

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



**BAZI TOPRAK BAKTERİLERİNİN TRANSGLUTAMİNAZ,
LEVANSUKRAZ VE BETA GALAKTOZİDAZ ÜRETİM
YETENEKLERİNİN TARANMASI VE ELDE EDİLEN
ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Elif Gülşen KARABACAK

Danışman

Prof.Dr. Ahmet Hilmi ÇON

SAMSUN
2021

Tez Kabul ve Onayı

Elif Gülşen KARABACAK tarafından, Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON danışmanlığında hazırlanan “Bazı Toprak Bakterilerinin Transglutaminaz, Levansukraz ve Beta Galaktozidaz Üretim Yeteneklerinin Taranması ve Elde Edilen Enzimin Kısmi Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 17.8.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Remziye YILMAZ Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü		<input type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY
... / ... / ...
Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

Bilimsel Etiğe Uygunluk Beyanı

Hazırladığım Dönem Projesi tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

13 / 07 / 2021

Elif Gülşen KARABACAK

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Bazı Toprak Bakterilerinin Transglutaminaz, Levansukraz ve Beta Galaktozidaz Üretim Yeteneklerinin Taranması ve Elde Edilen Enzimin Kısmi Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 13.07.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 11

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza

13 / 07 / 2021

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

ÖZET

BAZI TOPRAK BAKTERİLERİNİN TRANSGLUTAMİNAZ, LEVANSUKRAZ VE BETA GALAKTOZİDAZ ÜRETİM YETENEKLERİNİN TARANMASI VE ELDE EDİLEN ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Elif Gülşen KARABACAK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
GIDA MÜHENDİSLİĞİ Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans, Temmuz /2021
Danışman: Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Çalışmada; farklı proses şartlarında aktivite gösterebilecek ve endüstriyel alanda kullanımı fazla olan transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzimleri için uygun bir üretici mikroorganizmanın seçilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla ekstrem koşullara sahip habitatlardan izole edilmiş 41 aktinobakter izolatının hedeflenen enzimleri üretim yetenekleri araştırılmış; elde edilen enzimlerin kısmi saflaştırılması gerçekleştirilerek enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklık ile pH faktörlerinin etkisi incelenmiş ve molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Biyoinformatik taramada tüm izolatların “transglutaminaz benzeri enzim” kodlayan gen bölgesi içerdiği belirlenmiş, 9 adedinin kalitatif analiz sonucunda üretim yeteneği doğrulanmış, ancak sıvı besiyerinde geliştirilen hiçbir izolatta aktivite saptanmamıştır. Levansukraz enzim genine ise sadece *Micromonospora* sp. KC721 ve *Micromonospora* sp. KC213 izolatlarının sahip olduğu ancak hiçbir izolatın ne katı ne de sıvı besiyerinde aktivite göstermediği saptanmıştır. β -galaktozidaz enzim üretim geni varlığı da 35 izolatta saptanmıştır. Besiyeri ortamında enzim üretimi varlığı 17 bakteride gösterilmiş ve bunlar arasından diğerlerine göre hızlı gelişen ve nispeten yüksek aktivite gösteren *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 izolatları potansiyel üretici olarak seçilmiştir.

Streptomyces sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 izolatları tarafından üretilen β -galaktozidazın amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve diyaliz uygulamaları ile kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve kısmi saflaştırılmış enzim çözeltilerinin spesifik aktiviteleri sırasıyla $3,588 \pm 0,0007$ U/mg protein, $1,32 \pm 0,09$ U/mg protein ve $1,262 \pm 0,02$ U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Optimum çalışma koşulları da aynı sırayla 40°C ve 7,0 pH, 50°C ve 7,0 pH ve 50°C ve 9,0 pH olarak saptanmıştır. *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 β -galaktozidazlarının 4,0 ve 5,0 pH değerlerinde de aktivite gösterdikleri belirlenmiş ve gıda proseslerinde kullanılabilmesi düşünülmüştür. Bununla birlikte, farklı alanlarda ve farklı proses şartlarında aktivite gösterebilecek enzimlerin yerli kaynaklardan verimli olarak üretilmesi için daha geniş kapsamlı tarama çalışmalarının uygun olacağı ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Enzim Üretimi, Transglutaminaz, Levansukraz, β -galaktozidaz

ABSTRACT

SCANNING THE TRANSGLUTAMINASE, LEVANSUCRASE AND BETA GALACTOSIDASE PRODUCTION OF SOME SOIL BACTERIA AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ENZYMES

Elif Gülşen KARABACAK

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Food Engineering

Master, July/ 2021

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

In this study, we aimed to select a suitable producer microorganism for transglutaminase, β -galactosidase and levansucrase enzymes that can show activity in different process conditions. For this aim, targeted enzyme production capabilities of 41 actinobacter isolates isolated from extreme conditions habitats were investigated. After performing partial purification of the enzymes, the effect of temperature and pH factors on enzyme activity and stability was investigated and molecular weight determined.

By bioinformatics scanning, it was determined that all actinobacter isolates contain gene region encoding “transglutaminase like enzyme” production ability of 9 of them was confirmed as a result of qualitative analysis, however no activity was detected in any isolates grown in liquid medium. Levansucrase enzyme production gene was determined that only 2 isolates (*Micromonospora* sp. KC 721 and *Micromonospora* sp. KC213) but none of these isolates showed activity in either agar or broth medium. The presence of β -galactosidase enzyme production gene detected in 35 isolates. The enzyme production in medium was shown in 17 bacteria, then *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 and *Jiangella* sp. KC603 isolates that are fast grow and show relatively high enzyme activity compared to others were selected as potential producers

Partial purification of β -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 and *Jiangella* sp. KC603 isolated was carried out by ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration and dialysis. The specific activities of the partially purified enzyme solutions were 3.588 ± 0.0007 U/ mg protein, 1.32 ± 0.09 U/mg protein and 1.262 ± 0.02 U/mg protein respectively. Optimum conditions were also determined as respectively 40°C and pH 7.0, 50°C and pH 7.0, 50°C and pH 9.0. *Jiangella* sp. 8K307 and *Jiangella* sp. KC603 β -galactosidases also showed activity at pH 4.0 and 5.0 and it was thought that they could be used in food processes.

It has been demonstrated that more comprehensive screening studies would be appropriate for the efficient production of enzymes that can be active in different areas and under different process conditions.

Keywords: Enzyme Production, Transglutaminase, Levansucrase, β - galactosidase

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgilerimi benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam büyük bir sabır ve ilgiyle yardımcı olan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, problemler karşısında getirdiği analitik bakış açısı ile ufkumu genişleten, gelecekteki mesleki hayatımda da kıymetli bilgilerinden faydalanacağımı düşündüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON'a

Güler yüzleri, pozitif enerjileri ve akademik vizyonları ile araştırmam süresince ilgi ve desteklerini eksik etmeyen Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL ve Dr. Öğretim Üyesi Hayrettin SAYGIN'a,

Deneyler sırasında laboratuvar imkanlarından faydalanmamızı kolaylaştıran KİTAM-Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM'a,

Laboratuvar çalışmalarındaki emek ve sabrından dolayı sevgili arkadaşım Sümeyye CİLMELİ'ye,

Desteği ile hep yanımda olup bana moral veren can arkadaşım Araş. Gör. Hilal TOMBULOĞLU'na,

Doğduğum günden beri her durumda beni cesaretlendiren, desteklerini bir an olsun esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan, hayatta asla değişmeyeceğim canım ailem; annem Zeynep KARABACAK, babam Fatih KARABACAK ve can kardeşim Şeyda KARABACAK'a,

Umutsuzluğa kapıldığım anlarda bana güç ve cesaret veren; moral ve motivasyonumu daima yüksek tutmamı sağlayan varlığıyla tüm zorlukları kolaylaştıran İbrahim GÜNHAN'a

Sonsuz teşekkürler...

Elif Gülşen KARABACAK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimler	4
2.1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri ve Kimyasal Yapıları.....	5
2.1.3. Enzim Kaynağının Seçimi	6
2.1.4. Enzim İzolasyonu ve Saflaştırma	7
2.2. Transglutaminaz Enzimi.....	8
2.2.1. Mikrobiyal Transglutaminaz Enzimi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	9
2.2.2. Mikrobiyal Transglutaminaz Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	11
2.2.3. Transglutaminaz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı.....	17
2.3. Beta Galaktozidaz Enzimi	20
2.3.1. Mikrobiyal β -Galaktozidaz Enzimi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	22
2.3.2. Mikrobiyal β -Galaktozidaz Biyosentezini ve Aktvitesini Etkileyen Faktörler.....	24
2.3.3. Beta Galaktozidaz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı	27
2.4. Levansukraz Enzimi	29
2.4.1. Mikrobiyal Levansukraz Enzimi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	30
2.4.2. Mikrobiyal Levansukraz Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler	31
2.4.3. Levansukraz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı	33
2.5. Aktinobakteriler.....	34
2.5.1. Aktinobakterilerden Transglutaminaz Enzim Sentezi	37
2.5.2. Aktinobakterilerden Beta Galaktozidaz Enzim Sentezi.....	38
2.5.3. Aktinobakterilerden Levansukraz Enzim Sentezi.....	39

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1. Materyal.....	41
3.2 Yöntem	41
3.2.1. Transglutaminaz, Levansukraz ve β -galaktozidaz Üretim Potansiyeline Sahip İzolatların Biyoinformatik Tarama ile Belirlenmesi.....	41
3.2.2. Enzim Üretim Potansiyeline Sahip Bakterilerin Aktifleştirilmesi, Saflık kontrolleri ve Muhafazası	44
3.2.3. Bakterilerin Enzim Üretim Yeteneklerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi... ..	44
3.2.4. Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi	46
3.2.4.1. Transglutaminaz Aktivitesinin Belirlenmesi	48
3.2.4.2. Levansukraz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	48
3.2.4.3. β -Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	49
3.2.5. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....	49
3.2.6. Ham Enzim Çözeltilerinin Saflaştırılması.....	50
3.2.6.1. Ultrafiltrasyon Uygulaması	50
3.2.6.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	51
3.2.6.3. Diyaliz Uygulaması	51
3.2.7. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	51
3.2.8. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu	52
3.2.8.1. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi	52
3.2.8.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH Değerinin Etkisinin Belirlenmesi	53
3.2.8.3. Enzimlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	53
3.2.9. İstatistiki Analiz.....	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1. Transglutaminaz, Levansukraz ve β -Galaktozidaz Üretim Genlerine Sahip İzolatların Belirlenmesi	54
4.2. Bakterilerin Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi	55
4.2.1 Transglutaminaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi.....	55
4.2.2. Levansukraz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi	59
4.2.3. β -Galaktozidaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi	60
4.3. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu	65
4.3.1. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	65
4.3.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi	70
4.4. Enzimlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi	75

KAYNAKÇA.....	81
EKLER.....	96
ÖZ GEÇMİŞ	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

E: Enzim

S: Substrat

ES: Enzim Substrat Kompleksi

P: Ürün

U: Unit

kDa: Kilodalton

pH: Aktüel Asitlik (Power of Hydrogen)

mTg: Mikrobiyal Transglutaminaz

IU: International Unit

rpm: Dakikada Devir Sayısı (Revolutions per Minute)

mg: Miligram

L: Litre

GOS: Galaktooligosakkarit

FOS: Fruktooligosakkarit

µmol: Mikromol

dk: Dakika

GAP: Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

µM: Mikromol

M: Molar

FPD: Kağıt Disk Filtre (Filter Paper Disk)

mM: Milimolar

nm: Nanometre

mL: Mililitre

mmol: Milimol

g: Gram

G+C: Guanin + Sitozin

~: Yaklaşık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. β -galaktozidaz enziminin gerçekleştirdiği hidroliz tepkimesi.....	21
Şekil 2.2. Levansukraz enzimi hidroliz mekanizması.....	30
Şekil 2.3. Levansukraz enzimi transfruktasilasyon aktivitesi.....	30
Şekil 3.1. ONPG metodu pozitif/negatif sonuç görünümü.....	45
Şekil 3.2. FB1 ortamında gelişen bakteriler (Transglutaminaz üretimi).....	47
Şekil 3.3. FB2 ortamında gelişen bakteriler (Beta galaktozidaz üretimi).....	47
Şekil 3.4. FB3 ortamında gelişen bakteri (Levansukraz üretimi).....	47
Şekil 3.5. Buz üzerinde ultrafiltrasyon uygulaması.....	51
Şekil 4.1. RAST sisteminde enzim üretim genlerinin taranmasına arayüz fotoğrafı.....	54
Şekil 4.2. Transglutaminaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi.....	57
Şekil 4.3. L-glutamik asit γ -monohidroksimat standart grafiği.....	58
Şekil 4.4. Hidroksamat yöntemi pozitif kontrol.....	58
Şekil 4.5. β -Galaktozidaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi.....	61
Şekil 4.6. O-nitrofenol standart grafiği.....	62
Şekil 4.7. Bradford yöntemi ile elde edilen protein standart grafiği.....	63
Şekil 4.8. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	63
Şekil 4.9. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidazının farklı sıcaklıklardaki aktivitesi.....	65
Şekil 4.10. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ...	66
Şekil 4.11. <i>Jiangella</i> sp. 8K307 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi... ..	67
Şekil 4.12. <i>Jiangella</i> sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi... ..	67
Şekil 4.13. <i>Jiangella</i> sp. KC603 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	68
Şekil 4.14. <i>Jiangella</i> sp. KC603 β -galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	69
Şekil 4.15. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	71
Şekil 4.16. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine pH'nın etkisi	71
Şekil 4.17. <i>Jiangella</i> sp. 8K307 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	72
Şekil 4.18. <i>Jiangella</i> sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine pH'nın etkisi.....	73
Şekil 4.19. <i>Jiangella</i> sp. KC603 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	74
Şekil 4.20. pH'nın <i>Jiangella</i> sp. KC603 enzim çözeltisinde enzim stabilitesi üzerine etkisi	74
Şekil. 4.21. Kısmi saflaştırılmış β -Galaktozidaz örneklerinin SDS-PAGE profili.....	76

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Enzim saflaştırmada kullanılan yöntemler ve kullanım düzeyi.....	8
Tablo 2.2. Farklı kaynaklardan elde edilen mikrobiyal transglutaminazların karakteristik özellikleri.....	10
Tablo 2.3. Mikrobiyal transglutaminaz üretiminde uygulanan stratejiler.....	12
Tablo 2.4. Transglutaminaz üretici türler.....	13
Tablo 2.5. Transglutaminazın ürün kalitesine etkisi.....	18
Tablo 2.6. β -galaktozidaz enziminin elde edildiği farklı kaynaklar.....	21
Tablo 2.7. Farklı kaynaklardan elde mikrobiyal β -Galaktozidaz enziminin bazı özellikleri.....	23
Tablo 2.8. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen levansukraz enzimi ve bazı özellikleri.....	31
Tablo 2.9. Mikrobiyal kökenli doğal ürün sayıları.....	36
Tablo 3.1. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Temin Edilen Bakteri İzolatları ve Bilgileri.....	42
Tablo 4.1. Enzim üretim yetenekleri taranan mikroorganizmalar ve tarama sonuçları	55
Tablo 4.2. β -Galaktozidaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi sonucu seçilen bakteriler ve en yakın akraba tip türleri ile biyoinformatik tarama sonuçları.....	60
Tablo 4.3. Seçilen bakterilerin kısmı saflaştırma öncesi ve sonrası β -Galaktozidaz enzim aktivitesi, toplam protein içeriği, spesifik aktivitesi, verimi ve saflaştırma katsayısı	63
Tablo 4.4. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	65
Tablo 4.5. <i>Jiangella</i> sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	66
Tablo 4.6. <i>Jiangella</i> sp. KC603 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	68
Tablo 4.7. <i>Streptomyces</i> sp. 3K401 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	70
Tablo 4.8. <i>Jiangella</i> sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	72
Tablo 4.9. <i>Jiangella</i> sp. KC603 β -galaktozidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine pH'nın etkisi.....	73

1. GİRİŞ

Moleküler dünyadaki gelişmeler, mikrobiyal çeşitliliğin detaylı bir şekilde incelenmesini mümkün hale getirerek ucuz, yüksek miktarda ve etkin enzimler üretebilen organizmaların keşfedilmesi ihtimalini artırmakta ve bilim insanlarını bu konuda yeni araştırmalara sürüklemektedir. Farklı ekolojik ortamlara adapte olan ve bu habitatlarda gelişebilen mikroorganizmaların yapısal ve hücresel düzeyde farklı özelliklere sahip olabilmeleri nedeniyle özellikle endüstriyel öneme sahip metabolit üretim yeteneklerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Mikrobiyal metabolitlerin en önemlilerinden birisi olan enzimler birçok endüstriyel alan açısından vazgeçilemez katalizörler durumundadır. Tarihsel gelişim sürecinde birçok farklı kaynaktan (bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal) elde edilen endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklı olarak elde edilmektedir (Wolfgang et al., 2004). Bu tercihin nedeni mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin bitki ve hayvanlardan elde edilenlere kıyasla; yüksek aktiviteye sahip olmaları, istenmeyen ara ürün oluşturmamaları, yüksek stabilite göstermeleri, büyük çapta elde edilmeleri ile ucuz olmalarıdır (Wiseman and Price, 1987). Mikrobiyal enzim üretiminde çevre şartlarının kontrol altında tutulması, fermentasyon metodlarının gelişmesi ve doğru suşların seçimi ile üretim miktarı artırılarak miktar sınırlandırması faktörü ortadan kalkmaktadır (Topal, 1988). Ayrıca yatırım masrafının nispeten düşük ve fabrika dizaynının kolay olması gibi üstünlükleri de pek çok enzimin mikrobiyal kaynaklı olmasında önemli bir faktördür (Pekin, 1983).

Günümüzde farklı alanlarda kullanılmaya başlanılan ticari değeri olan özellikle sert çevresel koşullara dayanıklı enzimlerin yerli kaynaklardan verimli olarak üretilmesi oldukça önemlidir. Gece-gündüz sıcaklık farkı, örneklem alanında hissedilen sıcaklık, pH, basınç ve tuzluluk değerleri gibi çevresel şartlar hem ortamın mikrobiyotasını hem de bu ortamlara uyum sağlamış mikroorganizmaların metabolit üretim yeteneklerini şekillendirebilmektedir. Bu nedenle, alışlagelmiş alanlar dışından izole edilen mikroorganizmaların endüstriyel enzimlerinin varlığının belirlenmesi için taranması önem taşıyan ve başarı şansını arttıran bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir.

Enzimler hücreler için hayati önem taşıdıkları gibi gıda ve diğer pek çok endüstriyel alanda da teknolojik açıdan oldukça önemlidir. Örneğin; süt, peynir, şarap, bira, et ürünleri, ekmekçilik, meyve suyu ve şeker şurupları üretimi gibi birçok

gıda prosesleri ile yün, deri, tekstil, kağıt endüstrileri gibi bir çok endüstriyel ve kimyasal proseslerde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Enzim kullanımının fiziksel-kimyasal yollara göre daha az çevre kirliliğine yol açması ve daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilmesi, birçok sektörde (gıda, tekstil, deri, deterjan, atık su arıtımı vb.) yaygın şekilde kullanılmasının başlıca nedenlerindedir. Gıda endüstrisinde enzimlerden yeni bir ürün elde etmek, ürüne istenen özellikleri kazandırmak, özel katkı maddeleri üretimini sağlamak ve gıda hammaddelerindeki toksik veya beslenme değerini düşürücü öğeleri uzaklaştırmak gibi değişik amaçlara yönelik olarak yararlanılmaktadır (Whitaker, 1996).

1.1 Tezin Amacı

Endüstriyel alanda talep gören ve kullanımı fazla olan transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzimi üretiminde en önemli konu; enzim üretim maliyetinin azaltılarak proses girdi maliyetlerinin düşürülmesi ve elde edilecek enzimin proses koşullarında yeterli aktivite göstermesidir. Bu nedenle günümüzde enzim üretimi üzerine yapılan araştırmaların önemli bir kısmı, uygun bir üretici mikroorganizmanın seçilmesi/oluşturulması ile ucuz ve kolay hazırlanabilen üretim ortamının tasarlanması üzerine yapılmaktadır. Bu bağlamda farklı alanlarda kullanılmak üzere ticari değeri olan veya ekstrem şartlara (sıcaklık, pH, basınç vb) dayanıklı enzimlerin yerli kaynaklardan daha verimli olarak üretilebilmesi, ülkemizin yerlileştirme ve dışa bağımlılığı azaltma politikası açısından da önem ihtiva etmektedir. Bu hedefe ulaşabilmek için ortamın mikrobiyotasını ve bu ortamlara uyum sağlamış mikroorganizmaların metabolit üretim yeteneklerini şekillendirebilen farklı ve ekstrem şartlara sahip, alışılmadık alanlar dışındaki habitatlardan izole edilen mikroorganizmaların, endüstriyel enzimlerinin varlığının belirlenmesi için taranması önem taşıyan ve başarı şansını arttıran bir yaklaşımdır.

Bu bilgiler ışığında düşük maliyetli ve gıda üretim proses koşullarında yeterli aktivite gösteren transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzimlerinin eldesinin amaçlandığı çalışmanın hedefleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında farklı bölgeler ve farklı koşullara sahip topraklardan izole edilerek stoklanan bakterilerin enzim üretim yetenekleri taranarak daha önce yapılmış bir projenin çıktılarının endüstriye ve ekonomiye kazandırılması,

- Transglutaminaz, levansukraz ve β -galaktozidaz genlerine sahip izolatların saptanması, takiben uygun besiyerlerinde ilgili enzimleri üretim yetenekleri ve potansiyellerinin belirlenmesi,
- Elde edilen enzimlerin saflaştırılarak kısmi karakterize edilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerdeki biyolojik olayların kimyasal reaksiyonlarını katalizleyen kompleks yapıları organik maddelerdir. Protein yapısında olan enzimler; hücre içindeki maddelerin yapım (anabolizma), yıkım (katabolizma) ve biyodönüşüm reaksiyonlarının gerçekleştirilmesinde katalizörlerin fonksiyonlarını üstlenmektedir (Topal, 1985).

Antik çağlardan kalma belgelere dayanarak enzimlerin en eski ticari kullanımının şarap yapımı olduğu saptanmıştır. Bu dönemlerde, Roma, Yunan, Mısır, Çin ve Hint toplumlarında enzim kaynağı olarak, mikrobiyal fermentasyon kullanılmıştır (Price and Stevens, 1982; Copeland, 2000). Yunanca olan enzim terimi; 1878 yılında Willi Kühne tarafından ortaya atılmış olup; Türkçe'ye "maya içinde" veya "mayadaki madde" olarak çevrilmiştir (Avcıbaşı, 1991; Özgen, 1996).

Mikroorganizmaların kullanımı gibi enzim ekstraktlarının da gıda ve fermentasyon proseslerinde kullanımı oldukça eskilere dayanmaktadır. Tarihsel süreç içinde; 1883 yılında Payen ve Persoz, nişastanın çözünürlüğünde malt içinde bulunan diastazın etkili olduğunu; malt özütünün kaynatıldığında bu etkinin kaybolduğunu belirtmiştir. 1885 yılında Blumental, rennin enzim ekstraktının büyük ölçekli üretimini gerçekleştirmiştir. 1908'de Wallenstein'in malt diastazının kalsiyum sülfat ile kararlı duruma geldiğini gözlemlemesi enzimin endüstriyel kullanımının yaygınlaşmasına zemin hazırlamıştır. 1915 yılında Rolm, lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularına katılmasıyla etkili temizlik sağlanabileceği yorumunda bulunmuştur. 1926 yılında da Summer, üreaz kristallerini elde etmiş; enzim molekülünün büyük kısmının proteinden oluştuğunu belirtmiştir (Martin et al., 1986).

Takip eden yıllarda yapıları ve fonksiyonları daha net ortaya konan enzimlerin endüstriyel kullanımlardaki temel avantajları aşağıda özetlenmiştir:

- Fiziksel-kimyasal metotlara göre daha az çevre kirliliğine yol açmaktadırlar.
- Reaksiyonların daha ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlamaktadırlar.
- Toksik değildirler.
- Düşük konsantrasyonlarda etkili şekilde kullanılabilirler.

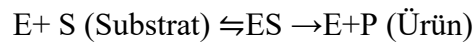
Bu sayılan temel avantajlar enzimlerin gıda, tekstil, deri, deterjan, atık su arıtımı gibi birçok sektörde yaygın kullanımına katkı sağlamaktadır.

2.1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri ve Kimyasal Yapıları

Reaksiyon sonunda değişmeden kalan ve reaksiyonu hızlandıran maddeler “katalizör” olarak tanımlanmaktadır. Katalizörün kullanım alanlarına örnek olarak; organik kimyada hidroliz ve ester oluşum tepkimelerini hızlandıran asit ve bazlar ile otomobillerin egzoz sistemindeki konvertörlerde kullanılan rodyum, platin gibi geçiş metalleri verilebilir. Bir katalizör gibi görev yapan enzimleri bu tip katalizörlerden ayıran ve Bugg (2001) tarafından bildirilen özellikler aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:

- Yüksek kataliz hızı (Katalizörsüz tepkimeye kıyasla, tepkime hızını 10^6 - 10^{14} kat artırmaktadır.)
- Substrat için yüksek spesifiklik (Enzimler, enantiyomerler ya da aynı molekülün ayna görüntüleri arasında ayırım yapabilmektedir.)
- Belirli substrat üzerinde katalize edilen reaksiyon üzerinde yüksek özgüllük (Bir polipeptit zincirinin belirli bir bölümü için hidroliz vb.)

Enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesinde genellikle ilk basamakta; enzim (E), substrat (S) ile birleşerek enzim-substrat kompleksini (ES) oluşturmakta, oluşan kompleks yapıdaki enzim, reaksiyon ortamında serbest hale geçmekte ve ürün (P) meydana gelmektedir (Temiz, 1998).



Enzim üzerinde substratın bağlanarak kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği bölge aktif merkez olarak adlandırılmaktadır. Substratın tanınmasında önemli rolü bulunan aktif merkezin iç çeperi aminoasit kalıntılarıyla kaplıdır ve genelde yarık ya da cep şeklindedir. Enzim gibi çalışan ribozimlerde de benzer şekilde aktif bölgeden söz edilirken, bunların iç kısımlarının nükleotitlerle kaplı olduğu bildirilmektedir. Substratlar enzim üzerindeki aktif bölgeye Van der Waals bağları, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları aracılığıyla bağlanarak Enzim-Substrat kompleksini oluşturmaktadır. Aktif bölge reaksiyon mekanizmasını değiştirerek; aktivasyon enerjisini azaltmaktadır. Ürün (P); sterik etkileşimler sebebiyle aktif bölgede kararlı olmayıp buradan salınmakta ve serbest kalım sonucunda enzim başlangıçtaki haline dönmektedir (EMBL-EBI, 2013).

Hücre içinde aktivite gösteren enzimler intraselüler enzim (hücre içi enzim) olarak adlandırılırken; hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınarak burada aktivite gösteren enzimler ekstraselüler enzim (hücre dışı enzim) olarak adlandırılmaktadır (Özarlan, 2018).

Bazı enzimlerin yapısında protein olmayan çeşitli bileşenler bulunmaktadır; “haloenzim” olarak adlandırılan bu enzimler apoenzim olarak bilinen protein yapısına ilaveten protein olmayan bir kısım da içerirler. Enzimatik fonksiyon için gerekli olan protein olmayan gruplar “koenzim” olarak adlandırılmaktadır. Koenzim; sıkıca bağlanmış bir prostetik grup veya kofaktör olarak da bilinen gevşek bir şekilde bağlanmış organik veya inorganik gruplar olabilmektedir (Hashim and Adnan, 1994).

2.1.3. Enzim Kaynağının Seçimi

Giderek yükselen enzim talebine yeterli miktarda ve ekonomik olarak cevap verebilmek için endüstriyel enzim üretiminde ilk ve en önemli basamak, doğru enzim kaynağının seçimidir. Günümüzde enzimlerin; %60’ı küf, %24’ü bakteri, %4’ü maya, %2’si *Streptomyces*, %6’sı hayvansal doku, %4’ü ise bitkisel doku kaynaklıdır. Eski ticari enzim üretimlerinde özellikle esteraz, lipaz, proteaz gibi enzimler hayvansal dokulardan izole edilirken; papain, bromelin gibi enzimler bitkisel dokulardan izole edilmiştir. Ancak enzim üretiminde hayvansal ve bitkisel doku kullanımı; miktar sınırlandırması, izolasyon ve saflaştırma işlemlerindeki maliyet yüksekliği, hayvansal dokulardan kaynaklanabilecek çeşitli kontaminasyon riskleri (ör: prion proteini) gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir (Kaur and Gill, 2019). Günümüzde sahip olduğu çeşitli avantajlar nedeniyle enzim üretiminde mikroorganizmaların kullanımı hayvansal ve bitkisel doku kullanımına kıyasla daha sık tercih edilmektedir. Enzim üretiminde mikroorganizma kullanımının avantajları aşağıda sıralanmıştır:

- Farklı çevre şartlarına kolay adapte olabilen mikroorganizmaların; doğrudan laboratuvar erlenine ya da fermentöre nakli oldukça kolaydır.
- Tarama işlemleri basit olduğundan kısa sürede binlerce mikroorganizma incelenebilmektedir.
- Mikroorganizmaların oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olmaları hem çok farklı enzimleri üretmelerini hem de aynı enzimi üretebilen farklı türlerin bulunmasını sağlamaktadır. Alternatif kaynak seçimi reaktördeki proses şartlarında da esneklik imkanı oluşturmaktadır.

- Gen mühendisliği uygulamalarının mikroorganizmalar üzerine kolayca uygulanabilmesi; hem *in vivo* (hücre içi) veya *in vitro* (hücre dışı) olarak üretim miktarının binlerce kat artırılabilmesine hem de tümüyle yeni ürünler/enzimler elde edilmesine imkan sağlamaktadır.
- Mikroorganizmaların ucuz karbon ve azot kaynaklarında gelişebilmeleri de büyük miktarlarda üretimlerini sağlamaktadır (Barredo, 2005).

Enzim üreticisi mikroorganizma seçimi sırasında birtakım parametreler göz önüne alınmalıdır. Üretici suşlar; patojenik özellik göstermemeli, toksik olmayan ürünler vermeli ve biyolojik stabilitesi yüksek olmalıdır (Topal, 1985). Günümüzde yaygın kullanılan mikroorganizmalar; *Aspergillus* türleri, *Trichoderma* türleri, *Bacillus* türleri, *Streptomyces* türleri ile *Kluyveromyces* türleri olarak sıralanabilir. Bu türler gıda endüstrisinde çeşitli mutasyon ve seleksiyon çalışmaları yapılarak yıllardır kullanılmaktadır (Sarrouh et al., 2012).

2.1.4. Enzim İzolasyonu ve Saflaştırma

Enzim kaynağının seçiminden sonra gelen diğer önemli işlem basamakları izolasyon ve saflaştırma. Enzimlerin fonksiyonellik ve özgülüklerinin sahip oldukları doğal formlarından kaynaklanması nedeniyle bu doğal yapının korunmasında uygun izolasyon ve saflaştırma yöntemlerinin seçimi ayrı bir önem taşımaktadır. Enzim üretiminde kullanılan proses bir bütün olarak düşünülmeli ve optimizasyon sırasında her bir işlem basamağı arasında gerçekleşebilecek etkileşimler ayrı ayrı dikkate alınarak, proses dizaynında göz önünde bulundurulmalıdır. Bu etkileşimler genel süreç optimizasyonu açısından da oldukça önemlidir (Groep et al., 2000). Örneğin; fermentasyon işleminin saflaştırma üzerindeki etkisi dikkate alınmadan gerçekleştirilecek bir optimizasyon tüm prosesin verimliliği olumsuz etkileyebilmektedir. Enzim saflaştırma proseslerinde; maksimum verim ve katalitik aktivite ile mümkün olan maksimum saflık hedeflenmektedir (Patel et al., 2017).

Fermentasyon sonunda elde edilen ürünler boyut ve yapı bakımından farklılıklar gösterdiği için; izolasyon ve saflaştırmada farklı teknikler geliştirilmiştir (Mukherjee, 2019). Aşağıda verilen Tablo 2.1’de enzim saflaştırmada kullanılan yöntemler özetlenmiştir.

Tablo 2.1 Enzim saflaştırmada kullanılan yöntemler ve kullanım düzeyi

Ayrım Özelliği	Yöntem	Kullanım Düzeyi
Boyut veya kütle	Santrifügasyon	Geniş veya küçük ölçek
	Jel Filtrasyon	Genellikle küçük ölçek
	Diyaliz, Ultrafiltrasyon	Genellikle küçük ölçek
Polarite	İyon değişim Kromatografisi	Geniş veya küçük ölçek
Yük	Elektroforez	Genellikle küçük ölçek
Hidrofobik Karakter	Hidrofobik Etkileşim	Genellikle küçük ölçek
Çözünürlük	pH değişimi	Genellikle geniş ölçek
	İyonik Kuvvet Değişimi	Geniş veya küçük ölçek
	Dielektrik Sabitinin Düşürülmesi	Genellikle geniş ölçek
Özel Bağlanma Bölgeleri veya Yapısal Özellikler	Afinite Kromatografisi	Genellikle küçük ölçek
	İmmobilize Metal İyon Kromatografisi	Geniş veya küçük ölçek
	Dye-Ligand Kromatografisi	Geniş veya küçük ölçek

(Patel, 2017 esas alınarak düzenlemiştir.)

2.2. Transglutaminaz Enzimi

Transglutaminazlar (EC. 2.3.2.13), proteine bağlı serbest amino grupları veya peptidlere bağlı lizin grupları (açıl aseptörleri, alıcıları) ile proteinin γ -karboksiamide grupları veya peptidlere bağlı glutamin grupları (açıl donörleri) arasındaki kovalent bağ oluşumunu kataliz eden enzim ailesidir (Zhu et al., 2011). Enzim; peptid bağındaki glutaminil kalıntısının açıl verici olan -karboksiamid grubu ile açıl alıcı olan bir primer amin arasındaki açıl-transfer tepkimesini gerçekleştirmektedir (Folk and Finlayson, 1977). Proteinin yapısında meydana gelen bu molekül içi ve/veya moleküller arası bağlanmalar; onun son kullanımını büyük oranda etkilemektedir (Zhu et al., 1995; Yokoyama et al., 2004).

Transglutaminaz enzimleri; hayvan doku ve sıvılarından, bitkilerden, balıklardan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Memelilerden elde edilen transglutaminazlar kalsiyuma bağlımlıyken; mikroorganizma kaynaklı olanlar kalsiyumdan bağımsız olup düşük moleküler ağırlıklıdır. Transglutaminazların Gln kalıntılarına karşı aktivitesi de elde edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir. Transglutaminazlar, lipit veya yağda çözünen materyalleri yüksek sıcaklığa dayanıklı filmler oluşturarak enkapsüle etmekte, jelleşmede yüksek sıcaklığın etkilerine karşı koruma sağlamakta, ürünlerin başta elastikiyet ve su tutma kapasitesi gibi çeşitli çözünlük ve fonksiyonel özelliklerini modifiye etmektedir. Transglutaminazlar

kullanarak proteinin glutamin kalıntılarına çeşitli fonksiyonel grupların dahil edilmesi, proteinin son kullanımını da geliştirmektedir (Zhu et al., 2011).

Transglutaminaz enzimi; whey proteinleri, soya proteinleri, aktin, miyozin ve gluten gibi bir dizi proteinin çapraz bağlanmasını kataliz etmek için kullanılmaktadır. Gıda proteinlerinin transglutaminaz ile modifikasyonu önemli gıda proteinlerinden olan lizini çeşitli kimyasal reaksiyonlara karşı korumakta, lipid ve yağda çözünen materyalleri enkapsüle etmekte, ısı ve suya dayanıklı film oluşturmada, elastikiyet ve su tutma kapasitesini geliştirmekte, çözünürlük ve fonksiyonel özellikleri modifiye etmekte ve esansiyel amino asit içeren proteinlerin çapraz bağlanmasını sağlayarak yüksek besleyici değere sahip gıda proteinlerinin eldesini gerçekleştirmektedir (Matheis and Whitaker, 1987).

Transglutaminazların ağartma ve yıkama işlemlerinde yün kalitesi üzerindeki olumlu etkileri de belirtilmektedir (Gembah et al., 2005).

2.2.1. Mikrobiyal Transglutaminaz Enzimi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Doğada oldukça yaygın bulunan transglutaminaz enzimi; çeşitli memeli dokuları, bazı omurgasızlar ve mikrobiyal hücreler (Yu et al., 2008; Kashiwagi et al., 2002) ile soya, yer elması, pancar, elma gibi bitkisel dokulardan (Falcano et al., 1993) izole edilebilmektedir. Enzimin bu dokularda koagülasyon, antibakteriyel immün reaksiyonları ile fotosentez gibi çeşitli proseslere dahil olduğu kanıtlanmıştır (Kashiwagi et al., 2002).

1957 yılında ilk olarak Guinea domuzu karaciğerinden izole edilen enzime duyulan ilgi günümüze kadar giderek artmış ve çeşitli dokularda izolasyon çalışmaları yapılmıştır (Serafini-Fracassini and Duca, 2008). Uzun dönem tek ticari kaynak olarak Guinea domuzu kullanılmış ancak enzimin karmaşık izolasyon ve saflaştırma işlemleri yüksek maliyete (80 USD/ U) neden olduğundan araştırmacıları farklı kaynak arayışına sürüklemiştir (Zheng et al., 2001). 80'li yılların son dönemlerinde ise bitki transglutaminazları üzerine yoğunlaşmıştır. Mısır dokusunda transglutaminaz üretim geni tanımlanmış ve potansiyel üretim kabiliyetine sahip olduğu belirtilerek patentlenmiştir (Torne et al., 2007). Transglutaminaz üretim geni tütün çiçeği, pirinç (Campos et al., 2013), elma poleni, soya fasulyesi yaprakları (Kang ve Cho, 1996) ve biberiye yapraklarında da (İbrahim vd., 2017) tespit edilmiştir. 80'li yıllar bitmeden önce Ando ve arkadaşları *Streptoverticillium* türlerinde transglutaminaz aktivitesi saptayarak enzimin ticari üretiminde bir devrim

başlatmıştır (Mostafa, 2020). Üretilen enzimin aktif merkezinde sistein, histidin, asparajin (ya da aspartat) kalıntıları bulunmaktadır (Kieliszek and Misiewicz, 2014).

Günümüzde ise gıda işleme endüstrisi, yün sanayii, çeşitli kozmetikler, biopolimerler ile klinik uygulamalarda yaygın kullanılan transglutaminazın ana kaynağı mikroorganizmalardır (Savoca et al., 2018; Wang et al., 2018). Saflaştırma ve ön karakterizasyon işlemleri sonunda Ca^{+2} 'den tamamiyle bağımsız olan mikrobiyal transglutaminaz enzimi; *Streptoverticillium cinnamoneum* CBS 683.68 (Duran et al., 1998), *Streptoverticillium ladakanum* (Ho et al., 2000), *S. mobaraense* (Yokoyama et al., 2004), *Streptomyces netropsis* (Yu et al., 2008), *Streptomyces hygroscopicus* (Cui et al., 2008), *Streptomyces griseocarneus* (Mabel and Jacob, 2012), *Bacillus circulans* BL32 (Souza et al., 2011) ve *Kutzneria albida* (Steffen et al., 2017) gibi çeşitli mikrobiyal kaynaklardan izole edilmiştir (Mostafa, 2020). Farklı kaynaklardan elde edilen mikrobiyal transglutaminaz (mTg) enziminin karakteristik özelliklerinin belirtildiği Tablo 2.2'den görülebileceği gibi üretici türe göre değişmekle birlikte mTg enziminin optimum çalışma koşullarının genel olarak 45-55°C ile 6-8 pH arasında değiştiği söylenebilecektir.

Tablo 2.2. Farklı kaynaklardan elde edilen mikrobiyal transglutaminazların karakteristik özellikleri (Mostafa, 2020)

Kaynak	Moleküler Ağırlık (kDa)	İzoelektrik Nokta	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	pH Stabilitesi	Referans
<i>Bacillus circulans</i>	45	6,3	7,0	47	6-8,5	Soares et al. (2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	29	-	8,2	60	7,5-8,5	Suzuki et al. (2000)
<i>Physarum polycophalum</i>	39,6	6,1	-	-	-	Klein et al. (1992)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	38	-	6-7	37-45	5-8	Cui et al. (2007)
<i>Streptomyces mobaraense</i> S-8112	40	8,9	6-7	50	5-9	Ando et al. (1989)
<i>Streptomyces mobaraensis</i> DSM-40587	38	-	6,0	55	5-6	Zhang et al. (2012)
<i>Streptomyces platensis</i> Recombinant	40	-	6,0	55	5-6	Lin et al. (2008)
<i>Streptomyces</i> sp.	45	-	6-6,5	35-40	4,5-8	Macedo et al. (2010)

Hayvansal dokulardan sağlanan transglutaminaz enziminin aktivitesi; Ca^{+2} iyonları başta olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Yokoyama et al., 2004; Sharma et al., 2002). Ca^{+2} iyonlarının; enzim molekülünde çeşitli konformasyonel değişikliklere neden olarak enzim aktivitesini artırdığı ve katalitik merkezdeki aminoasit kalıntılarına etki gösterdiği bilinmektedir (Kieliszek and

Misiewicz, 2014). Mikrobiyal orijinli transglutaminazın Ca^{+2} 'ye ihtiyaç duymadan aktivite göstermesi; enzim praperatlarının hazırlanmasında pratiklik sağlayacağı için büyük avantaj getirmektedir (Macedo et al., 2010).

Mikrobiyal transglutaminaz, hayvansal dokulardan elde edilen transglutaminaza kıyasla daha düşük molekül ağırlığına sahiptir. Üretici türe göre değişkenlik göstermekle birlikte yaklaşık 38 kDa molekül ağırlığına sahip olan mikrobiyal transglutaminazlar tek polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Abd-et al. (2010) tarafından yürütülen çalışmada elde edilen mTg'nin 331 amino asitten oluştuğu ve izoelektrik noktasının 8,9 pH olduğu raporlanmıştır.

Mikrobiyal kaynaklı enzim, enerji ve ekonomik tasarruflar sağlamanın yanı sıra belirli proseslerin daha kolay gerçekleştirilmesine de yardımcı olmaktadır. Günümüzde gen transfer teknolojisindeki gelişmelerle *E.coli* gibi hücrelerde gen ekspresyonu sağlanarak enzim üretimi daha verimli yollarla gerçekleştirilebilmektedir (Kieliszek and Misiewicz, 2014). Örneğin *Streptomyces* sp.'deki ilgili enzimi kodlayan gen *Pichia pastoris*'e aktarılarak enzimin düşük maliyet ile yüksek miktarlarda üretimi gerçekleştirilmiştir (Özçelik et al., 2019).

2.2.2. Mikrobiyal Transglutaminaz Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Kültür ortamında transglutaminaz oluşum hızı, verimliliği ve kararlılığı; sıcaklık, pH, O_2 varlığı gibi çeşitli çevresel faktörler ile ortam bileşiminden etkilenmektedir (Tokatlı vd., 2018).

Giderek artan çalışmalarla enzim biyosentezini etkili şekilde kontrol edebilmeyi sağlayan farklı stratejilerin geliştirilmesi de mümkün hale gelecektir. Bu bağlamda üretici mikroorganizma türü, besiyeri bileşiminin optimizasyonu, fermentasyon şartları ve tekniğinin kontrolü ile stres faktörleri göz önünde bulundurulmuş faktörlerdir. Mikrobiyal transglutaminaz üretiminde uygulanan çeşitli stratejiler Tablo 2.3'de örneklendirilmiştir (Zhu and Tramper, 2008).

Tablo 2.3. Mikrobiyal transglutaminaz üretiminde uygulanan stratejiler

Suş	Uygulanan Strateji	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Referans
<i>S.mobaraense</i>	Mikroorganizma tür seçimi	2,00	Ando et al. (1989)
<i>Streptovercillium mobarense</i>	Besiyeri bileşimi optimizasyonu	~1	Zhu et al. (1996)
<i>Streptovercillium cinnamoneum</i>	Besiyeri bileşimi optimizasyonu	0,331	Junqua et al. (1997)
<i>Streptovercillium mobarense</i> WSH-Z2	Fermentasyon şartlarının kontrolü (sıcaklık kontrolü)	3,37	Zheng et al. (2001)
<i>Streptovercillium mobarense</i> WSH-Z2	Fermentasyon şartlarının kontrolü (pH kontrolü)	3,40	Zheng et al. (2002)
<i>Streptovercillium ladakanum</i> NRRL-3191	Besiyeri bileşimi optimizasyonu (karbon kaynağı seçimi)	0,348	Tellez-Luis et al. (2004)
<i>Streptovercillium ladakanum</i> NRRL-3191	Besiyeri bileşimi optimizasyonu (karbon kaynağı seçimi)	0,725	Tellez-Luis et al. (2004b)
<i>Streptovercillium mobaraense</i>	Fermentasyon şartlarının kontrolü (karıştırma hızının etkisi)	3,32	Yan et al. (2005)
<i>Bacillus circulans</i> BL32	Besiyeri bileşimi optimizasyonu, üretici mikroorganizma seçimi	0,306	de Souza et al. (2006)
<i>Streptomyces</i> sp. P20	Besiyeri bileşimi optimizasyonu, fermentasyon şartlarının kontrolü	1,4	Macedo et al. (2008)

2.2.2.1. Mikroorganizma Türü ve Besiyeri Bileşimi

Etkin olarak transglutaminaz üretimi gerçekleştiren temel bakteri aileleri; *Streptomyceataceae* başta olmak üzere *Micrococcaceae*, *Bacillacea* ve *Pseudomonadacaeae* olarak sıralanabilir. Literatürde sıkça karşımıza çıkan transglutaminaz üretici türler Tablo 2.4.'te özetlenmiştir (Kieliszek and Misiewicz, 2014).

Tablo 2.4 Transglutaminaz üretici türler

Enzim Üreticisi Tür	Ulaşılan Enzim Aktivitesi (U/ml)	Referans
<i>Actinomadura</i> sp. T-2	-	Kim et al. (2000)
<i>Bacillus circulans</i> BL32	0,28	de Souza et al. (2006)
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	Itaya ve Kikuchi (2008)
<i>Enterobacter</i> sp. C3261	0,77	Bourneow et al. (2001)
<i>Providencia</i> sp. C1112	0,92	Bourneow et al. (2012)
<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	2,00	Ando et al. (1989)
<i>Streptomyces platensis</i> M5218	0,66	Lin et al. (2006)
<i>Streptomyces lividans</i> JT46/pAE053	2,20	Lin et al. (2006)
<i>Streptoverticillium griseocarneum</i>	1,46	Lin et al. (2003)
<i>Streptoverticillium</i> sp. s-8112	1,46	Kanaji et al. (1993)

Gıda endüstrisinde enzimin ticari üretiminde *Streptomyces mobaraensis* şuşları yaygın olarak kullanılmaktadır (Ando et al., 1989). Bazı araştırmacılar son yıllarda yürüttükleri çalışmalarla *S. ladakanum*, *S. lividans* gibi şuşların genetik modifikasyonu ile daha başarılı bir şekilde enzim üretimini gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir (Kieliszek and Misiewicz, 2014).

Biyoteknoloji tabanlı endüstriyel proseslerde; kültür ortamının formülasyonu, son ürün konsantrasyonu ile verimi büyük ölçüde etkilediğinden üzerinde durulan önemli bir parametredir. Tüm biyosentez süreci düşünüldüğünde toplam maliyetin neredeyse %30'unu kültür ortamı maliyetleri oluşturmaktadır (Portilla Rivera et al., 2009). Bu nedenle doğru şekilde planlanan kültür ortamı maliyetlerini düşürerek genel proses ekonomisini de olumlu etkilemektedir (de Souza et al., 2006).

Streptomyces türlerinden transglutaminaz eldesiyle ilgili yayınlanan çalışmaların çoğunda kültür ortamının aynı olduğu gözlenmektedir (Ando et al., 1989). Ortam maya ekstraktı, pepton, sodyum fosfat, potasyum fosfat, magnezyum sülfat ve bir karbon kaynağından oluşmaktadır (Guerra-Rodriguez and Vazquez, 2013). Karbon kaynağı olarak genelde glikoz kullanılırken, sukroz, nişasta ve dekstrinler de kullanılabilir (Kieliszek and Misiewicz, 2014). Azot kaynakları ise kazein, pepton, üre ve maya özütü olarak sıralanmakla birlikte inorganik amonyum tuzları da azot kaynağı olarak kullanılabilir. Ancak inorganik amonyum tuzlarının kullanımı enzim sentezinde yapıya katılacak elzem aminoasitlerin eksikliğine yol açacağından daha az tercih edilmektedir (Zilda, 2014).

Maya ekstraktı, pepton gibi nispeten pahalı bileşenler ise maliyetin yükselmesine neden olmaktadır (Kieliszek and Misiewicz, 2013).

Junqua ve arkadaşları tarafından *Streptoverticillium cinnamoneum*'dan transglutaminaz eldesinde; enzim aktivitesi ve üretimi üzerine kazein, gliserol, pepton, maya ekstraktı ve oligoelement varlığının etkisi incelenmiştir. Oligoelement varlığının ne bakteri gelişmesi ne de transglutaminaz üretimi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Kültür ortamında kazein (38,4 g/l) ve gliserol (31,2 g/l) kullanımının kontrol grubuna kıyasla enzim aktivitesini 3 kat artırdığı raporlanmıştır (Junqua et al., 1997).

Bacillus circulans BL32'den transglutaminaz eldesi üzerine 2006 yılında yapılan bir çalışmada karbon, azot ve mineral kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Uygun kültür ortamının tasarlanması için test edilen anahtar bileşenler; gliserol, sukroz, pepton, tripton, Na₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O ve FeSO₄.7H₂O'dur. Bunlar arasında enzim üretimi üzerinde %90 güven seviyesi ile sukrozun negatif; peptonun ise pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir (de Souza et al., 2006). Ceresino ve arkadaşları tarafından ise kültür ortamında glukoz, kazein peptonu ve KH₂PO₄.7H₂O kullanımının *Streptomyces* sp. CBMAI 1617'dan transglutaminaz eldesinde olumlu etki sağladığı belirtilmiştir (Ceresino et al., 2018).

Endüstriyel boyutta üretimde ise ekonomik açıdan uygulanabilir olması için, daha ucuz hammaddelere dayalı kültür ortamlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Bahrim et al., 2010). Bu bağlamda son yıllarda tarım atıklarının kullanımına dayalı daha ucuz formülasyonlar tasarlanmaktadır. *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191'den transglutaminaz eldesinde; sorgum samanı ile hazırlanan kültür ortamı ile endüstriyel ksiloz içeren kültür ortamı karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda 20 g/l ticari ksiloz içeren ortamda 96 saat sonunda 0,282 U/ml transglutaminaz aktivitesi ölçülmüştür. Filtrasyon ile sterilize edilen sorgum samanı ile birlikte 20 g/l ksiloz kullanıldığında ise 72 saat sonunda 0,348 U/ml enzim aktivitesi ölçülmüştür. Buna dayanarak sorgum samanı hidrolizatlarının *S. ladakanum*'dan enzim eldesinde etkili bir kaynak olabileceği yorumunda bulunulmuştur (Tellez-Luis et al., 2004a).

Aynı çalışma ekibiyle yapılan başka bir çalışmada ise enzim üretimini iyileştirmek amacıyla gliserol, ksiloz ve kazeinden oluşan ortam optimize edilmeye çalışılmıştır. Ortamın 0, 30, 60 g/L gliserol; 0, 30, 60 g/L ksiloz ve 20, 40, 60 g/L

kazein içerecek şekilde deneysel tasarımı kullanılarak optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve model maksimum enzim aktivitesi için ksiloz içermeyen ortamda; 50,5 g/L gliserol ve 20 g/L kazein kullanılabileceğini önermiştir (Tellez-Luis et al., 2004b).

Streptomyces sp. P20'den enzim üretimi için en uygun karbon ve nitrojen kaynağını belirlemeye yönelik yapılan çalışmada nitrojen kaynağı olarak; %0,2 maya + %2 pepton, %2 pepton, %2 mısır şurubu likörü ve %2 kazein seçilmiştir. Karbon kaynakları olarak da %0,2 glikoz + %2 patates nişastası, %2 melas, %2 sukroz, %2 maltodekstrin, %2 gliserol, %2 çözümlü nişasta seçilmiştir. Çalışma nitrojen kaynağı olarak pepton; karbon kaynağı olarak patates nişastası/glikoz karışımı kullanıldığında daha iyi sonuçlar vermiştir. (Macedo et al., 2007).

Bir başka çalışmada *Streptomyces mobaraensis*'ten enzim eldesinde süt-patates-gliserolden meydana gelen yüksek aktiviteye sahip enzim eldesi için kullanılabilecek alternatif ortam bileşenleri (600 g/L yağsız süt, 40 g/L patates 5 g/L gliserol) olabileceği belirtilmiştir (Guerra-Rodriguez and Vazquez, 2014). Başka bir çalışmada da *Streptomyces mobareanse*'den transglutaminaz eldesinde kültür ortamında tarım endüstrisi atıklarından buğday kepeği kullanılmıştır. Çalışmada aktif enzim salınımını artırmak amacıyla kültür ortamına proteaz ve cetrimonium bromide (CTAB) eklentisi de yapılmıştır. Optimize edilmiş koşullarda (5 g buğday kepeği, 39,14 U proteaz, 0,10 M MgCl₂, %0,08 CTAB (Cetrimonium bromide) ile %2 inokülasyon oranı) optimize edilmemiş koşullara göre 4 kat fazla enzim aktivitesi (12,949 ± 0,061 IU/g) gözlenmiştir (Fatima et al., 2019).

2.2.2.2. Fermentasyon Şartlarının Kontrolü

Enzim üretiminde fermentasyon şartları optimize edilirken göz önünde bulundurulacak önemli parametreler; sıcaklık, pH, karıştırma şekli ve hızıdır. Transglutaminaz üretiminde hem hücre büyümesi hem de ürün oluşumunda önemli çevresel parametrelerden sıcaklık ve pH'nın etkileri ile ilgili kinetik veriler fermentasyon sürecinin optimize edilmesini kolaylaştırmaktadır (Yan et al., 2005). Geliştirilen birçok kinetik model, gelişme hızı ile fermentasyon sıcaklığı arasındaki ilişkiyi açıklamak için çeşitli öngörülerde bulunmaktadır. Bu bağlamda Shoolfield ve arkadaşları tarafından gelişme hızını sıcaklığın bir fonksiyonu olarak belirten doğrusal olmayan model örnek olarak gösterilmektedir (Zheng et al., 2001).

Literatürde, fermentasyon sıcaklığı ile pH'nın transglutaminaz üretimi üzerine etkisini inceleyen bazı çalışmalarda farklı sonuçlara da rastlanmaktadır. Uygun fermentasyon koşullarının *S. griseocarneum*, *S. cinnamoneum* ve *S. mobaraense* için 30°C ve 7,0 pH olduğu belirtilirken (Gerber et al., 1994); *S. mobaraense* için 28°C ve 6,5 pH (Zhu and Tramper, 2008); *S. cinnamoneum* için de 28°C ve 7,0-7,4 başlangıç pH'sı olduğu (Junqua et al., 1997) belirtilmektedir.

Farklı fermentasyon sıcaklıklarının elde edilen son ürün üzerine etkisinin incelenmesi için iki basamaklı sıcaklık stratejisi uygulanan çalışmada *S. mobaraense* WSH-Z2 bakterisinden elde edilen transglutaminazın enzim aktivitesi ölçülerek karşılaştırma yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. 25-35°C arasında değişen fermentasyon sıcaklıklarında inkübasyona bırakılan bakteriden elde edilen enzim için en yüksek aktivite 2,94 U/mL ile 30°C'de gözlenmiştir. Ayrıca 32°C ve üzeri sıcaklıklarda lag süresinin daha kısa, spesifik gelişme hızı ile spesifik transglutaminaz üretim hızının daha yüksek olduğu da saptanmıştır, 28°C'de ise büyümenin orta ve ilerleyen aşamalarındaki spesifik gelişme hızı ve spesifik transglutaminaz üretim hızlarının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre geliştirilen iki basamaklı sıcaklık stratejisinde fermentasyonun ilk 18 saatinde 32°C'ye bırakılan; ikinci 18 saatinde ise 28°C'ye bırakılan bakteriden elde edilen enzimin spesifik aktivitesinin 3,37 U/ml olduğu raporlanmıştır (Zheng et al., 2001). Macedo ve arkadaşları tarafından yeni izole edilen *Streptomyces* sp. P20'den transglutaminaz eldesi için uygun fermentasyon sıcaklığı 30°C olarak önerilmiştir (Macedo et al., 2008).

E. coli aracılığıyla üretilen rekombinant transglutaminaz sentezinde; fermentasyon sıcaklığının gen transferi yapıldıktan sonra hücreler için oldukça önemli bir parametre olduğu ve ürün veriminin sıcaklıktan oldukça etkilendiği vurgulanmıştır. Elde edilen enzim için en yüksek aktivitenin 1386 U/g ile 29°C'de gözlemlendiği bildirilmiştir (Sommer et al., 2011).

Hücre büyümesi ve ürün (enzim) oluşumunu etkileyen önemli parametrelerden biri olan pH'nın mTg üretimi üzerine etkisi daha az bilinmektedir. Halbuki, daha iyi bir mTg üretimi için optimum bir sıcaklık politikası uygulanarak pH'nın enzim kinetiği üzerine olan etkisinin dikkate alınması gereklidir. Bu amaçla yürütülen bir çalışmada; pH 5,0-8,5 aralığındaki ortamlarda inkübasyona bırakılan *S. mobarene* WSH-Z2'den elde edilen enzimin aktivite değerleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. En

yüksek aktivite 2,90 U/ml olarak pH 6,5'te gözlenmiştir. Ayrıca uygulanan iki basamaklı bir pH değişim stratejisi ile ilk aşamada 13 saat pH 7,0 ortamında inkübasyona bırakılan bakteri süre sonunda pH 6,5 ortamına alınarak tekrar 13 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi 3,40 U/ml olarak raporlanmıştır (Zheng et al., 2002).

Fermentasyon sırasında uygulanan havalandırma oranı veya karıştırma hızı da gerek çözülmüş oksijen miktarı gerek ısı ve kütle transferini etkilediğinden enzim üretiminde göz önünde bulundurulması gereken önemli parametrelerdendir. *S. mobarense*'den transglutaminaz eldesi üzerinde fermentasyon karıştırma hızının etkisinin incelendiği iki basamaklı karıştırma uygulanan bir çalışmada; bakteri ilk 24 saatte 450 rpm karıştırma hızında inkübasyona bırakılmış devamında karıştırma hızı 350 rpm'e düşürülerek 24 saat daha inkübasyona devam edilmiştir. Çalışma sonunda enzim aktivitesinin 3,32 U/ml olduğu ve 350 rpm'de inkübasyona bırakılan bakteriden elde edilen enzim aktivitesinin %15,3 daha yüksek olduğu saptanmıştır (Yan et al., 2005).

Streptoverticillium ladakanum'dan transglutaminaz eldesinde fermentasyonda uygulanan 200, 300 ve 400 rpm karıştırma hızlarının karşılaştırıldığı çalışma sonucunda; karıştırma hızı artıkça enzim biyokütle konsantrasyonunun arttığı ve en yüksek enzim aktivitesinin 400 rpm karıştırma hızında gliserol ve melas içeren besi ortamında inkübasyona bırakılan bakteriden sağlandığı belirtilmiştir (Portilla-Rivera et al., 2009). Bir başka çalışmada da *Streptomyces* sp. P20 bakterisinden transglutaminaz eldesi için; uygun fermentasyon koşullarının 30°C, 100 rpm karıştırma hızı olduğu bildirilmiştir (Macedo et al., 2008).

2.2.3. Transglutaminaz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Proteinler, gıdaların tekstürel yapısından sorumlu, ürünün yapısını, işleme özelliklerini ve kararlılığını etkileyen, gıda teknolojisinde büyük önem taşıyan işlevsel bileşenlerdir. Proteinlerin bu özellikleri sahip oldukları molekül yapılarından ileri gelmektedir. Bu yapıları fiziksel, kimyasal veya enzimatik olarak çeşitli yollarla modifiye edilebilmekte ve ürünlere yeni teknolojik özellikler kazandırılabilir. Enzimatik modifikasyon, kimyasal modifikasyonlara göre daha az toksik etki oluşturduğundan daha sık tercih edilmektedir (Schorsch et al., 2000). Transglutaminaz, gıda endüstrisinde kullanılan çoğu enzimin aksine; ortamda küçük alt birimler oluşturmak yerine çeşitli bağ oluşumları ve çapraz bağlanmalar

aracılığıyla büyük partiküller oluşturmaktadır. Oluşan güçlü çapraz bağlanmalar; parçalama, dondurma, pişirme gibi çeşitli gıda proseslerinde bile devamlılığını korumaktadır (Gaspar and Goes-Favoni, 2015).

Tablo 2.5’de çeşitli ürün gruplarında kullanılan transglutaminazın ürünler üzerine etkisi özetlenmiştir. Enzim gıdaların tekstür, çözünürlük, viskozite, jelleşme ve su tutma kapasitesi gibi birçok karakteristik özelliğini etkilemektedir.

Tablo 2.5. Transglutaminazın ürün kalitesine etkisi

Ürün Kaynağı	Ürün Grubu	Etki
Süt	Kremalar, tatlılar, sütlü içecekler ve soslar	Ürün kalitesini ve tekstürü geliştirme
Et	Hamburger, Hazır Köfteler, Dondurulmuş Etler, Konserve Etler	Görünüm ve kaliteyi iyileştirme, Sertliği artırma
Kazein	Çapraz bağlı protein, mineral ve adsorpsiyon geliştiriciler	Sindirim sisteminde mineral adsorpsiyonunu geliştirme
Buğday	Fırıncılık Ürünleri	Tekstürü geliştirme, yüksek hacim sağlama
Jelatin	Tatlıcılık Ürünleri	Düşük kalorili gıda ürünlerinde tekstür ve elastikiyeti iyileştirme
Balık	Balık ürünleri	Sertliği artırma
Soya fasulyesi	Tofu	Raf ömrünü artırma, tekstürü iyileştirme
Yağ	Katı yağlar	Domuz yağı ikamesi
Bitkisel proteinler	Protein tozları	Tat ve tekstürü iyileştirerek jel oluşumunu sağlama

(Kieliszek and Misiewicz, 2014 esas alınarak düzenlenmiştir.)

Transglutaminaz ilavesinin set tipi yoğurtların titre edilebilir asitlik, laktik asit, tirozin miktarı, viskozite, jel katılığı, sineresis, aroma bileşimi ve duyuşal özellikleri üzerine etkisini belirlemek için farklı zamanlarda (homojenizasyon sonrası, pastörizasyon sonrası, starter kültürler beraber) enzim ilavesi yapıp 10 dakika ve 1 saat inkübe edilmiştir. Pastörizasyon sonrası enzim ilavesinin jel kuvvetini artırdığı ve sineresisi azalttığı gözlenmiştir. Elektron mikroskopunda yapıda gerçekleşen çapraz bağlanmalar sayesinde proteinlerin jel ağında daha eşit dağıldığı görülmüştür (Şanlı et al., 2011).

Sütün mikrobiyal transglutaminaz (2 U/g) ile 40°C’de 2 saat inkübasyonu sonucu transglutaminazın gerçekleştirdiği çapraz bağlanmalar ile daha yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler (55-200 kDa) elde edilmiştir. İnkübasyonun ilk saatinde süt proteinleri arasındaki çapraz bağlanmaların daha dinamik olduğu

raporlanmıştır. Ayrıca enzimatik modifikasyonun pastörize ve ultrafiltre sütler de dahil olmak üzere süt proteinlerinin etanol stabilitesini önemli ölçüde artırdığı da bildirilmiştir (Tarapatsky et al., 2019).

Bileşiminde yumurta proteinleri bulunan kaplamalı tavuk kanadı ürünlerine %0,3 oranında transglutaminaz ilave edilerek 40°C'de 30 dakika 500 mPa basınca maruz bırakılan ve takiben 75°C'de 5 dakika bekletilerek enzimin inaktif hale gelmesinin sağlandığı çalışma sonunda enzim ve basınç uygulanan örneklerde basınç uygulanan ancak enzim uygulanmayan örneklerle kıyasla sertlik ve çiğnenebilirlik (chewiness) parametrelerinde belirgin bir artış gözlemlendiği raporlanmıştır (Trespacios and Pla, 2007). Parçalanmış et ürünlerine transglutaminaz ilavesinin de ürünlerin elastikiyetini iyileştirerek, pişirme kayıplarını önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (Merenkova et al., 2019).

Ekmek ve kuruvasan hamurundan izole edilen proteinlere mikrobiyal transglutaminaz uygulamasının iki hamur türünde de gliadin fraksiyonlarında artışa neden olduğu gözlemlenmiş ve yüksek molekül ağırlığına sahip glütenin fraksiyonları elde edilmiştir (Gerrard et al., 2001).

Transglutaminaz ilavesinin yulaf hamurunun reolojik ve termomekanik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmada da enzim ilavesinin hamurun su tutma, viskoelastik özellikleri ve termal stabilitesi üzerine olumlu etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Transglutaminaz ilavesiyle serbest amino gruplarının sayısında belirgin bir azalmada gözlenirken bu durumun enzimin kataliz ettiği çapraz bağlanmayı doğrular nitelikte olduğu yorumunda bulunulmuştur. Globulin ve aveninin proteinlerinin enzim için iyi bir substrat olduğu da raporlanmıştır (Huang et al., 2010). Transglutaminaz ilavesinin soya proteinleri ile tofu tekstürü üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma sonucunda da soya proteinlerinin özellikle denatüre edildiğinde enzim için mükemmel bir substrat olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonunda artan kırılma kuvveti etkisiyle daha sert yapılı tofu üretimi gerçekleştirilmiştir (Yasir et al., 2007).

Emülsifiye gıda ürünlerine tekstür kazandırmak için tuz ve fosfat kullanımı yaygın yöntemlerdendir. Bu yolla proteinlerin çözünürlüğü artırılarak; su tutma kapasitesi, emülsifikasyon ve jel oluşturma özellikleri iyileştirilmektedir. Ancak bu maddelerin yüksek dozda kullanımı ürünün duyu özelliklerini etkilediği gibi başta

yüksek tansiyon olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarına da yol açmaktadır. Sağlık üzerine olumsuz olası etkileri azaltmak amacıyla farklı klorid tuzları ve ikame edici katkıları araştırılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda transglutaminazın tuz ve fosfat kullanımına karşı etkili bir alternatif olabileceği saptanmıştır (Kurt ve Zorba, 2004).

Bu kapsamda yapılan bir çalışmada; balık jambonuna çeşitli oranlarda tuz (%0, %1, %2) ve mikrobiyal transglutaminaz (%0, %0,3, %0,6) eklenerek son ürünün çözünürlük, mekanik özellikleri, su tutma kapasitesi karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda ürünlerdeki mekanik özelliklerin gelişimi için mikrobiyal transglutaminazın NaCl'ye ihtiyaç duyduğu yorumunda bulunulmuş ve %0,3 enzim, %1 tuz ilavesiyle düşük tuz içeriğine sahip homojen yapıya sahip balık ürünü elde edildiği raporlanmıştır (Ramirez et al., 2002).

2004 yılında yapılan bir çalışmada da düşük tuz oranına sahip balık ürünlerine whey proteinleri ile transglutaminaz eklenerek ürünün mekanik özelliklerindeki değişimler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda düşük tuz içeriğine sahip ürünlerde whey proteinleri ve transglutaminaz kullanımının ürünün mekanik özelliklerini iyileştirdiği, su tutma kapasitesini artırdığı gözlenmiştir (Uresti et al., 2004).

Düşük yağ içeriğine sahip domuz jambonu ve domuz pastırmasına eklenen transglutaminazın etkilerinin araştırıldığı çalışma sonunda %0,1 oranında eklenen transglutaminazın yapıda bulunması gereken tuz oranını kalite parametrelerinde bir bozulma görülmeden %1,5'ten %1'e düşürdüğü raporlanmıştır. Yine ürün formülasyonlarına %0,3 oranında transglutaminaz eklenmesi sayesinde %10 oranında emülsifiye etin eklenmesine gerek olmadığı yorumu yapılarak ürünlerin su tutma kapasitesinde gelişme gözlemlendiği bildirilmiştir. Transglutaminaz uygulamasının; düşük yağ ve tuz içeriğine sahip ürünlerde tekstürel özellikleri geliştirip su tutma kapasitesini artırmak amacıyla kullanılabilirliği yorumu yapılmıştır (Chin and Chung, 2003).

2.3. Beta Galaktozidaz Enzimi

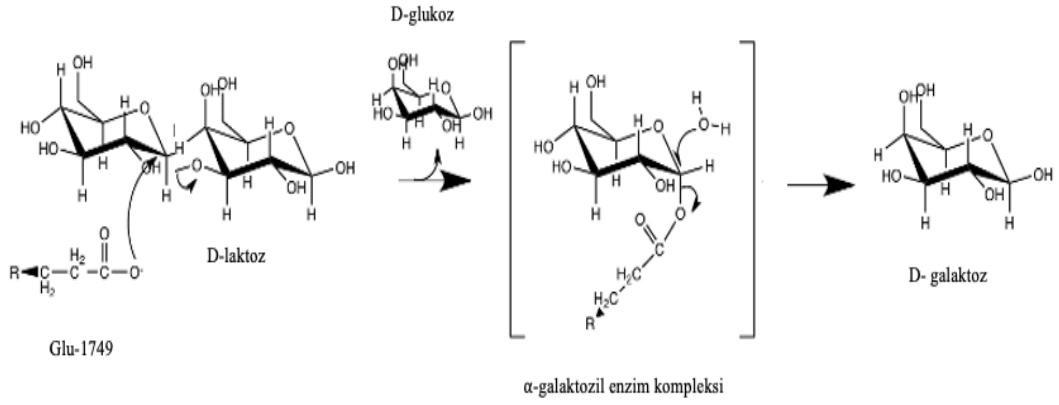
Laktaz olarak da bilinen β -galaktosidaz enzimi (EC. 3.2.1.23); laktozun glikoz ve galaktoz birimlerine hidrolizinden sorumludur (Kumar et al., 2012a).

Bu hidroliz tepkimesi 3 temel basamakta gerçekleşmektedir (Uyanık, 2008).

Bunlar:

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

Şekil 2.1’de beta galaktozidaz enziminin gerçekleştirdiği hidroliz tepkimesi özetlenmiştir.



Şekil 2.1. β-galaktozidaz enziminin gerçekleştirdiği hidroliz tepkimesi

β-galaktozidaz (EC. 3.2.1.23), fungal, bitkisel ve haysansal kaynaklar ile maya ve bakterilerden elde edilebilmektedir. Ancak endüstriyel uygulamalarda ucuz ve kolay ulaşılabilir olduğundan mevcut kaynaklara kıyasla mikroorganizmalardan daha çok yararlanılmaktadır (Kumar et al., 2012b). Enzimin elde edildiği farklı kaynaklara örnekler Tablo 2.6’da verilmiştir.

Tablo 2.6. β-galaktozidaz enziminin elde edildiği farklı kaynaklar

Enzim Tipi	Kaynak
Bakteriyel	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus helvenous</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus sporogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Fungal (Küf, Maya)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Mucor pucillus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>Brettanomyces anomolus</i> , <i>Wingea robersii</i>
Bitkisel	Domates, elma, kavun, avokado, kivi meyvesi, kahve, mango, çilek, papaya
Hayvansal	İnce bağırsak, Beyin ve deri dokusu

β -galaktozidaz enziminin tam aktivite gösterebilmesi için; Na^+ ya da K^+ iyonlarının enzimin aktif bölgesine (Asp201) bağlanması gerekmektedir. Bununla birlikte henüz bu tek değerlikli katyonların aktivite üzerindeki rolü ise belirlenememiştir. Benzer şekilde Mg^{+2} veya Mn^{+2} gibi iki değerlikli iyonlarda enzimin aktif bölgelerine (Glu416, His418, Glu461) bağlanarak aktiviteyi güçlendirmektedir. Bu bağlı iyonlar aynı zamanda bir elektrofil olarak da hareket etmekte-oldukları bildirilmektedir (Huber, 2001).

2.3.1. Mikrobiyal β -Galaktozidaz Enzimi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

β -galaktozidaz; bakteri, maya, küf, aktinomisetler ile hayvan ve bitki dokuları gibi değişik biyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Enzimin elde edildiği kaynağa göre özelliklerinde de belirgin farklılıklar gözlenmektedir.

Hayvansal ve bitkisel dokulara kıyasla; mikrobiyal kaynaklardan daha düşük üretim maliyeti ve yüksek verim ile enzim elde edilmektedir. Ayrıca bakteriyel kaynaklar; yüksek enzim aktivitesi, fermentasyon kolaylığı ve stabil enzim eldesi gibi avantajları nedeniyle de enzim üretiminde tercih edilmektedirler. Gıda ve gıda sistemlerinde özellikle *Bifidobacterium*'lardan (probiyotik organizma) sağlanan enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle; *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, *Bifidobacterium longum* CCRC 15708, *Bifidobacterium longum* CCRC15708 şuşlarından elde edilen enzimlerde yüksek aktivite saptanmıştır (Hsu et al., 2007; Özarslan, 2018).

Bakteriyel kaynak olarak önemli potansiyele sahip olan *E.coli* ise en çok çalışılan β -galaktozidaz kaynaklarından biri olmasına rağmen; koliformların sahip olduğu olası toksik faktörler, enzimin ham izolatlarının gıda üretim proseslerinde kullanımına engel olmaktadır (Puri et al., 2010). *Escherichia coli*'den elde edilen β -galaktosidaz enziminin her biri 1023 aminoasitten oluşan, dört özdeş altbirimli bir tetramer olduğu belirtilmiştir (Fowler and Zabin, 1978; Matthews, 2005).

Süt ve süt ürünlerinde yaygın bulunan *Kluyveromyces lactis* mayası da ticari açıdan önemli β -galaktozidaz kaynağıdır. Maya kaynaklı enzimin çalışma pH'sı 6,0-7,0 aralığındadır. Ek olarak; psikrofilik özellikli *Guehomyces pullulans*'tan soğuğa dayanıklı asidik β -galaktosidaz üretimi gerçekleştirilmiş; enzim peynir altı suyu ve süt hidrolizinde kullanılmıştır. Ortamda bulunan iyonlar enzim aktivitesini farklı etkilemektedir. *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragili*'ten elde edilen enzim;

manganaz (Mn^{+2}), magnezyum (Mg^{+2}), sodyum (Na^{+}) iyonlarına ihtiyaç duyarken; kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarından olumsuz etkilenmektedir.

Küf kaynaklı fungal β -galaktozidazlar ise; asidik pH değerlerinde optimum çalışırlar ve asidik pH çalışma aralığına (pH 2,5-5,4) sahiptirler. Bu yönleriyle peyniraltı suyu gibi asidik koşullardaki laktozun parçalanmasında etkili olarak kullanılabilirler. Endüstriyel boyutta; ekstraselüler β -galaktozidaz üreten *Aspergillus oryzae* sıklıkla kullanılmaktadır (Kazemi et al., 2016).

Çeşitli bakteri, maya ve küflerden elde edilen enzimler ve bazı özellikleri aşağıdaki Tablo 2.7’de özetlenmiştir.

Tablo 2.7. Farklı kaynaklardan elde mikrobiyal β -galaktozidaz enziminin bazı özellikleri

Mikroorganizma	Etkinlik	Sıcaklık (°C)	pH	Referans
Bakteriler				
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	Intraselüler	55	5,5	Ji et al. (2019)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ekstraselüler	60		Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides (2007)
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	Intraselüler	65	6,0	Rao and Dutta (1978)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Intraselüler	50	6,0	Chanalia et al. (2018)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bilinmiyor	40	6,0	Füreder et al. (2020)
Mayalar				
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Intraselüler	30-35	6,0	Roy and Gupta (2003)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Bilinmiyor	60	6,2	Matheus and Rivas (2003)
Küfler				
<i>Aspergillus niger</i>	Bilinmiyor	55	3,5-4,5	Haider and Husian (2007)
<i>Rhizomucor</i> sp.	Ekstraselüler	60	4,5	Shaikh et al. (1997)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Intraselüler	30	4,0	Nagy et al. (2001)

Endüstriyel boyutta kullanılan enzimlerin %50’den fazlası maya ve küflerden; üçte biri ise bakterilerden sağlanmaktadır (Panesar et al., 2010). Endüstride β -galaktozidaz uygulamalarında göz önünde bulundurulması gereken en önemli parametre; reaksiyon koşullarıdır. Enzimler reaksiyon ortamının pH değerlerine karşı oldukça hassastırlar; bu sebeple kullanılacağı ortamın pH değerlerinde maksimum aktivite gösteren enzimlerin seçimi doğru bir yaklaşım olacaktır (Scopes, 2002).

β -galaktozidaz süt endüstrisinde; süt, tatlı peynir altı suyu (pH 6,0-7,0) ve peynir altı suyu (pH 5,0 ve daha az) gibi ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dutra Rosolen et al., 2015). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler; pH 4,0 (*Penicillium simplicissimum*) ile pH 8,5 (*Bacillus subtilis*) arasında değişen geniş bir aralıkta aktivite göstermektedir. Fungal kaynaklı enzimlerin asidik pH’larda optimum aktivite göstermesi sebebiyle peynir altı suyu hidrolizinde; maya kaynaklı

enzimlerin ise süt ve tatlı peynir altı suyu hidrolizinde kullanılması önerilmektedir (Zolnere and Ciprova, 2017).

Endüstriyel açıdan bir diğer önemli nokta ise kullanılacak β -galaktozidaz enziminin; yüksek reaksiyon hızı, düşük kontaminasyon riski, uzun yarılama ömrü, daha az ürün inhibisyonu, yüksek çözünürlük ve yüksek verim gibi avantajlara sahip olmasıdır.

2.3.2. Mikrobiyal β -Galaktozidaz Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Gıda endüstrisinde özellikle süt ürünlerinin lezzetini, çözünürlüğünü ve sindirimini iyileştirmede yaygın şekilde kullanılan β -galaktozidaz enziminin (Husain, 2010; Gupte and Nair 2010) artan endüstriyel talebini karşılayabilmek için üretiminin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Braga et al., 2012). Bu konuda yapılan çok sayıda çalışmalardan farklı kültür koşullarının etkisinin incelendiği araştırma sonuçlarından bazıları aşağıda özetlenmiştir.

2.3.2.1. Mikroorganizma Türü ve Besiyeri Bileşimi

Penicillium chrysogenum ile gerçekleştirilen çalışmada; farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi ile hücre büyümesi üzerine etkisinin incelendiği çalışma sonucunda: Glikoz, sukroz, gliserol ve galaktoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında iyi bir büyüme gözlenmişken; laktoz kullanıldığında daha yavaş büyüme görülmüştür. Bununla birlikte karbon kaynağı olarak laktoz kullanımında diğer test edilen karbon kaynaklarına göre; daha yüksek β -galaktozidaz aktivitesi saptanmıştır (Nagy et al., 2001).

Türkiye’de Toros Dağları bölgesinden izole edilen yoğurt bakterilerinden (*Streptococcus thermophilus* 95/2, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 77) β -galaktozidaz üretiminin cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyonu çalışmasında; enzim üretimi için optimum üretim ortamı bileşimi %5 peynir altı suyu, %4 mısır likörü, %2 potasyum fosfat ve %2 pepton olarak belirlenmiş ve 43°C’de 8 saat inkübasyon önerilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında *Streptococcus thermophilus* 95/2 %6,4 daha fazla, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 77 de - %39 daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir (Tari et al., 2009).

Laktik asit bakterilerinden β -galaktozidaz üretiminin optimizasyonu çalışmasında 5 farklı laktik asit bakterisi (*Lb. acidophilus* ATCC 4356, *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, *Lb. reuteri* ATCC 23271, *Lb. helveticus* ATCC 15009, *Lb.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* ATCC 11842) ile farklı fermentasyon koşulları ve ekstraksiyon yöntemlerinin etkisi araştırılmıştır. *Lb. acidophilus* ATCC 4356'nın en yüksek üretim potansiyeline sahip olduğu gözlenmiş ve maksimum spesifik aktivite (1,01 IU/mL); 150 rpm çalkalama hızında %2,5 laktoz ile modifiye edilmiş MRS Broth'ta, 37°C'de 2 gün sonunda saptanmıştır. Intraselüler enzim salınımı için en etkili yöntemin kuartz kumu ile vorteksleme olduğu belirtilmiştir. Enzimin optimum çalışma koşulları ise 6,5-7,5 pH ve 45°C olarak raporlanmıştır (Carevic et al., 2015).

Halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 izolatu kullanarak çeşitli tarımsal-endüstriyel atıkların azot ve karbon kaynağı olarak kullanımının β -galaktozidaz üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışma sonucunda; buğday kepeği, deproteinize asit peynir altı suyu, mısır şurubu likörü gibi atıklar ile MgSO₄ ün ortamda kullanılabilmesi önerilmiştir. En yüksek enzim üretiminin (15,936 U/g kuru substrat) 2 mL mısır şurubu likörü, 50 mg MgSO₄, 5 g buğday kepeği ile 20 mL deproteinize asit peynir altı suyu içeren ortamda sağlandığı raporlanmıştır (Raol et al., 2015).

Aspergillus niger ATCC 9142'den β -galaktozidaz eldesinde besiyeri ortamında fıstık kabuğu, buğday ve pirinç samanı gibi daha ucuz katı atıkların kullanımını incelenmiştir. Çalışma sonucunda pirinç samanının uygun substrat olabileceği belirtilmiştir (Kazemi et al., 2016).

2.3.2.2. Fermentasyon Şartlarının Kontrolü

Kluyveromyces lactis NRRL Y-8279 mayasından β -galaktozidaz üretiminin optimizasyonu çalışmasında kullanılan farklı hücre parçalama yöntemleri arasında en yüksek aktivite, hücreler izoamil alkol ile geçirgen hale getirildiğinde saptanmıştır. Cevap yüzey yöntemi aracılığıyla; karıştırma hızı, pH, başlangıç substrat konsantrasyonu ile inkübasyon süresi optimize edilmiş ve maksimum spesifik enzim aktivitesi (4218,4 U/g): 7,3 pH, 179,2 rpm karıştırma hızı, 24,9 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu ve 50,9 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir (Dağbağlı ve Göksungur, 2008).

Kluyveromyces marxianus CCT 7082 mayası kullanılarak yürütülen çalışmada karıştırma hızı 200-500 rpm, havalandırma oranı 0,5-1,5 vvm (hacim besiyeri için dakikadaki hava hacmi) arasında değiştirilmiştir. Çalışma sonunda enzim üretiminin havalandırmadan daha az, karıştırma hızından ise daha çok etkilendiği ve en uygun koşullarda (500 rpm, 1,5 vvm) üretim sonucunda elde edilen maksimum aktivitenin 1,2 U/ml olarak hesaplandığı bildirilmiştir (Alves et al., 2009).

Süt işleme tesisi yakınındaki toprak örneğinden izole edilen *Bacillus* sp. MPTK 121'den ekstraselüler β -galaktozidaz üretiminde inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ile ortam pH'sının etkileri incelenerek optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakterinin pH 7,0 ortamında ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldığında enzim üretiminin maksimum olduğu gözlenmiş ve MgCl₂ iyonlarının enzim üretimini desteklediği saptanmıştır (Kumar et al., 2012b).

Aspergillus alliaceus ile enzim üretimi için optimum koşulların; 4,5 pH, 30°C ve 144 saat inkübasyon süresi olduğunu belirtmiştir. Elde edilen termostabil β -galaktozidaz'ın optimum çalışma koşulları da 45°C ve pH 7,2 olarak raporlanmıştır (Sen et al., 2012).

Kluyveromyces marxianus'tan β -galaktozidaz eldesinde başlangıç şeker konsantrasyonu, çalkalama hızı, başlangıç pH'sı, inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi parametrelerin optimizasyonu cevap yüzey yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağı olarak laktoz seçilmiş ve en yüksek enzim aktivitesi için; başlangıç şeker konsantrasyonu %10, karıştırma hızı 250 rpm, pH 3,0, 20°C inkübasyon sıcaklığı ve 64 saat inkübasyon süresi uygulanması gerektiği raporlanmıştır (Al-Jazari et al., 2015).

Bacillus licheniformis ATCC 127592'dan β -galaktozidaz üretimi için optimum kültür şartları belirlenmiştir. Enzimin üretiminde pirinç kepeğiyle zenginleştirilmiş ortamda katı faz fermentasyon metodu uygulanmış ve inkübasyon zamanı, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH'sı ile nem içeriği olarak belirlenen parametreler ayrı ayrı incelenmiştir. Çalışma sonucunda; maksimum miktarda β -galaktozidaz üretiminin; 48 saatte, 37°C'de, başlangıç pH'sı 7,5'te ve %20 nem içeriğinde elde edildiği raporlanmıştır (Akcan, 2018).

Aspergillus niger'in soya fasülyesi atıkları kullanarak hazırlanan ortamda β -galaktozidaz enzim üretimi faktöriyel dizayn ile optimize edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi (24,64 U/ml) %2 soya fasülyesi atığı, 7,0 pH, 120 rpm karıştırma hızı, 28°C inkübasyon sıcaklığında 7 gün sonunda elde edilmiştir. Optimizasyon çalışmasının ANOVA değerinin de sıcaklık ve pH ile ilgili yanıt verilerini anlamlı bulduğu eklenmiştir (Martarello et al., 2019).

Lactobacillus leichmannii 313 bakterisi ile inkübasyon sıcaklıkları 30-55°C, başlangıç pH'sı 5,5-7,5 ve karbon kaynakları glukoz, laktoz, galaktoz, fruktoz ve

sukroz kullanılarak maksimum β -galaktozidaz aktivitesi üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimize edilmemiş ortamda maksimum ham β -galaktozidaz aktivitesi inkübasyondan 12 saat sonra 4,5 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Optimize edilmiş ortam pH değerinin 7.0 pH, ortam sıcaklığının 37-45°C ve laktoz konsantrasyonunun 15,29 g/L olduğu; ortamdan elde edilen enzimin 23,13 U/mg protein enzim aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Deng et al., 2020).

2.3.3. Beta Galaktozidaz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı

β -galaktozidaz; beslenme, gıda prosesleri ve çeşitli çevresel uygulamalarda geniş kullanım alanına sahip, endüstriyel açıdan önemli enzimlerdendir. Özellikle; laktozu tolere edemeyen kişilerin sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Ray, 1996). Gıda endüstrisinde özellikle süt ürünlerinin lezzetini, çözünürlüğünü ve sindirimini iyileştirmede β -galaktozidaz yaygın şekilde kullanılmaktadır. Laktoz intolerant bireyler için laktozsuz ürün üretiminde ve konsantre ürün proseslerinde kristallenme sorunuyla başa çıkmada kullanılan yaygın kullanılan teknolojiler arasında yer almaktadır (Husain, 2010; Gupte and Nair 2010).

Bağırsakta aşırı laktoz varlığı; doku dehidrasyonu ve düşük asitlik nedeniyle kalsiyum emilimini azaltarak; ishal, şişkinlik ve kramplara neden olmaktadır (Felicilda-Reynaldo and Kenneally 2016). Laktozun emiliminde; ince bağırsakta bulunan ve laktoz hidrolizini sağlayan laktaz enzim aktivitesi gerekmektedir. Enzimin bağırsaktaki eksikliği laktoz intoleransına yol açarak; hastaların süt ve süt ürünleri tüketimini engellemektedir (İaniro et al., 2017). β -galaktozidaz; memelilerde emzirme döneminde doğal olarak bulunurken; bu dönemden sonra enzim aktivitesi giderek azalmakta ve hipolaktazi ile laktoz intoleransı sorunları baş göstermektedir. Dünya'daki yetişkin nüfusunun %70'inde bu bozukluk gözlenmekteyken; Batı ülkelerinde bu oran %4 ile %50 arasında değişmektedir. Madry ve arkadaşları; bağırsaklardaki bu bozukluğun Avrupa'nın doğusu ile güneyine gittikçe arttığını, Türkiye ile Güney İtalya'daki yetişkinlerde ise %70 civarında görüldüğünü belirtmiştir (Mardy et al., 2010).

Yaygın karşılaşılan laktoz intoleransı sorunları nedeniyle laktoz intolerant bireylerin kullanımına sunmak için laktozu hidrolize süt, laktoz içeriği azaltılmış süt ve süt ürünleri ile sıvı, toz ve tablet formunda laktaz üretiminde yeni teknolojiler geliştirilmektedir (Akın vd., 2012).

Skryplonek et al. (2019) tarafından yürütülen çalışmada; laktozsuz dondurulmuş yoğurt üretimi gerçekleştirilmiş ve değişen oranlarda ilave edilen mısır nişastası ile κ -karragenanın ürün karakteristik özellikleri ile duyu özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Fermentasyon basamağında gerçekleşen enzimatik hidroliz yoluyla laktoz içeriğinin düşürülmüş ve HPLC ile yapılan ölçüm sonunda 80 saat sonunda %0,05 olduğu raporlanmıştır. Stabilizatör olarak κ -karragenanın kullanılan ürünler beslenme ve ürün karakteristikleri yönünden daha başarılı bulunmuştur.

El-Yazeed Abd El-Salam et al. (2020) tarafından yürütülen çalışmada; *Aspergillus terreus* NRRL 280'den β -galaktozidaz enzimi izole edilmiş (7,0 U/L) ve enzim aromalı çığ süte eklenerek laktozun hidrolizi sağlanmıştır. 6 günlük depolama periyodu sonunda laktoz hidrolizinin 23,9 g/L ile %94,16 arasında gerçekleştiği raporlanmıştır Chanalia et al. (2018) tarafından yürütülen çalışmada da probiyotik *Pediococcus acidilactici*'den elde edilen β -galaktozidaz enzimi süte ilave edilmiş ve 65 dakikalık reaksiyon süresi sonunda laktoz hidroliz oranının %98 olduğu raporlanmıştır.

Laktozun higroskopik yapısı nedeniyle yüksek oranda bulunduğu süt tatlıları gibi gıda ürünlerinde yol açtığı kristalizasyon problemlerinin çözümünde de β -galaktozidaz enziminden yararlanılmaktadır (Champluvier et al., 1988). 2010 yılında süt tatlısında gözlenen kristalizasyona karşı β -galaktozidaz kullanımının etkisinin incelendiği çalışma sonunda; 0,2 g/L enzim kullanımının laktoz hidrolizini %23,16 oranında sağladığı ve kumsuluk sorunun çözümünde yeterli olduğu belirtilmiştir (Klein et al., 2010).

Ek olarak; ciddi su kirliliğine neden olan peynir endüstrisi atıklarından olan peyniraltı suyunun uzaklaştırılmasında β -galaktozidaz enzimi kullanılmaktadır. Bu yolla şekerleme, fırıncılık ve çeşitli endüstrilerde kullanım alanına sahip olan etanol ve tatlı şurup gibi ürünler de elde edilebilmektedir (Zhou and Chen, 2001). Wierzbicki and Kosikowski (1972) yürüttükleri çalışmada; peynir altı suyunu *Aspergillus niger*'den elde edilen β -galaktozidaz enzimi ile farklı pH değerlerinde bekleterek proteinlerin çökmesini sağlamış ve bu yolla altın renkli tatlı şuruplar elde etmişlerdir.

β -galaktozidaz peynir üretiminde de üretim hızı ve lezzet kalitesini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Altaş, 2007; Casteren, 2000). Olgunlaşma sırasında ortaya çıkabilen acılık ve istenmeyen aromanın oluşumu gibi sorunları engellemek için de çoğu zaman β -galaktozidaz kaynağı olan *Lactobacillus bulgaricus* ilave kültür olarak kullanılarak acılık azaltılmakta ve aroma zenginleştirilmektedir (Champe and Harvey, 1997).

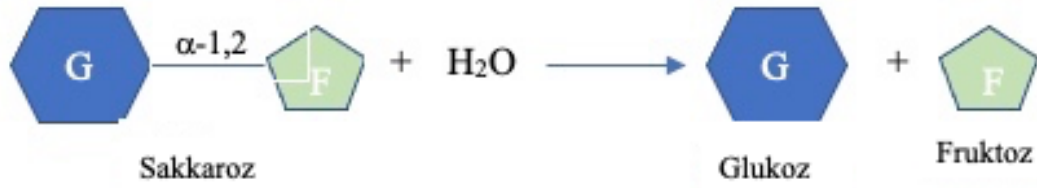
Prebiyotik gıda ürünlerinde önemli bir bileşen olarak kullanılan galakto-oligosakkaritlerin (GOS) üretimi de β -galaktozidazın transglikalizasyon aktivitesi sayesinde gerçekleştirilmektedir (Gosling et al., 2010). 3-6 adet sakkarit ile 2-5 galaktoz ünitesinin β (1-4; 1-6) bağlarıyla bağlanması sonucunda oluşan GOS molekülleri, laktoz miktarını azaltmanın yanı sıra gıda ürünlerinin tatlılığını da artırmaktadır (Sako et al., 1999; Gosling et al., 2010). Liu et al. (2011) tarafından yürütülen çalışmada; *Lactobacillus fermentum* K-4'teki *lacL* ve *lacM* genleri *E.coli*'ye klonlanarak; enzimin rekombinant yolla üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzimin; toplam şekerin %37'sinden GOS oluşturduğu raporlanmış ve bu bakteriden elde edilen enzimin GOS oluşumu için kullanılması önerilmiştir.

Geiger ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada; *Streptococcus thermophilus*'dan *Lactobacillus plantarum* WCFS1'e gen aktarımı yaparak β -galaktozidaz üretimi gerçekleştirmiştir. Elde ettikleri enzimi; başlangıç laktoz içeriği 205 g/L olan peynir altı suyu permeatı ile muamele etmişlerdir. Çalışma sonunda elde edilen maksimum galakto-oligosakkarit veriminin %90 laktoz dönüşümünde toplam şekerin yaklaşık %50'sine ulaştığı belirtilerek peyniraltı suyu laktozunun verimli şekilde değerlendirildiği yorumunda bulunulmuştur (Geiger et al., 2016).

2.4. Levansukraz Enzimi

Levansukraz (EC. 2.4.1.10); sakkaroz molekülünü parçalayıp açığa çıkan fruktoz gruplarının başka bir sakkaroz eklenmesini katalizleyen ve bu yolla fruktan polimer oluşumunu sağlayan enzimdir (Li et al., 2015). GH68 glikozit hidrolaz enzim sınıfında bulunan levansukraz hem transfruktasilasyon hem de hidroliz aktivitesi göstermektedir.

Hidroliz aktivitesi ile sakarozdaki $\alpha(2\rightarrow1)$ bağları parçalanarak serbest fruktozlar açığa çıkmaktadır. Oluşan serbest fruktozlar levan oligomerlerini oluşturmaktadır (Santos-Moriano et al., 2015). Tepkime Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Levansukraz enzimi hidroliz mekanizması

Transfruktasilasyon aktivitesi ile sakkarozdaki β (2 \rightarrow 1) bağları parçalanarak serbest glukoz, sakkaroz gibi alıcı moleküllere fruktosil gruplarının transferi gerçekleştirilmekte ve fruktooligosakkarit (FOS) ile levan oluşumu katalizlenmektedir (Belghith et al., 2012). Tepkime Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Levansukraz enzimi transfruktasilasyon aktivitesi

Fruktoz ünitelerinin β (2 \rightarrow 6) glikozit bağları ile bağlanmasıyla oluşan levan hücre dışı bir β -fruktandır (Arvidson et al., 2006). Yapısındaki bu β (2 \rightarrow 6) bağları sayesinde hem yağda hem suda çözünebilir özelliğine sahiptir. Hem hidrofilik hem hidrofobik karaktere sahip olması; sulu çözeltilerde nano boyutta parçacıklar halinde bulunmasına katkı sağlamaktadır (Rehm, 2009). Zincirin başında sakarozdan gelen D-glukoz dallanma noktalarında ise β (2 \rightarrow 1) bağları bulunmaktadır (Benigar et al., 2014).

2.4.1. Mikrobiyal Levansukraz Enzimi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Levansukraz farklı mikroorganizmalar tarafından üretilmekte olup; enzimin mikrobiyal kökenine bağlı olarak oluşacak son ürün de farklılık göstermektedir (Sözgen, 2019). Literatürde genellikle Gram negatif bakterilerden sağlanan enzimin oligosakkarit ürettiği; Gram pozitif bakterilerden (*Streptococcus salivarius*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*) izole edilen levansukrazın uzun zincirli levan sentezlediği (Chamvert et al., 1974; Homann et al., 2007) belirtilmiştir.

Levansukraz enzimi hidroliz ve transfruktosilasyon aktivitelerini farklı sıcaklıklarda göstermektedir, sıklıkla daha düşük sıcaklıklarda transfruktosilasyon reaksiyonunu gerçekleştirmektedir. Tian et al. (2011) tarafından yürütülen çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens*'tan izole edilen enzimin; optimum transfruktosilasyon aktivitesi 40°C optimum hidroliz aktivitesi ise 50°C olarak raporlanmıştır.

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen levansukraz enzimlerinin sahip oldukları bazı özellikler Tablo 2.8'de belirtilmiştir.

Tablo 2.8. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen levansukraz enzimi ve bazı özellikleri

Mikroorganizma	Intraselüler/ Ekstraselüler	Sıcaklık (°C)	pH	Referans
<i>Acetobacter nitrogenifigens</i>	Ekstraselüler	30	6,00	Mukherjee et al. (2019)
<i>Acetobacter. diazotrophicus</i>	Ekstraselüler	42	5,00	Hernandez et al., (1995).
<i>Actinomyces viscosus</i>	Ekstraselüler	37	6,00	Pabst, (1977)
<i>Aspergillus awamori</i> EM66	Ekstraselüler	40	5,20	Mostafa et al., (2018)
<i>Bacillus circulans</i>	Ekstraselüler	40	5-70	Oseguera et al. (1996).
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ekstraselüler	50	6,00	Nakapong et al. (2013)
<i>Bacillus</i> sp.	Ekstraselüler	50	6,50	Belghith et al (2012).
<i>Bacillus subtilis</i> NRC16	Ekstraselüler	45	8,20	Salama et al. (2019)
<i>Clostridium arbusti</i> SL206	Rekombinant	55	6,50	Li et al. (2016)
<i>Erwinia herbicola</i> NRRL-B 1678	Ekstraselüler	-	-	Cote (1988)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Intraselüler	57	6,75	Inthanavong et al. (2013)
<i>Microbacterium laevaniformans</i> ATCC 15953	Intraselüler	30	6,00	Park et al. (2003).
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Ekstraselüler	30	6,00	Youssef et al. (2014).
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola	Ekstraselüler	18	6,20	Hettwer et al. (1995).
<i>Rahnella aquatilis</i>	Intraselüler	50-60	6,00	Ohtsuka et al. (1992).
<i>Zyomonas mobilis</i>	Ekstraselüler	-	-	Bekers et al. (2002).

2.4.2. Mikrobiyal Levansukraz Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Her mikroorganizma grubunun ihtiyaç duyduğu farklı gereksinimler ve büyüme döngüsü, onlar tarafından üretilen enzimler ile üretilme kinetiklerinde farklılığa neden olmaktadır. Bu sebeple seçilen mikroorganizma grubuna göre proses şartları göz önünde bulundurulmalıdır (Patel et al., 2017). Mikrobiyal enzim üretiminde çevresel etkenlerden sıcaklık, basınç, pH, oksijen gibi fiziksel değişkenler kültür gelişimi üzerinde birinci derece önemlidirler ve her kültür için spesifik bir çevresel optimum değer bulunmaktadır (Beckhorn et al., 1965).

Mikrobiyal enzim üretiminin biyolojik sistemlerde gerçekleşen bir fermentasyon tekniği olması nedeni ile üretilen enzimin stabilitesi üzerinde iç

faktörlere ek olarak üretildiği ortam formülasyonu da etkili olmaktadır. Yanlış katkıların kullanımı veya formülasyondaki eksiklikler, elde edilecek enzimin stabilitesini etkilemektedir. İdeal bir fermentasyon ortamında üretilen enzimin raf ömrü haftalarca hatta aylarca uzarken; enzim soğuk zincirdeki dalgalanmalardan, nakliyedeki aksaklıklardan da daha az etkilenmektedir (Hellmuth and Brink, 2013).

2.4.2.1. Mikroorganizma Türü ve Besiyeri Bileşimi

Mikroorganizmalar aracılığıyla levansukraz üretiminde önemli parametrelerden biri kültür ortamı için uygun karbon kaynağı seçimidir. Üretici mikroorganizmaya bağlı olarak seçilen karbon kaynağı ve etki mekanizması da farklılık göstermektedir (Erdal et al., 2016). *Erwinia hercicola*'dan levansukraz üretiminin incelendiği bir çalışmada kültür ortamında kullanılan glukoz, sorbitol, sakaroz, fruktoz gibi farklı karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda; karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında maksimum enzim üretimi gözlenmişken; fruktozun hücre gelişimini yavaşlatarak enzim üretimini düşürdüğü belirtilmiştir (Cote, 1988).

Abdel-Fattah et al. (2010) tarafından *Bacillus subtilis* ile gerçekleştirilen çalışmada levansukrazın hem glikoz hem sakkaroz ile üretilebileceği gösterilmiştir. Tian et al. (2011) çalışmalarında *Bacillus amyloliquefaciens* 'dan levansukraz üretiminde besiyerinde sukroz kullanımının indükleyici etki yaptığını gözlemiştir. Benzer şekilde; Belghith et al. (2012) tarafından *Bacillus*'tan levansukraz eldesinde fermentasyon ortamında glukoz, fruktoz, laktoz, maltoz ve sukroz gibi farklı karbon kaynaklarından sukrozun enzim üretiminde indükleyici etki yaptığı belirtilmiştir. Inthanavong et al. (2013) tarafından da termofilik *Geobacillus stearothermophilus* 'tan levansukraz üretiminde besiyerinde sukroz kullanımının fruktoz, glukoz, gliserol ve rafinoz kullanımına kıyasla daha verimli olduğu belirtilmiştir.

Levansukraz üretiminde kültür ortamında kullanılacak nitrojen kaynağı da göz önünde bulundurulması gereken bir diğer faktördür. *B. amyloliquefaciens* (Tian et al., 2011), *B. subtilis* NRC33a (Abdel-Fattah et al., 2005) ve *Bacillus* sp. (Belghith et al., 2012) levansukraz üretmek için maya ekstraktı kullanmayı tercih ederken; Inthanavong ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışma sonucunda *Geobacillus stearothermophilus*'dan maya ekstraktı yerine pepton veya tripton içeren ortamda daha yüksek seviyede levansukraz üretildiği belirtilmiştir (Inthanavong et al., 2013).

2.4.2.2. Fermentasyon Koşulları

Fermentasyon sıcaklığı, metal iyonları gibi faktörler de levansukraz üretimi üzerinde oldukça etkili faktörlerdendir. *Bacillus subtilis* NRC33a için optimum levansukraz üretim sıcaklığı 30°C ve uygun metal Mg^{+2} olarak raporlanmıştır (Abdel-Fattah et al., 2005); Ancak Belgith et al. (2012) tarafından *Bacillus* sp. ile yürütülen çalışmada optimum sıcaklığın 50°C ve uygun metal iyonunun Fe^{+2} olduğu belirtilmiştir.

Bacillus subtilis Natto CCT 7712 ile yürütülen bir çalışmada NaCl, KCl, $ZnCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, Na_2SO_4 , $FeSO_4$, $CuSO_4$ (0,2-0,8 M) gibi farklı tuzların levansukraz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda 0,4-0,8 M konsantrasyonunda Na^+ , K^+ ve Zn^+ gibi tek değerlikli katyonların enzim aktivitesini artırdığı raporlanmıştır. Enzim üretim için optimum sıcaklık ise 50°C olarak belirtilmiştir (Celligoi, 2013).

Youssef et al. (2014) *Pediococcus acidilactici*'den levansukraz üretimini inceledikleri araştırma da optimum üretim şartlarını 30°C ve 6,0 pH olarak; Wu et al (2013) de *Bacillus subtilis natto*'dan levansukraz enzim üretiminde uygun fermentasyon şartlarını 7,0 pH, 37 °C ve 175 rpm çalkalama hızı olarak bildirmiştir (Wu et al., 2013).

Erdal et al., (2017) tarafından *Zyomonas mobilis* NRRL B-14023'ten levansukraz üretiminde pH, başlangıç şeker konsantrasyonu ve fermentasyon sıcaklığı gibi parametrelerin cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimize edildiği çalışma sonunda maksimum levansukraz aktivitesi (13,3 μ mol glukoz/dk) 4,9 pH, 159,01 g/L başlangıç sukroz konsantrasyonu ve 30,3°C sıcaklık olarak bildirilmiştir.

2.4.3. Levansukraz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Levansukraz, fruktozil alıcı moleküle bağlı olarak; polimerizasyon, transfruktosilasyon ve hidroliz dahil olmak üzere 3 farklı reaksiyon gerçekleştirmektedir. Özellikle levan ve levan tipi fruktooligosakkarit sentezinde anahtar biyokatalizör olduğundan enzime duyulan ilgi giderek artmaktadır. Bu moleküllerin sahip olduğu fizyolojik etkiler gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanım potansiyelini artırmaktadır (Li et al., 2015). Son yıllarda düşük kalori içeriğine sahip ve sağlığa faydalı gıdalara yönelimin artış göstermesiyle fruktooligosakkaritlere (FOS) duyulan ilgi de artmıştır. Sakarozdan 3 kat daha az tatlılık değerine sahip

fruktooligosakkaritler; reçeller, şekerlemeler ve çikolatalarda düşük kalorili fonksiyonel tatlandırıcı olarak sakaroz yerine kullanılmakta ve diyabet hastaları için de bu gıdaların tüketimi güvenli hale gelmektedir (Yıldız, 2011). Renuka et al. (2013) tarafından *Aspergillus oryzae* MTCC5154 levansukrazı kullanarak üretilen FOS'ların ilave edildiği portakal, mango ve ananas gibi meyve sularının 6 ay depolama boyunca fizikokimyasal yapısında değişiklik olmadığı, mikrobiyal ya da enzimatik bir bozulma gerçekleşmediği gözlenmiştir.

Levan ise hem suda hem yağda çözünebilmesi, yüksek molekül ağırlığına sahip olması ve oda sıcaklığında su içinde şişmemesi gibi özellikleriyle gıda endüstrisinde; jelleştirici ajan, emülgatör, stabilizatör ve kıvam artırıcı olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Arvidson et al., 2006). Levan sahip olduğu yüksek moleküler ağırlığı sayesinde dildeki tat reseptörleri tarafından algılanamayacak büyüklükte olup uçuculuk özelliğinin algılama seviyesinden çok düşük olması onun yağ ikamesi olarak kullanımını sağlamaktadır (Xiao et al., 2014). Jakob et al (2012), ekmeğin üzerinde yürüttükleri çalışmalarında levanın mikrojel oluşturmasıyla raf ömrünün uzadığını gözlemlemiş ve buğday unuyla hazırlanmış ekmeklere en az %1 levan ilavesinin kontrole kıyasla %18-26 daha yumuşak ekmeğin elde edilmesini sağladığını belirtmiştir.

Levansukrazın sahip olduğu; monosakkarit, disakkarit, aromatik ve alkil alkoller gibi geniş substrat spesifikliğı de bu enzime duyulan ilginin artmasına neden olmuştur. Enzim laktosukroz, erloz, raffinoz ve metil fruktosit, hidrokinon fruktozid gibi fonksiyonel fruktosit bileşiklerini eldesinde de kullanılabilir (Li et al., 2015). Çeşitli prebiyotik özellikleri ile düşük kalori içeriğine sahip laktosukraz; Japonya'da FOSHU (Food for Specified Health Uses, Belli Sağlık Faydası Bulunan Gıda) tanımlamasına dahil edilmiştir ve çeşitli gıdalar ile içeceklerde endüstriyel boyutta yaygın olarak kullanılmaktadır (Fujita et al., 1991; Fujita et al., 1995).

2.5. Aktinobakteriler

Aktinobakteriler, su ve karasal ekosistemlerde yaygın bulunan Gram pozitif ve yüksek G+C içeriğine sahip bakteri filumundandır (Barka et al., 2015). İsim kökeni Yunanca aktis veya aktin (ray, hif) ve mukos (mantar) sözcüklerinin türetilmesinden meydana gelen Aktinobakteriler, hif yapılarının uzama ve dallanma kombinasyonu ile gelişim göstermektedir. Geleneksel yaklaşımda ise aktinomisetler; bakteriler ve

mantarlar arasındaki geçiş formu olarak kabul edilmektedir. Çoğu aktinobakteri; filament oluşturan mantarlar gibi misel yapı oluşturmakta ve sporülasyonla çoğalmaktadır. Ancak aktinobakterilerin bu şekilde mantarlarla kıyaslanması yüzeysel bir yaklaşımdır. Çünkü diğer tüm bakteriler gibi Aktinomisetlerde prokaryotik bir nükleotid ve peptidoglikan hücre duvarı taşımaktadırlar. Ayrıca antibakteriyel maddelere duyarlılıkları da yüksektir. Fizyolojik ve ekolojik olarak çoğu Aktinobakteri aerobik özellik göstermekteyken; istisnalar da mevcuttur. Hetetorofik veya kemoototrofik özellikte gösterebilmektedirler. Çoğu aaktinomiset kemoototrofik olup kompleks polisakkaritler de dahil olmak üzere çeşitli besin kaynaklarını kullanabilmektedir (Lechevalier and Lechevalier, 1965; Zimmerman, 1980).

Morfolojik olarak da çeşitlilik gösteren aktinobakteriler; kok (*Micrococcus*), çubuk (*Mycobacterium*) ya da dallanmış misel yapıya sahip (*Streptomyces*) çoğu spor oluşturabilmektedir. Aktinobakteriler hem sucul hem karasal habitatlarda yaygın bulunmaktadır. Aktinobakteriler Orta Çağ duvar resimleri, çöl toprakları, tereyağı, deniz süngerleri ve radon içeren kaplıcalar gibi çok farklı ortamlardan izole edilebilmektedir. Aktinobakterilerin ekstrem alanlarda yaşama kabiliyeti ölü bitki, hayvan ve mantar gibi materyallerin parçalanmasından sorumlu olan ekstraselüler hidrolitik enzimleri üretme yeteneğinden ileri gelmektedir. Bu açıdan bakteriler, karbon dönüşümünde de büyük rol oynamaktadır. *Rhodococcus* gibi bazı türler daha karmaşık yapıya sahip nitro-, di-nitrofenol, piridin ve nitroaromatik bileşiklerini indirgeme yeteneğine de sahiptirler (Ul-Hassan and Wellington, 2009).

Genellikle toprakta 10^6 – 10^9 /g aralığında bulunan Aktinobakterilerin yaklaşık %95 i *Streptomyces* ailesine aittir (Williams and Vickers 1988).

Sıcaklık, pH, nem miktarı gibi çeşitli parametreler aktinobakterilerin gelişimi üzerinde etkilidir. Çoğu bakteri 25-30°C sıcaklıklarda optimum gelişim gösteren mezofilik karaktere sahiptir. Bazı termofilik Aktinobakteriler 50-60°C arası sıcaklıklarda da iyi bir gelişim göstermektedir (Edward, 1993). Toprakta vejetatif yolla gelişen bakteriler düşük nem değerlerini tercih etmektedir. Çoğu toprak bakterisi, en iyi gelişimi pH 6,0-9,0 arasında göstermektedir. Ancak bazı *Streptomyces* türlerinin asidik topraklardan (pH 3,5) izole edildiği literatürde belirtilmiştir (Kim et al., 2003).

Aktinobakteriler; çeşitli antibakteriyel ve antifungal etkiye sahip ikincil metabolitleri oluşturma yeteneğine sahiptir (Ul-Hassan and Wellington, 2009).

Berdy (2005) tarafından mikroorganizmalardan tanımlaması yapılan 23.000'in üzerindeki sekonder metabolitten %42'sinin Aktinobakterilerce üretildiği (Berdy, 2005); bu grup üyelerinden *Streptomyces* cinsinin bilinen 12.400 biyoaktif bileşik (11.000 antibiyotik) üretme yeteneği ile büyük biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu; diğer Aktinobakterilerin ise 3600 biyoaktif bileşik ürettiği (Berdy 2012) bildirilmektedir. Aktinobakterilerin ürettiği metabolitler içerisinde büyük endüstriyel öneme sahip lipaz, proteaz, amilaz, pektinaz, selüloz gibi enzimler de bulunmaktadır (Prakash et al., 2013). Mikrobiyal kökenli doğal ürün sayıları Tablo 2.9'da sunulmuştur.

Tablo 2.9. Mikrobiyal kökenli doğal ürün sayıları

Üretici Organizmalar	Antibiyotikler	Tüm Biyoaktifler	Toplam Bilinen
Actinobacteria	14500	16000	20000-21000
<i>Streptomyces</i> sp.	11000	12400	17000
Diğer aktinobakteriler	3400	4700	4400
Eubacteria	3500	4700	11000-12000
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	1400
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	950
<i>Mycobacteriales</i>	450	750	1200
<i>Cyronobacteria</i>	400	1800	4500
Diğer bakteriler	800	2000	5000
Fungi	10500	18000	40000-45000
Mikroskopik funguslar	9000	14000	32000
<i>Aspergillus</i>	-	4100	9000
<i>Penicillium</i>	-	340	3000
<i>Basidiomycetes</i>	2900		
Diğer funguslar	110		
Toplam Mikrobiyal	28500	38000	75000-80000

Aktinobakteriler toprakta yoğun olarak bulunduğu için sıklıkla toprak örneklerinde çalışılmıştır (Fenical, 1993). Son yapılan çalışmalarda yeni aktinobakteri veya bunlardan elde edilen bileşiklerin oranı düşmüştür. Var olan çalışmalar genelde bilinen türlerin veya farklı türlerden aynı aktif bileşiğin elde edilmesi şeklinde ilerlemiş ve sonuçlanmıştır (Igarashi, 2004). Araştırmacılar mevcut durumdaki bu sorunun daha önce hiç çalışılmamış ekstrem şartlara sahip alanlardan toplanan örneklerin analiz edilerek çözülebileceğini düşünmektedir (Bull, 2011). Ekstrem koşullara adaptasyon sağlayabilmiş mikroorganizmaların farklı biyoaktif bileşikleri üretebildiği belirlenmiştir (Thumar et al., 2010; Mohammadipanah and

Wink 2016). Çünkü mikroorganizmalar karşılaştıkları ekstrem şartların üstesinden gelebilmek için mevcut durumda kullanmadıkları genetik bilgilerini kullanmaya ve adaptasyonu gerçekleştirmeye yardımcı olacak çeşitli sekonder metabolitleri üretme eğilimindedir (Mitra et al., 2008; Ningthoujam et al., 2009).

2.5.1. Aktinobakterilerden Transglutaminaz Enzim Sentezi

Yüksek verimli transglutaminaz üretim yeteneğine sahip suşların izolasyonu; enzim üretiminin optimizasyonunda oldukça önemlidir. Şimdiye kadar; mikrobiyal orijinli transglutaminaz üretimi için en az 6 farklı suş incelenmiştir. Bu suşlar; *Streptoverticillium mobaraense*, *Streptoverticillium cinnamoneum*, *Actinomadura sp.*, *Streptoverticillium ladakanum*, *Bacillus circulans*, *Streptomyces sp.* ve *Streptomyces hygroscopicus* olarak sıralanabilir. Bunlar arasında; *Streptomyces spp.*'ler tarafından sağlanan üretim diğer türlere kıyasla daha yüksek verim sağlamaktadır (Guan et al., 2009).

Ho ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada *Streptoverticillum ladakanum*'dan mikrobiyal Tg elde edilmiştir. Elde edilen enzim için optimum çalışma koşulları; 40°C ve 5,5 pH olarak raporlanmıştır. Ayrıca enzimin 5,0-7,0 pH aralığında stabil olduğu ve 45°C 10 dakika bekletildikten sonra inaktif hale geldiği gözlenmiştir. Saflaştırılmış enzimin aktivitesinin K⁺, Na⁺, Ca⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² iyon varlığında arttığı Fe⁺³ ağır metali ile etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) tuzları varlığından etkilenmediği belirtilmiştir (Ho et al., 2000).

Topraktan izole edilen *Actinomadura sp.* T-2'den elde edilen transglutaminaz enziminin optimum çalışma koşulları 8,0 pH ve 45°C olarak raporlanmıştır. Ek olarak enzimin aktivite göstermesi için Ca⁺²'ye ihtiyaç duymadığı ve 5,0-9,0 pH aralığında 30-45°C değerlerinde stabil olduğu belirtilmiştir (Kim et al., 2000).

Lin ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada ise; transglutaminaz kodlayan gen *Streptomyces platensis*'ten *Streptomyces lividans*'a klonlanarak ekspresyonu sağlanmıştır. Enzimin bu yolla endüstriyel ölçekte daha verimli üretim potansiyeline sahip olduğu yorumu yapılmıştır (Lin et al., 2006).

Kore ormanlarından izole edilen *Streptomyces platensis* YK-2 bakterisinden elde edilen enzimin 5,0-9,0 pH aralığında aktivitesini koruduğu ve 30-45°C aralığında stabil olduğu belirtilmiştir. Ek olarak enzimin optimum çalışma şartlarınının 8,0 pH ve 45°C olduğu raporlanmıştır (Yeo et al., 2009).

Streptomyces mobarensis'ten elde edilen enzimin 5,0-10,0 pH aralığında aktivite gösterdiği; maksimumu aktiviteyi 6,0 pH ve 48°C sıcaklıkta gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca elde edilen enzimin yüksek tuz içeriğine sahip ortamlarda da stabil olduğu raporlanmıştır (Jin et al., 2016).

Başka bir çalışmada ise; *Streptomyces mobaraensis*'deki ilgili gen bölgesi GAP promotörü kontrolü altında *Pichia pastoris*'e klonlanarak ekspresyonu sağlanmıştır. Çalışma sonunda; *P. pastoris* ekspresyon sisteminin rekombinant mikrobiyal Tg enzim üretimi için uygun bir sistem oluşturacağı yorumu yapılmış ve elde edilen enzimin aktivitesi 37640 U/mL olarak raporlanmıştır (Özçelik et al., 2019).

Zhang et al. (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada da mikrobiyal transglutaminaz enzimini kodlayan gen; endüstride yaygın Tg üreticisi olarak kullanılan *Streptomyces mobarensis*'den alınarak *Corynebacterium glutamicum*'a aktarılmış ve ekspresyonu sağlanmıştır. Çalışma sonunda; *C. glutamicum*'un büyüme eğrisinde belirgin bir farklılık gözlenmezken şimdiki kadar bildirilen en yüksek hücre içi mTg aktivitesi olan 49 U/mL ile 2 L'lik biyoreaktörde üretim gerçekleştirildiği raporlanmıştır.

Suzuki ve arkadaşları tarafından aktinomiset kökenli bakterilerden elde edilen termo-tolerant transglutaminaz enzimi ABD'de patentlenmiştir. Elde edilen enzimin 25-68,4°C arası sıcaklıklarda aktivitesini koruduğu raporlanmıştır (Suzuki et al., 2013).

2.5.2. Aktinobakterilerden Beta Galaktozidaz Enzim Sentezi

Aktinobakteriler; büyük miktarlarda enzim üretme potansiyeli, biyokimyasal çeşitlikleri ve genetik manipülasyonlara uygunlukları nedeniyle alternatif enzim kaynakları arasındadır. Nüfusun hızla arttığı ve pek çok doğal kaynağın tükenme tehlikesi altında olduğu günümüz dünyasında; endüstrinin önümüzdeki yıllarda karşılaşacağı zorlukların üstesinden gelmeye yardımcı olacak potansiyele sahiptir. (Vaijayanthi et al., 2016). Aşağıda bu konuya açıklık getirecek β -galaktozidaz üretiminde aktinobakteriler ile ilgili yürütülen çalışmalardan örnekler verilmiştir.

1974 yılında Collinge ve arkadaşları tarafından *Streptomyces coelicolor* tarafından termostabil β -galaktozidaz enzimi üretilmiş ve ABD'de patentlenmiştir. Elde edilen enzimin; 70°C'de aktif olduğu, optimum çalışma aralığının 60-70°C ve

maksimum aktivitenin ise 65°C'de gözleendiği belirtilmiştir. Bu açıdan düşük sıcaklık ile yapılan pastörizasyon proseslerinde (63°C'de 30 dakika) kullanımı önerilmiştir. Enzimin 65°C'deki aktivitesinin 40°C'deki aktivitesine kıyasla 3 kat daha yüksek olduğu da eklenmiştir. (Collinge et al., 1974).

Sanchez and Hardisson (1979) tarafından *Streptomyces violaceus*'tan ortamdaki galaktozun indüklemesiyle enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve üretilen enzim aktivitesinin 1,490 U/ml olduğu raporlanmıştır. Nakao et al. (1994) tarafından da *Saccharopolyspora rectivirgula* bakterisinden yüksek transgalaktozilasyon aktivitesine sahip termostabil β -galaktozidaz elde edilmiştir. Enzimin; 70°C'de 1,75 M laktoz ile muamele edildiğinde (7,0 pH) 22 saat sonunda %41 verimle GOS ürettiği raporlanmıştır. Ayrıca enzimin pH 7,2'de 60°C'de 10 μ M MnCl₂ varlığında 4 saat; 70°C'de 1,75 M laktoz ve 10 μ M MnCl₂ varlığında 22 saat boyunca stabil kaldığı gözlenmiştir. Elde edilen enzimin laktozdan GOS üretiminde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen proseslerde başarıyla kullanılabilceği önerilmiştir.

Hildebrandt et al. (2009) tarafından da Antartika bölgesinden izole edilen *Arthro bacter* sp. 32c'den elde edilen β -galaktozidazın 6,5 pH ve 50°C'de maksimum aktivite gösterdiği; 25°C sıcaklık değerinde maksimum aktivitenin %60'ının; 0°C'de ise maksimum aktivitenin %15'inin gözleendiği bildirilmiştir.

Hindistan- Kolkata bölgesindeki sığır ahırlarından gelen toprak örneklerinden izole edilen toprak bakterilerinin β -galaktozidaz üretim yetenekleri taranmıştır. İzole edilen 2 bakterinin enzimi ürettiği ve optimum 7,0 pH ve 40°C'de çalıştığı raporlanmıştır (Maity et al., 2013). Antartika bölgesinden izole edilen *Arthro bacter* sp. 32cB β -galaktozidaz üretim geni klonlanarak; *E.coli*'de eksprese edilmiş ve üretilen enzimin maksimum aktivitesinin 8,0 pH ve 28°C'de görüldüğü; 10°C'de ise maksimum aktivitesinin %42'sini gösterdiği bildirilmiştir (Pawlak-Szukalska et al., 2014).

2.5.3. Aktinobakterilerden Levansukraz Enzim Sentezi

Aktinobakteri levansukraz üretimi üzerine literatürde çok fazla çalışmanın yapılmadığı belirlenmiş; ulaşılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Pabst (1977) tarafından yürütülen bir çalışmada; *Actinomyces* sınıfında yer alan *Actinobacter vicous*'tan levansukraz elde edilmiştir. Elde edilen enzimin pH 4,0-9,0 gibi geniş bir aralıkta aktivitesini koruduğu; maksimum aktivitenin ise pH

6,5'te gözleendiği raporlanmıştır. Park et al. (2003) tarafından da *Microbacterium laevaniformans*'tan levansukraz eldesi üzerine çalışılmıştır. Çalışma sonunda; enzimin indirgen şeker oluşturma aktivitesi için optimum pH'nın 6,5; levan oluşturma aktivitesi için ise 6,0 olduğu belirtilmiştir. Enzimin 5,0-7,0 pH aralığında aktivitesini koruduğu; pH 9,2'da ise inaktif hale geldiği raporlanmıştır. Enzim için optimum çalışma sıcaklığının 30°C olduğu; 45°C'de ise maksimum düzeyde indirgen şeker açığa çıkardığı bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Mikrobiyal transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzim üretimi varlığını test etmek amacıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde depolanan, çöl, sediment ve toprak olmak üzere farklı ekolojik özelliklere sahip ortamlardan izole edilmiş ve draft genom dizisi belirlenerek tanımlanmış üretici tür olması beklenen toplam 41 adet bakteri temin edilmiştir. Temin edilen bakteriler, izole eden araştırmacı ve izolasyon kaynağı Tablo 3.1’de yer almaktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1. Transglutaminaz, Levansukraz ve β -galaktozidaz Üretim Potansiyeline Sahip İzolatların Biyoinformatik Tarama ile Belirlenmesi

Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde depolanan, çöl, sediment ve toprak olmak üzere farklı ekolojik özelliklere sahip ortamlardan izole edilen bakteri izolatlarının draft genom dizilerinin (kontigler) ilgili enzimlerle örtüşme biçimleri gözlenmiştir. Bu bağlamda GenBank veritabanını kullanan sistem, daha önce sunulmuş olan aktinobakteriyel kökenli transglutaminaz (EC. 2.3.2.13), levansukraz (EC. 2.4.1.10) ve β -galaktozidazların (3.2.1.13) amino asit dizilerini kendi içinde karşılaştırmakta ve korunmuş bölgeleri tespit etmektedir.

Sistemde araştırmacı tarafından draft genom dizileri yüklenen her bir bakterinin tek tek ilgili genleri üretim yetenekleri taranmış ve pozitif sonuç veren izolatlar kalitatif testler de kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çalışmada tüm genom dizi analizleri gerçekleştirilerek değişken sayıda parçadan oluşan genom verileri elde edilen izolatların transglutaminaz, levansukraz ve β -galaktozidaz enzimleri üretim genlerine sahip olup olmadıklarının belirlenmesinde biyoinformatik araç olarak Rapid Annotation Using Subsystem Technology (RAST version 2.0) kullanılmıştır (Aziz et al., 2008; Overbeek et al, 2014). Çalışmada kullanılan RAST sistemi çoğu bilim insanı tarafından gen fonksiyonları ile yeni yolları keşfetmek için yaygın kullanılan tüm filogenetik ağaçtaki prokaryotlar için yüksek kaliteli genom açıklamaları sunmaktadır. Sistem; Işık, (2012) tarafından da bildirildiği gibi daha önce araştırmacılar tarafından

Tablo 3.1. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Temin Edilen Bakteri İzolatları ve Bilgileri

No	Kullanılan Mikroorganizma	En Yakın Akraba Tip Türü	% Benz.	İzolasyon Kaynağı	İzole eden Araştırmacı	GenBank Accession No.
1	<i>Streptomyces coryli</i> A7024	<i>Streptomyces cadmiisoli</i> ZFG47	97,7	Fındık Bahçesi - Düzce	Nevzat Şahin	JAACKZV000000000
2	<i>Streptomyces boncukensis</i> SB3404	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014	97,2	Boncuk Tuzlası - Çorum	Demet Tatar	JAACKZZ000000000
3	<i>Nocardioides</i> sp. KC13	<i>Nocardioides luteus</i> KCTC 9575	99,3	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	JAALAA000000000
4	<i>Rhodococcus</i> sp. 14C212	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> 10bc312	98,8	Bazaltik anamateryal - Samsun	Salih Sarıcaoğlu	JAALAH000000000
5	<i>Streptomyces scabichelini</i> HC44	<i>Streptomyces vastus</i> NBRC 13094	97,6	Hacıbektaş - Nevşehir	Talha Gençbay	JAACKZY000000000
6	<i>Streptomyces mesophilus</i> YC504	<i>Streptomyces caldifontis</i> NCCP-1331	98,6	Yeniçağa Gölü - Bolu	Ali Tokatlı	JAACKZW000000000
7	<i>Streptomyces ureilyticus</i> YC419	<i>Streptomyces vastus</i> NBRC 13094	99,0	Yeniçağa Gölü - Bolu	Ali Tokatlı	JAACKZX000000000
8	<i>Streptomyces boluensis</i> YC537	<i>Streptomyces ziwulingensis</i> F22	97,9	Yeniçağa Gölü - Bolu	Ali Tokatlı	JAAAH000000000
9	<i>Nonomuraea</i> sp. K271	<i>Nonomuraea kuesteri</i> NRRL B-24325	98,9	Zafer Burnu - KKTC	Aysel Veyisoğlu	JAAAH000000000
10	<i>Shimazuella alba</i> KC615	<i>Shimazuella kribbensis</i> KCTC 9933	98,2	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	WUUL000000000
11	<i>Microbacterium</i> sp. 5K110	<i>Microbacterium testaceum</i> NBRC 12675	99,2	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	VBUM000000000
12	<i>Nonomuraea longispora</i> KC401	<i>Nonomuraea salmonaea</i> DSM 43678	98,1	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	VBUN000000000
13	<i>Streptomyces</i> sp. 8K308	<i>Streptomyces hainanensis</i> YIM 47672	99,2	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKC000000000
14	<i>Actinomadura</i> sp. 7K507	<i>Actinomadura bangladeshensis</i> 3-46-b3	98,9	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKK000000000
15	<i>Actinomadura</i> sp. KC345	<i>Actinomadura bangladeshensis</i> 3-46-b3	98,4	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKH000000000
16	<i>Actinomadura</i> sp. KC06	<i>Actinomadura darangshiensis</i> DSLS-70	98,5	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKT010000000
17	<i>Actinomadura</i> sp. KC216	<i>Actinomadura darangshiensis</i> DSLS-70	98,8	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMJX000000000
18	<i>Actinomadura</i> sp. 7K534	<i>Actinomadura livida</i> JCM 3387	99,3	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKB000000000
19	<i>Actinomadura</i> sp. 6K520	<i>Actinomadura livida</i> JCM 3387	99,3	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMLC000000000
20	<i>Saccharopolyspora</i> sp. 7K502	<i>Saccharopolyspora shandongensis</i> 88	99,4	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKW000000000
21	<i>Saccharopolyspora</i> sp. 5K548	<i>Saccharopolyspora pathumthaniensis</i> S582	99,8	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMLA000000000

(Devam)

Tablo 3.1. (Devam)

No	Kullanılan Mikroorganizma	En Yakın Akraba Tip Türü	% Benz.	İzolasyon Kaynağı	İzole eden Araştırmacı	GenBank Accession No.
22	<i>Saccharopolyspora</i> sp. 16K309	<i>Saccharopolyspora pathumthaniensis</i> S582	99,7	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKS00000000
23	<i>Saccharopolyspora</i> sp. 16K404	<i>Saccharopolyspora endopytica</i> YIM 63158	99,7	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKV00000000
24	<i>Jiangella ureilytica</i> KC603	<i>Jiangella mangrovi</i> 3SM4-07	99,4	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKL00000000
25	<i>Jiangella asiatica</i> 5K138	<i>Jiangella alba</i> DSM 45237	99,5	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKZ00000000
26	<i>Jiangella aurantiaca</i> 8K307	<i>Jiangella alkaliphila</i> DSM 45079	99,2	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMLB00000000
27	<i>Kribella turkmenica</i> 16K104	<i>Kribella antibiotica</i> YIM 31530	99,2	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKX00000000
28	<i>Micromonospora</i> sp. 15K316	<i>Micromonospora avicenniae</i> DSM 45758	99,4	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKG00000000
29	<i>Micromonospora</i> sp. KC723	<i>Micromonospora pallida</i> DSM 43817	99,1	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKD00000000
30	<i>Micromonospora</i> sp. KC721	<i>Micromonospora haikouensis</i> 232617	99,3	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMJY00000000
31	<i>Micromonospora</i> sp. KC213	<i>Micromonospora krabiensis</i> DSM 45344	99,4	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKF00000000
32	<i>Micromonospora</i> sp. KC207	<i>Micromonospora fluostatini</i> PWB-003	99,4	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKJ00000000
33	<i>Micromonospora</i> sp. KC606	<i>Micromonospora chersina</i> DSM 44151	99,2	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKN00000000
34	<i>Nonomuraea longispora</i> KC201	<i>Nonomuraea salmonea</i> DSM 43678	99,0	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMJZ00000000
35	<i>Nonomuraea diastatica</i> KC712	<i>Nonomuraea candida</i> HMC10	98,1	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKP00000000
36	<i>Nonomuraea deserti</i> KC310	<i>Nonomuraea candida</i> HMC10	98,1	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMKO00000000
37	<i>Nonomuraea mesophila</i> 6K102	<i>Nonomuraea salmonea</i> DSM 43678	98,3	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	SMLD00000000
38	<i>Streptomyces cahuitamycinicus</i> 13K301	<i>Streptomyces variegatus</i> NRRL B-16380	98,9	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	POUC00000000
39	<i>Spongiactinospora gelatinilytica</i> 7K107	<i>Spongiactinospora rosea</i> LHW63015	98,7	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	POUA00000000
40	<i>Micromonospora deserti</i> 13K206	<i>Micromonospora spongicola</i> S3-1	98,6	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	POUB00000000
41	<i>Nonomuraea</i> sp. KC333	<i>Nonomuraea maritima</i> FXJ7.203	98,9	Karakum Çölü - Türkmenistan	Hayrettin Saygın	POUD00000000

yüklenen genom dizinleri veya çevrimiçi olarak ulaşılabilen National Center for Biotechnology Information (NCBI) verilerindeki dizinleri, BLAST programı aracılığıyla girilen protein ya da nükleotid dizinleri ile karşılaştırarak arasındaki benzerlikleri açıklamaktadır. Gen aileleri üyelerinin belirlenmesinin yanısıra dizinler arasındaki fonksiyonel ve evrimsel ilişkileri anlamak için de kullanım potansiyeline sahiptir.

Biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılan taramada parçalı genom verilerinin kullanılması nedeniyle enzimleri kodlayan gen bölgelerinin tamamını aynı genom parçasında içermeyen bazı izolatlar negatif sonuçlar verebilmiş olabileceğinden, genom verisine dayalı taramalar sonucunda pozitif sonuç veren izolatların yakın akrabası olan fakat negatif sonuç veren farklı habitatlardan izole edilmiş bazı izolatlar da ileriki çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir.

3.2.2. Enzim Üretim Potansiyeline Sahip Bakterilerin Aktifleştirilmesi, Saflık kontrolleri ve Muhafazası

Enzim üretim potansiyeli bulunan bakteriler Pepton ilaveli Glucose Yeast-Malt Extract Broth (GYMEPB: 10 g/L glukoz, 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 2,5 g/L pepton, pH 7,0 ± 0,2) besiyerinde aktifleştirilmiş, Pepton ilaveli Glikoz Yeast-Malt Extract Agar (GYMEPA: 4 g/L maya özütü, 10 g/L malt özütü, 2,5 g/L pepton, 4 g/L glukoz, 20 g/L agar, pH 7,0±0,2) besiyerinde saflık kontrolleri yapılmış ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere aynı katı besiyerinde +4°C'de; uzun süreli olarak da -80°C'de muhafaza edilmiştir (Shirling and Gottlieb, 1966).

3.2.3. Bakterilerin Enzim Üretim Yeteneklerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi

Transglutaminaz, levansukraz ve β -galaktozidaz üretme potansiyeli bulunan bakterilerin bu genlerinin ekspresyon yetenekleri aşağıda verilen yöntemler uygulanarak belirlenmiştir.

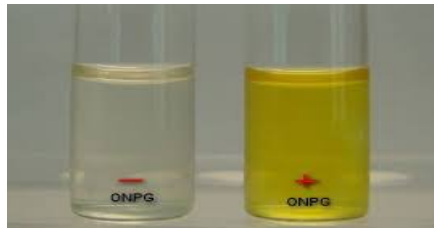
3.2.3.1. Transglutaminaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Bourneow et al. (2012) tarafından önerilen filtre kağıt disk (FPD) yöntemi uygulanmıştır. Transglutaminaz üretim genine sahip bakteriler Nutrient Agar (NA: 5,0 g/L pepton, 3,0 g/L et ekstraktı, 12,0 g/L agar-agar ve pH 7,0 ± 0,2) içeren 2 petriye nokta ekim yapılarak ekilmiş ve 28-30°C'de inkübasyona bırakılmıştır (NA besiyeri daha az renk girişimine sebep olduğu için seçilmiştir). Petri kaplarından birisinde gelişen her bir koloninin üstüne hazırlanan filtre kağıdı diskleri

yerleştirilerek (disklerin çapı; $0,56\pm 0,01$ cm ve su tutma kapasiteleri $9,45\pm 0,15$ μ L), her bir disk üzerine 30 μ L substrat karışımı (37,5 mM CBZ-Gln-Gly, 125 mM hidroksilamin ve 12,5 mM glutatyon; 200 mM sitrat tamponunda çözdürülmüştür, pH 6,0) eklenmiş ve 28°C de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 10 μ L sonlandırma çözeltisi (%5 FeCl₃.6H₂O içeren %15'lik TCA) eklenip 28°C de 1 saat bekletildikten sonra renk yoğunluğu, diğer petrideki koloni ile karşılaştırılmıştır. Yoğun kahverengi renk oluşturan izolatlar üretici olarak seçilmiştir (Bourneow et al, 2012).

3.2.3.2. β -Galaktozidaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Enzim üretim genine sahip bakterilerin; ilgili geni ifade etme durumları 2-nitrofenil β -D-galaktropiranosid (ONPG) testi uygulanarak taranmıştır (Anonim, 2005). Bu amaçla ilk olarak bakteriler modifiye edilmiş GYM Agar (4 g/L maya, 10 g/L malt, 2 g/L CaCO₃, 4 g/L laktoz, 20 g/L agar ve pH 7,2) besiyerinde geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerden bir öze alınıp; 0.25 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edildikten sonra üzerine 0.25 mL ONPG besiyeri ilave edilmiştir. Takiben 28°C sıcaklıkta 3 saat 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda tüplerde sarı rengin meydana gelmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. ONPG metodu pozitif/negatif sonuç görünümü

ONPG besiyerinin hazırlanması aşağıdaki gibidir:

- 1) 50 mL distile su + 5 g tripton + 2,5 g NaCl, pH 7,5 çözeltisi hazırlanmış ve 121°C 15 dakika sterilize edildikten sonra "A çözeltisi" olarak etiketlenmiştir.
- 2) 10 mL 0,01 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7,5) + 0,06 g ONPG (2-nitrofenil β -D-galaktropiranosid) çözdürülmüş, steril kabin içerisinde 0,2 μ m porlu filtreden geçirilmiş ve "B çözeltisi" olarak etiketlenmiştir.
- 3) 30 mL A çözeltisi ile 10 mL B çözeltisi aseptik koşullarda karıştırılmıştır.

3.2.3.3. Levansukraz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Levansukraz üretimi, Sukroz Agar'da geliştirilen kolonilerin mukoid yapı oluşturma fenotipi test edilerek belirlenecektir (Desai ve Patel, 2019). Bu amaçla bakteri izolatları, Modifiye Sukroz Agar'a (MSA: %2,5 sukroz, %1 tripton, %1 maya ekstraktı, %0,5 NaCl, %0,025 K₂HPO₄, %3 agar ve pH 7,0±0,2) tek koloni düşürecek şekilde ekilecek ve petriyerler 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılacaktır. Mukoid (yapışkan) yapılı koloniler levansukraz pozitif olarak seçilmiştir.

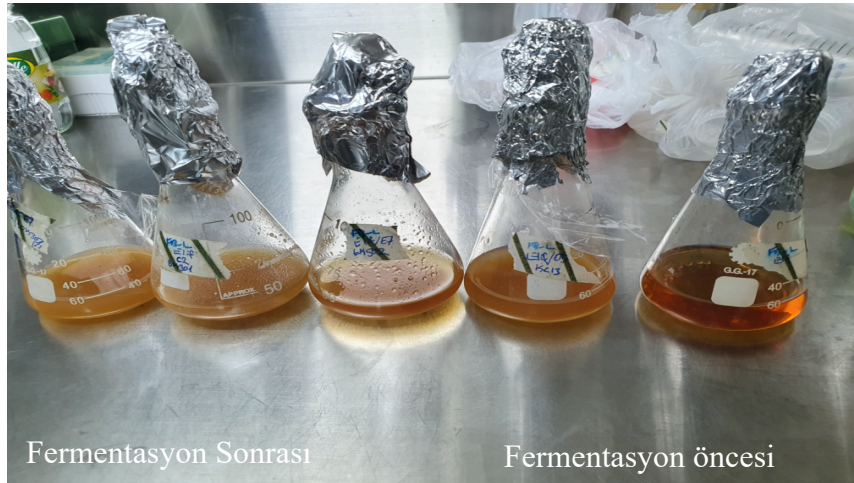
3.2.4. Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

Enzim aktivite düzeylerinin belirlenmesi için enzim üreticisi bakteriler GYMEPA besiyerinde 30°C'de 7 gün inkübe edilerek geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerden öze ucu ile alınarak GYMEPB besiyerine aktarılıp 30°C'de 180 rpm çalkalamalı koşullar altında 3 gün inkübasyona bırakılarak aşılama kültürü hazırlanmıştır. Her çalışma öncesinde 100 mL'lik erlenlerde 30 mL besiyerinde taze olarak hazırlanan aşılama kültürlerinden, transglutaminaz, β-galaktozidaz ve levansukraz üretimi için sırasıyla Fermantasyon Besiyeri 1 (FB1: 20 g/L pepton, 20 g/L nişasta, 2 g/L maya özütü, 2 g/L MgSO₄. 7H₂O, 2 g/L K₂HPO₄ ve 2 g/L KH₂PO₄) ve Fermantasyon Besiyeri 2 (FB2: 20 g/L laktoz, 10 g/L pepton, 10 g/L maya özütü, 5 g/L amonyum sülfat, 3 g/L K₂HPO₄, 1 g/L KH₂PO₄ ve 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O) ve Fermantasyon Besiyeri 3 (FB 3: 50 g/L sukroz, 7 g/L maya özütü, 1,6 g/L amonyum sülfat, 2,5 g/L KH₂PO₄ ve 1 g/L MgSO₄. 7H₂O ortamlarına %5 oranında aşılama yapılmıştır (Erdal et al., 2017; Sorde and Ananthanarayan, 2019).

Aşılanmış besiyerleri 28-30°C'de 180 rpm çalkalamalı koşullarda bulanıklık gözlenene kadar inkübasyona bırakılmış; inkübasyon sonrasında, kültür ortamı 10000 g kuvvetinde 4°C'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve hücrelerden arındırılmış kültür sıvısı enzim aktivite analizlerinde kullanılmıştır. Enzim aktivitesi belirlenmesi için; her bir üretici bakteri 30 mL fermentasyon besiyeri içeren 100 mL'lik erlenlerde çoğaltılmıştır. Fermentasyon-1, Fermentasyon-2 ve Fermentasyon-3 ortamlarında gelişen bakteriler Şekil 3.2., Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'te yer almaktadır.



Şekil 3.2. FB1 ortamında gelişen bakteriler (Transglutaminaz üretimi)



Şekil 3.3. FB2 ortamında gelişen bakteriler (Beta galaktozidaz üretimi)



Şekil 3.4. FB3 ortamında gelişen bakteri (Levansukraz üretimi)

3.2.4.1. Transglutaminaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Transglutaminaz enzim aktivitesi hidroksamat yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Sorde and Ananthanarayan, 2019). Yöntemde, substrat solüsyonu olarak 100 mM hidroksilamin, 10 mM indirgenmiş glutatyon ve 30 mM Z-Gln-Gly içeren 0,2 M'lık Tris-HCl tamponu (pH 8,0±0,2) kullanılmıştır. Enzim çözeltisinden 100 µL alınarak 180 µL substrat çözeltisi ile karıştırılmış ve 30°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 320 µL sonlandırma çözeltisi ile durdurulmuştur (Macedo et al, 2007). Sonlandırma çözeltisi %5 FeCl₃.6H₂O içeren %15'lik TCA (Trikloro Asetik Asit) çözeltisidir.

Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra karışım 13000 g kuvvetiyle 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantın 200 µL'si 96'lık plakalardaki kuyucuğa aktararak 525 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak bakterilerden elde edilen enzim çözeltisi yerine gine domuzu karaciğerinden elde edilen saf transglutaminaz kullanılmıştır. Test kontrolü için substrat, enzim ve sonlandırma çözeltileri aynı anda karıştırılarak reaksiyon başlamadan durdurulmuştur. Böylelikle tüm karışımın başlangıçta 525 nm'deki absorpsiyonu belirlenmiştir. Oluşan hidroksamat miktarı reaksiyon sonundaki absorbans değişimine göre "L-glutamik asit γ-monohidroksamat" standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır (Fu et al, 2020).

3.2.4.2. Levansukraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Levansukraz enziminin aktivitesinin belirlenmesi için dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanılmıştır (Miller, 1959). Tris-HCl tamponu (200 mM, pH 8,0) ile hazırlanmış 0,5 M sukroz çözeltisi ile 500 µL enzim çözeltisi karıştırılarak 30°C'de 10 dakika tutulmuştur. Karışımın 200 µL'si ve 400 µL DNS (Dinitrosalisilik asit) çözeltisi test tüpüne aktararak kaynayan su içerisinde 5 dakika bekletilmiş ve tüp içerisindeki karışım hızla soğutulduktan sonra 1 mL distile su ilave edilmiştir. Son karışımın 540 nm'deki absorbansı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak ticari levansukraz ile hazırlanan enzim çözeltisi; test kontrolünde ise 10 dakika kaynatılmış enzim çözeltisi kullanılmıştır. Açığa çıkan indirgenmiş şeker miktarı reaksiyon sonundaki absorbans değişimine göre "glukoz" standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmış (Hamdy et al., 2017) ve bir ünite levansukraz aktivitesi analiz koşulları altında, 1 mL enzim çözeltisinde dakikada 1 µmol indirgenmiş şekerin oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak sunulmuştur.

DNS çözeltilisinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

1) 1 g DNS (Dinitrosalisilik Asit) 50 mL deiyonize suda çözündürülmüştür.

2) Üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2 M NaOH çözeltisi eklenmiştir.

3) Hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve hazırlanan çözelti ışığa karşı duyarlı olduğundan alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde kaplanmış; kullanıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Garriga et al., 2017).

3.2.4.3. β -Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β -galaktozidaz aktivitesinin belirlenmesi için 100 μ L enzim çözeltisi, 100 μ L 2-nitrofenil β -D-galaktropiranosid (ONPG) çözeltisi (20 mM) ve 800 μ L Tris-HCl (100 mM, pH 8,0)'den oluşan reaksiyon karışımı 30°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon 500 μ L 1 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra karışım 13000 g kuvvetiyle 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantın 200 μ L'si 96'lık plakalardaki kuyucuğa aktarılarak 420 nm'deki absorbansı ölçülmüştür (Yamada et al, 2017; Kosciow and Deppenmeier, 2020). Açığa çıkan o-nitrofenolün konsantrasyonu o-nitrofenol standart grafiği yardımı ile hesaplanmıştır (Kim et al., 2004).

Bir ünite beta galaktozidaz aktivitesi, analiz koşulları altında, 1 mL enzim çözeltisinde dakikada 1 μ mol o-nitrofenol açığa çıkmasını sağlayan enzim miktarı olarak aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.1) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivite } \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{A_{420} V_h}{k} \cdot \frac{1}{V_o} \cdot \frac{1}{k} \cdot D_f \quad (3.1)$$

A₄₂₀: 420 nm'de ölçülen absorbans
V_h: Hazırlanan toplam reaksiyon hacmi
V_o: Okutulan toplam reaksiyon hacmi
k: ONP standart grafiğinin eğimi
t: Reaksiyon süresi
D_f: Dilüsyon faktörü

Enzim aktivitesinin spesifik aktivite cinsinden ifadesinde aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.2) kullanılmıştır.

$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi (U/mg)} = \text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} / \text{Protein miktarı (mg/mL)} \quad (3.2)$$

3.2.5. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Hücrelerden arındırılmış kültür sıvısı ve enzim çözeltilerindeki toplam protein miktarı Bradford yöntemi uygulanarak belirlenmiştir (Bradford, 1976). Protein

konsantrasyonu bilinmeyen çözelti uygun şekilde seyreltikten sonra çözeltinin 100 µL'si 1 mL Bradford çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip karışımın 595 nm'deki absorbanı ölçülmüştür. Protein miktarının hesaplanmasında farklı konsantrasyonlardaki bovine serum albumin (BSA) çözeltisi yardımıyla çizilen standart grafikten faydalanılmıştır.

Bradford çözeltisinin hazırlanması için; 10 mL %95'lik ethanol, 20 mL %85'lik fosforik asit ve 35 mg Coomassive Brilliant Blue G-250 ile hazırlanan çözeltinin hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.6. Ham Enzim Çözeltilerinin Saflaştırılması

Daha önce "3.2.4. Enzim Üreticisi Bakterilerin Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi" kısmında anlatılan yöntemle elde edilen 500 mL ham enzim çözeltisi içerdiği enzimlerin saflaştırılması için ilk olarak ultrafiltrasyon ile 3-5 kat yoğunlaştırılmış ve amonyum sülfat çöktürmesi sonrası tampona karşı diyaliz edilmiştir. Saflaştırma basamağı sonrasında enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı yukarıda verilen aynı yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca aşağıdaki eşitlikler yardımıyla saflaştırma katsayısı (3.3) ve saflaştırma verimi (3.4) de hesaplanmıştır (Domurcuk, 2018).

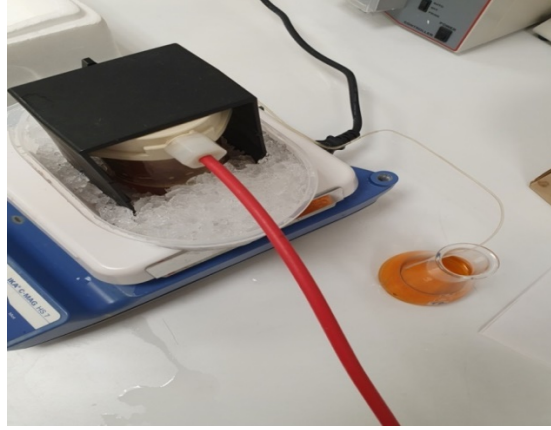
Saflaştırma Katsayısı= SS Spesifik Aktivite (U/g protein) / SÖ Spesifik Aktivite (U/g protein) (3.3)

Verim (%) = [SS Enzim Aktivitesi (U/mL) / SÖ Enzim Aktivitesi (U/mL)] x 100 (3.4)

SS: Saflaştırma Basamağı Sonrası
SÖ: Saflaştırma Basamağı Öncesi

3.2.6.1. Ultrafiltrasyon Uygulaması

Kültür sıvılarının yoğunlaştırılması için 200 mL'lik Amicon karıştırmalı ultrafiltrasyon hücresi ve 10 kDa ve üstü moleküler büyüklüğe sahip proteinlerin geçmesini engelleyecek ultrafiltrasyon membranları kullanılmıştır. Kültür sıvısı altı kısmına membran takılmış ultrafiltrasyon hücresine doldurulduktan sonra hücrenin kapağı kapatılarak azot tüpüne bağlanmıştır. Azot gazı ile hücre içinde 2-5 bar'lık basınç yaratılarak çözülmüş moleküller ve 10 kDa'dan küçük proteinlerin hücre dışına çıkışı sağlanarak hücre içindeki proteinler kısmen saflaştırılmış ve yoğunlaştırılmıştır. Uygulama süresince ultrafiltrasyon hücresi buz ile soğutulmuştur (Nagy and Szakacs, 2008).



Şekil 3.5. Buz üzerinde ultrafiltrasyon uygulaması

3.2.6.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Kültür ortamından enzim proteininin yüksek miktarda geri kazanımını sağlamak amacıyla ilk aşamada %60 doygunluk oranında olacak şekilde amonyum sülfat tuzu ultrafiltrasyon sonrası yoğunlaştırılan ortama yavaş yavaş ilave edilmiş, tuzun çözünmesi için manyetik karıştırıcı karıştırılmış ve proteinlerin çökmesi için +4°C’de bir gece bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler santrifüj (3300 rpm, 10 dakika, +4°C) edilerek süpernetant uzaklaştırılmıştır. Çökelti ise tampon ilave edilerek süspanse edilmiştir. Çöktürme denemelerinde etkinliğin belirlenmesi için; diyaliz sonrası örneklerin enzim aktivite değerleri (U/ml), protein miktarları (mg/mL) belirlenerek karşılaştırılmıştır (Ekren, 2013).

3.2.6.3. Diyaliz Uygulaması

Uygun boyutlarda kesilen diyaliz tüpleri önce %2 sodyum bikarbonat ve %0,05 EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) ile hazırlanan çözeltide 10 dakika, daha sonra saf suda 10 dakika kaynatılmıştır. Takiben örnekler hazırlanan tüplere doldurulmuş ve örnek hacminin 10 katı kadar saf su ile doldurulan behere atılarak 18 saat +4°C’de diyalize bırakılmıştır. Diyaliz süresince tampon çözelti 4 saatlik aralıklarla yenilenmiştir (Stockingerlab, 2020).

3.2.7. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi Laemmli (1970) tarafından bildirilen şekilde gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE için önce ayırma jeli daha sonra ise bunun üzerine yükleme jeli dökülerek polimerize edilmiştir. Ayırma jeli 0,375 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8) ile %10 akrilamid, %0,1

SDS, %0,27 bis-akrilamid, %0,006 amonyum persülfat (APS) ve %0,15 tetrametilethilenediamin (TEMED) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Örnek yükleme jeli 0,125 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8) ile %4 akrilamid, %0,105 bis-akrilamid, %0,1 SDS, %0,012 APS ve %0,3 TEMED içerecek şekilde hazırlanmıştır. Daha öncesinden 1/1 oranında 2X'lik örnek yükleme tamponuna (0,125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptetanol, %0,2 bromofenol mavisi, pH 6,8) karıştırılmış 98°C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edilen enzimler jele yüklenerek 200 V sabit akımla yürütülmüştür. Tank tamponu (pH 8,3) bileşimi 0,005 M Tris, 0,0384 M glisin ve %0,2 SDS'den oluşmuştur.

Yürütme işlemi sonrasında cam plakalar arasından alınan jeller boyama solüsyonu (1 g Coomassie Blue, 500 mL metanol, 100 mL glasiyel asetik asit, 400 mL distile su) bulunan kaplarda oda sıcaklığında 50 rpm kuvvetinde çalkalanarak 2 saat bekletilmiştir. Boyanan jeller yıkama solüsyonunda (50 mL etanol, 850 mL distile su, 100 mL glasiyel asetik asit) 18 saat bekletildikten sonra jeldeki protein bantları görüntülenmiştir. Yıkama çözeltisi her 6 saatte bir tazelenmiştir.

3.2.8. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu

Saflaştırılan enzimlerin karakterizasyonu için maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri belirlenerek; sıcaklık ve pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu karakterizasyon çalışmalarında enzim aktiviteleri "3.2.4. Enzim Üreticisi Bakterilerin Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi" başlığı altında anlatıldığı gibi ölçülmüştür.

3.2.8.1. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi diğer koşullar sabit tutularak belirlenmiştir. Bu amaçla, enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için reaksiyon karışımları "3.2.4. Enzim Üreticisi Bakterilerin Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi" kısmında belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra enzimlerin aktiviteleri 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda U/mL olarak belirlenmiştir (Kim et al., 2014; Fu et al., 2020).

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için de kısmi saflaştırılmış enzim çözeltileri stabilitenin belirleneceği sıcaklıklarda (optimum aktivite gözlemlendiği sıcaklık değeri ile bir alt ve bir üst sıcaklık değeri) 30, 60, 120 ve

150 dakika bekletildikten sonra hızlı bir şekilde soğutularak standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır (Adıgüzel, 2020).

3.2.8.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH Değerinin Etkisinin Belirlenmesi

Enzimlerinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için reaksiyon karışımları “3.2.3. Enzim Üreticisi Bakterilerin Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi” kısmında belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra enzimlerin aktiviteleri 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 değerlerine sahip 50 mM tampon ile U/mL olarak belirlenmiştir (Kim et al., 2014; Fu et al., 2020). Farklı pH değerlerinde aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında 4,0-6,0 pH aralığı için sodyum sitrat, 7,0-9,0 pH aralığı için Tris-HCl ve 10,0-11,0 pH aralığı için glisin-NaOH solüsyonu kullanılmıştır (Cui et al, 2007; Jin et al, 2016; Ceresino et al, 2018).

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için de kısmi saflaştırılmış enzim çözeltileri stabilize eden pH değerlerinde (optimum aktivitenin gözlemlendiği pH değeri ile bir alt ve bir pH değerinde) 30, 60, 120 ve 150 dakika bekletildikten sonra standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır (Adıgüzel, 2020).

3.2.8.3. Enzimlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Saf enzim preparatları moleküler ağırlıkları bilinen farklı proteinleri içeren çözelti (protein standartı) ile birlikte daha önce “3.2.5.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi” kısmında anlatıldığı gibi poliakrilamid jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Laemmli, 1970).

3.2.9. İstatistiksel Analiz

İki veya üç paralelli olarak yürütülen analiz sonuçlarının ortalamaları alınmış standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması SPSS (Statistical Package for the Social Science, version 28.0) programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. İstatistiksel açıdan farklılık %95 güven aralığında ($p < 0,05$) belirlenmiştir.

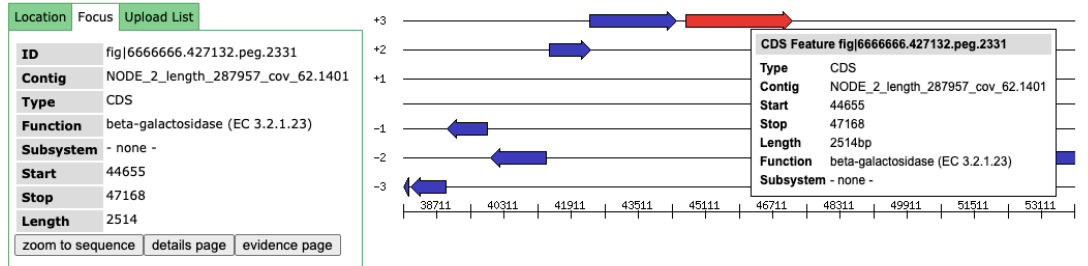
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Transglutaminaz, Levansukraz ve β -Galaktozidaz Üretim Genlerine Sahip İzolatların Belirlenmesi

Karakum Çölü başta olmak üzere, farklı lokalitelerden izole edilen ve tüm genom dizi analizleri gerçekleştirilerek değişken sayıda parçadan oluşan genom verileri tanımlanan 41 toprak bakterisinin transglutaminaz, levansukraz ve β -galaktozidaz enzimleri üretim genlerine sahip olup olmadıkları biyoinformatik araçlar (Rapid Annotation using Subsystem Technology; RAST version 2.0) kullanılarak (Aziz et al., 2008; Overbeek et al, 2014) belirlenmiş ve taranan mikroorganizmalar ile tarama sonuçları Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

RAST sistemi kullanılarak gerçekleştirilen biyoinformatik tarama sonucunun değerlendirilmesine örnek olmak üzere *Jiangella* sp. 8K307 izolatının β -galaktozidaz enzimi üretim geni varlığı analizine ait sistemden alınan ekran görüntüsü Şekil 4.1’de yer almaktadır. Kırmızı ile belirtilen bölge β -galaktozidaz enzimi üretim geni varlığına işaret etmektedir.

Browse Genome: *Jiangella* sp. 8K307 (666666.427132)



Şekil 4.1. RAST Sisteminde Enzim Üretim Genlerinin Taranması Arayüz Fotoğrafı

Tarama sonucunda; taranan bakterilerden her birinin bu enzimlerden en az birini kodlayan gen bölgesine sahip olduğu; transglutaminaz enzim üretim geninin tüm bakterilerde, levansukraz enzimi üretim geninin 2 bakteride (*Micromonospora* sp. KC721, *Micromonospora* sp. KC213), β -galaktozidaz üretim geninin de 35 bakteride bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar; ilgili bakterilerin enzim üretim genlerinin ekspresyonunun araştırılmasının ve üretim miktarının belirlenerek endüstriye kazandırılmasının gerektiğini ortaya koymaktadır. Ulaşılan bu sonuç dikkate alınarak enzim üretim gen bölgesine sahip bakterilerin ekspresyon yetenekleri kalitatif ve kantitatif yöntemlerle belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Enzim üretim yetenekleri taranan mikroorganizmalar ve tarama sonuçları

Mikroorganizma	Transglutaminaz	Levansukraz	β-Galaktozidaz
<i>Streptomyces</i> sp. A7024	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. SB3404	+	-	+
<i>Nocardioides</i> sp. KC13	+	-	+
<i>Rhodococcus</i> sp. 14C212	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. HC44	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. YC504	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. YC419	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. YC537	+	-	+
<i>Nonomuraea</i> sp. KC271	+	-	+
<i>Shimazuella</i> sp. KC615	+	-	-
<i>Kribella</i> sp. KC401	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. 8K308	+	-	+
<i>Actinomadura</i> sp. 7K507	+	-	+
<i>Actinomadura</i> sp. KC345	+	-	+
<i>Actinomadura</i> sp. KC06	+	-	+
<i>Actinomadura</i> sp. KC216	+	-	+
<i>Actinomadura</i> sp. 7K534	+	-	+
<i>Actinomadura</i> sp. 6K520	+	-	-
<i>Saccharopolyspora</i> sp. 7K502	+	-	+
<i>Saccharopolyspora</i> sp. 5K548	+	-	+
<i>Saccharopolyspora</i> sp. 16K309	+	-	+
<i>Microbacterium</i> sp. 5K110	+	-	-
<i>Saccharopolyspora</i> sp. 16K404	+	-	+
<i>Jiangella</i> sp. KC603	+	-	-
<i>Jiangella</i> sp. 5K138	+	-	+
<i>Jiangella</i> sp. 8K307	+	-	+
<i>Kribella</i> sp. 16K104	+	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 15K316	+	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC723	+	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC721	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC213	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC207	+	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC606	+	-	+
<i>Nonomuraea</i> sp. KC201	+	-	-
<i>Nonomuraea</i> sp. KC712	+	-	+
<i>Nonomuraea</i> sp. KC310	+	-	+
<i>Nonomuraea</i> sp. 6K102	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. 13K301	+	-	+
<i>Sinosporangium</i> sp. 7K107	+	-	+
<i>Salinispora</i> sp. 13K206	+	-	+
<i>Nonomuraea</i> sp. KC333	+	-	+

+: Enzim Üretim Geni Taşıyor; -: Enzim Üretim Geni Taşıymıyor)

4.2. Bakterilerin Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

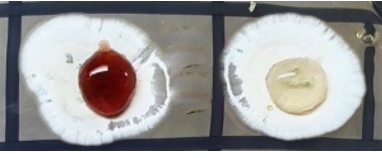

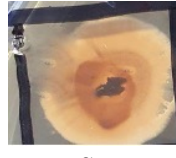


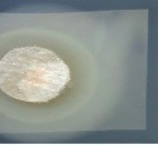








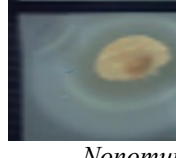
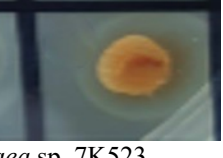


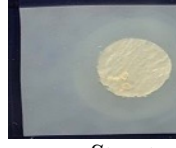

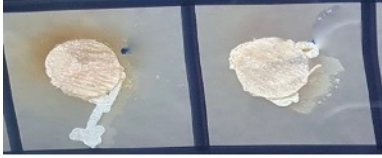
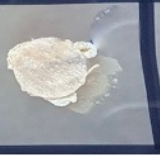








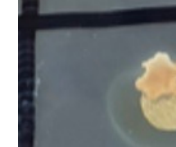

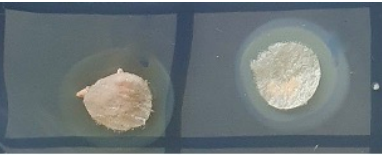
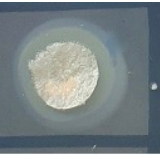
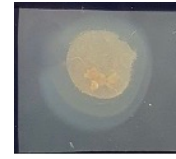
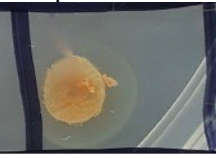
4.2.1 Transglutaminaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Transglutaminaz enzim üretim genine sahip bakterilerin; ilgili geni ifade etme durumları katı besiyerinde Bourneow et al (2012) tarafından bildirilen (Filtre Kağıt Disk) FPD yöntemi uygulanarak kalitatif olarak taranmıştır. Yöntemin uygulamasında Nutrient Agar besiyerilerine bir petride 4 bakteri olacak şekilde “Nokta Yöntemi” ile ekim yapılmış, inkübasyon sonunda petri kaplarında gözlenen

renk değişimleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve yoğun kahverengi renk gözlenen izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

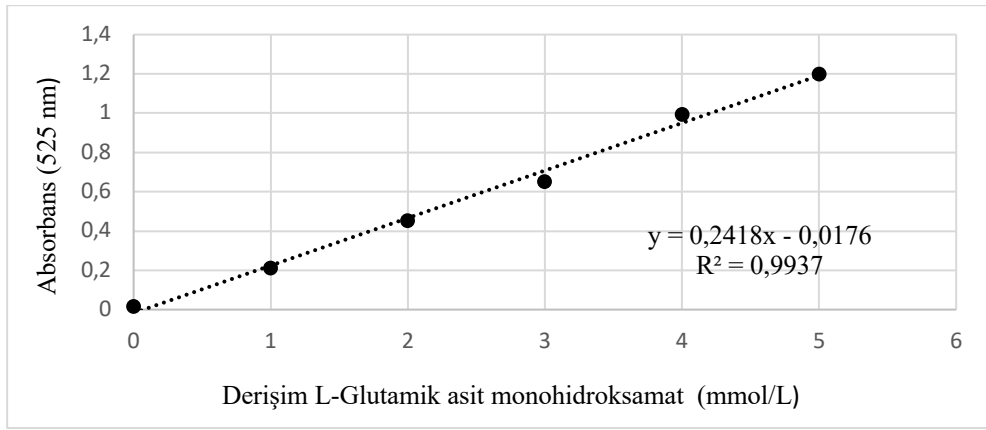
Bakterilerin çoğunda kontrol grubuna kıyasla kahverengi renk yoğunluğu fazla bulunmuş olmakla birlikte kahverengi renk yoğunluğu daha belirgin şekilde gözlenen, farklı türe sahip olan ve besiyerinde daha hızlı gelişim gösteren 9 adet bakteri ileriki çalışmalar için seçilmiş ve bunların ekim yapılan petri kaplarının üstten ve alttan görünümüne ait fotoğraflar Şekil 4.2’de verilmiştir.

Diğer ekim yapılan bakterilere ait petri kaplarının üstten ve alttan görünümüne ait fotoğraflara EK.1.’de yer verilmiştir Seçilen bakterilerin RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology; RAST version 2.0) ile gerçekleştirilen biyoinformatik taramasında “Transglutaminaz like enzymes-transglutaminaz benzeri enzim” kodlayan gen bölgesi varlığına sahip oldukları tespit edilmiştir. 2019 yılında Giordano ve arkadaşları tarafından yürütölen bir çalışmada PFAM (The Protein Families) veritabanı kullanılarak mikrobiyal transglutaminaz üreticisi bakterilerin protein sekansları incelenmiştir. Tarama sonuçlarında *Streptomyces mobaraensis*, *Streptomyces auratus*, *Streptomyces fradie*, *Streptomyces decoyicus*, *Streptomyces paucisporogenes*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Streptomyces* sp. H021, *Streptomyces* sp. XY332 gibi bakterilerde bu gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir (Giordano et al., 2018).

Petri Kutusu Üstten Görünüm		Petri Kutusu Alttan Görünüm	
Örnek	Kontrol	Kontrol	Örnek
			
<i>Streptomyces</i> sp. 16K401		<i>Streptomyces</i> sp. 16K401	
			
<i>Pseudonocardia</i> sp. 5K418		<i>Pseudonocardia</i> sp. 5K418	
			
<i>Streptomyces</i> sp. 6K502		<i>Streptomyces</i> sp. 6K502	
			
<i>Nonomuraea</i> sp. 7K523		<i>Nonomuraea</i> sp. 7K523	
			
<i>Streptomyces</i> sp. 13K105		<i>Streptomyces</i> sp. 13K105	
			
<i>Jiangella</i> sp. KC603		<i>Jiangella</i> sp. KC603	
			
<i>Kribella</i> sp. 16K104		<i>Kribella</i> sp. 16K104	
			
<i>Actinocorallia</i> sp. 5K550		<i>Actinocorallia</i> sp. 5K550	
			
<i>Actinomadura</i> sp. 7K534		<i>Actinomadura</i> sp. 7K534	

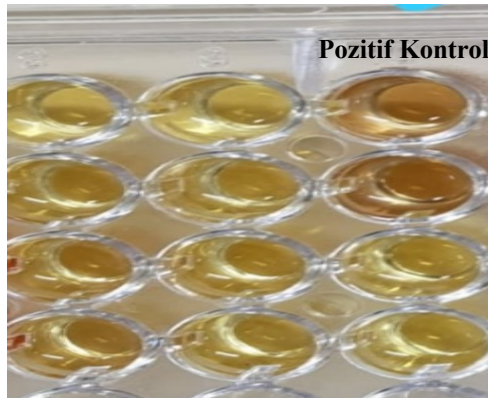
Şekil 4.2. Transglutaminaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi

Transglutaminaz enzim aktivitesine sahip ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen 9 bakteri canlandırma besiyerinde geliştirildikten sonra fermentasyon-1 (FB-1) ortamına %5 oranında aşılansak çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiş ve takiben “Hidroksamat Yöntemi” ile enzim üretimi kantitatif olarak belirlenmiştir. Bu amaçla pozitif kontrol olarak Maysa Gıda’dan temin edilen ticari transglutaminaz enzimi kullanılmıştır. Hidroksamat miktarının absorbans değişimine göre hesaplanması için L-glutamik asit γ -monohidroksimat standart grafiğı çizilmiş ve farklı konsantrasyonlarda (mmol/L) L-glutamik asit γ -monohidroksimata karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3. L-glutamik asit γ -monohidroksimat standart grafiğı

Pozitif kontrol ile yapılan uygulamada (Şekil 4.4) kontrol grubuna kıyasla belirgin bir absorbans farkı gözlenmişken ($p < 0,05$), diğerk bakterilerde örnek grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir absorbans farkı ($p > 0,05$) gözlenmemiştir.



Şekil 4.4. Hidroksamat yöntemi pozitif kontrol

FB-1 ortamında üretim elde edilememesi nedeni ile kalitatif analizde kullanılan Nutrient Agar besiyerinde pozitif sonuç verdiği belirlenen izolatlar Nutrient Broth besiyerinde de geliştirilmiş ve Hidroksamat Yöntemi uygulanmıştır. Ancak bu kültür ortamında da istatistiksel olarak anlamlı olan bir absorbans farkı gözlenmemiştir. Bu durum bakterinin sıvı besiyerinde uygun miktarda enzim üretmediği şeklinde yorumlanmıştır. Bu bakteriler ile yapılacak ileri çalışmalar için öncelikle enzim üretimi için uygun besiyeri tasarımı ile optimizasyonunun yapılması ve ikinci bir strateji olarak da transglutaminaza ait gen bölgelerinin tespit edilerek uygun restriksiyon kesim bölgeleri içeren ileri geri primerler tasarlanarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polimerase Chain Reaction) ile çoğaltılması ve plasmid ile transformasyonla *E.coli* BL21'e aktarılması planlanmıştır.

Pasternack ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yürütülen bir çalışmada *Streptovercillium mobaraense* tarafından transglutaminaz enziminin pro-transglutaminaz formunda sentezlendiği raporlanmış ve kimotripsin, tripsin gibi bazı proteazların enzimin aktifleşmesinde rol aldığı belirtilmiştir (Pasternack et al., 1998). Zhang ve arkadaşları tarafından *Streptomyces hygroscopicus* ile yürütülen çalışmada endojen serin ve metalloproteazların transglutaminaz aktivasyon sürecinde rol oynadığı belirtilmiştir (Zhang et al., 2008). Zotzel ve arkadaşları tarafından *Streptomyces mobaraensis* ile yürütülen çalışmada mikrobiyal transglutaminaz enziminin hücre büyümesi evresinde değil de farklılaşma sırasında salgılanarak aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Zotzel et al., 2003).

4.2.2. Levansukraz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Biyoinformatik tarama sonuçlarında 2 izolatın (*Micromonospora* sp. KC721, *Micromonospora* sp. KC213) levansukraz enzim üretim genine sahip olduğu gözlenmiş ancak taramada negatif sonuç veren suşlarda enzimi kodlayan gen bölgelerinin tamamını aynı genom parçasında içermemesi ihtimali göz önünde bulundurularak tüm izolatlar modifiye edilmiş Sukroz Agar'a nokta ekim yöntemiyle ekilerek mukoid yapı oluşturma fenotipi test edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler incelenmesinde mukoid (yapışkan) yapılı koloni oluşumu gözlenmemiştir.

Katı besiyerinde mukoid (yapışkan) yapılı koloni oluşumu tespit edilememesi nedeni ile izolatlar 20 mL'lik FB-3 besiyeri ortamında da geliştirilerek "3.2.4.3. Levansukraz Aktivitesinin Belirlenmesi" kısmında anlatılan Dinitrosalisilik Asit Yöntemi de (DNS yöntemi) tarama deneyi olarak uygulanmıştır. Uygulanan DNS

yöntemi sonucunda da kontrol grubu ile örnek grubu arasında istatistiki olarak belirgin bir absorbans farkı gözlenmemiş ($p > 0,05$) ve hiçbir izolat mikrobiyal levansukraz üreticisi olarak seçilememiştir. Bakteri izolatlarının ilgili geni içermesine rağmen, test edilen ortam ve şartlarda ifade edemediği sonucuna varılmıştır.

4.2.3. β -Galaktozidaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Enzim üretim genine sahip bakterilerin; ilgili geni ifade etme durumları Anonim (2005) tarafından bildirilen ONPG testi uygulanarak taranmış ve test sonunda tüplerde daha yoğun sarı renk oluşturan, farklı türe sahip olan ve besiyerinde daha hızlı gelişim gösteren 17 izolat β -Galaktozidaz üreticisi olarak seçilmiştir. Seçilen β -Galaktozidaz Aktivitesine sahip 17 izolatın en yakın akraba Tip türleri ile biyoinformatik tarama sonuçları Tablo 4.2’te verilmiştir.

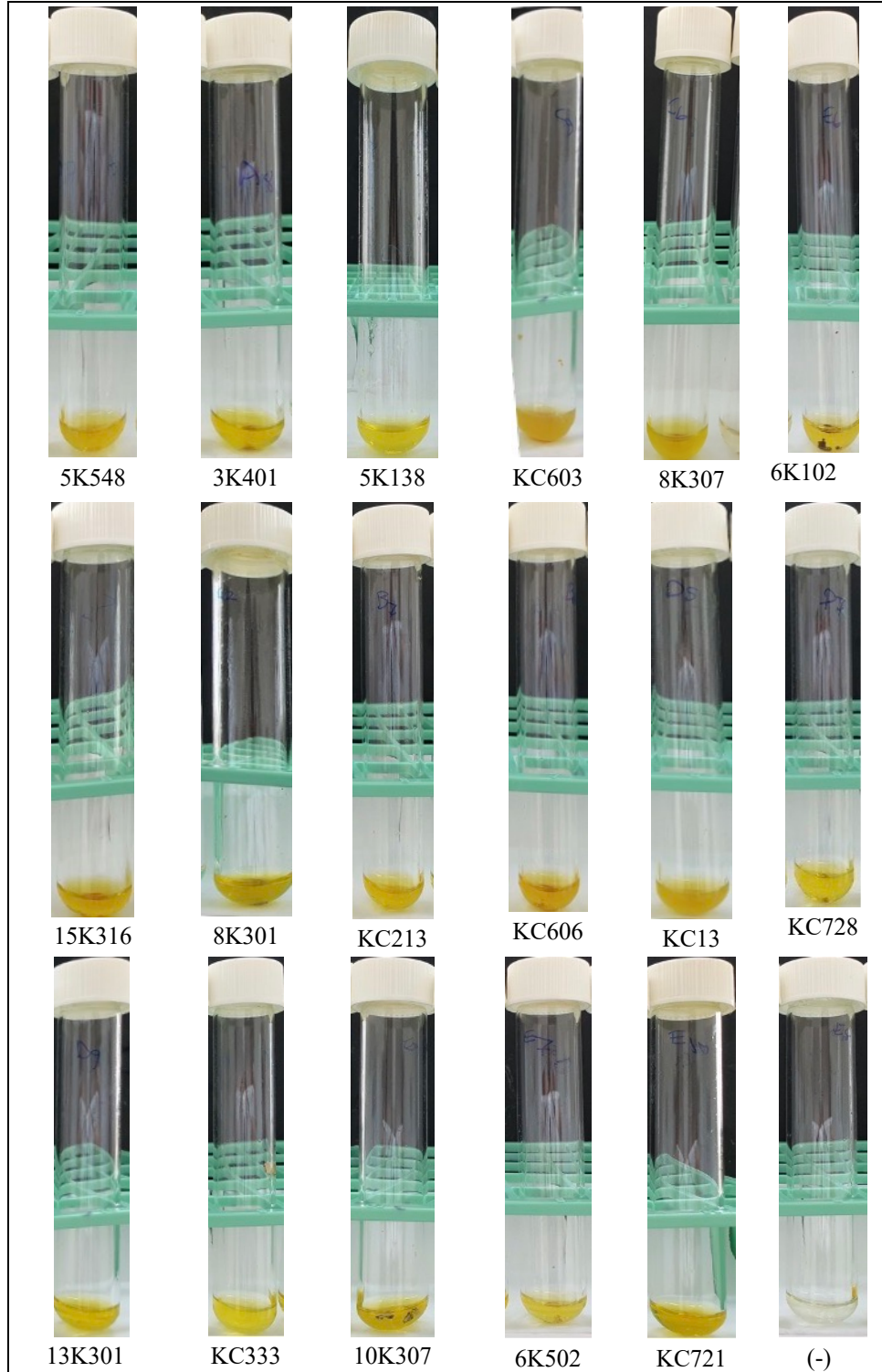
Tablo 4.2. β -Galaktozidaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi sonucu seçilen bakteriler ve biyoinformatik tarama sonuçları

İzolat	β -Galaktozidaz Geni
<i>Saccharopolyspora</i> sp. 5K548	+
<i>Streptomyces</i> sp. 3K401	+
<i>Jiangella</i> sp. 5K138	+
<i>Jiangella</i> sp. KC603	-
<i>Jiangella</i> sp. 8K307	+
<i>Nonomuraea</i> sp.6K102	+
<i>Micromonospora</i> sp.15K316	+
<i>Streptomyces</i> sp. 8K301	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC213	+
<i>Micromonospora</i> sp. KC606	+
<i>Nocardioide</i> sp. KC13	+
<i>Plantactinospora</i> sp. KC728	-
<i>Streptomyces</i> sp. 13K301	+
<i>Nonomuraea</i> sp. KC333	+
<i>Streptomyces</i> sp. 10K307	+
<i>Streptomyces</i> sp.6K502	-
<i>Micromonospora</i> sp. KC721	+

+: β -Galaktozidaz geni var; -: β -Galaktozidaz geni yok

Yapılan kalitatif analiz sonucunda β -Galaktozidaz üreticisi olarak seçilen 17 izolatın genom analiz sonuçlarında 3 tanesinin üretim genine sahip olmadığı saptanamamış ve bu durum ilgili bakterilerin parçalı genom verisine sahip olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu izolatların enzimi kodlayan gen bölgelerinin tamamını aynı

genom parçasında içermediklerinden biyoinformatik taramalarda negatif sonuçlar vermiş olabilecekleri tahmin edilmektedir. Bu risk göz önüne alınarak çalışmada biyoinformatik taramada negatif sonuç veren suşlar da enzim üretim testlerine dahil edilmişlerdir. ONPG test sonucu pozitif olarak seçilen 17 bakteriye ait analiz sonuç görünümüne ait fotoğraflara Şekil 4.5’de yer verilmiştir.

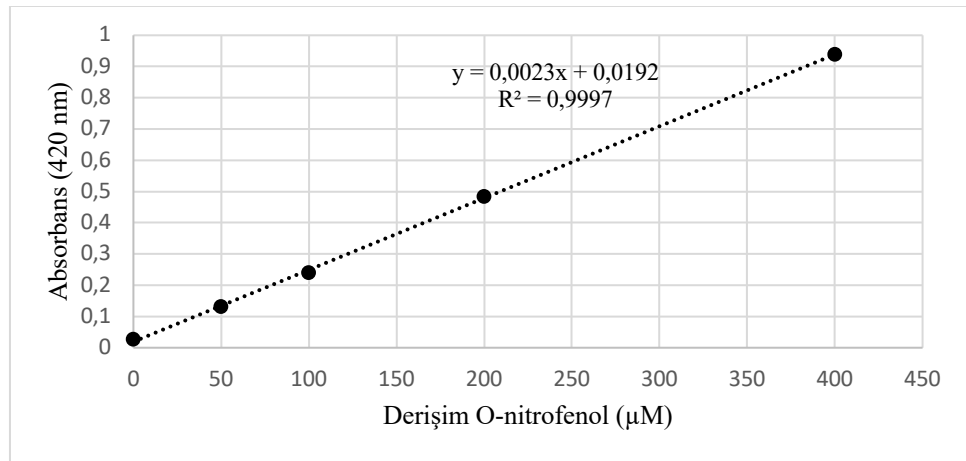


Şekil 4.5. β -Galaktosidaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi

Diğer bakterilere ait ONPG test sonucu deney tüplerinin görünümüne ait fotoğraflara EK.2’de yer verilmiştir.

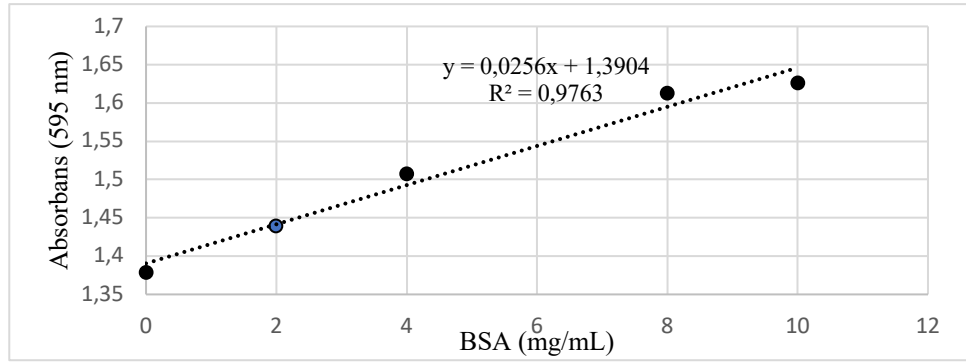
Literatürde daha önce yapılan bir çalışmada da toprak bakterilerinin β -Galaktozidaz ürettiği gösterilmiştir. Fiss ve Brooks tarafından yürütülen bu çalışmada; *Nocardia*, *Rhodoccus*, *Streptomyces* ve *Mycobacterium* türlerinde β -Galaktozidaz aktivitesi varlığı katı besiyerinde incelenmiştir. Çalışma sonunda incelenen 25 *Nocardia* spp. ve 4 *Streptomyces* spp.’nin tümünün β -Galaktozidaz pozitif; 13 *Mycobacterium* türünden 1 tanesinin pozitif; 40 *Rhodococcus* türünden ise 1 tanesinin pozitif olarak gözlemlendiği raporlanmıştır (Fiss and Brooks, 1991).

β -Galaktozidaz enzim aktivitesi ile spesifik aktivitenin hesaplanması için kalitatif analizde belirlenen 17 bakteri arasından diğerlerine göre besiyerinde hızlı gelişip nispeten yüksek aktivite gösteren *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 bakterileri seçilmiş ve FB-2 ortamında geliştirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak Maysa Gıda’dan temin edilen ticari beta galaktozidaz enzimi kullanılmıştır. Analizde reaksiyon sonunda oluşan 2-nitrofenol miktarının absorbans değişimine göre hesaplanması için Şekil 4.6’de verilen, farklı konsantrasyonlarda (mmol/L) o-nitrofenole karşılık gelen absorbans değerlerini içeren o-nitrofenol standart grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.6. O-nitrofenol standart grafiği

Spesifik aktivitenin hesaplanması için enzim ekstraktlarının protein miktarının belirlenmesinde kullanılan, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözelitilerinin 595 nm’de ölçülen absorbanslarına karşı oluşturulan standart grafik de Şekil 4.7’de verilmiştir.



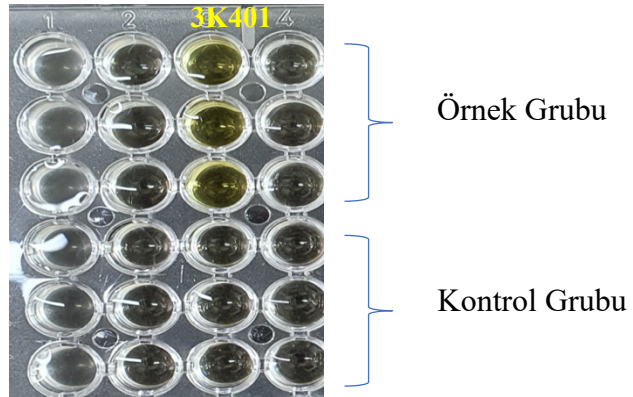
Şekil 4.7. Bradford yöntemi ile elde edilen protein standart grafiği

Seçilen bakterilere ait; kısmi saflaştırma öncesi ve sonrasındaki enzim aktivitesi, toplam protein, spesifik aktivite, verim ve saflaştırma katsayısı değerleri Tablo 4.3’de; aktivite tayininde gözlenen renk değişimine örnek *Streptomyces sp.* 3K401’e ait fotoğraf da Şekil 4.8.’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Seçilen bakterilerin kısmi saflaştırma öncesi ve sonrası β -galaktozidaz enzim aktivitesi, toplam protein içeriği, spesifik aktivitesi, verimi ve saflaştırma katsayısı

İzolat	Enzim Durumu*	Aktivite (U/mL)	Toplam Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
<i>Streptomyces sp.</i> 3K401	Ham	0,975±0,004	0,349±0,000	2,794±0,012	100	1,00±0,000
	Kısmi saf	0,773±0,022	0,2185±0,001	3,588±0,070	79,28	1,294±0,014
<i>Jiangella sp.</i> 8K307	Ham	0,365±0,009	0,320±0,003	1,145±0,006	100	1,00±0,000
	Kısmi saf	0,225±0,035	0,199±0,007	1,320±0,090	61,60	1,162±0,012
<i>Jiangella sp.</i> KC603	Ham	0,306±0,008	0,259±0,007	1,181±0,007	100	1,00±0,000
	Kısmi saf	0,120±0,002	0,092±0,012	1,262±0,020	39,21	1,073±0,007

*: Fermentasyon ortamından elde edilen enzim çözeltisi süpernatant ham; diyaliz işlemi sonrası elde edilen enzim çözeltisi kısmi saf olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.8. *Streptomyces sp.* 3K401 β -galaktozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada β -Galaktozidaz enzimi, *Streptomyces* sp. 3K401 izolatında %79,28 verimle 1,294 kat; *Jiangella* sp. 8K307 izolatında %61,60 verimle 1,162 kat; *Jiangella* sp. KC603 izolatında da %39,21 verimle 1,073 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası tüm bakterilerde toplam enzim aktivitesinde düşüş olmuş, ancak spesifik aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu sonuç genel bilgiler ile uyumludur.

Literatürde Özarslan (2018) tarafından *K. marxianus* kullanılarak elde edilen β -galaktozidazın sırasıyla iyon değişim ve afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemleri sonrasında %87,77 verimle 6,27 kat saflaştırıldığı; De-Macias et al. (1983b) tarafından *Lactobacillus murinus* β -galaktozidazının ultrajel ACA 34, DEAE-Sephadex A-50 ve afinite kromatografisi yöntemleriyle 292 kat saflaştırıldığı; Fujimura et al. (2003) tarafından da *K. lactis*'den izole edilen β -galaktozidazın jel filtrasyon ile %72 verimle 2 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir. Hem literatürler arası hem de literatür ile bizim örneklerimiz arasındaki saflaştırma farklarının özellikle kullanılan saflaştırma yönteminin farklılığından kaynaklandığı söylenebilir.

2013 yılında yapılan bir çalışmada *S. thermophilus*'dan β -galaktozidaz eldesinde amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ile Sephadex G-100 teknikleri kullanılarak 1,13 kat saflaştırma yapıldığı ve en yüksek enzim aktivitesi 7,76 U/mL olduğu raporlanmıştır (Princely et al., 2013). Chanalia et al. (2018) tarafından da *Pediococcus acidilactici* ile yürütülen çalışmada; saflaştırma basamaklarına amonyum sülfat çöktürmesi sonrası Sephadex G-100 ve Q-Sepharose yöntemleri sonrasında 3,06 kat saflaştırma elde edildiği ve enzimin spesifik aktivitesinin 0,883 U/mg olduğu belirtilmiştir. Yine Kılıç vd. (2014) tarafından da 39 *Lactobacillus* ve 3 *Bifidobacterium* cinsine ait bakteri ile yürütülen çalışmada; *L. fermentum* ZYN17 (2,468 U/mg), *L. casei* LB65 (1,116 U/mg), *L. rhamnosus* GD11 (1,034 U/mg) ve *L. acidophilus* BAZ36 (0,947 U/mg) ile *B. breve* A26 (0,726 U/mg) suşlarının yüksek spesifik aktivite yeteneğine sahip oldukları belirtilmiştir. Çalışmada elde edilen spesifik aktivite değerlerinin Chanalia et al. (2018) ve Kılıç vd. (2014) tarafından elde edilenlerden daha yüksek olduğu söylenebilmektedir. Bu sonuçtan hareketle tez kapsamında diyaliz ile kısmi saflaştırılan enzim çözeltilerinin iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri ile saflaştırılması ile ilgili yeni çalışmaların yapılması planlanmıştır.

4.3. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu

Kısmi saflaştırılan β -galaktozidaz enziminin karakterizasyonunda optimum sıcaklık ve pH, sıcaklık ve pH'nın stabilite üzerine etkisi belirlenmiş. SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tespit edilmiştir.

4.3.1. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

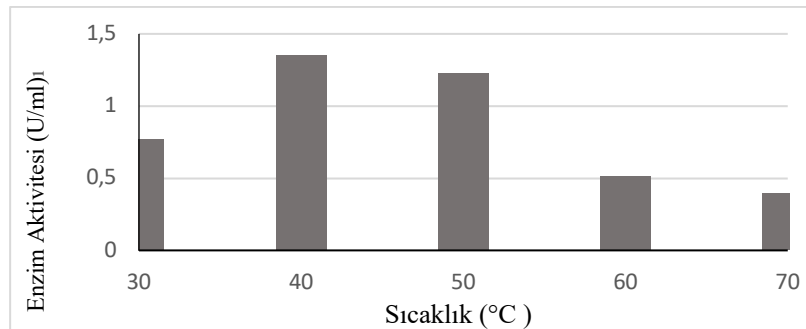
Seçilen 3 bakteri tarafından üretilen ve kısmi saflaştırılan β -galaktozidazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 30, 40, 50, 60, 70°C değerlerinde aktivite belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. 3K401 tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış β -galaktozidaz enzim çözeltisinin en iyi çalışma sıcaklığının 40°C olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/mL)*
30	0,773 \pm 0,023 ^c
40	1,355 \pm 0,077 ^a
50	1,230 \pm 0,000 ^b
60	0,512 \pm 0,003 ^d
70	0,395 \pm 0,005 ^e

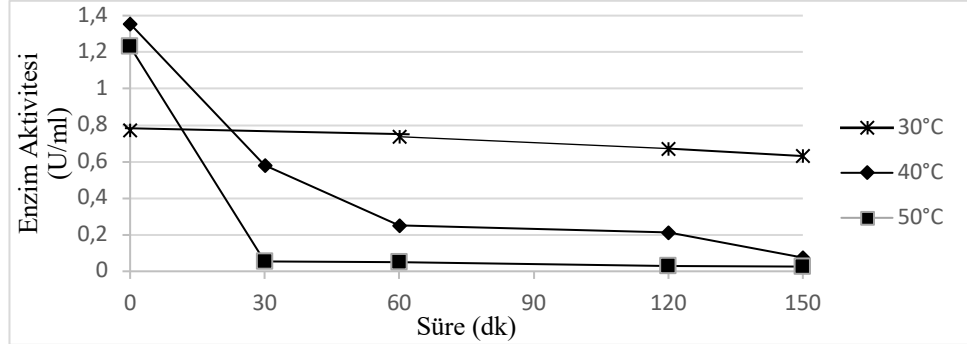
*: Aynı sütunda farklı harfle (a,b,c,d,e) işaretli ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

İstatistiksel değerlendirmede farklı sıcaklık değerlerinde hesaplanan enzim aktivitelerinin ortalamaları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmış ve test edilen sıcaklık değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farka (p<0,05) sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan çoklu karşılaştırma testi (Duncan) sonucunda, anlamlı farkın tüm sıcaklık değerleri arasında olduğu görülmüştür. Şekil 4.9'de verilen *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim çözeltisinin 40°C'de diğer sıcaklıklara göre aktivite farkı belirgin şekilde görülmektedir.



Şekil 4.9. *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidazının farklı sıcaklıklardaki aktivitesi

Enzim çözeltilisinin farklı sıcaklık değerlerinde stabilite çalışmaları için yüksek aktivite gösterdiği 3 sıcaklık seçilerek (30, 40 ve 50°C) termal stabilitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

30°C sıcaklıkta; 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin (0,631±0,002) başlangıç aktivitesine (0,773±0,02267) kıyasla %81,63 korunduğu; başlangıç değerine göre enzim çözeltilisinin aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı farkın 120. dakikada olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 40°C sıcaklıkta 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin (0,075±0,042) başlangıç aktivitesine (1,355±0,077) kıyasla ancak %5,54 oranında korunduğu; 50°C'de 150 dakika sonunda ise enzim aktivitesinin (0,0258±0,008) başlangıç aktivitesine kıyasla (1,230±0,000) ancak %2,1 oranında korunduğu gözlenmiştir. 40 ve 50°C sıcaklıklarının her ikisinde de 30 dakika sonunda enzim çözeltilisinin aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu bağlamda enzimin 30°C'de 40 ve 50°C sıcaklık değerlerine kıyasla daha stabil kaldığı dolayısıyla endüstriyel kullanımda bu durumun gözönünde bulundurulmasının gerekli olduğu yorumunda bulunulmuştur.

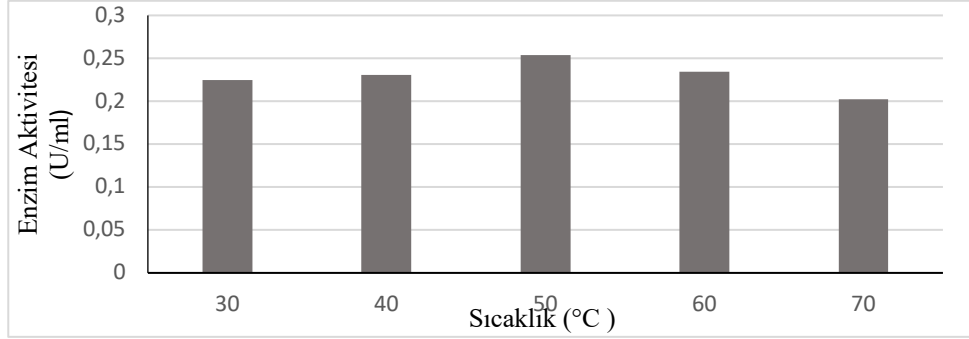
Kısmi saflaştırılmış *Jiangella* sp. 8K307 β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin en iyi çalışma sıcaklığının 50°C olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *Jiangella* sp. 8K307 β -Galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/mL)*
30	0,225±0,035 ^a
40	0,231±0,014 ^a
50	0,254±0,012 ^a
60	0,235±0,009 ^a
70	0,202±0,018 ^a

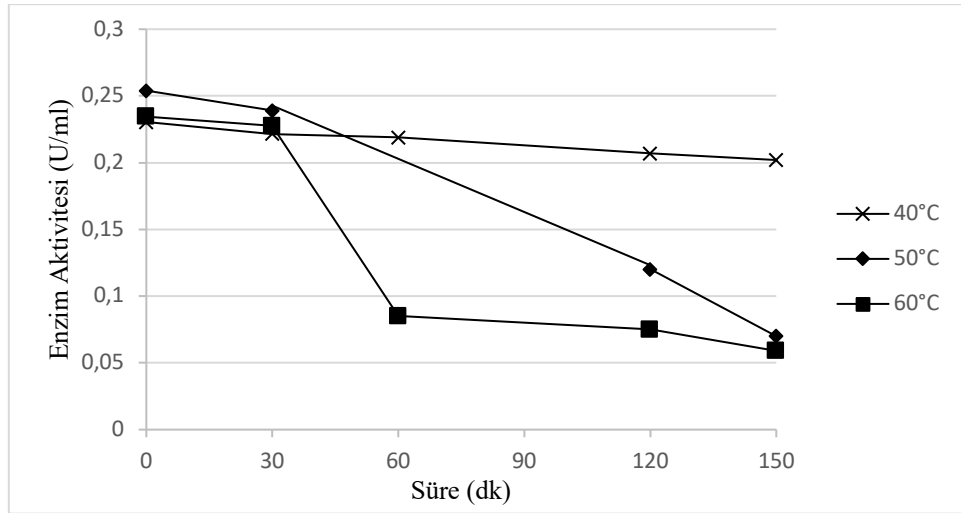
*: Aynı sütunda farklı harfle (a,b) işaretli ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Şekil 4.11’da görülen en yüksek aktivite değerinin yapılan istatistiksel değerlendirmede farklı sıcaklık değerlerinde hesaplanan enzim aktivite değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.11. *Jiangella* sp. 8K307 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Test edilen sıcaklıklarda enzim aktivitesi açısından istatistiksel olarak fark bulunmamakla birlikte gerçekleşen değer olarak en yüksek aktivite veren 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda termal stabilitesi belirlenmiş ve sonuçları Şekil 4.12’de yer almaktadır.



Şekil 4.12. *Jiangella* sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Jiangella sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin 40°C’de 150 dakika muamele sonundaki enzim aktivitesinin ($0,202\pm 0,017$) başlangıç aktivitesine ($0,2305\pm 0,0014$) göre %87,63’ünün korunduğu ve uygulanan süreler sonundaki aktiviteler arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) gözlenmiştir. Yine 150 dakika 50°C sıcaklık uygulaması sonundaki enzim aktivitesinin ($0,07\pm 0,007$) başlangıç

aktivitesine (0,2390±0,012) kıyasla %29,28'inin; 60°C uygulaması sonunda (0,059±0,000) başlangıç aktivitesine (0,2345±0,009) kıyasla %25,16'sının korunduğu saptanmıştır. 50 ve 60°C'de 60 dakika sonunda enzim çözeltisinin aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (p<0,05). Bu sonuçlar enzimin 40°C'de 50 ve 60°C sıcaklık değerlerine kıyasla daha stabil kaldığı şeklinde yorumlanmıştır.

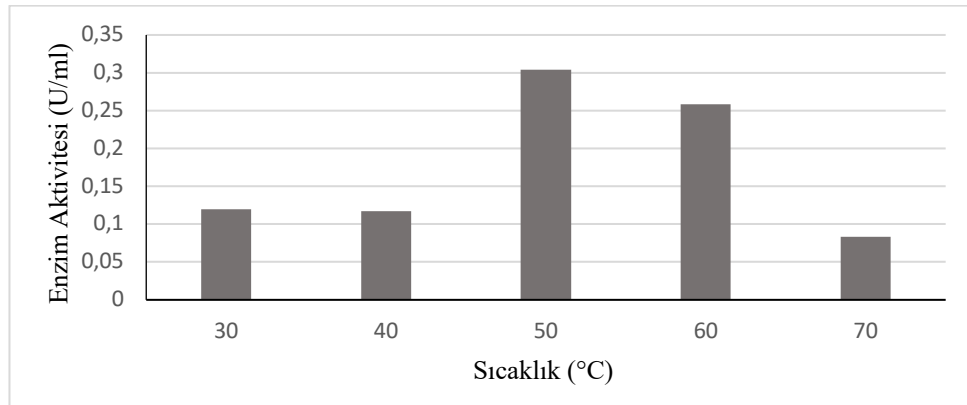
Jiangella sp. KC603 tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış β-galaktozidaz enzim çözeltisinin 50°C en yüksek aktivite gösterdiği saptanmış ve elde edilen diğer sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. *Jiangella* sp. KC603 β-galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/mL)*
30	0,120±0,002 ^c
40	0,117±0,002 ^c
50	0,304±0,007 ^a
60	0,258±0,002 ^b
70	0,083±0,019 ^d

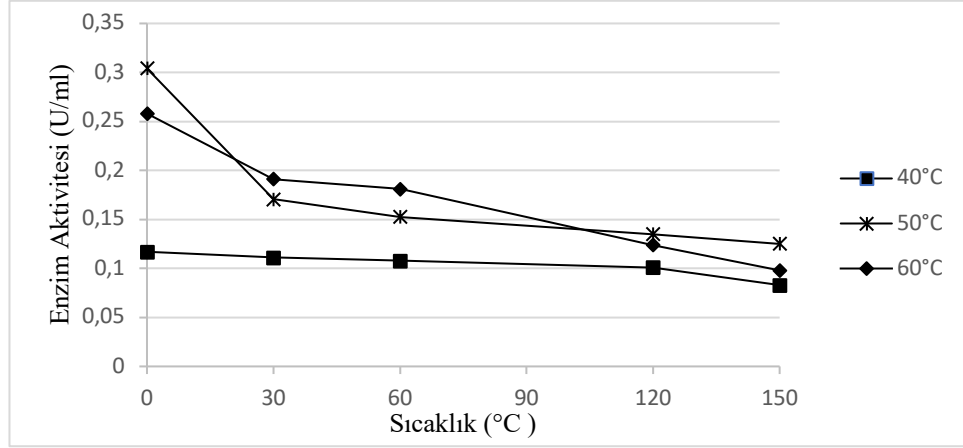
*: Aynı sütunda farklı harfle (a,b,c,d) işaretli ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Şekil 4.13'de farklı sıcaklıklardaki aktivite farkları görsel olarak sunulan *Jiangella* sp. KC603 β-galaktozidaz enzim çözeltisinin farklı sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesinin istatistiksel olarak önemli derecede etkilendiği (p<0,05) ve test edilen sıcaklık değerlerinden 30°C ile 40°C arasında anlamlı bir fark görülmezken (p>0,05) diğer sıcaklık değerlerindeki enzim aktivitelerinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.13. *Jiangella* sp. KC603 β-galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Jiangella sp. KC603 β -galaktozidaz enzim çözeltisinin diğer sıcaklıklardan önemli düzeyde yüksek aktiviteye sahip olduğu 50 ve 60°C ile 40°C sıcaklıktaki termal stabilitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.14’de sunulmuştur.



Şekil 4.14. *Jiangella* sp. KC603 β -galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

β -galaktozidaz enzim çözeltisinin 40°C’de 150 dakika sonundaki aktivitesinin (0,083±0,011) başlangıç aktivitesinin (0,117 ±0,002) %70,94’ü olduğu ve bu sıcaklıkta uygulama sürelerinin enzim çözeltisinin aktivitesi üzerine önemli bir fark oluşturmadığı (p>0,05) gözlenmiştir. 50°C sıcaklık uygulamasında 150 dakika sonundaki aktivitenin (0,125±0,02) başlangıç aktivitesinin (0,304±0,007) %41,18’i; 60°C 150 dakika sıcaklık uygulaması sonunda elde edilen aktivitenin de (0,098±0,02) başlangıç aktivitesinin (0,258±0,002) %37,98’u olduğu saptanmıştır.

50 ve 60°C’de 30 dakika uygulama sonunda enzim çözeltisinin aktivitesinde başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (p<0,05). Bu sonuç enzimin 40°C’de, 50 ve 60°C sıcaklık değerlerine kıyasla daha stabil olduğunu göstermiştir.

Bu sonuçlar β -galaktozidaz enziminin farklı sıcaklık uygulamalarında elde edildiği kaynak bakteriye göre hem aktivitesinin hem de stabilitesinin değiştiğine işaret etmektedir. Enzim aktivitelerindeki sıcaklığa bağlı oluşan değişimler, enzim proteininde meydana gelen konformasyonel değişimlere bağlanabileceğinden, test edilen bakteriler tarafından üretilen enzimlerin konformasyonel yapılarının da farklı olabileceği söylenebilecektir. *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. KC603 ve *Jiangella* sp. 8K307 enzim çözeltilerinin 60-70°C gibi yüksek sıcaklık değerlerinde de aktivite göstermesi nedeniyle; düşük sıcaklıkta uzun süreli pastörizasyon

proseslerinde de (63°C’de 30 dakika) aktif kalabileceği söylenebilecektir. Isıl işlem sonrası aktif olması istenilen durumlarda bu özellikteki enzimin pastörizasyon öncesi ortama ilave edilebilmesi önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Elde edilen enzimlerin sıcaklığa dayanım özellikleri, literatürlerde toprak bakterileri için verilen değerlerle paralellik göstermektedir.

Literatürde de farklı sıcaklıklarda optimum aktivite ve stabilite gösteren β -galaktozidaz enzimleri bildirilmektedir. Örneğin Collinge ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada *Streptomyces coelicolor* tarafından üretilen β -galaktozidaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının 65°C olduğu (0,0174 u mol/ mg/min) ve 70°C’de de aktivite gösterdiği raporlanmıştır (Collinge et al., 1974). Nakao et al. (1994) tarafından da *Saccharopolyspora rectivirgula*’dan üretilen ekstraselüler β -galaktozidaz enzimin pH 7,2’de, 60°C’de ve 10 μ M MnCl₂ varlığında 4 saat stabil kaldığı bildirilmiştir.

4.3.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilesi Üzerine pH’nın Etkisi

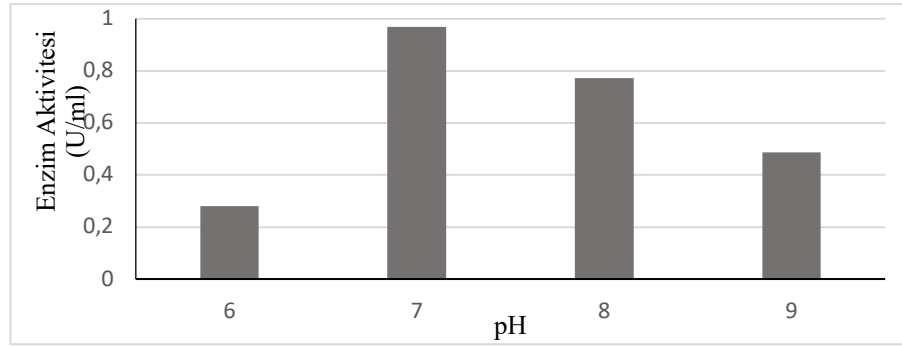
Üretilen 3 farklı bakteriye ait β -Galaktozidazlara ait optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla her birisinin pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0’da aktiviteleri belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin optimum çalışma pH’sının 7,0 olduğu; pH 4,0 ve 5,0’de aktivite göstermediği saptanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi

pH	Enzim Aktivitesi (U/mL)*
4,0	-
5,0	-
6,0	0,279±0,013 ^d
7,0	0,969±0,004 ^a
8,0	0,773±0,022 ^b
9,0	0,486±0,004 ^c

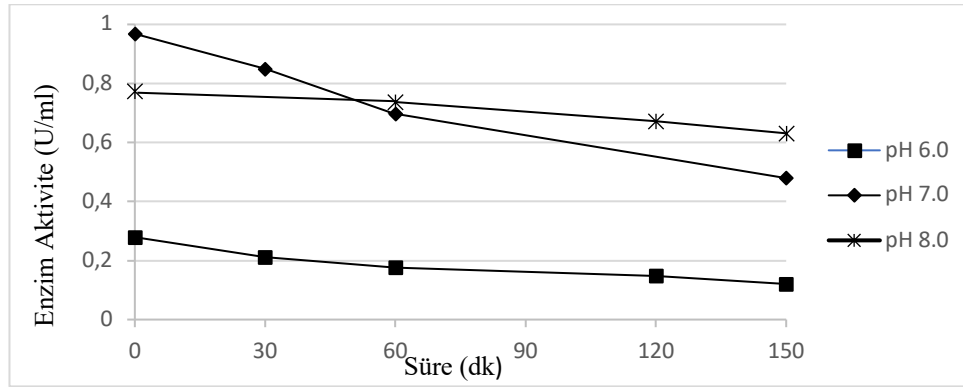
*: Aynı sütunda farklı harfle (a,b,c,d) işaretli ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Şekil 4.15’de verilen *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enziminin aktivite gösterdiği pH değerlerine ait grafikte, pH değerlerine ait aktivite düzeyleri arasında var olduğu görülen farkın istatistiksel değerlendirmede önemli olduğu (p<0,05) belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırma testi sonucunda, tüm pH değerlerindeki aktivitelerin birbirinden önemli düzeyde farklı olduğu görülmüştür (p<0,05).



Şekil 4.15. *Streptomyces* sp. 3K401 β-galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

En yüksek enzim aktivitesinin belirlendiği pH 7,0'nin bir alt ve bir üst pH değerlerinde (pH 6,0, 7,0 ve 8,0) stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. *Streptomyces* sp. 3K401 β-galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

pH 6,0'da 150 dakika muamele sonunda belirlenen enzim aktivitesinin ($0,121 \pm 0,003$) başlangıç aktivitesinin ($0,279 \pm 0,001$) %43,37'si olduğu; 30 dakika sonunda enzim çözeltisinin aktivitesindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). pH 7,0'da 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin ($0,479 \pm 0,014$) başlangıç aktivitesinin ($0,968 \pm 0,077$) %49,48'u olduğu; pH 8,0'da 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin ($0,631 \pm 0,003$) başlangıç aktivitesine kıyasla ($0,773 \pm 0,022$) %81,6 oranında korunduğu gözlenmiştir. pH 7,0'da 30 dakika sonunda enzim çözeltisinin aktivitesindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). pH 8,0'da ise 30 dakika sonunda enzim çözeltisinin aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı ($p > 0,05$); başlangıç ve 60 dakika arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

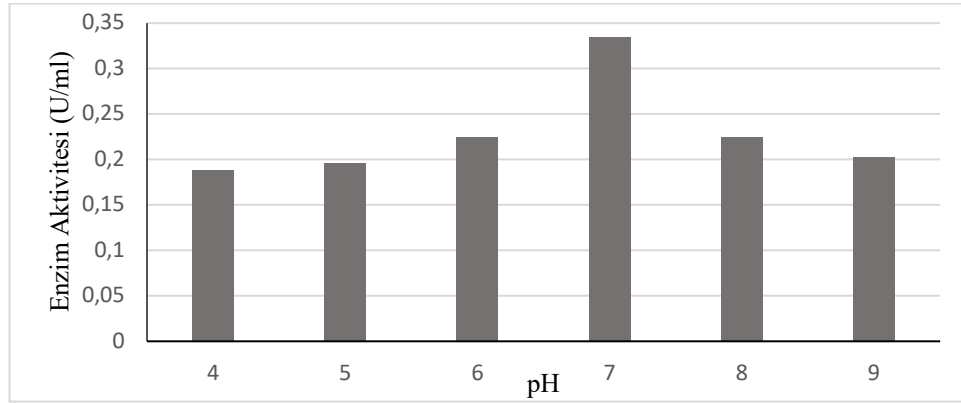
Jiangella sp. 8K307 bakterisi tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin optimum çalışma pH'sının 7,0 olduğu ve 4,0- 9,0 pH arasında aktivite gösterebildiği belirlenmiş; aktivite düzeyleri Tablo 4.8'da verilmiştir.

Farklı pH değerlerinde gösterilen enzim aktiviteleri arasında önemli fark bulunduğu ($p<0,05$); optimum pH değeri olarak belirlenen pH 7,0'de gözlenen enzim aktivitesinin bunu takip eden 6,0 ve 8,0 değerlerinden önemli düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Şekil 4.17'da bu farkın görsel olarak da belirgin şekilde farkedildiği görülmektedir.

Tablo 4.8. *Jiangella* sp. 8K307 β -galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

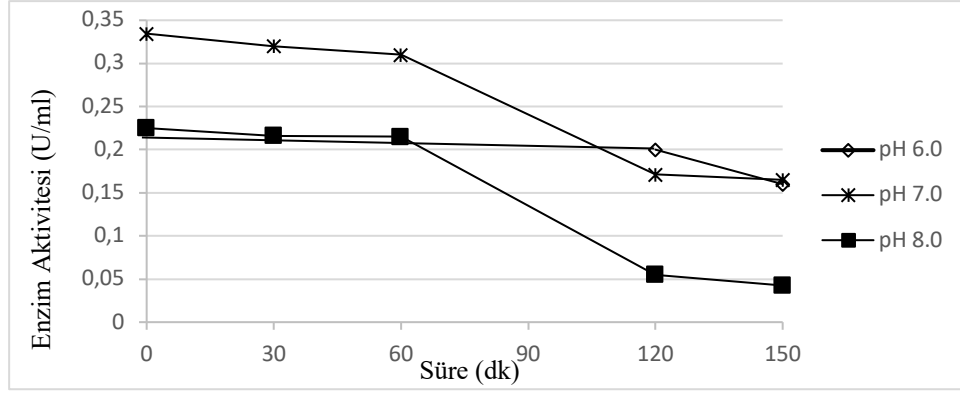
pH	Enzim Aktivitesi (U/mL)*
4,0	0,188±0,030 ^b
5,0	0,196±0,017 ^b
6,0	0,225 ±0,030 ^b
7,0	0,334±0,006 ^a
8,0	0,225±0,035 ^b
9,0	0,203 ±0,009 ^b

*: Aynı sütunda farklı harfle (a,b) işaretli ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.17. *Jiangella* sp. 8K307 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Jiangella sp. 8K307 bakterisi tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin stabilite çalışmalarında en yüksek değeri veren pH 7,0 ile bunu takip eden pH 6,0 ve 8,0 ortamlarında tutulma süresinin enzim stabilitesine etkisi saptanmış ve Şekil 4.18'de sunulmuştur.



Şekil 4.18. *Jiangella* sp. 8K307 β-galaktozidaz enziminin stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

pH 6,0'da 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin (0,16±0,014) başlangıç aktivitesinin (0,225 ±0,03) %71,1'i olduğu; başlangıç ile 120 dakika muameleye kadar ölçülen enzim aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$); 150 dakika muamele sonunda belirlenen enzim aktivitesinin ise başlangıç değerinden istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). pH 7,0'da 150 dakika sonunda belirlenen enzim aktivitesinin (0,165±0,03) başlangıç aktivitesinin (0,334±0,006) %49,4'ü olduğu; başlangıç ile 30 ve 60 dakikada ölçülen enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) başlangıç ile 120 dakika arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). pH 8,0'da 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin (0,042±0,005) başlangıç aktivitesinin (0,225±0,035) %18,89'u olduğu görülmüş ve benzer şekilde başlangıç aktivitesi ile 120 dakika arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

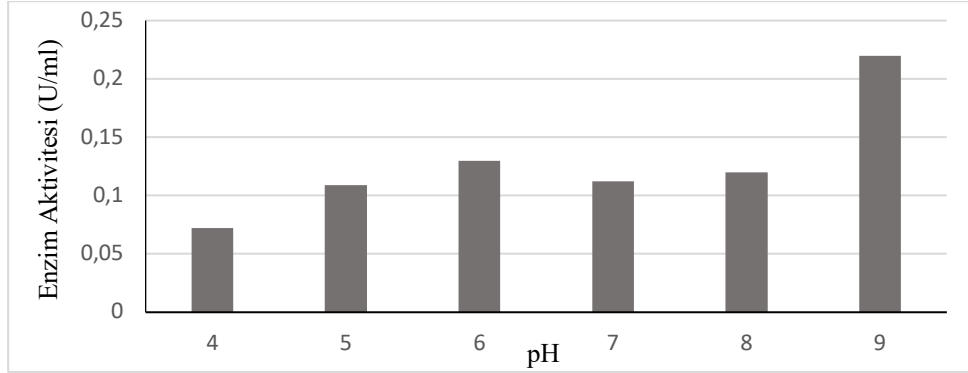
Jiangella sp. KC603 tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış β-galaktozidaz enzim çözeltilisinin optimum çalışma pH'sı pH 9,0 olarak saptanmış, farklı pH değerlerinde elde edilen aktivite düzeyleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. *Jiangella* sp. KC603 β-galaktozidaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Enzim Aktivitesi (U/mL)*
4,0	0,072±0,000 ^d
5,0	0,109±0,043 ^c
6,0	0,130±0,014 ^b
7,0	0,112±0,004 ^b
8,0	0,120±0,002 ^b
9,0	0,220 ±0,050 ^a

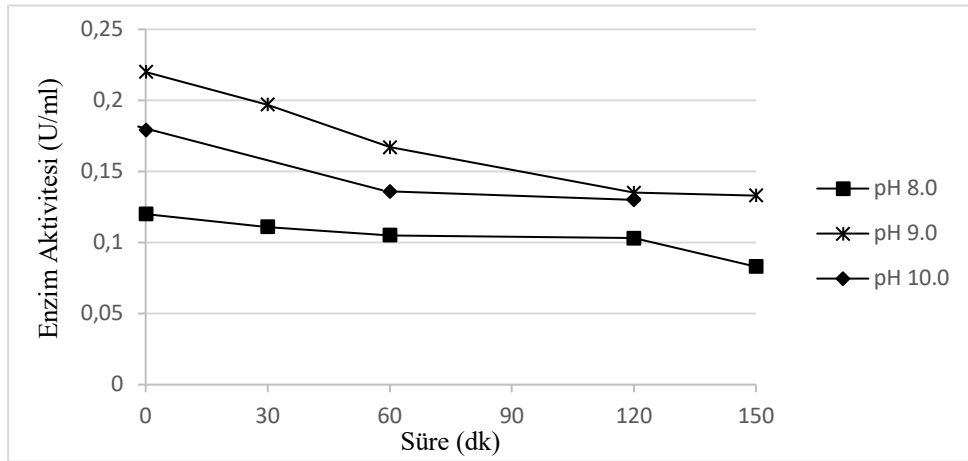
*: Aynı sütunda farklı harfle (a,b,c,d) işaretli ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Farklı pH değerlerinde belirlenen enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark bulunduğu saptanmış ve yapılan karşılaştırma testi sonucunda pH 9,0'da gözlenen enzim aktivitesinin hem gerçek değer olarak (Şekil 4.19) hem de istatistiksel olarak diğer pH değerlerinde belirlenenlerden önemli düzeyde farklı ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.19. *Jiangella* sp. KC603 β -galaktozidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Jiangella sp. KC603 β -galaktozidaz enziminin termal stabilitesi, maksimum aktivite belirlenen pH 9,0 ile bunun bir alt ve bir üst pH değerlerinde (8,0 ve 10,0 pH) belirlenmiş ve 8,0, 9,0, 10,0 pH değerlerinde süreye bağlı aktivite değişimi Şekil 4.20'da verilmiştir.



Şekil 4.20. pH'nın *Jiangella* sp. KC603 enzim çözeltisinde enzim stabilitesi üzerine etkisi

pH 8,0'da 150 dakika sonunda belirlenen β -galaktozidaz enzim aktivitesinin ($0,083\pm0,011$) başlangıç aktivitesinin ($0,120\pm0,002$) %69,17'si olduğu; başlangıç ile 30, 60 ve 120 dakika muamele sonunda ölçülen enzim aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$); 150 dakika bekletilen enzim çözeltisinin aktivitesinin ise başlangıç ile istatistiksel olarak farklı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). pH 9,0'da 150

dakika sonunda saptanan enzim aktivitesinin (0,133±0,007) başlangıç aktivitesinin (0,22±0,05) %60,45'i olduğu; başlangıç ile 30 dakika muamele sonrası ölçülen enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken (p>0,05) başlangıç ile 60 dakika muamele sonrası değer ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (p<0,05). pH 10,0'da da 150 dakika muamele sonunda saptanan enzim aktivitesinin (0,130±0,009) başlangıç enzim aktivitesinin (0,179±0,004) %72,62'si olduğu ve başlangıç aktivitesi ile 60 dakika muamele sonrası ölçülen değer arasındaki farkın önemli düzeyde olduğu (p<0,05) belirlenmiştir.

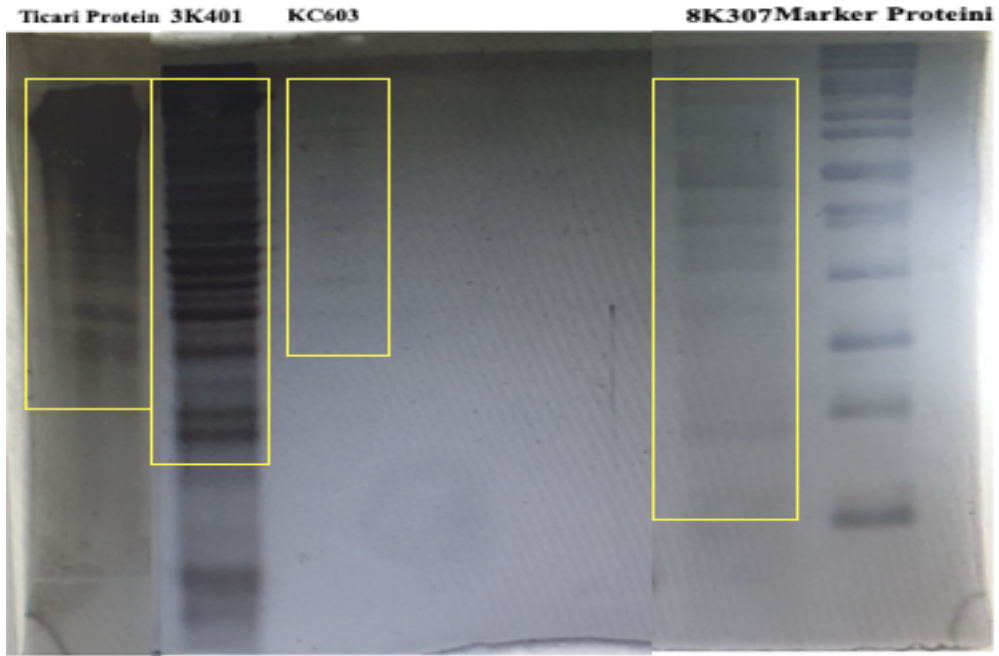
Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen β -galaktozidaz enziminin optimum pH değerleri çalışmada olduğu gibi literatürde de birbirinden farklılık göstermektedir. β -galaktozidaz enzimin optimum çalışma pH'sı; Tanaka et al. (1975) tarafından *A.oryzae*'dan elde edilen enzim için 4,5 pH, *L. helveticus*'dan elde edilen enzim için 6,5 pH olarak belirlenirken; De-Macias et al. (1983a) tarafından *Str. thermophilus* β -galaktozidazının 7,2 pH (Princely et al., 2013); Oluwaniyi et al., (2016) tarafından da *K. lactis*'ten elde edilen enzimin optimumunun 6,5 pH olduğu raporlanmıştır. 2009 yılında Hildebrant ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada *Artrobacter* sp. 32c'den izole edilen β -galaktozidaz enziminin pH 6,5'te maksimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Maity ve arkadaşları tarafından da toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin optimum pH 7,0'da çalıştığı belirtilmiştir (Maity et al., 2013). *Artrobacter* sp. 32cB'deki β -galaktozidaz üretim geninin *E. coli*'ye klonlanmasıyla elde edilen enzimin maksimum aktivitesinin pH 8,0'da görüldüğü bildirilmiştir (Pawlak-Szukalska et al., 2014).

Streptomyces sp. 3K401 *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 enzim çözeltilerinin içme sütü (pH 6,4-6,8) proseslerinde kullanılabileceği; ek olarak, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 enzim çözeltilerinin peynir altı suyunun (pH 4,3-4,6) değerlendirilmesinde de kullanılabileceği düşünülmektedir.

4.4. Enzimlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Streptomyces sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 izolatlarından elde edilerek diyaliz ile kısmi saflaştırılan β -galaktozidaz enzimleri ile Maysa Gıda'dan temin edilen ticari Maylactase enzimine Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) uygulanarak (Laemmli, 1970) belirlenen elektrofrez jel bantları Şekil 4.21'de verilmiştir.

Ticari Enzim, *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. KC603 ve *Jiangella* sp. 8K307 enzim çözeltilerinin benzer şekilde birden fazla protein bantları verdikleri belirlenmiştir. Marker ile karşılaştırıldığında; *Jiangella* sp. 8K307’de gözlenen protein bantlarının 70, 100 ve 150 kDa bölgesindeki bantlara denk geldiği ve 150 kDa bölgesindeki protein bandının daha yoğun bulunduğu görülmektedir. *Jiangella* sp. KC603’de 100-120 kDa bölgesindeki bantlarla eşleştiği görülen oldukça silik bantlar elde edilmiş ve bu durum çözeltideki enzim konsantrasyonunun düşük olmasına bağlanmıştır. Enzim çözeltileri arasında en belirgin bantlara *Streptomyces* sp. 3K401’in sahip olduğu ve *Jiangella* sp. KC603 ile *Jiangella* sp. 8K307’ye benzer şekilde 100 ve 150 kDa aralığında protein bantları verdiği görülmekle birlikte; 40-50 kDa aralığında da belirgin bantlara sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil. 4.21. Kısmi saflaştırılmış β -galaktozidaz örneklerinin SDS-PAGE profili

SDS-PAGE jel görüntüsünde her bir enzim çözeltilisine ait birden fazla bant gözlenmesi, kısmi saflaştırılmış enzim çözeltilisinde enzim dışında protein fraksiyonlarını da içerdiğine işaret etmektedir. *Jiangella* sp. KC603 ve *Jiangella* sp. 8K307 enzim çözeltilerinde belirgin ve keskin protein bantlarının görülmemesi, çözeltideki enzim konsantrasyonunun düşük olmasına bağlanmıştır.

Uyanık (2008) tarafından iyon değişim kromatografileri ile saflaştırılan *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 β -galaktozidaz enziminin protein bantları markerın 135 kDa ağırlığındaki bölgesinde belirgin olarak gözlenmiştir. Ayrıca

çalışmaya benzer şekilde iç içe geçmiş protein bantları görüldüğü de eklenmiştir (Uyanık, 2008). Yine Duan et al. (2017) tarafından da *Bacillus circulans*'tan *E. coli*'ye klonlanarak üretilen ekstraselüler β -galaktozidaz enziminin molekül ağırlığı tayininde jelde birden çok protein bandı görülmüş ve belirgin bandın 97,2 kDa molekül ağırlığında olduğu bildirilmiştir.

Chanalia et al. (2018) tarafından amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleriyle saflaştırılan *Pediococcus acidilactici* β -galaktozidaz enziminin 39,07 kDa molekül ağırlığına ve 15,55 ve 19,58 kDa alt ünitelere (heterodimer yapı) sahip olduğu bildirilmiştir.

Saccharopolyspora rectivirgula bakteri izolatından elde edilen termostabil β -galaktozidaz enziminin molekül ağırlığının 145 kDa olduğu (Nakao et al., 1994); *Arthrobacter* sp. 32c'den *E.coli* ve *Pichia pastoris*'e klonlanarak üretilen β -galaktozidaz enziminin molekül ağırlığının 110 kDa'un üstünde olduğu (Hildebrandt et al., 2009) ve *Arthrobacter* sp. 32 cB'den *E. coli*'ye klonlanarak üretilen β -galaktozidaz enziminin 2 alt üniteden oluştuğu ve yaklaşık 257 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu (Pawlak-Szukalska et al., 2014) raporlanmıştır. Tüm bu literatür verileri incelendiğinde β -galaktozidaz enzimin elde edildiği kaynağa göre farklı molekül ağırlığına sahip olabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, Saygın (2019) tarafından farklı bölgeler ve farklı koşullara sahip topraklardan izole edilerek stoklanan bakterilerin; endüstriyel alanda talep gören ve kullanımı fazla olan transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzimi üretim yetenekleri araştırılarak enzim aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen enzimlerin ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiş, enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklık, pH gibi faktörlerin etkisi belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE ile molekül ağırlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar ile öneriler aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Çöl, kıraç topraklar ile tatlı su ve deniz sedimentleri örneklerinden izole edilen ve tüm genom verisi bulunan 42 aktinobakteri izolatlarının biyoinformatik taraması sonucunda; transglutaminaz enzimi üretim genine tümünün, β -galaktozidaz üretim genine 35'inin ve levansukraz üretim genine 2'sinin sahip olduğu belirlenmiştir.
- 2) Transglutaminazın enzim üretim yeteneğinin belirlenmesi amacıyla katı besiyerinde yürütülen kalitatif taramada diğer izolatlarla kıyasla daha yoğun kahverengi renk oluşumu gözlenen ve daha hızlı gelişen *Streptomyces* sp., *Pseudonocardia* sp., *Actinomadura* sp., *Jiangella* sp., *Kribella* sp., *Actinocorallia* sp., *Nonomuraea* sp., *Pseudonocardia* sp. cinslerine ait 9 bakteri izolatu; β -galaktozidaz enzim üretim yeteneğinin belirlenmesi amacıyla kontrol grubuna kıyasla yoğun sarı renk oluşturan ve diğerlerine kıyasla hızlı gelişen *Jiangella* sp., *Nonomuraea* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp., *Saccaropolyspora* sp. cinslerine ait 17 bakteri izolatu ileriki çalışmalar için seçilmiştir.
- 3) Levansukraz enzim üretim geninin ekspresyonunun incelendiği katı besiyerinde gerçekleştirilen çalışmada pozitif sonuç veren 2 bakteri izolatına (*Micromonospora* sp.) ek olarak, izolatların parçalı genom verisine sahip olup enzim kodlayan gen bölgelerinin tamamının aynı genom parçasında bulunmayabileceği düşünülerek biyoinformatik taramada negatif sonuç veren tüm izolatlar taranmış (Söz konusu durum diğer enzimler için de uygulanmıştır), ancak hiçbir bakteride katı besiyerinde mukoid yapı oluşturma fenotipi gözlenmemiştir. Aynı izolatların levansukraz enzimi üretimi için tasarlanan sıvı besiyerinde de aktivite varlığı taranmış, ancak hiçbirinde levansukraz üretimi saptanmamıştır.

- 4) Transglutaminaz enzimi üretimi için seçilen 9 bakterinin üretim için tasarlanan sıvı besiyerinde ve sonradan karar verilerek kullanılan Nutrient Broth besiyerinde enzim üretimi gözlenmemiştir. Bu problemin ileriki çalışmalarda besiyeri optimizasyonu ve ilgili gen bölgesinin *E.coli*'de ekspresyonu ile aşılması planlanmıştır.
- 5) β -galaktozidaz üretimi için seçilen bakterilerin enzim üretimi için tasarlanan sıvı besiyerinde ürettikleri enzim miktarı da dikkate alınarak *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 izolatlarının enzim üretiminde kullanılmasına karar verilmiştir. Seçilen izolatların ham enzim çözeltilerinin aktivite değerleri sırasıyla $0,975\pm 0,004$, $0,365\pm 0,009$, $0,306\pm 0,008$ U/ml olarak belirlenmiştir.
- 6) β -galaktozidaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi (%60 doygunlukta), ultrafiltrasyon ve diyaliz işlemleri uygulanmıştır. *Streptomyces* sp. 3K401 enzim çözeltilisinden $1,294\pm 0,14$ kat ve %79,28 verimle saflaştırılmış $3,588\pm 0,0007$ U/mg protein spesifik aktivite değerine sahip β -galaktozidaz; *Jiangella* sp. 8K307 enzim çözeltilisinden $1,162\pm 0,12$ kat ve %61,6 verimle saflaştırılmış $1,32\pm 0,09$ U/mg protein spesifik aktivite değerine sahip β -galaktozidaz; *Jiangella* sp. KC603 enzim çözeltilisinden de $1,073\pm 0,007$ kat ve %39,21 verimle saflaştırılmış $1,262\pm 0,02$ U/mg protein spesifik aktivite değerine sahip β -galaktozidaz elde edilmiştir.
- 7) *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin 40°C 'de maksimum aktivite gösterdiği ($1,355\pm 0,077$ U/ml) ve 50°C 'de 150 dk muamele sonunda aktivitesinin %2,1'ini koruduğu; *Jiangella* sp. 8K307 enzim çözeltilisinin 50°C 'de maksimum aktivite ($0,2540\pm 0,012$ U/ml) gösterdiği ancak test edilen diğer sıcaklık değerlerinde de belirgin bir düşüşün gözlenmediği ve 60°C 'de 150 dakika muamele sonunda aktivitesinin %25,16'sını koruduğu; *Jiangella* sp. KC603 enzim çözeltilisinin de maksimum aktiviteyi 50°C 'de ($0,304\pm 0,007$) gösterdiği ve 60°C 'de 150 dakika muamele sonunda aktivitesinin %37,98'ini koruduğu saptanmıştır.
- 8) *Streptomyces* sp. 3K401 β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin pH 7,0'de en yüksek aktivite ($0,9685\pm 0,004$) ve pH 8,0'de en yüksek stabiliteye; *Jiangella* sp. 8K307 β -galaktozidaz enzim çözeltilisinin pH 7,0'de en yüksek aktive ($0,334\pm 0,006$) ve pH 6,0' da en yüksek stabiliteye; *Jiangella* sp. KC603 β -galaktozidaz enzim

çözeltisinin pH 9,0'da en yüksek aktivite ($0,220\pm 0,05$) ve pH 10'da en yüksek stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir.

- 9) SDS-PAGE sonucunda enzim çözeltilerinin kısmi saflaştırma uygulaması sebebiyle birden fazla protein bandına sahip olduğu ve ticari enzim çözeltisi ile benzer aralıkta bantlar içerdiği gözlenmiştir.
- 10) *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. KC603 ve *Jiangella* sp. 8K307 enzim çözeltilerinin yürütülen aktivite çalışmalarında 60-70°C gibi yüksek sıcaklık değerlerinde de aktivite göstermesi nedeniyle; düşük sıcaklık ile yapılan pastörizasyon proseslerinde (63°C'de 30 dakika) aktif kalabileceği; bu yöntem kullanılarak üretilen ve enzim işlevi istenilen ürünlere ısıl işlem öncesi de katılabileceği düşünülmektedir.
- 11) *Streptomyces* sp. 3K401, *Jiangella* sp. 8K307 ve *Jiangella* sp. KC603 enzim çözeltilerinin içme sütü (pH 6,4-6,8) proseslerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.
- 12) Nötr veya alkali pH'larda iyi çalışan bakteri β -galaktozidaz enzim çözeltileri gıda dışı uygulama alanı olarak belirtilen farmakolojik uygulamalarda da kullanılabilecektir.

Gerçekleştirilen tez çalışması ile elde edilen ve yukarıda özetlenen sonuçlardan hareketle toprak bakterilerinin farklı alanlarda ve farklı proses şartlarında aktivite (sıcaklık, pH vb.) gösterebilecek enzimlerin izolasyonu için daha geniş olarak taranmasının uygun olacağı, genetik modifiye edilmemiş enzim kaynağı mikroorganizma olarak potansiyel taşıyabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abd-Rabo, F.H.R., El-Dieb, S.M., Abd-El-Fattah, A.M., Sakr, S.S. (2010). Natural state changes of cow's and buffaloes' milk proteins induced by microbial transglutaminase. *Journal of American Science*, 6(9), 612-620.
- Abdel-Fattah, A.F., Mahmoud, D.A., Esawy, M.A. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, 51, 402-407.
- Adıgüzel, A.O. (2020). Production and characterization of thermo-, halo-and solvent-stable esterase from *Bacillus mojavensis* TH309. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(3), 1-17.
- Akcan, N. (2018). Cultural conditions optimization for production of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 under solid-state fermentation. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(3), 240–247.
- Akın, N., Gündüz, A., Konak, Ç. (2012). Teknolojik Açıdan Süt Ürünlerinde Laktoz Dönüşümleri ve İntoleransı. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 10(4),77-84.
- Al-jazairi, M., Abou-ghorra, S., Bakri, Y., Mustafa, M. (2015). Optimization of β -Galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *International Food Research Journal*, 22(4), 1361-1367.
- Altaş Kıymaz, N., (2007). *Hypocrea jecorina QM9414 Kültürlerinde Beta Galaktozidazın Karakterizasyonu ve Kısmi Saflaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- Alves, F.G., Filho, F.M., de Medeiros Burkert, J.F., Kalil, S.J. (2009). Maximization of β -Galactosidase Production: A Simultaneous Investigation of Agitation and Aeration Effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(5), 1528-1539.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuuara, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2613-2617.
- Anonim, 2005. Sayfa 358. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Editör: Halkman, A.K. Ankara: Başak Matbaacılık.
- Arvidson S, Rinehart B, Gadala-Maria F. (2006). Concentration Regimes of Solutions of Levan Polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 144-149.
- Avcıbaşı, Y. (1991). *Domuz Ciğeri ve Bezelye Tohumundan Diamin Enziminin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü Anabilim Dalı, İstanbul, 2-3.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., Dejongh, M. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology, *BMC Genomics*, 9(75), 1-15.
- Bahrim, G., Iancu, C., Butu, N., Negoita, T. (2010). Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 5197-5203.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clement, C., Ouhdouch, Y., Wezel, G. (2015). Taxonomy, Physiology and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Barredo, J.L. (2005). *Methods in Biotechnology*. New Jersey: Human Press, 1-27.
- Beckhorn, E.J., Labbee, M.D., Underkofler, L.A. (1965). Food Additives, Production and Use of Microbial Enzymes for Food Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13(1), 30-34.

- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova L, Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38, 701-706.
- Belghith, K.S., Dahech, I., Belghith, H., Mejdoub, H. (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 451–458.
- Benigar, E., Dogsa I., Stopar, D., Jamnik, A., CigicI., Tomsic, M. (2014). Structure and Dynamics of a Polysaccharidematrix: Aqueous Solutions of Bacterial Levan. *Langmuir*, 30(14), 4172-4182.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58, 1-26.
- Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*, 65, 385-395.
- Bourneow, C., Benjakul, S., Sumpavapol P., H-Kittikun, A. (2012). Isolation and Cultivation of Transglutaminase- Producing Bacteria From Seafood Processing Factories. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 28-39.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Braga, A.R.C., Gomes, P.A., Kalil, S.J. (2012). Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1653-1663.
- Bugg, T.D. (2001). *Enzymes: General Properties. Encyclopedia of Life Sciences.* doi:10.1038/npg.els.0000709
- Bull, A.T., Horikoshi, K. (eds). (2011). *Extremophiles Handbook*. Switzerland: Springer. 1203-1240.
- Campos, N., Castanon, S., Urreta, I., Santos, M., Torne, J.M. (2013). Rice transglutaminase gene: Identification, protein expression, functionality, light dependence and specific cell location. *Plant Science*. 205-206, 97-110.
- Carevic, M., Vukasinovic, M., Grbavčić, S., Stojanovic, M., Mihailovic, M., Dimitrijević, A., Bezbradica, D. (2015). Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hemijaska Industrija*, 69(3), 305-312.
- Casteren, W.H.M., Eirmermann, M., Broek, L.A.M., Vincken, J.P., Schols, H.A., Voragen A.G.J., (2000). Purification and Characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with Activity Towards (modified) Exopolysaccharides from *Latococcus lactis* subsp. *Cremoris* B39 and B891. *Carbohydrate Research*, 329(1), 75-85.
- Celligoi, M.A. (2013). Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1(2), 2-8.
- Ceresino, E.B., Melo, R.R., Kuktaite, R., Hedenqvist, M.S., Zucchi, T.D., Johansson, E., Sato, H.H. (2018). Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: Production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. *Food Chemistry*, 241, 403-410.
- Chambert, R., Gonzy-Treboul, G., Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 41(2), 285–300.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., (1997). *Lipincott's Illustrated reviews*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Champluvier, B., Kamp, H.E., Rouxhet, P.G. (1988). Immobilization of β galactosidase retained in yeast: adhesion of the cells on a support. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 464-469.

- Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., Dhanda, S. (2018). Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorganic Chemistry*, 77, 176-189.
- Chin, K.B., Chung, B.K. (2003). Utilization of Transglutaminase for the Development of Low-Fat, Low-salt Sausages and Restructured Meat Products Manufactured with Pork Hams and Loins. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16(2), 261-265.
- Collinge, A.E., Neubeck, C., Udinsky, J. (1974). "Thermostable Lactase". United States Patent <https://patentimages.storage.googleapis.com/56/d9/9c/7a577f198ab4fe/US3816259.pdf> (Erişim Tarihi: 05.072020).
- Copeland, R.A. (2000). *Enzymes* (2 nd Ed.). Germany: Wiley-Vinçh, 1-10.
- Cote L. (1988). Production of Constitutive Extracellular Levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL-B 1678. *Biotechnology Letter*, 10(12), 879-882.
- Cote, G. L. (1988). Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnology Letters*, 10(12), 879-882.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Chen, J. (2008). Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Bioresource Technology*, 99(9), 3794-3800.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., Chen, J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food Chemistry*, 105, 612-618
- Dagbagli, S., Goksungur, Y. (2008). Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4),
- De Souza, C.F.V., Flores, S. H., Ayub, M.A.Z. (2006). Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. *Process Biochemistry*, 41(5), 1186-1192.
- De-Macias, M.E., DeNadra, M., Saad, A., Holgado, A., Oliver, G. (1983a) Isolation and properties of β -galactosidase of a strain of *Lactobacillus helveticus* isolated from natural whey starter. *The Journal of Applied Biochemistry*, 5, 275- 281.
- De-Macias, M.E., De Nadra, M.C.M., de Saad, A.M.S. (1983b). Isolation and purification of beta galactosidase of *Lactobacillus murinus* CNRZ 313. *Current Microbiology*, 9, 99-103.
- Deng, Y., Xu, M., Ji, D., Agyei, D. (2020). Optimization of β -galactosidase Production by Batch Cultures of *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830™). *Fermentation*, 6(1):27, 2-17.
- Desai, M., Patel, K. (2019). Isolation, optimization, and purification of extracellular levansucrase from nonpathogenic *Klebsiella* strain L1 isolated from waste sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101107.
- Domurcuk, G. (2018). *Farklı İnkübasyon Koşulları ve Stres Faktörlerinin Mikrobiyal Transglutaminaz Üretimine Etkisi, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 59-60, Tokat.
- Duan, X., Hu, S., Qi, X., Gu, Z. (2017). Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* β -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Process Biochemistry*, 53, 17-24.
- Duran, R., Junqua, M., Schmitter, J.M., Gancet, C., Goulas, P. (1998). Purification, characterization and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamomeum* CBS 83.68. *Biochimica et Biophysica Acta*, 80(4), 313-319.
- Dutra Rosolen, M., Gennari, A., Volpato, G., Volken De Souza, C.F. (2015). Lactose hydrolysis in milk and dairy whey using microbial β -galactosidases. *Enzyme Research*, 2015, 1 – 7.

- Edwards, C. (1993). Isolation Properties and Potential Application of Thermophilic Actinomyces. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42, 161-179.
- Ekren, G.S. (2013). *Production, purification and characterization of phytase from phytase producing fungus*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, 108-120.
- El-Yazeed Abd El-Salam, B.A., El-Hamid Ibrahim, O.A., El-Sayed Amer, A. (2020). Efficient enzymatic conversion of lactose in milk using fungal β -galactosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101813.
- EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute (2020), Catalytic Site Atlas Erişim: 26.06.2020, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>
- Erdal, Ö., Döner, F., Kaplan, B.T., Göksungur, Y. (2016). Mirobiyel Yolla Üretilen Levansukrazlar ve Sentezlediği Biyopolimerler. *Gıda*, 41(4), 283-290.
- Erdal, Ö., Kaplan-Türköz, B., Taştan, Ö., Göksungur, Y. (2017). Levansucrase production by *Zyomonas mobilis*: Optimization of process parameters and fructooligosaccharide production. *Journal of Food Biochemistry*, 41(3), 3-9.
- Falcone, P., Serafin-Fracassini, D., Del-Duca, S. (1993). Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. *Journal of Plant Physiology*, 142(3). 265- 273.
- Fatima, S.W., Tiwari, R., Khare, S.K. (2019). Utilization of Agro-industrial Waste for Production of Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Bioresource Technology*, 287, 121391.
- Felicilda-Reynaldo, R.F., Kenneally, M. (2016). Digestive enzyme replacement therapy: pancreatic enzymes and lactase. *Medsurg Nursing.*, 25(3), 182- 185.
- Fenical, W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews*, 93(5), 1673-1683.
- Fiss, E., Brooks, G.F. (1991). Use of a siderophore detection medium, ethylene glycol degradation, and beta-galactosidase activity in the early presumptive differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and rapidly growing *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(7), 1533-1535.
- Folk, J.E., Finlayson, J.S. (1977). The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Advances in Protein Chemistry*, 31, 1-133
- Fowler, A., Zabin, I. (1978). Amino acid sequence of β -galactosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 253(15), 5521-5525.
- Fu, L., Wang, Y., Ju, J., Cheng, L., Xu, Y., Yu, B., Wang, L. (2020) Extracellular production of active-form *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Bacillus subtilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 623-631.
- Fujita, K., Ogata, Y., Hara, K., Terada, A., Hara, H., Mitsuoka, T. (1995) Effect of 4G- β -D-galactosylsucrose lactosucrose on intestinal flora. *Proc Res Soc Jap Sugar Reiiin Technol*, 43, 83-91.
- Fujita, K., Osawa, T., Mikuni, K., Hara, K., Hashimoto, H., Kitahara, S. (1991) Production of lactosucrose by β -fructofuranosidase and some of its physical properties. *Dennpun Kagaku* 38(1), 1-7.
- Fujimura, Y., Rokushika, S., Ohnishi, M. (2003). Purification and molecular characterization of beta galactosidase from yeast *Kluyveromyces lactis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3, 97-103.
- Füreder, V., Rodriguez-Colinas, B., Cervantes, F.V., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Plou, F.J. (2020). Selective synthesis of galactooligosaccharides containing

- $\beta(1\rightarrow3)$ linkages with β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* (Saphera). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(17), 4930-4938.
- Garriga, M., Almaraz, M. and Marchiaro, A. (2017). Determination of Reducing Sugars in *Undaria Pinnatifida* (Harvey) Algae by UV-Visible Spectrophotometry (DNS Method). *Actas de Ingeniería*, 3(2017), 173-179.
- Gaspar, A.L.C., de Góes-Favoni, S.P. (2015). Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chemistry*, 171, 315–322.
- Geiger, B., Nguyen, H.-M., Wenig, S., Nguyen, H.A., Lorenz, C., Kittl, R., Nguyen, T.-H. (2016). From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 45–53.
- Gembh, S.V., Jr Taylor, H.M.F, Brown. E.M., Marmer, W.N. (2005). Application of transglutaminase to derivatize proteins: 1. Studies on soluble proteins and preliminary results on wool. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 418–424.
- Gerber, U., Jucknischke, U., Putzien, S., Fuchsbauer, H.L. (1994). A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Biochemical Journal*, 299, 825–829.
- Gerrard, J.A., Fayle, S.E., Brown, P.A., Sutton, K.H., Simmons, L., Rasiah, I. (2001). Effects of Microbial Transglutaminase on the Wheat Proteins of Bread and Croissant Dough. *Journal of Food Science*, 66(6), 782–786.
- Giordano, D., Facchiano, A. (2018). Classification of microbial transglutaminases by evaluation of evolution trees, sequence motifs, secondary structure topology and conservation of potential catalytic residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 509(2), 506-513.
- Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121(5), 307–318.
- Groep, M.E., Gregory, M.E., Kershenbaum, L.S., Bogle, I.D.L. (2000). Performance modeling and simulation of biochemical process sequences with interacting unit operations. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(3), 300–311.
- Guan, T.W., Tang, S.K., Wu, Y.Z., Zhi, X.Y., Zhang, L.L., Li, W.J. (2009). *Haloglycomyces albus* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Glycomycetaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1297-1301.
- Guerra-Rodríguez, E., Vázquez, M. (2013). Technical and economical evaluation of microbial transglutaminase production on enzymatic hydrolyzates of potato (*Solanum tuberosum*) *CyTA- Journal of Food*, 11(3), 277-284.
- Guerra-Rodríguez, E., Vázquez, M. (2014). Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(4), 784-791.
- Gupte, A.M., Nair, J.S. (2010). β -Galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 69, 855-859.
- Haider, T., Husein, Q. (2007). Calcium alginate entrapped preparation of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 72-80.
- Hashim, O. H., Adnan, N. A. (1994). Coenzyme, Cofactor and Prosthetic Group. *Biochemical Education*, 22(2), 1-2.

- Hellmuth, K., van den Brink, J. M. (2013). Microbial production of enzymes used in food applications. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*, 262-287.
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical Journal*, 309(1), 113–118.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*, 177, 2834–2839.
- Hildebrandt, P., Wanarska, M., Kur, J. (2009). A new cold-adapted β -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiology*, 9(1), 151.
- Ho, M.-L., Leu, S.-Z., Hsieh, J.-F., Jiang, S.-T. (2000). Technical Approach to Simplify the Purification Method and Characterization of Microbial Transglutaminase Produced from *Streptovercillium ladakanum*. *Journal of Food Science*, 65(1), 76–80.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical Journal*, 407(2), 189–198.
- Hsu, C.A., Lee, S.L, Chou, C. (2007) Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Lactobacillus pentosus* purification characterization and formation of galactooligosaccharides from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2225–2230.
- Huang, W., Li, L., Wang, F., Wan, J., Tilley, M., Ren, C., Wu, S. (2010). Effects of transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough. *Food Chemistry*, 121(4), 934-939.
- Huber, R.E. and Brenner, S., Miller, J.H. (eds). (2001). *Encyclopedia of Genetics*. Cambridge: Academic Press. 212-214.
- Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41-62.
- Ianiro, G., Pecere, S., Giorgio, V., Gasbarrini, A., Cammarota, G. (2017). Digestive enzyme supplementation in gastrointestinal diseases. *Current Drug Metabolism*, 17(2), 187-193.
- Ibrahim, O.A., Nour, M.M., Khorshid, M.A., El-Hofi, M.A., El-Tanboly, E.E., Abd-Rabou, N.S. (2017). UF-White sfot cheese cross-linker by rosemary transglutaminase. *International Journal of Dairy Science*, 12 (1), 64-72.
- Igarashi, Y. (2004). Screening of Novel Bioactive Compounds from Plant-Associated Actinomycetes. *Actinomycetol*, 18(2), 63-66.
- Inthanavong, L., Tian, F., Khodadadi, M., Karboune, S. (2013). Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Biotechnology Progress*, 29(6), 1405–1415.
- Işık, B. (2012). Çinko eksik koşullarda yetiştirilmiş *Hordeum spontaneum* C. Koch gövdesinden kurulumuş baskılayıcı çıkarım hibridizasyon kütüphanesinden seçilen cDNA'ların moleküler ve biyoinformatik analizleri. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, 18-29.
- Itaya, H., Kikuchi, Y. (2008). Secretion of *Streptomyces mobarensis* pro-transglutaminase by corynform bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 621-625.

- Jakob, F., Meißner, D., Vogel, R.F. (2012). Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species. *Acetic Acid Bacteria*, 1(1), 6-13.
- Ji, D., Oey, I., Agyei, D. (2019). Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of β -galactosidase from *Lactobacillus leichmannii* 313. *LWT-Food Science and Technology*, 16, 108545.
- Jin, M., Huang, J., Pei, Z., Gao, H., Chang, Z. (2016). Purification and characterization of a high-salt-resistant microbialtransglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 6-11.
- Junqua, M., Duran, R., Gancet, C., Goulas, P. (1997). Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 730-734.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M., Shimonishi, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium* sp. strain s-8112. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11565-11572.
- Kang, H., Cho, Y.D. (1996). Purification and properties of transglutaminase from Soybean (*Glycine max*) leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223 (2), 288- 292.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., Suzuki, E. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44252-44260.
- Kaur, H., Gill, P.K. (2019). Microbial Enzymes in Food and Beverages Processing. Grumezescu A. M., Holban A.M. (eds). in: *Engineeering Tools in Beverage Industry* (p. 255-282). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Kazemi, S., Khayati, G., Faezi-Ghasemi, M. (2016). β -galactosidase Production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 Using Inexpensive Substrates in Solid-State Fermentation: Optimization by Orthogonal Arrays Design. *Iranian Biomedical Journal*, 20(5), 287–294.
- Kılıç, Y., Yüksekdağ, Z., Yüksekdağ, H. (2014). Lactobacillus ve Bifidobacterium Cinsi Bakterilerin Beta Galaktozidaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 39(4), 211-218.
- Kieliszek, M., Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59, 241-250.
- Kim, C. S., Ji, E. S., Oh, D. K. (2004). Characterization of a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 1006-1014.
- Kim, H.S., Jung, S.H., Lee, I., Yu, T.-S. (2000). Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(2), 187-194.
- Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C., Goodfellow, M. (2003). *Streptoacidiphilus* gen. nov., *acidophilus* actinomycetes with chemotype I and emendation of yhe family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943) ^{AL}) emend. Rainey et al. 1977. *Antonie van Leeuwenhoek*. 83, 107-116.
- Klein, J.D., Guzman, E., Kuehn, G.D. (1992). Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2599-2605.
- Klein, M.P., Jong, E.V. de, Révillion, J.P.P. (2010). Utilização da β -galactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(6), 1530–1535.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-kyriakides, M. (2007). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1), 150–157.

- Kosciow, K., Deppenmeier, U. (2020). Characterization of three novel β -galactosidases from *Akkermansia muciniphila* involved in mucin degradation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 331-340.
- Kumar, D.J.M., Jayanthisiddhuraj, Amutha, B., Devi, D.M., Kumaran, M.D.B., Kalaichelvan, P.T., (2012a). Purification and Characterization of α -Amylase and β -Galactosidase from *Bacillus* sp. MNJ23 Produced in a Concomitant Medium. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(5), 566-573.
- Kumar, D.J.M., Sudha, M., Devika, S., Balakumaran, M.D., Kumar, M.R., Kalaichelvan, P.T. (2012b). Production and optimization of β -galactosidase by *Bacillus* sp. MPTK 121, isolated from dairy plant soil. *Annals of Biological Research*, 3(4), 1712-1718.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö. (2004). Transglutaminaz ve Proteinlerin modifikasyonunda Kullanımı. *Gıda*. 29(5), 357-364.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 22, 680-685.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1965). Classification des actinomycetes aerobic basee sur leur morphologie et leur composition chimique. *Annales de l'Institut Pasteur*. 108, 662-673.
- Li, W., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2016). Synthesis of raffinose by transfructosylation using recombinant levansucrase from *Clostridium arbusti* SL206. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 43-49.
- Li, W., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2015). Recent Novel Applications of Levansucrases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 6959-6969.
- Lin, Y.-S., Chao, M.-L., Liu, C.-H., Tseng, M., Chu, W.-S. (2006). Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochemistry*, 41(3), 519-524.
- Liu, G. X., Kong, J., Lu, W. W., Kong, W. T., Tian, H., Tian, X. Y., Huo, G. C. (2011). β -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5811-5820.
- Mabel, P.S.G., Jacob, M. (2012). Microbial transglutaminase production by *Streptomyces griseocarneus* MTCC 328 and optimization of nutritional parameters by response surface methodological approach. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 2 (1). 64-78.
- Macedo, J. A., Sette, L. D., Sato, H. H. (2007). Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp., *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(4), 618-626.
- Macedo, J.A., Cavallieri, A.L.F., da Cunha, R.L., Sato, H.H. (2010). The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. *International Dairy Journal*. 20 (10). 673-679.
- Macedo, J.A., Sette, L.D., Sato, H.H. (2008). Optimisation studies for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 904- 911.
- Mağry, E., Fidler, E., Walkowiak, J. (2010). Lactose intolerance-current state of knowledge. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(3), 343-350.
- Maity, M., Sanyal, S., Bhowal, J., Bhattacharyya, D.K. (2013). Studies on isolation and characterization of lactase produced from soil bacteria. *International Journal of Recent Scientific Research*, 2(8), 92-94.
- Martarello, R.D., Cunha, L., Cardoso, S. L., de Freitas, M.M., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y.M., Magalhães, P.O. (2019). Optimization and partial purification of beta-galactosidase

- production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. *AMB Express*, 9(81), 2-13.
- Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (1986). *Harper'in Biyokimyaya Bakışı* (19. Baskı). İzmir: Ege Üni Basımevi, 56-82.
- Matheis, G., Whitaker, J.R (1987) A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 11(4), 309-327.
- Matheus, A., Rivas, N. (2003). Production and partial characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 53(2), 194- 201.
- Matthews, B.W. (2005). The structure of *E.coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus Biologies*, 328(6), 549-556.
- Merenkova, S., Zinina, O., Loretz, O., Neverova, O., Sharaviev, P. (2019). Effects of transglutaminase and bacterial concentrates on the development of functional and technological properties of minced meat. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 387-396.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mitra, A., Santra, S. C., Mukherjee, J. (2008). Distribution of actinomycetes, their antagonistic behaviour and the physico chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 685-695.
- Mohammadipanah, F., Wink, J. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Frontiers in Microbiology*, 6(Article: 1541), 1-10.
- Mostafa, F.A., Abdel Wahab, W.A., Salah, H.A., Nawwar, G.A.M., Esawy, M.A. (2018). Kinetic and thermodynamic characteristic of *Aspergillus awamori* EM66 levansucrase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 232–239.
- Mostafa, H.S. (2020). Microbial transglutaminase: An overview of recent applications in food and packaging. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38 (3), 161-177.
- Mukherjee, S. (2019). Isolation and Purification of Industrial Enzymes: Advances in Enzyme Technology. *Advances in Enzyme Technology*, 41–70.
- Nagy, V., Szakacs, G. (2008). Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 25(8), 1137-1345.
- Nagy, Z., Keresztessy, Z., Szentirmai, A., Biró, S. (2001). Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology*, 41(6), 351–362.
- Nakao, M., Harada, M., Kodama, Y., Nakayama, T., Shibano, Y., Amachi, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(5), 657-663.
- Nakapong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M., Pongsawasdi, P. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 30–36.
- Ningthoujam, D.S., Sanasam, S., Nimaichand, S. (2009). Screening of Actinomycete Isolates from Niche Habitats in Manipur for Antibiotic Activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 221-225.
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Ozawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T. (1992). Characterization of Levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(9), 1373–1377.

- Oluwaniyi, T.T., Omafuvbe, B.O., Agboola, F.K. (2016). Purification and Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* Isolated from a Yoghurt Waste Site. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5(1), 52-57.
- Oseguera, M.A.P., Guereca, L., Lopez-Munguia, A. (1996). *Properties of levansucrase from Bacillus circulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(4), 465–471.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42, 206-214.
- Özarlan, S. (2018). *Kefir danesinden izole edilen Kluyveromyces marxianus'dan üretilen β -galaktosidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 53-64, Isparta.
- Özçelik, A.T., Ersöz, F., İnan, M. (2019). Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 159, 83-90.
- Özgen, S. (1996). *Hayvansal Kaynaklardan Ksantin Oksidaz İzolasyonu ve Saflaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü Anabilim Dalı, İstanbul.
- Pabst, M.J. (1977). Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infection and Immunity Journal*, 15(2), 518-526.
- Panesar, P.S., Marwaha, S.S., Chopra, H.K. (2010). *Enzymes in food processing: fundamentals and potential applications*. New Delhi: I K International Publish.
- Park, H.-E., Park, N. H., Kim, M.-J., Lee, T. H., Lee, H. G., Yang, J.-Y., Cha, J. (2003). Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7), 820–827.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2017).” Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes”. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 13–41.
- Patel, A.K., Singhania, R.R., Pandey, A. (2017). Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 13-41.
- Pawlak-Szukalska, A., Wanarska, M., Popinigis, A.T., Kur, J. (2014). A novel cold-active β -d-galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32cB – Gene cloning, purification and characterization. *Process Biochemistry*, 49(12), 2122–2133. 2133.
- Pekin, B. (1983). Endüstriyel Mikrobiyoloji. Editör: Çetin, D. İstanbul: Fatih Gençlik Matbaası (s. 145-160).
- Portilla Rivera, O., Tellez Luis, S., Vazquez, M., (2009). Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 19-26.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource *BioMed Research International*, (Article ID: 264020), 1-8.
- Price, N.C., Stevens, L. (1982). *Fundamentals of Enzymology*. UK: Oxford University Press, 15-44.
- Princely, S., Basha, N.S., Kirubakaran, J.J., Dhanaraju, M.D. (2013). Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 242-251.

- Puri, M., Gupta, S., Pahuja, P., Kaur, A., Kanwar, J.R., Kennedy, J.F. (2010). Cell disruption optimization and covalent immobilization of beta-D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 98-108.
- Ramirez, J., Uresti, R., Tellez, S., Vazquez, M. (2002). Using Salt and Microbial Transglutaminase as Binding Agents in Restructured Fish Products Resembling Hams. *Journal of Food Science*, 67(5), 1778–1784.
- Rao, M.V., Dutta, S.M. (1978). Lactase activity of microorganisms. *Folia Microbiologica*, 23(3), 210–215.
- Raol, G.G., Raol, B.V., Prajapati, V.S., Bhavsar, N.H. (2015). Utilization of agro-industrial waste for β -galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. *3 Biotech*, 5(4), 411–421.
- Ray, B. (1996). *Fundamental Food Microbiology*. New York: CRC press. 169-180.
- Rehm, A. (2009). Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursor: Application and Perspectives. Norfolk, UK: Causer Academic Press, pp. 145.
- Renuka, B., Kulkarni, G., Vijayananol, P., Prapulla, G. (2013) Fructooligosaccharides for Notification of Selected Fruit Juice Beverages: Effect on the Quality Characteristic, *LWT-Food Science Technol*, 42(5), 1031-1033.
- Roy, I., Gupta, M.N. (2003). Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, 39(3), 325–332.
- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9(1), 69-80.
- Salama, B.M., Helmy, W.A., Ragab, T.I.M., Ali, M.M., Taie, H. A.A., Esawy, M.A. (2019). Characterization of a new efficient low molecular weight *Bacillus subtilis* NRC16 levansucrase and its levan, *Journal of Basic Microbiology*, 59(10), 1004-1015.
- Sanchez, J., Hardisson, C. (1979). Induction of β -galactosidase in *Streptomyces violaceus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(7), 833–840
- Santos-Moriano P., Fernandez-Arrojo L., Poveda A., Jimenez-Barbero J., Ballesteros A, Plou F.J. (2015). Levan Versus Fructooligosaccharide Synthesis Using the Levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of Reaction Conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, 18-25.
- Sarrouh, B., Santos, T.M., Miyoshi, A., Dias, R., Azevedo, V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of Bioprocess Biotechniq.* 4(2), 1-10.
- Savoca, M.P., Tonoli, E., Atobatele, A.G., Verderio, E. (2018). Biocatalysis by transglutaminase: a review of biotechnological applications. *Micromachines*. 9(1), 562.
- Saygın, H. (2019). *Karakum çölü (Türkmenistan) kültürlenebilir aktinobakteri biyoçeşitliliğinin genoma dayalı polifazik taksonomisi. Doktora tezi*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN.
- Schorsch, C., Carrie, H., Norton, I.T. (2000). Crosslinking Casein micelles by a Microbial Transglutaminase: Influence of Crosslinks in Acid-induced Gelation. *International Dairy Journal*, 10(8), 529-539.
- Scopes, R.K. (2002). Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-6. DOI: 10.1038/ npg.els.0000712.)
- Sen, S., Ray, L., Chattopadhyay, P. (2012). Production, Purification, Immobilization, and Characterization of a Thermostable β -Galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(7), 1938–1953.

- Serrafini- Fracassini, D., Duca, S.D. (2008). Transglutaminase: widespread cross-linking enzymes in plants. *Annals of Botany*, 102(2), 145-152.
- Shaikh, S.A., Khire, J.M., Khan, M.I. (1997). Production of beta-galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 239-245.
- Sharma, R., Zakora, M., Qvist, K.B. (2002). Susceptibility of an industrial concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, 12(12), 1005-1012.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* Species, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Skryplonek, K., Henriques, M., Gomes, D., Viegas, J., Fonseca, C., Pereira, C., Mituniewicz-Małek, A. (2019). Characteristics of lactose-free frozen yogurt with κ -carrageenan and corn starch as stabilizers. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7838-7848.
- Soares, L.H., Assmann, F., Ayub, M.A. (2003). Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid-state and submerged cultivations. *Biotechnol*, 25(23), 2029-33.
- Sommer, C., Volk, N., Pietzsch, M. (2011). Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 77(1), 9–19.
- Sorde, K.L., Ananthanarayan, L. (2019). Isolation, screening, and optimization of bacterial strains for novel transglutaminase production, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(1), 64-73.
- Souza, C., Venzke, J., Flores, S., Ayub, Z.M. (2011). Enzymatic properties of transglutaminase produced by new strain of *Bacillus circulans* BL32 and its activation over food proteins. *LWT- Food Science and Technology*, 44(2), 443-450.
- Sözgen, G. 2019. *Zymomonas mobilis* levansukrazının üretimi, saflaştırılması ve kristalizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 30-40, İzmir.
- Steffen, W., Ko, F.C., Patel, I., Lyamichev, V., Thomas, J., Albert, T.J., Benz, J., Rudolph, M., Streidl, T., Kratzch, P. (2017). Discovery of a microbial transglutaminase enabling highly site-specific labelling of proteins. *Journal of Biology Chemistry*, 292(38), 15622-15635.
- Stockinger Lab, Ohio Agricultural Research and Development Center, Lab Protocols. Site Erişim Tarihi: 26.06.2020, <https://stockingerlab.osu.edu/sites/stockinger/files/imce/PDFs/Protocols/DialysisTubing.pdf>
- Suzuki, M., Date, M., Yokoyama, K. (2013). “Thermotolerant Transglutaminase Originating Actinomyces”. United States Patents. Erişim Tarihi: 06 Şubat 2021, <https://patentimages.storage.googleapis.com/8b/5e/45/2a7dd1d43cfbd3/US8580537.pdf>
- Şanlı, T., Sezgin, E., Deveci, O., Şenel, E., Benli, M. (2011). Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1477–1481.
- Tanaka, Y., Kagamiishi A., Kiuchi A., Horiuchi T. (1975). Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry*, 77(1), 241-247.
- Tarapatsky, M., Domagała, J., Zagała, G. (2019). The effect of transglutaminase on colloidal stability of milk proteins. *Food Measure*, 13, 2339-2346.
- Tari, C., Ustok, F. I., Harsa, S. (2009). Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, β -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 19(4), 236-243.

- Tellez-Luis, S.J., de Leon, J.A., Vazquez, M. (2004a). Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source. *Food Technology and Biotechnology*, 42(2), 75-81.
- Tellez-Luis, S.J., Gonzalez-Cabriales, J.J., Ramirez, J.A., Vazquez, M. (2004b). Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 1-4.
- Temiz, A., Saldamlı İ (eds). (2014). *Gıda Kimyası*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 319-398.
- Thumar, J.T., Dhulia, K., Singh, S.P. (2010). Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2081–2087.
- Tian F, Inthanavong L, Karboune S. (2011). Purification and Characterization of Levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in Intra- and Extracellular Forms Useful for the Sythesis of Levan and Fructooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(10), 1929-1938.
- Tokai, S., Uraji, M., Hatanaka, T. (2020). Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of *Streptomyces* transglutaminases, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(3), 575-582.
- Tokatlı, M., Domurcuk, G., İşleroğlu, H. (2018). The effect of femrentation conditions and stress factors on production of Transglutaminasae by *Streptomyces* spp. *Turkish Journal of Agriculture*, 6(11), 1606-1616.
- Topal, Ş. (1985). Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve teknolojide rennin'nin yeri. *Gıda*, 10(1), 25-37.
- Topal, Ş. (1988). Mikrobiyal Enzimler ve Biyoteknolojik Yolla Rennin Üretimindeki Gelişmeler. *Gıda*, 13(3), 183-190.
- Torne, J.M., Santos, M., Talavera, D., Villalobos, E., Rigau, J. (2007). Maize nucleotide sequence coding for a protein with transglutaminase activity and use thereof. United States Patents. Erişim Tarihi: 06 Şubat 2021, <https://patentimages.storage.googleapis.com/0f/b2/fc/dd94febec9c562/EP1535992A1.pdf>
- Trespalacios, P., Pla, R. (2007). Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. *Food Chemistry*, 100(1), 264–272.
- Ul-Hassan, A., Wellington, E.M. Schaechter, M (eds). (2009). *Encyclopedia of Microbiology*. USA: Academic Press, 25-44.
- Uresti, R.M., Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J.A., Vázquez, M. (2004). Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 86(2), 257-262.
- Uyanık, A. (2008). *Beta-Galaktozidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 15-19, Ankara.
- Vaijayanthi, G., Vijayakumar, R., Dhanasekaran, D. (2016). Actinobacteria - A Biofactory of Novel Enzymes. Actinobacteria Basics and Biotechnological Applications. Erişim Tarihi: 05.07.2021, <https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/actinobacteria-a-biofactory-of-novel-enzymes>
- Wang, L., Yu, B., Wang, R., Xie, J. (2018). Biotechnological routes for transglutaminase production: recent achievements, perspectives and limits. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 116-120.

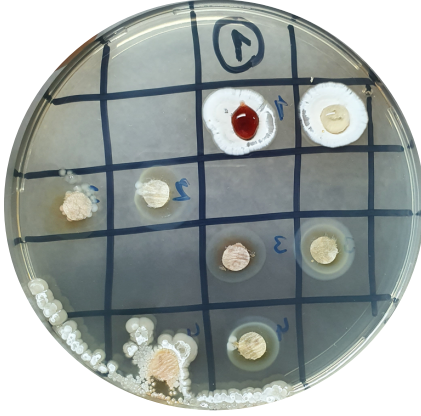
- Whitaker, J.R. 1996. "Enzymes". Food Chemistry 3rd Ed. Editörler: Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. New York: Marcel Dekker.
- Wierzbicki, L.E., Kosikowski, F.V. (1973). Food Syrups from Acid Whey Treated with β -Galactosidase of *Aspergillus niger*. *Journal of Dairy Science*. 56(9), 1182–1184.
- Williams, S.T., Vickers, J.C. In Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H. (eds). (1988). *Biology of actinomycetes*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, Sayfa 165-270.
- Wiseman, M.O., Price, R.L. (1987). Characterization of protein concentrates of jojoba (*Simmondsia chinensis*) meal. *Cereal Chemistry*, 64(2), 91-93.
- Wolfgang, A., McAuliffe, J.C., Whited, G., Ward, D.E. (2004). Industrial Enzymes and Biocatalysis. Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology 10th Ed. Editör: Kent, J. A. USA: Springer US.
- Wu, F.-C., Chou, S.-Z., Shih, I.-L. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 846–853.
- Xiao, M., Feng, F., Lu, L. (2014). Preparation method of levan-contained yogurt. Erişim Tarihi: 05.07.2020 <https://patentimages.storage.googleapis.com/56/d9/9c/7a577f198ab4fe/US3816259.pdf>
- Yan, G., Du, G., Li, Y., Chen, J., Zhong, J. (2005). Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*: application of a two stage agitation speed control strategy. *Process Biochemistry*, 40(2), 963- 968.
- Yamada, M., Chiba, S., Endo, Y., Isobe, K. (2017). New alkalophilic β -galactosidase with high activity in alkaline pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(1), 15-19.
- Yasir, S., Sutton, K., Newberry, M., Andrews, N., Gerrard, J. (2007). The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture. *Food Chemistry*, 104(4), 1491–1501.
- Yeo, S.H., Yoon, J.H., Lee, D.G., Kim, H.S. (2009). Screening and identification of a *Streptomyces platensis* YK-2, a new transglutaminase producer. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 588-595.
- Yıldız, S. (2011). The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants. *Food Reviews International*, 27(1), 16–50.
- Yokoyama, K., Nio N., Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447–454.
- Youssef, G.A., Youssef, A.S., Talha, S., Aassar, S.A. (2014). Increased Fructosyltransferase (levansucrase) Production by Optimizing Culture Condition from *Pediococcus acidilactici* strain in Shaking batch Cultures. *Life Science Journal*, 11(7), 33-47
- Yu, Y.J., Wu, S.C., Chan, H.H., Chen, Y.C., Chen, Z.Y., Yang, M.T. (2008). Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 523- 532.
- Zhang, L., Zhang, L., Yi, H., Du, M., Ma, C., Han, X., Fen, Z., Jiao, Y., Zhang, Y. (2012). Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3559-68.
- Zhang, L., Rao, W., Muhayimana, S., Zhang, X., Xu, J., Xiao, C., Huang, Q. (2018). Purification and biochemical characterization of a novel transglutaminase from *Mythimna separata* larvae (Noctuidae, Lepidoptera). *Journal of Biotechnology*, 265, 1-7.

- Zhang, D., Wang, M., Wu, J., Cui, L., Du, G., Chen, J. (2008). Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(56), 10261-10264.
- Zhang, N., Zhang, S., He, Y., Chen, X., Zhang, Y., Dong, Z. (2020). Intein-mediated intracellular production of active microbial transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 142, 109680.
- Zheng, M., Du, G., Guo, W. (2001). A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochemistry*, 36(6), 525- 530.
- Zheng, M., Du, G., Guo, W., Chen, J. (2001). A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochemistry*, 36(6), 525–530.
- Zheng, M., Du, G., Jian, C. (2002). pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4). 477-481.
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering*, 9(1). 33-40
- Zhu, D., Wu, Q., Wang, N. and Moo-Young, M. (eds) (2011). *Comprehensive Biotechnology*. Oxford: Pergamon Press. p. 3-13.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bol, J. (1995). Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 277–282.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bol, J. (1996). Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(3), 291-298.
- Zhu, Y., Tramper, J. (2008). Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology*, 26(10), 559-565.
- Zilda, D.Z. (2014). Microbial transglutaminase: source, production and its role to improve surimi properties. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 9(1), 35-44.
- Zimmerman, W. (1980). Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13, 119-130.
- Zolnere, K., Ciprovica, I. (2017). The comparison of commercially available beta galactosidases for dairy industry: review. *Food Science*, 1, 215-222.
- Zotzel, J., Keller, P., Funchsbauer, H.L. (2003). Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *European Journal of Biochemistry*, 270, 3214-3222.

EKLER

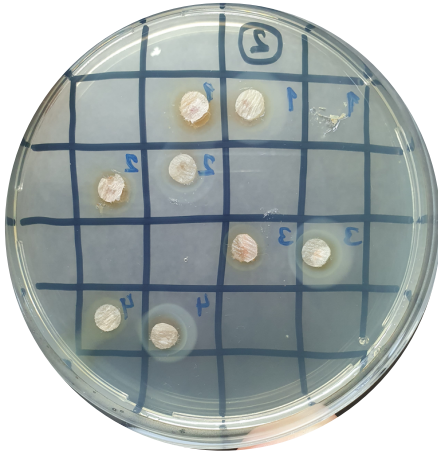
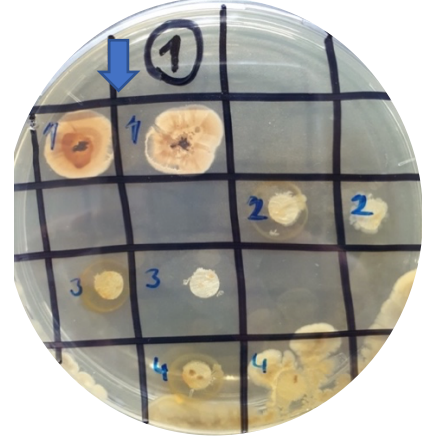
EK.1. Transglutaminaz aktivitesinin kalitatif analiz ile belirlenmesine ait örnek fotoğraflar ve seçilen izolatlar

Petri Kutusu Üstten Görünüm

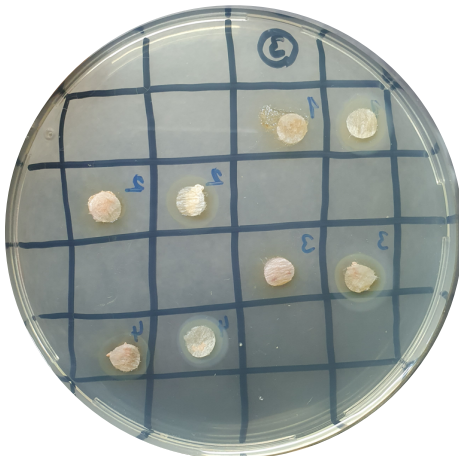
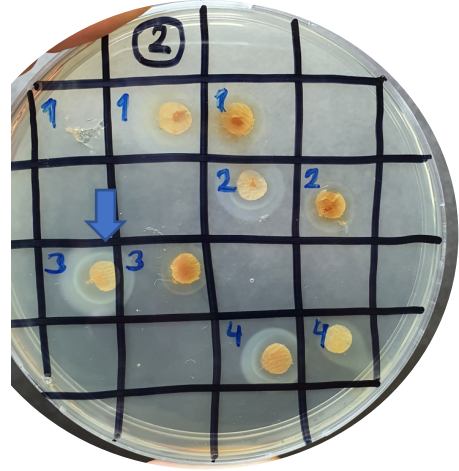


1) *Streptomyces* sp. 16K401

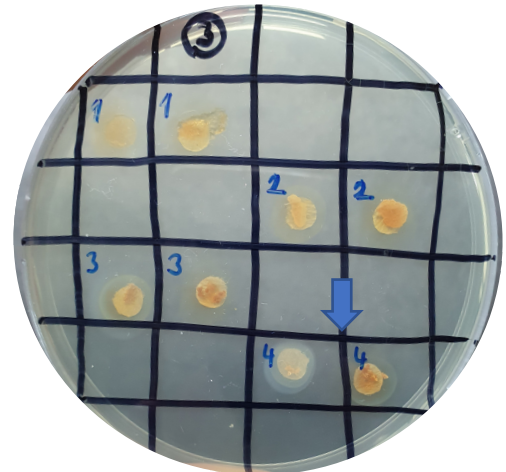
Petri Kutusu Alttan Görünüm



3) *Pseudonocardia* sp. 5K418

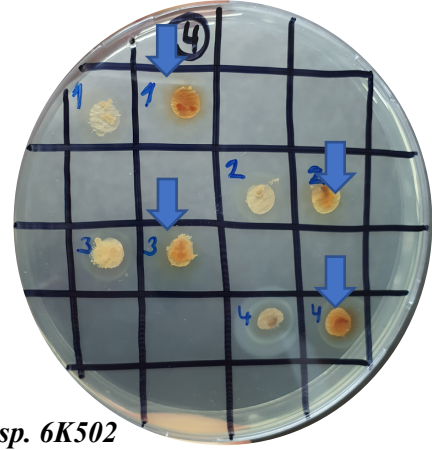
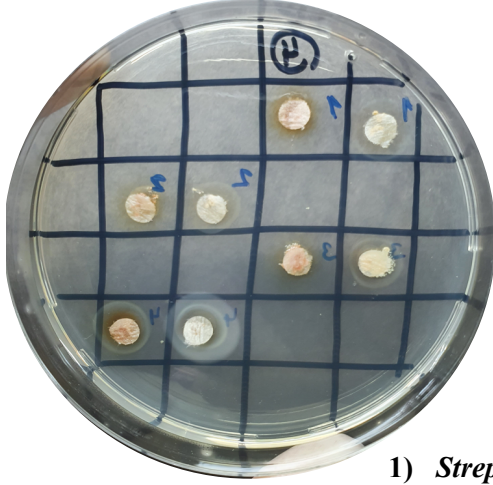


4) *Actinomadura* sp. 7K534

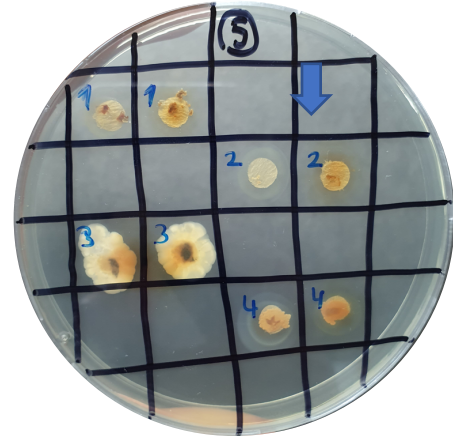
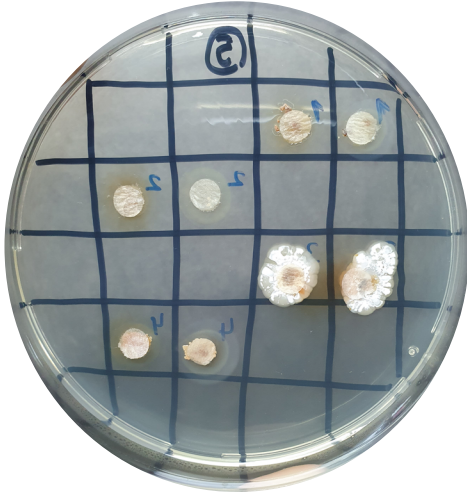


Petri Kutusu Üstten Görünüm

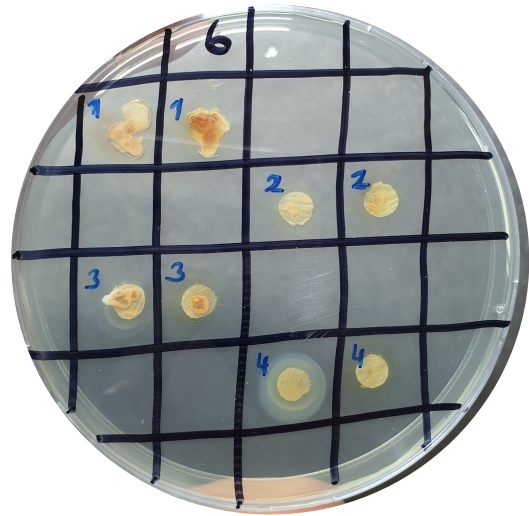
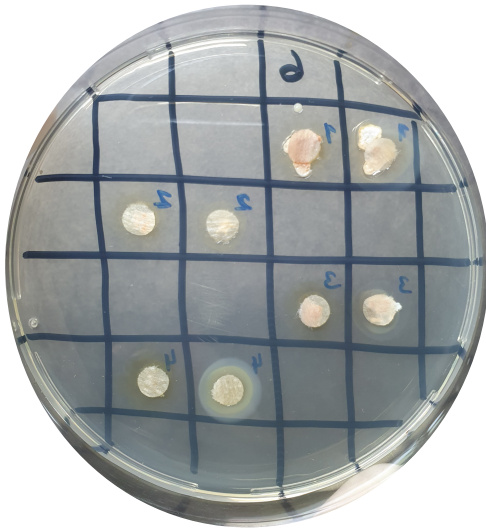
Petri Kutusu Alttan Görünüm



- 1) *Streptomyces* sp. 6K502
- 2) *Micromonospora* sp. KC606
- 3) *Micromonospora* sp. KC213
- 4) *Nonomuraea* sp. 7K523

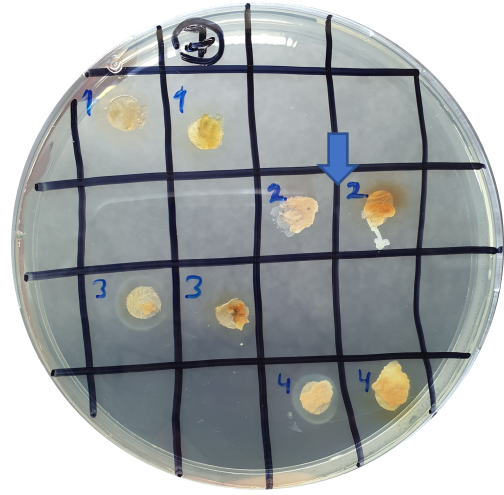
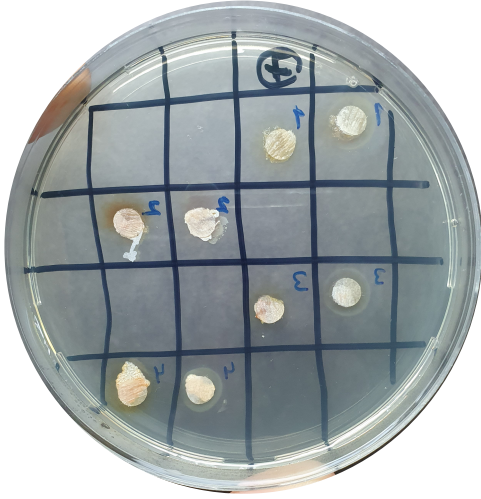


- 2) *Streptomyces* sp. 13K105

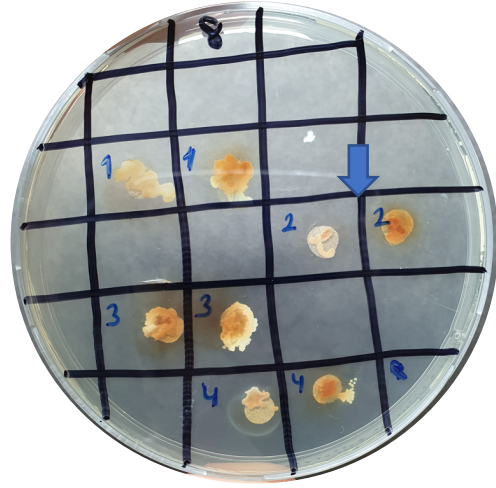
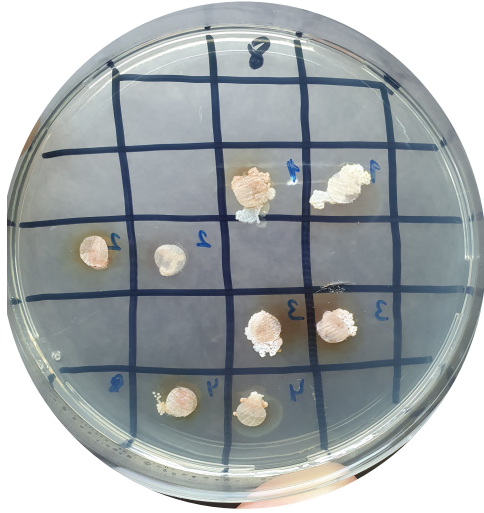


Petri Kutusu Üstten Görünüm

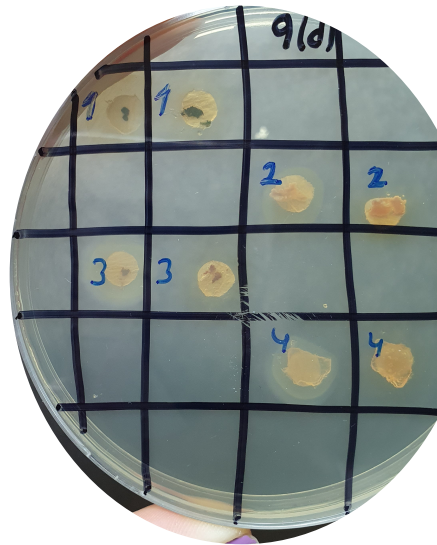
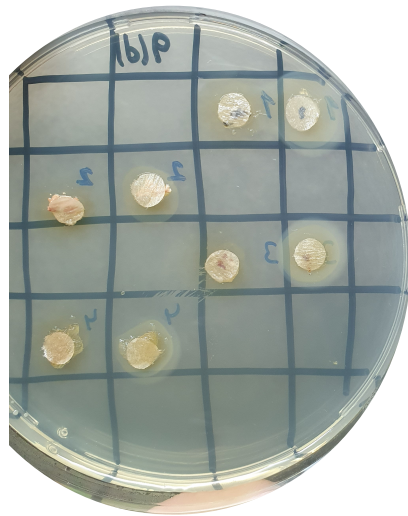
Petri Kutusu Altın Görünüm



2) *Jiangella* sp. KC603

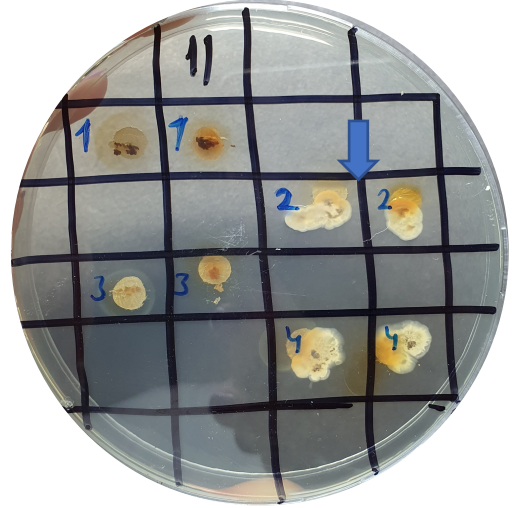
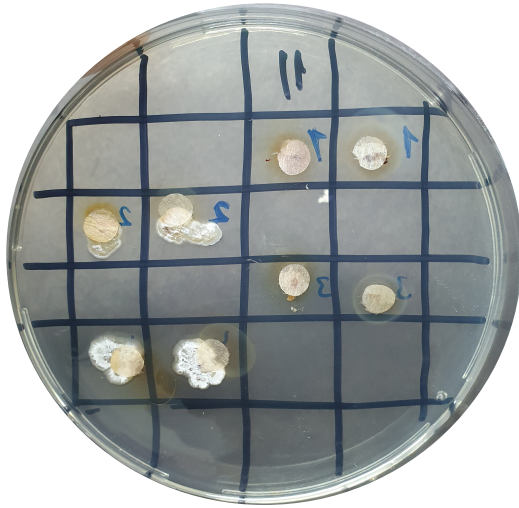
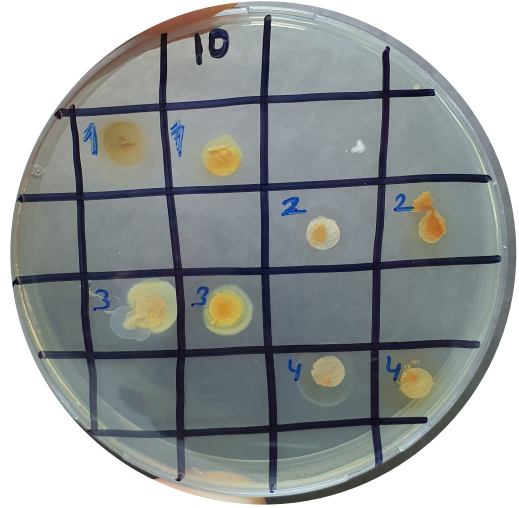
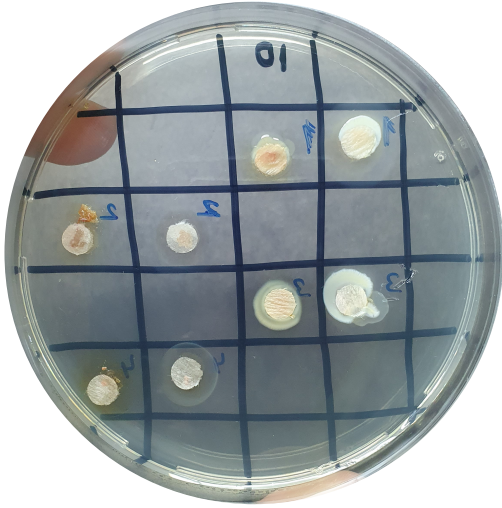


2) *Kribella* sp. 16K104

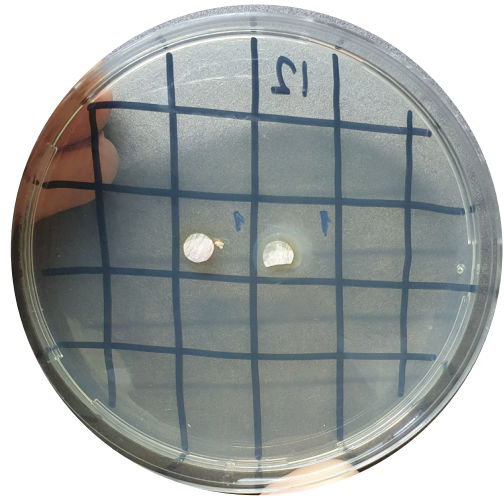
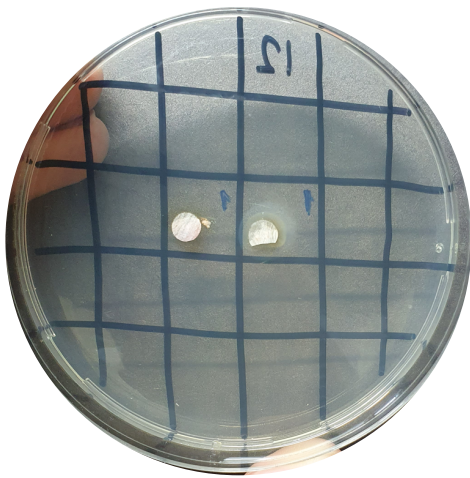


Petri Kutusu Üstten Görünüm

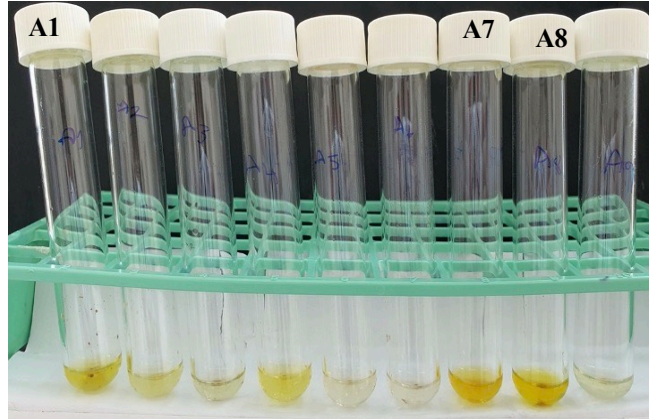
Petri Kutusu Alttan Görünüm



2) *Streptomyces* sp. 6K502



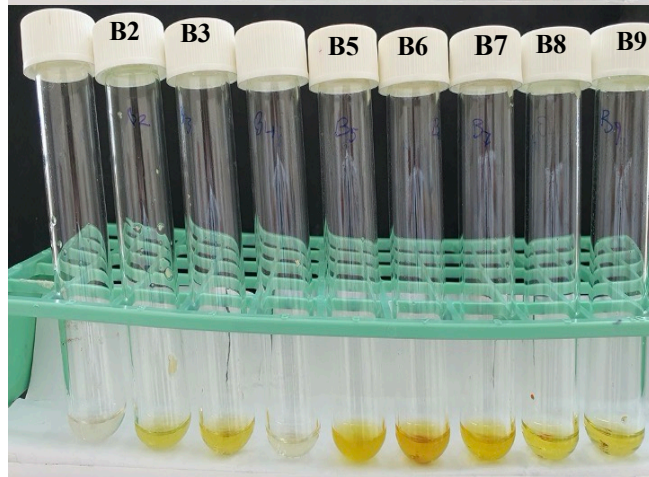
EK.2. Beta galaktozidaz aktivitesinin kalitatif analiz ile belirlenmesine ait örnek fotoğrafları



A1: *Streptomyces* sp. 16K401

A7: *Saccharopolyspora* sp. 5K418

A8: *Streptomyces* sp. 3K401



B2: *Saccharopolyspora* sp. 16K404

B3: *Nonomuraea* sp. 7K110

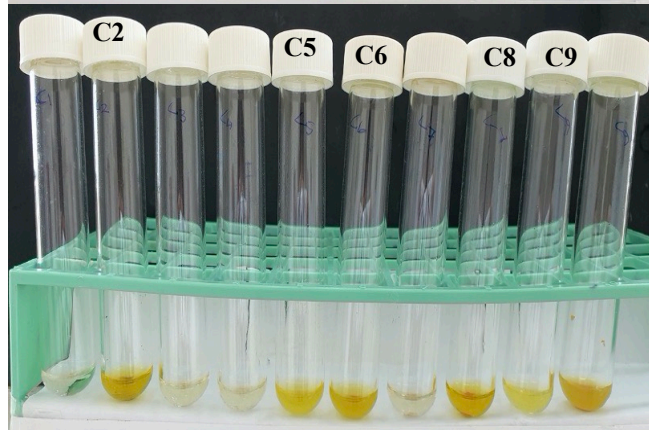
B5: *Streptomyces* sp. 6K520

B6: *Micromonospora* sp. KC606

B7: *Micromonospora* sp. KC213

B8: *Micromonospora* sp. 7K523

B9: *Nonomuraea* sp. KC201



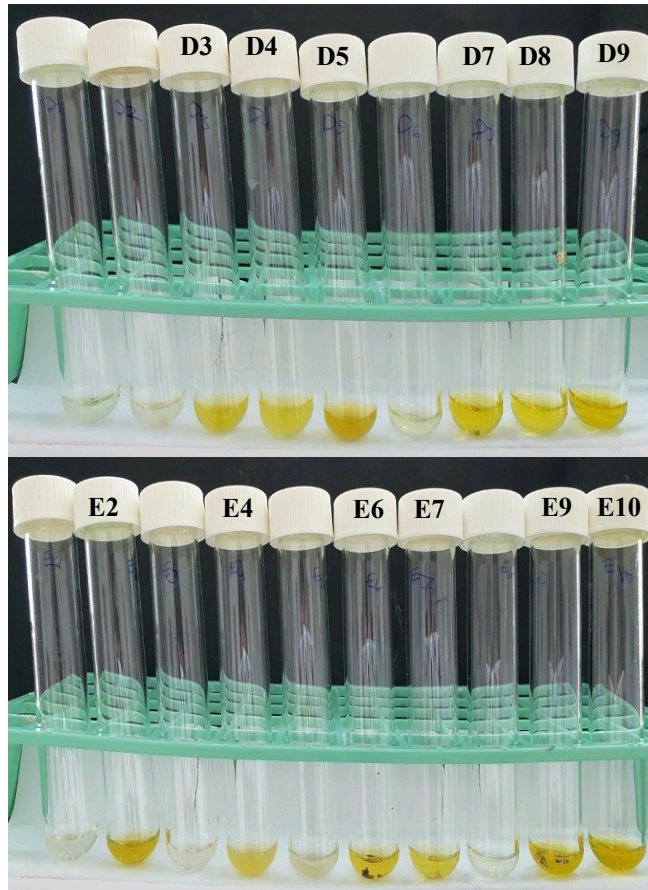
C2: *Streptomyces* sp. 8K301

C5: *Jiangella* sp. 5K138

C6: *Jiangella* sp. 8K307

C8: *Micromonospora* sp. 15K316

C9: *Jiangella* sp. KC603



D3: *Saccharopolyspora* sp.16K309

D4: *Kribella* sp. 16K104

D5: *Nocardioides* sp. KC13

D7: *Plantactinospora* sp. KC728

D8: *Nonomuraea* sp. KC333

D9: *Streptomyces* sp. 13K301

E2: *Streptomyces* sp. 8K308

E4: *Microbacterium* sp. 5K110

E6: *Nonomuraea* sp. 6K102

E7: *Streptomyces* sp. 6K502

E9: *Streptomyces* sp. 10K307

E10: *Micromonospora* sp. KC721

ÖZ GEÇMİŞ

Elif Gülşen KARABACAK, Ankara/ Dr. Binnaz Ege-Dr. Rıdvan Ege Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünden 2018 yılında bölüm üçüncülüğü derecesi ile mezun oldu. Lisans eğitimi sırasında bir dönem Polonya Warsaw University of Life Sciences- Food Science 'da Erasmus programı ile bir dönem öğrenim gördü. 2018 yılında başladığı Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans eğitimine 2019 yılında yatay geçiş ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde devam etti. Orta-İyi derecede İngilizce bilmektedir. 2019 yılından itibaren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID: <https://orcid.org/my-orcid?orcid=0000-0002-3513-0986>

Yayınlanmış Çalışmalar:

- 1) Karabacak, E.G., Saygın, H., Şahin, N., Çon, A.H. 2020. Farklı Bölgelerden İzole Edilen Bakterilerin Gıda Endüstrisinde Önemli Olan Bazı Enzimleri Üretim Potansiyellerinin Taranması. 13. Gıda Kongresi, Çanakkale/Turkey (Poster Bildirisi)
- 2) Karabacak, E.G, Çon, A.H. Enzim Saflaştırmada Kromatografik Yöntemler. Second International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, Gaziantep/Turkey. (Poster Bildirisi)