ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge CAN

β-GALAKTOZİDAZ KULLANIMI İLE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİ VE SENTEZİN YÜZEY YANIT YÖNTEMİ KULLANIMI İLE OPTİMİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

β-GALAKTOZİDAZ KULLANIMI İLE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİ VE SENTEZİN YÜZEY YANIT YÖNTEMİ KULLANIMI İLE OPTİMİZASYONU

Özge CAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 16/01/2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….....	……..	…..…….....
Prof. Dr.S. Seyhan Tükel	Prof. Dr.Güzide Yücebilgiç	Prof. Dr. Sadullah Sakallıoğlu
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlham YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2011YL19

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

β-GALAKTOZİDAZ KULLANIMI İLE GALAKTOOLİGOSAKKARİT SENTEZİ VE SENTEZİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ KULLANIMI İLE OPTİMİZASYONU

Özge CAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Yıl : 2012, Sayfa: 63
Juri : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. Sadullah SAKALLIOĞLU

Bu çalışmada *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı kullanılarak laktoz'dan galaktooligosakkarit (GOS) sentezi ve sentez için en uygun koşulların yanıt yüzey yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Modelin oluşturulması amacıyla 4-faktör ve 3-düzey Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır. GOS sentezini etkileyen faktörler, reaksiyon ortamının pH'sı, sıcaklığı, başlangıç laktoz derişimi ve reaksiyon süresi olarak seçilmiştir. Box-Behnken dizaynı ile belirlenen farklı koşullar içeren toplam 27 farklı deneysel sentez ortamında GOS sentezi gerçekleştirilmiştir. En yüksek GOS verimine %17,2 (w/w) olarak pH'nın 6, sıcaklığın 60 ^{o}C, başlangıç laktoz derişiminin 300 mM (%10 w/v) ve reaksiyon süresinin 6 saat olduğu koşullarda ulaşılmıştır. Ayrıca önerilen modelin matematiksel formunun *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı kullanılarak katalizlenen GOS sentezi için GOS verimlerini tahminlemede kullanılabilirliğinin uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Galaktooligosakkarit**,** β-galaktozidaz, yanıt yüzey yöntemi

ABSTRACT

MSc-THESIS

OPTIMIZATION OF β-GALACTOSIDASE CATALYZED SYNTHESIS OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Özge CAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year : 2012, Page: 63
Jury : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. Sadullah SAKALLIOĞLU

In this study, it was aimed to synthesize galactooligosaccharide (GOS) from lactose by using *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase and to optimize the reaction conditions by using response surface methodology. 4-factor and 3-level Box-Behnken design was used for response surface methodology. The four independent factors for GOS synthesis were chosen as reaction pH, temperature, initial lactose concentration and reaction time. The highest GOS yield was obtained as 17,2 % (w/w) when the reaction pH was 6, temperature was 60 ^{o}C, initial lactose consantration was 300 mM (10% w/v) and reaction time was 6 hour among the 27 different sets of experimental conditions. It was determined that the usability of mathematical form of proposed model was suitable in the prediction of GOS yields of GOS synthesis catalyzed by using *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase.

Key words: Galactooligosaccharides, β-galactosidase, response surface methodology

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmam süresince her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım çok değerli Danışmanım Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL'e gösterdiği sabır, anlayış ve iyi niyetinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayata ve bilime olan sevgisiyle akademik yaşantımda bana örnek olan çok sevgili hocam, Prof. Dr. Güzide Yücebilgiç; ve bu şüreç içerisinde yardımlarını ve gülen yüzünü esirgemeyen Doç. Dr. Ramazan Bilgin'e manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve manevi desteğini esirgemeyen, bütün süreç boyunca sabrı anlayışı ve bilgi birikimiyle destek olan değerli hocam Dr. Deniz Yıldırım'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Her zaman yanımda olan, anlayışı ve destekleri ile beni yalnız bırakmayan sevgili annem Leyla CAN'a, ağabeyim Mehmet CAN ve ablam Özlem SHİNSATO'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……I
ABSTRACT……...II
TEŞEKKÜR……..III
İÇİNDEKİLER……..…….IV
ÇİZELGELER DİZİNİ…….VI
ŞEKİLLER DİZİNİ……..VIII
1. GİRİŞ……...1
1.1. Galaktooligosakkarit yapıları ……..…..…….....2
1.2. Galaktooligosakkaritlerin Verimini Etkileyen faktörler…….……....4
1.3. Galaktooligosakkarit'in Kullanım Alanları……..…….....5
1.4. Laktoz…….....7
1.5. β-galaktozidaz Enzimi ve Özellikleri……....8
1.6. β-galaktozidazın GOS Üretimindeki Enzimatik Mekanizması……...13
1.7. GOS Sentez Kinetiğinin Modellenmesi……..…….....16
1.8. β-galaktozidaz'ın Uygulama Alanları……..……....17
1.9. β-galaktozidazın Fizyolojik Önemi ve Eksikliği…….18
1.10. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM)……...…….…...19
1.10.1. Yanıt Yüzey Modelinin Oluşturulması …….....19
1.10.2. Model Parametrelerinin Tahminlenmesi…….....19
1.10.3. Model Uygunluğunun Test Edilmesi……..……20
1.10.4. Model Uygunsuzluğu (Lack of Fit) Testi……..……21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR ……....23
3. MATERYAL VE METOD……....27
3.1. Materyal…….27
3.1.1.Kimyasallar……...…….....27
3.1.2. Araç ve gereçler……...…….…..27
3.2. Metod 27

3.2.1. Yanıt Yüzey Modelinin Oluşturulması ……...……..27
3.2.2. Galaktooligosakkarit Sentezi ……...…….....30
3.2.3. Galaktooligosakkarit' lerin Karakterizasyonu……...30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA …….33
4.1. Bulgular……..33
4.1.1. ^{1}H-NMR' ın Yorumlanması……...……44
4.2. Tartışma…….....45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER …….49
5.1. Sonuçlar…….....47
5.2. Öneriler……..47
KAYNAKLAR……..51
ÖZGEÇMİŞ…….....59
EKLER……..61

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1 β-galaktozidaz varlığında sentezlenen GOS'lerin bağlanma şekilleri , ana ürünleri ve elde edilen verimler…….…….....3
Çizelge 1.2 Değişik reaksiyon koşullarındaki GOS verimleri…….....6
Çizelge 1.3 β-galaktozidaz enziminin bulunduğu kaynaklar……..9
Çizelge 3.1 Yanıt yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin kodları …….28
Çizelge 3.2 Yanıt yüzey yöntemiyle oluşturulan deneysel koşullar…….....29
Çizelge 4.1 Analizler sonucu elde edilen laktoz dönüşüm oranları...…….....34
Çizelge 4.2 Yanıt yüzey yöntemi için anova değerleri……..35
Çizelge 4.3 Tahminlenen değerlerle deneysel verilerin karşılaştırılması……..36

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1 Galaktooligosakkaritin genel yapısı……1

Şekil 1.2. Galaktooligosakkarlerin Farklı Kombinasyonları...…….....3

Şekil 1.3. Laktoz yapısındaki β-D glikozidik bağ……7

Şekil 1.4. Laktozun hidroliz reaksiyonu…….10

Şekil 1.5. β-galaktozidaz enziminin katalizlediği reaksiyon……...10

Şekil 1.6. Laktozun β-galaktozidaz enzimiyle hidrolizi a) β-galaktozidaz enzimi ile laktozun etkileşmesi b) β-galaktozidaz enziminden galaktozun transferi……...12

Şekil 1.7. Aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamik asit artığı bulunan β-Galaktozidazın katalizlediği hidroliz mekanizması……..12

Şekil1.8. β-galaktozidaz aktivitesi için hidroliz ve transgalaktozilasyon mekanizmalarının şematik gösterimi……..14

Şekil 1.9. β-galaktozidaz aktivitesi için basitleştirilmiş reaksiyon mekanizması...15

Şekil 1.10. Endüstride β-galaktozidaz uygulama alanı…….17

Şekil 4.1. Tahminlenen ve gözlenen değerler…….37

Şekil 4.2. Laktoz derişimi ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak GOS verimi'nin üç boyutlu grafiği …….....38

Şekil 4.3. Sıcaklık ve zamanın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği…….....39

Şekil 4.4. pH ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği…….....40

Şekil 4.5. Zaman ve laktoz derişiminin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği……...41

Şekil 4.6. pH ve laktoz derişimi'nin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği…….....42

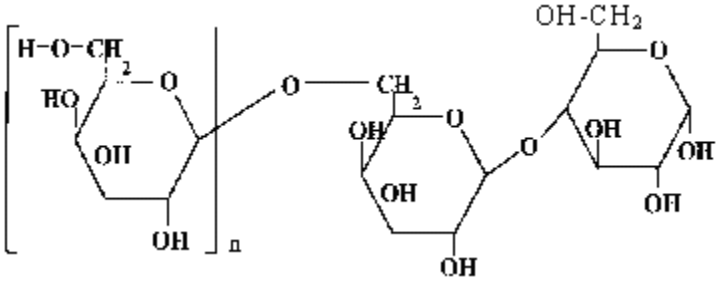
Şekil 4.7. pH ve zamanın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği……...43

Şekil 4.8. ^{1}H-NMRyorumu için numaralandırılmış GOS yapısı…….44

1. GİRİŞ

Laktaz olarak da bilinen β-Galaktozidaz (β-D-galaktosid-galaktohidrolaz (EC 3.2.1.23)), hidrolazların karbohidrazlar alt sınıfına ait bir enzimdir. Bu enzim mayalar ve küfler başta olmak üzere çeşitli organizmalardan saflaştırılmaktadır.

β-Galaktozidazın iyi bilinen hidrolitik aktivitesinin yanı sıra transgalaktozilasyon aktivitesi gösterdiği ve galaktooligosakkarit (GOS) oluşumunda da rol oynadığı saptanmıştır. Şekil 1.1'de GOS'ların genel yapısı gösterilmiştir. β-galaktozidaz transgalaktozilasyon aktivitesi ile galaktozu hidroksil grubu içeren nükleofilik bir alıcı gruba aktarmaktadır. Transfer suya olursa galaktoz, eğer başka bir karbohidrata olursa di, tri ve daha büyük galaktosil sakkaritler yani galaktooligosakkaritler oluşmaktadır. Çoğu denemelerde ortamdaki yüksek su varlığından dolayı hidrolitik yönün daha baskın olduğu ve bundan dolayı GOS üretimi ve veriminin düşük olduğu belirlenmiştir. Verimi artırmak için su içeriği azaltılmalı ve/veya şeker konsantrasyonu artırılmalıdır.



Şekil 1.1. Galaktooligosakkaritin genel yapısı (Aykut ve ark., 2008).

Bu çalışmada *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile laktoz'dan GOS sentezlenmesi için en uygun koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.

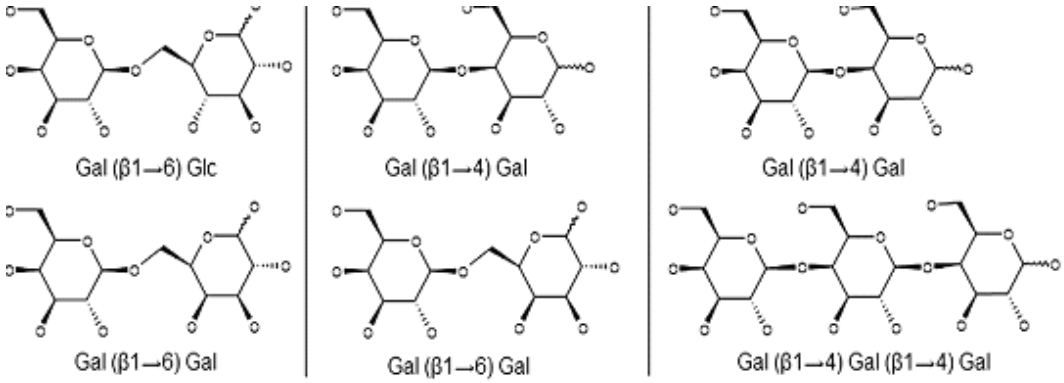
1.1.Galaktooligosakkarit Yapıları

GOS yapıları sakkarit kompozisyonlarının, glikozidik bağların ve polimerizasyon derecelerinin farklı olmasıyla birbirinden ayrılırlar. Bu yapısal farklılıklar farklı kimyasal özellikteki GOS yapılarının oluşmasına neden olmaktadır. *İn vitro* denemeler prebiotik mikroorganizmaların farklı yapıdaki oligosakkaritleri kullandıklarında farklı büyüdüklerini göstermişlerdir (Rycroft ve ark., 2001; Sanz ve ark., 2005; Sanz ve ark., 2006a, 2006b). Bu farklılıktan dolayı mikroorganizmaların hangi gıda uygulamalarında kullanılacaklarını GOS yapılarının belirlediği bildirilmiştir.

β-galaktozidaz ile laktozdan elde edilen GOS ürünlerinin doğal yapısı genellikle Gal_n-Glc yapısındadır (n polimerizasyon derecesidir ve genellikle 1 ile 5 arasındadır (Manchilha, 2007)). Bununla birlikte Gal_n-Gal yapılarınında bulunduğu gösterilmiştir (Sanz ve ark., 2002).

GOS ürünlerinin sentezindeki kontrol basamakları birincil olarak enzimlerle sağlanır (Wallenfels ve ark.,1972). İnsan vücudundaki prebiyotik mikroorganizmalardan elde edilen β-galaktozidazın diğer bakterilerden elde edilenlere göre daha hızlı GOS ürettiği ve GOS'un yapısının daha kuvvetli olduğu gösterilmiştir (Rabiu ve ark., 2001). Örneğin prebiotik bir mikroorganizma olan ***B. bifidumdan*** sağlanan β-galaktozidaz ile üretilen GOS'un ticari GOS (insan vücudundan elde edilmeyip diğer kaynaklardan saflaştırılan) karışımlarına (***A. oryzae*** daki β-galaktozidaz ile üretilen) göre daha sağlam yapılara ve belirgin prebiotik güce sahip oldukları bildirilmiştir (Depeint ve ark., 2008). ***B. bifidum*** β-galaktozidaz ile yapılan GOS üretimlerinde GOS'un büyük ölçüde β1→3 bağları, az miktardada β1→4 ve β1→6 bağları içerdiği görülmüştür. Pek çok ticari uygulamada elde edilen GOS'ler ise primer olarak β1→6 ve β1→4 bağları içerir. Oluşan GOS'ler arasında β1→6 bağları içeren ürünler tercih edilir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda β1→4 ve β1→3 bağlı GOS ürünlerine pek sık rastlanılmamıştır. Şekil 1.2'de farklı GOS yapıları, glikozidik bağlar ve polimerizasyon dereceleri gösterilmiştir. Çizelge 1.1'de ticari önemi olan β-

galaktozidaz enzimleri varlığında üretilen GOS'lerin bağlanma şekilleri, ana ürünleri, elde edilen verimler ve olası yapıları gösterilmiştir.



Şekil 1.2.- Glukoz ve galaktoz ünitelerinin farklı kombinasyonlarıyla oluşan GOS ürünlerinin yapıları.

Çizelge 1.1. Ticari önemi olan β-galaktozidaz enzimleri varlığında üretilen GOS'lerin bağlanma şekilleri, ana ürünleri ve elde edilen verimler (A.Gosling ve ark., 2010)

Mikrobiyal enzim kaynağı	**%5 lik (w/v)başlangıç laktoz konsantrasyonu için elde edilen GOS verimleri(%)**	**GOS'lerin ana ürünleri**	**Öncelikli bağlanma şekli**
Cryptococcus laurentii	43	Çoğunlukla trisakkarit	β1→6
Bacillus circulan	41	pentasakkarit	β1→4
Streptococcus thermophilus	25	Disakkarit	β1→6
Kluyveromyces fragilis	22	Di ve trisakkarit	β1→6
Aspergillus oryzae	15	hekzosakkarit	β1→6
Kluyveromyces lactis	14	tetrasakkarit	β1→6

1.2. Galaktooligosakkaritlerin Verimini Etkileyen Faktörler

Maksimum GOS verimini elde edebilmek için çeşitli araştırmacılar farklı *in vitro* koşullarda çalışmışlardır (Prenosil ve ark., 1987; Zarate ve ark.,1990). Bu çalışmalarda GOS veriminin reaksiyon koşullarına bağlı olarak değiştiği ve %50' yi geçen GOS verimine pek sık rastlanılmadığı bildirilmiştir. Verim genellikle %30-%40 aralığında rapor edilmiştir.

Maksimum GOS verimi artırmak için en önemli faktörlerden birinin başlangıç laktoz konsantrasyonu olduğu bilinmektedir (Mahoney, 1998). Başlangıç laktoz konsantrasyonu GOS oluşumuna iki yönden etki eder. Ya galaktozil akseptörünü artırarak ve su kullanılabilirliğini azaltarak GOS sentez verimini artırır, ya da laktoz hidrolizi ve GOS'un parçalanma hızını azaltarak yine GOS verimini artırır. Maksimum GOS verimine alıcı konsantrasyonunun katkısını miktarsal olarak değerlendirmek zordur. Transgalaktozilasyondaki su aktivitesinin araştırılması daha kolaydır. GOS'deki verim, düşük su aktivitesinde organik çözücü sistem kullanıldığında daha yüksek bulunmuştur. Bazı çalışmalarda verimdeki bu artışın nedeninin hidroliz hızının azalmasından dolayı olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2001; Maugard ve ark., 2003).

Sıcaklığın artırılmasına bağlı olarak laktoz çözünürlüğünün artmasıyla da GOS verimi artmaktadır (White, 2000). Son yıllarda yapılan araştırmalarda termal kararlığı yüksek β-galaktozidazların bulunmasına çalışılmıştır. Bu amaçla *Sulfolobus solfataricus*, *Thermotoga maritima*, *Pyrococcus furiosus*, *Saccharopolyspora rectivirgula* mikroorganizmalarının kullanıldığı rapor edilmiştir (Nakao ve ark., 1994; Bruins ve ark., 2003a; Ji ve ark., 2005; Park ve ark., 2008). Bu enzimlerle gerçekleştirilen sentezlerde yüksek sıcaklıklarda çalışılmış ve GOS veriminin maksimum değere ulaşmasına sıcaklık ve başlangıç laktoz konsantrasyonunun birlikte etkili olduğu gösterilmiştir.

E. coli β-galaktozidazı ile yapılan çalışmalarda pH değişimlerinin GOS sentezi ve laktoz hidroliz kinetiğine etkileri incelenmiş, GOS veriminin pH ile kontrol edilmesinin mümkün olabileceği ve reaksiyon ortamındaki pH'nın azalması

ile GOS veriminin artacağı bildirilmiştir (Huber ve ark., 1976). Çizelge 1.2'de farklı koşullarda sentezlenen GOS verimleri gösterilmiştir.

Galaktoz ve/veya glukoz pek çok β-galaktozidaz için laktoz hidroliz inhibitörü olarak bilinirler (Jurado ve ark., 2004; Hatzinikolaou ve ark., 2005). Laktoz hidrolizindeki galaktoz inhibisyonunun genellikle yarışmalı, glukoz inhibisyonunun ise biraz daha karışık olduğu, bazı β-galaktozidazlarda yarışmalı (Boon ve ark., 1999) bazılarında ise yarışmasız olduğu bildirilmiştir (Demirhan ve ark., 2008). Bu monosakkaritlerden kaynaklanan inhibisyonunun GOS ürünlerinin veriminde etkili olduğu bilinmektedir.

1.3. Galaktooligosakkarit'in Kullanım Alanları

Galaktooligosakkaritler kısa zincirli karbohidratlardır ve endojen kolon bakterileri için substrat görevi görürler. Bağırsaklarda normal olarak bulunan bakterileri besleyerek sağlıklı olma durumunu devam ettirir ve gastrointestinal sistemin normal işlevini yerine getirmesine yardımcı olur.

İnsan vücudunda, GOS'in belli bir kısmı ince bağırsakta sindirilebilir. Galaktooligosakkaritler, kolon bakterileriyle fermente olur. Bu fermentasyon insan kolik ekosistemlerinde iyi yönde değişimlere neden olabilir. Örneğin sağlığa yararlı olan *Bifidobakteri* bazı kanserlere karşı koruma niteliğindedir ve kolestrolü düşürür (Coulier ve ark., 2009).

Prebiyotiklerin en belirgin yararlı etkileri, kolonik mikroflorada yer alan *Laktobasiller* ve *Bifidobakterilerin* çoğalmasını seçici olarak uyarmaktır. Bu nedenle, prematüre bebek mamalarına fruktooligosakkarit ve galaktooligosakkarit eklenmesi bifidobakterilerin çoğalmasını uyarır, yumuşak ve sık dışkılama sağlar.

Prebiyotik bakteriler ve prebiyotik oligosakkaritler süt ve süt ürünlerinin üretilmesinde kombinasyonlu bir şekilde kullanılırlar. *Streptococcus thermophilus* ya da *Lactobacillus bulgaricus*'ın ürettiği β-galaktozidazla işlem yapılmış sütteki laktozların en azından %15'i galaktooligosakkarite dönüşür.

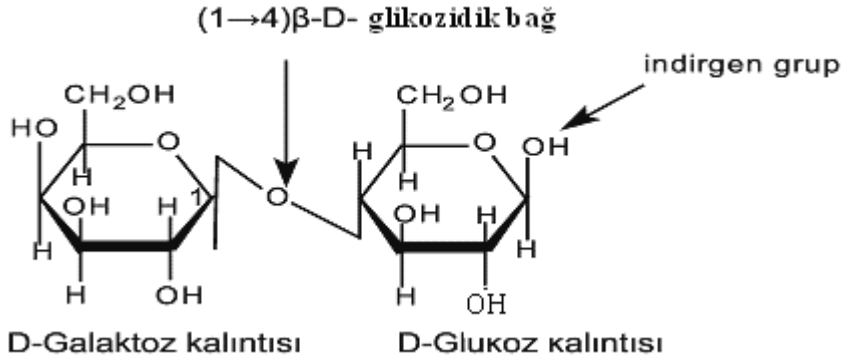
Çizelge 1.2. Değişik reaksiyon koşullarındaki GOS verimleri (Gosling ve ark., 2010).

Enzim kaynağı	**Reaksiyon koşulları**				**Maksimum GOS verimi (w/w)%**
	Başlangıç laktoz konsantrasyonu	**Sıcaklık (ºC)**	**pH**	**Tampon konsantrasyonu**	
Sulfolobus solfataricus	600 g/L	80	6,0	50 mM potasyum fosfat	52,5
Aspergillus oryzae	500 g/L	40	4,5	20 mM sitrat fosfat	52
Bullera singularis	180 g/L	50	6,0	50 mM sodyum fosfat	50
Aspergillus oryzae	1.67 M	40	4,5	pH 1 M HCl ile ayarlanabilir	31
Saccharopolyspora rectivirgula	600 g/L	70	7,0	1 M NaOH, 10M $MnCl_2$ nin ilavesi ile pH aynı değerde tutulabilir	41
Sterigmatomyce elviae	200 g/L	60	5,0	100 mM sodyum asetat	39
Lactobacillus reuteri	205 g/L	37	6,5	50 mM fosfat içerisinde1 mM $MgCl_2$ içeren	38
Pyrococcus furiosus	270 g/L	70	5,5	20 mM sodyum sitrat	33
Bifidobacterium longum	400 g/L	45	6,8	30 mM fosfat	32,5
Sulfolobus solfataricus	270 g/L	70	5,5	20 mM sodyum sitrat	26
Kluyveromyces lactis	400 g/L	40	7,0	200 mM potasyum fosfat içerisinde 2 mM $MgCl_2$ içeren	24,8
Thermotoga maritima	500 g/L	80	6,0	50 mM potasyum fosfat	19
Pyrococcus furiosus	745 mmol/kg	80	5,0	0.2 mol/kg sitrat	18

1.4. Laktoz

Süt şekeri olarakta bilinen laktoz 1 mol D-glukoz ile 1 mol D-galaktozun β-(1→4) galaktozidik (glikozidik) bağı ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Glukoz ve galaktozdan oluşan laktoz sistematik olarak; β-D-galaktopiranozil-β-(1→4)glukopiranoz veya glukoz-β-D galaktozit olarak adlandırılır (Kutay ve ark., 2002; Stryer ve ark.,1981; Colin ve ark.,1990). Yapısında yer alan glukozun serbest aldehit grubundan ötürü laktoz indirgendir. Şekil 1.3'de laktoz'un genel yapısı verilmiştir. Laktoz, sütte ve peynir altı suyunda bulunmaktadır. Laktoz, sütü oluşturan üç temel bileşenden birisidir. Sütteki diğer katı bileşenler lipidler ve proteinlerdir (Savaiano ve ark.,1987; Zadow ve ark.,1984). Sadece süt şekeri olarak bulunan laktozun tatlılığı düşüktür.

İnsan sütündeki laktoz konsantrasyonu sığır sütünün hemen hemen iki katıdır. Sadece laktosyon sırasında meme bezi tarafından sentez edilen laktoz, özellikle süt çocuklarında aktif olan β-galaktozidaz enzimi tarafından bağırsak mukoza hücrelerinde glukoz ile galaktoza ayrılmaktadır.



Şekil 1.3. Laktoz yapısındaki β-D glikozidik bağ.

β-galaktozidaz ile hidrolizi sonucu laktozun bazı istenmeyen özellikleri giderilebilmektedir. Laktozun istenmeyen özellikleri ise sakkarozdan % 60 oranında daha az tatlılık, düşük çözünürlük, yüksek derişimde yer aldığı üründe ağızda kumlu yapı hissi, zayıf sindirilebilirlik ve laktoz intoleransıdır (Tunç, 2006).

1.5. β-galaktozidaz Enzimi ve Özellikleri

β-galaktozidaz bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda (mantarlar, bakteriler, mayalar) bulunan bir enzimdir. Enzimin Kaliforniya deniz arslanı hariç bütün memelilerde bulunduğu bilinmektedir. Çizelge 1.3'de β-galaktozidaz enziminin bulunduğu bazı kaynaklar verilmiştir.

Bitki ve hayvan kaynakları ile karşılaştırıldığında mikrobiyal β-galaktozidazların ticari önemi daha fazladır. Mikrobiyal β-galaktozidazlar farklı özellikler gösterirler, bundan dolayı enzim kaynağı iyi seçilmelidir (Mahoney ve ark.,1998).

İnsan ince bağırsağında üç değişik β-galaktozidaz vardır.

1. Laktaz (laktaz 1): İnce bağırsak epitel hücresinin kenar membranında bulunur. Gıdalarda alınan laktozu, glukoz ve galaktoza hidroliz eder. Bu hidroliz ürünleri Na^+ ya bağımlı ve aktif olarak bağırsak epitel hücresi içine taşınırlar.

2. Asit-β-galaktozidaz (laktaz 2): İnce bağırsak epitel hücre lizozomlarında bulunmaktadır.

3. Hetero-β-galaktozidaz: İnce bağırsak epitel hücre stoplazmasında bulunur. Asit ve hetero β-galaktozidazın gıdalarla alınan laktozun sindiriminde rolü yoktur. (Numanoğlu ve ark.,1997).

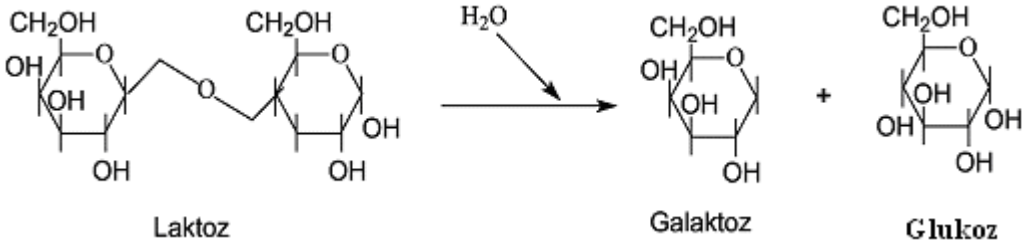
β-galaktozidazlar kofaktör içermezler. Metal ile aktivite olan enzimlerdir. Metalle aktivite olan enzimler, çözeltideki alkali ya da toprak alkali iyonları zayıfça bağlayan enzimlerdir. Bu iyonlar substratla birlikte çözeltiden alınırlar. Ortamın pH'ını enzimin maksimum aktivite göstereceği değere getirerek enzimin aktivitesini artırırlar (Barker ve ark.,1971).

Çizelge 1.3**.** β-galaktozidaz enziminin bulunduğu kaynaklar (Tunç 2006).

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü, kahve
Hayvan organları	İnce bağırsak, beyin ve deri dokusu
Mayalar	*Kluyveromyces- (Saccharomyces) lactis,* *Kluyveromyces- (Saccharomyces) fragilis,* *Candida pseudotropical,* *Brettanomyces anomolus,* *Wingea robersii,*
Bakteri	*Escherichia coli, Thermus aquaticis* *acillus sp.,* *Bacillusmegaterium-streptococus lactis,* *Streptococus thermophilus,* *Lactobacillus-bulgaricus,* *Lactobacillus-helvenous,* *Bacillus-circulans,* *Bacillus-steorotherrphilus,* *Lactobacillus sporogenes*
Mantar	*Neurospora crassa,* *Mucor pucillus, Alternaria palmi,* *Aspergillus foetudut, Mucor miehiei,* *Culvularia inoegualli,* *Aspergillus niger, Fusorium moniliforme,* *Aspergillus flavus, Alternaria alternara* *Aspergillus oryzae,* *Aspergillus phoenicis*

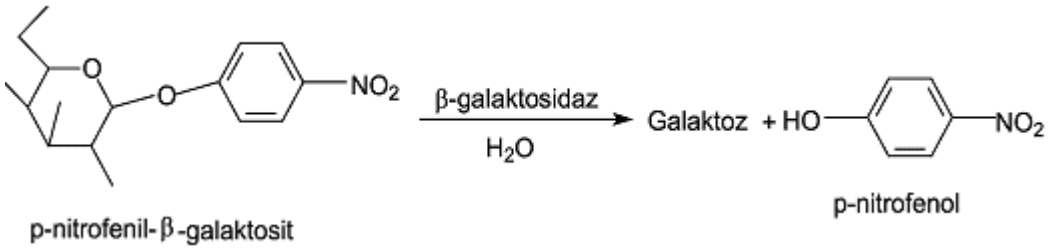
Laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizi (Şekil 1.4), gıda teknolojisi ve beslenme açısından önemlidir. Çünkü hidrolizin temel ürünleri daha tatlı, daha çözünebilir, daha kolay fermente edilebilir ve ince bağırsakta doğrudan absorbe edilebilirler (Boze ve ark.,1987; Lartillot ve ark., 1993).

β-galaktozidaz, substrat olarak laktoz kullanıldığında alfa laktozun β-1,4 bağını kırarak glukoz ve galaktoz karışımı oluşturmaktadır.



Şekil 1.4. Laktozun hidroliz reaksiyonu.

β-galaktozidaz'ın enzim olarak kullanıldığı bir diğer reaksiyon ise p-nitrofenil- β-galaktozil'in hidroliz mekanizmasıdır. Bu mekanizmada ortama su ilavesi ile galaktoz ve p-nitrofenol ürünleri oluşur. Şekil 1.5'de bu reaksiyonun mekanizması verilmiştir.



Şekil 1.5. β-galaktozidaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

Laktoz hidrolizi iki şekilde gerçekleşmektedir; asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz.

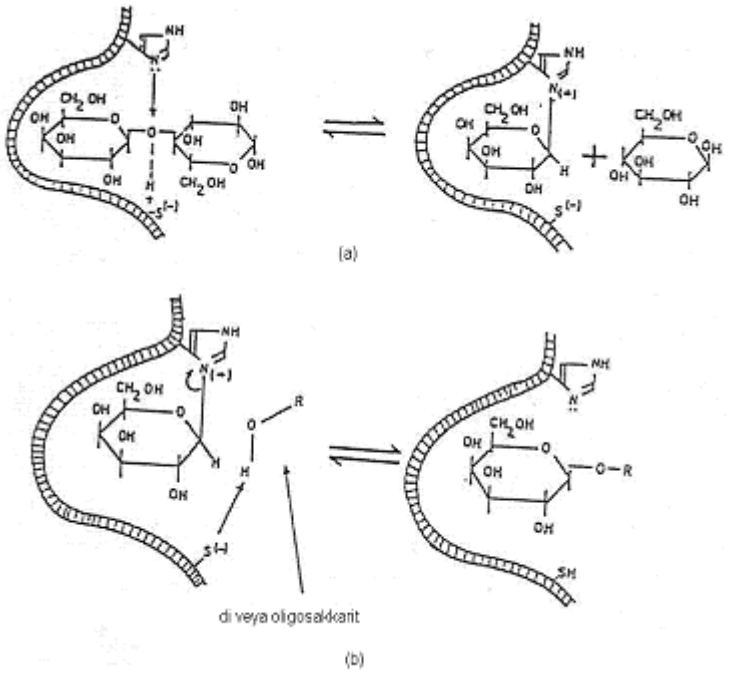
Asit hidrolizi: Laktoz hidrolizinde ilk bilinen ve uygulanan yol asit hidrolizidir. Laktoz hidrolizi ya bir asit çözeltisi içerisinde ya da bir iyon değiştirici reçine kullanılarak yapılmaktadır. Asit hidrolizi sert koşullar altında gerçekleşmektedir. Örneğin, % 80'lik hidroliz verimi pH 1,2'de sıcaklığın 150 ºC olduğu koşullarda üç dakikada gerçekleşmektedir (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985).

Basit görünmesine rağmen bu proses bazı dezavantajlara sahiptir. En büyük dezavantajı peynir altı suyundaki proteinin denatürasyonudur. Denatürasyon proteinin fonksiyonlarının azalmasına neden olur ve böylelikle proteinlerin çoğu ürünlerde kullanılmasını önler. Bundan başka peynir altı suyundaki tuzlar asitin deaktivasyonuna neden olur ve ekstra bir demineralizasyon reaksiyonu gerektirmektedir. Diğer dezavantajı ise istenmeyen renkte ve kokuda ürün oluşumudur. Bu nedenlerden dolayı asit hidroliz mekanizması enzim hidroliz mekanizmasına oranla daha az tercih edilmektedir (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985).

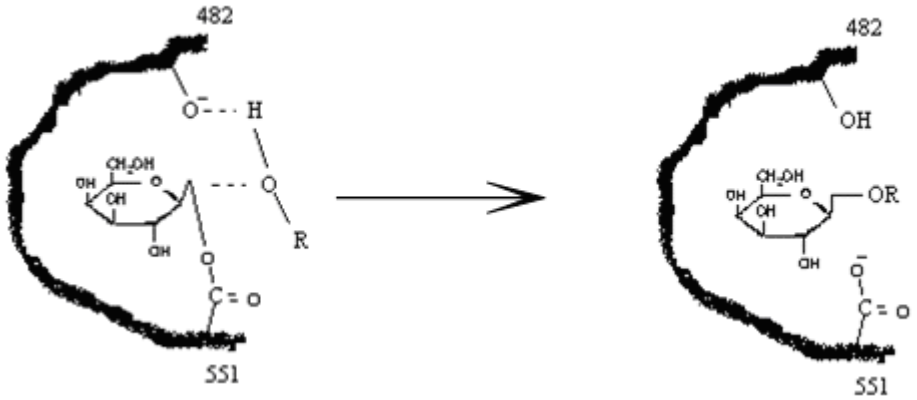
Enzimatik hidroliz: Laktozun enzimatik hidrolizi gıda endüstrisi için önemli bir biyoteknolojik prosestir.

Laktoz hidroliz mekanizması *Eschericahia coli*'den elde edilen β-galaktozidaz enzimi kullanılarak açıklanmıştır (Jacobson 1994). Enzimatik hidroliz mekanizması ikili yer değiştirme mekanizması olarak önerilmiştir. Gakes ve ark. (1995) β-galaktozidaz'ın aktif tarafında protein dönorü ve akseptörü olarak görev yapan sistein ve histidin aminoasitlerinin olduğunu önermişlerdir. Sistein aminoasiti proton dönorü olabilen sülfidril grup içerir. Histidin kalıntıları ise glikozidik bağ kopmasını kolaylaştırmak için nükleofil olarak davranan imidazol grubu içerir. Şekil 1.6'da laktozun enzimatik hidroliz basamakları gösterilmiştir.

Zhou ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmalarda ise β-galaktozidaz için yeni bir aktif bölgenin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu aktif bölgede glutamik asit artığı bulunmaktadır. Mikrobiyal kökenli bazı β-galaktozidazlarda iki tane glutamik asit artığı bulunmaktadır (Glu^{482} ve Glu^{551} gibi). Bunlardan birisi proton alıcı ve diğeri ise proton verici olarak görev yapmaktadır. Reaksiyonun mekanizması şekil 1.7'de gösterilmektedir:



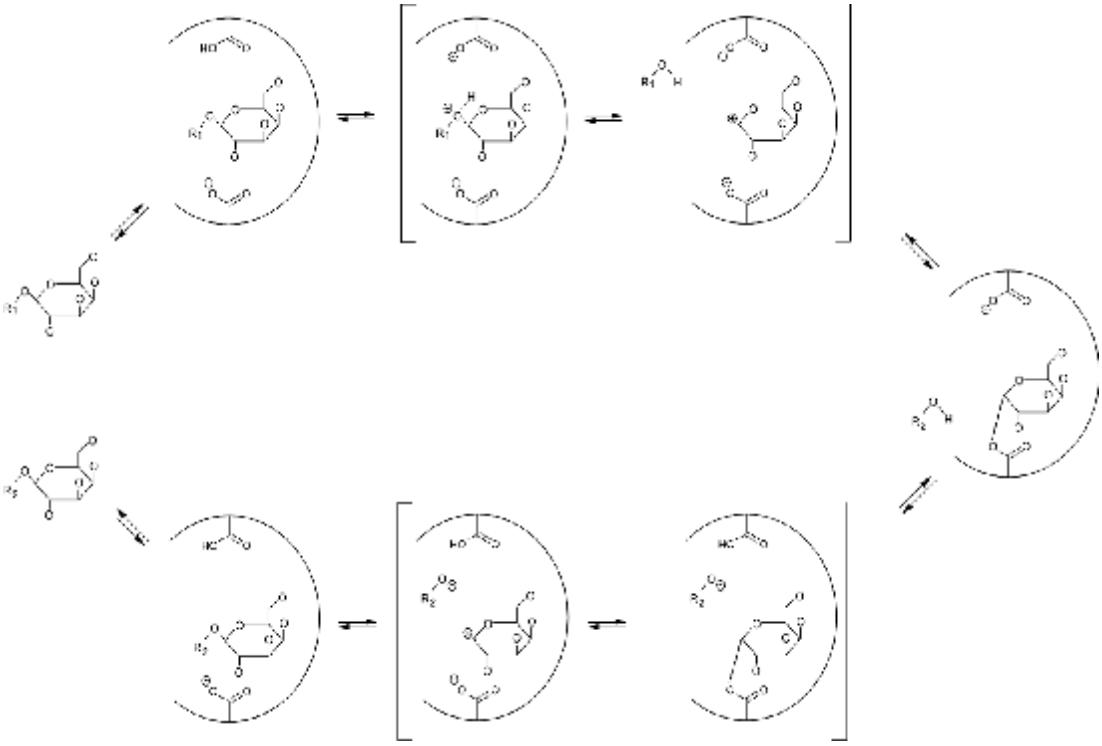
Şekil 1.6. Laktozun β-galaktozidaz enzimiyle hidrolizi a) β-galaktozidaz enzimi ile laktozun etkileşmesi b) β-galaktozidaz enziminden galaktozun transferi (Gakes ve ark., 1985)



Şekil 1.7. Aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamikasit artığı bulunan β-Galaktozidazın katalizlediği hidroliz mekanizması (Zhou ve Chen, 2001).

1.6. β-galaktozidazın GOS Üretimindeki Enzimatik Mekanizması

β-galaktozidaz aktivitesinin biyokimyasal mekanizması GOS ürünlerinin sentezi için büyük önem taşımaktadır. Bu mekanizma aynı zamanda GOS sentezi ve verimini etkileyen bazı faktörler hakkında fikir verir ve Şekil 1.8'de şematik olarak gösterilmiştir. Reaksiyon mekanizması ilk olarak laktoz'un β-galaktozidaz enzimi'nin aktif bölgesi içerisine alınmasıyla başlar. Laktoz enzim içerisine alındıktan sonra β-galaktozidaz enzimi üzerinde bulunan alken akseptörler tarafından β-D-glukozidik bağ üzerinde bulunan oksijen protonlanır. Glukoz kalıntısı (şekilde R_1 grubu) OH grubunuda alarak yani glukoz olarak galaktoz kalıntısından ayrılır. Galaktoz β-D-glukozidik bağ ayrıldıktan sonra oksijenini kaybettiği için artı yükle yüklenir. Ortamda β-galaktozidaz üzerinde daha önce protonunu glukozidik bağa vermiş olan eksi yüklü alken akseptörü vardır ve artı yüklü galaktoz kalıntılarıyla bağ oluştururlar (Zechel ve ark., 2000; Juers ve ark., 2001; Vasella ve ark., 2002; Bras ve ark., 2008).

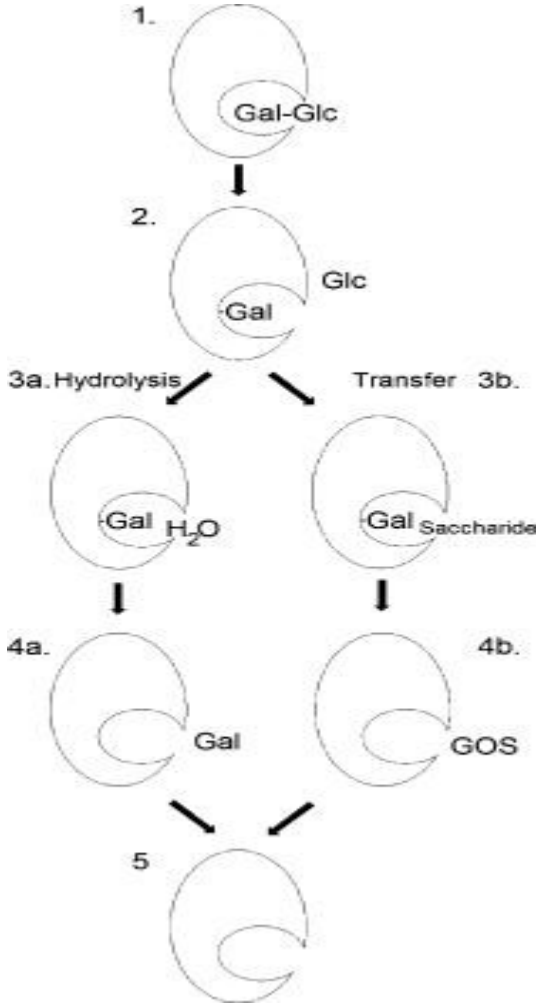


Şekil 1.8. β-galaktozidaz aktivitesi için hidroliz ve transgalaktozilasyon mekanizmalarının şematik gösterimi (R_1 glukoz ve R_2 su, glukoz, galaktoz, laktoz ve GOS molekülü). (*E.coli* bakterisi kullanılarak yapılan çalışmadan alınmıştır (Juers ve ark., 2001).)

Reaksiyon mekanizması bu kısma kadar hidroliz ve transgalaktosilazyon mekanizmaları için aynı şekilde gerçekleşmektedir. Bundan sonra hidrolizmi yoksa transgalaktosilazyonun mu olacağı reaksiyon ortamına eklenecek gruba bağlıdır. Reaksiyon ortamına su eklenirse su hidrojenlerinden birini enzim üzerinde bulunan eksi yüklü alken akseptörlerinden birine verecek ve ortamda hidroksil iyonu oluşacaktır. Galaktoz kalıntısı hidroksil iyonuna daha fazla ilgi göstereceği için enzimle arasındaki bağı koparıp hidroksil grubuyla bağ oluşturacaktır. Böylece galaktoz kalıntısı galaktoz oluşturmuş olacaktır. Bu mekanizmaya hidroliz mekanizması denmektedir ve laktoz galaktoz ve glukoza parçalanır. Eğer reaksiyon ortamına su değilde sakkarit (yani, R_2 = glukoz, galaktoz, laktoz ve GOS molekülü) eklenirse yine galaktoz kalıntısı yüksek ilgiden dolayı enzimle olan bağını koparıp ortamda bulunan protonunu kaybetmiş sakkaritle bağ oluşturacaktır. Bu mekanizmaya da transgalaktozilasyon mekanizması denmektedir ve GOS yapıları

oluşmaktadır. Şekil 1.9'da ise β-galaktozidaz için basitleştirilmiş reaksiyon mekanizması gösterilmiştir.

Literatürden araştırmalarımız laktozun hidroliz aktivitesinin transgalaktozilasyon aktivitesine göre daha fazla çalışıldığını göstermektedir. Bunun nedeni laktoz intöleransı için üretilen ürünlerin endüstriyel olarak daha geniş yer bulmasındandır.



Şekil 1.9. β-galaktozidaz aktivitesi için basitleştirilmiş reaksiyon mekanizması

1.7. GOS Sentez Kinetiğinin Modellenmesi

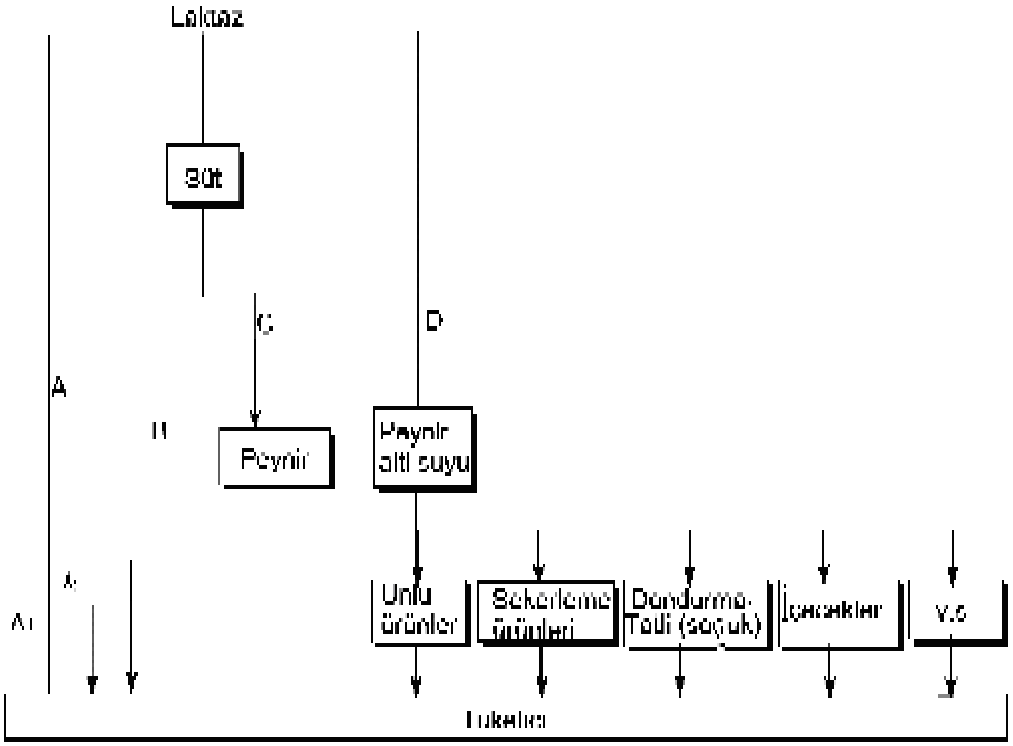
GOS sentezi karmaşıktır. Bu karmaşıklığın farklı reaksiyonların (transfer ve hidroliz) farklı substratlar üzerinde (farklı yapıdaki GOS türleri ve laktoz) farklı oranlarda gerçekleşmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu karmaşıklığa rağmen GOS oluşumlarının modellenmesinde pek çok yeni çalışmalar vardır. Bu modeller mekanik ve empirik olarak katagorize edilebilirler (Huber ve ark., 1981).

Mekanik modeller başlangıçta bir tepki yolu önererek geliştirilirler. Hız sabitleri kataliz sırasında da her basamakta ayrıştırılırlar ve daha sonra deneysel olarak tahmin edilirler. Ancak deneysel tahmin gerektiren hız sabitlerinin sayısı sınırlandırılır. Örneğin polimerizasyon derecesi (PD) sınıfları içindeki GOS yığınlarının çalışılması, PD sınıflarının rejoizomeraz ile oluşması ve yıkılması oranlarının çalışılmasından daha yaygındır. Daha fazla sadeleştirme yapıldığında model daha az doğru, geliştirilmesi daha uygundur. Doğruluk ve model oluşturmanın kolaylığı arasında bir denge bulunması gerekir.

Empirik modeller de matematiksel GOS üretimini tanımlamak için kullanılabilirler. Bu yaklaşım doğru bir şekilde GOS'u belirlemek ve GOS verimini optimize etmek amacıyla deneysel olarak ölçülen reaksiyon süresi içerisinde uygun denklemleri içerir. Empirik yaklaşımlar ayrıntılı reaksiyon mekanizmaları için gerek kalmadan tek bir model içinde birden fazla proses parametreleri (örneğin başlangıç laktoz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi) sisteme dahil edilebiliyor olmanın avantajına sahiptir. Bu yaklaşım süt veya diğer süt ürünleri gibi daha karmaşık reaksiyon sistemlerine uygundur. Bu empirik modellere örnek olarak son zamanlarda GOS üretimini optimize etmek için yanıt yüzey yöntemi (response surface methodology (RSM)) kullanılmaktadır.

1.8. β-galaktozidaz'ın Uygulama Alanları

Şekil 1.10'da β-galaktozidaz enzimi ile ilgili kullanım alanları şematik olarak verilmiştir.



Şekil.1.10.Endüstride β-galaktozidaz uygulama alanı (Tunç, 2006)

Bu uygulamalar temel olarak;

A_1 (farmasotik uygulamaları): β-galaktozidaz'ın ağız yoluyla alınması.

A_2, B : Tüketici tarafından doğrudan süte β-galaktozidaz'ın eklenmesi ; nötral β-galaktozidaz tüketici tarafından süte eklenmektedir. Buzdolabında bir gece bekletildikten sonra, eklenen β-galaktozidaz miktarına bağlı olarak sütteki laktoz kısmen veya tamamen hidroliz edilmektedir.

C, D : Gıda endüstrisinde uygulamaları

β-galaktozidaz kullanılarak geliştirilmiş bazı süt ürünleri elde edilmektedir; Bunlara düşük laktozlu süt, laktozu hidrolizlenmiş sütten yoğurt üretimi, laktozu hidrolizlenmiş sütten peynir üretimi, düşük laktozlu konsantre dondurma, peynir altı suyu laktozundan tatlı şurup üretimi örnek olarak verilebilir (Tunç, 2006).

1.9. β-galaktozidazın Fizyolojik Önemi ve Eksikliği

β-galaktozidaz enzimi, vücutta ince bağırsak hücreleri tarafından salgılanır, laktozun ince bağırsakta bu enzimle hidrolizlenmesi sonucunda oluşan glukoz ve galaktoz yine ince bağırsaktan absorplanarak kan dolaşımına geçer ve karaciğerde metabolize edilir. Enzimin ince bağırsakta üretimi yeni doğan bir bebek için çok önemlidir. Sindirilmemiş laktoz çocuklarda ve yetişkinlerde hiçbir işe yaramadığı gibi çocuklukta büyümeyi engellemektedir.

β-galaktozidaz enzimin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intöleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı olan kişilerde de ince bağırsak duvarından çok az miktarda laktoz molekülü hücre içerisine geçebilir ve geride kalan büyük miktardaki laktoz vücut tarafından kullanılamaz. Sindirilemeyen laktoz ince bağırsaklardan kalın bağırsağa geçer ve buradan atılır. Bu geçiş sırasında ince bağırsakda iki olay meydana gelmektedir; bunlardan birincisi fiziksel diğeri ise biyokimyasal bir işlemdir. Fiziksel proseste, ince bağırsak sıvısındaki laktoz moleküllerinin tanecik sayısının artması sonucunda oluşan osmotik etki ile dokulardaki sıvı ince bağırsağa çekilir. Biyokimyasal proseste ise, laktoz kolonda bakteriler tarafından fermente edilerek organik asitler ve CO_2'e dönüştürülür. Bu maddeler şişlik hissi, karın bölgesinde kramplar ve sulu patlayan ishalleri içeren birçok fermentatif ishal semptonlarına yol açar (Cook ve ark., 1967; Bryant ve ark., 1970).

1.10. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM)

Yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Metodology, RSM) 'Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması' ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. Kimya endüstrisinde ilk kullanımı ise Myers ve Montgomery (1995) tarafından açıklanmıştır. Yanıt yüzey yönteminin esası iki ve/veya daha fazla değişken yardımıyla tanımlanan yüzeylerin matematiksel ve istatistiksel teknikler yardımı ile modellenmesidir (Myers ve ark., 1995; Myers ve ark., 2004: Koç ve ark., 2009). Bu yöntem kimyasal proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu, değişkenlerin azaltılarak ürün performansının ve sürecin iyileştirilmesini amaçlamaktadır (Myers ve ark., 2004). Yanıt yüzey metodu, süreç açısından en iyi yanıtın bulunması için faktörlerin belirlenmesini, süreçte etkin olan faktör seviyelerinin bulunmasını, mevcut koşullarda elde edilen bir kalite düzeyinin üzerinde bir ürün kalitesi sağlanabilmesi için yeni üretim koşullarının belirlenebilmesini, yanıt ve nicel faktörler arasındaki ilişkinin bir modelle tanımlanmasını sağlamaktadır (Göncü, 2011).

Yanıt yüzey modelinin oluşturulması, model parametrelerinin tahminlenmesi, model uygunluğunun test edilmesi ve model uygunsuzluğu (Lack of Fit) testi çeşitli literatürlerden faydalanmakla birlikte esas olarak Banu Koç ve ark., (2009) tarafından literatürde bildirilen derlemeden faydalanılmıştır.

1.10.1. Yanıt Yüzey Modelinin Oluşturulması

Yanıt yüzey yöntemi model regresyon analizi yardımıyla oluşturulur. Yanıt yüzey oluşturmanın amacı, deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkin olan çok sayıdaki parametrelerden oluşan bir tasarım düzleminde belirli özellikleri sağlayan bir bölgeyi (etkinliği araştırılan parametreleri kapsayan bir aralık) ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmektir. Bir faktörün etkisinin veya diğer faktörlerle etkileşiminin yanıt değişkenin değerlerinde ne derece önemli bir etkiye sahip olduğuna regresyon katsayıları yardımıyla karar verilir (Turan ve ark., 2011).

1.10.2. Model Parametrelerinin Tahminlenmesi

Çok yaygın olarak kullanılan lineer regresyon analizi, bağımlı değişken (yanıt) ile bir veya daha fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak inceleyen istatistiksel bir tekniktir. Polinomiyal modeller gibi lineer olan herhangi bir model, oluşturduğu yanıt yüzeyin şekli ne olursa olsun lineer regresyon modelidir. Çoklu lineer regresyon modelinde, regresyon katsayıları en küçük kareler yöntemi kullanılarak tahminlenmektedir (Myers ve ark., 1995). En küçük kareler yönteminin uygulandığı, yanıt yüzeyin tahminlenmesinde kullanılan ikinci dereceden polinomiyal denklem Eşitlik (1)'deki gibidir (Koç ve ark., 2009).

$$y_i = b_0 + \sum_{1\le j\le m}^{m} b_j x_j + \sum_{1\le j\le k\le m}^{m} b_k x_j x_k + e_i \qquad \text{i=1,2,3…….n} \qquad (1)$$

Burada, n gözlem sayısını, x_{ij} i'inci gözlemin j'inci bağımsız değişkenini, ε_i ise i'inci gözlemdeki rastgele hatayı ifade etmektedir.

1.10.3. Model Uygunluğunun Test Edilmesi

Regresyon modeli tahminlendikten sonra bu denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemi kullanarak yapılacak tahminlerin ne derece hassas olacağının araştırılması gerekmektedir (İkiz ve ark., 2000)

Yapılan varsayımlardan biri olan, seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği de test edilmelidir. Bu amaçla, varyasyon katsayısının hesaplanması, regresyon analizine hipotez testlerinin uygulanması, hipotez testlerinin regresyon katsayılarına bireysel olarak uygulanması, regresyon katsayısının (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının hesaplanması (R^2_{adj}), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamının (PRESS) hesaplanması, yeterli tahminleme (adequite precision) değerinin hesaplanması, model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi) ve kalıntı analiz gibi farklı test yöntemleri uygulanmaktadır (Koç ve ark., 2009).

1.10.4. Model Uygunsuzluğu (Lack of Fit) Testi

Yanıt yüzey yönteminde, tasarım edilmiş denemelerde alınan veriler, regresyon modeline uygunlaştırılmıştır. Elde edilen bu model gerçek yanıt fonksiyonuna sadece bir yaklaşım olduğu için, tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasındaki fark (kalıntı), sadece saf deneysel hatayı değil modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hatayı da içermektedir. Modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (lack of fit) denmektedir (Koç ve ark., 2009). İdeal olarak, istatistiksel açıdan modelin matematiksel formunun uygunsuzluğunun önemsiz ve regresyon modeli için önemli olması gerekmektedir (Myers ve ark., 1995; Castillo ve ark., 2007; Box ve ark., 2007).

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Reuter ve ark., (1999), yapmış oldukları çalışmada *S. Solfataricus*'den elde edilen termofilik β-galaktozidaz'ın sentetik aktivitesi ile, ticari *Aspergillus oryzae'*dan elde edilen β-galaktozidaz ve termofilik olmayan *E.coli*'den elde edilen β-galaktozidazın sentetik aktivitelerini karşılaştırmışlardır. GOS'ler farklı sıcaklıklarda, laktoz'un verici ve N-asetil laktoz aminin alıcı olduğu ortamda sentezlemişlerdir. *S. sulfotaricus*, *A.oryzae* ve *E.coli* kullanıldığı zaman GOS verimini sırasıyla % 48 , % 36 ve % 32 w/w olarak belirlemişlerdir.

Boon ve ark., (2000), yapmış oldukları çalışmada oligosakkaritlerin enzimatik sentezinde GOS miktarının sıcaklık ve enzim kaynağı ile değişimini araştırmışlardır. *Bacillus circulans, Aspergillus oryzae, Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragilis'*den elde edilen β-galaktozidaz enzimlerini kullanmışlardır. Reaksiyon zamanı ve başlangıç laktoz konsantrasyonunun belirlenmesi için kinetik model kullanmışlardır. Bu kinetik parametreleri değişik sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50 ^{o}C) yapılan deneylerle belirlemişlerdir. Sıcaklığın kinetik parametrelere etkisini Arrhenius eşitliği ile tanımlanmışlardır. Sıcaklıklar yükseldikçe oligosakkaritlerin veriminin de yavaşça yükseldiğini göstermişlerdir. GOS verimindeki farkın kullanılan β-galaktozidaz miktarıyla ve oluşan ürünlerin farklı bağlanma şekilleri olan oligosakkarit ürünleriyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır. *Bacillus circulans* daki β-galaktozidazdan farklı bağlanma şekilleri olan ve miktarsal olarak büyük ölçülerde oligosakkaritler üretmişlerdir. *Kluyveromyces laktis* β-galaktozidaz kullandıklarında büyük ölçüde trisakkaritlerin üretildiğini bildirmişlerdir. Farklı enzimler için kinetik parametreler belirlemiş ve farklılıkları tartışmışlardır.

Chen ve ark., (2003), Galaktooligosakkarit'i *Escherichia coli* β-galaktozidaz'ını kullanarak ters miçeller içerisinde su konsantrasyonunun kontrol edilebildiği koşullarda sentezlemişlerdir. Oluşan ürün asetonitril eklenmesiyle çöktürülmüş ve HPLC ile analiz edilmiştir. Allolaktozu ana ürün olarak belirlemişler ve yapısını ^{13}C-NMR kullanılarak doğrulamışlardır. En yüksek GOS verimi pH 6,5 ve sıcaklık 37 ^{o}C olduğunda % 29,7 (w/w) (allolaktoz) ve %14 (w/w) (diğer oligosakkaritler) olarak rapor etmişlerdir. Artan sıcaklığın GOS

sentezini etkilemediğini göstermişler ancak daha fazla laktoz (%45) ilavesi ile daha fazla GOS üretilebileceğini belirlemişlerdir. Bu çalışmayı miçellerde serbest su içeren transgalaktozilasyon modelleri için önermişlerdir ve üretilen allolaktoz miktarının deneysel data ile iyi bir ilişki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Cho ve ark., (2003), ***Bullera singularis*** mayasından ekstrakte edilen β-galaktozidazı kullanarak laktozu hidroliz etmişler ve GOS üretmişlerdir. Ham enzimin yüksek transgalaktozilasyon aktivitesi sonucunda saf laktoz ve peynir altı suyunun fermentesinden elde edilen oligosakkaritlerin veriminin % 34' ün üzerinde olduğunu belirlemişlerdir. Enzimi iki kromotografik adımda saflaştırmışlar ve 96 kat saflaştırmadan sonra saflaştırma verimini %16 olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığını 56 kDa olarak belirlemişlerdir. Hidrolitik aktivitesini en yüksek pH 5 ve 50 ^{o}C gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin 10 mM Ag^{+} ve 10 mM SDS ile inhibe edildiğini, laktoz hidrolizi için K_m değerinin 0,58 M ve maksimum reaksiyon hızının (V_{max}) 4mM dk olduğunu bildirmişlerdir.

Ji ve ark., (2005) , ***Bifidobacerium bifidum'***dan β-galaktozidazı izole etmişler ve laktoz'dan GOS üretiminde kullanmışlardır. ***Bifidobacterium***'dan izole edilen β-galaktozidaz'ın optimum aktivitesini pH: 6,8-7 ve 40 ^{o}C de gösterdiğini belirlemişlerdir. ***B. bifidum*** hücrelerinde transgalaktozilasyon aktivitesi ile % 25 disakkarit, % 35 trisakkarit, % 25 tetrasakkarit ve % 15 pentasakkarit bulunan GOS karışımları üretmişlerdir. Fermantasyon denemelerinde ***B.bifidumun*** artmasıyla GOS ürünlerinin arttığını göstermişlerdir.

Ji ve ark., (2005)**,** Bir başka çalışmalarında ***Termotogo maritima*** β-galaktozidazını kullanarak laktozdan GOS üretmişlerdir. GOS ürünü için maksimum enzim aktivitesini pH: 6 ve 90 ^{o}C olarak belirlemişlerdir. Enzimin yarılanma ömrünü pH: 5, pH :8, 80 ^{o}C ve 95 ^{o}C de sırasıyla 27, 82, 41 saat ve 14 dk olarak bulmuşlardır. Cu^{+2} ve EDTA'nın başlangıç enzim aktivitesinin % 84 den daha fazlasını inhibe ettiğini belirlemişlerdir. GOS üretiminin artan laktoz konsantrasyonuyla arttığını göstermişlerdir. En yüksek GOS üretimini 1,5 ünite enzim kullanıldığında gözlemlemişlerdir. Bütün bu koşullar altında 300 dk sonunda 91 g/L GOS üretildiğini belirlemişlerdir.

Hsu ve ark., (2007), GOS'i transgalaktozilasyonla *Bifidobacterium longum*'dan elde edilen β- galaktozidaz kullanarak üretmişlerdir. % 40 laktozdan β-galaktozidaz ile glukoz, galaktoz ve GOS oluşturmuşlardır. Maksimum GOS verimini pH: 6,8 ve 45 ^{o}C de % 32 olarak belirlemişlerdir.

Park ve ark., (2008), *Sulfalobus solfatricus*'daki β-galaktozidazla GOS üretmişlerdir. GOS üretimi için enzim aktivasyonunun en fazla olduğu koşullar pH 6,0 ve 85 ^{o}C olarak belirlenmiştir. β-galaktozidaz için yarılanma ömrü 70, 75, 80, 85, ve 90 ^{o}C de sırasıyla 700, 111, 72, 43, ve 2.4 saat olarak, aktivasyon enerjisi ise 213 kJ/mol olarak belirlemişlerdir. GOS üretimi için optimum enzim miktarını 3,6 U enzim/mL olarak bulmuşlardır. Artan laktoz konsantrasyonu ile GOS üretiminin artacağını göstermişlerdir. pH 6,0'da, 85 ^{o}C, başlangıç laktoz konsantrasyonunun 600 g /mL olduğu koşullarda 56 saat reaksiyon süresi sonunda % 52,2 verimle 315 g GOS elde etmişlerdir.

Neri ve ark., (2009), bu çalışmalarında immobilize β-galaktozidazı GOS üretimi için kullanmışlardır. β-galaktozidaz immobilizasyonunda destek materyali olarak polianilin magnetik polisilikon tabaka (mPOS-PANI) kullanmışlardır. GOS sentezinde farklı başlangıç laktoz konsantrasyonlarında (5-50%) ve farklı sıcaklıklarda (30-60 ^{o}C) çalışmışlardır. Başlangıç laktoz konsantrasyonunun GOS ürünleri miktarını etkilediğini göstermişlerdir. Reaksiyonda hidroliz ve transgalaktozilasyon mekanizmalarında bir denge olduğunu göstermişlerdir. Serbest ve immobilize enzim kullanılarak üretilen GOS'lerde belirgin bir farklılığın olmadığını belirtmişlerdir. Laktoz hidrolizi ve GOS oluşumunun artan sıcaklıkla arttığını göstermişlerdir.

Gosling ve ark., (2009), bu çalışmada GOS ürütimini % 10'luk (w/v) laktoz içeren tampon ve yağsızsüt içerisinde *Bacillus circulans*(Biolacto FN5) kullanılarak araştırmışlardır. GOS verimine sıcaklığın etkisini incelemişler ve GOS parçalanma hızının Biolacto FN5'de 40 ^{o}C üzerindeki sıcaklıklarda seçici olarak azaldığını belirlemişlerdir. Ilımlı koşullarda (40 ^{o}C ve üzeri) sıcaklığa maruz bırakılmış Biolacto FN5 β-galaktozidaz enziminin GOS sentezi için kullanıldığında GOS veriminin her iki reaksiyon sisteminde anlamlı derecede arttığını belirlemişlerdir.

Yang ve ark., (2010), bu çalışmada *Lycopus lucidus turcz* (RL) bitkisinin köklerinden alfa galaktooligosakkarit karışımlarının izolasyonunu ve karekterizasyonunu çalışmışlardır. Ayrıca RL-GOS un kimyasal bileşenleri ve immünolojik fonksiyonlarını araştırmışlardır. HPLC analizi ile saflaştırılan RL-GOS rafinoz ailesi oligosakkariti olduğunu ve 51,8% (w/w) stakoz, 26,5% rafinoz ve 10,1% verbeskoz içerdiğini belirlemişlerdir.

Hernández-Hernándeza ve ark., (2011), bu çalışmada farklı mantar kaynaklı (*Aspergillus oryzae, Aspergillus aculeatus ve Kluveromyces lactis*) β-galaktozidazı kullanılarak prebiotik laktulozdan transgalaktozilasyon reaksiyonları ile elde ettikleri GOS'ların karekterizasyonu ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Polimerizasyon derecesi 6'ya kadar olan oligosakkaritler HPLC-ESI MS kullanılarak belirlemişler ve miktar tayinlerini yapmışlardır. Disakkaritleri (galaktozil-galaktoz ve galaktozilfuruktoz) ve trissakkaritleri (6^{l}-galaktozil-laktuloz, β-galaktopironozil-(1→4)-[β-galaktopironozil-(1→1)]-fruktoz) GC-MS kullanarak karakterize etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1.Kimyasallar

Kluyveromyces lactis β-galaktozidaz (Sigma G-3664,2600 Unite/g), laktoz, sitrik asit, fosforik asit, asetonitril, sodyum hidroksit.

3.1.2. Araç ve Gereçler

Shimadzu yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC), Supercosil LC-NH2 HPLC kolonu (5µm,250x4,6mm), pH metre (HANNA8417), magnetik karıştırıcı, terazi, otomatik pipet, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu

3.2. Metod

3.2.1.Yanıt Yüzey Modelinin Oluşturulması

Yanıt Yüzey Modelinin Oluşturulması amacıyla Design Expert 8.0.6 bilgisayar programı kullanılmıştır. GOS sentezini etkileyen faktörler literatür incelenerek reaksiyon ortamının pH'sı, sıcaklığı, başlangıç laktoz derişimi ve reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Design Expert bilgisayar programı kullanılarak oluşturulan Box-Behnken dizaynının matematiksel ifadesi eşitlik 3.1'de verilmiştir.

$$y = b_{k0} + \sum_{i=1}^{k} b_{ki} c_i + \sum_{i=1}^{k} b_{kii} c_i^2 + \sum_{i\,\mathbf{p}\,j=2}^{k} b_{kij} c_i c_j \qquad (3.1)$$

Bu eşitlikte y GOS verimini, X_i ,X_j, X_{ij}, $X_{ijk,}$ sırasıyla sıcaklık, başlangıç laktoz derişimi, zaman ve pH dır. β_{ko}, β_{ki}, β_{kii}, β_{kiii} ise programdan bulunan katsayıları göstermektedir. İncelenen her bir parametrenin en düşük, orta ve en

yüksek değerleri -1, 0, +1 olarak kodlanmıştır ve çizelge 3.1'de verilmiştir. Box-Behnken dizaynı kullanılarak Design Expert bilgisayar programı ile oluşturulan deneysel koşullar (27 farklı deney seti) çizelge 3.2'de verilmiştir. GOS sentezinde ortam pH'sı 4,6,8 (pH 4 için 100 mM asetat tamponu, pH 6 için 100 mM sitrat tamponu, pH 8 için 100 mM fosfat tamponu) ortam sıcaklığı 20,40,60 ºC, son laktoz derişimi 100,300,500 mM (%3 w/v, %10 w/v, %17 w/v) ve reaksiyon süresi 6,15,24 saat olarak belirlenmiştir. Her bir deney seti en az 3 tekrarla çalışılmıştır.

Çizelge 3.1 Değişkenlerin kodları

Değişkenler		**Değişkenlerin kodları**		
		En düşük	**Orta**	**En yüksek**
	semboller	-1	0	+1
Sıcaklık (^{o}C)	A	20	40	60
Laktoz derişimi (mM)	B	100	300	500
Zaman (sa)	C	6	15	24
pH	D	4	6	8

Çizelge 3.2. Laktoz dönüşümünü bulabilmek için yanıt yüzey yöntemi ile oluşturulan deney koşulları.

Deneme sayısı	**pH**	**Sıcaklık (ºC)**	**Laktoz derişimi (mM)**	**Reaksiyon süresi (sa)**
1	6	20	100	15
2	8	40	300	6
3	8	20	300	15
4	6	40	300	15
5	6	60	300	24
6	6	40	500	24
7	6	60	300	6
8	6	20	500	15
9	4	40	300	24
10	4	20	300	15
11	6	40	100	24
12	6	40	500	6
13	8	40	300	24
14	6	20	300	6
15	6	40	300	15
16	4	40	500	15
17	6	40	100	6
18	6	60	500	15
19	4	60	300	15
20	6	60	100	15
21	4	40	100	15
22	6	20	300	24
23	8	60	300	15
24	6	40	300	15
25	8	40	500	15
26	8	40	100	15
27	4	40	300	6

3.2.2. Galaktooligosakkarit Sentezi

GOS'lerin β-galaktozidaz ile sentezi Petzelbauer ve arkadaşları'nın (1999) önerdiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Yöntemin esası laktozun önce galaktoz ve glukoza hidroliz edilmesi, ardından hidrolizle elde edilen galaktoz ünitelerinin β-galaktozidaz enzimi varlığında reaksiyon ortamında var olan sakkaritlerin galaktoz ünitelerine eklenmesi ile GOS sentezlenmesidir. Yanıt yüzey metodu kullanılarak deneysel dizayn yapılmadan önce, sabit enzim derişiminde, sıcaklığın, başlangıç laktoz derişiminin, pH'nın ve reaksiyon süresinin aralıkları literatürdeki bilgilerden yararlanılarak belirlenmiştir (Chockchaisawasdee ve ark., 2005). Özetle, ilgili pH'da hazırlanmış 480 µL laktoz çözeltisi üzerine 20 µL (stok enzim çözeltisi 15 mg/mL) enzim çözeltisi eklenerek reaksiyon Çizelge 3.2'de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda enzimin kaynar su banyosunda 5 dk ısıtılmasıyla durdurulmuştur. Reaksiyonda oluşan GOS'lerin analizi refraktif indeks dedektörü kullanılarak HPLC (Supercosil LC-NH2 HPLC kolonu (5µm,250x4,6mm)) ile yapılmıştır (EK 1). Hareketli faz olarak akış hızı 1mL/dk olan asetonitril/su karışımı (75/25, v/v) kullanılmıştır. Oluşan GOS verimi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%\ verim = \left(1 - \frac{\text{GOS'a dönüşen Laktoz miktarı}}{\text{Başlangıç laktoz miktarı}}\right) \times 100$$

3.2.3. Galaktooligosakkarit' lerin Karakterizasyonu

Son derişimi 300 mM olacak şekilde 100 mM pH:6.0 sitrat tamponu içerisinde hazırlanmış 19,2 mL laktoz çözeltisi üzerine 0,8 mL stok enzim çözeltisi ilave edilmiş ve GOS sentezi 60 ^{o}C'de su banyosu içerisinde 6 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda, reaksiyon karışımı 10.000 rpm'de, 5 ^{o}C'de, 4 dk boyunca santrifüj edilmiş ve serbest enzim, reaksiyona girmeyen laktoz ve glukoz ve galaktoz içeren üst faz atılarak elde edilen ve GOS içeren katı 5 ^{o}C'de

kurutulmuştur. Sentezlenen GOS'un karekterizasyonu Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) kullanılarak yapılmıştır.

4- BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı kullanılması ile en yüksek verimde GOS sentezinin yapılabilmesi için uygun deneysel koşulların belirlenmesi araştırılmıştır. Literatür bilgileri ve ön deneysel çalışmalarımız sabit enzim derişiminde, başlangıç laktoz derişimi, sıcaklık, pH ve reaksiyon süresinin GOS verimine etkili olduğunu göstermektedir. Bu bilgilere göre pH için minimum ve maksimum değerler; pH 4 ve 8, sıcaklık için 20 ve 60 ^{o}C, başlangıç laktoz derişimi için 100 ve 500 mM, reaksiyon süresi için 6 ve 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu aralıklarda yapılan analizler sonucunda elde edilen deneysel GOS verimleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen GOS verimleri Design Expert bilgisayar programında analiz edilerek eşitlik 3.1'de verilen β_{ko}, β_{ki}, β_{kij}, ve β_{kij}, katsayıları aşağıda verildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$Y=6,85+2,18.A+(-3,65).B+(-0,72).C+0,49.D+(-0,83).A.B+0,295.A.C+3,46.A.D+ 0,61.B.C+ 0,17.B.D+(-0,45).C.D+ 2,62.A^2+0,79.B^2+ 0,13\ C^{2+}+(-0,45\ ).D^2$$

Çizelge 4.1. Analizler sonucu elde edilen laktoz dönüşüm miktarları

Deneme sayısı	**pH**	**Sıcaklık (ºC)**	**Laktoz derişimi (mM)**	**Reaksiyon süresi (sa)**	**Laktoz dönüşümü (%) (w/w)**
1	6	20	100	15	12,34
2	8	40	300	6	2,1
3	8	20	300	15	2,0
4	6	40	300	15	3,2
5	6	60	300	24	5,80
6	6	40	500	24	5,03
7	6	60	300	6	17,20
8	6	20	500	15	4,51
9	4	40	300	24	2,80
10	4	20	300	15	4,93
11	6	40	100	24	13,91
12	6	40	500	6	2,52
13	8	40	300	24	1,13
14	6	20	300	6	6,06
15	6	40	300	15	6,62
16	4	40	500	15	1,10
17	6	40	100	6	13,86
18	6	60	500	15	5,86
19	4	60	300	15	2,81
20	6	60	100	15	17,00
21	4	40	100	15	3,70
22	6	20	300	24	6,44
23	8	60	300	15	13,73
24	6	40	300	15	7,09
25	8	40	500	15	1,16
26	8	40	100	15	3,09
27	4	40	300	6	1,98

Eşitlik 3.1'de önerilen matematiksel modelin *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı ile gerçekleştirilen GOS sentezin için uygunluğu en küçük kareler yönteminin kullanıldığı varyans analizi (ANOVA) ve model uygunsuzluğu testi (Lack of fit) ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Yanıt yüzey yöntemi için ANOVA değerleri

kaynak	**Kareler toplamı**	**df**	**Ortalama kareler**	**F değeri**	**p-değeri Prob > F**	
model	545.04	14	38.93	5.76	0.0012	*anlamlı*
A-sıcaklık	56.85	1	56.85	8.42	0.0116	*anlamlı*
B-laktoz derişimi	159.51	1	159.51	23.62	0.0003	*anlamlı*
C-zaman	6.22	1	6.22	0.92	0.3535	
D-pH	2.89	1	2.89	0.43	0.5236	
AB	2.74	1	2.74	0.41	0.5345	
AC	34.69	1	34.69	5.14	0.0398	*anlamlı*
AD	47.96	1	47.96	7.10	0.0185	*anlamlı*
BC	1.48	1	1.48	0.22	0.6473	
BD	0.11	1	0.11	0.017	0.8993	
CD	0.80	1	0.80	0.12	0.7357	
A^2	44.49	1	44.49	6.59	0.0224	*anlamlı*
B^2	4.05	1	4.05	0.60	0.4515	
C^2	0.12	1	0.12	0.017	0.8973	
D^2	140.23	1	140.23	20.76	0.0004	*anlamlı*
kalıntı	94.56	14	6.75			
Regresyon katsayısının uyumluluğu	*94.33*	*10*	*9.43*	*165.26*	*+0.0001*	*anlamlı*

Önerilen matematiksel model için F değeri 5,76 ve Prob > F değeri 0,0012 olarak hesaplanmış ve yanılma payı % 0,12 olarak belirlenmiştir. Regresyon modelinin belirleyicilik katsayısı (R^2), 0,85 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç önerilen matematiksel modeli toplam değişimin %85'ini açıkladığını göstermektedir. Prob > F değeri 0,0500 den daha küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bu çalışma için anlamlı değerler A, B, AC, AD, A^2, D^2'daki değişimler anlamlı olarak belirlenmiştir. Prob > F değeri 0,1 den daha büyük olan değerler anlamlı değer olarak alınmamıştır. Model uygunsuzluğunun önemesizliği değeri

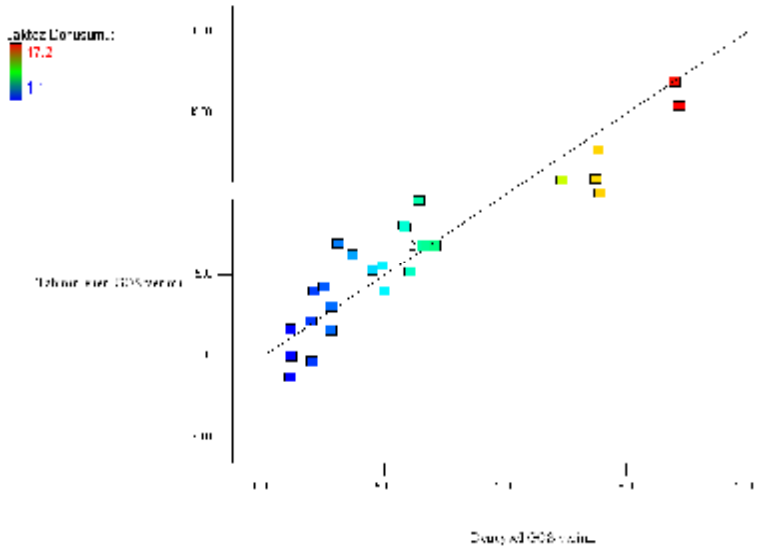
165,26 ve Prob > F değeri 0,001 hesaplanmıştır. Sadece % 0,01 kadar yanılma payı olduğu bulunmuştur.

$Y=6,85+2,18.A+(-3,65).B+(-0,72).C+0,49.D+(-0,83).A.B+0,295.A.C+3,46.A.D+ 0,61.B.C+ 0,17.B.D+(-0,45).C.D+ 2,62.A^2+0,79.B^2+ 0,13\ C^2+(-0,45\ ).D^2$

Bu eşitliği kullanarak programın oluşturduğu tahminsel değerlerle deneysel verilerin karşılaştırılması Çizelge 4.3'de ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

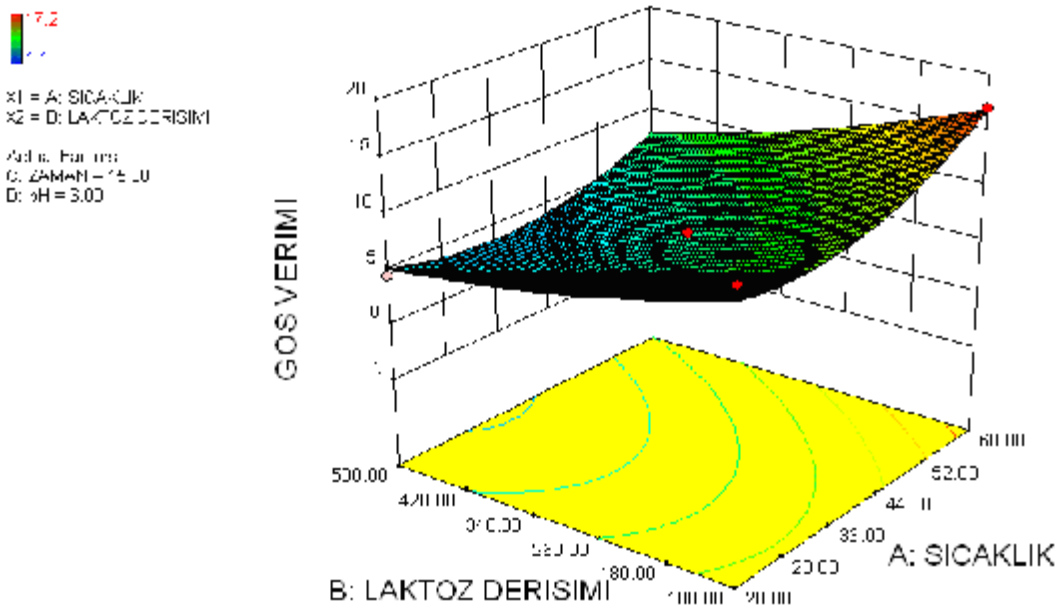
Çizelge 4.3. Tahminlenen değerlerle deneysel verilerin karşılaştırılması

Deneme sayısı	**Deneysel veriler**	**Tahminlenen değerler**
1	12,34	10,89
2	2,1	2,11
3	2,0	0
4	3,2	6,85
5	5,80	8,11
6	5,03	4,02
7	17,20	15,43
8	4,51	5,26
9	2,80	1,57
10	4,93	5,60
11	13,91	10,08
12	2,52	4,23
13	1,13	1,65
14	6,06	5,19
15	6,62	6,85
16	1,10	0
17	13,86	12,75
18	5,86	7,96
19	2,81	3,03
20	17,00	16,90
21	3,70	6,30
22	6,44	9,65
23	13,73	10,95
24	7,09	6,85
25	1,16	0
26	3,09	6,95
27	1,98	2,11



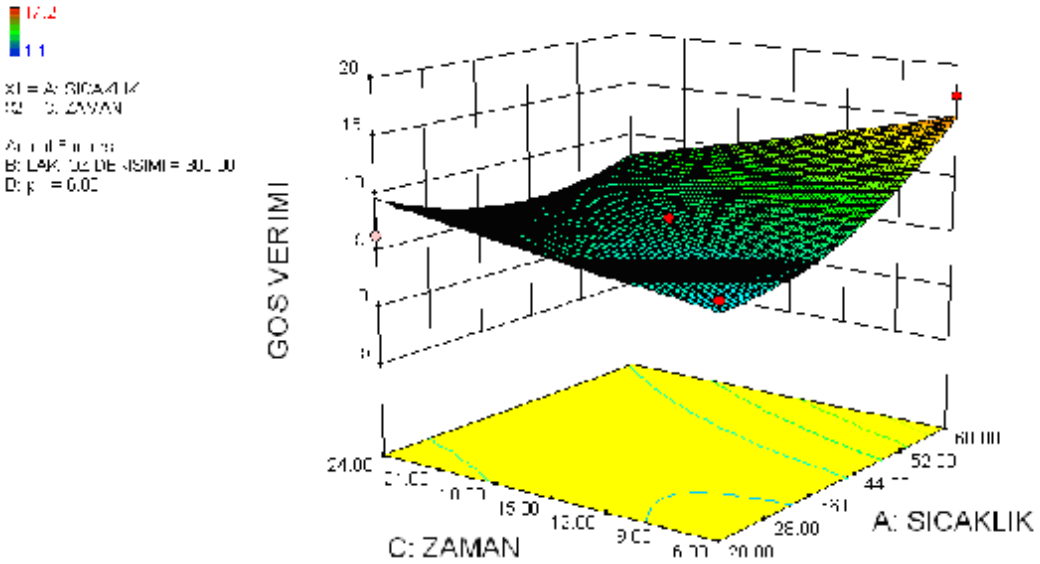
Şekil 4.1. Tahminlenen ve gözlenen değerler

Design Expert bilgisayar programı kullanılarak oluşturulan yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.2- 4.7'de verilmiştir. Bu grafikler deneysel ve tahminlenen değerlere göre çizilmiştir. Grafiklerde yanıt yüzey yöntemi üzerinde aynı anda iki faktörün etkisi izlenirken diğer ikisi sabit tutulmaktadır.



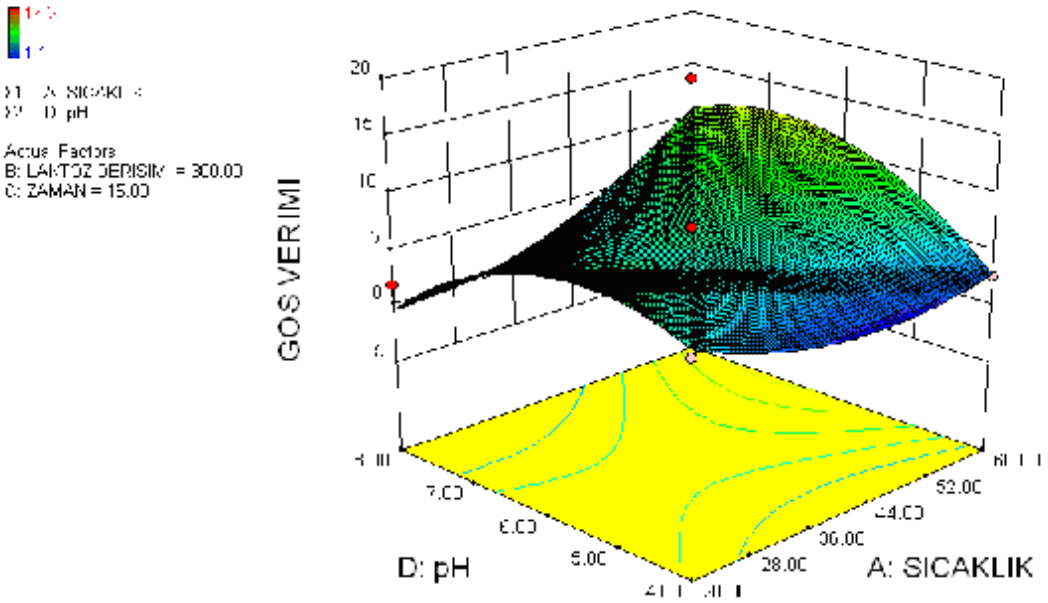
Şekil.4.2. Laktoz derişimi ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak GOS verimi'nin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.2'de laktoz derişimi ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak GOS verimi'nin sabit pH (6.0) ve reaksiyon süresinde (15 saat) üç boyutlu grafiği gösterilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi laktoz derişimi'nin 100 mM olduğu koşullarda sıcaklığın 20 ºC den 60 ºC ye çıkması ile GOS verimi %12,34'den % 17' ye yükselmiştir. Yani sıcaklık artışı GOS verimine pozitif yönde etki etmiştir. Laktoz derişimi ise sıcaklığın 20 ºC olduğu koşullarda 100 mM'dan 500 mM'a arttıkça verim %12,34'den % 4,51'e azalmıştır. Laktoz derişimi'nin artması GOS verimini ters yönde etkilemiştir.



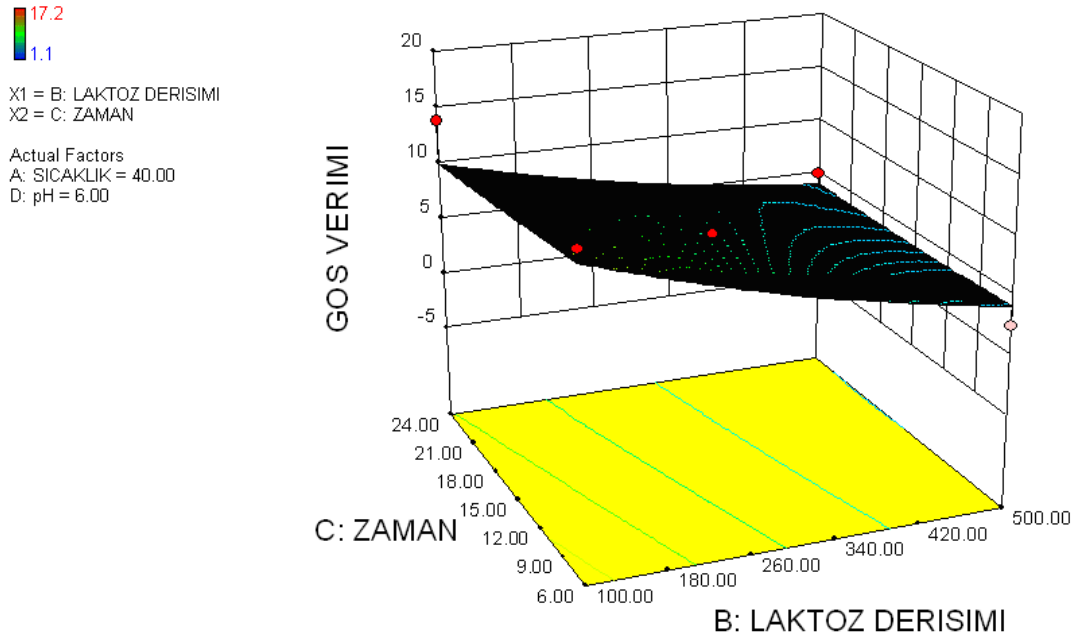
Şekil.4.3. Sıcaklık ve zamanın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.3'de sıcaklık ve reaksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin sabit pH (6.0) ve laktoz derişiminde (300mM) üç boyutlu grafiği gösterilmiştir. Sıcaklığın 20 ºC de olduğu koşullarda zamanın 6 saat'ten 24 saat'e artması ile GOS verimi'de %6,06'dan %9,59'a artmıştır. Sıcaklık 60 ºC reaksiyon süresi 6 saat 'ten 24 saat'e artması ile GOS verimi %17,20 'den %5,80'e azalmıştır.



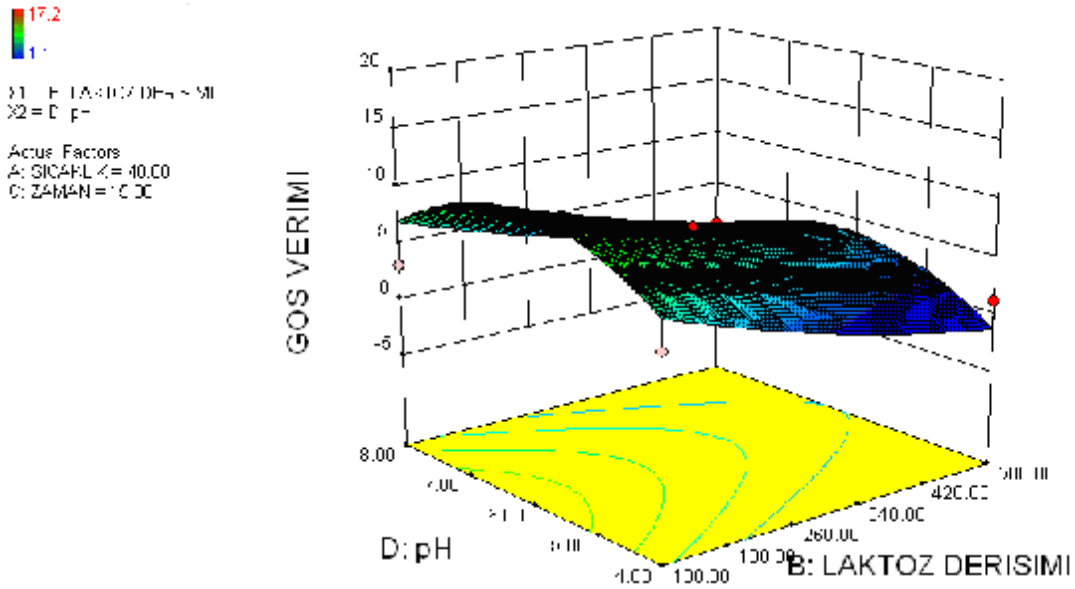
Şekil.4.4. pH ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.4'de pH ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin sabit laktoz derişimi (300 mM) ve reaksiyon süresi 15 (saat) üç boyutlu grafiği gösterilmiştir. Sıcaklığın 20 ºC olduğu koşullarda pH 4'de verim % 4,93, pH 6'da verim % 7,47 ve pH 8'de verim % 0,25 olarak bulunmuştur. pH'nın artması ile önce verim artmış daha sonra azalmaya başlamıştır. En yüksek GOS verimine pH 6.0'da yapılan sentezde ulaşılmıştır. pH'nın 4 olduğu koşullarda sıcaklığın GOS verimine etkisi incelendiğinde 20 ºC'de GOS verimi % 4,93 ve 60 ºC'de GOS verimi %2,81 olarak belirlenmiştir.



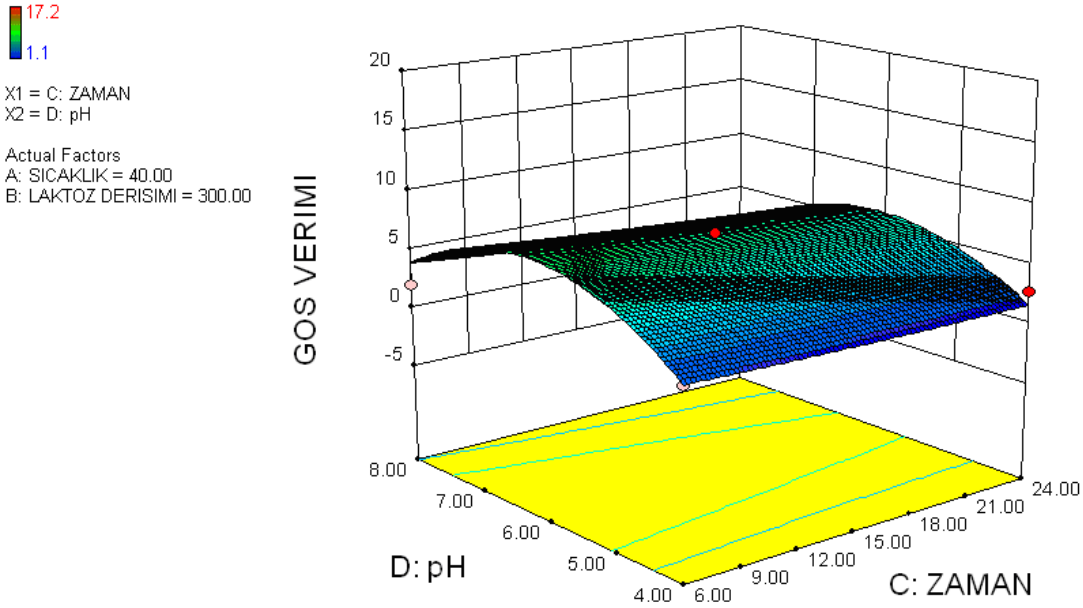
Şekil 4.5. Reaksiyon süresi ve laktoz derişiminin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.5'de zaman ve laktoz derişiminin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin sabit pH (6.0) ve sıcaklıktaki (40 ºC) üç boyutlu grafiği gösterilmiştir. Laktoz derişiminin 100 mM olduğu koşullarda reaksiyon süresi 6 saat'den 24 saat'e kadar arttıkça GOS verimi %13,86'dan % 10,14'e azalmıştır. Laktoz derişimi ise reaksiyon süresinin 6 saat olduğu koşullarda 100 mM'dan 500mM'a arttırıldığında GOS verimi % 13,86'dan % 4,32'e azalmıştır.



Şekil 4.6. pH ve laktoz derişimi'nin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği.

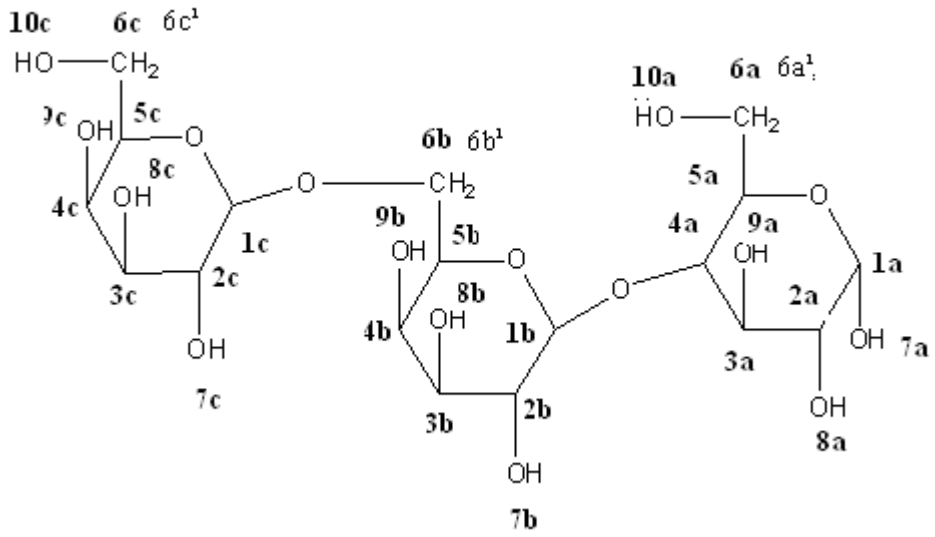
Şekil 4.6'da pH ve laktoz derişimi'nin bir fonksiyonu olarak GOS veriminin sabit sıcaklık (40 ºC) ve reaksiyon süresi (15 saat) değişiminin üç boyutlu grafiği gösterilmiştir. Bu grafik çizilirken sırasıyla sıcaklık ve zaman 40 ºC ve 15 saat olarak sabit tutulmuştur. Laktoz derişimi'nin 100 mM olduğu koşullarda GOS verimi pH 4'de % 6,58 ve pH 8'de % 7 olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 20 ºC ve laktoz derişiminin 300 mM olduğu koşullardan farklı olarak pH 8'de verim pH 4 ile hemen hemen aynı bulunmuştur. pH 4'de laktoz derişiminin 100 mM'dan 500 mM'a arttırılması ise GOS verimini % 6,58'den % 1,1'e azaltmıştır.



Şekil 4.7. pH ve zamanın bir fonksiyonu olarak GOS veriminin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.7'de pH ve zamanın bir fonksiyonu olarak 40 ºC'de ve 300 mM laktoz derişiminde GOS verimini göstermektedir. Reaksiyon süresinin 6 saat ve pH'nın 4 olduğu koşullarda GOS verimi %1,98, pH 6'da % 7,70 ve pH 8'de % 4,05 olarak bulunmuştur. Grafikten görüldüğü gibi pH 4'den pH 6'a artırılması GOS verimini arttırmış fakat pH'nın dahada arttırılması 8.0 GOS veriminde bir azalmaya neden olmuştur. pH'nın 4 olduğu koşullarda reaksiyon süresi 6 saat'den 24 saat'e arttırılması GOS verimini %1,98 'den % 1,63'e azaltılmıştır.

4.1.1 ^{1}H-NMR' ın Yorumlanması



Şekil 4.8 ^{1}H-NMRyorumu için numaralandırılmış GOS yapısı.

Sentezlenen GOS'in yapısı ^{1}H-NMR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde halkaya bağlı olan –OH gruplarına (7a, 8a,9a, 7b, 8b,9b, 7c,8c,9c) ait proton piklerinin yaklaşık olarak 3,50 ile 4,20 ppm aralığında olduğu, halkaya bağlı -CH_2 grubundaki (6a, 6a^{l}, 6b, 6b^{l}, 6c ve 6c^{l}) protonların 3,5 ile 4 aralığın da pik verdiği, halkalı yapıya ait karbonlara bağlı olan protonların ve -CH_2 gruplarına bağlı -OH gruplarındaki protonların (10a, 10c) ise halkaya bağlı -OH gruplarındaki proton ile aynı aralıkta pik verdiği rapor edilmiştir. Halkalı yapıya ait karbon gruplarından 1a ve 1c protonlarının ise 4,80 ile 5,20 aralığında pik verdiği rapor edilmiştir (Konstantin ve ark., (2002); Wieneke ve ark., (2007)). ^{1}H-NMR yorumlanırken ilk olarak eş protonlar (gruplardaki benzer çevreye ait protonlar) belirlenmiştir. Ek 2'de verilen ^{1}H-NMR spektrumundan görüleceği gibi 3,5 ile 4 ppm aralığında yoğun bir pik grubu vardır. Bu pik grubunun halkaya bağlı -OH gruplarına, -CH_2 gruplarına bağlı -OH gruplarına ve halkaya ait karbon gruplarına bağlı 2a, 2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 4b, 4c protonlarına ait olduğu belirlenmiştir. Halkaya ait olan Şekil 4.8'de 5a ve 5c ile gösterilen protonların ^{1}H-NMR da 4,40 ppm'de pik verdikleri belirlenmiştir. 5b'deki proton ise bunlardan farklı olarak 3 ile 4 ppm aralığında pik verdiği belirlenmiştir. 1b ve 1c protonları eş protonlardır ve

4,70 ppm'de çıkan piklerin 1b ve 1c'deki protonlara ait olduğu belirlenmiştir. 1a'daki protonun ise 5,20 ppm'de tekli pik verdiği belirlenmiştir. 4a' daki protonun 2,60 ppm'de pik verdiği belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda elde edilen ^{1}H-NMR sunuçlarının literatür çalışmalarıyla uygunluk içinde olduğu belirlenmiştir (Konstantin ve ark., (2002); Wieneke ve ark., (2007)).

4.2. Tartışma

Galaktooligosakkaritler genellikle gıda endüstrisinde kullanıldığı için enzimatik sentezinde kullanılacak β-galaktozidaz kaynağını seçerken hem yüksek verimde GOS sentezleyebilecek hem de gıda uygulamalarında güvenli olarak kullanılabilecek bir kaynaktan elde edilen enzimin kullanımı önemlidir. Çalışmamızda *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı kullanılmıştır. *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazını seçmemizin önemli nedenlerinden birisi *Kluyveromyces lactis*'in güvenli bir mikroorganizma olarak kabul edilmesi (Wiseman , A.,1986) diğeri de literatürde bu kaynaktan elde edilen β-galaktozidaz kullanımı ile ilgili yapılmış çok fazla çalışmanın bulunmamasıdır (Boon ve ark., 2000; Chockchaisawasdee ve ark., 2007).

Çalışmamızda enzim miktarı sabit tutulduğunda GOS sentez verimini etkileyen değişkenlerin sıcaklık, başlangıç laktoz derişimi, pH ve reaksiyon süresi olduğu belirlenmiş ve en yüksek deneysel verim pH'nın 6 sıcaklığın 60 ^{o}C ve başlangıç laktoz derişiminin 300 mM (%10 w/v) olduğu koşullarda %17,2 (w/w) olarak bulunmuştur. Boon ve ark., (2000) *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı ile yapmış oldukları çalışmada en yüksek GOS verimini pH 5, sıcaklık 40 ^{o}C, reaksiyon süresi 6 saat ve başlangıç laktoz derişimi 110 g/L'lık olduğu koşullarda %23 w/w olarak rapor etmişlerdir. *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı'nın kullanıldığı diğer bir çalışmada ise GOS verimi pH'nın 7, reaksiyon süresinin 3 saat, başlangıç laktoz derişiminin % 40 w/v ve sıcaklıkların 40 ^{o}C olduğu koşullarda araştırılmış ve bu şartlarda GOS verimi %23,8 w/w olarak bulunmuştur (Chockchaisawasdee ve ark. 2007).

Literatür incelendiğinde Cho ve ark. (2003) ***Bullera singularis*** β-galaktozidazı kullanarak sıcaklığın 50 ^{o}C, başlangıç laktoz derişiminin 47 g/L ve pH'nın 5 olduğu koşullarda GOS verimini % 41 w/w olarak, Chen ve ark. (2003) ***Escherichia coli*** β-galaktozidaz'ını kullanarak sıcaklığın 37 ^{o}C, başlangıç laktoz derişiminin 64,6 mM ve pH'nın 6,5 olduğu koşullarda GOS verimini % 29,7 w/v olarak, Ji ve ark. (2005) sıcaklığın 80 ^{o}C, başlangıç laktoz derişiminin 500 g/L ve pH'nın 6 olduğu koşullarda GOS verimini 91 g/L (% 18 w/w) olarak rapor etmişlerdir. Diğer kaynaklardan sağlanan β-galaktozidazlarla yapılan çalışmalarda ise şimdiye kadar en yüksek GOS verimi ***Sulfolobus solfataricus*** β-galaktozidazı için başlangıç laktoz derişiminin 600 g/L, sıcaklığın 80 ^{o}C, pH 'nın 6 olduğu koşullarda % 52,5 w/w olarak rapor edilmiştir (Park ve ark., 2008).

Çalışmamızda reaksiyon sıcaklığının GOS sentez verimine etkisi deneysel olarak incelendiğinde, 20-60 ^{o}C aralığında, sıcaklık arttıkça GOS veriminin %12,34'den % 17'ye arttığı ve en yüksek GOS veriminin 60 ^{o}C'de olduğu belirlenmiştir. Hsu ve ark. (2007) ***B.longum*** β-galaktozidazı kullanılması ile GOS sentezinde optimum sıcaklığı 45 ^{o}C olarak belirlemişlerdir. Bruins ve ark. (2003) ***Pyrococcus furiosus*** β-galaktozidazı ile yaptıkları çalışmada optimum reaksiyon ortam sıcaklığını 80 ^{o}C olarak rapor etmişlerdir.

Galaktooligosakkarit verimine başlangıç laktoz derişiminin etkilerini incelediğimizde GOS veriminin başlangıç laktoz derişiminin 100 mM (34,2 g/L) dan 500 mM (171 g/L) artırılması ile aynı reaksiyon koşullarında (pH 6, sıcaklık 20 ^{o}C, reaksiyon süresi 15 saat) %12,34'den % 4,51'e azaldığı görülmüştür. Ancak başlangıç laktoz derişiminin GOS verimi üzerinde tek başına etkili olmadığı incelenen diğer parametrelerinde (özellikle pH ve sıcaklık) önemli olduğu bulunmuştur. Literatür incelendiğinde en yüksek GOS sentez veriminin 100-400 g/L aralığında laktoz kullanıldığında elde edildiği rapor edilmiştir (Onishi ve ark. 1995, Cho ve ark. 2003, Petzelbauer ve ark 2000, Splechtna ve ark. 2006, Hsu ve ark. 2007).

GOS sentezi yanıt yüzey yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Yanıt yüzey yönteminin en büyük avantajı belirlediğimiz en düşük ve en yüksek aralıklarda (pH 4-8, sıcaklık için 20-60 ^{o}C, başlangıç laktoz derişimi için 100-500 mM, reaksiyon

süresi için 6-24 saat) optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi için klasik yöntemlere göre daha az sayıda deneysel çalışma ile optimum koşulların belirlenebilmesini sağlaması ve bu aralıklarda deneysel çalışma yapılmayan koşullarda da GOS verimini tahmin etme olanağı sağlamasıdır. Çalışmamızda elde ettiğimiz matematiksel eşitliğin GOS sentez verimlerini %85 güvenilirlik ile (regresyon modelinin belirleyicilik katsayısı R^2 0,85) tahmin ettiği belirlenmiştir. Çizelge 4.3'de görüleceği gibi en yüksek deneysel GOS veriminin elde edildiği iki değer sırasıyla % 17,20 ile başlangıç laktoz derişiminin 300 mM, sıcaklığın 60 ^oC, pH'nın 6 ve reaksiyon süresinin 6 saat olduğu ve % 17 ile başlangıç laktoz derişiminin 300 mM, sıcaklığın 60 ^oC, pH'nın 6 ve reaksiyon süresinin 15 saat olduğu koşullarda olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda tahminlenen değerler sırasıyla % 15,43 ve % 16,90'dır. İstatistiksel olarak deneysel verimle tahminlenen verim arasındaki uyumun en yakın olduğu durumda GOS veriminin % 17 olarak bulunduğu deneysel koşullar optimum koşullar olarak önerilebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. En yüksek GOS verimi başlangıç laktoz derişiminin 300 mM, sıcaklığın 60 ^{o}C olduğu, reaksiyon süresinin 6 saat ve pH'nın 6 olduğu koşullarda %17,2 olarak elde edilmiştir.
2. Box-Behnken yöntemi ile elde edilen 2. dereceden matematiksel eşitliğin elde ettiğimiz deneysel sonuçları açıklamada uygun bir model olduğu belirlenmiştir.
3. Bağımsız değişken olarak incelenen 4 parametreden verime en yüksek katkının 2,18 etkinlik katsayısı ile sıcaklık olduğu belirlenmiştir.
4. En yüksek deneysel GOS verimi % 17,20 olmasına rağmen deneysel verilerle tahminlenen değerlerin birbirine yakın olması nedeniyle istatistiksel açıdan en anlamlı GOS veriminin başlangıç laktoz derişiminin 300 mM, sıcaklığın 60 ^{o}C, pH'nın 6 ve reaksiyon süresinin 15 saat olduğu koşullarda % 17 olduğu, ancak diğer tüm koşullar aynı olmasına karşılık reaksiyon süresinin 6 saatlik reaksiyon süresine göre çok daha uzun (15 saat) olmasının enzimatik bir proses için bir dezavantaj olabileceği sonucuna varılmıştır.

5.2. Öneriler

1. Başka kaynaklardan saflaştırılan β-galaktozidaz enzimleri kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile GOS sentezinin optimizasyonu yapılarak *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı ile elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırılabilir.
2. Oluşan GOS yapılarının ayrıntılı analizleri yapılabilir.
3. *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidazı çeşitli desteklere immobilize edilerek GOS sentezi için tekrar kullanılabilirliği ve termal kararlılığı araştırılabilir. Bu çalışmalar yüksek sıcaklıklarda ve uzun sürelerde gerçekleştirilecek GOS sentezleri için daha kapsamlı bilgilere ulaşılmasını sağlayabilir.

KAYNAKLAR

AYKUT,U., TEMIZ, H., DERVISOGLU, M., 2008. β–Galaktozidaz'ın Transgalaktosilasyon Yönü ve Galaktooligosakkarit Sentezi Yüksek Lisans Tezi.

BARKER, S. A., EMERY, A. N., NOVOIS J. M., 1971. Enzyme reactor for industry. Process Biochmistry, 5:11.

BOON, M. A., JANSSEN, A. E. M., VAN DER PADT, A., 1999. Modelling and Parameter estimation of the enzymatic synthesis of oligosaccharides by β-galactosidase from *Bacillus circulans*. Biotechnology and Bioengineering, 64(5): 558–567.

BOON M. A., JANSSEN, A. E. M., VAN'T RIET, K., 2000. Effect of temperature and enzym origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme and Microbial Thechology, 26: 271-281.

BOX G., DRAPER N. R., 2007. Empirical Model Building and Response Surface. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.

BOZE, H., MOUILIN, G., GALZY, P., 1987. Uptake of Galactose and *Kluyveromyces lactis* Biochemical Characteristic and Attemped Genetical Analysis. General Microbiology, 133:15-23.

BRÁS, N. F., MOURA-TAMAMES, S. A., FERNANDES, P. A., RAMOS, M. J., 2008. Mechanistic studies on the formation of glycosidase-substrate and glycosidase inhibitor covalent intermediates. Computational Chemistry, 29(15): 2565–2574.

BRYANT, G. D., CHU, Y. K., LOUITT, R., 1970. Incidence and aetology of lactose intolerans. Med. J. Aust., 1:1285-1288.

BRUINS, M. E., STRUBEL, M., VAN LIESHOUT, J. F. T., JANSSEN, A. E. M., BOOM, R. M., 2003A. Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β-glucosidase from *Pyrococcus furiosus* Kinetics and modelling. Enzyme and Microbial Technology, 33(1): 3–11.

CASTILLO E. D., 2007. Process Optimization, a Statistical Approach. Springer Science and Business Media, LLC, New York, NY.

CHEN, S. X., WEI, D. Z., HU, Z. H., 2001. Synthesis of galactooligosaccharides in AOT isooctane reverse micelles by β-galactosidase. Molecular Catalysis, 16(2):109–114.

CHEN, W. C., CHAO-CHIH, O., CHIH-WEI, Y., 2003. synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. Enzyme and Microbial Thechology, 33: 497-507.

CHO, Y. J., SHIN, H. J., BUCKE, C., 2003. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β-galactosidase from ***Bullera singularis***. Biotechnology Letters, 25(24): 2107–2111.

CHOCKCHAISAWASDEE, S., ATHANASOPOULOS, V. I., NIRANJAN, K., RASTALL, R. A., 2005. Synthesis of galactooligosaccharide from lactose using β-galactosidase from ***Kluyveromyces lactis:*** Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 89(4): 434–443.

COLIN, J. S., 1990. Enzyme Chemistry: Impact and Applications Champman and Hall, 412.

COOK, G. C., 1967. Lactose activity in new born and infant baganda. Brit Med J., 1:527-530.

COULIER, L., TIMMERMANS, J., BAS, R., 2009. In depth Characterization of Prebiotic Galactooligosaccarides by a Combinatin of Analytical Techniques.

DEMIRHAN, E., APAR, D. K., OZBEK, B., 2008. Product inhibition of whey lactose hydrolysis. Chemical Engineering Communications, 195(3): 293–304.

DEPEINT, F., TZORTZIS, G., VULEVIC, J., I'ANSON, K., GIBSON, G. R., 2008. Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produce by the enzymatic activity of ***Bifidobacterium bifidum***, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled

intervention study. American Journal of Clinical Nutrition, 87(3): 785–791.

GEKAS, V., LOPEZ-LEIVA, M., 1985. Hydrolysis of Lactose Lıterature Review. Process Biochemistry, 20(1): 2-10.

GOSLING, A., ALFTRE J., STEVENS, W., BARBERF R., 2009. Facile Pretreatment of Bacillus circulans β-Galactosidase Increases the Yield of Galactosyl Oligosaccharides in Milk and Lactose Reaction Systems. Food Chemistry, 57: 11570–11574.

GOSLING, A., STEVENS, A., BARBER, A. R., KENTISH, S. E., 2010. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chemistry, 121: 307-318.

GONCU, Y., 2011.Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile Bor Nitrürün Saflaştırılmasının Eniyilemesi. Anadolu Üniversitesi Müh. Mim. Fak. Mlz. Bil. ve Müh. Böl., Eskişehir.

HATZINIKOLAOU, D. G., KATSIFAS, E., MAMMA, D., KARAGOUNI, A. D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., 2005. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration on whey permeate by a thermostable β-galactosidase from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 24(2): 161–172.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, I. C., LEBRÓN-AGUILAR, R., MORENO, F. J., SANZ, M. L., 2011. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides. Journal of Chromatography, 1218: 7691-7696.

HSU, C. A., LEE, S. L., CHOU, C. A., 2007. enzymatic production of GOS by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum*. Food Chemistry, 55: 2225-2230.

HUBER, R. E., KURZ, G., WALLENFELS, K., 1976. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β-galactosidase (*E. coli*) on lactose. Biochemistry, 15(9): 1994–2001.

HUBER, R. E., HURLBURT, K. L., TURNER, C. L., 1981. The anomeric specificity of β-galactosidase and lac permease from *Escherichia coli.* Canadian Journal of Biochemistry, 59(2): 100–105.

IKIZ F., PUSKULCU H., EREN S., 2000. Istatistiğe Giriş. Barış yayınları, Fakülteler kitabevi, 6. Baskı, İzmir, Türkiye

JACOBSON, R. H., ZHANG, X. J., DUBOSE, R. F., MATTHEWS, B. W., 1994. Threedimensional structure of β -galactosidase from *E. Coli.* Nature, 369: 761 -766.

JI, E. S., PARK, N. H., OH, D. K. 2005. Galactooligosaccharide production by a thermostable recombinant β-galactosidase from *Thermotoga maritima*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(5): 759–764.

JUERS, D. H., HEIGHTMAN, T. D., VASELLA, A., MCCARTER, J. D., MACKENZIE, L., WITHERS, S. G., 2001. A structural view of the action of *Escherichia coli (lacZ*) β-galactosidase. Biochemistry, 40(49): 14781–14794.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., VICARIA, J. M., 2004. Kinetic models of activity for β-galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. Enzyme and Microbial Technology, 34(1): 33–40.

KOC, B., KAYMAK, F., 2009. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda Işleme Uygulamaları. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir.

KONSTANTIN, A. S., KULMINSKAYAA, A. A., SAVEL'EVB, A. N., SHISHLYANNIKOVA, S. M., NEUSTROEVA, K. N., 2002. Enzymatic properties of β -galactosidase from Trichoderma reesei in the hydrolysis of galactooligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology , 30 :231–239.

KUTAY, F., ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E. Y., 2002. Enzimler insan biyokimyası, Palme Yayıncılık , Ankara, 197-202.

LARTILLOT, S., 1993. Immobilization of Lactase an Silica Gel: Study of Lactase Hidrolysis Wing The Immobilized Material. Biochemical Education, 21(3): 157-159.

MAHONEY, R. R., 1998. Galactosyloligosaccharide formation during lactose hydrolysis. Food Chemistry, 63(2): 147–154.

MAUGARD, T., GAUNT, D., LEGOY, M. D., BESSON, T., 2003. Microwave-assisted synthesis of galactooligosaccharides from lactose with immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biotechnology Letters, 25(8): 623–629. Vining GG

MANCILHA, I. M., MUSSATTO, S. I., 2007. Non-digestible oligosaccharides. Carbohydrate Polymers, 68(3): 587–597.

MYERS, R. H., MONTGOMERY D. C., 1995. Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.

MYERS, R. H., MONTGOMERY D. C., VINING G. G., BARROR C.M., KOWALSKI S. M., 2004. Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey. J. Quality Tech, 36: 53-77

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*. Microbiology and Biotechnology, 40(5): 657–663.

NERI, D. F. M., BALCAO, V. M., COSTA, R. S., ROCHA, I., TORRES, D. P. M., 2009. Galactooligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. Food Chemistry, 115(1): 92–99.

NUMANOGLU Y., 1997. Maya Hücreleri ile β-Galaktozidaz Enzim Üretimi, Immobilize Maya β-Galaktozidazı ile Laktozun Hidrolizi Yüksek Lisans Tezi , ANKARA Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 18-19.

ONISHI, N., TANAKA, T., 1995. Purification and properties of a novel thermostable galactooligosaccharide producing β-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae*. Applied and Environmental Microbiology, 61(11): 4026–4030.

PARK, H. Y., KIM, H. J., LEE, J. K., KIM, D., OH, D. K., 2008. Galactooligosaccharide production by a thermostable β-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(8): 1553–1558.

PETZELBAUER, I., NIDETZKY, B., HALTRICH, D., KULBE, K. D., 1999. Development of an ultra high temperature process for enzymatic hydrolysis of lactose. I. The properties of two thermostable β-glycosidases. Biotechnol. Bioengineering, 64(3): 322-332.

PRENOSIL, J. E., STUKER, E., BOURNE, J. R., 1987a. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: Part II: Experimental. Biotechnology and Bioengineering, 30(9):1026–1031. 1987b. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis Part I:. Biotechnology and Bioengineering, 30(9): 1019–1025.

RABIU, B. A., JAY, A. J., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., 2001. Synthesis and fermentation properties of novel galactooligosaccharides by β-galactosidases from *Bifidobacterium* species. Applied and Environmental Microbiology, 67(6): 2526–2530.

REUTER, S., NYGAARD, R., ZIMMERMAN, W., 1999. β-galactooligosaccharides synthesis with β-galactosidases from *Sulfolobus solfataricus, Aspergillus orzae and Eshericahia coli*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 509-516.

RYCROFT, C. E., JONES, M. R., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. Applied Microbiology, 91(5): 878–887.

SANZ, M. L., COTE, G. L., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., 2006A. Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria. Agricultural and Food Chemistry, 54(26): 9779–9784.

SANZ, M. L., COTE, G. L., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., 2006B. Selective fermentation of gentiobiose-derived oligosaccharides by human gut

bacteria and influence of molecular weight. FEMS Microbiology Ecology, 56(3): 383–388.

SANZ, M. L., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., 2005. Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity *in vitro*. Agricultural and Food Chemistry, 53(13): 5192–5199.

SANZ, M. L., SANZ, J., MARTINEZ-CASTRO, I., 2002. Characterization of O-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography–mass spectrometry. Chromatographia, 56(9–10): 617–622.

SAVAIANO, D. A., LEVITT, M. D., 1987. Milk Intolerance and Microbe Containing Dairy Foods. Journal Dairy Science, 70: 397-406.

SPLECHTNA, B., NGUYEN, T. H., STEINBOCK, M., KULBE, K. D., LORENZ, W., HALTRICH, D., 2006. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. Agricultural and Food Chemistry, 54(14): 4999–5006.

STRYER, L.,1981. Biochemistry, Standford University, 31

TUNC, G., 2006. Poli Hidrojeli Kullanılarak β-galaktosidazın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile Immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi.

TURAN, M. D., ALTUNDOGAN, H. S., 2011. Hidrometalurjik Araştırmalarda Yanıt Yüzey Yöntemlerinin Kullanımı. Madencilik, 50: 11-23.

VASELLA, A., DAVIES, G. J., BOHM, M., 2002. Glycosidase mechanisms. Current Opinion in Chemical Biology, 6(5): 619–629.

WALLENFELS, K., WEIL, R., 1972.. The enzymes New York In P. D. Boyer (Ed.), Academic Press. 7: 617–663

WHITE, J. S., 2000. Sugar, special sugars. In Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology.

WIENEKE, R., KLEIN, S., GEYERA, A., LOOSB, E., 2007. Structural and functional characterization of galactooligosaccharides in Nostoc commune: β-D-galactofuranosyl-(1-6)-[β-D-galactofuranosyl-(1-6)]2- β-D-1,4-anhydrogalactitol and β -(1-6)-galactofuranosylated homologues. Science Direct, 342: 2757–2765

WISEMAN, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology 2nd Edition.Ellis Horwood Limited Publishers.

YANG, X., ZHAO, Y., HE, N., CROFT, K. D., 2010. Isolation, Characterization, and Immunological Effects of r-Galacto-oligosaccharides from a New Source, the Herb *Lycopus lucidus Turcz*. Food Chemistry. 58: 8253–8258.

ZADOW, J. G., 1984. Lactose Properties and Uses. Journal Dairy Science, 67: 2654-2679.

ZARATE, S., LOPEZ-LEIVA, M. H., 1990. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis. Food Protection, 53(3): 262–268.

ZECHEL, D. L., WITHERS, S. G., 2000. Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. Accounts of Chemical Research, 33(1): 11–18.

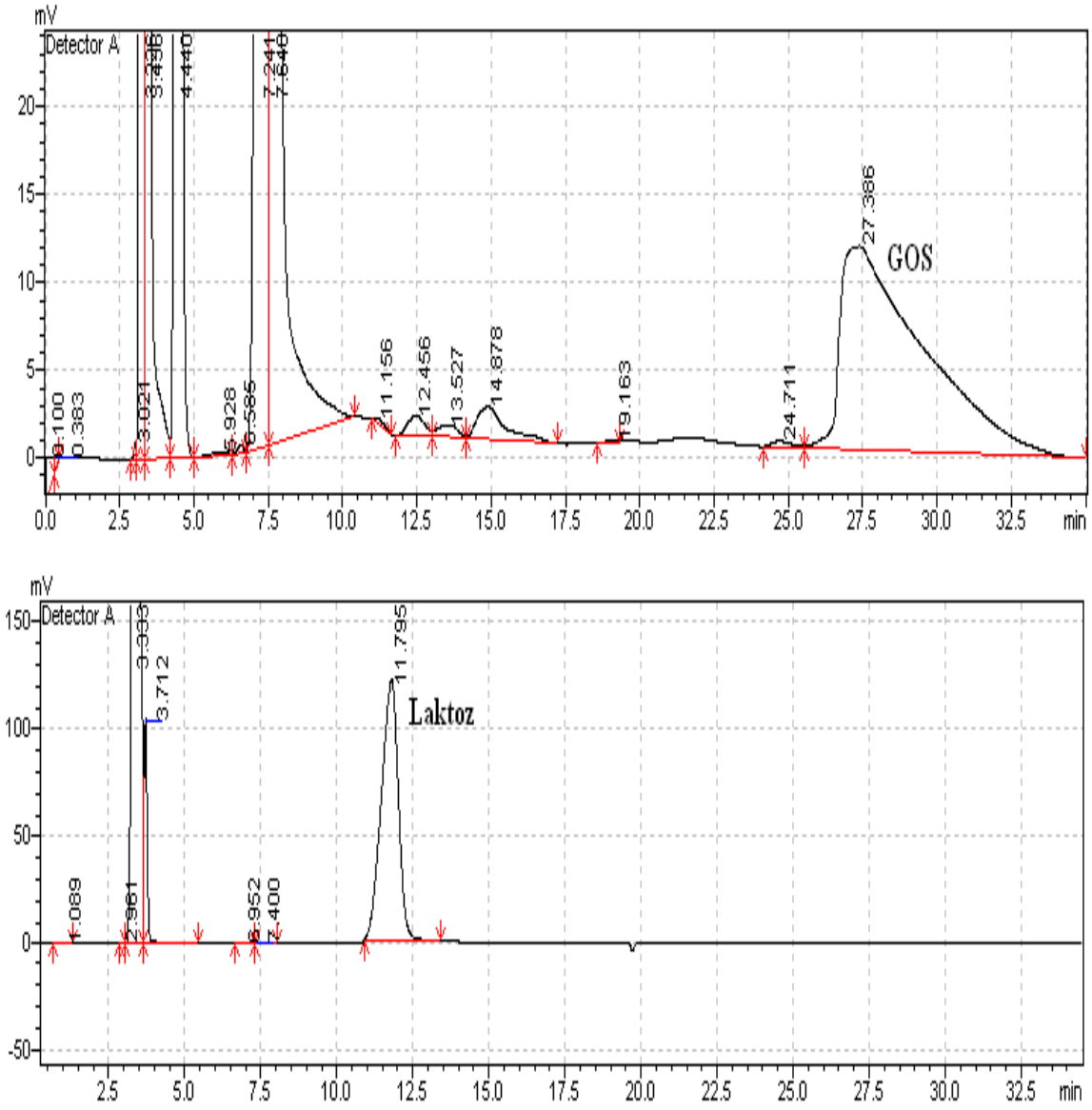
ZHOU, Q. Z. K., CHEN X. D., 2001. Immobilization of β-Galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde. Food Engineering, 48: 69–74.

ÖZGEÇMİŞ

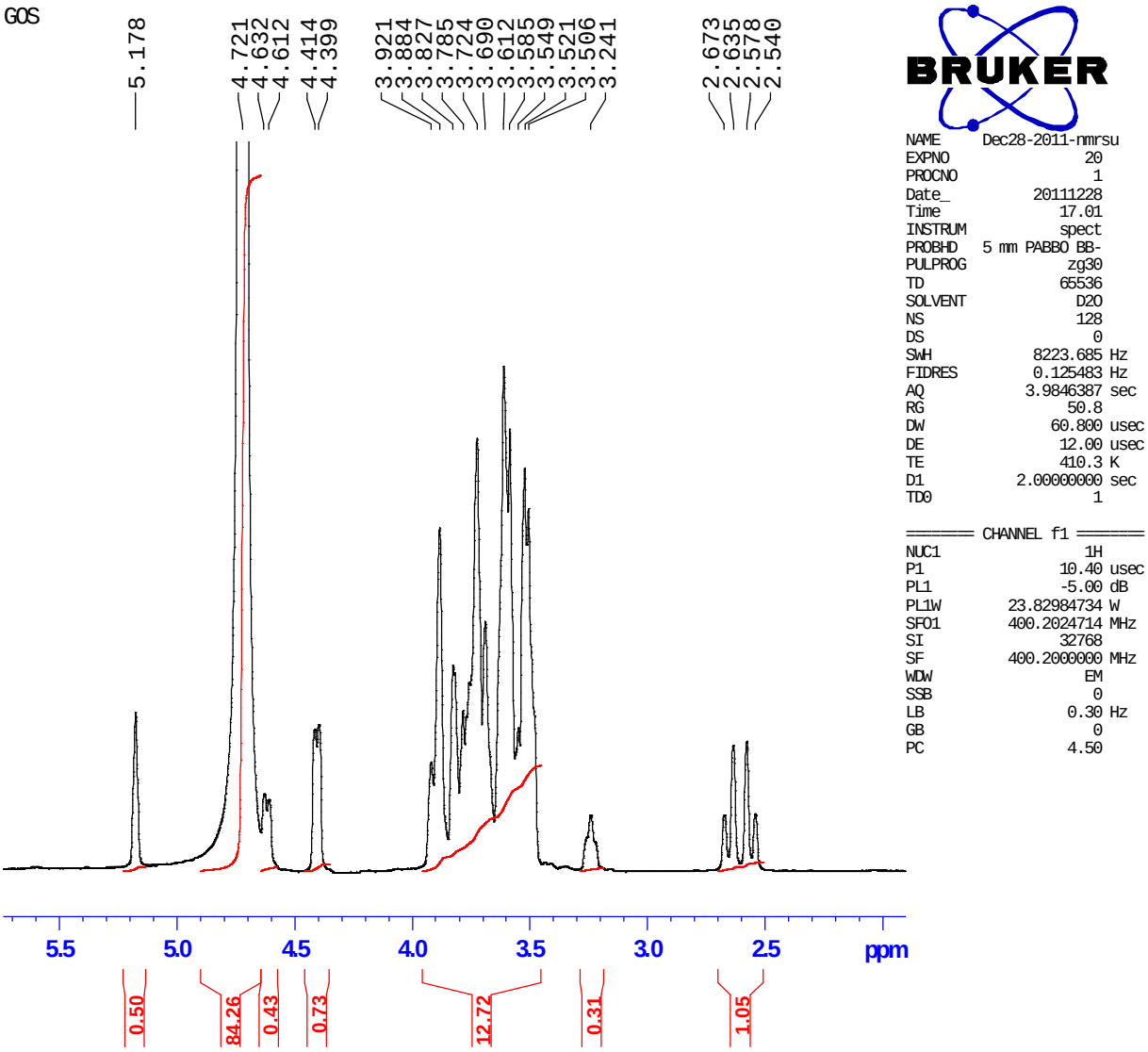
1983 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kayseride tamamladı. Lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 2002 yılında İzmir Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde üniversite eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.

EKLER

EK 1: Laktoz ve GOS için örnek bir HPLC spektrumu.



EK 2: GOS için ^{1}H-NMR spektrumu.



BRUKER

NAME	Dec28-2011-nmrsu
EXPNO	20
PROCNO	1
Date_	20111228
Time	17.01
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm PABBO BB-
PULPROG	zg30
TD	65536
SOLVENT	D2O
NS	128
DS	0
SWH	8223.685 Hz
FIDRES	0.125483 Hz
AQ	3.9846387 sec
RG	50.8
DW	60.800 usec
DE	12.00 usec
TE	410.3 K
D1	2.00000000 sec
TD0	1
====== CHANNEL f1 ======	
NUC1	1H
P1	10.40 usec
PL1	-5.00 dB
PL1W	23.82984734 W
SFO1	400.2024714 MHz
SI	32768
SF	400.2000000 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	4.50