

LACTOBACILLUS ve BIFIDOBACTERIUM CİNSİ BAKTERİLERİN BETA GALAKTOSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ*

Yasemin Kılıç¹, Zehra Nur Yüksekdağ^{1}, Hazer Yüksekdağ²**

¹Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji AbD, Teknikokullar, Ankara

²Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara

Geliş tarihi / Received: 27.11.2013

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 17.12.2013

Kabul tarihi / Accepted: 23.12.2013

Özet

Bu çalışmada, insan, gıda ve hayvan kaynaklı 39 *Lactobacillus* cinsine ait ve yeni doğan gaitasından izole edilmiş 3 *Bifidobacterium* cinsine ait toplam 42 bakteri kullanılmıştır. O-nitrofenil-beta-D-galaktosit (o-NPG) substrat olarak kullanılarak, kültürlerin β -galaktosidaz enzim ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir. *Lactobacillus* cinsine ait kültürlerden *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) suşlarının, *Bifidobacterium* cinsine ait kültürlerden de *B. breve* A26 (0.726 U/mg) suşunun en yüksek spesifik aktivite yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, bakterilerin 5-brom-4-klor-3-indolil- β -D-galaktopiranosit (X-gal) substrat bileşiğiyle de nitel olarak enzim aktivitesinin varlığı değerlendirilmiştir. Yüksek spesifik β -galaktozidaz aktivitesi gösteren ZYN17 suşuna ait β -galaktozidaz enziminin optimizasyonu yapılmıştır. β -galaktozidaz enziminin optimum pH'sı 6.8, optimum sıcaklığı 37 °C ve optimum tamponun potasyum fosfat tamponu olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, β -galaktosidaz enzim aktivitesi

BETA GALACTOSIDASE ENZYME ACTIVITIES of LACTOBACILLUS and BIFIDOBACTERIUM GENUS*

Abstract

In this study total 42 bacteria were used; 39 *Lactobacillus* originated from human, food and animal and 3 *Bifidobacterium* isolated from new born baby feces. The β -galactosidase enzyme activities and specific activities were determined by using o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (o-NPG) as a substrate. The highest specific enzyme activities observed among Lactobacilli cultures were at *L. fermentum* ZYN17 (2.468 U/mg), *L. casei* LB65 (1.116 U/mg), *L. rhamnosus* GD11 (1.034 U/mg), and *L. acidophilus* BAZ36 (0.947 U/mg) strains and the highest enzyme activities observed among Bifidobacterium was at *B. breve* A26 (0.726 U/mg) strain. The enzyme activities of bacteria were also determined qualitatively by using the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktoside (X-gal) substrate compound. The enzyme optimization of ZYN17 strain with highest specific β -galactosidase activity was achieved. The optimum pH was determined as 6.8, optimum temperature was 37 °C and the optimum buffer was potassium phosphate buffer for the enzyme.

Keywords: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, β -galactosidase enzyme activity

* Bu araştırma birinci yazarın yüksek lisans tezinin bir kısmından özetlenmiştir/ This research is the summary of 1st author's MSc thesis.

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉ zehranur@gazi.edu.tr,

☎ (+90) 312 202 1376,

☎ (+90) 312 212 2279

GİRİŞ

Laktoz sütte bulunan disakkarittir. Vücut tarafından laktozun absorpsiyonu için önce monosakkaritlerine parçalanması gerekir. Bu olayda rol oynayan enzim ince bağırsaklarda da bulunan laktaz (Beta-galaktozidaz) enzimidir (1, 2). Beta-galaktozidaz (β -d-galaktozitolaktohidrolaz, EC.3.2.23), laktozdan glikoz ve galaktoz oluşumunu katalizleyen hidrolitik bir enzimdir (3, 4). Laktoz direk olarak bağırsaktan absorbe edilemediğinden hidrolize olması gerekmektedir. Hidroliz, ince bağırsak kanalının iç yüzeyinde bulunan β -galaktozidaz enzimiyle veya probiyotik bakterilerce sağlanmaktadır (5). β -galaktozidaz enziminin vücuttaki eksikliğinde veya işlevini tam görmemesi durumunda laktoz intoleransından söz edilmektedir (6, 7). İnsanlarda laktaz enzimiyle ilgili olarak ortaya çıkan problemler, bu enzimin salgılanmamasından veya doğumdan itibaren ince bağırsakta yetersiz miktarda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu durumda laktoz yeterince sindirilemez ve ince bağırsaktaki sindirim veya kalın bağırsakta fermantasyon değişikliğinden dolayı klinik semptomlar (karın ağrısı, gaz, ishal vb) açığa çıkar. Laktozun sindirimi ve fermantasyonunun fizyolojik yönleri göz önüne alındığında, laktoz intoleransı semptomlarının tüketilen laktoz dozu ile ilişkili olduğu ve ince bağırsakta yeterli düzeyde hidroliz ile semptomların önlenebileceği çok açıktır (5). Laktoz intolerantlıların, laktoz içeren gıdalardan sakınmaları gerekmektedir. Ancak, laktoz içeren gıdalardan sakınmak beslenme açısından risk yaratabilir (8). Bu nedenle laktoz içeren gıdaların kullanımının kısılması yerine bu tür ürünlerin nasıl kullanılabileceği konusu araştırılmalıdır.

Probiyotiklerin bütün yararlı etkileri arasında laktoz intoleransını düzenleyici etkisi önem taşımaktadır. Cerrahi operasyon, bağırsak düzensizlikleri ve antibiyotik tedavisi gibi faktörler vücudun laktaz üretimini azaltabilmektedir. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* gibi laktaz pozitif probiyotik bakteri türleri, genellikle pastörize süt ürünlerine ilâve edildiklerinde bu ürünlerdeki laktoz sindirimini arttırmaktadırlar (9, 10). Probiyotik suşlar, hidrolitik kapasiteleri ile yoğurt gibi süt ürünlerinde laktoz miktarının azaltılmasında ve aynı zamanda, ince bağırsakta genel hidrolitik kapasiteyi arttırmak için de kullanılabilir (11). Süt ürünlerine probiyotik bakteri ilave edilmesinin laktoz intoleransına

yararlı etkileri iki olası mekanizma ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bunlardan birincisi, fermantasyon ile süt ürünlerinde bulunan laktozun parçalanması, ikincisi ise laktaz enzimi üreten probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal bölgedeki çoğalmasdır (9). Bütün bunlar göz önüne alındığında, laktoz intoleransı tedavisi için probiyotiklerin umut verici olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, farklı izolasyon kaynaklı laktobasil ve bifidobakter cinslerine ait suşların β -galaktozidaz aktivitelerinin o-NPG ve X-gal substratları ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, yüksek spesifik aktiviteye sahip *L. fermentum* ZYN17 suşunda β -galaktozidaz enziminin optimizasyonu amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan tavuk (18), peynir (3), yoğurt (1) ve yeni doğan izolatu (17) olan *Lactobacillus* spp. (39) ve yeni doğan gaitası izolatu olan *Bifidobacterium* spp. (3) ait olmak üzere toplam 42 suş, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. 39 laktobasil suşundan 14'ü *L. casei*, 11'i *L. acidophilus*, 4'ü *L. rhamnosus*, 3'ü *L. salivarius*, 3'ü *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 2'si *L. fermentum*, 1'i *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve 1'i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türlerine ait suşlar iken, Bifidobakterilerde 2'si *B. breve* ve 1'i *B. longum* türlerine aittir. Laktobasillerin geliştirilmesinde MRS besiyeri, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde ise MRS içeriğinde bulunan glikoz yerine laktozun (%2) ilavesi ile hazırlanmış Lac-MRS besiyeri kullanılmıştır. Bifidobakterilerin geliştirilmesinde TPY (Trypticase phytone yeast extract) besiyeri, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde ise TPY içeriğinde bulunan glikoz yerine laktozun (%2) ilavesi ile hazırlanmış Lac-TPY besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca bifidobakteriler ile yapılan tüm deneysel çalışmalar, anaerobik jar (Oxoid, Anaerobar) içerisinde ortama % 10 CO₂ salınımını sağlayan anaerobik kit (Oxoid, Anaerobic generating kit) kullanılarak yapılmıştır.

β -galaktozidaz Aktivitesinin X-gal ile Belirlenmesi

20 mg/mL 5-brom-4-klor-3-indolil- β -D-galaktopyranosit (X-gal, Sigma) dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde hazırlanmıştır. 60 μ L X-gal substratı MRS agar üzerine dökülmüş daha sonra petri 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. X-gal

içeren MRS agar üzerine Densimat (Biomerioux) ile McFarland 0.5'e ayarlanan bakteri kültürlerinden 20 µL konularak drigalsi özesi ile yayma ekim gerçekleştirilmiştir. Laktobasiller 16-18 saat, bifidobakteriler ise 36-48 saat uygun sıcaklıklarda ve koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda turkuaz renk oluşumu, kültürün β-galaktozidaz aktivitesine sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır (1).

β-galaktozidaz Enzim Ekstraktının Hazırlanması ve Protein Miktar Tayini

Bakteriler uygun besiyortamlarında iki kez aktifleştirildikten sonra 5000 rpm'de 20 dak +4 °C'da santrifüj yapılmıştır (Sigma 2-16 KC). Hücre pelleti serum fizyolojik (SF) ile iki kez yıkanarak Mc Farland 6'ya (~18 log cfu/mL) ayarlanmıştır. Kültürlerden SF, santrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet 0.03 M potasyum fosfat tamponuyla (pH 6.8) yıkanmış ve 1 mL tamponda çözülmüştür. Bakterilerin hücre duvarı 50 MHz frekansına ayarlanan ultrasonikasyon (Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT marka) cihazı ile parçalanmıştır. Hücre atıklarının uzaklaştırılması amacıyla 1000 rpm'de 10 dak +4 °C'da santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatant ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır (12).

Kültürlerin protein konsantrasyonu, Bradford Reagent Kit (Amresco) kullanılarak belirlenmiştir. Standart olarak 0.0025-0.05 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda Bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

β-galaktozidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

β-galaktozidaz aktivitesi soğuk şartlarda Shah ve Otieno (13)'nün metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivitenin belirlenmesinde o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozit (o-NPG, Sigma) substrat olarak kullanılmıştır. 0.03 M potasyum fosfat reaksiyon tamponu (pH 6.8) içinde, 0.2 mL 15 mM o-NPG içeren karışıma, enzim ekstraktından 1 mL ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. 37 °C'da 15 dak inkübasyona bırakılmış, 1 M 0.5 mL sodyum karbonat (Merck) solüsyonu ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur. 1000 rpm'de 10 dak +4 °C'da santrifüjden sonra spektrofotometre cihazı ile (Hitachi UV-1800) 420 nm dalga boyunda absorbans değeri okunmuştur. Körv olarak, ham ekstrakt yerine 1 mL 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) kullanılmıştır. 1 ünite β-galaktozidaz aktivitesi dakikada 1 µmol o-nitrofenolü serbest bırakan enzim miktarı

olarak tanımlanmıştır. Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı ise spesifik aktivite olarak kabul edilmiştir. β-galaktozidaz aktivitesi, 420 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden faydalanarak aşağıda belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/mL)} = \frac{OD_{420}}{k} \times \frac{1}{t} \times [V_t/V_e] \times D$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = \left[\frac{\text{Enzim aktivitesi (U/mL)}}{\text{Protein miktarı (mg/mL)}} \right]$$

V_t = Tüpte hazırlanan toplam reaksiyon hacmi

V_e = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi

k = Standart eğrinin eğimi

t = Reaksiyon zamanı

D = Dilüsyon faktörü

β-galaktozidaz Enziminin Optimizasyonu

β-galaktozidaz aktiviteleri belirlenen kültürlerden, en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren *L. fermentum* ZYN17 suşu seçilerek farklı pH, sıcaklık ve tamponlarda enzim optimizasyonu yapılmıştır.

Farklı pH'lardaki aktivitelerin belirlenmesi için, reaksiyon ortamında kullanılan 0.03 M potasyum fosfat tamponunun pH'sı 5.5, 6.0, 6.8, 7.0, 7.5 ve 8.0 değerlerine ayarlanmış ve reaksiyon 37 °C'de gerçekleştirilmiştir (14). Farklı sıcaklıklardaki aktivitelerin belirlenmesi için, 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) içinde, 15 mM 0.2 mL o-NPG içeren karışıma hücre süspansiyonundan 1 mL eklendikten sonra, reaksiyon 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C ve 45 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir (15). 0.03 M ve pH'sı 6.8 olan potasyum fosfat, sodyum fosfat, Tris-HCl, Tris-NaCl ve Tris-potasyum fosfat tamponlarının reaksiyon ortamında kullanılmasıyla tamponların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir (16).

İstatistiksel Analiz

Tüm çalışmalar 3 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve çalışmaların ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (15.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Parametrik testlerden Pearson korelasyonuna göre, bütün suşların enzim ve spesifik aktiviteleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Farklı pH, sıcaklık ve tampon ile elde edilen spesifik aktivite değerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirleyebilmek için nonparametrik testlerden Friedman testi kullanılmıştır.

BULGULAR

β -galaktozidaz Aktivitesinin X-gal ile Belirlenmesi

Suşların β -galaktozidaz aktivitesi nitel olarak X-gal substratı ile belirlenmiştir. Suşların hepsinin, MRS-X gal agar besiyerinde turkuaz renk oluşturduğu gözlemlenmiştir.

β -galaktozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β -galaktozidaz enzim aktivitesi kültürlerin hem pelletin de hem de kültür süpernatantların da tespit edilmiştir. Kültür süpernatantlarında enzim aktivitesine rastlanılmamıştır. Bakteriler, 0.153 U/mL (*L. fermentum* ZYN17)-0.004 U/mL (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ZYN31) arasındaki değişen değerlerde β -galaktozidaz enzim aktivitesi, 2.468 U/mg (*L. fermentum* ZYN17)-0.065 U/mg (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ZYN31) arasında β -galaktozidaz spesifik aktivite göstermişlerdir. *L. fermentum* ZYN17 (2.468 U/mg), *L. casei* LB65 (1.116 U/mg), *L. rhamnosus* GD11 (1.034 U/mg),

L. acidophilus BAZ36 (0.947 U/mg) ve *B. breve* A26 (0.726 U/mg) suşlarında yüksek β -galaktozidaz spesifik aktivite yeteneği tespit edilmiştir (Çizelge 1).

β -galaktozidaz Enziminin Optimizasyonu

En yüksek spesifik aktiviteye sahip *L. fermentum* ZYN17 suşu enzim optimizasyonu (pH, sıcaklık, tampon) çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. *L. fermentum* ZYN17 suşunun, farklı pH değerlerine (5.5, 6.0, 6.8, 7.0, 7.5 ve 8.0) ayarlanan potasyum fosfat tamponu kullanılarak enzim ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 2). Değişen pH değerlerinde *L. fermentum* ZYN17 suşundan elde edilen enzim protein miktarı 0.062-0.089 mg/mL, β -galaktozidaz enzim aktivitesi 0.084-0.153 U/mL ve β -galaktozidaz spesifik aktivitesi 1.120-2.468 U/mg olarak tespit edilmiştir. Enzimin değişen pH'larda aktivitesini kaybetmediği, genel olarak nötre yakın pH'lara daha dayanıklı olduğu görülmüştür. ZYN17 suşundan elde edilen enzim optimum pH'sı 6.8

Çizelge 1. Laktobasillerin ve Bifidobakterilerin en düşük ve en yüksek β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivite değerleri
Table 1. The lowest and highest values of β -galactosidase enzyme and specific activity in Lactobacilli and Bifidobacteria

Bakteriler <i>Bacteria</i>	Protein Miktarı (mg/mL) Protein content (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL) Enzyme activity (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg) Specific activity (U/mg)
<i>L. acidophilus</i> (n=11)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.038	0.017	0.354
En yüksek <i>Maximum</i>	0.059	0.039	0.947
Ortalama <i>Average</i>	0.048±0.006	0.024±0.007	0.509±0.184
<i>L. rhamnosus</i> (n= 4)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.041	0.015	0.366
En yüksek <i>Maximum</i>	0.071	0.061	1.034
Ortalama <i>Average</i>	0.057±0.012	0.041±0.019	0.687±0.295
<i>L. fermentum</i> (n=2)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.062	0.037	0.474
En yüksek <i>Maximum</i>	0.078	0.153	2.468
Ortalama <i>Average</i>	0.070±0.008	0.095±0.058	1.471±0.997
<i>L. salivarius</i> (n=3)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.043	0.008	0.078
En yüksek <i>Maximum</i>	0.102	0.056	0.903
Ortalama <i>Average</i>	0.069±0.030	0.026±0.026	0.436±0.423
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (n=1)			
	0.078	0.043	0.551
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> (n=3)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.062	0.004	0.065
En yüksek <i>Maximum</i>	0.063	0.035	0.556
Ortalama <i>Average</i>	0.058±0.007	0.019±0.015	0.343±0.251
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (n=1)			
	0.075	0.033	0.440
<i>L. casei</i> (n=14)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.043	0.037	0.457
En yüksek <i>Maximum</i>	0.101	0.062	1.116
Ortalama <i>Average</i>	0.075±0.012	0.047±0.006	0.651±0.156
<i>Bifidobacterium breve</i> (n=2)			
En düşük <i>Minimum</i>	0.062	0.029	0.420
En yüksek <i>Maximum</i>	0.069	0.045	0.726
Ortalama <i>Average</i>	0.066±0.003	0.037±0.008	0.573±0.153
<i>Bifidobacterium longum</i> (n=1)			
	0.053	0.026	0.491

olarak belirlenmiştir. Optimum pH değerinden daha asidik ve daha alkali ortamlarda aktivitede düşüş gözlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

İnek sütü ve diğer süt ürünleri insanlar için ana

Çizelge 2. *L. fermentum* ZYN17 suşuna ait β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesine pH'nın etkisi
Table 2. Effect of pH on β -galactosidase enzyme and specific activity in *L. fermentum* ZYN17 strain

		pH					
		5.5	6.0	6.8 (Kontrol)	7.0	7.5	8.0
Protein Miktarı (mg/mL)	Protein content (mg/mL)	0.083±0.007	0.072±0.000	0.062±0.003	0.073±0.000	0.089±0.001	0.075±0.001
Enzim Aktivitesi (U/mL)	Enzyme activity (U/mL)	0.149±0.004	0.151±0.001	0.153±0.000	0.151±0.001	0.150±0.000	0.084±0.000
Spesifik Aktivite (U/mg)	Specific activity (U/mg)	1.795±0.010	2.097±0.012	2.468±0.000	2.069±0.024	1.685±0.011	1.120±0.014

0.03 M potasyum fosfat reaksiyon tamponunun pH'sı 6.8, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C ve 45 °C'ye ayarlanarak *L. fermentum* ZYN17 suşunun β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 3). Farklı sıcaklıklarda, ZYN17 suşundan elde edilen enzimin protein miktarı 0.062-0.086 mg/mL, β -galaktozidaz enzim aktivitesi 0.147-0.153 U/mL ve β -galaktozidaz spesifik aktivitesi 1.733-2.468 U/mg olarak belirlenmiştir. ZYN17 suşundan elde edilen enzimin optimum sıcaklığın 37 °C olduğu görülmüştür.

besleyici gıdalar arasındadır. Bu nedenle, günlük karbonhidrat alımında laktoz ağırlıktadır. Bazı insanlar β -galaktozidaz enzimi eksikliği nedeniyle laktoza toleransları yoktur ve laktozu sindiremezler. Dünyadaki insanların yarısından fazlası gıda olarak değerli bir kaynağı kullanamaz haldedir. Bilim insanları, laktoz intoleranslı bireylerin β -galaktozidaz enzimini üreten probiyotikleri kullanabileceklerini bildirmektedirler (17, 18). *Lactobacillus casei* Shirota ve *Bifidobacterium breve* Yakult kombinasyonunun gastrointestinal

Çizelge 3. *L. fermentum* ZYN17 suşuna ait β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi
Table 3. Effect of temperature on β -galactosidase enzyme and specific activity in *L. fermentum* ZYN17 strain

		Sıcaklık (°C) Temperature				
		30	35	37 (Kontrol)	40	45
Protein Miktarı (mg/mL)	Protein content (mg/mL)	0.068±0.000	0.067±0.000	0.062±0.003	0.083±0.001	0.086±0.001
Enzim Aktivitesi (U/mL)	Enzyme activity (U/mL)	0.147±0.001	0.151±0.000	0.153±0.000	0.150±0.000	0.149±0.003
Spesifik Aktivite (U/mg)	Specific activity (U/mg)	2.162±0.012	2.254±0.020	2.468±0.000	1.807±0.011	1.733±0.014

L. fermentum ZYN17 suşunun β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesi, 0.03 M potasyum fosfat, sodyum fosfat, Tris-HCl, Tris-NaCl ve Tris-potasyum fosfat (pH 6.8) tamponlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4). Kullanılan tamponlarda, ZYN17 suşundan elde edilen enzimin protein miktarı 0.062-0.072 mg/mL, β -galaktozidaz enzim aktivitesi 0.147-0.150 U/mL ve β -galaktozidaz spesifik aktivitesi 2.042-2.468 U/mg olarak belirlenmiştir. ZYN17 suşundan elde edilen enzim için uygun tamponun potasyum fosfat tamponu olduğu görülmüştür. En düşük β -galaktozidaz spesifik aktivitesi ise Tris tamponun da belirlenmiştir.

geçiş sırasında hayatta kaldığı ve laktoz intolerans semptomlarını azalttığı ifade edilmektedir (19). Gheytanchi ve arkadaşları (1) tarafından probiyotik laktobasil suşlarının salgıladıkları β -galaktozidaz enzimi ile sütteki laktozun tüketilerek süt ve süt ürünlerinin kullanımının artırılabilceği rapor edilmiştir. Yoğurt ile alınan ve ince bağırsakta lizis olan bakterilerin β -galaktozidazının serbest kaldığı ve bu enzimin laktozu metabolize ettiği bildirilmiştir (20).

Çalışmada, bakterilerin β -galaktozidaz aktivitesi X-gal substratı ile nitel olarak belirlenmiştir. Suşların tümü besi ortamında kromojenik substratı hidroliz ederek turkuaz renk oluşturmuşlardır.

Çizelge 4. *L. fermentum* ZYN17 suşuna ait β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesine farklı tamponların etkisi
Table 4. Effect of different buffers on β -galactosidase enzyme and specific activity in *L. fermentum* ZYN17 strain

		Tampon Buffer				
		Potasyum Fosfat (Kontrol) Potassium phosphate (Control)	Tris	Tris-NaCl	Tris-Sodyum Fosfat Tris-Sodium phosphate	Sodyum Fosfat Sodium phosphate
Protein Miktarı (mg/mL)	Protein content (mg/mL)	0.062±0.003	0.072±0.000	0.070±0.002	0.065±0.002	0.069±0.001
Enzim Aktivitesi (U/mL)	Enzyme activity (U/mL)	0.153±0.000	0.147±0.000	0.148±0.000	0.150±0.002	0.150±0.001
Spesifik Aktivite (U/mg)	Specific activity (U/mg)	2.468±0.000	2.042±0.000	2.114±0.000	2.308±0.036	2.174±0.022

Gheyntanchi ve ark., (1) süt ve peynirden izole edilen laktobasil izolatları tarafından üretilen β -galaktozidaz enzimini X-gal substratını kullanarak yaptıkları çalışmada bütün suşlarda koyu turkuaz renk oluşumunu gözlemlemişlerdir.

Çalışmada spektrofotometrik aktivite analizleri sonucunda, en yüksek β -galaktozidaz spesifik aktivitesi hayvan kaynaklı *L. fermentum* ZYN17 (2.4680 U/mg), *L. acidophilus* BAZ36 (0.947 U/mg) ve insan kaynaklı *L. rhamnosus* GD11 (1.037 U/mg), *L. casei* LB65 (1.116 U/mg) suşlarında tespit edilmiştir. Genel olarak bakterilerin β -galaktozidaz spesifik aktiviteleri değerlendirildiğinde, aktivitenin suşlar arasında önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. Enzim ve spesifik enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). Bu anlamlı ilişki ile birlikte enzim aktivitesi yüksek suşların spesifik aktivitelerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Tanı ve ark., (21) artisanal yoğurtlardan izole ettikleri termofilik laktik asit bakterileri için 0.011-0.240 U/mL aralığında, Gheyntanchi ve ark., (1) *L. delbrueckii* suşu için 1.966 U/mL, Mozumder ve ark., (22) Dakka şehrinde bulunan yoğurtlardan izole edilen *Lactobacillus* bakterilerinde 850.69 U/L, Meira ve ark., (23) Brezilya'daki küçükbaş hayvanlardan üretilen peynir kaynaklı olan 12 *Lactobacillus* izolatı için 47.7-2503 Miller units aralığında β -galaktozidaz enzim aktivitesi belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar bazı araştırmacıların sonuçlarına yakınlık gösterirken, bazı araştırmacıların sonuçlarından daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin, kullanılan besiyeri, sıcaklık, pH, tampon, enzim ekstraksiyon metodu, hacim, kullanılan enzim ve substrat miktarı hatta başlangıç bakteri yoğunluğunun enzim aktivitesini etkilemesi olabileceği gibi aktivite hesaplanma yöntemlerindeki farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

β -galaktozidaz enzimi bulunduğu mikroorganizmanın türüne göre intrasellüler veya ekstrasellüler olarak üretilebilmektedir (15, 21, 24). Çalışmada kullanılan türlerde hücre pelletinde β -galaktozidaz aktivitesi belirlenirken, kültür süpernatantında enzim aktivitesine rastlanılmamıştır. Böylece laktobasil ve bifidobakterilerde β -galaktozidaz enziminin intrasellüler enzim olduğu sonuçlarla desteklenmiştir.

Enzim üretim koşullarının ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu, enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu şartların belirlenmesi açısından önemli bir konudur. Bu sebeple bir çok çalışmada

enzimlerin özelliklerinin ve uygun enzimatik reaksiyon koşullarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılması gerektiği bildirilmiştir (14, 15, 25, 26).

Enzim reaksiyonları hidrojen iyon konsantrasyonu, sıcaklık ve tampon gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu çalışmada, enzimin optimum pH'sının, sıcaklığının ve uygun reaksiyon tamponunun β -galaktozidaz enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda *L. fermentum* ZYN17 suşunda enzim aktivitelerinin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmada *L. fermentum* ZYN17 suşunda pH'nın (5.5, 6.0, 6.8, 7.0, 7.5 ve 8.0) β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesine etkisi belirlenmiştir. *L. fermentum* ZYN17 suşunun pH 5.5'dan pH 6.8'e kadar olan pH değerlerinde enzim ve spesifik aktivitesinde artış gözlenmiş ve en yüksek β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesi pH 6.8'de belirlenmiştir. pH 6.8'den sonra ise enzim ve spesifik aktivitede düşüş gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan pH'lardaki β -galaktozidaz spesifik aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olduğu Friedman testi uygulanarak ($p < 0.05$) belirlenmiş ve β -galaktozidaz aktivitesinin pH 6.8'de en yüksek olduğu doğrulanmıştır. Genel olarak, literatürlerde de β -galaktozidaz enziminin optimum pH değerinin nötr pH aralıklarında veya nötr pH'a yakın pH değerinde değiştiği bildirilmiştir. β -galaktozidaz enziminin optimum pH değerini, İsmail ve ark., (15) *L. acidophilus* NRRL 4495 suşu için, Iqbal (27) *L. plantarum* WCFS1 suşu için, Toba ve ark., (25) *L. bulgaricus* B-6 ve *L. plantarum* 118 suşları için, Üstok (26), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 77, *S. thermophilus* 95/2 suşları için 7.0 olduğunu rapor etmişlerdir. Iqbal (27), *L. sakei* lb790 suşu için, Kim ve Rajagobal (28), *L. crispatus* ATCC 33820 suşu için, Toba ve ark., (25) *L. helveticus* B-1 ve *L. lactis* L-3 suşları için en uygun pH değerinin 6.5 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Enzim aktivitesi, enzimlerin kararlı olabildiği sıcaklık aralığında, sıcaklıkla artar. Sıcaklık belirli bir değerin üstüne çıkınca enzim proteini denatüre olmaya başlayacağından aktivitede düşme gözlenir (29). Bu sebeple enzimin yüksek aktiviteye sahip olduğu sıcaklığın ve sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Çalışmada, *L. fermentum* ZYN17 suşundan izole edilen enzimin 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C ve 45 °C reaksiyon sıcaklıklarında enzim ve spesifik

aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesi 37 °C' de belirlenirken en düşük enzim aktivitesi ise 30 °C'de tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık değerinden düşük sıcaklık (30 °C) ve yüksek sıcaklıkta (45 °C) belirlenen aktivelerde düşüş gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu farklı sıcaklıklardaki enzim aktivitesinin 37 °C'de yüksek olduğu Friedman testi ile doğrulanmıştır ($p < 0.01$). İsmail ve ark., (15) çalışmalarında β -galaktozidaz enziminin optimum 40 °C'de (98 U/g) en iyi aktivite gösterdiğini, Toba ve ark., (25) *L. bulgaricus* B-6, *L. lactis* L-3 ve *L. plantarum* 118 suşlarının 50 °C'de en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğunu, Üstok (26), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 77, *S. thermophilus* 95/2 suşlarından elde edilen β -galaktozidaz enziminin optimum 45-50 °C sıcaklıklarında yüksek aktivite gösterdiğini, Kara (14), *L. plantarum* suşunda β -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklığının 35 °C-40 °C arasında olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, bakteri kaynaklı β -galaktozidaz'lar nötr pH'da optimum olarak karakterize edilirken bakteriler arasındaki varyasyonlarda ve hatta aynı bakteri suşları arasında optimum sıcaklığın farklı olduğu vurgulanmaktadır (14, 15, 30, 31).

Çalışmada kullanılan farklı tamponların enzim ve spesifik aktiviteye etkisi de belirlenmiştir. 0.03 M potasyum fosfat (2.468 U/mg), 0.03 M sodyum fosfat (2.174 U/mg), 0.03 M Tris (2.042 U/mg), 0.03 M Tris-NaCl (2.114 U/mg) ve 0.03 M Tris-sodyum fosfat (2.308 U/mg) tamponları kullanılarak β -galaktozidaz enzim ve spesifik aktivitesi üzerinde tamponların etkisi araştırılmıştır. İstatistiksel olarak, Friedman testi ile tamponlar arasında spesifik aktivite açısından anlamlı bir fark olduğu görülmüş ($p < 0.05$) ve spesifik aktivitenin potasyum fosfat tamponunda daha yüksek olduğu doğrulanmıştır. Citti ve ark., (16), *S. lactis* 7962 suşunda farklı tamponların β -galaktozidaz spesifik aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 0.05 M (pH 7) sodyum fosfat, potasyum fosfat, Tris, Tris + sodyum klorit, Tris + sodyum fosfat tamponlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucu en yüksek spesifik aktivite sodyum fosfat tamponunda (0.75 U/mg), en düşük enzim aktivitesini ise Tris tamponunda (0.02 U/mg) belirlemişlerdir. Bu çalışma bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Son yıllarda β -galaktozidaz enzimi endüstriyel

öneminden dolayı hem bilim insanlarının hem de girişimcilerin ilgisini çekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, yüksek enzim aktivitesine sahip probiyotik suşların belirlenmesi önem kazanmıştır. Bu amaçla, probiyotik özellikleri çeşitli çalışmalar ile belirlenmiş farklı kaynaklardan izole edilerek, moleküler tanımlamaları yapılmış *Lactobacillus* spp. (39) ve *Bifidobacterium* spp. (3) suşlarının β -galaktozidaz enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir. Bunlardan en iyi spesifik aktiviteye sahip *L. fermentum* ZYN17 suşu enzim optimizasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *L. fermentum* ZYN17 suşundan izole edilen β -galaktozidaz enzimi, saflaştırılarak endüstriyel amaçlı kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2012-40 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Gheyanchi E, Heshmati F, Shargh KB, Nowroozi J, Movahedzadeh F. 2010. Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *Afr J Microbiol Res*, 4, 454-458.
2. Karasova P, Spiwok V, Mala S, Kralova B, Russell NJ. 2002. Beta-galactosidase activity in psychrophilic microorganisms and their potential use in food industry. *Czech J Food Sci*, 20(2), 43-47.
3. Verma LM, Barrow JC, Kennedy JF, Puri M. 2012. Immobilization of β -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *Int J Biol Macromol*, 50(2), 432-437.
4. Panesar R, Panesar PS, Singh RS, Kennedy JF. 2011. Hydrolysis of milk lactose in a packed bed reactor system using immobilized yeast cells. *J Chem Technol Biotechnol*, 86(1), 42-46.
5. Vonk RJ, Reckman GAR, Harmsen HJM, Priebe MG. 2012. Probiotics and Lactose Intolerance. Chapter 7. *InTech Open*, 7, 149-160.
6. Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. 2013. Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc*, 63(2), 253-257.

7. Setty-Shah N, Maranda L, Candela N, Fong J, Dahod I, Rogol AD, Nwosu BU. 2013. Lactose Intolerance: Lack of Evidence for Short Stature or Vitamin D Deficiency in Prepubertal Children. *PLOS ONE*, 8, 1-9.
8. Bayhan A, Yentür G. 1993. Laktoz İntoleransı. *GIDA*, 18 (6), 385-388.
9. Rolfe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*, (Supplement).130 (2), 396-402.
10. Sanders ME. 1999. Probiotics. *Food Technol*, 53 (11), 67-77.
11. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*, 73 (2), 421-429.
12. Zhang W, Wang C, Huang CY, Yu Q, Liu HC, Zhang CW, Pei XF, Xu X, Wang GQ. 2012. Analysis of β -galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Lett*, 34 (6), 1067-1071.
13. Shah NP, Otieno DO. 2007. Endogenous β -glucosidase and β -galactosidase activities from selected probiotic microorganisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. *J Appl Microbiol*, 103 (4), 910-917.
14. Kara F. 2004. Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. M.C. Thesis, Department of Biotechnology, Middle East Technical University, 89p.
15. Ismail SAA, El-Mohamady Y, Helmy WA, Abou-Romia R, Hashem AM. 2010. Cultural condition affecting the growth and production of β -galactosidase by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. *Aust J Basic Appl Sci*, 4 (10), 5051-5058.
16. Citti JE, Sandine WE, Elliker PR. 1965. β -Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol*, 89 (4), 937-942.
17. Li J, Zhang W, Wang C, Yu Q, Dai R, Pei X. 2012. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96 (6), 1499-506.
18. Jokar A, Karbassi A. 2011. In-house production of lactose-hydrolysed milk by beta-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *J Agr Sci Technol*, 13 (4), 577-584.
19. Almeida CC, Lorena SLS, Pavan CR, Akasaka HMI, Mesquita MA. 2012. Beneficial effects on long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose- intolerant patients. *Nutr Clin Pract*, 27 (2), 247-251.
20. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie Leeuwenhoek*, 82 (1-4), 279-289.
21. Tari C, Ustok FI, Harsa S. 2010. Production of food grade β -galactosidase from artisanal yogurt strains. *Food Biotechnol*, 24 (1), 78-94.
22. Mozumder NHMR, Akhtaruzzaman M, Bakr MA, Zohra FT. 2012. Study on isolation and partial purification of lactase (β -Galactosidase) enzyme from *Lactobacillus* bacteria isolated from yogurt. *J Sci Res*, 4 (1), 239-249.
23. Meira MMS, Helfer EV, Velho VR, Lopes CF, Brandelli A. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. *J Dairy Res*, 79 (1), 119-127.
24. Hsu CA, Yu RC, Chou CC. 2005. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int J Food Microbiol*, 104 (2), 197-206.
25. Toba T, Tomita Y, Itoh T, Adachi S. 1981. β -Galactosidases of lactic acid bacteria: characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J Dairy Sci*, 64 (2), 185-192.
26. Üstok FI. 2007. Production of β -Galactosidase Using Lactic Acid Bacteria and Optimisation of Fermentation Parameters. (M.Sc), Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir İleri teknoloji Enstitüsü, İzmir, 35s.
27. Iqbal S. 2011. Characterization of β -Galactosidase and Enzymatic Synthesis of Prebiotic Galacto-oligosaccharides. M.Sc. Hons., University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, 70 p.
28. Kim JW, Rajagopal SN. 2000. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol*, 45, 29-34.
29. Pamuk F. 2011. Biyokimya, Gazi Kitabevi, Ankara, Türkiye, 272s.
30. Tzortzis G, Goulas AK, Gibson GR. 2005. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68 (3), 412-416.
31. Rabiou BA, Jay AJ, Gibson GR, Rastall RA. 2001. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium* species. *Appl Environ Microbiol*, 67 (6), 2526-2530.