da verilmiştir. API 32c testi ile elde edilen sonuçlar ayrıca karbonhidrat asimilasyon testleri sonuçları ve standart *K. lactis* ATCC8585 suşu üreme ve asimilasyon sonuçları ile de kıyaslanmış ve sonuçların büyük çoğunlukla uyumlu olduğu görülmüştür.

**Tablo 10.** Saflaştırılan maya örneklerinin API 32c kit'i ile belirlenen tür adları.

<b>Maya Kod No</b>	<b>API 32c'ye Göre Adlandırma</b>	<b>Bazı Sinonim Adları</b>
MY1	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	Torulopsis colliculosa Zygosaccharomyces delbrueckii Torula colliculosa
MY2	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	
MY3	Cryptococcus albidus % 99,9	Torulopsis albida Torula gelatinosa
MY4 (pembe)	Rhodotorula mucilaginosa % 86,3 Rhodotorula glutinis % 13,7	Saccharomyces glutinis Rhodotorula rubra
MY5	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	
MY6	Candida zeylanoides % 99,9	Mycotorula zeylanoides Azymocandida zeylanoides
MY7	Candida kefir % 99,9	Kluyveromyces marxianus Kluyveromyces bulgaricus Dekkeromyces fragilis
MY8	Candida kefir % 99,9	
MY9	Candida lusitaniae % 99,1	Clavispora lusitinae
MY10	Candida kefir % 99,9	
MY11	Candida kefir % 99,9	
MY12	Candida kefir % 99,9	
MY13	Candida kefir % 99,9	
MY14	Candida kefir % 99,9	
MY15	Candida kefir % 99,9	
MY16	Candida krusei % 86 Candida valida % 12,91	Saccharomyces krusei Tricosporon krusei

**Tablo 10 devamı**

<b>Maya Kod No</b>	<b><i>API 32c'ye Göre Adlandırma</i></b>	<b>Bazı Sinonim Adları</b>
MY17	Candida kefyır % 99,9	
MY18	Candida lambica % 99,9	Pichia fermentans Zymopichia fermentans Candida monosa
MY19	Candida lambica % 99,9	
MY20	Candida lambica % 99,9	
MY21	Candida lambica % 99,9	
MY22	Candida sphaerica % 99,9	Kluyveromyces lactis Saccharomyces lactis
MY23	Candida sphaerica % 99,9	
MY24	Candida sphaerica % 99,9	
MY25	Candida sphaerica % 99,9	
MY26	S. cerevisiae % 59,4 Zygosaccharomyces spp. % 40,3	
MY27	S. cerevisiae % 97,5	
MY28	Candida sphaerica % 99,9	
MY29	Candida sphaerica % 99,9	
MY30	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	
MY31	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	
MY32	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	
MY33	Candida colliculosa % 66,9 Zygosaccharomyces spp % 17,1	
MY34 (Pembe)	Rhodotorula mucilaginosa % 79 Rhodotorula glutinis % 17	
MY35	Candida lambica % 99,9	
MY36	Candida lambica % 99,9	
MY37	Candida lambica % 99,9	
Ref K l. var lactis	Candida spherica % 99,9	Saccharomyces lactis

**Tablo 11.** Süt örneklerinden saflaştırılan maya türleri ve bulunma frekansları

<i>Maya Türleri<sup>a</sup></i>	<b>Bulunma frekansları</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (% 99,9)	% 24,3
<i>Pichia fermentans</i> (% 99,9)	% 18,9
<i>Candida colliculosa</i> (% 66,9)	% 18,9
<i>Kluyveromyces lactis</i> (% 99,9)	% 16,2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (% 86,3)	% 5,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (% 59,4)	% 5,4
<i>Candida zeylanoides</i> (% 99,9)	% 2,7
<i>Candida crusei</i> (% 86)	% 2,7
<i>Candida lusitaniae</i> (% 99,1)	% 2,7
<i>Cryptococcus albidus</i> (% 99,9)	% 2,7

Parantez içindeki %'ler tür tayinindeki yaklaşık doğruluk oranını göstermiştir.

API 32c test sistemi ve karbonhidrat ile azot kullanım test sonuçları da göz önüne alınarak saflaştırılan maya örneklerinin türleri belirli bir % olasılıkla belirlenebilmiştir (Tablo 11). Araştırmalarımızda maya türlerinin izolasyonu için kaynak olarak kullandığımız süt ve peynirlerde en yaygın olarak bulunan türün % 24,3 sıklıkla bulunabilen *K. marxianus* türü maya olduğu görülmüştür. *P. fermentans* ve *C. colliculosa* türlerinin ise %18,9 sıklıkla görülebilen ikinci en yaygın maya türleri olduğu bulundu. Daha az frekansta bulunmakla birlikte (% 16,2) *K. lactis* türlerinin de araştırmalarımızda kullanılan süt ürünlerinde sıklıkla rastlanabilecek bir maya türü olduğu tespit edilmiştir. Genellikle süt ürünlerinde sık rastlanabilen bu maya türlerine ek olarak daha az frekansta olmakla birlikte başka maya türlerine de rastlanmıştır. Kullandığımız süt örneklerinde yaklaşık olarak % 3- % 5,5 sıklıkla çeşitli *Candida* türleri, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa* ve *S. cerevisiae*'nin da yer aldığı görülmüştür (Tablo 11).

#### **4.1.2. *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces marxianus* Türlerinde Laktaz Aktivitelerinin Ölçülmesi**

İzole edilen mayalarla endüstriyel kullanıma sahip standart mayadan fermentasyon sonucu elde edilen enzim aktiviteleri yöntem olarak farklılık arz etmektedir. İzolatlar ile yapılan çalışmalar hangi türün ne kadar iyi bir laktaz üreticisi olduğunu bulmak amacıyla, düşük hacimlerde (mikrolitre) yürütüldüğünden hücre yoğunluğu cinsinden laktaz aktivitesi Miller Ünitesi olarak tayin edilmiş ve birbiri ile karşılaştırılmıştır. Tablo 12 ve 13'de farklı maya izolatları ve standart endüstriyel mayalar arasındaki laktaz aktiviteleri kıyaslanmıştır. Sonuçta *K. marxianus* izolatları hem standart mayadan hem de *K. lactis* izolatlarından daha düşük aktivite gösterdiği için fermentasyon çalışmalarında kullanılmamıştır. *K. lactis* izolatlarının tümü standart *K. lactis*'e yakın aktiviteler gösterdiğinden, izolatların her biri için ayrı ayrı fermentasyon optimizasyonu ve üretimi yapılmamıştır. Standart *K. lactis* suşu hem çok iyi tanımlanmış olup hem de endüstriyel kullanıma sahip olduğu için fermentasyon optimizasyonu ve üretimi için model olarak alınmış ve elde edilen sonuçların diğer izolatlar için temsili koşulların belirlenmesinde kullanılmıştır.

Saflaştırılıp türleri belirlenen ve laktoz pozitif fenotip olan *C. albidus*, *K. lactis* ve *K. marxianus* türü mayaların laktaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Bunun için maya suşları YP laktoz üreme ortamında standart şartlarda logaritmik faza veya durağan faza kadar üretilmiştir. Araştırmalarımızda standart kontrol maya suşları olarak da *K. lactis* ATCC8585

ve *K. marxianus* CBS2762 suşları kullanılmıştır. *C. albidus*'da laktaz aktivitesinin hem logaritmik ve hem de durağan fazda *Kluyveromyces* türlerine göre çok düşük olduğu bulundu (Tablo 12). *K. marxianus*'da ise laktaz aktivitelerinin suşlar arasında önemli değişiklikler gösterdiği görülmüştür. *K. marxianus*'un MY15 suşunda laktaz aktivitesi diğer *K. marxianus* suşlarına göre yaklaşık 2 kat daha fazla olarak ölçülmüştür. Fakat bu suшта durağan fazda laktaz aktivitesinin daha düşük seviyede (293 MU'dan 219 MU'ya) olduğu da dikkat çekmiştir. Araştırmamızda saflaştırılıp *K. marxianus* olarak türlerini belirlenen maya suşlarında MY 15 hariç diğer *K. marxianus*'larda durağan fazda ortalama % 50 daha fazla laktaz aktivitesi olduğu görülmüştür (Tablo 12). Bununla birlikte daha önce tanımlanan ve standart suş olarak araştırmamızda kullanılan *K. marxianus* CBS2762 suşuna göre bizim saflaştırdığımız *K. marxianus* türlerinde laktaz aktivitelerinin ortalama olarak 2 veya 3 kat daha düşük olduğu da görülmüştür (Tablo 12). Çalışmalarımızın amacı yüksek enzimatik aktivitesi olan *K. lactis* suşlarını izole etmek ve onlardaki enzimatik aktiviteleri karakterize etmek olduğundan bu aşamadan sonraki araştırmalarımızda *K. marxianus* suşları kullanılmamıştır.

*K. lactis*'de laktaz biyosentezinin glukoz baskılaması ile kontrole edildiği bilinmektedir (Zacharie ve Breunig, 1993; Zenke vd., 1993). Araştırmalarımızda saflaştırılan *K. lactis* suşlarında ekspres edilen laktaz enzimlerine glukoz baskılamasının etkileri de araştırılmıştır. Bunun için saflaştırılan *K. lactis* suşları (MY22-MY29) farklı konsantrasyonlarda glukoz veya laktoz içeren maya özütü pepton üreme ortamlarında logaritmik faza kadar üretilmiş ve her bir maya suşunun laktaz aktivitesi ölçülmüştür. Üreme ortamında % 4 konsantrasyonunda glukoz bulunduğunda MY22-MY29 suşlarında önemli seviyede ve kontrol suşundan yaklaşık 2-kat daha fazla laktaz biyosentezi yapılabildiği bulunmuştur (Tablo 13). *K. lactis* suşlarının laktoz içeren üreme ortamındaki laktaz aktiviteleri ile kıyaslandığında, MY22-MY29 suşlarında da laktaz biyosentezinin glukoz baskılaması ile kontrol edildiği görülebilir. Fakat tarafımızdan izole edilen suşlardaki laktaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkileri, kontrol suşu olarak kullandığımız standart *K. lactis* suşundan çok daha az seviye olduğu da belirlenmiştir (Tablo 13).



**Tablo 12.** Saflaştırılan MY (Milk Yeast) suşlarının logaritmik ve durağan fazdaki laktaz aktiviteleri (üreme ortamı YP+2% laktoz).

Maya Suşu (izolasyon kodu)	Laktaz Aktiviteleri <sup>a</sup>	
	Logaritmik faz	Durağan Faz
<i>Cryptococcus albidus</i> (MY 3)	4	9
<i>K. marxianus</i> (MY 7)	140	231
<i>K. marxianus</i> (MY 8)	126	208
<i>K. marxianus</i> (MY 10)	147	222
<i>K. marxianus</i> (MY 11)	128	208
<i>K. marxianus</i> (MY 12)	125	186
<i>K. marxianus</i> (MY 13)	166	198
<i>K. marxianus</i> (MY 14)	178	217
<i>K. marxianus</i> (MY 15)	293	219
<i>K. marxianus</i> (MY17)	145	180
<i>K. lactis</i> (MY 22)	617	620
<i>K. lactis</i> (MY 23)	608	565
<i>K. lactis</i> (MY 24)	721	653
<i>K. lactis</i> (MY 25)	554	679
<i>K. lactis</i> (MY 28)	555	733
<i>K. lactis</i> (MY 29)	633	883
Standart <i>K. lactis</i>	714	692
Standart <i>K. marxianus</i>	485	374

<sup>a</sup>Laktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir. YP: %1 Yeast extract, %2 Pepton'u göstermektedir

**Tablo 13.** Laktaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkileri.

Maya Suşu (izolasyon kodu)	Laktaz aktiviteleri <sup>a</sup>			
	YP+ %2 Laktoz	YP+0,1 glukoz	YP+%2 Glukoz	YP+%4 glukoz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	617	177	119	124
<i>K. lactis</i> (MY 23)	653	171	135	112
<i>K. lactis</i> (MY 24)	721	181	131	117
<i>K. lactis</i> (MY 25)	553	132	100	112
<i>K. lactis</i> (MY 28)	573	152	86	93
<i>K. lactis</i> (MY 29)	633	186	144	127
Standart <i>K. lactis</i>	735	127	98	67

<sup>a</sup>Laktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir. YP: %1 Yeast extract, %2 Pepton'u göstermektedir.

*K. lactis*'de laktaz biyosentezinin üreme ortamındaki laktoz tarafından da aktive edildiği bulunmuştur. Bu nedenle araştırmalarımız sırasında saflaştırılan *K. lactis* suşlarında laktoz biyosentezinin laktoz aktivasyonu altında olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Glukoz baskılamasının oluşturulduğu (% 4 glukoz) üreme ortamına laktoz ilave edildiğinde laktaz biyosentezinde glukoz baskılaması koşullarında olmasına rağmen 3-4 katlık bir artış olduğu bulunmuştur (Tablo 14). Bu sonuçlar, yerel kaynaklardan izole edilip türleri *K. lactis* olarak belirlenen suşlarımızda laktaz biyosentezinin normal, standart *K. lactis*'de olduğu gibi gerçekleştiğini göstermiştir. Fakat laktaz aktivitesinin standart *K. lactis* suşundan daha fazla olduğu görülmüştür.

*K. lactis* suşlarının doğal habitatları süt ve süt ürünleridir. Süt endüstrisinde önemli bir yan ürün olarak peyniraltı suyu oluşur ve laktozu metabolize edebilen mikroorganizmalar için iyi bir besiyeridir. İzole edilen *K. lactis* suşları peyniraltı suyunda üretilerek laktaz aktiviteleri belirlenmiştir. *K. lactis* suşlarının hem logaritmik ve hem de durağan fazda önemli miktarlarda laktaz biyosentezi yapabildikleri belirlenmiştir (Tablo 15).

**Tablo 14.** Laktaz biyosentezinin laktoz ile aktivasyonu

Maya Suşu (izolasyon kodu)	Laktaz aktiviteleri <sup>a</sup>		
	YP+% 2 Laktoz	YP+% 4 glukoz	YP+% 4 Glukoz + % 2 laktoz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	617	124	317
<i>K. lactis</i> (MY 23)	653	112	345
<i>K. lactis</i> (MY 24)	721	117	388
<i>K. lactis</i> (MY 25)	553	112	299
<i>K. lactis</i> (MY 28)	573	93	375
<i>K. lactis</i> (MY 29)	633	127	406
Standart <i>K. lactis</i>	735	67	213

<sup>a</sup>Laktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir. YP: %1 Yeast extract, %2 Pepton'u göstermektedir.

**Tablo 15.** Peynir altı suyunda üretilen (% 2 Whey + % 0,5 Amonyum sülfat) MY (Milk Yeast) suşlarının logaritmik ve durağan fazdaki  $\beta$ -galaktosidaz aktiviteleri

Maya Suşu (izolasyon kodu)	Laktaz aktiviteleri <sup>a</sup>	
	Logaritmik faz	Durağan Faz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	289	291
<i>K. lactis</i> (MY 23)	321	306
<i>K. lactis</i> (MY 24)	267	301
<i>K. lactis</i> (MY 25)	326	385
<i>K. lactis</i> (MY 28)	292	304
<i>K. lactis</i> (MY 29)	276	306
Standart <i>K. lactis</i>	444	606

<sup>a</sup>Laktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir.

#### 4.1.3. *Kluyveromyces lactis* Türlerinde İnvertz Aktivitelerinin Ölçülmesi

*K. lactis*'de invertz enzim aktivitesi olduğu daha önce rapor edilmiştir. Araştırmalarımızda saflaştırılan maya türlerinin de invertz aktiviteleri belirlenmiştir. İnvertz hücre içi ve hücre dışında bulunan bir enzimdir. *K. lactis*'de de *S. cerevisiae*'da olduğu gibi periplazmik alanda bulunur. *K. lactis*'de *KIINV1* geninden invertz sentezi glukoz baskılaması ile kontrol edildiğinden saflaştırılan *K. lactis* suşlarının invertz aktiviteleri farklı üreme ortamlarında belirlenmiştir (Tablo 16).

**Tablo 16.** Saflaştırılan *K. lactis* suşlarında invertz aktiviteleri (üreme ortamı YP+ % karbon kaynağı).

Maya Suşu (izolasyon kodu)	İnvertz aktiviteleri <sup>a</sup>			
	% 4 glukoz	2% Glukoz	%0,05 Glukoz	2% Gliserol+ 2% Laktat
<i>K. lactis</i> (MY 22)	205	325	537	280
<i>K. lactis</i> (MY 23)	213	230	523	297
<i>K. lactis</i> (MY 24)	262	319	700	273
<i>K. lactis</i> (MY 25)	216	353	561	301
<i>K. lactis</i> (MY 28)	241	309	622	318
<i>K. lactis</i> (MY 29)	260	321	472	303
<b>Standart <i>K. lactis</i></b>	56	49	154	446

<sup>a</sup>İnvertz aktiviteleri µm glukoz/dak/ 100mg maya (kuru ağırlık) olarak verilmiştir. Üreme ortamı: %1 Maya ekstraktı (Yeast extract), %2 pepton, % karbon kaynağı.

*K. lactis* suşlarında ölçülen invertz aktiviteleri kontrol suşuna göre oldukça farklı bir düzenlenme mekanizması göstermiştir. Araştırmalarımızda saflaştırılan *K. lactis* suşlarının invertz aktivitelerinin kontrol suşu olarak kullanılan standart *K. lactis*'e göre 4-5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, MY22-MY29 suşlarında invertz biyosentezinin glukoz baskılanmasından çok fazla etkilenmediği de bulunmuştur (Tablo 16). Standart *K. lactis*

suşunda glukoz baskılamasının olduğu şartlarda yaklaşık olarak 50 ünite olarak ölçülen invertaz aktivitesinin MY22-MY29 suşlarında 200-260 ünite arasında değişen miktarlarda olduğu bulunmuştur. Glukoz baskılamasının olmadığı şartlarda da (% 0,05 Glukoz) MY22-MY29 suşlarında invertaz aktivitesinin standart *K. lactis* suşundan 4-5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur.

#### 4.1.4. *Kluyveromyces lactis* Suşlarının Üreme Değerlerinin Ölçülmesi

Mayaların ikilenme süreleri endüstriyel amaçlar için kullanımlarında çok önemli bir parametredir. İkilenme süresini etkileyen en önemli kriter besiyeri bileşenleridir. Bu amaçla, araştırmamızda saflaştırılan maya suşlarının ikilenme süreleri hem standart laboratuvar üreme ortamı olan maya özütü, pepton ve % 2 glukoz içeren besiyerinde hem de endüstriyel amaçlar için kullanılan peyniraltı suyunda belirlenmiştir. Yaptığımız ölçümlere göre *K. lactis* MY22-MY29 suşlarının standart *K. lactis* suşundan çok farklı olmadığı belirlenmiştir (Tablo 17). Fakat, Tablo 17’de de görülebileceği gibi MY28 suşunda ikilenme süresinin diğer suşlardan oldukça farklı olarak bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni tam olarak anlayamamıştır ve bunun için daha detaylı analizler gerekmiştir.

**Tablo 17.** YP+ %2 glukoz ortamında üretilen *Kluyveromyces lactis* (MY 22-29) maya suşlarının ikilenme süreleri.

Maya Suşu Kodları	İkilenme Süreleri <sup>a</sup>	
	YP+%2 Ortamı	Peyniraltı Suyu
<i>K. lactis</i> (MY 22)	110	122
<i>K. lactis</i> (MY 23)	112	104
<i>K. lactis</i> (MY 24)	126	106
<i>K. lactis</i> (MY 25)	90	92
<i>K. lactis</i> (MY 28)	76	120
<i>K. lactis</i> (MY 29)	138	110
<i>K. lactis</i> (standart Suş)	120	118

<sup>a</sup>İkilenme Süresi logaritmik aşama için ve dakika olarak verildi. Deneyler ikili olarak yapıldı ve tekrarlandı. Herbir ikilenme süresi 4 bağımsız deneyin ortalamasını göstermiştir. YP: %1 Yeast extract, %2 pepton.

#### 4.1.5. *Metschnikowia* Türü Mayaların İzolasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Tanımlanması

*Metschnikowia pulcherrima* türü mayaların biyokontrol ajanı olarak çeşitli fungal enfeksiyonlara karşı kullanılabilmesi daha önce rapor edilmiştir (Sipiczki, 2006). Fakat bir başka araştırmada *M. pulcherrima* türü mayaların çok heterojen bir grup olduğu, çok fazla tür içi varyasyon gösterdikleri de rapor edilmiştir (Janisiewicz vd., 2001). Bu maya türünde tür içi varyasyonun antagonistik etkilerinde de görüldüğü, her *M. pulcherrima* türünün antagonistik etkisinin aynı olmadığı da bulunmuştur. Araştırmamızın bu bölümünde ülkemizde bulunan kaynaklardan çok güçlü antimikrobiyal etkisi olan *M. pulcherrima* türü mayaların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu tür mayaların en belirgin özellikleri üreme ortamına salgıladıkları *Pulcherrimin* pigmenti nedeni ile kolonilerin etrafında kırmızı bir zon oluşturmalarıdır. *M. pulcherrima* türü mayalar bu fenotipleri nedeni ile Düzce bölgesinde yetişen üzümlerden kolaylıkla saflaştırılmıştır. *M. pulcherrima* türü mayaların bulunma frekansları %18 olarak belirlenmiştir. *M. pulcherrima* ile birlikte *Pichia norvegensis* (% 56), *M. pulcherrima* (% 18), *Kloeckera japonica* (% 13), ve *Kloeckera apiculata* (% 13) türü mayalar da saflaştırılmış, fakat araştırmamızın bundan sonraki bölümlerinde kullanılmamıştır.

Saflaştırılan *M. pulcherrima* türü mayaların (UMY12, UMY14, UMY15) farklı mikroorganizmalara olan antagonistik etkileri araştırıldığında daha önce de rapor edildiği şekilde önemli tür içi farklılıklar olduğu görülmüştür. Tablo 18’de verilen bakteri ve maya suşlarına karşı en güçlü antagonistik etkisi olan *M. pulcherrima* suşu UMY14 olarak belirlenirken, UMY12 suşunun da en zayıf suş olduğu belirlenmiştir (Tablo 18). *M. pulcherrima* UMY12, 14 ve 15 suşlarının çeşitli küflerin spor germinasyonlarına etkileri de belirlenmiştir. Bu testte de en etkin suşların UMY14, UMY15 olduğu bulunmuştur. UMY12 suşunun spor germinasyonuna antagonistik etkisinin de zayıf olduğu gösterilmiştir (Tablo 19, Şekil 2).

**Tablo 18.** *M. pulcherrima* suşlarının farklı maya ve bakterilere antagonistik etkileri.

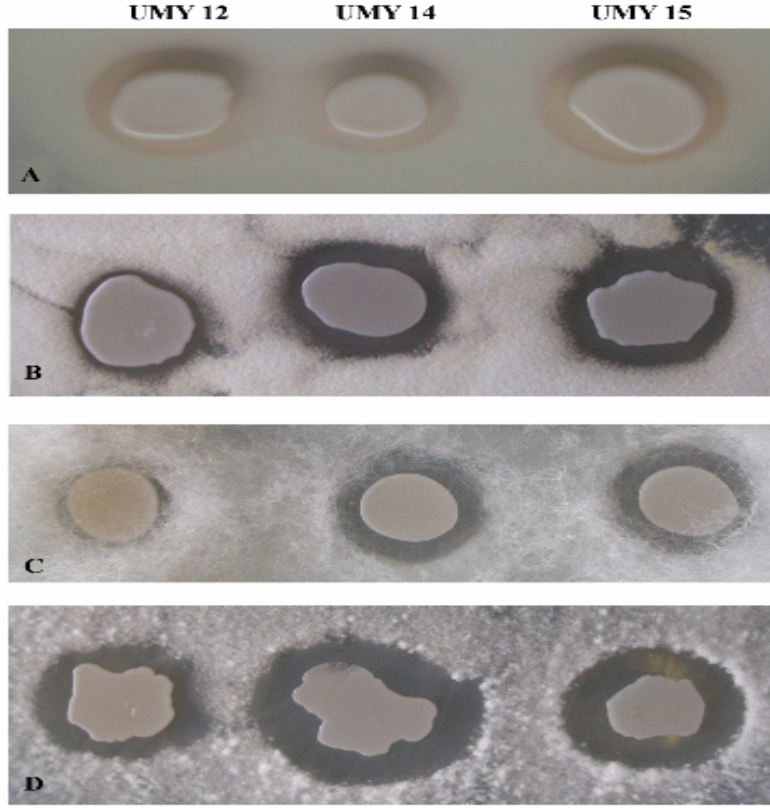
Mikroorganizmalar	İnhibisyon zonu <sup>a</sup> [mm]		
	UMY12	UMY14	UMY15
<i>Escherichia coli</i>	4	ZG	ZG
<i>Proteus vulgaris</i>	5	4	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	3	3
<i>Debaryomyces occidentalis</i>	3	4	4
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ZG	2	5
<i>Candida albicans</i> 24433	1	1	3
<i>Candida albicans</i> 10231	ZG	2	3
<i>Candida albicans</i> 2730	ZG	1	3
<i>Candida parapsilosis</i>	2	4	5
<i>Candida krusei</i>	1	3	4
<i>Candida dupliensis</i>	1	2	2
<i>Candida tropicalis</i>	ZG	2	2
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	4	4

<sup>a</sup>Inhibisyon zonları *M. pulcherrima* kolonilerinin kenarından başlayarak mikroorganizmaların üremeye başladığı alana kadar olan bölge olarak ölçüldü. ZG, İnhibisyon zonu görülmedi.

**Tablo 19.** *M. pulcherrima* suşlarının farklı küflerde spor gelişimine antagonistik etkileri.

Microorganizmalar	İnhibisyon zonu <sup>a</sup> [mm]		
	UMY12	UMY14	UMY15
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	2
<i>Aspergillus flavus</i>	1	2	3
<i>Aspergillus terreus</i>	1	2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	3	3
<i>Paecilomyces</i> spp.	2	3	3
<i>Mucor</i> spp.	1	3	3
<i>Trichoderma</i> spp.	3	5	4
<i>Bipolaris</i> spp.	1	4	3

<sup>a</sup>Inhibisyon zonları *M. pulcherrima* kolonilerinin kenarından başlayarak mikroorganizmaların üremeye başladığı alana kadar olan bölge olarak ölçüldü.



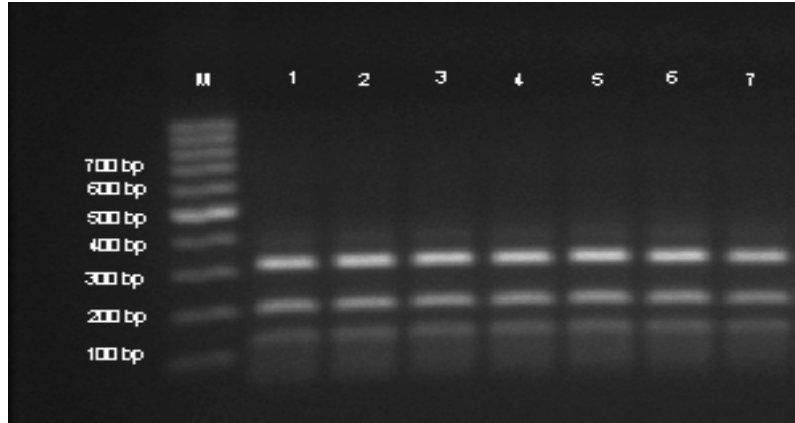
**Şekil 2.** *M. pulcherrima* suşları UMY12, UMY14 ve UMY15'in farklı mikroorganizmalara karşı antagonistic etkileri. (A) *Proteus vulgaris*; (B) *Paecilomyces* spp. (C) *Mucor* spp. (D) *Trichoderma* spp.

#### 4.1.6. Maya Türlerinin rDNA Dizilerinin Belirlenmesi ve RFLP Analizleri

Mikroorganizmalarda tür tayininde çok çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Araştırmamızda saflaştırılan mayaların türleri önce fermentasyon özellikleri ile bazı karbon ve azot kaynaklarını kullanma prensibine dayalı olan API kitleri ile yapılmıştır. Bu test sistemi genellikle % 99 doğru sonuç vermekle birlikte özellikle yakın türlerde yanlış adlandırmalara da neden olabilmektedir. Bundan dolayı araştırmamızda saflaştırılan ve API test kiti ile *K. lactis* ve *M. pulcherrima* olarak belirlenen mayaların türleri ITS-5.8 rDNA bölgelerindeki DNA dizisine göre de yapılmıştır. Bu prensibe göre API kiti ile *K. lactis* olarak belirlenen maya suşlarının % 100 olarak *K. lactis* oldukları doğrulanmıştır. *K. lactis* suşlarının türleri ITS-rDNA RFLP analizi yapılarak da standart suş ile karşılaştırılmıştır. MY22-MY29 suşlarından saflaştırılıp Hinfl enzimi ile kesilen ITS1-5.8S rDNA ITS2 bölgelerinin RFLP şeklinin standart *K. lactis* suşu ile aynı olduğu belirlenmiştir (Şekil. 3). Fakat *M. pucherrima*



suşlarının daha önce rapor edilen suşlardan genetik olarak farklı oldukları bulunmuştur. *M. pulcherrima* suşlarının daha önce tanımlanan suşlara olan benzerliklerinin % 92-% 97 arasında olduğu görülmüştür (EK 1). Sekans analizi yapılan ITS1-5.8S rDNA-ITS dizileri kıyaslandığında bizim saflaştırdığımız *M. pulcherrima* türlerinin büyük olasılıkla yeni bir alt tür olduğu belirlenmiştir. Bu DNA dizileri Gen Bankasına kayıt edildi ve UMY maya suşlarına sırasıyla UMY12 (FJ172528), UMY14 (FJ172527), ve UMY15 (FJ172526) accession kodları verilmiştir.

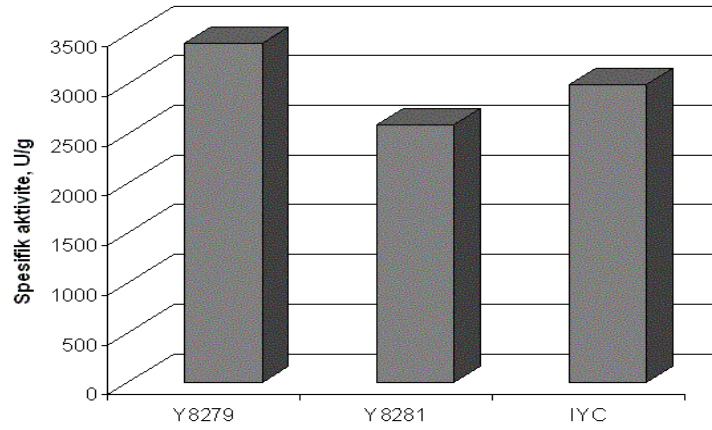


**Şekil 3.** *K. lactis* suşlarının ITS-5.8 rDNA RFLP analizi. M: Marker, 1: Standart *K. lactis*, 2-7: Sırasıyla MY22-MY29 kodları ile verilen *K. lactis* genomik DNA örneklerinden elde edilen PZR ile elde edilen rDNA'ların HinfI enzimi ile kesim sonuçları.

## 4.2. Mayalardan (*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279) $\beta$ -Galaktosidaz Enzimi Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

### 4.2.1. Farklı Mayaların Enzim Aktivite Değerleri

Çalışmada, Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilen *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 (Y-8279), *Kluyveromyces marxianus* Y-8281 (Y-8281) ve Industrial Yeast Collection (Perugia, Italy)'dan temin edilen *Kluyveromyces lactis* (IYC) hücreleri kullanılarak  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.** Çalışmada kullanılan mayalar ve bunların enzim aktivite sonuçları

En yüksek spesifik enzim aktivitesi, *K. lactis* NRRL Y8279 suşu ile 3416,6 U/g olarak bulunmuştur. Daha sonra Industrial Yeast Collection'dan temin edilen *Kluyveromyces lactis* (3001,3 U/g) ve *Kluyveromyces marxianus* Y-8281 suşları ile sırasıyla 3001,3 U/g ve 2599,5 U/g olarak bulunmuştur (Şekil 4). Bu sonuçlar doğrultusunda en yüksek spesifik enzim aktivitesi elde edilen *K. lactis* NRRL Y8279 suşu ile çalışmaya devam edilmiştir.

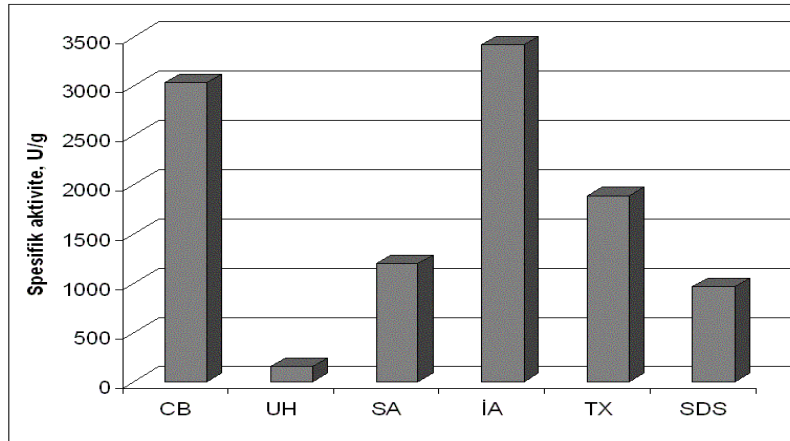
#### 4.2.2. Hücre Parçalama Yöntemlerinin Spesifik Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Hücre parçalama yöntemleri kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki grup altında incelenebilir. Bu işlemler uygulandığında ya hücre zarı parçalanarak enzimler açığa çıkar ya da hücre geçirgenliği artırılır. Hücre geçirgenliği artırıldığında, hücre zarından substrat, ürün yada koenzim gibi küçük moleküllerin geçişi kolaylaşır. Hücre geçirgenliğini arttıran ajanlar, hücre içinde ve dışında çözülmüş durumda olan düşük molekül ağırlıklı maddelerin pasif geçişine izin veren membran yapısını parçalarlar. Hücre geçirgenliğini arttırıcı ajan olarak organik çözücüler, hücre zarındaki fosfolipid miktarını azaltarak zara etki ederler (Panesar ve ark. 2007).

Bu çalışmada fiziksel ve kimyasal hücre parçalama yöntemleri test edilmiştir. En yüksek spesifik enzim aktivitesi,  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin ölçümünden önce *K. lactis* hücrelerinin isoamil alkol ile muamele edilmesiyle bulunmuştur. İsoamil alkol ile hücre geçirgenliği arttırıldıktan sonra ONPG hücre içine girmiş ve  $\beta$ -galaktosidaz ile hücre içinde hidrolize edilmiştir.

Hücre parçalama *K. lactis*'den hücre içi  $\beta$ -galaktosidaz üretiminde en önemli işlemlerden biridir. Fermentasyon sonunda farklı fiziksel ve kimyasal hücre parçalama metodları denenmiştir. Sonuçlar spesifik  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin kullanılan hücre parçalama yöntemine bağlı olduğunu göstermiştir. En yüksek spesifik enzim aktivitesi, isoamil alkol kullanılarak hücre geçirgenliği arttırıldığında bulunmuştur (3416,6 U/g, Şekil 5). Cam boncuklar kullanılarak mekanik olarak hücre parçalandığında ise, spesifik enzim aktivitesi 3038,9 U/g olarak tespit edilmiştir. Diğer kullanılan hücre parçalama yöntemleri olan Triton X-100, sıvı azot ve SDS kullanıldığında spesifik aktivite sırasıyla 1888,8 U/g, 1199,4 U/g ve 964,3 U/g olarak bulunmuştur. En düşük spesifik enzim aktivitesi ultrasonik homojenizatör kullanıldığında bulunmuştur (152,6 U/g).

Organik çözücülerle mikrobiyal hücrelerin hücre geçirgenliğinin arttırılması üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir (Numanoğlu ve Sungur, 2004; Panesar ve ark. 2007; Flores ve ark. 1994; Park ve ark. 2007; Kondo ve ark. 2000). Flores ve ark. (1994) kloroform, toluen ve etanol ile *K. lactis*'in hücre zarı geçirgenliğinin artırılması üzerine çalışmışlar ve bu çözücülerin performanslarının inkübasyon süresine, inkübasyon sıcaklığına ve hem hücre hem de çözücü konsantrasyonuna bağlı olduğunu bulmuşlardır.

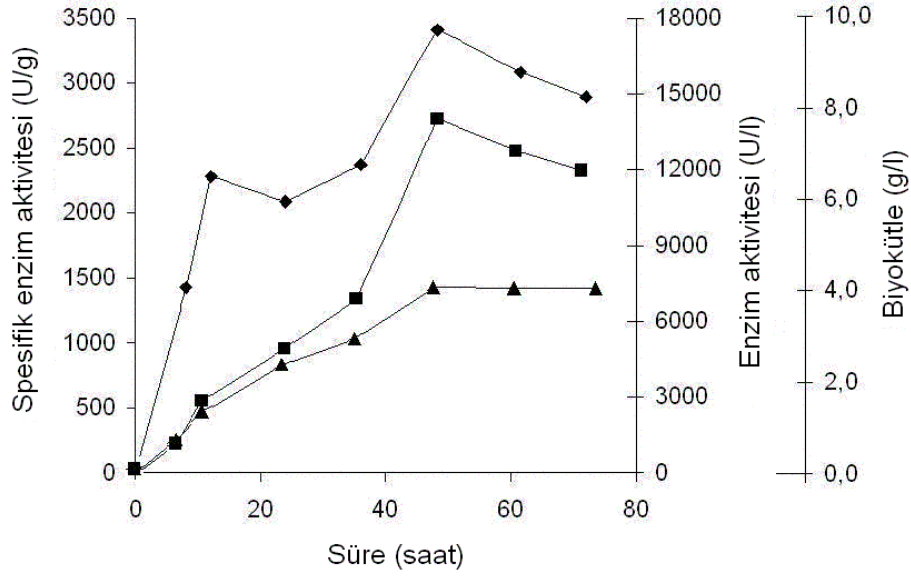


**Şekil 5.** Farklı hücre parçalama yöntemlerinin enzim aktivitesine etkisi. CB: Cam boncuk, UH: Ultrasonik homojenizatör, SA: Sıvı azot, İA: İsoamil alkol, TX: Triton X-100, SDS: Sodyum dodesil sülfat

### 4.2.3. $\beta$ -galaktosidaz Enzim Üretiminin Kinetiği

Çalkalamalı kültürde 30 g/l başlangıç şeker konsantrasyonundaki sentetik ortamda *K. lactis* suşunun gelişme ve  $\beta$ -galaktosidaz üretim kinetiği incelenmiştir. Şekil 6'da da görüldüğü gibi spesifik enzim aktivitesinde logaritmik fazın başlangıcında ve sonunda olmak üzere iki tepe noktası bulunmaktadır. En yüksek spesifik ve volumetrik enzim aktivitesi, fermentasyonun 48. saatinde sırasıyla 3416,6 U/g ve 14106 U/l olarak bulunmuştur. Durağan fazdaki enzim aktivitelerindeki hızlı düşüşün sebebi büyük olasılıkla stabil olmayan hücre içi enzimlerden kaynaklanmaktadır. En yüksek spesifik ( 189,83 U/g h) ve volumetrik (293,88 U/gh) verimlilik sırasıyla 8. ve 48. saatlerde tespit edilmiştir. Kalan şeker miktarı beklenildiği gibi fermentasyon boyunca azalmış ve üretim ortamındaki şekerin tamamının tükeltildiği gözlenmiştir. Fermentasyon sonunda kalan şeker miktarı 1,1g/l olarak bulunmuştur. Ortam pH'sı fermentasyon boyunca azalmış ve başlangıçta 7,0 olan pH'nın 48 saatlik fermentasyondan sonra 5,0-5,3'e düştüğü gözlenmiştir.

Üretim kinetiği ile ilgili benzer sonuçlar literatürde rapor edilmiştir (Rech ve ark 1999; Martins ve ark. 2002; Rajoka ve ark. 2003). Rech ve ark. (1999), *K. marxianus*'un iki suşunu kullanarak  $\beta$ -galaktosidaz üretimi üzerine çalışmışlar ve zamana bağlı olarak buldukları spesifik enzim aktivitesi kineğinde logaritmik fazın başlangıcında ve sonunda olmak üzere iki tepe noktası gözlemlemişlerdir. Volumetrik enzim aktivitesi ise durağan fazın başlangıcına kadar arttığını ve durağan fazda enzim aktivitesinin hızla düştüğünü ifade etmişlerdir. Martins ve ark. (2002), *K. marxianus* ile  $\beta$ -galaktosidaz üretimini incelemişler ve inkübasyondan 4 saat sonra maksimum spesifik enzim aktivitesi gözlemlemişlerdir. İkinci en yüksek spesifik enzim aktivitesini ise durhan fazın başlangıcı olan 16. saat sonra bulmuşlardır. Rajoka ve ark. (2003), çalkalamalı kültürde *K. marxianus* ile  $\beta$ -galaktosidaz üretimi üzerine çalışmışlar ve en yüksek enzim üretimine 30 ve 40 saatlerden sonra ulaşıldığını rapor etmişlerdir.



Şekil 6. *K.lactis* suşunun gelişme ve β-galaktosidaz üretim kinetiği. (◆: Spesifik enzim aktivitesi, ■: enzim aktivitesi, ▲: biyokütle)

#### 4.2.4. Çalkalamalı İnkübatörde Optimizasyon

Çalışmada öncelikle *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279, kültür ortamında geliştirilmiş, daha sonra üretim ortamlarına aşılacaktır (% 2 v/v). β-galaktosidaz enzim üretimi, sentetik üretim ortamında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon, 30°C'de, çalkalamalı inkübatörde (B.Braun Certomat) gerçekleştirilmiştir.

Tablo 20. Çalkalamalı inkübatör ortamında incelenen parametreler ve seviyeleri

Faktor	Bağımsız Değişkenler	Değişken Seviyeleri				
		-α	-1	0	+1	+α
X <sub>1</sub>	pH	5	6	7	8	9
X <sub>2</sub>	Karıştırma Hızı (rpm)	100	150	200	250	300
X <sub>3</sub>	Substrat Konsan. (g l <sup>-1</sup> )	10	20	30	40	50
X <sub>4</sub>	Süre (saat)	24	36	48	60	72

Verilerin istatistiksel analizinde Minitab Statistical Software (Release 13.20) kullanılmıştır. Deneysel tasarımda kullanılan bağımsız değişkenler ve bunların ön denemeler sonucunda seçilen seviyeleri Tablo 20’de listelenmiştir. Çalışmada, 31 deneysel noktadan (24 farklı kombinasyona sahip ve merkezde yedi tekrarlı) oluşan ve dört değişken ile oluşturulan merkez tümleşik tasarım (central composite rotatable design) kullanılmıştır.

**Tablo 21.** Çalkalamalı inkübatör ortamında kullanılan deneysel tasarım ve cevaplar

<i>Çalışma sırası</i>	pH	Karıştırma hızı (rpm)	Substrat kon. (g/l)	Süre (saat)	Spesifik Aktivite (U/g)
1	6	150	20	36	3025
2	7	200	30	48	3757
3	7	200	30	48	3717
4	6	150	40	60	2460
5	6	250	40	60	2042
6	8	150	40	36	2809
7	6	250	20	36	2766
8	7	200	30	48	3752
9	9	200	30	48	2598
10	7	200	30	24	3311
11	8	150	40	60	2895
12	7	200	30	48	3722
13	7	300	30	48	2690
14	7	200	30	48	3757
15	5	200	30	48	1992
16	6	250	20	60	2492
17	8	250	40	60	2542
18	7	200	30	48	3717
19	7	100	30	48	3390
20	7	200	30	48	3737
21	6	250	40	36	2664
22	8	250	20	36	2964
23	6	150	40	36	2755
24	8	150	20	36	3286
25	7	200	50	48	2210
26	8	250	40	36	2556
27	7	200	30	72	3173
28	7	200	10	48	3122
29	8	150	20	60	3679
30	6	150	20	60	3014
31	8	250	20	60	3064

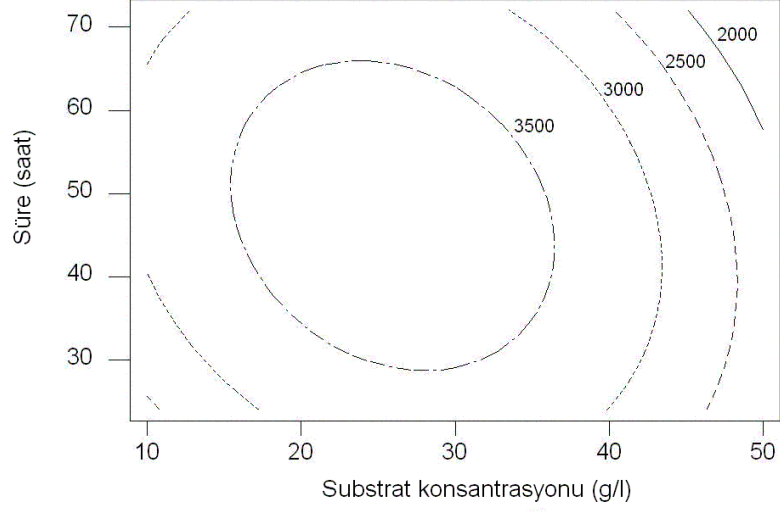
**Tablo 22.** İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi

	SD	<i>KT</i>	Düz. KT	Düz.KO	F	P
Regresyon	14	8586783	8586783	613342	998,41	<0,001
Lineer	4	2550677	2787665	696916	1135,0	<0,001
İkinci derece	4	5642044	5642044	1410511	2297,3	<0,001
Etkileşim	6	394062	394062	65677	106,91	<0,001
Artık hata	16	9829	9829	614		
Uyum eksikliği	10	7779	7779	778	2,28	0,163
Saf hata	6	2050	2050	342		
Toplam	30	8596612				

SD,serbestlik derecesi; KT, kareler toplamı ; Düz. KT, düzeltilmiş kareler toplamı; Düz. KO, düzeltilmiş kareler ortalaması

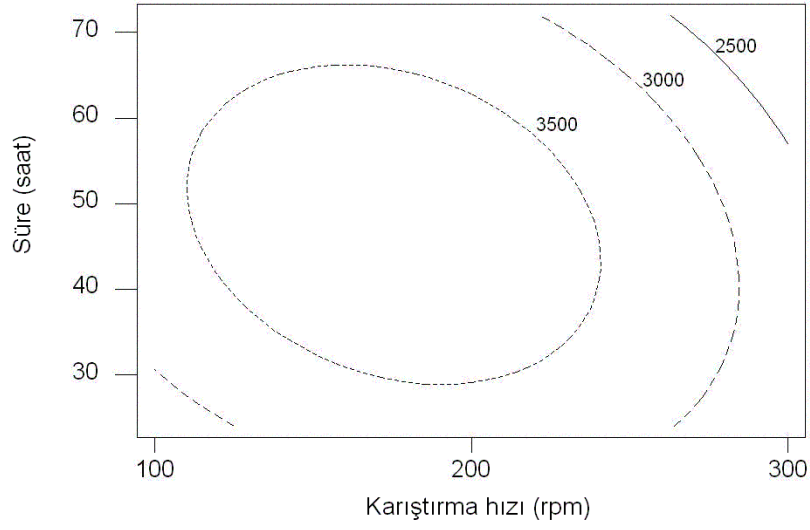
**Tablo 23.** Spesifik enzim aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH Kat.	T	P
<i>Sabit</i>	-20297,9	415,275	-48,878	<0,001
pH	4944,30	76,226	64,864	<0,001
Karıştırma hızı	28,3190	1,303	21,741	<0,001
Substrat	180,239	6,252	28,828	<0,001
Süre	57,7840	5,427	10,647	<0,001
pH × pH	-359,041	4,635	-77,464	<0,001
Karıştırma × Karıştırma	-0,0691163	0,002	-37,280	<0,001
Substrat × Substrat	-2,66287	0,046	-57,452	<0,001
Süre × Süre	-0,849373	0,032	-26,389	<0,001
pH × Karıştırma	-0,191813	0,124	-1,548	0,141
pH × Substrat	-4,46805	0,620	-7,211	<0,001
pH × Süre	8,68165	0,516	16,813	<0,001
Karıştırma × Substrat	0,0878612	0,012	7,090	<0,001
Karıştırma × Süre	-0,112674	0,010	-10,910	<0,001
Substrat × Süre	-0,600165	0,052	-11,623	<0,001



Sabit değerler: pH:7.0, Karıştırma hızı: 200 rpm

(a)

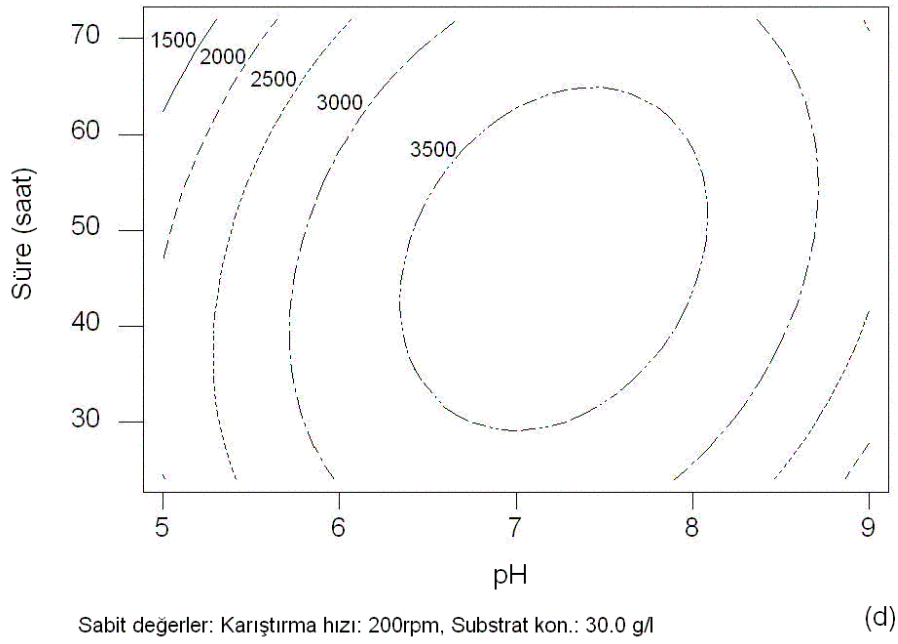
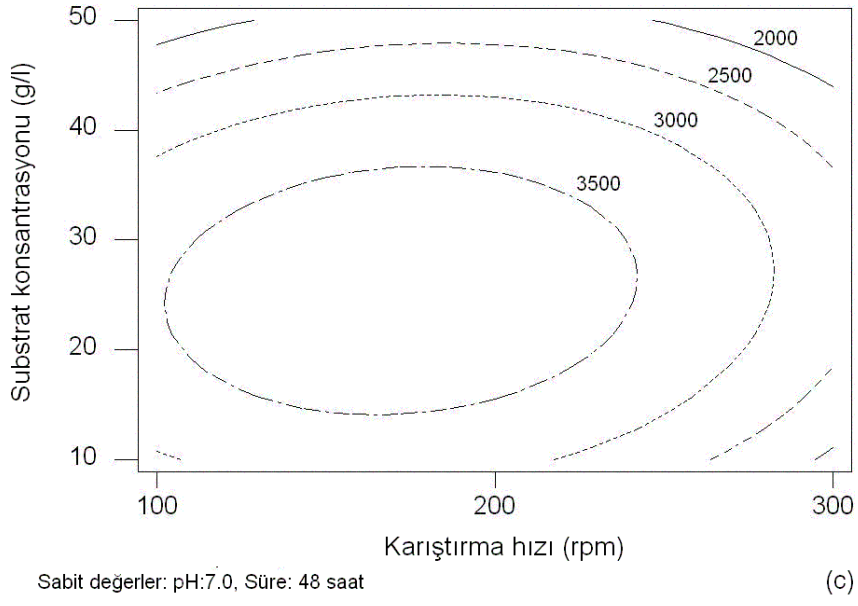


Sabit değerler: pH:7.0, Substrat kon.: 30.0 g/l

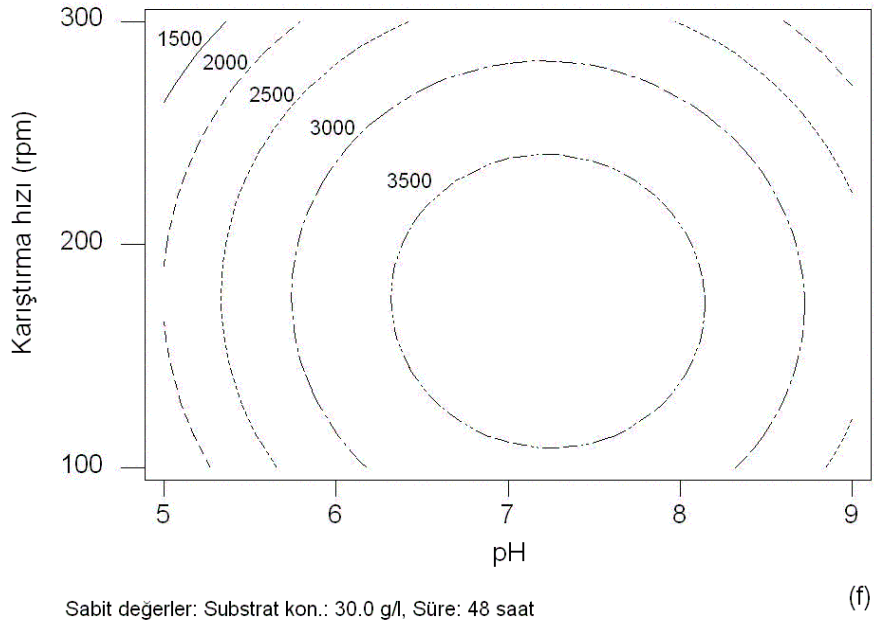
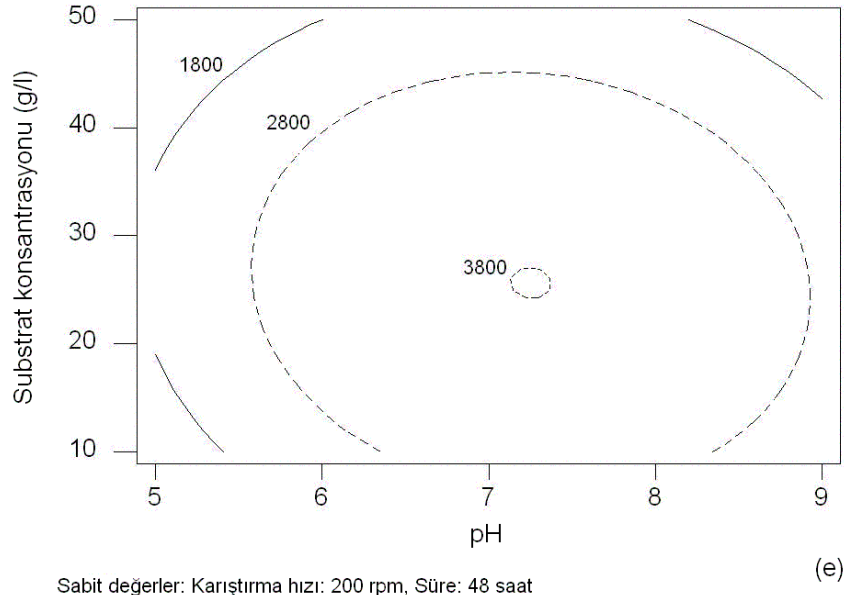
(b)

**şekil 7.** alkalamalı kültürde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri





**şekil 7.** alkalamalı kültürde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri (devamı)



**Şekil 7.** Çalkalamalı kültürde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri (devamı)

Bu çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları Tablo 21’de verilmiştir. Tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Tablo 22’ de verilmiştir. Deneysel veriler ve tahmin edilen veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı ( $R^2$ ) değeri 0,998 ve uyum eksikliği değeri 0,163 ( $p>0,05$ ) olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre modelin uyum eksikliği önemsizdir. Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları Tablo 23’de gösterilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir.

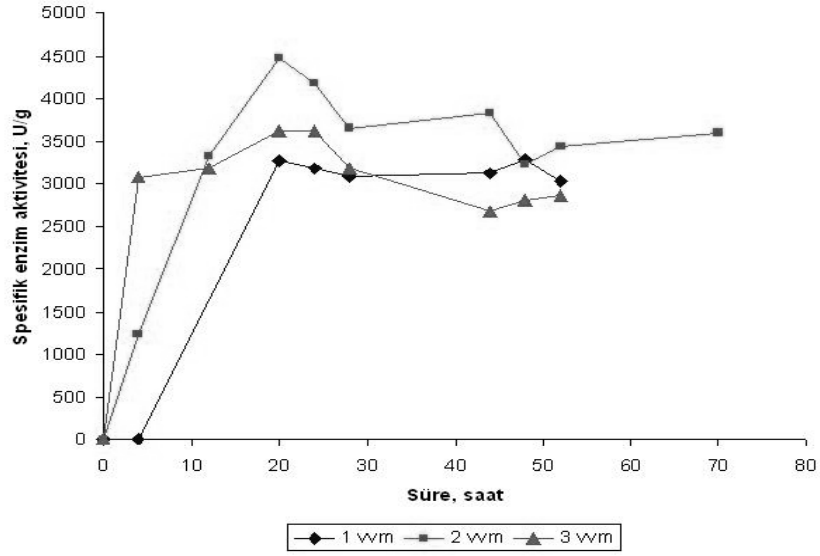
$$Y = - 20297,9 + 4944,3 X_1 + 28,319 X_2 + 180,239 X_3 + 57,784 X_4 - 359,041 X_1^2 - 0,06912 X_2^2 - 2,66287 X_3^2 - 0,84937 X_4^2 - 4,46805 X_1X_3 + 8,68165 X_1X_4 + 0,087861 X_2X_3 - 0,11267 X_2X_4 - 0,60017 X_3X_4$$

Şekil 7 a-f’de, iki bağımsız değişken sabitken diğer bağımsız değişkenlerin spesifik enzim aktivitesi üzerine etkilerini gösteren izohips eğrileri verilmiştir. Şekillerde spesifik enzim aktivitesinin, pH 7,3, karıştırma hızı 180 rpm, başlangıç şeker konsantrasyonu 25 g/l ve fermentasyon süresi 50 saat olduğu koşullarda maksimum değerde olacağı görülmektedir.

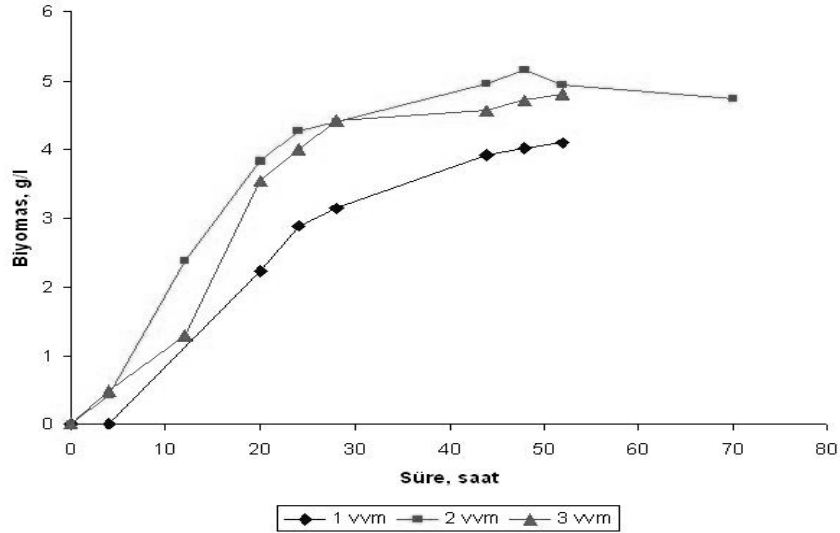
Yukarıda verilen ikinci derece polinom eşitlik çözülerek proses için optimum koşullar, pH 7,35, karıştırma hızı 179,2 rpm, başlangıç substrat konsantrasyonu 24,9 g/l ve fermentasyon süresi 50,9 saat olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda, maksimum olarak 4218,4 U g<sup>-1</sup> spesifik enzim aktivitesi bulunmuştur.

#### 4.2.5. Karıştırmalı Tank Tipi Biyoreaktörde Gerçekleştirilen Ön Denemeler

$\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi, sentetik üretim ortamında, 30 °C’de, karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde (New Brunswick Scientific BioFlo<sup>®</sup> 110, 1,75 l) gerçekleştirilmiştir. *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279, kültür ortamında geliştirilmiş, daha sonra üretim ortamlarına aşılacaktır (% 2 v/v). Enzim üretimi üzerine havalandırma hızının ve karıştırma hızının etkileri incelenmiştir.  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimine 1, 2, 3 vvm havalandırma ve 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında üretimler gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 8.** Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 ile  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi üzerine havalandırma hızının etkisi (200 rpm karıştırma hızında)

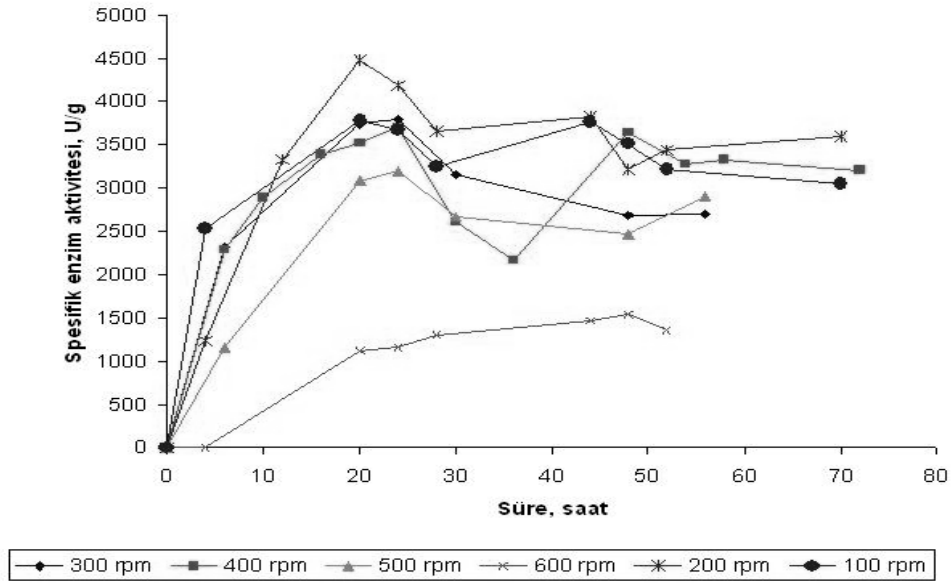


**Şekil 9.** Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 ile biyokütle üretimi üzerine havalandırma hızının etkisi (200 rpm karıştırma hızında)

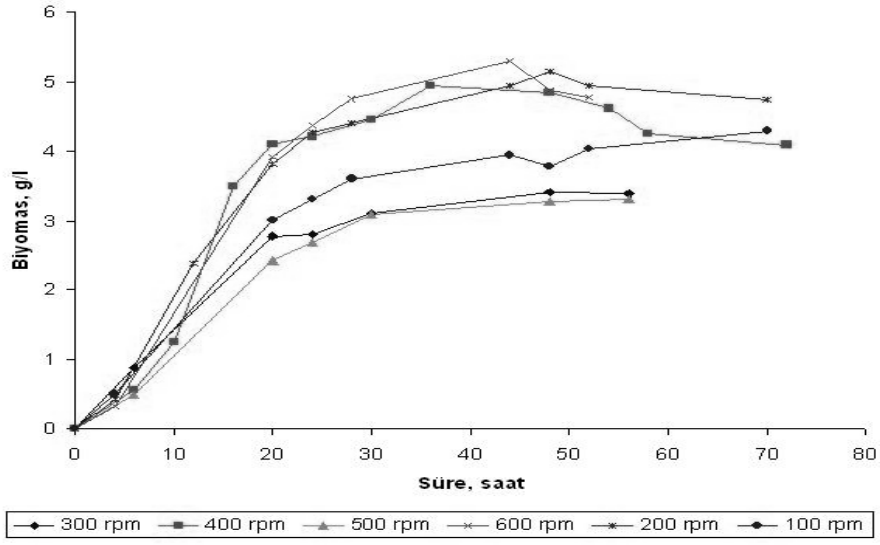
Havalandırma hızının  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi üzerine etkisini incelendiğinde 1, 2 ve 3 vvm hızlarındaki üretimlerin 20. saatteki spesifik enzim aktiviteleri sırasıyla 3267, 4470 ve 3621 U/g olarak belirlenmiştir (Şekil 8). Aynı havalandırma hızlarındaki biyokütle üretimleri Şekil 9’de verilmiştir.

Farklı karıştırma hızının  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi üzerine etkisini incelemek için 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 rpm hızlarında üretimler gerçekleştirilmiş ve 20. saatteki spesifik enzim aktiviteleri sırasıyla 3779, 4470, 3741, 3530, 3082 ve 1126 U/g olarak belirlenmiştir (Şekil 10). Aynı karıştırma hızlarındaki biyokütle üretimleri Şekil 11’de verilmiştir.

Sonuç olarak en yüksek spesifik enzim aktivitesi, 25 g/l başlangıç laktoz konsantrasyonunda, 2 vvm havalandırma ve 200 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilen üretimde görülmüştür.



**Şekil 10.** Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 ile  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi üzerine karıştırma hızının etkisi (2 vvm havalandırma hızında)



**Şekil 11.** Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 ile biyokütle üretimi üzerine karıştırma hızının etkisi (2 vvm havalandırma hızında)

#### 4.2.6. Karıştırmalı Tank Tipi Biyoreaktörde $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretiminin Optimizasyonu

Çalışmada, *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279, kültür ortamında geliştirilmiş ve daha sonra üretim ortamlarına aşılacaktır (% 2 v/v).  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretimi, sentetik üretim ortamında, 30 °C’de, karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde (BioFlo® 110, New Brunswick Scientific) gerçekleştirilmiştir. Tablo 24’de  $\beta$ -galaktosidaz üretiminin optimizasyonu için kullanılan bağımsız değişkenler ve bunların ön denemeler sonucunda seçilen seviyeleri verilmiştir. Çalışmada, 31 deneysel noktadan (24 farklı kombinasyona sahip ve merkezde yedi tekrarlı) oluşan ve dört değişken ile oluşturulan yüzey merkezli istatistiksel dizayn (face central statistical design,  $\alpha=1$ ) kullanılmıştır.

**Tablo 24.** Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörde incelenen parametreler ve seviyeleri

Faktör	Bağımsız Değişkenler	İncelenen parameter seviyeleri		
		-1	0	+1
X <sub>1</sub>	Havalandırma Hızı (vvm)	6	7	8
X <sub>2</sub>	Karıştırma Hızı (rpm)	150	200	250
X <sub>3</sub>	Substrat Konsan. (g l <sup>-1</sup> )	20	30	40
X <sub>4</sub>	Süre (saat)	36	48	60

Bu çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları Tablo 25’de verilmiştir. Tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Tablo 26’de verilmiştir. Deneysel veriler ve tahmin edilen veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R<sup>2</sup>) değeri 0,996 ve uyum eksikliği değeri 0,141 (P>0,05) olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre modelin uyum eksikliği önemsizdir. Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları Tablo 27’de gösterilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$Y = - 564,849 + 1749,64 X_1 + 16,2884 X_2 + 49,4414 X_3 + 78,8684 X_4 - 503,587 X_1^2 - 0,0315592 X_2^2 - 1,27187 X_3^2 - 3,01087 X_4^2 - 0,588513 X_1X_2 + 11,1039 X_1X_3 + 8,66000 X_1X_4 - 0,119414 X_2X_3 + 1,36665 X_3X_4$$

**Tablo 25.** Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktör denemelerindeki deneysel tasarım ve cevaplar

Çalışma Sırası	Havalan. hızı (vvm)	Karış. hızı (rpm)	Substrat kon. (g l <sup>-1</sup> )	Süre (saat)	Spesifik Aktivite (U g <sup>-1</sup> )
1	3	100	15	12	3103
2	1	300	15	32	2932
3	1	300	35	12	2992
4	2	200	25	22	4420
5	3	300	15	12	3111
6	1	100	15	12	3208
7	1	100	35	32	3320
8	2	200	25	22	4493
9	1	300	15	12	3494
10	3	100	35	32	3994
11	2	200	25	22	4460
12	3	300	15	32	2939
13	1	100	35	12	3303
14	2	200	25	22	4416
15	3	100	15	32	2996
16	1	200	25	22	3892
17	2	100	25	22	4213
18	1	100	15	32	2710
19	2	200	25	32	4134
20	2	200	25	22	4528
21	3	300	35	32	3515
22	3	100	35	12	3611
23	2	200	35	22	4374
24	3	200	25	22	4049
25	3	300	35	12	3172
26	2	200	25	12	4212
27	2	200	25	22	4446
28	2	300	25	22	4104
29	2	200	15	22	4320
30	1	300	35	32	3096
31	2	200	25	22	4460



**Tablo 26.** İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi

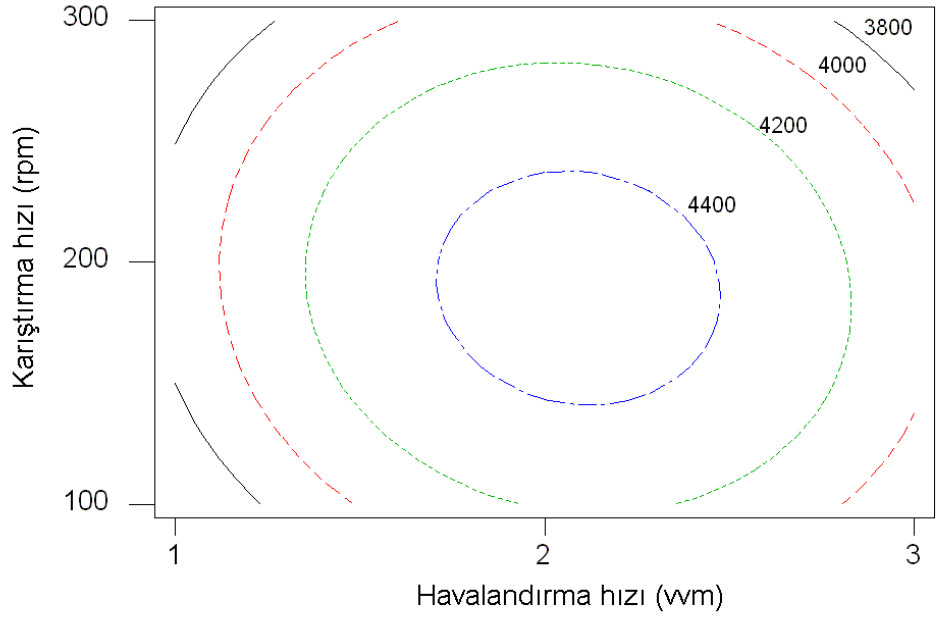
	SD	<i>KT</i>	Düz. KT	Düz.KO	F	P
Regresyon	14	11037016	11037016	788358	261,25	<0,001
Lineer	4	582774	582774	145694	48,28	<0,001
İkinci derece	4	9554131	9554131	2388533	791,51	<0,001
Etkileşim	6	900110	900110	150018	49,71	<0,001
Artık hata	16	48283	48283	3018		
Uyum eksikliği	10	38839	38839	3884	2,47	0,141
Saf hata	6	9444	9444	1574		
Toplam	30	11085299				

SD,serbestlik derecesi; KT, kareler toplamı ; Düz. KT, düzeltilmiş kareler toplamı; Düz. KO, düzeltilmiş kareler ortalaması

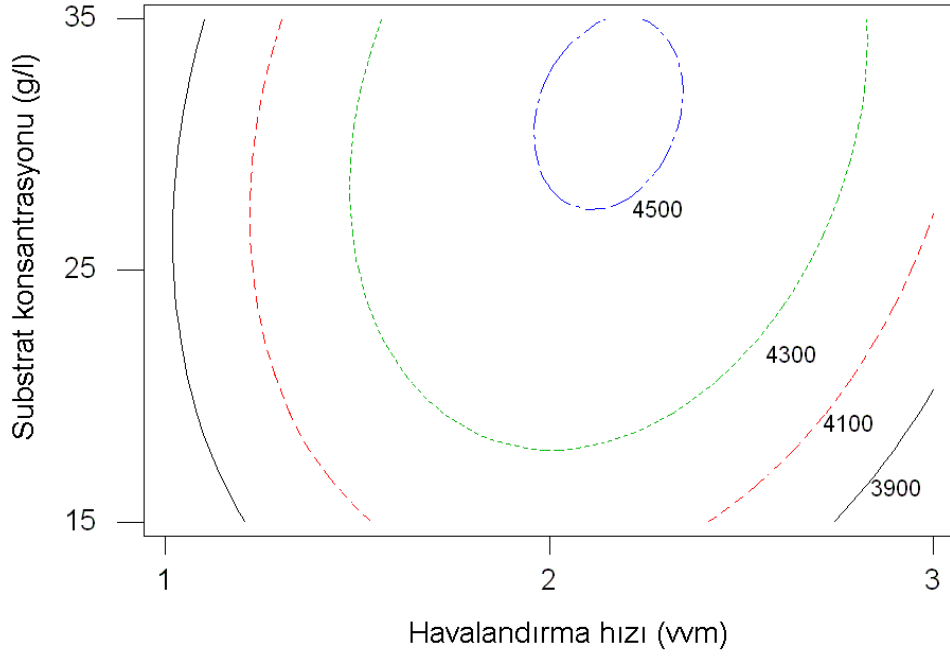
**Tablo 27.** Spesifik enzim aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH Kat.	T	P
Sabit	-564,849	16,30	274,105	<0,001
Havalandırma hızı	1749,64	12,95	6,619	<0,001
Karıştırma hızı	16,2884	12,95	-4,731	<0,001
Substrat	49,4414	12,95	10,997	<0,001
Süre	78,8684	12,95	-2,447	0,026
Havalandırma × Havalandırma	-503,587	34,10	-14,768	<0,001
Karıştırma × Karıştırma	-0,0315592	34,10	-9,255	<0,001
Substrat × Substrat	-1,27187	34,10	-3,730	0,002
Süre × Süre	-3,01087	34,10	-8,830	<0,001
Havalandırma × Karıştırma	-0,588513	13,73	-4,285	0,001
Havalandırma × Substrat	11,1039	13,73	8,085	<0,001
Havalandırma × Süre	8,66000	13,73	6,306	<0,001
Karıştırma × Substrat	-0,119414	13,73	-8,695	<0,001
Karıştırma × Süre	-0,00522500	13,73	-0,380	0,709
Substrat × Süre	1,36665	13,73	9,951	<0,001

SH kat., Standart hata katsayıları

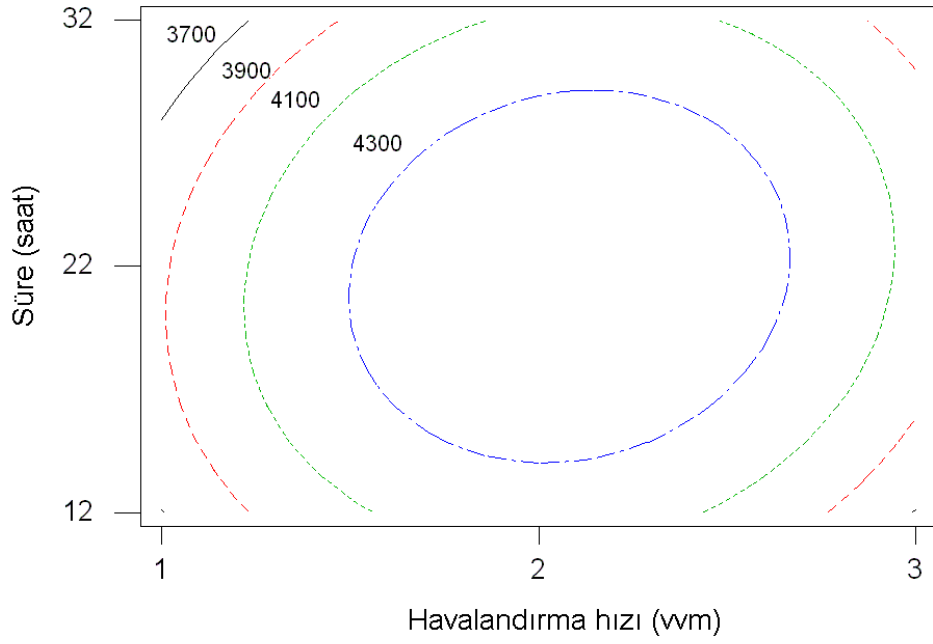


Sabit değerler: Substrat kon.: 25 g/l, Süre: 22 saat (a)

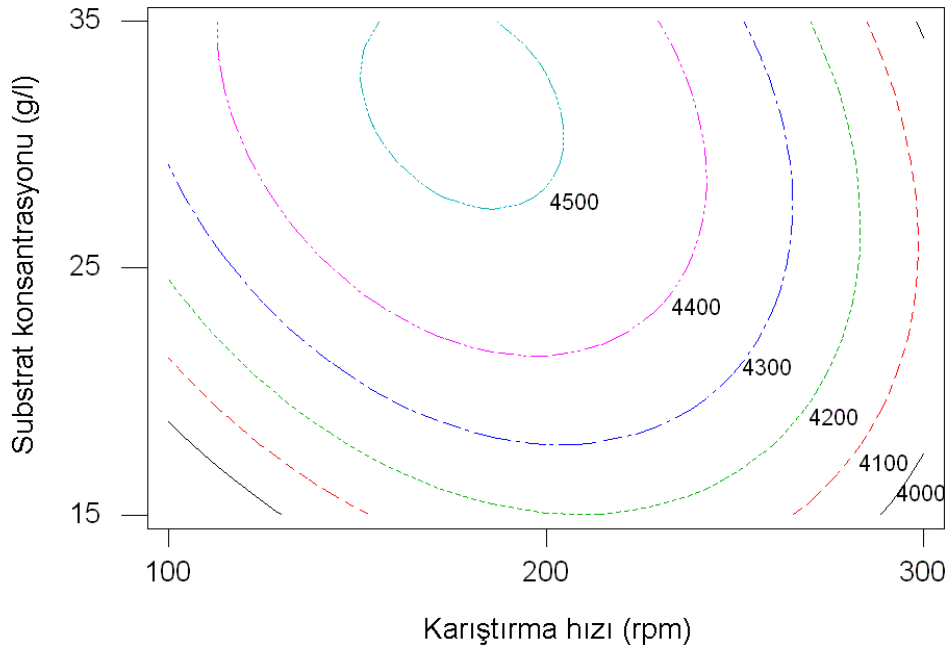


Sabit değerler: Karıştırma hızı: 200 rpm, Süre: 22 saat (b)

**Şekil 12.** Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri

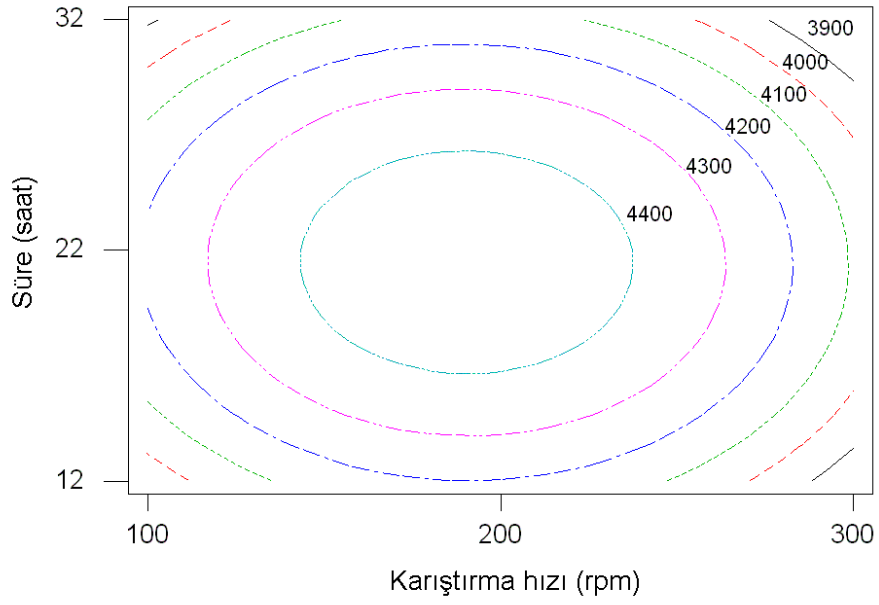


Sabit değerler: Karıştırma hızı: 200 rpm, Substrat kon.: 25 g/l (c)

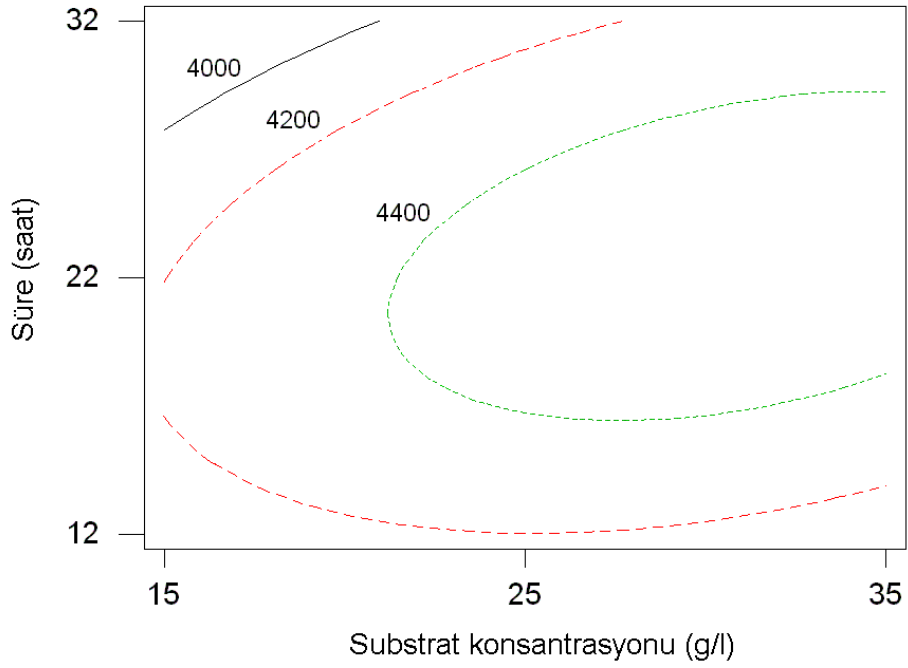


Sabit değerler: Havalandırma hızı: 2 vvm, Süre: 22 saat (d)

**Şekil 12.** Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri (devamı)



Sabit değerler: Havalandırma hızı: 2 vvm, Substrat kon.: 25 g/l (e)



Sabit değerler: Havalandırma hızı: 2 vvm, Karıştırma hızı: 200 rpm (f)

**Şekil 12.** Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde spesifik enzim aktivitesi üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren izohips eğrileri (devamı)

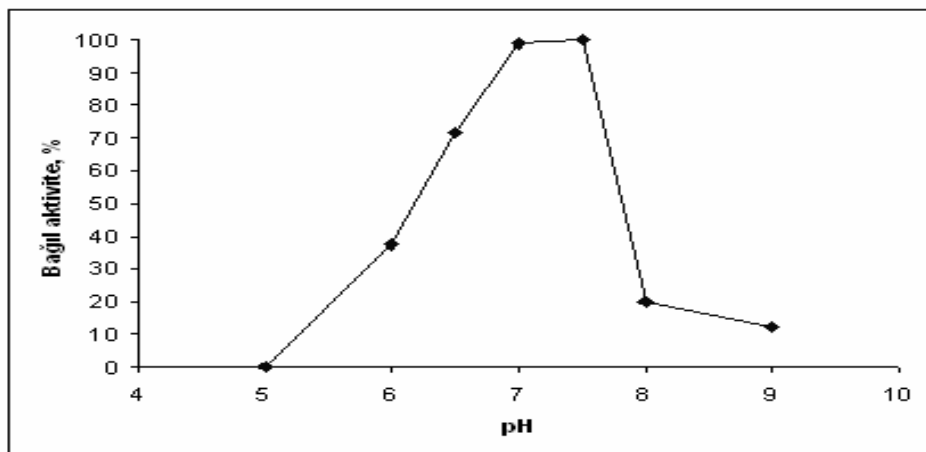
Şekil 12 a-f’de, iki bağımsız değişken sabitken diğer bağımsız değişkenlerin spesifik enzim aktivitesi üzerine etkilerini gösteren izohips eğrileri verilmiştir. Şekillerde spesifik enzim aktivitesinin, havalandırma hızı 2, karıştırma hızı 180 rpm, başlangıç şeker konsantrasyonu 30 g/l ve fermentasyon süresi 22 saat olduğu koşullarda maksimum değerde olacağı görülmektedir.

Bu model yardımıyla proses için belirlenen optimum koşullar, havalandırma hızı 2,21 vvm, karıştırma hızı 173,3 rpm, başlangıç substrat konsantrasyonu 33,84 g/l ve fermentasyon süresi 23,96 saattir. Bu optimum koşullarda, maksimum olarak 4566,5 U g<sup>-1</sup> spesifik enzim aktivitesi bulunmuştur. Sonuç olarak CYY’nin,  $\beta$ -galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonunda ve proses parametreleri arasındaki interaksiyon etkilerinin belirlenmesinde başarı ile kullanılabilceği belirlenmiştir.

#### 4.2.7. *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279’dan Elde Edilen $\beta$ -Galaktosidaz’ın Karakterizasyonu

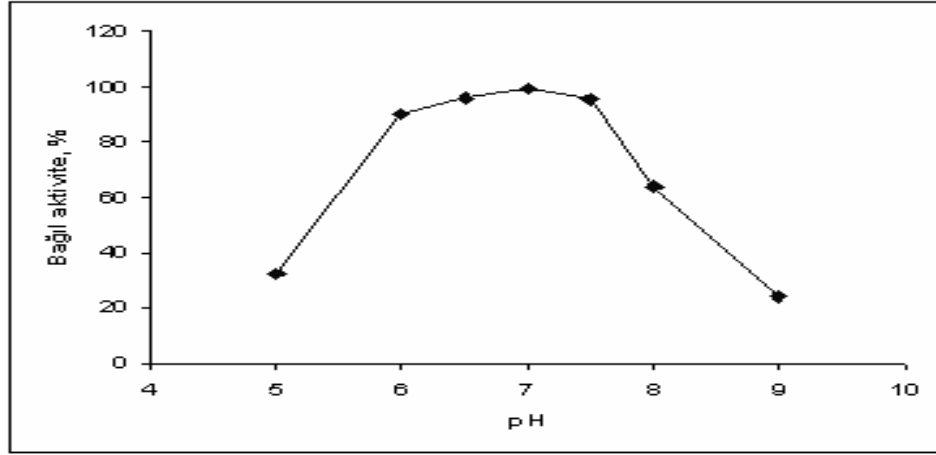
##### 4.2.7.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz’ın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi

*Kluyveromyces lactis*’den elde edilen ham  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesine pH’ın etkisi araştırılmış ve Şekil 13’de gösterilmiştir. Enzim için optimum pH değeri pH 7,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 13. Ham maya  $\beta$ -galaktosidazının aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi

37 °C'deki pH stabilite grafiği Şekil 14'da gösterilmiştir. Enzimin esas olarak 6,0-7,5 pH aralığı üzerinde % 90-99 oranında kararlı olduğu bulunmuştur.

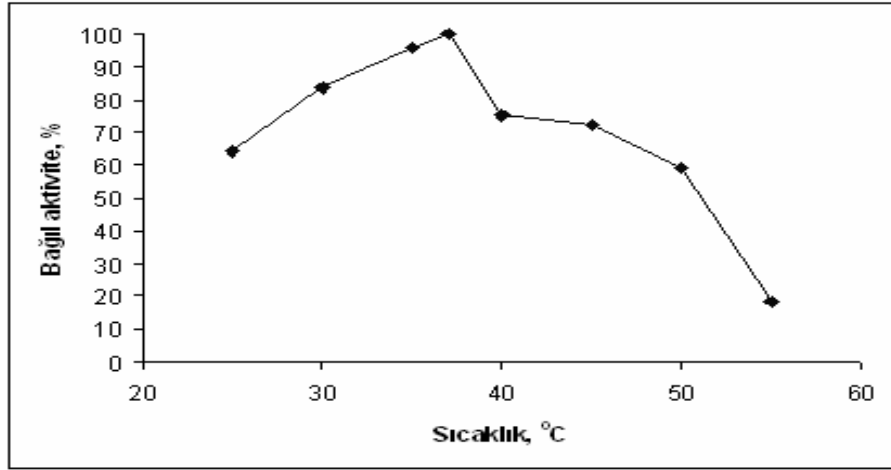


**Şekil 14.** Ham maya  $\beta$ -galaktosidazının stabilitesi üzerine pH değerinin etkisi

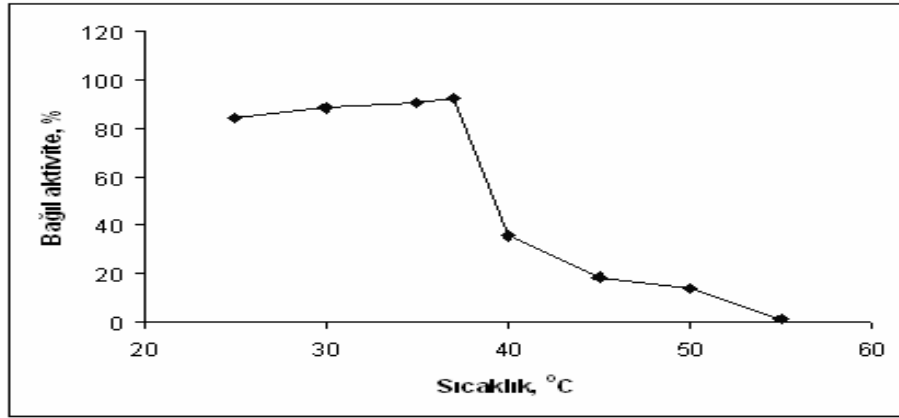
#### 4.2.7.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi zerine Etkisi

*Kluyveromyces lactis*'den elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz'ın optimum sıcaklığının 37 °C olduğu bulunmuştur. Bu enzim 30-37 °C arasında aktivitesinin % 84-100'n korumuŐtur (Şekil 15).

Isıl stabilite; bir enzimin, substratların yokluğunda ısısız yapı bozulmalarına gösterdiği direnç kabiliyeti olarak tanımlanır. *Kluyveromyces lactis*'den elde edilen ham  $\beta$ -galaktozidaz'ın ısıl stabilitesi, 25 °C'den 55 °C'e kadar değişen çeşitli sıcaklıklarda enzimin 30 dakika boyunca inkübe edilmesinden sonra kalan aktivitenin ölçülmesi ile belirlenmiştir. Şekil 16'da gösterildiği gibi,  $\beta$ -galaktozidaz enzimi 25-37 °C arasındaki sıcaklıklarda stabildir. Bununla birlikte, 40 °C'de enzimlerin inkübasyonundan sonra,  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi % 36'ya dŐm ve ham ekstrat 55 °C'de aktivitesini kaybetmiştir (Şekil 16).



Şekil 15. Ham maya  $\beta$ -galaktosidazının aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi



Şekil 16. Ham maya  $\beta$ -galaktosidazının stabilitesi üzerine sıcaklık etkisi

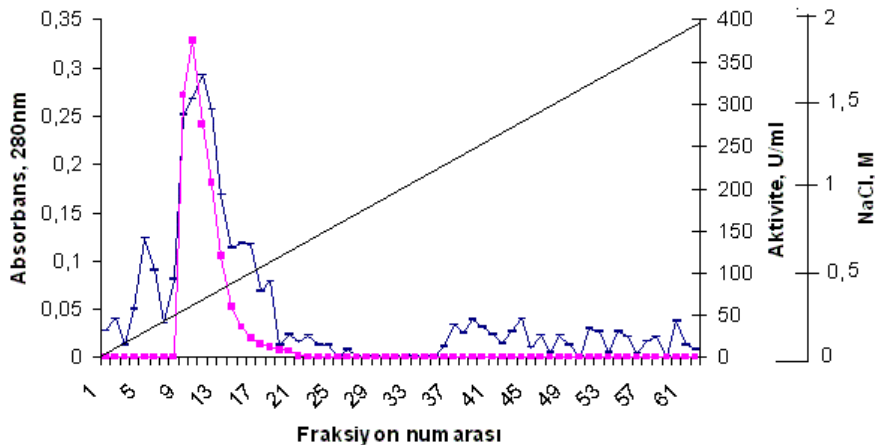
#### 4.2.7.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması

*Kluyveromyces lactis*'den üretilen  $\beta$ -galaktosidaz enziminin pH 6,5 ve 37 °C'de o-nitrofenil- $\beta$ -D galaktopiranozid'i (ONPG) hidroliz etmesi için gerekli kinetik parametreleri, Lineweaver Burk grafiği kullanılarak bulunmuştur. Hidroliz olan ONPG için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri hesaplanmıştır.  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla 1,2 mM ve 1000  $\mu$ mol/dk mg protein olarak hesaplanmıştır.

#### 4.2.8. *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279'den Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

Maya hücreleri cam boncuk ile parçalanarak (Bkz. 3.2.3.1.1) ham enzim ekstraktı elde edilmiştir. Mayadan üretilen  $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasının ilk basamağında, ham enzim ekstraktı % 60 amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılmış ve pelet, tampon çözelti (fosfat tamponu, pH 7,0) ile çözündürülmüştür. Elde edilen enzim örneğinde protein ve aktivite tayinleri yapılmış ve protein miktarı 159,26  $\mu$ g/ml, enzim aktivitesi 9011,88 U/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen enzim örneği daha sonra fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir.

Elde edilen dializat Sephadex DEAE-A25 kolona beslenerek adsorbe edilmiştir. Adsorbe edilen enzim kesikli olarak NaCl (0-2 M) içeren fosfat tamponu (pH 7,0) ile yıkanmış ve 5'er ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda protein içeriği 280 nm'deki absorbansla takip edilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Şekil 17'de fraksiyonlardaki protein ve enzim aktivitesi grafiği verilmiştir. 9 ile 20 arasındaki fraksiyonlarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu nedenle bu fraksiyonlar toplanmış, birleştirilmiş ve protein ve aktivite tayinleri yapılmıştır ve yine aynı tamponla diyaliz edilmiştir.



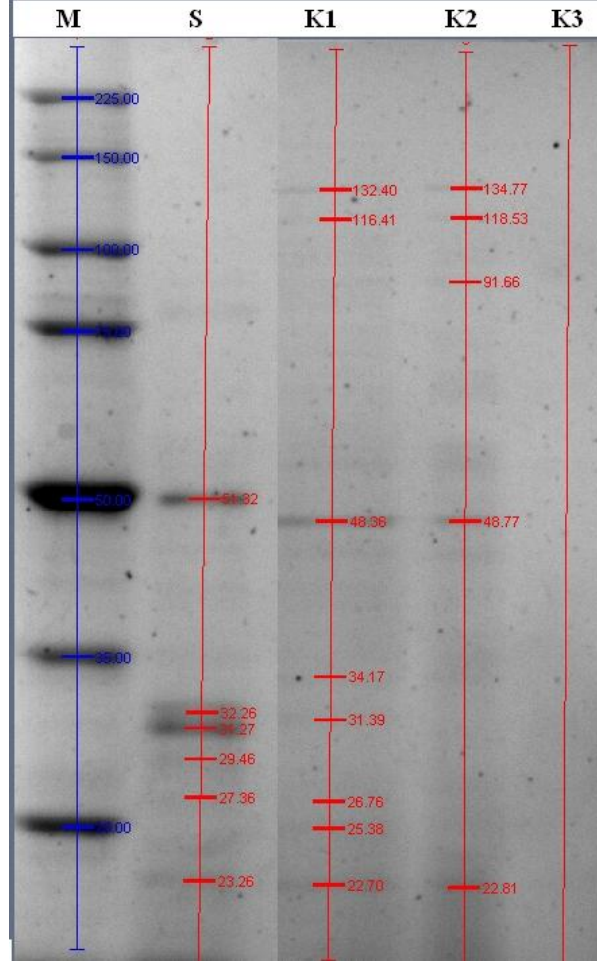
**Şekil 17.** Maya enziminin Sephadex DEAE-A25 kolonundan geçişindeki fraksiyonların protein ve enzim aktivitesi grafiği (—: Protein miktarı,  $A_{280 \text{ nm}}$ , ■: Enzim aktivitesi)



Laktaz enziminin saflaştırma basamakları ve verimlilikleri Tablo 28’de görölmektedir.  $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının elektroforezle SDS-PAGE profilleri göröntölenmiş olup Şekil 18’de gösterilmektedir.

**Tablo 28.** Mayadan elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırma basamakları ve sonuçları

Saflaştırma basamağı	Aktivite, U/ml	Protein, $\mu$ g/ml	Spesifik aktivite, U/ $\mu$ g protein	Saflaştırma	Verim, %
Ham enzim	13002,85	145,55	89,34	1	100
Ammonyum sülfat, % 60 ile presipitasyon	9011,88	159,26	56,58	0,633	69,31
Diyaliz	8432,54	102,41	82,34	0,922	64,85
Sephadex DEAE-A25 Anyon Kromatografisi	1699,38	11,85	143,41	1,605	13,07
Diyaliz	1544,89	7,59	203,54	2,278	11,88



**Şekil 18.** Mayadan elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri: M, marker proteini; S, standart  $\beta$ -galaktosidaz (*Saccharomyces fragilis*); K1, ham ekstrakt; K2, amonyum sülfat çöktürmesi; K3, Sephadex DEAE A25 kolon

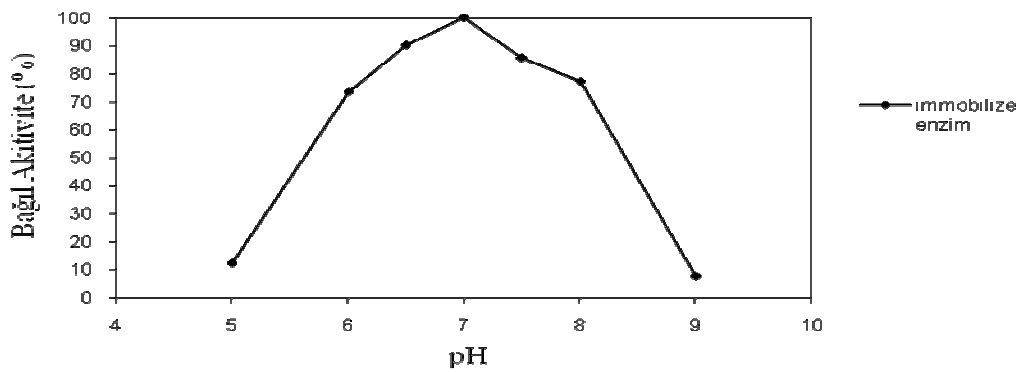
Şekil 18'deki laktaz enziminin saflaştırma basamakları sonrası SDS-PAGE profiline bakıldığında mayadan üretilen ham laktaz enziminin standart enzime nazaran yüksek molekül ağırlıklı safsızlıklar içerdiği, bu safsızlıkların amonyum sülfat ile presipitasyon basamağında giderilemediği ve Tablo 28'den de görüleceği üzere presipitasyon esnasında protein miktarında kayıp olmamasına rağmen, enzim aktivitesinde yaklaşık % 30 gibi bir kayıp olduğu için bu sonuca varılmıştır. Anyon kromatografisinde % 13 verimlilikle yaklaşık 150-200 U/ $\mu$ g protein spesifik aktivitesiyle saf laktaz elde edilmesine rağmen SDS-PAGE jelinde çok düşük konsantrasyonda olduğu için görüntülenememiştir. Enzimin diğer safsızlık proteinlerinden ayrıştırıldığı kanısına Tablo 28'deki toplam protein miktarının 8-10  $\mu$ g/ml gibi düşük olması nedeniyle varılmaktadır.

Diyaliz işlemi sonucunda belirlenen miktardaki saflaştırılmış enzimin (5 ml), 1,5 g kitosan-HA bilyeleri içeren kaplara alınıp belirli koşullar altında (pH: 6,5, Süre: 4 saat, sıcaklık: 20 °C) immobilizasyon işlemine tabi tutulmuştur ve sonucunda bilyelere immobilize edilen enzimin serbest enzimle karşılaştırılması amacıyla karakterizasyon işlemi uygulanmıştır. Immobilizasyon işlemi sonucunda kompleks maddeye tutunan enzim miktarı 11,72 µg enzim/g bilye olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.9. *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279'den Elde Edilen İmmobilize $\beta$ -galaktosidaz'ın Karakterizasyonu

##### 4.2.9.1. pH Değerinin $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi

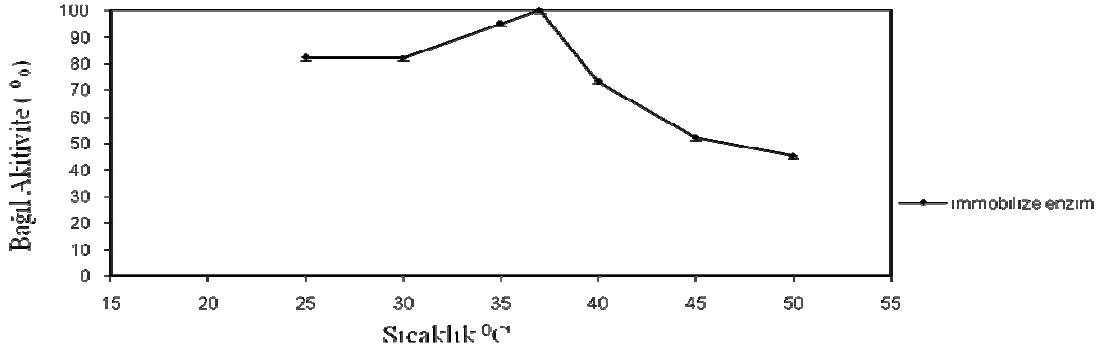
İmmobilizasyon işlemiyle enzimin optimum pH değerindeki değişim Şekil 19'dan gözlenmektedir. İmmobilize enzimin optimum pH değerinde serbest enzime nazaran 0,5 ünite kayma olduğu bulgulanmıştır. pH'daki bu farklılığın enzimin mikroçevresinde meydana gelen değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir. İmmobilizasyon sonrasında enzimin karakterizasyonunda genellikle bir değişim meydana gelmektedir, ve bu değişim de çoğunlukla beklenen bir durumdur.



Şekil 19. Ortam pH'ının immobilize maya  $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi

#### 4.2.9.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi

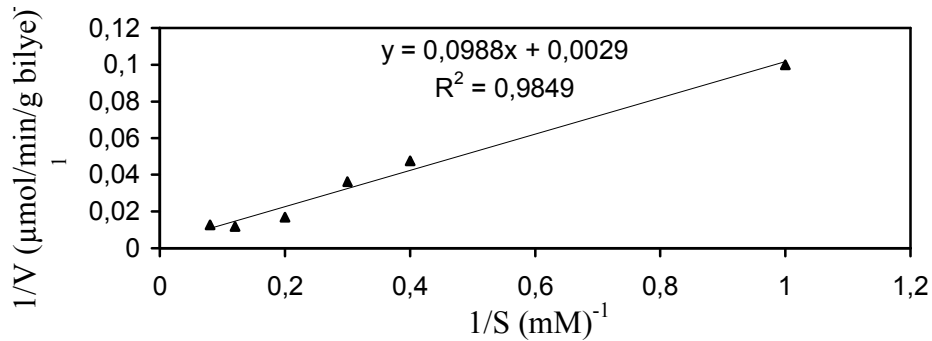
Farklı sıcaklık derecelerinde serbest enzimin karakteristiğinin değişmediği söylenebilir. İmmobilizasyon enzimin karakteristiğinde sıcaklık değişimine bağlı olarak bir farklılık bulgulanmamıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Sıcaklığın immobilize maya  $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi

#### 4.2.9.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması

*Kluyveromyces lactis*'den üretilen immobilize  $\beta$ -galaktosidaz enziminin pH 6,5 ve 37 °C'de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid'i (ONPG) hidroliz etmesi için gerekli kinetik parametreleri, Lineweaver Burk grafiği kullanılarak bulunmuştur. Hidroliz olan ONPG için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri hesaplanmıştır.  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla 34,06 mM ve 344  $\mu$ mol/dk g bilye olarak bulunmuştur.



Şekil 21. İmmobilize maya  $\beta$ -galaktosidazının substratı (ONPG) hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik

### **4.3. *Kluyveromyces lactis* Ticari $\beta$ -Galaktosidaz Enziminin Kitosan-Hidroksiapatit Kompleksine İmmobilizasyonu**

Projenin bu bölümünde maya, bakteri ve küf laktaz enzimleri için optimum immobilizasyon koşullarının belirlenebilmesi ve bu çalışmalar için ön bilgi sağlaması amacıyla standard ve bulk miktarda bulunabilen ticari *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galaktosidaz enzimi kullanılmıştır. Bu nedenle laktaz / Kitosan-HA immobilizasyon sistemine gluteraldehit konsantrasyonu, pH, sıcaklık, iyon kuvveti, katı/sıvı oranının etkileri ve immobilizasyon kinetiği ile izotermeleri incelenmiştir. Serbest ve immobilize laktaz enziminin karakteristikleri, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ile depolama koşullarındaki değişiklikler de bu bölümde verilmektedir.

#### **4.3.1. İmmobilizasyonda Gluteraldehit Konsantrasyonunun Etkisi**

Farklı gluteraldehit konsantrasyonlarının  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyonu üzerine etkisi Şekil 22’de gösterilmiştir. Gluteraldehit konsantrasyonu bağlanan enzim miktarını etkilediği gibi enzim aktivitesi üzerinde de etkilidir.

Şekil 22’den görülebileceği üzere, başlangıç gluteraldehit konsantrasyonu arttıkça immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinde de düşüş gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak artan gluteraldehit miktarı ile immobilizasyon sırasında enzimde yapısal değişikliklerin meydana gelmesi ve bu yapısal değişimle substratın erişilebilirliğinin azalarak aktivite kaybının oluşması gösterilebilir. Ek olarak, gluteraldehit oranındaki artış ile daha çok enzim molekülü bağlanmış olup, bu durum enzim-taşıyıcı arasındaki bağları olumsuz olarak etkileyerek sonuçta da parçacıkların kürecik yüzeyinden koparak ayrılmasına yol açmış olabilir. Bu çalışmada gluteraldehit konsantrasyonu % 0,1’ den % 0,3 oranına yükseltildikçe immobilize enzim aktivitesi yaklaşık % 40 oranında azalmış, ancak daha sonra bir yükselme gözlenmiştir (Şekil 23). Bu durum, enzim aktif bölgesinde meydana gelen bir değişimle açıklanabilir.

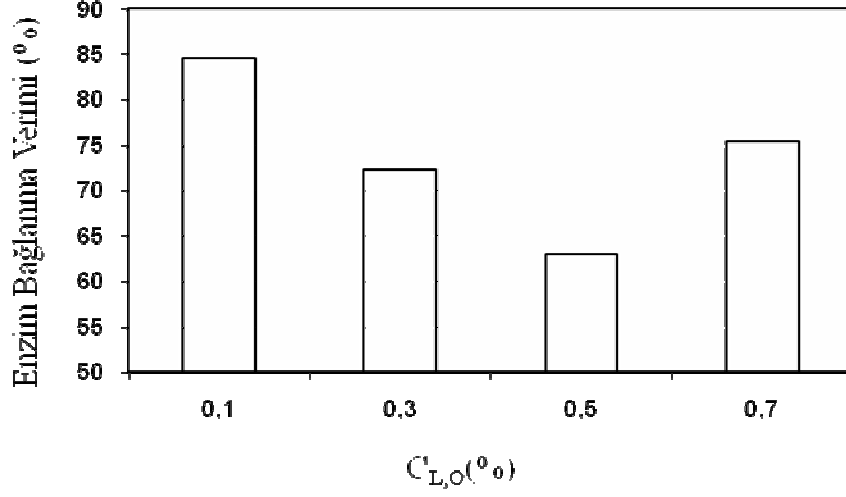
Sonuç olarak % 0,1 gluteraldehit konsantrasyonu  $\beta$ -galaktosidaz enziminin immobilizasyonu için en uygun miktar olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyonun etkinliği enzim bağlanma verimi açısından verilmiştir. Enzim bağlanma verimi YI (%) Denklem 1’ deki gibi hesaplanmıştır.

$$YI (\%) = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$

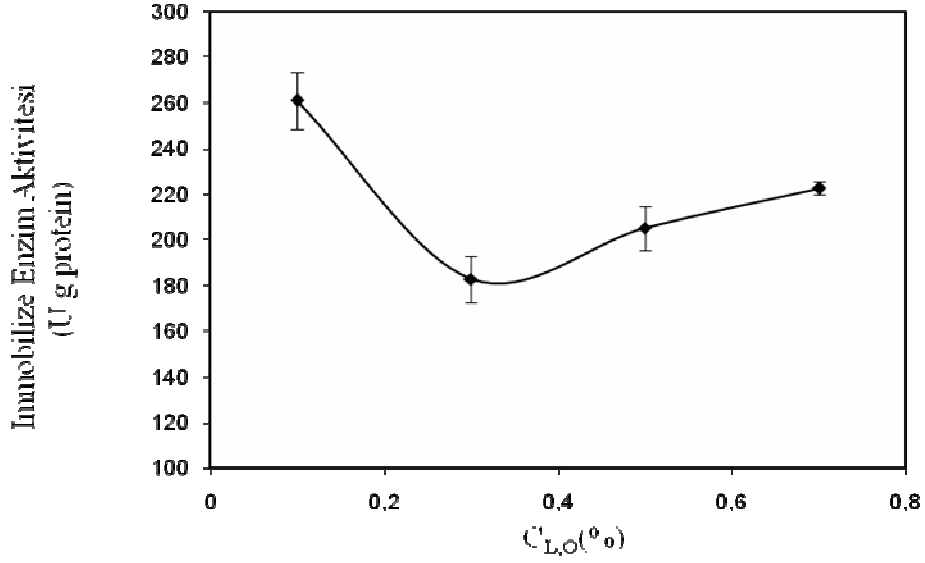
(Denklem 1)

$P_1$ : immobilize  $\beta$ -galaktosidaz miktarı

$P_0$ : başlangıç  $\beta$ -galaktosidaz miktarı



Şekil 22. Glutaraldehit konsantrasyonunun  $\beta$ -galaktosidazın immobilizasyon verimliliğine etkisi



Şekil 23. Glutaraldehit konsantrasyonunun immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi

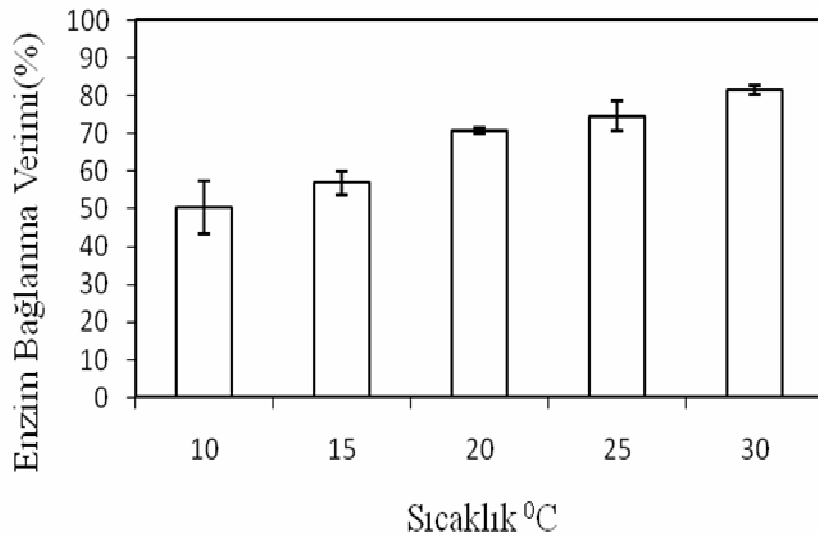
Zhang ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, % 0,8' in üzerindeki gluteraldehit konsantrasyonlarında immobilize enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Yüksek gluteraldehit konsantrasyonunda yapılmış diğer bir çalışmada ise (Synowiecki ve ark 2000), yine benzer bir şekilde aktivitede kayıp gözlenmiştir.

#### 4.3.2. İmmobilizasyonda Sıcaklığın Etkisi

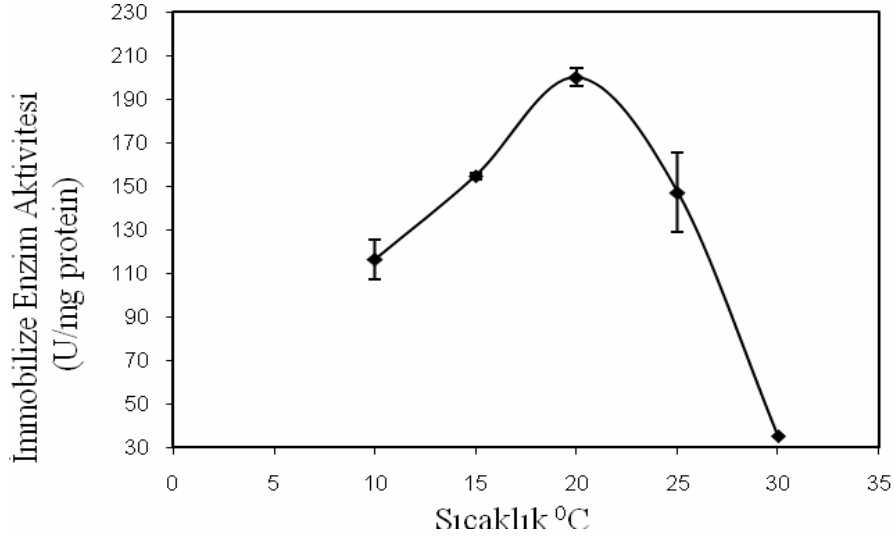
Enzim immobilizasyonunda en uygun sıcaklık derecesinin belirlenmesi, enzimin inaktivasyonuna sebebiyet vermeden en yüksek immobilizasyon kapasitesini belirleyebilmek için önemlidir. Genellikle reaksiyon sıcaklığı artırıldıkça bağlanan enzim miktarında artış kaydedilmiştir.

Bu çalışmada sıcaklığın immobilizasyon verimine etkisi araştırılmıştır. Şekil 24' de görüldüğü üzere tutuklanan enzim miktarı, sıcaklık 10 °C' den 30 °C' ye yükseltildikçe, artış göstermiştir. 10 °C de % 50 verime ulaşılmışken 30 °C de % 81' e yükselmiştir.

Ancak sıcaklığın immobilize enzim aktivitesindeki etkisine bakıldığında ise (Şekil 25), kalan aktivitenin 20 °C sıcaklık üzerindeki derecelerde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Bu durum, immobilizasyon esnasında sıcaklık yükseldikçe enzimin deaktivasyona uğramasından kaynaklanmıştır. Sonuç olarak 20 °C, immobilizasyon işlemi için en uygun sıcaklık olarak seçilmiştir.



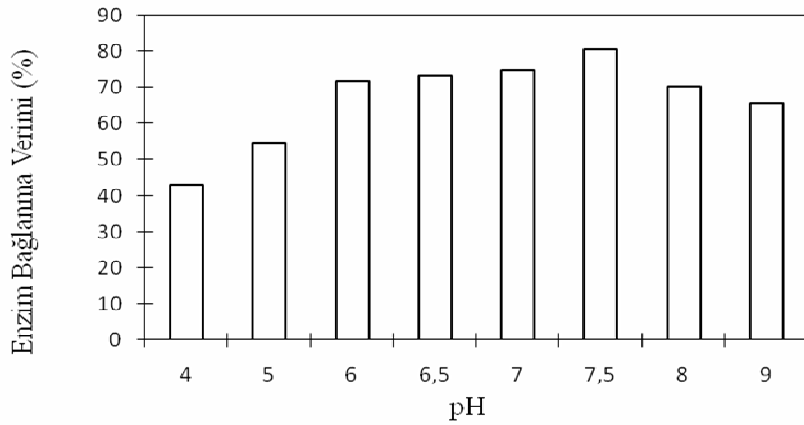
Şekil 24. Ortam sıcaklığının  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi



**Şekil 25.** Ortam sıcaklığının immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi

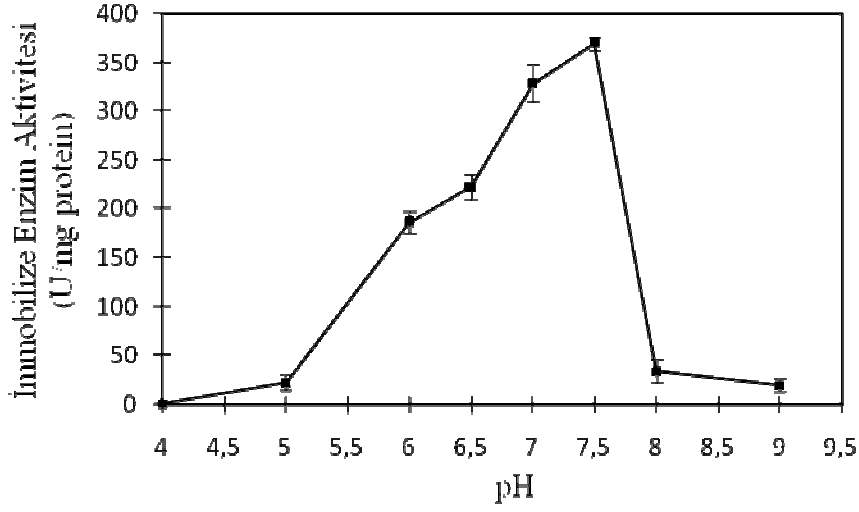
#### 4.3.3. İmmobilizasyonda Ortam pH' sının Etkisi

Bu çalışmada pH' nın etkisini belirlemek üzere pH 4-9 aralığı seçilmiştir. Şekil 26' de ortam asitliğinin verimliliğe olan etkisi görülmüştür. Şekilde görüldüğü üzere immobilizasyon sisteminin ortam asitliğinden etkilendiği sonucuna varılabilir. Optimum pH aynı zamanda optimum immobilizasyon pH' sı olarak da seçilebilir (% 81). Enzim aktivitesinin kaybı, konformasyondaki değişikliklerden meydana gelebileceği gibi izoelektrik noktasındaki aktivite düşüşünden de kaynaklanabilir (Şekil 27).



**Şekil 26.** Ortam pH' sının  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi

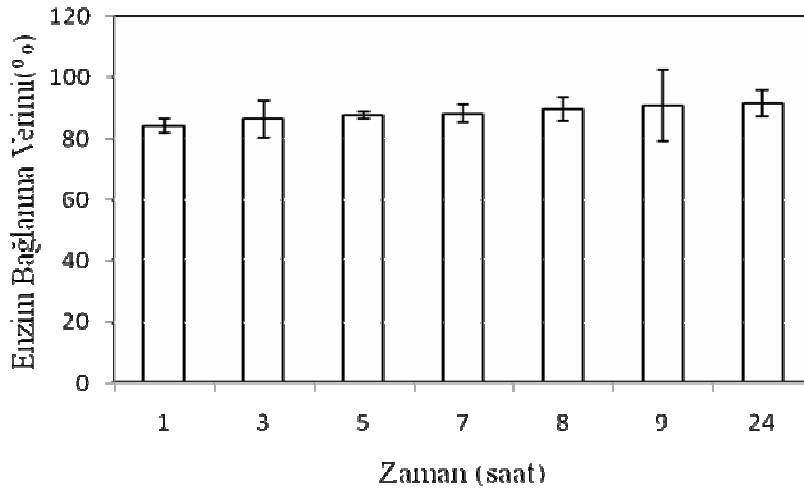




Şekil 27. Ortam pH'sının immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi

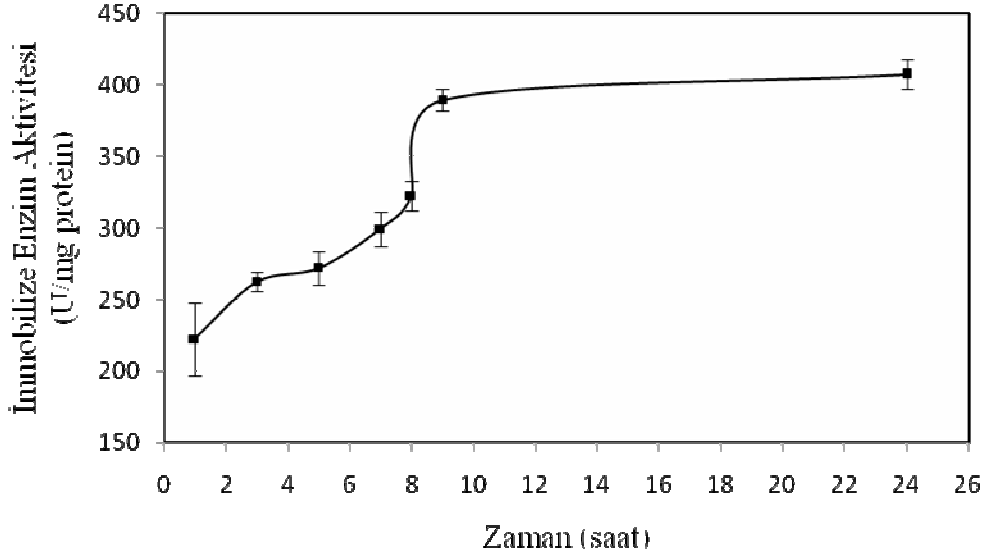
#### 4.3.4. İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi

Bu çalışmada immobilizasyon verimine immobilizasyon süresinin etkisi araştırılmıştır. İlk bir saat içerisinde enzimin büyük miktarının (% 85), dokuz saat içerisinde de çok az bir artışla da olsa enzimin tamamına yakınının tutuklama maddesine bağlandığı görülmüştür (Şekil 28).



Şekil 28.  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğinin zamanla değişimi

Şekil 29’ de immobilizasyonun enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. Enzim aktivitesinin 24 saat içerisinde düşüşü beklense de görüldüğü üzere herhangi bir aktivite kaybı gözlenmemiştir.



Şekil 29. İmmobilizasyon işleminin  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi

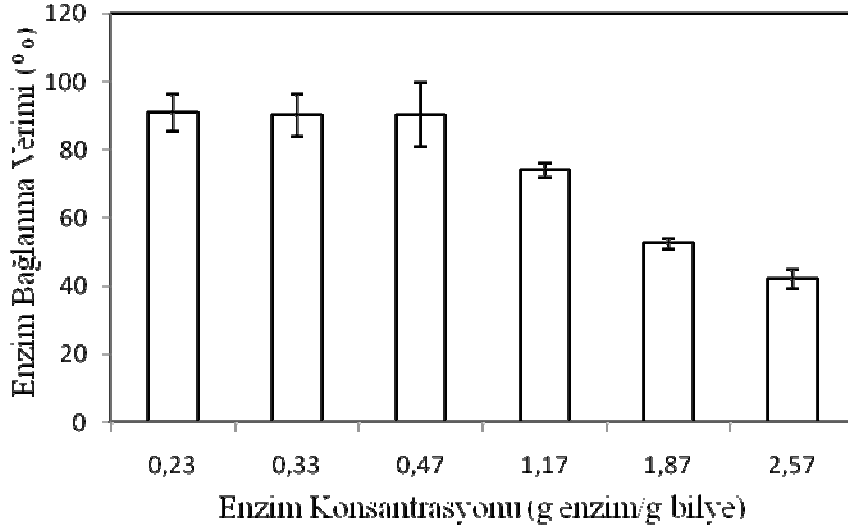
Benzer bir çalışmada (Zhang ve ark. 2008), 12 saat sonra immobilize enzim aktivitesinde bir düşüş ortaya çıkmıştır. Ancak bu çalışmanın aksine, bulgularımız immobilize enzimin aktivitesinin zamanla korunduğunu göstermiştir.

#### 4.3.5. İmmobilizasyonda Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

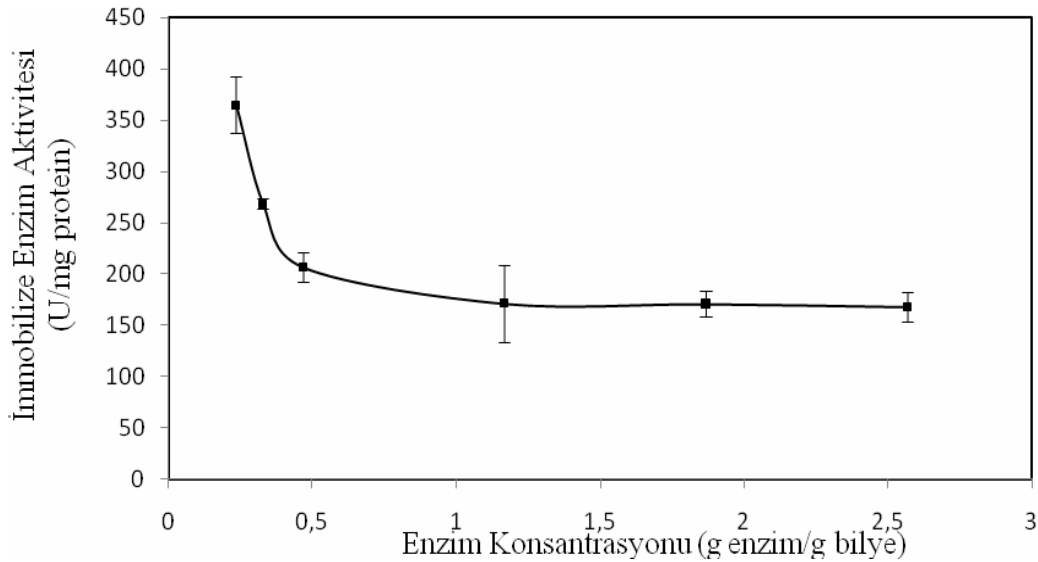
Enzim çözeltisi içerisindeki  $\beta$ -galaktosidaz miktarı  $0,23-2,56 \times 10^3$  mg enzyme/g. küre aralığında değiştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 30’ da görülmüştür. Her bir deneyde 1,5 g küreye 5 ml enzim çözeltisi kullanılmıştır.

Şekil 30’ da görüldüğü üzere enzim konsantrasyonunun artışıyla birlikte bilyeler üzerine tutunan enzim miktarı da artmıştır. Ancak verimliliğe bakıldığında ise bu orantının ters olduğu görülmüştür. Diğer bir değişle enzim konsantrasyonu ile immobilizasyon verimliliği doğru orantılı olarak değişmemiştir. Bunun sonucunda belirtilen koşullar altında en yüksek immobilizasyon kapasitesi yaklaşık 1,082 g enzim/g bilye (% 45,2 enzim immobilizasyon etkinliği) olarak bulunmuştur.

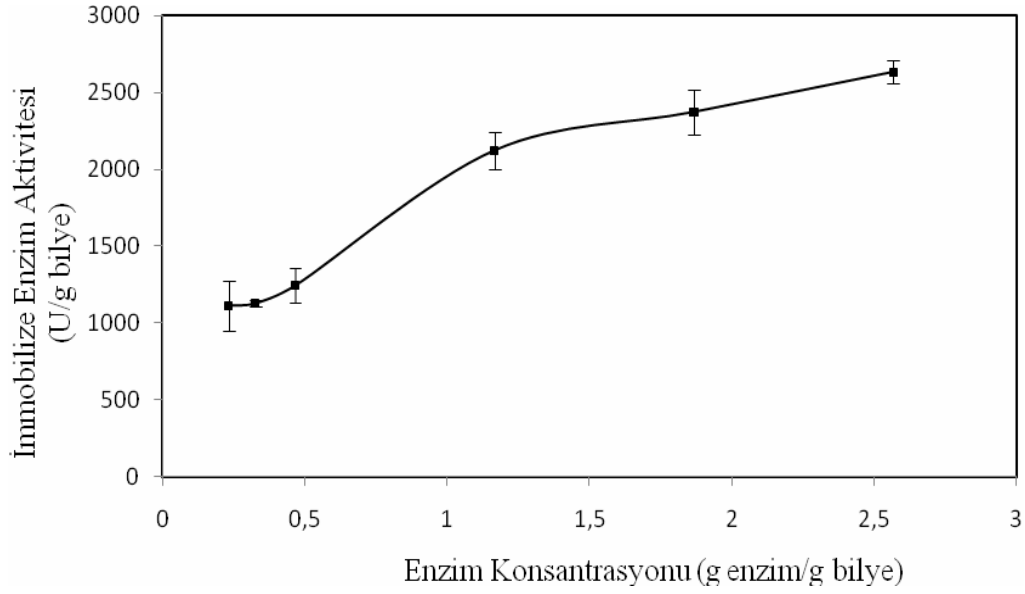
Ek olarak aktivite (U/g bilye) artan enzim konsantrasyonu ile artsa da (Şekil 32), spesifik aktivite azalma göstermiştir (Şekil 31). Maksimum spesifik aktivite 365 U/mg protein, en düşük enzim konsantrasyonunda ( $0,23 \times 10^3$  mg/g) elde edilmiştir (Şekil 31).



Şekil 30. Enzim konsantrasyonunun  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi



Şekil 31. Enzim konsantrasyonunun immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi



**Şekil 32.** Enzim konsantrasyonunun immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi

$\beta$ -galaktosidaz enziminin kitosan-hidroksiapatit boncuklarına immobilizasyonunda adsorpsiyon mekanizması ve denge durumu kesikli sistem denemeleriyle tayin edilmiştir. Immobilizasyon kapasitesi aşağıdaki denklemlerle ifade edilmiştir;

$$Q = \frac{Q_m \cdot C^*}{k_d + C^*}$$

$$\frac{1}{Q^*} = \frac{1}{Q_m} + \left(\frac{k_d}{Q_m}\right) \cdot \left(\frac{1}{C^*}\right)$$

$Q^*$ : Denge durumunda immobilize edilen laktaz enzim miktarı (mg enzim  $g^{-1}$  bilya)

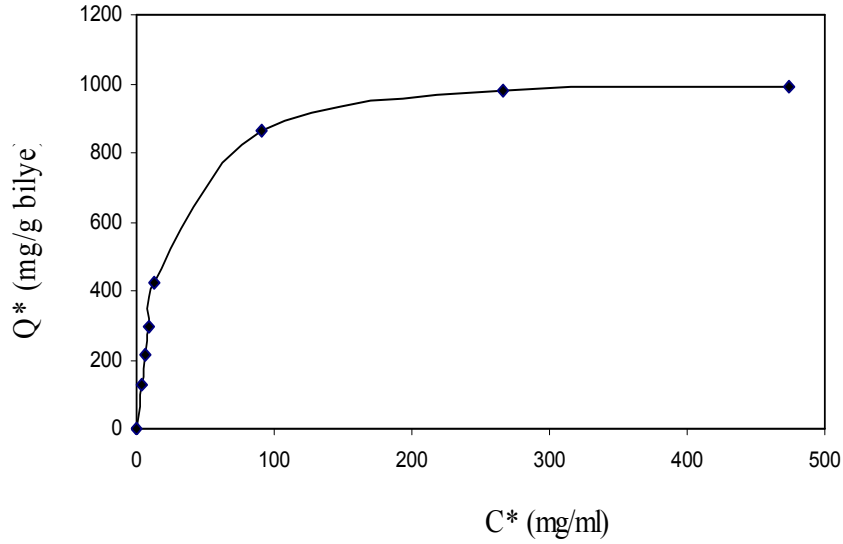
$Q_m$ : Maksimum immobilize laktaz enzim miktarı (mg enzim  $g^{-1}$  bilya)

$C_o$ : Başlangıç çözeltisindeki laktaz enzim konsantrasyonu (mg enzim  $ml^{-1}$ )

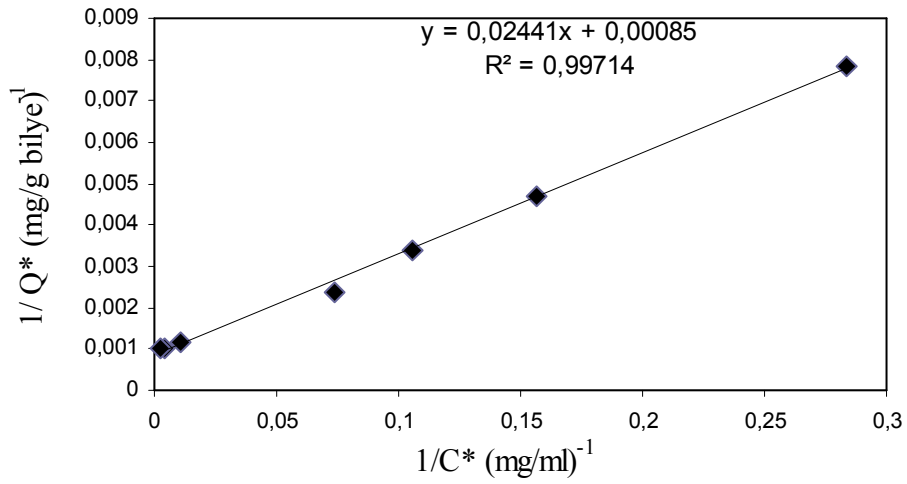
$C^*$ : Denge durumunda laktaz enzim konsantrasyonu (mg enzim  $ml^{-1}$ )

$k_d$ : Langmuir kinetik sabiti

Şekil 33 ve Şekil 34’ de Langmuir izotermi için elde edilen sabitler  $K_d = 28 \text{ mg /ml}$  enzim çözeltisi ve  $Q_m = 1176,47 \text{ mg/g}$  bilye. Langmuir sabitleri Tablo 29’ da verilmiştir.



Şekil 33. Kitosan-Hidroksiapatit /  $\beta$ -galaktosidaz enzim immobilizasyon sistemi için Langmuir izotermi



Şekil 34. Kitosan-Hidroksiapatit/ $\beta$ -galaktosidaz enzim immobilizasyon sistemi için Lineer Langmuir izotermi

**Tablo 29.** Laktaz/kitosan-hidroksiapatit kompleksi için izoterm sabitleri

İzoterm tipi	R <sup>2</sup> değeri	Q <sub>m</sub> (mg/g bilye)	K <sub>d</sub> (mg/g bilye)
Langmuir parametreleri	0,997	1176,47	28,72

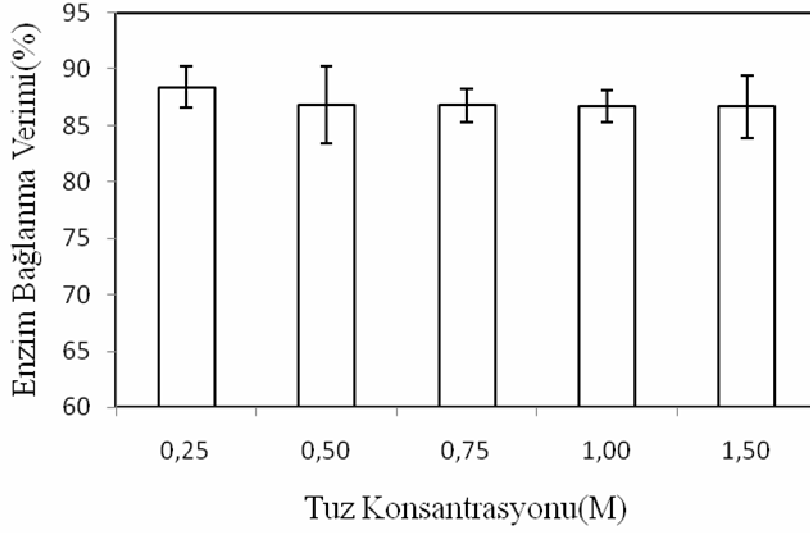
Yukarıdaki Tablo 29’da ve grafiklerden görüleceği üzere laktaz enzimi Kitosan/HA bilyeleri üzerine Langmuir denklemi ile çok iyi ifade edilebilecek şekilde adsorbe edilmiştir.

#### 4.3.6. İmmobilizasyonda Tuz (NaCl) konsantrasyonunun Etkisi

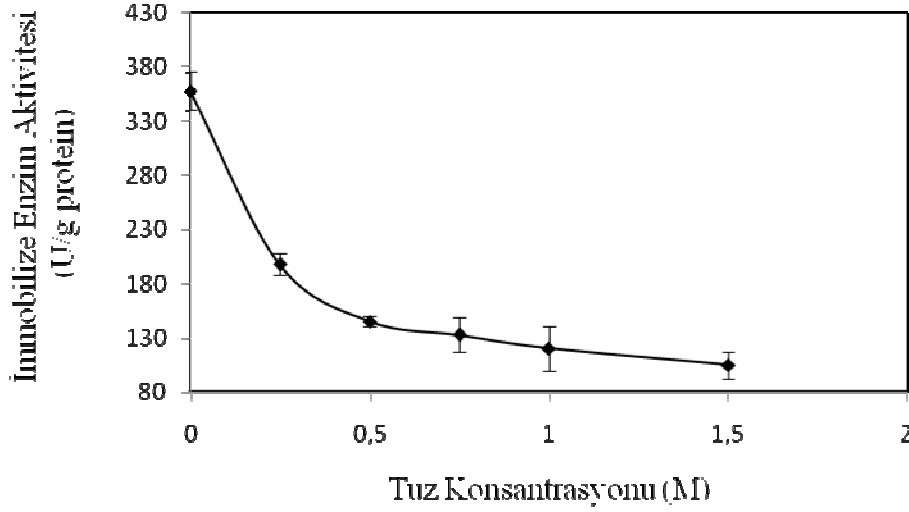
Şekil 35 ve 36’ da, iyonik kuvvetin immobilizasyon verimliliğine ve immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi gösterilmiştir. İyonik kuvvet artırıldığında immobilizasyon verimliliğinde düşüş gözlenmiştir. Böylece immobilizasyon verimliliği artan iyonik kuvvet ile ters bir etki içerisinde. Bunun iki ana sebebinin olduğu düşünülmüştür. İlk olarak iyonik kuvvetin artmasıyla tutuklama maddesinin yüzeyindeki yüklü gruplar arasında rekabet başlamıştır. Diğeri ise absorbent ve protein yüzeyindeki su artan iyonik konsantrasyonla azalmıştır. Azalan su miktarı da protein yapısındaki stabiliteyi azaltmakta ve hidrofobik grupların ortaya çıkması sonucunda da kitosan gibi hidrofilik tutuklanma maddesindeki bağlanma verimliliğini azaltmıştır (Chen ve ark. 2003).

Yapılan bir çalışmada (Pessela ve ark. 2006), en yüksek  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi iyonik kuvvet düşük olduğunda elde edilmiştir. Bu da enzim immobilizasyonunun tuz konsantrasyonu ile değiştiğini göstermiştir.

İyonik kuvvetin enzim aktivitesine olan etkisini incelemek amacıyla belirlenmiş tuz konsantrasyonlarında immobilize edilen enzimler aktivite tayinine tabi tutulmuştur. Sonuçlar Şekil 36’ de gösterilmiştir.



Şekil 35. Tuz konsantrasyonunun  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi

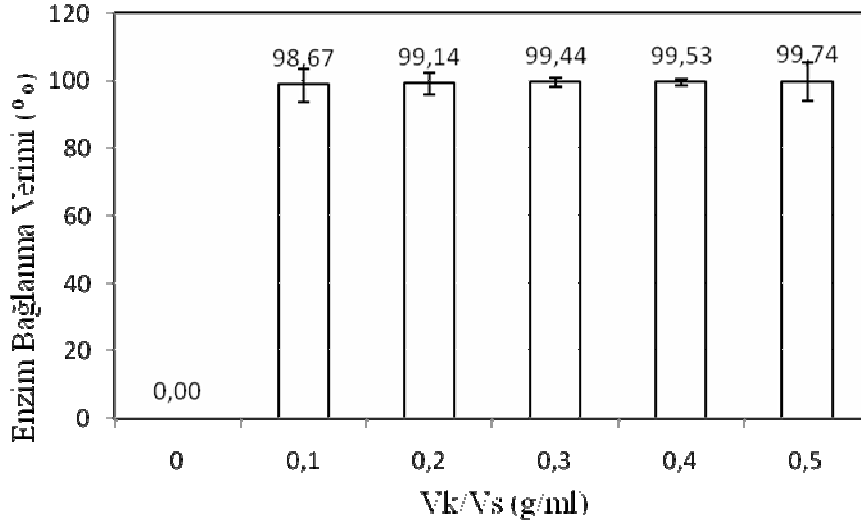


Şekil 36. Tuz konsantrasyonunun immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi

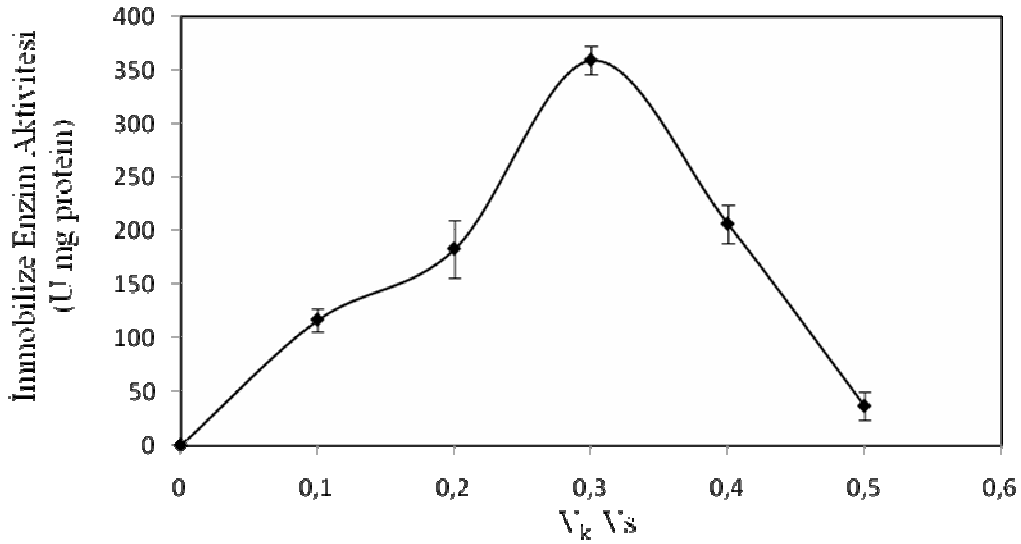
#### 4.3.7. İmmobilizasyonda Katı-Sıvı Oranının ( $V_k/V_s$ ) Etkisi

Katı ( $V_k$  = küre miktarı) / sıvı ( $V_s$  = enzim çözeltisi hacmi) oranının immobilizasyon verimine etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Şekil 37' de immobilizasyon yüzdesinin katı-sıvı oranı  $0,1 \text{ g/cm}^3$  iken yaklaşık % 98 olduğu görülmektedir. Ancak immobilize enzim aktivitesinde de giderek bir düşüş kaydedilmiştir. Şekil 38' de görüleceği gibi katı/sıvı oranı  $0,3 \text{ g/cm}^3$  'den yüksek değerlerde enzimin spesifik aktivitesinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu

durum, enzim çözeltisi oranı arttıkça immobilizasyon ortamındaki enzim konsantrasyonunun da yükselmesi nedeniyle daha fazla miktardaki enzimin immobilize olması ile açıklanabilir. Bu artışla enzim molekülleri birbirlerine çok yakın tutunmuş, bu da substrat erişebilirliğini azaltmış olabilir.

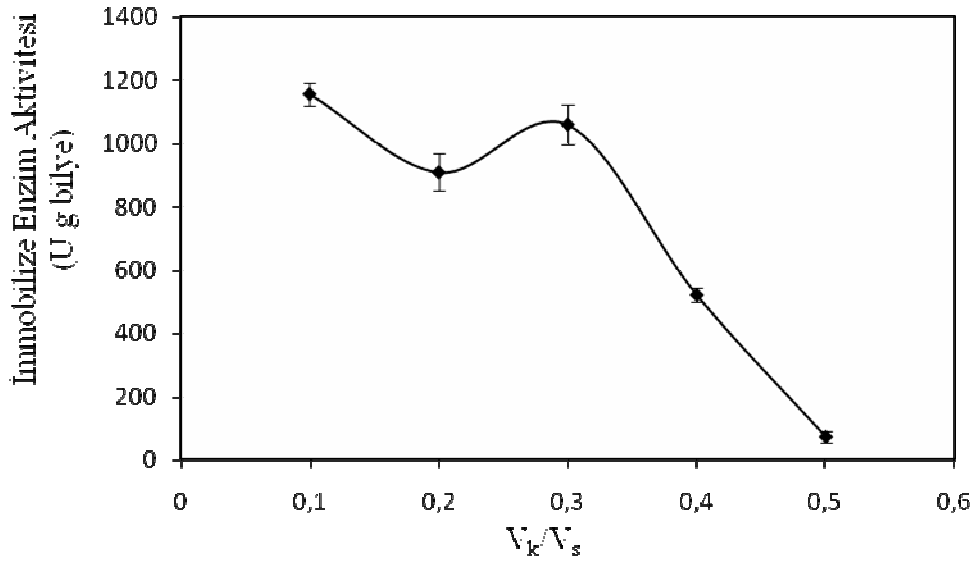


Şekil 37. Katı-Sıvı Oranının ( $V_k/V_s$ )  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon verimliliğine etkisi



Şekil 38. Katı-Sıvı oranının immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi





Şekil 39. Katı-Sıvı oranının immobilize  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi.

#### 4.3.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

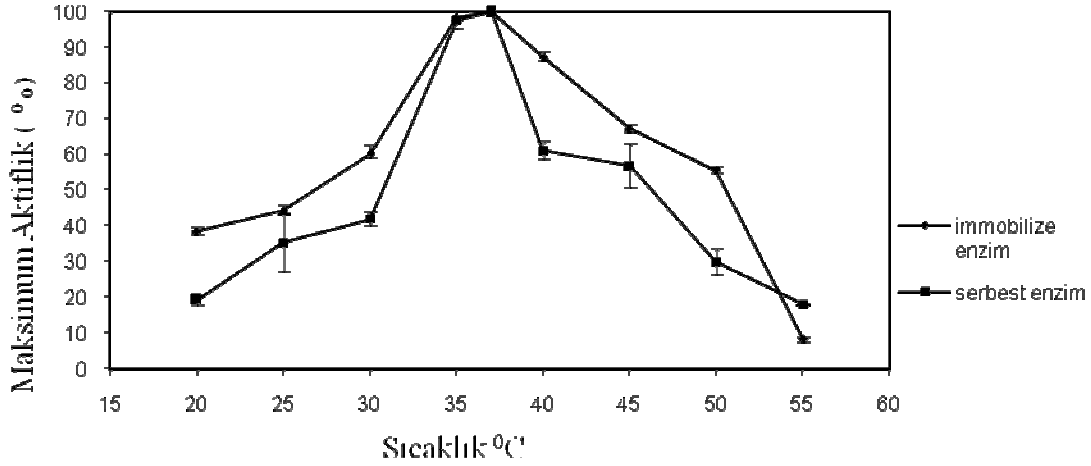
##### 4.3.8.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktifliğine ve Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi Şekil 40' da gösterilmiştir. Düşük sıcaklıklarda serbest ve immobilize laktaz enzim aktivitesi sıcaklık arttıkça artmıştır. Ancak yüksek sıcaklık değerlerine gelindiğinde ise aktivite değerlerinde keskin bir düşüş görülmüştür.  $\beta$ -galaktosidaz (*Kluyveromyces lactis*) optimum sıcaklık değeri her iki enzim preparatı için 37 °C' dir (Şekil 64). Bu sıcaklık değeri Cavaille ve Combes'un 1995 yılında gerçekleştirmiş olduğu çalışmasıyla uyumluluk göstermiştir. Aynı şekilde yapılan çalışmada  $\beta$ -galaktosidaz (*Kluyveromyces lactis*) enziminin optimum sıcaklık değeri 37 °C olarak bulunmuştur.

İmmobilizasyon işlemi sıcaklık değerinde bir değişimine yol açmamıştır. Ancak immobilize enzimin daha geniş bir sıcaklık profili gösterdiği Şekil 40'de görülmüştür. Böylelikle immobilizasyon işleminin enzimi sıcaklık değişimlerine karşı meydana gelebilecek aktivite kaybına karşı koruduğu sonucuna varılabilir.

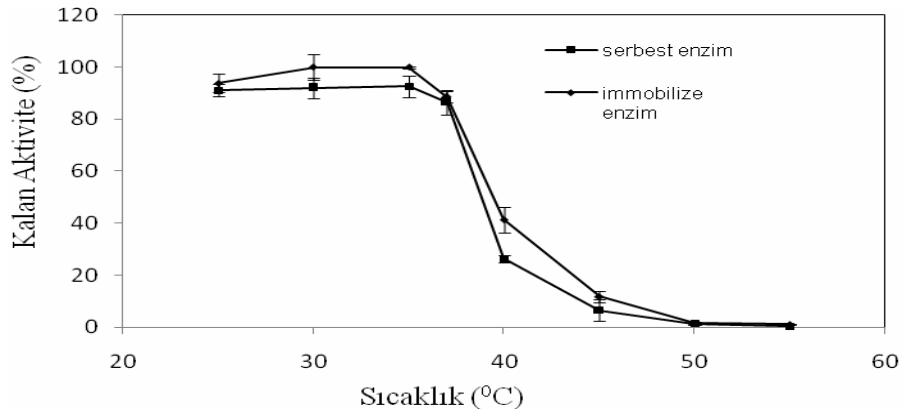
Roy ve Gupta (2003) tarafından gerçekleştirilen benzeri bir çalışmada, immobilize enzimin optimum sıcaklık değerinde bir değişim meydana gelmemiştir. Zhou ve Chen (2001) tarafından gerçekleştirilmiş olan diğer bir çalışmada ise, sıcaklığın grafit yüzeyine immobilize edilen  $\beta$ -galaktosidaz üzerine etkisi araştırılmıştır ve optimum sıcaklığın sonuçta arttığı

gözlenmiştir. Bu tip bir sonuç difüzyon kısıtlamalarıyla açıklanabilir. Sıcaklık artışı enzimin substrata ulaşmasını ve etkileşimleri kolaylaştırmış ve böylece daha önceki duruma nazaran daha yüksek sıcaklıkta en yüksek aktiviteye ulaşılmıştır.



**Şekil 40.** Sıcaklığın serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine etkisi

Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı enzim preparatlarını 30 dakika boyunca 20-55 °C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilmesi ve ardından kalan aktivite değerlerinin ölçülmesiyle belirlenir. Şekil 41’de görüldüğü üzere immobilize enzim 25-37 °C arası % 91-% 86 kalan aktivite değerleriyle sabittir.



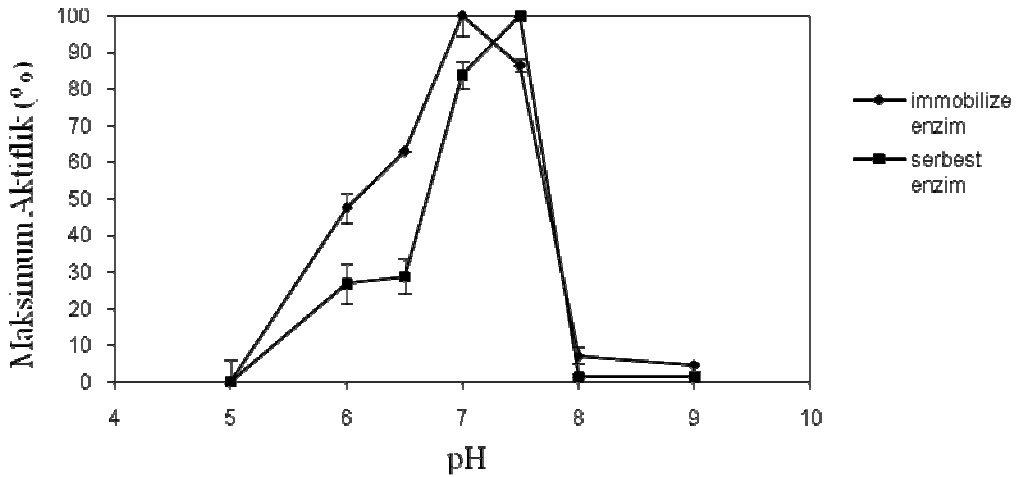
**Şekil 41.** Sıcaklığın serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktosidazın stabilitesine etkisi

#### 4.3.8.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Aktifliğine ve Stabilitesine pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize laktaz aktivitesine pH'nın etkisi ile pH optimumunu Şekil 42' de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi serbest ve immobilize enzimin pH'sı sırasıyla 7,5 ve 7,0' dir. Enzimin pH stabilitesi pH 5,0 civarında çok düşüktür. Bunun sebebi izo-elektrik noktasından ( $pI = 5,42$ ) kaynaklandığı düşünülmektedir.

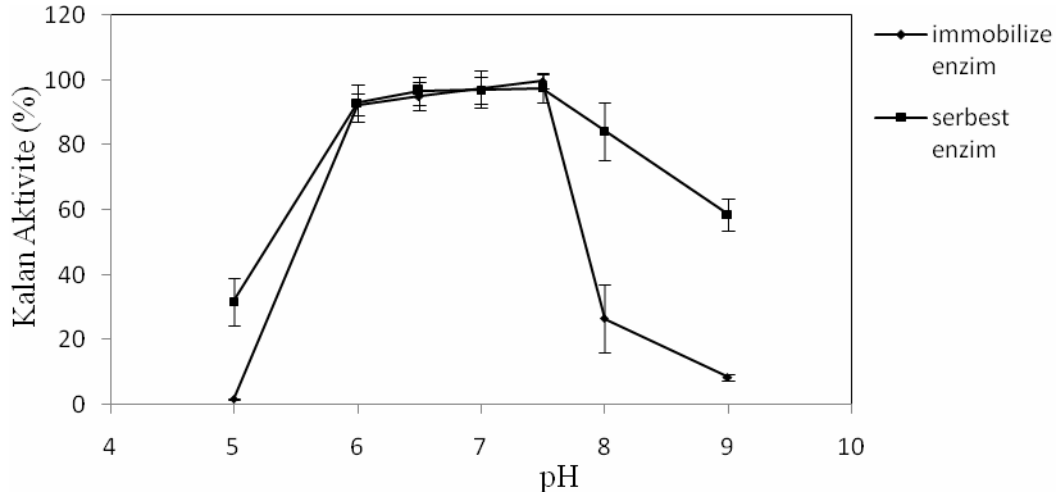
Şekil 42'da görüldüğü üzere immobilizasyon işlemiyle enzimin optimum pH değerinde değişim gerçekleşmiştir. Optimum pH değerinde serbest enzime nazaran 0,5 ünite nötral bölgeye doğru bir kayma olduğu bulgulanmıştır. İmmobilizasyon sonrasında pH değerindeki kayma, genellikle beklenen bir durumdur. Çünkü immobilizasyonda kullanılan taşıyıcı yüklü olabilir ve enzimatik reaksiyon sonucu asidik ya da bazik karakterli bir ürün oluşabilir.

Sonuçlar daha önce yapılan bazı çalışmalarla benzerlik göstermiştir. 2007 yılında yapılan bir araştırmada (Goddard ve ark. 2007) immobilize enzim optimum pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur. Ek olarak diğer bir çalışmada ise (Bayramoğlu ve ark. 2006) *E. coli*  $\beta$ -galaktosidaz enzimi manyetik poly (GMA–MMA) kürelerine immobilize edilmiş ve immobilize  $\beta$ -galaktosidaz'ın optimum pH değeri pH 7,0 değerinden pH 7,5 değerine kaymıştır.



Şekil 42. Ortam pH'ının serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine etkisi

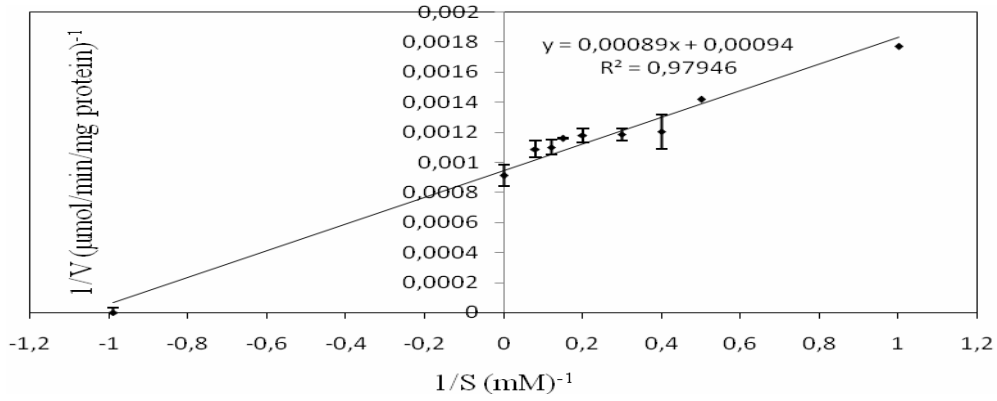
Yukarıdaki sonuçlara ek olarak, serbest enzimin pH' sının immobilize enzimininkine göre daha stabil olduğu bulgulanmıştır (Şekil 43). pH' daki bu değişim enzimin mikroçevresinde meydana gelen değişimden kaynaklandığı düşünülmüştür.



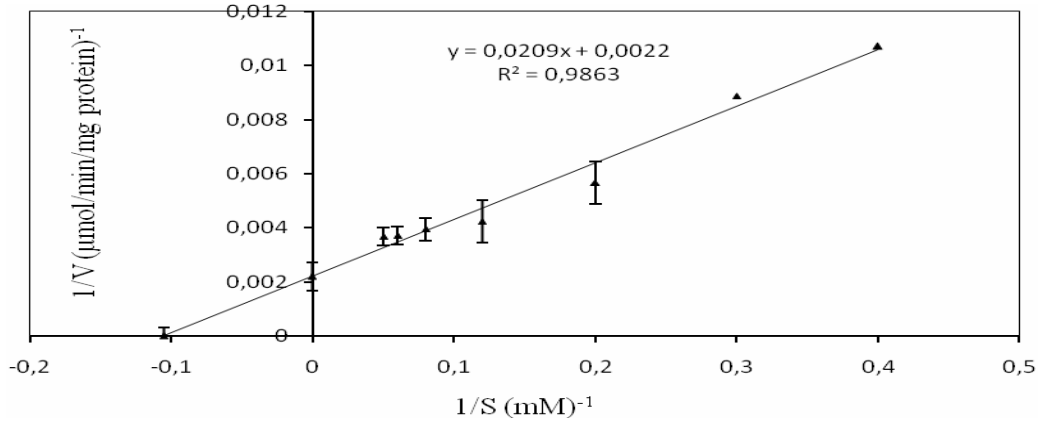
Şekil 43. Ortam pH' sının serbest ve immobilize  $\beta$ -galaktosidazın stabilitesine etkisi

#### 4.3.8.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Doygunluk substrat konsantrasyonunu  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini belirleyebilmek için belirli substrat konsantrasyon aralıkları kullanılarak serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri standart koşullarda belirlenmiştir. Değerler Lineweaver-Burk diyagramı en küçük kareler yöntemine göre çizilerek Şekil 44 ve Şekil 45' de verilmiştir. Michaelis-Menten sabitleri  $K_m$  ve  $V_m$  değeri sırasıyla serbest enzim için 1,011 mM ve 1098,9  $\mu\text{mol ONP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein, ve immobilize enzim için ise 9,5 mM ve 454,5  $\mu\text{mol ONP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein olarak belirlenmiştir.  $K_m$  değerindeki bu artışın sebebi uygulanan immobilizasyon yönteminde enzimin yapısal bir değişikliğe uğramasının doğal bir sonucu olabileceği ya da substratın immobilize enzim aktif merkezine yaklaşmasının zor olduğu şeklinde açıklanabilir.



**Şekil 44.** Serbest  $\beta$ -galaktosidaz enziminin substrat ONPG hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik



**Şekil 45.** İmmobilize  $\beta$ -galaktosidazın substratı (ONPG) hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik

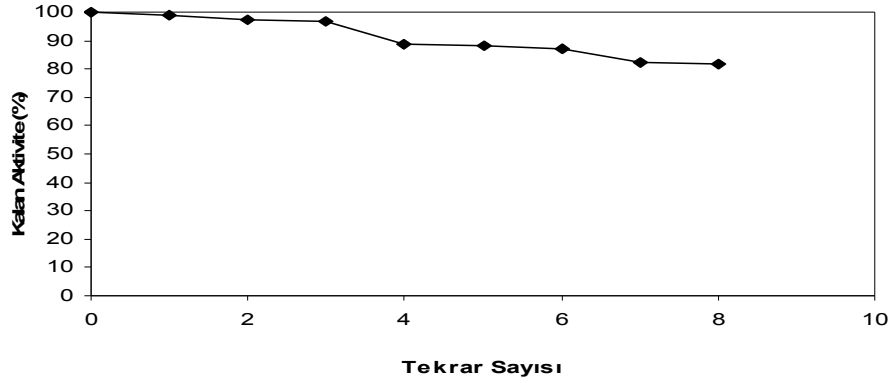
$\beta$ -galaktosidaz'ın kitosana immobilizasyonu konulu bir çalışmada (El-Masry, ve ark., 2001),  $K_m$  değeri yaklaşık 4 kat artmış bulunmuştur. Poly (2-hydroxyethylmethacrylate) membrana gerçekleştirilen enzim adsorpsiyonu çalışmasında ise  $K_m$  değerinde önemli bir değişim olmadığı rapor edilmiştir (Baran ve ark. 1997).

#### 4.3.9. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanabilirliği

İmmobilize enzimlerin endüstriyel açıdan değerlerini etkileyen bir parametre de preparatların birden fazla ve uzun süre kullanılabilmeleleridir. Şekil 46' de immobilize enzimin 37 °C' de tekrar kullanılabilirlik sonuçları verilmiştir. Bir günde aynı immobilize enzim ile 8

kez ölçüm gerçekleştirilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize laktazın 8 kez kullanılması halinde bile aktivitesini % 81' ini koruduğu belirlenmiştir.

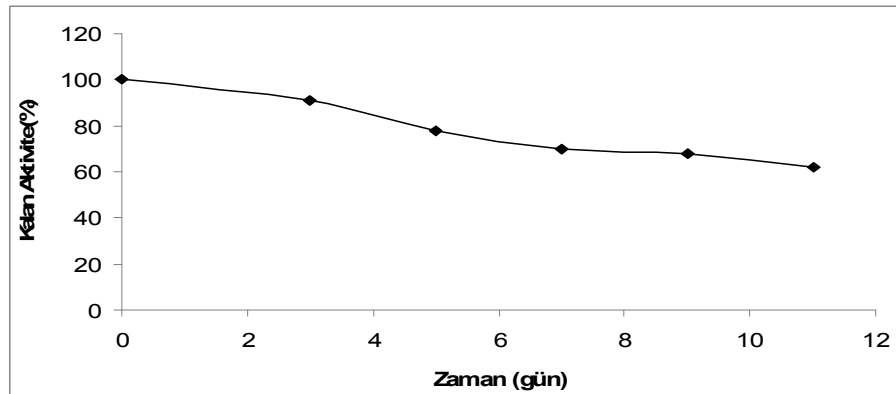
Kitosan ve Artemisia seed gum üzerine yapılan benzer bir çalışmada (Zhang ve ark. 2008), immobilize enzim aktivitesinin sekiz kez kullanım sonucunda % 53 oranında korunduğu belirtilmiştir.



Şekil 46. İmmobilize  $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine tekrar kullanımın etkisi

#### 4.3.10. İmmobilize Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

İmmobilize enzim 15 gün boyunca buzdolabı sıcaklığında depolanmış ve çeşitli zaman aralıklarında örnekler alınıp aktivite tayinine tabi tutulmuştur. Şekil 47' de görüldüğü üzere 15 gün sonunda yaklaşık aktivitenin % 82 elde edilmiştir.



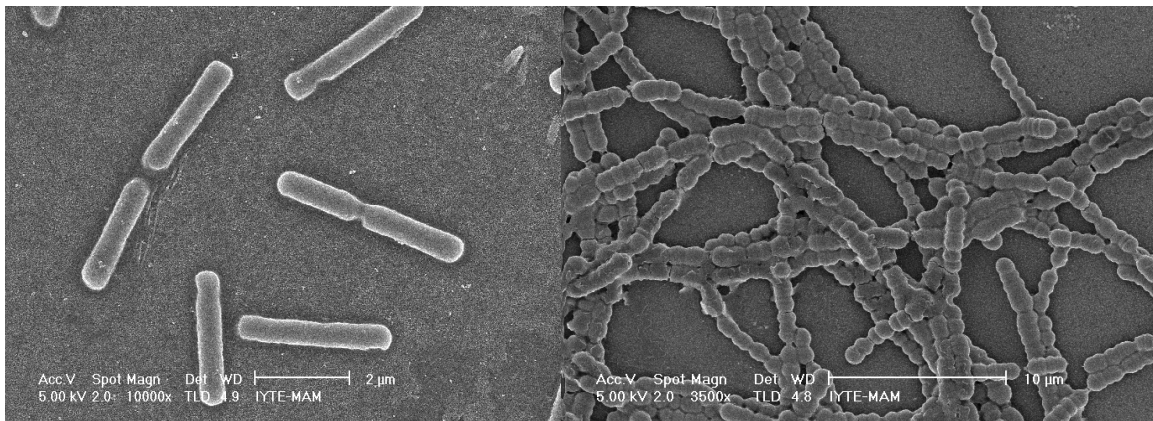
Şekil 47. İmmobilize  $\beta$ -galaktosidazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

#### 4.4. Çeşitli Süt Ürünlerinden Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Bakteri Suşlarının $\beta$ -Galaktosidaz Genlerinin Karakterizasyonu

Toroslardan toplanan geleneksel yöntemlerle üretilmiş olan yoğurt örneklerinden yapılan izolasyon sonucunda, yoğurt bakterileri olarak bilinen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactocabillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* türleri saf kültür olarak elde edilerek gliserol stoklara alınmıştır. İzolasyonun sonucunda 51 adet kok şeklinde, Gram pozitif, katalaz negatif mikroorganizmanın *S. thermophilus* olduğu ve 67 adet çubuk şeklinde, Gram pozitif, katalaz negatif mikroorganizmanın ise *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* olduğu tahmin edilmiştir.

Biyokimyasal tanımlama sonuçlarına göre 37 basil izolatları *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* olarak belirlenmiştir. Kok izolatları oldukça değişken şeker fermantasyon profilleri göstermiş ve ancak 49 tanesi tam olarak *S. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Daha sonradan uygulanan moleküler karakterizasyon, ribosomal RNA genlerinin 16S-ITS (Internal Transcribed Spacer) bölümünün amplifikasyonu ve RFLP'lerinin (Restriction Fragment Length Polymorphism) karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin kok ve basil izolatlarının morfolojik yapıları taramalı elektron mikroskobu Philips XL-305 FEG ile görüntülenmiştir. Santrifüjlendikten sonra besiyeri sıvısından ayrılarak mikroskopik analize alınan tanımlanmış suşlardan çekilen elektron mikroskop (SEM) görüntüleri aşağıdaki Şekil 48' de verilmiştir.



**Şekil 48.** Basil ve kok izolatlarının Taramalı Elektron Mikroskopi görüntüleri

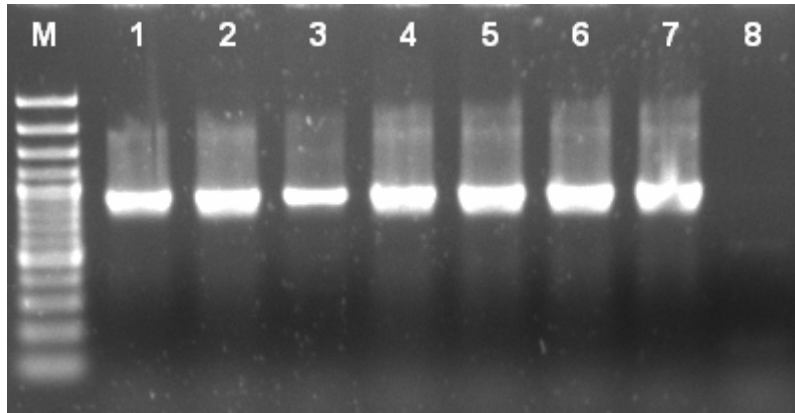
İzole edilip tanımlanan laktik asit bakterisi suşları arasında, literatürde *Streptococcus thermophilus* ile yapılmış olan çalışmalar oldukça fazla olduğu için bu çalışmada  $\beta$ -galaktosidaz geninin belirlenmesi ve karakterizasyonu ile ilgili literatürdeki eksiklikleri gidermek amacıyla, *L. bulgaricus* suşları ile çalışmalar sürdürülmüştür.

#### 4.4.1. $\beta$ -galaktosidaz Geni

##### 4.4.1.1. $\beta$ -galaktosidaz Geni PZR Sonuçları

$\beta$ -Galaktosidaz geni bgal primer çifti kullanılarak çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde koşturulmuş, ve EtBr ile boyama yapıldıktan sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir.

PZR işlemi sonucunda bütün suşlardan tahmin edilen 850bp büyüklüğünde gen ampliconları elde edilmiştir. Sonuçlar Şekil 49' da görülebilir.



**Şekil 49.** M: 100bp DNA ladder plus (Fermentas), 1: *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* DSM20081, 2: *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* Visby1000-1, 3: *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* Visby1000-2, 4: M2-16, 5: M2-14, 6: K2-3, 7: N2-5, 8: Negatif kontrol

PZR ürünleri elde edildikten sonra saflaştırılmış ve ardından dizileme işlemi yaptırılmıştır. Yapılan dizileme işlemi ClustalW programı kullanılmıştır,  $\beta$ -galaktosidaz geni üzerindeki suşlar arası baz farklılıkları aşağıdaki bölümde verilmektedir.



#### 4.4.1.2. $\beta$ -galaktosidaz Gen Dizilimi Sonuçları

$\beta$ -galaktosidaz geni üzerindeki suşlar arası baz farklılıkları Şekil 50'de görülebilmektedir. 600 nükleotidde 8 baz farklılığı gözlenmiştir (% 1,33).

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
M23-4          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M23-13        CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M23-3          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M23-1          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M21-4          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K2-5           CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K2-4           CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K2-3           CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K2-2           CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K2-1           CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M2-21         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M2-20         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M21-7         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M2-16         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M2-12         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M2-8          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M21-3         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
20081         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
V1_F          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
V2_b-bgal f-180ct2007 CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
V3_b-bgal f-180ct2007 CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
N3-2          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
N6-2          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K1-19         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
K1-43         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
N2-2          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
N2-4          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
N2-5          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
N4-3          CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
M23-2         CATTATCTCAGTTGAATACGCTCAGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCTGGCCGCCT
*****

M23-4          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M23-13        ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M23-3          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M23-1          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M21-4          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K2-5           ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K2-4           ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K2-3           ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K2-2           ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K2-1           ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M2-21         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M2-20         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M21-7         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M2-16         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M2-12         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M2-8          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M21-3         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
20081         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
V1_F          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
V2_b-bgal f-180ct2007 ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
V3_b-bgal f-180ct2007 ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
N3-2          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
N6-2          ACACGGCTCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K1-19         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
K1-43         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
N2-2          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
N2-4          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
N2-5          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
N4-3          ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
M23-2         ACACGGCCCTGGAAAAATACCCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTGGATTGACC
```



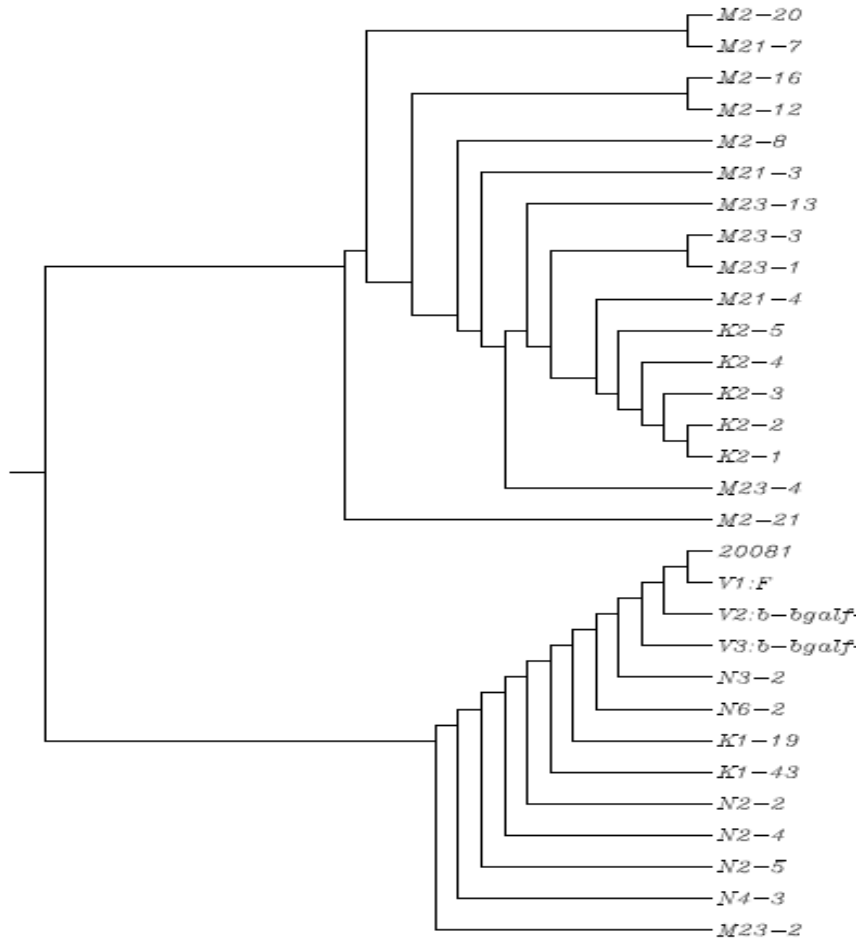




M23-4	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M23-13	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M23-3	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M23-1	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M21-4	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K2-5	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K2-4	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K2-3	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K2-2	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K2-1	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M2-21	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M2-20	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M21-7	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M2-16	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M2-12	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M2-8	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M21-3	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
20081	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
V1_F	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
V2_b-bgal f-18Oct2007	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
V3_b-bgal f-18Oct2007	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
N3-2	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
N6-2	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K1-19	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
K1-43	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
N2-2	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
N2-4	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
N2-5	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
N4-3	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG
M23-2	AAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCCAGATTTAG

\*\*\*\*\*

**Şekil 50.** *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarında β-galaktosidaz geni dizileme sonuçlarının ClustalW ile sıralanması

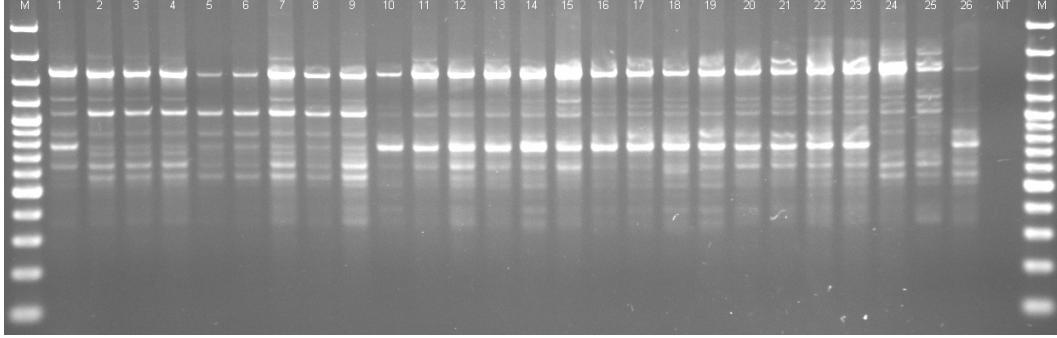


**Şekil 51.** *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarında  $\beta$ -galaktosidaz gen dizimlerinden NJ kullanılarak çizilen dendrogram

$\beta$ -galaktosidaz gen dizimli sonuçlarına göre çizilen NJ dendrogramı (Şekil 51) incelendiğinde iki ana gruptan oluşan bir dendrogram göze çarpmıştır. Gruplandırmalar sonucunda  $\beta$ -galaktosidaz geninin suşların kaynağına göre oldukça iyi ayırım yapabildiği görülmüştür. Tip suş olan *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* DSM20081 suşu ticari suşlarla beraber ikinci grupta yer almıştır. Bu da tip suşun ticari olarak kullanılan suşlarla yakın akrabalığı bulunduğunu göstermiştir.

#### 4.4.2. RAPD-PZR Sonuçları

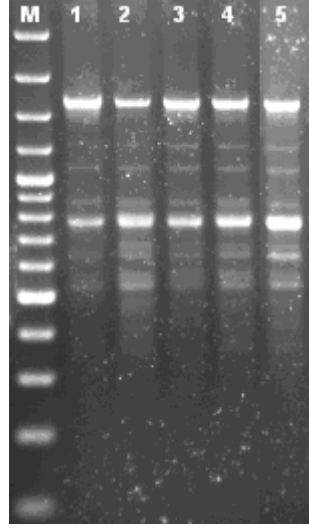
M13 primeriyle yapılan parmakizi sonuçları aynı kaynaklardan elde edilen *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının benzer parmakizleri oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 52 ve 53), bu sonuç ise beklenen bir sonuçtur (Corsetti ve ark., 2003).



**Şekil 52.** M13 primeriyle *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarında RAPD-PZR analizi.

M: 100bp marker, lane 1: *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* DSM20081, 2: M2-20, 3: M2-12, 4: M2-16, 5: M2-21, 6: M2-17, 7: M21-3, 8: M21-4, 9: M2-8, 10: M23-1, 11: M23-2, 12: M23-3, 13: M23-4, 14: M23-13, 15: N2-4, 16: N2-2, 17: N2-5, 18: N3-2, 19: N4-3, 20: N6-2, 21: K2-1, 22: K2-2, 23: K2-3, 24: K2-5, 25: K1-43, 26: K1-19, NT: Negatif kontrol.

Şekil 52 incelendiğinde *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının parmakizlerinin birbirlerine çok benzediği ortaya çıkmıştır. M13 primeriyle oluşturulan bantlar 500 bp ile 2000 bp arasında değişmiştir ve oluşan bantların sayısı 6 ile 9 arasında değişmiştir. Bir çok ortak bant gözlenmiştir, ancak bazı izolatlarda bu bantların daha soluk olduğu göze çarpmıştır. Ortak bantlar 1700 bp, 1100 bp ve 650 bp lik bantlardır.



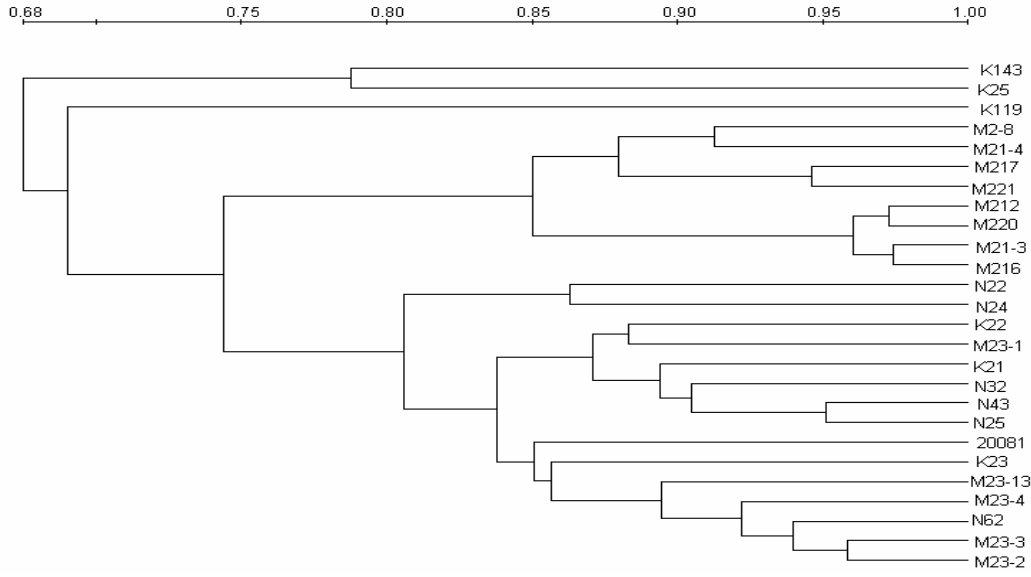
**Şekil 53.** M13 primeriyle ticari *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarında RAPD-PZR analizi. M: 100bp marker, *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* 1: DSM20081, 2: Visby B1000-1, 3: Visby B1000-2, 4: Visby B1000-3, 5: Yo-mix 410-1.

Şekil 53 ise ticari suşların parmakizi sonuçlarını göstermiştir. B1000-1, B1000-2, B1000-3 ve Yo-mix 410-1 suşları aynı parmakizlerini üretmişlerdir, ve bu parmakizleri tip suş olan DSM20081 suşu ile çok benzerlik göstermiştir. B1000-1, B1000-2 ve B1000-3 suşları aynı ticari starter suşundan izole edilmişlerdir, ve aynı bantları üretmeleri beklenmiştir, ancak Yo-mix 410-1 suşuyla olan benzerlikleri önemli bulunmuştur.

RAPD-PZR deneyinin tamamlanmasının ardından köy yoğurtlardan izole edilen suşların oluşturduğu bantlardan UPGMA yöntemiyle dendrogramı çizilmiştir (QuantityOne, BioRad). Sonuç Şekil 54'de görülmüştür. Dendrogramda % 80 benzerlik düzeyi esas alındığında 5 ana grup olduğu görülmüştür. Bu dendrograma göre K2-5, K1-19 ve K1-43 suşları diğerlerinden farklı bir profil göstermişlerdir. Ancak yine % benzerlik sonuçları karşılaştırıldığında tür içi benzerliğin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (% 68).

Sonuç olarak RAPD-PZR metodu *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının tiplendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Yöntem kolay ve hızlıdır, ancak tekrarlanabilir deney koşulları elde edebilmek ve kontaminasyon problemlerinden kurtulma için standardize bir yöntem kullanılması gerekmektedir.





**Şekil 54.** M13 primeriyle yapılan RAPD-PZR analizi sonucunda oluşturulan UPGMA dendrogramı.

Çalışılan metodların dendrogramları karşılaştırıldığında  $\beta$ -galaktosidaz gen dizilemesinin 600 nükleotidde 8 farklılık olduğunu göstermiştir. Bu oran ise % 1,3 oranında bir polimorfizmi işaret etmiştir. Elde edilen dendrogramlar karşılaştırıldığında ise RAPD-PZR dendrogramının  $\beta$ -galaktosidaz gen dizilimi dendrogramına kıyasla suşların tiplendirilmesi düzeyinde oldukça iyi ayırım yapabildiği gözlenmiştir.

#### 4.5. Bakterilerden $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

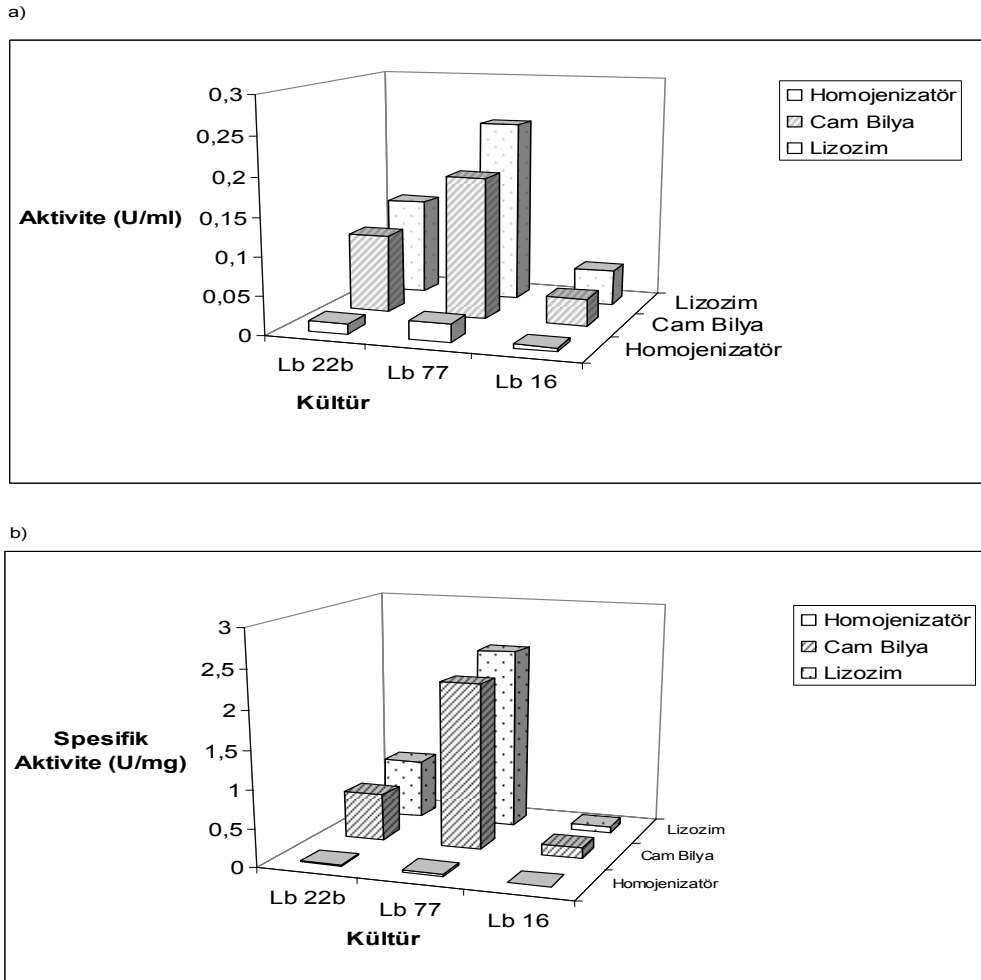
Bu bölümde Toros bölgesinden toplanan, tamamen doğal yöntemlerle üretilen yoğurt örneklerinden izole edilmiş, önceki bölümde sonuçları verilmiş olan yoğurt kültürlerinin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactocabillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz kaynağı olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu kültürler içinden laktozu kullanma ve laktik asit üretimine bağlı olarak en iyi 3 laktik asit bakterisi fermentasyonla laktaz enzimi üretimi için kullanılmıştır. İstatistiksel deney tasarımı ile besi ortamı, çalkalama hızı ve kültürün  $\beta$ -galaktosidaz ve laktik asit üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Ayrıca farklı enzim ekstraksiyon yöntemlerinin uygulanması ile ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması ve sonraki çalışmalarda hangi yöntemin kullanılacağına karar

verilmesine olanak sağlamıştır. Sözkonusu ekstraksiyon çalışmaları laktaz enzimi üretiminin optimizasyonundan önce sunulmaktadır.

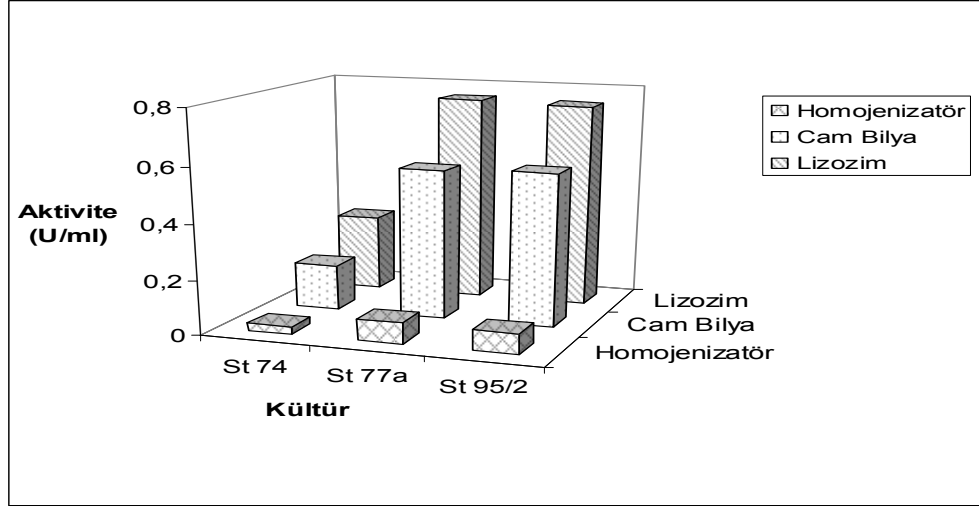
#### 4.5.1. Enzim Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Laktik asit bakterilerinden üretilen  $\beta$ -galaktosidaz hücre içi bir enzimdir. Enzimin hücre dışına alınabilmesi için bu çalışmada 3 farklı enzim ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve yöntemlerin etkinliği Şekil 55 ve 56'de karşılaştırılmıştır. En yüksek  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi hem *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* hem de *Streptococcus thermophilus* suşları için lizozim kullanıldığında elde edilmiştir.

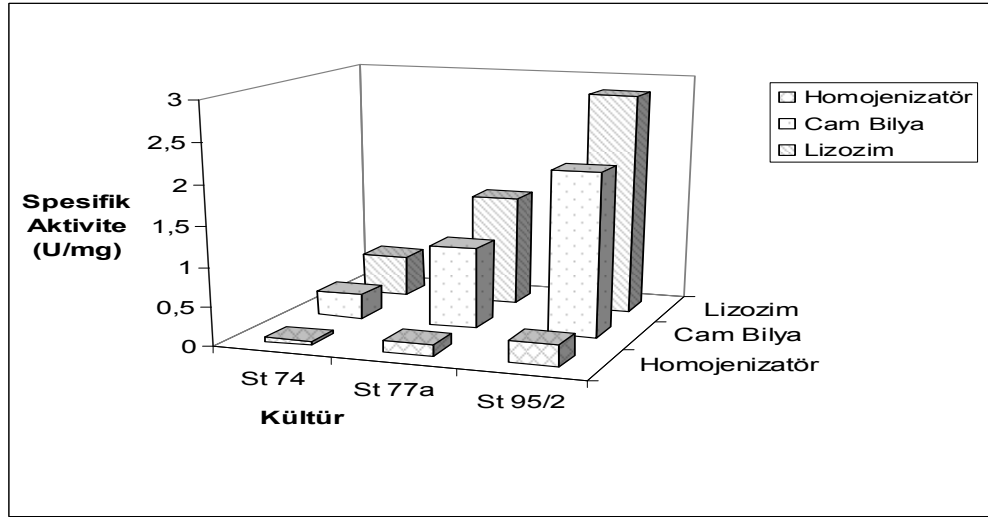


Şekil 55. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* türleri için enzim ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması: (Süt tozu besi ortamında, 43 °C 'de 8 saat çalkalamasız ortamdaki fermentasyon koşullarında) a) aktivite(U/ml), b) spesifik aktivite (U/mg protein)

a)



b)



**Şekil 56.** *Streptococcus thermophilus* türleri için enzim ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması: (% 2 peyniraltı suyu tozu + % 3 mısır şurubu sırası + % 2 pepton + % 2 potasyum fosfat içeren M2 besi ortamında), 43 °C 'de 8 saat çalkalamasız ortamdaki fermentasyon koşullarında) a) aktivite(U/ml), b) spesifik aktivite (U/mg protein)

Lizozimle enzim ekstraksiyonu homojenizatörle ekstraksiyona göre Lb 22b, Lb 77 ve Lb 16 suşları için sırasıyla 19,07; 10,07 ve 9,77 daha fazla  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesi ile sonuçlanmıştır. Homojenizatörle enzim ekstraksiyon işlemi lizozime göre 10 kat daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir. Bunun nedeni, homojenizasyon işlemi sırasında oluşan ısı ve buna bağlı yetersiz soğutmadan kaynaklanmıştır. *Streptococcus thermophilus* suşları içinde

benzer sonuçlar elde edilmiştir. Lizozimle ekstraksiyonun St 95/2 suşu üzerinde sırasıyla St 77a ve St 74/2 e göre 5,39 ve 1,98 kat daha etkili olduğu bulgulanmıştır.

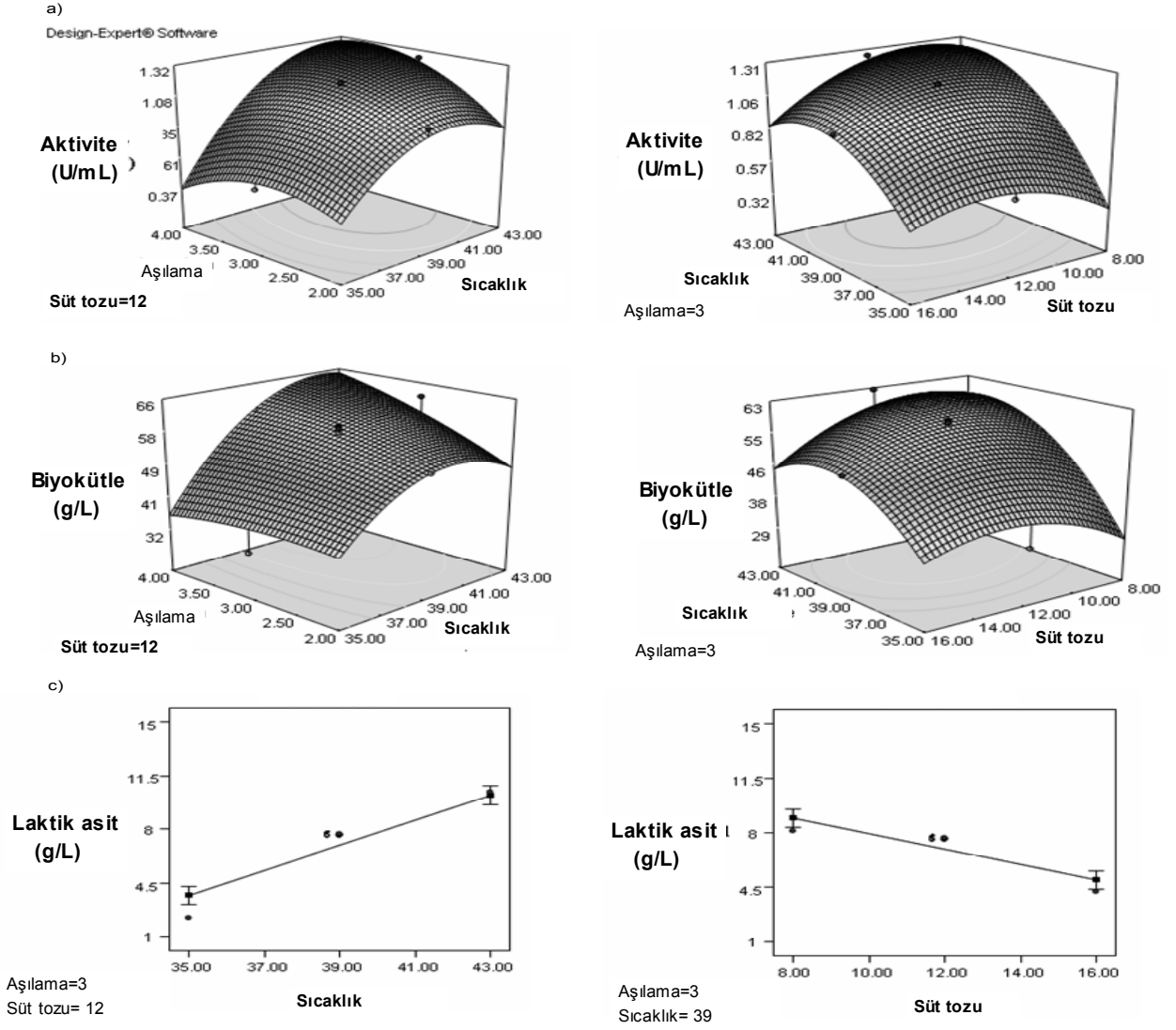
#### **4.5.2. Merkezi Karma Deney Tasarımı**

##### **4.5.2.1. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 Suşu için Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu**

Yapılan faktoriyel istatistiksel dizaynı sonucuna göre *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 suşu en yüksek  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarına bu suş ile devam edilmiştir.

Bu bölümde, aşılama oranı, sıcaklık ve süt tozu konsantrasyonunun biyokütle, laktik asit ve  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üzerine olan etkisini belirlemek için yüzey cevap yöntemi kullanılarak bu faktörlerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Grafıklere göre (Şekil 57), en yüksek enzim aktivitesi, biyokütle ve laktik asit üretiminin yüksek sıcaklık ve aşılama oranıyla birlikte süt tozu konsantrasyonunun % 8-8,5 olduğu durumda elde edildiği görülmüştür.

Yüksek enzim aktivitesi (1,36 U/ml), biyokütle (69,03 g/l) ve laktik asit (13,06 g/l) için istatistiksel yazılım ile belirlenen optimum koşullar, sıcaklığın 43 °C, aşılama oranının % 4,0 ve süt tozu konsantrasyonunun % 8,0 olduğu koşullardır.



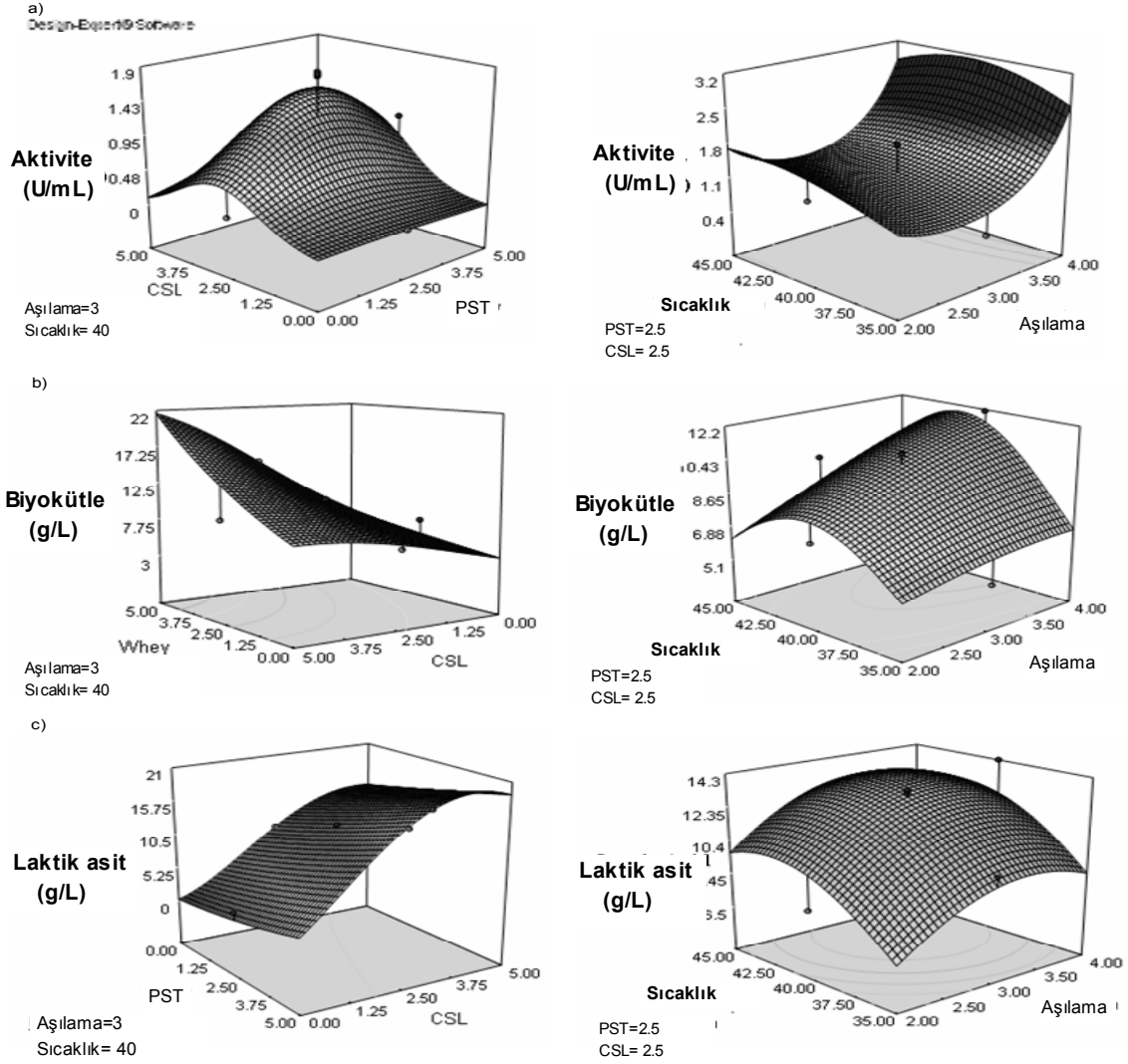
Şekil 57. Lb 77 suşu için elde edilen optimizasyon sonuçları

#### 4.5.2.2. *Streptococcus thermophilus* 95/2 Suşu için Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Yapılan faktoriyel istatistiksel dizaynı sonucuna göre *Streptococcus thermophilus* 95/2 suşunun diğer izole edilen *Streptococcus thermophilus* suşlarına oranla yüksek  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarına bu suş ile devam edilmiştir.

Sıcaklık, aşılama oranı, peyniraltı suyu tozu konsantrasyonu ve mısır şırası şurubu konsantrasyonunun biyokütle, enzim aktivitesi ve laktik asit üretimi üzerine olan etkisi yüzey cevap yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Deney tasarımı ve elde edilen sonuçlar Ek 7'de

gösterilmiştir. Grafiklere göre maksimum aktivite yüksek sıcaklık ve aşılama oranlarıyla birlikte peyniraltı suyu tozu ve mısır şırası şurubu konsantrasyonunun % 2,5 olduğu koşullarda elde edilmiştir. Bunun yanı sıra maksimum laktik asit ve biyokütle ise yüksek sıcaklık ve aşılama oranlarıyla birlikte peyniraltı suyu tozu ve mısır şırası şurubu konsantrasyonunun % 5 olduğu koşullarda elde edilmiştir. Optimizasyon sonuçları Şekil 58'den görülebilmektedir.



**Şekil 58.** St 95/2 suşu için elde edilen optimizasyon sonuçları (PST: Peyniraltı suyu tozu, CSL: Mısır şırası şurubu)

Bu sonuçlara bağlı olarak maksimum enzim aktivitesi (2,03 U/ml), biyokütle (21,86 g/l) ve laktik asit (22,76 g/l) üretimi için gerekli olan optimum koşullar sırasıyla 44 °C sıcaklık, % 3,87 aşılama oranı, % 5 peyniraltı suyu tozu konsantrasyonu ve % 4,16 mısır

şırası şurubu konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu optimizasyon çalışmasından elde edilen sonuçlar Lb 77 suşu kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçları ile karşılaştırıldığında; St 95/2'nin 1,50 kat daha fazla  $\beta$ -galaktosidaz ve 1,76 kat daha fazla laktik asit ürettiği sonucu çıkmıştır.

#### **4.5.2.3. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 ve *Streptococcus thermophilus* 95/2 Suşları için Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu**

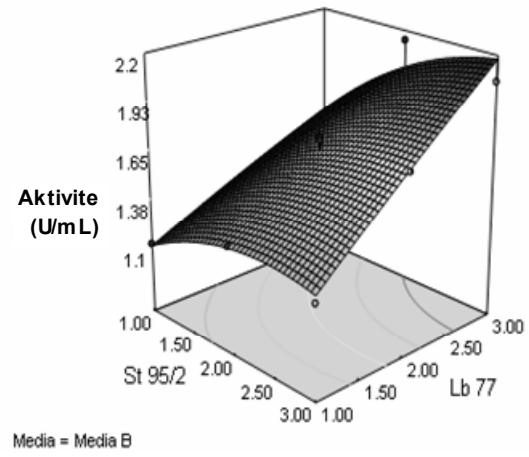
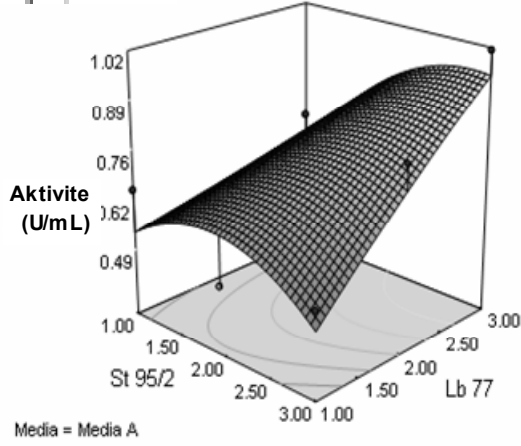
Bilindiği üzere bazı kültürler bir arada olduklarında yalnız başlarına olduklarına oranla daha iyi büyürler. Bu nedenle *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* arasındaki simbiyotik ilişki yoğurt üretiminde büyük önem taşımaktadır. Literatürde starter kültürler arasındaki sinerjistik ilişki süt ürünlerinin reolojik ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine incelenmiştir ve sinerjistik ilişkinin enzim üretimi üzerine olan etkisini inceleyen bir çalışmaya henüz rastlanamamıştır. Bu nedenle daha önce her bir kültür için yapılan optimizasyon çalışmaları sonuçlarından yararlanılarak *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 ve *Streptococcus thermophilus* 95/2 suşları arasındaki simbiyotik ilişkinin incelenmesi için yeni bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada Lb 77 ve St 95/2'nin aşılama oranı ve besi ortamının enzim aktivitesi, biyokütle ve laktik asit üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Optimizasyon sonuçları Şekil 59'da verilmektedir. Grafik sonuçlarına göre maksimum  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi ve laktik asit üretimi besi ortamı B (Media B; peyniraltı suyu tozu % 5, mısır şırası şurubu % 4, potasyum fosfat % 2, pepton % 2 )'de aşılama oranı 2:3 (St 95/2: Lb 77) olduğunda elde edilmiştir. Bunun yanı sıra en yüksek biyokütle üretimi besi ortamı A (Media A; % 8 süt tozu)'nın besi ortamı olarak kullanılması ve aşılama oranı 2.6:3 (St 95/2: Lb 77) ile elde edilmiştir.

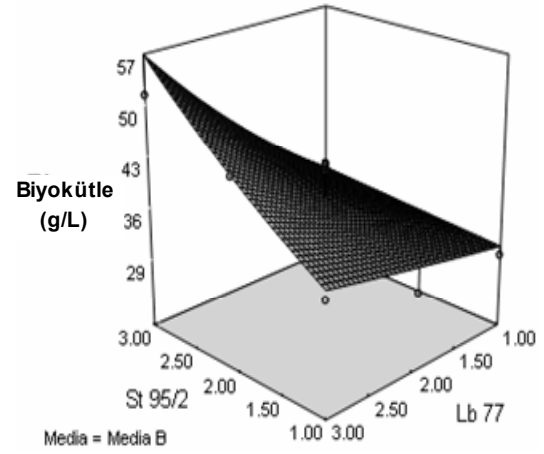
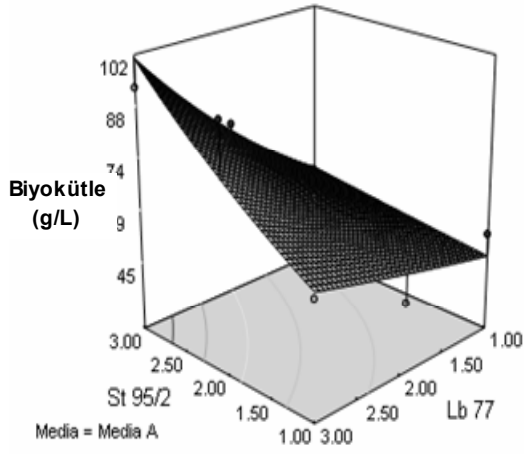
Kültürlerin simbiyotik ilişkisi, Lb 77'in tek başına kullanılmasına göre % 39 daha fazla  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi ve % 44 daha fazla laktik asit üretmiştir. Benzer şekilde bu ilişki, St 95/2'in tek başına kullanılmasına göre % 6,1 daha fazla  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi ve % 8,73 daha fazla laktik asit üretmiştir.

a)

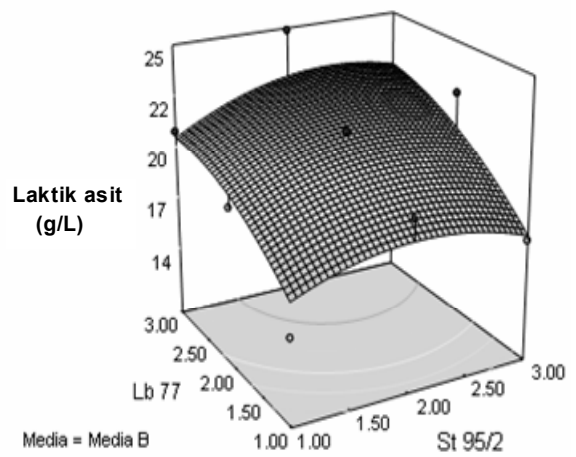
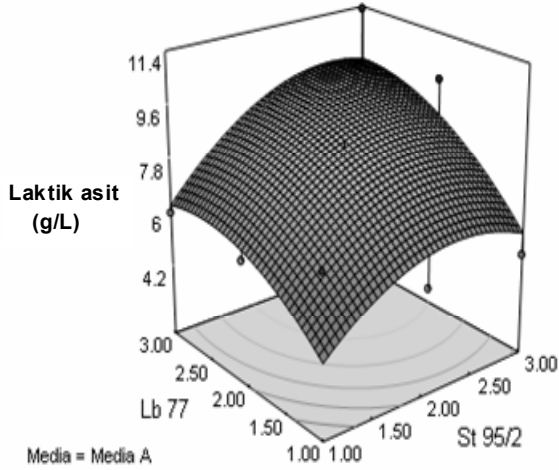
Design-Expert® Software



b)



c)



Şekil 59. Lb 77 ve St 95/2 suşlarını bir arada kullanımı ile elde edilen optimizasyon sonuçları



### 4.5.3. Fermentör Denemeleri

Fermentör denemeleri optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre gerçekleştirilmiştir ve böylece ölçek büyütmenin etkileri de incelenmiştir.

#### 4.5.3.1. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77

*Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 için optimize edilmiş koşullar sıcaklığın 43 °C, besi ortamı % 8 süt tozu ve aşılama oranı % 4 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda iki farklı deney gerçekleştirilmiştir. Birinci denemede pH sabit tutulmamış, diğer denemede ise 2N NaOH ilavesi ile pH 6,2' de sabitlenmiştir. Her 2 saatte bir örnek alınarak enzim aktivitesi, laktik asit, laktoz, biyokütle ve hücre sayımı analizlerinde kullanılmıştır, bu bilgiler Tablo 30'da gösterilmektedir.

**Tablo 30.** *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 için farklı deney koşulları ve sonuçları

Lb 77 (pH sabit tutulmadan)					
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı (ln kob/ml)	Laktik asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,0022	10,25	15,65	0	46,56
2	0,0755	14,65	16,57	0,984	45,963
4	0,6205	40,3	17,82	3,391	40,83
6	0,8791	59,68	18,23	5,199	35,946
8	1,2807	68,65	19,24	8,873	26,958

Lb 77 (pH 6,2±0,1)					
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı (ln kob/ml)	Laktik asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,0021	10,32	15,88	0	46,413
2	0,0095	15,19	16,38	0,881	44,785
4	0,3912	34,68	17,32	2,529	37,183
6	0,673	48,27	18,72	4,119	33,748
8	0,807	55,63	19,94	7,676	24,665

Tablo 30'dan görüldüğü üzere, fermentasyon sonunda pH 6,2'de sabit tutulduğunda enzim aktivitesi 1,58 kat düşmüştür. Laktik asit ve biyokütle sonuçları kontrolsüz pH sonuçları ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmüştür.

#### 4.5.3.2. *Streptococcus thermophilus* 95/2

*Streptococcus thermophilus* 95/2 için optimum koşullar sıcaklığın 44 °C, besi ortamı peyniraltı suyu tozu (% 5), mısır şırası şurubu ( % 4), pepton (% 2) ve potasyum fosfat (% 2) ve aşılama oranı % 3,9 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda iki farklı deney gerçekleştirilmiştir. Birinci denemede pH sabit tutulmamış, diğer denemede ise 2N NaOH ilavesi ile pH 6,2’de sabitlenmiştir. Her 2 saatte bir örnek alınarak enzim aktivitesi, laktik asit, laktoz, biyokütle ve hücre sayımı analizlerinde kullanılmıştır, bu bilgiler Tablo 31’de görülebilmektedir.

**Tablo 31.** *Streptococcus thermophilus* 95/2 için farklı deney koşulları ve sonuçları

St 95/2 (pH sabit tutulmadan)					
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı (ln kob/ml)	Laktik asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,044	8,17	14,59	0	38,943
2	0,103	10,12	16,11	3,881	36,265
4	0,6918	14,48	17,79	7,674	25,738
6	1,3703	19,87	19,43	12,161	18,273
8	1,897	22,18	20,1	16,939	2,642

St 95/2 (pH 6,2±0,1)					
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı (ln kob/ml)	Laktik asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,052	7,65	15,64	0	37,14
2	0,163	10,8	16,36	3,881	35,176
4	0,625	12,9	18,38	6,861	26,329
6	1,3403	17,7	19,09	9,757	19,226
8	1,961	22,4	20,23	12,392	4,823

Tablo 31’de verildiği üzere, fermentasyon sonunda pH 6,2’de sabit tutulduğunda enzim aktivitesi % 3,37 artmıştır. Bunun yanı sıra laktik asit sonuçlarının pH sabit tutulduğunda düşük olduğu görülmüştür.

#### 4.5.3.3. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 ve *Streptococcus thermophilus* 95/2

*Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 ve *Streptococcus thermophilus* 95/2 arasındaki simbiyotik ilişki incelenmiştir. Kültürleri bir arada kullanmanın kültürleri tek

başına kullanmaya oranla daha etkili olduğu görülmüştür. Optimum koşullar; sıcaklık 43 °C, besi ortamı peyniraltı suyu tozu (% 5), mısır şırası şurubu ( % 4), pepton (% 2) ve potasyum fosfat (% 2) ve aşılama oranı % 3,9 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 3 ayrı deneme gerçekleştirilmiştir. Birinci denemede pH sabit tutulmamışken ikinci denemede pH 6,2’de sabit tutulmuştur. Üçüncü denemede ise 4 saat sonunda 500 ml % 5’lik peyniraltı suyu tozu beslenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 32’de gösterilmiştir. pH 6,2’de sabit tutulduğunda enzim aktivitesi % 3,92, laktik asit % 26 oranında düşmüştür. % 5’lik peyniraltı suyu tozu ile beslendiğinde enzim aktivitesi ve laktik asit sırasıyla % 11,76 ve % 6,10 oranında düşmüştür.

**Tablo 32.** *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus 77* ve *Streptococcus thermophilus 95/2* arasındaki simbiyotik ilişki için farklı deney koşulları ve sonuçları

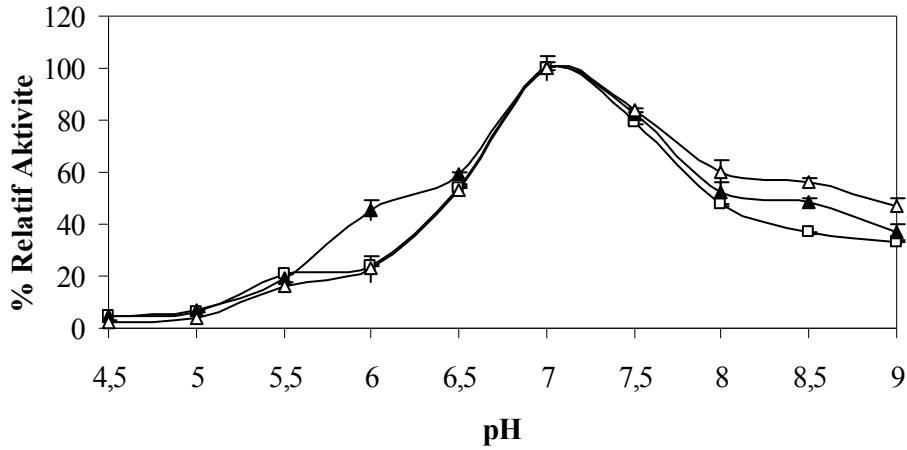
<b>Lb 77 &amp; St 95/2 (pH sabit tutulmadan- kesikli)</b>						
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı. Lb 77 (ln kob/ml)	Hücre sayımı. Lb 77 (ln kob/ml)	Laktik Asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,103	10,8	15,7	17,03	0	38,295
2	0,322	12,6	16,21	18,4	4,915	36,024
4	0,788	24,3	18,23	19,81	8,571	24,753
6	1,962	31,8	19,97	21,37	12,697	13,676
8	2,549	48,7	20,71	23,62	19,672	0,6075
<b>Lb 77 &amp; St 95/2 (pH 6.2±0.1 – kesikli)</b>						
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı. Lb 77 (ln kob/ml)	Hücre sayımı. Lb 77 (ln kob/ml)	Laktik Asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,093	9,83	15,84	16,13	0	37,139
2	0,298	11,43	16,86	17,93	4,826	35,084
4	0,704	21,98	18,69	16,21	8,1117	24,771
6	1,987	29,74	19,65	20,83	10,195	15,411
8	2,449	43,65	20,31	22,72	14,472	3,543
<b>Lb 77 &amp; St 95/2 (pH sabit tutulmadan- Yarı kesikli)</b>						
Süre (h)	Aktivite (U/ml)	Biyokütle (g/l)	Hücre sayımı. Lb 77 (ln kob/ml)	Hücre sayımı. Lb 77 (ln kob/ml)	Laktik Asit (g/l)	Laktoz (g/l)
0	0,078	9,17	15,54	16,72	0	38,145
2	0,265	10,45	17,06	17,59	4,761	36,063
4	0,804	18,92	18,25	19,42	7,997	25,548
6	2,016	28,73	19,55	20,97	14,603	23,456
8	2,249	45,65	20,1	21,81	18,472	17,543

#### 4.5.4. Enzim Karakterizasyonu Sonuçları

Optimizasyon sonucunda elde edilen ham enzimler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

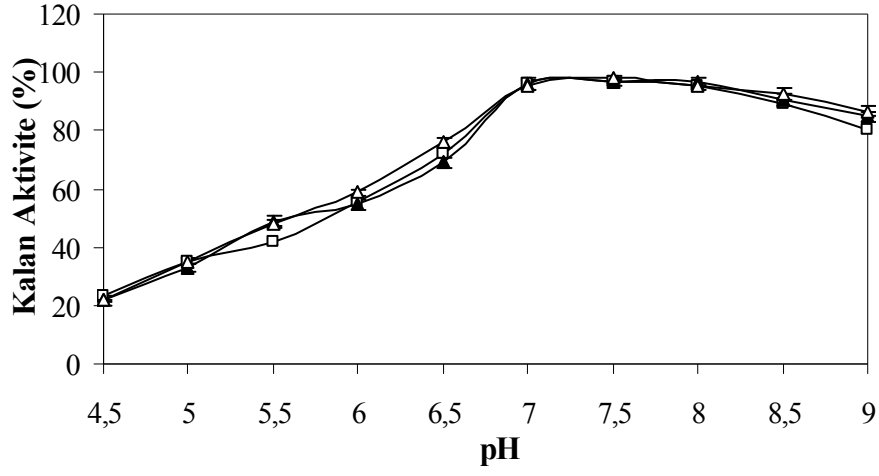
##### 4.5.4.1. pH'nın $\beta$ -galaktosidaz Enzim Aktivitesi ve Stabilite Üzerine Etkisi

pH'nın enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 4,5-9,0 aralığında farklı pH'lardaki tamponların kullanılmasıyla belirlenmiştir. Grafikten görüldüğü üzere optimum pH değeri tüm enzim ekstraktları için pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Ayrıca her üç kaynaktan elde edilen enzim ekstraktı pH 7,0-7,5 arasında % 80 aktivite göstermiştir (Şekil 60).



**Şekil 60.** pH'nın bakteri  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisi; Lb 77(□), St 95/2(▲) ve Lb 77 & St 95/2 (Δ) elde edilen enzim ekstraktları

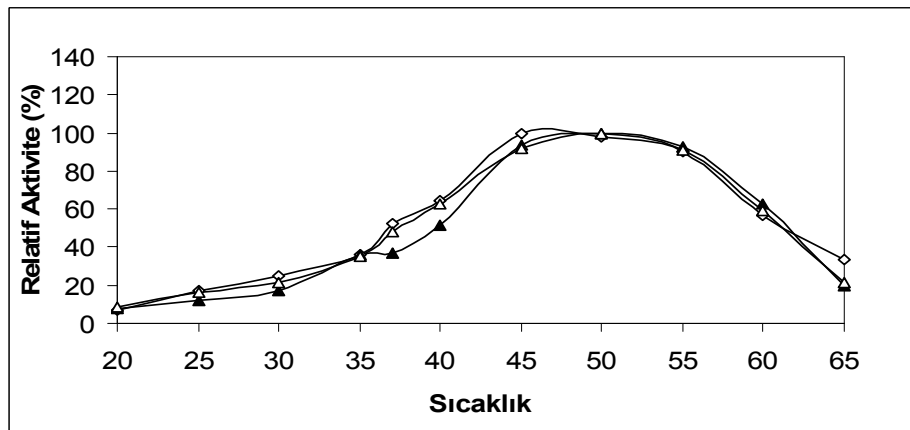
Enzim ekstraktlarının 37 °C'de elde edilen pH stabilite profilleri Şekil 61'de gösterilmiştir. Enzim ekstraktlarının pH 7-9 aralığında % 85-90 oranında stabil olduğu görülmüştür.



**Şekil 61.** pH'nın bakteri β-galaktosidazının stabilitesi üzerine etkisi; Lb 77(□), St 95/2(▲) ve Lb 77 & St 95/2 (Δ) elde edilen enzim ekstraktları

#### 4.5.4.2. Sıcaklığın β-galaktosidaz Enzim Aktivitesi ve Stabilite Üzerine Etkisi

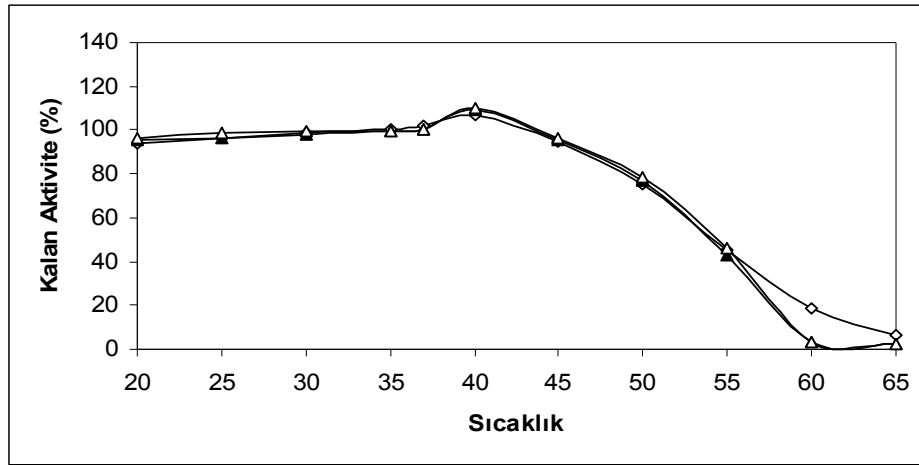
Lb 77, St 95/2 ve bu iki kültürün bir arada büyümesinden elde edilen enzim ekstraktlarının optimum sıcaklık değeri sırasıyla 40 °C, 50 °C ve 50 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca bu enzimler 45- 55 °C aralığında enzim aktivitelerinin % 90-100 oranına sahiptir (Şekil 62).



**Şekil 62.** Sıcaklığın bakteri β-galaktosidazının aktivitesi üzerine etkisi; Lb 77(□), St 95/2(▲) ve Lb 77 & St 95/2 (Δ) elde edilen enzim ekstraktları

Enzimlerin sıcaklık stabilitesi enzimin 20-65 °C sıcaklıklarda 30 dakika bekletilmesi sonucunda kalan aktivitenin hesaplanmasıyla belirlenmiştir.

Şekil 63'den görüldüğü üzere her üç kaynaktan da elde edilen enzimler 20-37 °C stabildir. Bunun yanı sıra 40 °C'de bekletilmesi enzim aktivitesinde % 6-10'luk bir artışa neden olmuştur. Enzimin 55 °C'de bekletilmesi ise enzim aktivitelerinde % 53-57 arasında bir düşüşe neden olmuştur.



**Şekil 63.** Sıcaklığın bakteri  $\beta$ -galaktosidazının stabilitesi üzerine etkisi; Lb 77(□), St 95/2(▲) ve Lb 77 & St 95/2 (Δ) elde edilen enzim ekstraktları

#### 4.5.4.3. Metal İyonlarının $\beta$ -galaktosidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Ortamda bulunan iyonlar enzim aktivitesi üzerine aktivatör ya da inhibitör etkisi gösterebilmiştir. Bu nedenle farklı konsantrasyonlardaki (1-10 mM) metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Tablo 26'da iyonların konsantrasyonları ve göstermiş olduğu etkiler verilmiştir.

Tablo 33'den görüldüğü üzere  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkide bulunmuştur. Bunun yanı sıra,  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  tüm enzim ekstraktlarında aktivasyona neden olmuştur.

**Tablo 33.** Metal İyonlarının bakteri  $\beta$ -galaktosidazının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

<b>Lb 77</b>		<b>% Relatif Aktivite</b>			
<b>Kontrol</b>		100			
<b>Metal iyonları</b>	<b>1mM</b>	<b>2,5mM</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	
K <sup>+</sup>	97,55	94,34	96,24	98,4	
Na <sup>+</sup>	98,4	99,64	91,27	88	
Ca <sup>2+</sup>	55	35	28	15	
Mg <sup>2+</sup>	97,73	104,24	105,35	108,43	
Mn <sup>2+</sup>	100,8	106,25	117,68	122,87	
Zn <sup>2+</sup>	55	40	25	ND	
Cu <sup>2+</sup>	25	18	5	ND	
Fe <sup>2+</sup>	90	85	75	30	

<b>St 95/2</b>		<b>% Relatif Aktivite</b>			
<b>Kontrol</b>		100			
<b>Metal iyonları</b>	<b>1mM</b>	<b>2,5mM</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	
K <sup>+</sup>	93,91	99,25	97,69	98	
Na <sup>+</sup>	98,8	96,72	92,,66	90,11	
Ca <sup>2+</sup>	48,18	26	12	10	
Mg <sup>2+</sup>	98,73	101,76	103,51	109,87	
Mn <sup>2+</sup>	101,76	107,9	108,53	130,21	
Zn <sup>2+</sup>	58	45	15	ND	
Cu <sup>2+</sup>	6,63	ND	ND	ND	
Fe <sup>2+</sup>	93	88	77	25	

<b>(Lb 77&amp;St 95/2)</b>		<b>% Relatif Aktivite</b>			
<b>Kontrol</b>		100			
<b>Metal iyonları</b>	<b>1mM</b>	<b>2,5mM</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	
K <sup>+</sup>	99,36	97,1	95,77	98,14	
Na <sup>+</sup>	94,91	93,88	90,19	89,26	
Ca <sup>2+</sup>	64,18	46	27	14	
Mg <sup>2+</sup>	99,39	103,29	107,18	110,93	
Mn <sup>2+</sup>	116,21	134,32	159,78	167,12	
Zn <sup>2+</sup>	56	40	21	ND	
Cu <sup>2+</sup>	5,29	ND	ND	ND	
Fe <sup>2+</sup>	91	83	72	28	

#### 4.5.4.4. Termal İnaktivasyon Kinetiği ve İnaktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi

$K_d$  sabitleri ve tüm enzim ekstraktlarının yarı ömürleri hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 34'de belirtilmiştir.

**Tablo 34.** Tüm bakteri enzim ekstraktlarının  $K_d$  sabitleri ve yarı ömürleri

<b>T ( C)</b>	<b>Kd</b>			<b>t<sub>1/2</sub> (dk)</b>		
	<b>Lb 77</b>	<b>St 95/2</b>	<b>Lb 77 &amp; St 95/2</b>	<b>Lb 77</b>	<b>St 95/2</b>	<b>Lb 77 &amp; St 95/2</b>
45	0,0021	0,0033	0,0025	330,07	210,04	277,25
50	0,0092	0,0104	0,0089	75,34	66,65	77,88
55	0,027	0,0187	0,0194	25,67	37	35,73
60	0,097	0,099	0,0995	7,14	7	6,96

Enzim ekstraktları için 45 °C’de elde edilen  $t_{1/2}$  değerleri diğer sıcaklıklarda elde edilen değerlere oranla daha yüksektir. Bu sonuç enzim ekstraktlarının 45 °C’de diğer sıcaklıklara oranla daha stabil olduğunu göstermiştir. Ayrıca aynı sıcaklıkta Lb 77 suşundan elde edilen enzim ekstraktının diğer suşlardan elde edilen ekstraktlara oranla daha stabil olduğu görülmüştür.

Tüm enzim ekstraktları için inaktivasyon enerjisi hesaplanmıştır ve Lb 77, St 95/2 ve bu iki kültürün bir arada büyümesinden elde edilen enzim ekstraktları için inaktivasyon enerjisi değerleri sırasıyla 51,288; 44,01 ve 48,25 kcal mol<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Bu değerler birçok mikrobiyal enzim için tahmin edilen inaktivasyon enerjisi (40-70 kcal mol<sup>-1</sup>) değerleri arasında yer almıştır.

#### 4.5.4.5. Kinetik Sabitlerin ( $K_m$ ve $V_{max}$ ) Belirlenmesi

ONPG kullanılarak tüm enzim ekstraktları için Lineweaver Burk plot kullanılarak kinetik sabitler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) belirlenmiştir. Tablo 35’de enzim ekstraktları için bulunan değerler yer almaktadır.

**Tablo 35.** Bakteri enzimleri için kinetik sabitler

	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dk.mg}$ )	$K_m$ (mM)
Lb 77	2,461	1,72
St 95/2	2,994	0,981
Lb 77& St 95/2	3,44	3,671

Tablodan görüldüğü üzere St 95/2’den elde edilen enzim ekstraktının  $K_m$  değeri diğerlerine göre daha düşüktür. Bu St 95/2’den elde edilen enzimin substrata karşı daha fazla affiniteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca elde edilen  $K_m$  değerlerinin literatürde yer alan enzimlerin  $K_m$  değerlerine çok yakın olduğu görülmüştür.

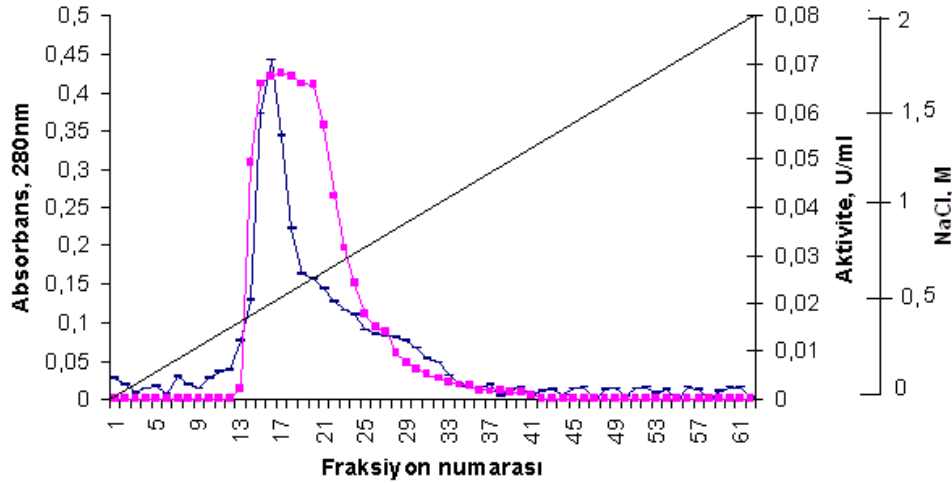
#### 4.5.5. Bakterilerden Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz’ın Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

Saflaştırma ve immobilizasyon çalışmalarında optimizasyon sonuçlarına bağlı olarak *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* suşundan elde edilen ham enzim kullanılmıştır.



$\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasında ilk basamağında, ham enzim ekstraktı %50 amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 10 000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılmış ve pelet, tampon çözelti (fosfat tamponu, pH 6,5) ile çözündürülmüştür. Elde edilen enzim örneği daha sonra fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen enzim örneğinde protein ve aktivite tayinleri yapılmış ve protein miktarı 0,118 mg/ml, enzim aktivitesi 0,0673 U/ml olarak bulunmuştur.

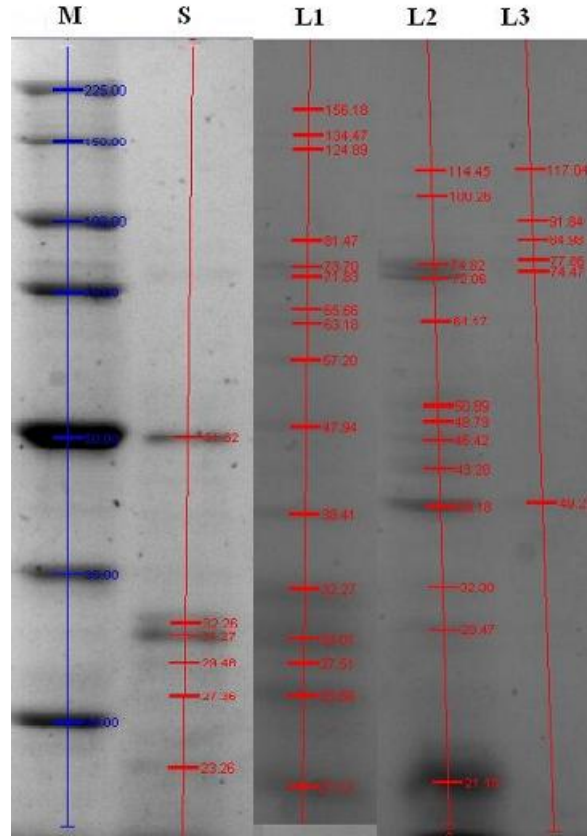
Şekil 64’de bakteriden elde edilen laktaz enziminin kolon kromatografisi ile saflaştırılması ve Tablo 36’da saflaştırma basamakları gösterilmektedir. Ham ve saf enzimin SDS-PAGE elektroforez jel profilleri ise Şekil 65’de verilmektedir.



**Şekil 64.** Bakteri enziminin Sephadex DEAE-A25 kolonundan geçişindeki fraksiyonların protein ve enzim aktivitesi grafiği (—: Protein miktarı, A<sub>280nm</sub>, ■: Enzim aktivitesi)

**Tablo 36.** Bakteri  $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırma basamakları ve sonuçları

Saflaştırma basamağı	Aktivite, U/ml	Protein, mg/ml	Spesifik aktivite, U/mg protein	Saflaştırma	Verim, %
Ham enzim	0,0756	0,194	0,389	1	100
Ammonyum sülfat, %50 + diyaliz	0,067	0,118	0,57	1,46	89,02
Gradient (NaCl) + diyaliz	0,064	0,018	3,54	9,08	84,26



**Şekil 65.** Bakteri  $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri: M, marker proteini; S, standart  $\beta$ -galaktosidaz (*Saccharomyces fragilis*); L1, ham ekstrakt; L2, amonyum sülfat çöktürmesi; L3, Sephadex DEAE-A25 kolon

Elde edilen diyalizat Sephadex DEAE-A25 kolona beslenerek adsorbe edilmiştir. Adsorbe edilen enzim kesikli olarak NaCl (0-2 M) içeren fosfat tamponu (pH 6,5) ile yıkanmış ve 5'er ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda protein içeriği 280 nm'deki absorbansla takip edilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Şekil 64'deki fraksiyonlardaki protein ve enzim aktivitesi grafiğinden, enzim aktivitesi 14 ile 35 arasındaki fraksiyonlarda bulunmuştur. Bu nedenle bu fraksiyonlar birleştirilmiş ve yine aynı tamponla diyaliz edilmiştir. Elde edilen enzim immobilizasyon denemesinde kullanılmıştır. SDS-PAGE profilinden görüleceği üzere bakteri enzimi standart maya laktazından oldukça farklı özelliktedir. Presipitasyon işlemi ile kısmi olarak safsızlık proteinlerinden uzaklaştırılan laktaz enzimi kolon kromatografisi ile saflaştırılmış olup yüksek molekül ağırlıklı izoenzimlerinin olduğu görülmüştür.

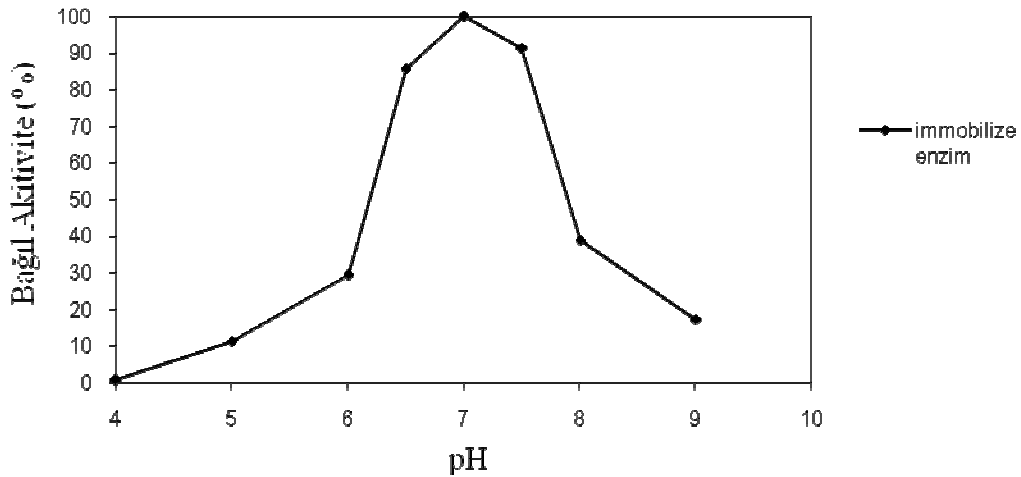
Diyaliz işlemi sonucunda belirlenen miktardaki saflaştırılmış enzim (5 ml), 1,5 g bilye içeren kaplara alınıp belirli koşullar altında (pH: 7, Zaman: 4 saat, sıcaklık: 20 °C) immobilizasyon işlemine tabi tutulmuştur ve sonucunda immobilize olan kürelerin serbest enzimle karşılaştırılması amacıyla karakterizasyon işlemi uygulanmıştır. Immobilizasyon işlemi sonucunda kompleks maddeye tutunan enzim miktarı 46,29 µg enzim/g küre olarak belirlenmiştir.

#### 4.5.5.1. Bakterilerden Elde Edilen İmmobilize β-galaktosidaz'ın Karakterizasyonu

Optimizasyon sonuçlarına göre en yüksek enzim aktivitesi gösteren *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* 77 suşu immobilizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

##### 4.5.5.1.1 pH Değerinin β-galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi

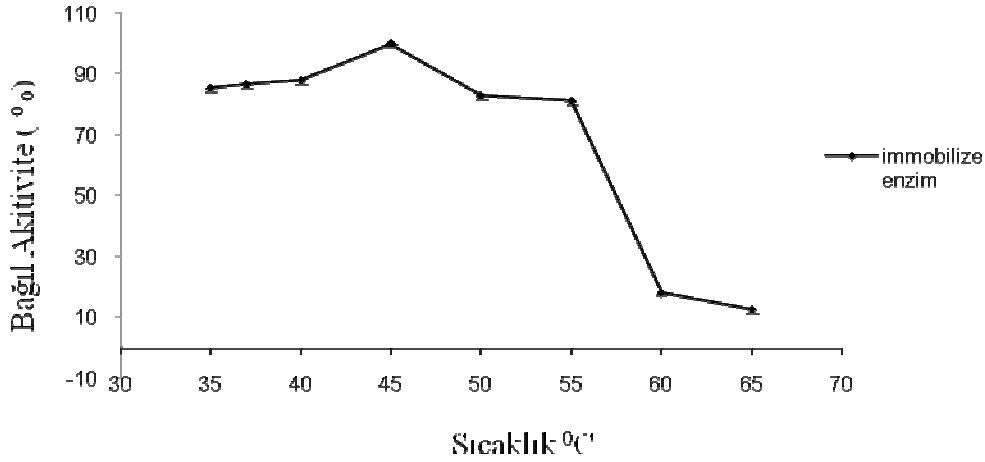
Şekil 66'da görüldüğü üzere immobilize enzimin optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur. Yukarıdaki serbest enzim karakterizasyon sonuçlarına bakıldığı zaman ise pH değerinde bir değişim olmadığı gözlenmektedir.



Şekil 66. Ortam pH' sının immobilize bakteri β-galaktosidazının aktifliğine etkisi

#### 4.5.5.1.2. Sıcaklığın $\beta$ -galaktosidaz'ın Aktivitesi Üzerine Etkisi

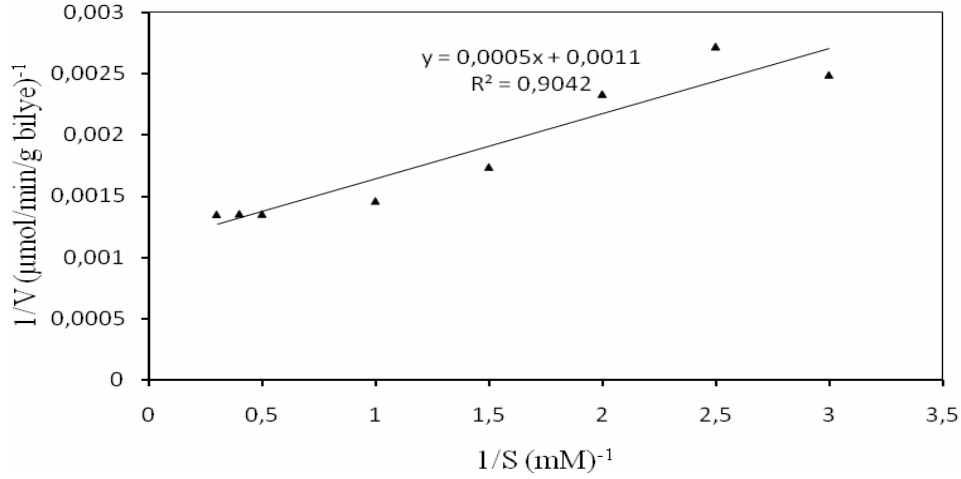
Şekil 67' de görüldüğü üzere optimum sıcaklık immobilize enzim için 45 °C dir. Bu sonuca göre immobilizasyonla enzimin optimum sıcaklık değerinde 5 °C lik bir artış gözlenmiştir.



Şekil 67. Sıcaklığın immobilize bakteri  $\beta$ -galaktosidazının aktifliğine etkisi

#### 4.5.5.1.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması

Doygunluk substrat konsantrasyonunu  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini belirleyebilmek için belirli substrat konsantrasyon aralıkları kullanılarak serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri standart koşullarda belirlenmiştir. Değerler Lineweaver-Burk diyagramı en küçük kareler yöntemine göre çizilerek Şekil 68'de verilmiştir. Michaelis–Menten sabitleri  $K_m$  ve  $V_m$  değeri immobilize enzim için ise 2,2 mM ve 909,09  $\mu\text{mol ONP dk}^{-1} \text{g}^{-1}$  bilye olarak belirlenmiştir.



**Şekil 68.** İmmobilize bakteri  $\beta$ -galaktosidazının substratı (ONPG) hidrolizinde sabitlerin belirlenmesi için lineer grafik

#### 4.6. Küflerden $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu

Optimizasyon çalışmaları, aşılama miktarı, şeker çeşidi, katı ortam çeşidi ve kültür çeşidinin tepkiler ( $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi, biyokütle ve toplam spor sayısı) üzerine etkilerini belirlemek için Yüzey Merkezli Merkezi Karma Deney Tasarımı kullanılmıştır. Tepki değişkenleri ( $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi, biyokütle ve toplam spor sayısı) ile deneysel işlemler Tablo 6’de gösterilmiştir. Bütün üç tepkinin varyans analizi sonuçları her bir deneysel tasarım için (Tablo 37, Tablo 38 ve Tablo 39) ilgili modellerin oldukça önemli olduğunu göstermiştir.  $R^2$  değerleri deneysel ve tahmin edilen değerler arasında iyi bir uyum olduğuna işaret etmiştir. “Tahmin edilen  $R^2$ ” değerleri “Uyarlanmış  $R^2$ ” değerleri ile uyum içinde bulunmuştur.

**Tablo 37.** Küf enzimi aktivitesi için Varyans Analizi sonuçları (U/ g katı substrat)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler	Değer	Olasılık > F	
Model	14,95	4	3,74	33,76	< 0,0001	Önemli
A-Aşılama Oranı	0,013	1	0,013	0,11	0,7389	
B-Kültür	0,90	1	0,90	8,12	0,0111	
C-Katı besiyeri	12,12	1	12,12	109,52	< 0,0001	
D-Şeker	0,69	1	0,69	6,25	0,0229	
Artık Hata	1,88	17	0,11			
Uyumsuzluk	1,51	12	0,13	1,70	0,2907	önemli değil
Salt hata	0,37	5	0,074			
Toplam	16,83	21				

**Tablo 38.** Biyokütle için Varyans Analizi sonuçları (g/L)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler	Değer	Olasılık > F	
Model	24,79	4	6,20	4,29	< 0,0140	Önemli
A-Aşılama Oranı	2,95	1	2,95	2,05	0,1708	
B-Kültür	0,022	1	0,022	0,015	0,9036	
C-Katı besiyeri	5,19	1	5,19	3,59	0,0752	
D-Şeker	15,80	1	15,80	10,94	0,0042	
Artık hata	24,56	17	1,44			
Uyumsuzluk	21,54	12	1,79	2,97	0,1187	önemli değil
Salt hata	3,02	5	0,60			
Toplam	49,35	21				

**Tablo 39.** Toplam spor için Varyans Analizi sonuçları

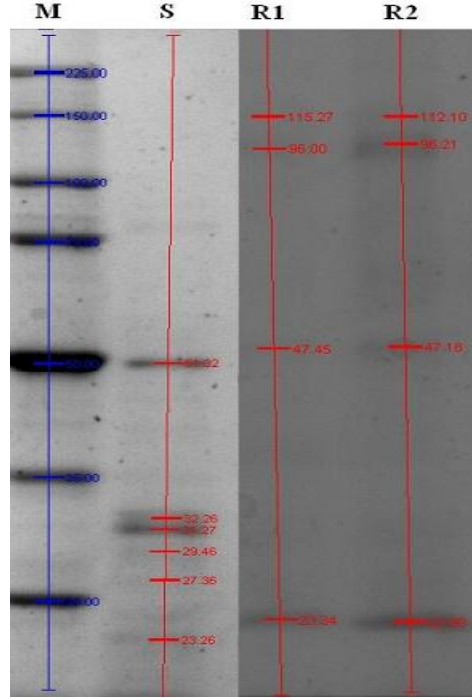
Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler	Değer	Olasılık > F	
Model	3,434E-008	4	8,585E-009	10,50	< 0,0002	önemli
A-Aşılama Oranı	1,352E-010	1	1,352E-010	0,17	0,6893	
B-Kültür	2,983E-008	1	2,983E-008	36,50	0,0001	
C-Katı besiyeri	5,029E-010	1	5,029E-010	0,62	0,4436	
D-Şeker	1,416E-009	1	1,416E-009	1,73	0,2055	
Artık hata	1,389E-008	17	8,173E-010			
Uyumsuzluk	9,266E-009	12	7,722E-010	0,83	0,6335	önemli değil
Salt hata	4,628E-009	5	9,257E-010			
Toplam	4,823E-008	21				

Merkezi Karma Tasarım (Tablo 6) sonuçlarına göre en yüksek  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi (9,05 U/g katı besiyeri) mısırözü küsperi ile elde edilmiş ancak en yüksek spor üretimi ise mısır kırığıyla gözlenmiştir.

#### 4.6.1. *Rhizomucor meihei* 'den Elde Edilen $\beta$ -galaktosidaz'ın Saflaştırma ve İmmobilizasyon Sonuçları

Küflerden  $\beta$ -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasının ilk basamağında, ham enzim ekstraktı % 90 amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C'de

10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılmış ve pelet, tampon çözelti (sitrato-fosfat tamponu, pH 4,8) ile çözündürülmüştür. Elde edilen enzim örneği daha sonra fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen enzim örneğinde protein ve aktivite tayinleri yapılmış ve protein miktarı 0,138 mg/ml, enzim aktivitesi 0,0381 U/ml olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzim ve ham ekstrakt SDS-PAGE profilleri elektroforez yöntemi ile görüntülenmiş olup Şekil 69'da verilmiştir.



**Şekil 69.** Küf  $\beta$ -galaktosidaz ekstraktlarının SDS-PAGE profilleri: M, marker proteini; S, standart  $\beta$ -galaktosidaz (*Kluyveromyces lactis*); R1, ham ekstrakt; R2, amonyum sülfat çöktürmesi

Şekil 69'dan görüleceği üzere, standart olarak kullanılan maya enzimi ile projemizde üretilen küf enziminin molekül ağırlıkları birbirinden farklıdır. Ham enzimin konsantrasyonu çöktürme ile artırılmıştır.

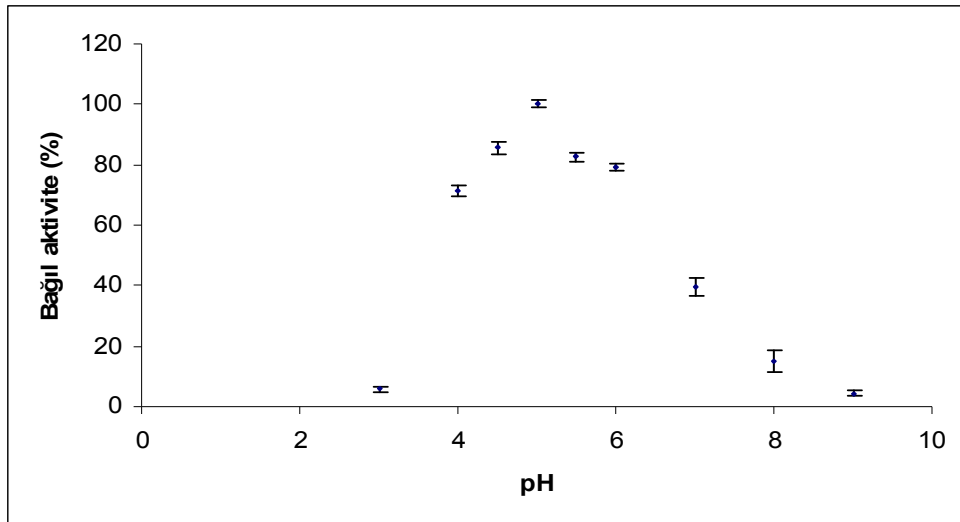
Gluteraldehit ile aktivasyon işleminden sonra aktifleştirilmiş 1,5 g kitosan-hidroksiapatit boncukları üzerine 5,0 mL enzim çözeltisi ilave edilmiş orbital karıştırıcı ile 20 °C sıcaklıkta 4 saat süreyle immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra immobilize enzim tampon çözelti ile süzüntüde protein kalmayınca dek yıkanmıştır. Immobilizasyon sonrası üst fazda protein ve aktivite tayini yapılmıştır.

İmmobilizasyon öncesi çözeltilerde 411,11 µg protein, immobilizasyon sonrası üst fazda 3,703 µg protein bulunmuştur. Buna göre proteinin % 99,09'u boncuklarda tutuklanmıştır. Ancak immobilize boncuk ve immobilizasyon sonrası üst fazdaki spesifik enzim aktiviteleri sırasıyla 2,469 ve 54,95 U/mg protein olarak bulunmuştur. Buna göre enzimin boncuklarda çok az tutuklandığı, tutuklanan proteinin, safsızlık proteinleri olduğu sonucuna varılmıştır. Bunu nedeni tutuklama maddesinin yüzeyindeki yüklü gruplar ile bağlanması istenen enzimin, safsızlık proteinleri ile arasındaki rekabettir. Dolayısıyla enzimin tutuklama maddesine bağlanma verimliliğinin azaldığı gözlenmiştir (Chen ve ark. 2003). İmmobilize edilen küf enzimlerinde tekrar kullanılabilirlik nitelikleri enzimin kitosan-hidroksiapatit destek materyaline tutunma kapasitesinin çok düşük olması nedeniyle incelenememiştir.

#### 4.6.2. *Rhizomucor meihei* 'den Elde Edilen β-galaktosidaz'ın Karakterizasyonu

##### 4.6.2.1. pH Değerinin β-galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi

*Rhizomucor meihei*'den elde edilen ham β-galaktosidaz aktivitesine pH'nın etkisi araştırılmış ve Şekil 70'de gösterilmiştir. Enzim için optimum pH değeri pH 5 olarak bulunmuştur.

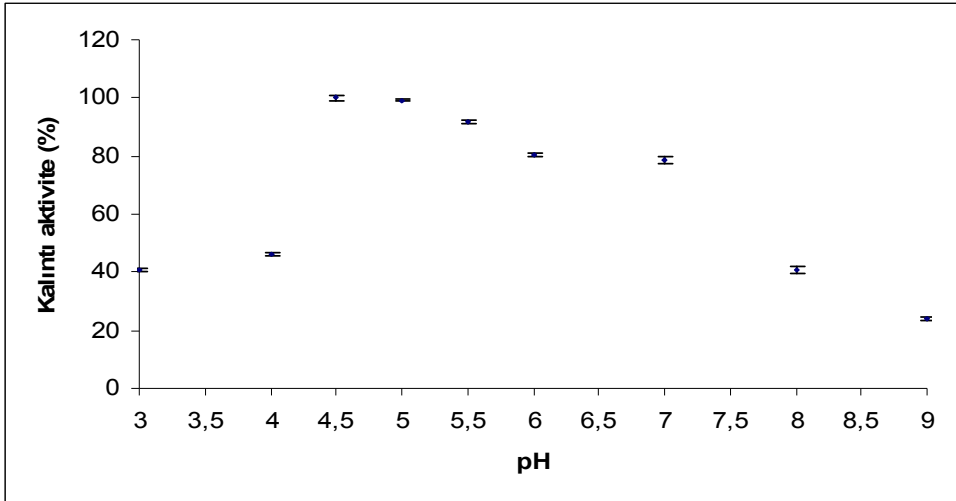


Şekil 70. Ham küf β-galaktosidazının aktivitesi üzerine pH değerinin etkisi



60 °C'deki pH stabilite grafiği Şekil 71'de gösterilmiştir. Enzim esas olarak 4,5-6 pH aralığı üzerinde % 80-90 oranında kararlı olarak bulunmuştur.

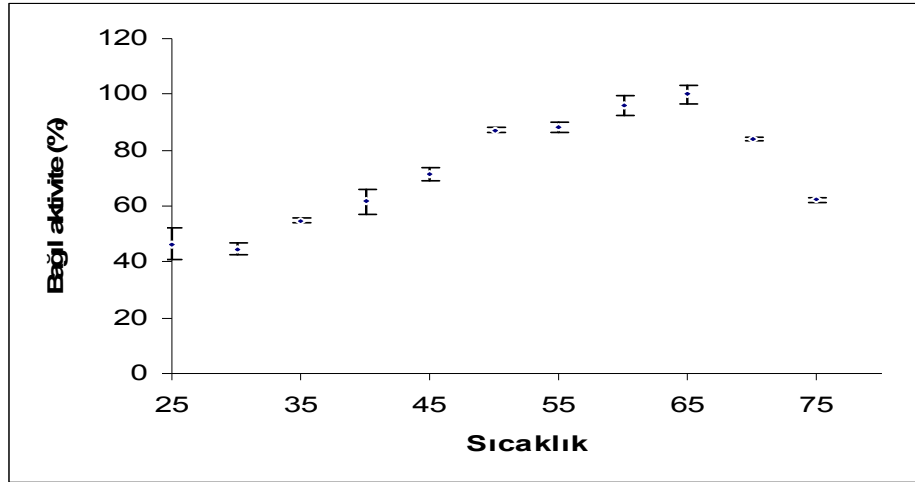
Belirtilen özelliklerinden dolayı bu enzim yüksek asitli ürün uygulamaları ve ilaç preparatları için potansiyel bir aday olarak kabul edilebilir.



**Şekil 71.** Ham kf -galaktosidazının stabilitesi üzerine pH değerinin etkisi

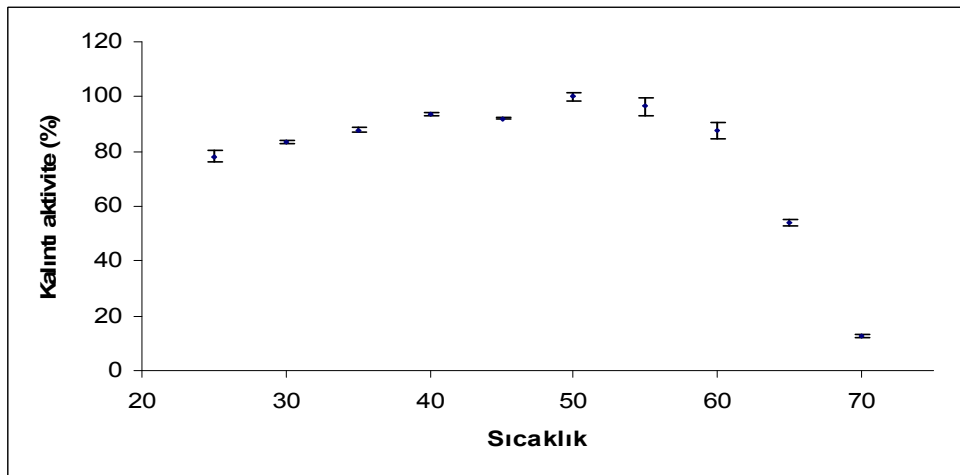
#### 4.6.2.2. Sıcaklığın -galaktosidaz'ın Aktivitesi ve Stabilitesi zerine Etkisi

*Rhizomucor meihie*'den elde edilen -galaktosidaz'ın optimum sıcaklığının 60 °C olduğu bulunmuştur. Bu enzim 55-65 °C arasında aktivitesinin % 90-100'n korumuŐtur (Şekil 72). Bazı literatür çalışmalarında benzer bulgular rapor edilmiştir. Örneğin Shaikh ve ark. (1999) *Rhizomucor* türlerinden elde edilen -galaktosidaz'ın optimum sıcaklığını 60 °C olarak bulmuŐtur.



**Şekil 72.** Ham küf β-galaktosidazının aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

Isıl stabilite; bir enzimin, substratların yokluğunda ısıl yapı bozulmalarına gösterdiği direnç kabiliyeti olarak tanımlanır (Bhatti ve ark. 2006). *Rhizomucor meihei*'den elde edilen ham β-galaktosidaz'ın ısıl stabilitesi, 25 °C'den 70 °C'e kadar değişen çeşitli sıcaklıklarda enzimin 30 dakika boyunca inkübe edilmesinden sonra kalan aktivitenin ölçülmesi ile belirlenmiştir. Şekil 73'de gösterildiği gibi, β-galaktosidaz enzimi 40-60 °C arasındaki sıcaklıklarda stabildir. Bununla birlikte, 65 °C'de enzimlerin inkübasyonundan sonra, β-galaktosidaz aktivitesi % 45,75'e düşmüştür ve ham ekstrap 70 °C'de aktivitesinin % 90'ını kaybetmiştir.



**Şekil 73.** Ham küf β-galaktosidazının stabilitesi üzerine sıcaklık etkisi

#### 4.6.2.3. Kinetik Sabitlerin Hesaplanması

*Rhizomucor meihei*'den üretilen  $\beta$ -galaktosidaz enziminin pH 4,8 ve 60 °C'de o-nitrofenil- $\beta$ -D galaktopiranozid'i (ONPG) hidroliz etmesi için gerekli kinetik parametreleri, Lineweaver Burk grafiği kullanılarak bulunmuştur. Hidroliz olan ONPG için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri hesaplanmıştır.  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla 1,42 mM ve 4,84  $\mu$ mol/dk olarak bulunmuştur.

Yapay substratlar için *Aspergillus fonsecaeus* (Gonzales ve ark. 1991) ve *M. pusillus* (Cavaille ve Combes 1995)' dan elde edilen enzimlerin kullanılması durumunda enzim benzer bir karakter göstermiştir.  $K_m$  değerleri aynı zamanda, diğer mantar kaynaklarından olan  $\beta$ -galaktosidaz'ın kullanıldığı durumdaki  $K_m$  değerleri ile de kıyaslanabilir (Fischer ve ark. 1995, Berger ve ark. 1997).

## 5. SONUÇLAR

Çalışmanın ilk aşamasında Bursa ve Düzce-Bolu bölgesinden toplanan çeşitli peynir ve süt ürünlerinden maya suşlarının izolasyonu ve tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan ve izole edilen 73 adet maya türleri fenotipik ve genotipik karakterizasyonu yapıldığında en yaygın olanının % 24,3 sıklıkla bulunan *K. marxianus* türü maya olduğu görülmüştür. *P. fermentans* ve *C. colliculosa* türlerinin ise %18,9 sıklıkla görülebilen ikinci en yaygın maya türleri olduğu bulunmuştur. Daha az frekansta bulunmakla birlikte (%16,2) *K. lactis* türlerinin de araştırmalarımızda kullanılan süt ürünlerinde sıklıkla rastlanabilecek bir maya türü olduğu tespit edilmiştir. Genellikle süt ürünlerinde sık rastlanabilen bu maya türlerine ek olarak daha az frekansta olmakla birlikte başka maya türlerine de rastlanmıştır. İzole edilen maya suşlarının laktaz aktiviteleri belirlenmiştir. *K. lactis* suşlarının hem logaritmik ve hem de durağan fazda önemli miktarlarda laktaz biyosentezi yapabildikleri belirlenmiştir. *C. albidus*'da laktaz aktivitesinin hem logaritmik ve hem de durağan fazda *Kluyveromyces* türlerine göre çok düşük olduğu bulunmuş, *K. marxianus*'da ise laktaz aktivitelerinin suşlar arasında önemli değişiklikler gösterdiği görülmüştür. *K. marxianus*'un MY15 suşunda laktaz aktivitesi diğer *K. marxianus* suşlarına göre yaklaşık 2 kat daha fazla olarak ölçülmüştür. Bununla birlikte daha önce tanımlanan ve standart suş olarak araştırmamızda kullanılan *Kluyveromyces* cinslerine göre projede saflaştırılan *K. marxianus* türlerinde laktaz aktivitelerinin ortalama olarak 2 veya 3 kat daha düşük olduğu görülmüştür. Yüksek laktaz aktivitesine sahip olan maya suşları kataloglanmış, ileride yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere koruma altına alınmışlardır. *K. lactis* suşlarına ek olarak biokontrol mayalar olarak meyvelerin korunmasında da kullanılan üç yeni *Metschnikowia pulcherrima* türü maya da izole edilmiştir. İzole edilen *M. Pulcherrima* türlerinin antimikrobiyal özellikleri de karakterize edilmiştir.

Projemizde mayalardan laktaz enzimi üretimi, saflaştırılması ve immobilizasyonu çalışmaları standart suşlardan olan *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sözkonusu suş kullanılarak  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretimi çalkalamalı karıştırıcı ve karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Çalkalamalı karıştırıcı sisteminde en yüksek spesifik enzim aktivitesi ( $4218,4 \text{ U g}^{-1}$ ) pH 7,35, karıştırma hızı 179,2 rpm, başlangıç substrat konsantrasyonu 24,9 g/l ve fermentasyon süresi 50,9 saatte bulunmuştur. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde ise enzim üretimi için belirlenen optimum koşullar, havalandırma hızı 2,21

vvm, karıştırma hızı 173,3 rpm, başlangıç substrat konsantrasyonu 33,84 g/l ve fermentasyon süresi 23,96 saattir. Bu optimum koşullarda, maksimum spesifik enzim aktivitesi 4566,5 U g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Sonuç olarak CYY'nin, β-galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonunda ve proses parametreleri arasındaki interaksiyon etkilerinin belirlenmesinde başarı ile kullanılabileceği belirlenmiştir.

*Kluyveromyces lactis*'den elde edilen ham β-galaktosidaz enzimi için optimum pH değeri pH 7,5, enzimin % 90-99 oranında kararlı olduğu pH aralığı ise 6,0-7,5 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık ise 37 °C, enzimin aktivitesinin % 84-100'ünü koruduğu sıcaklık aralığı ise 30-37°C arasında olduğu bulgulanmıştır. *Kluyveromyces lactis*'den üretilen β-galaktosidaz enziminin pH 6,5 ve 37 °C'de K<sub>m</sub> ve V<sub>m</sub> değerleri sırasıyla 34,06 mM ve 344 μmol/dk g bilye olarak bulunmuştur. *Kluyveromyces lactis*'den elde edilen enzimin immobilizasyon işlemi sonucunda kompleks maddeye tutunan enzim miktarı 21,3 μg enzim/g bilye olarak belirlenmiştir.

Ticari β-galaktosidaz enzimi de kitosan-hidroksiapatit kompleksine immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimin pH stabilitesinin serbest enzime göre 0,5 ünite kayma gösterdiği belirlenmiştir. Sıcaklık stabilitesinin ise serbest enzime göre değişmediği belirlenmiştir. İmmobilize enzim için kinetik parametreler olan Michaelis–Menten sabitleri K<sub>m</sub> ve V<sub>m</sub> değeri sırasıyla serbest enzim için 1,011 mM ve 1098,9 μmol ONP min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein, ve immobilize enzim için ise 9,5 mM ve 454,5 μmol ONP min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak belirlenmiştir.

Toroslardan toplanan yoğurt örneklerinden izole edilen 179 mikroorganizma saflaştırılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda 37 kok şeklinde, Gram pozitif, katalaz negatif organizmanın *Streptococcus thermophilus* olduğu; 49 çubuk şeklinde, Gram pozitif, katalaz negatif organizmanın ise *Lactobacillus bulgaricus* olduğu tahmin edilmiştir. İleri düzeydeki moleküler karakterizasyon sonucunda tanımlanan *Lactobacillus delbrueckii* suşları için β-galaktosidaz ve peptidaz genlerinin karakterizasyonu PZR-RFLP analizleri ile yapılmıştır. Sonuç olarak RAPD-PZR metodu *L. delbrueckii* alttür *bulgaricus* suşlarının tiplendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Yöntem kolay ve hızlıdır, ancak tekrarlanabilir deney koşulları elde edebilmek ve kontaminasyon probleminden kurtulmak için standardize bir yöntem kullanılması gerekmiştir.

Çalışılan metodların dendrogramları karşılaştırıldığında β-galaktosidaz gen dizilemesinin 600 nükleotidde 8 farklılık olduğunu göstermiştir. Bu oran ise %1,3 oranında bir polimorfizmi işaret etmiştir. Elde edilen dendrogramlar karşılaştırıldığında ise RAPD-PZR

dendrogramının  $\beta$ -galaktosidaz gen dizilimi dendrogramına kıyasla suşların tiplendirilmesi düzeyinde oldukça iyi ayırım yapabildiği gözlenmiştir.

İzole edilen ve tanımlanan laktik asit bakteri suşları laktaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve immobilizasyonunda kullanılmıştır.  $\beta$ -galaktosidaz *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürlerinden yüksek verimlilikle üretilmiştir. Tam faktöriyel istatistiksel tasarım, *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürleri için ayrı ayrı kullanılmıştır. Bakteriler arasında *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* 77 ve *Streptococcus thermophilus* 95/2 suşlarının yüksek  $\beta$ -galaktosidaz ve laktik asit üretme potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Karakterizasyon çalışmaları, yerel floradan izole edilen gıda kaynaklı bu termofil laktik asit bakterilerinden elde edilen enzimlerin gıdalarda kullanılabilir ve termostabil olarak ele alınabileceğini göstermiştir. *Lactobacillus delbrueckii* alttür *bulgaricus* 77'den elde edilen enzimin immobilizasyon işlemi sonucunda kompleks maddeye tutunan enzim miktarı 46,29  $\mu\text{g}$  enzim/g bilye olarak belirlenmiştir.

*Rhizomucor meihei* ve *Rhizomucor pusillus* ile  $\beta$ -galaktosidaz üretimleri gerçekleştirilmiş ve en yüksek  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi (9,05 U/g katı besiyeri) *Rhizomucor meihei* ile mısırözü küspesi kullanılarak, en yüksek spor üretimi ise *Rhizomucor pusillus* ile elde edilmiştir. Modellerin uygunluğunu doğrulamak için, tahmin edilen optimum koşullarda dört kere tekrarlanan toplam üç doğrulama deneyi gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar deneysel ve tahmin edilen değerlerle iyi bir ilişki içinde bulunmuştur.

Bu amaçla D-Optimal istatistiksel deney tasarımı kullanılmıştır ve faktörler, iki çeşit kültür (*Rhizomucor meihei* ve *Rhizomucor pusillus*), iki çeşit katı ortam (mısır kırığı ve mısırözü küspesi), iki farklı şeker çeşidi (laktoz ve glukoz, 5% konsantrasyonda) ve aşılama oranı  $5 \times 10^5$ - $10 \times 10^5$  toplam spordan oluşmaktadır. Kullanılan katı besi ortamının, kültür ve şeker çeşidinin  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üzerine önemli bir etkisi bulunmaktadır ( $p < 0.05$ ). En yüksek  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi (9,05 U/g katı besiyeri) mısırözü küspesi katı besi ortamı olarak kullanıldığında elde edilmiştir. Bunun yanısıra en yüksek spor üretimi mısır kırığının katı besi ortamı olarak kullanılmasıyla elde edilmiştir. *Rhizomucor meihei* küfü en yüksek enzim aktivitesine mısırözü küspesi ve laktozun besi ortamı olarak kullanılmasıyla ve yüksek aşılama oranının kullanılmasıyla elde edilmiştir. En yüksek spor üretimi ( $7,25 \times 10^7$  toplam spor) ise *Rhizomucor pusillus* küfünün kullanıldığı durumda mısır kırığının katı besi ortamı olarak seçilmesiyle sağlanmıştır.

*Rhizomucor meihei*'den elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz immobilizasyon denemelerinde kullanılmıştır. Immobilizasyon öncesi çözeltide 411,11  $\mu\text{g}$  protein, immobilizasyon sonrası üst fazda 3,703  $\mu\text{g}$  protein bulunmuştur. Buna göre proteinin % 99,09' u boncuklarda tutuklanmıştır. Ancak immobilize boncuk ve immobilizasyon sonrası üst fazdaki spesifik enzim aktiviteleri sırasıyla 2,469 ve 54,95 U/mg protein olarak bulunmuştur. Buna göre enzimin boncuklarda çok az tutuklandığı, tutuklanan proteinin, safsızlık proteinleri olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- ADAM, A. C., Rubio-Teixeira, M., Polaina J., Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 553-557, (2004).
- AMBERG D. C., Burke D. J., Strathern J. N., *Methods in Yeast Genetics*, 2005 Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA., (2005).
- ANDRIGHETTO, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* , 30, 5-9, (2000).
- ANONYMOUS, Lactase ( $\beta$ -galactosidase) Activity, *Food Chemicals Codex*, 3<sup>rd</sup> ed. National Academy Press, Washington, D.C., (1993), Pp: 491.
- ATTFIELD, P.V., Stress tolerance: The key to the effective strains of industrial bakers yeast, *Nature Biotechnology*, 15, 1351-1357, (1997).
- BARAN, T., Arica, Y., Denizli, A., Hasric, V., Comparison of  $\beta$ -galactosidase immobilization by entrapment in and adsorption on poly membranes (2-hydroxyethylmethacrylate). *Polymer International*, (1997).
- BARBERIS, S., Segovia, R., Maximum volumetric production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis* in fed-batch culture with automatic control, *J Chem Technol Biotechnol*, 77, 706-710, (2002).
- BAYRAMOGLU, G., Tunali, Y., Arica, M.Y., Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor, *Catalysis Communications*, 8, 1094-1101, (2007).
- BECERRA M., Siso M. I. G., Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations. *Enzyme Microbial Technol.*, 19, 39-44, (1996).
- BERGER, J. L., Lee, B. H., Lacroix C., Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass  $\beta$ -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25, 29-41, (1997).
- BHATTI, H. N., Asgher, M., Abbas, A., Nawaz R., Sheikh, M. A., Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*, *J. Agric. Food Chem.* 54, 4617-4623, (2006).
- BOLTIN-FUKUHARA M., vd., Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett.*, 487, 66-70, (2000).
- BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-254, (1976).



- BRADY, D., Marchant, R., McHale, L., McHale, A.P., Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media, *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 696-699, (1995).
- BREUNIG, K.D., Glucose repression of LAC gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. *Mol Gen Genet.*, 216, 422-427, (1989).
- BURY, D., Jelen, P., Kalab, M., Disruption of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science and Technology* 2,23-29, (2001)
- BÜYÜKKİLEÇİ, A.O., Harsa, S. Batch production of L(+) lactic acid from whey by lactobacillus casei (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79,1036-1040, (2004).
- CAPECE, A., Salzano, G., Romano, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non *Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiology*, 84,33-39, (2003).
- CARLSON M., Botstein D., Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 28, 145-154, (1982).
- CARLSON M., Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 202-207, (1999).
- CAVAILLE, D., Combes, D., Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biotechnology and Applied biochemistry*, 22, 55-64, (1995).
- CELENZA, J. L., Carlson, M., Cloning and genetic mapping of *SNF1*, a gene required for expression of glucose repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 49-53, (1984).
- CODON A.C., Benitez T., Korhola M., Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 154-163, (1998).
- COPPOLA, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G., Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area, *Journal of Dairy Research*, 73, 264-272, (2006).
- CORSETTI, A., De Angelis, M., Dellaglio, F., Paparella, A., Fox, P.F., Settanni, L., Gobbetti, M., Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 641-654, (2003).
- CORTES, G., Trujillo-Roldan ,M. A., Ramirez, O.T., Galindo, E., Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension, *Process Biochemistry*, 40, 773-778, (2005).

- DE VRIES, R. P., Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61, 10-20, (2003).
- DICKSON, R. C., Markin J. S., Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, 142, 777-785, (1980).
- DOMINGUES, L., Lima N., Teixeira, J. A., *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase production by yeast in a continuous high density reactor, *Process Biochem.*, 40, 1151-1154, (2005).
- DONG, J., Dickson R. C., Glucose repression the lactose-galactose regulon in *kluyveromyces lactis* through a SNF1 and MIG1-dependent pathway that modulates galactokinase (GAL1) gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3657-3664, (1997).
- DROBY, S., Chalutz E., Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. *In: Biological Control of Postharvest Diseases-Theory and Practice.* Ed: Wilson, C. L. Ve Wisniewski M. E., CRC Press, Boca Raton, Florida, (1994).
- EL-MASRY, M.M., Maio, A. De, , Abd El-Latif, Z.H., Portaccio, M., Bencivenga, U., Mita, D.G., Influence of the immobilisation process on the activity of  $\beta$ -galactosidase bound to nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate Non-isothermal behaviour, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16:191–204, (2001).
- Erlandson, K.A.; Park, J.; El Khal, W.; Kao, H.; Brydges, S.; Basaran, P.; Batt, C.A. Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3974-3980, (2000).
- ESPINEL-INGROFF, A., Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* 25, 101-106, (2008).
- FADDA, M. E., Cosentino S., Deplano M., Palmas F., Yeast populations in Sardinian feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 153-156, (2001).
- FADDA, M.E., Mossa V., Pisano M.B., Deplano M., Cosentino S., Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 95, 51-59, (2004).
- FEKETE, E., Karaffa, L., Sandor, E., Seiboth, B., Biro, Szentirmai, A., Kubicek, C. P., Regulation of formation of the intracellular  $\beta$ -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* 179, 7-14, (2002).
- FIEDUREK, J., Szczodrak, J., Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Acta Microbiol Polonica*, 43, 57-65, (1994).
- FISCHER, L., Scheckermann, C., Wagner, F., Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1497–1501, (1995).

- FLORES M. V., Voget C. E., Ertola R. J. J., Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme Microb Technol.*, 16, 340-346, (1994).
- FORTINA, MG., Ricci, G., Mora, D., Parini, C., Manachini, PL. (2001). Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. *FEMS Microbiology Letters*. 198: 85-89.
- FUKUHARA H., *Kluyveromyces lactis*, a retrospective. *FEMS Yeast Research*, 6, 323-324, (2006).
- FURLAN, S.A., Schneider, A.L.S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M.F., Jonas, R., Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of  $\beta$ -D-Galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free medium, *ACTA Biotechnologica*. 21, 57-64, (2001).
- FURLAN, SA., Schenier, ALS., Merkle, R., Carvalho-Jonas, MF., Jonas, R., Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of  $\beta$ -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, 22, 589-593, (2000).
- GANGA, MA., Martinez, C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Applied Microbiol.* 96: 76-83.
- GARVIE, E.I. Taxonomy and Identification of Bacteria Important in Cheese and Fermented Dairy Products. In: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, ed: F. Lyndon Davies ve Barry A. Law, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., England, (1984), Pp: 35-67.
- GECIOVA, J., Bury, D., Jelen, P., Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry- a review, *International Dairy Journal*, 12, 541-553 (2002).
- GEKAS, Lopez-Leiva, Hydrolysis of lactose. A literature review. *Process Biochemistry*. 20, 2-12 (1985).
- GEORIS I., Cassart J.-P., Breunig K. D., Vandenhoute., Glucose repression of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene *KLINVI* does not require Mig1p. *Mol. Gen. Genet.*, 261, 862-870, (1999).
- GHOSE, T., Measurement of cellulase activities, *Commission on Biotechnology*, 2-3, (1984).
- GIRAFFA, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D., Neviani, E., Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes, *International Journal of Food Microbiology*, 82, 163-172, (2003).
- GODDARD, J. M., Talbert, J. N., Hotchkiss, J. H., Covalent Attachment of lactase to low density polyethylene films, *Journal of Food Science* 72, 36-41, (2007).
- GÖDECKE, A., Zachariae W., Arvanitidis A., Breunig K. D., Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and  $\beta$ -galactosidase genes is achieved by interaction

of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 Kbp divergent promoter. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5351-5358, (1991).

GOFFRINI, P., Ficarelli A., Ferrero I., Hexokinase activity is affected in mutants of *Kluyveromyces lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology*, 141, 441-447, (1995).

GOLDSTEIN A., Lampen. J. O.,  $\beta$ -D-Fructofuranoside Fructohydrolase from yeast. *Methods in Enzymol.* 42c, 504-511, (1975).

GONZALES, R.R., Monsan, P., Purification and some characteristics of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*, *Enzyme Microb. Technol.* 13, 349-352, (1991).

GREENBERG, N.A., Mahoney, R.R., Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Food Science*, 47, 1824-1828, (1982).

GUARENTE, L., Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, 101, 181-191, (1983).

İSMAIL, S.A., Mabrouk, S.S., Mahoney, R.R., Purification and Characterization of Beta-galactosidase From *Mucor pusillus*. *Journal of Food Biochemistry* 21, 145-162, (1997).

JANISIEWICZ, W. J., Tworkoski T. J., Kurtzman C.P., Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple, *Phytopathology*, 91, 1098-1108, (2001).

JIANG, T., Mustapha, A.; Savaiano, D.A. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* 79: 750-757, (1996).

JURADO, E., Camacho, F., Luzon, G., Vicaria J. M., A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme and Microbiol. Technol.* 31, 300-309, (2002).

KARA, F., Release and Characterisation of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (2004).

KENNY, O.M., Fitzgerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T.P., Jordan, K.N., Comparative analysis of the autolytic potential of *Lactobacillus helveticus* strains during Cheddar cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*, 58, 207-213, (2005).

KIM, J.W., Rajagopal, S.N., Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*, *Folia Microbiology*, 45, 29-34, (2000).

KLUYVER, A., Van Der Walt, J.P., Van Triet, J., Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 39, 583-593, (1953).

KONDO, A., Liu, Y., Furuta, M., Fujita, Y., Matsumoto, T., Fukuda, H., Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 806-811, (2000).

- KRISTO, E., Biliaderis, C.G., Tzanetakis, N., Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology, *Food Chemistry*, 83, 437-446, (2003).
- KURTZMAN, C.P., Fell J. W., The Yeasts, A Taxonomic Study. Fourth Revised and Enlarged Edition. Elsevier Science BV. Amsterdam, The Netherland, (2000).
- KURTZMAN, C.P., Robnett C. J., Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DAN partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 331-371, (1998).
- LACHANCE, M. A., Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Research*, 7, 642-645, (2007).
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (London), 227: 680-682 pp.
- LEE, Y. J., Kim, C. S., Oh, D. K., Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 787-793, (2004).
- LEVIN, R.E., Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis to *Listeria monocytogenes*: A review of methodology and results, *Food Biotechnology*, 17, 217-236, (2003).
- LIN, M.Y., Savaiano, D.A., Harlander, S., Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on maltose maldigestion in humans. *J. Dairy Sci.* 74, 87-95, (1991).
- LINKO, S., Enwald, S., Zhu, Y. H., Mayna-Makinen, A., Production of  $\beta$ -galactosidase by *Streptococcus salivarius alttär thermophilus* 11F, *J. Indust. Microbiol. & Biotechnol.* 20, 215-219, (1998).
- LIU, D.L., Yao, D.S., Liang, Y.Q., Zhou, T.H., Song, Y.P., Zhao, L., Ma L., Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillariella tabescens* (E-20), *Food and Chemical Toxicology*, 39, 461-466, (2001).
- LOPANDIC K., Zelger S., Banszky L. K., Eliskases-Lechner F., Prillinger H., Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.*, 23, 341-350, (2006).
- LOWRY, O.H.; Rosebrough, J.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, (1951).
- MacFARLANE, G. T., Steed H., S. Macfarlane S., Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 305- 344, (2008).
- MACIUNSKA, J., Czyn, B., Synowiecki, J., Isolation and some properties of  $\beta$ -galactosidase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilu.* *Food chemistry*, 63, 441-445, (1998).

MARTINS, D. B. G., Souza, C. G., Simões, D. A., Morais, M. A., The  $\beta$ -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose, *Current Microbiology*, 44, 379-382, (2002).

MILLS, D.A., Johannsen E.A., Cocolin L., Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884-4893, (2002).

MONTANARI, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Benevelli, M., Chiavari, C., Release of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacilli*, *Food Technol. Biotechnol.*, 38, 129-133, (2000).

NAGY, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., Biro, S.,  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. *Protein Expression and Purification*, 21, 24-29, (2001).

NANCIP, N., Ghoul, M., Larous, L., Nancib, A., Adimi, L., Remmal, M., Boudrant, J., Use of date products in production of the thermophilic dairy starter strain *Streptococcus thermophilus*, *Bioresource Technology*, 67, 291-295, (1999).

National Academy of Sciences, *Food Chemicals Codex* (4<sup>th</sup> ed.) National Academy Press, Washington, DC., (1996). Pp.802-803.

NUMANOĞLU, Y., Sungur, S.,  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system, *Process Biochemistry*, 39, 703-709, (2004).

NGUYEN, QD., Rezessy-Szabo JM., Claeysens, M., Stals, I., Hosche, A. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC34626. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 345-352, (2002).

PANESAR, R., Panesar, P. S., Singh, R. S., Kennedy, J. F., Bera, M. B., Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells, *Food Chemistry*, 101, 789-790, (2007).

PAPAYANNAKOS, N., Markas, G., Kekos, D., Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *The Chemical Engineering Journal*. 52, B1-B12, (1993).

PARK, P. K., Kim, E. Y., Chu, K. H., Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments, *Separation and Purification Technology*, 53, 148-152, (2007).

PEREZ, T., Albornoz, J., Dominguez, A., An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature, *Molecular Ecology*, 1347-1357, (1998).

PESSELA, Benevides C.C., Fuentes, M., Mateo, C. Munilla, R., Carrascosa, A.V., Lafuente, L. F., Guisan, J. M., Purification and very strong reversible immobilization of large proteins on anionic exchangers by controlling the support and the immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 909-915, (2006).

- PINHEIRO, R., Belo, I., Mota, M., Growth and beta-galactosidase activity of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology*. 37, 438-422, (2003).
- QIN G., Tian S., Xu Y., Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 51-58, (2004).
- RAJOKA, M. I., Khan, S., Shahid, R., Kinetics and regulation studies of the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates, *Food Technology and Biotechnology*, 41, 315-320, (2003).
- RAO, D.R. (1997). Oral supplements to improve lactose digestion and tolerance. *Food Sci. and Tech. Int.* 3 (2): 87-92.
- RECH, R., Cassini, C. F., Secchi, A., Ayub, M. A. Z., Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, 91-96, (1999).
- ROSETTI, L., Giraffa, G., Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases, *Journal of Microbiological Methods*, 63, 135-144, (2005).
- ROTHER C., Lehle L., Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal recognition particle. *Eur. J. Biochem.* 252, 16-24, (1998).
- ROY, I., Gupta, N.M. Lactose hydrolysis by Lactozym TM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Bioch.*, 39, 32-332, (2003).
- RUBIO-TEXEIRA, M., Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol. Adv.*, 24, 212-225. (2006).
- SAMOSHINA, N. M., Samoshin, V. V., The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast)  $\beta$ -Galactosidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 239-251 (2005).
- SANCHEZ, I., Sesena, S., Poveda, J.M., Cabezas, L., Palop, L., Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 102: 355– 362, (2005).
- SAROKIN L., Carlson M., Upstream region of the SUC2 gene confers regulated expression to a heterologous gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 10, 2521-2526, (1985).
- SCHAFFRATH R., Breunig K.D., Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.*, 30, 173-190, (2000).
- SHAIKH, S. A., Khire, J. M., Khan, M. I., Characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochimica et Biophysica Acta* 1472, 314-322, (1999).

- SHAIKH, S. A., Khire, J. M., Khan, M. I., Production of  $\beta$ -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 239-245, (1997).
- SHULER, M. L., Kargi, F., *Bioprocess Engineering Basic Concepts 2nd ed.*, (Prentice Hall, Upper Saddle River), (2002), Pp. 57.
- SIPINCZKI M., *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6716-6724, (2006).
- SISO M., Beta-galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Process Biochem.*, 29, 565-568, (1994).
- SOMKUTI, GA., Halsinger, VH. (1997) Microbial technologies in the production of low-lactose dairy foods. *Food Sci. and Tech. Int.*, 3(3): 163-169.
- SONG, D. D., Jacques, N. A., Cell Disruption of *Escherichia coli* by Glass Bead Stirring for the Recovery of Recombinant Proteins, *Analytical Biochemistry*, 248, 300–301, (1997).
- SYNOWIECKI, J., Macimska, J., Scbisz, M., Stability and properties of a thermostable  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitin, *Journal of Food Biochemistry* 24, 299-310, (2000).
- SZCZODRAK, J., Wiater, A., Selection of method for obtaining an active lactase preparation from *Penicillium notatum*. *J. Basic Microbiol.* 38, 71-175, (1998).
- SZCZODRAK, J., Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 10, 631-637, (2000).
- SZILAGYI A., Review Article: lactose- a potential prebiotic. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, 1591-1602, (2002).
- TANRISEVEN, A., Doğan, Ş., A novel method for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase, *Process Biochemistry*, 38, 27-30, (2002).
- TORRIANI, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. (1999). Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrückii* alttür *bulgaricus* and *L. delbrückii* alttür *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4351-4356.
- TRUMBLY R. J., Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 6, 15-21, (1992).
- TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. In *The Genera of lactic acid bacteria*, ed: B.J.B. Wood and W.H.Holzappel, Vol: 2 Chapman&Hall, UK, (1995).Pp:173-235
- TÜRKEK, S., Effects of various physiological stresses on transcription of the SUC2 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Turk J. Biol.* 24, 233-240, (2000).



USTOK, F.I., Tari, C., Gogus, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology*, 127, 322–334, (2007).

VAN OUYEN A. J. J., Dekker P., Huang M., Olsthoorn M. M.A., Jacobs D. I., Colussi P. A., Taron C. H., Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 6, 381-392, (2006).

VASILJEVIC, T., Jelen, P., Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria, *Innovative Food Sci. & Emerg. Technol.*, 2, 75-85, (2001).

VETERE, A., Paoletti, S., Separation and characterization of three  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1380, 223-231, (1998).

VOGET, C. E., Flores, M. V., Faloci, M. M., Ertola, R. J. J., Effects of the ionic environment on the stability of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 27, 324-330, (1994).

WANG, D., Shakibara, M. (1997). Lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry* 4:255-261.

WHITE, T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics., *PCR Protocols, A guide to methods and applications*, ed: Innis M.A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., Academic Press Inc. San Diego, CA., USA. (1990), Pp: 315- 322.

WITTE, M. M., Dickson R. C., The C6 zinc finger and adjacent amino acids determine DNA-binding specificity and affinity in the yeast activator protein LAC9 and PPR1. *Mol. Cell Biol.*, 10, 5128-5137, (1990).

WOLF, K., Non-conventional yeasts in Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin Germany, (1996), Pp: 139-202.

ZACHARIAE, W., Breunig K.D., Expression of transcriptional activator LAC9 (K1GAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Mol. Cell Biol.*, 13, 3058-3066, (1993).

ZACHARIAE, W., Kuger P., Breunig K.D., Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator LA1C9 (K1GAL4). *Nucl Acids Res.*, 21, 69-77, (1993).

ZENKE, F., Zachariae W., Lunkes A., Breunig K. D., Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differentially to glucose repression of galactose regulon. *Mol. Cell Biol.*, 13, 7566-7576, (1993).

ZHANG, J., Zhang, S., Wang, Y., Gao, S., Stability of  $\beta$ -galactosidase immobilized on composite microspheres of Artemisia seed gum and chitosan, *Polymer Composites* 29:9-14, (2008).

ZHOU, Q.Z.K, Chen, X.D. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde, *J. Food Eng.*, 48, 69–74, (2001).

## EKLER

### Ek 1. *K. Lactis* ve *m. Pulcherrima* Suşlarının its1-5.8s rdna-its2 Sekansları.

#### 1- Standart *K. lactis* suşu (ATCC8585).

GGGAAATAGAGAGTAATACTGGGGGATCGCTGAAATGGCCTGCGCTTAATTGCG  
CGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTCTCTCATCCTAAACACAATGGA  
GTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAAC  
ACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAA  
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGC  
GATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAAC  
CTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAG  
CCGTTGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGC  
ACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTA  
TAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATCAA  
AACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA  
TCATAAGCGGAGGAA

#### 2. *K. lactis*, MY22.

GGGAAATATGATGATAATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGC  
GCGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTCTCTCATCCTAAACACAATG  
GAGTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAA  
ACACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATT  
GCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCA  
AACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCT  
AGCCGTTGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCT  
TGCACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGC  
TTATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAAT  
CAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC  
ATATCAATAAGCGGAAGAAAA

#### 3. *K. lactis*, MY23.

GGGAAATTGATGATAATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCG  
CGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTCTCTCATCCTAAACACAATGG  
AGTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAA  
CACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTG  
CGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACAT  
TGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAA  
CCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTA  
GCCGTTGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTT  
GCACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCT  
TATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATC

AAAACCTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA  
TATCATAGGCCGGAAGAAA

**4. *K. lactis*, (MY24).**

CCCGATAATATGATGAGAGATACTGGGGGATCGCTGAAATGGCCTGCGCTTAATT  
GCGCGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAA  
TGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACAT  
AAACACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATT  
CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
TTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCTGAATCATCAAATCTTTGAACGCA  
CATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTC  
AAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGG  
CTAGCCGTTGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACT  
CTTGACATCTACCTCTTAGGTTTGCGCCAATTCCTGGTAAGCTAGGGTCAATGAG  
CTTATAAGTGTATAAAGACTCGCCTGTGTTTGTCTCCCTGAGGCCTACGGCTAAT  
TCAAACTCTCAAAGTTTGACCCTCGAATCAGGGTAGGAATACCCCCCTGAACTT  
TAAGACAAATCAATAAACCGAAAGAAAGCTTTTTTTTTCTCCGCTCGCATGCGC  
ACAATTAATAATCCCTTACTTAGAACAAACCCGGGAAACCCTTTTCCCCCGAGC  
CCGAAACAAGAGAAAAACCTTCCCTACCATTTCTTGGGGGG

**5. *K. lactis*, MY25.**

GGGAAATAGATGATAATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCG  
CGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAATGG  
AGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAA  
CACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTG  
CGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCTGTAATCATCAAATCTTTGAACGCACAT  
TGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAA  
CCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTA  
GCCGTTGCCTTCTCCCTGAACAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTG  
CACCTCTACGACTTAAGTTTGACACCAATTCGTGGTAAGCCAGGGCCAGGGGAACA  
TAACCGTTCTAATAAAGAACCCTAGGTGTTTGTCTCCCTGAGGATTCCGGATTT  
ATCCAAAACCCTCAAGGTTTGGACCCCAATCCAAGGTCGAAATACCCCCCTGGA  
ACTTAAAACCAATATAAAAAAGGCGGAAAAAAAATTTTCCCCCTGGCTGGGCC  
CACACATGGAATAGGAAATCCCAGGCAGTAAAAAAAATTGGGCAAATCCTCTTT  
CCCCAGAGCCCCCCCAGGGAAAAAACCTTCC

**6. *K. lactis*, (MY28).**

GGATAATTGATAGTGATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCG  
CGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAATGG  
AGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAA  
CACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTG  
CGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCTGTAATCATCAAATCTTTGAACGCACAT  
TGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAA  
CCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTA  
GCCGTTGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTT  
GCACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCT

TATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGGTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATC  
AAAACCTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA  
TATCAATAGNNCGGAGGAAAA

**7. *K. lactis*, (MY29).**

GGATAATTGATGANAGATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGC  
GCGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAATG  
GAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAA  
ACACAAACAACATTTTGCATTATGAAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATT  
GCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCA  
AACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTTAACTTGAAAGTGGC  
TAGCCGTTGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTC  
TTGCACATCTACGTCTTAGGTTTTCGCGCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAG  
CTTATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGGTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAA  
TCAAACCTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG  
CATATCAT

**8. *M. pulcherrima*, (UMY12).**

AAAAGGATAATATAACCTTTTAGCAAACTCTAATCTTGACCGTTTATAATTTTAT  
TTAAAAATTTTACAACGGATCTCTTTGGTCTCGCATCTATGAAAAAACACCGA  
ATTGTGATACTAATATGACTTGTGGACATGAATCATTGAATCTTTTAAAACAC  
ATTGTGCCCCGGGGGATTCCCCACGGGATGCGTGGGTGAGCGATTTTACTCTCA  
AACCTCCCGTTTGGGCCTGCGTTTGCCTAATATAAACGGGGCTCTAAAAAGTTTT  
ATACCCATTCTTTTTTCTCACCCCTCTTAAGAGTACCCGCTGAAATTTAGCATATCT  
CTAAGCGGGAGGAAAA

**9- *M. pulcherrima*, (UMY14).**

TTTGGATAATGTTTACCCTTTGGGAAAACACCTAAATCTGAATTGCTAATATATTT  
AATAAAAAAATTTCTACAACGCGATATCTCTGGTTCTCGCCATCCATGAAAAAAG  
CACCGCAATATGTGATACGCTAAATATGAGCATTGTGGACACTGAAATCATTGAA  
ATCTTTGAACGCACATTGTGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGGATGCGTGGGTGAGA  
GATATTTACTCTCAAACATCCGGGTGTTGGGTCTGCGTTCTGCCTATTATCTACG  
GCGCTAGAATAAGTTTTAGACCCATTCTTTTTCTCACCCCTCGTAAGAGAACCCGC  
TGAAATTAAGCATATCTCTAAGCGGAGGAAAA

**10- *M. pulcherrima*, (UMY15).**

TTTGATATGTTTACCCTTTAGGAAAACCTCTAATCTTAACCGTAATATCTTTAAAAA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATT  
GCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTG  
CGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATTTTACTCTCAAACC  
TCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCC  
CATTCTTTTTCTCACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG  
CGGAGGAAAA

Tablo E1. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* kültürleri için tam faktoriyel istatistiksel deney tasarımı sonuçları

Kombinasyon	Kültür	Besi ortamı	Çalkalama hızı	Biyokütle (g/l) <sup>a</sup>	Laktik Asit (g/l) <sup>b</sup>	Aktivite (U/ml) (Lizozim)	Aktivite (U/ml) (Cambilya)	Aktivite (U/ml) (Homojenizatör)
1	Lb22b	WYE	0	11	3,79	0,0246	0,0212	0,0024
2	Lb77	WYE	0	12,4	5,23	0,0238	0,0204	0,0026
3	Lb16	WYE	150	14,4	3,31	0,0194	0,0194	0,0018
4	Lb22b	S	0	112	8,72	0,1278	0,1022	0,0134
5	Lb22b	S	150	92	3,01	0,0874	0,0762	0,0098
6	Lb22b	W	0	11,4	4,62	0,0288	0,0252	0,003
7	Lb77	WMRS	150	14	3,36	0,0178	0,0148	0,0016
8	Lb16	W	150	13,2	2,44	0,0452	0,0318	0,0044
9	Lb22b	W	150	8,98	2,83	0,028	0,0262	0,0022
10	Lb16	W	0	12,1	4,8	0,0274	0,024	0,003
11	Lb77	W	150	14,4	2,5	0,0278	0,0206	0,0026
12	Lb77	W	0	18,2	4,6	0,042	0,0366	0,0042
13	Lb16	WYE	0	14,3	4,9	0,022	0,0216	0,0022
14	Lb16	WMRS	150	14	3,59	0,00672	0,0128	0,0012
15	Lb16	S	150	124,1	4,02	0,109	0,1378	0,0098
16	Lb22b	WMRS	0	16,2	4,3	0,0194	0,0184	0,0018
17	Lb16	WMRS	0	15,4	5,15	0,0172	0,0152	0,0018
18	Lb77	S	150	112	2,15	0,03	0,024	0,0028
19	Lb22b	WYE	150	21	2,02	0,022	0,024	0,0024
20	Lb77	S	0	116,7	3,71	0,24	0,186	0,024
21	Lb77	WMRS	0	16	3,7	0,0104	0,009	0,001
22	Lb16	S	0	78	4,49	0,046	0,0362	0,0048
23	Lb22b	WMRS	150	15,3	2,85	0,0112	0,0132	0,0012
24	Lb77	WYE	150	25	2,93	0,024	0,0206	0,0026

\* Kullanılan tüm besi ortamlarının bileşimleri yöntemler kısmında tablo halinde detaylı olarak verilmiştir.

Tablo E2. *Streptococcus thermophilus* kültürleri için tam faktoriyel istatistiksel deney tasarımı sonuçları

Kombinasyon	Kültür	Besiortamı	Çalkalama hızı	Biyokütle (g/l) <sup>a</sup>	Laktik Asit (g/l) <sup>b</sup>	Aktivite (U/ml) (Lizozim)	Aktivite (U/ml) (Cambilya)	Aktivite (U/ml) (Homojenizatör)
1	St 74	M1	0	9,8	7,692	0,0539	0,037	0,0043
2	St 77a	M1	150	103,5	6,082	0,6177	0,438	0,0543
3	St 95/2	M4	150	6,5	9,042	0,0192	0,0156	0,0031
4	St 95/2	M1	150	10,7	6,977	0,0612	0,0298	0,0058
5	St 77a	M1	0	20,7	7,196	0,1042	0,0603	0,0095
6	St 77a	M4	0	6,7	8,146	0,0321	0,0259	0,0035
7	St 95/2	M3	0	9,8	4,851	0,0485	0,0376	0,005
8	St 95/2	M2	0	116,3	14,439	0,739	0,5582	0,0749
9	St 77a	M3	0	18,6	5,684	0,0973	0,0705	0,0101
10	St 95/2	M1	0	24,1	5,704	0,1247	0,1026	0,0131
11	St 95/2	M3	150	7,8	5,516	0,029	0,0247	0,0028
12	St 95/2	M2	150	113	13,095	0,737	0,5792	0,0727
13	St 74	M3	0	12,8	6,769	0,0528	0,0381	0,0053
14	St 74	M3	150	9,3	5,237	0,0272	0,0202	0,0033
15	St 77a	M2	150	37,2	7,653	0,1376	0,0972	0,0142
16	St 74	M1	150	11	4,143	0,0411	0,0305	0,0041
17	St 77a	M4	150	9,7	5,909	0,0452	0,0345	0,0045
18	St 74	M2	0	41	10,86	0,2819	0,1689	0,0275
19	St 74	M4	0	38,1	11,729	0,2978	0,1844	0,0308
20	St 95/2	M4	0	18,1	6,509	0,0717	0,0458	0,0092
21	St 77a	M3	150	16,4	4,029	0,0667	0,0418	0,0071
22	St 74	M4	150	8,2	7,089	0,035	0,024	0,0035
23	St 74	M2	150	9,4	8,41	0,0251	0,0208	0,0026
24	St 77a	M2	0	125,4	9,81	0,7537	0,5471	0,0766

\* Kullanılan tüm besi ortamlarının bileşimleri yöntemler kısmında tablo halinde detaylı olarak verilmiştir.

Tablo E3. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus* 77 için optimizasyon sonuçları

İşlem No	Sıcaklık (°C)	Aşılama (%)	Süt tozu (%)	Aktivite U/ml	Biyokütle g/l	Laktik asit g/l
1	39	3	12	1,1867	58,35	7,69
2	43	3	12	1,2584	62,35	10,45
3	39	3	12	1,1791	57,5	7,62
4	35	4	16	0,1802	29,85	1,98
5	35	4	8	0,2395	32,3	6,06
6	35	2	8	0,1211	26,9	5,41
7	39	3	12	1,1854	57,5	7,65
8	39	3	12	1,1913	58,9	7,63
9	39	3	16	0,9572	49,3	4,21
10	35	2	16	0,492	39,3	1,54
11	43	2	8	0,8139	42,4	9,27
12	43	4	16	0,873	45,7	7,58
13	43	2	16	0,4572	38,8	7,99
14	43	4	8	1,3405	69,2	14,44
15	39	3	8	0,9969	50,35	8,14
16	39	3	12	1,1906	59,2	7,58
17	39	3	12	1,1833	58,6	7,61
18	35	3	12	0,5489	32,55	2,19
19	39	4	12	1,0201	57,6	8,42
20	39	2	12	0,9865	52,4	5,97



Tablo E4. *Streptococcus thermophilus* 95/2 için optimizasyon sonuçları

İşlem No	Sıcaklık (C)	Aşılama (%)	PST (%)	CSL (%)	Aktivite U/ml	Biyokütle g/l	Laktik asit g/l
1	40	3	2,5	2,5	1,7967	10,75	13,4455
2	40	3	2,5	2,5	1,8055	10,8	13,4025
3	35	3	2,5	2,5	0,485	5,15	9,8995
4	45	2	5	5	0,755	13,5	19,9165
5	40	3	2,5	2,5	1,7925	10,76	13,2865
6	45	2	5	0	0,0143	3,55	1,4945
7	35	4	0	0	0,0911	2,5	0
8	40	3	2,5	2,5	1,7649	10,78	13,355
9	40	3	5	2,5	0,964	14,55	16,6875
10	40	3	2,5	5	0,336	9,35	13,46
11	35	2	5	0	0,0111	2,95	1,05
12	35	4	5	0	0,0605	4,85	2,536
13	45	4	5	5	1,1955	22	22,7515
14	40	3	0	2,5	0,1955	6,4	9,5565
15	40	3	2,5	2,5	1,794	10,75	13,485
16	45	2	0	0	0,0562	2,7	0
17	35	4	5	5	0,6279	14,9	10,623
18	45	4	0	0	0,0619	3,4	0
19	45	3	2,5	2,5	1,1328	9,6	11,746
20	40	3	2,5	2,5	1,8278	10,78	13,448
21	45	2	0	5	0,17	4,8	11,784
22	40	2	2,5	2,5	1,1597	7,3	7,8625
23	35	2	5	5	0,316	12,5	8,383
24	35	2	0	5	0,0972	6,85	7,8145
25	35	2	0	0	0,0616	2,05	0
26	45	4	0	5	0,473	7,35	12,1435
27	40	4	2,5	2,5	2,0268	12,1	14,2775
28	40	3	2,5	0	0,029	6,95	2,846
29	35	4	0	5	0,206	5,2	10,5375
30	45	4	5	0	0,022	6,715	3,7145

\* PST: Peyniraltı suyu tozu, CSL: mısır şurubu şırası

Tablo E5. *Lactobacillus delbrueckii alttür bulgaricus 77* ve *Streptococcus thermophilus 95/2* için optimizasyon sonuçları

İşlem No	St 95/2 (%)	Lb 77 (%)	Besi ortamı	Aktivite U/ml	Biyokütle g/l	Laktik asit g/l
1	2	2	A	0,748	62,54	8,175
2	2	2	B	1,7478	41,85	21,3265
3	2	2	B	1,7233	42,3	21,349
4	2	2	A	0,7539	62,05	8,1645
5	2	2	A	0,7578	63,4	8,1745
6	3	2	A	0,8055	75,15	9,845
7	2	2	A	0,752	63,6	8,1805
8	3	3	B	2,058	51,6	18,428
9	1	2	A	0,5382	45,18	5,878
10	2	3	B	2,1438	45,25	24,8565
11	2	2	A	0,7539	62,1	8,15
12	1	3	A	0,6934	58,25	6,018
13	1	1	A	0,6547	53,05	7,069
14	1	3	B	1,5313	34,9	20,446
15	1	2	B	1,2353	30,05	18,637
16	3	3	A	1,0128	93,2	11,305
17	3	2	B	1,7392	39,9	22,3105
18	2	1	B	1,32681	29,3	19,158
19	2	2	B	1,7402	42,45	21,303
20	2	3	A	0,7337	93,1	8,75
21	3	1	A	0,5437	52,35	5,173
22	2	1	A	0,4953	48,4	5,285
23	2	2	B	1,7343	41,65	21,394
24	1	1	B	1,1242	29,75	14,761
25	3	1	B	1,256	32,45	16,696
26	2	2	B	1,637	41,25	21,325

\* Kullanılan tüm besi ortamlarının bileşimleri yöntemler kısmında tablo halinde detaylı olarak verilmiştir.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> TOVAG-COST-928 (104 O 270)
<b>Proje Başlığı:</b> Süt Ürünlerimizden İzole Edilen Mikroorganizmalardan Laktaz Enzimi Üretimi, Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. H. Şebnem Harsa (yürütücü), Prof. Dr. Sezai Türkel, Prof. Dr. Haluk Hamamcı, Doç. Dr. Candan Gürakan, Doç. Dr. M. Yekta Göksungur, Doç. Dr. Canan Tarı, Aysun Cebeci Aydın, Fatma Işık Üstok (araştırmacılar)
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gülbahçe, Urla, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/06/2005 – 01/12/2008
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> <p>Bu çalışmada süt ürünlerimizden izole edilen mikroorganizmalar, sentezledikleri laktaz (<math>\beta</math>-galaktosidaz) enzimi bakımından taranarak moleküler karakterizasyonları da yapılarak kataloglanmışlardır. İzole edilen laktik asit bakterilerinde (<i>Lactobacillus</i> türlerinde) laktaz enziminin genotipik karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaca paralel olarak da farklı maya, küf ve doğal kaynaklarımızdan izole edilip tanımlanmış laktik asit bakteri suşlarından laktaz enziminin fermentasyon yoluyla üretimi, üretim koşullarının optimizasyonunun yanı sıra saflaştırma, immobilizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.</p>
<b>Anahtar Kelimeler:</b> <p><math>\beta</math>-galaktosidaz (laktaz), laktoz tahammülsüzlüğü, laktik asit bakterileri, maya, küf, genotipik karakterizasyon, fermentasyon, saflaştırma, immobilizasyon, karakterizasyon</p>

**Fikri Urun Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet**  **Gerekli Değil**

Fikri Urun Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

**Proje Kapsamında Yapılan Yayınlar:**

HARSA, S., Hamamcı, H., Laktoz Tahammülsüzlüğü Sorunu ve Çözüm Önerileri, *Dünya Gıda Dergisi*, Şubat Sayısı, 64-67 (2005).

USTOK, F.I., Tari, C., Harsa, S., Screening of *Streptococcus thermophilus* ssp. Isolated From Traditional Turkish Yogurts for  $\beta$ -galactosidase and Lactic Acid Production, *5th International Congress on Food Technology*, Thessaloniki, Greece. Congress Proceedings vol:1 p:277-285, 9-11 March 2007.

USTOK, F. I., Tari, C. and S. Harsa, Effect of Symbiotic Relationship of *Lactobacillus bulgaricus* 77 and *Streptococcus thermophilus* 95/2 on  $\beta$ -galactosidase and Lactic Acid Production, *Journal of Biotechnology*, 131,2S, 224, (2007).

HARSA, S., Hamamci, H. Production, Purification and Immobilization of Lactase Enzymes from Dairy Products, Control and Exploitation of Enzymes for Added Value Food Products, Working Group 1-2-3 Meeting of COST Action 928, Montpellier, France, (2007) pp: 29.

ALTAY, N., Cebeci, A., G.C. Gurakan. Characterization and identification of wild strains isolated from traditionally prepared Turkish yogurts. 5th NIZO Dairy Conference, Papendal, The Netherlands, (2007). (www.NIZO dairyconf.elsevier.com).

DAĞBAĞLI, S., Göksungur, Y. Cevap Yüzey Yöntemi Kullanılarak *Kluyveromyces Lactis* NRRL Y-8279 ile  $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimini Optimizasyonu. 15. Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, (2007) pp: 355-358.

CEBECİ Aydın A., Altay N., and Gürakan G.C. Identification and characterization of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made Turkish yogurts using biochemical and molecular tools. Biomicroworld2007, Sevilla, Spain (2007).

ÇABUK, B., Harsa, Ş. ve C. Tari, "Beta-galaktosidaz Enziminin Kitosan-Hidroksiapatit Küreleri Üzerine İmmobilizasyonu", I. Ulusal Maya Moleküler Biyolojisi ve Biyoteknolojisi Sempozyumu, Bursa, (2008).

TÜRKEK, S., E. Arik, N. Kayakent, S. Güzelvardar. *Kluyveromyces lactis* türü mayaların izolasyonu, Laktoz ve İnvertaz aktivitelerinin belirlenmesi. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. Antalya (2007).

USTOK, F.I., Tari, C., S. Harsa, "Biochemical properties of beta-galactosidase produced by novel yoghurt cultures", 2nd International Congress on Food and Nutrition, , İstanbul, Turkey, (2007), pp:239.

ÜSTOK, F. I., Production of  $\beta$ -Galactosidase Using Lactic Acid Bacteria and Optimization of Fermentation Parameters, (M.Sc), Fen Bilimleri Enstitüsü, İYTE, (2007).

DAĞBAĞLI, S., Göksungur, Y. Karıştırılmalı Tank Tipi Biyoreaktörde *Kluyveromyces Lactis* NRRL Y-8279 ile  $\beta$ -Galaktosidaz Enzim Üretimine Bazı Parametrelerin Etkisi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum (2008), Pp:939.

TARİ, C., Ustok, F.I., Hakguder, B., Harsa, S., Production of Beta-galactosidase by *Rhizomucor* sp. In Solid-State Fermentation Systems, Food Micro2008, Programme and Abstract Book, P A26, 192, Aberdeen, Scotland (2008).

ÇABUK, B., Harsa, S. and C. Tari, Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto Chitosan-Hydroxyapatite Composite Beads, COST 928 2<sup>nd</sup> Annual Meeting on Control and Exploitation of Enzymes for Added Value Food Products, Abstract Book, İstanbul, Turkey (2008). pp: 34 (51).

HAKGUDER, B., Ustok, F.I., Tari, C., Hamamci, H., Harsa, S., Production and Characterization of  $\beta$ -galactosidase by *Rhizomucor meihei*, COST 928 2<sup>nd</sup> Annual Meeting on Control and Exploitation of Enzymes for Added Value Food Products, İstanbul, Turkey (2008). pp: 4 (51).

DAGBAGLI, S., Goksungur, Y., Optimization of  $\beta$ -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, (2008), 11(4). Available from Internet: <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol11/issue4/full/12/index.html> ISSN 0717-3458.

TÜRKEK, S. Maya identifikasyonu prensipleri: *S. cerevisiae* ve *K. lactis* örnekleri. I. Ulusal Maya Moleküler Biyolojisi ve Biyoteknolojisi, Bursa, (2008).

TÜRKEK, S. *Metschnikowia pulcherrima* Türü Mayaların İzolasyonu ve Pulcherrimin'in Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi. KTÜ, Trabzon (2008).

TÜRKEK, S., Arik, E. and Güzelvardar, S. Effect of Hyperosmotic Stress and Nitrogen Starvation on the Growth and the  $\beta$ -galactosidase Synthesis in *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*, *Turk J. Biol.* 32, 175-180, (2008).

ÇABUK, B., “ $\beta$ -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis*: Immobilization, Characterization and Hydrolysis Behavior of Enzyme”, (M.Sc) , Fen Bilimleri Enstitüsü, İYTE, (2008).

TARI, C., Ustok, F.I., Harsa S., Optimization of the Associative Growth of Novel Yoghurt Cultures in the Production of Biomass, Beta-galactosidase and Lactic Acid Using Response Surface Methodology, *International Dairy Journal*, 19, 236-243 (2009).

USTOK, F.I., Tari C, Harsa S. Biochemical and thermal properties of beta-galactosidase enzymes produced by novel yogurt cultures. (yayına gönderildi- incelemede, Food Chemistry)

TARI C, Ustok, F.I., Harsa S. Production of beta-galactosidase from novel yogurt strains isolated from traditional Turkish yogurts. (yayına gönderildi-incelemede, Food Biotechnology).

KAYAKENT, N. and Türkel, S. Isolation and characterization of *Kluyveromyces lactis* species from local dairy products and analysis of their lactase activities (Yayına Hazırlanıyor).

TÜRKEK, S., Ener, B. Isolation and Characterization of the New *Metschnikowia pulcherrima* Strains as Producers of the Antimicrobial Pigment Pulcherrimin. (Yayına gönderildi, incelemede).

KAYAKENT, N. *Kluyveromyces lactis* Taksonu Mayaların İzolasyonu, Metabolik ve Genetik Özelliklerinin Karakterizasyonu, (Doktora tezi), Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2009'da tamamlanması bekleniyor.

DAĞBAĞLI, S.,β-galaktosidaz Enzim Üretiminin Optimizasyonu ve Saflaştırılması, (Doktora Tezi), Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, EGE ÜNİVERSİTESİ, 2009'da tamamlanması ekleiyor.