

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BETA-GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN MİKROBİYAL HÜCRELERDEN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Ash UYANIK

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2008**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Aslı UYANIK tarafından hazırlanan “**Beta-Galaktosidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu ve Karakterizasyonu**” adlı tez çalışması 16/07/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER ,

Eş Danışman: Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU,

Jüri Üyeleri :

Başkan: Prof. Dr. Murat ELÇİN,
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER,
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya A.B.D.

Üye : Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU,
Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya A.B.D.

Üye : Doç. Dr. Şule COŞKUN,
Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji A.B.D.

Üye : Doç. Dr. Handan YAVUZ,
Hacettepe Üniversitesi Fakültesi Kimya A.B.D.

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BETA-GALAKTOSİDAZ ENZİMİNİN MİKROBİYAL HÜCRELERDEN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Aslı UYANIK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

Eş Danışman : Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

Beta-Galaktosidaz, (Laktaz , E:C: 3.2.1.23) bir dissakkarit olan laktozun glikoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen enzimdir. Beta-Galaktosidaz enzimi hidrolaz enzim sınıfından olup, doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve mikrobiyal kaynaklardan (bakteri, maya, küf) izole edilmektedir.

Yapılan çalışmada, Beta-Galaktosidaz enzimi *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 mayasından saflaştırılmıştır. *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 mayası, uygun besi ortamında çoğaltılıp, ultrasonikatör ile hücre duvarı parçalanmıştır. Elde edilen ham ekstraktan, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi teknikleri kullanılarak enzim saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Elektroforez tekniği kullanılarak, saflaştırılan Beta-Galaktosidaz marker enzim ile aynı yerde gözlemlenmiştir.

Temmuz 2008, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler : Beta-Galaktosidaz, *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, elektroforez.

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF BETA-GALACTOSIDASE ENZYME FROM MICROBIAL CELLS

Aslı UYANIK

Ankara University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

Co-Supervisor: Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

Beta-Galactosidase (Lactase, E:C: 3.2.1.23) is an enzyme which catalyses hydrolysis glucose and galactose which are monosaccharides bringing about lactose that is a disaccharide. Beta-Galactosidase enzyme is classified in hydrolase enzyme category. This enzyme which is widespread in nature and isolated from microbial sources (bacteria, yeast, mold).

In this work, Beta-Galactosidase enzyme was purified from yeast *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140. Yeast *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140, were grown in proper feeding conditions, cell wall being disrupted with ultrasonicator. By using the obtained crude protein extract, enzyme was purified with gel filtration chromatography and ion-exchange chromatography techniques. Purified enzyme activity was determined using as a substrate orto-nitrophenol-beta-D-galactopyranoside spectrophotometrically.

Purified enzyme of Beta-Galactosidase was observed in the same place with marker enzyme using SDS-PAGE technique.

July 2008, 72 pages

Key Words : Beta-Galactosidase, *Kluyveromyces lactis* NRRL- Y1140, gel filtration chromatography, ion- exchange chromatography, electrophoresis.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezi yazmamda büyük desteği olan saygıdeğer tez danıőmanım Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER'e (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü) emeği ve sabrı için teşekkür etmek isterim. Tez konumu belirleme ve çalışmalarımı genişletme aşamalarındaki büyük katkılarının karşılığını asla ödeyemem. Tezimi okuyarak çok değerli yorumlar yapan ve çalışmanın son hâlini almasında büyük emeği geçen Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU'na içten teşekkür ederim.

Refik Saydam Hıfzısıhha Başkanı Doç. Dr. Mustafa ERTEK'e ve deneysel çalışmalarım da aktardığı fikirleri ve bilgi birikimiyle tezime farklı açılardan yaklaşmamı sağlayan tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen Refik Saydam Hıfzısıhha Aşı-Serum Üretimi Müdürü Mustafa HACİÖMEROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan annem Ayőe UYANIK ve kardeőim Seda UYANIK'a, manevi desteği ile beni hiç yalnız bırakmayan Ali Aytaç SEYMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aslı UYANIK
Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1 Kaynak Araştırması.....	2
2.2 Kuramsal Temeller	8
2.2.1 Enzimlerin genel özellikleri;.....	8
2.2.2 Enzim reaksiyonlarını etkileyen faktörler	8
2.2.3 Enzimlerin sınıflandırılması.....	11
2.3 Beta-Galaktosidaz (Laktaz) Enzimi	15
2.3.1 Beta-Galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar	19
2.3.2 Beta-Galaktosidazın fizyolojik önemi ve eksikliği	19
2.3.3 Laktoz intoleransı	20
2.3.4 Beta-Galaktosidaz enziminin biyoteknolojik uygulamaları.....	21
2.3.5 Hücre: <i>Kluyveromyces lactis NRRL-Y-1140</i>	24
2.4.1 Belli Başlı Saflaştırma İşlemleri.....	29
2.5 Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	32
2.5.1 Jel Filtrasyon Kromatografisi Yöntemiyle Molekül Kütlesi Tayini.....	37
2.6 İyon Değişim Kromatografisi.....	39
2.6.1 Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri.....	42
2.7 Enzimin tesbiti için Proteinlerin Elektroferezle Gözlenmesi.....	43
2.7.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroferez	44
2.8 Enzim Aktivite Tayinlerinde Kullanılan Yöntemler	44
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
3.1 Materyal	47
3.1.1 Kullanılan aletler.....	47
3.1.2 Kullanılan kimyasallar	47
3.2 Yöntem	48
3.2.1 <i>Kluyveromyces lactis NRRL-Y-1140</i> mayasının çoğaltılması ve parçalanması.....	48
3.2.2 Jel filtrasyon kromatografisi.....	49
3.2.3 Amonyum sülfat ile çöktürme ve ultrafiltrasyon	49
3.2.4 İyon değişim kromatografisi	50
3.2.5 Aktivite tayini	50
3.2.6 SDS-PAGE (Sodyumdodesil sülfat-Poliakrilamit jel elektroferez).....	51
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	52
4.1 Sonuçlar	52
4.1.1 Beta-Galaktosidazın hücre dışına çıkarılması.....	52
4.1.2 Kullanılan kromatografik yöntemlerin sonuçları.....	52

4.1.3 <i>Kluyveromyces Lactis NRRL-Y-1140</i> mayasından saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enzim aktivite tayini.....	54
4.1.3.1 Ham ekstrakt enzim aktivite tayini	54
4.1.3.2 Jel filtrasyon kromatografisi enzim aktivite tayini	54
4.1.3.3 İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim aktivite tayini.....	56
4.1.4 Protein miktar tayini.....	58
4.1.5 SDS- PAGE ile enzimin gözlenmesi.....	60
4.2 Tartışmalar	61
4.2.1 Enzim aktivite sonuçlarının değerlendirilmesi.....	62
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER DİZİNİ

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforez
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforez
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
ONPG	orto-nitrofenil-Beta-D-Galaktopiranosit
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi)
kDa	Kilodalton
U	Ünite
β	Beta
nm	Nanometre
mm	Milimetre
ml	Mililitre
mg	Miligram
μ mol	mikromol
A	Absorbans
Kav	Dağılma Katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Enzim tepkime hızı	9
Şekil 2.2 Reaksiyon hızının değişmesi	10
Şekil 2.3 Enzimlerin genel yapısı.....	12
Şekil 2.4 Laktoz	14
Şekil 2.5 Laktoz molekülünün enzim ile hidroliz edilmesi.....	15
Şekil 2.6 Beta-Galaktosidaz tarafından laktozun hidrolizi (Richmond, 1981)	16
Şekil 2.7 Beta-Galaktosidaz tarafından katalizlenen galaktozil transfer reaksiyonu (Richmond, 1981)	17
Şekil 2.8 Aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamik asit artığı bulunan Beta-Galaktosidazın katalizlediği hidroliz mekanizması (Zhou and Chen, 2001)	18
Şekil 2.9 Sütteki laktozun hidrolizine ait proses şeması	22
Şekil 2.10 Endüstride laktazın uygulanması	24
Şekil 2.11 ONPG'nin enzim ile hidroliz tepkimesi (Chandler <i>et al.</i> 1998).....	27
Şekil 2.12 Bir Sefadex kolonunda farklı büyüklükteki iki proteinin ayrılması.....	33
Şekil 2.13 Jel filtrasyon kromatografisinde elüsyonun temsili şeması.....	36
Şekil 2.14. Saflaştırılan bir enzime ait jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile elde edilen elüsyon grafiği.....	37
Şekil 2.15 Jel filtrasyon kromatografisinde V_0 (void hacim) , V_t (yatak hacmi) ve V_t-V_0 değerlerinin kolonda gösterilmesi.....	38
Şekil 2.16 Molekül kütlesi tayini için Sefadex G-150 kolon materyali ile yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik.....	39
Şekil 2.17 Örnek birer anyon ve katyon değişim reçinelerinin şekilleri.....	40
Şekil 2.18 Dimetilaminoetil (DEAE)- selüloz ve Karboksimetil-selülozun yapısı	41
Şekil 3.1 Kluyveromyces Lactis'in geliştirildiği fermentör.....	48
Şekil 3.2 Pharmacia Biopilot FPLC	50
Şekil 3.3 ONPG ile enzim reaksiyonu (Chandler <i>et al.</i> 1998).....	51
Şekil 4.1 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 280 nm'de zamana karşı değişimi	53
Şekil 4.2 İyon Değişim Kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 280 nm'de zamana karşı değişimi	53
Şekil 4.3 Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzimin zamana karşı ünite miktarı	55
Şekil 4.4 Jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin 420 nm 'deki absorbanlarına karşılık gelen enzim aktivite değerleri.....	55
Şekil 4.5 Jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin enzim aktivitesine karşı spesifik aktivite değerleri	56
Şekil 4.6 İyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen enzimin zamana karşı ünite miktarı	57
Şekil 4.7 İyon değişim kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin 420 nm'deki absorbanlarına karşılık gelen enzim üniteleri.....	57
Şekil 4.8 İyon değişim kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin enzim aktivitesine karşı spesifik aktivite değerleri	58
Şekil 4.9 Jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen ürünlerin ünite enzim- mg protein grafiği.....	59

Şekil 4.10 İyon değişim kromatografisi ile elde edilen ürünlerin ünite enzim – mg protein grafiği.....	59
Şekil 4.11 Elde edilen SDS-PAGE görüntüsü	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Beta-Galaktosidaz Enziminin Bulunduğu Kaynaklar (Gekas,Lo'pez-Leiva, 1985).	19
Çizelge 2.2 Şekerlerin tatlılık oranları	21
Çizelge 2.3 Bazı Ticari Beta-Galaktosidaz Enzimlerinin Önemli Özellikleri	26

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki reaksiyonları yüksek seçicilik ve verimle katalizledikleri için in vitro olarak çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Enzimler protein yapısında biyokatalizörlerdir. İlk kez Berzelius tarafından kullanılan ve 1840 yılında ders kitaplarına geçen “*Protein*” adı yunanca bir numara, birinci sırada olmak anlamına gelen *proteuo* kelimesinden türetilmiştir.

Sayırsız hayat fonksiyonu proteinlere bağıdır ve proteinsiz bir canlı söz konusu olamaz.

Her hücrenin bileşeni olan proteinlerin

- enzimatik kataliz
- taşınım
- depolama
- mekanik destek
- koordine hareket
- sinir uyarılarının iletimi
- bağışıklık
- büyüme ve farklılaşmanın kontrolü

gibi fonksiyonları vardır.

Proteinlerin saflaştırılması hem bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının aydınlatılması hem de in vitro koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması açısından büyük önem taşır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kaynak Araştırması

Tanaka *et al.* (1975), *Aspergillus oryzae* kültüründen 2-propanol fraksiyonasyonu, DEAE- Sefadex A-50 ve Sefadex G-200 kolon kromatografileri ile Beta-Galaktosidaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimin ONPG (o-nitrofenil-beta-D-galaktopiranosit) substratına karşı optimum pH'ı 4,5, substrat olarak laktoz kullanıldığında ise pH 4,8 bulunmuştur. Kararlı pH aralığı 4,0-9,0 ve optimum sıcaklık 46 °C ölçülmüştür. Enzimin molekül kütlesi Sefadex jel filtrasyon ve sakkaroz yoğunluk gradient santrifüj ile 105 kDa hasaplanmıştır (Tanaka *et al.*, 1975).

Tomino and Meisler (1975), C57BL fare karaciğerlerinden saflaştırdıkları Beta-Galaktosidaz enzimini sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tek bir band olarak gözlemlemişlerdir. Denatüre ve indirgenmiş enzimin molekül kütlesi 63 kDa bulunmuştur. Beta-Galaktosidaz'ın doğal şeklinin pH 5,0' de 240 kDa'luk bir tetramer olduğu, bazik pH'da molekül kütlesi 113 kDa'luk dimer yapıda olduğu gözlenmiştir (Tomino and Meisler ,1975).

Zagustina ve Tikhomirova (1976) bitkinin yapraklarında lekeler yol açan bir mantar türü olan *Curvularia inaequalis*'in sıvı kültüründen, DEAE- Selüloz kromatografisi ve hidroksiapatit kullanılarak spesifik aktivitesi mg protein başına 50 ünite, yüksek saflıkta Beta-Galaktosidaz enzimi elde etmiştir. Enzim ONPG (optimum pH 3,7-4,5) ve laktozun (optimum pH 3,9-5,3) hidrolizi ile bulunmuştur. Enzimin izoelektrik noktası pH 4,4'de gözlemlenirken, optimum sıcaklık 60 °C olarak belirlenmiştir. Molekül kütlesi 115-126 kDa arasında ve enzimin aminoasit bileşimi saptanmıştır. Km değerleri, ONPG için $0,55 \cdot 10^{-3}$, laktoz için $4,5 \cdot 10^{-3}$ 'dir. Poliakrilamit jel disk elektroforezde spesifik aktivite olan tek bir band açığa çıkmıştır. Enzimin homojenliği ultrasantrifüjle sağlanmıştır (Zagustina and Tikhomirova, 1976).

Letunova *et al.* (1981) bir mantar türü olan *Alternaria tenuis* kültür sıvısından Beta-Galaktosidaz enzimini, aseton çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi,

hidroksiapatit adsorpsiyon ve N-(beta-D-galaktopiranozil-thiocarbamol)-beta-aminocaprol-AN-Sefaroz 4B affinite kromatografisi ile homojen olarak saflaştırmıştır. Homojen enzimin ultrasantrifüj ve SDS ve SDS'siz poliakrilamit jel elektroforez ile varlığı ispat edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi mg protein başına 160 U, molekül kütlesi çeşitli metotlar kullanılarak 142-176 kDa, izoelektrik noktası pI 4,6, optimum sıcaklık 60-65 °C olarak belirlenmiştir. ONPG ve laktoz için optimum pH 3,8-4,4 ve 3,6-4,8 bulunmuştur. Çalışma sonucunda enzimin bir glikoprotein olduğu ve % 30'un üzerinde karbonhidrat içerdiği belirtilmiştir. EDTA ve pCMP varlığı Beta-Galaktosidaz aktivitesini etkilemez. Glikoz enzim aktivitesine inhibitör etkisi yapmazken, Galaktoz yarışmalı inhibitör gibi davranır (Letunova *et al.*, 1981).

De Macias *et al.* (1983), Arjantin sert peynirlerin yapımı ve bunların özelliklerinin çalışılması için doğal mayalardan izole edilen *Lactobacillus helveticus*'dan Beta-Galaktosidaz izole etmiştir. Enzim DEAE- Selüloz ve Sefaroz 6B-DEAE-selüloz kromatografileri ve agaroz-p-aminofenil-b-D-thiogalaktosit affinite kromatografisi ile 14 kat saflaştırılmıştır. Saf ekstrakt poliakrilamit jel elektroforezinde tek bir band ile kanıtlanmıştır. Maksimum enzimatik aktivite 50 mM fosfat tamponu içinde pH 6,5 ve 42 °C'de gözlenmiştir. Km değerleri ONPG ve ONPG + 10 mM laktoz için $4,46 \times 10^{-5}$ ve $8,9 \times 10^{-5}$ 'dir. Glikoz, galaktoz, galaktoz-6-fosfat ve laktat yarışmalı olmayan inhibitör gibi davranır. ONPG'nin enzimatik hidroliz aktivasyon enerjisi 11,400 cal/ mol olarak ölçülmüştür. Enzimin molekül kütlesi 250 kDa hesaplanmış, buna göre enzimin molekül kütlesi 65 kDa olan 4 altbirimden oluşmuş oligomerik bir enzim olduğu açıklanmıştır (De Macias *et al.*, 1983).

Di Cioccio *et al.* (1984), sığır karaciğerinden affinite kromatografisi ile Beta-Galaktosidaz enzimini saflaştırmıştır. Burada ana saflaştırma adımı aktif hale getirilmiş divinil sülfon ile destekli D- Galaktoz bağlı Sefaroz kolon üzerinde yapılan affinite kromatografisidir. Denatüre enzimin molekül kütlesi 67 kDa'dur. pH 7,0'de native enzimin molekül kütlesi 68 kDa iken pH 4,5-5,0'de 141 kDa olarak saptanmıştır (DiCioccio *et al.*, 1984).

Javeri and Uhlenbruck (1984), tavuk karaciğerinden Beta-Galaktosidaz enziminin izolasyonu araştırmıştır. Bunun için belirlenen izolasyon prosedürü, önce amonyum sülfat çöktürmesi ve arkasından Con-A Sefaroz 4-B kolonunda Lektin kromatografisi, DEAE-Selüloz kolonunda iyon değişim kromatografisi, Sefaroz 6-B kolonunda jel filtrasyon ve p-aminofenil-thio-beta-D-galaktosit-agaroz üzerinde affinite kromatografisidir. Bu deneyler sonucunda Beta-Galaktosidaz % 11 geri kazanımlı enzim aktivitesi ile 3000 kat saflaştırılmıştır. SDS-poliakrilamit jel elektroforezde molekül kütlesi 200 kDa üzerinde proteinin varlığı gözlenmiştir (Javeri and Uhlenbruck, 1984).

Brandao *et al.* (1987) bitki köklerini etkileyen, bitkilerde sararma ve solgunluğa neden olan toprak kökenli fungal etmen *Fusarium oxysporum*'dan Beta-Galaktosidaz enzimini izole etmiştir. *Fusarium oxysporum*'un hücre ekstraktından Beta-Galaktosidaz enzimi, sıcak şok ve ardından DEAE-selüloz DE-52 ve Sefadex G-100 kromatografileri ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS jel elektroforez üzerinde homojenliği görülmüştür. Enzimin izoelektrik noktası 3,83; optimum pH ve sıcaklığı ise 5,0 ve 55 °C'dir. Enzimin molekül kütlesi jel filtrasyon ile 224 ve SDS-PAGE ile 36 kDa hesaplanmıştır. Buna göre enzimin heksamer yapıda olduğu düşünülmüştür. (Brandao *et al.*, 1987).

Mbuyi-Kalala *et al.* (1988), yetişkinlerde laktaz noksanlığında insan laktazının kinetik davranışlarının görevini yapması için *Saccharomyces lactis* mayasından Beta-Galaktosidaz enzimini saflaştırmışlardır. *S. Lactis*'ten elde edilen Beta-Galaktosidaz, insan laktazına göre daha kolay elde edilebilir. Sütün laktozunun hidrolizinde ticari olarak kullanılan *S. Lactis* enzim preparatının (Maxilact 40,000) Beta-Galaktosidaz'ın dört izozimini içerdiği bulunmuştur. Dört enzimin her biri için ayırma ve saflaştırma yöntemleri geliştirilmiştir. Çalışmalar sonucuna enzimlerin molekül kütlesi, kinetik davranışı, izoelektrik noktası, pH'a tepkisi, spesifik hacmi ve metal iyonlarına karşı duyarlılığının farklı olduğu saptanmıştır. Dört enzimin gözlenen molekül kütleleri 630 kDa, 550 kDa, 41 kDa ve 19 kDa olarak belirtilmiştir (Mbuyi-Kalala *et al.*, 1988).

Mutoh *et al.* (1988), çalışmalarında, normal kontrol ve GM₁ gangliosidosisin yetişkin halindeki hastanın karaciğerlerinden homojen olarak Beta-Galaktosidaz enzimini saflaştırmışlardır. Purifikasyon, DEAE- Sefaroz hızlı akış, Con A- Sefaroz, p-aminofenil-1-thio-beta-D-galaktopiranozit-Sefaroz ve QAE- Mono Q kromatografileri ile sağlanmıştır. Normal ve mutant enzimler sırasıyla %10 verimle 5000 kat ve %34 verimle 1800 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan normal enzim TSK jel G-4000 SW kolonunda ayrılarak, üç yerde simetrik pik ve enzim aktivitesi vermiştir. Bu üç pikten enzimin görünen molekül ağırlıkları 800 (polimer), 140 (dimer) ve 65 kDa (monomer) iken mutant enzim iki yerde simetrik pik ve enzim aktivitesi vererek ayrılmıştır. Saflaştırılan mutant enzimin varolan dimerik formu yokken monomerik formun molekül kütlesi 60 kDa gözlenmiştir. Normal ve mutant purifiye enzim preparatları merkaptetanol ile muamele edildikten sonra SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde sırasıyla molekül ağırlıkları 65 ve 60 kDa olarak tek band halinde gözlemlenmiştir. Saflaştırılmış enzim preparatlarının karakteristiklerini gösteren bu datalar GM1 gangliosidosisin erişkin halindeki hastaların yapısal olarak değişik beta galaktosidaza sahip olduğunu kanıtlar (Mutoh *et al.*, 1988).

Pisani *et al.* (1990), bir archaeobacterium olan *Sulfolobus solfataricus*'un ham ekstraktlarından iyon değişim ve affinite kromatografisi içeren bir prosedürle termofilik ve termokararlı Beta-Galaktosidaz'ı homojen olarak saflaştırmışlardır. Homojen enzimin o-nitrofenil-beta-D-galaktopiranosit (ONPG) substratına karşı spesifik aktivitesi 75°C'de 116,4 ünite/mg olarak hesaplanmıştır. Molekül kütlesi çalışmalarında *S. solfataricus* Beta-Galaktosidaz'ının benzer ya da eş alt birimlerden oluşan 240+/- kDa'luk bir tetramer olduğu kanıtlanmıştır (Pisani *et al.*, 1990).

Diaz *et al.* (1996), *Aspergillus nidulans* mantarın miselyum (mantarın lifsel kısmı) ekstraktından affinite kromatografisi ile saflaştırılan Beta-Galaktosidaz 120 ve 97 kDa'luk monomerlerden oluşan 450 kDa'luk multimerik bir enzim olduğunu bulmuşlardır. Elde edilen bu enzim sadece laktoz ve p-nitrofenil-beta-D-galaktosit (PNPG) gibi beta-galaktosit substratlarına karşı aktiftir (Diaz *et al.*, 1996).

Shaikh *et al.* (1999), termofilik mantar *Rhizomucor sp.*'den DEAE-selüloz kromatografisi ve ardından Sephacryl S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile homojen bir ekstraselüler Beta-Galaktosidaz enzimi saflaştırmıştır. İki eş altbirimden oluşan native enzimin molekül kütlesi 250,000 Da olarak bulunmuş, ayrıca enzimin asidik bir protein olduğu ve izoelektrik noktasının pI 4,2 olduğu belirtilmiştir. Saf Beta-Galaktosidaz'ın bir glikoprotein ve % 8 nötral şeker içerdiği görülmüştür. Enzim aktivitesi için optimum pH 4,5 ve optimum sıcaklık 60°C hesaplanmıştır. Grup-spesifik reaktifler kullanarak aktif bölge karakterizasyonu çalışmalarında triptofan ve lizin kalıntılarının enzimin katalitik aktivitesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Shaikh *et al.* 1999).

Li *et al.* yaptığı çalışmada (2001), Hindistan, Endonezya ve Amerika'nın sıcak bölgelerinde yetişen baklagiller familyasından olan, yenilebilir mung bitkisi tohumlarından elde edilen beş günlük filizlerden Beta-Galaktosidaz'ın beş izoformu izole edilmiştir. Beta-Galaktosidaz II ve III, asit karışımı çöktürmesi, amonyum sülfat fraksiyonasyonu, dietilaminoetil- selüloz (DEAE) kromatografisi, con-A-Sefaroz ve kromatofokuslama prosedürü tarafından elektroforetik homojenite ile saflaştırılmıştır. Beta -Galaktosidaz I, II ve III' ün, molekül kütlesi 38 ve 48 kDa'luk iki eşit olmayan altbirim içeren 87 kDa'luk aynı molekül kütlesine sahip olduğu bulunmuştur. Beta -Galaktosidaz IV ve V'in molekül kütleleri ise 45 ve 73 kDa olarak bulunmuştur (Li *et al.*, 2001).

Nagy *et al.* (2001), *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 tür mantardan intraselüler Beta-Galaktosidaz'ı, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-sefadeks kolonunda iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi ve kromatofokuslama prosedürleri ile 66 kat % 8 verimle saflaştırmıştır. ONPG (o-nitrofenil-beta-D-galaktopiranosit) substratına karşı spesifik aktivite 5,84 U_{mg}/l bulunmuştur. Aktivitenin optimum pH'ı 4,0, optimum sıcaklığı 30°C' dir. 66 kDa'luk monomerlerinden oluşan enzimin molekül kütlesi 270 kDa olarak saptanmıştır (Nagy *et al.*, 2001).

Lee *et al.* yaptığı araştırmalarda (2003), şeftaliden saflaştırılıp karakterize edilen Beta-Galaktosidaz enziminin molekül kütlesi 42 kDa olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzim,

Beta –Galaktosidaz’ın substratı olan ONPG (orto-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozit)’e karşı yüksek aktivite göstermiştir. Enzim aktivitesinin optimum pH’ı 3,0’dür. Ancak pH 3.0-10 arasında aktivite kararlı kalmıştır. Optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir (Lee *et al.*, 2003).

De Alcantra *et al.* (2006), *Hymenaea courbaril* L. bitkisinin tohumundan çıkan ilk yapraklardan (kotiledon) saflaştırdıkları Beta-Galaktosidaz enziminin molekül kütlesi 52-62 kDa olarak belirlemiştir. Optimum pH 3-4 arası olup, enzim aktivitesi 50 °C’nin üzerinde lineer olarak artmaktadır (De Alcantra *et al.*, 2006).

Nguyen *et al.* (2006), *Lactobacillus reuteri*’nin iki türü olan L103 ve L461’de varolan hücre içi Beta-Galaktosidaz enzimleri amonyum sülfat fraksiyonasyonu, hidrofobik etkileşim ve afinite kromatografisi ile saflaştırmıştır. İki enzim de 35 kDa ve 72 kDa’luk altbirimler içeren, molekül kütlesi 105 kDa olan heterodimerdir. L. Reuteri L461 ve L103 beta-gal.’ın izoelektrik noktaları 3,8-4,0 aralığında bulunmuştur. İki enzimin de en aktif olduğu pH aralığı 6-8’dir. Bununla birlikte enzimler pH 8’de kararlı değillerdir (Nguyen *et al.*, 2006).

Todorova-Balvay *et al.* (2006) yaptığı çalışmada, *Aspergillus oryzae* H26-10-7 mutant türden hücre dışı Beta-Galaktosidaz enzimi metal-iyon affinite kromatografisi (IMAC) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile karakterize edilmiştir. Bu fungal Beta-Galaktosidaz 113 kDa’a karşılık bir protein olarak tespit edilmiştir. Elde edilen enzim, sentetik substrat o-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozit’de beş kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Todora-Balvay *et al.*, 2006).

Erythrina indica, tropikal Asya ve Kuzey Avustralya’da yetişen, siyah tohumları olan orta boylu bir dikenli ağaçtır. *Erythrina indica*’da saptanan glikozidazlardan biri Beta-Galaktosidaz’dır. Kestwal and Bhide (2007), enzimin homojen preparatından iyon değişim ve arkasından jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin molekül ağırlıklarını 74 ve 78 kDa olarak dimer halde SDS-PAGE ile ayrı

ayrı bulmuştur. Enzim aktivitesinin optimum pH'ı 4,4 ve optimum sıcaklığı 50 °C' dir (Kestwal and Bhide, 2007).

O'Connel and Walsh (2007), *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 mayasından ürettikleri Beta-Galaktosidaz enzimini, jel filtrasyon, iyon değişim ve hidroksiapatit kromatografilerinin homojen kombinasyonu ile saflaştırmıştır. Denatüre (123 kDa) ve doğal (251 kDa) molekül kütleleri, enzimin homodimer olduğunu önerir. Saf enzimin optimum pH'ı 6,8, optimum sıcaklığı 37 °C olarak bulunmuştur (O' Connel and Walsh, 2007).

2.2 Kuramsal Temeller

2.2.1 Enzimlerin genel özellikleri;

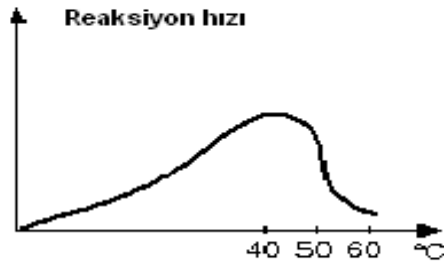
Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlerdir (Zaborsky, 1973). Enzim reaksiyonlarında yan ürün meydana gelmez, verim % 100'dür. Enzimler spesifiktir, etki ettikleri maddeler tek ve belirlidir. Enzimlerle reaksiyon veren maddelere "SUBSTRAT" adı verilmektedir (Tüzün 1991). Enzimler katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek hızı, kimyasal reaksiyonlara göre 10^8 - 10^{10} kat arttırırlar (White *et al.* 1978).

- Biyolojik reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek çabuk dengeye ulaşmasını sağlar.
- Enzimler 55°C 'nin altında tekrarlanabilir reaksiyonlar vermektedirler
- Enzimler cansız ortamda da görev yaparlar.

2.2.2 Enzim reaksiyonlarını etkileyen faktörler

Enzimler kimyasal reaksiyonları gerçekleştirdiklerinde bazı faktörlerin etkisi altında kalırlar. Bunlar;

Sıcaklık: Her enzim reaksiyonunun optimal bir sıcaklık düzeyi vardır. İnsanda bu sıcaklık 36,5 derecedir. 0°C’de enzimler inaktiftir. Enzim reaksiyonlarında sıcaklığın her 10°C artmasına karşılık enzimin reaksiyon hızı bir ve ya üç kat kadar artmaktadır. Bazı enzimlerde bu artış daha fazla olmaktadır. Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle optimum sıcaklığa ancak 40-50°C arasında erişirken, bitkisel kaynaklı enzimlerde bu değer genellikle 50-60°C arasındadır. Bu sıcaklıkların üzerinde enzimlerin ısıya bağlı olarak denatüre olma hızı enzimin reaksiyon hızı artışından daha hızlı olduğu için enzim aktivitesi azalmaktadır.



Şekil 2.1 Enzim tepkime hızı

pH: (asitlik-bazlık oranı): Enzim reaksiyon hızı farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH’ya o enzimin optimum pH’ sı adı verilmektedir. Optimum pH’ nın her iki yanında enzim reaksiyonu yavaşlamaktadır. Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum pH değeri enzimden enzime farklılık göstermektedir. Optimum pH değeri tampon sistemleri ile sağlanmaktadır. Optimum pH çeşitli koşullara bağlıdır. Bu koşulları, kullanılan tamponun cinsi, substratın yapısı ve enzimin elde edildiği kaynak olarak sıralamak mümkündür.

Substrat konsantrasyonu: Ortamda reaksiyon hızını artırıcı yapılardan biri de enzim ve substrat miktarıdır. Her ikisinin miktarı belirli oranlarda artırılırsa reaksiyon hızı sürekli artar.



Şekil 2.2 Reaksiyon hızının değişmesi

Enzim konsantrasyonu: Enzim reaksiyonunun hızı, enzimin substrata doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak lineer bir biçimde artmaktadır. Buna sebep de her enzim molekülünün diğerinden bağımsız olarak davranmasıdır. Ortamda ne kadar çok enzim molekülü çalışıyorsa reaksiyon da o kadar hızlı yürüyecektir. Substratın çok olduğu koşullarda reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu ile lineer bir şekilde artmaktadır.

Zaman: Bir enzim reaksiyonunun hızı belirli bir zamanda oluşan ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Genellikle enzim aktivite tayinlerinde tayin süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir.

Su: Enzim reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için ortamda belirli oranda su bulunması gerekir. Çünkü moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hareketi sağlayacak sıvı bir ortamın olması gerekir. Tohumlarda su miktarı az olduğundan enzim reaksiyonları minimal seviyede gerçekleşmektedir.

Substrat Yüzeyi: Enzimden etkilenen maddenin yüzeyindeki artış tepkimeyi hızlandırır.

İnhibitörler ve Aktivatörler: Bazı kimyasal maddeler enzimleri etkisiz hale getirir. Bazı yılan, akrep zehirleri ve Ca^{2+} , Na^+ gibi iyonlar kimyasal olarak enzim aktivitesini etkilemektedir. Bunlara **inhibitörler** denir. Bazı maddelerin ortamda bulunması enzim

çalışmasını hızlandırır. Böyle maddelere **aktivatör** denir. K^+ ve Mg^{+2} gibi bazı iyonlar ve su aktivatöre örnek verilebilir.

2.2.3 Enzimlerin sınıflandırılması

Her enzimin 4 rakamlı bir numarası vardır, örneğin, 3.6.1.3. "ATP fosfohidrolaz" da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir. Buna göre enzim sınıfları şunlardır:

Oksidoredüktazlar: Redoks tepkimelerini katalizler.

- a) Dehidrogenazlar: Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.
- b) Oksidazlar: Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.
- c) Redüktazlar: Substratı bir redüktör aracılığıyla indirgeyen enzimlere denir. Örneğin, Asetaldehit redüktaz, asetaldehiti alkole redükler.
- d) Transhidrogenazlar: Bir molekülden diğerine hidrojen taşıyarak onu redüklerler.
- e) Hidroksilazlar: Substratlarına bir hidroksil ya da su molekülü katan enzimlere denir, örneğin, fenilalanin hidroksilaz bir hidroksil grubunu fenilalanine ekleyerek onu tirozine dönüştürür.

Transferaz Enzimler: Hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.

Dekarboksilazlar: Karboksilik asitlerden CO^2 çıkmasını sağlarlar.

Hidrolaz Enzimler: Bir molekül su sokmak suretiyle ya da su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptit, asitanhidrit ve glikozidik bağlarına etki ederler (Beta-Galaktosidaz enzimi laktozu glikoz ve galaktoza hidroliz etmektedir).

- a) Esterazlar: Ester bağı yıkan enzimlerdir (lipaz, ribonükleaz, fosfataz, pirofosfataz, glikozidaz).
- b) Proteazlar: Peptit bağı yıkan enzimlerdir (proteinaz).

Liyazlar: Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir, örneğin C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır. Keza C-O ve C-N bağı yıkanlar da vardır.

İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.

Örneğin; rasemaz, epimeraz.

Ligazlar (= Sentetazlar): Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını; örneğin amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlarlar.

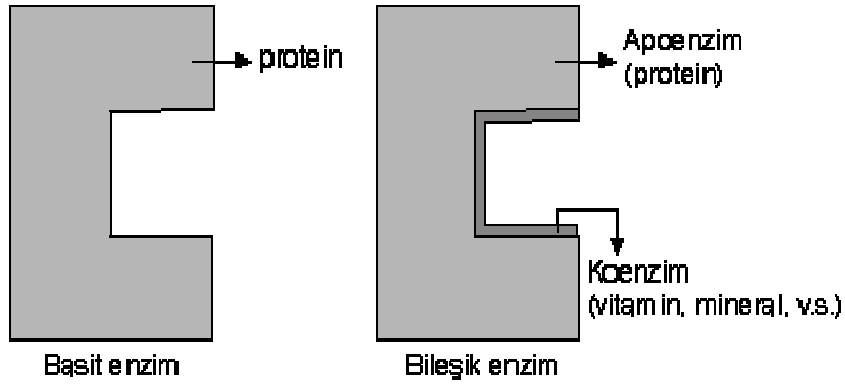
Enzimler yapı olarak iki kısımda incelenir.

a) Basit enzimler:

Sadece protein molekülünden oluşurlar.

b) Bileşik enzimler:

Protein yapısına protein olmayan kofaktör veya koenzim denen yapıların bağlı olduğu enzimlerdir. Bunlara **holoenzim** de denir.



Şekil 2.3 Enzimlerin genel yapısı

İkinci gruba giren enzimlerde protein özelliğinde olan ve yalnızca amino asitlerden oluşan taşıyıcı kısma apoenzim, buna bağlı protein olmayan gruba ise koenzim adı verilir. Enzimlerin çoğu bileşik yapıdadır. Koenzim olmadan protein kısım iş göremez. Koenzim olarak; bazı vitaminler ve bazı mineraller (kofaktör) olmak üzere iki molekül çeşidinin herhangi birisi görev yapabilir.

Prostetik grup: Organik bileşiklerdir. Apoenzim'e devamlı bağlı kalırlar. Örneğin, katalaz enziminin prostetik grubu hem molekülüdür.

Vitaminler: Organik bileşik olan bu yapılar geçici olarak Apoenzime bağlanırlar.

Metal iyonları: Enzim aktivitesinin çoğunda metal iyonlarına ihtiyaç vardır. Bunlara kofaktör de denir.

Mikroorganizma ile bitki ve hayvanlardan elde edilen çok sayıda enzim, yapılarına ve kontrol ettikleri reaksiyonların mekanizmalarına göre karakterize edilmektedir.

Mikroorganizmadaki enzim sistemlerinin yürüyebilmesi için ekzo ve endo olmak üzere iki türlü enzim vardır :

-Ekzo enzimler; üreme ortamında bulunan kompleks bileşikleri, hidroliz ve ayrışma ile daha basit ve çözünebilen maddelere parçalayarak hücre içine girebilecek hale getiren enzimlerdir.

-Endo enzimler; hücre içi metabolizmasını yürütürler (Bilgehan, 1992). Enzim reaksiyonlarının spesifikliği ve yüksek reaksiyon verimine ulaşılabilirliği enzimleri ticari önemi yüksek olan materyaller sınıfına sokmaktadır. Bir kez kullanımın getirdiği yüksek maliyet ve işlem sonunda enzimin ürünlerden ayrılmasının zor olması çeşitli immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

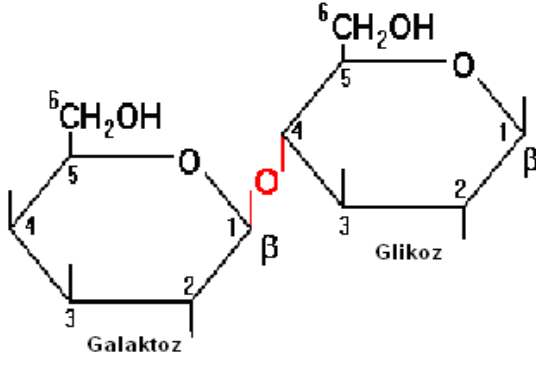
İmmobilizasyon, biyolojik olarak aktif maddelerin (enzim, hücre, hormon) katalitik aktivitelerini kaybetmeksizin defalarca ve sürekli kullanılabilmesi amacıyla çeşitli taşıyıcılara yerleştirilmeleridir.

İmmobilize enzimler, reaksiyon ortamında çözünmediği için, ortamdan kolaylıkla ayrılabilmesi daha saf ürün elde edilebilmesine ve birçok kez kullanılabilmesine olanak vermektedir.

Laktoz (Süt şekeri)

Laktoz, bir galaktoz molekülü ile bir glikoz molekülünün **Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc** biçiminde kondensasyonu ile oluşmuş molekül yapısına sahip disakkarittir. Önemli miktarda yalnızca sütte bulunur. Tatlılığı düşüktür (Stryer, 1981, Chapman and Hall, 1990).

- Glikoz ve galaktozdan oluşur.
- Süt şekeri, yeni doğanlar için enerji kaynağıdır.
- Sindirim kanalını uyarır, fizyolojik gelişimi sağlar.
- Patojen bakterilerin çoğalmasını önler.
- Emilimi düşüktür, ishal şekillenebilir.
- Laktoza toleransı olmayan bireyler mevcuttur.



Şekil 2.4 Laktoz

En sık tüketilen laktoz kaynakları şunlardır:

- Süt
- Tereyağı
- Margarin
- Peynir
- Süttozu
- Bazı hamur ürünleri
- Çikolata
- Bazı hazır gıdalar
- Yoğurt

Laktoz sütün başlıca karbonhidratı olup yaklaşık %3-8 (kütle/hacim)'ini oluşturmaktadır. Laktoz konsantrasyonu sütün kaynağına göre 50-100 g/L arasında değişmektedir. Laktozun hidrolizi asitlerle veya enzimatik olarak sağlanabilmektedir. Asit kullanılan işlemlerde sütteki laktoz hidroliz edildiğinde süt ve sütün türevlerinin tadında, kokusunda ve renginde bozulma görülmektedir. Laktoz hidrolizi enzimatik olarak gerçekleştiğinde ise sütün sadece tatlılığında bir değişiklik oluşmakta, sütün tatlılık oranı 4 kat artmaktadır (Pivarnik *et al.* 1995).

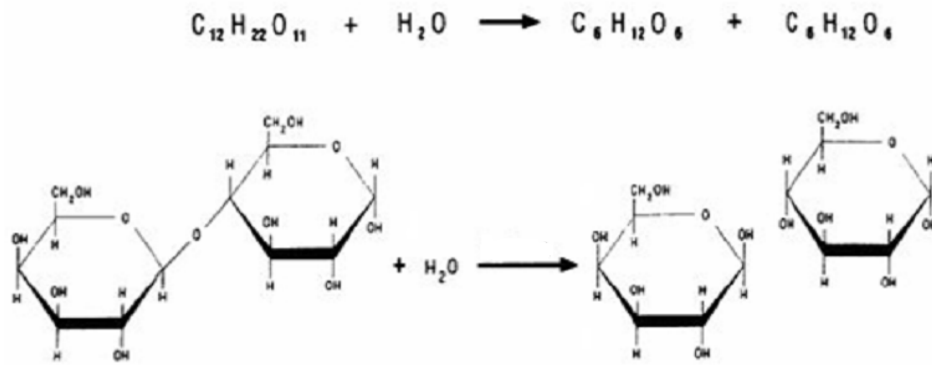
2.3 Beta-Galaktosidaz (Laktaz) Enzimi

Beta-Galaktosidaz, (Laktaz, E:C:3.2.1.23) bir dissakkarit olan laktozu, kendisini meydana getiren monosakkaritler olan glikoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen enzimdir.



Bu hidroliz tepkimesi aşağıdaki basamaklarda gerçekleşmektedir.

1. Enzim + Laktoz \rightarrow Enzim - Laktoz kompleksi
2. Enzim - Laktoz kompleksi \rightarrow Galaktosil – Enzim + Glikoz
3. Galaktosil – Enzim + H₂O \rightarrow Galaktoz + Enzim



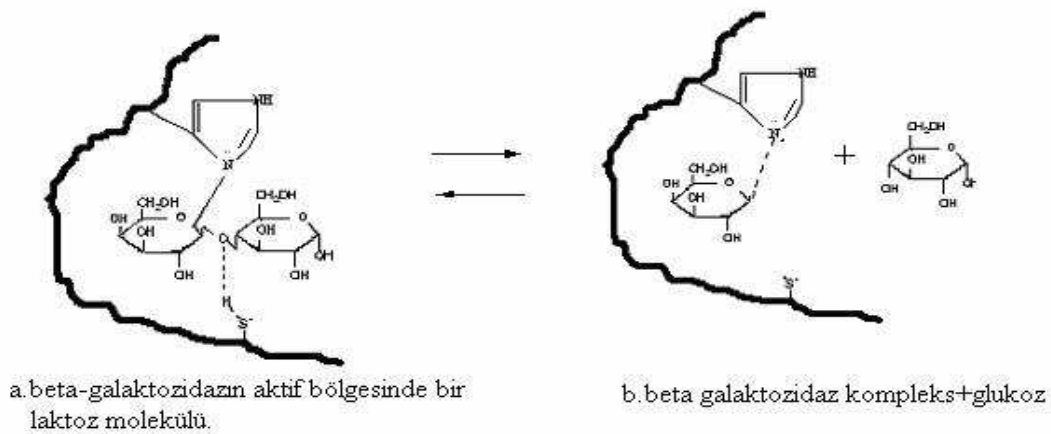
Şekil 2.5 Laktoz molekülünün enzim ile hidroliz edilmesi

Beta-Galaktosidaz, hidrolaz enzim sınıfına girer. Sistematik ismi Beta-D-Galaktosid-galaktohidrolaz olan enzim doğada yaygın halde bulunmaktadır. Beta-Galaktosidaz enzimi dört eşit aminoasit zincirinden oluşan bir homotetramerdir. Her zincirin laktoz molekülü ile etkileşen bir aktif bölgesi vardır. Doğada yaygın olarak bulunan bu enzim mikrobiyal kaynaklardan da (bakteri, maya, küf) izole edilmektedir. Beta-Galaktosidaz enzimi biyoteknolojide özellikle de süt teknolojisinde oldukça önemli yere sahiptir.

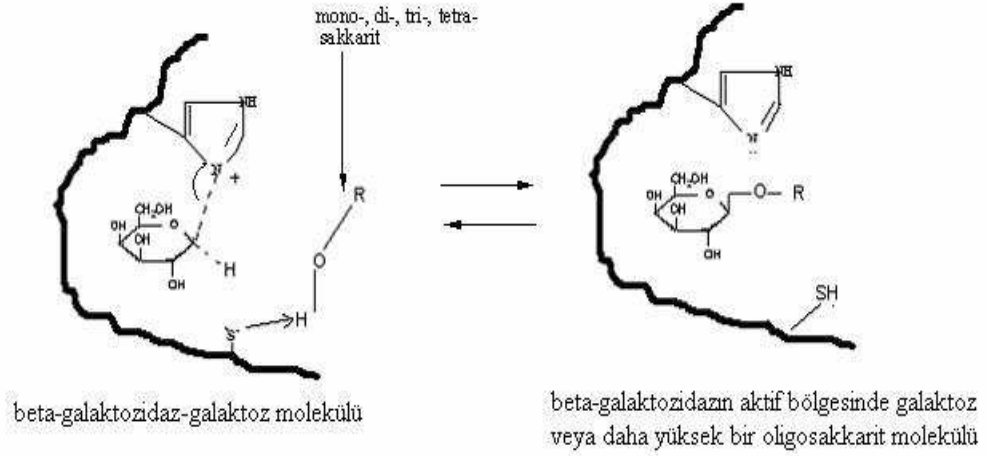
Beta-Galaktosidaz enziminin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intoleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı, sütün baskın şekeri laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklanır. Dünyada laktoz intoleransının fazla olması sebebiyle endüstride düşük laktozlu veya laktozu hidrolizlenmiş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

Wallenfels and Malhotra (1961), *E-coli*'den izole ettikleri laktazı kullanarak laktozun hidroliz mekanizmasını tanımlamışlardır. Bunun dışında çeşitli yayınlarda laktozun hidroliz mekanizması ve galaktozil transfer reaksiyonunun mekanizması tanımlanmaktadır (Richmond 1981, Rouwenhorst *et al.*, 1989, Mahoney 1998, Zhou and Chen 2001). Bu çalışmalarda önerilen reaksiyon mekanizmasında Beta-Galaktozidaz'ın aktif bölgesinde proton verici olarak sistein ve proton alıcı olarak ise histidin aminoasiti bulunmaktadır. *E. Coli* ve *K. Fragilis*' den izole edilen enzimler, nötral pH'da hem sülfidril grubu içermekte hem de nükleofil görevini yüklenen imidazol grubu aracılığıyla glikozid bağının ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Küflerden izole edilen Beta-Galaktosidaz ise, nükleofil olarak rol oynayan bir karboksil grubunu ve elektrofil görevini yapan bir imidazol grubunu içermektedir.

Laktozun enzimatik hidrolizinin ve galaktozil transfer reaksiyonunun mekanizması sırasıyla şekil 2.6- 2.7 'de gösterilmiştir.

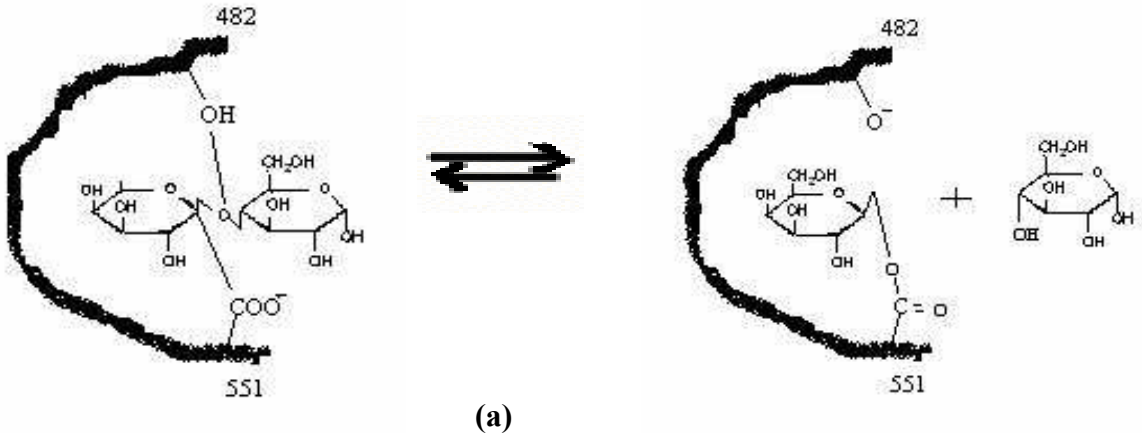


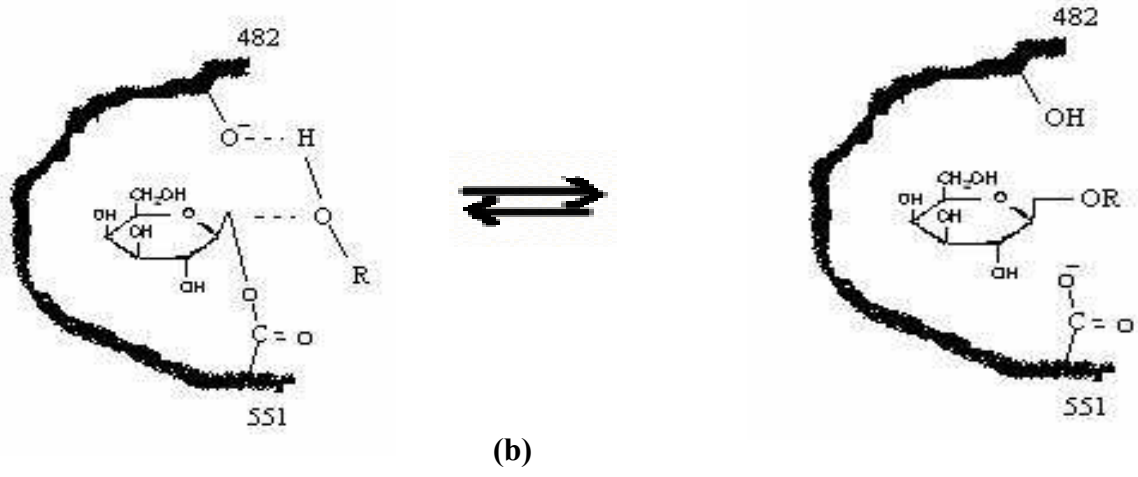
Şekil 2.6 Beta-Galaktosidaz tarafından laktozun hidrolizi (Richmond 1981)
Beta-Galaktosidaz enziminin nötral pH'da hidroliz mekanizması (Sülfidril grubu proton alan, imidazol grubu proton veren olarak davranır) .
(Richmond 1981).



Şekil 2.7 Beta-Galaktosidaz tarafından katalizlenen galaktozil transfer reaksiyonu (Richmond 1981)

Son zamanlarda Beta-Galaktosidaz için yeni bir aktif bölgenin olduğu ileri sürülmüştür (Zhou and Chen, 2001). Bu aktif bölgede glutamik asit artığı bulunmaktadır. Mikrobiyal kökenli bazı Beta-Galaktosidazlarda iki tane glutamik asit artığı bulunmaktadır (Glu⁴⁸² ve Glu⁵⁵¹ gibi). Bunlardan birisi proton alıcı ve diğeri ise proton verici olarak görev yapmaktadır. Reaksiyonun mekanizması şekil 2.8 'de gösterilmektedir:





Şekil 2.8 Aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamik asit artığı bulunan Beta-Galaktosidazın katalizlediği hidroliz mekanizması (Zhou and Chen, 2001)

- a) Enzim-galaktozil kompleks oluşumu ve eş zamanlı glikozun serbest kalışı (Zhou and Chen 2001)
b) Enzim-galaktozil kompleksi hidroksil grup içeren alıcıya aktarılır.

Bununla birlikte farklı mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan Beta-Galaktosidaz'ın aktif bölgesinde bulunan glutamik asitlerin pozisyonları, protein zincirinin uzunluğu ve molekül kütlesi farklıdır. Çizelge 2.1'de bazı örnekler verilmektedir.

2.3.1 Beta-Galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar

Çizelge 2.1. Beta-Galaktosidaz Enziminin Bulunduğu Kaynaklar

(Gekas,Lo'pez-Leiva 1985)

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü, kahve
Hayvan Organları	İnce bağırsak, Beyin ve deri dokusu
Mayalar	Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Candida pseudotropical, Brettanomyces anomolus, Wingea robersii
Bakteri	Escherichia coli, Thermus aquaticis, Bacillus sp., Bacillusmegaterium streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Bacillus circulans, Bacillus stearotherophilus, Lactobacillus sporogenes
Mantar	Neurospora crassa, Mucor pucillus, Alternaria palmi, Asperigillus foetidus, Mucor miehei, Curvularia inoequalis, Asperigillus niger, Fusarium moniliforme, Asperigillus flavus, Alternaria alternata, Asperigillus oryzae, Asperigillus phoenicis

2.3.2 Beta-Galaktosidazın fizyolojik önemi ve eksikliği

Beta-Galaktosidaz enzimi, vücutta ince bağırsak duvar hücreleri tarafından salgılanır, laktozun ince bağırsakta bu enzimle hidrolizlenmesi sonucu oluşan glikoz ve galaktoz yine ince bağırsaktan absorplanarak kan dolaşımına geçer ve karaciğerde metabolize edilir. Enzimin ince bağırsakta üretimi yeni doğan bir bebek için çok önemlidir (Lartillot 1993). Sindirilmemiş laktoz çocuklarda ve yetişkinlerde hiçbir işe yaramadığı gibi çocuklukta büyümeyi engellemektedir (Stryer 1981).

GM₁ Gangliozidozis hastalığı lizozomal bir enzim olan Beta-galaktozidaz enzim eksikliği sonucu meydana gelen otozomal resesif kalıtım gösteren bir lipit depo hastalığıdır. Çeşitli klinik bulguları olan bir grup hastalıktır. İnfantil formunda hepatosplenomegali, ödem, döküntü, maküler kiraz kırmızı nokta, disostozis multiplex ve kardiomegali bulguları vardır. Geç ortaya çıkan formunda ataksi, disartri ve serebral palsi benzeri spastisite bulguları vardır. Tanı beyaz kan hücrelerinde ve kültür cilt fibroblastlarında enzim eksikliğinin saptanması ile konur.

2.3.3 Laktoz intoleransı

Yıllarca, inek sütü midede şişkinlik, hazımsızlık, ürtiker plakları (vücutta oluşan kaşıntılı kızarıklıklar) gibi istenmeyen rahatsız edici semptomların kaynağı diye bilinir. Bu reaksiyonlar laktoz intoleransından kaynaklanır. Beta-Galaktosidaz enziminin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intoleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı, sütün baskın şekeri laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklanır. Laktoz intoleransı olan kişilerde ince bağırsak duvarından çok az miktarda laktoz molekülü hücre içerisine ve geride kalan büyük miktardaki laktoz vücut tarafından kullanılamaz. Sindirilemeyen laktoz ince bağırsaklardan kalın bağırsağa hareket eder. Burada iki olay meydana gelmektedir; bunlardan birincisi fiziksel diğeri ise biyokimyasal bir işlemdir. Fiziksel işlemde, ince bağırsak sıvısındaki laktoz moleküllerinin tanecik sayısının artması sonucunda oluşan osmotik etki ile dokulardaki sıvı ince bağırsağa çekilir. Biyokimyasal işlemde ise; laktoz, kolondaki bakteriler tarafından fermente edilerek organik asitler ve CO₂ 'ye dönüştürülür. Bu maddeler şişlik hissi, mide bulantısı, karın bölgesinde kramplar, gaz ve bir çok ishal semptomlarına yol açmaktadır (Kretchmer 1972, Dewit *et al.* Greenberg *et al.* 1981, Rosado *et al.* 1987). Bu semptomlar laktoz alındıktan yarım saat ile iki saat arasında bir süre sonra başlar. Semptomların şiddeti kişinin laktozu tolere edebilmesine göre değişir. Daha seyrek olarak çocuklarda laktaz üretimi doğuştan düşük olabilir. Birçok insan için ise laktaz eksikliği doğal olarak zamanla gelişen bir durumdur. Yaklaşık 2 yaşından sonra, vücut laktazı daha az üretmeye başlar. Bununla birlikte birçok insan yaşlanmadan önce semptomlarla karşılaşmayabilir. Beta-galaktosidaz'ın insan bağırsağında bulunmasına

rağmen bazı kişilerde yaşam boyunca hiç aktivite göstermediği veya aktivitesinin zamanla kaybedebildiği rapor edilmektedir (Pivarnik *et al.* 1995).

2.3.4 Beta-Galaktosidaz enziminin biyoteknolojik uygulamaları

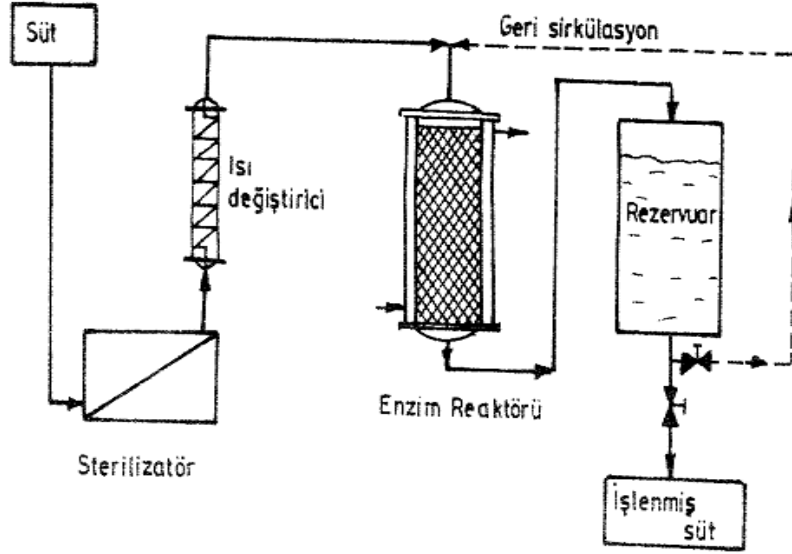
Günümüzde Beta-Galaktosidaz süt endüstrisinde birçok değişik amaç için artan oranlarda kullanılmaktadır.

Laktozu hidrolizlenmiş süt ve süt ürünlerinin avantajı laktozun hidrolizini teşvik etmektedir. Glikoz ve Galaktoz kolay çözünebilen, kristallenmeye yatkınlığı az olan ve tatlandırıcı olarak kullanılabilen şekerlerdir. Laktoza göre daha kolay absorbe ve metabolize edilmektedir. Hidroliz ürünleri glikoz ve galaktozun tatlılığının laktoza göre daha yüksek olması, laktozun hidrolizlenmesinin kazandırdığı önemli bir ekonomik avantajdır.

Çizelge 2.2 Şekerlerin tatlılık oranları

Şekerin Adı	Tatlılık
Sakaroz	100
Laktoz	40
Glikoz	75
Galaktoz	70

Laktoz intoleransı rastlanan kişilerin tüketimine sunulacak olan sütteki laktozun hidrolizi, laktozun kolay kristalize olabilmesi nedeniyle dondurma gibi donmuş yiyeceklerin kristallenmesini önlemek ve şekerleme üretiminde tatlılık oranını arttırmak için Beta-galaktosidaz kullanılmaktadır. Ayrıca fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde (Pivarnik *et al.* 1995) ve fırıncılıkta mayanın gelişmesi için (Pomeranz 1964) Beta-galaktosidaz enziminden faydalanılmaktadır.



şekil 2.9 Sütteki laktozun hidrolizine ait işlem şeması

Beta-Galaktosidaz kullanılarak geliştirilmiş bazı süt ürünlerini řu şekilde sıralayabiliriz:

- Düşük laktozlu süt
- Laktozu hidrolizlenmiş süttten yoğurt üretimi
- Laktozu hidrolizlenmiş süttten peynir üretimi
- Düşük laktozlu konsantre dondurma
- Peynir altı suyu laktozundan tatlı şurup üretimi

Laktozu hidrolizlenen süttten üretilen peynir, normal süttten yapılandan daha hızlı bir şekilde olgunlaşmaktadır.

Laktozu hidrolizlenmiş süttten yapılan yoğurt sadece tatlılık oranının artmasından dolayı geleneksel yoğurda tercih edilmekle kalmaz aynı zamanda yoğurt yapımında bu sütün kullanılması yoğurt oluşum pH' ına ulaşılması için gereken süreyi kısaltmaktadır.

Laktozun enzimatik hidrolizi, peynir endüstrisinde bir yan ürün olan ve birikimi önemli bir çevre problemine neden olan peynir altı suyunun şeker içeriğinden yararlanmayı geliştiren bir çok biyoteknolojik işlemin temelini teşkil etmektedir. Peynir endüstrisi

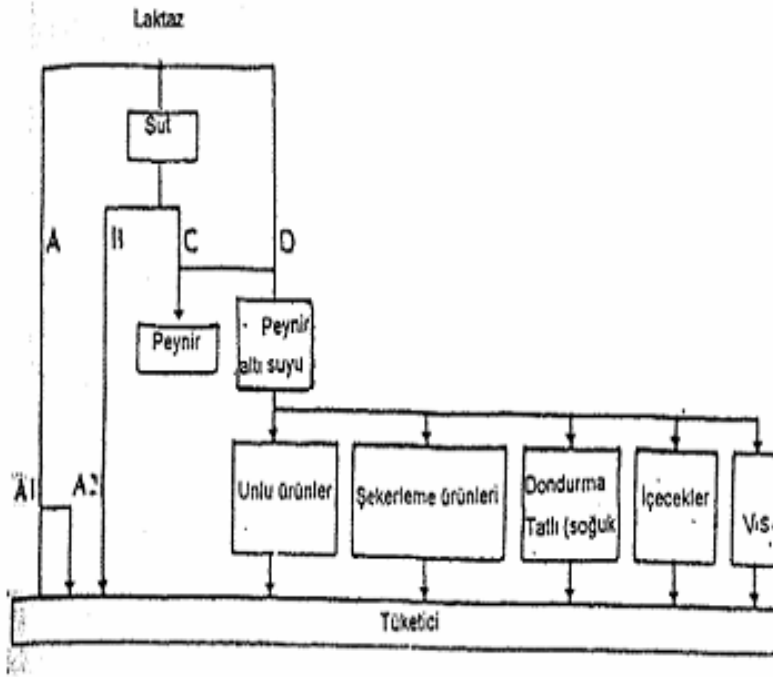
büyük miktarda peynir altı suyu üretmektedir (kullanılan toplam suyun hacimce yaklaşık % 83'ü).

Bu ürün orijinal sütün toplam besin unsurlarının yaklaşık %50'sini içermektedir. Beta-Galaktosidaz süt endüstrisinde atık madde olan peynir altı suyunun birçok değerlendirilebilir materyale dönüşmesinde kullanılmaktadır.

Laktazın peynir altı suyu ve ürünlerine uygulanması ile daha yoğun şuruplar, alkollü içecekler, hayvan yemi ve tatlı yapımında yararlı sonuçlar elde edilmektedir. Peynir altı suyunda yüksek oranda bulunan laktozun geri kazanılmasıyla bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba ve şarküteri ürünlerinin imalatında belirli oranlarda kullanıldığında süt tozunun yerine kullanılabilen bir ürün elde edilmekte ve aynı zamanda ekonomiye katkı sağlanmaktadır (Uhlig 1998).

Beta-Galaktosidaz sentezi için genel olarak peynir altı suyu ve şeker kamışı küspesinden yararlanılmaktadır.

Peynir altı suyundaki yüksek süt şekeri içeriği dolayısıyla bazı tesisler bu şekerin bir kısmını kristalize laktoz olarak elde ederler. Daha sonra temizlenerek ilaç ve şekerleme endüstrisinde kullanılmaktadır.



Endüstride laktazın (β -galaktosidaz enzimi) uygulanması (Birch, 1981)

Şekil 2.10 Endüstride laktazın uygulanması

A₁ : Farmasotik Uygulamalar : Laktazın ağız yoluyla alınması; asitli laktaz direkt olarak sindirilirken , nötral laktaz enterik kaplı olarak sindirilebilir.

A₂B : Tüketici tarafından direkt olarak süte laktazın uygulanması; nötral laktaz tüketici tarafından süte eklenmektedir. Buzdolabında bir gece belettikten sonra kullanılan laktaz miktarına bağlı olarak süt kısmen ve ya tamamen hidrolizlenir.

C, D : Gıda endüstrisindeki uygulamaları

Sütteki laktozun hidrolizi süt ürünlerinin pazarlanmasında potansiyelin artmasına neden olmaktadır. Tatlılığın artması, laktozun kristalizasyonunun azalması, ürünün kalitesini arttırdığı için bu durum laktozu normal sindiren ve Beta-Galaktosidaz eksikliği olan tüketicilere yönelik yeni pazarların oluşmasına olanak sağlayabilmektedir.

2.3.5 Hücre: *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140

Yüksek kalitede enzimlerin üretimi için mikrobiyal hücreler en uygun kaynaklardır. Mayalar etil alkol üretiminde, gliserinin fermantasyonunda, ekmek yapımında, besin ve yem mayacılığında kullanılan endüstriyel öneme sahip organizmalardır. Eumyetes alt bölümünde, klorofil içermeyen, gerçek mantar olan ve doğada yaygın olarak bulunan ve sitoplazma, çekirdek, yedek besin depoları olan vakuoller ve metakromatik cisimcikler

içerirler. Mayalar endüstride birçok ürünün elde edilmesinde kullanılan mikroorganizmalardır. *Saccharomyces* hücrelerinin yaklaşık 30 türü bulunmaktadır.

Laktoz içeriği bulunmayan besi ortamlarında yetişen hücrelerde Beta-Galaktosidazın enzim düzeyleri düşüktür. Besi ortamına laktoz ilavesi ilk hücre jenerasyonu boyunca Beta-Galaktosidaz aktivitesinde 10 misli artış sağlar. Enzim indüksiyonu bir başlatıcının sürekli hazır bulunmasına ihtiyaç duyar, çünkü başlatıcının uzaklaşması enzim seviyesinde bir azalmaya sebep olmaktadır (Dickson *et al.* 1980, Sheetz 1980). Galaktosidaz üretimi mayanın cinsine ve gelişme koşullarına bağlıdır. Mayalardan enzim elde edilmesi enzimatik işlemlerde karşılaşılan yüksek maliyetin çözümü için son yıllarda önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

Kluyveromyces lactis maya hücrelerinin geliştirilmesinde laktoz kullanılması oldukça büyük önem taşımaktadır. Çünkü laktoz metabolizmada hem Beta-Galaktosidazın aktivitesini hem de laktoz taşıma sisteminin indüksiyonunu gerçekleştirir. Laktoz, enerji gerektiren bir taşıyıcı işlem aracılığıyla hücre içine taşınır, bu laktoz taşıma sistemi laktoz için çok spesifiktir. Bu sistem laktoz ve galaktoz tarafından teşvik edilirken glikoz tarafından güçlü bir şekilde bastırılmaktadır (Dickson 1983., Boze *et al.* 1987, Moulin *et al.* 1987).

Çalışmada kullanılan *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 hücresinin içerdiği Beta-Galaktosidaz enzimi bir endo enzimdir. Bu nedenle saflaştırma işlemi yapmadan önce hücre parçalama işlemlerinden yararlanarak enzimin kazanılması gerekmektedir.

Kluyveromyces lactis enzimi optimum 35-40 °C sıcaklık ve pH 6,6-6,8'de en aktif durumda iken + 4 °C sıcaklıkta da aktivite gösterdiği bulunmuştur. Hücre enzimin bu özelliğinden dondurulmuş süt ürünleri yapımında yararlanılmaktadır (Chapman and Hall 1990) .

Mikrobiyal Beta-Galaktosidaz'ların ticari önemi diğer kaynaklar (Bitkiler, hayvan organları) ile karşılaştırıldığında daha fazladır. Bakteri, maya ve mantar kaynakları laktaz için çok iyi kaynaklardır. Mikrobiyal Beta-Galaktosidaz'lar farklı özellikler

gösterirler. Beta-Galaktosidazlar, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte bakteriyal kaynaklı Beta-Galaktosidazlar daha çok tercih edilmektedirler. Çünkü yüksek enzim aktivitesi gösterirler ve kararlıdırlar (Godfrey and West 1996). Ticari enzim preparatlarının hazırlanmasında kaynak olarak daha çok *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* ve *Candida pseudotropicalis* adlı mayalar, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* küfleri, *Basillus stearothermophilus* ve diğer bazı bakteriler kullanılmaktadır. Çizelge 2.3’de ticari Beta-Galaktosidaz enzimlerinin önemli karakteristikleri verilmiştir (Fox 1985).

Çizelge 2.3 Bazı Ticari Beta-Galaktosidaz Enzimlerinin Önemli Özellikleri

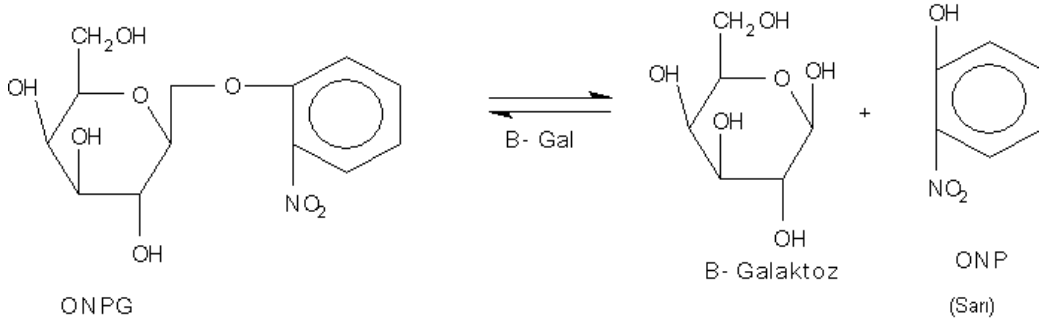
KAYNAK	MOLEKÜL AĞIRLIĞI x 10 ³	PH Optimum	Optimum sıcaklık(°C)	Aktivatör	İyonik İnhibitörler
<i>A.Niger</i>	124	3.0 – 4.0	55-60	-	-
<i>A.Oryzae</i>	80	5.0	50-55	-	-
<i>K. Lactis</i>	135	6.5 – 7.3	35	K ⁺ ,Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺
<i>K. Fragilis</i>	201	6.6	37	K ⁺ ,Mg ²⁺ ,Mn ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺
<i>E. Coli</i>	540	7.2	40	K ⁺ ,Mg ²⁺ , Na ⁺	-
<i>B. Subtilis</i>	-	6.5	50	-	-
<i>B. Stearother</i>	215 – 230	5.8 – 6.4	65	Mg ²⁺	-
<i>S. Thermophilus</i>	530	7.1	55	K ⁺ ,Mg ²⁺ ,Mn ²⁺	Ca ²⁺
<i>L. Thermophilus</i>	540	6.2	55	-	-

Ca⁺² Beta -Galaktozidazların inhibitörü olarak bilinmektedir. Fakat sütte bulunan Ca⁺² iyonlarının tamamı kazeine bağlıdır ve çözelti içerisinde serbest halde bulunmamaktadır. Bu nedenle Beta-Galaktozidazın aktivitesini inhibe etmemektedir (Garman *et al.* 1996).

Günümüzde en çok kullanılan ticari enzim preparatları Lactozym ve Macilact’ tır. Lactozym, *Kluyveromyces fragilis*’ den izole edilen bir Beta-Galaktosidaz’dır. Sıvı

halde bulunan bu enzimin pH'sı 6.5, optimum sıcaklığı 37 °C olup, sodyum ve kalsiyum iyonları varlığında inhibe olmaktadır. *Saccharomyces lactis* adlı mayadan izole edilen Maxilact enzim preparatının optimum çalışma koşulları ise 6.3 – 6.7 pH ve 30 °C'dir. Ağır metallere inhibe olan bu enzimin aktivatörleri potasyum, magnezyum ve manganezdır. Bu enzim preparatlarının çeşitli süt ve süt ürünlerine uygulanması ile yeni süt mamullerinin üretimi gerçekleştirilmiştir (Anonymous 1987).

Beta-Galaktosidaz enzimi, laktozun dışında orto-nitrofenil-β-D-Galaktopiranosit (ONPG) ve para-Nitrofenil-α-L-arabinopiranosit (PNPG) gibi sentetik substrat bileşikleriyle de reaksiyona girmektedir. Beta-Galaktosidaz enzimi, ONPG ile hidroliz reaksiyonuna girdiğinde, substrat, galaktoz ve orto-Nitrofenol (ONP) bileşenlerine ayrılmaktadır. Renksiz bir bileşik olan ONPG, bu hidroliz reaksiyonu sonunda oluşan ve çözeltiliye sarı renk veren orto-Nitrofenol sayesinde enzimin aktivite değerlendirme çalışmalarında kullanılabilir (Chandler *et al.* 1998)



Şekil 2.11 ONPG'nin enzim ile hidroliz tepkimesi (Chandler *et al.* 1998)

Beta-Galaktosidaz enzimi endüstrideki kullanım alanlarının yanında toksisite testlerinde çalışılan enzimler arasındadır. Günümüzde çevredeki kirlilik yükünün gerek endüstriyel gerekse tarımsal aktiviteler sonucunda giderek artması toksisite testlerinin önemini arttırmıştır (Bitton and Koopman 1992). Yapılan bir çalışmada yaşadığımız çevrede bulunabilecek mikropsal ve enzimatik toksisite testi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Toksik etkilerin belirlenmesinde *Bacillus* sp. tarafından sentezlenen Beta-Galaktosidaz enzimi kullanılmıştır. *Bacillus* cinsi bakteriler Beta-Galaktosidaz enzimini genellikle ekstraselüler olarak sentezlemektedir. Çalışmada çevre kirleticileri arasında yer alan ve

toksik bileşikler olarak tanımlanan 4- Klorfenol, 2,4- Diklorfenol ve 2,4,6- Triklorfenol bileşiklerinin bakterinin üreme, Beta-Galaktosidaz sentezi ve aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Toksikite testlerinde kullanılan enzimler arasında yer alan β -Galaktosidaz enzimi ile gerek biyosentezi gerekse aktivitesi bakımından birçok araştırmada çalışılmıştır (Koopman *et al.* 1988). Beta-Galaktosidaz biyosentezi testi, atık su sistemlerinde gerek organik kimyasal bileşiklerin gerekse çeşitli ağır metallerin toksisitesinin değerlendirilmesi bakımından kullanışlı bir metot olarak öngörülmüştür (Koopman *et al.* 1988).

Beta-Galaktosidaz enzimi ayrıca tıpta ELISA tekniğinde kullanılan enzimler arasındadır. Kanda belirli bir antikorun varlığını saptamak ya da düzeyini belirlemek amaçlı yapılan kan testidir. AIDS teşhisinde büyük rol oynar (Gacesa 1987).

2.4 Enzim saflaştırmada planlama ve strateji

Protein yapısı ve işlevinin anlaşılması için birçok farklı proteinle çalışmalar yapılmıştır. Bir protein hakkında herhangi bir ayrıntıyı çalışmak için bu diğer proteinlerden ayrılmalı ve uygun tekniklerle özellikleri tanımlanmalıdır. Bu yöntemler biyokimyanın en eski dallarından olan protein kimyasından gelmektedir.

Bir proteinin özelliklerini, aminoasit bileşimini ve dizisini tanımlayabilmek için önce saf olarak elde edilmesi esastır. Hücreler binlerce farklı çeşit protein içermektedir ve bunlardan sadece bir tanesinin saflaştırılması bir proteinin diğerinden farklı özelliklerinin olmasıyla sağlanabilir. Örneğin pek çok protein, özgül olarak başka biyomoleküllerle bağlanır ve bağlanma özellikleriyle proteinler ayrıştırılabilir.

Protein kaynağı genellikle doku veya mikrobiyal hücrelerdir.

Enzim saflaştırma stratejisinde, temel kriter; en düşük maliyetle, en yüksek saflık ve enzim aktivitesini elde etmektir.

Öncelikle saflaştırılacak enzimin ne için gerekli olduğuna karar verilmelidir. Laboratuar çalışmaları için az enzim ama saflık derecesi mümkün olduğu kadar yüksek, sanayideki kullanımı için ise çok enzim ama saflık derecesinin yüksekliği pek de fazla olmayan

enzim numunesi istenir. Enzimle ilgili verilerin toparlanıp ortaya konması hayati öneme sahiptir. Strateji belirlenirken yapılması gereken hususlardan birisi de enzim kaynağıdır. Maliyet ve zaman saflaştırmada oldukça önemlidir.

Dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardan birisi de enzim aktivitesinin korunmasıdır. Ne yapılırsa yapılsın enzim aktivitesi azalacaktır. Ama bu azalışı en aza indirecek şekilde gerekli önlemler alınmaya çalışılmalıdır:

- Enzim her zaman +4 °C' de saklanmalıdır.
- Her enzim için uygun bir tampon kullanılmadadır.
- Kullanılan araç-gereç, kimyasalların sağlıklı olması gerekmektedir.

2.4.1 Belli Başlı Saflaştırma İşlemleri

1. Enzim Kaynağından Enzimin Çıkarılması: Bu işlem her kaynak için farklı şekillerde yapılabilir. Mesela bakteri için sonikasyon (ses dalgalarıyla parçalama) kullanılırken, bitki için ezme yöntemi kullanılabilir. Hücre dışında bulunan enzimlerle yapılan çalışmalar enzimin izole edilmesi için ek işlem gerektirmez, halbuki hücre içinde bulunan enzimler için hücre duvarı ve zarının bir bariyer olarak difüzyon kısıtlamasına neden olacağı açıktır. Bu engeli aşabilmek için çeşitli hücre parçalama yöntemleri geliştirilmiştir (Angal and Harris 1990).

-Hücre parçalama işlemleri

Hücre zarı parçalanması hücre içi proteinlerin yalıtılması için gereklidir. Rekombinant DNA teknolojisi ile yapılan çalışmalar maya ve bakterideki birçok farklı proteinin koloniler halinde bulduklarını göstermektedir. Parçalama yöntemleri kimyasal ve fiziksel olarak iki grup altında incelenmektedir.

i) Kimyasal işlemler

Kimyasal işlemlerde uygun tamponlardaki bakteri ve maya hücre çözeltileri ile organik çözücüler, enzimler, deterjanlar ve bazlarla muamele edilir. Toluen veya deterjanla hücrelerin muamele edilmesi sonucunda zar lipidleri çözüneceği için bu yolla hücre içi proteinlerin serbest kalması sağlanabilmektedir. İşlem sırasında hücre duvarı tamamen bozulmadığı için zara bağlı proteinlerin çoğu hücre içerisinde kalmaktadır (Jeffrey 1980).

ii) Fiziksel parçalama

Uygun tamponlardaki bakteri ve maya hücre çözeltilerine çeşitli mekanik parçalama tekniklerinin uygulanmasıdır. Fiziksel parçalama işlemleri, osmotik şok, ses dalgaları (sonikasyon), homojenizasyon, cam bilyelerle parçalama olarak gruplandırılmaktadır (Angal and Haris 1990).

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

Ses dalgaları (sonikasyon) : Şiddetli ultrasonik dalgalar hücre süspansiyonunda buhar kabarcıkları oluşumunu artırır, bu oluşum hücre zarının çökmesine ve yıkılmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda hücre çözeltilisinin viskozluğunda azalma ve köpürme görülür. İşlem sırasında proteolitik bozunma ve proteinlerin denatürasyonu ile önemli miktarda ısı açığa çıkmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla proteinlerin denatüre olmaması için soğutma işlemi uygulanmalıdır. Bu metot özellikle bakteri hücrelerinin analitik ölçekte parçalanmasında kullanılabilir.

Homojenizasyon : Homojenizatörde yüksek basınç altında, sürekli olarak dönen metal içine hücre pompalanması ile gerçekleştirilen parçalama işlemidir. Basıncın şiddeti ve aniden düşmesi hücre zarının parçalanmasına neden olur. İşlem sonunda hücre çözeltilisinin viskozitesinde azalma görülmektedir. Mekanik enerjinin büyük miktarının

dağılmasından dolayı sıcaklık 15°C'ye kadar çıkabilmekte ve proteinlerin denatürasyonuna sebep olabilmektedir. Bu nedenle parçalama işlemi öncesi ve homojenizasyon boyunca yapılması gereken soğutma için homojenizatör içinden geçen soğutucular çok yönlü olarak kullanılmalıdır. Parçalama işlemi sonucunda oluşan hücre yıkıntıları büyük yoğunlukta küçük parçalardan oluşmaktadır, filtrasyonun zorluğu ve katılaşmaya yatkınlıklarından dolayı elde edilen enzimlerden ayrılması sorunludur.

Cam bilyelerle parçalama : Küçük cam bilyelerin (R 0,3-0,4 mm) bulunduğu bilye değirmeninde hücre süspansiyonu yüksek hızda çalkalanır. Optimum hücre konsantrasyonu mikroorganizmaya göre değişmektedir.

Homojenizasyondan önemli bir farkı, hücre konsantrasyonu parçalama verimini etkilerken, çalkalama hızındaki artışın parçalama üzerindeki etkisi daha azdır. İşlem sonucunda ısı enerjisindeki artış soğutma ceketleri ile düşürülmektedir. Proteinlerin denatürasyonunun önüne geçebilmek için sıcaklık 0-4 °C arasında tutulmalıdır.

Bu metot yüksek lifli mikroorganizmaların parçalanması için de kullanılmaktadır (Angal and Haris 1990).

2. Santrifüjleme: Değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. 1. basamaktan sonra hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. Bunun yanı sıra amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra da yapılır. Çok defa başvurulabilecek bir işlemdir.

3. Amonyum Sülfatla Çöktürme : Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Çöktürme işlemlerindeki istediğimiz aralığı bulduğumuz zaman diğer proteinlerden kurtulmuş oluruz.

4. Diyaliz: İstenmeyen küçük maddelerden kurtulmak için yapılan bir işlemdir.

5. Isıtma: Aradığımız enzimin de özelliklerini göz önünde bulundurarak belirli dereceye kadar ısıtma işlemi yaptığımızda ilgilenmediğimiz diğer bazı proteinlerden kurtulabiliriz.

6. İzoelektrik Noktaya Göre Çöktürme: Aranılan enzimin izoelektrik noktasına göre belli bir PH aralığında karıştırılarak çöktürme işlemi yapıldığında yine bir çok proteinden kurtulmuş oluruz.

7. Kolon: Saflaştırma teknikleri içinde en çok saflaştırma derecesi veren işlem kromatografik tekniklerdir. Kromatografi bir örnek içindeki komponentlerin hareketli ve durgun fazlar arasında yapılan diferansiyel bir ayırma işlemidir. Molekül büyüklüğü, elektriksel yük, afinite gibi değişik özelliklerden yararlanılarak hazırlanan kolonlardan numune geçirildiği zaman yüksek bir saflaştırma yüzdesi elde edilir.

Proteinleri fraksiyonlamada kullanılan en güçlü teknik olan kolon kromatografisinin avantajı, proteinleri yük, büyüklük, bağlanma afinitesi ve diğer özelliklerine göre ayırmasıdır. Uygun kimyasal özelliğe sahip poröz katı maddeyle kolon kaplanır (duran faz) ve tampon çözelti (hareketli faz) bundan filtre edilir. Protein içeren çözelti kolonun tepesinden bırakılır, katı matriks üzerinden bu çözelti filtre olur. Her bir protein özelliğine göre hızlı veya yavaş olarak kolon boyunca hareket eder. Protein bantın genişliğini ayırışan proteinlerin farklı özellikleri ve difüzyonel dağılımları belirler. Kolon uzunluğu arttırıldığında protein çözeltisinin kolondan çıkış süresi uzar.

Kromatografik metotların geliştirilmiş olanı HPLC veya yüksek performans sıvı kromatografisidir. HPLC'de yüksek basınçlı pompalar kullanılır ve protein molekülleri kolonun aşağısına doğru hızla itilir, yüksek nitelikli kromatografik madde bu basınçlı akımın ezici kuvvetine karşı koyacak şekilde yapılmıştır. HPLC'de kolondan geçiş süresi oldukça azaltılmış, böylece protein bantların difüzyonel dağılması sınırlandırılabilmiş ve yüksek çözünürlükte ayırışma sağlanmıştır.

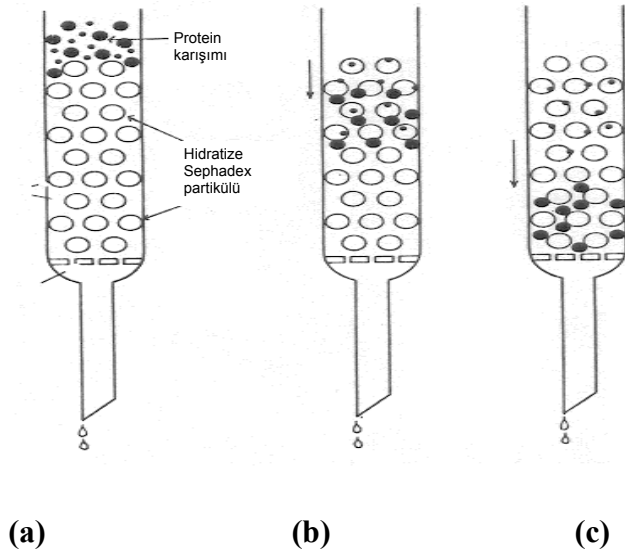
2.5 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve en etkili yöntem, jel filtrasyon kromatografisidir. Genel adıyla dışarılama kromatografisi olarak da bilinen bu kromatografide duran faz, polimer yuvalarına su emdirilip oluşturan bir jel, yürüyen faz sıvıdır. Bu metotta bir kolona kuvvetli hidratize olmuş polimer materyal

konulur. Bu materyal Sefadexs, Sefaroz gibi bir polisakkarit veya Biogel gibi bir poliakrilamid türevi olabilir. Jel partikülleri değişik büyüklükte porlara sahip şekilde hazırlanabilir.

Polimer materyal iyice yıkanır, tamponla dengelenir ve daha sonra aynı tampon içinde çözülmüş olan protein karışımı kolona uygulanır. Büyük molekülü proteinler jel partiküllerinin porlarına giremezler ve hızlıca yürürler. Küçük molekülü proteinler ise, porlara girerler ve akışları engellenir. Böylece elüatta önce büyük molekülü proteinler, daha sonra da küçük molekül büyüklüğüne göre proteinler toplanırlar.

Bu işlem süzme işleminin tersidir. Elüatlar küçük fraksiyonlar halinde toplanarak, gerekli analizler yapılır



Şekil 2.12 Bir Sefadexs kolonunda farklı büyüklükteki iki proteinin ayrılması

(a)'da protein karışımı tatbik ediliyor.

(b)'de küçük moleküller porlara giriyor, büyük moleküller yürüyorlar .

(c)'de iki protein birbirinden ayrılıyor.

Jel filtrasyon kromatografisi, diğer makromoleküller, virüsler, ribozomlar, hücre çekirdekleri ve hatta bakteriler gibi çok daha büyük yapıların karışımlarının ayrılmasında da kullanılabilir. Bu durumlarda sadece uygun porlu partiküller

seçilmelidir. Bu metotta ayırma gücü o kadar büyüktür ki, bu basit metod proteinlerin molekül kütlelerinin tayininde de kullanılabilir.

Jel filtrasyon kromatografisinde en sık kullanılan duran faz, Sefadeks ticari adıyla bir İsveç firması tarafından piyasaya sürülen polimerdir. Sefadeks, bir karbonhidrat olan dextranın üç boyutlu hale getirilmesi ile elde edilir. Fazla miktarda hidroksil grubu içermesi dolayısıyla suya ve elektrolit çözeltilerine ilgisi fazladır. Bu sıvıları emerek yarı saydam jel tanecikleri oluşturur, bu esnada hacmi artar, elde edilen jel tanecikleri kolona doldurulabilir.

Jellerin özelliklerini belirlemede kullanılan temel terim “su kazanım değeri”dir. Bir gram kuru jelin yuvarlarının gözenekleri tarafından emilebilen su miktarına o jelin su kazanım değeri denir. Su kazanım değeri 10 ile çarpılarak ve önüne G harfi getirilerek jelin ticari adının sonuna yazılır. Örnek olarak Sefadeks G-15 jelinin su kazanım değeri 1,5’tur (1g madde 1,5 g su emebilir). Bir jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar. G-10 jeli ile molekül kütlesi ancak 700’e kadar olan moleküller ayrılabilir. G-200 jeliyle molekül kütlesi 5.000 ile 800.000 arasında olan bileşikler ayrılabilir.

<u>Jel Türü</u>	<u>Ayrırma Kesri (Dalton)</u>
Sefadeks G-10	700
Sefadeks G-15	1.500
Sefadeks G-25	1.000-5.000
Sefadeks G-50	1.500-30.000
Sefadeks G-75	3.000-70.000
Sefadeks G-100	4.000-150.000
Sefadeks G-150	5.000-400.000
Sefadeks G-200	5.000-800.000

Sefadeks’ten başka ticari adlarla piyasaya sürülen jeller de vardır. Bunlardan Amerika’da imal edilen ve Biogel ticari adıyla piyasaya sürülenler üç boyutlu poliakrilamid

polimerleri yuvarlarından oluşmuştur. Daha büyük moleküllerin, mesela bazı proteinler ve virüslerin ayrılmasında agardan elde edilen ve nötral bir polisakkarit olan agaroz jeli (Sefaroz) kullanılır (agar, sülfat asidi ile esterleşmiş heksoz birimlerinden oluşan galaktozlardan oluşur).

Yukarıda bahsedilen jeller su veya sulu çözeltiler için uygun olanlardır. Jellerdeki hidrofil grupları bazı reaktiflerle etkileştirilerek hidrofob gruplara çevrilebilir. Ayrıca polistirenin üç boyutlu hale getirilmesiyle elde edilen jel yuvarları, lipitler gibi hidrofob maddelerin ayrılmasında kullanılabilir. Bu ayrılmalarda yürütücü sıvı olarak organik çözücüler kullanılabilir

Kolonun Hazırlanması ve Dengelenmesi

Jel filtrasyon kromatografisinde en sık kullanılan Sefadeks katı halde bulunur. 100 ml yatak hacmi oluşturmak üzere;

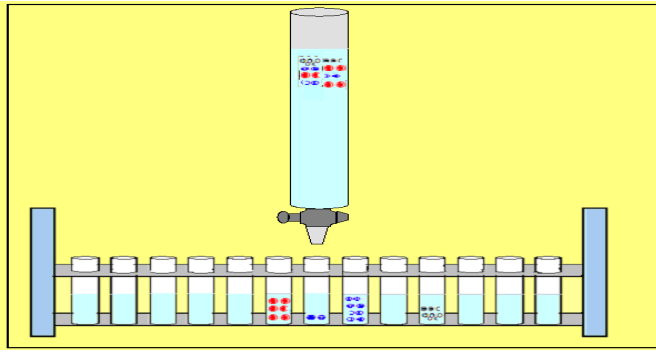
- 20 gram Sefadeks G-25,
- 10 gram Sefadeks G-50,
- 8 gram Sefadeks G-75,
- 5 gram Sefadeks G-100
- 3 gram Sefadeks G-200 alınır.

Büyükçe bir beherde saf su veya tampon içine alınarak, oda sıcaklığında 1 gece veya 90°C'de su banyosunda 4-5 saat bekletilerek polimer materyal şişirilir. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırılır.

Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali, dengeleme tamponuyla dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarılır. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapılır. Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH'sı ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçülür, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edilir ve kolonun akış hızı yaklaşık 15-20 ml/saat olarak ayarlanır.

Örneğin Uygulanması ve Elüsyon

Örneğin uygulanmasından önce dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel düzeyine indirilir. Örneğin uygulanması için protein çözeltisinden küçük hacimde (% 10'luk gliserinli olabilir, yaklaşık 2-3 ml) kolona tatbik edilir. Bu protein çözeltisi jele iyice emdirilir ve üzerine birkaç ml elüsyon tamponu dikkatlice ilave edilerek tekrar jele iyice girişi sağlanır. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak elüsyona devam edilir; elüatlar yaklaşık 3'er ml olacak şekilde tüplerde toplanır.

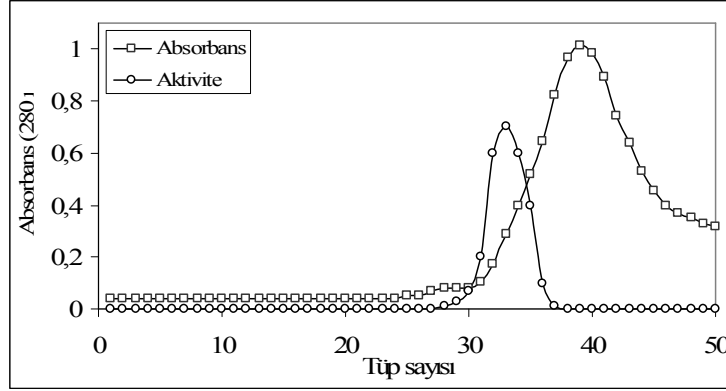


Şekil 2.13 Jel filtrasyon kromatografisinde elüsyonun temsili şeması.

Değerlendirme:

Elüsyon tamponunun kör olarak kullanılmasıyla, toplanan elüatların tek tek veya 2-3 tüpte bir 280 nm de absorbansları ölçülür. Elüsyon almaya 280 nm'deki absorbans değerleri sıfır oluncaya kadar devam edilir. Enzim saflaştırılması yapılıyorsa 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde yine ya tek tek veya 2-3 tüpte bir aktivite ölçümleri yapılır. 280 nm'de kalitatif protein tayini için alınan absorbans değerleri ve enzim aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirilir.

Kromatografi işlemi sonunda enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirilir. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen enzim çözeltileri için Bradford, Lowry ve ya benzer bir metodla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteleri belirlenerek saflaştırma oranları saptanır.



Şekil 2.14 Saflaştırılan bir enzime ait jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile elde edilen elüsyon grafiği.

2.5.1 Jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle molekül kütlesi tayini

Son yıllarda proteinlerin molekül kütleleri tayininde çok kullanılan ve çok basit aletlerle gerçekleştirilen bir methodur. Özellikle globuler (küresel) proteinlerde başarı ile kullanılmaktadır. Bu methodda proteinler, kromatografi işlemine tabi tutulurlar. Küresel proteinlerin kolondan geldiğini gösteren 280 nm deki absorbansa karşılık gelen elüsyon tampon hacmi (veya Kav değeri: distribution coefficient; dağılıma katsayısı; kağıt kromatografisindeki Rf değerinin benzeri bir değer) ile proteinin molekül kütleleri arasında bir ilişki vardır. Önce kolondan molekül kütleleri bilinen saf küresel proteinler akıtılarak bir standart grafik elde edilir.

Bu grafik, 280 nm de maksimum absorbansın elde edildiği tüp sayısına karşı molekül kütlelerinin logaritmasının çizilmesiyle hazırlanır. Daha sonra molekül kütlesi bilinmeyen proteinin kaçınıcı tüplerde geldiği bulunur ve grafikten molekül kütlesi tayin edilir. Bu methodun en önemli avantajlı yönü, molekül kütlesi tespit edilmek istenen proteinin saf halde olması gerekmemektedir. Ancak proteinin hangi fraksiyonda geldiğini belirleyen bir yöntem olmalıdır.

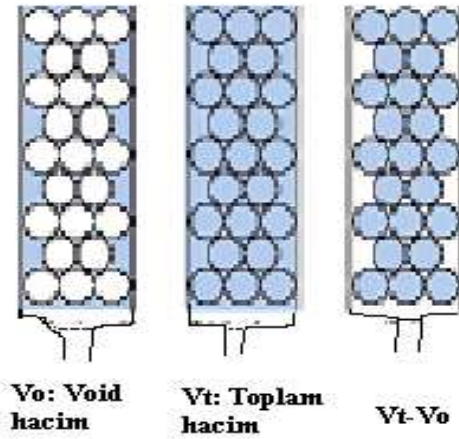
Kav değeri'nin bulunması için aşağıdaki formül kullanılır:

$$K_{av} = \frac{V_p - V_o}{V_t - V_o}$$

V_p : Proteinin elüsyon hacmi

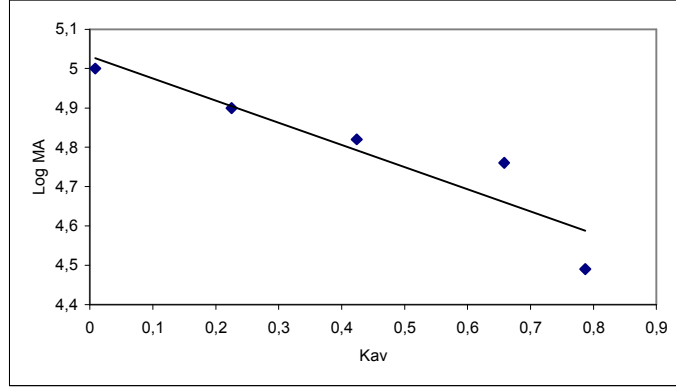
V_o : Void hacim (Mol kütlesi 2.000 kDa olan Blue dextran'ın elüsyon hacmi)

V_t : Kolonun yatak hacmi



Şekil 2.15 Jel filtrasyon kromatografisinde V_o (void hacim) , V_t (yatak hacmi) ve $V_t - V_o$ değerlerinin kolonda gösterilmesi

Standart proteinlerin nasıl uygulanacağı üretici firma tarafından verilen protein standartının üzerinde belirtilmiştir. Herbir standart proteinin elüsyon hacmi bulunur. Daha sonra herbir standart protein için K_{av} değeri hesaplanır. “log molekül kütlesi- K_{av} değeri” grafiği çizilir. Daha sonra molekül kütlesi bulunması istenen enzim çözeltisi kolondan geçirilerek, hangi fraksiyonda geldiği ve elüsyon hacminin ne olduğu bulunur. Grafikten ekstrapolasyonla veya grafiğin denkleminde molekül kütlesi bilinmeyen proteinin molekül kütlesi hesaplanır.



Şekil 2.16 Molekül kütlesi tayini için Sefadex G-150 kolon materyali ile yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik. Standart olarak hegzokinaz: 100 kDa, kreatin kinaz: 81kDa, bovin serum albumin: 67 kDa, deoksiribonükleaz: 31 kDa kullanılmıştır.

2.6 İyon Değişim Kromatografisi

Bu kromatografide duran fazda bulunan ve yerlerinden kolaylıkla ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki (yürüyen sıvıdaki ve karışım içindeki) iyonlarla yer değiştirir. Bu değişim sonucunda duran fazın fiziki görünümünde değişim olmaz. İyon değişim kromatografisi ile ayırma için iyonik yapı şarttır. Bu yöntemle basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılabilen gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir.

Başlıca üç tip iyon değişim materyali vardır:

- *İyon değişim reçineleri
- *İyon değişim jelleri
- *İyon değişim selülozları

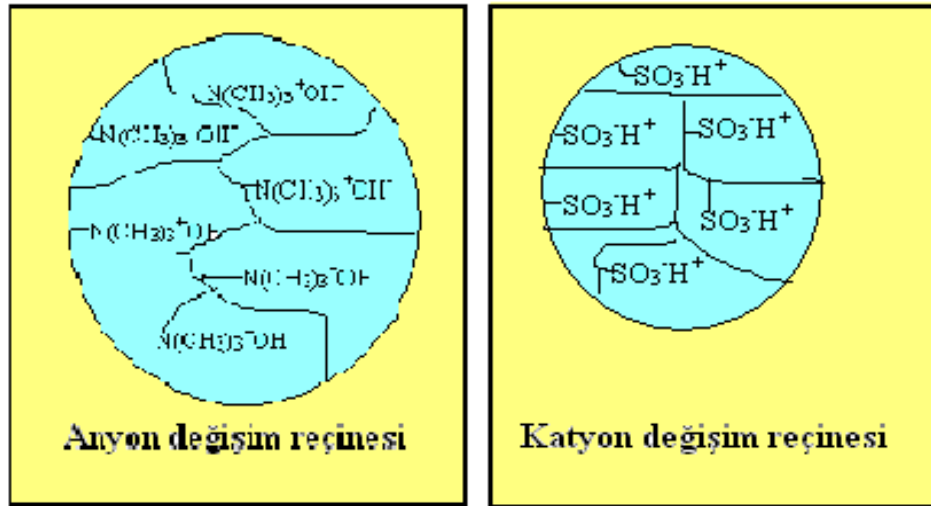
İyon değişim reçinelerinden tabii olanlarına zeolitler denir. Bunlar karışık silikat yapısında ve suyun sertliğinin giderilmesinde kullanılan maddelerdir. Kromatografik amaçlı ayırmalarda kullanılamazlar. Sentetik iyon değişim reçineleri ise bu amaçlara uygundur.

Sentetik İyon Değişim Reçineleri

İlk sentetik iyon değişim reçinesi fenol sülfonik asidin formaldehitte etkileştirilmesiyle elde edilmiştir. Bu reçineler $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$ gibi asidik gruplar içermektedir.

Stiren ve divinilbenzenin üç boyutlu polimerleştirilmesiyle ve daha sonra elde edilen polimere asidik veya bazik gruplar bağlanmasıyla katyon değişim veya anyon değişim reçineleri elde edilebilir.

Katyon değişim reçinelerinde hidrojen iyonu (H^+) veya sodyum iyonu (Na^+), ayrılacak maddelerin katyonlarıyla, anyon değişim reçinelerinde ise hidroksit iyonu (OH^-) veya klorür iyonu (Cl^-) ayrılacak maddelerin anyonlarıyla yer değiştirir.



Şekil 2.17 Örnek birer anyon ve katyon değişim reçinelerinin şekilleri

İçinde ayrılacak iyonlar bulunan karışım iyon değişim reçinesi doldurulmuş kolonun üst tarafından konur. Karışımdaki iyonlar reçinelerdeki iyonlarla hemen yer değiştirir. Daha sonra kolondan iyon içeren bir çözelti geçirilir. Bu iyonlar asidik, bazik veya diğer nötral iyonlar olabilir. Çözeltideki iyonlar karışımın iyonlarını reçineden sökerek yürütürler. Bu yürümenin hızı farklı iyonlar için farklı olacağından kolonun alt tarafından iyonlar birbirlerinden ayrılmış olarak çıkacaklardır.

2.6.1 Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri

Protein karışımlarının DEAE-selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve herbir komponentin sırayla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azaltılır. Çünkü pH'nın düşmesiyle birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir.

Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha zayıf bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar. Elüatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır.

Bu metodun önemli bir tarafı da, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine edebilmesidir. Mesela, DEAE-Sefadeks kullanılarak proteinleri yüklerine ve moleköl büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür.

İyon değişim kromatografisi yöntemiyle proteinlerin saflaştırılması sırasında kolonun hazırlanması, dengelenmesi, örneğin uygulanması ve elüsyon işlemleri jel filtrasyon kromatografisindeki çok benzer. En önemli fark elüsyon işlemindedir.

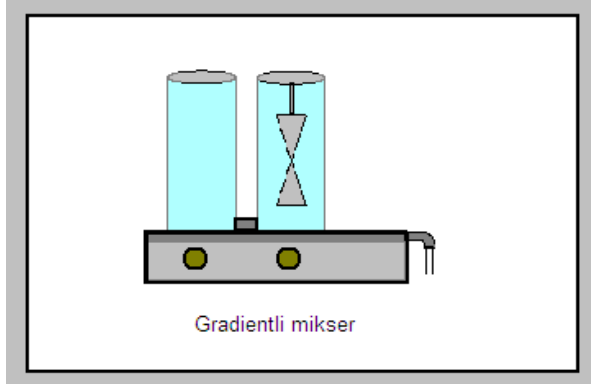
Genelde iki farklı elüsyon uygulanır:

1. Basamaklı Elüsyon:

Kolondan proteinlerin elüsyonu sırasında değişik pH'lı ve değişik iyonik şiddetli çözeltiler sırayla geçirilir. Bu yöntem çok zaman alıcıdır.

2. Gradientli Elüsyon:

Bu amaçla bir gradient mikser kullanılır. Örnek olarak DEAE-Selüloz kullanılarak pH 8.0-5.0 arasında gradient uygulamak isteyelim. Kolonun dengelenmesi ve numune tatbiki pH=8.0'de yapılır. Bu ortamda proteinler genelde negatif yüklü olduklarından kolona tutunurlar. Daha sonra gradient mikser cihazının kolona açılan tarafına pH=8.0'de bir tampon çözelti, cihazın diğer tarafına pH=5.0'da diğer bir tampon çözelti konulur.



Şekil 2.19 Gradientli mikser

Kolondan elüsyon tamponu akarken pH 8.0'den pH 5.0'e doğru bir gradient oluşturulur. Her protein izoelektrik pH'sına geldiğinde yüksüzleşir ve duran faza tutunamayarak elüe edilir. Benzer durum iyonik şiddet gradienti olarak da uygulanabilir. Yine kolona açılan tarafa düşük iyonik şiddette bir çözelti, diğer tarafına yüksek iyonik şiddette çözelti konur ve aynı şekilde gradient uygulanır.

2.7 Enzimin tesbiti için Proteinlerin Elektroferezle Gözlenmesi

Proteinleri ayırtmada bir diğer önemli teknik, yüklü proteinlerin elektrik alanındaki güçlerini esas alan elektroferez yöntemidir. Bu yöntem genel olarak büyük miktardaki proteinleri saflaştırmak için kullanılmaz, daha basit ve uygun alternatifler mevcuttur ve elektroforetik metotlar proteinlerin yapı ve dolayısıyla işlevlerini ters etkiler. Fakat elektroferez, özellikle faydalı bir analitik yöntemdir. Bu yöntemin avantajı, burada proteinlerin hem ayırtılması hem de görüntülenebilmesidir. Elektroferez ile karışımındaki farklı protein sayısını veya özgün bir proteinin saflık derecesi tahmin edilebilir. Ayrıca elektroferez, proteinlerin izoelektrik noktaları ve yaklaşık molekül ağırlıkları gibi çok önemli özelliklerini de tanımlamaya olanak sağlar.

Proteinler elektroferezde genellikle çapraz bağlı polimer olan poliakrilamitten ($[-CH_2CH(CONH_2)-]_n$) yapılmış jeller üzerinde yürütülür. Poliakrilamit ($MA=5.000.000-6.000.000$) jel, akrilamit monomerlerinin, N,N metilen-bis akrilamit ile polimerizasyonu sonucu oluşur. Metilen bis akrilamit çapraz bağlama görevi yapar. Jel, elektroferez kaplarında dondurulur ve reaktiflerin konsantrasyonlarını değiştirerek çeşitli büyüklükte

jeller oluşturulur. Bunlar geniş bir pH sınırları içinde ve oda sıcaklığında sabittirler. Poliakrilamitin büyük önemi bulunan teorik bir özelliğide, proteinleri ayırmak için uygun büyüklükte jellerin elde edilebilir olmasıdır (Aras 1975). Poliakrilamit jel bir elek görevi yapar ve yük/kütle oranına göre proteinlerin göçü yavaşlar. Göç proteinin şeklinden de etkilenir. Elektroforezde makromolekölü hareket ettiren güç elektriksel potansiyel (E)'dir.

2.7.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) elektroforez

Elektroforetik yöntem çoğunlukla saflık ve moleköl ağırlığını belirlemek için uygulanır ve deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılır. SDS çoğu proteine kabaca moleköl ağırlığının belirlediği miktarda, iki aminoasit kalıntısına bir moleköl SDS olacak şekilde bağlanır. Bağlı SDS net negatif yükü artırır, proteinin iç yükü maskelenir ve her proteinin yük/kütle oranı benzer olur. Ayrıca, SDS bağlandığında proteinin doğal şekli de değişir ve birçok protein benzer şekil alır. Böylece SDS varlığına elektroforezde proteinler tamamen moleköl ağırlığı temel alınarak ayrılır, ufak polipeptitler daha hızla göç eder. Elektroforez sonrasında proteinler, jele bağlanmayan fakat proteinlere bağlanan Coomassie blue, Gümüş nitrat ($AgNO_3$) gibi bir boyayla görüntülenir. Böylece protein saflaştırma işleminin gelişimi de monitorize edilebilir, çünkü her yeni bir fraksiyonasyon basamağından sonra boyanın protein bandının sayısı azalacaktır. Eğer tanımlanmamış proteinin pozisyonu, moleköl ağırlığı bilinen bir proteinin jeldeki göçüyle karşılaştırılırsa, moleköl ağırlığı tanımlanabilir. Eğer protein iki veya daha fazla alt birim içeriyorsa, bu alt birimler genellikle SDS ile ayrılacaktır ve her biri için ayrı bant gözlenecektir (Lehninger 2005).

2.8 Enzim Aktivite Tayinlerinde Kullanılan Yöntemler

Enzim aktivite tayinlerinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat veya meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülmektedir. Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken o yöntemin pratik oluşuna, hızlı oluşuna ve hassas oluşuna özen göstermek gereklidir.

Enzim aktivite tayininde kullanılan bazı terimler aşağıda verilmektedir.

Ünite: Bir mikromol (μmol) substratı bir dakikada, optimum koşullar altında ürüne dönüştüren enzim miktarı bir ünite (IU) olarak kabul edilmektedir.

Spesifik aktivite: Bir miligram (mg) proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilmektedir. Buna göre spesifik aktivite;

$$\text{Spesifik Aktivite} = \text{Ünite} / \text{mg protein}$$

Enzim aktivite tayininde kullanılan yöntemler şunlardır (Gözükara 1997)

- 1) Spektrofotometrik Yöntem
- 2) Monometrik Yöntem
- 3) Thunberg Yöntemi
- 4) Elektrot Yöntemi
- 5) Polarimetrik Yöntem
- 6) Kromatografik Yöntem
- 7) Kimyasal Tayin Yöntemi

Spektrofotometrik Yöntem: Pek çok enzimin substratı, ürünü veya koenzimi görünen ışıktaki veya ultraviyole ışıktaki bir tepe değeri göstererek pik vermektedir. Bu durumda substratın kaybolması veya ürünün meydana gelişi ya da koenzimdeki değişiklik spektrofotometreden tayin edilir. Spektrofotometrik yöntem kolaylığı, basitliği ve hassas oluşuyla diğer yöntemlere tercih edilmektedir. Bu yöntemde optik yoğunluk değişimi, enzim reaksiyonunun ölçülmesi olarak alınmaktadır. Belirli zamandaki optik yoğunluk değişimi, belirli miktardaki enzim ünitesine eşit kabul edilmektedir

Monometrik Yöntem: Bir komponenti gaz alan enzimlerin aktivitelerini ölçmek için kullanılan bir yöntemdir (Dixon 1951).

Thunberg Yöntemi: Çok sayıdaki *dehidrogenaz* enziminin aktivitesi bu yöntem kullanılarak tayin edilmektedir. Metilen mavisi elektron akseptörüdür. Bu bileşiğin okside durumu renkli, redükte durumu ise renksizdir. Enzim aktivite tayininde ortama belli bir miktarda metilen mavisi ilave edilir. Göz ile renk kaybolmasındaki geçen

zaman saptanır. Deney sistemini havanın oksijeninden korumak için özel yapıdaki Thunberg tüpü kullanılır.

Elektrot Yöntemi: Cam elektrotlar ile oluşan asit ürünlerin ölçülmesi enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan diğer bir yöntemdir. Ancak her enzim belirli bir pH 'da optimum aktivite gösterdiğinden dolayı pH değişmesi enzim aktivitesinin değişmesine sebep olacağı için bu metoda itirazlar olmuştur. Kullanılan çözeltinin tampon çözelti olması nedeni ile gerçekte meydana gelen asiditeyi tayin etmenin mümkün olmadığı söylenerek pH değişimini ölçmek yerine ortama baz ilave ederek ortam pH'sını sabit tutmanın daha iyi bir yol olduğu önerilmiştir (Jacobsen 1957).

Polarimetrik Yöntem: Pek çok enzimin substratı optikçe inaktiftir. Eğer üründe optik aktivite değişmesi görülecek olursa bu yöntem kullanılmaktadır. Eğer substrat ve ürünün ikisinde optikçe aktif ise bu yöntemin kullanılması uygun değildir.

Kromatografik Yöntem: Diğer yöntemlerle bir ölçme yapılamadığı zaman bu metoda başvurulmaktadır. Enzim substrat karışımlarından belirli zaman aralıklarında örnekler alınır. Kromatografik yöntemde, substrat ve ürün ya kromatografi kağıdında veya ince tabaka kromatografisi ile birbirinden ayırt edilir. Miktar tayini için leke kazınarak veya kesilerek o madde ekstrakte edilip başka bir kimyasal yöntem ile ürün miktarı tayini yapılır. Pratik bir yöntem değildir.

Kimyasal Tayin Yöntemi: Birçok enzimde reaksiyon başladıktan sonra belirli zaman aralıklarında karışımdan örnek alınıp substrat veya ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan aletler

- Absorbans ölçümleri için Shimadzu UV-1700 UV/VIS ve Pharmacia Ultraspec 3000 UV/ VIS Spektrofotometre,
- pH ölçümleri için SESA 1400 model pH- metre,
- İnkübatör olarak Nüve EN 120,
- Sigma 8K10 ve Sigma 3K30 model santrifüj,
- Mayanın parçalama işlemi için Dr. Hielsher UP 200 H ultrasonikatör,
- Jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisinde Pharmacia Biopilot FPLC,
- Sartorius sartocan micro 100 model ultrafiltrasyon aleti,
- Bio-Rad Protean Iixi Cell model elektroforez kullanıldı.
- Mayanın üremesi için kullanılan fermentör el yapımıdır.

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup başka ek işlem yapılmadı.

- Maya ekstraktı ve pepton Difco, laktoz Merck firmasından temin edilmiştir.
- Tris-HCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Quantum Biotechnologies,
- MgCl_2 , EDTA, Gliserin, PMSF, Na_2CO_3 , AgNO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Etanol, Metanol, Asetik asit ve formaldehit Merck firmasından,
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, β -Merkaptoetanol, Sodyumdodesilsülfat (SDS), Akrlamit, Bis-Akrlamit, amonyum persülfat, ONPG Sigma firmasından
- Temed Biorad firmasından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 mayasının çoğaltılması ve parçalanması

Çalışmada kullanılan *Kluyveromyces Lactis* NRRL-Y-1140 mayası, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir.

Mayanın üremesi için uygun besi ortamı : 10 L YPL (10 g/L maya ekstraktı, 5 g/L pepton, 40 g/L laktoz) kullanılmıştır (Becerra, 1998).

Maya, el yapımı fermentör kullanılarak (Şekil 3.1) 36 °C'de 24 saat bekletilerek hazırlanmıştır.

Fermentör için; 10 L cam damacananın ağzı kauçuk tıpa ile kapatıldı. Tıpayı önceden iki delik açıldı. Deliklerden biri, ortama 0.2 µ filtreden süzülerek steril hava vermek için, diğeri damacananın içindeki havanın 0.2 µ filtreden süzülerek dışarı çıkması için kullanıldı.

Besiyeri içine magnet koyuldu, 121 °C' de bir saat otoklavlandı. 36 °C'de fermentör, manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bir taraftan hava kaynağı pompadan hava verildi. 24 saatlik kültürün 600 nm'de absorbansı başlangıç kültüre (kör) karşı 1,876 bulundu.

Sigma 8K10 santrifüjle, 6000 devirde mayaların çöktürülerek ayrılması sağlandı.



Şekil 3.1 *Kluyveromyces Lactis*'in geliştirildiği fermentör

***Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 mayasının parçalanması işlemi:**

Çöken mayalar 3 defa resüspanse edilerek tekrar santrifüjlendi.

Maya kültürüne, 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF ve 2µM β-Merkaptoetanol eklenmiş %10 gliserin tamponu şeklinde hazırlanan parçalama çözeltisi ilave edilerek çözüldü (Becerra 1998). Bu çözelti içinde ultrasonikatör kullanılarak maya 1 saat parçalandı. Daha sonra Sigma 3K30 15,000 rpm ve + 4 °C'de santrifüjlendi. Süpernatant alındı.

3.2.2 Jel filtrasyon kromatografisi

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, Kluyveromyces Lactis' den izole edilen β-Galaktosidaz enziminin molekül ağırlığının 135 kDa olduğu bilindiği için, molekül ağırlığı 10 ile 600 kDa arası proteinleri ayıran 26x60 cm' lik Superdex 200 kolon kullanıldı.

Süpernatandan 10 ml alınarak, 0.02 M pH 7,4 potasyum fosfat tamponu ile dengelenmiş olan Superdex 200 kolonda jel filtrasyonuna tabi tutuldu. Örnek, 3 ml/dak akış hızında 1,5 dakika arayla superfrac'da 4,5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. 280 ve 260 nm'de fraksiyonlar tek tek değerlendirildi. 40 ile 60. fraksiyonlar arasında aktivite gözlemlendi. Aktif olan fraksiyonlar bir araya toplandı.

3.2.3 Amonyum sülfat ile çöktürme ve ultrafiltrasyon

Jel filtrasyon kromatografisinde aktif olan fraksiyonlar amonyumsülfat ile çöktürülerek Sartorius sartocan micro 100 kDa'luk ultrafiltre ile konsantre edildi. 100 kDa'dan küçük olanlar bir kaptaki toplandı. 100 kDa'dan büyük olanlar ayrıldı. Az bir hacim kalınca üzerine bir miktar su ilave ederek amonyum sülfatın iyice uzaklaşması sağlandı. Suyu karşı 280 nm'de 100 kDa'dan az olan ayrılan çözeltinin absorbansı 0,2 M'dan düşük çıktığında amonyum sülfatın tamamen uzaklaştığı görüldü. 100 kDa'dan büyük olan çözelti iyon değişim kromatografisine uygulandı.

3.2.4 İyon değişim kromatografisi

Konsantre edilen örnek 0,02 M pH 7,4 potasyum fosfat tamponu ile dengelenmiş olan DEAE (16x20 cm'lik Dietilaminoetil) Selüloz kolonda Biopilot sisteminde 1 M NaCl eşliğinde lineer gradient uygulandı.

10 ml örnek 3 ml/dak akış hızında 1,5 dakika arayla superfrac'da 4,5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. 280 ve 260 nm'de fraksiyonlar tek tek değerlendirildi. 5-20. fraksiyonlar arasında aktivite gözlemlendi.



Şekil 3.2 Pharmacia Biopilot FPLC

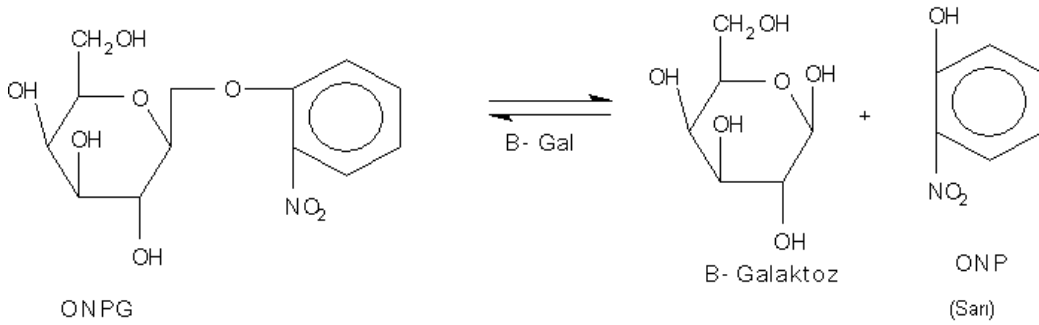
3.2.5 Aktivite tayini

Saflaştırılan enzimin aktivite tayini Guarente metodu modifiye edilerek yapıldı (Becerra, 1998). Burada sodyumfosfat yerine potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Bunu sebebi Na^+ iyonlarının *Kluyveromyces lactis* Beta-Galaktosidazına inhibitör etkisi varken K^+ iyonlarının *Kluyveromyces lactis* Beta-Galaktosidazına aktivatör etkisinin olmasıdır.

0,1 M potasyum fosfat tamponu pH 7, 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -Merkaptoetanol ile Z tamponu hazırlandı.

Enzim çözeltisi 440 ml ONPG (4 mg/ml) ile 2 ml Z tamponu içinde 30 °C’de beş dakika inkübe edildi. 1 M Na₂CO₃’ den 0,5 ml eklenerek reaksiyon durduruldu. Açığa çıkan ONP 420 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu şartlar altında o-nitrofenol’ün molar ekstinksiyon katsayısı 4,5x10³ l.mol⁻¹cm⁻¹’dir. Molar Ekstinksiyon Katsayısı; 1 molar çözeltinin 1cm. lik küvette verdiği absorbanstır.

Analiz koşulları altında dakikada ONPG’ den 1 µmol ONP açığa çıkaran enzimin ölçüsü 1 enzim ünitesi olarak tanımlandı. Reaksiyon şekil 3.3. ‘den görülmektedir.



Şekil 3.3 ONPG ile enzim reaksiyonu (Chandler *et al.* 1998)

3.2.6 SDS-PAGE (Sodyumdodesil sülfat-Poliakrilamit jel elektroforez)

Bu çalışmada Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi ile elde edilen bütün ekstraktların içerdiği enzim saflığı araştırıldı. β-Galaktosidaz varlığının kesin olarak anlaşılması için DEAE selüloz kolondan gelen fraksiyonlar ile Jel fitrasyon kromatografisinde aktivitesi olan fraksiyonlar ve ham ekstrakt SDS- PAGE yapılarak incelendi (Laemmli 1970).

Sodyumdodesil sülfat-Poliakrilamit jel elektroforez ’de % 8’lik jel hazırlandı. 300 volt, 200 miliamper’de örnekler elektroforezde yürütüldü. Dört saat sonra örneklerin jelde yürümesi bitince, jel çıkartılarak fiksasyon işlemine geçildi. Fiksasyon işlemi proteinlerin jele yapışmasını sağlar. Gümüş boyama yöntemine göre jel boyanarak görüntüleme sağlandı. Gümüş nitratla boyama yönteminin diğer yöntemlere göre hassasiyeti yüksektir.

SDS-PAGE 'den elde edilen görüntü, şekil 4.11'den görülmektedir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Beta-Galaktosidazın hücre dışına çıkarılması

Yapılan çalışmada maya hücresi *Kluyveromyces Lactis NRRL-Y-1140* β -Galaktosidaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. *Kluyveromyces Lactis* β -Galaktosidazı hücre içi bir enzim olup bu nedenle hücre duvarının yok edilerek enzimin hücre dışına çıkarılması gerekmektedir.

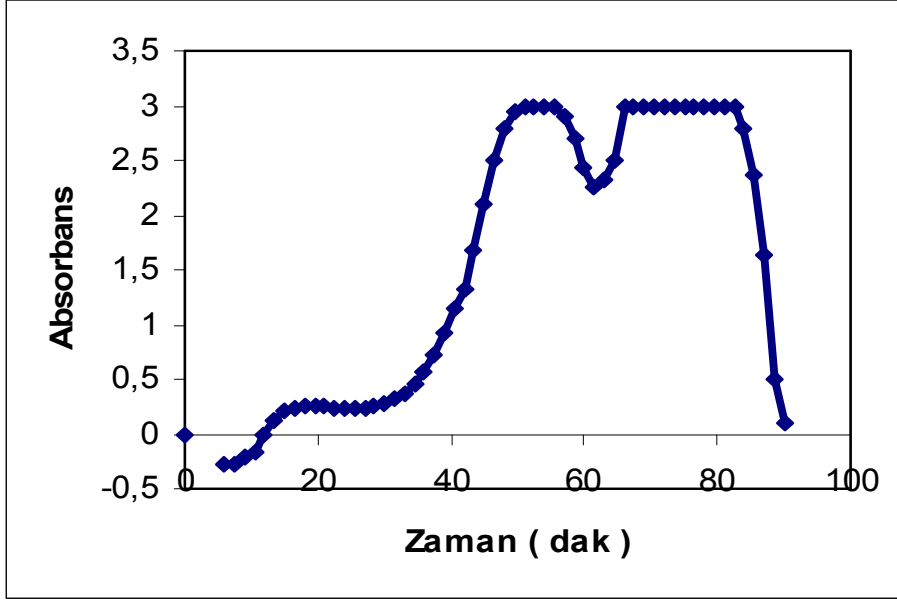
Kluyveromyces Lactis hücresinin geliştirilmesi optimum koşullarda 24 saatte fermentör yardımıyla sağlanmıştır. Fermentör şekil 3.1'den görülmektedir.

Optimum koşullarda geliştirilen maya hücrelerinin hücre duvarı, bir fiziksel hücre parçalama işlemi olan ultrasonikatör kullanılarak parçalanmış, β -Galaktosidaz enziminin dışarı çıkmasıyla yoğun ve bulanık renkli bir ekstrakt elde edilmiştir. Santrifüjlendikten sonra alınan süpernatant kısmı ham ekstrakt olarak kullanılmış ve 280 nm' de ham ekstraktın absorban değeri 1,786'dır.

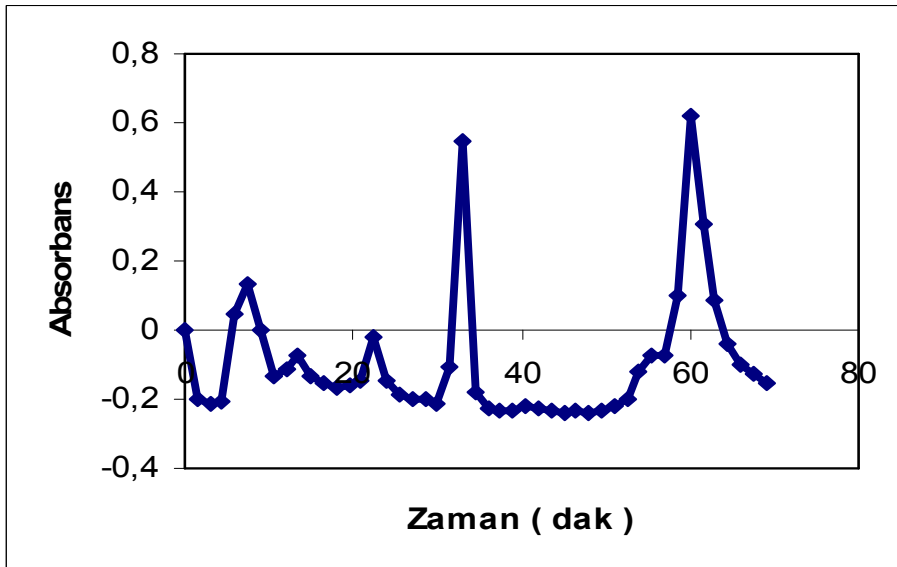
4.1.2 Kullanılan kromatografik yöntemlerin sonuçları

Kluyveromyces Lactis NRRL-Y-1140 hücresinin hücre duvarı parçalanarak elde edilen ham ekstraktan kromatografik yöntemler kullanılarak Beta-Galaktosidaz (Laktaz) enzimi izole edilmiştir. Kromatografik yöntemler kullanılırken pH 7.4 potasyum fosfat tamponu ile kolon dengelenmiştir, sıcaklık ise oda sıcaklığıdır. Bu çalışmada, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografileri uygulanmış ve elde ettiğimiz saf enzim elektroforez tekniği ile gözlemlenmiştir. Sonuç olarak Beta-Galaktosidaz (Laktaz)

enzimi *Kluyveromyces Lactis NRRL-Y-1140* 'den saf olarak izole edilmiş ve aktivitesine bakılmıştır. Bu deneylerden elde edilen enzimlerin aktivite sonuçları bölüm 4.1.3'de görülmektedir.



Şekil 4.1 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 280 nm'de zamana karşı değişimi



Şekil 4.2 İyon Değişim Kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 280 nm'de zamana karşı değişimi

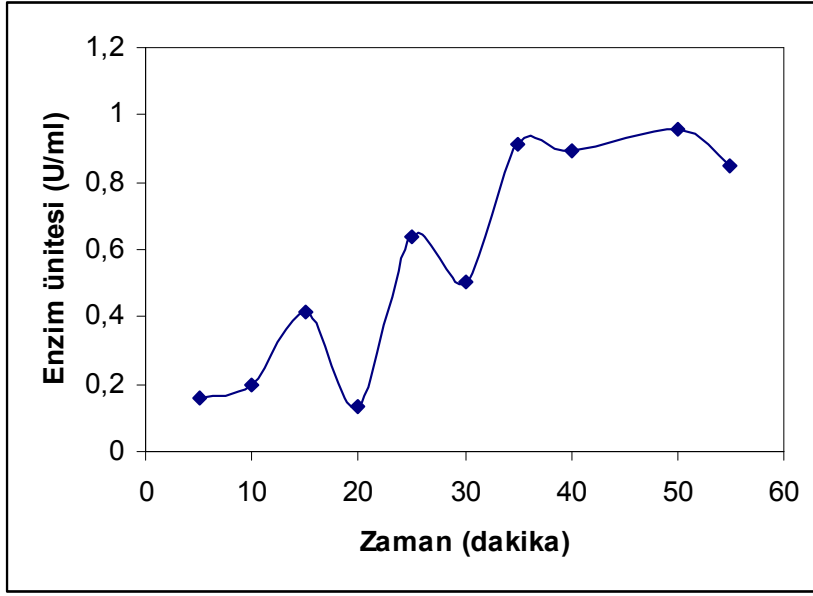
4.1.3 *Kluyveromyces Lactis NRRL-Y-1140* mayasından saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enzim aktivite tayini

4.1.3.1 Ham ekstrakt enzim aktivite tayini

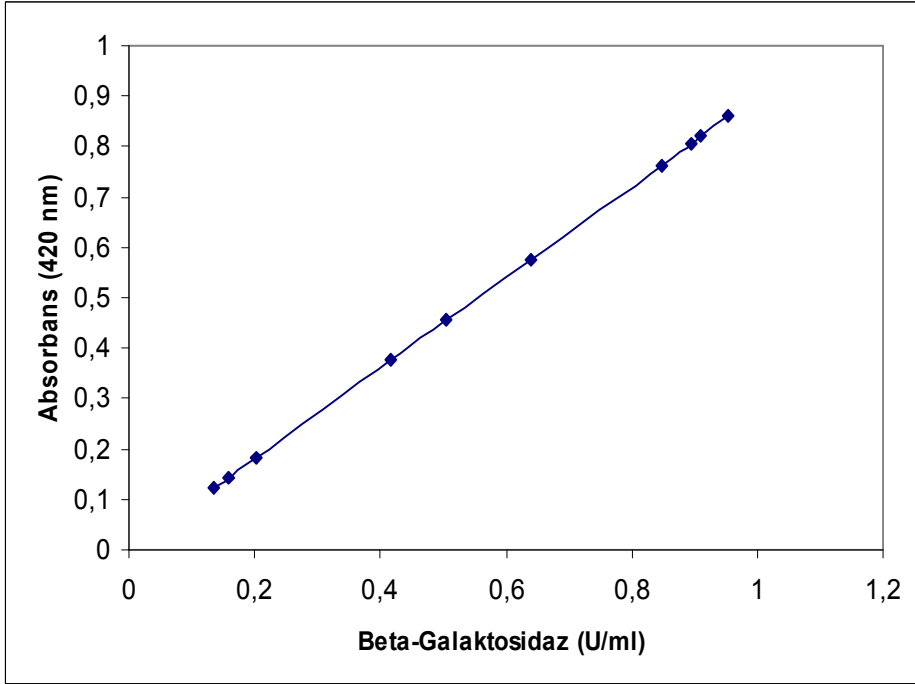
Mayayı üretilen hücre duvarını parçaladıktan sonra başka işlemleri yapmadan önce elde ettiğimiz ham ekstraktın uygun koşullarda ONPG ile enzim aktivitesi 420 nm’de köre karşı 0,620 olarak görülmüştür. Aktivite değeri 0,689 U/ml olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ile bakıldığında ham ekstraktın markerla aynı yerde band vermesi ekstraktın içinde Beta-Galaktosidaz enziminin varlığını kanıtlamıştır. Böylece bu aşamadan sonra enzimi daha saf elde etmek için purifikasyon adımları uygulanmıştır. SDS-PAGE sonucu şekil 4.11’den görülmektedir.

4.1.3.2 Jel filtrasyon kromatografisi enzim aktivite tayini

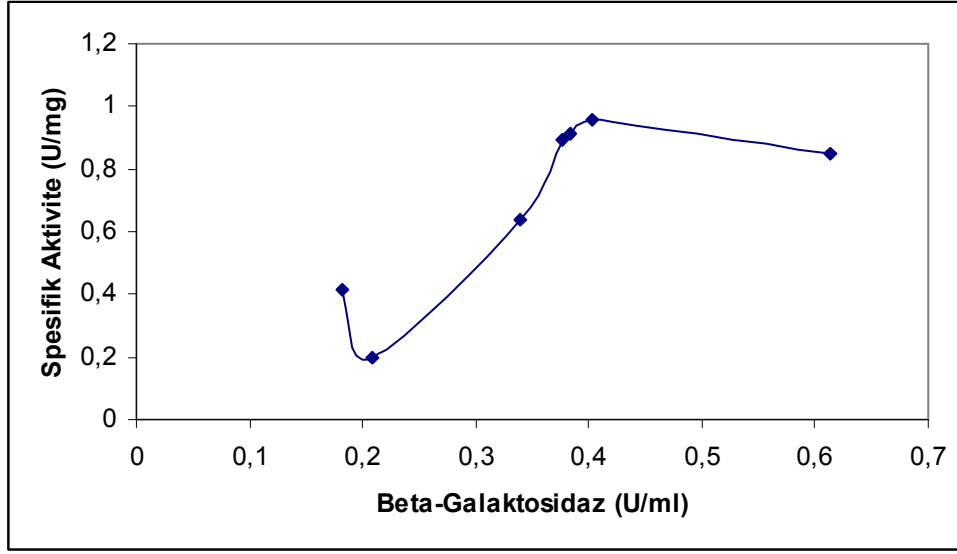
Purifikasyon adımlarımızdan ilki olan Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarının 280 nm’deki absorbanslarına bakılarak aktiflikleri incelendi. Bunun sonucunda 53-60 no’lu fraksiyonların aktif enzim içerdikleri tesbit edildi. Bu fraksiyonlar Guarente metoduna göre bu enzim çözeltilerinin ONPG substratı ile 420 nm’de verdiği reaksiyona bağlı olarak absorbans değerlerine bakıldı. Enzim ile ONPG substratı arasındaki reaksiyon şekil 3.3’de verilmiştir. Bu absorbans değerlerinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enzimi ünite miktarları ve spesifik aktiviteleri hesaplandı. Şekil 4.3-4.4-4.5’e göre elde edilen enzim SDS-PAGE’den de görüldüğü gibi saf olmakla birlikte çok az miktarda olması sebebiyle düşük aktivite gözlenmiştir. 50. dakikadan sonra aktivite değerleri düşmeye başlamıştır. En yüksek spesifik aktivite 56. fraksiyonda gözlenmiştir. Yani, mg enzime karşılık gelen enzim aktivite değeri en yüksek olan fraksiyon 56. fraksiyondur. 420 nm’deki absorbanslara karşılık hesaplanan Beta-Galaktosidaz aktivitesi lineer bir artış göstermiştir (Şekil 4.4). Grafikler aşağıda görülmektedir.



Şekil 4.3 Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzimin zamana karşı ünite miktarı



Şekil 4.4 Jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin 420 nm 'deki absorbanslarına karşılık gelen enzim aktivite değerleri



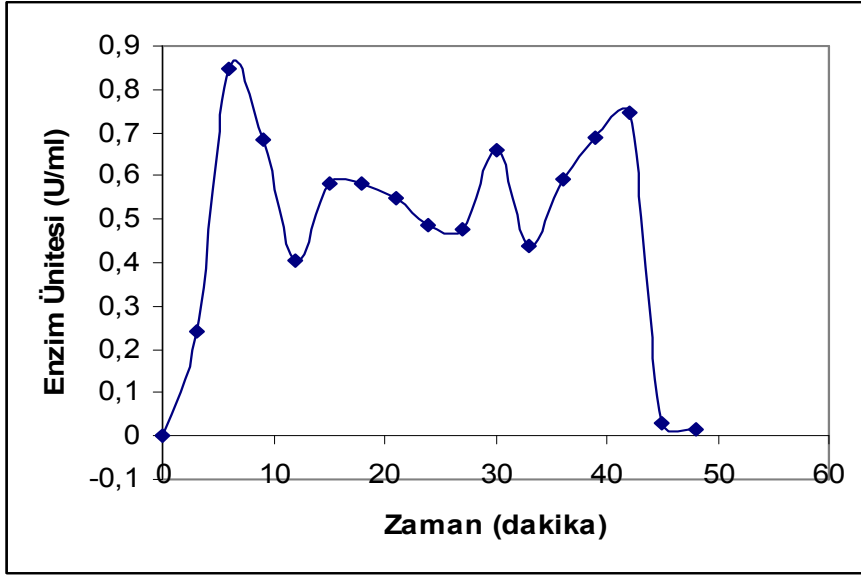
Şekil 4.5 Jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin enzim aktivitesine karşı spesifik aktivite değerleri

4.1.3.3 İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim aktivite tayini

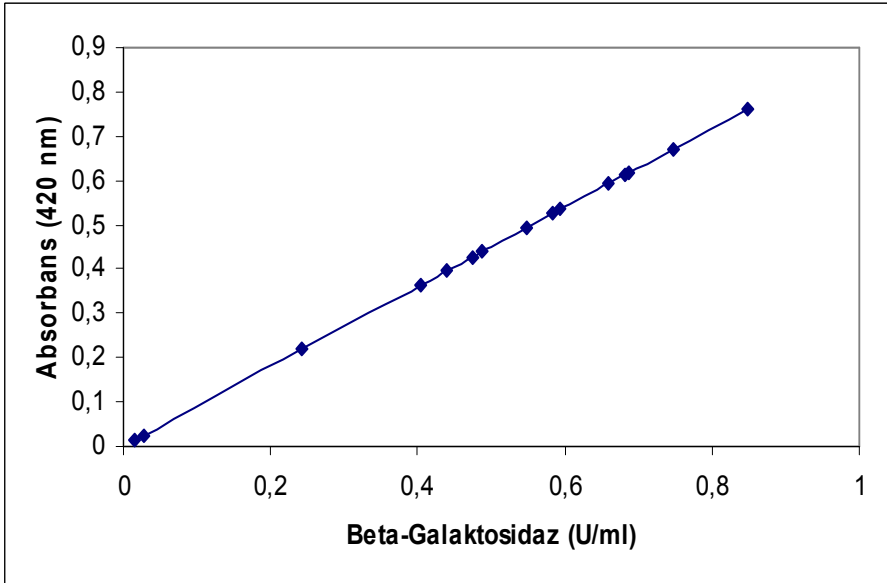
Jel geçirgenlik kromatografisinden sonra ultrafiltrasyonla konsantre edilen fraksiyonlara iyon değişim kromatografisi tekniği uygulanmıştır. İyon değişim kromatografisi sonucu 280 nm'deki ölçülen absorbans değerlerine bakarak enzimin olduğu fraksiyonların 420 nm'de aktivitesine bakılmıştır. İyon değişim kromatografisinden elde edilen aktif olduğu düşünülen fraksiyonlar 5-20. tüplerdedir. Elde edilen grafik şekil 4.6'da görülmektedir.

İyon değişim kromatografisi sonuçları değerlendirildiğinde enzim 48. dakikadan sonra kolondan ayrılmıştır. Çizilen grafiklerde enzim içeren fraksiyonlar incelenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde olduğu gibi 420 nm'deki ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanan Beta-Galaktosidaz aktiviteleri Şekil 4.7'de görüldüğü üzere lineer bir artış göstermektedir.

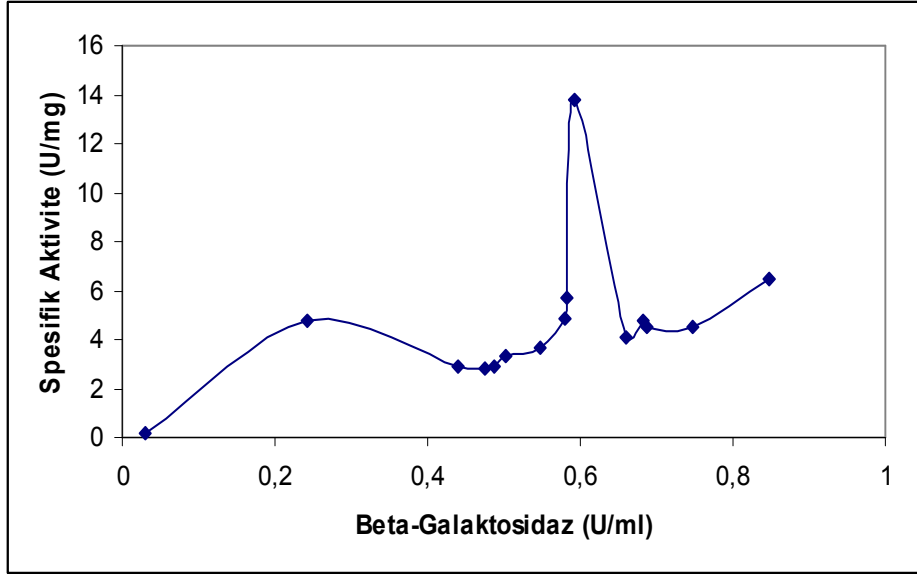
Maksimum spesifik aktivite 14. fraksiyonda ölçülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.6 İyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen enzimin zamana karşı ünite miktarı



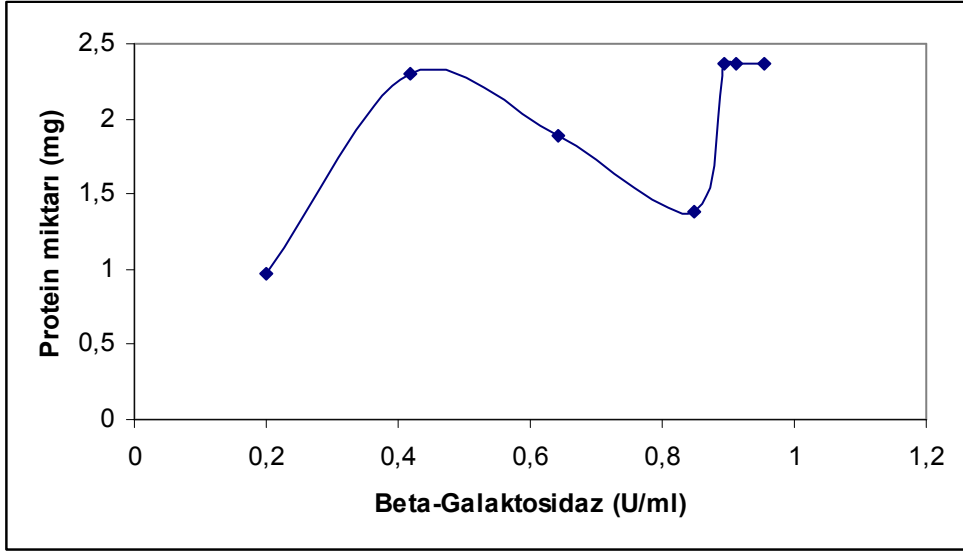
Şekil 4.7 İyon değişim kromatografisinden saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin 420 nm'deki absorbanlarına karşılık gelen enzim üniteleri



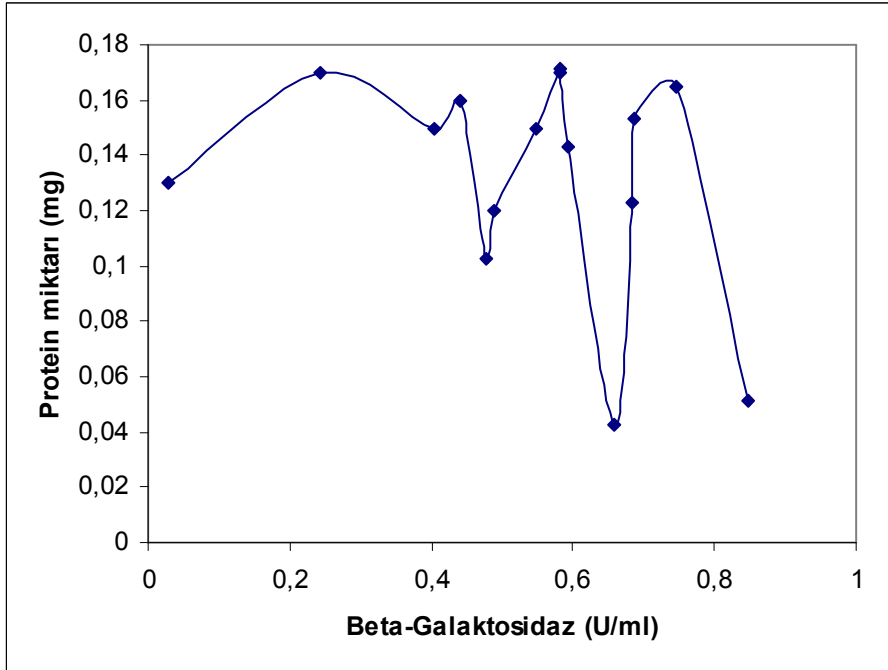
Şekil 4.8 İyon değişim kromatografisinden saflaştıırılan Beta-Galaktosidaz enziminin enzim aktivitesine karşı spesifik aktivite değerleri

4.1.4 Protein miktar tayini

Jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografilerinden ve aktivite gösteren fraksiyonların Warburg-Christian protein tayin metoduna göre ürünlerdeki enzim miktarı hesaplanmıştır. Bu yöntemle göre Jel filtrasyon kromatografisinde ortalama 2,37 mg/ünite protein enzim örneklerinde hesaplanmıştır. İyon değişim kromatografisi sonucunda aktif enzim çözeltilerinde ortalama 0,17 mg/ünite protein miktarı bulunmuştur. Buna göre her iki kromatografik yöntemden elde edilen ünite-enzim değerlerine karşılık mg protein grafiği şekil 4.9- 4.10'da görölmektedir.



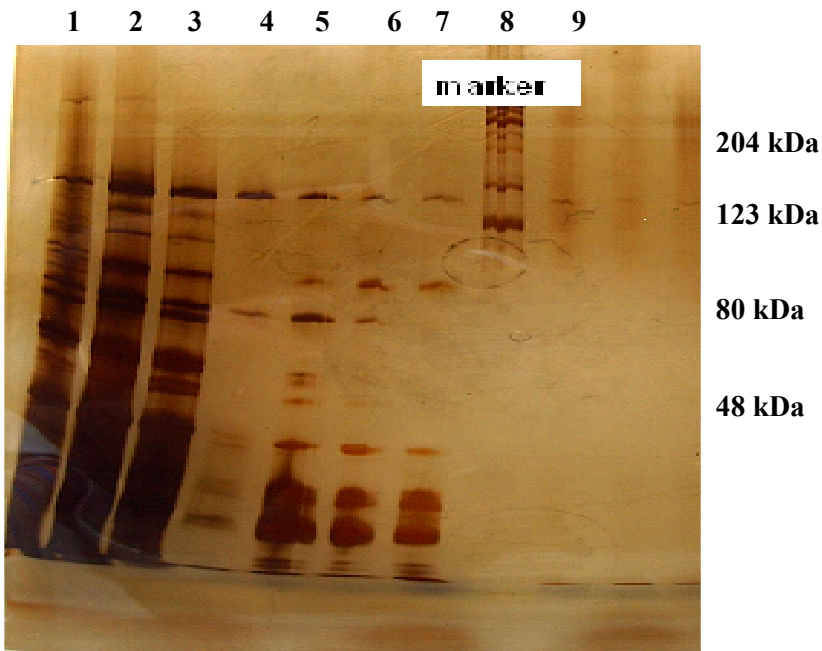
Şekil 4.9 Jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen ürünlerin ünite enzim- mg protein grafiği



Şekil 4.10 İyon değişim kromatografisi ile elde edilen ürünlerin ünite enzim – mg protein grafiği

4.1.5 SDS- PAGE ile enzimin gözlenmesi

Maya hücresi *Kluyveromyces Lactis NRRL-Y-1140*'den ham ekstrakt ve jel filtrasyon, iyon değişim kromatografileri sonucu elde edilen aktif olarak saflaştırdığımız Beta-Galaktosidaz enzimi yapılışı 3.2.6'da anlatılan şekilde SDS-PAGE'e uygulanmış ve Şekil 4.11 görüntüsü elde edilmiştir. Bu görüntüye göre, 135 kDa ağırlığındaki enzimin bir alt ünitesi marker'la aynı yerde gözlemlenmiştir. Bütün fraksiyonlarımızda Beta-Galaktosidaz enziminin varlığı görülmektedir.



Şekil 4.11 Elde edilen SDS-PAGE görüntüsü

1 numara	ham ekstrakt
2 numara	Jel filtrasyon 45
3 numara	Jel filtrasyon 53
4 numara	Jel filtrasyon 60
5 numara	İyon değişim 6
6 numara	İyon değişim 10
7 numara	İyon değişim 15
8 numara	Marker protein
9 numara	Ham ekstrakt

Protein (Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standards High Range)

Myosin	204 kDa
Beta-Gal.	123 kDa
Bovine Serum Albümin	80 kDa
Ovalbümin	48 kDa

4.2 Tartışmalar

Sunulan çalışmada maya hücresi *Kluyveromyces Lactis* NRRL-Y-1140 Beta-Galaktosidaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Maya hücrelerinde bulunan Beta-Galaktosidaz enziminin kromatografik yöntemlerle elde edilmesi araştırılmıştır. *Kluyveromyces Lactis* Beta-Galaktosidaz enzimi hücre içi bir enzim olduğundan öncelikle hücre duvarı uygun yöntemle parçalanarak enzimin hücre dışına çıkartılması sağlanmıştır.

Saflaştırma iki adımda gerçekleşmiştir. Hücre duvarı parçalanarak açığa çıkan ham ekstrakt ilk olarak pH 7,4 potasyum fosfat tamponu ile dengelenen süperdeks-200 kolonunda jel filtrasyon kromatografisine uygulanmıştır. Toplanan fraksiyonlar spektrofotometrede değerlendirilerek aktif olanlar bir araya toplanmıştır. 100 ml'lik çözelti ultrafiltre ile konsantre edilmiştir. Daha sonra bu çözelti pH 7,4 potasyum fosfat tamponuyla dengelenen DEAE-selüloz kolonunda iyon değişim kromatografisine uygulanmıştır. Elde edilen fraksiyonlardan aktif olanlar elektroforez için kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre iki adımda *Kluyveromyces Lactis* mayasından Beta-Galaktosidaz enziminin saflaştırıldığı elektroforez ile gözlenmiştir. *Kluyveromyces Lactis*'den saflaştırılan 135 kDa'luk Beta-Galaktosidaz enzimi dışında parçalanma ürünlerine rastlandı. Ancak 4 numaradaki jel filtrasyonun 60. fraksiyonunun, elektroforez görüntüsünde daha saf olduğu görülmektedir. Boyama, gümüş nitrat ile yapıldığından dolayı bu yöntem diğer boyama yöntemlerine göre daha hassas olduğu için diğer parçalanma ürünlerini de elektroforezde gözlemledik.

Literatürde, Beta-Galaktosidaz enziminin elektroforez ile incelenmesi farklı uygulamalar ile görülmektedir. % 5-15'lik akrilamit jel elektroforezde Beta-

Galaktosidaz enziminin tetramerik yapıda olmasından dolayı 483, 385, 239 ve 146 civarında band gözlenmiştir (Becerra *et al.* 1998).

Başka birkaç uygulamada ise saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin molekül kütlesi elektroforezde 135 kDa gözlenmiştir (Becerra *et al.* 1998). Bizim yaptığımız çalışmada da saflaştırılan Beta-Galaktosidaz enziminin molekül kütlesi 135 kDa civarında çıkan band ile karşılaştırılarak elde edildiği görülmüştür.

4.2.1 Enzim aktivite sonuçlarının değerlendirilmesi

Aktivite tayini Guarente metoduna göre yapılarak ham ekstraktın aktivitesi 0,689 U/ml bulunmuştur. Jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlarda 53 ile 60. tüpler arasında aktivite gözlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde ortalama 0,568 U/ml bulunmuştur. En yüksek enzim aktivite ve spesifik aktivite değeri 56. fraksiyonda gözlenmiştir (Şekil 4.3-4.4). Bu noktadan sonra aktivite giderek azalmıştır.

Ultrafiltre ederek deriştirdiğimiz fraksiyonlara iyon değişim kromatografisi uygulanmış ve burada 5-20. fraksiyonlarda aktivite gözlenmiştir. İyon değişim kromatografisinde ortalama 0,570 U/ml bulunmuştur. En yüksek enzim aktivite değeri 18. fraksiyonda (Şekil 4.7), spesifik aktivite değeri ise 14. fraksiyonda gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu noktadan sonra aktivite giderek azalmıştır.

Enzimin aktivitesi jel filtrasyon kromatografisi sonucunda 35-40. dakikalar arasında maksimum değerde iken (Şekil 4.3) , konsantre edilerek iyon değişim kromatografisine uygulandıktan sonra 6. dakikada maksimum değer göstermiştir (Şekil 4.6). Aktivitenin zamana karşı değişkenlik göstermesi enzimin çabuk bozulan bir enzim olmasından ve kararlı halini zaman içinde kaybetmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca hücre yeterince parçalanmamış ya da parçalama işlemi sırasında zaman ve sıcaklığın iyi ayarlanamamış olması gibi bir çok faktör enzim aktivitesini etkilemektedir.

Ham ekstrakt spesifik aktivite değeri 0,383 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Buna göre ikinci adım olan jel filtrasyonda, ham ekstrakta göre 2,49 kat, iyon değişim kromatografisinde jel fitrasyon kromatografisine göre 14,44 kat , ham ekstrakta göre 36 kat saflaştırma yapılmıştır.

Jel filtrasyon kromatografisinde elde edilen verim % 42 iken, iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen verim % 45,2'dir.

KAYNAKLAR

- Angal, S. and Harris, E. 1990. "Protein Purification Applications." IRL Pres at Oxford University Pres, UK.
- Anonymous. 1987. Lactozym, Novo Industry A/Ş Denmark.
- Aras, K. ve Ersen, G., Klinik Biyokimya, 1975. Hacettepe Kitapçılık, Ankara.
- Becerra, M., Cerdan, E. and Gonzalez, S., 1998a. " Dealing with different methods for Kluyveromyces lactis β -galactosidase purification ." Biological Procedures Online, 1:1.
- Becerra, M., Cerdan, E. and Gonzalez,S., 1998b. "Micro-scale purification of β -galactosidase from Kluyveromyces lactis reveals that dimeric and tetrameric forms are active." Biotechnology Techniques, 12:3: 253-256.
- Bilgehan, H., 1992. Temel Mikrobiyoloji ve Başıklık Bilimi.
- Birch, G.G., Blakebrough, N. and Parker, K.J. 1981. "Enzymes and food processing." Applied Science Publishers Ltd., London.
- Bitton, G. and Koopman, B. 1992. "Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment." Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 125: 1-22.
- Boze, H., Moulin, G. And Galzy, P. 1987. "Galactose lactose transport in kluyveromyces lactis " Folia Microbiol., 32: 107-111.
- Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. 1987 "Uptake of galactose and lactose by kluyveromyces lactis; biochemical characteristic and attempted genetical analysis." J. General Microbiol., 133: 15-23.

- Brandao, R.L., Nicoli, J.R. and Figueiredo, A.F. 1987. "Purification and characterization of a beta- galactosidase from *Fusarium oxysporum* var. lini." *J Dairy Sci.* 70 (7): 1331-7.
- Chandler, V., Donovan, S., Goodwin, W., Sprague, S. and Stiefbold, F. 1998. Enzyme kinetics, Proceeding of the 19th Workshop/ Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), Volume 19, S.J. Karcher (Ed.), 81-97. <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/vol-19/06-chandler/06-chandler.htm>.
- Chapman and Hall., 1990. "Enzyme Chemistry: Impact and applications." Second Edition.
- De Alcantra, P.H., Martim, L., Silva, C.O. and Dietrich, S.M., Buckeridge, M.S. 2006. "Purification of a beta- galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function." *Plant Physiol Biochem.* 44 (11-12): 619-27.
- De Macias, ME., Manca de Nadra, MC., Strasser de Saad, AM., Pesce de Ruiz Holgado, AA. and Oliver, G. 1983. "Isolation and properties of beta-galactosidase of a strain of *Lactobacillus helveticus* isolated from natural whey starter." *J Appl Biochem.* 5(4-5): 275-81.
- Dewitt, O., Boudrae, G., Tounami, M. and Desceux, J.F. 1987. "Breath hydrogen test and stool characteristic after ingestion of milk and yogurt in malnourished children with chronic diarrhea and lactase deficiency." *J. Tropic. Pediat.*, 33: 177-180.
- Diaz, M., Pedregosa, A.M., de Lucas, J.R., Torralba, S., Monistrol, I.F. and Laborda, F. 1996. "Purification and properties of beta- galactosidase from *Aspergillus nidulans*." *Microbiologia.* 12 (4): 585-92.

- Di Cioccio, R.A., Barlow, J.J. and Matta, K.L. 1984. "Purification of a beta- D-galactosidase from bovine liver by affinity chromatography." *Carbohydr Res.* 127 (1): 109-20.
- Dickson, R.C. and Kathleen, B. 1983. "Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*." *J. Bacteriol.*, 154:3: 1245-1251.
- Dickson, R.C., Dickson, L R. and Markin, J.S. 1978. "Purification and Properties of an Inducible β -Galactosidase Isolated from the Yeast *Kluyveromyces lactis*." *J. Bacteriol.*, 137: 51-61.
- Dixon, M. *Monometric Methods.*, 1951. Cambridge University Pres.
- Fox, P.F. 1985. "Development in Dairy Chemistry-3. Lactase and minor constituents". Elsevier Applied Science Publishers, First edition, London, 405 sy.
- Gacesa, P. and Hubble, J. 1987. *Enzyme Technology.*
- Garman, J., Coolbear, T. and Smart, J. 1996. "The Effect of Cations on the Hydrolysis of Lactose and the Transferase Reactions Catalysed by β -galactosidase from Six Strains of Lactic Acid Bacteria." *Applied Microbiol. Biotechnology*, 46: 22–37.
- Gekas, V. and Lopez- Leiva, M. 1985. "Hydrolysis of lactose: A literature review." *Process Biochemistry*. 20:1:2-12.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. *Industrial Enzymology* 2nd. Ed.
- Gözükara, M.E. 1997, *Biyokimya, Cilt-2, Nobel Tıp Kitabevleri, üçüncü baskı.*
- Greenberg, NA. and Mahoney, R.R. 1981. "Immobilization of lactase (β -

- galactosidase) for use in dairy processing.” A review *Process Biochemistry*. 16:2: 1612.
- Guarente, L. 1983. “Yeast Promoters and lacZ Fusions Designed to Study Expression of Cloned Genes in Yeast.” *Methods in Enzymology*, 101: 181-191.
- Jacobsen, C.F., Leonis, J., Linderstromlan, K. and Otteson, M. 1957. *Methods of Biochemical Analysis.*, 4: 171.
- Javeri, S. and Uhlenbruck, G. 1984. “Isolation of a beta- galactosidase from chicken liver.” *J Clin Chem Clin Biochem*. 22 (11): 735-9.
- Jeffrey, M., Becker Gey, A. and Coldwell, EA. 1990. *Biotechnology a Laboratory Course*. Academic pres. Inc. New York.
- Kestwal, R.M. and Bhide, S.V. 2007. “Purification of beta-galactosidase from *Erythrina indica*: involvement of tryptophan in active site.” *Biochim Biophys Acta*. 1770 (10): 1506-12.
- Koopman, B., Bitton, G., Dutton, R.J. and Logue, C.L. 1988. “ Toxicity testing in wastewater systems: application of a short term assay based on induction of the lac operon in *E. Coli*.” *Water Science and Technology*. 20: 11-12, 137-143.
- Kretschmer, N. 1972. “Lactose and lactase.” *Sci. Amer.*, 227: 71-78.
- Laemmli, U.K. 1970. “Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* 227: 680–685.
- Lartillot, S. 1993. “Immobilization of lactose on silica gel: study of lactose hydrolysis using the immobilized material.” *Biochemical Education*. 21 (3), 157-159.

- Lee, D.H., Kang, S.G., Suh, S.G. and Byun, J.K. 2003. "Purification and characterization of a beta- galactosidase from peach (*Prunus persica*).” *Mol cells*. 15 (1): 68-74.
- Lehninger 2005, *Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık.
- Letunova, E.V., Tikhomirova, A.S., Shiiian, S.D., Markin, V.A. and Khorlin, A.I. 1981. "Purification and properties of beta- galactosidase from *Alternaria tenuis*.” *Biokhimiia*. 46 (5): 911-9.
- Li, S.C., Han, J.W., Chen, K.C. and Chen, C.S. 2001. "Purification and characterization of isoforms of beta- galactosidases in mung bean seedlings.” *Phytochemistry*. 57 (3): 349-59.
- Mahoney R.R. 1998. Galactosyl-oligosaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: A Review. *Food Chemistry*, 63 (2): 147–154.
- Mbuyi-Kalala, A., Schnek, A.G. and Leonis, J. 1988. "Separation and characterization of four enzyme forms of beta- galactosidase from *Saccharomyces lactis*.” *Eur J Biochem*. 178 (2): 437-43.
- Mutoh, T., Naoi, M., Nagatsu, T., Takahashi, A., Matsuoka, Y., Hashizume, Y. and Fujiki, N. 1988. "Purification and characterization of human liver beta-galactosidase from a patient with the adult form of GM1 gangliosidosis and a normal control.” *Biochim Biophys Acta*. 964 (2): 244-53.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A. and Biro, S. 2001. "Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme.” *Protein Expr Purif*. 21 (1): 24-9.
- Nguyen, T.H., Splechtna, B., Steinböck, M., Kneifel, W., Lettner, H.P., Kulbe, K.D. and Hatrich, D. 2006. "Purification and characterization of two novel beta-

- galactosidases from *Lactobacillus reuteri*.” *J Agric Food Chem.* 54 (14): 4989-98.
- Numanoğlu, Y. and Sungur, S. 2003. “ β -galactosidase from *Kluyveromyces Lactis* Cell Disruption and Enzyme Immobilization Using a Cellulose-gelatin Carrier System.” *Process Biochemistry*, 39: 703–709.
- O’ Connel, S. and Walsh, G. 2007. “Purification and properties of a beta-galactosidase with potential application as a digestive supplement.” *Appl Biochem Biotechnol.* 141 (1): 1-14.
- Pisani, F.M., Rella, R., Raia, C.A., Rozzo, C., Nycci, R., Gambacorta, A., Derosa, M. and Rossi, M. 1990. “Thermostable beta- galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties.” *Eur J Biochem.* 187 (2): 321-8.
- Pivarnik, L.F., Senecal, A.G. and Rand, A.G. 1995. Hydrolytic and Transgalactosylic Activities of Commercial β -Galactosidase (Lactase) in Food Processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 38: 1-102.
- Pomeranz Y. 1964. Lactase (beta-D-Galactosidase) I. Occurrence and Properties. *Food Technology*, 18 (5):690–697.
- Richmond, M.L. 1981. β -galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns and Immobilization *Journal of Dairy Science*, 64: 1759-1771.
- Rosado, J.L., Alan, L.H. and Solomons N.W. 1987. “ Milk consumption, symptom response and lactose digestion in milk intolerance.” *Am. J. Clin. Nutr.*, 45: 1457-1460.
- Rouwenhorst R.J, Pronk J.T. and Vandijken J.P. 1989. The Discovery of

galactosidase. *TIBS* 14: 416–418.

Shaikh, SA., Khire, JM. and Khan, MI. 1999. “Characterization of a thermostable extracellular beta- galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp.” *Biochim Biophys Acta.* 1472 (1-2): 314-22.

Sheetz, V.J. and Dickson, R.C. 1980. “ Mutations affecting synthesis β -Galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*.” *Genetics*, 95: 877-890.

Stryer, L. 1981. *Biochemistry* (Stanford University) Second Edition.

Tanaka, Y., Kagamiishi A., Kiuchi A. and Horiuchi T. 1975. “Purification and properties of beta- galactosidase from *Aspergillus oryzae*.” *J Biochem. (Tokyo).* 77 (1): 241-7.

Telefoncu, A., *Biyoteknoloji*, , Ege Üniv. Fen Fakültesi Yayınları, No: 152. 1995.

Tomino, S. and Meisler, M. 1975. “Biochemical and immunological studies of purified Mouse beta-galactosidase.” *J Biol Chem.* 250 (19): 7752-8.

Todorova-Balvay, D., Stoilova, I., Gargova, S. and Vijayalakshmi, MA. 2006. “An efficient two step purification and molecular characterization of beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*.” *J Mol Recognit.* 19 (4): 299-304.

Tüzün, C. 1991. ,*Biyokimya* Palme Yayınevi, Ankara.

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

Wallenfels, K. and Malhotra, O.P. 1961. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 16: 239-298.

White, A., Handler, P., Smith, E., Hill, RL. and Lehman, L.R. 1978. Principles of Biochemistry.

Zaborsky, O. 1973. "Immobilized Enzymes" Edited by Zaborsky, I., CRC Press, Cleveland, Ohio.

Zagustina, NA. and Tikhomirova, AS. 1976. "Purification and properties of beta-galactosidase from fungus, *Curvularia inaequalis*." *Biokhimiia*. 41 (6): 1061-6.

Zhou, Q.Z.K. and Chen, X.D. 2001. "Immobilization of β -Galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde." *Journal of Food Engineering*, 48: 69–74.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aslı UYANIK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 12.12.1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : İncirli Lisesi, 1994

Lisans : Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü(1998)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (Eylül 2005 – Temmuz 2008)