

Aktinobakteri İzolatlarının Transglutaminaz, Levansukraz ve Beta Galaktozidaz Üretim Yetenekleri

Elif Gülşen Karabacak¹  ✉, Ali Osman Adıgüzel² , Hayrettin Saygın² , Ahmet Hilmi Çon¹ 

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Atakum, Samsun

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Atakum, Samsun

Geliş Tarihi (Received): 18.11.2021, Kabul Tarihi (Accepted): 01.02.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): elif.karabacak@omu.edu.tr (E.G. Karabacak)

☎ 0 362 312 19 19-1513 📠 0 362 457 60 35

ÖZ

Aktinobakteriler ekstrem şartlarda gelişme, büyük miktarlarda enzim üretme potansiyeli, biyokimyasal çeşitlik ve genetik manipülasyonlara uygunluk özellikleriyle alternatif enzim kaynakları arasında önemli bir konumdadır. Çalışmada, endüstriyel alanda kullanımı fazla olan transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzimleri için uygun bir üretici Aktinobakteri cinsi mikroorganizmanın seçilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla ekstrem koşullara sahip habitatlardan farklı araştırmacılar tarafından izole edilmiş 46 aktinobakteri izolatının hedeflenen enzimleri üretim yetenekleri araştırılmıştır. Aktinobakteri izolatlarının ilgili enzimler açısından üretici olup olmadıkları, önce veri tabanlarında kayıtlı olan genom dizilerinin "Rapid Annotation using Subsystem Technology Version 2.0" kullanılarak taranmış, devamında ilgili gene sahip olanların transglutaminaz için Hidroksimat Yöntemi (Kağıt Disk Yöntemiyle), β -galaktozidaz için ONPG yöntemi, levansukraz için ise mukoid yapı oluşturma fenotipinin belirlenmesi şeklinde enzim üretme yetenekleri belirlenmiştir. Biyoinformatik taramada tüm izolatların "transglutaminaz benzeri enzim" kodlayan gen bölgesi içerdiği, kalitatif tarama sonucunda farklı türe sahip ve besiyerinde daha hızlı gelişim gösteren 9 adet bakteri izolatının potansiyel olduğu belirlenmiştir. Levansukraz enzim genine ise sadece *Micromonospora* sp. KC721 ve *Micromonospora* sp. KC213 izolatlarının sahip olduğu ancak hiçbir izolat ne katı ne de sıvı besiyerinde aktivite göstermemiştir. β -Galaktozidaz enzim üretim geni varlığı 38 izolatla saptanmıştır. Enzim üretim genine sahip izolatlara uygulanan kalitatif test sonucunda, daha yoğun renk oluşturan, farklı türe sahip olan ve besiyerinde diğerlerine göre hızlı gelişim gösteren 17 izolat potansiyel β -galaktozidaz üreticisi olarak seçilmiş ve farklı biyoteknolojik uygulamalar için endüstriyel ölçekli enzim üretiminde kullanım potansiyeline sahip aktinobakter izolatları olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzim üretim yeteneği, Transglutaminaz, Levansukraz, β -Galaktozidaz, Aktinobakteri

Production Capabilities of Transglutaminase, Levansucrase and Beta Galactosidase of Actinobacteria Isolates

ABSTRACT

Actinobacteria occupy an important position among alternative enzyme sources with their ability to growth in extreme conditions, their potential to produce large amounts of enzymes, biochemical diversity and compatibility with genetic manipulations. In this study, the selection of suitable producer microorganisms for transglutaminase, β -galactosidase and levansucrase enzymes was aimed, and the enzyme production capabilities of 46 actinobacterial isolates were determined. The ability of these actinobacterial isolates to produce related enzymes was determined by scanning the genome sequences deposited in "GenBank using Rapid Annotation using Subsystem Technology Version 2.0". Subsequently, the enzyme production capabilities of these isolates with relevant gene were determined by Hydroximate Method for transglutaminase (with the Paper Disc Method), the ONPG method for β -galactosidase and

the mucoid structure formation phenotype for levansucrase. By bioinformatics scanning, it was determined that all isolates contained a "transglutaminase-like enzyme" gene region and by qualitative screening, 9 isolates with different species and that can grow rapidly in medium were identified as potential isolates. A levansucrase-production gene was determined in only 2 isolates (*Micromonospora* sp. KC 721 and *Micromonospora* sp. KC213) but none of these showed activity in agar and broth medium. The presence of β -galactosidase enzyme production gene was detected in 38 isolates. As a result of the qualitative test, 17 isolates with more intense color, different species and that can grow rapidly in medium were selected as potential β -galactosidase-producers and determined as actinobacterial isolates with a potential to be used in industrial scale enzyme production for different biotechnological applications.

Keywords: Enzyme production capability, Transglutaminase, Levansucrase, β -Galactosidase, Actinobacteria

GİRİŞ

Endüstriyel enzimlerin üretiminde proses girdi maliyetlerinin düşürülmesi ve elde edilecek enzimin proses koşullarında yüksek aktivite göstermesi en önde gelen taleplerdendir. Bu nedenle günümüzde enzim üretimi üzerine yapılan araştırmaların önemli bir kısmı, uygun bir üretici mikroorganizmanın seçilmesi/oluşturulması, ucuz ve kolay hazırlanabilen üretim ortamının tasarlanması üzerine gerçekleştirilmektedir. Bu hedefe ulaşabilmek için 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 artıran bir yaklaşımdır. Bu kapsamda ekstrem şartlarda gelişmiş, büyük miktarlarda enzim üretme potansiyeli, biyokimyasal çeşitlik ve genetik manipülasyonlara uygunluk gösteren aktinobakteriler alternatif enzim kaynakları olarak önem taşımaktadırlar [1, 2].

Aktinobakteriler, 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 [3]. Bu sınıf su ve karasal ekosistemlerde yaygın bulunan, yüksek G+C içeriğine sahip Gram pozitif bakterileri kapsamaktadır [4]. Ayrıca, ölü bitki, hayvan ve mantar gibi materyallerin parçalanmasından sorumlu olan ekstraselüler hidrolitik enzimleri üretme yeteneklerinden dolayı ekstrem alanlarda yaşama kabiliyetine sahiptirler [5] ve enzim üretimi için dikkat çekicidirler. Mikroorganizmalardan tanımlaması yapılan 23.000'in üzerindeki sekonder metabolitten %42'sinin Aktinobakterilerce üretildiği [6]; 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 [7] bildirilmektedir. Aktinobakterilerin ürettiği metabolitler içerisinde büyük endüstriyel öneme sahip lipaz, proteaz, amilaz, pektinaz, selülaz gibi enzimler de bulunmaktadır [9].

Çalışmada üretici kaynak mikroorganizma belirlenmesi için tarama yapılan ve özellikle gıda endüstrisinde önemli kullanım alanına sahip olan transglutaminaz, β -galaktozidaz ve levansukraz enzimlerinden transglutaminazlar (EC. 2.3.2.13), proteine bağlı serbest amino grupları veya peptidlere bağlı lizin grupları (açil aseptörleri, alıcıları) ile proteinin γ -karboksiamide

grupları veya peptidlere bağlı glutamin grupları (açil donörleri) arasındaki kovalent bağ oluşumunu kataliz eden enzim ailesidir [9]. Gıda endüstrisinde çeşitli bağ oluşumları ve çapraz bağlanmalar aracılığıyla parçalama, dondurma, pişirme gibi farklı gıda proseslerinde devamlılığını koruyabilen büyük partiküller oluşturmada [10], böylece üründe istenilen tekstür, çözünürlük, viskozite, jelleşme ve su tutma kapasitesinin eldesinde [11-16] önem taşımaktadır. Gıda endüstrisinde süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, bitkisel proteinler, fırıncılık ürünleri gibi geniş bir kullanım potansiyeline sahip olan transglutaminaz enzimlerinin farklı pH değerlerinde çalışabilmesi ve yüksek sıcaklık uygulamalarında stabil kalabilmeleri seçimlerinde önem taşıyan faktörlerdendir.

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 [17]. Fruktozil alıcı moleküle bağlı olarak; polimerizasyon, transfruktosilasyon ve hidroliz dahil üzere 3 farklı reaksiyon gerçekleştirmekte; sahip olduğu fizyolojik etkiler dolayısıyla gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanım potansiyelini gittikçe artan levan ve levan tipi fruktooligosakkarit sentezinde anahtar biyokatalizör olarak rol oynamaktadır [17]. Levan, jelleştirici ajan, emülgatör, stabilizatör, kıvam artırıcı ve yağ ikamesi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip iken [18, 19]; fruktooligosakkaritler reçeller, şekerlemeler ve çikolatalarda düşük kalorili fonksiyonel tatlandırıcı olarak [20] kullanılabilir. Bu uygulamalarda düşük pH ve yüksek sıcaklık dayanımları kullanım alanlarını genişletebilecek ve daha esnek üretim planlaması yapılmasına imkan verecektir.

Laktaz olarak da bilinen β -galaktozidaz enzimi de (EC. 3.2.1.23), laktozun glikoz ve galaktoz birimlerine hidrolizinden sorumludur [21]. Beslenme, gıda prosesleri ve çeşitli çevresel uygulamalarda geniş kullanım alanına sahip, endüstriyel açıdan önemli enzimlerdendir [22]. Süt ürünlerinin lezzetini, çözünürlüğünü ve sindirimini iyileştirmek; laktoz intolerant bireyler için laktozsuz ürün üretmek ve konsantre ürün proseslerinde kristallenme sorununu çözmek amacıyla kullanılmaktadır [23-30]. Kullanılacak enzimlerin geniş pH aralığında çalışıp (pH 4.0-8.5); yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini kaybetmemesi tercih edilen özelliklerdendir.

Günümüzde farklı alanlarda kullanılmak üzere ticari değeri olan özellikle sert çevresel koşullara dayanıklı enzimlerin yerli kaynaklardan daha verimli olarak

üretilebilmesine önem verilmektedir. 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 yetenekleri ile metabolitlerinin özelliklerini şekillendirebilmektedir. Bu yaklaşımdan hareketle çalışmada, karasal ve kurak bir iklime sahip, zemin yüzeyinde 80°C'ye varan sıcaklığın hissedildiği, düşük organik madde içeriğine sahip Türkmenistan'daki Karakum Çölü'nden; yüksek tuz içeriğine sahip Çorum'daki Boncuk Tuzlası'ndan ve az organik maddeli kireçli topraklara sahip Haçibektaş'tan alınan toprak örneklerinden izole edilmiş aktinobakterilerle, Bolu Yeniçağa Gölü (1 metre derinlikten alınan sediment örnekleri), Düzce fındık bahçesi ve KKTC Zafer Burnu gibi daha önce çalışılmamış farklı bölgelerin toprak örneklerinden izole edilmiş aktinobakteriler kullanılmıştır. Bu izolatlardan elde edilecek yüksek sıcaklık değerlerine dayanıklı enzimlerin pastörizasyon işleminde ürünlere ısı işlem öncesi eklenebilmesi; asidik pH değerleri ve yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren enzimlerin bu şartlarda üretimi gerektiren ve/veya ekonomik hale getiren endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek olması gibi avantajlarının olacağı düşünülmektedir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Mikrobiyal transglutaminaz, levansukraz ve beta galaktozidaz enzim üretim yeteneğinin varlığını test etmek amacıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde depolanan farklı ekolojik özelliklere sahip ortamlardan izole edilmiş ve draft genom dizisi belirlenerek tanımlanmış toplam 46 adet bakteri temin edilmiştir. Temin edilen bakteriler, izole eden araştırmacı ve izolasyon kaynağı Tablo 1'de yer almaktadır.

Metot

Transglutaminaz, Levansukraz ve β -Galaktozidaz Üretim Potansiyeline Sahip İzolatların Biyoinformatik Tarama ile Belirlenmesi

Biyoinformatik taramada, farklı ekolojik özelliklere sahip ortamlardan izole edilen bakteri izolatlarının draft genom dizileri (kontigler) ile GenBank veritabanına 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 dizileri kendi içinde karşılaştırılarak korunmuş bölgeler tespit edilmiş ve örtüşme biçimleri ortaya konulmuştur. İzolatların 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 [31, 32]. 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.

Enzim Üretim Potansiyeline Sahip Bakterilerin Aktifleştirilmesi, Safılık Kontrolleri ve Muhafazası

Biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılan taramada ilgili gene sahip olanlarla; bunların yakın akrabası olan ve parçalı genom verilerinin kullanılması nedeniyle enzimleri kodlayan gen bölgelerinin tamamını aynı genom parçasında içermeyebileceği için negatif sonuç verebilecek olan farklı habitatlardan izole edilmiş bazı izolatlar da ileriki çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir. Enzim üretim potansiyeli bulunan bu 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 safılık kontrolleri yapılmış ve ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere aynı katı besiyerinde +4°C'de; uzun süreli olarak da -80°C'de muhafaza edilmiştir [33].

Bakterilerin Enzim Üretim Yeteneklerinin Kalitatif Belirlenmesi

Seçilen izolatların transglutaminaz, levansukraz ve β -galaktozidaz üretim yetenekleri aşağıda verilen yöntemler uygulanarak belirlenmiştir.

Transglutaminaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Transglutaminaz üretim genine sahip bakteriler Nutrient Agar (Merck, 105450) içeren 2 petriye nokta ekimle aşılınmış ve 28-30°C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra petri kaplarında gelişen her bir koloninin üstüne filtre kağıdı diskleri (disklerin çapı; 0.56±0.01 cm ve su tutma kapasiteleri 9.45±0.15 μ L) yerleştirilmiştir. Petri kaplarından birindeki her bir disk üzerine 30 μ L substrat karışımı (37.5 mM Z-Gln-Gly, 125 mM hidroksilamin ve 12.5 mM glutatyon; 200 mM sitrat tamponunda çözdürülmüştür, pH 6.0) diğerindeki her bir disk üzerine 30 μ L saf su eklenerek (kontrol) 28°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda filtre kağıtları üzerine 10 μ L sonlandırma çözeltisi (%5 FeCl₃.6H₂O içeren %15'lik TCA) eklenip 28°C'de 1 saat bekletildikten sonra her bir izolatın 2 farklı petrideki renk yoğunlukları karşılaştırılmış ve kontrol örneğine göre yoğun kahverengi renk oluşturan izolatlar üretici olarak seçilmiştir [32]. Yöntem, enzimin spesifik bir substratı olan Z-Gn-Gly (Sigma-Aldrich, C6154) ile hidroksilamin (Sigma-Aldrich, 438227) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan hidroksimatın ferrik kompleksi ile koyu bordo/kahverengi renk oluşturması esasına dayanmaktadır [35].

Levansukraz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Levansukraz üretimi, Modifiye Sukroz Agar'da (MSA: %2.5 sukroz, %1 tripton, %1 maya ekstraktı, %0.5 NaCl, %0.025 K₂HPO₄, %3 agar ve pH 7.0±0.2) geliştirilen

kolonilerin mukoid yapı oluşturma fenotipi test edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla bakteri izolatları, MSA besiyerine tek koloni düşürecek şekilde ekilmiş ve petriler 35°C'de 24–48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mukoid (yapışkan) yapılı koloniler levansukraz pozitif olarak seçilmiştir [36]. Levansukraz üreticisi izolatların sukroz molekülünden mukoid yapıya sahip levansukraz polissakariti üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir [37].

Katı besiyerinde mukoid yapı oluşturmeyen izolatların üretim yeteneklerinin varlığı dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanılarak da taranmıştır. Bu amaçla GYMEPA besiyerinde 30°C'de 7 gün inkübe edilerek geliştirilen kolonilerden öze ucu ile alınarak GYMEPB besiyerine ekim yapıp 30°C'de 180 rpm çalkalamalı koşullar altında 3 gün inkübe edilmiş ve kültürden taze olarak hazırlanan fermentasyon ortamına (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) %5 oranında aşılama yapılmıştır [38, 39]. Aşılama besiyerleri 28-30°C'de 180 rpm çalkalamalı koşullarda bulanıklık gözlenene kadar inkübasyona bırakılmış; takiben 10000 g kuvvetinde 4°C'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatanta levansukraz enzim varlığı DNS metodu [40] kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için Tris-HCl tamponu (200 mM, pH 8.0) ile hazırlanmış 0.5 M sukroz çözeltisi ile 500 µL enzim çözeltisi karıştırılıp 30°C'de 10 dakika tutulmuştur. Karışımın 200 µL'si ve 400 µL DNS çözeltisi test tüpüne aktararak kaynayan su içerisinde 5 dakika bekletilmiş ve tüp içerisindeki karışım hızla soğutulduktan sonra 1 mL distile su ilave edilmiş ve karışımın 540 nm'deki absorbanı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuç saf su ve glukoz içeren standart çözelti ile karşılaştırılarak levansukraz aktivitesi varlığı saptanmıştır.

β-Galaktozidaz Enzimi Üretimini Belirlenmesi

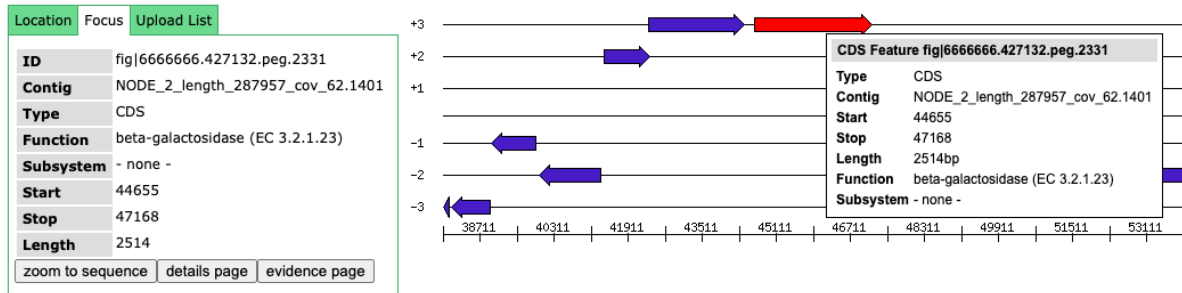
Enzim üretim genine sahip bakterilerin; ilgili geni ifade etme durumları 2-nitrofenil β-D-galaktropiranosid (ONPG) testi uygulanarak taranmıştır. Bu amaçla ilk olarak bakteriler modifiye edilmiş GYM Agar (4 g/L maya, 10 g/L malt, 2 g/L CaCO₃, 4 g/L laktöz, 20 g/L agar ve pH 7.2) besiyerinde geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerden bir öze alınıp; 0.25 mL fizyolojik tuzlu su ile süspansiyon edildikten sonra üzerine 0.25 mL ONPG besiyeri (30 mL A çözeltisi (50 mL distile su + 5 g tripton + 2.5 g NaCl, pH 7.5) + 10 mL B çözeltisi (10 mL 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7.5) + 0.06 g ONPG) 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 [41]. Yöntemin prensibi; β-galaktozidaz enziminin renksiz bir bileşik olan ONPG (Sigma-Aldrich N1127) 'yi hidroliz ederek galaktoz ve sarı renkli orto-Nitrofenol (ONP) bileşenlerine parçalamasıdır [42].

BULGULAR ve TARTIŞMA

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

Farklı bölgelerden izole edilen ve tüm genom dizi analizleri gerçekleştirilerek değişken sayıda parçadan oluşan genom verileri tanımlanan 46 toprak bakterisinin transglutaminaz, levansukraz ve β-galaktozidaz enzimleri üretim genlerine sahip olup olmadıkları biyoinformatik araçlar kullanılarak belirlenmiş (Şekil 1) ve taranan mikroorganizmalar ile tarama sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

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



Şekil 1. *Jiangella* sp. 8K307 izolatının RAST Sisteminde β-galaktozidaz enzimi üretim geni varlığına işaret etmektedir

Figure 1. Screenshot of *Jiangella* 8K307 isolate for the presence of a β-galactosidase production gene in RAST System (The red region indicates the presence of a β-galactosidase production gene)

Taranan 46 bakteriden hepsinin bu enzimlerden en az birini kodlayan gen bölgesine sahip olduğu; transglutaminaz geninin tüm bakterilerde, levansukraz geninin 2 bakteride (*Micromonospora* sp. KC721, *Micromonospora* sp. KC213), β-galaktozidaz geninin de 38 bakteride bulunduğu saptanmıştır. Elde edilen

sonuçlar enzim üretim kaynağı olabilecek bakterilere işaret etmiş ve ilgili genlere sahip bakterilerin enzim üretim genlerinin ekspresyonunu ortaya koymak, endüstriyel üretim çalışmalarında denenmek üzere önermek için enzim üretimleri kalitatif yöntemlerle belirlenmiştir.

Tablo 1. Enzim üretim yetenekleri taranan mikroorganizmalar ve tarama sonuçları
Table 1. Microorganisms screened for enzyme production capabilities

No	Kullanılan Mikroorganizma	En Yakın Akrafa Tip Türü*	% Benzerlik	İzolasyon Kaynağı / İzole Eden Araştırmacı	GenBank Accession No.	Enzim Üretim Geni**		
						Tr.	Le.	β-Ga.
1	<i>Streptomyces coryli</i> AT024 ^T	<i>S. cadmissoli</i> ZFG47 ^T	97.7	Fındık Bahçesi – Düzce / Nevzat Şahin	JAACKZ000000000	+	-	+
2	<i>Streptomyces boncukensis</i> SB3404 ^T	<i>S. albus</i> NBRC 13014 ^T	97.2	Boncuk Tuzlası – Çorum / Demet Tatar	JAACKZ000000000	+	-	+
3	<i>Streptomyces scabichelini</i> HC44 ^T	<i>S. vastus</i> NBRC 13094 ^T	97.6	Hacıbektaş – Nevşehir / Talha Gençbay	JAACKZY000000000	+	-	+
4	<i>Streptomyces mesophilus</i> YC504 ^T	<i>S. caldifontis</i> NCCP-1331 ^T	98.6	Yeniçağa Gölü – Bolu / Ali Tokatlı	JAACKW000000000	+	-	+
5	<i>Streptomyces ureilyticus</i> YC419 ^T	<i>S. vastus</i> NBRC 13094 ^T	99.0	Yeniçağa Gölü – Bolu / Ali Tokatlı	JAACKX000000000	+	-	+
6	<i>Streptomyces boluensis</i> YC537 ^T	<i>S. ziwulingensis</i> F22 ^T	97.9	Yeniçağa Gölü – Bolu / Ali Tokatlı	JAAAH000000000	+	-	+
7	<i>Nonomuraea</i> sp. K271	<i>No. kuesteri</i> NRRL B-24325 ^T	98.9	Zafer Burnu – KKTÇ / Aysel Veyisoğlu	JAAAHR000000000	+	-	+
8	<i>Rhodococcus</i> sp. 14C212	<i>R. aetherivorans</i> 10bc312 ^T	98.8	Bazaltik Ana Materyal – Samsun / Salih Sarıcaoğlu	JAALH000000000	+	-	-
9	<i>Nocardioideis</i> sp. KC13	<i>N. luteus</i> KCTC 9575 ^T	99.3	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	JAAALAA000000000	+	-	+
10	<i>Shimazuella alba</i> KC615	<i>Sh. kribbensis</i> KCTC 9933 ^T	98.2	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	WUUL000000000	+	-	+
11	<i>Microbacterium</i> sp. 5K110	<i>M. testaceum</i> NBRC 12675 ^T	99.2	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	VBUM000000000	+	-	-
12	<i>Nonomuraea</i> sp. 7K523	<i>No. Harbinensis</i> NEAU-yn31 ^T	99.7	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770787	+	-	+
13	<i>Streptomyces</i> sp. 8K308	<i>S. hainanensis</i> YIM 47672 ^T	99.2	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKC000000000	+	-	+
14	<i>Pseudonocardia</i> sp. 5K418	<i>Ps. Kunmingensis</i> YIM 63158 ^T	99.8	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770740	+	-	+
15	<i>Actinomadura</i> sp. KC345	<i>A. bangladeshensis</i> 3-46-b3 ^T	98.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKH000000000	+	-	+
16	<i>Streptomyces</i> sp. 13K105	<i>S. puniceus</i> NRRL ISP-5058 ^T	98.8	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770836	+	-	+
17	<i>Actinocorallia</i> sp. 5K550	<i>Ac. libanotica</i> IFO 14095 ^T	99.1	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MK156414	+	-	+
18	<i>Actinomadura</i> sp. 7K534	<i>A. livida</i> JCM 3387 ^T	99.3	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKBA000000000	+	-	+
19	<i>Streptomyces</i> sp. 16K401	<i>S. fragilis</i> NRRL 2424 ^T	98.9	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770867	+	-	-
20	<i>Saccharopolyspora elongata</i> 7K502 ^T	<i>Sa. shandongensis</i> 88 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKW000000000	+	-	+
21	<i>Saccharopolyspora karakumensis</i> 5K548 ^T	<i>Sa. pathumthaniensis</i> S582 ^T	99.8	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMLA000000000	+	-	+
22	<i>Saccharopolyspora terrae</i> 16K309 ^T	<i>Sa. pathumthaniensis</i> S582 ^T	99.7	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKS000000000	+	-	+
23	<i>Saccharopolyspora aridisoli</i> 16K404 ^T	<i>Sa. endopytica</i> YIM 63158 ^T	99.7	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKV000000000	+	-	+
24	<i>Jiangella ureilytica</i> KC603 ^T	<i>J. mangrovi</i> 3SM4-07 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKL000000000	+	-	-
25	<i>Jiangella asiatica</i> 5K138 ^T	<i>J. alba</i> DSM 45237 ^T	99.5	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKZ000000000	+	-	+
26	<i>Jiangella aurantiaca</i> 8K307 ^T	<i>J. alkaliphila</i> DSM 45079 ^T	99.2	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMLB000000000	+	-	+
27	<i>Kribbella turkmenica</i> 16K104 ^T	<i>K. antibiotica</i> YIM 31530 ^T	99.2	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKX000000000	+	-	+
28	<i>Micromonospora</i> sp. 15K316	<i>Mi. avicenniae</i> DSM 45758 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKG000000000	+	-	+
29	<i>Micromonospora</i> sp. KC723	<i>Mi. pallida</i> DSM 43817 ^T	99.1	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKD000000000	+	-	+
30	<i>Micromonospora</i> sp. KC721	<i>Mi. haikouensis</i> 232617 ^T	99.3	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMJY000000000	+	+	+
31	<i>Micromonospora</i> sp. KC213	<i>Mi. krabiensis</i> DSM 45344 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKF000000000	+	+	+
32	<i>Micromonospora</i> sp. KC207	<i>Mi. fluostatini</i> PWB-003 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKJ000000000	+	-	+
33	<i>Micromonospora</i> sp. KC606	<i>Mi. chersina</i> DSM 44151 ^T	99.2	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKN000000000	+	-	+
34	<i>Nonomuraea longispora</i> KC201 ^T	<i>No. salmonea</i> DSM 43678 ^T	99.0	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMJZ000000000	+	-	-
35	<i>Nonomuraea diastatica</i> KC712 ^T	<i>No. candida</i> HMC10 ^T	98.1	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKP000000000	+	-	+
36	<i>Nonomuraea deserti</i> KC310 ^T	<i>No. candida</i> HMC10 ^T	98.1	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMKO000000000	+	-	+
37	<i>Nonomuraea mesophila</i> 6K102 ^T	<i>No. salmonea</i> DSM 43678 ^T	98.3	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	SMLD000000000	+	-	+
38	<i>Streptomyces cahuitamycinicus</i> 13K301 ^T	<i>S. variegatus</i> NRRL B-16380 ^T	98.9	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	POUC000000000	+	-	+
39	<i>Spongiactinospora gelatinilytica</i> 7K107 ^T	<i>Sp. rosea</i> LHW63015 ^T	98.7	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	POUA000000000	+	-	+
40	<i>Micromonospora deserti</i> 13K206 ^T	<i>Mi. spongicola</i> S3-1 ^T	98.6	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	POUB000000000	+	-	+
41	<i>Nonomuraea aridisoli</i> KC333 ^T	<i>No. maritima</i> FXJ7.203 ^T	98.9	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	POUD000000000	+	-	+
42	<i>Streptomyces</i> sp. 3K401	<i>S. krungchingensis</i> KC-035 ^T	98.5	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770703	+	-	+
43	<i>Streptomyces</i> sp. 8K301	<i>S. coeruleofuscus</i> NBRC 12757 ^T	99.1	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG70800	+	-	+
44	<i>Plantactinospora</i> sp. KC728	<i>P. veratri</i> NEAU-FHS4 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770685	+	-	-
45	<i>Streptomyces</i> sp. 10K307	<i>S. atrovirens</i> NRRL B-16357 ^T	99.3	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770814	+	-	+
46	<i>Streptomyces</i> sp. 6K502	<i>S. marokkonensis</i> Ap1 ^T	99.4	Karakum Çölü – Türkmenistan / Hayrettin Saygın	MG770757	+	-	-

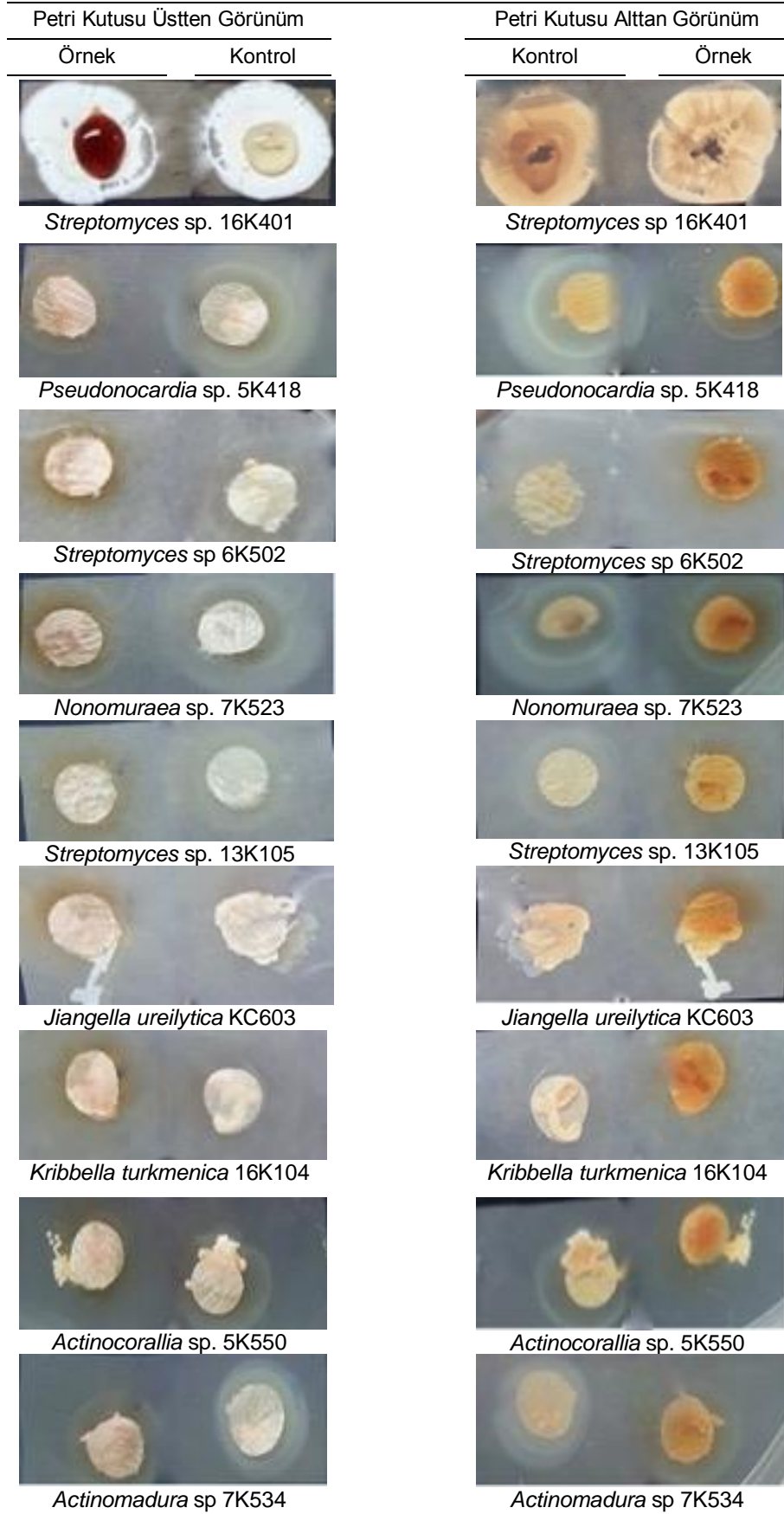
*: *S.*: *Streptomyces*; *N.*: *Nocardioideis*; *R.*: *Rhodococcus*; *No.*: *Nonomuraea*; *Sh.*: *Shimazuella*; *M.*: *Microbacterium*; *A.*: *Actinomadura*; *Sa.*: *Saccharopolyspora*; *J.*: *Jiangella*; *K.*: *Kribbella*; *Mi.*: *Micromonospora*; *Sp.*: *Spongiactinospora*; *P.*: *Plantactinospora*; *Ps.*: *Pseudonocardia*; *Ac.*: *Actinocorallia*. **: Tr.: Transglutaminaz; Le.: Levansukraz; β-Ga.: β-Galaktozidaz; +: Enzim Üretim Geni Taşıyor; -: Enzim Üretim Geni Taşımıyor

Bakterilerin Enzim Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Transglutaminaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Transglutaminaz enzim üretim genine sahip bakterilerin ilgili geni ifade etme durumlarını ortaya koymak için gerçekleştirilen Filtre Kağıt Disk yöntemi sonucunda; bakterilerin çoğunda kontrol grubuna kıyasla kahverengi renk yoğunluğu fazla bulunmuştur. Analiz sonrası bakteriler arasında renk yoğunluğu daha belirgin şekilde gözlenen, farklı türe sahip olan ve besiyerinde daha hızlı gelişim gösteren 9 adet bakteri potansiyel izolat olarak belirlenmiş, seçilen izolatların ekim yapılan petri kaplarının üstten ve alttan görünümüne ait fotoğraflar Şekil 2'de verilmiştir. Seçilen bu izolatların RAST ile gerçekleştirilen biyoinformatik taramasında "Transglutaminase like enzymes- transglutaminaz benzeri enzim" kodlayan gen bölgesi varlığına sahip oldukları tespit edilmiştir. Literatürde de benzer şekilde

aktinobakterilerin enzim üretim genlerine veya yeteneklerine sahip oldukları gösterilmiştir. Örneğin; Giordano ve ark. [43] tarafından *Streptomyces mobaraensis*, *Streptomyces auratus*, *Streptomyces fradie*, *Streptomyces decoyicus*, *Streptomyces paucisporogenes*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Streptomyces* sp. H021, *Streptomyces* sp. XY332 gibi bakterilerde bu gen bölgesinin varlığı belirlenmiştir. Transglutaminaz üretiminin varlığı da Guan ve ark. [44] tarafından *Streptoverticillium mobaraense*, *Streptoverticillium cinnamoneum*, *Actinomadura* sp., *Streptoverticillium ladakanum*, *Bacillus circulans*, *Streptomyces* sp. ve *Streptomyces hygrosopicus*'da; Ho ve ark. [45] tarafından *Streptoverticillium ladakanum*'da; Kim ve ark. [46] tarafından *Actinomadura* sp. T-2'de; Yeo ve ark. [47] tarafından *Streptomyces platensis* YK-2'de; Jin ve ark. [48] ile Zhang ve ark. [49] tarafından da *Streptomyces mobaraensis*'te gösterilmiştir.



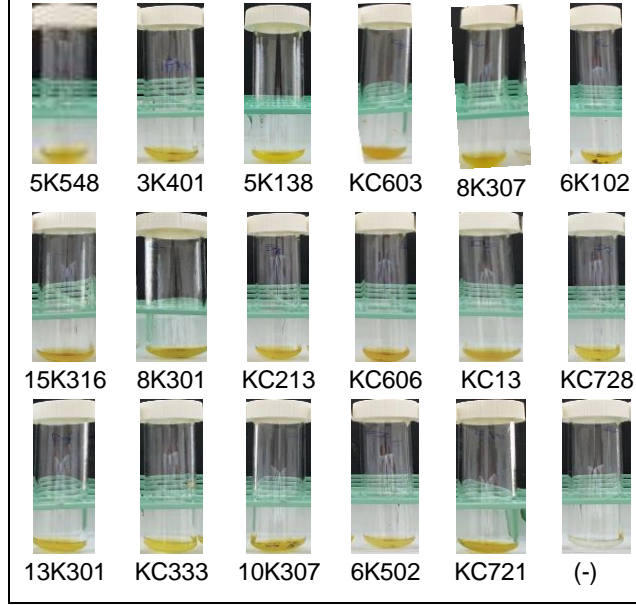
Şekil 2. Transglutaminaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesine ait ekim yapılan petri kaplarındaki kolonilerin üstten ve alttan görünüşleri

Figure 2. Top and bottom views of the colonies in the inoculated petri dishes for the qualitative determination of transglutaminase activity

β-Galaktozidaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

β-Galaktozidaz enzim üretim genine sahip bakterilerin ONPG testi uygulanarak belirlenen üretim yetenekleri testi sonucu, daha yoğun sarı renk oluşturan, farklı türe sahip olan ve besiyerinde daha hızlı gelişim gösteren 17 izolat (5K548, 3K401, 5K138, KC603, 8K307, 6K102, 15K316, 8K301, KC213, KC13, KC728, 13K301, KC333, 10K307, 6K502, KC721, KC606), potansiyel β-galaktozidaz üreticisi olarak seçilmiştir. Kalitatif analiz

sonucunda β-galaktozidaz üreticisi olarak seçilen bu 17 izolatın genom analiz sonuçlarında 3 tanesinin üretim genine sahip olmadığı saptanmıştır. Bu durum ilgili bakterilerin parçalı genom verisine sahip olması nedeniyle ilgili enzimi kodlayan gen bölgelerinin tamamının aynı genom parçasında bulunmaması ile ilişkilendirilmiştir. ONPG test sonucu pozitif olarak seçilen 17 bakteriye ait analiz sonuç görünümüne ait fotoğraflara Şekil 3'de yer verilmiştir.



Şekil 3. β-galaktozidaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen ONPG test sonucunda pozitif olarak seçilen 17 izolatın görünümleri (Sarı renk: pozitif, renk değişimi olmaması: negatif)

Figure 3. Views of 17 isolates selected as a positive result of the ONPG test performed for the qualitative determination of β-galactosidase activity (Yellow color: positive, No color change: negative result)

Toprak bakterilerinin β-galaktozidaz ürettiği çalışma sonuçlarına benzer şekilde daha önce yapılan ve literatüre giren çalışmalarda da gösterilmiştir. Fiss ve Brooks [50] tarafından katı besiyerinde 25 *Nocardia* spp. ve 4 *Streptomyces* spp.'nin tümünün; 13 *Mycobacterium* türünden 1 tanesinin ve 40 *Rhodococcus* türünden de yine 1 tanesinin β-galaktozidaz pozitif olarak gözlemlendiği raporlanmıştır. Yine Sanchez ve Hardisson [51] Antartika bölgesinden izole edilen *Artrobacter* sp. 32c'nin; Maity ve ark. [53] Hindistan-Kolkata bölgesindeki sığır ahırlarından gelen toprak örneklerinden izole edilen 2 toprak bakterisinin β-galaktozidaz üretim yeteneğine sahip olduğunu bildirmiştir.

Collinge ve ark. [54] tarafından *Streptomyces coelicolor* tarafından termostabil β-galaktozidaz enzimi üretilmiş ve ABD'de patentlenmiştir. Elde edilen enzimin; 70°C'de aktif olduğu, maksimum aktivitenin ise 65°C'de gözlemlendiği belirlenmiş ve düşük sıcaklık ile yapılan pastörizasyon proseslerinde (63°C'de 30 dakika) kullanımı önerilmiştir. Nakao ve ark. [55] tarafından da *Saccharopolyspora rectivirgula* bakterisinden elde edilen yüksek transgalaktozilasyon aktivitesine sahip

termostabil β-galaktozidazın 70°C'de (1.75 M laktöz ortamında, 7.0 pH) 22 saat sonunda %41 verimle GOS ürettiği raporlanmış ve yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen proseslerde laktözden GOS üretiminde başarıyla kullanılabileceği önerilmiştir.

SONUÇ

Çalışmada farklı ve ekstrem koşullara sahip bölgelerden izole edilen ve genom verisi bulunan 46 toprak bakterisinin gıda endüstrisinde talep gören ve kullanımı fazla olan transglutaminaz, β-galaktozidaz ve levansukraz enzimi üretim yetenekleri biyoinformatik ve kalitatif yöntemlerle araştırılmıştır. İzolatların; transglutaminaz enzimi üretim genine tümünün, β-galaktozidaz üretim genine 38'inin ve levansukraz üretim genine 2'sinin sahip olduğu belirlenmiştir. Enzim üretim yeteneklerinin kalitatif olarak taranması sonucunda, transglutaminaz enzimi üretim yeteneğine sahip olan ve diğer izolatlarla kıyasla daha yoğun kahverengi renk oluşumu ve/veya daha hızlı gelişen 9 bakteri izolatı (16K401, 5K418, 6K502, 7K523, 13K105, KC603, 16K104, 5K550, 7K534) ile β-galaktozidaz enzim üretim yeteneğine sahip olan ve diğer izolatlarla kıyasla daha yoğun sarı renk oluşturan ve/veya hızlı

gelişen 17 bakteri izolatu (5K548, 3K401, 5K138, KC603, 8K307, 6K102, 15K316, 8K301, KC213, KC13, KC728, 13K301, KC333, 10K307, 6K502, KC721, KC606) potansiyel üretici olarak seçilmiştir. Levansukraz enzim üretim genine sahip olan 2 bakteri izolatu (KC721, KC213) ile ilgili geni taşımayan diğer izolatlardan hiçbirinde katı besiyerinde mukoid yapı oluşturma fenotipi gözlenmemiş; levansukraz enzimi üretimi için tasarlanan sıvı besiyerinde aktivite varlığı da saptanmamıştır. İlgili geni içeren izolatların levansukraz üretmemesi test edilen ortam ve şartlarda ifade edemediğini düşündürmektedir. Bu durum çalışmalarda rastlanılan bir fenomendir.

Potansiyel üretici olarak seçilen transglutaminaz üreticisi 9 ve β -galaktozidaz üreticisi 17 izolatın, enzim üretim miktarlarının belirlenip, üretilen enzimlerin karakterizasyonu ile optimum enzim üretim ortamı ve şartlarının belirlenerek farklı işlem şartlarında (sıcaklık, tuz vb.) çalışabilecek endüstriyel enzimlerin yerli kaynaklardan verimli olarak üretilme potansiyelinin ortaya konulmasının; ithal olarak karşılanan enzimlerin yerli olarak üretiminin sağlanması, dışa bağımlılığın azaltılması ve girdi maliyetlerinin düşürülerek işletmelerinin karlılığının artırılması yoluyla ülke ekonomisine katkı vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] 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, 221-225.
- [2] 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.
- [3] Vijayanthi, G., Vijayakumar, R., Dhanasekaran, D. (2016). Actinobacteria-A Biofactory of Novel Enzymes. Actinobacteria Basics and Biotechnological Applications. <https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/actinobacteria-a-biofactory-of-novel-enzymes> (05.07.2021).
- [4] 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.
- [5] Ul-Hassan, A., Wellington, E.M. (2009). Actinobacteria. In Desk Encyclopedia of Microbiology, Edited by Schaechter, M, Academic Press, USA, 1-19.
- [6] Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58, 1-26.
- [7] Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*, 65, 385-395.
- [8] 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.
- [9] Zhu, D., Wu, Q., Wang, N. (2011). Industrial Enzymes. in Comprehensive Biotechnology. Edited by Moo-Young, M, Pergamon Press, Oxford, 3-13.
- [10] 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.
- [11] Yasir, S., Sutton, K., Newbeery, M., Andrews, N., Gerrard, J. (2007). The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture. *Food Chemistry*, 104(4), 1491-1501.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Kieliszek, M., Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59, 241-250.
- [15] Tarapatsky, M., Domagała, J., Zagula, G. (2019). The effect of transglutaminase on colloidal stability of milk proteins. *Food Measure*, 13, 2339-2346.
- [16] 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.
- [17] Li, W., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2015). Recent novel applications of levansucrases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 6959-6969.
- [18] Arvidson, S., Rinehart, B., Gadala-Maria, F. (2006). Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 144-149.
- [19] Xiao, M., Feng, F., Lu, L. (2014). Preparation method of levan-contained yogurt. <https://patentimages.storage.googleapis.com/56/d9/9c/7a577f198ab4fe/US3816259.pdf> (05.07.2020).
- [20] Yıldız, S. (2011). The Metabolism of fructooligosaccharides and fructooligosaccharide-related compounds in plants. *Food Reviews International*, 27(1), 16-50.
- [21] Kumar, D.J.M., Jayanthisiddhuraj, Amutha, B., Devi, D.M., Kumaran, M.D.B., Kalaichelvan, P.T. (2012). 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.
- [22] Ray, B. (1996). *Fundamental Food Microbiology*. New York: CRC press. 169-180.

- [23] Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41-62.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Akin, N., Gündüz, A., Konak, Ç. (2012). Teknolojik açıdan süt ürünlerinde laktöz dönüşümleri ve intoleransı. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 10(4), 77-84.
- [28] 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.
- [29] Skryplonek, K., Henriques, M., Gomes, D., Viegas, J., Fonseca, C., Pereira, C., Mituniewicz-Malek, A. (2019). Characteristics of lactose-free frozen yogurt with κ -carrageenan and corn starch as stabilizers. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7838-7848.
- [30] 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.
- [31] Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., Dejongh, M. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(75), 1-15.
- [32] 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.
- [33] Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
- [34] 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.
- [35] Leblanc, A., Gravel, C., Labelle, J., Keillor, J.W. (2001). Kinetic studies of guinea pig liver transglutaminase reveal a general-base-catalyzed deacylation mechanism. *Biochemistry*, 40, 8335-8342.
- [36] 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, 101-107.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- [41] Tille, P.M., Forbes, B.A. (2014). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (Thirteenth Edition). Elsevier, St. Louis, Missouri.
- [42] Chandler, V., Donovan, S., Goodwin, W., Sprague, S., Stiefbold, F. (1998). Enzyme kinetics. In *Tested Studies for Laboratory Teaching*. Edited by Karcher. S.J., Volume 19, 81-97.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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 *Streptoverticillium ladakanum*. *Journal of Food Science*, 65(1), 76-80.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] Jin, M., Huang, J., Pei, Z., Gao, H., Chang, Z. (2016). Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 6-11.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] Sanchez, J., Hardisson, C. (1979). Induction of β -galactosidase in *Streptomyces violaceus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(7), 833-840.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] Collinge, A.E., Neubeck, C., Udinsky, J. (1974). "Thermostable Lactase". <https://patentimages.storage.googleapis.com/56/d9/9c/7a577f198ab4fe/US3816259.pdf>. (05.07.2020).
- [55] 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.
-
-