



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**ÇAPRAZ BAĞLI İMMOBİLİZE  
α-GALAKTOZİDAZ ENZİM  
AGREGATLARININ HAZIRLANMASI,  
KARAKTERİZASYONU, RAFİNOZ VE  
RAFİNOZ TİP OLİGOSAKKARİTLERİN  
HİDROLİZ PROSESLERİNDE KULLANIM  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hasan BAYRAKTAR**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Seçil ÖNAL**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 07.02.2018**

**EÜ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Bornova-İZMİR**

**2018**



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ÇAPRAZ BAĞLI İMMOBİLİZE  $\alpha$ -GALAKTOZİDAZ  
ENZİM AGREGATLARININ HAZIRLANMASI,  
KARAKTERİZASYONU, RAFİNOZ VE RAFİNOZ TİP  
OLİGOSAKKARİTLERİN HİDROLİZ  
PROSESLERİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hasan BAYRAKTAR**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Seçil ÖNAL**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 07.02.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**



Hasan BAYRAKTAR tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Çapraz Bağlı İmmobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Agregatlarının Hazırlanması, Karakterizasyonu, Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidroliz Proseslerinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **07.02.2018** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.


**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Sesi Önal 


Raportör Üye

: Prof. Dr. Ayhan Zengin 

Üye

: Prof. Dr. Senay Sarıca 

Üye

: Doç. Dr. Gülşah SAĞI 

Üye

: Doç. Dr. AYŞE DİNÇEL 



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Çapraz Bağlı İmmobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Agregatlarının Hazırlanması, Karakterizasyonu, Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidroliz Proseslerinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13 / 02 / 2018

İmzası  


Adı-Soyadı

Hasan BAYRAKTAR





**ÖZET****ÇAPRAZ BAĞLI İMMOBİLİZE  $\alpha$ -GALAKTOZİDAZ ENZİM  
AGREGATLARININ HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU,  
RAFİNOZ VE RAFİNOZ TİP OLİGOSAKKARİTLERİN  
HİDROLİZ PROSESLERİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

BAYRAKTAR, Hasan

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Şubat 2018, 224 sayfa

$\alpha$ -D-Galaktozidazlar ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, Melibiaz, EC. 3.2.1.22) basit ve kompleks oligo- ve polisakkaritlerin (rafinoz, melibiyöz, stakiyöz, galaktomannan)  $\alpha$ -1,6-bağlı D-galaktoz birimlerini hidrolizleyen ekzoglikozidazlardır. Galaktoz konjugatlarının  $\alpha$ -galaktozidik bağlarının transgalaktozilasyon reaksiyonlarında da görev yapan  $\alpha$ -galaktozidazlar doğada oldukça yaygın olarak bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunurlar. Hem hidrolaz hem de transferaz aktiviteleri  $\alpha$ -galaktozidazların endüstriyel ve medikal alandaki uygulamaları için oldukça önemlidir.  $\alpha$ -Galaktozidazlar, gıda işleme ve hayvan besleme prosedürleri, şeker endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, kan grubu dönüşümleri ve Fabry hastalığının tedavisi gibi çeşitli biyoteknolojik ve medikal uygulama alanlarına sahiptir.

Enzim immobilizasyonu teknolojisi enzim stabilizasyonu için ana metodlardan birisi olduğundan son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bu bağlamda, enzim immobilizasyonu teknolojisinde kullanılacak enzim immobilizasyon yöntemleri her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda enzim immobilizasyonunda, çapraz bağlı enzim agregatlarının (Cross-Linked Enzyme Aggregates; CLEAs) hazırlandığı enzim immobilizasyon tekniği oldukça revaçtadır. Immobilizasyon için bir taşıyıcıya gereksinim yoktur. Genellikle yeterli saflıktaki proteinler bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak çapraz bağlı enzim agregatları oluşturulur. CLEA' lar iyi mekanik özelliklerinin yanı sıra oldukça aktif enzim preparatlarıdır. Çünkü enzimatik aktivite içermeyen çok yüksek oranda yabancı materyal içermezler ve çok sert koşullarda bile artmış kararlılık gösterebilirler ki bu onların uygulamalarını daha da değerli hale getirmektedir.

CLEA' nın önemli bir avantajı, immobilizasyon sırasında kullanılan proteinin çok saf olmasına gerek yoktur, ham enzim preparatları da kullanılabilir.

Bu çalışmada, mısırdan (*Zea mays*) izole edilen ve kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlanarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Kullanılan immobilizasyon prosedürünün optimizasyonu için immobilizasyona çeşitli parametrelerin etkisi (amonyum sülfat konsantrasyonu, protein miktarı, glutaraldehit konsantrasyonu, tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ı, çapraz bağlama süresi, çapraz bağlama sıcaklığı ve çalkalama hızı, BSA ilavesi) incelendi. Optimum koşullarda (1:5 (v/v) enzim: amonyum sülfat oranı, 7.5 mg protein ve % 0.1 (v/v) glutaraldehit, 6 saat, 4°C, 150 rpm) % 47 aktivite geri kazanımı ile CLEA hazırlandı. Hazırlanan immobilize ve serbest enzimlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim aktivitesine etki eden bazı parametreler (sıcaklık, pH, substrat spesifikliği ve konsantrasyonu, efektör konsantrasyonları, inhibisyon etkisi, stabilizatör etkisi) incelenerek kararlılık testleri (termal, pH, depo, operasyonel kararlılık) ve tekrar kullanılabilirlik yapıldı. İmmobilize ve serbest enzimlerin 40°C' de maksimum aktivite gösterdiği ve optimum pH değerlerinin sırasıyla pH 5.5 ve 6.0 olduğu gözlemlendi. Serbest ve immobilize enzimler için farklı substratlar varlığında (pNPG, stakiyoz, melibiyoz ve rafinoz) kinetik sabitler ( $k_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$ ) belirlendi. Çeşitli efektörlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı.  $\alpha$ -Galaktozidaz CLEA' sının termal, pH, depo ve operasyonel kararlılıklarının serbest enzime kıyasla oldukça iyi olduğu belirlendi. Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidroliz proseslerinde kullanım potansiyeli ile ilgili çalışmalar yapıldı. CLEA ve serbest enzimin soya sütündeki rafinoz ve stakiyozun % 85' inden fazlasını hidrolizlediği belirlendi.

**Anahtar sözcükler:** Mısır (*Zea mays*),  $\alpha$ -galaktozidaz, immobilizasyon, CLEA, soya sütü, rafinoz hidrolizi.

**ABSTRACT****PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED  
IMMOBILIZED  $\alpha$ -GALACTOSIDASE ENZYME AGGREGATES  
AND INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF THEM FOR  
THE HYDROLYSIS PROCESSES OF RAFFINOSE AND  
RAFFINOSE TYPE OLIGOSACCHARIDES**

BAYRAKTAR, Hasan

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

February, 2018, 224 pages

$\alpha$ -D-Galactosidases ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, Mellibiase, EC. 3.2.1.22) are exoglycosidases that catalyse the hydrolysis of  $\alpha$ -1,6-bounded D-galactose residues of basic and complex oligo- and polysaccharides (raffinose, stachyose, mellibiose, galactomannans). They are widely distributed in nature and found in plants, animals and microorganisms.  $\alpha$ -Galactosidases are also involved in transgalactosylation reactions of  $\alpha$ -galactosidic linkages of galactose conjugates. Both the hydrolase and transferase activity of  $\alpha$ -galactosidases are very important for their industrial applications. They have many potential biotechnological and medicinal applications such as in food processing and animal feed processing, sugar industry, pulp and paper industry, enzymatic synthesis, structural analysis, conversion of blood type and treatment of Fabry' s disease.

Since enzyme immobilization technology is one of the main methods for enzyme stabilization, it has become very important in recent years. In this context, enzyme immobilization methods that can be used in enzyme immobilization technology are increasing day by day. In recent years, the enzyme immobilization technique, prepared with Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) in enzyme immobilization, is quite popular. There is no need for a carrier for immobilization. Generally, proteins of sufficient purity are cross-linked with bifunctional reagents to form cross-linked enzyme aggregates. CLEA's are very active enzyme preparations as well as good mechanical properties. Because they do not contain very high levels of foreign material that do not contain enzymatic activity and they can show increased stability even under extreme conditions, which makes their practice even

more valuable. An important advantage of CLEA is that the protein used during immobilization does not need to be very pure, and crude enzyme preparations can be used.

In this study, cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of  $\alpha$ -galactosidase enzyme isolated and partially purified from maize (*Zea mays*) were prepared and immobilized. The effects of various parameters (ammonium sulfate concentration, protein amount, glutaraldehyde concentration, buffer type, concentration and pH, cross-linking time, temperature and rate, BSA addition) were examined for immobilization for the optimization of the immobilization procedure used. CLEA was prepared with 47% recovery of activity at optimum conditions (1:5 (v/v) enzyme:ammonium sulfate ratio, 7.5 mg protein and 0.1% (v/v) glutaraldehyde, 6 hours, 4°C, 150 rpm). Physical and chemical characterization of prepared immobilized and free enzymes was carried out. Stability tests (thermal, pH, storage, operational stability) and reusability were performed by examining some parameters affecting enzyme activity (temperature, pH, substrate specificity and concentration, effector concentrations, inhibition effect, stabilizer effect). Immobilized and free enzymes showed maximum activity at 40 °C and their optimal pH values were pH 5.5 and 6.0, respectively. Kinetic constants ( $k_M$ ,  $v_{max}$  and  $k_{cat}$ ) were determined for free and immobilized enzymes in the presence of different substrates (pNPG, stachyose, melibiose and raffinose). The effects of various effectors on enzyme activity were investigated. The thermal, pH, storage and operational stability of  $\alpha$ -Galactosidase CLEA was found to be quite good compared to the free enzyme. Studies on the potential use of free and immobilized  $\alpha$ -galactosidase enzymes in hydrolysis processes of raffinose and raffinose-type oligosaccharides in soy milk have been carried out. CLEA and free enzyme hydrolyzed more than 85% of raffinose and stachyose in soy milk.

**Keywords:** Maize (*Zea mays*),  $\alpha$ -galactosidase, immobilization, CLEA, soy milk, raffinose hydrolysis.

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım başta hocam Sayın Prof. Dr. Seçil ÖNAL olmak üzere tüm Biyokimya Bölümü öğretim elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tez İzleme Toplantılarında kıymetli görüşlerinden yararlandığım Doç. Dr. Ayşe Dinçer'e ve özellikle HPLC çalışmalarında bana yol gösteren Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na, SDS-PAGE analizlerimde yardımlarını esirgemeyen Dr. Canan ÖZYURT ve doktora öğrencisi Özge UĞURLU'ya, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca bana vermiş oldukları destek, göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için ANNEM, BABAM ve ABLAMLARA, hep yanımda olan dostlarıma ve çalışma arkadaşlarıma minnettarım.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2013 FEN 022 nolu proje ile desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Galaktozidazlar.....	1
1.1.1 $\alpha$ -Galaktozidazların sınıflandırılması.....	2
1.1.2 $\alpha$ -Galaktozidaz substratları.....	2
1.1.3 $\alpha$ -Galaktozidaz kaynakları.....	6
1.1.4 $\alpha$ -Galaktozidaz üretimi.....	7
1.1.5 $\alpha$ -Galaktozidazların saflaştırılması ve karakterizasyonu.....	12
1.1.6 Tür iyileştirmesi.....	26
1.1.7 $\alpha$ -Galaktozidazların uygulama alanları.....	27
1.2 İmmobilize Enzimler.....	34
1.2.1 İmmobilizasyon yöntemleri.....	35

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
1.2.2 Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA).....	40
1.2.3 CLEA teknolojisi ile enzimatik katalitik özelliklerin iyileştirilmesi .....	53
1.2.4 Multi-CLEA' lar ve kombi-CLEA' lar .....	59
1.2.5 Kaskat Reaksiyonlarında kombi-CLEA.....	60
1.2.6 Reaktör tasarımı .....	60
1.2.7 Katı matrisler ve nanopartiküllerle CLEA' nın birleştirilmesi.....	62
1.2.8 Sürekli proseslerde CLEA' lar.....	63
1.2.9 $\alpha$ -Galaktozidazlar ve CLEA teknolojisi ile ilgili gelecekte beklenenler ...	64
2. MATERYAL VE METOD .....	67
2.1 Materyal .....	67
2.2 Cihaz ve Sistemler.....	67
2.3 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini .....	68
2.3.1 p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid ile aktivite tayini .....	68
2.3.2 Rafinoz ile aktivite tayini .....	69
2.4 İnvvertaz Aktivitesi Tayini.....	70
2.5 Aktivite Geri Kazanımı ve Agregasyon Verimi .....	70
2.6 Protein Tayini .....	71



**İÇİNDEKİLER (devam)****Sayfa**

2.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini .....	72
2.7.1 Polimerizasyon protokolü .....	73
2.7.2 Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması .....	73
2.7.3 Protein bantlarının boyanması.....	74
2.8 Mısır Unundan İzole Edilen $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması .....	74
2.9 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu .....	75
2.9.1 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) hazırlanması .....	76
2.10 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu .....	80
2.10.1 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi .....	80
2.10.2 Kararlılık testleri.....	84
2.11 İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının pNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı.....	88
2.12 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi.....	88
2.12.1 Soya sütünün hazırlanması.....	88
2.12.2 Soya sütünde toplam oligosakkarit miktarının tayini .....	89
2.12.3 Kesikli karıştırmalı tank reaktörde (Batch Stirred-Tank Reactor) hidroliz	89

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.12.4 HPLC ile ayırım ve hidroliz derecesinin belirlenmesi .....	89
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	91
3.1 Mısır Unundan İzole Edilen $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması.....	91
3.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu .....	95
3.2.1 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) hazırlanması.....	96
3.2.2 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) değerlendirilmesi .....	111
3.3 Serbest ve İmmobilize Mısır $\alpha$ -Galaktozidaz Enzimlerinin Karakterizasyonu .....	112
3.3.1 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi .....	113
3.3.2 Kararlılık testleri.....	129
3.4 İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının pNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı.....	143
3.5 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi .....	145
3.5.1 Soya sütününün hazırlanması ve toplam oligosakkarit miktarının tayini.....	145
3.5.2 HPLC ile ayırım ve hidroliz derecesinin belirlenmesi .....	145

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	158
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	162
ÖZGEÇMİŞ.....	218



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 $\alpha$ -Galaktozidazın doğal substratları (Naumoff, 2004).....	3
1.2 Melibiyozun $\alpha$ -galaktozidaz ile hidrolizi (Anisha, 2017).....	3
1.3 Rafinoz ailesi şekerleri arasındaki yapısal ilişki (Mulimani and Dhananjay, 2007) .....	4
1.4 Legümlü bitkilerde gaz oluşumuna neden olan oligosakkaritlerden rafinoz (A), stakiyoz (B) ve verbaskozun (C) yapıları (Anisha, 2017)....	4
1.5 Keçi boynuzu sakızının yapısı ve hidrolizini katalizleyen enzimler (Anisha, 2017).....	5
1.6 Guar sakızının yapısı ve hidrolizini katalizleyen enzimler (Anisha, 2017) .....	5
1.7 Genel transglukozilasyon mekanizması ( <a href="https://www.cazypedia.org/index.php/Transglycosylases">https://www.cazypedia.org/index.php/Transglycosylases</a> ).....	25
1.8 $\alpha$ -Galaktozidaz ve Fabry hastalığı (Garman and Garboczi, 2004).....	32
1.9 Kırmızı kan hücresi yüzeyindeki AB antijenik karbohidrat yapıları ve O kan grubuna dönüşümleri (Chapanian et al., 2014) .....	33
1.10 İmmobilizasyon yöntemleri (Holmberg et al., 2014) .....	36
1.11 Enzim immobilizasyon yaklaşımları, geri dönüşümsüz yöntemler (Brena et al., 2013) .....	38
1.12 Enzimlerin çapraz bağlayıcı ajanlar ile etkileşimi (Yan et al., 2015) ....	40
1.13 Organik bir çözügen içerisinde CLEA'nın hazırlanma işlemi (López-Serrano et al., 2002) .....	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.14 CLEA morfolojisi. A) Tip 1, CAL-B'nin CLEA, amplifikasyon X3500; B) Tip 2, CRLA CLEA, amplifikasyon X25000 (Schoevaart et al., 2004) .....	53
1.15 Kombi CLEA oluşumu (Ahumada et al., 2016) .....	59
1.16 Enzimatik reaktör sisteminin genel şematik diyagramı (Zhou and Chen, 2001) .....	63
2.1 p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG)' nin $\alpha$ -galaktozidaz ile hidrolizi (Cao et al., 2016).....	68
2.2 Rafinozun $\alpha$ -galaktozidaz ile hidrolizi (Daude et al., 2012).....	69
2.3 Sükrozun invertaz ile hidrolizi ( <a href="https://www.decodedscience.org/processingchemistrysugarcane/43324">https://www.decodedscience.org/processingchemistrysugarcane/43324</a> ) .....	70
2.4 Aktivite geri kazanımı (%) (a) ve agregasyon verimi (%) (b) (Vaidya et Al., 2012).....	71
3.1 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE elektroforegramı ( <b>1:</b> Ham ekstrakt, <b>2:</b> %85 amonyum sülfat çöktürmesi, <b>3:</b> %35 amonyum sülfat gradient çöktürmesi, <b>4:</b> %85 amonyum sülfat gradient çöktürmesi, <b>5:</b> Protein moleküler kütle standartları).....	95
3.2 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidazların aktivitelerine sıcaklığın etkisi .....	114
3.3 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Arrhenius diyagramları.....	115
3.4 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine pH' ın etkisi ve optimum pH .....	116

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat konsantrasyonunun (PNPG) etkisi .....	118
3.6 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG) .....	118
3.7 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat (Melibiyoz) konsantrasyonunun etkisi .....	119
3.8 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat (Rafinoz) konsantrasyonunun etkisi .....	119
3.9 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat (Stakiyoz) konsantrasyonunun etkisi .....	120
3.10 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Melibiyoz) .....	121
3.11 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz) .....	121
3.12 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Stakiyoz) .....	122
3.13 Metallerin serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri .....	124
3.14 $MgCl_2$ 'nin farklı konsantrasyonlarının serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri .....	125
3.15 Şekerlerin serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri .....	125

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.16 Galaktozun farklı konsantrasyonlarının serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.....	126
3.17 Melibiyozun farklı konsantrasyonlarının serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.....	127
3.18 Galaktozun inhibisyon türünün belirlenmesi: (a) immobilize ve (b) serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi.....	128
3.19 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin termal kararlılığı.	131
3.20 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (37°C).....	133
3.21 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (40°C).....	133
3.22 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (50°C).....	134
3.23 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin pH kararlılığı .....	136
3.24 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılığı (Sıcaklık: -20°C).....	137
3.25 İmmobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılıkları ....	141
3.26 İmmobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri....	142
3.27 Kesikli karıştırmalı tank reaktördeki ürün ve substrat miktarları (Substrat: pNPG, Sıcaklık: 37°C, pNPG S <sub>0</sub> : 0,5 $\mu$ mol) .....	144
3.28 Kesikli karıştırmalı tank reaktördeki ürün ve substrat miktarları (Substrat: Rafinoz, Sıcaklık: 50°C, Rafinoz S <sub>0</sub> : 10 $\mu$ mol). .....	144

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.29 pNPG ve rafinozun kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki dönüşüm eğrisi. .....	145
3.30 Karbohidrat standartlarının DAD (200 nm) dedektörün kullanıldığı HPLC analizine yönelik kromatogram [HPLC Koşulları: Kolon akış hızı 1,0 mL/dakika, dengeleme tamponu (Asetonitril) (Tampon A), elüsyon tamponu (su) (Tampon B), gradient elüsyon 0-2 dk. %20 (Tampon B), 2-5 dk %25 (Tampon B), 5-22 dk %25 (Tampon B), 22-23 dk %20 (Tampon B), kolon sıcaklığı 40°C, dalga boyu 200 nm, kolon LC-NH <sub>2</sub> ] .....	146
3.31 Karbohidrat standartlarının RID dedektörün kullanıldığı HPLC analizine yönelik kromatogram [HPLC Koşulları: Kolon akış hızı 1,0 mL/dakika, Mobil faz: Asetonitril:su (75:25), izokratik elüsyon, kolon sıcaklığı 50°C, kolon LC-NH <sub>2</sub> ].....	148
3.32 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: DAD (200 nm)) a) soya sütü $\alpha$ -galaktozidaz öncesi b) serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an c) serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat.....	149
3.33 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: DAD (200 nm)) a) soya sütü $\alpha$ -galaktozidaz öncesi b) immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an c) serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat... ..	150
3.34 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: RID a) soya sütü $\alpha$ -galaktozidaz öncesi b) serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an c) serbest $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat.....	151



**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.35 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: RID) <b>a)</b> soya sütü $\alpha$ -galaktozidaz öncesi <b>b)</b> immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0. an <b>c)</b> immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat .....	152
3.36 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki rafinozun hidrolizi. a) Dedektör: DAD (200 nm) b) Dedektör: RID..	153
3.37 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki stakiyozun hidrolizi. a) Dedektör: DAD (200 nm) b) Dedektör: RID.	154

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Batık fermantasyonda $\alpha$ -galaktozidazın mikrobiyal üretimi (Anisha, 2017) .7	
1.2 Katı hal fermantasyonunda (SSF) $\alpha$ -galaktozidazın mikrobiyal üretimi (Anisha, 2017) .....	9
1.3 Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin karakteristikleri (Anisha, 2017) .....	13
1.4 Bazı bitki tohumlarındaki $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri (Dey, 1984).....	15
1.5 İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri (Önal, 2000) .....	35
1.6 Enzim agregat tipleri (Roy et al., 2017) .....	42
1.7 Çözünmüş agregatların % 90 (v/v)' lık çöktürücü kullanıldıktan ve çapraz bağlandıktan sonra aktivitesi (Schoevaart et al., 2004) .....	45
3.1 % 85' lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonrası enzim preparatının $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz içeriği .....	92
3.2 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları .....	93
3.3 İvertaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları .....	93
3.4 Mısırdan kısmi olarak saflaştırılan ve ticari enzim preparatlarının $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz içeriği .....	96
3.5 Ticari ve mısır $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin immobilizasyonu .....	97

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 Mısır $\alpha$ -galaktozidaz enziminin agregasyonuna amonyum sülfat konsantrasyonunun etkisi.....	98
3.7 Mısır $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna protein miktarının etkisi.....	100
3.8 Mısır $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi.....	102
3.9 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna tampon türü ve pH' ın etkisi.....	105
3.10 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna sitrat tamponu (pH 5,0) konsantrasyonunun etkisi.....	106
3.11 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna çapraz bağlama süresinin etkisi.....	107
3.12 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna çapraz bağlama sıcaklığının etkisi.....	109
3.13 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna çapraz bağlama sıcaklığının etkisi.....	109
3.14 Mısır $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna BSA ilavesinin etkisi .....	110
3.15 Mısır $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için belirlenen optimum koşullar.....	111
3.16 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enziminin doygunluk substrat konsantrasyonu .....	120
3.17 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enziminin kinetik sabitleri .....	122

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.18 Stabilizatörlerin serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitelere etkileri .....	129
3.19 İmmobilize enzimin farklı zamanlardaki $t_{1/2}$ ve $k_D$ değerleri .....	140
3.20 İmmobilize enzimlerin ortalama $t_{1/2}$ ve $k_D$ değerleri .....	140
3.21 Karbohidratların HPLC ile kolonda alıkonma süreleri (Dedektör: DAD (200 nm)).....	147
3.22 Karbohidratların HPLC ile kolonda alıkonma süreleri (Dedektör: RID) .	148
4.1 Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyon sonuçları .....	159

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
GH	Glikozil hidrolaz
pNPG	p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid
oNPG	o-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid
RFO	Rafinoz ailesi oligosakkaritleri
SSF	Katı hal fermantasyonu
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
TKT	Transkaryotic Therapies
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF	Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu
pI	İzoelektrik nokta
DEAE	Dietilaminoetil
CM	Karboksimetil
RBC	Kırmızı kan hücresi
GA	Glutaraldehit
$\mu$ m	Mikrometre

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CLEA	Çapraz bağlı enzim agregatları
CLE	Çapraz bağlı enzimler
CLEC	Çapraz bağlı enzim kristalleri
U	Unite aktivite birimi
PEG	Polietilen glikol
DMSO	Dimetil sülfoksit
BSA	Sığır serum albümini
MSR	Membran bulamaç reaktörü
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
nm	Nanometre
mM	Milimolar
mL	Mililitre
$\mu$ mol	Mikromol
İE	İmmobilize enzim
SE	Serbest enzim
DNS	Dinitrosalisilik asit

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamin
mg	Miligram
RID	Refraktif indeks dedektör
DAD	Diyot dizi dedektörü
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
$t_{1/2}$	Yarılanma ömrü
$k_D$	Bozunma sabiti
$K_M$	$V_{max}$ 'ın yarısına denk gelen hızdaki substrat konsantrasyonu
$V_{max}$	Doygun substrat konsantrasyonundaki reaksiyon hızı
$k_{cat}$	Turn over sayısı
$S_0$	Başlangıç anında rezervuardaki substrat konsantrasyonu
$S_t$	t anında rezervuardaki substrat konsantrasyonu
X	Substrat dönüşümü
$A_0$	Başlangıç anındaki enzimatik aktivite
$A_t$	t anındaki enzimatik aktivite





# 1. GİRİŞ

## 1.1 $\alpha$ -Galaktozidazlar

$\alpha$ -Galaktozidaz veya melibiyaz ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi galaktooligosakkaritler ve galaktomannanlar gibi dallanmış polisakkaritler de dâhil olmak üzere  $\alpha$ -D-galaktozidlerden  $\alpha$ -1,6-bağlı galaktoz birimlerini hidrolizleyen bir ekzoglikozidazdır (Naumoff, 2004).  $\alpha$ -Galaktozidazlar, biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalar için farklı potansiyele sahip çok yönlü enzimlerdir. Bunlar, gastrik gaza neden olan rafinoz tip şekerler gibi besleyici olmayan galaktooligosakkaritlerin azaltılması veya giderilmesi için kullanılır; böylelikle legüm bazlı gıdaların besin değerini arttırlar (Wang et al., 2014).  $\alpha$ -galaktozidazlar, şeker endüstrisinde sükrözün kristalleşmesini olumsuz olarak etkileyen rafinoz ve / veya stakiyozu ortadan kaldıran faydalı enzimlerdir (Ohtakara and Mitsutomi, 1987). Bazı  $\alpha$ -galaktozidazların transglikozidaz aktivitesine sahip olduğu da gösterilmiştir (Anisha, 2011; Kurakake et al., 2015).  $\alpha$ -Galaktozidazların transferaz aktiviteleriyle üretilen galaktooligosakkaritler fonksiyonel gıdalarda probiyotik olarak kullanılabilirler (Rivero-Urgell and Santamaria-Orleans, 2001).  $\alpha$ -Galaktozidazların hamur ve kağıt endüstrisinde de ilgi çekici uygulamaları vardır (Clarke, 2000).

$\alpha$ -Galaktozidazlar, medikal alanda Fabry hastalığının tedavisinde, hayvanlardan insana nakledilen dokuların reddinin (xenorejection) önlenmesinde ve kan grubu dönüşümünde artan bir ilgi kazanmaktadır.  $\alpha$ -Galaktozidazlar,  $\alpha$ -galaktozidaz A genindeki mutasyonların neden olduğu ve bu enzimin kusurlu aktivitesiyle sonuçlanan bir X bağlantılı (lokus Xq22) lizozomal depolama bozukluğu olan Fabry hastalığının tedavisinde enzim replasman tedavisinde kullanılırlar (Daitx et al., 2015; Desnick, 2015). Bu hastalık, enzimin substratı olan globotriaosilseramidin ilerleyen birikimi, plazmadaki ve özellikle hemizigot erkek hastaların vasküler endotelial lizozomlarındaki ilgili glikosfingolipidler ile karakterizedir (Desnick, 2015). Etkilenen erkeklerde kalp, böbrek ve beyindeki tıkaçıcı hastalığa bağlı olarak erken ölümler gözlenebilir.  $\alpha$ -Galaktozidaz tedavisi, hayvandan alınan dokuların reddini önlemek için en cazip alternatiftir; çünkü domuz endotel hücrelerinin ve lenfositlerin yeşil kahve çekirdeği  $\alpha$ -galaktozidazı ile *in vitro* olarak muamele edilmesi insan ksenoreaktif doğal antikörlerinin bağlanmasını önemli ölçüde azaltır (Watier et al., 1996). Ayrıca, rekombinant bir taro  $\alpha$ -galaktozidazın, Fabry hastalığındaki hastalardan alınan dokularda biriken  $\alpha$ -

1,4 bağı galaktozil artıklarını hidrolize etmekle kalmayıp aynı zamanda,  $\alpha$ -1,3 bağı galaktozid B kırmızı kan hücrelerini de hidrolizlediği rapor edilmiştir (Chern et al., 2012).

### 1.1.1 $\alpha$ -Galaktozidazların sınıflandırılması

$\alpha$ -Galaktozidazlar, substrat spesifiklikleri ve sekans benzerliklerinin hidrofobik analizleri temel alınarak sınıflandırılmışlardır. Substrat spesifikliklerine göre: Grup I  $\alpha$ -galaktozidazlar, melibiyoz, rafinoz, stakiyoz ve verbaskoz gibi oligosakkaritleri hidrolize eder; Grup II  $\alpha$ -galaktozidazlar, galaktomannan ve galaktoglukomannan gibi polisakkarit substratlar üzerinde etkilidir (Henrissat and Bairoch, 1996).

$\alpha$ -Galaktozidazlar amino asit dizilimi homolojisine göre de dört glikozil hidrolaz (GH) ailesine ayrılırlar: GH-4, GH-27, GH-36 ve GH-57.  $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi, GH-4 ailesinin sadece altı enzimi ve GH-57'nin iki enzimi için gösterilmiştir. Bilinen  $\alpha$ -galaktozidazların çoğunluğu GH-27 ve GH-36 ailelerine aittir (Henrissat and Bairoch, 1996). *Aspergillus niger* AglA (den Herder et al., 1992) ve AglB (de Vries et al., 1999) de dâhil olmak üzere ökaryot kökenli çoğu  $\alpha$ -galaktozidaz, GH-27 ailesine aittir. GH-36 ailesi, öncelikle *Bacillus stearothermophilus* NUB 3621 (Fridjonsson, 1999), *Thermus thermophilus* (Fridjonsson and Mattes, 2001) ve *Thermus sp.* T2 (Ishiguro et al., 2001) türünden elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazlar da dâhil olmak üzere bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazları içerir. Bununla birlikte, prokaryotik orijinli bazı  $\alpha$ -galaktozidazlar GH-27'ye dâhildir. Benzer şekilde bazı ökaryotik  $\alpha$ -galaktozidazlar da GH-36'ya dâhildirler. Örneğin, *Streptomyces coelicolor* A3' den bir  $\alpha$ -galaktozidaz, GH-27 ailesinin bir üyesidir, oysa *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidazı ise GH-36 ailesinin üyesidir (Anisha et al., 2009, 2011).

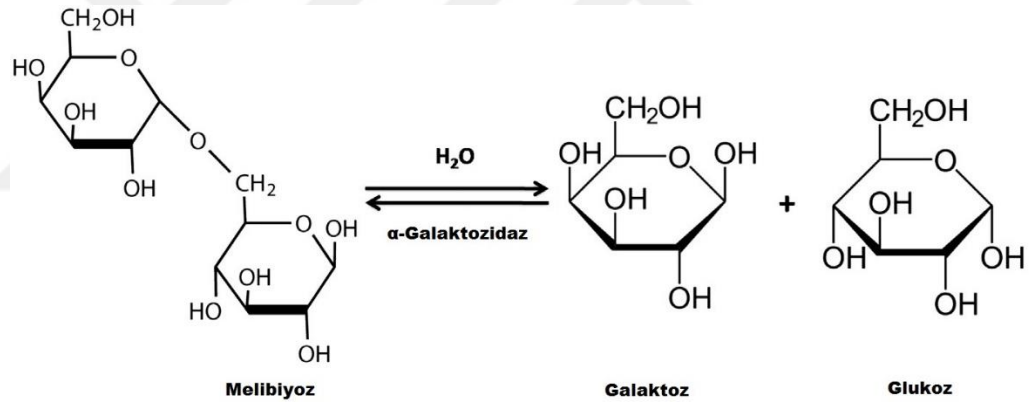
### 1.1.2 $\alpha$ -Galaktozidaz substratları

$\alpha$ -Galaktozidazlar için substratlar genellikle  $\alpha$ -galaktozidler olarak adlandırılırlar.  $\alpha$ -Galaktozidler, indirgeyici olmayan terminal bir  $\alpha$ -D-galaktozil artığı (ilk karbon veya anomerik karbon) içeren bir asetal bağı ile karbohidrat veya karbohidrat olmayan kısma bağlanan glikozitlerdir.  $\alpha$ -D-galaktozil grupları, yüksek bitkilerin her yerinde bulunur. Çeşitli oligosakkaridler, polisakaridler ile gliserol, inositol ve belirli lipidler gibi bazı şeker olmayan yapıları da içerirler. Bu tür galaktozidler, esas olarak  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için substrattır.  $\alpha$ -Galaktozidazın

rutin analizi için kullanılan en yaygın substrat, enzimatik hidroliz sonucu p-nitrofenolü serbest bırakan sentetik substrat olan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranoziddir (pNPG) ve p-nitrofenol daha sonra spektrofotometrik olarak tayin edilir (Anisha et al., 2011).  $\alpha$ -Galaktozidazın doğal substratları ise Şekil 1.1' de görüldüğü gibi oligosakkaritler ile galaktomannanlar ve galakto (gluko) mannanlar gibi polisakaritlerdir. Bir glukoz ve galaktoz disakkaridi olan melibiyoz üzerindeki etkisi nedeniyle  $\alpha$ -galaktozidaz, melibiyaz olarak da bilinir (Şekil 1.2).

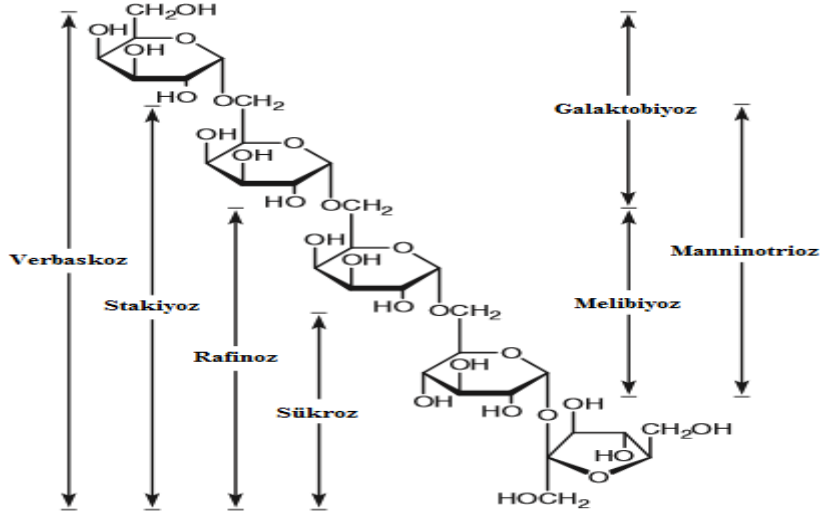
- **melibiyoz** ( $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glu),
- **rafinoz** ( $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glup(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fru),
- **stakiyoz** ( $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glup(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fru)
- **verbaskoz** ( $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glup(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fru)

Şekil 1.1  $\alpha$ -Galaktozidazın doğal substratları (Naumoff, 2004).

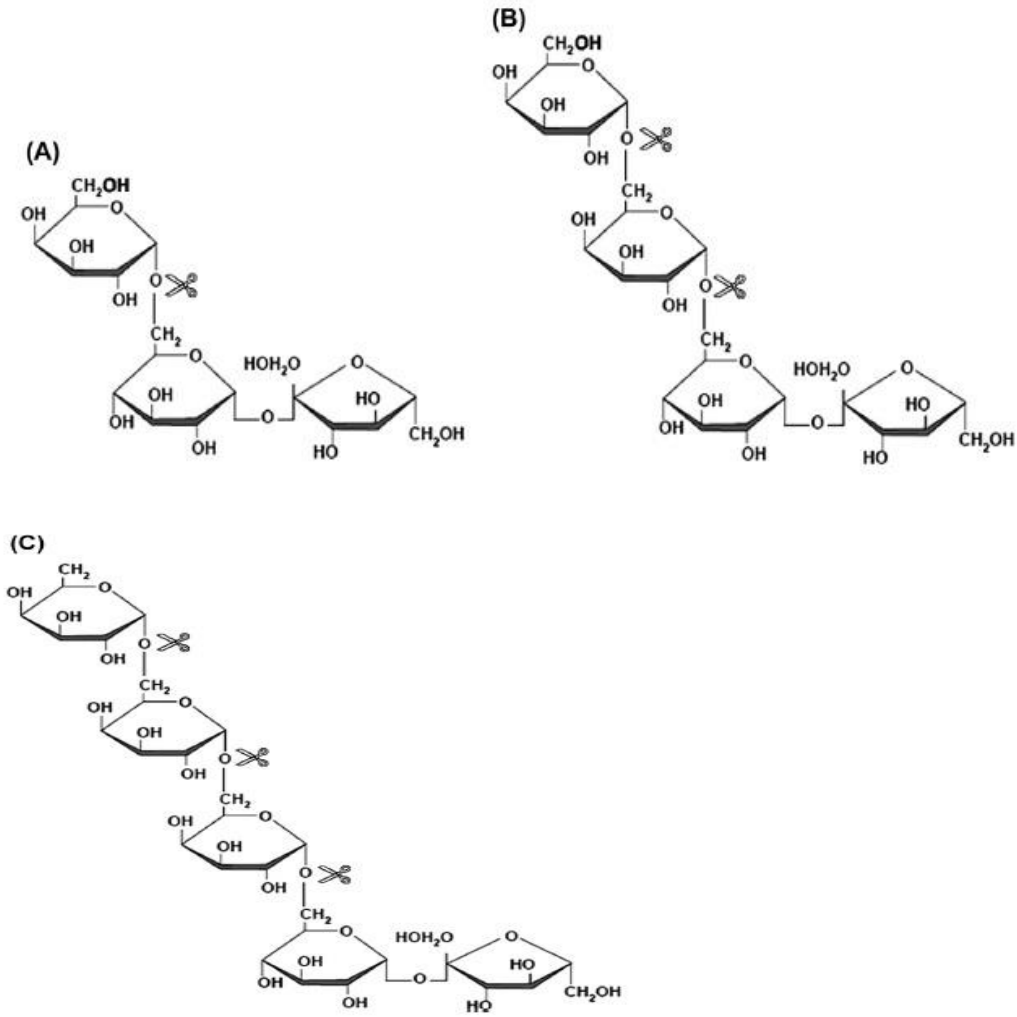


Şekil 1.2 Melibiyozun  $\alpha$ -galaktozidaz ile hidrolizi (Anisha, 2017).

Genellikle rafinoz ailesi oligosakkaritleri (RFO' lar) (Şekil 1.3) olarak anılan rafinoz, stakiyoz ve verbaskoz, *Leguminosae* familyasının üyelerinin tohumlarında, köklerinde, saplarında ve yapraklarında bol miktarda bulunurlar. Buldukları yerlerde hem rezerv karbohidratlardırlar hem de don ve kuraklığa karşı koruma amacına hizmet ederler. RFO' ların (rafinoz, stakiyoz ve verbaskoz) yapıları ve  $\alpha$ -galaktozidaz ile hidroliz yerleri Şekil 1.4' de gösterilmektedir (Anisha et al., 2010).

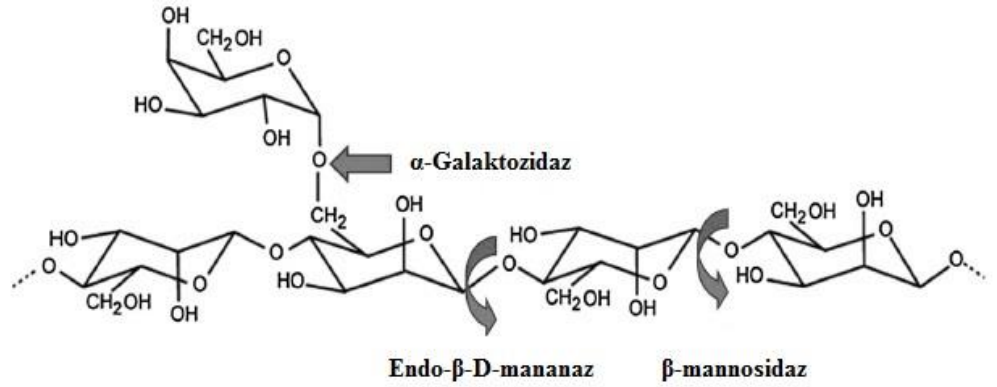


Şekil 1.3 Rafinoz ailesi şekerleri arasındaki yapısal ilişki (Mulimani and Dhananjay, 2007).

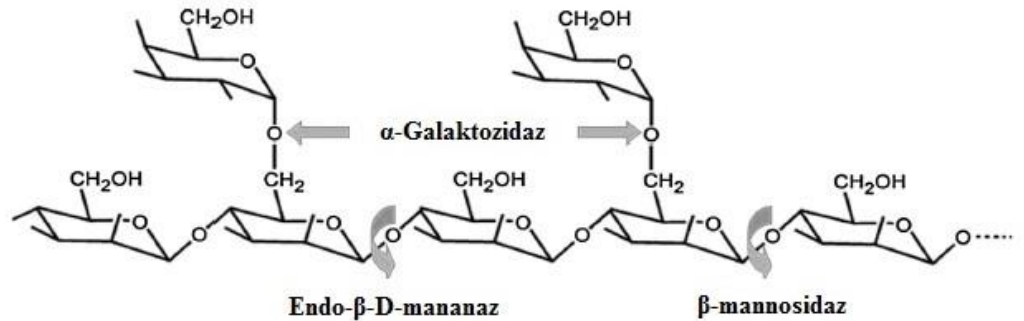


Şekil 1.4 Legümlü bitkilerdeki baskın gaz oluşumuna neden olan oligosakaritlerden rafinoz (A), stakiyoz (B) ve verbaskozun (C) yapıları (✂️ sembolü,  $\alpha$ -galaktozidazın hidrolitik etkisinin yerlerini işaret etmektedir) (Anisha, 2017).

$\alpha$ -Galaktozidaz için polimerik substratlar, *Cyamopsis tetragonoloba* (harnup ağacı) ve *Cyamopsis siliqua* (keçiboynuzu ağacı) gibi, *Leguminosae* familyasındaki üyelerde bol bulunan galaktomannanlar ve galakto (gluko) mannanlardır (Moreira and Filho, 2008). *C. tetragonoloba* yıllık bir bitkidir. Hindistan'ın kurak bölgelerinde hayvanlar için bir gıda ürünü olarak yetiştirilir ve tohum endospermünde guar sakızı adı verilen galaktomannan bulunur. Keçiboynuzu sakızı, keçiboynuzu ağacı (*C. siliqua*)'nın tohumlarının endosperminden ekstrakte edilen başka bir galaktomannan olup, Akdeniz ülkelerinde yetişir. Bu galaktomannanlar, bir  $\beta$ -1,4 bağlı D-mannopiranoz iskelet ve  $\alpha$ -1,6 bağlı D-galaktopiranoz yan grupları içermektedir. Bu polimerik galaktoglukomananların tam hidrolizi için üç farklı enzimin ( $\alpha$ -galaktozidaz,  $\beta$ -mannosidaz ve endo- $\beta$ -D-mananaz) birlikte etki etmesi gerekmektedir (Zeilinger et al., 1993; Wang et al., 2010; Malgas et al., 2015). Keçiboynuzu sakızının ve guar sakızının yapıları ve enzimatik hidroliz yerleri sırasıyla Şekil 1.5 ve 1.6' da gösterilmektedir.



Şekil 1.5 Keçi boynuzu sakızının yapısı ve hidrolizini katalizleyen enzimler (Anisha, 2017).



Şekil 1.6 Guar sakızının yapısı ve hidrolizini katalizleyen enzimler (Anisha, 2017).

### 1.1.3 $\alpha$ -Galaktozidaz kaynakları

$\alpha$ -Galaktozidazlar, doğada çeşitli bitkilerde (Bıçak Çelem and Önal, 2008; Çalcı et al., 2009; Bıçak Çelem et al., 2009; Şen et al., 2011; Bayraktar and Önal, 2013), hem omurgalı hem omurgasız hayvanlarda (Dean and Sweely 1979a; 1979b; 1979c; Alonso et al., 2005), bakteri, mantar ve mayalar gibi mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur. Şu anda sanayide kullanılan  $\alpha$ -galaktozidazların çoğu mikrobiyal kökenlidir. Filamentöz aktinomisetler de dâhil pek çok bakterinin  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi içerdiği bildirilmiştir. Bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidaz kaynaklarına *B. stearothermophilus* (Gote et al., 2006), *Lactobacillus acidophilus* (Fredslund, 2011), *Lactobacillus fermentum* (Garro et al., 1996), *Bifidobacterium adolescentis* (Leder et al., 1999), *Bifidobacterium breve* (Xiao et al., 2000) örnek verilebilir. *Streptomyces erythrus* (Elshafei et al., 2001), *S. coelicolor* A3 (2) (Kondoh et al., 2005), *Saccharopolyspora erythraea* (Post and Luebke, 2005), *Streptomyces griseoloalbus* (Anisha et al., 2008; Anisha et al., 2009, 2010) ve *Streptomyces sp.* S27 (Cao et al., 2010) gibi filamentöz aktinomisetler de  $\alpha$ -galaktozidaz kaynaklarıdır.  $\alpha$ -Galaktozidaz varlığı, yüksek termofilik eubakteri (*Rhodothermus marinus*) (Gomes et al., 2000), deniz bakterisi (*Pseudoalteromonas sp.*) (Bakunina et al., 1998) ve laktik asit bakterisinde (*Carnobacterium piscicola*) (Coombs and Brenchley, 2001) bildirilmiştir. Yüksek asiditeye sahip karasal volkanik havuzlarda yaşayan aerobik bir mikroorganizma olan *Sulfolobus solfataricus* P2' nin hipertermofilik arkeadan ender bir hücre içi  $\alpha$ -galaktozidaz izole edilmiştir ve bu farklı termostabil *Sulfolobus*  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi, arkeanın ilk üyesini temsil etmiştir. (Brouns et al., 2006). Mantarlardan *T. reesei* (Zeilinger et al., 1993), *Aspergillus oryzae* (Shankar and Mulimani, 2007), *Aspergillus fumigatus* (Gurkok et al., 2011), *Gibberella fujikuroi* (Mulimani and Ramlingam, 1995), *Mortierella vinacea* (Galas and Miszkiewicz, 1996), *Penicillium simplicissimum* (Luonteri et al., 1998), *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1999), *Thermomyces lanuginosus* (Puchart et al., 2000) ve *Rhizopus oligosporus* (Bei-Zhong et al., 2003)  $\alpha$ -galaktozidaz kaynaklarıdır. *Neosartorya fischeri* P1' den yüksek spesifik aktiviteli, geniş substrat spesifikliğı ve önemli hidroliz kabiliyeti olan bir termofilik  $\alpha$ -galaktozidazın üretildiğı literatürde bildirilmiştir (Wang et al., 2014). Fibröz mantarlar, ucuz tarımsal kalıntılar üzerine ekilebilir ve genellikle enzim maliyetini düşürmeye büyük katkıda bulunan kültür ortamına yüksek seviyede enzim salgılaması nedeniyle  $\alpha$ -galaktozidazların üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aleksieva et al., 2010; Awan et al., 2009). Genel olarak güvenli sayılan mantarlar, *Aspergillus* ve *Saccharomyces sp.*  $\alpha$ -galaktozidazları, gıda ve yem endüstrisinde ticari olarak kullanılmaktadır. Fungal kaynakların yanı sıra, bakterilerden elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazlar, özellikle Bifidobakteri ve laktik

asit bakterileri gibi probiyotik bakteriler önemli bir ilgi görmüştür; çünkü fermantasyon soya sütünde RFO' ların uzaklaştırılması için ya da  $\alpha$ -galaktozidaz üretiminde "canlı kültürler" olarak kullanılabilirler (Farzadi et al., 2011; Scalabrini et al., 1998). Ekstremofilik bakterilerden elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazlar, soya sütünün pastörize edilmesi gibi birçok uygulamada yüksek işleme sıcaklıklarına dayanabilen aşırı termostabil enzimlerin kaynağı olmuştur (Brouns et al., 2006; Fridjonsson et al., 1999).

#### 1.1.4 $\alpha$ -Galaktozidaz üretimi

Aerobik mikroorganizmalar için batık (submerged) fermantasyon,  $\alpha$ -galaktozidaz üretiminde bugün bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Elshafei et al., 2001; Anisha et al., 2008; Svastits-Dücsö et al., 2009). Çizelge 1.1' de batık fermantasyonda çeşitli karbon kaynakları üzerindeki çeşitli mikroorganizmaların  $\alpha$ -galaktozidaz verimleri listelenmektedir. Svastits-Dücsö ve ark. (2009),  $\alpha$ -galaktozidaz veriminin karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu sakızı veya guar sakızı ile optimize edilmiş ortam içinde üç ile beş kat arttığını bildirmişlerdir.

Çizelge 1.1 Batık fermantasyonda  $\alpha$ -galaktozidazın mikrobiyal üretimi (Anisha, 2017).

Mikrobiyal Türler	Katı Substrat/İndükleyici	$\alpha$ -Galaktozidaz Verimi
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 395.62/b	Locust bean gum/guar gum	6 U/mL
<i>Aspergillus foetidus</i> ZU-G1	Soybean meal + wheat bran	64.75 U/mL
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Galactose	35.68 U/mL
<i>Streptomyces griseoalbus</i>	Locust bean gum	50 U/mL
<i>T. lanuginosus</i> CBS 395.62/b	Sucrose	90 U/mL
<i>Monascus pilosus</i>	Galactose	13.9 U/mL
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	Locust bean gum + galactose	0.195 U/mL
<i>Bacillus</i> sp. JF <sub>2</sub> strain	Soy effluent stream	0.6 U/mL
<i>Bacillus</i> sp. JF strain	Wheat flour + soybean seed flour	27.4 U/mL
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Soybean meal	1.08 U/mL
<i>Streptomyces erythrus</i>	Galactose	9.94 U/mL
<i>Absidia griseola</i> var <i>iguchii</i> ATCC 20431	Lactose	23 U/mL

$\alpha$ -Galaktozidazların indüksiyonu için kullanılan karbon kaynağının, üretilen  $\alpha$ -galaktozidazın özellikleri üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. *Bacteroides ovatus*' un iki indüklenebilir  $\alpha$ -galaktozidaz ürettiği bildirilmiştir: Galaktomannanı hidrolize edebilen  $\alpha$ -galaktozidaz I, diğer galaktozidler tarafından değil de guar sakızı ile indüklenirken, guar sakızı üzerine etki yapmayan  $\alpha$ -galaktozidaz II sentezi galaktoz, melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz ile indüklenir (Gherardini et al., 1985). Benzer şekilde, *Aspergillus tamarii*, rafinoz karbon

kaynağı olarak kullanıldığında, iki adet misel  $\alpha$ -galaktozidaz ve galaktomannan varlığında ekildiğinde de bir salgı  $\alpha$ -galaktozidaz üretmektedir (Civas et al., 1984).  $\alpha$ -Galaktozidaz I' in üretimi, substrat iskeletini indirgeyen mannanaz aktivitesiyle koordineli olarak düzenlenmiş gibi görünmüştür. Başka bir galaktomannan olan keçiyoynuzu sakızının, *T. reesei* Rut C-30 (Zeilinger et al., 1993) ve *S. griseoalbus* (Anisha et al., 2008)' den  $\alpha$ -galaktozidaz üretimini indüklediği bildirilmiştir. *B. ovatus*  $\alpha$ -galaktozidaz I durumunda olduğu gibi, *B. stearothermophilus*' da aşılamadan 5 gün sonraya kadar  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi elde edilmemiş ve bu durum  $\alpha$ -galaktozidazın belirgin şekilde eksprese edilmeden galaktomannanın oligosakkaritlere depolimerleştirilmesinde, mannanazın gerektiğini düşündürmüştür (Talbot and Sygusch, 1990). *T. reesei*' de yapısal olarak düşük  $\alpha$ -galaktozidaz miktarı mevcuttur ve bu enzimin, keçiyoynuzu sakızından galaktozu serbest bıraktığı ve dolayısıyla indüklenebilir  $\alpha$ -galaktozidaz üretimini tetiklediği öne sürülmüştür (Zeilinger et al., 1993).  $\alpha$ -Galaktozidaz, melibiyoz, rafinoz veya laktoz takviyesi sonrasında belirgin aktivite artışları göstermemesine rağmen, termofilik fungal *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1998) ve *Streptococcus mutans* (Aduse-Opoku et al., 1991) tarafından yapısal olarak üretildiği de bildirilmiştir. Wong-Leung ve ark. (1993), *Monascus anka* M9 IAM için karbon kaynakları olarak şeker kamışı ve soya atıklarının ekstraktlarını kullanmıştır. Her ikisi de mantarın büyümesini desteklemiş, ancak şeker kamışı atığının  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için daha üstün olduğu gözlenmiştir.

Buğday kepeği veya buğday unu, pirinç kepeği, soya unu, soya fasulyesi küspesi veya soya küspesi, mısır, darı gibi ucuz tarım kalıntıları  $\alpha$ -galaktozidaz üretiminde kullanılır (Coombs and Brenchley, 2001; Kotwal et al., 1998; Jin et al., 2001). Rafinoz ve stakiyoz gibi birkaç galaktoz içeren oligosakkaritler, karbon kaynağı olarak  $\alpha$ -galaktozidazların indüksiyonu için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Jin et al., 2001; Gote et al., 2004). Bu düşük molekül ağırlıklı bileşikler *M. pilosus* (Wong et al., 1986) ve *Corynebacterium murisepticum* ATCC 21474 (Nadkarni et al., 1992) tarafından hücre içi enzimlerin ve aktinomiset *S. griseoalbus* (Anisha et al., 2010)' un hücre dışı  $\alpha$ -galaktozidazın üretilmesi için etkili indüktör olmuşlardır.

Foda ve ark. (1995), melibiyoz veya galaktoz ile takviye edilmiş Czapek-Dox agar ortamı kullanarak  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için 38 mantar suşunu taramışlardır. Sadece beş suş fark edilir miktarda enzim üretmiş ve bunlardan *P. janthinella*' nin, intra- ve extracellular  $\alpha$ -galaktozidazın oluşumu için üstünlüğü gözlenmiştir. Bu mantar ile yapılan daha ileri araştırmalarda, lupin tohumu tozunun ve soya



fasulyesinin  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için en iyi karbon kaynakları olduğu gösterilmiştir.

Birkaç örnekte, organizmanın ekimi ve fermantasyon ortamında  $\alpha$ -galaktozidaz üretilmesi için atık ve atık yan ürünleri kullanılmıştır (Wong-Leung et al., 1993). Geleneksel Çin soya fasulyesi ekmeği olan dofunun üretiminde oluşan atık suların, % 0,69' u protein ve % 0,96' sı total şekerdir ve bunun da % 0,3'ü rafinozdur. *Bacillus sp.* JF2' nin  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için mükemmel bir karbon ve azot kaynağı olduğu bildirilmiştir (Li et al., 1997). İpliksi mantar *Talaromyces flavus* CCF 2686' dan spesifik bir indüktör olan 6-deoksi-D-glukoz (kuinovoz) varlığında üretilen sıra dışı bir  $\alpha$ -galaktozidaz bildirilmiştir (Simerska et al., 2007).

Mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu, endüstriyel biyoteknolojide istenen ürünlerin üretimini arttırmak için yaygın olarak kullanılan bir başka yaklaşımdır. *S. griseoloalbus*' tan ilk kez  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için tam hücre immobilizasyonu rapor edilmiştir (Anisha and Prema, 2008). Katı Hal Fermantasyonu (Solid State Fermentation - SSF) ile  $\alpha$ -galaktozidaz üretimine ait çok sayıda rapor bulunmaktadır. Çizelge 1.2' de, SSF ile  $\alpha$ -galaktozidaz üretmek için rapor edilen çeşitli mikroorganizmalar listelenmiştir. *M. vinacea*' dan  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için koji yöntemi ile yapılan ilk makale 1969' da yayınlanmıştır (Suzuki et al., 1969). Buğday kepekli SSF' de  $\alpha$ -galaktozidaz ürettiği bildirilen organizmalar: *A. niger* (Srinivas et al., 1993), *A. oryzae* (Shankar and Mulimani, 2007; Annunziato et al., 1986; Shankar et al., 2006), *Aspergillus foetidus* (Liu et al., 2007), *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1998), *Penicillium sp.* (Wang et al., 2004), *T. lanuginosus* (Sonia et al., 2005), *Absidia sp.* (Li et al., 2006) ve *S. griseoloalbus* (Anisha et al., 2010).

**Çizelge 1.2** Katı hal fermantasyonunda (SSF)  $\alpha$ -galaktozidazın mikrobiyal üretimi (Anisha, 2017).

Mikrobiyal Türler	Katı Substrat/İndükleyici	$\alpha$ -Galaktozidaz Verimi <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 839	Wheat bran + guar flour + lactose	87.0 U/gds
<i>Aspergillus oryzae</i>	Soy flour (defatted)	10.4 U/gds
<i>A. oryzae</i>	Pigeon pea plant waste	5.12 U/gds
<i>A. oryzae</i>	Red gram plant waste	3.4 U/gds
<i>Aspergillus foetidus</i>	Wheat bran + soybean meal	2207.19 U/gds
<i>Humicola sp.</i>	Soy flour	44.6 U/gds
<i>Penicillium sp.</i>	Wheat bran + soy meal + beet pulp	185.2 U/gds
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (D <sub>2</sub> W <sub>3</sub> )	Sorghum straw	13.4 U/gds
<i>Absidia sp.</i> WL511	Soybean meal	117.8 U/gds
<i>Streptomyces griseoloalbus</i>	Soybean flour	197.2 U/gds

<sup>a</sup>Verilen değerler her çalışmada ilgili enzimler için optimum değer olmayabilir.

Soya unu ve soya fasulyesi, SSF' de  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için en ideal substratlar olarak düşünülmektedir (Shankar et al., 2006). Sonia ve ark. (2005), yerli termofilik *T. lanuginosus* (D2W3) tarafından üretilen  $\alpha$ -galaktozidaz da dâhil olmak üzere selüloz içermeyen ksilanaz ve ilgili hemiselülazların üretimi için bir süpürge darısı samanı temelli SSF prosesi bildirmişlerdir. Shankar ve Mulimani (2007), *A. oryzae*  $\alpha$ -galaktozidazı üretimi için en iyi katı substrat olarak buğday kepeği ile karıştırılmış güvercin bezelyesi atığını bildirmişlerdir.

#### **1.1.4.1 Endüstriyel üretim**

Birkaç  $\alpha$ -galaktozidaz preparatı SSF kullanılarak üretilse de, bu fermantasyon tekniği  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için endüstriyel olarak henüz kullanılmamıştır. Hem batık fermantasyon hem de SSF yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları vardır. Bağlı verim ve kolay uygulanabilirlik, fermantasyon yöntemini seçmede en önemli faktörlerdir (Anisha, 2017). Ticari olarak  $\alpha$ -galaktozidaz üretimi için tercih edilen mikroorganizmalar: *Circinella muscae*, *Absidia griseola*, *Absidia hyalospora* (Hokkaido Şeker Şirketi Ltd., Tokyo, Japonya) (Narita et al., 1976), *M. vinacea* (Suzuki et al., 1974) ve *B. stearothermophilus* (Monsanto Company, Louis, MO) (Delente et al., 1974). Ticari olarak ve analitik düzeyde *A. niger*' den (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Danimarka) ve *Escherichia coli*, yeşil kahve tohumu ve kavundan (Sigma) üretilmektedir (Knap et al., 2001).

Birçok  $\alpha$ -galaktozidaz preparatı ticari olarak Bean (GlaxoSmithKline, ABD), Gas-Zyme 3X, TerrainZyme, Jarro-Zymes Plus, EZ-Gest, Bean-Zyme (Mikeska Ürünleri LLC, Santa Barbara, CA), Validase AGS (Valley Research, Inc., ABD), Nutriteck  $\alpha$ -galaktozidaz (Ultra Bio-Logics, Inc., Rigaud, QC, Kanada Bölümü), Alpha-Gal (Novozymes) vb. ticari isimlerine sahiptirler ve diyet takviyeleri olarak insan diyetinde kullanılırlar. Rafinozu hidrolizleyen *M. vinaceae* suşu (Suzuki et al., 1972) ve *A. niger* (Novo Nordisk) (Knap et al., 2001) tarafından üretilen enzimler, pancar şekeri endüstrisinde, gıda ve yem işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *A. niger*' den elde edilen  $\alpha$ -galaktozidaz ( $\Omega$ -zyme ve Enzalase Group 2) (Therabiotics, Inc.) gibi birçok sindirim enzimi ürününde bir enzim takviyesidir. Herhangi bir  $\beta$ -galaktozidaz kontaminasyonu olmaksızın yeşil kahve çekirdeğinden yüksek oranda saflaştırılmış Glyko  $\alpha$ -(1-3,4,6)-galaktozidaz (Glyko, Inc.) da ticari olarak temin edilebilir (Anisha, 2017).

Fabry hastalığının tedavisinde enzim replasman tedavisi için kullanılabilen iki rekombinant glikoprotein ürünü vardır: Fabrazyme ve Replagal (Schiffmann et

al., 2001; Eng et al., 2001). Fabrazyme, Genzyme Corp. (Cambridge, MA) tarafından ve Replagal de Transkaryotic Therapies (TKT; Cambridge, MA) tarafından üretilir ve pazarlanır. Fabrazyme bir Çin hamsteri yumurtalık hücre dizisinde üretilirken, Replagal bir insan hücre dizisinde genetik mühendisliği teknolojisi ile üretilen insan  $\alpha$ -galaktozidaz A' dır. TKT' nin gen aktivasyon teknolojisi, genlerin klonlanmasını ve daha sonra insan olmayan hücre soylarına sokulmasını gerektirmeyen, terapötik proteinlerin büyük ölçekli üretimi için özel bir yaklaşımdır. Replagal, daha büyük miktarda kompleks karbohidrat içerirken, Fabrazyme ise sialillenmiş ve fosforillenmiş karbohidratın daha yüksek bir fraksiyonunu içerir (Lee et al., 2003). İki glikoprotein polipeptit sekansı aynı olduğu için, karbohidrat bileşimindeki bu farklılıklar yalnızca doku dağılımındaki farklılıklardan ve iki enzimin replasman tedavisindeki doz yanıtından sorumludur.

Genzyme Corp' un Fabry hastalığının enzim replasman tedavisinin merkezinde  $\alpha$ -galaktozidaz bulunmaktadır. Genzyme Corp, Fabrazyme' ın pazarlanması için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)' nin onayını almıştır. Genzyme, dünya çapında sadece 2000 ile 4000 kişinin bu hastalıktan muzdarip olduğunu tahmin etmektedir. Ancak bu kadar az sayıda hasta bile eğer rekabet yoksa ve ilaç fiyatı yüksekse, yüksek gelir anlamına gelebilir. Genzyme' in önde gelen ürünlerinden Cerezyme olarak adlandırılan ve Gaucher hastalığı adı verilen başka bir nadir kalıtsal bozukluğu tedavi eden ilaç, yaklaşık 500 milyon dolarlık satışa sahiptir. İlacı sadece 3000 hasta alıyor olmasına rağmen, her biri yılda yaklaşık 170.000 dolar ödemektedir. Ekim 2002' den itibaren, Fabrazyme, Avrupa Birliği' nin 15 ülkesi de dâhil olmak üzere 25 ülkede kullanım için onaylanmıştır. Replagal, Avrupa Birliği' nin 15 ülkesi dâhil olmak üzere 27 ülkede ticari kullanım için onaylanmıştır. TKT' nin raporlarına göre, Replagal' ın satışı 2004'te yaklaşık 77 milyon dolar ve tahmini mevcut pazar ABD pazarından daha yüksek olan Batı Avrupa' da 190 milyon dolardır (Anisha, 2017).

Large Scale Biology Corp. (LSBC; Vacaville, CA), dünya çapında Fabry nüfusunun tüm kesimlerinin potansiyel olarak ihtiyaçlarına cevap verebilecek biyolojik üretim yöntemlerini kullanarak, Enzagal markalı  $\alpha$ -galaktozidaz A'nın yeni bir ürününü geliştirmiştir. LSBC' nin Enzagal' ı, rakip ürünlere göre daha verimli ve daha fazla üretilebilir olmuştur, potansiyel olarak pazarını geniş ölçüde büyütebilir niteliktedir. LSBC ve işbirlikçileri tarafından yürütülen yaygın klinik öncesi ve imalat araştırma geliştirme ve düzenleyici değerlendirmeler, LSBC' nin yeni ürününün hızlı ve önemli rekabet avantajları ile ticarileştirilebileceğini göstermiştir (Anisha, 2017).

## 1.1.5 $\alpha$ -Galaktozidazların saflaştırılması ve karakterizasyonu

### 1.1.5.1 Moleküler kütle ve izoelektrik nokta

$\alpha$ -Galaktozidazlar, bitkisel kaynaklardan, birkaç tür mantardan, bakteriden ve mayadan saflaştırılmıştır. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmış  $\alpha$ -galaktozidazların özellikleri Çizelge 1.3' te listelenmiştir. Mantarlar tarafından üretilen  $\alpha$ -galaktozidazların çoğu, çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* suşlarından izole edilmiştir. *Aspergillus*  $\alpha$ -galaktozidazları oldukça değişken moleküler özelliklere sahip heterojen bir grup oluştururlar. *T. lanuginosus*' tan saflaştırılmış  $\alpha$ -galaktozidazın 53 kDa olduğu tahmin edilmektedir (Svastits-Dücsö et al., 2009). Fungal  $\alpha$ -galaktozidazların çoğu monomerik proteinlerdir ve ortalama molekül kütlesi 50 kDa' dır (Puchart et al., 2004; Shibuya et al., 1995; Shibuya et al., 1997). Bununla birlikte, *L. asidofilus*' tan saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidazın kristal yapısı analizi, dört eş monomerden oluştuğunu ortaya koymaktadır, her monomerde aktif bölgenin yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan üç monomerin sıkıca paketlenerek bir tetramer oluşturduğu gözlenmiştir (Fredslund et al., 2011).

Moleküler kütlelerde heterojeniteye rağmen, *Aspergillus*  $\alpha$ -galaktozidazları için belirlenen izoelektrik noktalar oldukça benzer bir aralıktadır (4.2 ile 4.8 arasında) (Ademark et al., 2001; Manzanares et al., 1998). *Penicillium*  $\alpha$ -galaktozidazları, Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile belirlendiği üzere 55-67 kDa arasındaki moleküler kütlelerle daha homojen bir grup oluştururlar; ancak izoelektrik noktaları 4.0 ve 7.0 arasında değişmektedir (Luonteri et al., 1998; Shibuya et al., 1995). *Monascus pilosus*' un, jel filtrasyonla, 150 kDa' lık moleküler kütleyle sahip büyük bir  $\alpha$ -galaktozidaz ürettiği gözlenmiştir (Wong et al., 1986).

**Çizelge 1.3** Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin karakteristikleri (Anisha, 2017).

Mikroorganizma	$M_r$ (kDa)	pI	pH <sub>opt</sub>	T <sub>opt</sub> (°C)	Aktif Substratlar	pNPG için $K_m$ (mM)	$V_{max}$
<i>Rhizopus</i> sp. F78 ACCC30795	210	n.a.	4.8	50	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose	2.9	246.1 $\mu$ mol/min/mg
<i>Talaromyces flavus</i>	63	n.a.	3.5–4.5	50	pNPG, raffinose, stachyose, galactomannans	0.54	0.21 mM/min
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 395.62/b	93	3.9	5–5.5	65	pNPG, raffinose, stachyose	1.13	2498 $\mu$ mol/min/mg
<i>T. lanuginosus</i>	57	5.2	4.5–5.0	65–70	pNPG, melibiose, raffinose	0.5	52.4 U/mg
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	50	5.2	4	60	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, locust bean gum	1.2	30.1 U/mg
<i>Mortierella vinacea</i>	240	5.4	3–4.0	60	Oligosaccharide chains	n.a.	n.a.
$\alpha$ -Galactosidase I	60	8.5	3–4.0	60	Galactomannooligosaccharides, galactomannans	n.a.	n.a.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	54.7		4.5	55	pNPG, melibiose	0.38	0.16 $\mu$ mol/min/mg
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 46890	350	4.15	4.5	60	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose	1.4	18000 nkat/mg
$\alpha$ -Gal I							
$\alpha$ -Gal II	117	4.5	4.5	60	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, galactomannooligosaccharides	0.22	3600 nkat/mg
$\alpha$ -Gal III	117	4.7	4.5	60	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose	0.27	3000 nkat/mg
$\alpha$ -Gal IV	117	4.8	4.5	60	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, galactomannooligosaccharides	0.24	3200 nkat/mg
<i>M. vinacea</i>	n.a.	n.a.	4–6	n.a.	pNPG, oNPG, methyl- $\alpha$ -D-galactoside, melibiose, raffinose, stachyose, 4-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-D-galactose, 6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-O- $\beta$ -D- galactopyranosyl-1-glycerol, methyl- $\beta$ -L-arabinoside	0.43	143.5 $\mu$ mol/min/mg
<i>Penicillium simplicissimum</i> AGLI	61	5.2	3–4.5	40	pNPG, raffinose family oligosaccharides, polymeric galacto(gluco)mannans	n.a.	n.a.
AGLII	84	4.4	4–5	60	pNPG, raffinose family oligosaccharides	0.75	26600 nkat/mg
AGLIII	61	7.0	3–4.5	45	pNPG, raffinose family oligosaccharides, polymeric galacto(gluco)mannans		
<i>Penicillium purpurogenum</i>	67	4.1	4.5	55	pNPG, galactomannooligosaccharides	n.a.	n.a.
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	210	3.5	5	75	pNPG	0.31	630 $\mu$ mol/min/mg
<i>Monascus pilosus</i>	150	n.a.	4.5–5	55	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose	0.8	39 $\mu$ mol/min/mg
<i>Ganoderma lucidum</i>	249	n.a.	6	70	Melibiose, raffinose, stachyose	0.4	n.a.
<i>Bacillus stearothersophilus</i>	247	n.a.	7–7.5	60	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, galactomannans	0.25	195 U/mg
<i>B. stearothersophilus</i> NCIM 5146	165.9	4.9	6.5–7	65	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, galactomannans (limited activity)	0.5	833 U/mg
<i>Lactobacillus plantarum</i>	194.5	n.a.	5.8	45	pNPG	0.079	2838 $\mu$ mol/min/mg
<i>Thermotoga neopolitana</i> 5068	61	n.a.	7.5	100–105	Polymeric galactomannans	n.a.	n.a.
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	344	n.a.	5.5	55	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, $\alpha$ -1,3-D-galactobiose, $\alpha$ -1,4-D- galactobiose, gal- $\alpha$ -1,3-gal- $\beta$ -1,4-gal, gal- $\alpha$ -1,3-gal- $\beta$ -1,4-gal- $\alpha$ -1,3-gal	0.957	n.a.
<i>Bifidobacterium breve</i>	160	n.a.	5.5–6.5	37	Melibiose, raffinose, stachyose	n.a.	n.a.
<i>Bacteroides fragilis</i>	125	6.2	5.5	n.a.	pNPG	n.a.	n.a.
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	45	n.a.	6.1	65	Melibiose, raffinose, stachyose	0.65	31 $\mu$ mol/min/mg
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	58	n.a.	7	40	pNPG, raffinose, stachyose	n.a.	n.a.
<i>Streptomyces griseoalbus</i>							
$\alpha$ -Gal I	72	4.41	5.0	65	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose, polymeric galactomannan	0.79	693.4 $\mu$ mol/min/mg
$\alpha$ -Gal II	57	5.6	6.5	50	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose	1.0	297.3 $\mu$ mol/min/mg
$\alpha$ -Gal III	35	6.13	5.5	55	pNPG, melibiose, raffinose, stachyose	1.3	195.3 $\mu$ mol/min/mg

Çeşitli bitki tohumlarından elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazlar Çizelge 1.4' de verilmiştir. Bunlara ek olarak, mercimek tohumlarından (*Lens culinaris*) saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin jel filtrasyonu sonrasında  $\alpha$ -galaktozidaz I ve  $\alpha$ -galaktozidaz II olmak üzere enzimin iki formu gözlenmiştir. Bunların molekül kütleleri sırasıyla 160 kDa ve 40 kDa olarak bulunmuştur.  $\alpha$ -Galaktozidaz I' in SDS-PAGE analizi sonrası molekül kütlelerinin 40 kDa olduğu ve bu enzimin 4 homojen alt birimden oluştuğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu enzimin izoelektrik noktasının da 8.0 olduğu rapor edilmiştir (Dey et al., 1983). *Pycnopus cinnabarinus*  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE ve jel filtrasyonu sonrası molekül kütlesi sırasıyla 52 kDa ve 210 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar enzimin 4 homojen alt birimden oluştuğunu göstermiştir (Ohtakara et al., 1984). Kavundan saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidazın Native-PAGE sonrası molekül kütlesi bazik form I ve II için sırasıyla 84 ve 102 kDa, SDS-PAGE sonrası ise 79 ve 92 kDa olarak bulunmuştur. Bu bazik  $\alpha$ -galaktozidaz formlarının izoelektrik noktaları ise form I için 5.0 ve form II için 4.7 olarak bulunmuştur (Gao and Shaffer, 1999). Ay çekirdeğinden saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin SDS-PAGE ve jel filtrasyonu sonrası molekül kütlesi 40,3 kDa olarak bulunmuştur (Kim et al., 2003).  $\alpha$ -Galaktozidaz, taze ölümsüzlük mantarı (*Ganoderma lucidu*) gövdesinden saflaştırılmış ve enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 56 kDa ve jel filtrasyon kolon kromatografisi ile de yaklaşık 249 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidazın, her biri 56 kDa' lık moleküler kütleyle sahip 4 alt-birimden oluştuğu rapor edilmiştir (Sripuan et al., 2003). Çimlenen *Tachigali multijuga* Benth. tohumlarından saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidazın SDS-PAGE ve jel filtrasyonu sonrası monomerik yapıda olduğu belirtilmiş ve molekül kütlesi sırasıyla 38 kDa ve 34 kDa olarak bulunmuştur (Fialho et al., 2008). Beyaz nohut (*Cicer arietinum*)  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE ve MALDI-TOF analizi sonrası 45 kDa' lık bir molekül kütleline sahip monomerik bir enzim olduğu görülmüştür. Enzimin izoelektrik noktası 5,6 olarak bulunmuştur (Singh and Kayastha, 2012a). *Phaseolus coccineus* tohumlarından saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin SDS-PAGE analizi sonrası moleküler kütlesi 43 kDa olarak bulunmuştur (Du et al., 2013).

**Çizelge 1.4** Bazı bitki tohumlarındaki  $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri (Dey, 1984).

$\alpha$ -Galaktozidaz Kaynağı	Moleküler Kütle (Dalton)	Ayırma Yöntemi
<i>Cajanus indicus</i>	87,000	Jel Filtrasyon
<i>Coffea sp.</i>	26,000	Jel Filtrasyon
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	25,000	DEAE-Selüloz
<i>Glycine max</i>		
I	130,000-150,000	DEAE-Selüloz
II	40,000	
III	40,000	
IV	25,000	
<i>Laburnum alpinum</i>		
I	150,000	Jel Filtrasyon
II	30,000	
<i>Lens culinaris</i>		
I	160,000	Jel Filtrasyon ve SDS-PAGE
II	40,000	
<i>Phaseolus limensis</i>		
I	180,000	Jel Filtrasyon
II	39,000	
<i>Spartium junceum</i>		
I	160,000	Jel Filtrasyon
II	30,000	
<i>Ulex europaeus</i>		
I	160,000	Jel Filtrasyon
II	42,000	
<i>Vicia faba</i>		
I	160,000	Jel Filtrasyon ve SDS-PAGE
II <sup>1</sup>	43,000	
II <sup>2</sup>	41,000	
<i>Vigna radiata</i>		
I	160,000	Jel Filtrasyon
II	40,000	

Bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazlar aynı zamanda daha kompleks bir yapıya sahip heterojen enzim grubudur ve molekül kütleleri 45 ile 400 kDa arasında değişir (Ishiguro et al., 2001; Halstead et al., 2000). *C. murisepticum*' dan elde edilen  $\alpha$ -galaktozidaz, 320 kDa' luk bir homotetramerdir (Nadkarni et al., 1992).  $\alpha$ -Galaktozidazın en kompleks yapısı, *Thermus sp.* tür T2' de, 400 kDa' luk molekül kütlelerine sahip olduğu ve çözeltide oktamirik formda mevcut bulunmuştur

(Ishiguro et al., 2001). Bununla birlikte, *Thermotoga neapolitana*'daki  $\alpha$ -galaktozidaz, 61 kDa'lık bir monomer olarak aktiftir (King et al., 1998). *B. stearothermophilus* NCIM 5146' dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz moleküler kütlesi 165.9 kDa ve pI 4.9 olan dimerik bir proteindir (Gote et al., 2006). *S. coelicolor* A3 (2) 36 ailesinin  $\alpha$ -galaktozidazı moleküler kütlesi 58 kDa olan monomerik bir proteindir (Kondoh et al., 2005). *Streptomyces sp.* S27' den saflaştırılmış rekombinant  $\alpha$ -galaktozidaz SDS-PAGE' de yaklaşık 82 kDa'lık tek bir protein bandı göstermiştir; Nondenatüre gradient PAGE de yaklaşık 220, 320 ve 480 kDa'lık üç bant gözlenmiş ve bu da trimer, tetramer veya heksamer doğal yapıyı işaret etmektedir (Cao et al., 2010). *Pichia pastoris*'teki saflaştırılmış rekombinant *Rhizomucor miehei*  $\alpha$ -galaktozidaz (RmgalB), bir tetramerdir ve SDS-PAGE' de 83.1 kDa'lık moleküler kütleyle karşılık gelen tek bir bant göstermiştir (Chen et al., 2015).

Alt birim molekül kütlesi temelinde, bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazlar iki gruba ayrılmıştır (Ishiguro et al., 2001). Birinci grup  $\alpha$ -galaktozidazlar *S. mutans* (Aduse-Opoku et al., 1991), *B. stearothermophilus* (Fridjonsson et al., 1999), *E. coli* Raf A (Aslanidis et al., 1989), *B. breve* (Xiao et al., 2000) ve *Pseudomonas fluorescens* (Halstead et al., 2000)'tan oluşurlar ve bunların molekül kütlesi 80 kDa' dan daha fazladır. *Thermus brockianus* (Fridjonsson et al., 1999), *Thermotoga maritima* (Liebl et al., 1998) ve *T. neapolitana* (King et al., 1998)'dan elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazlar 53-65 kDa aralığında moleküler kütleyle sahiptirler ve bunlar ikinci gruba dahildirler. Bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazların izoelektrik noktaları ise 4.5 ile 6.9 aralığındadır (Gote et al., 2006; Berg et al., 1980).

### **1.1.5.2 $\alpha$ -Galaktozidazların multimoleküler formları**

$\alpha$ -Galaktozidazın multimoleküler formlarının altında yatan biyokimyasal neden, proteolitik bölünme veya proteinlerin diferansiyel glikozilasyonu gibi posttranslasyonel modifikasyonlar olabilir. *T. lanuginosus*  $\alpha$ -galaktozidazı, proteinin diferansiyel glikozilasyonuna bağlı olarak mikro heterojenite sergilemektedir (Puchart et al., 2000). Bazen izoenzimler iki ayrı genin ürünüdür. *B. stearothermophilus* KVE39' da, iki farklı gen, agaA ve agaB ile düzenlenen iki  $\alpha$ -galaktozidaz izoenzimi tespit edilmiştir (Ganter et al., 1988). İzoenzimlerin ekspresyonu, mikroorganizmanın büyümesi için ortamda bulunan karbon ve azot kaynağının bir fonksiyonu olarak belirgin şekilde değişebilir (Naessens and Vandamme, 2003). *S. griseoalbus*  $\alpha$ -galaktozidazların üç formunu üretir:  $\alpha$ -Gal I,  $\alpha$ -Gal II ve  $\alpha$ -Gal III.  $\alpha$ -Gal I hem galaktooligosakkaritler hem de polimerik



galaktomannanlar üzerinde etkinken,  $\alpha$ -Gal II ve  $\alpha$ -Gal III, sadece galaktooligosakkaritler üzerinde etkindir (Anisha et al., 2009). Biri galaktooligosakkaritler için ve diğeri de galaktomannanlar için spesifik olan  $\alpha$ -galaktozidazların iki formu, *M. vinacea* (Suzuki et al., 1970), *A. tamaris* (Civas et al., 1984) ve *B. ovatus* (Gherardini et al., 1985)' den saflaştırılmıştır.  $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi sergileyen fakat molekül kütlesi ve pI' da farklılık gösteren çoklu proteinler, *A. niger*' den rapor edilmiştir (Ademark et al., 2001; Manzanares et al., 1998).

Bitkisel  $\alpha$ -galaktozidazın ilk multimoleküler formlarının varlığı Petek ve Dong (1961) tarafından bildirilmiştir. *Coffea* sp. ve *Plantago ovata* tohumlarından enzimin iki formu kolon kromatografisi ile ayrılmıştır. Dey ve Pridham (1969), *Vicia faba* tohumlarında moleküler ağırlıkları bakımından farklı iki  $\alpha$ -galaktozidazı (I ve II) jel filtrasyonu ile ayırmışlardır. *V. faba*' dan  $\alpha$ -galaktozidaz II, CM-selüloz kolon kromatografisi kullanılarak yaklaşık olarak benzer molekül ağırlığa sahip iki aktif fraksiyon II<sup>1</sup> ve II<sup>2</sup> elde edilmiştir (Dey et al., 1971). Bununla birlikte, enzim I, bu uygulama ile çözülememiştir. Suzuki ve ark. (1970), DEAE-Sephadex kolon kullanarak, *M. vinacea*' da üç  $\alpha$ -galaktozidaz formu saptamış ve bileşenlerden birini kristallendirmişlerdir. Buna rağmen, enzimin üç formunun benzer molekül ağırlıklarına sahip olup olmadığı bilinmemektedir.  $\alpha$ -Galaktozidazın multimoleküler formları çok benzer özelliklere sahip olabilir ve bu nedenle çözülmesi zor olabilir. Örneğin *A. niger*' den elde edilen enzim, Sephadex G-200, Bio-Gel P-200, DEAE-Sephadex ve DEAE selüloz kolonlarda kromatografi ile değerlendirildiğinde homojen; ancak CM-selüloz kolondan geçirildiğinde üç aktif form haline gelmiştir (Dey and Pridham, 1972).

Bir organizmanın biyolojik ekonomisi göz önüne alındığında, bir enzimin multimoleküler formlarının üretimi, aynı tepkimeyi katalize ettiği için boşa gider. Bu durum, çok formlu enzimlerin kendilerini üreten organizmaya sunduğu spesifik avantajlarla dengelenir. Farklı kinetik parametreler, seçicilikler, düzenleyici özellikler ve stabiliteye sahip çok formlu enzimler değişen çevre koşulları, besin maddelerinin kullanılabilirliği ve metabolik ihtiyaçla başa çıkabilmek için organizmaya esneklik ve uyarlanabilirlik kazandırır (Anisha, 2017).

### **1.1.5.3 Glikoprotein doğası**

Fungal  $\alpha$ -galaktozidazların çoğu glikozillenmiş proteinlerdir (Ademark et al., 2001; Kotwal et al., 1999; Manzanares et al., 1998). Bununla birlikte, *Rhizopus* sp.'

den saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz glikozillenmemiş proteindir (Cao et al., 2007). Genel olarak bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazlar glikozillenmemiştir (Gote et al., 2006).  $\alpha$ -Galaktozidazların karbohidrat içeriği sadece birkaç örnekte tahmin edilmiştir; bileşimi ve yapısal analizi hakkında çok az çalışma yapılmıştır. *M. vinacea*' den elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazın, % 10.8 nötr şeker ve % 2.7 D-glukozamin içerdiği belirlenmiştir (Suzuki et al., 1970). *Cephalosporium acremonium*  $\alpha$ -galaktozidazı yaklaşık % 27 nötr şeker içerir; karbohidrat bileşimleri, 2: 7: 3: 11 molar oranlarda N-asetilglukozamin, mannoz, galaktoz ve sialik asittir (Zaprometova et al., 1990). *T. lanuginosus*  $\alpha$ -galaktozidazı % 5.3 karbohidrat (% 56 D-mannoz, % 8 D-galaktoz, % 36 D-glukozamin ve < % 1 D-glukoz) içerir. Karbohidratların, enzim yapısını, aktivitesini ve stabilitesini dengede tutmada önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Karbohidrat kısımları, enzimler üzerindeki proteolitik saldırıya karşı direnç de kazandırır (Rezessy-Szabo et al., 2007).

Bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlardan *M. vinacea*' dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin % 2,7 D-glukozamin ve % 10,8 heksoz içeren bir glikoprotein olduğu bildirilmiştir (Suzuki et al., 1970). Bakla (*V. faba*)' dan saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin ksiloz, mannoz, glukoz ve glukozamin artıklarını içeren glikoprotein olduğu gösterilmiştir (Dey et al., 1982). Mercimek tohumlarından (*L. culinaris*) saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin % 0,94 glukozamin ve % 2,9 mannozdan oluşan glikoprotein yapıda bir enzim olduğu bildirilmiştir (Dey et al., 1983). Beyaz nohut (*C. arietinum*)  $\alpha$ -galaktozidazının karbohidrat içeriği yaklaşık % 8-10 arasında bulunmuş ve Schiff reaktifi ile işaretlenen Native-PAGE sonrası enzimin bir glikoprotein olduğunu doğrulamıştır (Singh and Kayastha, 2012a).

#### **1.1.5.4 pH ve sıcaklığın etkileri**

Genellikle, bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazların pH 6.0-7.5 aralığında bir optimum pH değeri varken (Gherardini et al., 1985), mantar ve maya  $\alpha$ -galaktozidazlarının pH optimumu 3.5-5.0 aralığındadır (Ulezlo and Zaprometova, 1982). Saflaştırılmış *S. coelicolor* 36 ailesi  $\alpha$ -galaktozidazı, pH 7.0' da en aktiftir ve 1 saatten fazla bir süre pH 7.0 ile 9.5 arasında aktivitesi stabildir (Kondoh et al., 2005). Benzer şekilde, *Streptomyces sp.* S27' den saflaştırılmış rekombinant  $\alpha$ -galaktozidaz, pH 7.4' te optimal olarak aktiftir (Cao et al., 2010).  $\alpha$ -Galaktozidaz için en asidik pH optimum pH 3.0-4.5' de *P. simplicissimum* (Luonteri et al., 1998), *M. vinacea* (Shibuya et al., 1997) ve *A. niger* (Ademark et al., 2001) gibi mantarlarda gözlenmiştir. *N. fischeri* için optimal pH 4.5' dur (Wang et al., 2014). *T.*

*lanuginosus*  $\alpha$ -galaktozidazının, pH 4.6-4.8' de optimum düzeyde aktif olduğu ve pH 4.0-7.0 aralığında kararlı olduğu rapor edilmiştir (Svastits-Dücsö et al., 2009). Yüksek spesifik aktiviteye sahip rekombinant *R. miehei*  $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH değeri, pH 5.5' dir ve pH 5.5-9.5 arasında stabildir (Chen et al., 2015). *L. fermentumdan*  $\alpha$ -galaktozidazının, pH optimumunda bir kayma gözlenmiştir (Schuler, 1985). Benzer şekilde, *Penicillium duponti*' nin  $\alpha$ -galaktozidazları, substrat bağımlı farklı pH optimumu göstermektedir (Arnaud et al., 1976).

Bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlardan biri olan *P. cinnabarinus*  $\alpha$ -galaktozidazını optimum pH değeri 5.0 olarak bulunmuş ve enzimin geniş bir pH aralığında (pH 3.0-9.0) kararlı olduğu bildirilmiştir (Ohtakara et al., 1984). Ölümsüzlük mantarı (*G. lucidu*) gövdesinden saflaştırdıkları  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum pH değeri pH 6.0' dır ve enzim pH 5.0 – 7.0 arasında kararlıdır (Sripuan et al., 2003). Çimlenen *T. multijuga* Benth.  $\alpha$ -galaktozidazı için pH 5.0' in optimum olduğu ve pH 4.0-6.0 arasında başlangıç aktivitesinin % 70' inden fazlasını koruduğu bildirilmiştir (Fialho et al., 2008). *A. terreus* hücrelerinin ürettiği üç hücre dışı  $\alpha$ -galaktozidazlardan (E1, E2 ve E3) E1 ve E2  $\alpha$ -galaktozidazları, pH 5.0' te maksimum aktivite sergilerken, E3  $\alpha$ -galaktozidazının pH 5.5' te daha aktif olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, E1 ve E2 enzimlerinin pH 4-7' de 6 saat boyunca kararlı oldukları belirtilmiştir (Ferreira et al., 2011). Singh ve Kayashta (2012a), beyaz nohut (*C. arietinum*)  $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH' sın 4.5 olarak bulmuşlar ve enzimin 4.0-6.0 arasında kararlı olduğunu gözlemişlerdir. *P. coccineus*  $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH değeri 3.0 olarak bulunmuş ve enzimin pH 2.0-4.0 arasında oldukça kararlı olduğu bildirilmiştir (Du et al., 2013).

Kaynağına bağlı olarak,  $\alpha$ -galaktozidazlar sıcaklık optimumlarına ve termal stabilitelerine göre farklılık gösterirler. Diğer endüstriyel uygulamalarda da olduğu gibi şeker üretim sürecinde kullanılan yüksek sıcaklıklar nedeniyle  $\alpha$ -galaktozidazların yüksek sıcaklıktaki stabilite ve aktivitesi önemli özelliklerindedir (Fridjonsson and Mattes, 2001). *Penicillium purpurogenum*  $\alpha$ -galaktozidazı sadece 40°C' nin altındaki ısıya dayanıklıdır (Shibuya et al., 1995). *M. vinacea* (Shibuya et al., 1997) ve *M. pilosus* (Wong et al., 1986)  $\alpha$ -galaktozidazları 55°C' nin altında stabildir. *Streptomyces sp.* S27' den saflaştırılmış rekombinant  $\alpha$ -galaktozidaz, optimal olarak 35°C' de aktiftir (Cao et al., 2010). *R. miehei*' nin rekombinant  $\alpha$ -galaktozidazının optimum sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiştir ve aynı zamanda 55°C' ye kadar stabildir (Chen et al., 2015). Bununla birlikte, termostabil  $\alpha$ -galaktozidazlar çok çeşitli mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiştir. *T. neapolitana* 5068 (TN5068)  $\alpha$ -galaktozidazı 100-103°C' lik optimum

sıcaklıkta, 90°C' de 2 saat ve 100°C' de 3 dakika yarılanma ömrü olan şimdiye kadar izole edilen en termoaktif  $\alpha$ -galaktozidazdır (Duffaud et al., 1997). Hipertermofilik arkea *S. solfataricus*' tan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazın optimum sıcaklığının 90°C olduğu gözlenmiştir (Brouns et al., 2006). *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*  $\alpha$ -galaktozidazı 70°C' de 36 saat süreyle stabil kalmıştır (King et al., 2002).  $\alpha$ -Galaktozidazın trimerik ve tetramerik formları, monomerik ve dimerik formlarla karşılaştırıldığında yüksek termal kararlılığa sahiptir (Gote et al., 2006). Termofilik mantar *T. lanuginosus*' tan saflaştırılmış  $\alpha$ -galaktozidaz, 60-66°C sıcaklık aralığında maksimum katalitik aktivite gösterir ve 70°C' de stabildir (Svastits-Dücsö et al., 2009). Benzer şekilde, *N. fischeri* kaynaklı doğal ve rekombinant  $\alpha$ -galaktozidazın 60-70°C' de optimum sıcaklığa sahip olduğu bildirilmektedir (Wang et al., 2014). *P. cinnabarinus*' tan saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklık değeri 75°C olarak bulunmuş ve bu sıcaklıkta enzimin kararlı olduğu bildirilmiştir (Ohtakara et al., 1984). Sripuan ve ark. (2003), ölümsüzlük mantarı (*G. lucidu*) gövdesinden saflaştırdıkları  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 70°C olduğunu bildirmişlerdir. Enzim 70°C' de 30 dakika boyunca tamamen kararlılık göstererek aktivitesini korumuş ve 80°C' de 30 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin hala % 30' unu koruyabilmiştir. Çimlenen *T. multijuga* Benth.  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 50°C olduğu ve 12 saat 40°C yada 200 saat 35°C de inkübe edildikten sonra bile başlangıç aktivitesinin % 75' ini koruduğu gözlenmiştir (Fialho et al., 2008). *A. terreus*  $\alpha$ -galaktozidazlarının (E1, E2 ve E3) maksimum aktivite gösterdikleri optimum sıcaklıklar sırasıyla 60, 55 ve 50°C olarak bulunmuştur. E2  $\alpha$ -galaktozidazı, 50°C' de 70 saat boyunca başlangıç aktivitesinin % 90' ını korumuştur (Ferreira et al., 2011). Beyaz nohut (*C. arietinum*)  $\alpha$ -galaktozidazı için optimum sıcaklığın 50°C olduğu gözlenmiş ve bu sıcaklıkta enzimin oldukça kararlı olduğu rapor edilmiştir. 50°C' nin üzerine çıkıldıkça artan inkübasyon zamanına bağlı aktivitede kayıplar gözlenmiştir (Singh and Kayastha, 2012a). Du ve ark. (2013), *P. coccineus*' den izole ettikleri  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklık değerini 70°C olarak bulmuşlar ve bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde hızlı bir düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Enzimin 60°C' de 30 dakika inkübasyon işleminden sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 56' sını kaybettiğini ve 70°C' de 30 dakika süreyle tamamen aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir. Guar fasulyesi (*C. tetragonolobus*)  $\alpha$ -galaktozidazının optimum sıcaklığının 50°C olduğu ve enzimin 24 saatten fazla bir süre 37°C' de ve 30 dakika 50°C' de kararlı olduğu bildirilmiştir (Malgas et al., 2015).

### 1.1.5.5 Metal iyonlarının ve şekerlerin etkileri

$\alpha$ -Galaktozidazların aktivitesini etkileyen geniş bir kimyasal yelpazesinin olduğu bilinmektedir.  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi iki değerlikli metal katyonlarının  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi üzerinde belirgin inhibisyon etkileri olduğu bulunmuştur (Gote et al., 2006; Fridjonsson et al., 1999). Bu durum aktif bölgedeki histidinin karboksil, amino ve imidazol gruplarının tiyol grupları ile reaksiyonunu işaret etmektedir (Dey and Pridham, 1972). Bununla birlikte,  $Cu^{+2}$  (Sripuan et al., 2003),  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $K^{+}$  (Elshafei et al., 1993; Scigelova and Crout, 2000; Rezessy-Szabo et al., 2007) için de aktive edici bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. Çoğu diğer metal katyonların  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi üzerinde hiç veya az etkisi olduğu bulunmuştur (Gote et al., 2006; Kondoh et al., 2005; Rezessy-Szabo et al., 2007; Sripuan et al., 2003). *T. lanuginosus*' tan saflaştırılmış  $\alpha$ -galaktozidaz,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $K^{+}$  iyonlarıyla önemli ölçüde aktive olurken,  $Ca^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Hg^{+2}$ ' nin varlığı nedeniyle önemli derecede inhibe edilir (Svastits-Dücsö et al., 2009).

$\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi aynı zamanda bazı şekerler ve şeker türevleri tarafından etkilenir. Genellikle galaktoz, melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz varlığında substrat olarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid ile aktivite tayini yapıldığına bu şekerlerin,  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi üzerinde inhibitör bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Gote et al., 2006; Scigelova and Crout, 2000). Bunun nedeni, bu bileşiklerin galaktoz kalıntılarının enzimin aktif bölgesi için yarışması ve p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glikopiranozid (pNPG) galaktozil kalıntısına analog olmasıdır. Ancak Suzuki ve ark. (1970), *M. vinacea*  $\alpha$ -galaktozidazının üzerinde D-galaktozun inhibisyonunun karma bir tip olduğunu bildirerek, enzim üzerindeki yarışmalı ve yarışmasız bağlanmasını önermiştir. *M. vinacea* (Suzuki et al., 1970) ve *Aspergillus ficuum* (Zapater et al., 1990)  $\alpha$ -galaktozidazları D-glukoz ile rekabet edilemez şekilde inhibe edilirken, *A. ficuum*' dan elde edilen  $\alpha$ -galaktozidaz mannoz ile yarışmasız inhibisyon göstermiştir (Zapater et al., 1990). Luonteri ve ark. (1998), *P. simplicissimum*' da üç tane  $\alpha$ -galaktozidaz varlığı bildirilmiştir; AGL II, galaktozun diğer iki enzim olan AGL I ve AGL III' e kıyasla ürün inhibisyonuna karşı daha fazla direnç gösterdiği bildirilmiştir.

### 1.1.5.6 Substrat spesifikliğı

$\alpha$ -Galaktozidazlar, substratın anomer seçiciliğı açısından çok spesifiktir, ancak glikon ve aglikon spesifikliğinde bir miktar esneklik göstermektedirler.  $\alpha$ -Galaktozidazın etkisiyle serbest bırakılan ürünün anomerik konfigürasyonu,

substrat içindeki  $\alpha$ -galaktozidik bağlantı türüne rağmen, özellikle  $\alpha$ -<sup>4</sup> dır, örneğin  $\alpha$ -1, 2,  $\alpha$ -1, 3,  $\alpha$ -1, 4,  $\alpha$ -1, 6 gibi (Puchart et al., 2000; Zaprometova et al., 1990; Comfort et al., 2007). Bununla birlikte, pek çok enzim, glikon artıkları için mutlak spesiflik göstermemekte ve yapısal analog  $\beta$ -L-arabinopiranozidler ve  $\alpha$ -D-fukopiranozidler hidroliz etmektedir (Berg et al., 1980). Substratın aglikon grubu hidroliz üzerinde belirgin bir etkiye sahip olabilir veya olmayabilir; dolayısıyla birçok galaktozidaz, örneğin metil, etil, n-propil veya  $\alpha$ -naftil galaktoz, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid; melibiyoz ve rafinoz için hidrolize olabilir (Halstead et al., 2000; Shabalin et al., 2002). Çoğu mikrobiyal  $\alpha$ -galaktozidaz ortak noktada, pNPG ve oNPG gibi sentetik veya aril glikozitleri, melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi doğal  $\alpha$ -galaktozidlerden daha kapsamlı şekilde hidrolize edebilirler; bu da aril glikozitlerin alkil türevlerinden daha iyi substratlar olduğunu belirtir (Anisha et al., 2009). *A. niger*  $\alpha$ -galaktozidazı sadece sentetik substratı hidrolizlemiş ve melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi doğrusal yapılarda  $\alpha$ -1,6 bağlı galaktoz terminalini kesememiştir (Kaneko et al., 1991).

Daha önce belirtildiği gibi,  $\alpha$ -galaktozidazlar iki tiptir, bir grup sadece oligomerik substratlar üzerinde aktiftir ve diğer grup oligomerik ve polimerik substratlar üzerinde aktiftir. Genellikle GH 27  $\alpha$ -galaktozidazlar polimerik ve oligomerik substratlar üzerinde aktifken, GH 36  $\alpha$ -galaktozidazlar sadece oligomerik substratlar üzerinde etkindir. GH 36 ailesindeki  $\alpha$ -galaktozidazların çoğu, tetramerik yapıya sahip büyük enzimlerdir ve dolayısıyla polimerlerden galaktoz hidrolizleme kabiliyeti muhtemelen sterik olarak sınırlandırılmıştır (Fridjonsson et al., 1999; Aduse-Opoku et al., 1991; Aslanidis et al., 1989). *A. tamarii* (Civas et al., 1984), *P. simplicissimum* (Luonteri et al., 1998), *B. ovatus* (Gherardini et al., 1985) ve *B. stearothermophilus*' un (Talbot and Sygusch, 1990) trimerik ya da tetramerik  $\alpha$ -galaktozidazları polimerik substratlara karşı çok az veya hiç aktiviteye sahip değildir. GH-36 ailesinde iki fungal  $\alpha$ -galaktozidaz, *T. reesei* AGLII (Margolles-Clark et al., 1996) ve *A. niger*  $\alpha$ -Gal I (Ademark et al., 2001), melibiyoz ve rafinoz gibi oligosakkaritlere karşı daha spesifiktir ve polimerik substratlar üzerinde çok az veya hiç aktiviteye sahip değildirler. GH 27 ailesindeki  $\alpha$ -galaktozidazlar genellikle daha küçüktür ve en azından bazıları monomerdirler (Luonteri et al., 1998; Shibuya et al., 1997). GH 27' deki birçok  $\alpha$ -galaktozidazı, *T. reesei* AGLI (Margolles-Clark et al., 1996), *M. vinacea*  $\alpha$ -galaktozidaz II (Shibuya et al., 1997), *P. simplicissimum* AGLI (Luonteri et al., 1998) ve *A. niger* AgIB (de Vries et al., 1999; Manzanares et al., 1998) galaktozu bozulmamış galaktomannan polimerlerinden salabilirler. Melibiyozu karşı ihmal edilebilir hidrolitik aktiviteye sahip, ancak keçiyoynuzu sakızı ve guar sakızında aktif olan bir  $\alpha$ -galaktozidaz,

filamentli mantar *T. flavus* CCF 2686' dan saflaştırılmıştır (Simerska et al., 2007). Chen ve ark. (2015), *R. miehei*' den rafinoz ve stakiyoza spesifisite gösteren ve besleyici olmayan RFO' ları tamamen hidrolize eden bir rekombinant  $\alpha$ -galaktozidaz bildirmişlerdir.

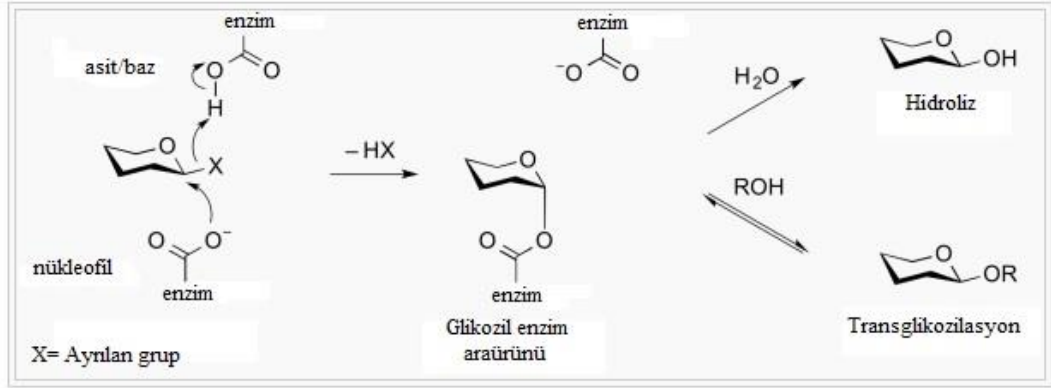
Bitki  $\alpha$ -galaktozidazları tohum, meyve, yaprak ve kökte bulunur.  $\alpha$ -Galaktozidazlar, aktiviteleri için optimum pH' ya göre asit veya bazik olarak sınıflandırılır (Keller and Pharr, 1996). Bitki tohumlarından ve yapraklarından izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazların çoğu asidik enzimlerdir ve GH 27 ailesine aittir. GH 27 enzimlerinin, kovalent bir glikozil-enzim ara maddesinin oluşumunu içeren klasik Koshland çift yer değiştirme mekanizmasını kullanmaları beklenir (Rigden, 2002). Rafinoz ve stakiyozu bünyesinde barındıran bitkilerde bazik pH optimumuna karşı nötral olan  $\alpha$ -galaktozidazlar bulunmuştur (Bachmann et al., 1994; Lee et al., 2004; Blöchl et al., 2008). Diğer  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan karşılaştırmalar, bazik enzimlerin rafinoz ve stakiyoz sentazlara daha çok benzediğini ve GH 36 ailesine ait olduklarını göstermiştir (Blöchl et al., 2008). GH 27 ve 36 aileleri arasında katalitik mekanizmanın korunduğu düşünüldüğünde, pirinç (*Oryza sativa*)  $\alpha$ -galaktozidazına göre numaralandırılmış Asp106 ve Asp107 iki bitişik muhtemel proton verici olarak gösterilmiştir. Bunlar,  $\beta$ -iplikçik 2' yi ve sırasıyla 36 ve 27 ailelerinde korunan Gly-Trp ve Cys-Trp' i izler. Yine, korunmuş bir Trp' nin katalitik bölgeye yakın konumlandırılması, substrat bağlanmasında bir rolü kuvvetle düşündürmektedir (Rigden, 2002).

Sripuen ve ark. (2003), birçok sentetik ve doğal substratı kullanarak ölümsüzlük mantarı (*G. lucidu*) gövdesinden saflaştırdıkları  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin aktivitesindeki değişimleri gözlemlemişler ve sentetik substratlardan pNPG, doğal substratlardan da rafinoz, melibiyoz ve stakiyozun enzim için uygun substratlar olduğunu bildirmişlerdir. *P. coccineus* (Du et al., 2013) ve çimlenen *T. multijuga* Benth. (Fialho et al., 2008) tohumlarından saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi keçiboynuzu sakızı ve guar sakızı gibi polimerik substratlara kıyasla rafinoz, melibiyoz, stakiyoz gibi oligosakkaritlerle daha yüksek aktivite göstermişlerdir. *A. terreus*' un hücre dışı üç  $\alpha$ -galaktozidazı (E1, E2 ve E3) pNPG, melibiyoz, rafinoz ve stakiyozu hidroliz etmiştir. Ayrıca E1 ve E2 enzimleri, guar sakızı ve keçiboynuzu sakızı substratlarını da hidrolize edebilmiştir (Ferreira et al., 2011).

### 1.1.5.7 Transglikozilasyon reaksiyonu

Birçok mikrobiyal  $\alpha$ -galaktozidazın, özellikle yüksek substrat konsantrasyonlarında hidrolitik aktiviteye ek olarak transglikozilasyon aktivitelerine de sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.7) (Anisha, 2011; Kurakake et al., 2015; Scigelova and Crout, 2000). Transglikozidaz aktivitesinde, akseptör rolü sudan başka basit alkoller, hidroliz ürünleri (Hashimoto et al., 1995), sakkaritler veya ikinci bir substrat molekülü (substrat transglikozilasyonu) gibi hidroksil bileşikleriyle sağlanır (Weignerova et al., 2001).  $\alpha$ -Galaktozidazların transglikozidaz aktivitesinin özgülüğü ve kinetiği, birçok araştırmacı için araştırmanın odak noktası olmuştur (Savelev et al., 1996). Genellikle heksozlar galaktoz moleküllerinin daha iyi akseptörüdür. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, suyun ve organik akseptörlerin aynı bölgede bağlandığını göstermiştir, bu nedenle hidroliz ve transfer reaksiyonları enzim molekülünün aynı yerinde, muhtemelen aynı mekanizmalarla gerçekleşir.  $\alpha$ -Galaktozidazların, yüksek konsantrasyonlarda monosakkaritler ile inkübe edildiğinde oligosakkaritleri sentezlediği bilinmektedir ve bu prosedür birçok glukoz ve galaktoz türevlerinin hazırlanması için kullanılmıştır (Ajisaka and Fujimoto et al., 1989; Spangenberg et al., 2000). Eşsiz bir transglikozilasyon potansiyeline sahip hücre dışı bir  $\alpha$ -galaktozidaz, bir filamentli mantar olan *T. flavus* CCF 2686' dan izole edilmiştir (Simerska et al., 2007; Weignerova et al., 2001; Simerska et al., 2006). Bu enzim,  $\alpha$ -1,3 bağlarının oluşumu için selektif bir tercihle pNP- $\alpha$ -Gal' nin transglikozilasyonunda olağandışı bir bölge seçiciliği göstermiş (Weignerova et al., 2001) ve bir akseptör olan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozil-(1,3)-6-O-asetil-D-galaktopiranozid gibi p-nitrofenil-6-O-asetil- $\alpha$ -D-galaktopiranozidi tolere etmiştir (Simerska et al., 2006). Kendine özgü seçiciliğine ek olarak, bu indüklenebilir enzim,  $\alpha$ -galaktoz kalıntılarının substrat çözünürlüğünü artırmak için transglikozilasyon reaksiyonlarında yardımcı bir çözücü olarak kullanılan tert-butil alkol gibi sterik olarak engellenmiş alıcılara aktarımında aktif bulunmuştur (Simerska et al., 2007; Simerska et al., 2006; van Rantwijk et al., 1999).





Şekil 1.7 Genel transglikozilasyon mekanizması (<https://www.cazypedia.org/index.php/Transglycosylases>).

### 1.1.5.8 Proteaz direnci

Bilim dünyası her zaman yeni özelliklere sahip mikrobiyal enzimlere yönelmektedir. Bu amaçla, çeşitli araştırma grupları, farklı özelliklere sahip çeşitli enzimlerin geniş bir repertuarına sahip organizmaları araştırmışlardır. Cao ve ark. (2007), *Rhizopus sp.* F78 ACCC 30795' den hem nötr hem de alkali proteazlara karşı direnç göstererek tıbbi, gıda, hayvan yemi ve şeker endüstrisinde olası uygulamaları için temel oluşturacak proteaza dirençli yeni bir  $\alpha$ -galaktozidazın saflaştırıldığını bildirmişlerdir. Çeşitli nötr proteazlarla (subtilisin A, proteinaz K, kollajenaz, tripsin ve  $\alpha$ -kimotripsin dahil) yapılan işlem sonrasında, enzim aktivitesinin % 70' inden fazlasını korumuştur. Enzim aktivitesi alkali proteazlar (proleather ve alkalın proteaz dahil) tarafından az miktarda aktifleştirilmiştir.

*Streptomyces sp.* S27' den saflaştırılmış rekombinant  $\alpha$ -galaktozidazın, bazı nötr proteazlara ( $\alpha$ -kimotripsin, subtilisin A ve kollajenaz) dirençli olduğu bildirilmiştir (Cao et al., 2010). Dahası, melibiyoz, stakiyoz, rafinoz ve soya fasulyesi unu da dâhil olmak üzere doğal substratlar için hidrolitik kabiliyet göstermiştir. Bağırsak proteazlarıyla kombine edildiğinde enzim, soya fasulyesi ürünüde RFO' lar için daha yüksek hidrolitik özellik sağlamıştır.

### 1.1.5.9 Galaktoz toleransı

Son ürün inhibisyonu, enzimlerin katalitik verimliliğinde bir azalmanın pek çok nedeninden biridir. Son ürün inhibisyonuna karşı dirençli bir enzim bu açıdan avantajlı olacaktır. *S. griseoalbus*' un yeni bir galaktoz toleranslı  $\alpha$ -galaktozidaz ürettiği bildirilmiştir (Anisha et al., 2009). Bu aktinomisetle üretilen  $\alpha$ -

galaktozidaz, 100 mM kadar yüksek galaktoz konsantrasyonlarına tolerans gösterebilmiştir. Aksine, *A. niger* (Ademark et al., 2001) ve *B. stearrowthermophilus* (Gote et al., 2006)  $\alpha$ -galaktozidazlarının, galaktoz tarafından inhibe olduğu rapor edilmiştir. *S. griseoalbus* tarafından üretilen  $\alpha$ -Gal II ve  $\alpha$ -Gal III de galaktoz ile inhibe olmaktadır (Anisha et al., 2009).

### 1.1.6 Tür iyileştirmesi

Yeni bir  $\alpha$ -galaktozidaz kaynağı bulmak veya  $\alpha$ -galaktozidazın potansiyelini geliştirmek için araştırmalar dünyada çapında devam etmektedir. *Saccharomyces carlsbergensis* gibi maya suşlarındaki  $\alpha$ -galaktozidaz, MEL geni tarafından kodlanır (Sumner-Smith et al., 1985). Bununla birlikte, ticari olarak fırınlama için kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* suşları MEL' dir. Liljestrom ve ark. (1988), MEL geninin *S. cerevisiae*' ye dahil edildiğini bildirmiş ve bunun sonucunda ekmek mayası, pancar pekmezinde bulunan rafinozu kullanmaya başlamış ve ticari olarak daha yüksek biyo kütle ve  $\alpha$ -galaktozidaz üretmiştir. Turakainen ve ark. (1993), *S. cerevisiae* suşlarında  $\alpha$ -galaktozidaz üretiminin doza bağlı olduğunu bildirmiştir, diğer bir deyişle, birkaç MEL geni içeren suşlar, yalnızca bir gen içeren suşlardan 10 ile 100 kat daha fazla  $\alpha$ -galaktozidaz üretmektedir. Enzim üretimi, galaktoz indüksiyonu ile daha da artırılır. *S. cerevisiae* suşları  $\alpha$ -galaktozidaz üretiminde diğer *Saccharomyces* suşlarına göre daha etkilidir. Bir MEL lokusunu taşıyan suşlarda glukoz baskılaması çok sıklıdır; ancak birkaç MEL lokusuna sahip suşlarda daha az sıklıdır, böylece glukozun varlığı bile MEL geninin sentezlenmesini tamamen bastırmaz. Enzim üretiminde böyle doza bağlı bir iyileştirme,  $\alpha$ -galaktozidaz kodlayan genin aşırı ekspresyonu ve klonlanması ile  $\alpha$ -galaktozidazın endüstriyel üretimini iyileştirme imkânı olduğunu düşündürmektedir.

Birkaç araştırmacı, heterojen konakçıdaki çeşitli mikroorganizmalardan genlerin klonlanması ve ekspresyonunu bildirmiştir. *E. coli* ve *Saccharomyces*  $\alpha$ -galaktozidazın üretiminde ekspresyon konakçıları olarak sıklıkla kullanılır.  $\alpha$ -Galaktozidaz geninin klonlanması ve aşırı ekspresyonunun, enzim verimini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. 2015 yılında Chen ve ark., termofilik mantar *R. miehei*' den RmgalB olarak adlandırılan  $\alpha$ -galaktozidaz genini klonlamışlar ve bunu *P. pastoris*' de ifade etmişlerdir. Rekombinant  $\alpha$ -galaktozidazın (RmgalB), yüksek hücre yoğunluklu fermentörde 1953.9 U / mL gibi yüksek seviyelerde salgılandığı bildirilmiştir. Rekombinant enzim aynı zamanda 505.5 U / mg' lık çok yüksek bir spesifik aktivite sergilemiştir. Bir başka çalışmada, termofilik *N. fischeri* P1' de GH-27 ailesine ait ve 423 U / mg gibi yüksek spesifik aktivitesi olan bir hücre dışı

$\alpha$ -galaktozidaz (Gal27A) tespit edilmiş, kodlama geni (1680 bp) klonlanmış ve fonksiyonel olarak *P. pastoris*' de ifade edilmiştir (Wang et al., 2014). Araştırmacılar, *P. pastoris*' teki yüksek verim (3.1 g / L) dikkate alındığında rekombinant rGal27A' nın endüstriyel uygulamalar için daha elverişli olduğunu bildirmişlerdir.

*Thermus sp.* türü T2 (Ishiguro et al., 2001), *T. Brockianus* ITI 360 (agaT) (Fridjonsson et al., 1999) ve *T. neapolitana* (agaA) (King et al., 1998) gibi hipertermofilik mikroorganizmalardan termostabil  $\alpha$ -galaktozidaz kodlayan genlerin klonlanması ve ekspresyonunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Halstead ve ark. (2000), *P. fluorescens* subsp. selülozdan  $\alpha$ -galaktozidaz A' nın klonlanmasını ve yüksek seviyede ekspresyonunu ve bunun galaktomannan hidrolizindeki rolünü kanıtlamışlardır.

Cao ve ark. (2010) *Streptomyces sp. S27* ACCC 41168' den tam uzunlukta bir  $\alpha$ -galaktozidaz geni (2226 bp) klonlamış ve *E. coli*' de aşırı eksprese etmiştir. Rekombinant enzim, GH 36 ailesine ait  $\alpha$ -galaktozidaz ile daha yüksek benzerlik göstermiştir, memelilerin ve kümes hayvanlarının bağırsak koşullarına benzer koşullar altında optimal etkinlik göstermiştir. Ayrıca nötr proteazlara ( $\alpha$ -kimotripsin, subtilisin A ve kollajenaz) karşı direnç göstermiş; melibiyoz, stakiyoz, rafinoz ve soya fasulyesi unu da dahil olmak üzere doğal substratlar için hidrolitik kabiliyet göstermiştir. Bağırsak proteazlarıyla kombine edildiğinde enzim, soya fasulyesi ürününde RFO' lar için daha yüksek hidrolitik özellik göstermiştir. Araştırmacılar, bu olumlu özelliklerin *Streptomyces sp. S27*  $\alpha$ -galaktozidazının gıda ve yem sanayiinde soya işleme için iyi bir aday olmasını sağladığını doğrulamıştır.

### **1.1.7 $\alpha$ -Galaktozidazların uygulama alanları**

#### **1.1.7.1 Gıda endüstrisi**

$\alpha$ -Galaktozidazlar gıda endüstrisinde yaygın olarak uygulanmaktadır; soya ve diğer baklagil türevli gıda ürünlerinden rafinoz ve stakiyoz gibi besleyici olmayan RFO' ların yüksek miktarlarını içeren şekerlerin hidrolizinde görev yapar. Genellikle, piyasada bulunan  $\alpha$ -galaktozidazlar, gıdalarda mevcut olan gaza neden olan RFO' ları indirgemek için oral olarak alınabilen sindirim takviyeleri formundadır.

**Soya sütü ve baklagillerdeki rafinoz ailesi oligosakaritlerin (RFO'lar) hidrolizi**

Soya fasulyesi, yüksek protein içeriği, esansiyel yağ asitleri, vitaminler ve mineraller gibi çeşitli besleyici faydalarından dolayı mükemmel bir gıda olarak kabul edilmektedir. Çeşitli besinsel faydalara rağmen soya sütünün tüketimi, soya fasulyesinde yüksek miktarlarda bulunan rafinoz ve stakioz gibi sindirilemeyen oligosakaritlerin varlığı nedeniyle pek fazla popülerlik kazanmamıştır. Bu şekerler  $\alpha$ -1,6 bağlarını hidrolize etmek için gerekli olan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi, insanların ve monogastrik hayvanların pankreasında olmadığından dolayı sindirimleri gerçekleştirilemez. Sonuç olarak, diyetle alınan tüm stakioz ve rafinoz sindirilemez, böylece abdominal rahatsızlık, gaz veya irin gibi gastrointestinal bozukluklar ortaya çıkar. Dolayısıyla, soya sütünün tüketimini artırmak için besleyici olmayan RFO'ların uzaklaştırılmasına yönelik yöntemlerin geliştirilmesi esastır (Katrolia et al., 2013).

Birkaç araştırmacı, RFO'ların soya sütünden etkin bir şekilde uzaklaştırılması için *A. oryzae* (Kapnoor and Mulimani, 2010), *P. purpurogenum* (Ramalingam et al., 2010) ve *Humicola* sp. (Kotwal et al., 1999) gibi mikrobiyal  $\alpha$ -galaktozidazların kullanımını göstermişlerdir. Soya sütünün *Bifidobacterium* ve LAB türleri gibi verimli bir şekilde büyüyebildiği probiyotik bakterileri de içeren bir çok bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidaz, *in vitro* olarak başlatıcı kültürler halinde veya *in situ* gastrointestinal sistemde olmak üzere, soya sütünün RFO'larını hidrolize etmek için başarılı bir şekilde kullanılabilir (Donkor et al., 2007; Garro et al., 2004; LeBlanc et al., 2005; Patil et al., 2010). Bir LAB suşu olan *L. fermentum* CRL 722, üst sindirim sisteminde bir galaktozidaz aktivitesi de kazanmış ve uzun süre kemirgenlerde güvenle uygulanabilmiştir (LeBlanc et al., 2005). Kalsiyum aljinatta immobilize *A. oryzae* hücrelerinin, akışkan yataklı reaktörde sürekli sistemde soya sütü RFO'ların hidrolizinde hızlı, kolay, basit, ucuz ve çok yönlü bir teknik sunduğu rapor edilmiştir (Kumar and Mulimani, 2010). Buğday kepeği üzerinde yetiştirilen *A. terreus* hücreleri, üç hücre dışı formda  $\alpha$ -galaktozidaz (E1, E2 ve E3) üretmiştir. Soya sütü RFO'ların bu enzimlerle muamele edilmesi sonucu, E1  $\alpha$ -galaktozidazının, 12 saatlik reaksiyon sonrasında stakioz içeriğini sıfıra düşürdüğü, E2'nin rafinozun toplam hidrolizini arttırdığı rapor edilmiştir. Soya sütündeki oligosakaritlerin tamamen uzaklaştırılmasının, her iki enzimin sinerjistik etkisi ile sağlanabileceği ileri sürülmüştür (Ferreira et al., 2011). Termofilik *N. fischeri* P1'den saflaştırılan hücre dışı  $\alpha$ -galaktozidaz (Gal27A) ve rekombinant  $\alpha$ -galaktozidaz (rGal27A) soya sütü hidrolizinde başarılı bir şekilde

kullanılmış ve Gal27A ile muamele edildikten sonra, soya sütünün rafinoz ve stakiyoz içeriği sırasıyla % 69.9 ve % 94.5 oranında azalmıştır. Aynı koşullar altında, rGal27A, rafinozun % 72.5' ini ve stakiyozun da % 54.8' inde hidrolize etmiştir (Wang et al., 2014). Soya sütünün oligosakkaritleri, immobilize *Chaetomium madarasense* AUMC 9376  $\alpha$ -galaktozidazı ile muamele edildikten rafinoz ve stakiyoz miktarları sırasıyla 3.9' dan 1.2 mg/100 mL' ye (% 69.2 azalma) ve 6.17' den 2.2 mg/100 mL' ye (% 64.3 azalma) düşürülmüştür (Abo-Elmagd, 2014). *Pleurotus djamor*  $\alpha$ -galaktozidazı (PDGI), baklagillerdeki sindirilemeyen ve gaza neden olan stakiyoz ve rafinoz gibi oligosakkaritlerin 17 saatte tamamen hidrolizini gerçekleştirmiştir (Hu et al., 2017).

Baklagiller, proteinlerin, liflerin ve diğer gerekli besin maddelerinin kaynağı ve dünyadaki birçok insan için diyetin önemli bir parçasını oluştururlar. Bununla birlikte, soya fasulyesi gibi, diğer bakliyatlar da gaz oluşumundan sorumlu olan sindirilemez RFO' ları içerir. Çeşitli bakliyalarda RFO' ların  $\alpha$ -galaktozidaz ile bozunması, ıslatma ve pişirme gibi geleneksel yöntemlerden daha etkili olduğu ispatlanmıştır (Katrolia et al., 2012; Pugalenti et al., 2006; Song and Chang, 2006). İmmobilizasyonun endüstriyel kullanımının bu tür bakliyatların işlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Patil et al., 2009).

### **Alfa-galaktooligosakkaritler (GOS) ve yeni transglikozilasyon ürünleri üretimi**

Günümüzde, GOS gibi fonksiyonel gıda maddeleri, sayısız sağlık faydaları için giderek prebiyotik olarak teşvik edilmektedir. *Bifidobacterium adolescentis*  $\alpha$ -galaktozidazının transgalaktozilasyon aktivitesini kullanarak yeni bir trisakarit olan  $\alpha$ -D-Galp-(1→6)- $\alpha$ -D-Galp-(1→6)-D-Glcp, bağırsak bakterileri tarafından metabolize edilmiştir (van Laere et al., 1999). Tzortzis ve ark. (2003), çeşitli *Bifidobakterilerin* ve *Laktobasillerin* büyümesini destekleyen glikozil transfer reaksiyonlarındaki melibiyoz ve rafinozdan oligosakkaritleri sentezlemek için *Lactobacillus reuteri*  $\alpha$ -galaktozidazı kullandı. *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171'in tüm hücrelerini kullanarak prebiyotik  $\alpha$ - ve  $\beta$ -GOS sentezi Goulas ve ark. (2009) tarafından araştırılmıştır. İşlem sırasında bir  $\alpha$ -bağlı transgalaktozillenmiş disakarit üretildi. *A. nidulans* FGSC (AgIC) 'den rekombinant bir GH 36 ailesi  $\alpha$ -galaktozidaz, 13  $\alpha$ -galaktooligosakkaritleri oluşturan transglikozilasyon reaksiyonunu etkili bir şekilde katalize edebilir (Nakai et al., 2010). Bunlardan beşi yeni prebiyotik oligosakkarit adaylarını, örneğin  $\alpha$ -(1,6) bağlı GOS' u temsil etmiştir. Yamashita ve ark. (2005)  $\alpha$ -GOS' un ters reaksiyon ile üretilmesi için *A.*

*niger*  $\alpha$ -galaktozidazı kullanmıştır.  $\alpha$ -Galaktobioz,  $\alpha$ -galaktotrioz ve daha büyük oligosakaritlerden oluşan iyi bir  $\alpha$ -GOS ürünü elde edilmiş ve bu da yeni işlevsel gıdalar olarak ticari kullanımlarını göstermiştir.

### **Şeker pancarı endüstrisi**

Şeker pancarı endüstrisinde, rafinoz pancar şekerinin normal kristalleşmesinin önünde bir engel teşkil eder. Pancar pekmezindeki rafinozun galaktoz ve sükroza hidrolizi yoluyla enzimatik olarak uzaklaştırılması, pancar şekeri kristalleştirme verimliliğini önemli ölçüde artırabilir ve daha iyi bir verim sağlayabilir. *T. neapolitana* (King et al., 1998), *M. vinacea* (Shibuya et al., 1997) ve *A. griseola* (Fallahpour et al., 2002)' dan izole edilen enzimler melastaki oligosakaritleri hidrolize ederek şeker endüstrisinde fayda sağlamıştır.

#### **1.1.7.2 Yem sanayi**

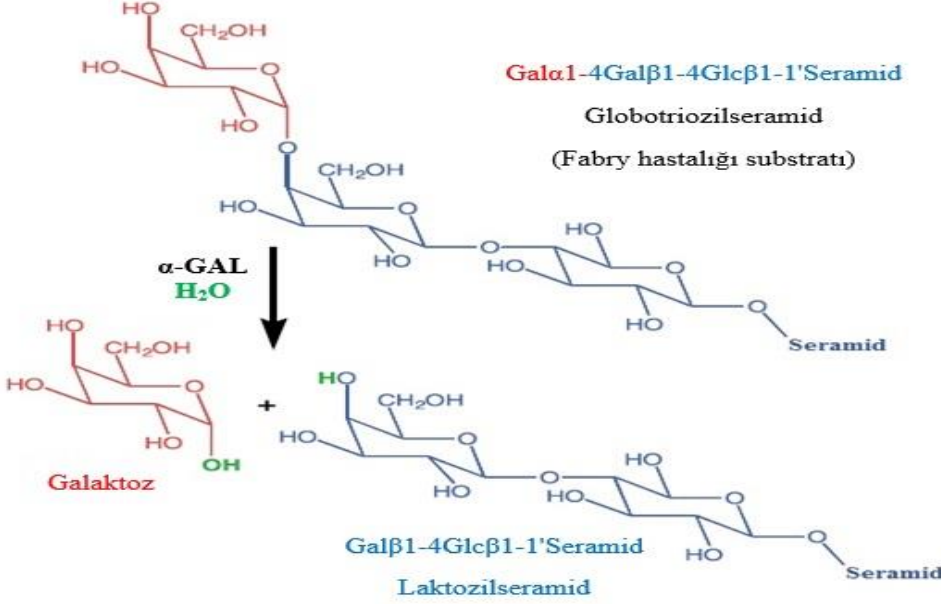
Kanatlı hayvanların ve domuzların diyetleri esas olarak soya fasülyesi yemi içerir, bu da midede gaz oluşması gibi gastrik problemlere neden olur ve böylece bağırsaklardaki beslenme geçiş oranını artırır ve yem kullanımını azaltır. Bunun nedeni geniş getirmeyen hayvanlarda bağırsak  $\alpha$ -galaktozidaz eksikliğidir ve rafinoz ve stakiozun uzaklaştırılması için hayvan yeminin  $\alpha$ -galaktozidaz ile ön işleme tabi tutulması sindirilebilirliği ve besin alımını geliştirebilir ve sindirim viskozitesini düşürebilir. Memelilerin ve kümes hayvanlarının bağırsakları için proteaza dirençli enzimlere benzer fizyolojik pH ve sıcaklıkta aktif olan  $\alpha$ -galaktozidazlar, yem katkı maddeleri olarak kullanılmak üzere avantajlıdır (Cao et al., 2009; Cao et al., 2010; Mi et al., 2007). Çalışmalar,  $\alpha$ -galaktozidaz takviyesi üzerine domuz yavruları (Pan et al., 2002; Veldman et al., 1993) ve tavuklarda (Ghazi et al., 2003) soya fasulyesi oligosakaritlerinin büyüme performansını, besin alımını ve ideal sindirilebilirliğini arttırdığını göstermektedir.

#### **1.1.7.3 Medikal uygulamalar**

İnsanlarda Fabry hastalığı,  $\alpha$ -galaktozidaz A' nin ( $\alpha$ -GalA) mutasyona uğramış aktivitesinden kaynaklanan ve kan damarlarında bir glikolit birikmesine neden olan, diğer doku ve organlarda ağrılı nöropati ve renal, kardiyovasküler ve serebrovasküler disfonksiyona yol açan, X bağlantılı resesif bir glikolipid depolama bozukluğudur (Morel and Clarke, 2009). Şekil 1.8' de  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin Fabry hastalığındaki etkisi gösterilmiştir. İnaktif mutant  $\alpha$ -galaktozidazlar, terminal

galaktoz şekerlerini ayırabilirler, böylece glikosfingolipidlerin bozunmasını önlerler. Terminal glikol (sphingo) lipid  $\alpha$ -galaktozil artıklarını hidrolize edebilen  $\alpha$ -galaktozidazlar, Fabry hastalığının tedavisinde yararlı olabilmektedir (Liu et al., 2007; Utsumia et al., 2005). Enzim replasman tedavisinin hastalığı başarıyla tedavi ettiği gösterilmiştir. Çin hamsteri yumurtalık hücreleri tarafından üretilen agalsidase beta (Fabrazyme) ve agalsidase alfa (Replagal) olmak üzere iki rekombinant enzim klinik araştırmaya uygulanmıştır (Eng et al., 2001; Morel and Clarke, 2009; Pastores, 2007). İlaç şirketleri Shire ve Genzyme, Fabry hastalığının tedavisinde sırasıyla Replagal ve Fabrazyme markaları altında agalsidase alfa ve agalsidase beta üretmektedir. Agalsidase alfa ve beta, hem insan  $\alpha$ -galaktozidaz A enziminin rekombinant biçimleridir hem de doğal enzimle aynı amino asit dizisine sahiptir. Agalsidase alfa ve beta, oligosakkarit yan zincirlerinin yapısında farklılık gösterir (Katrolia et al., 2013). Fabry hastalığının tedavisine yönelik yürütülen çalışmaların birinde, termolabil  $\alpha$ -galaktozidaz ( $\alpha$ -galaktozidaz A) ve termostabil  $\alpha$ -galaktozidaz ( $\alpha$ -galaktozidaz B) insan plasentasından saflaştırılmış ve her iki enzim preparatına karşı antikorlar üretilmiştir. İki enzim preparatı arasında çapraz reaktivite bulunmamıştır. Standart çift immün difüzyon teknikleriyle test edildiğinde, anti-A serum,  $\alpha$ -galaktozidaz A ile reaksiyona girmiş, ancak  $\alpha$ -galaktozidaz B preparatlarıyla reaksiyona girmemiştir. Tersine, anti-B serum,  $\alpha$ -galaktozidaz B ile reaksiyona girerken,  $\alpha$ -galaktozidaz A ile reaksiyona girmemiştir. Fabry hastalığı olan bir hastadaki fibroblastların  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi, anti-B serumuyla tedavi edilerek neredeyse tamamen ortadan kaldırılmış, buna karşın normal fibroblastlardan gelen enzimin sadece küçük bir kısmı bu antikor ile uzaklaştırılmıştır (Beutler and Kuhl, 1972). Fabry hastalığında replasman tedavisinde homolog enzim elde etmek için normal bir insanın idrarından saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidazın iki izoenzimi ( $\alpha$ -galaktozidaz A ve  $\alpha$ -galaktozidaz B) kullanılmıştır. Tavşanlarda bu saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz kullanılarak antiserum üretilmiştir. Normal idrar  $\alpha$ -galaktozidazının anti-serumla inkübe edilmesi, bir Fabry idrarının veya böbrek preparatının eşzamanlı olarak bulunup bulunmadığına bakılmaksızın,  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesinde düşüşe neden olmuştur. Bu durumda Fabry hastalığında çapraz reaksiyona giren herhangi bir materyal bulunmadığı sonucuna varılmıştır (Rietra et al., 1974). Rekombinant insan  $\alpha$ -galaktozidaz A' yı üretmek için metotrofik bir maya olan *P. pastoris* ekspresyonunun kullanıldığı başka bir çalışmada, saflaştırılan rekombinant  $\alpha$ -galaktozidaz A Fabry hastalığından türetilen fibroblastlar tarafından alınmış ve normal enzim seviyeleri bu koşullar altında onarılmıştır. Rekombinant enzim üzerinde bulunan karbohidratların analizi, karmaşık karbohidratlara kıyasla N-bağlı yüksek-mannoz yapıların baskın olduğunu işaret etmiştir. İnsan  $\alpha$ -galaktozidaz A

da dahil olmak üzere insan kaynaklı glikoproteinler, yüksek mannozlu ve karmaşık karbohidrat içerdiklerinden, böcek hücrelerinden veya *P. pastoris*'ten saflaştırılmış rekombinant glikoproteinlerin insanlarda antijenik olduğuna dair bir rapor bildirilmemiştir (Chen et al., 2000).

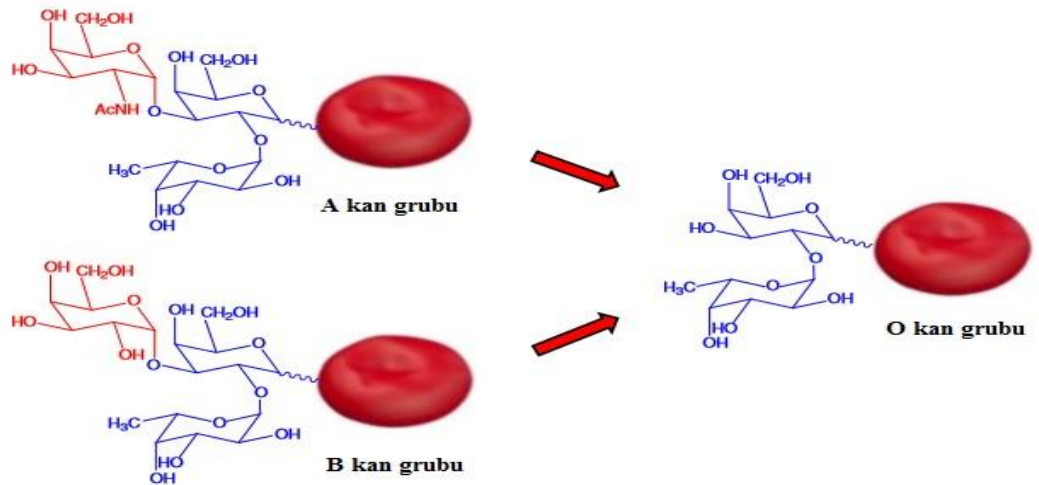


Şekil 1.8  $\alpha$ -Galaktozidaz ve Fabry Hastalığı (Garman and Garboczi, 2004).

$\alpha$ -Galaktozidazın bir diğer önemli tıbbi uygulaması da kan gruplarının dönüştürülmesidir. Çeşitli kan hastalıklarından ve kaza geçirmiş olan hastaların yaşamlarını kurtarmak için, kan bağışının önemi büyüktür.  $\alpha$ -Galaktozidaz oligo veya polisakkaritler, glikolipidler, glikoproteinlerdeki terminal  $\alpha$ -D-galaktoz artıklarını hidrolize eder ve grup özelliğine sahip kan eritrositlerini şeritler.  $\alpha$ -Galaktozidazın bu önemli özelliği hematolojik uygulamada evrensel vericinin kanını oluşturmak için kullanılabilir. Bitkisel (Chern et al., 2012; Zhu et al., 1996) ve mikrobiyal  $\alpha$ -galaktozidazlar (Varbanets et al., 2001), kan grubundaki B-RBC' nin antijeninden  $\alpha$ -1,3-bağlantılı galaktozu, B grubundan O grubuna dönüştürür (Şekil 1.9). Yeni GH 110 familyası  $\alpha$ -1,3-galaktozidazlar dallanmış B kanalı için nötr pH, yüksek spesifik aktivite ve substrat spesifikliği gibi uygun özellikler sergilerler ve enzimatik dönüşüm gibi biyomedikal uygulamalarda onları faydalı hale getirir (Liu et al., 2007, 2008). Taro (*Colocasia esculenta*)  $\alpha$ -galaktozidazının kullanıldığı çalışmada enzim insan kan grubu B antijeninin O' a dönüşümünde, B grubu kırmızı kan hücrelerinin içerdiği (1 $\rightarrow$ 3)-bağlı  $\alpha$ -D-galaktozil uç gruplarını parçalamada iyi bir aktivite göstermiştir. Bu grupların grup B antijeninden (H antijenine dönüşümü) hidrolizi, hemoliz ve hemaglutinasyon testleri ile izlenmiştir. 30 dakika sonra hücreler B' den H aktiviteye kısmi dönüşüm göstermiş ve dönüşüm



120 dakika içinde başarılı bir şekilde tamamlanmıştır (Chien and Lin-Chu, 1991). Davis ve ark. (1997), rekombinant fasülye (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ -D-galaktozidazının (rGal)  $\alpha$ -D-galaktozil artıkları ve bozulmuş B oligosakkarit için oldukça spesifik olduğunu ve preparatlarda saptanabilir hemaglutinin veya proteaz aktivitesini mevcut olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca rGal' ın, hücre süspansiyon analizlerinde doğal insan eritrositlerindeki B kan grubu antijenine karşı aktif olduğunu ve enzimatik olarak dönüştürülmüş evrensel olarak transfüze edilebilir tipteki O RBC' lerin potansiyel seri üretiminde faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.  $\alpha$ -Galaktozidazın kullanıldığı başka bir çalışmada, B antijeni enzimatik olarak ortadan kaldırılmış ve RBC ünitelerinin hastalarına transfüzyon yapılabilirliği ortaya koyulmuştur. Bu ECO (enzimatik olarak B grubundan O grubuna dönüşen) RBC ünitelerinin, emniyet ve etkinlik bakımından doğal O grup ünitelerinden ayırt edilemez nitelikte olduğu, hiçbir reaksiyon veya hemolizin gerçekleşmediği rapor edilmiştir (Kruskall et al., 2000). Kahve çekirdeği (*Coffea canephora*)  $\alpha$ -galaktozidazının kullanıldığı B kan grubunun enzimatik dönüşümü pH 5.5' te yaklaşık olarak 6 mg/mL enzim ile % 80-90 hematokritte yapılmıştır. Ortaya çıkan dönüştürülmüş O hücreleri, transfüzyon deneylerinde normal olarak işlev görmüş ve belirgin bir ters klinik parametre göstermemişlerdir. Bu veriler daha önceki yayınlarla birlikte, RBC' lerin enzimatik dönüşümünün uygulanabilir olduğunu ve B grubundan enzimatik O grubuna dönüştürülmüş (B-ECO) hücrelerin klinik transfüzyonda tedavi edilmemiş hücreler gibi işlev görebileceğini açıkça göstermiştir (Olsson et al., 2004). Beyaz nohut (*C. arietinum*)  $\alpha$ -galaktozidazının kullanıldığı çalışmada hücrelerin daha az kararlı olduğu asidik pH (pH 6.0)' da, enzim terminalindeki  $\alpha$ -bağlı galaktozu B kan grubundan ayırarak O kan grubuna dönüştürmüştür (Singh and Kayastha, 2012a).



**Şekil 1.9** Kırmızı kan hücresi yüzeyindeki AB antijenik karbohidrat yapıları ve O kan grubuna dönüşümleri (Chapanian et al., 2014).

## 1.2 İmmobilize Enzimler

Biyokataliz, kimya endüstrisi için yeşil ve sürdürülebilir süreçlerin geliştirilmesi açısından birçok avantaja sahiptir (Sheldon, 2004; Sheldon et al., 2007). Enzimler yenilenebilir kaynaklardan üretilir ve doğal, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir. Böylece metal katalizörlerinin kalıntılarının ürünlerden uzaklaştırılmasına ilişkin proseslerin maliyetlerinden kaçınılır. Reaksiyonlar, yüksek kemo-, regio- ve enantioselektifliklerde, çözücü olarak suda ılımlı koşullar altında (ortam sıcaklığı ve fizyolojik pH' da basınç) gerçekleştirilir. Biyokatalitik sentezler genelde daha küçük parçalı ve kademeli olarak ekonomiktir, aynı zamanda daha az enerji yoğunluğu vardır ve geleneksel organik sentezlere göre daha az atık üretirler. Bu avantajlara rağmen, enzimlerin operasyonel ve depolama istikrarının olmaması, maliyetli geri kazanım ve geri dönüşüm ve ürün kontaminasyonu ticarileştirilmelerini engellenmektedir. Ancak bu engeller genelde enzimin immobilizasyonu ile aşılabılır. İmmobilizasyon daha iyi depolama ve operasyonel stabilite sağlar, kolay uzaklaştırılabilir ve yeniden kullanılabilir. Dahası, immobilize enzimler cilde nüfuz edebilen serbest enzimlerin aksine hipoalerjeniktir (Hanefeld et al., 2009; Sheldon, 2007).

Enzimler enerji, gıda ve kimya endüstrilerindeki ilgili biyoteknolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadırlar (Andualema and Gessesse, 2012; Bornscheuer, 2014; Illanes, 2012). Bununla birlikte, sanayi düzeyinde kârlı olabilmek için, endüstriyel enzimler, kolay taşıma ve çalışma usullerine, stabilite ve yeniden kullanıma izin vermelidirler. Bu amaçla, enzim immobilizasyonu kaliteli endüstriyel biyokatalizörleri üretmek için bir araç olarak ortaya çıkmıştır (Singh et al., 2013).

İmmobilizasyon, enzimlerin katalitik aktivitesini koruyan, tekrar ve sürekli kullanımına izin veren belirli bir boşlukta enzimlerin sınırlanması olarak tanımlanmaktadır (Brena et al., 2013). Dahası, kaliteli biyokatalizörleri elde etmek için enzimlerin immobilizasyonu diğer kriterleri karşılamalıdır. Herhangi bir immobilize enzim, ayrılmaya ve yeniden kullanılmaya yardımcı olmak için hem tasarlanmış katalitik olmayan gereklilikleri (şekil, boyut, kalınlık, uzunluk, vb.) hem de hedef bileşikleri dönüştürmek için tasarlanmış katalitik gereklilikleri (aktivite, seçicilik, kararlılık, pH ve sıcaklık optimumu, vb.) içermelidir (Cao et al., 2003).

Enzimlerin immobilizasyonu, reaktivitelerini değiştiren şekil, sağlamlık ve agregasyon durumlarını etkiler (Palomo et al., 2002). Bu nedenle, enzim immobilizasyonu da enzim seçiciliğini modüle etmek için kullanılmıştır (Palomo, 2009; Mateo et al., 2007; Rodrigues et al., 2013). İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlı moleküllerdir. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri izelge 1.5’ de sıralanmıştır (nal, 2000).

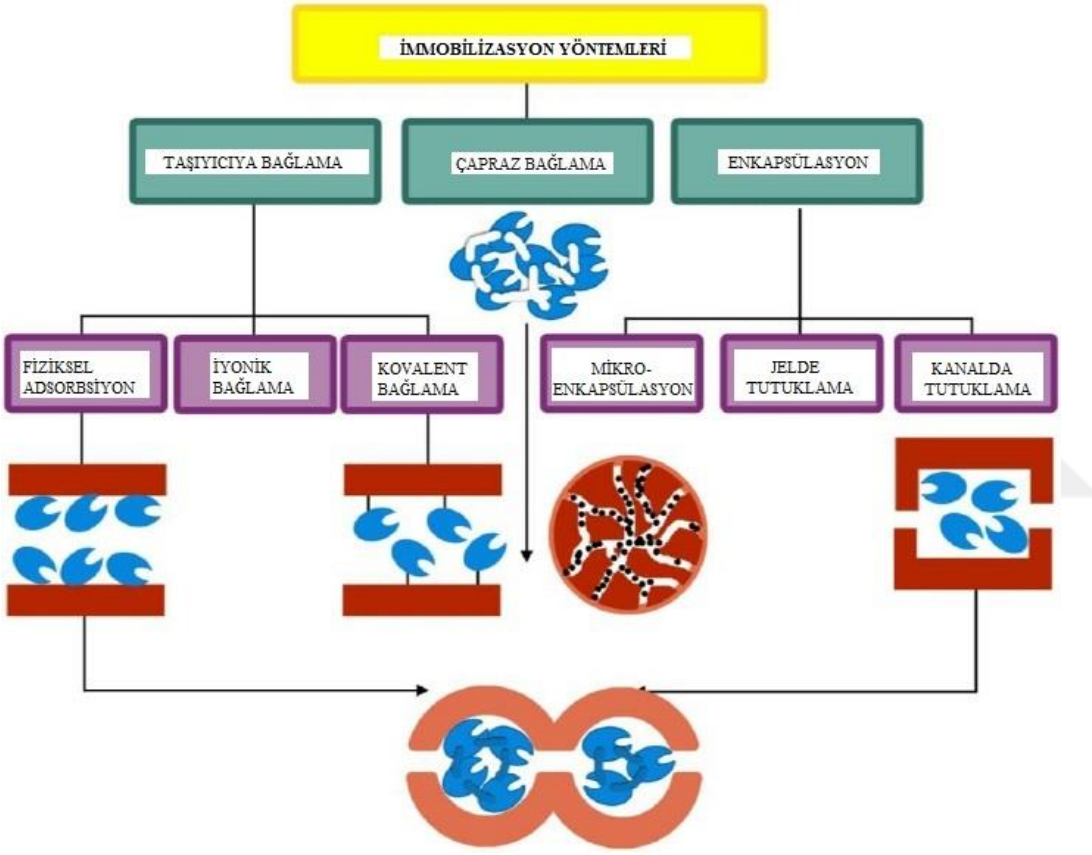
**Çizelge 1.5** İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri (nal, 2000).

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- evre koşulları (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- rn oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterir.
- Enzimin kendi kendisini parçalaması (otoliz) olasılığı azalır.
- Mekanistik alışmalar için uygundur.
- Otomatik işlemlere imkân verir.
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar, üretim kaybı azalır.

### 1.2.1 İmmobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için fiziksel veya kimyasal etkileşime sahip yöntemler kullanılır. Fiziksel yöntemler kullanıldığında, enzim, fiziksel olarak destek yapısı tarafından bağlandığı veya sıkıştığı için yapısal değişikliklere uğramaz. En önemli avantajı, tutuklanmış veya kapsüllenmiş immobilize enzimin neredeyse doğal halini korur olmasıdır; yeniden kullanılmasına izin vererek ve çoğu

durumda enzim stabilitesinde bir iyileşme sağlamıştır (Matsumoto and Ohashi, 2003; Raviyan et al., 2003; Mazurenko et al., 2015). Bununla birlikte, ana dezavantaj, destek ile enzim arasındaki birleşmenin çok zayıf olmasıdır; biyokatalizör sulu ortamda çalışırken enzim kaçışına neden olur. Adsorpsiyon, tutaklanma ve kapsülleme, fiziksel olarak immobilizasyonun daha temsili türleridir. Buna karşın, kimyasal immobilizasyon protein yapısını değiştirebilir, çünkü enzimlerin şekilleri, rijitlikleri ve agregasyon durumlarını değiştirebilen kimyasal bağlarla destek ve / veya yüzeye bağlanırlar (Cao, 2006). Genel olarak kullanılan immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.10’ da gösterilmiştir.



Şekil 1.10 İmmobilizasyon yöntemleri (Holmberg et al., 2014).

Enzimlerin bir desteğe kovalent bağlanarak immobilizasyonu, proteinlerin geri döndürülemez şekilde bağlandığı bir yöntemdir. İmmobilizasyonu gerçekleştirmek için, proteinlerin yüzeyinde tipik olarak bulunan lizin gibi amino asitlerin reaktif amino grupları esas olarak kullanılır. Bu amino asitlerle, enzimlerin desteğin reaktif bir grubuna kovalent bağlanması, oldukça kararlı bir kovalent bağ oluşturur. Epoksitler, enzim içindeki lizin amino gruplarıyla reaksiyona giren destekler üzerinde çoğunlukla reaktif gruplar olarak kullanılırlar (Mateo et al., 2007). Kovalent bağlanma, diğer immobilizasyon tiplerine kıyasla enzim ile destek

arasında en kuvvetli bağ sağlar ve enzimin destekten kaçışını en aza indirebilir (Cao, 2006). Yeniden kullanımına izin vermenin yanı sıra, desteklerin çoğu enzime koruyucu bir bariyer sağlar (Brady and Jordaan, 2009). Ancak, çoğu durumda, kullanılan desteklerin yüksek fiyatlara sahip olması nedeniyle, immobilize biyokatalizörlerin üretim maliyeti yükselmektedir (Sheldon, 2011). Diğer yandan, taşıyıcısız immobilizasyon veya kendi kendine immobilizasyon, iki enzim molekülünün bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanlar veya basit çapraz bağlayıcılar aracılığıyla bir destek kullanmadan bağlanmasını sağlamaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan bifonksiyonel bileşik, küçük bir dialdehit molekülü olan glutaraldehit (GA)'dir (Talekar et al., 2013). Kendiliğinden immobilizasyonun bazı avantajları şunlardır: Biyolojik katalizör kütlesi başına daha büyük hacimsel aktivite, artmış spesifik aktivite, daha kolay üretim, düşük üretim maliyetleri, daha yüksek saflık, daha az müdahale ve / veya kirletme ve daha düşük kütle transferi kısıtlamaları (Cao et al., 2003; Sheldon, 2007). Taşıyıcı içermeyen immobilize enzimler, yüksek verim ve üretim gerektiren işlemlerde avantajlı katalizörlerdir, burada enzimler geleneksel katı destekler vasıtasıyla stabilize edilmezler (Illanes et al., 2009).

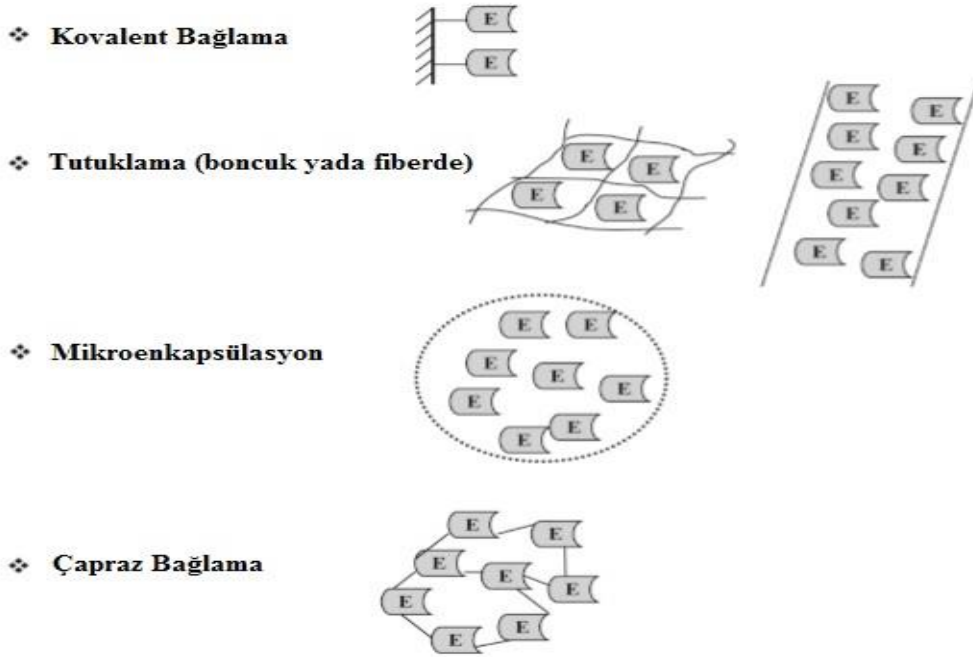
Birçok immobilizasyon stratejisi olmasına rağmen, hiçbiri tüm süreçlerdeki tüm enzimlerin kısıtlılıklarını aşamamaktadır. Immobilizasyonun spesifik stratejilerinin seçimi, enzimin doğurduğu sınırlamalar ve kullanılacağı süreç gibi birçok faktöre bağlı olacaktır. Dolayısıyla, en iyi enzim immobilizasyon tekniğinin seçimi, uygulama taleplerine ve maliyet üretimi ile immobilize biyokatalizörün doğrudan uygulanması üzerindeki potansiyel kullanımları arasındaki dengeye bağlı olacaktır. Bu bağlamda, çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) teknolojisi son on beş yılda geniş bir enzim yelpazesinde başarıyla kullanılmıştır ve enzim immobilizasyonunda kolay, hızlı, verimli ve uygun bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır (Garcia-Galan et al., 2011).

### **1.2.1.1 Taşıyıcı içermeyen immobilizasyon türleri, avantajları ve dezavantajları**

Taşıyıcı içermeyen immobilize enzimler, bir desteğe ihtiyaç duymazlar. Genellikle çapraz bağlı enzimlerin (CLE), kristalize enzimlerin (CLEC) ve agregatlaşmış enzimlerin (CLEA) doğrudan çapraz bağlanmasıyla üretilirler (Velasco-Lozano et al., 2015).

Bu yapıların ilk raporu Quioco ve Richards (1966) tarafından tarif edilmiş ve çözünmeyen protein bağlantılarının glutaraldehit gibi bifonksiyonel çapraz

bağlayıcı kimyasal gruplar kullanılarak elde edilebileceğini bulmuşlardır. Çapraz bağlanmış enzimler (CLE) olarak bilinen bu bağlı proteinler, katalitik aktivitelerini korumuştur. Bağlantı ileri düzeyde saflaştırılmış enzimlerle yapıldığında, bağlı proteinler çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC) olarak bilinirler (Quioco and Richards, 1964). Bununla birlikte, Quioco ve Richards (1964)' ın çalışması yayınlandığında, immobilizasyon araştırmalarındaki çabalar, CLE' nin sergilediği düşük aktivite ve stabilitesini koruma gücünden dolayı, adsorpsiyon, tutuklama ve kimyasal bağlanma yoluyla immobilizasyona odaklanmıştır (Şekil 1.11). Bu yapılar 1990'lı yıllarda daha yoğun bir şekilde incelenmeye başlanmıştır (Cao, 2006; Sheldon, 2007).



**Şekil 1.11** Enzim immobilizasyon yaklaşımları, geri dönüşümsüz yöntemler (Brena et al., 2013).

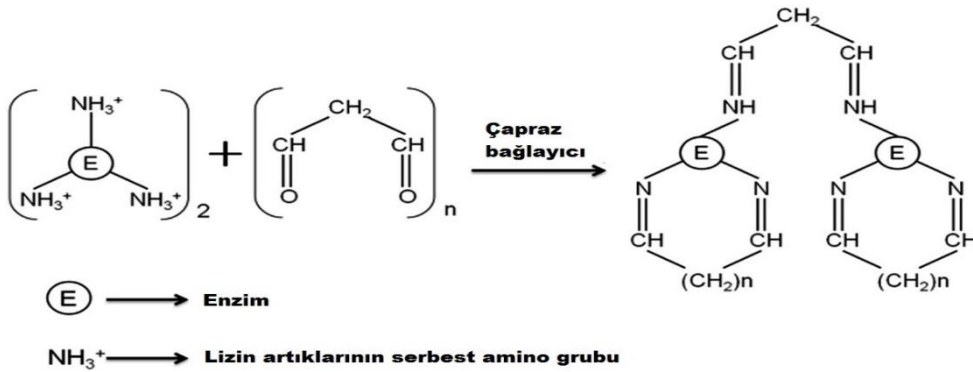
CLE, çözeltideki proteinler ile oluşturulur ve enzimler, 1 ile 100  $\mu\text{m}$  boyutlarına sahip çapraz bağlayıcı bir madde ile birbirine bağlanır. Doğal enzimlere kıyasla, bu tür biyokatalizörler termal stabiliteyi geliştirir, ancak pH, çapraz bağlama maddesi miktarı, iyonik kuvvet ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlere dikkat edilmesini gerektirir. Bununla birlikte, CLE, doğal aktivite düşük olması (genellikle% 50'den az), zayıf çoğaltılabilirlik ve düşük mekanik stabilite gibi dezavantajlara sahiptirler (Cao et al., 2003). Bu sakıncalar, CLE' yi bir jel matrikse veya membranlara sıkıştırarak kısmen aşılmıştır (Thomas et al., 1974; Broun et al., 1969; Khare et al., 1991).

CLE ile birlikte, sert koşullar altında yüksek kararlılığı nedeniyle sulu olmayan ortamdaki biyotransformasyonlara uygun CLEC üretimine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Quioco, 1966). CLEC, çapraz bağlayıcı bir madde ile birlikte bağlanan kristal proteinlerdir. Sıcaklık, pH, organik çözücüler ve proteolize karşı geliştirilmiş mekanik dayanıklılık ve yüksek stabilite sağlamışlardır (Sheldon, 2007; Gogoi et al., 2010; Roy and Abraham, 2006). Örneğin lipaz-CLEC, doğal düşük-pH gastrik koşulları altında ilaç iletimini iyileştirmek için geliştirilmiştir (Hetrick et al., 2014). CLEC ile elde edilen katalitik aktivite, enzim kristallerinin boyutu kontrol ederek iyileştirilebilir. Kristal boyutunun minimize edilmesinin, korunmuş katalitik etkinliği arttırdığı bulunmuştur. Ancak, proteinlerin kristalleştirilmesi zahmetli adımlar gerektirir, bu da üretim maliyetini artırır (Brady et al., 2004).

Kristalizasyon ile karşılaştırıldığında, enzim moleküllerini bir araya getirmek için daha ucuz bir yöntem ve daha fazla çapraz bağlama, tuzları, organik çözücülerini veya noniyonik polimerleri ekleyerek proteinleri çöktürmektedir (Sheldon, 2011; Sheldon and Van, 2013). Bu fikir ilk olarak Sheldon' un laboratuvarlarında (Cao et al., 2000) penisilin G amidazı ile yapılmış ve daha sonra CLEA Technologies (Hollanda) tarafından piyasaya sürülmüştür. Çapraz bağlanmış enzim agregatları (CLEA), kovalent olmayan bir şekilde bağlanarak bir arada kalan katı partikülleri oluşturan saflaştırılmamış çöktürülmüş enzimlerden elde edilir. Bu CLEA, glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı bir madde ile kovalent bağlandıktan sonra kalıcı olarak çözünmez hale gelir (Sheldon, 2007; Cao et al., 2000). CLEC ve CLEA, bir desteğe bağlanan biyokatalizörlere göre 10 ile 1000 kat daha fazla aktivite gösterir ( $U\ g^{-1}$  biyokatalizör) (Sheldon, 2007; Tischer and Kasche, 1999; Toral et al., 2007; Alagöz et al, 2015; Zhou et al., 2015). Sonuç olarak, taşıyıcı içermeyen immobilize enzimlerin kullanılması, yüksek üretkenlik ve verim, uzun süre kararlılık ve destekler üzerinde geleneksel immobilizasyon yöntemleri ile etkin şekilde stabilize edilemeyen kararsız enzimleri gerektiren prosesler için faydalı olabilir. Ayrıca, reaksiyon süresini uzatmaksızın, yeniden kullanım sırasında aktivite kaybını telafi eden yüksek miktarda enzimle reaktörleri beslemek mümkün olduğundan, taşıyıcısız immobilize enzimlerin kullanımı açıkça avantajlıdır (Cao et al., 2003; Sheldon et al., 2013). Buna karşılık, destekler üzerinde hareketsiz kılınan enzimler, aynı dönüşüm seviyelerini elde etmek için reaksiyon süresinin uzatılmasına neden olan, reaktörün % 10-20' sinden daha fazlasını işgal etmektedir (Illanes et al., 2006).

### 1.2.2 Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA)

Taşıyıcıya bağlanma veya kapsülleme, kaçınılmaz olarak, katalitik olmayan bir kütleli büyük bir oranının (toplamın % 90-99'u) uygulanması nedeniyle, katalitik aktivitenin seyreltilmesine ve dolayısıyla daha düşük üretkenliklere (kg enzim ürünü başına) yol açar. Aksine, enzim moleküllerinin çapraz bağlanması taşıyıcı içermeyen bir yöntemdir ve ortaya çıkan immobilize biyokatalizör yüksek oranda aktif enzim içerir. Protein yüzeyindeki reaktif  $\text{NH}_2$  grupları ile glutaraldehit arasındaki reaksiyon sonucu proteinlerin çapraz bağlanması ilk olarak 40 yıl önce geliştirilmiştir (Şekil 1.12)(Cao et al., 2003). Bu gibi çapraz bağlanmış enzimler (CLE'ler), sulu bir enzim çözeltisinin bir sulu glutaraldehid çözeltisi ile karıştırılmasıyla elde edilmektedir (Khare and Gupta, 1990). Bununla birlikte, CLE'ler düşük aktivite, zayıf çoğaltılabilirlik ve düşük mekanik stabilite sergilerken, jelatinimsi doğaları nedeniyle işlenmesi zordur. Dolayısıyla, bir taşıyıcıya bağlanma enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanılan metodoloji haline gelmiştir. 1990'ların başında Altus Biologics, endüstriyel biyokatalizörler olarak çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC'ler) kullanımını tanıtmışlardır. CLEC'lerin, geniş bir enzim aralığı için geçerli olduğu ve ısı, organik çözücüler ve proteoliz ile çözünebilir hale geçtiği ve daha fazla denatürasyona açık oldukları görülmüştür. Operasyonel kararlılığı, kontrol edilebilir parçacık boyutu ve geri dönüşüm kolaylığı, yüksek katalizör ve hacimsel üretkenlikleri ile birlikte onları endüstriyel biyokataliz için ideal bir hale getirmiştir. Ancak, CLEC'lerin doğasında olan bir sınırlaması, yüksek saflıkta bir enzim gerektiren zahmetli ve masraflı bir prosedür olan enzimin kristalleştirilmesi ihtiyacındandır (St. Clair and Navia, 1992; Margolin, 1996).



Şekil 1.12 Enzimlerin çapraz bağlayıcı ajanlar ile etkileşimi (Yan et al., 2015).

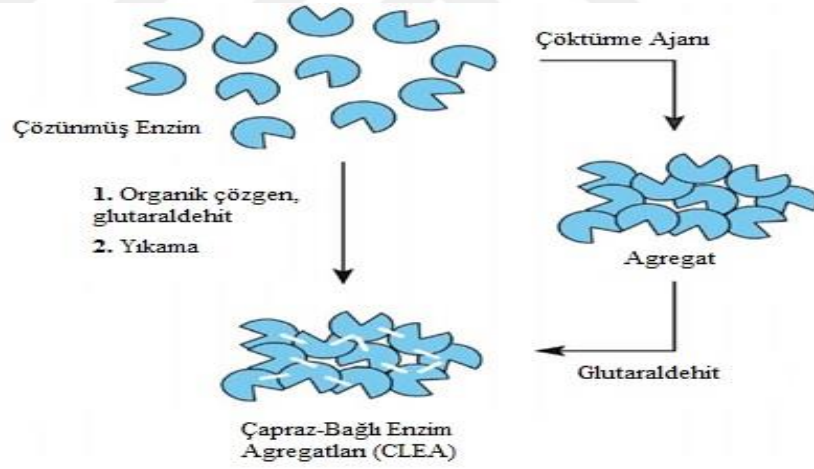
Geçen yıllarda kristalleşmenin belki de enzimin sulu tampondan çökeltilmesi, son derece saf enzim gerektirmeyen basit ve daha ucuz bir yöntemle



değiştirilebileceğini düşündürmüştür. Bu, çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA'lar) olarak adlandırılan, yeni bir immobilize enzim sınıfı geliştirilmesine yol açmıştır (Cao et al., 2000; Sheldon et al., 2005).

### 1.2.2.1 CLEA: Yöntem

Proteinlerin sulu solüsyonlarına tuz veya suda karışabilir organik çözücüler veya noniyonik polimerler eklenmesi, tersiyer yapısının bozulmasına yol açmadan kovalent olmayan bağ ile bir arada tutulan fiziksel agregatlar olarak çökmesine neden olur. Bu çökeltiye su ilavesi, enzimin çözünmesiyle sonuçlanır. Aksine, enzim yüzeyindeki reaktif grupların (örn. lizin artıklarının serbest amino grupları) glutaraldehit gibi bir bifonksiyonel ajan ile reaksiyona sokulmasıyla bu fiziksel agregatların çapraz bağlanmasını sağlar ve bu agregatlar katalitik aktivitelerini muhafaza ederek kalıcı olarak çözünmez hale gelirler. Çöktürme, enzim saflaştırması için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğu için, CLEA oluşumu esasen saflaştırma ve immobilizasyonu tek bir işlem halinde birleştirir (Şekil 1.13) (López-Serrano et al., 2002).



Şekil 1.13 Organik bir çözen içerisinde CLEA'nın hazırlanma işlemi (López-Serrano et al., 2002).

Glutaraldehit, genellikle ucuz olduğu ve ticari miktarlarda kolayca bulunabildiği için tercih edilen bir çapraz bağlayıcı ajandır. Yıllarca proteinler için çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır (Walt and Agayn, 1994; Wine et al., 2007). Lakin kimyası karmaşıktır ve tam olarak anlaşılammıştır (Walt and Agayn, 1994). Çapraz bağlama, komşu enzim moleküllerinin yüzeyi üzerindeki lizin artıklarının serbest amino gruplarının, glutaraldehydin aldol kondensasyonundan kaynaklanan oligomerler veya polimerlerin reaksiyonu yoluyla oluşur. Bu, Schiff baz oluşumunu ve  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehit parçalarına Michael tipi 1,4 ilave etmeyi gerektirebilir.

Çapraz bağlamanın derecesi karışımın pH' ına bağlıdır (Wine et al., 2007). Daha az karmaşık kimyayı içeren diğer dialdehitler de çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilir. Bazı enzimlerle örneğin nitrilazlarla bazen, glutaraldehit çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığında düşük veya hiç aktivite korunumu gözlemlenmemiş, ancak çapraz bağlayıcı olarak geri dönüşümsüz amin bağları oluşturmak için Schiff baz bölümlerinin sodyum borohidrür ile indirgenmesinin ardından dekstran polialdehid kullanılarak iyi aktivite geri kazanımı elde edilmiştir (Mateo et al., 2004). Galaktozun galaktoz oksidaz ile katalizlenmiş aerobik oksidasyonu ile oluşturulmuş olan galaktoz dialdehid de potansiyel bir protein çapraz bağlayıcı olarak önerilmiştir (Schoevaart and Kieboom, 2002).

Her enzim, farklı sayıda lizin kalıntısı sahip olan farklı bir molekül olduğundan, her enzimin çapraz bağlanma koşullarında farklı davranış göstermesini beklenir. Aslında, çapraz bağlanma az lizin kalıntıları içeren veya hiç bulunmayan enzimler ile etkisiz olabilir ve sulu ortamda kaçaklara karşı kararsız olan CLEA' lara yol açabilir. Bu sorunun üstesinden gelmek için başarıyla kullanılan bir yaklaşım, enzimin koagregatlarının polietilenimin gibi bir poliamin ile çapraz bağlanmasıdır (Lopez-Gallego et al., 2005).

Yukarıda da bahsedildiği gibi, CLEA yöntemi birçok çalışmada etkin bir şekilde kullanılmıştır. Çizelge 1.6' da enzim agregatlarının kullanıldığı çeşitli yaklaşımlar kısaca özetlenmiştir.

**Çizelge 1.6** Enzim agregat tipleri (Roy et al., 2017).

<b>Agregat Tipi</b>	<b>Özelliği</b>
<b>Çözünmeyen amorf kimyasal agregatlar</b>	Bu agregatlar oldukça yüksek aktiviteyi korurlar ve orta derecede yüksek sıcaklık ve yardımcı organik çözücüler gibi denatüre edici koşullar altında biraz daha gelişmiş kararlılık gösterirler.
<b>Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA)</b>	Bu yaklaşımda protein, çökelti formunda mevcut olduğunda çapraz bağlanır. Bu strateji, biyolojik aktivitenin daha yüksek düzeyde tutulması (çok sayıda örnekte % 100), parametrelerin (kimyasal agregat oluşumu, çapraz bağlayıcı miktarı, sıcaklık, pH ve iyonik kuvvet gibi birkaç faktör arasında hassas bir denge gerektirir) daha kolay kontrol edilmesiyle daha iyi tekrarlanabilirlik ve denatüre koşullara karşı daha yüksek mekanik stabilite ve kararlılık sunar.

Çizelge 1.6 Enzim agregat tipleri (Roy et al., 2017) (devam).

<b>Polimer katkı CLEA</b>	Enzimin polietilenimin (PEI) veya PEI-dekstran sülfat karışımlarıyla birlikte çökeltilmesi ile oluşturulur. Bu, enzimin aktivitesi, özgünlüğü ve enantioseçiciliğinde önemli değişiklikler meydana getirir. Bu yaklaşım, yüzeylerinde düşük sayıda lizine sahip enzimlerin CLEA' larının hazırlanması için kullanılabilir
<b>Proteik besleyici olarak sığır serum albumini (BSA) ile CLEA</b>	BSA ilavesi, enzim preparatındaki protein konsantrasyonunun düşük olduğu ve / veya enzim aktivitesinin, agregatlar elde etmek için gereken yüksek glutaraldehit konsantrasyonuna karşı savunmasız olduğu durumlarda, CLEA' ların elde edilmesini kolaylaştırır.
<b>Çapraz bağlı baskılı agregatlar (CLIP)</b>	Farklı çöktürücüler, geniş çapraz bağlanma ile "dondurulmuş" farklı enzim konformasyonlarına neden olur. Bu ilginç yaklaşıma çapraz bağlı baskılı (CLIP) yaklaşım denir.
<b>Kombi-CLEA</b>	Kombi-CLEA yaklaşımı, CLEA' yı çok basamaklı dönüşümler için çoklu enzim kompleksine dönüştürmeyi amaçlamaktadır.
<b>Çok amaçlı CLEA</b>	Bu yaklaşımda, CLEA, basamaklı olmayan reaksiyonları katalize etmek için birkaç enzim aktivitesi içerebilir.
<b>İçi boş fiber zarının melez biyoreaktörü ve lakkazın CLEA' ları</b>	Aromatik farmasötiklerin uzaklaştırılmasında atık su arıtımı için kullanılır.
<b>Kitosan kullanılan lakkaz CLEA</b>	Kitosan, karbodiimid birleşimi yoluyla enzimin karboksil grupları arasına sokulmak üzere bir uzatıcı olarak kullanılmıştır. Termal stabilite artmış, ancak kimyasal denatürasyona karşı stabilite sağlanılamamıştır.
<b>Çapraz bağlayıcı olarak rekombinant <i>V. spinosum</i> tirozinazının kullanımı</b>	Lizozim ve CAL B gibi kompakt globüler proteinlere fenol ilavesi, tirozinaz eklenerek CLEA' ların oluşumunu kolaylaştırmıştır.
<b>Hızlı PREP CLEA' lar</b>	N-asetil muramik asit-aldolaz CLEA' lar, karşılıklı bir bozucu (Hızlı PREP) dispersiyon halinde aldolaz aktivitesinde iki kat artış meydana getirmiştir.
<b>CO<sub>2</sub>-genişletilmiş misel çözeltilerinde sentez için CLEA' lar</b>	Trypsin, CO <sub>2</sub> ile genişletilmiş ters misel çözeltilerinde çökeltilmiş ve sonra dendritik CLEA' lar vermek üzere çapraz bağlanmıştır. Bu yöntemle elde edilen CLEA' ların aktivitesi geleneksel yöntemle elde edilenlere kıyasla geliştirilmiştir.

Çizelge 1.6 Enzim agregat tipleri (Roy et al., 2017) (devam).

<b><i>Rhodotorula glutinis</i>'ten fenilalanin amonyum liyazının melez CLEA' sı</b>	Fenilalanin amonyakının yeni melez manyetik çapraz bağlı enzim agregatları, enzim agregatlarının manyetik nanoparçacıklarının birlikte agregasyonu ve daha sonra glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla geliştirilmiştir. HM-PAL-CLEA' lar, harici bir manyetik alan kullanarak reaksiyon karışımından kolayca ayrılabilir.
<b>Mikro gözenekli silika jelde (MSG-CLEA' lar) fenilalanin amonyum liyazının CLEA' sı</b>	MSG-CLEA' lar, , sıcaklık ve denatürantlar gibi çeşitli deaktivasyon koşullarına karşı mükemmel enzim stabilitesini sergilemiştir ve aynı enzimin serbest PAL ve geleneksel CLEA' lara kıyasla daha yüksek depo kararlılığı göstermiştir.
<b>Alfa amilazın manyetik CLEA' ları</b>	Bunlar, enzim agregatlarının, manyetik alan kullanarak reaksiyon karışımından ayrılabilen amino işlevselleştirilmiş manyetik nanopartiküllerinin kimyasal çapraz bağlanmasıyla hazırlanmıştır. İlk aktivitenin % 100'ü manyetik CLEA' larda, buna karşın alfa amilaz CLEA' larında lizin artıklarının düşük olması nedeniyle sadece % 45'i bulunmuştur.
<b>3D düzenine sahip, makro gözenekli silika içine sıkışan CLEA' lar</b>	Lipaz, önce amonyum sülfat kullanarak silika gözeneklerinde çöktürülmüş ve daha sonra glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Bu CLEA' lar, mükemmel termal ve mekanik stabilite sergilemiş, organik ve sulu fazda 16 gün çalkalandıktan sonra başlangıçtaki aktivitenin % 85' inden fazlasını koruyabilmiştir.
<b>Ketoredüktaz ve D-glukoz dehidrojenazın kombi CLEA' ları</b>	Ketoredüktazlar tarafından katalize edilen değerli kiral alkollerin sentezinde kofaktör rejenerasyonu, bu CLEA' lar ile daha etkin bir şekilde mümkün olmuştur. Ketoredüktaz ve D-glukoz dehidrojenazın kombi-CLEA' ları, substrat etil 4-kloro-3-oksobütanoatın (COBE) tekrar tekrar etkin bir şekilde dönüştürülmesini sağlamıştır.

### 1.2.2.2 Optimizasyon protokolleri

CLEA preparatlarının optimizasyonu, sıcaklık, pH, konsantrasyon, karıştırma oranı, çöktürme ajanı, katkı maddeleri ve çapraz bağlayıcı ajan gibi değişken parametrelerin etkilerinin incelenmesini içerir. Çöktürücünün doğası, öngörülen şekilde aktivitenin iyileşmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve bu nedenle, polietilen glikoller (PEG' ler) gibi polimerlerin suda çözünebilir tuzların ve organik çözücülerin taranması gereklidir. Çöktürücülerin ilk taramasında, oluşan agregat miktarı belirlenir ve daha sonra sulu tamponda yeniden çözündürülür ve aktiviteleri ölçülür. Agregatlar, tamponda yeniden çözüldüklerinde tutulmayan, ancak çapraz bağlandıklarında korunacak olan, olumsuz bir konformasyonda enzim içerebilirler.

Dolayısıyla, çapraz bağlamada daha ileri tarama için iyi agregat verimi sağlayan birkaç çöktürücü ajan seçilmesi önerilir (Sheldon, 2011).

CLEA çöktürmesinin ilk aşamasında, enzimlerin fiziksel agregatlarının oluşumuna neden olacak çöktürücüler eklenir. Çöktürücüler ya inorganik tuzlar ya da organik çözücüler olabilir. Bunların birincisi, enzimlerin hidrasyon durumunu değiştirerek veya enzimlerin elektrostatik iticiliğini en aza indirerek çalışır (Burgess, 2009). İkincisi, ortamın dielektrik sabitinin azalması ve suyun organik çözücü tarafından kademeli olarak yer değiştirmesi nedeniyle protein etrafındaki çözgen tabakasının azalması nedeniyle çalışır (Aehle, 2007). CLEA' ların hazırlanmasında çok çeşitli çöktürücüler kullanılmıştır. Çizelge 1.7' de çapraz bağlanmadan önce ve sonra 12 enzimin enzim agregatlarının aktivitelere çöktürücülerin etkileri gösterilmektedir. Yüksek iyonik gücü, dielektrik sabiti ve hidrofilik özelliklerinden dolayı amonyum sülfat, asetonitril, tert bütül alkol ve polietilen glikol (PEG) en sık kullanılan çöktürücülerdir (Burgess, 2009). Buna karşılık, metanol, dimetilformamid (DMF) ve dimetil sülfoksit (DMSO) enzim aktivitesinin kaybına neden olmuştur (Schoevaart et al., 2004).

**Çizelge 1.7** Çözünmüş agregatların % 90 (v/v)' lık çöktürücü kullanıldıktan ve çapraz bağlandıktan sonra aktivitesi (Schoevaart et al., 2004).

Çöktürücü (90%)	CaLA	CaLB	TIL	RmL	GOx	GalOx	Lakkaz	$\beta$ Gal	Tripsin	ADH	FDH	Fitaz
1 Tampon	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 Metanol	3	64	43	21	0	3	0	0	89	0	2	19
3 Etanol	45	66	258	187	15	19	47	0	135	1	23	97
4 1-Propanol	48	30	1511	223	85	83	85	80	129	1	13	66
5 2-Propanol	43	77	169	95	104	100	99	82	144	6	55	93
6 tert-Bütül alkol	142	100	1779	934	116	107	139	99	148	13	90	88
7 Aseton	107	52	178	706	94	87	58	65	185	24	95	77
8 Asetonitril	100	75	561	428	116	93	27	88	151	21	84	79
9 DME	231	100	1013	561	113	88	78	79	142	7	50	95
10 Etil laktat	86	39	108	14	127	93	108	82	142	4	32	123
11 Doygun $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	101	131	113	133	101	74	139	83	186	100	88	52
12 DMF	6	72	62	58	1	1	0	0	85	0	0	19
13 DMSO	5	107	95	43	2	0	0	0	131	0	0	5
14 PEG	115	138	141	102	114	52	186	100	153	44	81	80
Çapraz bağlama sonrası	263	177	327	934	100	95	50	100	51	20	7	100

Lakkaz enzimi için, amonyum sülfat, tert-bütül alkol ve PEG iyi çöktürücüler olarak düşünülmüştür, çünkü lakkazın aktivitesi çöktükten sonra artmıştır. Öte yandan, DMF, DMSO ve metanol, lakkaz aktivitesinde önemli bir kayba neden oldukları için kötü çöktürücülerdir. Asetonitril çöktürücü olarak kullanıldığında, lakkazın yalnızca % 27' sinin etkin kaldığı kaydedilmiştir. Bununla birlikte, aynı

çöktürücü glukoz oksidazın (GOx) hiperaktivitesine (% 116) yol açmıştır. Amonyum sülfatta da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Lakkaz ve glukoz oksidazın agregatlarının aktivitelerinin % 139' u ve % 101' i kalmış, fitaz ve galaktoz oksidaz (GalOx) sırasıyla % 52 ve % 74 aktivite göstermişlerdir. Test edilen alkoller arasında tert-butil alkol, birçok enzim açısından CLEA oluşturmak için iyi bir çöktürücü olarak kabul edilebilirken, metanol çoğu durumda aktivitenin tamamen kaybına neden olmuştur. Metanol (% 18) ile tert-butil alkol (% 91) arasındaki aktivitenin farkı, metanolden (-0.69) (Hansch et al., 1995) tert-butil alkole (0.58) (Hansch et al., 1995) artan hidrofobiklik ve enzimlerin hidrasyon durumunun değiştirilmesi için azalan kapasite ile açıklanabilir. Enzimlerin hidrasyon durumundaki değişiklikler, enzimin konformasyonunu ve aktivitesini olumsuz bir şekilde etkileyebilir (Zhen et al., 2013).

Çözünmüş agregatların aktivitesinin, CLEA' larda immobilize enzimlerin korunmuş aktivitelerinden farklı olabileceği unutulmamalıdır. Çizelge 1.7' de gösterildiği gibi, çözülmüş agregat ve CLEA' larda ki enzimlerin korunan aktivitesinin düşmesi tüm örneklerde gözlenmiştir. Örnekler için, çözülmüş agregat ve CLEA' larda PEG ile çöken lakkazın aktiviteleri başlangıç aktivitesinin % 186' sı ve çapraz bağlama sonrası % 50' sidir. Benzer sonuçlar glukoz oksidazda (% 114 ve % 100) gözlenmiştir (Schoevaart et al., 2004).

Amonyum sülfat CLEA preparatları için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bazı çalışmalar amonyum sülfat ile çapraz bağlayıcılar arasındaki reaksiyonun katı agregatların oluşumunu durdurabileceğini bildirmiştir. Özellikle, Ribeiro ve Rabaça (2011), naringinaz çözeltisine amonyum sülfat ilave edildiğinde çökelti oluşmadığını bildirmiştir. Bu çözeltiye glutaraldehit ilave edildiğinde glutaraldehit ile amonyum sülfat ve / veya proteinler arasındaki reaksiyona bağlı olabilen sarıdan kahverengiye bir renk oluşmuştur. Şulek ve ark. (2011), amonyum sülfatın yaban turbu peroksidazı (HRP) çöktürmesinde etkin olmayan rolünü bildirmişlerdir. % 90 doygunluktaki amonyum sülfat ekledikten sonra agregat bulunamamış ve 3 saat inkübe edilmiştir.

Çöktürücülerin türüne ek olarak, çöktürücü konsantrasyonları CLEA' ların geri kazanım aktivitesini de etkiler. Agregat içindeki enzimlerin kalan aktiviteleri, çöktürme ve denatürasyon arasındaki rekabetin bir sonucudur. Çökme yavaş olduğunda enzim, yapısına uygulanan güçlü kuvvet nedeniyle denatüre edilebilir (Schoevaart et al., 2004). Çökme daha hızlı gerçekleşirse enzim supramoleküler yapıların oluşumu daha kolaydır ve enzimin denatürasyonu sınırlıdır. Çizelge 1.7,

enzimlerin çöktürülmesi için % 90 amonyum sülfat doygunluğu kullanıldığında, farklı enzimlerin CLEA' larının nispeten yüksek aktivitede kaldığını göstermiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, amonyum sülfat konsantrasyonunun CLEA' da glukoz oksidazın kalan aktivitesi üzerindeki etkisini vurgulamışlardır. Glukoz oksidazın aktivitesi, % 90 amonyum sülfat doygunlukları ile çöktürüldüğünde yüksek olmuştur. Aksine, düşük konsantrasyonda çöktürme (< %70 amonyum sülfat doygunlukları) kullanıldığında kısmi denatürasyon ve eksik çökeltme bildirilmiştir (Schoevaart et al., 2004).

Aytar ve ark. (2008), lakkaza çok benzer özelliklere sahip bir bakır bağlı oksidaz olan tirozinaz CLEA' sının oluşumunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında amonyum sülfatın, CLEA' da tirozinazın kalan aktivitesi üzerine etkisi rapor edilmiştir. Tirozinaz CLEA' sı yüksek amonyum sülfat konsantrasyonlarında neredeyse tüm aktivitesini korumuştur. Ayrıca, agregat morfolojisinde değişme olduğu bildirilmiştir. Düşük bir amonyum sülfat konsantrasyonunda (% 40 doygunluk), CLEA kaba taneli ve daha az yapılıyken, buna karşılık % 80 doygunlukta ince taneli ve daha gözenekli yapılar gözlenmiştir. Tükel ve ark. (2013), başka bir oksidoredüktaz olan katalaz üzerine çöktürücü konsantrasyonun etkisini bildirmiştir. Amonyum sülfat konsantrasyonunu % 50' den % 70' e artırarak, CLEA' daki katalazın etkinliği % 30 arttırılmıştır.

CLEA' larda enzimlerin kalan aktivitesi üzerinde organik solvent konsantrasyonunun etkileri de bildirilmiştir (Zhao et al., 2008; Kaul et al., 2007). Zhao ve ark. (2008), CLEA' da immobilize lipazın aktivitesinin artan aseton miktarına bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Kaul ve ark. (2007), artan çeşitli organik çözücü konsantrasyonları ile nitrilaz aktivitesinin artış gösterdiğini ve nitrilaz CLEA' sının izopropil alkol (% 85, v/v) kullanarak kendi doğal aktivitesinin % 95' ini koruduğunu belirlemişlerdir. Öte yandan, çöktürücünün lipaz parçacık boyutu üzerindeki etkisinin oluşum süreci, Yu ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Yu et al., 2006). Lipaz CLEA' sının parçacık boyutu amonyum sülfat fraksiyonundan etkilenmiştir. Genel olarak, daha yüksek konsantrasyonda bir çöktürücü kullanmak, enzimlerin konformasyonel değişimini sınırlar ve yüksek aktivite geri kazanımıyla birlikte tam agregasyon sağlar.

Çöktürme zamanı bu süreçte önemli bir parametredir. Bu parametrenin tam kontrol edilemediğinden bahsetmek gerekir. Örneğin, Matijošytė ve ark. (2010), çöktürücü maddeleri ve lakkaz çözeltisini 1 saat karıştırarak lakkazın çökeldiğini bildirmişlerdir. Canaba ve ark. (2007), lakkazın ve çöktürücülerin 16 saat inkübe

edildiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışma grubu bir çöktürücü ile yalnızca 2 saat inkübe ederek CLEA lakkazı oluşumunu bildirmiştir (Kumar et al., 2014). Bu gruptaki bir başka çalışmada, lakkaz, aseton ile 90 dakika karıştırılarak çöktürülmüştür (Arca-Ramos et al., 2016). Enzimlerin bir kaç saat organik çözücülere daldırılması enzim konformasyonlarında ve aktif alanların denatürasyonunda değişikliklere neden olabilir (Pchelintsev et al., 2009; Bidmanova et al., 2014). Şulek ve ark. (2011), aseton içine 40 dakika daldırma nedeniyle HRP aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Çöktürme koşullarını kontrol etmenin, daha küçük agregat elde edilmesine ve glutaraldehidin çöktürülmüş enzim kümelerine nüfuz etmesini azaltmasına ve aynı zamanda üniform CLEA parçacıklarının elde edilmesine yardımcı olabileceği önerilmiştir. Çöktürme süresinin kontrolü, hidrofobik çözücülerin neden olduğu enzim konformasyonunun değişimini korumaya yardımcı olabilir.

Özetle, farklı konformasyon ve özelliklerinden dolayı farklı enzimlerin CLEA preparatları için birkaç çöktürücü kullanılabilir. Organik solventlerin enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkileri hidrofobik özelliklerine bağlıdır. Hızlı çöktürme, enzimlerin denatürasyonunu tam agregasyon ile sınırlar. Sağlam ve aktif CLEA' lar için çöktürücülerin uygun şekilde taranması ve konsantrasyonlarının optimize edilmesi ve çöktürme süresinin uzatılması gereklidir. Şu anda, uygulanabilir çöktürücünün ve konsantrasyonunun seçimi genellikle ampiriktir (Schoevaart et al., 2004; Zhao et al., 2008; Aytar and Bakir, 2008; Tükel et al., 2013; Sheldon, 2011).

Çapraz bağlayıcı ile enzim arasındaki oran açıkça önemli bir faktördür. Oran çok düşükse, yeterli çapraz bağlanma meydana gelmez ve çözünmeyen CLEA' lar oluşmaz; eğer çok yüksek ise çok fazla çapraz bağlanma meydana gelir ve enzimin aktivitesi için gerekli esnekliğin tamamen kaybolmasına neden olur. Her enzim, çeşitli lizin kalıntılarını içeren eşsiz bir yüzey yapısına sahip olduğundan, optimum oran her enzim için belirlenmelidir (Sheldon, 2011).

Çapraz bağlayıcının enzime oranı, CLEA' ların parçacık boyutunun belirlenmesinde de önemlidir (Yu et al., 2006). Partikül boyutu, büyük ölçekli uygulamalar açısından önemli bir özelliktir; çünkü operasyonel koşullar altında doğrudan kütle transferi ve filtreleme özelliklerine etki eder. CLEA' ların tipik partikül boyutu 5-50 µm' dir ve filtreleme özelliği batch işlemler için genellikle yeterlidir. Bununla birlikte, bazı büyük ölçekli uygulamalar için, reaksiyonu, biyokatalizör dolu bir yatak üzerinde sürekli bir çalışma modunda gerçekleştirmek



gerekebilir. Bu, kolon üzerinde büyük bir basınç düşüşünden kaçınmak için nispeten büyük partiküller gerektirir. Artan partikül boyutu ve mekanik stabiliteye sahip CLEA' ların hazırlanmasına yönelik bir yaklaşım, bunları bir polivinil alkol matrisinde (Lentikats olarak adlandırılır) kapsüllemektir (Wilson et al., 2004).

CLEA' ların önemli bir avantajı, çok zayıf enzim ekstraktlarından, muhtemelen doğrudan fermantasyon ile elde edilen özütlerden hazırlanabilmesidir. Bununla birlikte, bazen düşük protein içerikli enzim preparatlarından CLEA oluşumunu sağlamak zordur. Bu gibi durumlarda, CLEA oluşumu, proteik besleyici olarak adlandırılan sığır serum albümini (BSA) gibi ikinci bir proteinin eklenmesiyle desteklenebilir (Shah et al., 2006).

Çapraz bağlama işleminin bir diğer önemli parametresi, CLEA' larda immobilize enzimlerin kalan aktivite oranını maksimuma çıkarmak için optimize edilmesi gereken çapraz bağlanma süresidir. Çapraz bağlanma süresinin, oluşan enzim preparatının mikroyapı yapısal düzenini ve enzimlerin katalitik özelliklerini etkilediği bulunmuştur (Şulek et al., 2011; Pchelintsev et al., 2009; Cui et al., 2012). Enzimler ve glutaraldehid arasındaki çapraz bağlanma süresi geniş bir aralıkta (birkaç saniye ile saat arasında) değişir (Migneault et al., 2004). Kısa çapraz bağlama süresinde yetersiz çapraz bağlanma ve kötü CLEA' nın operasyonel istikrarı gözlemlenmiştir. Düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda ve uygun bir çapraz bağlama zamanında, CLEA' lar kalan aktivitesini maksimum gerçekleştirebilirler. Daha yüksek bir çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile, verimli çapraz bağlanmayı elde etmek daha kısa zaman alabilir. Aşırı çapraz bağlanma, enzimlerin uzun bir çapraz bağlanma zamanı için aşırı glutaraldehid konsantrasyonu ile çapraz bağlandığı zaman gözlenmiştir (Talekaret al., 2013; Illanes et al., 2009; Zhenget al., 2011).

### **1.2.2.3 Çapraz bağlanmanın kimyasal doğası ve en fazla kullanılan çapraz bağlayıcılar**

Glutaraldehit (GA), CLEA' nın hazırlanması için en sık kullanılan çapraz bağlayıcı ajandır, çünkü yüksek dönüşüm etkinliği sağlar, bunun yanında düşük maliyetli ve pazarlanabilirliği yüksektir (Sheldon, 2011). Bununla birlikte, nitrilazlar gibi bazı enzimler, bu dialdehidi çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanırken aktivite geri kazanımı çok düşük veya hemen hemen sıfırdır (Sheldon, 2007). Mateo ve ark. (2004), büyük bir polialdehid molekülünü (dekstran polyaldehit) test etmiştir. Bu çapraz bağlayıcı ile oluşturulmuş CLEA, GA ile yaygın olarak

oluşturulanlara kıyasla daha yüksek aktivite (10-90 kat) sunmuştur. Dahası, GA ile çapraz bağlanmış nitrilazların CLEA' sını, aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Bu etki, proteinin içerisine girmeyi ve onun tersiyer yapısını yok etmeyi başaran ajanın küçük boyutuna (0.1 kDa) dayandırılır ve böylece aktivite tamamen kaybedilmiştir. İkinci etki, uzun zincirli bir polimer olan dekstran polialdehit (100-200 kDa) gözlenmemiştir. Bununla birlikte, daha az denatüre edici olmasına rağmen, dekstran polialdehit (DP) her zaman GA' dan üstün değildir. Valdés ve ark. (2011), GA ve DP ile çapraz bağlanmış *Burkholderia cepacia* lipaz PS' nin CLEA' sının aktivitesi, boyutu, stabilitesi ve yeniden kullanılabilirliğini karşılaştırarak, glutaraldehidin, daha küçük, düzgün çapraz bağlanmış, aktif, kararlı ve yeniden kullanılabilir biyokatalizörleri oluşturduğunu ve daha büyük dekstran polialdehid ile elde edilenlerden daha iyi olduklarını rapor etmişlerdir.

Diğer çapraz bağlayıcı ajanları GA' dan farklı bulan az sayıda çalışma mevcuttur. Bunların arasında, Mateo ve ark. (2004) ilk kez dekstran polialdehid kullanmışlardır. Miletić ve Loos, (2009) kullanılan diepoksitin çapraz bağlanma derecesi ve zincir boyutunun enzimin termostabilitesine bağlı olan farklı zincir uzunluğundaki diepoksitleri kullanarak CaL-B lipazın CLEA' sını hazırlamışlardır. Wang ve arkadaşları (2011), GA ile hazırlanan CLEA' ya kıyasla, *Geobacillus sp.* 'nin rekombinant lipazının çapraz bağlayıcı ajan olarak p-benzokinonun 50°C' de 90 dakika boyunca kullanılmasıyla termostabiliteyi beş kat arttırdığını bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar yüksek biyoyumlu peroksidaz ve üreaz-CLEA' sının hazırlanması için çapraz bağlayıcı olarak L-lizinin kullanılmasıyla elde edilmiştir (Ayhan et al., 2012). Bununla birlikte, tüm bu çapraz bağlayıcı maddeler, protein-amino grupları ile çapraz bağlayıcı maddelerin reaktif grubu arasındaki kovalent bağların oluşumuna dayanmaktadır. Talekar ve ark. (2014), pektinin glukoamilaz için GA' ya göre daha uygun bir çapraz bağlayıcı olduğunu göstermiş; GA-CLEA' ya kıyasla daha aktif ve kararlı pektin-CLEA elde etmiştir.

Başka bir çalışma da, lakkaz-CLEA' sını (Arsenault et al., 2011) için çapraz bağlayıcı olarak karboksille aktive edilmiş protein amino gruplarının kitosan ile çapraz bağlanması ve lipaz-CLEA için polietileniminlerin (Velasco-Lozano et al., 2014) çapraz bağlanmasıdır. Proteinlerin karboksil ile aktifleştirilmiş çapraz bağlanması, karboksil gruplarının amino gruplarına göre daha bol olması avantajına sahiptir. Böylelikle protein rijitliğinin ve termal kararlılığın artması ile daha yüksek kimyasal modifikasyon derecesine ulaşılır (Velasco-Lozano et al., 2014; Galvis et al., 2012).

Öte yandan, çapraz bağlama maddesinin konsantrasyonu, çapraz bağlanmanın derecesini düzenler ve bu nedenle, CLEA' nın son yapısını değiştirir; bu da CLEA' nın aktivitesini ve stabilitesini etkiler. Wilson ve ark. (2009), çapraz bağlama derecelerindeki fazlalığın, sefalesin üretimi için hazırlanan penisilin açılaz CLEA' larının verimliliğini, stabilitesini ve performansını düşürdüğünü bulmuşlardır. Majumder ve ark. (2008), *Pseudomonas cepacia* lipazının CLEA aktivitesinin, stabilitesinin ve enantiyoseçiciliğinin farklı GA konsantrasyonları kullanılarak önemli derecede modifiye edilebileceğini göstermiştir. Bulguları, daha yüksek bir çapraz bağlanma derecesinde CLEA' nın termostabilitesinde artış olduğunu göstermiş; bununla birlikte, aktivite ve enantio seçiciliği, enzim rijitliğinin yüksek derecesi nedeniyle tehlikeye girmiştir. Ayrıca, CLEA' nın morfolojisinin, konsantrasyonunu arttırarak artan çapraz bağlanma derecesine bağlı olduğunu ve daha düşük katalitik aktivite ile sonuçlanan molekülün rijitlik derecesini arttırdığını kanıtlamışlardır. Buna ek olarak çapraz bağlama zamanı ve sıcaklığı CLEA' nın nihai etkinliğinde de geçerlidir, çünkü daha uzun zamanlar (Cruz et al., 2012; Kim et al., 2013) ve yüksek sıcaklıklar (Arsenault et al., 2011; Yang et al., 2012) daha yüksek çapraz bağlanma derecelerine yol açar, dolayısıyla bu özelliği değiştirir. pH da, çapraz bağlama aşamasında önemli bir rol oynar, çünkü GA, ortamın pH koşullarına bağlı olarak monomerik veya polimerik formlarda olabilir. GA' nın alkali ve asidik koşullar altında çapraz bağlama aşamasında elde edilen reaksiyonun nihai ürünleri farklıdır (Wine et al., 2007); çünkü GA yüksek pH değerlerinde polimerize olma eğilimi gösterir (Valdés et al., 2011; Wilson et al., 2009). Ayrıca Yu ve ark. (2006), CRL' nin CLEA parçacığının boyutunun, pH' dan etkilendiğini ve alkalik ortamda daha büyük boyuta sahip olduğunu keşfetmişlerdir.

#### **1.2.2.4 CLEA' ların avantajları**

CLEA' lar endüstriyel biyokataliz bağlamında birçok ekonomik ve çevresel faydaya sahiptir. Ham enzim ekstraktlarından kolaylıkla hazırlanırlar ve taşıyıcı maliyetlerini (genellikle pahalı) önlerler. Genellikle ısı, organik çözücüler ve otoproteoliz ile denatürasyona yönelik geliştirilmiş saklama ve operasyonel kararlılık gösterirler ve sulu ortamda kaçırlara karşı kararlıdırlar. Üstelik, yüksek katalizör verimliliklerine (kg biyolojik katalizör başına ürün kg'mı) sahiptir ve kolaylıkla geri kazanılabilir ve geri dönüştürülebilirler. Yine başka bir avantajı, çoklu biyotransformasyonları bağımsız olarak veya katalitik kaskat işlemleri olarak katalizleyebilen CLEA' ları temin etmek üzere iki veya daha fazla enzimi birlikte harekete geçirme imkânı sağlamasıdır (Sheldon, 2011).

Tüm immobilize enzimlerde olduğu gibi, katı bir katalizörde difüzyonel sınırlamalar nedeniyle aktivite kaybı beklenebilir. Bununla birlikte, CLEA' lar oldukça gözenekli malzemelerdir ve organik sentezde kullanılan biyokatalitik dönüşümlerde bunları kullanırken herhangi bir difüzyonel sınırlama gözlemlenmemiştir. Buna karşın, kolorimetrik testlerde difüzyonel sınırlamalar gözlemlenmiştir ki genelde bu reaksiyonlar çok hızlıdır. Sonuç olarak, bu denemelere dayanan aktiviteler, CLEA' nın öngörülen biyotransformasyonda düşük bir aktiviteye sahip olduğuna dair yanlış sonuca yol açabilir. Açıkçası, yukarıda belirttiğimiz gibi difüzyon oranı da parçacık boyutundan (örneğin; çapraz bağlayıcı/enzim oranı) etkilenir. Optimum hızlar daha küçük parçacıklarla gözlemlenir, ancak pratik hususlar (örneğin filtrasyon kolaylığı) daha büyük parçacıkların kullanımını zorlar (Sheldon, 2011).

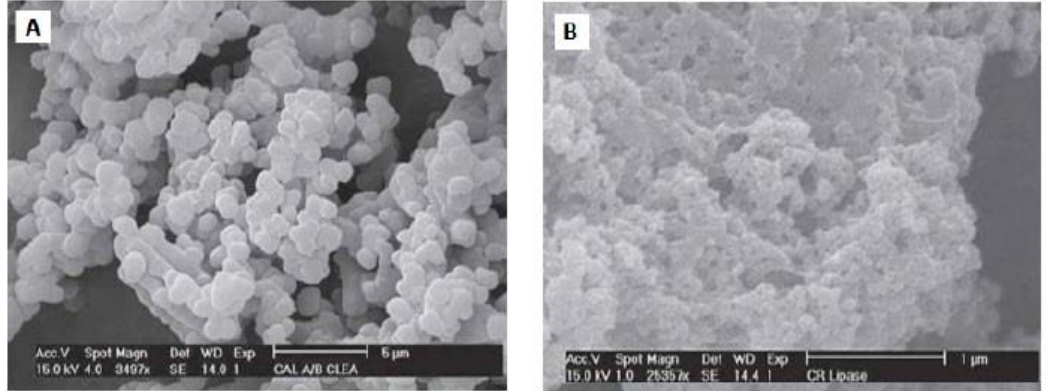
CLEA' nın büyük ölçekli uygulamaları için önemli bir özelliği, kütle transferi kısıtlamaları ve filtrelenebilirlik üzerinde doğrudan etkisi olan parçacık boyutudur (Sheldon, 2011). Tipik olarak, bir CLEA parçacık boyutu, 0.1-200 µm arasında değişir. Bununla birlikte, filtreleme ve santrifüj gibi iyileştirme işlemlerinin gerekli olduğu endüstriyel proseslerin uygulanması esnasında, partikül büyüklüğünün artması, kütle transferi sınırlamalarını teşvik eder ve dolayısıyla genel aktivitesinde azalma olur (Montoro-García et al., 2010). CLEA boyutunu belirleyen faktörler arasında, enzim miktarı ve çapraz bağlayıcının konsantrasyonu önemli rol oynamaktadır (Talekar et al., 2013). *Candida rugosa* lipazı CLEA' sı için, her iki parametre, biyolojik katalizörün nihai halini değiştirebilir ve bu enzimin laurik asit hidrolizinde optimum aktivitesi 40-50 µm partiküller ile elde edilmiştir (Yu et al., 2006).

CLEA, kütle transferi kısıtlamasını sunan "kümeler" olarak adlandırılan daha büyük boyuttaki (> 1 µm) agregatlar oluşturabilir. Gelecekteki çalışmalar, kümelenme oluşturma eğilimi az olan CLEA oluşumunu amaçlamaktadır. Son zamanlarda, karıştırma hızını ve zamanını arttırmanın, CLEA' yı büyütmezsizin kütle transferinde bir artış elde etmek ve serbest enzimin başlangıç aktivitesinin % 100' ünü geri kazanmasına izin verdiği için kümelenmelerin oluşmasını önlediği bildirilmiştir. Bu amaçla, karşılıklı hücre bozucu (FastPrep®) kullanılmıştır. Bir vorteksin kullanımıyla karşılaştırıldığında, FastPrep® kullanımı, sadece 30-60 sn muamele sırasında CLEA boyutunu azaltarak aktivitenin % 100' ünü geri kazandırır. Aksine, bir girdabın kullanılması başlangıçtaki aktivitenin % 80' ini geri kazanmak için 90 dakika boyunca karıştırma gerektirir (Montoro-García et al., 2010; Aytar and Bakir, 2008; García-García et al., 2011). CLEA' nın kütle

transferini artırmak için bir başka çaba, gözenek oluşturan ajan olarak nişasta ilave edilerek gözenekli CLEA'nın (p-CLEA) elde edilebildiğini kanıtlamıştır (Wang et al., 2011). Taşıyıcı içermeyen immobilize enzimlerin avantajlarına rağmen, araştırmacılar enzim agregatlarının boyutunu tam olarak nasıl kontrol edeceğini, esnekliklerini nasıl artırabileceğini, ayrıca kararlılığı, seçiciliği ve aktiviteyi modüle etmek için kesin metodolojileri bilmediğinden, bazı dezavantajları vardır (Cao et al., 2003). Ne yazık ki, en iyi performans için immobilize enzimlerin tasarımı hala büyük ölçüde deneyseldir ve detaylı karakterizasyon çalışmaları yoktur (Sheldon, 2007).

### 1.2.2.5 CLEA'ların sınıflandırılması

Morfolojilerine göre, CLEA şu şekilde sınıflandırılabilir: **Tip I.** Bu CLEA'ların çapı 1 µm civarında ölçülür ve CLEA başına  $8 \times 10^6$  enzim molekülü içeren ve küresel bir yapıya sahip agregatlar oluşturan CaL-B gibi büyük hidrofobik yüzeylere sahip düşük glikozillenmiş enzimlerden oluşurlar (Şekil 1.14A). **Tip II.** Çapı 0,1 µm'den az olan ve büyük hidrofilik yüzeyleri olan ve *C. rugosa* lipazları ve *Prunus amygdalus* oksinitrilazları gibi yüksek glikozilasyon seviyeleri olan enzimden oluşurlar. Bu tip CLEA'lar, CLEA başına yaklaşık  $8 \times 10^3$  enzim molekülü içerir ve hafif düzensiz şekillerde agregatlar olup tip 1' dekilerden daha küçüktürler (Şekil 1.14B) (Schoevaart et al., 2004).



**Şekil 1.14** CLEA morfolojisi. A) Tip 1, CaL-B'nin CLEA, amplifikasyon X3500; B) Tip 2, CRLA CLEA, amplifikasyon X25000 (Schoevaart et al., 2004).

### 1.2.3 CLEA teknolojisi ile enzimatik katalitik özelliklerin iyileştirilmesi

CLEA'nın nihai katalitik davranışından sorumlu birkaç faktör vardır. Bazı çalışmalar, bu gibi etkenleri tanımlama ve anlama çabalarını CLEA'nın teknoloji

hazırlığı üzerindeki etkilerine ayırmışlardır ve enzimlerin katalitik özelliklerini CLEA olarak immobilizasyon yoluyla geliştirmek için farklı stratejileri özetlemektedir (Talekar et al., 2013; Sheldon, 2011; Cui and Jia, 2015).

### **1.2.3.1 CLEA aktivitesinin geliştirilmesi**

CLEA aktivitesi, çöktürücü ajan, katkı, çapraz bağlayıcı, çapraz bağlanma süresi, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve çalkalama gibi bazı faktörlere bağlıdır. Çöktürme ajanları ve çöktürme koşulları, CLEA' nın hazırlanmasında hayati bir rol oynamaktadır. Enzimin daha aktif bir konformasyonunu indükleyebilirler (López-Serrano et al., 2002). Ancak, her enzimin kullanılan çöktürme ajanına vereceği tepki farklı olacağından, tüm enzimler için tek bir çöktürme ajanını genelleştirmek doğru olmaz (Sheldon, 2011).

Yapılan bir araştırma, CLEA hazırlığı sırasında, enzimlerin çökeltmesi ile çapraz bağlama aşaması arasındaki zaman süresinin, elde edilen enzim preparatının yapısal düzenini büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir. Bu farklı özelliklere bir örnek olarak, hem polietilenglikol (PEG6000) hem de GA ile çapraz bağlanarak çöktürülen penisilin açılazın (PA) (taze: çöktürmeden hemen sonra çapraz bağlanmış ve olgun: yedi gün 4°C' de bekletildikten sonra çapraz bağlanmış) CLEA' sı değerlendirilmiştir (Pchelintsev et al., 2009). Olgun CLEA' nın taze CLEA' ya göre daha büyük boyutlarda olduğu gözlenmiştir; ayrıca, kinetik çalışmalar, olgun CLEA' nın hem sentez hem de hidroliz reaksiyonlarında daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, agregatın büyüklüğünün PA' ın kovalent modifikasyonlarının derecesini düzenleyebileceğini ve bu nedenle de kendi CLEA' larının katalitik özelliklerini etkileyebileceğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, CLEA boyutunun da kullanılan çöktürücü tuzlarının türüne ve konsantrasyonuna göre değiştiği bulunmuştur (Yu et al., 2006; Aytar and Bakir, 2008). Çöktürücü ajanlar olarak kullanılan organik çözücüler, enzimler için denatüre edici olabilir. Bu tür maddelerin neden olduğu hasar, öncelikle çözücülerin proteine bağlı suyu uzaklaştırdığından, proteinin esnekliğindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. Bu sorunu çözmek için Wang ve ark. (2011), glikoz, trehaloz ve sukroz gibi şekerler varlığında çöktürmeyle CLEA' nın hazırlanmasını incelemiştir. Elde edilen CLEA birkaç denatüre edici çözügene karşı stabilize edilmiştir.

Öte yandan, çöktürme basamağında katkı maddeleri ilavesi değerlendirilmiştir. Triton X-100, sodyum dodesil sülfat ve crown (taç) eterlerinin kullanımının, CLEA aktivitesine etkisini gösterilmiştir (Schoevaart et al., 2004;

López-Serrano et al., 2002; Gupta et al., 2009). Triton X-100 eklenmesi, dimerler oluşturmaya eğilimli olan *T. lanuginosus* (TLL) gibi lipazların aktivitesini arttırırken, *Candida antarctica* B (CAL-B) lipazı, Triton X-100 varlığından pek fazla etkilenmemiştir (Wilson et al., 2006).

Yüzey aktif maddeler ve crown eterler gibi katkı maddeleri nedeniyle lipazların aktivasyonu genellikle hazırlanma aşamasında enzimin dondurulması ve daha aktif konformasyonuna atfedilmektedir (Theil, 2000). Katkı maddeleri enzimle kovalent olarak bağlanmadığından, sabit bir katalitik konformasyonda immobilize edilmiş enzimi bırakarak uygun bir organik solvent yardımıyla CLEA' dan kolayca yıkanabilirler (Sheldon, 2007).

Lizin içeriği az olan proteinlerden CLEA hazırlığı zorlaşır çünkü lizin kalıntıları, GA kullanıldığında çapraz bağlama aşamasında ana rol oynar. Bu problem, polilizin (Yamaguchi et al., 2011) ve polietilenimin (Wilson et al., 2006; López-Gallego et al., 2005) gibi primer amino grupları içeren polimerlerle proteinlerin çöktürülmesi ile çözülebilir; organik çözücüler ile protein arasındaki teması önleyen, pozitif yüklü bir mikro ortam oluştururlar ve bu organik çözücüler varlığında yüksek stabilite sağlarlar (Montes et al., 2007; Pan et al., 2011). Diğer bir alternatif ise, ilgili enzimin çapraz bağlanmasını gerçekleştirmek için protein ve amino gruplarının kaynağı olarak hizmet eden bir protein besleyici olarak sığır serum albüminin (BSA) kullanılmasıdır (Majumder et al., 2008; Shah et al., 2006). BSA varlığında hazırlanan CLEA' nın BSA olmadan hazırlananlara kıyasla katalitik doğal aktiviteyi daha yüksek oranda koruduğu bildirilmiştir. *P. cepacia* lipazı CLEA' sını elde etmek için BSA eklenmesi doğal aktivitesinin % 100' ünü elde etmekle birlikte, BSA yokluğunda aynı immobilize enzim sadece % 0.4' de kalmıştır (Shah et al., 2006). CLEA' nın hazırlanmasında BSA ilavesi, çapraz bağlamanın performansını, boyutunu ve esnekliğini ve CLEA' nın stabilitesini geliştirir (García-García et al., 2011; Velasco-Lozano et al., 2014; Cruz et al., 2012; Shah et al., 2006). Dahası, BSA' nın CLEA preparatına eklenmesi, proteolizi engeller, biyokatalizörün stabilitesini arttırır (Cabana et al., 2007).

CLEA hazırlanması esnasında spesifik substratlarla yapılan biyolojik baskı, daha aktif konfigürasyonun çapraz bağlanmasını destekleyen doğal enzim aktivitelerinin sürdürülmesini sağlar. L-fenilalaninin sentezi sırasında serbest enzime kıyasla daha aktif ve kararlı olan transsinamik asitlerle fenilalanin amonyak liyazı (PAL) için substrat destekli tedaviler uygulanmıştır (Cui et al., 2015). Üstelik substrat baskısı, trioktanoin ile baskılanmış lipaz CLEA' sını için gözlemlendiği

üzere, çapraz bağlantı basamağı esnasında aktif kalıntıların korunması için bir alternatif olabilir ve mevcut trigliserid bulunmadığında 2 kat daha aktiftir (Velasco-Lozano et al., 2014).

### **1.2.3.2 CLEA' nın stabilitesinin geliştirilmesi**

Genellikle, büyük ölçekli reaksiyon koşullarında düşük doğal enzim kararlılığı, endüstriyel biyoproselerle hızlı birleşmelerine engel olan temel dezavantajdır. Bu nedenle, çeşitli sert üretim koşullarında doğal enzimlerin dengelenmesi sağlanmalıdır. Sıcaklık ve pH, endüstriyel seviyedeki enzim aktivitesi üzerinde zararlı etkilere sahip operasyonel parametrelerdir. Dengeler oluşturan sıcaklıklara karşı enzim kararlılığı, molekülün rijitlik derecesine bağlıdır (Bommarius and Paye, 2013). Yani, molekül içi ve moleküller arası kovalent bağların sayısı arttıkça, termal kararlılık da artar. Bu nedenle, enzimlerin kovalent immobilizasyonu, sıcaklığa karşı büyük ölçüde enzimin stabilizasyonu ile ilişkilidir. Termostabilizasyona ilişkin birkaç örnek, farklı enzimlerin CLEA olarak immobilizasyonu ile tanımlanmıştır (Kartal et al., 2011; Arsenault et al., 2011; Galvis et al., 2012; Dong et al., 2010). CLEA hazırlanması sırasında, çapraz bağlanma zamanının, çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun ve çapraz bağlayıcı tipinin etkisi, nihai CLEA' nın termostabilizasyon etkisinde doğrudan yer alır. Termostabilite CLEA eldesi için kullanılan çöktürücü ajanın türüne de bağlı olabilir. Tert-butanol ile çökelen penisilin G açılaz CLEA' sının termostabilitesi DME ve PEG ile elde edilenden daha yüksek bulunmuştur (Kopp et al., 2014). Öte yandan, CLEA' nın PEI varlığında (katkı maddesi veya çapraz bağlayıcı olarak) hazırlanması, lipaz CLEA' nın termal stabilitesini artıran yararlı etkiler ortaya koymuştur (Velasco-Lozano et al., 2014; Yan et al., 2012).

Doğal enzimlerin diğer bir zayıflığı da, yüksek substrat ya da ürün konsantrasyonlarının olumsuz etkisidir. CLEA' nın yaklaşımı, substrat veya ürün inhibisyonunu azaltmak için etkili bir araç olarak kullanılmıştır. Cui ve ark. (2015), transsinamik asitler ile baskılanmış fenilalanin amonyak liyazı CLEA' sının substrat inhibisyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Sıcaklık ve substrat / ürün inhibisyonunun yanı sıra asit veya alkali koşullar, enzim stabilizasyonunda önemli konulardır. Enzimler belli pH aralıklarında daha aktiftir ve belirli bir pH değerinde maksimum aktivite gösterir. Bununla birlikte, birçok hidrolitik ve sentetik reaksiyonlar, enzimleri sıklıkla denatüre edecek asidik veya alkali koşullar gerektirir, dolayısıyla doğrudan uygulamalarını engeller.



CLEA immobilizasyonu ayrıca enzimlerin daha geniş bir pH aralığında stabilitesini arttırmak için başarıyla kullanılmaktadır. Örneğin, *Brassica rapa'* dan izole edilen peroksidaz CLEA' sı, serbest enzimle karşılaştırıldığında asitlik koşullarında daha yüksek aktivite göstermektedir (Tandjaoui et al., 2015). Öte yandan, glutamat dekarboksilazın alkali değerlerinde stabilitesinin artırılması, reaksiyon sırasında pH artışı ile karakterize edilen  $\gamma$ -aminobütirik asit üretimine izin verir (Dinh et al., 2015). L-fenilalanin sentezi sırasında fenilalanin liyazın CLEA' sında da benzer bir etki gözlenmiştir (Cui et al., 2015).

Klibanov, hidrolitik enzimlerin organik çözücülerde çok sayıda sentetik reaksiyonu katalize ettiğini gösterdiğinden, bilim adamları denatüre edici çözücülerin bulunduğu dengeli biyokatalizörleri yoğun bir şekilde araştırmaya başlamışlardır. Bu alandaki CLEA teknolojisi, solvante dirençli enzimatik biyokatalizörleri sunma konusundaki yetkinliğini de doğrulamıştır (Sheldon et al., 2013; Sheldon, 2012). CLEA hazırlanması sırasında PEI gibi yüklü polimerlerin eklenmesi, çözücü ve dengesizliğe karşı koruyucu etkiye sahiptir, çünkü çözücünün ve enzimin temasını engeller (Wilson et al., 2006; Pan et al., 2011; Vaidya et al., 2012).

Endüstriyel biyokatalizörler de yüksek depolama kararlılığını gerektirirler. Bu amaca yönelik olarak, CLEA, enzimlerin yüksek saklama koşullarını sağlamış olduğunu göstermiştir. Örneğin, amiloglukozidaz-CLEA' sı, 60 gün sonra 4°C' de başlangıç aktivitesinin % 98' ini muhafaza ederken, serbest enzim aynı depolama koşullarında 5 gün sonra başlangıç aktivitesinin % 50' sinden fazlasını kaybetmiştir (Gupta et al., 2015). Dahası, deniz boyalarında uygulanan proteaz-CLEA' sı, bu tür oksitleyici koşullarda 28 günlük depolamadan sonra % 900' lük bir aşırı aktifleşme sergileyerek stabilize edilmiştir (Skovgaard et al., 2010). CLEA' nın yüksek depolama kararlılığının diğer iyi örnekleri de literatürde ele alınmıştır (Martínez et al., 2014; Park et al., 2013).

### **1.2.3.3 CLEA' nın seçiciliğinin geliştirilmesi**

Enzim seçiciliği, değerli bileşiklerin hazırlanmasında enzimlerin güçlü araçlar haline gelmesini sağlayan çekici katalitik özelliklerden biridir. Dolayısıyla, arzu edilen seçiciliğin modifikasyonu ve modülasyonu, bilimsel topluluğun asıl amacıdır. Sheldon, CLEA tarafından katalize edilen, lipazlar, proteazlar, amidazlar, esterazlar, nitrilazlar, peroksidazlar ve nitril hidratazın enantioselektif asimetric sentetik çözümlüklerini özetlemiştir (Sheldon, 2012). Enzim seçiciliğindeki

gelişme, birkaç faktöre bağlıdır. Özellikle Majumder (2008), GA konsantrasyonunun *P. cepacia* lipazı CLEA' nın aktivitesini, kararlılığını ve enantioseçiciliğini farklı şekilde etkilediğini ortaya koymuştur.

Biyokatalizörün seçiciliği, CLEA' nın hazırlanması sırasında katkı maddelerinin kullanılması ile de etkilenir. Wilson ve arkadaşları (2006), polietilenimin ve dekstran sülfat varlığında *Alcaligenes sp.* lipazının CLEA enantioseçiciliğini çöktürme ajanları olarak değerlendirmişler; Triton X-100 ilavesi glisidil butirat hidrolizinde aktiviteyi ve enantioseçiciliğini değiştirir. Dahası, lipaz-CLEA' sı hazırlaması sırasında BSA eklenmesi, S-mandelik asidin hidrolitik çözünürlüğü sırasında enzim enantioseçiciliğine belirgin bir etki göstermiştir (Velasco-Lozano et al., 2014). Dahası, yakın zamanda *Yarrowia lipolitica* lipazının manyetik-CLEA' sının enantioseçiciliğinin ve aktivitesinin S-2-oktanolün çözünmesi sırasında alternatif bir manyetik alan tarafından büyük oranda etkilendiği bildirilmiştir. Bu son etki çoğunlukla mikroskopik karıştırıcılar olarak manyetik-CLEA' nın davranışına dayandırılmıştır (Liu et al., 2015).

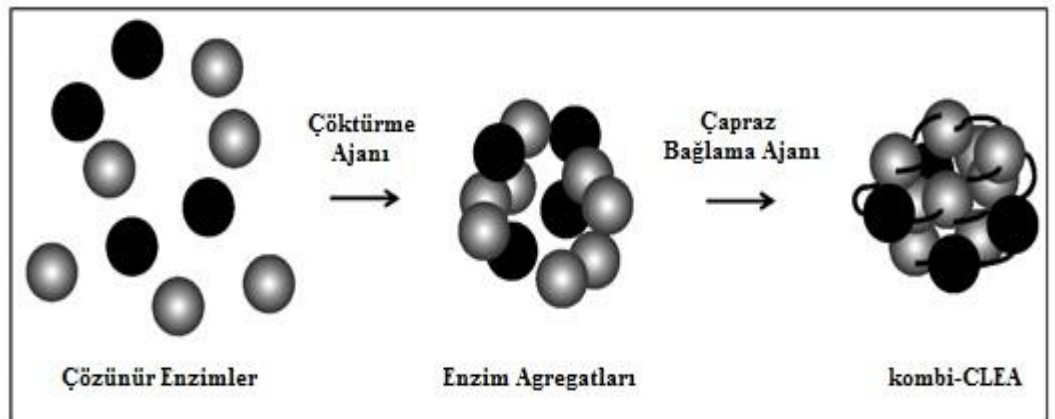
#### **1.2.3.4 Enzim depo kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin geliştirilmesi**

Depo kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik, enzimlerin endüstriyel uygulamalarını genişletmek için ana zorluklardır. Birçok çalışma, CLEA' ların stabilitesinin arttığını bildirmiştir. CLEA' ların tekrar kullanılabilirliği, immobilize pahalı enzimlerin reaksiyon ortamından ayrılmasını kolaylaştırmak için önemli bir diğer nedendir. Daha iyi kararlılığın başlıca nedeni, enzim disosiyasyonunu önleyerek ve yapılarını stabilize eden enzim molekülleri arasında oluşan CLEA' ların ve birbiri arasındaki kovalent bağların sonucunda enzimlerin agregat içinde çapraz bağlanmasından kaynaklanabilir (Sheldon, 2011; Sheldon et al., 2005; Park et al., 2012; Vinoth Kumar et al., 2012). Örneğin, zayıf operasyonel kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik nedeniyle, azo boyalarının giderilmesinde serbest lakkazın uygulanması ekonomik olarak uygulanabilir değildir. Lakkazın CLEA olarak immobilizasyonu literatürde gösterildiği gibi operasyonel stabiliteyi ve tekrar kullanılabilirliği arttırmak için potansiyel bir çözümdür (Fernández-Fernández et al., 2013).

### 1.2.4 Multi-CLEA' lar ve kombi-CLEA' lar

İlave proteinler, çöktürme ve çapraz bağlanma yoluyla CLEA' lara dâhil edilebilir. Bu düşünce, birden fazla enzim içeren ham enzim ekstraktlarıyla çok amaçlı CLEA' ların oluşturulmasına neden olur. Örneğin, Gupta ve arkadaşları, lipaz, fosfolipaz A2 ve R-amilaz aktivitesi içeren domuz pankreatik aseton tozu ekstraktından bir CLEA hazırlamışlardır. Her üç enzim aktivitesi CLEA' da tamamen tutulmuş ve R-amilaz kayda değer bir aktivite kaybı olmaksızın 3 kez yeniden kullanılmıştır (Dalal et al., 2007). Benzer şekilde, pektinaz, ksilanaz ve selüloz aktiviteleri sergileyen çok amaçlı bir CLEA, ticari preparat Pectinex Ultra SP-L'den hazırlanmıştır. Bu çok amaçlı CLEA, üç bağımsız reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için kullanılabilir: poligalakturonik asit (pektinaz aktivitesi), ksilan (ksilanaz aktivitesi) ya da karboksimetil selülozun (selüloz aktivitesi) hidrolizi. Üç enzimle birlikte CLEA, serbest enzimlere kıyasla artan termal kararlılık sergilemiştir ve aktivite kaybı olmaksızın üç kez kullanılabilmiştir. Bu tür CLEA' lar, farklı enzim gruplarından oluştukları ve bağımsız olarak farklı biyotransformasyonların gerçekleştirilmesi için kullanılabilirler için Multi-CLEA ismini alırlar (Dalal et al., 2007).

Öte yandan, sırayla iki veya daha fazla biyotransformasyonu, yani multienzim kaskat proseslerini gerçekleştirmek amacıyla, tek bir CLEA' da iki veya daha fazla enzimin kasıtlı ortak harekete geçirilmesi de öngörülmüştür. Bu tür katalizörlere de kombi-CLEA (Şekil 1.15) adı verilmektedir (Ahumada et al., 2016).



Şekil 1.15 Kombi CLEA oluşumu (Ahumada et al., 2016).

### 1.2.5 Kaskat reaksiyonlarında kombi-CLEA

Günümüzde, kaskat reaksiyonları, ayrı işlemler yerine tek bir adımda yürütülebilen çok basamaklı reaksiyon işlemlerinin hazırlanması için avantajlı bir yaklaşımı temsil etmektedir (Muschiol et al., 2015). İmmobilize çoklu enzimatik sistemler, kararsız ara ürünlerin birikiminden kaçınılması, ikincil istenmeyen reaksiyonların azaltılması, çoklu kaskat reaksiyon proseslerinin başarılanması ve kofaktörlerin *in situ* yenilenmesi gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Garcia-Galan et al., 2011). Birden fazla tipte enzim içeren kombi-CLEA' lar üretmek için benzer stratejiler kullanılır. Kombi-CLEA, kaskat reaksiyonlarında S-mandelik asit ve çok amaçlı tepkimeler içeren proseslerde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Chmura et al., 2013; Mateo et al., 2006). Bunların örnekleri, aynı anda üç aktiviteyi içeren pektinaz, ksilanaz ve selülozun kombi-CLEA' sı ve alkil ferülatların üretimi için çeşitli feruloil esterazların kombi-CLEA' sıdır (Vafiadi et al., 2008). Ayrıca, kombi-CLEA yaklaşımı, sıcaklık ve kimyasal denatürasyonun sert koşullarında yüksek kararlılık sergileyen lakkaz ve tirozinaz esaslı CLEA' nın birleştirici etkisi ile atık sularda asetaminofenin biyolojik olarak parçalanması için de uygulanmıştır (Ba et al., 2014).

Bazı çok aşamalı reaksiyonlar, sıklıkla, bozunumlarını önlemek için korunması gereken kararlı ara ürünlerin oluşumunu gerektirirler. (S)-hidroksinitril liyaz ve bir nitrilazdan oluşan kombi-CLEA, bu tür uygulamalara mükemmel örneklerdir. Bu kombi-CLEA, (S)-2-hidroksikarboksilik asit amidlerin iki kademeli kaskat sentezinde uygulanmıştır; nitril dönüştürücü enzimin korunmasıyla (van Pelt et al., 2009), (S)-2-hidroksinitril ara maddesinin rasemizasyonunun önlenmesi gerekir. Son biyolojik dönüşüm de katalizör olarak bütün hücreler ile gerçekleştirilmiştir; bununla birlikte kombi-CLEA stratejisi, uygun çözücüde (diizopropileter) daha yüksek kararlılık sunmuş ve tüm hücrelere göre daha kolay bir geri dönüşüm biyokatalizatörüdür (van Rantwijk and Stolz, 2015).

### 1.2.6 Reaktör tasarımı

Farmasötik ve hassas kimyasal endüstrilerinde immobilize enzimlerin uygulanması, genellikle, filtreleme veya santrifüjleme ile iyileştirme içeren toplu işlemler içerir. Diğer endüstrilerde (örn. sıvı ve katı yağ işlenmesi), sürekli işlemlerde daha çok kural vardır ve immobilize enzimler dolgulu yatak reaktörlerde kullanılır. Bu genellikle kolon üzerinde büyük bir basınç düşüşünü önlemek için oldukça büyük parçacıklar gerektirir. Bununla birlikte, büyük parçacıkların

kullanılması difüzyon sınırlamalarına yol açabilir, bu da daha düşük reaksiyon oranına neden olur ve bu nedenle bir uzlaşma bulunması gerekir (Sheldon, 2011).

Bir alternatif, nispeten yoğun olması gereken çok küçük parçacıkları içerebilen bir akışkan yatak kullanmaktır. Aksi takdirde kolondan atılırlar. Fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküllerin varlığında çapraz bağlamayı gerçekleştirerek manyetik CLEA' lar son yıllarda geliştirilmiştir. Ortaya çıkan manyetik CLEA' lar manyetik dekantasyon ile ayrılabilir veya manyetik olarak stabilize edilmiş bir akışkan yatakta kullanılabilir (Sheldon, 2011).

### **1.2.6.1 Membran bulamaç (slurry) reaktörü**

Alternatif olarak, Membran Bulamaç Reaktörü (MSR) kullanılabilir. Burada CLEA reaktörde tutulur, zira membranın gözeneklerinden geçmek için çok büyüktür. Tersine, substrat ve ürün reaktör içine ve dışına pompalanabilir. Küçük ve / veya geniş parçacık boyutu olan CLEA' lar kullanılabilir, böylece yüksek reaksiyon oranlarının bir araya getirilmesinin kolaylaştırılması mümkündür. Bu aynı zamanda işlem koşullarının daha iyi kontrol edilmesini sağlar, akış proses adımlarını ortadan kaldırır ve biyokatalizörün son derece verimli bir şekilde kullanılmasını sağlar. Yüksek katalizör yüklemeleri mümkündür, bu da zaman-zaman verimin yüksek olmasına neden olur. Prensip olarak, sürekli veya batch olan standart karıştırılmalı tank reaktörleri, yalnızca küçük değişiklikler uygulayarak bir membran bulamaç reaktörüne dönüştürülebilir ve piyasada birçok ucuz, boyut seçici membran mevcuttur ve MSR' de kullanılabilir (Sorgedraeger et al., 2008).

MSR' nin yüksek katalizör yükleme kapasitesinden faydalanılarak CLEA' ların hazırlanma kolaylığı ve reaktör içindeki katalizörün tutulması, endüstriyel ölçekte sürekli biyotransformasyonların gerçekleştirilmesi için çok uygun maliyetli bir sistem sunar (Sheldon, 2011).

### **1.2.6.2 Mikrokanal reaktörlerinde CLEA**

Mikroreaktör teknolojileri, hassas kimyasalların üretimi için hızla popülerlik kazanmaktadır (Roberge et al., 2008). Başlıca yararları, klasik reaktörlere kıyasla hacim oranlarına göre çok daha büyük yüzey alanının bir sonucu olarak son derece etkili bir ısı alışverişi ve kütle transferinin olmasıdır. Mikrokanal enzim reaktörleri ayrıca biyotransformasyonların hızlı taranmasını ve optimizasyonunu sağlayabilir. Sonuç olarak, enzimin immobilize edilmesini gerektiren mikrokanal enzim

reaktörlerinin uygulanmasına hızla artmakta olan bir ilgi vardır, ya enzim ayrı ayrı ya da mikrokanal yüzeyine eklenmiştir (Miyazaki and Maeda, 2006; Thomsen et al., 2007).

### 1.2.7 Katı matrisler ve nanopartiküllerle CLEA' nın birleştirilmesi

Taşıyıcı içermeyen immobilize enzimler, düşük mekanik stabilite ve sert karıştırma koşulları sergilediğinden, endüstriyel seviyelere henüz tam olarak ölçeklenemediği için dezavantaja sahiptir (Talekar et al., 2013; Cui and Jia, 2015; Wilson et al., 2004).

CLEA' nın mekanik stabilitesini arttırmak amacıyla, polimer ve matrislerde bunların stabilitesini arttırmalarını sağlayan çeşitli araştırma grupları, bunların kapsüllenmesi, kaplanması ve tutuklanması üzerinde çalışmışlardır. Moon ve ark. (2007) kimotripsin ve *Mucor javanicus* lipazı CLEA' sını hazırlamışlar ve bunlar hiyerarşik olarak sıralı gözenekli mezo-gözenekli bir mezosellüler silika matrisinin (HMMS) gözeneklerinde sıkışmışlardır. Bu malzeme 37 nm boşluklara sahiptir ve burada CLEA, GA ile çapraz bağlandıktan sonra tutulur ve dışarı çıkamaz; çünkü bu küçük deliklerin her biri, CLEA' nın geçemediği ve gözeneklerde tutulduğu 13 nm çapındaki kanallarla birleştirilmiştir. Bu tip tutuklama ile, 200 rpm' de 2 hafta karıştırılan CLEA' nın stabilitesinin artırılması mümkün olmuş ve bu da kimotripsin otolizinin inhibisyonunu engellemiştir (Moon et al., 2007).

Benzer bir şekilde, penisilin açılaz CLEA' ları, organik çözücüler içinde oldukça kararlı olduğu ortaya çıkan polivinilalkol (LentiKats®) sert polimer matrisinin bir hidrojelinin içinde kapsüllenmiştir; mekanik karıştırma işleminde 50 gün boyunca aktivitesinin % 95' ini 20°C' de muhafaza etmiştir (Wilson et al., 2004).

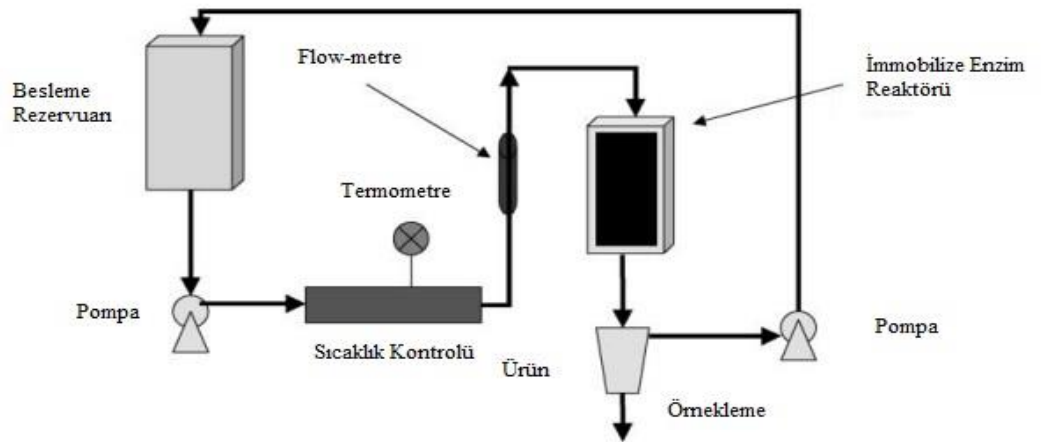
Farklı bir alternatif, CLEA' nın amino-fonksiyonlu manyetik nanopartiküller (manyetik-CLEA) ile çapraz bağlanması yoluyla (Talekar et al., 2016) veya manyetik parçacıklardaki enzimlerin doğrudan çapraz bağlanmasıyla (CLEMPA) stabilizasyonudur (Tudorache et al., 2013). Bu tür yapılar, biyolojik katalizörlere daha yüksek operasyonel kararlılık, daha kolay ayırma ve tekrar kullanma gibi iyileştirmeler sağlarken, CLEA' ların da yığınlaşmasının önüne geçilmektedir (Cui and Jia, 2015). Ayrıca CLEA manyetik boncuklara manyetik kaplamalı mezo-gözenekli silika olarak çapraz bağlanmış ve 35 gün boyunca çalkalandıktan sonra

başlangıçtaki aktivitelerini sürdürmüş ve biyokatalizör 35 kez tekrar değerlendirilebilmiştir (Lee et al., 2009).

CLEA formundaki immobilizasyon teknolojisi birçok ve çeşitli enzimlere başarıyla uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır, endüstriyel biyokatalizörlerin araç kataloğu için yeni bir seçenek haline gelmiştir. Bu alanda, hareketsizleştirilmiş agregatların tutulduğu yüzeyler ve ürünler reaktörden pompalanan membranlar gibi bazı reaktör konfigürasyon tipleri önerilmiştir (Hilal et al., 2004; Sorgedraeger et al., 2008). Ayrıca, sürekli reaktörlerde CLEA kullanılmıştır (Wilson et al., 2008).

### 1.2.8 Sürekli proseslerde CLEA' lar

CLEA' lar, paket yataklı reaktörlerde, perfüzyon sepeti reaktörlerinde ve membran reaktörlerde biyokatalizör olarak kullanılabilir (Şekil 1.16). Bu proseslerde enzimlerin inhibisyonu, membranlar kullanılarak reaktörlerden reaksiyon ürünlerinin yerinde çıkarılmasıyla azaltılabilir (Sorgedraeger et al., 2008; Xu et al., 2012). CLEA' lar serbest enzimlere göre daha büyük olduğundan, inhibitörler reaktörlerden uzaklaştırılırken reaktörlerde etkin bir şekilde tutulabilirler (Taboada-Puig et al., 2011; Ba et al., 2013). Örneğin, Cabana' nın grubu (Cabana et al., 2007, 2009) nonilfenol, triklosan ve bisfenol A' nın % 95' inden fazlasını ortadan kaldırmak için *Corioloopsis polyzona*' dan bir akışkan yataklı reaktörde (Cabana et al., 2007) ve bir perfüzyon sepet reaktöründe (Cabana et al., 2009) lakkaz CLEA' sının immobilizasyonunu bildirmiştir. Ardından, bu grup, atık sularda aromatik bileşiklerin sürekli bozunması için hibrid biyoreaktör ve mikrofiltrasyon membranında immobilize CLEA lakkazının kullanılmasını göstermiştir (Ba et al., 2014).



Şekil 1.16 Enzimatik reaktör sisteminin genel şematik diyagramı (Zhou and Chen, 2001).

Taboada-Puig ve ark. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada bisfenol A' nın uzaklaştırılması için zar içerisinde çok yönlü peroksidaz ve glukoz oksidaz kombi-CLEA' ları immobilize edilmiştir. Kombi-CLEA' lı bu membran reaktörü 43 saat boyunca sürekli olarak çalıştırılmış ve % 90 oranında bisfenol A çıkarılmıştır. Hilal ve ark. (2004), lipaz CLEA' sının mikro gözenekli polimerik zara gömülmesini bildirmiştir. Bu membran reaktörü CLEA aktivitesinde herhangi bir kayıp olmaksızın 2 hafta boyunca çalıştırılmıştır. Son olarak, Sorgedraeger ve ark. (2008) penisilin amidaz CLEA' sının bir membran bulamaç reaktöründe Penisilin G' nin 6-amino penisilanik asite sürekli hidrolizi için yaklaşık % 75-85' lik bir verimle kullanımını bildirmiştir.

### 1.2.9 $\alpha$ -Galaktozidazlar ve CLEA teknolojisi ile ilgili gelecekte beklenenler

Biyoteknolojik uygulama alanları nedeniyle  $\alpha$ -galaktozidazlar oldukça değerli ve önemli bir enzim grubudur.  $\alpha$ -Galaktozidazların en önemli uygulama alanlarından birisi şeker endüstrisidir. Şeker endüstrisinde, şeker pancarı veya şeker kamışından çıkılarak sakkaroz üretimi yapılmaktadır. Üretim sırasında kristallendirme adımından önce şurup % 0,1 oranında rafinoz içermektedir. Rafinoz, D-galaktoz, D-glukoz ve D-fruktozdan oluşmuş bir trisakkarittir. Sukroz, Steffen prosesi ile melastan geriye kazanıldığında proses buharında rafinoz içeriği artar. Konsantrasyon % 4-5' e ulaştığında sükroz kristalizasyonu büyük ölçüde engellenir ve sükroz verimi önemli oranda azalır. Bu problem rafinozun  $\alpha$ -galaktozidaz enzim ile hidroliziyle çözülmekte ve büyük bir ekonomik yarar sağlanmaktadır (Önal, 2000).

İmmobilizasyon işlemi enzime kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, kolay uygulanabilirlik ve maliyet açısından avantaj sağladığı için immobilize enzimler endüstriyel proseslerde tercih edilmektedirler. Ayrıca immobilize enzim, gıdaların alerjik etkilere neden olabilecek enzimlerce (proteinler) kontamine olmasını engellemektedir. Çapraz bağlanmış enzim agregatlarının (CLEA' lar) hazırlanması pek çok avantajı ve sadeliği nedeniyle son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. CLEA teknolojisi hem saflaştırma hem de immobilizasyonu tek aşamalı bir işleme dönüştürür ve oldukça saf enzimlere ihtiyaç duymaz (Yusof et al., 2016). Literatürde daha önce  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile yapılmış CLEA çalışması bulunmamaktadır.  $\alpha$ -Galaktozidazın yukarıda saydığımız avantajlarının yanı sıra, CLEA ile immobilizasyonu sonucu kararlılığındaki gelişmeler de göz önüne alındığında, özellikle şeker endüstrisi başta olmak üzere birçok sanayi kolu için etkin bir preparat hazırlanacağı beklenmektedir. Elde edilecek sonuçların  $\alpha$ -



galaktozidaz ve CLEA alandaki mevcut literatürlere olumlu yönde katkı yapacağı ve hayata geçirilebilir olacağı düşünülmektedir.

Geniş çaplı immobilizasyon teknikleri içinde, çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlığın basitliği, düşük üretim maliyeti ve hızlı optimizasyon ve pazarlama süresinin kısılması gibi cazip avantajlar sunmaktadır. Yüksek aktivite geri kazanımı, düşük veya hiç alerjeniklik, gelişmiş termal kararlılık, organik çözücülere karşı daha iyi tolerans ve proteolize karşı geliştirilmiş direnç sergileyen sağlam, geri dönüşümlü katalizörleri oluşturmak için ham madde olarak kullanılabilirler. CLEA teknolojisinin, biyokataliz süreçlerini yararlı bir araç haline getiren çok çeşitli enzimlere uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, CLEA' nın istikrarını, endüstriyel proseslerdeki performansı ve yeni çapraz bağlayıcı ajanlar bulmayı amaçlayan sayısız çalışma olacaktır. Teknik, katalitik kaskat süreçlerinde avantajlı olarak kullanılabilen iki veya daha fazla enzim içeren kombi-CLEA' ların hazırlanmasına uygulanabilir. Mikrokanal reaktörlerde immobilize CLEA' ların kullanımı, biyotransformasyonların ve sonuçta sürekli üretim süreçlerinin hızlı taranması ve optimizasyonunda belirgin bir potansiyele sahiptir. Kısaca, CLEA' ların gelecekte endüstriyel biyotransformasyonlarda ve immobilize enzim gerektiren diğer alanlarda yaygın olarak uygulanacağına inanılmaktadır.

Soya sütü yüksek protein içeriğine sahip olan, esansiyel amino asitleri dengeli ve yeterli miktarda bünyesinde bulunduran soya fasulyesinden elde edilmektedir. Özellikle çocuklar için inek sütü yerine önerilen bir içecektir. Ayrıca soya sütü geliştirmekte olan ülkeler için düşük maliyetli bir preparattır ve soya fasulyesi laktoz içermediğinden laktoz-intolerant popülasyon için önemli bir besin kaynağıdır. Ancak soya fasulyesi de diğer legümlü bitkiler gibi yüksek oranda  $\alpha$ -galaktooligosakkaritler (stakiyoz ve rafinoz) içermektedir. Memelilerde pankreatik  $\alpha$ -galaktozidaz eksik olduğu için bu şekerlerin sindirimi zordur. Bu nedenle soya sütünde bulunan rafinoz tip galaktooligosakkaritlerin enzimatik yollarla parçalanması önem taşımaktadır (Gote et al., 2004; Prashanth and Mulimani, 2005; Naganagouda et al., 2007; Cowan and Fernandez-Lafuente, 2011).

Bu projede, mısırdan izole edilerek gradient amonyum sülfat (% 35 - % 85) çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için amonyum sülfatın çöktürücü ajan ve glutaraldehitin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı

immobilizasyon yöntemi ile çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlanmıştır.  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için optimizasyon çalışmaları ve ayrıca serbest ve immobilize enzimler için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyonun optimizasyonu için amonyum sülfat konsantrasyonu, protein miktarı, GA konsantrasyonu, tampon türü, tampon konsantrasyonu ve tampon pH' ı, çapraz bağlama süresi, çapraz bağlama sıcaklığı ve karıştırma hızı, BSA ilavesi gibi parametrelerin immobilizasyona etkisi incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında ise sıcaklık, pH, substrat spesifikliğı ve konsantrasyonu, efektör, inhibisyon türü ve stabilizatörlerin enzim aktivitesine etkisi incelenmiş ve ayrıca kararlılık testleri (termal, pH, depo ve operasyonel) ile tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzimler kıyaslanmıştır. Hazırlanan soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde immobilize ve serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve yöntemlere ait bilgiler ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Kullanılan kimyasal maddeler; p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (PNPG), Sitrik asit, Borik asit, Glutaraldehid, KCl, NaCl, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Sukroz, Rafinoz, Stakiyoz, Na/K Tartarat, 3,5-Dinitrosalisilik asit, Glisin ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) Moleküler Kütle Standartları Sigma Chem. Co (St. Louis, CA)'dan, p-Nitrofenol, Amonyum sülfat, NaOH, HCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> E. Merck (Almanya)'den, Sığır Serum Albümini (Albümin Fraksiyon V) ve Coomassie-Brilliant Blue G-250 Bio-Rad Laboratuvarları (Richmond, CA) ve BDH Ltd. (Poole, UK)' den, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, Galaktoz, Glukoz, Fruktoz, Laktoz, Maltoz, Melibioz ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Fluka' dan, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ve Etanol Riedel' den temin edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi mısır (*Zea mays*) unundan izole edilmiştir. Ticari  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinden Alpha Galactosidase Powder; Advanced Enzyme Technologies (India), Ltd., Validase AGS; Valley Research Inc.(South Bend)' den ve  $\alpha$ -Galactosidase DS30; Amano Enzyme Inc.(Japonya)' den sağlanmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılan mısır unu ile soya sütü hazırlanmasında kullanılan soya unu yerel marketlerden satın alınmıştır.

### 2.2 Cihaz ve Sistemler

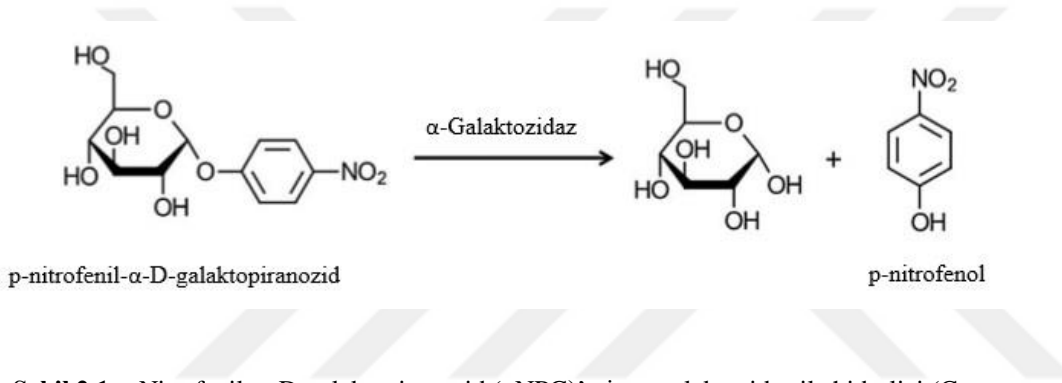
Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılan araç ve gereçler: Blender (Simbo, Türkiye), homojenizatör (Silverson STL 2, UK), santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Almanya), mini jel sistemi (Biorad, Amerika), derin dondurucu (Uğur, Türkiye), orbital karıştırıcı (IKA Labortechnik KS 260 basic, Almanya), vorteks (IKA MS 2, Almanya), lineer karıştırmalı su banyosu (Memmert, Almanya), spektrofotometre (Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis, ABD), pH-metre (Hanna Instrument, ABD), yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) (DAD ve RID dedektörler) (Agilent HP1260, Almaya), HPLC kontrol programı (HP-Chemstation, Agilent, Almanya), HPLC kolonu (LC-NH<sub>2</sub> 5,0  $\mu$ m, Supelco,

Almanya), tek kullanımlık şırınga filtre (Millipore Millex-GN, Naylon, 0,20  $\mu\text{m}$ ), distile su cihazları (Fistream, England ve Milli-Q Milipore, ABD).

## 2.3 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini

### 2.3.1 p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid ile aktivite tayini

$\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi, enzimin sentetik bir substratı olan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG) kullanılarak tayin edilmiştir. Aktivite yöntemi, önceden kullanılan bir yöntemin (Itoh et al., 1986) modifiye edilmiş halidir (Önal, 2000). Prosedürde esas, ölçüm karışımında açığa çıkan p-nitrofenolün alkali ortamda tayinidir. Reaksiyon aşağıda verilmiştir (Şekil 2.1).



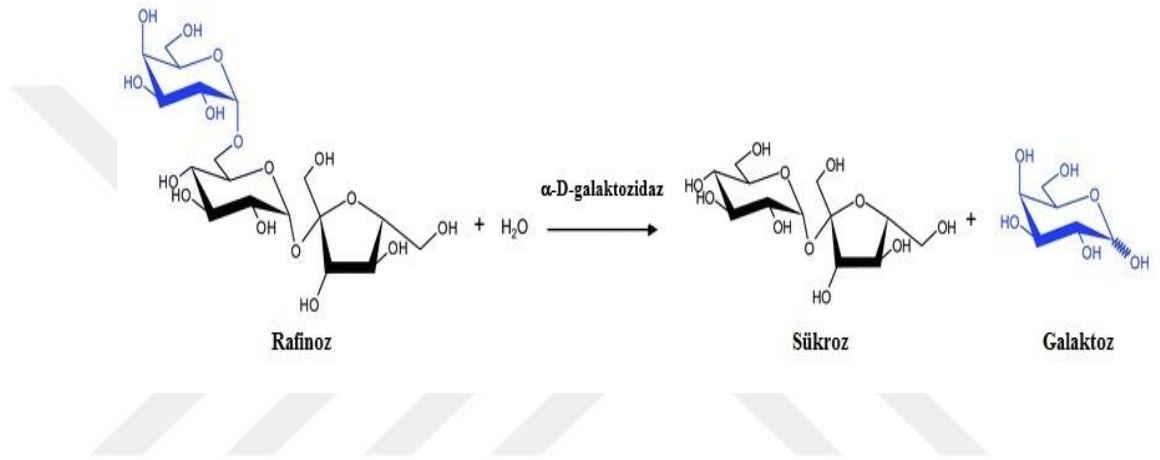
Şekil 2.1 p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG)' nin  $\alpha$ -galaktozidaz ile hidrolizi (Cao et al., 2016).

$\alpha$ -Galaktozidazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,5 mL sodyum sitrat tamponu (100 mM; pH 5,0) ve 0,25 mL 2 mM pNPG (pH 5,0 ve 100 mM sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 0,25 mL uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. İmmobilize enzimin aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı 0,25 mL serbest enzim yerine aynı hacimde tamponda süspanse edilmiş 2,5 mg immobilize enzim içerir. Reaksiyon karışımı, 37°C' de 30 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon, 3,5 mL 200 mM sodyum borat tamponu (pH 9,8) ilave edilerek durdurulur. Açığa çıkan p-nitrofenol miktarı, 400 nm' de absorbans okunarak spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör, 0,25 mL enzim çözeltisi yerine sodyum sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) içerir. Enzim aktivite miktarlarının hesaplanmasında, 0,01–0,25  $\mu\text{mol}$  p-nitrofenol konsantrasyon aralığı ile hazırlanan p-nitrofenol standart grafiği kullanılır.

Bir  $\alpha$ -galaktozidaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1  $\mu$ mol p-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarıdır (Unite).

### 2.3.2 Rafinoz ile aktivite tayini

$\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi, enzimin doğal bir substratı olan rafinoz kullanılarak tayin edilmiştir. Prosedürde esas, ölçüm karışımında açığa çıkan galaktozun dinitrosalisilik asit reaktifi (DNS reaktifi) ile 546 nm' de spektrofotometrik olarak belirlenmesine dayanır (Miller, 1959). Reaksiyon aşağıda verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Rafinozun  $\alpha$ -galaktozidaz ile hidrolizi (Daude et al., 2012).

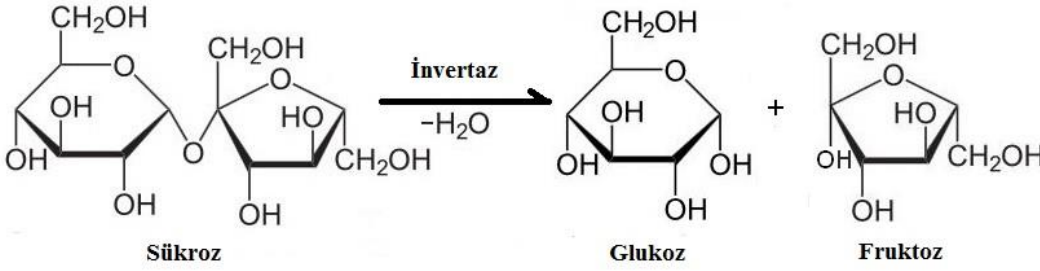
**DNS Reaktifi:** 1 g DNS, 20 mL 2 N NaOH çözeltisine eklenir ve üzeri kapalı olarak ısıtılarak çözülür. Son hacim distile su ile 50 mL' ye tamamlanır. Üzerine 30 g Na/K tartarat ilave edilir ve çözüldükten sonra son hacim 100 mL' ye tamamlanır.

$\alpha$ -Galaktozidazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,5 mL sodyum sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ve 0,25 mL rafinoz (100 mM ve pH 5,0 sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 0,25 mL uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı, 50°C' de 1 saat boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon ortamından alınan 1 mL örnek üzerine 1 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 10 mL bidistile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Açığa çıkan galaktoz miktarı 546 nm' de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör, 0,25 mL enzim çözeltisi yerine 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) içerir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında 2,5-50  $\mu$ M galaktoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır.

Bir  $\alpha$ -galaktozidaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1  $\mu$ M galaktoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Unite).

## 2.4 İvertaz Aktivitesi Tayini

İvertaz enziminin aktivitesi, sükroz hidrolizi ile açığa çıkan indirgen şeker miktarının DNS ile 546 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edilir (Şekil 2.3) (Miller, 1959).



Şekil 2.3 Sükrozun invertaz ile hidrolizi (<https://www.decodedscience.org/processing-chemistry-sugarcane/43324>).

İvertaz aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,6 mL sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,0), 0,2 mL 0,5 M sukroz (0,2 M, pH 5,0 sodyum asetat tamponunda hazırlanmış) ve 0,2 mL uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı 37°C' de 30 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon ortamından alınan 1 mL örnek üzerine 1 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 10 mL bidistile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Açığa çıkan indirgen şeker miktarı 546 nm' de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör, 0,2 mL enzim çözeltisi yerine sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,0) içerir.

Bir invertaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında sukrozdan dakikada 1  $\mu$ mol glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Unite).

## 2.5 Aktivite Geri Kazanımı ve Agregasyon Verimi

En uygun çöktürme çözgeni, enzim ve glutaraldehit konsantrasyonları ve temas süresi gibi farklı proses parametreleri, % aktivite geri kazanım ve %

agregasyon verimi olmak üzere iki değerlendirme parametresi temel alınarak optimize edilmiştir (Şekil 2.4) (Vaidya et al., 2012).

$$(a) \text{ Aktivite Geri Kazanımı (\%)} = \frac{\text{CLEA'nın total aktivitesi (U)}}{\text{CLEA oluşturmak için kullanılan toplam serbest enzim aktivitesi (U)}} \times 100$$

$$(b) \text{ Agregasyon Verimi (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Kalan çözeltinin total aktivitesi (U)}}{\text{CLEA oluşturmak için kullanılan toplam serbest enzim aktivitesi (U)}} \right] \times 100$$

Şekil 2.4 Aktivite geri kazanımı (%) (a) ve agregasyon verimi (%) (b) (Vaidya et Al., 2012).

## 2.6 Protein Tayini

Enzim preparatlarının ve immobilizasyon sonrası yıkama sularının protein konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Yöntem, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır.

Sığır serum albumininin (BSA), distile suda hazırlanmış 1 mg/mL' lik stok standart çözeltilerinden 0,02–0,2 mg/mL konsantrasyon aralığı ile hazırlanan BSA standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

**Bradford Reaktifi:** 40 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250; % 95'lik 50 mL etanolde çözülür. Üzerine 55 mL % 88 (w/v)'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır ve filtre edilir. Reaktif 20°C' de 2 hafta dayanıklıdır.

Her bir örneğin (standartlar ve bilinmeyen protein örnekleri) protein miktarı aşağıdaki prosedüre göre belirlenmiştir:

- a) 0,1 mL standart protein, bilinmeyen protein örneği ve distile su (kör için) tüplere pipetlenir.
- b) 2 mL Bradford reaktifi eklenir ve vorteks ile karıştırılır.

- c) Tüm tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
- d) Her bir örneğin 595 nm’de absorbansı okunur.
- e) Protein konsantrasyonları, hazırlanan BSA standart grafiği (0,02–0,2 mg/mL BSA standartları) kullanılarak hesaplanır.

### **2.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini**

SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektrofrezinin en yaygın olarak kullanılanı olup, protein karışımlarının özelliklerini analizlemek açısından önemlidir. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve proteinin molekül boyutuna göre bir ayırım yapması nedeniyle bağıl molekül kütlesi tayininde de kullanılır. O nedenle, mısırdan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini belirlemek için SDS-PAGE kullanıldı.

Poliakrilamid jel elektrofrez, Laemmli (1970) tarafından geliştirilen yöntemle göre mini jel sistemi ile gerçekleştirildi. Yöntem heterojen tampon sistemi temelinde dayanır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jelle girmeden önce düzenleyici jelle, elektrofrez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenerek konsantre edilirler. Tayin için gerekli olan çözeltiler:

Akrilamid/bis (A/B): 30 g Akrilamid ve 0,8 g bis-N,N'-Metilenbisakrilamid distile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlanır, filtre edilir ve kahverengi şişede 4°C’de saklanır.

Alt Tris (LT): 18,2 g Tris hidroksiaminometan, 2 mL % 20 SDS distile suda çözülür, pH’sı derişik HCl ile 8,8’e ayarlanır ve distile su ile 100 mL’ye tamamlanarak 4°C’de saklanır.

Üst Tris (UT): 6,06 g Tris, 2 mL % 20’lik SDS distile suda çözülür, pH’sı derişik HCl ile 6,8’e ayarlanır ve distile su ile 100 mL’ye tamamlanarak 4°C’de saklanır.

Amonyum persülfat (AP): 100 mg/mL’lik sulu çözeltisi taze hazırlanmalıdır.



Reservuar tamponu: 7,58 g Tris, 36 g Glisin ve 2,5 g SDS 250 mL distile suda çözülerek hazırlanır.

### 2.7.1 Polimerizasyon protokolü

Poliakrilamid jeller akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajan ile kopolimerizasyonu sonucu oluşur. Poliakrilamid jeller için en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan da N,N'-metilenbisakrilamid(Bis)dir. Akrilamid polimerizasyonu serbest radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ile başlatılır. TEMED, persülfat iyonunun dekompozisyonunu katalizleyerek serbest bir radikal oluşumunu sağlar. Aktif monomer, aktiflenmemiş monomer ile reaksiyon verir ve polimer zincirin uzaması başlar. Uzayan polimer zincir çapraz bağlı metilen bisakrilamid ile birlikte yapılır. Oksijen, serbest radikalleri uzaklaştırdığından ve polimerizasyonu engellediğinden tüm jel çözeltileri kullanılmadan önce vakumlanmalı ve oksijen uzaklaştırılmalıdır.

Kaliteli bir SDS-PAGE için şu faktörlere dikkat etmek gerekir: Oldukça yüksek saflıktaki reaktifler, doğru başlangıç konsantrasyonları (yürütücü jel için % 0,04 ve düzenleyici jel için % 0,1), sıcaklık (polimerizasyon için genellikle 23°C), çözeltilerin gazsızlaştırılması (oksijen polimerizasyonunun inhibitörüdür) ve jel oluşturma tamponlarının pH'sı.

Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE' i için, % 12' lik akrilamid monomeri kullanılmıştır. Polimerizasyon protokolü (iki jel için) aşağıda verilmiştir:

- Çözelti 1, 2 ve 3 karıştırılarak oda sıcaklığına getirilir.
- 5 dakikalık gazsızlaştırma işlemi ardından çözelti 4 ve 5 sırasıyla eklenerek yavaşça karıştırılır.
- Yürütücü jel dökülür, gece boyunca ya da 3 saat bekletilir. Ardından düzenleyici jel dökülerek 1–1,5 saat bekletilir.

### 2.7.2 Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması

Örnek tamponunun (3,55 mL distile su, 1,25 mL UT, 2,5 mL gliserol, 2 mL % 10 SDS, 0,2 mL % 0,5, w/v, bromfenol mavisi) 950  $\mu$ L' sine 50  $\mu$ L  $\beta$ -

merkaptotenol eklendi. Örenkler 95°C’ de 5 dakika inkübe edilerek jel kuyucuklarına 20 µL örnek uygulandı.

Anod ve katod rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütüldü. Proteinlerin elektroforezinde düzenleyici jelde 80 volt ve yürütücü jelde 100 volt güç uygulandı. Bromfenol mavisinin oluşturduğu bant jele ulaşmadan 0,5 cm önce elektroforez işlemine son verildi.

### 2.7.3 Protein bantlarının boyanması

Jellerin boyanmasında Coomassie-Brillant Blue metodu kullanıldı. Bu boyama metodunun esası boyanın asidik pH’ da proteinlere bağlanmasıdır. Jeller, Coomassie Blue çözeltisi (% 50 metanol,v/v; % 10 asetik asit, v/v, ve % 0,05 Coomassie Brilliant Blue R 250 , w/v) ile 1 saat boyunca yavaşça çalkalandı. Jelde oluşan mavi renk % 40 metanol (v/v) ve % 10 asetik asitten (v/v) oluşan çözelti ile gece boyu yıkandı.

## 2.8 Mısır Unundan İzole Edilen α-Galaktozidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

α-Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) enzim kaynağı olarak ülkemizde bol bulunması, ekonomik olması ve α-galaktozidaz aktivitesinin yüksek olması nedeni ile mısır (*Z. mays*) unu seçildi. Enzim başta mikrobiyal kaynaklar (Anisha et al., 2010; Fredslund, 2011; Wang et al., 2014) olmak üzere birçok çalışmada bitkisel (Bıçak Çelem et al., 2009; Şen et al., 2011; Bayraktar and Önal, 2013) ve hayvansal (Dean and Sweely 1979a; 1979b; 1979c; Alonso et al., 2005) kaynaklardan izole edilip, saflaştırılarak fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada, amacımıza uygun bir enzim preparatı hazırlamak için α-galaktozidaz enzimi temel biyokimyasal tekniklerle mısır unundan izole edilerek tuz çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Hazırlanan bu enzim preparatı kullanılarak α-galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlandı. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulandı.

Yerel pazardan temin edilen mısır unu pH 6,0 50 mM sitrat tamponu ile ıslatılarak 4°C’ de gece boyu bekletildi. Ardından önce blender yardımıyla ve sonra

homojenizatör ile homojenize edildi. Homejenat içindeki artıkları uzaklaştırmak için çift kat tülbentten süzüldü. Filtrat 9.000 rpm' de 15 dakika 4°C' de santrifüjlendi. Santrifüjyata % 85' lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak gece boyunca 4°C' de bekletildi. Amonyum sülfatlı preparat 9.000 rpm' de 30 dakika 4°C' de santrifüjlendi ve enzimatik aktiviteye sahip çökelek ayrıldı. Çökelek, tamponda (50 mM sitrat tamponu, pH 6,0) çözülerek aynı tampona karşı gece boyunca 4°C' de diyalizlendi. Diyaliz sırasında diyaliz tamponu ilk bir saat sonunda ve sonrasında da birkaç kez değiştirilerek enzim çözeltisi gece boyunca diyalize bırakıldı. Diyalizatta aktivite ve protein tayini yapılarak ileri saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C' de depolandı Enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivitesi sırasıyla 0,84 U/mL, 18,4 mg protein/mL, 0,046 U/mg olarak belirlendi.

İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidazların endüstriyel hidroliz proseslerinde kullanımında preparatın içerdiği invertaz enziminin  $\alpha$ -galaktozidaz ile yarışmaması için invertaz oranı mümkün olduğunca düşük bir enzim preparatına ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, mısırdan hazırlanan protein preparatına (% 85 amonyum sülfat çökeleği) gradient amonyum sülfat çöktürmesi (% 35 - % 85) uygulandı ve her iki enzimin ( $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz) baskın olarak bulunduğu tuz fraksiyonları belirlendi.  $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi yüksek ve invertaz aktivitesi düşük enzim preparatı elde edebilmek için hazırlanan enzim preparatına (% 85' lik amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen) önce % 35' lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Elde edilen çökelek uzaklaştırıldıktan sonra ardından üst faza % 85' lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. % 35' lik ve % 85' lik çöktürme sonrası elde edilen çökelekler yine tamponda (50 mM sitrat tamponu, pH 6,0) çözülerek aynı tampona karşı gece boyu 4°C' de diyalizlendi. % 85' lik çökeleğin diyalizatı immobilizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere derin dondurucuda -20°C' de saklandı.  $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivitesi sırasıyla 1,69 U/mL, 26,4 mg protein/mL, 0,064 U/mg olarak belirlendi. Hazırlanan bu preparat hem protein miktarı hem de  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi açısından immobilizasyon işlemleri için oldukça uygun bir enzim preparatıdır. Enzim preparatının saflığı ve enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile belirlendi.

## 2.9 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

Mısırdan izole edilerek tuz çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatının çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve çöktürme ajanı olarak da amonyum sülfatın kullanıldığı çapraz bağlı enzim agregatları

(CLEA) hazırlanarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. Immobilizasyon işlemlerinin optimizasyonu amacıyla  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna çeşitli parametrelerin etkisi incelendi. Hazırlanan immobilize enzimler, kullanılan immobilizasyon yöntemi ve elde edilen immobilizasyon verimleri açısından kıyaslandı ve biyokimyasal olarak karakterize edildi.

### **2.9.1 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) hazırlanması**

Mısır unundan izole edilerek saflaştırılan ve ticari ( $\alpha$ -Galactosidase DS30; Amano Enzyme Inc.) olarak temin edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi aşağıda verilen prosedür kullanılarak immobilize edildi: 1 mL tamponda (100 mM, pH 5,0 sitrat tamponu) hazırlanmış serbest  $\alpha$ -galaktozidaz çözeltisine (7,5 mg protein) 5 mL (1:5, v/v) amonyum sülfat çözeltisi (%90 (w/v) doymuş çözelti) ve son konsantrasyonu % 0,2 (v/v) olacak şekilde glutaraldehit çözeltisi ilave edildi. Örnekler 4 °C' de 2 saat boyunca 150 devir/dakika hızla karıştırdı. Kontrol örnekleri (glutaraldehit içermeyen) ve immobilizasyonun gerçekleştiği örnekler (glutaraldehit içeren) olmak üzere iki sistem hazırlandı. Örnekler 7000 rpm de 20 dakika santrifüjlendi ve çökelekler ayrıldı. Glutaraldehit içeren çökelekler, glutaraldehit fazlasını uzaklaştırmak için 1 mL 100 mM, pH 5,0 sitrat tamponu ile yıkandı. Kontrol amaçlı hazırlanan (glutaraldehit içermeyen) örneklerde aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Immobilizasyonun gerçekleştirildiği örnekler ise kendi tamponu ile tekrar yıkandı. Immobilize enzimlerde aktivite tayini, yıkama sularında ise hem aktivite hem de protein tayini yapılarak verimleri hesaplandı.

Immobilizasyon sonrası elde edilen sonuçlar ışığında, ticari  $\alpha$ -galaktozidaz ( $\alpha$ -Galactosidase DS30; Amano Enzyme Inc.) enzim preparatı ile hazırlanan çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) verimlerinin düşük olması sebebiyle, bitkisel bir kaynak olan mısır enzim ekstraktı ile immobilizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

#### **2.9.1.1 Amonyum sülfat konsantrasyonunun CLEA verimine etkisi**

Çapraz bağlama ile immobilizasyon işleminde önemli adımlardan ilki, çöktürücü ajan olan amonyum sülfat ile ortamdaki proteinlerin etkin bir şekilde çöktürülmesidir. Bu amaçla, 7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren ortama 1:0,4, 1:0,7, 1:1,25; 1:3; 1:5 ve 1:8 (v/v) oranlarında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90, w/v) ilave edilerek 4°C' de 2

saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak yukarıda Bölüm 2.9.1' de belirtilen prosedür kullanılarak CLEA' lar hazırlandı. Glutaraldehitin fazlasının uzaklaştırılması için 1 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) ile yıkama yapıldı. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

CLEA' ların protein içeriğini belirlemek için muhtemel yöntemler iyi bilinen Lowry, Biuret veya Bradford testleri olabilir; ancak bu yöntemlerin immobilize enzimler için bazı sınırlamaları vardır. CLEA' larda bulunan proteinin miktarının belirlenmesi için bir zorluk daha ortaya çıkar: Lowry, Biuret veya Bradford testleri, sadece bu metotlarda kullanılan kolorimetrik reaktiflerle reaksiyona girmek için mevcut proteinin fraksiyonunu nicelleştirir. Agregat çekirdeğinde veya zor erişime sahip herhangi bir bölgede bulunan proteinin, sözü edilen testler tarafından nicelleştirilemeyeceği ve dolayısıyla spesifik aktivitenin artacağı anlamına gelir. Toplam proteinin miktarını belirlemek için alternatif bir seçenek, onu CLEA sentezinde kullanılan başlangıç protein miktarını ve ayrıca CLEA hazırlandıktan sonra ortamdaki santrifüjle uzaklaştırılan süpernatant ve glutaraldehitin fazlasının uzaklaştırılması için yapılan yıkama adımlarında kalan toplam protein miktarını hesaplamaktır (Torres et al., 2013). Bu amaçla, glutaraldehit bulunmayan kör protein çöktürme denemeleri ile ortamda çöken protein miktarı belirlenmiştir. Asıl örneklerdeki süpernatant ve yıkama sularının protein miktarı hesaplanarak çöken protein miktarından çıkarılmış ve çöken toplam protein miktarına ulaşılmıştır. Bu aşamadan sonra yapılan her denemede kontrol amaçlı glutaraldehitsiz kör denemeler kullanılmıştır.

### **2.9.1.2 Protein miktarının CLEA verimine etkisi**

Çapraz bağlama ile immobilizasyon işleminde ortamdaki proteinlerin konsantrasyonu önemli diğer bir parametredir. Bu amaçla, 1:5 (v/v) oranında doygun amonyum sülfat çözeltisi (% 90' lık) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren ortama 1,0; 2,5; 5,0; 6,0; 7,5 ve 9,0 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C' de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı. Glutaraldehitin fazlasının uzaklaştırılması için 1 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) kullanıldı. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

### **2.9.1.3 Çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehid konsantrasyonunun CLEA verimine etkisi**

Çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehitin uygun optimum konsantrasyonunu belirlemek için 7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi ve 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90' lık) içeren ortama son konsantrasyonu % 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1,0 (v/v) olacak şekilde glutaraldehit ilave edilerek 4°C' de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı. Glutaraldehitin fazlasının uzaklaştırılması için 1 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) kullanıldı. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

### **2.9.1.4 Tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ının CLEA verimine etkisi**

Enzimin maksimum verimle immobilize edilerek CLEA' larının hazırlanması için immobilizasyon koşulları (tampon türü, konsantrasyonu ve pH) optimize edildi. Bu amaçla öncelikle tampon türü ve pH' ı belirlemek için 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90' lık) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren ortama 100 mM pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ve 6,5 sitrat tamponları ve 100 mM pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 fosfat tamponlarında hazırlanmış 7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C' de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapıldı ve CLEA' lar hazırlandı.

Enzimin daha yüksek verimle çapraz bağlanmasını sağlamak için tampon konsantrasyonu optimize edildi. Bu amaçla, immobilizasyon işleminde 25, 50, 75, 100 ve 150 mM sitrat tamponu (pH 5,0) kullanıldı. CLEA hazırlığı, ortamda 7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi, 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90, w/v) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit olacak şekilde 4°C' de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak gerçekleştirildi. Glutaraldehitin fazlası kullanılan tamponlar aracılığıyla yıkanarak uzaklaştırıldı. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

### **2.9.1.5 Çapraz bağlanma süresi, sıcaklığı ve karıştırma hızının CLEA verimine etkisi**

Çapraz bağlama süresi, sıcaklığı ve karıştırma hızı CLEA oluşumunda test edilmesi gereken parametrelerdendir. En uygun çapraz bağlama süresini belirlemek

için 7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi, 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90, w/v) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren ortam öncelikle 4°C' de 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 24 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı.

Çapraz bağlama süresi belirlendikten sonra aynı ortam (7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi, 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90, w/v) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren) 4, 20, 30, 37 ve 50°C' de 6 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı ve en uygun çapraz bağlama sıcaklığı belirlendi.

Son olarak karıştırma hızının immobilizasyona etkisi incelendi. Aynı immobilizasyon ortamına (7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi, 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90, w/v) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren) 4°C' de orbital karıştırıcıda 50, 100, 150, 200 ve 250 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı. Her bir denemede ortamdaki fazla glutaraldehitin uzaklaştırılması için 1 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) kullanıldı. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

#### **2.9.1.6 BSA ilavesinin CLEA verimine etkisi**

Bazen düşük protein içerikli enzim preparatlarından CLEA oluşumunu sağlamak zordur. Bu gibi durumlarda, CLEA oluşumu, proteik besleyici olarak adlandırılan sığır serum albümini (BSA) gibi ikinci bir proteinin eklenmesiyle desteklenebilir (Shah et al., 2006). İmmobilizasyon ortamına (1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90' lık) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren) 1:3, 2:2, 3:1 ve 4:0 (kontrol) mg (w/w) oranlarında Enzim:BSA ilavesi yapılarak son toplam protein miktarı 7,5 mg olacak şekilde 4°C' de 6 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı. Glutaraldehitin fazlasının uzaklaştırılması için 1 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) kullanıldı. Yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

## 2.10 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu

### 2.10.1 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi

Enzimin spesifikliği doğal substrata karşı çok yüksek olmalıdır; ancak enzim bu doğal substratlardan uzak bileşiklere karşı kullanıldığında, bu değer önemli ölçüde azalabilir. Bu durumda, enantioselektifliğin geliştirilmesi, endüstriyel açıdan ilgili bir proses elde etmek için kritik bir gereklilik olabilir. Enzim seçiciliğini arttıran birçok araç arasında yine protein immobilizasyonunu güçlü bir teknik olarak bulmak mümkündür. Bir proteinin immobilizasyonu, aktif bölgede bir miktar değişiklik oluşturarak protein gruplarının genel hareketliliğini azaltır. Dahası, kataliz sırasında büyük konformasyonel değişiklikler geçiren enzimler, bu değişiklikler hareketsiz hale getirildiğinde bozulabilir ve tamamen değişmiş katalitik özelliklere sahip immobilize enzimler üretebilir (Singh et al., 2013).

İmmobilize ve serbest enzimlerin aktivitelerinin kıyaslanabilmesi için çapraz bağlanan enzim miktarı bilinmelidir. Bu amaçla immobilizasyon öncesi serbest enzimin aktivite ve protein miktarı belirlenir. İmmobilizasyon sonrası yıkama sularında da aynı tayin yöntemleri kullanılarak aktivite ve protein miktarı tayinleri yapılır. Çapraz bağlama ile immobilize edilmiş protein miktarı da ilave edilen protein ile yıkama sularındaki bağlanmayan protein miktarı arasındaki farktan hesaplanarak belirlenir.

Mısırdan izole edilen ve ticari olarak temin edilen  $\alpha$ -galaktozidazların aktivite ve protein miktar tayinleri Bölüm 2.3 ve 2.6' da açıklanan yöntemler ile belirlendi.  $\alpha$ -Galaktozidazların aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri Sonuçlar ve Tartışma bölümünde ilgili tablolarda verildi.

#### 2.10.1.1 Sıcaklık

Çoğu kimyasal tepkimelerde olduğu gibi, enzim tarafından katalize edilen reaksiyon hızı, sıcaklık arttıa artmaktadır. Sıcaklık arttıa tüm moleküller arasındaki çarpışmalar artar. Bunun nedeni, sıcaklık artışını izleyen hız ve kinetik enerjideki artıştan kaynaklanmaktadır. Moleküller daha hızlı hareket ettiği için, enzimler ve substratlar arasındaki çarpışmalar da artar. Reaksiyon hızı sıcaklık ile birlikte maksimum seviyeye yükselir, daha sonra sıcaklık artışı ile denatürasyon sebebiyle aniden azalır. Bu nedenle immobilize enzimin etkin bir Şekilde çalışabileceği sıcaklık aralığının belirlenmesi gerekir.



Optimum sıcaklık, enzimin en iyi çalıştığı ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeridir.  $\alpha$ -Galaktozidazların saflaştırıldıkları kaynaklara göre optimum sıcaklık değerleri de değişiklik gösterir. Örneğin; bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlar için optimum sıcaklık değeri 37-40°C iken, mikrobiyal kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlar için daha yüksek sıcaklıklarda gözlenebilir. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğrileri çizilerek izlenir. Bu grafik, bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denatürasyon nedeniyle optimum sıcaklık düşer. İmmobilizasyon sonrasında enzimin fiziksel veya kimyasal değişikliğine bağlı olarak optimum sıcaklığı genellikle değişir.

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların aktivitelerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 4-80°C (4, 25, 30, 37, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80°C) sıcaklık aralığında enzimatik aktivite ölçülmüş, serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Ayrıca bu değerlerden çıkılarak çizilen Arrhenius diyagramlarından ( $1/T'$  ye karşılık log aktivite) aktivasyon enerjileri hesaplandı.

### **2.10.1.2 pH**

Optimum pH değeri, enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH olarak tanımlanır ve enzimin aktif bölgesi çevresinde bulunan amino asitlerin pKa' sına dayanmaktadır. Optimum pH' daki değişim, serbest enzim ile ilgili olarak immobilize enzimler arasında asidik veya bazik bölgeye kaymalar şeklinde gözlemlenmiştir. Değişimin derecesi, kullanılan immobilizasyon yönteminin türüne ve ayrıca taşıyıcı enzim immobilizasyonunda matrisin fiziksel ve kimyasal özelliklerine (matrisin yükü ve yüzey alanı) bağlıdır.

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim prepatlarının aktivitelerine pH'ın etkisinin belirlenmesi için inkübasyon tamponunun pH' ı 3-6 (100 mM sitrat) ve pH' ı 6,5-7,5 (100 mM fosfat) arasında değiştirilerek standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi. Serbest ve immobilize enzimler için oluşturulan pH-aktivite grafiklerinden tüm enzimlerin optimum pH' ı belirlendi. Her bir deneme seti çift çalışıldı.

### **2.10.1.3 Substrat spesifikliği ve kinetik parametreler**

Enzimler, substrat ve reaksiyon için spesifiktir. Bunun anlamı, yalnızca bir substratın ya da yapısal olarak ilişkili olan, substratların olası tepkimelerinden sadece birini katalize eden bir substrat ailesinin dönüşümünü katalize ettiği anlamına gelir. Enzim bir substrat üzerinde yalnızca hareket edebildiğinde, enzimin substrat için mutlak özgülük gösterdiği söylenir.  $\alpha$ -Galaktozidazların çeşitli sentetik (pNPG: p-nitrofenil  $\alpha$ -D-galaktopiranozid; oNPG: o-nitrofenil  $\alpha$ -D-galaktopiranozid) ve doğal (melibiyoz, laktoz, rafinoz, stakiyoz, sükroz, keçi boynuzu sakızı, guar sakızı) substratları ile ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur (Kaneko et al., 1991; Manzanares et al., 1998; Varbanets et al., 2001; de Rezende et al., 2005; Gote et al., 2006; Reis et al., 2010; Du et al., 2013; Wang et al., 2016; Hu et al., 2016).

Substrat konsantrasyonunun artırılması, reaksiyon oranını arttırır. Bunun nedeni, daha fazla substrat molekülünün enzim molekülleri ile çarpışması sonucu daha fazla ürün oluşmasıdır. Bununla birlikte, belli bir konsantrasyondan sonra, artışın reaksiyon hızı üzerinde herhangi bir etkisi olmayacaktır; çünkü substrat konsantrasyonu artık sınırlayıcı faktör olmayacaktır. Enzimler etkin bir şekilde doymuş olacak ve mümkün olan en yüksek oranda çalışacaklardır.

$\alpha$ -Galaktozidazın substrat spesifikliğinin tayini için sentetik bir substratı olan pNPG ve doğal substratlarından melibiyoz, rafinoz ve stakiyozun enzim aktivitesine etkisi incelenerek doymuluk substrat konsantrasyonları ile  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi.

#### **p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG):**

Doymuluk substrat (pNPG) konsantrasyonu ve  $K_M$  ile  $V_{Max}$  değerlerini belirlemek için 50 mM sitrat tamponunda (pH 6,0) hazırlanmış 10 mM stok pNPG' den çıkılarak farklı substrat konsantrasyonları ile (0,05- 2,5 mM) enzim aktivitesi tayin edildi. Her enzim formu için çift deneme yapıldı. Substrat konsantrasyonu ile aktivite arasında çizilen grafikten substrat doymuluk konsantrasyonu belirlenerek  $1/[S]$  ile  $1/V$  arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerleri hesaplandı.

### **Melibiyoz, Rafinoz ve Stakiyoz:**

Doygunluk substrat konsantrasyonu ile  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerlerinin belirlenmesi için sitrat tamponunda hazırlanmış (100 mM, pH 5,0) 100 mM stok rafinozdan çıkılarak 2,5-50 mM konsantrasyonlarında rafinoz; 25 mM stok stakiyozdan çıkılarak 0,5-15 mM konsantrasyonlarında stakiyoz; 50 mM stok melibiyozdan çıkılarak 1,0-25 mM konsantrasyonlarında melibiyoz substrat olarak kullanıldığı enzim aktiviteleri tayin edildi. Her deneme seti çift tekrarlı çalışıldı.

#### **2.10.1.4 Eftör etkisi**

İyonların enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkisi genelde Hoffmeister serisini veya kozmotropik düzeni izler: kozmotropik anyonlar ve kaotropik katyonlar enzimleri stabilize ederken, kaotropik anyonlar ve kozmotropik katyonlar bunları kararsızlaştırır. İyonik sıvıların (IL) enzim aktivitesi/kararlılık/ enantioseçiciliği üzerine olan etkisi, özellikle IL ortamında az miktarda su olduğunda karmaşıktır. Bununla birlikte, hidrofilik IL' lerin sulu solüsyonları reaksiyon ortamı olarak kullanıldığında, enzimler, Hofmeister serisini izler gibi görünür, çünkü IL' ler suda ayrı iyonlara ayrışır. Yüksek konsantrasyonlarda hem kozmotropik hem de kaotropik anyonların enzimi farklı mekanizmalarla inhibe ettiğine inanılmaktadır. Kozmotropik anyonlar belirgin Michaelis sabitini düşürür ve aktivasyon bariyerini arttırırken, kaotropik olanlar ters etki yapar. Aktif alan esnekliği, enzim işlevinde önemlidir. Kozmotropik anyonlar yüksek rijitlik oluştururken, kaotropik anyonlar yüksek esneklik sağlar. Her iki durum enzim aktivitesini düşürür (Zhao, 2005).

Enzimlerin katalitik aktivite gösterdikleri ortamlarına ilave edilen kimyasal etmenlerin (iyonlar, şekerler, şelatlayıcı ajanlar, tuzlar, deterjanlar, vb) aktivite üstüne etkileri arttırıcı (aktivatör) veya azaltıcı (inhibitör) yönde olabilir. Çeşitli kimyasallar ( $CaCl_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $KCl$ ,  $HgCl$ ,  $NaCl$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MnCl_2$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $Na_2CO_3$ , EDTA, SDS,  $(NH_4)_2SO_4$ ) ve şekerler (galaktoz, glukoz, sukroz, fruktoz, laktoz, maltoz, melibiyoz, rafinoz) enzimatik reaksiyon ortamına eklenerek enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Ortamdaki konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde metaller ve şekerler aktivite tayin ortamına ilave edildi. Standart aktivite tayini koşullarında tüm denemeler iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Aktivatör ve inhibitörler belirlendikten sonra, bunların değişen konsantrasyonlarının etkisi ve inhibisyonun türü belirlendi.

### **2.10.1.5 İnhibisyon türünün belirlenmesi**

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda, açığa çıkan galaktozun kuvvetli inhibisyon etki gösterdiği birçok çalışmada belirtilmiştir (King et al, 2002; Guimaraes et al., 2001; Soh et al., 2006; Viana et al., 2006; Hu et al., 2017). Bu amaçla, 50 mM sitrat tamponunda (pH 6,0) hazırlanmış 10 mM stok pNPG' den çıkılarak hazırlanan farklı substrat konsantrasyonlarını (0,05- 2,5 mM) içeren örnek tüplerine galaktozun farklı konsantrasyonlarını (2,5; 5,0 ve 10 mM) ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edildi. Her örnek için çift deneme yapıldı. Substrat konsantrasyonu ile aktivite arasında çizilen grafikten  $1/[S]$  ile  $1/V$  değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk diyagramları oluşturularak inhibisyon türleri belirlendi.

### **2.10.1.6 Stabilizatörlerin etkisi**

Enzimlerin depolanması için kullanılan stabilizatörler, aktivite kayıplarını önlemek ve belli koşullar altında uzun süre enzimin saklanmasına imkân sağlar. Stabilizatör etkisinin incelendiği çalışmada ise immobilize ve serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri 2 ay süre ile  $-20^{\circ}\text{C}$  de stabilizatör eklenerek muhafaza edilmiştir. Bu amaçla, üç farklı stabilizatör (%10 (w/v) Sükroz, %20 ve %30 (v/v) Gliserol) içeren ve stabilizatör içermeyen olmak üzere toplam 4 örnek hem serbest hem de immobilize enzim preparatları için hazırlanmıştır. 2 ayın sonunda standart aktivite ölçüm koşullarında kalan aktiviteler ölçülerek, stabilizatörlerin aktiviteye etkisi belirlenmiş ve birbiri ile kıyaslanmıştır.

### **2.10.2 Kararlılık testleri**

Enzim kararlılığı, aktivite kaybının operasyonel koşullar altında zamanla kontrol edilmesi ile tespit edilebilir. Aktivite bozulması, birinci dereceden kinetik kurallara uyan termal inaktivasyonda olduğu gibi basit kinetik kurallara göre ilerlediğinde kalan aktivite bile öngörülebilir. Komplikasyonlar, farklı enzim türlerinin karışımları bağlanma veya iç kararlılıklarında farklılıklara sahip olduğunda veya kütle transferi etkileri düşük etkinliklere neden olduğunda ortaya çıkar. İkinci durumda, düşük verimlilik sonucu düşük aktivite, enzimin yalnızca bir kısmının aktif olduğunu gösterir. Kullanılmayan kısım basitçe enzimin inaktive olduğu şekilde değiştirilebilir. Başka bir deyişle, kütle transferi ile kontrol edilen reaksiyonlar, enzim aktivitesinin bozulmasına çok daha az duyarlı görünmekte ve böylece yanlışlıkla bir stabilizasyon izlenimi yaratmaktadır. Uygulamada, yalnızca

faaliyetin zaman çizelgesini takip ederek operasyonel kararlılığı belirlemek değil, aynı zamanda üretkenliğini veya alternatif olarak, oluşan ürüne ilişkin tüketimini izlemek de önerilir (Tischer and Kasche, 1999).

Enzimin depo kararlılığı önemlidir; ancak reaktör performansını yöneten bir enzimin operasyonel kararlılığıdır; sıcaklık, pH, substrat ve destabilize edici ajanların varlığının karmaşık bir fonksiyonudur. Üretim maliyetleri ve kütle transferi etkileri en aza indirildiğinde bile, immobilize enzimlerin esas maliyete katkılarını, kararlılıkları belirlenir. İmmobilize enzimlerin artan operasyonel stabilitesi, yüksek maliyet avantajı elde etmek için şarttır (<http://slideplayer.com/slide/7708111/>).

### **2.10.2.1 Termal kararlılık**

Aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılık tayininde, önce bu enzimlerin 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (4, 25, 30, 37, 40, 50, 60, 65°C) inkübe edildi ve ardından standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. Her bir sıcaklık değeri için örnekler çift çalışılmıştır.

Ön inkübasyon zamanına bağımlı termal kararlılıklarını belirlemek için aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim preparatları 37°C, 40°C ve 50°C' de farklı sürelerde (5-10-15-20-25-30-45-60-75-90-105 ve 120 dakika) inkübe edildi ve ardından geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda ölçüldü. Her bir zaman değeri için çift örnek ve bir kör deneme yapıldı.

### **2.10.2.2 pH kararlılığı**

Serbest ve immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığına pH' ın etkisini incelemek amacı ile düzenlenen deney setinde, aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimler için inkübasyon tamponunun pH' ı, pH 3,0-6,0 sitrat tamponu (100 mM) ve pH 6,5-7,5 fosfat tamponu (100 mM) aralığında değiştirilerek 2 saat boyunca 4°C' de bekletildi. Standart koşullarda geriye kalan aktiviteleri tayin edildi. Her bir set çift çalışıldı.

### **2.10.2.3 Depo kararlılığı**

Depo kararlılığı ile operasyonel kararlılık arasında ayırım yapmak faydalıdır. Depo kararlılığı uygun bir formülasyonla sağlanır. Çoğu zaman, birkaç katkı

maddesi, enzimi önerilen saklama koşullarında denatürasyondan korur. Bu şekilde sevkiyat ve dağıtım desteklenmektedir (Tischer and Wedekind, 1999).

Depo kararlılığının belirlenmesi için, serbest ve immobilize enzimler  $-20^{\circ}\text{C}$  de 8 ay boyunca depolanmış ve belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda tayin edilmiştir.

#### **2.10.2.4 Operasyonel kararlılık**

Operasyonel kararlılık, pH, sıcaklık, çözücüler, safsızlıklar ve protein denatürasyonuna veya işlevsel grupların modifikasyonuna katkıda bulunan ve böylece inaktivasyonu arttıran diğer faktörlerin seçilen reaksiyon koşullarından kaynaklanan çalışma koşullarının ve zararlı etkilerin bütünüdür. Operasyonel kararlılık enzimin performansını ve maliyet avantajlarını belirler. Operasyonel kararlılık, reaktörden belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin standart koşullarda aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenir (Tischer and Wedekind, 1999).

Difüzyonsuz reaksiyonlar için, zamana bağlı inaktivasyon, birincil reaksiyona göre üssel aktivite bozulması gibi çeşitli inaktivasyon oranları boyunca ilerleyebilir. Bu durumda, inaktivasyon oranı Arrhenius denklemi ile sıcaklık bağımlılığı için verilen değere benzer şekilde tarif edilebilir. Tam difüzyon kontrollü reaksiyonlarda, yani düşük verimliliklerde, toplam immobilize enzim miktarının yalnızca küçük bir kısmı çalışmaktadır (Tischer and Wedekind, 1999).

Tamamen difüzyon kontrollü reaksiyonlarda, immobilize enzimin yalnızca küçük bir kısmı çalışır. Eğer aktif olarak çalışan enzim yıkılırsa, bazı "dinlenme" fraksiyonları bir dereceye kadar enzimin yerini alabilirler. Immobilize enzimlerin yanlışlıkla serbest enzimlere göre daha kararlı görülebilmelerinin bir sebebi budur. Bu yanlış yorumlamayı önlemek için, difüzyonel sınırlamaların yokluğunda enzim aktivitesinin kontrol edilmesi gereklidir. Endüstriyel uygulamalar için, yarı ömrünü değerlendirmek yerine enzimin performansını düşünmek daha yararlıdır (Tischer and Wedekind, 1999).

Maliyet avantajlarının elde edilmesi için immobilize enzimlerin operasyonel stabilitesinin artırılması esastır. Enzim stabilitesi, yarılanma ömrü aktivitesine ulaşılan kadar aktivite bozunumunun zamanla tahliliyle kontrol edilebilir. Bu, termal inaktivasyonun birinci derece kinetiğine göre gerçekleşmesi durumunda yararlı bir kontrol aracıdır (Tischer and Wedekind, 1999).

Çapraz bağlı enzim agregatları hazırlanarak immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin operasyonel kararlılık denemeleri substrat olarak hem pNPG hem de rafinoz kullanılarak gerçekleştirildi. pNPG ile yapılan operasyonel kararlılık denemelerinde reaktöre 2,5 mg immobilize enzim, 0,25 mL 2 mM pNPG ve 0,75 mL sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ilave edilerek 37°C' de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin üst sıvı fazı ayrılarak immobilize enzimin aktivitesi standart  $\alpha$ -galaktozidaz aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Sistem 50 saat boyunca sürekli olarak çalıştırıldı. Operasyonel kararlılık çalışması pNPG ile yapılan kararlılık çalışmasına benzer şekilde rafinoz ile de gerçekleştirildi. Reaktöre 2,5 mg immobilize enzim 0,9 mL sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ve 0,10 mL 10 mM rafinoz eklenerek 50°C' de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde DNS metodu ile enzim aktivite tayini gerçekleştirildi. Sistem 50 saat boyunca sürekli olarak çalıştırıldı.

#### **2.10.2.5 Tekrar kullanılabilirlik**

Endüstriyel uygulamalarda immobilize enzimlerin önemli bir avantajı da tekrar kullanılabilirliktir. İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidazların tekrar kullanılabilirlik denemeleri substrat olarak pNPG kullanılarak 37°C' de ve rafinoz kullanılarak 50°C' de gerçekleştirildi.

Substrat olarak pNPG' nin kullanıldığı reaksiyon ortamı; 0,5 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0), 0,25mL 2 mM pNPG (sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 2,5 mg immobilize enzim preparatı içermektedir. Bu karışım 37°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra immobilize enzim santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırıldı ve üst reaksiyon sıvısına 3,5 mL 0,2 M borat tamponu (pH 9,8) ilave edilerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Açığa çıkan p-nitrofenol miktarından enzimin aktivitesi belirlendi. Aynı enzim preparatları ile 1 günde 9 kez aktivite tayini yapılmıştır.

Substrat olarak rafinozun kullanıldığı reaksiyon ortamı; 0,9 mL 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0), 0,1 mL 10 mM rafinoz (sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 2,5 mg immobilize enzim preparatı içermektedir. Bu karışım 50°C' de 1 saat inkübe edildikten sonra immobilize enzim santrifüjlenerek uzaklaştırıldı ve üst reaksiyon sıvısında DNS metodu ile enzim aktivite tayini yapıldı. Aynı enzim preparatları ile 1 günde 6 kez aktivite tayini yapılmıştır.

## 2.11 İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının pNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı

Substrat olarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG) ve rafinoz kullanılarak kesikli karıştırılmalı batch sistemde  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin substrat hidroliz çalışmaları gerçekleştirildi.

Substrat hidroliz hızının belirlenmesi için 50 saat boyunca belirli zaman aralıklarında ortamdaki örnek alınarak aktivite tayini yapıldı. pNPG için kurulan sistemlerde 2,5 mg immobilize enzim 0,25 mL, 2 mM pNPG ve 0,75 mL sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ilave edilerek 37°C' de inkübe edildi. Rafinoz için kurulan sistemler ise 0,10 mL, 100 mM rafinoz; 0,9 mL sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ve 2,5 mg immobilize enzim içermektedir ve reaksiyon 50°C' de gerçekleştirilmiştir. Başlangıç anında ve belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde aktivite tayinleri yapılarak substrat hidroliz hızı (% Dönüşüm) belirlendi.

## 2.12 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi

### 2.12.1 Soya sütünün hazırlanması

Hidroliz proseslerinde kullanılacak olan soya sütü Mulimani ve Ramalingam (1995)' in önermiş olduğu yöntem kullanılarak yerel marketten alınan soya unundan (soya fasulyesinin öğütülmesi ile elde edilen) hazırlandı. Soya ununa, yağlı kısımlarını uzaklaştırmak için n-hegzan (1:1, (w/v)) ilave edildi ve iyice karışması sağlandı. Üzerinde oluşan yağ fazı Pasteur pipeti yardımıyla uzaklaştırıldı. Geriye kalan soya ununa 10 hacim distile su ilave edildi ve oluşan süspansiyon içerisindeki enzimatik aktivitenin sona erdirilmesi amacıyla 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Çözünmeyen kısımların uzaklaştırılması için preparat oda sıcaklığında 5 dakika 5000 rpm de santrifüjlendi. Santrifüj 4°C' de 24 saat bekletildikten sonra tekrar oda sıcaklığında 5 dakika 5000 rpm' de santrifüjlendi. Elde edilen santrifüj hidroliz proseslerinde kullanılacak olan soya sütü daha sonraki enzimatik hidroliz çalışmalarında kullanılmak üzere 4°C' de depolandı.



### 2.12.2 Soya sütünde toplam oligosakkarit miktarının tayini

Hazırlanan soya sütünde toplam karbohidrat miktarının tayini için Fenol-Sülfürik Asit yöntemi kullanıldı (Masuko et al., 2005). 400 µL soya sütü üzerine 2,0 mL derişik sülfürik asit ilave edildikten sonra hemen 400 µL % 5 fenol (d. H<sub>2</sub>O içinde) eklendi. Vortekslendikten sonra 15 dakika beklenildi ve tekrar vortekslenerek 10 dakika daha bekletildikten sonra (oda sıcaklığına gelince) 490 nm’ de karışımın absorbansı okundu. Toplam karbohidrat miktarlarının hesaplanmasında, 10-100 µg/mL galaktoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiğı kullanıldı.

### 2.12.3 Kesikli karıştırmalı tank reaktörde (Batch Stirred-Tank Reactor) hidroliz

Hidroliz reaksiyonları kesikli karıştırmalı sistemlerde hem serbest hem de immobilize enzim preparatları ile gerçekleştirildi. Deney tüplerinde 1 mL soya sütü içerisinde 0,1 U α-galaktozidaz aktivitesi içerecek şekilde serbest ve immobilize enzimler ilave edildi. Hidroliz reaksiyonları 50°C’ de 200 rpm’ de çalkalama yapılarak inkübatörde gerçekleştirildi. Başlangıç anında ve 4-24 saat aralığında örnek alındı. Serbest enzimle yürütölen reaksiyondan alınan örnek enzimatik reaksiyonun sona erdirilmesi için 10 dakika kaynar suda bekletildi. Tüm reaksiyon örnekleri HPLC ile analiz öncesi -20°C’ de derin dondurucuda saklandı.

### 2.12.4 HPLC ile ayırım ve hidroliz derecesinin belirlenmesi

HPLC ile karbohidratların ayırımında LC-NH<sub>2</sub> kolon kullanıldı. Örnek hacmi 20 µL, kolon akış hızı 1,0 mL/dakika, dengeleme tamponu (Asetonitril) (Tampon A), elüsyon tamponu (su) (Tampon B), gradient elüsyon 0-2 dk. %20 (Tampon B), 2-5 dk %25 (Tampon B), 5-22 dk %25 (Tampon B), 22-23 dk %20 (Tampon B), kolon sıcaklığı 40°C, dalga boyu 200 nm olarak ayarlandı. Ksiloz, arabinoz, fruktoz, glukoz, galaktoz, sukroz, laktoz, melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz HPLC sistemine tek tek enjekte edildikten sonra her biri için kolonda alıkonma süreleri belirlendi. Daha sonra karışım halinde enjekte edilen karbohidratların her biri için standart grafikler çizildi.

Refraktif indeks dedektör (RID) kullanılarak örneklerdeki karbohidratların tayinleri gerçekleştirildi. Örnek hacmi 20 µL, kolon akış hızı 1,0 mL/dakika, Mobil faz: Asetonitril:su (75:25), izokratik elüsyon, kolon sıcaklığı 50°C ve kolon LC-

NH<sub>2</sub> kullanıldı. Galaktoz, sukroz, laktoz, fruktoz, rafinoz ve stakiyoz HPLC sistemine tek tek enjekte edildikten sonra her biri için kolonda alıkonma süreleri belirlendi. Daha sonra karışım halinde enjekte edilen karbohidratların her biri için standart grafikler çizildi.

Soya sütü ve hidroliz sonrası örnekler RID ve DAD (200 nm) dedektörlerinin kullanıldığı HPLC sistemine uygulanarak hazırlanan enzim preparatları ile soya sütünde rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizlenebilirliği araştırıldı.



### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 Mısır Unundan İzole Edilen $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

$\alpha$ -Galaktozidazların endüstriyel alanda çok önemli çeşitli uygulamaları mevcuttur. Rafinoz ve stakiyozu hidrolizleyebilme kabiliyeti, bu enzimleri soya ve baklagil kaynaklı ürünlerdeki sindirilemeyen oligosakkaritlerin (NDO) ortadan kaldırılmasında ve şeker pancarı endüstrisinde sakkarozun kalitesini ve verimini arttırmak için gıda endüstrisinde son derece yararlı kılmaktadır (Shibuya et al., 1997). Ayrıca, yemlerin besleyici değerini arttırmak için hayvan yeminin ön muamelesinde kullanılırlar (Wang et al., 2010). Dahası, yumuşak ahşap kraft hamurunda endo1,4- $\beta$ -mananazların ağartma etkisini artırma kabiliyetleri için test edilmiştir (Clarke et al., 2000; Rattö et al., 1993). Biyoteknolojik kullanım dışında, çeşitli tıbbi uygulamalarda da kullanım alanı bulmaktadır. İnsanlarda,  $\alpha$ -galaktozidaz geninin mutasyonları glikolipidlerin ve glikoproteinlerin tam olarak parçalanması nedeniyle Fabry hastalığına neden olur.  $\alpha$ -Galaktozidaz kullanan enzim replasman tedavisi (ERT) hastalığın tedavisinde etkili olmuştur (Eng et al., 2001; Pastores, 2007). Rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak üretilen  $\alpha$ -galaktozidaz, örneğin Fabrazyme (agalsidaz beta) ve Replagal (agalsidaz alfa) şu anda Fabry hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Tıbbi alanda büyük önem taşıyan bir başka uygulama, B tipi kan antijenlerinin O-tipi antijene (evrensel kan grubu) dönüştürülmesidir (Liu et al., 2007; Olsson and Clausen, 2008).

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi bitkisel (Barham et al., 1971; Bıçak Çelem and Önal, 2008; Çalıcı et al., 2009; Bıçak Çelem et al., 2009; Şen et al., 2011; Bayraktar and Önal; 2013; Malgas et al., 2015; Kizhner et al., 2015), hayvansal (Oh et al., 2008; Huston et al., 2017; Üçeyler et al., 2016) ve mikrobiyal (Suzuki et al., 1970; Arnaud et al., 1976; Berg et al., 1980; Ulezlo and Zaprometova, 1982; Civas et al., 1984; Gherardini et al., 1985; Wong et al., 1986; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Ganter et al., 1988; Aslanidis et al., 1989; Zaprometova et al., 1990; Aduse-Opoku et al., 1991; Nadkarni et al., 1992; Zeilinger et al., 1993; Mulimani and Ramlingam, 1995; Shibuya et al., 1995; Galas and Miszkiewicz, 1996; Garro et al., 1996; Duffaud et al., 1997; Shibuya et al., 1997; Bakunina et al., 1998; King et al., 1998; Luonteri et al., 1998; Manzanares et al., 1998; Fridjonsson et al., 1999; Kotwal et al., 1999; Leder et al., 1999; Gomes et al., 2000; Halstead et al., 2000; Puchart et al., 2000; Xiao et al., 2000; Ademark et al., 2001; Coombs and Brenchley, 2001; Elshafei et al., 2001; Fridjonsson and Mattes, 2001; Ishiguro et al., 2001; Bei-Zhong et al.,

2003; Naessens and Vandamme, 2003; Puchart et al., 2004; Kondoh et al., 2005; Post and Luebke, 2005; Brouns et al., 2006; Gote et al., 2006; Cao et al., 2007; Shankar and Mulimani, 2007; Anisha et al., 2008; Anisha et al., 2009, 2010; Anisha et al., 2009, 2011; Svastits-Dücsö et al., 2009; Cao et al., 2010; Gurkok et al., 2011; Fredslund, 2011; Wang et al., 2014; Kurakake et al., 2015; Chen et al., 2015; Cao et al., 2016; Golotin et al., 2016; Gajdhane et al., 2016; Calhoun and Abdullahi, 2016) kaynaklardan çeşitli saflaştırma yöntemleri kullanılarak izole edilmişlerdir. Bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatlarının yüksek saflıkta ve homojen eldesi, mikrobiyal kaynaklı preparatlara kıyasla daha zor olsa da, sonraki uygulamalarda kullanılacak özelliklere sahip protein preparatlarının hazırlanması önemlidir. *Rhizopus oryzae* SUK suşu ile yapılan bir çalışmada katı yüzey fermantasyonu (SSF) ile üretilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi 17,74 kat saflaştırılmış, gıda ve şeker endüstrisinde yaygın olarak kullanılan  $\alpha$ -galaktozidaz uygulamaları için mükemmel bir aday olduğu gösterilmiştir (Gajdhane et al., 2016). Termofilik mantar *R. miehei*' den yeni bir  $\alpha$ -galaktozidaz geni (RmgalB) klonlanmış ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılıp karakterize edilen, sindirilemeyen rafinoz ailesi oligosakkaritlerinin (RFO) hidrolize edilmesindeki etkinliği, gıda ve yem endüstrisinde potansiyel olarak yararlı olmasını sağlamıştır (Chen et al., 2015). Yapılan başka bir çalışmada,  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi karpuzdan izole edilip üçlü-faz ayırma (TPP) sistemi ile 2,7 kat saflaştırılmış ve %76,7 aktivite geri kazanımıyla endüstriyel uygulamalar için alternatif bir preparat olarak sunulmuştur (Bayraktar and Önal, 2013).

Bu tez çalışmasında, enzim kaynağı olarak ülkemizde kolay temin edilebilen, bol yetişen, ucuz ve  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi ile termal kararlılığı oldukça yüksek olan mısır seçilmiştir. Enzim, “Materyal ve Metod” bölümünde detaylı olarak açıklandığı gibi bilinen genel ve geleneksel yöntemler kullanılarak mısırdan izole edilip amaca uygun şekilde kısmi olarak saflaştırılmıştır. % 85’ lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak hazırlanan kısmi saf enzim preparatının içerdiği  $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz enzimlerinin aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

**Çizelge 3.1** % 85’ lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonrası enzim preparatının  $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz içeriği.

ENZİM	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (Unit/mg)
$\alpha$ -Galaktozidaz	57	1250	0,046
İnvertaz	31	1250	0,025

İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidazların endüstriyel hidroliz proseslerinde kullanımında preparatın içerdiği invertaz, sükrözün kristalizasyon verimini düşürmekte ve  $\alpha$ -galaktozidaz ile yarışmalı bir tutum sergilemektedir. Bu nedenle kullanılacak olan enzim preparatında invertaz oranı mümkün olduğunca düşük olmalıdır. Bu amaçla, mısırdan izole edilen enzim preparatına daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkılarak gradient amonyum sülfat çöktürmesi (%35 – 85, w/v) uygulanmış ve her iki enzime ait sonuçlar sırasıyla Çizelge 3.2 ve 3.3’ de verilmiştir.

**Çizelge 3.2**  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.\*

Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%) (w/v)	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Safıştırma Katı (fold)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
35	10,5	363	0,029	0,62	18,4
85	45,7	714	0,064	1,36	80,2

\*  $\alpha$ -Galaktozidaz; 57 U, 1250 mg protein, 0,046 U/mg.

**Çizelge 3.3** İvertaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.\*

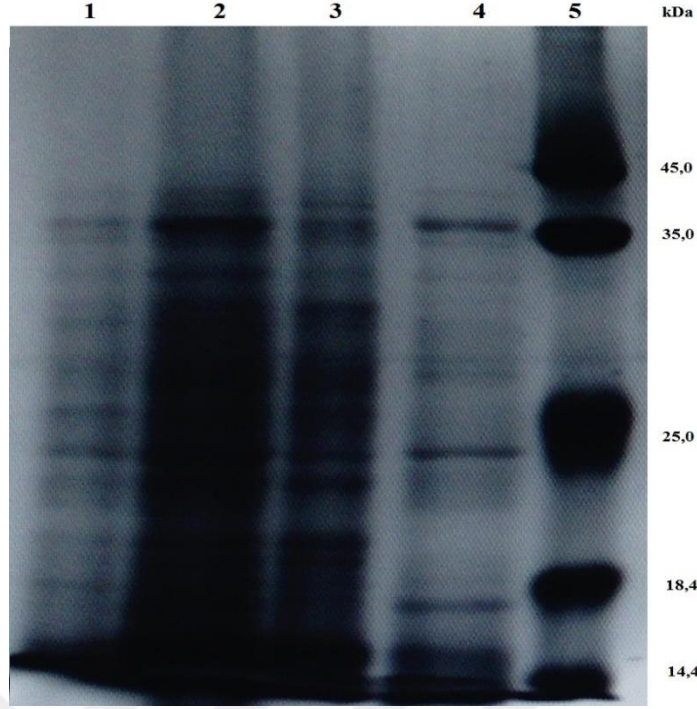
Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%) (w/v)	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Safıştırma Katı (fold)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
35	20	363	0,055	2,20	64,5
85	8	714	0,011	0,44	25,8

\* İvertaz; 31 U, 1250 mg protein, 0,025 U/mg.

Çizelge 3.2 ve 3.3’ den görüldüğü üzere, mısırdan % 85’ lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen protein preparatı  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi açısından zengindir ve invertaz içeriği de kabul edilebilir düzeydedir. Bu nedenle, yapılacak olan immobilizasyon çalışmalarına, önce % 85’ lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi ile deriştirilmiş ve ardından % 35-% 85’ lik (w/v) gradient tuz çöktürmesi yapılmış  $\alpha$ -galaktozidaz fraksiyonu ile devam edilmesine karar verilmiştir. Hazırlanan enzim preparatı immobilizasyon uygulamalarında kullanılmak üzere -20°C’ de depolanmıştır.

İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılacak olan mısırdan kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflığının kontrolünü yapmak ve molekül kütlesini tayin etmek için SDS-PAGE (Laemmli, 1970) gerçekleştirilmiştir.  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi için % 12' lik SDS-PAGE uygulandı ve elektroforez sonrasında jel Coomassie Brilliant Blue metodu ile boyandı. Elektroforegramdan (Şekil 3.1) görüldüğü gibi  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin molekül kütlesi 18.4, 25 ve 35 kDa' dan oluşan üç alt birimden oluşmaktadır. Literatürde birden fazla alt birime sahip bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlar rapor edilmiştir (Petek and Dong, 1961; Dey and Pridham, 1969; Suzuki et al., 1970; Dey et al., 1971; Dey and Pridham, 1972; Dey, 1984). Mısır unundan saflaştırılan enzim preparatında düşük de olsa invertaz aktivitesi bulunmuştur. SDS-PAGE ile elde edilen bantlardan birinin invertaz olduğu her ne kadar düşünülmüş olsa da, mısırdan saflaştırılan invertazlar genel olarak tetramerik olma eğilimindedir ve doğal biçiminde yaklaşık 200 kDa molekül ağırlığına sahip oldukları bildirilmiştir (McLaughlin and Boyer, 2004).

Çeşitli kaynaklardan farklı yöntemlerle izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri farklılıklar göstermektedir. *Chaetomium madarasense* AUMC 9376' dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazın molekül kütlesi 86 kDa (Abo-Elmagd, 2014), *R. miehei*  $\alpha$ -galaktozidazının molekül kütlesi 83,1 kDa (Chen et al., 2015), *Fusarium oxysporum*  $\alpha$ -galaktozidazının molekül kütlesi 40 kDa (Maruta et al., 2017), *Pleurotus djamor*  $\alpha$ -galaktozidazının molekül kütlesi 40 kDa (Hu et al., 2017), *Thermus* sp. T2 türlerinden elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazın molekül kütlesi 53 kDa (Pessela et al., 2007)' dur. Bitkisel kaynaklardan elde edilen  $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri genellikle 25–100 kDa arasında değişmektedir (Dey and Pridham, 1972; Gao and Schaffer, 1999; Önal, 2000; Feurtado et al., 2001; Gao et al., 2003; Bıçak Çelem and Önal, 2008; Bıçak Çelem et al., 2009; Şen et al., 2011; Bayraktar and Önal, 2013).



**Şekil 3.1** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE elektroforegramı (**1:** Ham ekstrakt, **2:** %85 amonyum sülfat çöktürmesi, **3:** %35 amonyum sülfat gradient çöktürmesi, **4:** %85 amonyum sülfat gradient çöktürmesi, **5:** Protein moleküler kütle standartları).

### 3.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi çeşitli kaynaklardan izole edilerek saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve farklı immobilizasyon teknikleri kullanılarak etkin bir şekilde immobilize edilmiştir (Reynolds, 1974; Gunaratne, 1988; Thippeswamy and Mulimani, 2002; Kotiguda et al., 2007; Mulimani and Dhananjay, 2007; Pessela et al., 2008; Filho et al., 2008; Bayraktar et al., 2011; Costa et al., 2013; Abo-Elmagd, 2014; Kumar et al., 2014). Literatürde CLEA' lar alkol dehidrogenaz (Hu et al., 2016), alkil sülfataz (Li et al., 2016), gluko amilaz (Nadar and Rathod, 2016), glukoz dehidrogenaz (Hu et al., 2016), hücre-zarf proteinaz (Agyei and He, 2015), lipaz (Shah et al., 2006; Zhao et al., 2008; Torres et al., 2013; Khanahmadi et al., 2015; Mahmud et al., 2015), lakkaz (Cabana et al., 2007; Matijosyte et al., 2010; Sinirlioglu et al., 2013), tirozinaz (Aytar and Bakir, 2008; Xu et al., 2011, Xu and Yang, 2013),  $\alpha$ -amilaz (Talekar et al., 2012; Liu et al., 2015), aminopeptidazlar (Stressler et al., 2015), proteaz (Mahmud et al., 2016), poli-3-hidroksibutirat depolimeraz (Hormigo et al., 2012), peroksidaz (Tandjaoui et al., 2015), penisilin açılaz (Shah et al., 2006, Wang et al., 2011), L-aminoaçılaz (Vaidya et al., 2012), lizozim (Park et al., 2013), para-nitrobenzil esteraz (Park et al., 2010), papain (Wang et al., 2010) ve  $\beta$ -galaktozidaz (Gaur et al., 2006) gibi birçok enzimin

immobilizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Literatürde  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile yapılmış CLEA çalışması bulunmamaktadır. Hem  $\alpha$ -galaktozidazın endüstriyel önemi hem de CLEA' nın avantajları düşünüldüğünde, hazırlanacak immobilize enzimin birçok çalışma için bir örnek olacağı düşünülmektedir.

### 3.2.1 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) hazırlanması

Mısırdan izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan ve ticari ( $\alpha$ -Galactosidase DS30) olarak temin edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlanmıştır. Amano Enzyme Inc' ten temin edilen  $\alpha$ -Galactosidase DS30 *Aspergillus niger* kaynaklıdır. Her iki enzim için  $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri hesaplanarak sonuçlar Çizelge 3.4' de verilmiştir.  $\alpha$ -Galactosidase DS30 ticari enziminin aktivite ve protein tayinleri için 1 mg katı enzim/mL' lik stok enzim çözeltisi kullanılmıştır. Çizelge 3.4' ten görüldüğü üzere, ticari  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin  $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz aktivitesi mısırdan izole edilen enzime kıyasla oldukça yüksektir.

**Çizelge 3.4** Mısırdan kısmi olarak saflaştırılan ve ticari enzim preparatlarının  $\alpha$ -galaktozidaz ve invertaz içerikleri.

Enzim/Kaynağı	$\alpha$ -GALAKTOZİDAZ			İNVERTAZ		
	Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite
	(U/mL)	(mg/mL)	(U/mg)	(U/mL)	(mg/mL)	(U/mg)
Mısır $\alpha$ -galaktozidazı ( <i>Zea mays</i> )	1,69	26,4	0,064	0,30	26,4	0,011
$\alpha$ -Galactosidase DS 30 ( <i>Aspergillus niger</i> )	16,2	0,14	116	52	0,14	371,4

Son yıllarda, yenilikçi, çok yönlü ve endüstriyel olarak güçlü bir immobilizasyon stratejisi olan çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA' lar), çözünmez, katalitik olarak aktif enzimlerin üretimi için destek matrisine ihtiyaç duyulmaması nedeniyle çok dikkat çekmiştir ve bu süreç basit, hızlı ve ekonomiktir.



CLEA tekniğinin, yüksek hacimsel aktivitesi, operasyonel ve depo kararlılığı (sıcaklık ve pH), mükemmel geri kazanımı, ölçeklendirmenin kolaylığı ve saflaştırılmış enzimlere ihtiyaç duyulmaması gibi birçok avantajla üstün bir immobilizasyon yöntemi olduğu görülmektedir. CLEA' lar, enzimin aktif olmayan formda suda karışabilir organik çözücüler, inorganik tuzlar ve iyonik olmayan polimerler gibi spesifik çöktürme ajanları ile çöktürülerek ve ardından bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan ile çapraz bağlanarak hazırlanır (Nadar et al., 2016).  $\alpha$ -Amilaz (Liu et al., 2015), glukoamilaz (Nadar and Rathod, 2016), aminopeptidazlar (Stressler et al., 2015), proteaz (Mahmod et al., 2016), penisilin açılız (Wang et al., 2011) gibi enzimlerin immobilizasyonunda CLEA tekniği başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Mısırdan kısmi olarak saflaştırılan ve ticari olarak temin edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri Bölüm 2.9.1' de verilen prosedür ile çöktürücü ajan olarak amonyum sülfatın doygun (% 90, w/v) çözeltisi ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak CLEA hazırlandı ve enzimler immobilize edildi. İmmobilizasyon ortamına 7,5 mg protein içerecek şekilde  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ilave edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilize enzimlerin aktiviteleri tayin edilerek % aktivite verimleri ve agregasyon verimleri hesaplandı (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5** Ticari ve mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin immobilizasyonu.

Serbest Enzim					İmmobilize Enzim*		
Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Aktivite Verimi	Agregasyon Verimi
(Unit)	(mg)	(U/mg)	(mg)	(%)	(Unit)	(%)	(%)
<b>Mısır <math>\alpha</math>-Galaktozidazı</b>							
0,274	3,77	0,073	3,49	92,6	0,105	40	92
<b><math>\alpha</math>-Galactosidase DS 30</b>							
665	7,90	84,2	4,60	58,2	15,7	2,36	12

\*Tablodaki değerler 2,5 mg immobilize enzim başınadır.

Çizelge 3.5' den görüldüğü üzere, mısırdan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz ve ticari  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hazırlanan CLEA' ların aktivite verimleri sırasıyla

% 40 ve % 2,36 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında, aktivite ve agregasyon verimi daha yüksek olduğu için mısırdan hazırlanan enzim ile immobilizasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verildi.

### 3.2.1.1 Amonyum sülfat konsantrasyonunun CLEA verimine etkisi

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanmasında ilk adım çöktürücü ajan olan amonyum sülfatın konsantrasyonunun belirlenmesidir. Çünkü çöktürme verimi ne kadar yüksekse, glutaraldehit ile bağlanacak molekül sayısı da o kadar çok olur. Bu amaçla, 5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisine 1:0,4; 1:0,7; 1:1,25; 1:3; 1:5 ve 1:8 (v/v) oranlarında doymuş (% 90, w/v) amonyum sülfat çözeltisi ilave edilerek 4°C’ de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm’ de karıştırma yapılarak agregasyon sağlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.6’ da verilmiştir.

**Çizelge 3.6** Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin agregasyonuna amonyum sülfat konsantrasyonunun etkisi.

Enzim:Amonyum Sülfat Oranı (v/v)	Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%) (w/v)	Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite
		(Unit)	(mg)	(U/mg)
1:0,4	25	0	0	0
1:0,7	37,5	0,013	0,26	0,050
1:1,25	50	0,264	1,17	0,226
1:3	67,5	0,302	2,01	0,150
1:5	75	0,336	2,19	0,153
1:8	80	0,349	2,20	0,159

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

Çizelge 3.6’ da görüldüğü üzere 1:0,4 (v/v) enzim:amonyum sülfat oranında (%25 amonyum sülfat konsantrasyonu) mısır  $\alpha$ -galaktozidazının çökmediği ve bu oranın agregasyon için çok düşük olduğu anlaşılmıştır. Artan amonyum sülfat konsantrasyonuna bağlı olarak çöken protein miktarı da artmış ve 1:5 (v/v)

oranından sonra etkin bir çökme gözlenmiştir. Bu nedenle sonraki immobilizasyon aşamalarında 1:5 (v/v) enzim:amonyum sülfat oranı (% 75) ile denemelere devam edilmesine karar verildi. Benzer şekilde enzim:amonyum sülfat oranı (1:5)(v/v), beyaz çürük mantar *Cerrena sp.* lakkazının CLEA' ları ile hazırlanan çalışmada kullanılmış ve % 113' lük aktivite geri kazanımı sağlanmıştır (Yang et al., 2016). Glukoamilazın manyetik makromoleküler CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada, yine 1:5 (v/v) enzim:amonyum sülfat oranı kullanılarak % 98 aktivite geri kazanımı gözlenmiştir (Nadar and Rathod, 2016).  $\alpha$ -Amilazın makromoleküler çapraz bağlı enzim agregatlarının (M-CLEA) hazırlandığı başka bir çalışmada, 1:5 (v/v) enzim amonyum sülfat oranı kullanılarak % 91 aktivite geri kazanımı sağlanmıştır (Nadar et al., 2016). Talekar ve ark. (2012), *Bacillus sp.* alfa amilazının manyetik CLEA' larının hazırlanmasında 1:5 (v/v) enzim:amonyum sülfat oranını kullandıklarını ve % 100' lük aktivite geri kazanımı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Tükel ve ark. (2013), sığır karaciğer katalazının çapraz bağlı enzim agregatlarını (CLEA-CAT) % 70 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonunda hazırladıklarını bildirmişlerdir. Subtilisinin CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada, immobilizasyon işlemi sırasında % 70 (w/v) amonyum sülfat oranında % 73 aktivite geri kazanımının olduğu bildirilmiştir (Sangeetha and Emilia Abraham, 2008).

### **3.2.1.2 Protein miktarının CLEA verimine etkisi**

Protein miktarı immobilizasyon verimini etkileyen önemli parametrelerden bir diğeridir. 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90, w/v) ve % 0,2 (v/v) glutaraldehit içeren ortama 1,0; 2,5; 5,0; 6,0; 7,5 ve 9,0 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C' de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak CLEA' lar hazırlandı ve sonuçlar Çizelge 3.7' de verilmiştir.

**Çizelge 3.7** Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna protein miktarının etkisi.

Serbest Enzim				İmmobilize Enzim			
Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Aktivite Verimi	Agregasyon Verimi
(Unit)	(mg)	(U/mg)	(mg)	(%)	(Unit)	(%)	(%)
0,040	1,00	0,040	0,37	37	0,008	29	90
0,102	2,50	0,040	1,14	45,6	0,027	29	97
0,202	5,00	0,040	2,77	55,4	0,051	27	97
0,242	6,00	0,040	3,02	50,3	0,073	34	96
0,304	7,50	0,040	3,77	50,3	0,105	40	97
0,364	9,00	0,040	3,97	44,1	0,108	38,3	98

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

Çizelge 3.7' den görüldüğü gibi  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için en yüksek % aktivite verimi % 40 ile 7,5 mg protein ile hazırlanan CLEA' dan elde edilmiştir. 7,5 mg proteinin altındaki miktarlarla hazırlanan CLEA' ların aktivite verimleri daha düşüktür. 7,5 mg' ın üzerindeki değerde ise ortamda artan protein miktarı, çapraz bağlama sonrası enzim-substrat ilişkisini engelleyici bir konformasyona sahip olmuş olabilir ve bu nedenle de aktivite de bir miktar düşme gözlenmesi, bu sterik engele bağlanabilir. Nadar ve Rathod (2016), glukoamilazın manyetik makromoleküler CLEA' larını hazırlamak için immobilizasyon ortamına 8 mg protein içeren 2 mL enzim çözeltisi ilave ederek ideal CLEA prosedürünü oluşturmuşlar ve % 98 aktivite geri kazanımı sağlamışlardır. Kızılcık meyvesi (*Corni fructus*)  $\alpha$ -amilazının manyetik çapraz bağlı enzim agregatlarının (MCLEAs-amilaz) hazırlanmasında 5 mg protein içeren 1 mL' lik enzim çözeltisi, CLEA oluşumu için kullanılmış ve % 95 aktivite geri kazanımı sağlandığı rapor edilmiştir (Liu et al., 2015). *Bacillus sp.* alfa amilazının CLEA' larının hazırlanması için 5 mg protein içeren 1 mL serbest alfa amilaz çözeltisi immobilizasyon prosedüründe kullanılmıştır (Talekar et al., 2012). Mantar tirozinazının CLEA' larının hazırlanmasında ortama 1 mg / mL tirozinaz ilave edilerek % 100 aktivite verimi ile immobilizasyon sağlanmıştır (Aytar and Bakir, 2008). Mung fasülyesi

epoksit hidrolazların (EH) çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA)'nın hazırlandığı başka bir çalışmada, immobilizasyon ortamına ilave edilen 20 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi ile % 95 aktivite verimi ile CLEA'lar hazırlanmıştır (Yu et al., 2013). *Pseudomonas sp.* lipazının (PSL) çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) için 30 mg/mL enzim çözelti kullanılarak % 45,1'lik aktivite verimi elde edilmiştir (Zhao et al., 2008).

### **3.2.1.3 Çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehit konsantrasyonunun CLEA verimine etkisi**

CLEA hazırlamasında çapraz bağlayıcının rolü, enzim aktivitesi ve operasyonel stabilite için çok önemlidir. Geleneksel olarak, CLEA hazırlanması için mevcut çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit, proteinler arasında düşük maliyet, kolay kullanım ve sayısız enzimle kovalent bağ oluşturma kabiliyeti nedeniyle yoğun şekilde kullanılmıştır (Nadar et al., 2016).

Çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi için mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi CLEA'ları farklı glutaraldehid konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Yukarıda optimize edilen koşullarda (1:5 (v/v) enzim:amonyum sülfat, 7,5 mg protein) çapraz bağlayıcı ajanın % 0,05–1,00 (v/v) konsantrasyon aralığı ile çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.8' de verilmiştir.

**Çizelge 3.8** Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi.

Glutaraldehid Konsantrasyonu	Bağlı Protein Miktarı	Protein Bağlanma Verimi	İmmobilize Enzim		
			Aktivite	Aktivite Verimi	Agregasyon Verimi
(%) (v/v)	(mg)	(%)	(Unit)	(%)	(%)
0,05	0	0	0	0	0
0,10	2,36	63	0,133	41	96
0,20	2,51	67	0,109	34	99
0,50	2,45	65	0,064	20	100
0,75	2,44	65	0,035	11	100
1,00	2,42	64	0,035	11	100

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

Çizelge 3.8' den görüldüğü gibi % 0,1 (v/v) (yaklaşık 100 mM) glutaraldehit konsantrasyonu % 41 aktivite verimi ile en yüksek değere sahiptir. % 0,05 glutaraldehit konsantrasyonunda ortamda bulunan proteinler çapraz bağlanmadığı için immobilizasyon gerçekleşmemiştir. % 0,1 (v/v) glutaraldehit konsantrasyonunun üzerine çıkıldığında ise aktivitede düşüşler gözlenmektedir. Glutaraldehitin yüksek konsantrasyonlarında aktivitedeki düşüşün nedeni, enzimin aktivitesi için gerekli esnekliğin bir kısmını kaybetmesine neden olan aşırı çapraz bağlanma olayından veya daha fazla çapraz bağlanmanın, güçlü bir difüzyon direnci ile çok güçlü CLEA' ya neden olmasından kaynaklanabilir. Genellikle, glutaraldehit kullanılarak hazırlanan CLEA' ların aktivitesi, enzimin türüne ve glutaraldehitin konsantrasyonuna oldukça bağımlı görünmektedir. Bu, enzimin yüksek reaktivitesi ve küçük glutaraldehit boyutundan kaynaklanmaktadır (Dong et al., 2010; Yu et al., 2013). Hem alkol dehidrogenazın (ADH) hem de glukoz dehidrogenazın (GDH) ortak-çapraz bağlı enzim agregatlarının (ortak-CLEA' lar) hazırlandığı çalışmada, glutaraldehit konsantrasyonu % 0,05 (v/v) olarak belirlenmiştir (Hu et al., 2016). Glukoamilazın manyetik makro moleküler CLEA' larının hazırlanması için glutaraldehit ve pektinin kullanıldığı çalışmada, her iki çapraz bağlama ajanı için uygun konsantrasyon % 1,5 (v/v) olarak belirlenmiştir

(Nadar and Rathod, 2016). Subtilisinin CLEA' larının hazırlanması için en iyi glutaraldehit konsantrasyonunun % 4 (v/v) olduğu ve glutaraldehit konsantrasyonunda daha fazla artışın, agregatların katalitik aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Sangeetha and Emilia Abraham, 2008). Mantar tirozinaz CLEA' larının hazırlanması için oluşturulan immobilizasyon prosedürde % 2' lik (v/v) glutaraldehit konsantrasyonu kullanılmıştır (Aytar and Bakir, 2008). Sığır karbonik anhidraz (bCA) enziminin normal ve manyetik nanopartiküllü (NP) çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) hazırlandığı çalışmada, 100 mM glutaraldehit konsantrasyonu kullanılarak immobilizasyon prosedürü hazırlanmıştır (Peirce et al., 2017). Pektinazın kombi-CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada glutaraldehit konsantrasyonu 110 mM olarak belirlenmiştir (Goetze et al., 2017). Kakao lipazı CLEA' larının üretimi için hazırlanan immobilizasyon prosedüründe glutaraldehit konsantrasyonu 70 mM olarak belirlenmiştir (Yusof et al., 2016).

#### **3.2.1.4 Tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ının CLEA verimine etkisi**

Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin maksimum verimle çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması için immobilizasyon ortamında kullanılan tamponun türü, konsantrasyonu ve pH' ı optimize edilmiştir. Bu amaçla, farklı tampon türleri (sodyum sitrat ve sodyum fosfat), konsantrasyonları (25-150 mM) ve pH' larında (pH 3,0-8,0) 7,5 mg protein içeren 1 mL enzim çözeltisi, 1:5 (v/v) oranında doymuş amonyum sülfat çözeltisi (% 90' lık) ve % 0,1 (v/v) glutaraldehit olacak şekilde 4°C' de 2 saat orbital karıştırıcıda 150 rpm' de karıştırma yapılarak gerçekleştirildi. Her bir deney seti için aktivite, % aktivite ve agregasyon verimleri hesaplandı (Çizelge 3.9 ve 3.10).

Çizelge 3.9' dan görüldüğü üzere, mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi sitrat tamponunda pH 5,0 de en yüksek aktivite verimini (% 46) göstermiştir. pH 5,0' in altındaki değerlere inildikçe aktivite düşmekte ve pH 3,0 de artık immobilize enzim aktivitesi görülmemektedir. Çünkü düşük pH değerinde çöken protein miktarı az olduğundan, ortamda proteine göre daha yoğun olarak bulunan glutaraldehit bu proteinlerin sıkıca çapraz bağlanmasını sağlamış ve enzimin substratı ile olan etkileşimini engellemiş olabilir. Fosfat tamponu ile yapılan denemelerde ise pH 6,5' de % 24' lük aktivite verimi gözlenmiştir. Fosfat tamponunda artan pH değerleri aktivitede düşümlere neden olmuş ve pH 8,0' e ulaştığında aktivite gözlenmemiştir. Bunun nedeni, ortamda artan pH' a bağlı olarak proteilerin denatüre olması ve glutaraldehitin yoğun çapraz bağlar oluşturması olabilir.

Tampon türü (sodyum sitrat) ve pH (5,0) belirlendikten sonra, tamponun konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 25-150 mM arasında değişen konsantrasyonlarda CLEA' lar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.10' da gösterilmiştir. Çizelge 3.10' dan görüldüğü üzere 100 mM sitrat tamponu (pH 5,0) % 45' lik en yüksek aktivite verimiyle CLEA oluşumunu sağlamıştır. Bu değer altındaki ve üstündeki iyon konsantrasyonlarında benzer agregasyon verimleri elde edilmiş olmasına rağmen, immobilize enzimin aktivitesi ve aktivite verimleri daha düşüktür. Bu nedenle, yapılacak olan enzim immobilizasyon çalışmalarına 100 mM iyon şiddeti ile devam edilmesine karar verildi. Pektinazın kombi-CLEA' larının hazırlandığı bir çalışmada, immobilizasyon çalışmaları için 50 mM pH 4.8 sitrat tamponu kullanılmıştır (Goetze et al., 2017). Glukoz oksidaz ve yaban turbu peroksidazının kombi-CLEA' larının hazırlandığı çalışmada 100 mM pH 5.0 fosfat tamponu CLEA hazırlanması için uygun bulunmuştur (Nguyen and Yang, 2017). Glukoamilazın manyetik makromoleküler CLEA' larının hazırlandığı immobilizasyon prosedüründe 100 mM pH 5.0 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır (Nadar and Rathod, 2016).  $\alpha$ -Amilazın makromoleküler çapraz bağlı enzim agregatlarının (M-CLEA) hazırlandığı çalışmada ise 100 mM pH 6.0 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır (Nadar et al., 2016). *Candida boidinii* format dehidrojenazı (FDH)' nın CLEA' larını hazırlamak için 100 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanılmıştır (Kim et al., 2013). *Aspergillus melleus* L-aminoaçilazının CLEA' larının hazırlanması için uygun tamponun 50 mM pH 8.0 fosfat tamponu olduğu belirlenmiştir (Vaidya et al., 2012).



**Çizelge 3.9** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna tampon türü ve pH' ın etkisi.\*

Tampon/pH	İmmobilize Enzim				
	Bağlı Protein Miktarı	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Aktivite Verimi	Agregasyon Verimi
	(mg)	(%)	(Unit)	(%)	(%)
<b>Sitrat</b>					
3,0	0,79	21	0	0	0
4,0	1,26	33	0,025	27	92
5,0	2,49	66	0,101	46	93
6,0	2,94	78	0,079	34	96
6,5	1,65	45	0,032	31	98
<b>Fosfat</b>					
6,5	1,81	48	0,027	24	97
7,0	2,10	56	0,002	6	100
7,5	2,66	71	0,001	5	100
8,0	2,40	64	0	0	0

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

**Çizelge 3.10** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna sitrat tamponu (pH 5,0) konsantrasyonunun etkisi.\*

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Bağlı Protein Miktarı (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite	Aktivite Verimi	Agregasyon Verimi
			(Unit)	(%)	(%)
25	4,06	54	0,145	26	98
50	4,86	65	0,167	30	97
75	4,93	66	0,190	35	98
100	5,36	71	0,246	45	98
150	5,08	68	0,175	32	98

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

### **3.2.1.5 Çapraz bağlanma süresi, sıcaklığı ve karıştırma hızının CLEA verimine etkisi**

Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile CLEA hazırlanmasında en uygun glutaraldehit konsantrasyonu optimize edilen koşullarda % 0,1 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra, çapraz bağlama işleminin süresi, sıcaklığı ve karıştırma hızı optimize edilmiştir. Öncelikle etkin bir çapraz bağlanma sağlanması için en uygun süre belirlendi. 1-24 saat arasında değişen sürelerde CLEA' lar hazırlandı ve aktivite verimleri hesaplandı (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11' den anlaşıldığı üzere artan çapraz bağlama süresine bağlı olarak immobilize enzim aktivitesi de artış göstermekte ve 6 saatte % 47' lik aktivite verimi ile en yüksek değeri vermiştir. Bu nedenle, sonraki immobilizasyon çalışmalarında çapraz bağlama süresinin 6 saat olmasına karar verilmiştir. 1 saatlik çapraz bağlanma süresi, çapraz bağlanma reaktifi glutaraldehit ve amino asitler arasındaki yetersiz reaksiyon nedeniyle düşük bir aktivite geri kazanımına yol açmıştır. Buna karşılık daha uzun çapraz bağlanma süreleri, CLEA' ların parçacık boyutunun artması nedeniyle gereksiz çapraz bağlanma ve / veya difüzyon sınırlamaları yüzünden esneklik kaybına neden olmuştur. CLEA' ların parçacık

boyutu daha büyük olursa, CLEA parçacıklarının içinde kalan enzim moleküllerinin substrat ile etkileşimi kısıtlanacaktır (Rehman et al., 2016). Kullanılan enzime bağlı olarak CLEA hazırlama aşamasında çapraz bağlanma süresi farklılık göstermektedir. Örneğin, nanopartiküllerin (NP) ilavesi ile *Rhizopus arrhizus* lipazının CLEA' larını hazırlamak için uygulanan immobilizasyon prosedüründe, çapraz bağlanma süresi 2 saat olarak bulunmuştur (Wang et al., 2017). Pektinazın kombi-CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada, 5 saatlik çapraz bağlanma süresi ile kombi-CLEA' lar elde edilmiştir (Goetze et al., 2017). Sığır karbonik anhidraz (bCA) enziminin normal ve manyetik nanopartiküllü (NP) CLEA' larının hazırlandığı çalışmada, immobilizasyon prosedürü 16 saatlik çapraz bağlanma ile tamamlanmıştır (Peirce et al., 2017). Kakao lipazı CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada, 17 saat inkübasyon sonrasında en yüksek aktivite verimine sahip CLEA' lar elde edilmiştir (Yusof et al., 2016). *R. oryzae* lipazı uygun çöktürücü ve çapraz bağlama ajanı ile 1 saat karıştırılarak CLEA' lar hazırlanmıştır (Kartal, 2016). *Bacillus sp.* alfa amilazının CLEA' larının hazırlanması için 3 saatlik inkübasyonun yeterli olduğu görülmüştür (Talekar et al., 2012). Penisilin açılaz CLEA' larının hazırlanması için ise 3 saat inkübasyon sonrasında CLEA' lar elde edilmiştir (Shah et al., 2006).

**Çizelge 3.11** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna çapraz bağlama süresinin etkisi.\*

Çapraz Bağlanma Süresi (Saat)	Bağlı Protein Miktarı (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Aktivite Verimi (%)	Agregasyon Verimi (%)
1	2,66	35	0,088	26	95
2	3,48	46	0,140	41	97
4	3,53	47	0,144	42	97
6	3,69	49	0,160	47	98
8	3,23	43	0,112	33	99
10	3,15	42	0,089	26	99
24	3,12	42	0,040	12	100

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

Çapraz bağlama süresi 6 saat olarak belirlendikten sonra, çapraz bağlanmanın gerçekleşeceği sıcaklığın belirlenebilmesi için 4-50°C arasındaki değişen sıcaklıklarda immobilizasyon gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.12' de verilmiştir. Çizelge 3.12' den anlaşıldığı üzere 4°C' nin % 43 aktivite verimi ile en uygun sıcaklık olduğu belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir. Artan sıcaklığa bağlı olarak aktivitede önemli oranda düşmeler gözlemlenmiştir. Bunun nedeni protein yapısında olan enzimin yapısının bozulması ve protein denatürasyonunun gerçekleşmesi olabilir.

Çapraz bağlama sıcaklığı da belirlendikten sonra, son olarak karıştırma hızının belirlenmesi amacıyla 50-250 rpm arasındaki farklı hızlarda CLEA oluşumu sağlandı ve aktivite verimleri hesaplandı (Çizelge 3.13). Çizelge 3.13' den görüldüğü üzere, artan çapraz bağlama hızının immobilize enzim aktivite veriminde çok fazla bir değişim sağlamaması nedeniyle, bu aşamaya dek kullanılan çalışma hızı 150 rpm ile çalışmaya devam edilmiştir. Wang ve ark. (2017), nanopartiküllerin (NP) ilavesi ile *R. arrhizus* lipazının CLEA' larını hazırlamak için 4°C' de 200 rpm karıştırma hızının uygun olduğunu bulmuşlardır. Kakao lipazı CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada, oda sıcaklığında 200 rpm' de inkübasyon sonrasında en yüksek aktivite verimine sahip CLEA' lar elde edilmiştir (Yusof et al., 2016). *Penicillium notatum* lipazının CLEA' larının hazırlandığı başka bir çalışmada, CLEA oluşumu için yine oda sıcaklığında 200 rpm karıştırma hızının uygun olduğu bulunmuştur (Rehman et al., 2016). *R. oryzae* lipazı uygun çöktürücü ve çapraz bağlama ajanı ile 400 rpm' de oda sıcaklığında karıştırılarak CLEA' lar hazırlanmıştır (Kartal, 2016). Penisilin açılaz CLEA' larının hazırlanması için 4°C'de 300 rpm inkübasyon sonrasında CLEA' lar elde edilmiştir (Shah et al., 2006).

**Çizelge 3.12** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna çapraz bağlama sıcaklığının etkisi.\*

Çapraz Bağlama (°C)	Bağlı Protein Miktarı (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Aktivite Verimi (%)	Agregasyon Verimi (%)
4	4,66	61	0,181	43	99
20	4,97	66	0,174	41	100
30	4,74	63	0,143	34	100
37	4,23	56	0,113	27	100
50	3,09	41	0,083	20	100

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

**Çizelge 3.13** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna çapraz bağlama sıcaklığının etkisi.\*

Çapraz Bağlama Hızı (rpm)	Bağlı Protein Miktarı (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Aktivite Verimi (%)	Agregasyon Verimi (%)
50	5,09	68	0,194	46	99
100	5,09	68	0,199	47	99
150	5,08	68	0,201	47	99
200	4,79	64	0,196	46	99
250	4,59	61	0,191	45	99

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

### **3.2.1.6 BSA ilavesinin CLEA verimine etkisi**

CLEA' ların hazırlanma parametrelerinin optimizasyonu son derece karmaşık bir süreçtir. Agregatlaşmayı veya agregatların çapraz bağlamasını değiştirebilecek

herhangi bir parametre, muhtemelen, kalan aktivite ve parçacık boyutu üzerinde bir etkiye sahip olacaktır. Aynı şekilde, çapraz bağlayıcı, çöktürme ajanı ve katkıların (BSA gibi) arasındaki birçok etkileşim, CLEA' ların son şeklini etkileyebilir (Yu et al., 2006; Cruz et al., 2012). Özellikle, düşük protein içerikli enzim preparatlarından CLEA oluşumunu desteklemek için proteik besleyici olarak BSA ilavesi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Bu amaçla, son toplam protein miktarı 7,5 mg ve enzim:BSA oranı 1:3, 2:2, 3:1 ve 4:0 (w/w) olacak şekilde CLEA' lar hazırlandı ve sonuçlar Çizelge 3.14' de verildi.

**Çizelge 3.14** Mısır  $\alpha$ -galaktozidazının immobilizasyonuna BSA ilavesinin etkisi.\*

Enzim:BSA Oran (w/w)	Bağlı Protein Miktarı (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Aktivite Verimi (%)	Agregasyon Verimi (%)
4:0	4,87	65	0,201	47	99
3:1	4,92	66	0,137	32	99
2:2	5,92	79	0,098	23	100
1:3	6,49	87	0,075	18	100

\*Serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz; 1,69 U/mL, 26,4 mg/mL protein, 0,064 U/mg.

CLEA' ların aktivitesi, enzimin katalitik artıkları glutaraldehid ile reaksiyona girdiğinde serbest enzim formuna kıyasla azalır. Dolayısıyla, BSA gibi bir proteinin "besleyici" olarak kullanılması, amino artıklarının miktarını arttırarak CLEA' nın etkinliğini arttırdığı önerilmiştir (Garcia-Galan et al., 2011; Kim et al., 2013). Ancak Çizelge 3.14' ten görüldüğü üzere, ortama ilave edilen BSA' nın aktivite veriminde pozitif yönde bir katkısı olmamış, kontrol örneği olan 4:0 enzim:BSA oranında en yüksek aktivite verimi gözlenmiştir. Bu nedenle, BSA ilavesi olmaksızın CLEA hazırlanmasına karar verilmiştir. Benzer şekilde, SDS degradasyonu yapan *Pseudomonas sp.* S9 alkil sülfatazı (SdsAP) CLEA' sının kullanıldığı çalışmada, CLEA hazırlığı aşamasında proteik besleyici olarak ortama ilave edilen BSA' nın SdsAP-CLEA' larının aktivitesi üzerine bir etkisi olmadığı görülmüş ve CLEA' ların hazırlanmasında ortama BSA ilavesi yapılmamıştır (Li et al., 2016).

### 3.2.2 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin $\text{çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) değerlendirilmesi$

Mısırdan izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi  $\text{çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA' lar)}$  hazırlanarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon yöntemi için enzim immobilizasyonunun optimizasyonu çalışmaları yapıldı. İmmobilize enzim preparatının hazırlanması için belirlenen optimum koşullar Çizelge 3.15' de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.15** Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için belirlenen optimum koşullar.

Parametre	CLEA
<b>Tampon türü, konsantrasyonu ve pH' sı</b>	Sitrat tamponu, 100 mM, pH 5,0
<b>Enzim:Amonyum sülfat oranı</b>	1:5 (v/v) (% 75 w/v, amonyum sülfat)
<b>Protein miktarı</b>	7,5 mg
<b>Glutaraldehit konsantrasyonu</b>	% 0,1 (v/v)
<b>Çapraz bağlama süresi, sıcaklığı ve hızı</b>	6 saat, 4 °C, 150 rpm

Optimize edilen koşullarda  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi büyük ölçekte immobilize edilmiş ve bu enzim ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan immobilize enzim ve serbest enzimin, soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Mısırdan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin  $\text{çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA)}$  optimize edilmiş koşullarda (100 mM sodyum sitrat tamponu, pH 5,0, 7,5 mg protein) (Çizelge 3.14) % 47 aktivite verimi ve % 90 üzerindeki agregasyon verimi ile hazırlandı.  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hazırlanmış herhangi bir CLEA çalışması literatürde mevcut değildir. Ancak birçok farklı enzimin yüksek verimlerle immobilizasyonu bu şekilde gerçekeştirilmif ve hazırlanan CLEA' lar çeşitli amaçlarla farklı uygulamalarda kullanılmıştır. Örneğin; fenolik atık suyun enzimatik işlemden geçirilmesinde kullanılmak amacıyla mantar tirozinazı CLEA' ları hazırlanmıştır. Çapraz-bağlı tirozinaz enzimi agregatları ile

katalize edilen fenol, p-kresol, p-klorofenol ve bisfenol A gibi fenolik bileşikler, etkin bir şekilde, 0.5-3 saat içinde tam dönüşüm ile elimine edilebilmiştir. Bu yöntemin aynı enzimin serbest veya geleneksel taşıyıcıya immobilizasyon yöntemleriyle bağlı immobilize formuyla yapılan diğer kataliz işlemlerinden daha üstün olduğu gözlenmiştir. Hydra sinesis testleri ile de fenol-içeren solüsyonun toksisitesinin tirozinaz CLEA' ları ile muamele gördükten sonra kayda değer ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Xu and Yang, 2013). *A. oryzae*  $\beta$ -galaktozidazı selit üzerine adsorpsiyon, kitosana kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile agregasyon gibi üç farklı yöntemle immobilize edilmiştir. Bu tekniklerin oligosakkarit sentezinde immobilizasyon verimleri açısından hazırlanmaları, enzimatik özellikleri, kararlılıkları ve verimlilikleri karşılaştırılmıştır.  $K_M$  değeri her bir immobilizasyon yöntemi için artmıştır. Kitosan üzerinde yapılan immobilizasyon ile maksimum enzim verimi ve oligosakkarit sentezi elde edilmiştir. 60°C' de kitosanda immobilize enzim, matriksin koruma etkisine bağlı olarak kararlıdır (1.6 kat). Ancak, 65°C' de B-galaktozidazın çapraz bağlı enzim agregatları  $t_{1/2}$ =1.07 saat iken, serbest enzim için bu değer 0.79 saat olarak bulunmuştur. Kitosanda immobilize enzim ve CLEA' ların her ikisi de oligosakkarit sentezinde kullanılmıştır. % 20 (w/v) laktozun kullanılmasıyla, 40 °C' de 2 saatte kitosanda immobilize enzim serbest enzime göre (% 10) maksimum oligosakkarit verimi (toplam şekerlerin % 17.3' ü) vermiştir. CLEA' nın 12 saatte laktoz hidrolizinde % 78 monosakkarit verimi ile daha etkin olduğu bulunmuştur (Gaur et al., 2006).

### 3.3 Serbest ve İmmobilize Mısır $\alpha$ -Galaktozidaz Enzimlerinin Karakterizasyonu

Enzimlerin aktivitesi yapı ve konformasyon tarafından belirlenmesine rağmen, immobilizasyondan kaynaklanan çevresel değişim sadece maksimum aktiviteyi değil, aynı zamanda enzim preparatının stabilitesini de etkiler. Enzimleri inaktive eden faktörler sistematik olarak anlaşılammıştır ve enzimin kendine has niteliğine, immobilizasyon yöntemine ve kullanılan reaksiyon koşullarına bağlıdır. Genel olarak, immobilize enzim preparatları daha iyi stabilite sergilemektedir. Enzimatik süreçlerin tasarımı reaktant ve ürün seçiciliği, ürün verimini sınırlayabilecek termodinamik denge ve işlem koşullarının bir fonksiyonu olarak reaksiyon hızı (enzim, substrat, inhibitörler, sıcaklık, pH, vb.) bilgisini gerektirir. Bir enzimin immobilizasyonu, sürekli bir reaktörde tutulmasına izin verir; ancak başlangıçtaki aktivitesi ve stabilitesi, endüstriyel uygulamalarda yararlılığını doğrudan etkiler. Bu nedenle endüstriyel proseslerde kullanılan immobilize enzim



preparatlarının kararlılıklarının iyi anlaşılması önemlidir (Tischer and Kasche, 1999).

İmmobilize enzimlerin stabilitesini etkileyen faktörlerin anlaşılması, daha uzun ömürleri olan faydalı preparatlara yol açabilir ve bu teknolojinin endüstri üzerindeki etkisini artırabilir. İmmobilizasyon, bir proteinin farklı bölgelerinin hareketsiz kalmasına neden olabilir, farklı sağlamlık kazandırır ve enzimi çok farklı şekillerde bozabilir, enzimin etrafında çok farklı fiziksel özellikler taşıyan farklı mikro ortamlar üretmek bile mümkün olabilir (Johnson, 1979).

Serbest ve immobilize mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyonu Bölüm 2.10' da verilen açıklamalar doğrultusunda gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyonu amacıyla enzimlerin aktivitelerine ve kararlılıklarına çeşitli parametrelerin etkisi incelendi.

### **3.3.1 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi**

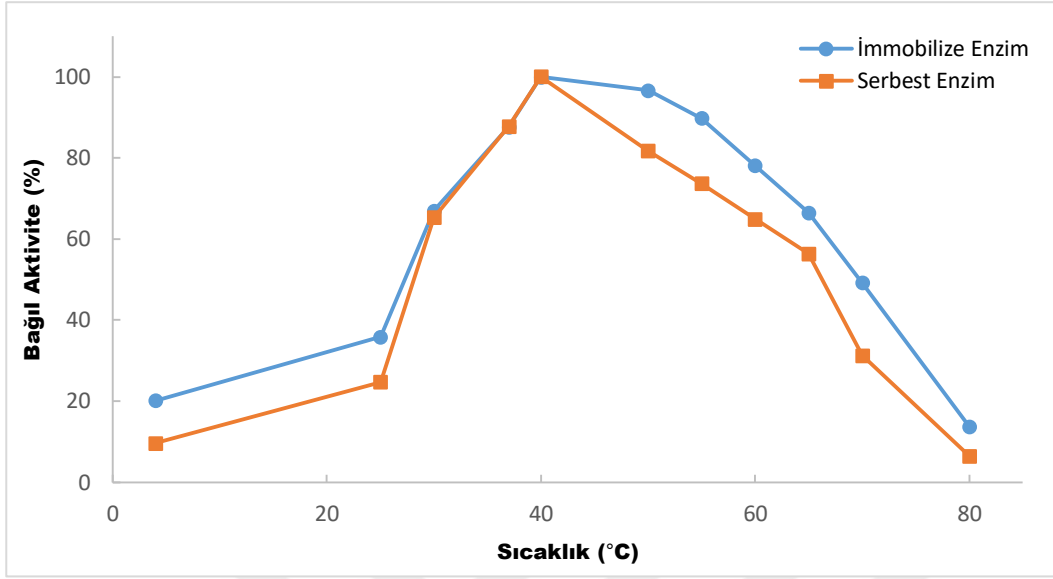
#### **3.3.1.1. Sıcaklık**

Enzim immobilizasyonunun ana ve birincil nedenlerinden birinin, immobilizasyonu gerçekleştiren moleküllerin konformasyonel hareketliliğinin sınırlı olması nedeniyle çeşitli deaktivasyon koşullarına karşı kararlılıkta beklenen artış olduğu ortaya çıkmıştır. Belirli bir zamanda sıcaklığa karşı immobilize enzimlerin direnci, enzimin potansiyel uygulamaları için önemli ve büyük bir avantaj olarak kabul edilir (Mahmod et al., 2016).

Optimum sıcaklık ifadesi, enzimin maksimum verimle en iyi çalıştığı sıcaklık değeridir. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine sıcaklık değişimlerinin etkisini incelemek için optimum eğrileri çizilir. Artan inkübasyon süresine bağlı olarak genellikle termal denatürasyon sebebiyle optimum sıcaklıkta düşüşler gözlenir. İmmobilizasyon işlemi sonrası enzimin optimum sıcaklığı genellikle değişir.

Sıcaklığın serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların aktivitelerine etkisinin belirlenmesi için 4-80°C aralığındaki farklı sıcaklıklarda çalışılarak optimum sıcaklık grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.2). Aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerine sıcaklığın etkisi Bölüm 2.10.1.1' de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi standart koşullar altında ölçülerek belirlenmiştir. Ayrıca elde

edilen sonuçlardan yola çıkılarak hazırlanan Arrhenius diyagramlarından ( $1/T'$  ye karşılık log aktivite) aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) hesaplandı (Şekil 3.3).



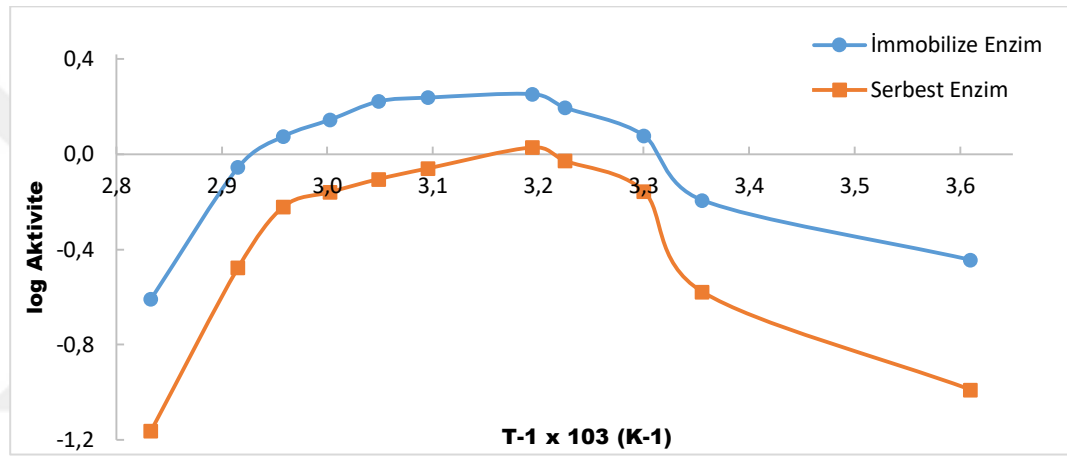
Şekil 3.2 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların aktivitelerine sıcaklığın etkisi.

Şekil 3.2' den görüldüğü üzere hem serbest hem de immobilize enzimler için optimum sıcaklık  $40^{\circ}\text{C}$  olarak bulunmuştur. Literatür ile kıyaslandığında, genel olarak bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri  $37-40^{\circ}\text{C}$  arasında değişmektedir. İmmobilize enzimin sıcaklık değişimlerine direnci enzimlerin pratik uygulamalarında önemli ve büyük bir avantaj olarak kabul edilmektedir.  $40^{\circ}\text{C}$ ' in üzerindeki sıcaklıklarda serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesinde bir düşüş gözlenirken, immobilize enzim sıcaklıktaki artışa direnmiş ve serbest enzime kıyasla daha yüksek aktivite kaydetmiştir. Serbest enzimler, yüksek sıcaklıkta kolaylıkla denatürasyona uğrayabilirken, immobilize enzimler muhtemelen rijid biçimiyle korunmaktadır. Dolayısıyla, immobilize enzimlerin, katalitik aktivitelerini serbest enzime kıyasla daha iyi koruyabildikleri görülmektedir (Tutar et al., 2009).

CLEA' ların inaktivasyon hızı sabitinin, her sıcaklıkta serbest formdan daha düşük olduğu ve yüksek termal kararlılığa sahip olduğu fark edilmiştir. Bu, enzim molekülleri ile aktif konformasyonda CLEA' ların muhafaza edilmesine katkıda bulunan çapraz bağlayıcılar arasında oluşan kovalent bağ ile sağlanan sertliğe atfedilebilir. Kimyasal çapraz bağlama, ısı ile indüklenen multimerik enzimin konformasyonel değişimlerini sınırlar ve enzimin kuaterner yapısını dengeler. Bu,

CLEA' ların ve serbest enzim üzerindeki üstün termal stabilite ve sağlam doğasını göstermektedir (Nadar et al., 2016).

Reaksiyon hızlarının sıcaklık duyarlılığı, genellikle Arrhenius denklemiyle tanımlanır ve bu, reaksiyonu başlatmak için gereken enerjiye (aktivasyon enerjisi ( $E_a$ )) dayanır. Kimyasal reaksiyonlar için, Arrhenius denklemi, aktivasyon enerjisinin sabit değerlerini varsayarak artan sıcaklık ile reaksiyon hızlarını katlanarak arttırmayı öngörür. Bu nedenle, Arrhenius davranışından sapmalar, enzim denatürasyonu ve proteoliz yoluyla enzim sistemlerinin sıcaklık duyarlılığının bir sonucu olarak veya örneğin ısıyla hızlandırılmış immobilize enzimlerin desorpsiyonu sonucu ortaya çıkabilir (Razavi et al., 2015).



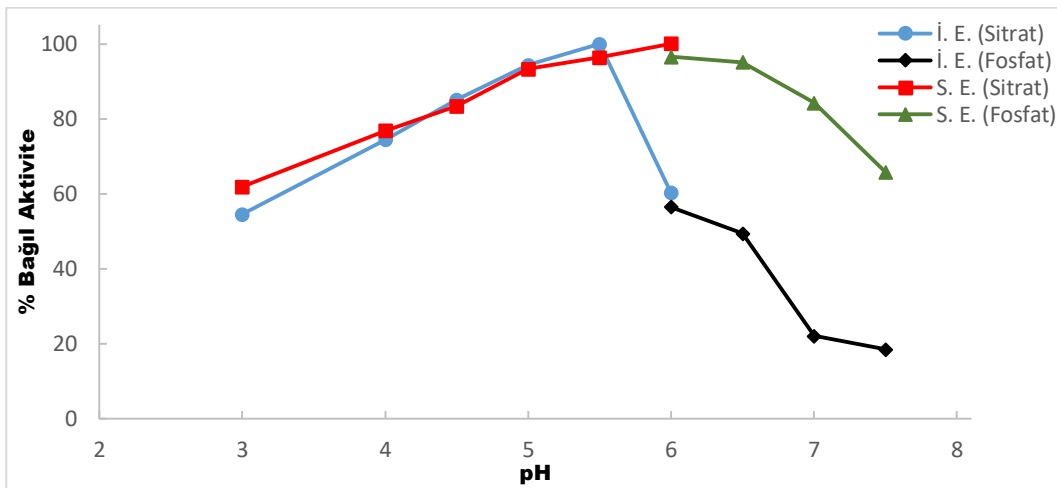
Şekil 3.3 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Arrhenius diyagramları.

Şekil 3.3' ten görüldüğü üzere, serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazlar için çizilen Arrhenius diyagramlarından aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) serbest enzim için 35,2  $\text{kJ mol}^{-1}$ , immobilize edilen enzim için 35,3  $\text{kJ mol}^{-1}$  olarak bulunmuştur. İmmobilize ve serbest enzim yaklaşık olarak benzer aktivasyon enerjisine sahiptir. Bu durum, termal inaktivasyonun esasen serbest ve immobilize enzim için aynı enerjik bozulmaya neden olduğunu gösterir. Yani, protein denatürasyonunun her iki formda aynı konformasyonel geçiş durumunda meydana geldiğini ifade etmektedir. İmmobilizasyon, proteini sınırlı bir alanda hareketsiz kılmış, protein dinamiklerini oldukça engellemiş ama protein konfigürasyonunu değiştirmemiştir (Haouz et al., 2001). DEAE-selüloza kovalent bağlı amiloglukozidaz enziminin serbest ve immobilize formu için çizilen Arrhenius diyagramlarından aktivasyon enerjisini hesaplanmış ve bu değer serbest ve immobilize enzim için 11,4  $\text{kcal/mol}$  olarak bulunmuştur (Oneill et al., 1971). Bahar ve Çelebi (1998), *A. niger* glukoamilazını manyetik polistiren parçacıklarda immobilize etmişlerdir. Serbest

ve immobilize enzim için aktivasyon enerjileri 14.09 kJ/mol olarak bulunmuştur. *S. cerevisiae* invertazının, anyon değiştirici reğine olan DOWEX-1X8-50®' nin adsorpsiyon kapasitesinin değerlendirilmesinde model bir enzim olarak kullanıldığı başka bir çalışmada immobilize ve serbest enzim formlarının sükroz hidrolizi için aynı miktarda aktivasyon enerjisi (57 kJ/mol) gerektirdiği gözlenmiştir (Ribeiro and Vitolo, 2005). Başka bir çalışmada *A. niger* glikoz oksidazı glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiş ve her iki enzim için aktivasyon enerjisi 70 kcal/mol olarak bulunmuştur (Haouz et al., 2001).

### 3.3.1.2 pH

Her enzim optimum pH' da maksimum aktivite gösterir ve optimum pH' nın üstünde veya altında aktivite düşüktür. Enzimler tipik olarak pH 5-9 aralığında en aktiftir. Proteinlerin karboksil ve amino terminallerinin yanı sıra çeşitli amino asit artıkları, hücre içi pH aralığında bir  $pK_a$  aralığına sahiptir. Bu nedenle, pH' da ki bir değişiklik, bir yan grubun protonlanmasına veya deprotonasyona uğramasına, dolayısıyla kimyasal özelliklerinin değişmesine neden olabilir. Örneğin, deprotonize edilen karboksil terminali, enzim konformasyonunu değiştirerek potansiyel olarak bitişik bir alt birimle olan etkileşimini kaybedebilir. Sonuç olarak, bu konformasyon substrat afinitesinde bir azalmaya neden olabilir. Daha şiddetli bir pH değişimi, protein katlanmasını değiştirebilir ve böylece enzimi tamamen deaktive edebilir veya geri döndürülemez şekilde proteolize neden olabilir (Berg, 2007). pH' ın serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların aktivitesine etkisi incelenmiş ve optimum pH belirlenmiştir. Sonuçlar şekil 3.4' te verilmiştir.



şekil 3.4 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine pH' ın etkisi ve optimum pH.

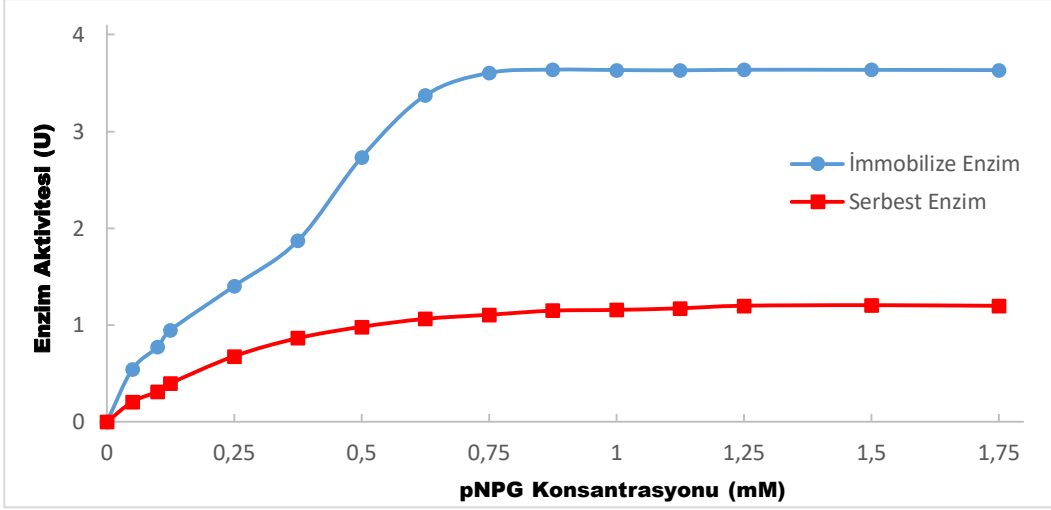
Şekil 3.4' ten görüldüğü gibi serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum pH değeri sırasıyla 6,0 ve 5,5 olarak bulunmuştur. Immobilize enzimin optimum pH' sında asidik tarafa doğru bu pH kayması, çapraz bağlama maddesi ve enzim arasındaki ikincil etkileşimlere bağlıdır. Optimum pH' daki değişim, enzimin yüküne bağlıdır. Enzimle glutaraldehitin birleşmesi, enzimin yüzeyindeki tüm mevcut amino gruplarını bağlamış ve dolayısıyla enzim yüzeyindeki bazik gruplar, enzim proteinine pozitif bir yük verip, neticede optimum pH' ı daha düşük tarafa kaydırmıştır. Yani, immobilizasyondan sonra bazik grupların miktarında bir artış meydana gelmiş ve enzim daha fazla poli-katyonik karakter kazanmıştır. Çapraz bağlama prosedürü pH kaymasına karşın enzimatik direnci önemli ölçüde artırabilir (Aytar and Bakir, 2008; Hormigo et al., 2012; Mahmud et al., 2016; Li et al., 2016).

### **3.3.1.3 Substrat spesifikliği ve kinetik parametreler**

Spesifiklik, bir substratın aktif bölgede atomların tanımlanmış bir düzenine sahip bir enzime bağlanması ile gerçekleşir. Substratın doğru bağlanabilmesi için aktif bölgenin enzimle eşleşen doğru bir şekilde sahip olması gerekir. Substrat enzime hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi çok zayıf bağ etkileşimleri vasıtasıyla bağlanır. Bazı durumlarda, aktif bölge, substrat enzime bağlanıncaya kadar şekil değiştirmez. Maksimum bağlanma enerjisi ancak doğru substrat enzime bağlandığında başarılabilir. Bu, substrat spesifikliğini çok önemli hale getirir. Substrat geçiş halindeyken bağlanma enerjisinin serbest bırakılması reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürür ve böylece reaksiyonun daha hızlı olmasını sağlayarak ürünün zamana oranla çok daha kısa olmasını sağlar (Berg, 2007). Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin substrat spesifiklikleri sentetik (pNPG: p-nitrofenil  $\alpha$ -D-galaktopiranozid) ve doğal (melibiyoz, rafinoz, stakiyoz) substratları kullanılarak test edilmiş ve sonuçlardan yola çıkılarak kinetik parametreler ( $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$ ) hesaplanmıştır.

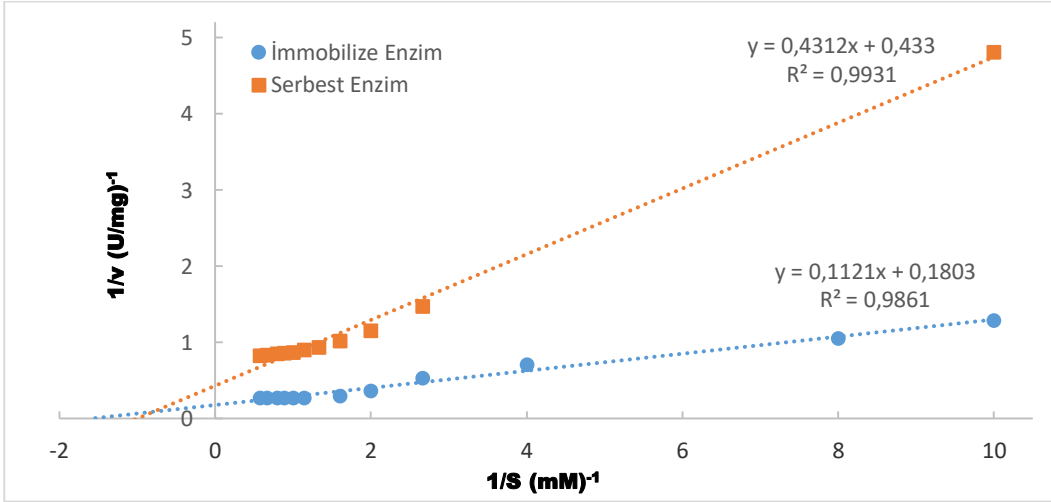
#### **p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG):**

Bölüm 2.10.1.3' de anlatıldığı üzere, serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesine sentetik substratı olan pNPG' nin etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.5). Şekil 3.5' ten görüldüğü üzere serbest ve immobilize enzim için yaklaşık doygunluk substrat konsantrasyonu sırasıyla 0,875 ve 0,75 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 3.5 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat konsantrasyonunun (PNPG) etkisi.

Kinetik parametreler  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerleri pNPG' nin substrat olarak kullanıldığı koşullarda çizilen Lineweaver-Burk diyagramı yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 3.6) Serbest enzim için  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 0,82 mM, 2,05 U/mg ve  $0,65 \text{ s}^{-1}$  immobilize enzim için de 0,62 mM, 5,55 U/mg ve  $2,06 \text{ s}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

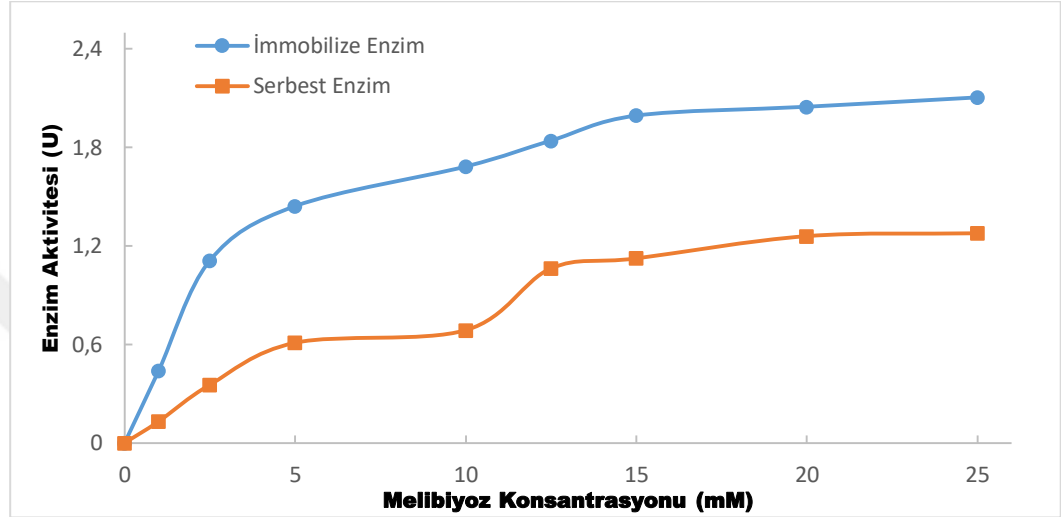


Şekil 3.6 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG).

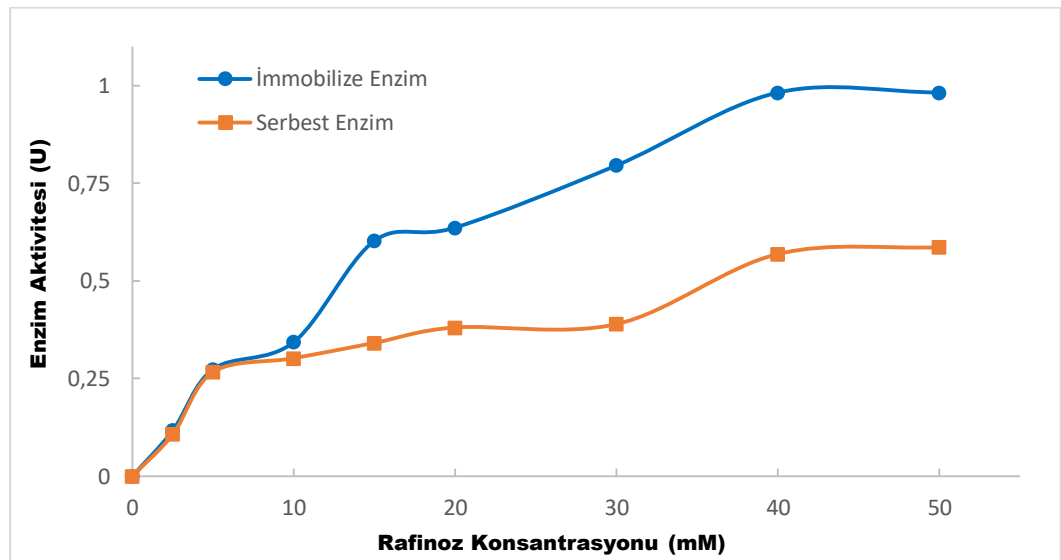
### Melibiyoz, Rafinoz ve Stakiyoz:

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin literatürdeki çalışmalarda en yaygın kullanılan doğal substratları melibiyoz, laktoz, rafinoz, stakiyoz, sükröz, keçiyoynuzu sakızı

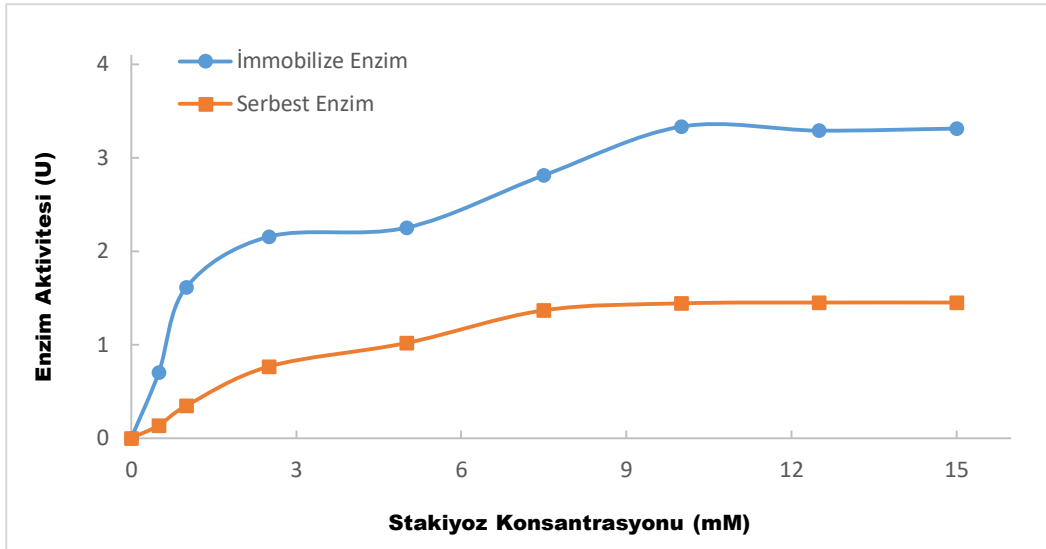
ve guar sakızdır. Melibiyoz, rafinoz ve stakiyozun kullanıldığında enzimin doygunluk substrat konsantrasyonu ile  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerlerini belirlemek için 2,5-50 mM konsantrasyonlarında rafinoz; 0,5-15 mM konsantrasyonlarında stakiyoz 1,0-25 mM konsantrasyonlarında melibiyoz kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine etkisi incelenmiştir (Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9). Bu üç doğal substratın doygunluk substrat konsantrasyonları serbest ve immobilize enzimler için Çizelge 3.16' da verilmiştir.



Şekil 3.7 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat (Melibiyoz) konsantrasyonunun etkisi.



Şekil 3.8 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat (Rafinoz) konsantrasyonunun etkisi.



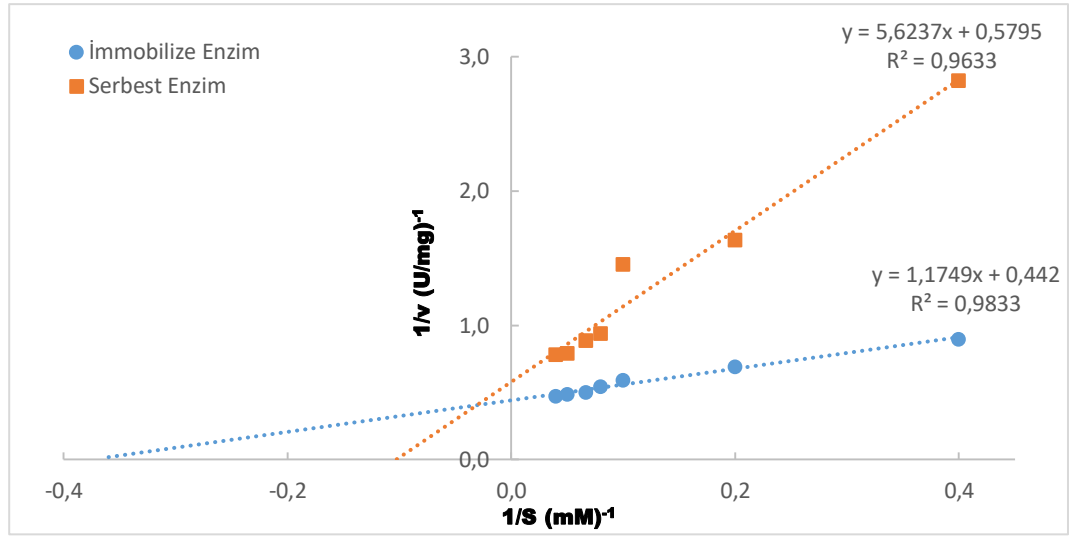
Şekil 3.9 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine substrat (Stakiyoz) konsantrasyonunun etkisi.

Çizelge 3.16 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin doygunluk substrat konsantrasyonu.

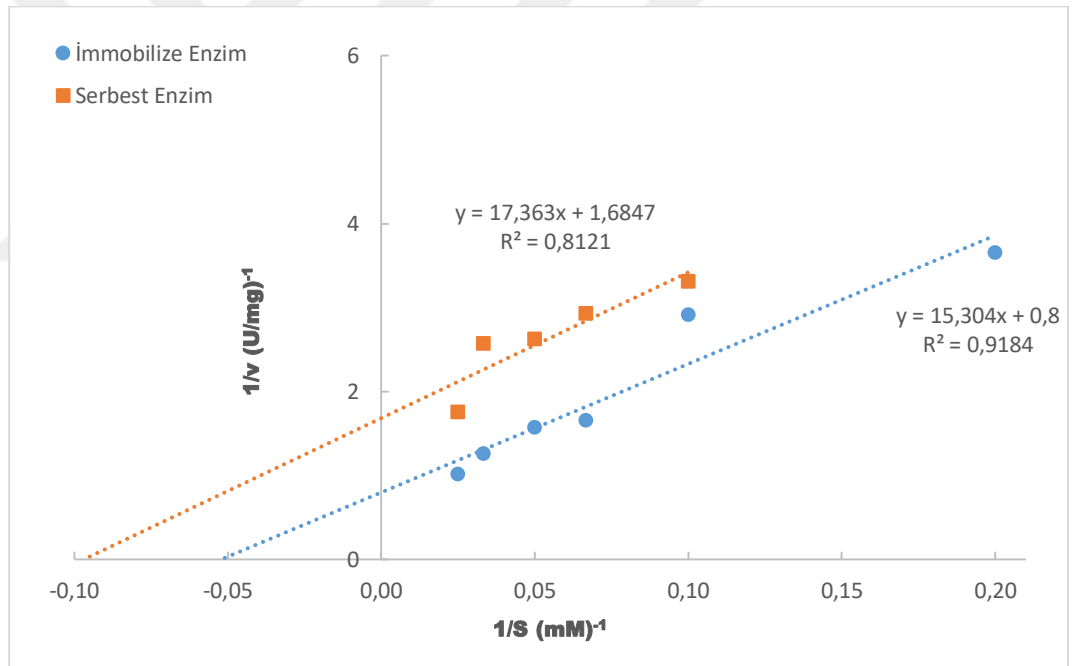
Substrat Doygunluk Konsantrasyonu (mM)		
<u>Substrat</u>	<u>Serbest Enzim</u>	<u>İmmobilize Enzim</u>
Stakiyoz	7,5	10,0
Melibiyoz	20,0	15,0
Rafinoz	40,0	40,0

Melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz için çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından (Şekil 3.10, 3.11 ve 3.12) serbest ve immobilize enzimlerin  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $k_{cat}$  değerleri hesaplanmış ve Çizelge 3.17’ de hem doğal hem de sentetik substratlar için bulunan değerler verilmiştir.

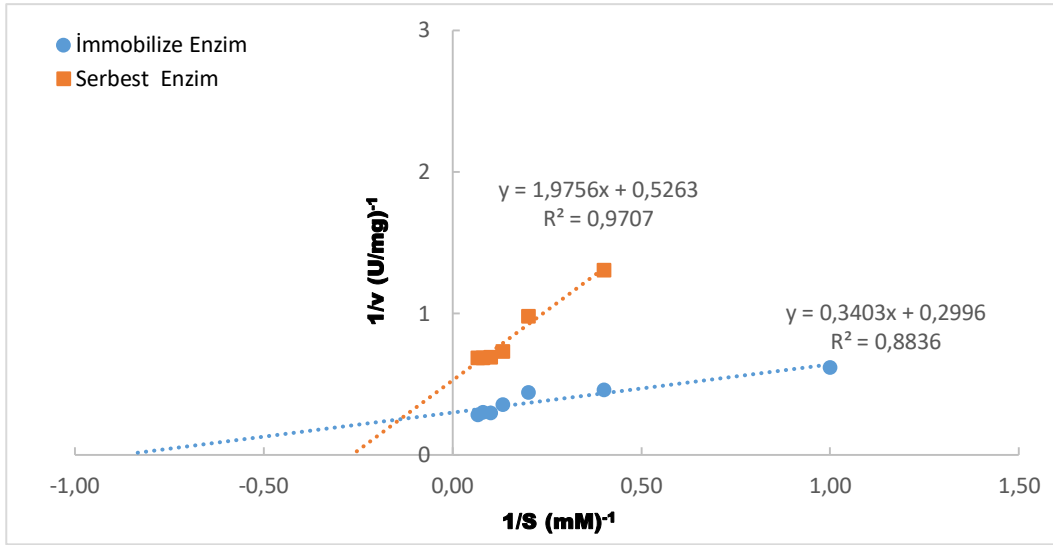




Şekil 3.10 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Melibiyoz).



Şekil 3.11 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz).



Şekil 3.12 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Stakiyoz).

Çizelge 3.17 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin kinetik sabitleri.

Substrat	Serbest Enzim			İmmobilize Enzim		
	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
pNPG	0,82	2,05	0,65	0,62	5,55	2,06
Stakiyoz	5,14	1,90	0,21	1,14	3,34	0,93
Melibiyoz	9,70	1,73	0,18	2,66	2,26	0,14
Rafinoz	12,22	0,63	0,01	19,12	1,25	0,01

Çizelge 3.17' den görüldüğü üzere pNPG, stakiyoz ve melibiyozun substrat olarak kullanıldığı immobilize enzimlerin  $K_M$  değeri serbest enzime göre azalmış,  $V_{max}$  değerleri ise artmıştır. Bu değer immobilizasyon sonrası enzim ve substrat arasındaki etkileşimin güçlendiğini göstermektedir. İmmobilize enzimin substrata olan daha yüksek afinitesi, esnek bir glutaraldehit kolunun varlığına bağlı olabilir

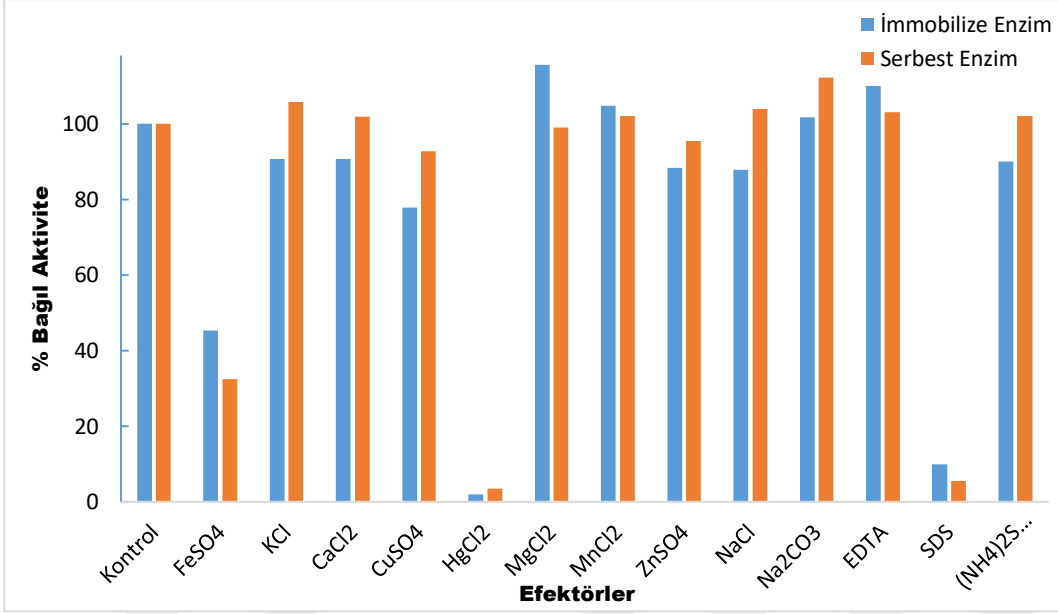
ve bu da enzimin, aktif bölgesini substrata doğru uygun bir şekilde yönlendirmesine yardımcı olur (Sangeetha and Emilia Abraham, 2008).

Substrat olarak rafinozun kullanıldığı deneme de ise immobilize enzimin  $K_M$  değerinin serbest enzimin  $K_M$  değerinden biraz yüksek olduğu ve immobilizasyon sonrasında serbest enzime kıyasla  $V_{max}$  değerlerinin de arttığı gözlemlendi. Sonuçlar, çapraz bağlı immobilizasyonun difüzyon direncine bağlı olarak, substratın immobilize enzimin aktif bölgesine erişebilirliğini azalttığını ve bunun sonucunda da enzime afinitesini azalttığını göstermiştir. Immobilizasyon sonrasında CLEA yapısı, sıvı formdaki serbest enzime kıyasla çapraz bağlanma nedeniyle substratla daha az ara yüzey etkileşimine sahiptir.  $V_{max}$  değeri temelde enzimin tamamen doymuş bir substratı ne kadar hızlı hidrolize edebildiğini ölçer. Dolayısıyla immobilize edildikten sonra  $V_{max}$  değerinde bir artış, birim zaman başına bir üründe dönüştürülmek için daha az substrata ihtiyaç duyulduğu anlamına gelir (Lei and Bi, 2007; Rehman et al., 2013; Yu ve diğerleri, 2013). Serbest enzimle karşılaştırıldığında CLEA için daha yüksek  $K_M$ ,  $\beta$ -galaktozidaz (Gaur et al., 2006), penisilin açılaz (Pchelintsev et al., 2009) ve tirozinaz (Xu et al., 2011) ile hazırlanan CLEA' lar için de gözlenmiştir.

#### **3.3.1.4 Efkör etkisi**

İyonların protein kararlılığına etkisi, proteinler ve iyonlar arasındaki kimyasal etkileşimlerin (veya şelatasyonun) substratlar, ortak substrat veya enzimlerin eş faktörleri olarak kullanılan iyonlar gibi kompleksleri oluşturmak için oluşabilir. Bununla birlikte, iyon özgülüğü çoğunlukla su yapısını değiştiren (fiziksel etki) iyon yeteneğine bağlanır ve böylece protein hidratasyon ortamını etkiler. Suyun yapısını arttıran kuvvetlice hidratlanmış iyonlara kozmotroplar (yapı yapıcılar) ve suyun yapısını azaltan zayıf derecede hidratlanmış iyonlara kaotroplar (yapısal ayırıcı) adı verilir. Kozmotroplar genellikle küçük ve yüksek yüklü iken, kaotroplar geniş ve düşük yüklüdür. Gerçekte, tüm çok değerlikli iyonlar çok hidratlıdır, bu nedenle kozmotropiktir.

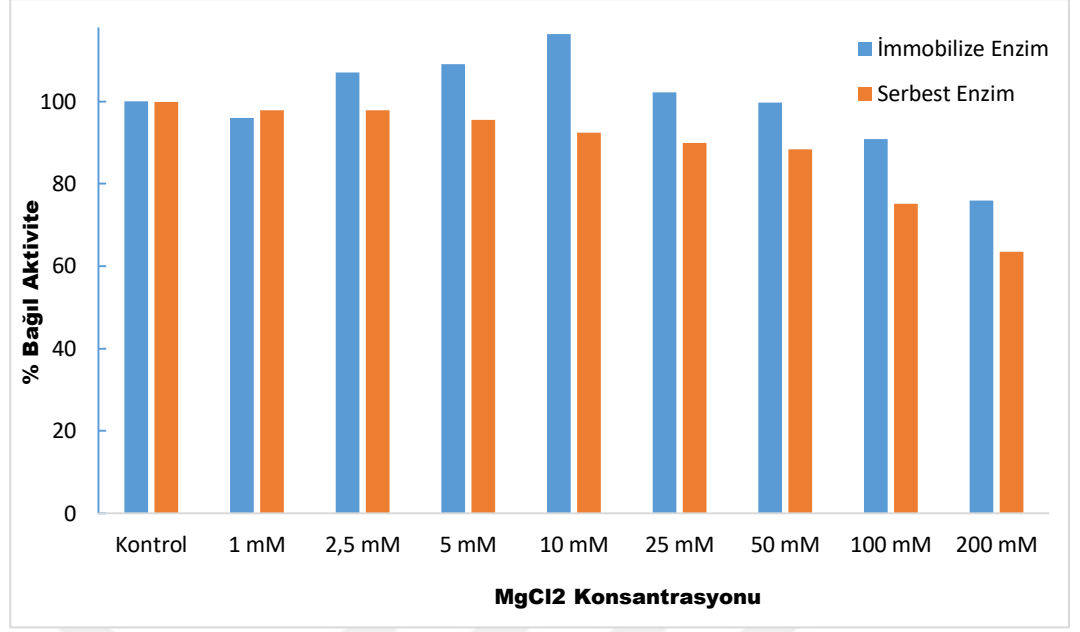
Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine ortama ilave edilen 10 mM konsantrasyondaki metallerin ( $CaCl_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $KCl$ ,  $HgCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MnCl_2$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $Na_2CO_3$ , EDTA, SDS,  $(NH_4)_2SO_4$ ) etkisi incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.13' te verilmiştir.



Şekil 3.13 Metallerin serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.

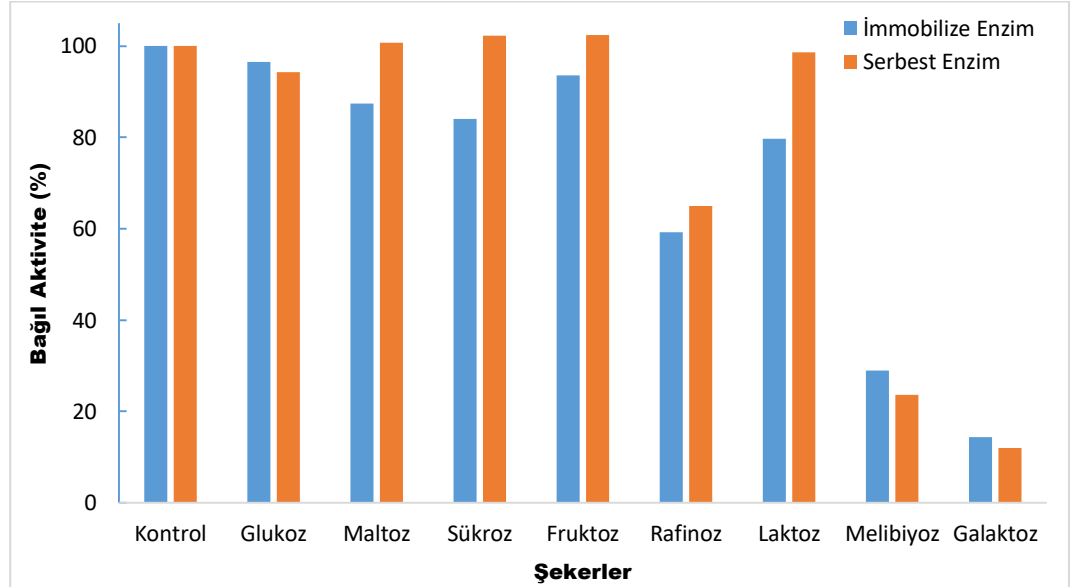
Şekil 3.13'den görüldüğü üzere MgCl<sub>2</sub> (%116), EDTA (%110) ve MnCl<sub>2</sub> (%105) immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için zayıf bir aktivasyon etkisi göstermişlerdir. Şelatlama ajanı EDTA'nın varlığında aktivite artışının nedeni, enzim aktivitesi için enzimin metal iyonlarına bağımlı olmadığını düşündürmektedir. HgCl<sub>2</sub> (%2) ve SDS (%10) hem serbest hem de immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz için kuvvetli inhibisyon etkisi göstermişlerdir. HgCl<sub>2</sub>, tiol özümlü güçlü bir inhibitördür; histidin amino ve imidazolium gruplarıyla ve peptid bağlarıyla reaksiyona girer ve enzim aktivitesinde azalmalara neden olur. SDS, proteinlerin üçüncül ve kuaterner yapılarını bozarak aşırı derecede denatüre eden bir reaktiftir ve ortama ilave edilmesi aktiviteyi olumsuz etkilemiştir (Hu et al., 2016). *Talaromyces leycettanus* JCM12802' den izole edilen termofilik  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için SDS ve Ag<sup>+</sup> inhibitör etki göstermiştir (Wang et al., 2016). Maruta ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> *F. oxysporum*  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin aktivitesini tamamen inhibe etmiştir (Maruta et al., 2017).

Efektörlerle yapılan çalışmanın ikinci kısmında kısmi aktivasyon etki gösteren MgCl<sub>2</sub> (Şekil 3.14) farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 3.14'ten görüldüğü üzere, MgCl<sub>2</sub>'nin 10 mM konsantrasyonda maksimum aktivasyon etkisi gösterdiği ve bu konsantrasyonun üzerine çıkıldığında ise artan iyon şiddetinin enzim aktivitesini olumsuz etkilediği gözlenmiştir.



Şekil 3.14 MgCl<sub>2</sub>' nin farklı konsantrasyonlarının serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine ortama ilave edilen 10 mM konsantrasyondaki şekerlerin (galaktoz, glukoz, sukroz, fruktoz, laktoz, maltoz, melibiyoz, rafinoz) etkisi incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.15' te verilmiştir.

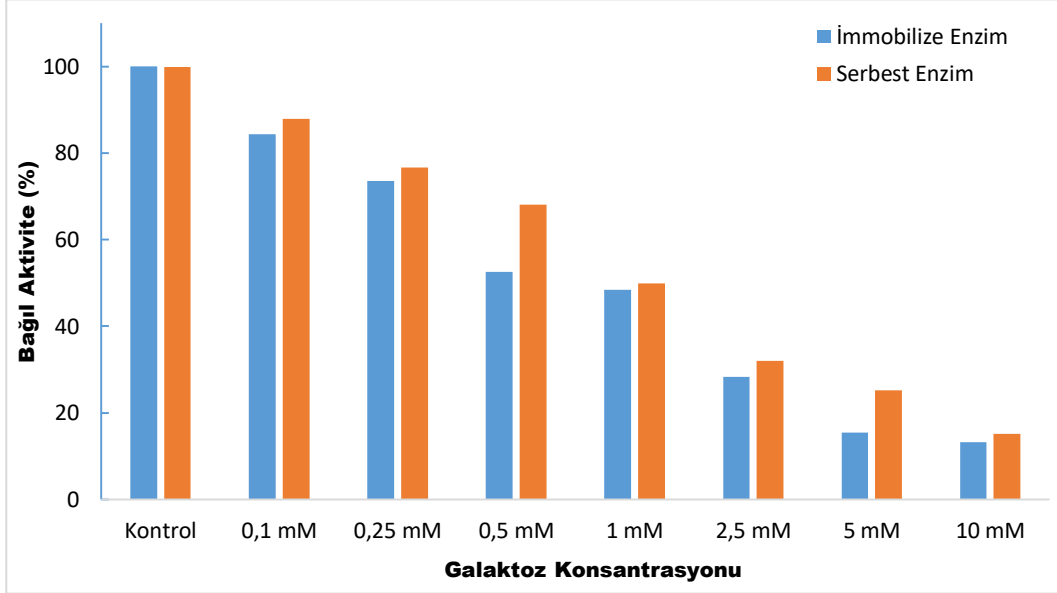


Şekil 3.15 Şekerlerin serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.

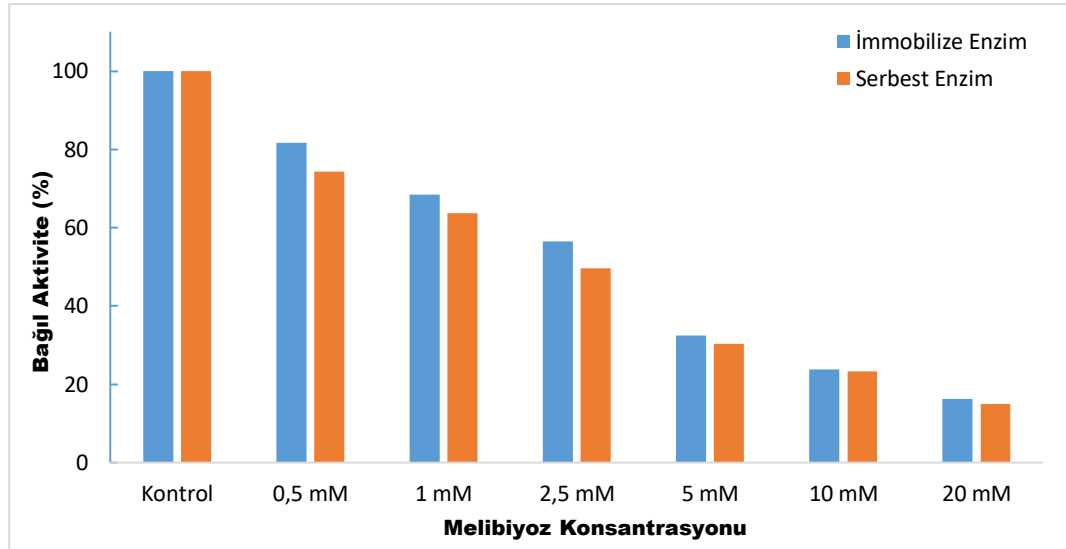
Şekil 3.15' ten görüldüğü üzere, galaktoz ve melibiyoz serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine kuvvetli inhibisyon etki göstermişlerdir. 10 mM

konsantrasyondaki melibiyoz ve galaktoz için % aktivite verimleri sırasıyla % 29 ve % 14 olarak belirlenmiştir. Diğer şekerler ise galaktoz ve melibiyozla oranla daha düşük bir inhibisyon etkisi sergilemişlerdir. *Pleurotus djamor*  $\alpha$ -galaktozidazı ile yapılan bir çalışmada artan galaktoz konsantrasyonu (2 mM' dan 200 mM' a) enzim aktivitesini % 21' e kadar düşürmüştür (Hu et al., 2017). Papaya (*Carica papaya* L.) meyvesinden elde edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için 10 mM galaktoz konsantrasyonu aktiviteyi % 19' a düşürmüştür (Soh et al., 2006).

Şekerlerle yapılan çalışmanın ikinci kısmında kuvvetli inhibisyon etki gösteren galaktoz (Şekil 3.16) ve melibiyozun (Şekil 3.17) farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 3.16 ve 3.17' de görüldüğü üzere artan galaktoz ve melibiyoz konsantrasyonları enzim aktivitesindeki düşüşü hızlandırmış ve kuvvetli inhibisyon etkisi gözlenmiştir.



**Şekil 3.16** Galaktozun farklı konsantrasyonlarının serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.



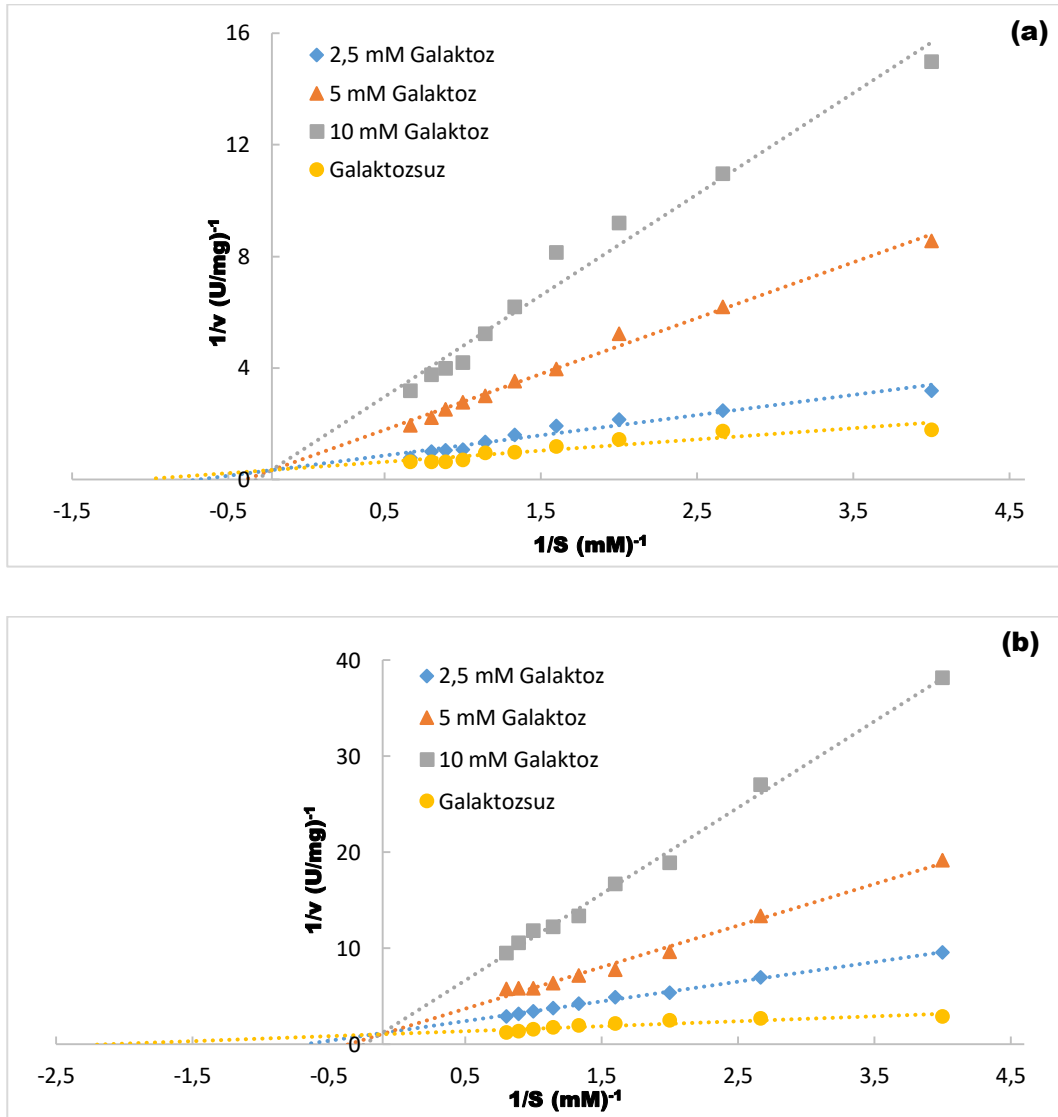
Şekil 3.17 Melibiyozun farklı konsantrasyonlarının serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.

### 3.3.1.5 İnhibisyon türünün belirlenmesi

İnhibitörlerin etkin bir enzim inhibisyonu gerçekleştirebilmesi için enzim protein yapısının belirli yerleri ile etkileşime girmesi gerekir. Dolayısıyla, immobilizasyon, iki farklı durumda inhibisyonu azaltabilir. Birincisi, inhibitörün, aktif merkezden farklı bir yerde proteinle etkileşen bir allosterik hareket gerçekleştirmesiyle oluşur. Bu durumda, enzimin bu bölgede immobilizasyonu, bu yeri deforme edebilir veya bloke edebilir; bu blokaj, inhibisyonu büyük ölçüde düşürebilir. İkincisi, inhibitörün aktif bölge ile etkileşime girdiği zamandır. Bu durumda, immobilizasyon, enzim aktif merkezini hafifçe deforme ederse, inhibitörün bağlanacağı bölgeye substratın bağlanması sağlanarak inhibisyonun etkisinin azaltılması sağlanır. Bu durum, substrat inhibitörden daha büyükse ve enzimde daha çok sayıda grupta etkileşime girmesi durumunda daha muhtemel olabilir (Mateo et al., 2007).

Galaktozun inhibisyon türünün belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarını (2,5; 5,0 ve 10 mM) içeren çözeltileri Bölüm 2.10.1.5’te belirtilen substrat olarak pNPG’ nin kullanıldığı koşullarında ortama ilave edilmiş, elde edilen aktivite/substrat konsantrasyonu grafikleri yardımıyla çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından immobilize ve serbest enzimler için inhibisyon türü belirlenmiştir (Şekil 3.18a ve 3.18b). Şekil 3.18a ve 3.18b’de görüldüğü üzere Lineweaver-Burk diyagramlarındaki eğim çizgileri immobilize ve serbest enzim için y-ekseni üzerinde bir noktada birleşmiş olup, kompetitif (yarışmalı) inhibisyon

sergilemişlerdir. Ayrıca, bu kesim noktası enzimin  $-K_i$  (inhibisyon sabiti) değerini verdiğinden, immobilize ve serbest enzim için  $K_i$  değerleri sırasıyla 0,375 ve 1,125 mM olarak bulunmuştur. Kavun (*Cucumis melo*)  $\alpha$ -galaktozidazının asit ve alkali form II enzimleri, reaksiyon ortamına galaktoz (Gal) ilave edildikten sonra güçlü bir yarışmalı inhibisyon sergilemişler ve  $K_i$  değerleri sırasıyla 0,06 ve 1,3 mM olarak hesaplanmıştır. Alkali form I ise 13 mm' lık  $K_i$  değeri ile asit form ve alkali form II' ye göre Gal inhibisyonuna karşı daha az duyarlılık göstermiştir (Gao and Schaffer, 1999). Beyaz çürük mantar (*Cerrena sp.*) lakkazının CLEA' larının kullanıldığı çalışmada, NaCl' ün inhibisyon etkisi araştırılmış ve  $K_i$  değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 1,6 ve 8,3 mM olarak bulunmuştur (Yang et al., 2016).



Şekil 3.18 Galaktozun inhibisyon türünün belirlenmesi: (a) immobilize ve (b) serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi.



### 3.3.1.6 Stabilizatörlerin etkisi

İmmobilize ve serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri 2 ay süre ile  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de Bölüm 2.10.1.6' da belirtilen koşullarda muhafaza edilmiş ve 2 aylık sürenin sonunda aktivite tayinleri yapılmıştır. Stabilizatörlerin serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine etkisi Çizelge 3.18' de verilmiştir.

**Çizelge 3.18** Stabilizatörlerin serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim aktivitesine etkileri.

<u>Stabilizatör</u>	<u>Bağlı Aktivite (%)</u>	
	<u>Serbest Enzim</u>	<u>İmmobilize Enzim</u>
Stabilizatörsüz (Kontrol)	87	101
% 10 Sükroz (w/v)	83	123
% 20 Gliserol (v/v)	69	100
% 30 Gliserol (v/v)	60	60

Çizelge 3.18' den görüldüğü üzere aynı koşullar altında farklı stabilizatörler ile  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de 2 ay süre ile muhafaza edildikten sonra immobilize enzimin serbest enzime kıyasla daha kararlı bir yapı sergilediği ve ortamdaki stabilizatörlerin de etkisi ile aktivitesini daha iyi koruduğu görülmektedir. Ayrıca, % 30 (v/v) gliserol içeren ortam dışındaki diğer iki stabilizatörlü ortamda aktivasyon olduğu ve immobilize enzim aktivitesinin % 100' ün üzerine çıktığı gözlenmiştir. *Lactobacillus fermenti*  $\alpha$ -galaktozidazı % 20 (v/v) gliserol içeren ortamda  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edildikten sonra neredeyse aktivitesinde hiç kayıp gözlenmemiştir (Gherardini et al., 1985). *Poterioochromonas malhamensis*  $\alpha$ -galaktozidazı % 30 gliserol (v/v) ve % 10 (w/v) sükroz içeren iki ayrı stabilizatörle  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de 3 ay muhafaza edildikten sonra yine aktivitede gözlenen önemli bir kayıp söz konusu olmamıştır (Dey and Kauss, 1981).

### 3.3.2 Kararlılık testleri

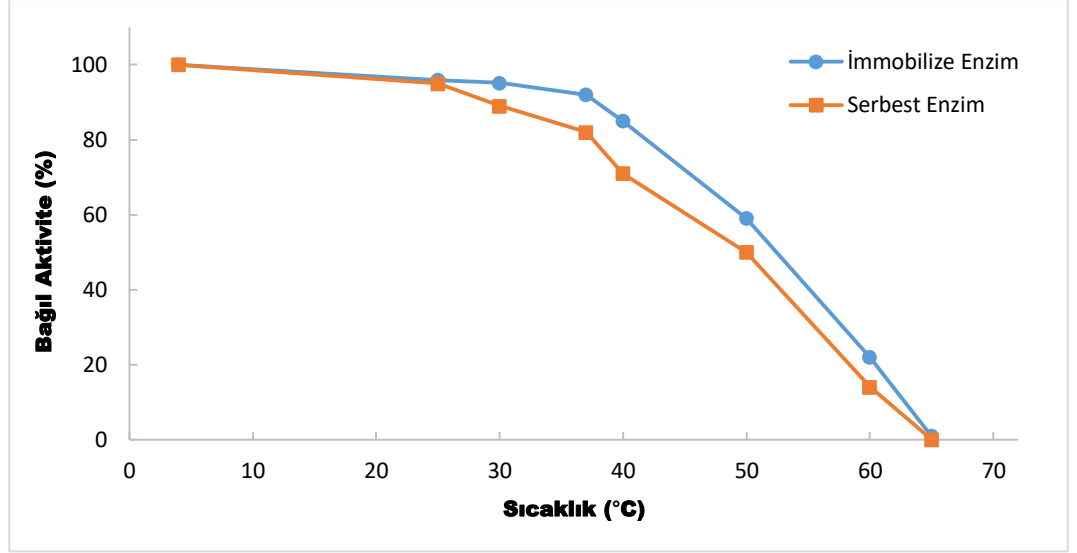
Enzimlerin stabilizasyonu, çeşitli uygulamalarda büyük önem taşımaktadır. Enzimler, biyokataliz, analitik kimya, gıda işleme, çevresel arıtım, deterjan imalatı, tıbbi teşhisler için biyosensör üretimi ve diğer ölçüm uygulamaları alanlarında kullanılmaktadır. Bütün bu alanlarda, enzim molekülünün biyolojik aktivitesinin

korunması çok önemlidir ve bu, enzimin biyolojik yapısının stabilize edilmesine bağlıdır. Çoğu durumda, enzimlerin gerçek stabilizasyon mekanizması çok fazla anlaşılammaktadır. Enzim yapıları çözüldükçe reaksiyon mekanizmaları anlaşılır ve protein katlanma ve deaktivasyon mekanizmaları işlenir, enzim stabilizasyonu mekanizmaları da daha iyi anlaşılır hale gelir. Enzim stabilizasyonu alanındaki uzmanlığın bileşimi ve bozunma işlemleri sırasında enzim yapısındaki değişikliklerin öngörülmesinde kullanılan yöntemlerin geliştirilmesiyle, belirli bir endüstriyel uygulama için bir enzimin nasıl stabilize edileceğini tahmin etmek gittikçe kolaylaşmaktadır (Drago and Gibson, 2001).

İmmobilize enzimlerin kullanımı, serbest enzimlerin kullanımına kıyasla avantajlıdır; çünkü işlemin sonunda enzim kolay geri kazanımını sağlar, enzimatik kararlılığı geliştirir, sürekli üretime olanak tanır ve ürün akışı içinde biyokatalizör bulunmadığını temin eder. Kimyasal çapraz bağlama, fiziksel adsorpsiyon ve polimerik kapsülleme de dâhil olmak üzere birçok enzim için immobilizasyon stratejisi geliştirilmiş olmasına rağmen; kimyasal çapraz bağlama kullanımı, pH' a ve iyonik dalgalanmalara karşı ilave stabilite sağlayan önemli avantajlar sağlar ve enzim, moleküler difüzyon ve ardışık enzimatik döngüler sırasında ortaya çıkan kayıplardan kaçınır. Bununla birlikte, enzimatik aktivitede bir azalma gözlemlenebilir; çünkü çapraz bağlanma, enzimin üç boyutlu yapısı üzerinde yapısal değişikliklere neden olabilir (Skoronski et al., 2014). Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin kararlılık çalışmalarına ait sonuçları aşağıda ilgili bölümlerde grafikler verilerek açıklanmıştır.

### **3.3.2.1 Termal kararlılık**

İmmobilize enzimlerin yararlılığı, tıbbî muamele, gıda endüstrisi, biyokimyasal analiz vb. konularında yaygın olarak görülmektedir. Amaçları ne olursa olsun, termal kararlılığı en önemli faktörlerden birisidir. Enzimlerin termal kararlılığı, enzimin reaktör tasarımlarında çok önemli bir parametredir; çünkü enzimin kullanım ve tekrar kullanım limitlerini, dolayısıyla işlem maliyetlerini belirler (Santos et al., 2007). Sıcaklığın serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin kararlılığına etkisi Şekil 3.19' da verilmiştir.

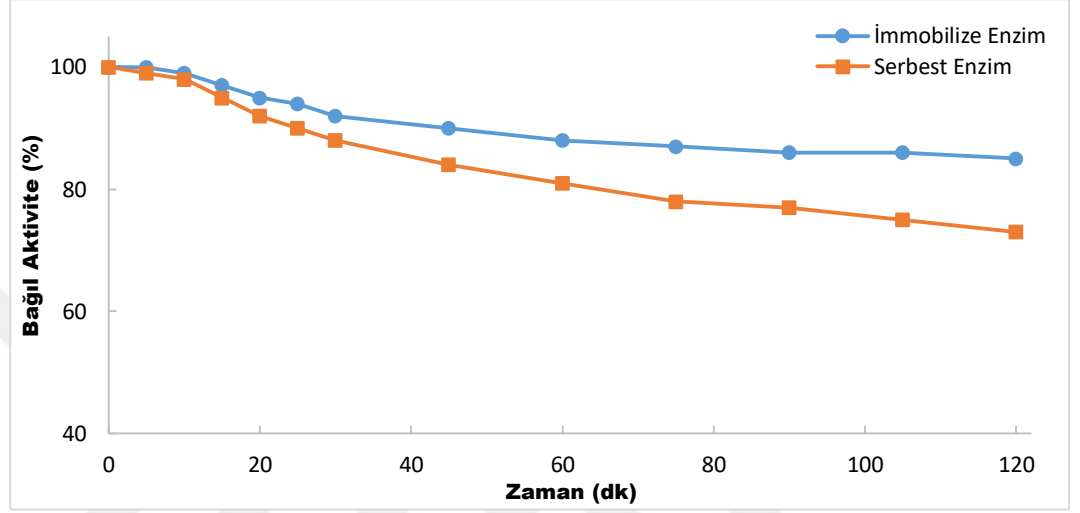


Şekil 3.19 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin termal kararlılığı.

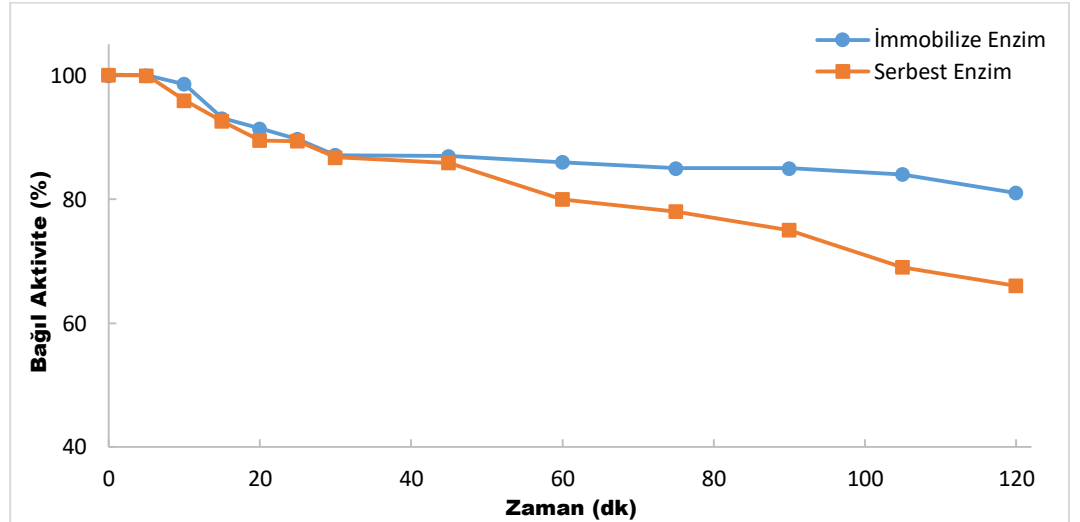
Şekil 3.19’ dan görüldüğü üzere immobilize enzimin termal kararlılığı serbest enzime göre bir miktar daha yüksektir. Artan termal kararlılık, moleküllerin agregatlar içindeki ve arasında intramoleküler çapraz bağlantılar vasıtasıyla sıralı düzenlenmesinden ve moleküllerin CLEA içindeki üç boyutlu düzenlenmesinin sağlanmasından ve moleküllerin, enzim molekülü arasındaki ek iyonik ve hidrofobik temasından kaynaklanabilir. CLEA’ nın artan termal stabilitesi, organik reaksiyonların yüksek bir sıcaklıkta yürütülmesi için de gerekli olan yararlı bir özelliktir (Sangeetha and Emilia Abraham, 2008). Serbest enzimlerin stabilitesinin düşük olmasının nedeni, enzimin uzun süre inkübasyon sonrasında ve yüksek sıcaklıklarda kısmi deaktivasyona uğraması olabilir. Serbest enzimler söz konusu olduğunda, yüksek sıcaklıklarda, kuaterner, tersiyer ve sekonder protein yapısındaki bağlar koparılır ve protein denatüre edilir. Bu bağlar yıkıldığında, protein (enzim) sadece peptid bağlarıyla birincil yapısına dönüşecektir. Bu nedenle, proteinin fonksiyonel yapısı kaybolur, aktif ve allosterik alanlar da işlevselliğini kaybeder (Khanahmadi et al., 2015). Bitkisel bir kaynak olan domatesten izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan ve immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin kullanıldığı bir çalışmada termal kararlılığının serbest enzime kıyasla oldukça arttığı rapor edilmiştir (Bayraktar et al., 2011). Literatürde çeşitli  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan kararlılık çalışmaları, enzimin genelde iyi bir termal kararlılığı olduğunu göstermiştir. Örneğin, *E. coli* içinde eksprese edilen rekombinant  $\alpha$ -galaktozidazın (rCbAga36) kullanıldığı çalışmada, enzim aktivitesi 60°C ile 75°C arasında değişen yüksek sıcaklık seviyelerde korunmuş, ancak 50°C’ nin altındaki ve 80°C’ in üstünde sıcaklıklarda aktivite keskin bir şekilde düşmüştür (Lee et al., 2017). Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının kullanıldığı başka bir çalışmada,

enzim 4-60°C aralığında iyi bir termal kararlılık sergilemiş olup, 60°C 'de başlangıç aktivitesinin %57' sini korumuştur. 60°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda bağlı aktivitesinde hızlı düşüşler gözlenmiştir (Bayraktar and Önal, 2013). Antarktik bakteri izolatı *Bacillus* sp. LX-1  $\alpha$ -galaktozidazının 45°C'de başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 88' ini muhafaza ettiği, ancak 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda hiçbir aktivite göstermediği bildirilmiştir (Lee et al., 2012). Pepino  $\alpha$ -galaktozidazı, 25-45°C sıcaklık aralığında çok dengeli bir termal kararlılık sergilemiş ve enzim 45°C' de başlangıç aktivitesinin % 60' ını korumuştur (Şen et al., 2011). CLEA sonrasında pek çok enzimin termal kararlılığında artış olduğu da bildirilmiştir (Zhu et al., 2001; Aytar and Bakir, 2008; Sangeetha and Emilia Abraham, 2008; Zhao et al., 2008; Xu et al., 2011; Lai et al., 2012; Kim et al., 2013). *Bacillus* sp. CFR1601 Endo- $\beta$ -1,4-mananaz (Man-1601) enziminin CLEA (MB-C)' sı ve manyetik nanokompozit CLEA (MB-Mag-C)' sının hazırlandığı çalışmada, MB-C, 70°C (30 dakika), 75°C (30 dakika) ve 80°C' de (10 dakika) başlangıç aktivitesini sırasıyla % 25.9, % 16.3 ve % 16.8' ini koruyarak serbest enzime kıyasla daha yüksek termal kararlılık sergilemiştir. MB-Mag-C, 70°C (35 dakika) ve 75°C' de (60 dakika) inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 42.5 ve % 36.8' ini korumuş; serbest enzime kıyasla yine daha yüksek bir termal kararlılık sergilemiştir (Panwar et al., 2017). Yeni proteik besleyici olarak tavuk tüyü unu (feather meal, FM) kullanılarak pektinazın kombi-CLEA' larının hazırlandığı çalışmada, kombi-CLEA-FM, serbest enzim ile karşılaştırıldığında yüksek termal kararlılık (1.5 kat) göstermiştir (Goetze et al., 2017). Nötraz ve papainin birlikte çapraz bağlı enzim agregatları (N-P-CLEA)' nin kullanıldığı çalışmada, 50°C' de 30 dakika inkübasyon sonrası, N-P-CLEA 'lar başlangıç aktivitesini % 70.55 korurken; serbest enzim başlangıç aktivitesinin sadece % 3.78' ini korumuştur (Chen et al., 2017). *P. notatum* lipazının CLEA' sının hazırlanmasında çapraz bağlama ajanı olarak glutaraldehit (GLA) ve etilen glikol-bis [süksinik asit N-hidroksisüksinimid] (EG-NHS) kullanılmış ve bu çalışmada serbest enzim 50°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin % 56.62' sini korurken, GLA-lipaz ve EG-NHS-lipaz başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 93.55 ve % 90.39' unu korumuşlardır. Benzer bir şekilde, 60°C' de 30 dakika inkübasyon sonrası GLA-lipaz ve EG-NHS-lipazın başlangıçtaki aktivitesinin % 70.97' sini ve % 76.92' sini korurken, serbest enzimin aynı sıcaklıkta sadece % 23.32 aktivitesini korumuştur (Rehman et al., 2016). *A. melleus* L-aminoaçilaz (AP) CLEA' larının kullanıldığı çalışmada, 50°C'de serbest enzim başlangıç aktivitesinin yalnızca % 66.4' ünü korurken, AP-CLEA başlangıçtaki aktivitesinin % 98.5' ini korumuştur. Benzer bir şekilde, 70°C' de serbest enzim başlangıç aktivitesinin sadece % 4.7' sini korurken, AP-CLEA' lar başlangıç aktivitesinin % 76.6' sını korumuştur (Vaidya et al., 2012).

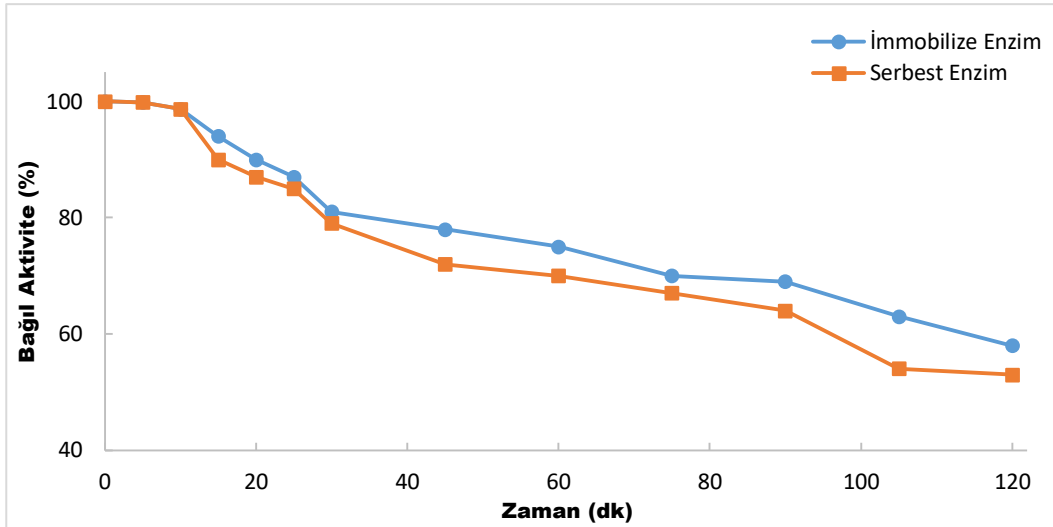
Enzimlerin endüstriyel proseslerdeki kullanımını sırasında, onların katalitik değerini belirleyen diğer bir parametre de belirli sıcaklıklardaki ön inkübasyon süresidir. Bu amaçla içerdikleri protein miktarı aynı olan serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri standart aktivite tayin sıcaklığı olan  $37^{\circ}\text{C}$ ' de (Şekil 3.20), optimum sıcaklık değeri olan  $40^{\circ}\text{C}$ ' de (Şekil 3.21) ve endüstriyel uygulamalardaki çalışma sıcaklığı olan  $50^{\circ}\text{C}$ ' de (Şekil 3.22), farklı sürelerde (0-120 dakika) inkübe edildikten sonra geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda ölçülmüştür.



Şekil 3.20 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı ( $37^{\circ}\text{C}$ ).



Şekil 3.21 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı ( $40^{\circ}\text{C}$ ).



Şekil 3.22 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (50°C).

Şekil 3.20' den görüldüğü üzere immobilize enzim 37°C' de 120 dakika inkübasyon sonrasında başlangıç aktivitesinin % 85' ini korurken, serbest enzim %73' ünü korumuştur. Sıcaklık 40°C olduğunda, 120 dakika ön inkübasyon süresi sonrasında immobilize enzim başlangıç aktivitesinin % 81' ini korurken, serbest enzim % 66' sını korumuştur (Şekil 3.21). Sıcaklık 50°C olduğunda (Şekil 3.22), aynı ön inkübasyon süresi sonrasında immobilize ve serbest enzimler sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 58'ini ve % 53' ünü korumuşlardır. Her üç sıcaklıkta da immobilize enzim serbest enzime kıyasla daha yüksek termal kararlılık sergilemiştir. Bunun nedeni, konformasyonel değişikliği durduran molekül içi ve moleküller arası kovalent çapraz bağlardan kaynaklanabilir (Zhu et al., 2001). Ön inkübasyon süresinin test edildiği termal kararlılık çalışmalarından birinde, 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda 1 saatin sonunda, SDS degradasyonu yapan *Pseudomonas sp.* S9 alkil sülfatazı (SdsAP) CLEA' sının başlangıç aktivitesi % 70' e kadar kademeli olarak azalırken, serbest enzimin aktivitesi % 40' a düşmüştür (Li et al., 2016). Epoksit hidrolazların (EH) CLEA' ları 45°C' de 4 saat inkübe edildiğinde başlangıç aktivitesinin en az % 85' ini korurken, serbest enzim % 68 aktivite göstermiştir (Yu et al., 2013). *Bacillus sp.* alfa amilazının normal ve manyetik CLEA' larının kullanıldığı çalışmada, 50°C' de manyetik CLEA' lar 120 dakika inkübasyon sonrasında aktivitesinin % 100' ünü korumuştur. Manyetik CLEA' lar 60°C ve 70°C' de 120 dakika inkübasyon sonrasında başlangıç aktivitelerinin % 85' inden fazlasını korurken, normal CLEA' ların aktivitesi aynı sıcaklıklarda % 40 ve % 25' e düşmüş; serbest enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Talekar et al., 2012). *Pseudomonas sp.* lipazı (PSL) CLEA' larının kullanıldığı başka bir çalışmada, 60°C' de 24 saat inkübasyon sonrasında serbest

lipaz başlangıç aktivitesinin % 76.7' sini kaybederken, PSL-CLEA sadece % 27.8' ini kaybetmiştir (Zhao et al., 2008). *Thermus* sp. T2 suşu  $\alpha$ -galaktozidazının saflaştırıldığı çalışmada, enzim 50 ve 60°C' de 24 saat boyunca tamamen aktif kalırken, 70°C ve 80°C' de aktivitesinde bir düşüş yaşamıştır. 70°C ve 80°C' de başlangıç aktivitesinin yarıya düştüğü süreler sırasıyla 150 ve 15 dakikadır (Pessela et al., 2007).

Endüstriyel proseslerde, yüksek stabilite ile yüksek enzim aktivitesi veren bir çalışma sıcaklığı bulmak, düşük proses maliyetleri ve yüksek verimlilik arasında bir uzlaşmayı temsil eder. İşlem sıcaklıkları mutlaka maksimum enzim aktivitesine karşılık gelmez, çünkü bu noktada enzimin denatürasyon hızı çok yüksektir. Bu nedenle, işlem sıcaklığı, enzim ömrünü uzatmak için maksimum aktiviteyi veren sıcaklıktan biraz daha düşük olmalı, ancak bir bütün olarak proses üretkenliğini etkilemeyecek bir seviyede olmalıdır. Bununla birlikte, yarılanma ömrü sıcaklık artışlarıyla birlikte çok hızlı bir şekilde azaldığından, daha düşük bir sıcaklığın seçilmesi, önemli bir aktivite kaybına uğramadan enzim stabilitesini artırabilir (Santos et al., 2007).

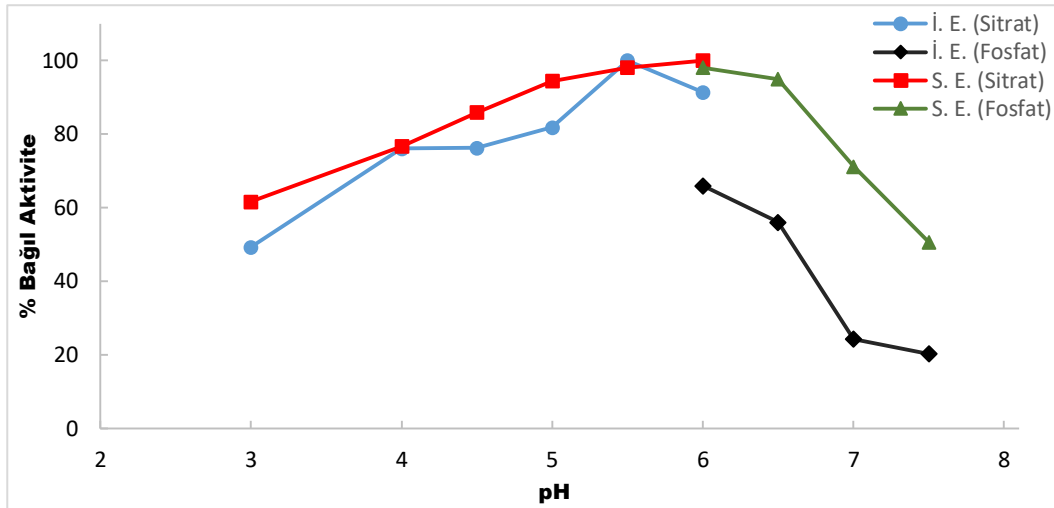
İmmobilizasyon enzimin konformasyonel esnekliğini azaltır, enzim sertliği ve ısı toleransında bir artışa neden olur ve bu da genellikle optimum sıcaklık ve inaktivasyona karşı kararlılık artışı ile gösterilir. İmmobilize enzimin gelişmiş termal davranışı, daha yüksek sıcaklıklar gerektiren çeşitli endüstriyel işlemler için enzim uygulamalarının temelini oluşturur (Rehman et al., 2016).

### **3.3.2.2 pH kararlılığı**

pH enzimlerin stabilitesinde önemli bir faktördür. Çünkü protein yapıda olan enzimler için pH' daki bir değişiklik, bir yan grubun protonlanmasına veya deprotonasyona uğramasına, dolayısıyla kimyasal özelliklerinin değişmesine neden olabilir. Enzim konformasyonunu değiştirerek potansiyel olarak bir altbirimle olan etkileşimini kaybedebilir. Sonuç olarak, bu konformasyon substrat afinitesinde bir azalmaya neden olabilir. Daha şiddetli bir pH değişimi, protein katlanmasını değiştirebilir ve böylece enzimi tamamen deaktive edebilir veya geri döndürülemez proteolize neden olabilir. Kullanılacak enzimin çalışma koşulları belirlenerek, etkin olduğu pH aralığının belirlenmesi bu açıdan önemlidir (Berg, 2007).

pH kararlılığının serbest ve immobilize enzimler üzerine etkisi Bölüm 2.10.2.2' de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Aynı miktar protein içeren serbest

ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatları pH 3,0-6,0 sitrat tamponu (100 mM) ve pH 6,5-7,5 fosfat tamponunda (100 mM) 2 saat boyunca 4°C' de bekletilmiştir. Standart koşullarda geriye kalan aktiviteleri tayin edilmiş ve sonuçlar Şekil 3.23' de verilmiştir.



Şekil 3.23 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin pH kararlılığı.

Şekil 3.23' den görüldüğü üzere geniş bir pH aralığında hem serbest (pH 3,0-7,5) hem de immobilize enzimler (pH 3,0-6,5) % 50' den fazla aktivitesini korumuşlardır. *Pycoporus cinnabarinus*' tan üretilen immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz pH 3,0-9,0 (Mitsutomi et al., 1985), alkalofilik *Bacillus*  $\alpha$ -galaktozidazı pH 3,0-7,2 (Itoh et al., 1986), alkalofilik *Micrococcus*  $\alpha$ -galaktozidazı pH 7.5-8.5 (Akiba et al., 1976) aralığında kararlılık sergilemişlerdir.  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi için geniş pH aralığında yüksek kararlılık sergilediği sonuçlar rapor edilmiştir (Şen et al., 2011; Bayraktar et al., 2011; Bayraktar and Önal, 2013; Hu et al., 2017). CLEA pH kararlılığının incelendiği bir çalışmada, *Bacillus sp.* CFR1601 Endo- $\beta$ -1,4-mananaz (Man-1601) enziminin çapraz bağlı enzim agregatı (MB-C) ve manyetik nanokompozit CLEA (MB-Mag-C)' sı kullanılmıştır. MB-C için optimum pH 7.0 bulunmuş ve pH 4-10 aralığı arasında serbest enzime göre % 73.2 daha yüksek aktivite göstermiştir. MB-Mag-C için optimum pH 6.0 olarak bulunmuş ve pH 4-9 aralığında serbest enzime göre % 46.0 daha yüksek bir aktivite göstermiştir (Panwar et al., 2017). Nötraz ve papainin birlikte çapraz bağlı enzim agregatlarının (N-P-CLEA) hazırlandığı çalışmada, N-P-CLEA' ların daha yüksek bağlı aktivitesi, serbest enzimlere kıyasla pH 2 ve 4 haricinde pH 3 – 9 arasında geniş bir pH aralığında elde edilmiştir (Chen et al., 2017). SDS degradasyonu yapan *Pseudomonas sp.* S9 alkil sülfatazının çapraz bağlı enzim agregatlarının (SdsAP-CLEA) hazırlandığı çalışmada, serbest enzim ve SdsAP-CLEA' lar için optimum

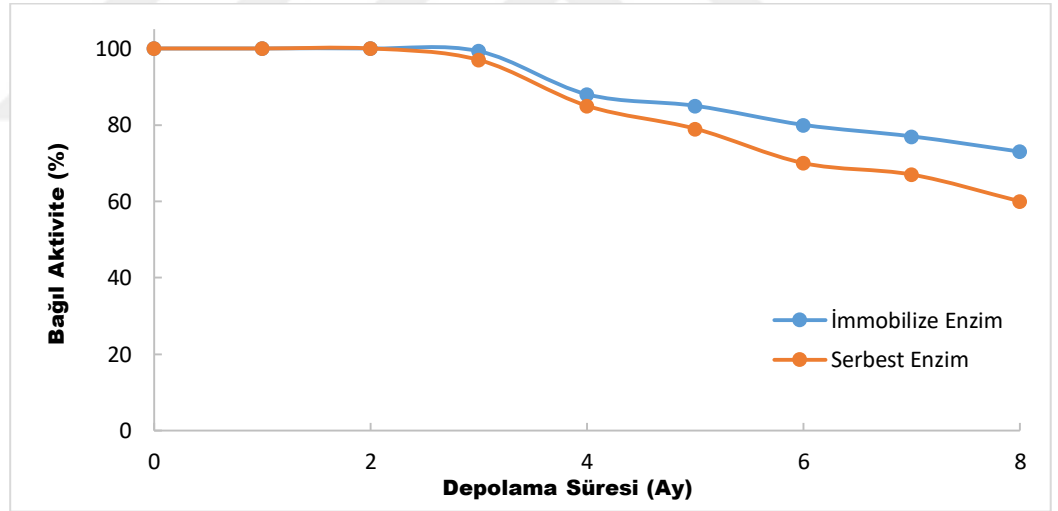


pH değerleri sırasıyla pH 9.0 ve 7.0 olarak bulunmuştur. SdsAP-CLEA' lar, özellikle pH 7.0' nin altındaki değerlerde, serbest enzimden daha yüksek aktivite sergilemiştir (Li et al., 2016).

### 3.3.2.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize edilmiş enzimi serbest enzimden daha avantajlı hale getirebilen enzim özelliklerini değerlendiren önemli indekslerden biridir. Depo kararlılığını ifade eden yarı ömür, üretim zamanı ve kullanım arasındaki biyokatalitik bakım kapasitesi hakkında bilgi sağlar. Genel olarak, eğer bir enzim solüsyondaysa, saklama sırasında stabil değildir ve aktivitesi yavaş yavaş azalır (Keerti et al., 2014).

Bölüm 2.10.2.3' de açıklandığı üzere serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıklarının belirlenmesi için  $-20^{\circ}\text{C}$  de 8 ay boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda tayin edilerek belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.24' de verilmiştir.



Şekil 3.24 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılığı (Sıcaklık:  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Şekil 3.24' ten görüldüğü üzere immobilize enzim 8. ayın sonunda başlangıç aktivitesinin % 73' ünü korurken, serbest enzim ise % 60' ini korumuştur. İmmobilizasyon sonrası enzimin değişen yapısı, depo kararlılığını da geliştirmiş ve uzun süre aktivitenin korunmasına da katkı sağlamıştır. Domatesten izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent bağlama ile immobilize edilmiştir. 6 ay sonra serbest ve Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da immobilize enzimlerin aktiviteleri sırasıyla % 36,

% 74 ve % 69 olarak ölçülmüştür (Bayraktar et al., 2011). Aljinat kürelerde tutuklama yöntemi ile immobilize edilen *Chaetomium madarasense* AUMC 9376  $\alpha$ -galaktozidazı için yapılan bir çalışmada, enzimler 32 gün boyunca +4°C' de muhafaza edilmiş ve bu sürenin sonunda immobilize ve serbest enzim aktiviteleri sırasıyla % 88 ve % 58 olarak ölçülmüştür (Abo-Elmagd, 2014). İmmobilize *Bacillus* sp. LX-1  $\alpha$ -galaktozidazı 18 gün boyunca 37°C' de muhafaza edilmiş ve başlangıç aktivitesinin % 50' sinden fazlasını koruduğu bildirilmiştir (Lee et al., 2013). Aytar ve Bakir (2008), 3 aydan uzun süre 4°C' de serbest tirozinazı ve CLEA' ları muhafaza ettikten sonra, başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 36' sını ve % 84' ünü koruduklarını bildirmişlerdir. Oda sıcaklığında 3 aydan daha uzun süre depolanan CLEA' lar başlangıçtaki aktivitelerinin % 83' ünü korumuşlardır. Serbest ve immobilize *A. melleus* L-aminoaçilazı 4°C' de fosfat tamponu (50 mM, pH 8.0) içinde inkübe edilmiştir. Serbest aminoaçilazın 4°C' deki depolama yarı ömrü ~1 gün, CLEA' nın ise 40 gün olarak bulunmuştur (Vaidya et al., 2012). Sığır karaciğer katalazı CLEA (CAT-CLEA)' larının kullanıldığı bir çalışmada, serbest enzim, 5°C' de ve oda sıcaklığında 11 gün bekletildikten sonra tamamen aktivitesini kaybetmiştir. İmmobilize enzim 5°C' de 30 ve 60 günlük bekletme sonrası başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla % 54 ve % 10' unu korumuştur. İmmobilize enzim oda sıcaklığında 30 ve 60 günlük bekletme sonrası ise başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla % 54 ve % 21' ini korumuştur (Tükel et al., 2013). Epoksit hidrolaz (EH) CLEA' larının depo kararlılıkları araştırmak için serbest enzim ve CLEA' lar fosfat tamponunda 4°C' de 150 gün boyunca muhafaza edildikten sonra, CLEA' lar başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık % 67' sini korurken, serbest enzim başlangıç aktivitesinin % 35' inden daha azını korumuştur (Yu et al., 2013). SDS degradasyonu yapan *Pseudomonas* sp. S9 alkil sülfatazının CLEA' larının 4°C' de 30 günün sonunda liziz tamponunda (300 mM NaCl ve % 5 gliserol içeren 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu) depolandığında herhangi bir aktivite kaybetmemiş, bu da CLEA ile soğuk depolamaya karşı iyi bir direnç kazandığını göstermiştir (Li et al., 2016).

#### **3.3.2.4 Operasyonel kararlılık**

Genellikle, enzim kararlılığı, enzim aktivitesinin başlangıçtaki aktivitesinin % 50' sine düştüğü an yarılanma ömrü ile ifade edilir. Yarılanma ömrü tayinlerinde ya enzim, önceden belirlenmiş bir sıcaklıkta farklı süreler boyunca bekletildikten sonra standart koşullardaki kalan aktivitenin ölçülmesi ya da belirlenmiş koşullarda tekrarlanan batch sistemlerde enzim başlangıç aktivitesinin yarıya düşene kadar toplam tepkime süresinin ölçülmesi suretiyle gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntem

de, çalışma koşulları altında enzim kararlılığının karakterizasyonu için yetersizdir. Birinci yöntem, enzim protein molekülünün kararlılığını vurgular; devreden çıkarma işlemi tepkime olmadığında gerçekleşir ve bu nedenle genellikle operasyonel kararlılığın bir ölçüsü değildir. İkinci yöntem, çeşitli dönüşümlerde enzim kararlılığını belirlemektedir; sonuçlar yalnızca aynı dönüşüm profili ile tekrarlanabilir. Tanımlanmış operasyonel enzim kararlılık ölçümleri, substratın sabit dönüşümünde gerçekleştirilir; bu da kararlı enzimlerde sabit turnover sayısını gösterir. Dönüşüm sabitini muhafaza etmek sürekli bir reaktör kullanılmasını gerektirir (Bommarius et al., 1992). Operasyonel kararlılığın ölçüsü olan yarı ömür ( $t_{1/2}$ ) aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$t_{1/2}=0,693/k_D$$

$$k_D=2,303/t \times \log (A_0/A_t)$$

Burada t: operasyon süresini,  $k_D$ : bozunma katsayısını,  $A_0/A_t$  ise sırasıyla başlangıç ve t anındaki enzimatik aktiviteyi göstermektedir (Önal, 2000).

Bölüm 2.10.2.4' de belirtildiği üzere çapraz bağlı enzim agregatları hazırlanan  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatının operasyonel kararlılık denemeleri hem sentetik bir substrat olan pNPG hem de doğal substratı rafinoz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. pNPG ile yapılan operasyonel kararlılık denemelerinde reaktöre 2,5 mg immobilize enzim, 0,25 mL 2 mM pNPG ve 0,75 mL sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ilave edilerek 37°C' de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin üst sıvı fazı ayrılarak immobilize enzimin aktivitesi standart  $\alpha$ -galaktozidaz aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Rafinoz ile operasyonel kararlılık çalışmasında reaktöre 2,5 mg immobilize enzim 0,9 mL sitrat tamponu (100 mM, pH 5,0) ve 0,10 mL 10 mM rafinoz eklenerek 50°C' de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde DNS metodu ile enzim aktivite tayini gerçekleştirildi. Sistem 50 saat boyunca sürekli olarak çalıştırıldı. Bozunma katsayısı ( $k_D$ ) pNPG ve rafinozun kullanıldığı her iki sistem için de hesaplanmıştır (Çizelge 3.19).

**Çizelge 3.19** İmmobilize enzimin farklı zamanlardaki  $t_{1/2}$  ve  $k_D$  değerleri.

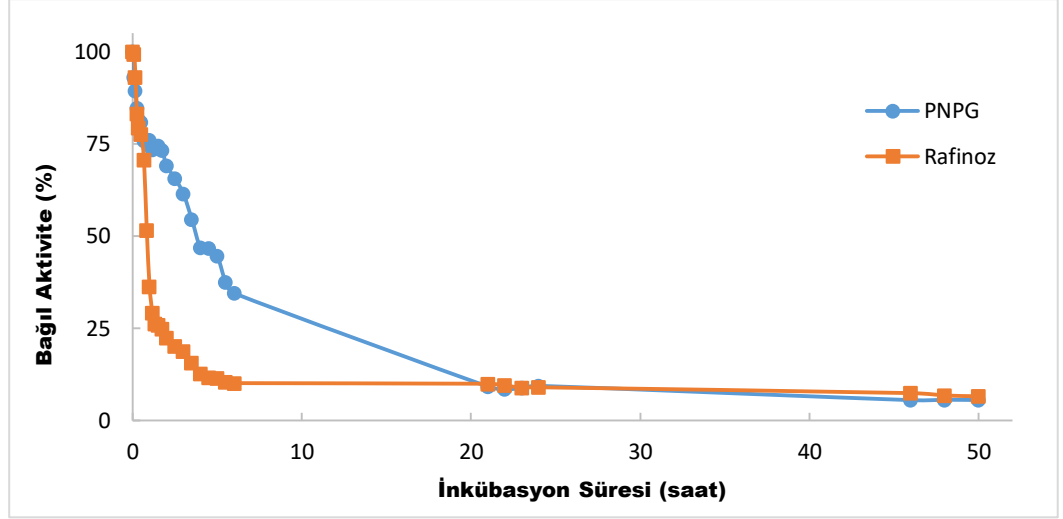
Operasyon Süresi (saat)	$k_D$ (mM)		$t_{1/2}$ (saat)	
	pNPG	Rafinoz	pNPG	Rafinoz
1	0,0046	0,0169	2,51	0,68
3	0,0027	0,0093	4,27	1,25
5	0,0027	0,0072	4,29	1,60
6	0,0030	0,0063	3,91	1,82
22	0,0019	0,0020	6,18	5,90
26	0,0017	0,0018	6,82	6,34
48	0,0010	0,0009	11,48	12,82
50	0,0009	0,0009	12,99	12,76

Çizelge 3.19’ da verilen  $t_{1/2}$  ve  $k_D$  değerlerinin ortalamaları hesaplandı ve yukarıda verilen denklemler kullanılarak  $t_{1/2}$  ve  $k_D$  değerleri hesaplandı (Çizelge 3.20). Çizelge 3.20’ den görüldüğü üzere, pNPG kullanılan denemenin bozunma katsayı daha düşük ve yarılanma süresi daha uzundur.

**Çizelge 3.20** İmmobilize enzimlerin ortalama  $t_{1/2}$  ve  $k_D$  değerleri.

Substrat	$k_D$ (mM)	$t_{1/2}$ (saat)
pNPG	0,0023	6,56
Rafinoz	0,0057	5,40

İmmobilize enzimlerin bağıl aktivitesi ile inkübasyon süresi arasında çizilen operasyonel kararlılık grafiği Şekil 3.25’ de verilmiştir.



Şekil 3.25 İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılıkları.

Şekil 3.25' den görüldüğü üzere, pNP' nin kullanıldığı sistemde immobilize enzimin 6. saatte hala aktivitesinin % 35' ini koruduğu gözlenmemiştir. Rafinozun kullanıldığı sistemde ise 3,5 saat sonra immobilize enzim başlangıç aktivitesinin % 16' sını korumaktadır. Bu immobilize enzim preparatlarının endüstriyel sürekli proseslerde tek kullanımlık serbest enzimlere kıyasla büyük bir avantaj sağladığı görülmektedir. *A. niger*  $\alpha$ -galaktozidazının Duolite A-568 iyon değiştirici reçinede immobilizasyonunun yapıldığı çalışmada, rafinozun substrat olarak kullanıldığı reaktörde immobilize enzim 72 saatin sonunda başlangıç aktivitesinin % 86' sını korumuştur (Costa et al., 2013).

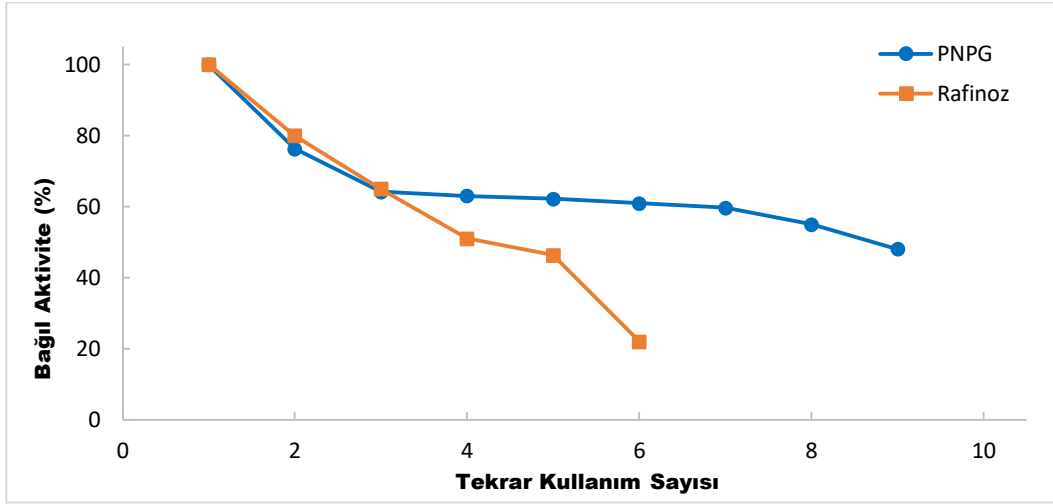
Operasyonel kararlılık, bir enzimin kullanımdayken aktivitesinin geri kazanımı ile ilgilidir. Biyokataliz, biyotransformasyonlar ve analitik izleme sistemleri için enzimleri kullanan sistemler için bu önemlidir. Bu bağlamda aktivitenin geri kazanımı çoğunlukla bir yarılanma ömrü veya enzim aktivitesi miktarının başlangıç değerinin yarısına düşmesi için geçen zamana bağlı olarak ölçülür ve bu enzimin endüstriyel proseslerdeki önceliğini ve kullanım potansiyelini belirler.

### 3.3.2.5 Tekrar kullanılabilirlik

Enzimlerin immobilizasyonunun en önemli amaçlarından biri, aynı biyokatalizör için birden çok kullanıma olanak sağlayan yeniden kullanılabilirliğidir ve endüstriyel uygulamalarda proses ekonomisi göz önüne alındığında, immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği önemli bir husustur. CLEA' ların bu alanda çok umut verici bir sonucu vardır; çünkü reaksiyon

karışımından kolayca ayrılabilir, yıkanır ve tekrar kullanılırlar. Dahası, CLEA' lar reaksiyon ortamında çözünmez, böylelikle ayrılması istenen ürünün karışmasını önler ve alt akış işlemini kolaylaştırır (Torabizadeh et al., 2014; Pan et al., 2014).

pNPG ve rafinozun substrat olarak kullanıldığı immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları Bölüm 2.10.2.5' de belirtildiği gibi yapılmıştır. pNPG' nin kullanıldığı sistemin sıcaklığı, standart ölçüm değeri olan 37°C ve rafinozun ki ise 50°C olarak ayarlanmış ve immobilize enzimler gün boyunca kullanılmışlardır. Günün sonunda pNPG kullanılan sistemde immobilize enzimler toplam 9 kez ve rafinozun kullanıldığı sistemdeki immobilize enzimler de 6 kez kullanılmışlardır (Şekil 3.26).



Şekil 3.26 İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri.

Şekil 3.26' dan görüldüğü üzere pNPG kullanılan sistemde immobilize enzim 9 kullanımdan sonra aktivitesinin % 48' ini, rafinoz kullanılan sistemdeki immobilize enzim ise 6 kullanım sonrası aktivitesinin % 22' sini korumaktadır. Tekrar kullanım esnasında yaşanan aktivite kaybının arkasındaki neden, tamponla tekrarlanan yıkama ve santrifüj prosedürleri sırasında immobilize enzim üzerindeki mekanik kuvvetler olabilir. Bu kaybın bir başka açıklaması, immobilize enzimlerin çözeltide düzgün dağılmamış ve kolay toplanamaması olabilir (Matijošyte et al., 2010; Xu and Yang, 2013; Nadar et al., 2016). Her iki substrat için  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatının endüstriyel prosesler için avantajlı oldukları gösterilmiştir. *Bacillus sp.* CFR1601 Endo- $\beta$ -1,4-mananaz (Man-1601) enziminin çapraz bağlı enzim agregatı (MB-C) ve manyetik nanokompozit CLEA (MB-Mag-C)' sının hazırlandığı çalışmada, keçi boynuzu hidrolizinde MB-C (65°C' de) ve MB-Mag-C (70°C' de) 12 tekrar kullanım sonrasında başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %

31.08 ve % 8.6' sını korumuşlardır (Panwar et al., 2017). *P. notatum* lipazının CLEA' nin hazırlanması aşamasında çapraz bağlama ajanı olarak glutaraldehit (GLA) ve etilen glikol-bis [süksinik asit N-hidroksisüksinimid] (EG-NHS)' in kullanıldığı çalışmada, 70°C' de 10 tekrar kullanım sonrasında, GLA-CLEA ve EG-NHS-CLEA' ları sırasıyla başlangıç aktivitelerinin % 63.62' sini ve % 70.9' unu korumuşlardır (Rehman et al., 2016). *Pseudomonas sp.* S9 alkil sülfatazı (SdsAP) CLEA' sı 50°C' de 10 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 60' ından fazlasını muhafaza etmiştir (Li et al., 2016). Glukoamilazın manyetik makro moleküler CLEA' larının ve manyetik glutaraldehitli CLEA' larının 10 tekrar kullanım sonrasında başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 84 ve % 62' sini korudukları bildirilmiştir (Nadar and Rathod, 2016). Kızılcık meyvesi (*C. fructus*)  $\alpha$ -amilazının manyetik CLEA' ları 5 tekrar kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 80' ini korumuştur (Liu et al., 2015). *C. boidinii* format dehidrojenazı (FDH) çapraz bağlı enzim agregatı (CLEA) hazırlandı. Dextran polialdehid (Dex-CLEA) ile hazırlanan CLEA' nın kalan aktivitesi 10 devir tekrar kullanımdan sonra % 95'in üzerindeydi (Kim et al., 2013). Sığır karaciğer katalazının çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA-CAT)' nin kullanıldığı çalışmada, immobilize enzimin 35°C' de 400 döngü sonunda, başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50' sini koruduğu gözlenmiştir (Tükel et al., 2013). *Streptomyces exfoliatus* poli-3-hidroksibutirat (PHB) depolimerazının çapraz bağlı enzim agregatlarının (PhaZSex-CLEA) kullanıldığı çalışmada, immobilize enzim katalitik aktivite kaybı olmaksızın ardışık 20 seri reaksiyon için tekrar kullanılmıştır (Hormigo et al., 2012). *Pseudomonas sp.* lipazı (PSL) CLEA' ları 10 döngü sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 80.9' unu korumuştur (Zhao et al., 2008).

### 3.4 İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının pNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı

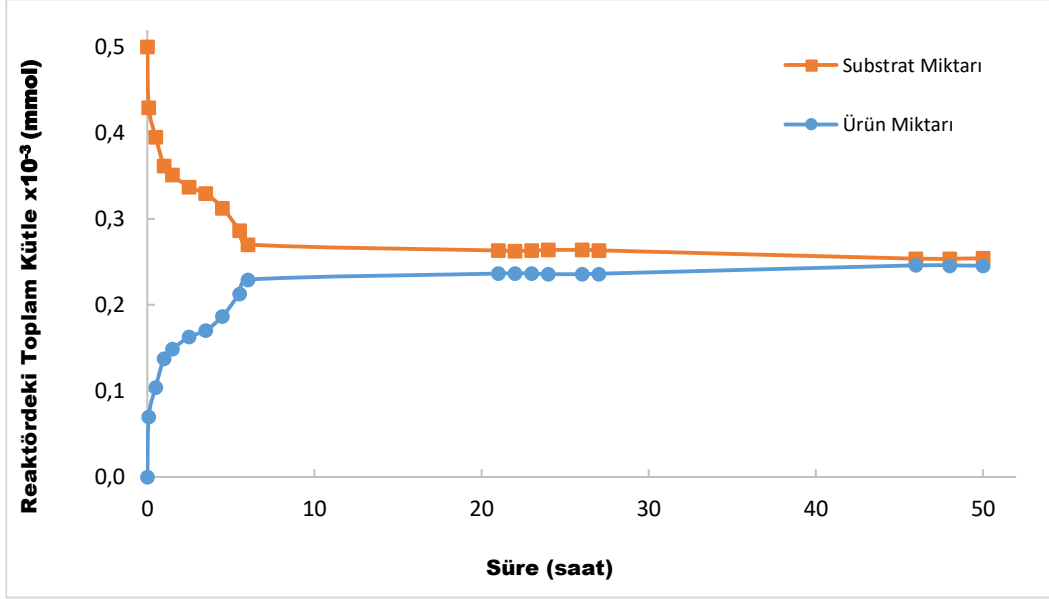
İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatlarının hidroliz çalışmaları Bölüm 2.11' de belirtildiği gibi pNPG (sistem sıcaklığı 37°C) ve rafinozun (sistem sıcaklığı 50°C) substrat olarak kullanıldığı kesikli karıştırmalı batch sistemde gerçekleştirilmiştir. 50 saat boyunca bu sistemde farklı zaman aralıklarında örnek alınarak aktiviteleri ölçüldü ve oluşan ürün miktarları her iki substrat (pNPG ve rafinoz) için hesaplandı. Substratın dönüşümü (X) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

$$X = [(S_0 - S_t) / S_0]$$

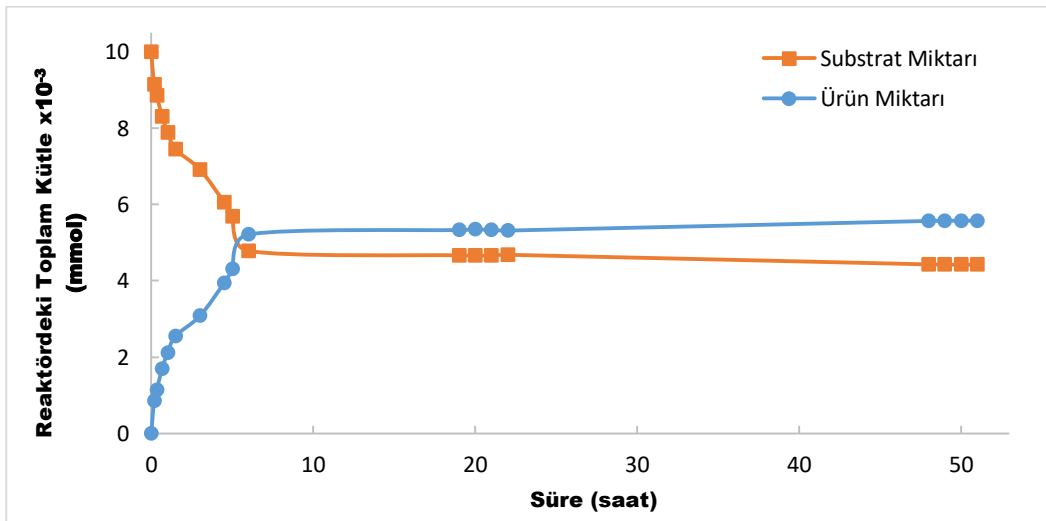
Burada  $S_0$ : başlangıç substrat konsantrasyonunu,  $S_t$ : t anındaki substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Bu eşitlikten yola çıkılarak farklı zamanlardaki

X değerleri hesaplanmış, bunların % X ile t zaman arasında çizilen grafiklerden de % dönüşüm değerleri hesaplanmıştır.

Şekil 3.27’ de pNPG’ nin substrat olarak kullanıldığı reaktördeki ürün ve substrat miktarları, Şekil 3.28’ da rafinozun substrat olarak kullanıldığı reaktördeki ürün ve substrat miktarları ve Şekil 3.29’ da pNPG ve rafinozun reaktördeki dönüşüm %’ si verilmiştir.

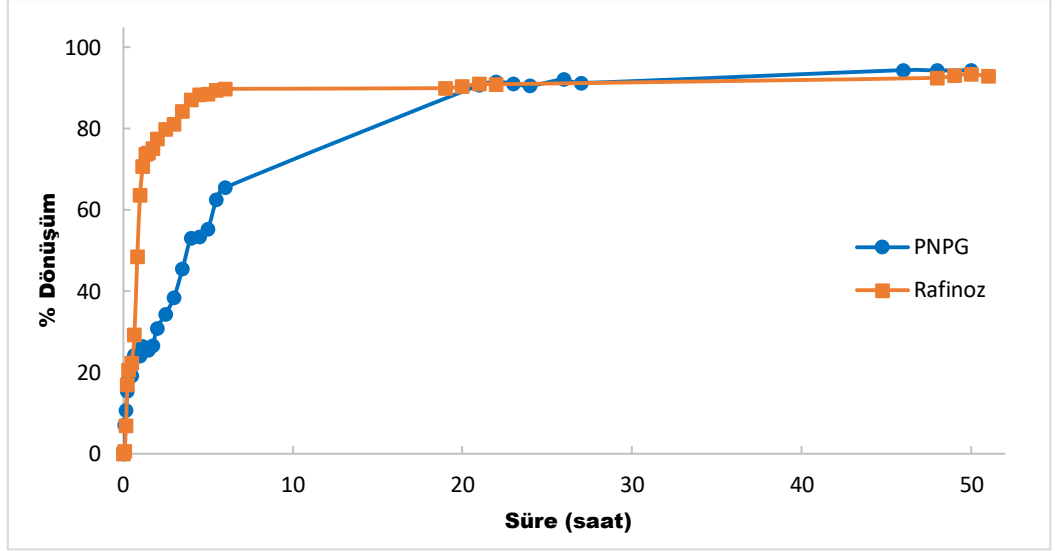


Şekil 3.27 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün ve substrat miktarları (Substrat: pNPG, Sıcaklık: 37°C, pNPG S<sub>0</sub>: 0,5 µmol).



Şekil 3.28 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün ve substrat miktarları (Substrat: Rafinoz, Sıcaklık: 50°C, Rafinoz S<sub>0</sub>: 10 µmol).





Şekil 3.29 pNPG ve rafinozun kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki dönüşüm eğrisi.

Şekil 3.29' dan görüldüğü üzere pNPG' nin kullanıldığı sistemde immobilize enzim 6. saatte substratın % 65' ini dönüştürmüştür ve bu değer 21. saate gelindiğinde % 91' e ulaşmıştır ve geçen zaman içinde % dönüşüm değerlerinde kayda değer bir farklanma gözlenmemiştir. Rafinozun kullanıldığı sistemde ise immobilize enzim 6 saatte substratın % 90' ını dönüştürmüştür ve sonraki zaman dilimlerinde bu dönüşüm çok fazla değişim göstermemiştir.

### 3.5 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi

#### 3.5.1 Soya sütünün hazırlanması ve toplam oligosakkarit miktarının tayini

Soya sütü Bölüm 2.12.1' de açıklanan Mulimani ve Ramalingam (1995) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak hazırlanmış ve fenol sülfirik asit yöntemi ile de toplam oligosakkarit miktarı 55,1 mg/mL olarak hesaplanmıştır. HPLC ile yapılacak analizlerde kullanılmak üzere soya sütü +4°C' de muhafaza edilmiştir.

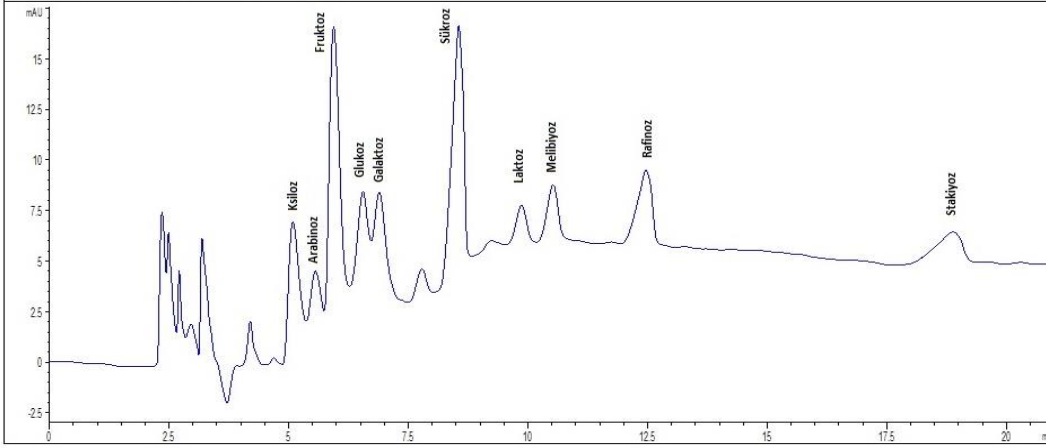
#### 3.5.2 HPLC ile ayırım ve hidroliz derecesinin belirlenmesi

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin optimize edilen koşullarda çapraz bağlı enzim agregatları büyük ölçekte hazırlanarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve hazırlanan soya sütünde enzimatik hidroliz için kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

HPLC ile karbohidratların (glukoz, sukroz, melibiyoz, galaktoz, laktoz, arabinoz, ksiloz, rafinoz, fruktoz ve stakioz) doğrusal tayin aralıkları ve alıkonma süreleri ( $t_R$ ) belirlendi (Şekil 3.30). HPLC koşulları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- Sistem** : Agilent 1260 Infinity (Almanya)  
**Kolon** : LC-NH<sub>2</sub> (Supelco, Almanya)(250mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ M, 100 A)  
**Mobil Faz A** : Asetonitril (Sigma, Almanya)  
**Mobil Faz B** : Su  
**Akış hızı** : 1,0 mL/dak.  
**Sıcaklık** : 40°C  
**Örnek** : 20  $\mu$ L (1:16 oranında seyreltme, initial; A/B  $\rightarrow$  80:20)  
**Dedeksiyon** : DAD 200 nm  
**Uygulama** : Gradient elüsyon; initial 20 % B  
 0-2. dakika 20 % B  
 2-23. dakika 20 – 25 % B  
 23-25. dakika 25 – 20 % B

HPLC ile ayırım sonrasında kolondan sırasıyla ksiloz, arabinoz, fruktoz, glukoz, galaktoz, sukroz, laktoz, melibiyoz, rafinoz ve stakioz elüe olmaktadır. Alıkonma süreleri Çizelge 3.21' de verilmiştir.



**Şekil 3.30** Karbohidrat standartlarının DAD (200 nm) dedektörün kullanıldığı HPLC analizine yönelik kromatogram [HPLC Koşulları: Kolon akış hızı 1,0 mL/dakika, dengeleme tamponu (Asetonitril) (Tampon A), elüsyon tamponu (su) (Tampon B), gradient elüsyon 0-2 dk. %20 (Tampon B), 2-5 dk %25 (Tampon B), 5-22 dk %25 (Tampon B), 22-23 dk %20 (Tampon B), kolon sıcaklığı 40°C, dalga boyu 200 nm, kolon LC-NH<sub>2</sub>].

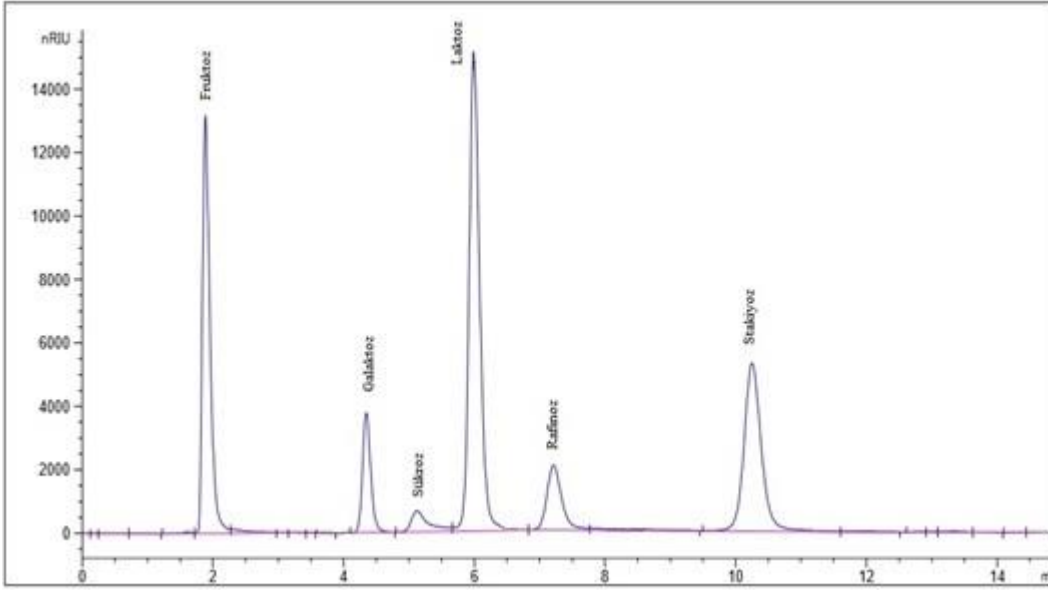
Çizelge 3.21 Karbohidratların HPLC ile kolonda alıkonma süreleri (Dedektör: DAD (200 nm)).

Karbohidratlar	Alıkonma Süresi (dak)
Ksiloz	5,090
Arabinoz	5,562
Fruktoz	5,941
Glukoz	6,555
Galaktoz	6,893
Sükroz	8,554
Laktoz	9,868
Melibiyoz	10,525
Rafinoz	12,568
Stakiyoz	19,207

Refraktif indeks dedektörü (RID) kullanılarak HPLC ile karbohidratların (rafinoz, stakiyoz, laktoz, fruktoz, sükroz ve galaktoz) doğrusal tayin aralıkları ve alıkonma süreleri ( $t_R$ ) belirlendi (Şekil 3.31). HPLC koşulları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- Sistem** : Agilent 1260 Infinity (Almanya)  
**Kolon** : LC-NH<sub>2</sub> (Supelco, Almanya)(250mm x 4,6 mm, 5µM, 100 Å)  
**Mobil Faz** : Asetonitril:Su (75:25)  
**Akış hızı** : 1,0 mL/dak.  
**Sıcaklık** : 50°C  
**Örnek** : 20 µL (1:16 oranında seyreltme, mobil faz)  
**Dedeksiyon** : RID  
**Uygulama** : İzokratik elüsyon

HPLC ile ayırım sonrasında kolondan sırasıyla galaktoz, sükroz, laktoz, rafinoz ve stakiyoz elüe olmaktadır. Alıkonma süreleri Çizelge 3.22' de verilmiştir.

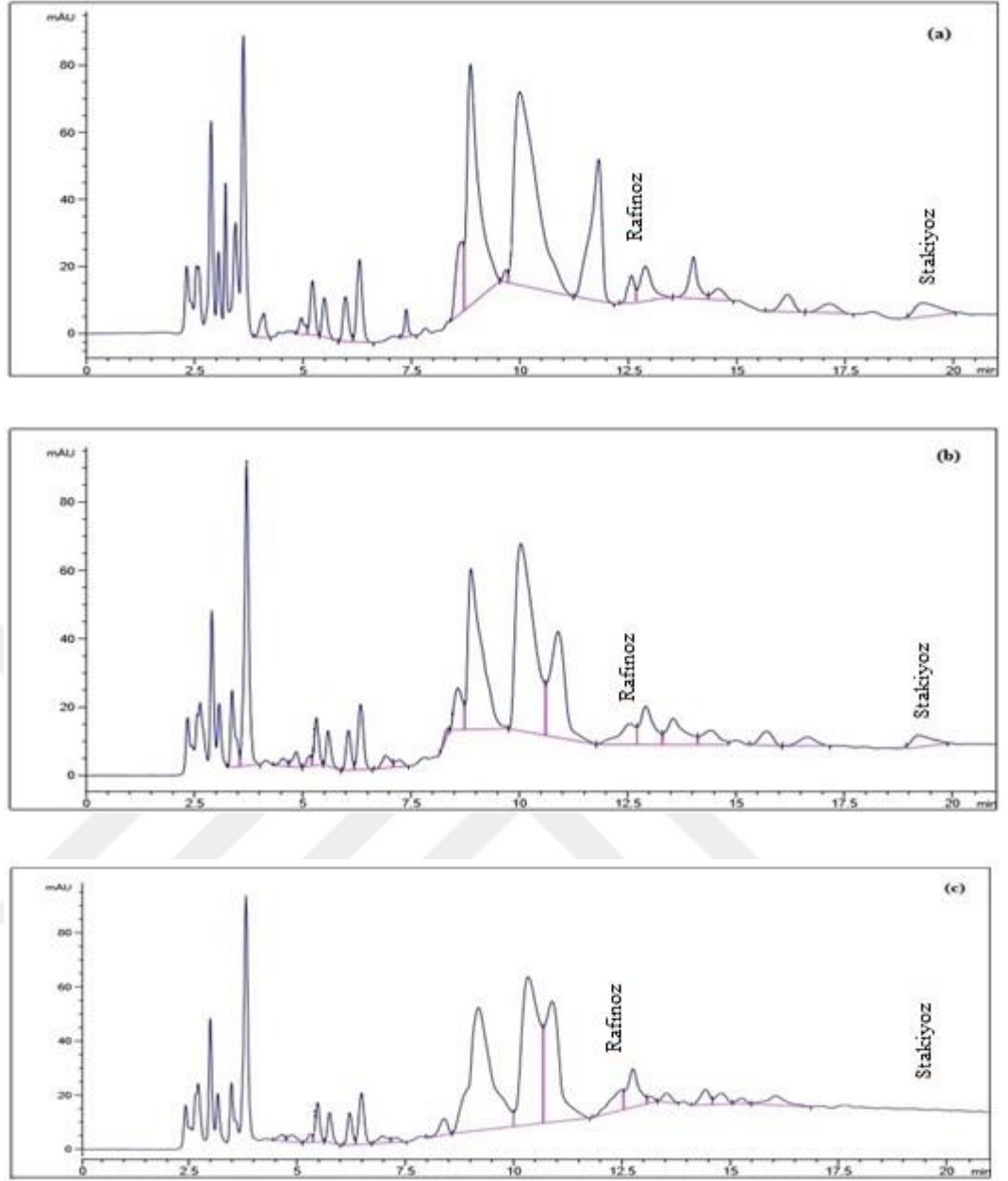


**Şekil 3.31** Karbohidrat standartlarının RID dedektörün kullanıldığı HPLC analizine yönelik kromatogram [HPLC Koşulları: Kolon akış hızı 1,0 mL/dakika, Mobil faz: Asetonitril:su (75:25), izokratik elüsyon, kolon sıcaklığı 50°C, kolon LC-NH<sub>2</sub>].

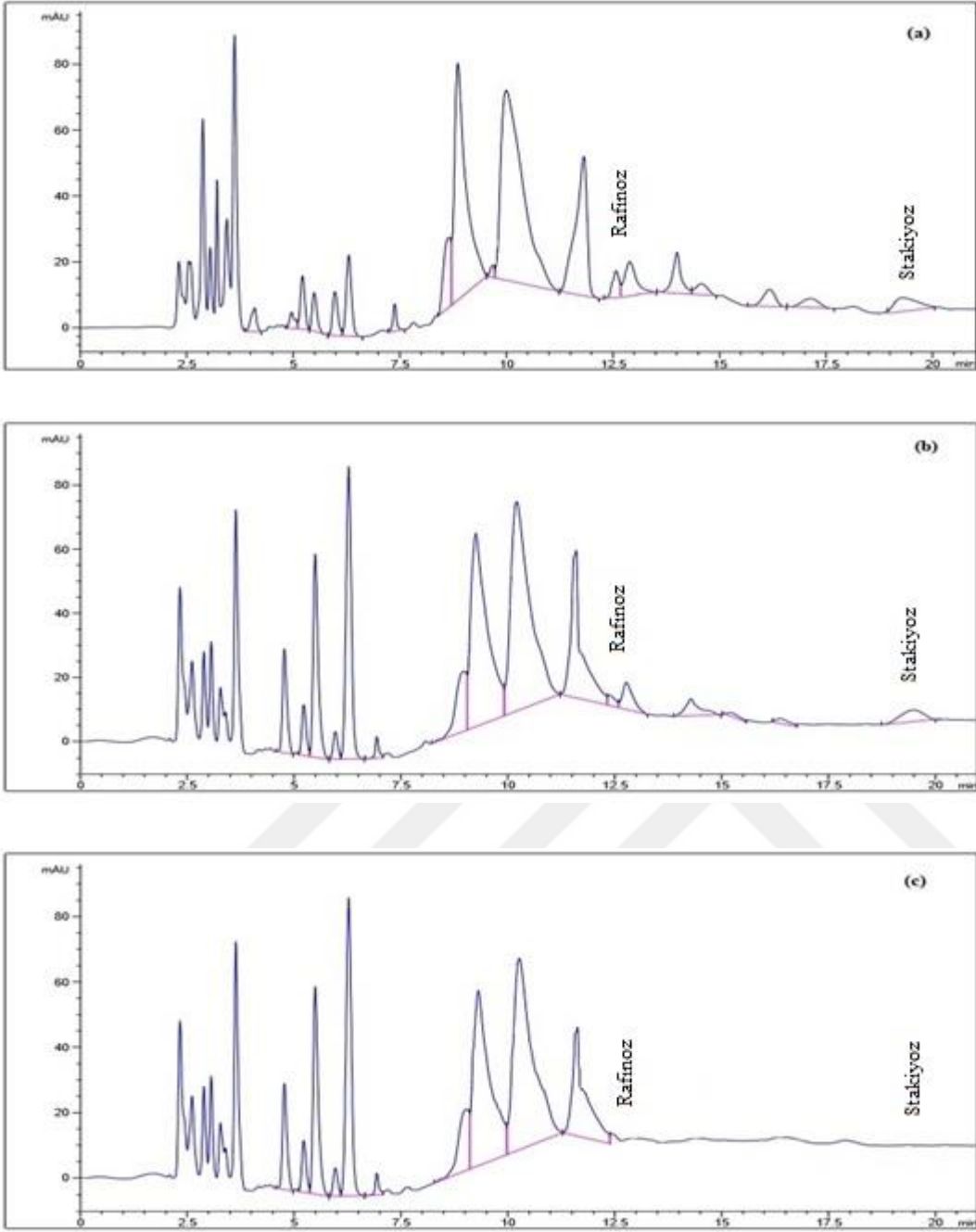
**Çizelge 3.22** Karbohidratların kolonda alıkonma süreleri (Dedektör: RID).

Karbohidratlar	Alıkonma Süresi (dak)
Fruktoz	1,886
Galaktoz	4,348
Sükröz	5,123
Laktoz	5,991
Rafinoz	7,263
Stakiyoz	10,249

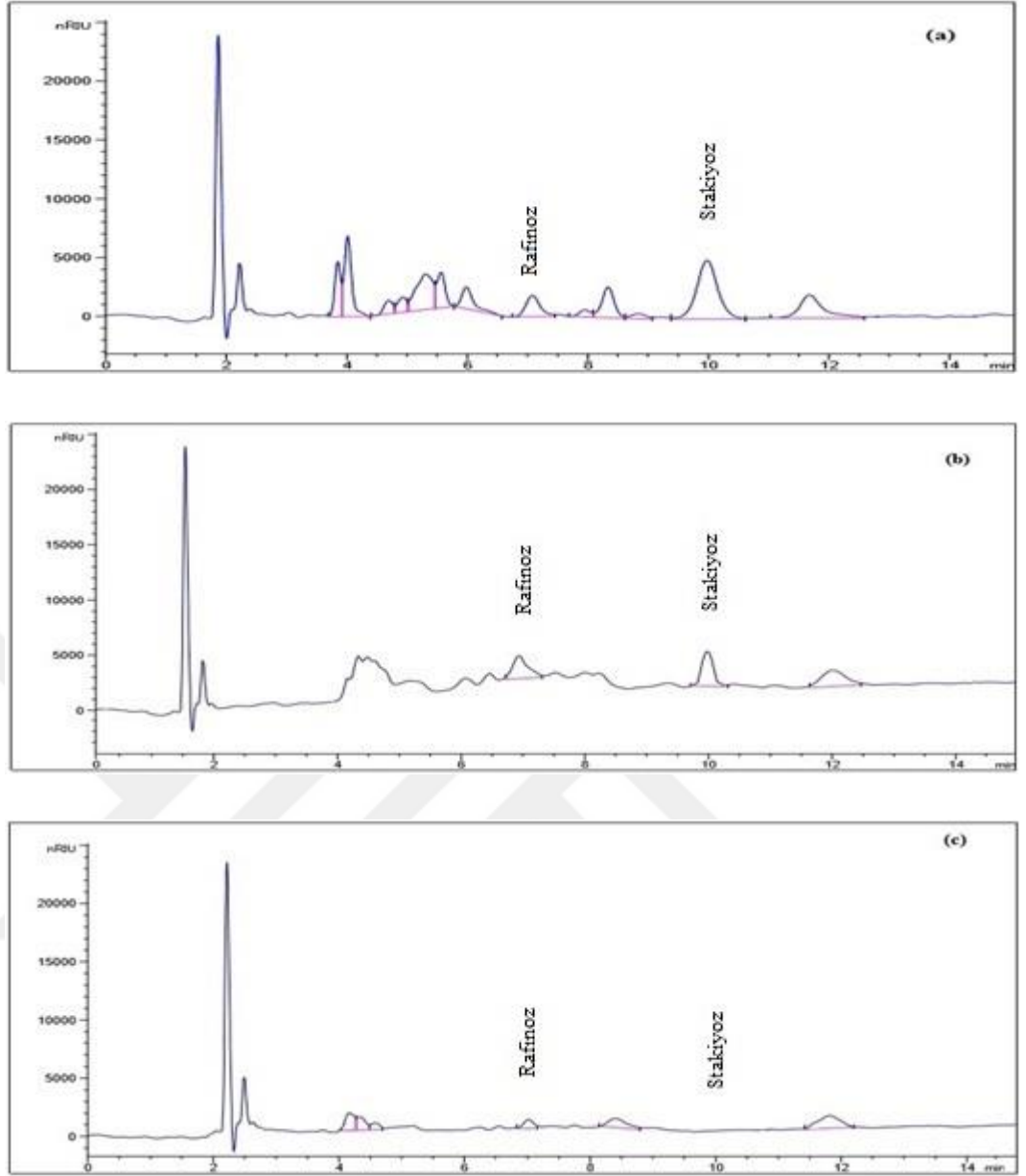
Bölüm 2.12.3' de belirtildiği gibi hidroliz reaksiyonları 50°C' de 200 rpm' de kesikli karıştırmalı inkübatörde çalkalama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan soya sütü ve enzimatik hidroliz sonrası örnekler DAD (200 nm) (Şekil 3.32 ve 3.33) ve RID (Şekil 3.34 ve 3.35) dedektörlerinin kullanıldığı HPLC sistemine uygulanmıştır. Hazırlanan immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatları ile soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidroliz sonrası örnekleri HPLC ile ayrılmıştır.



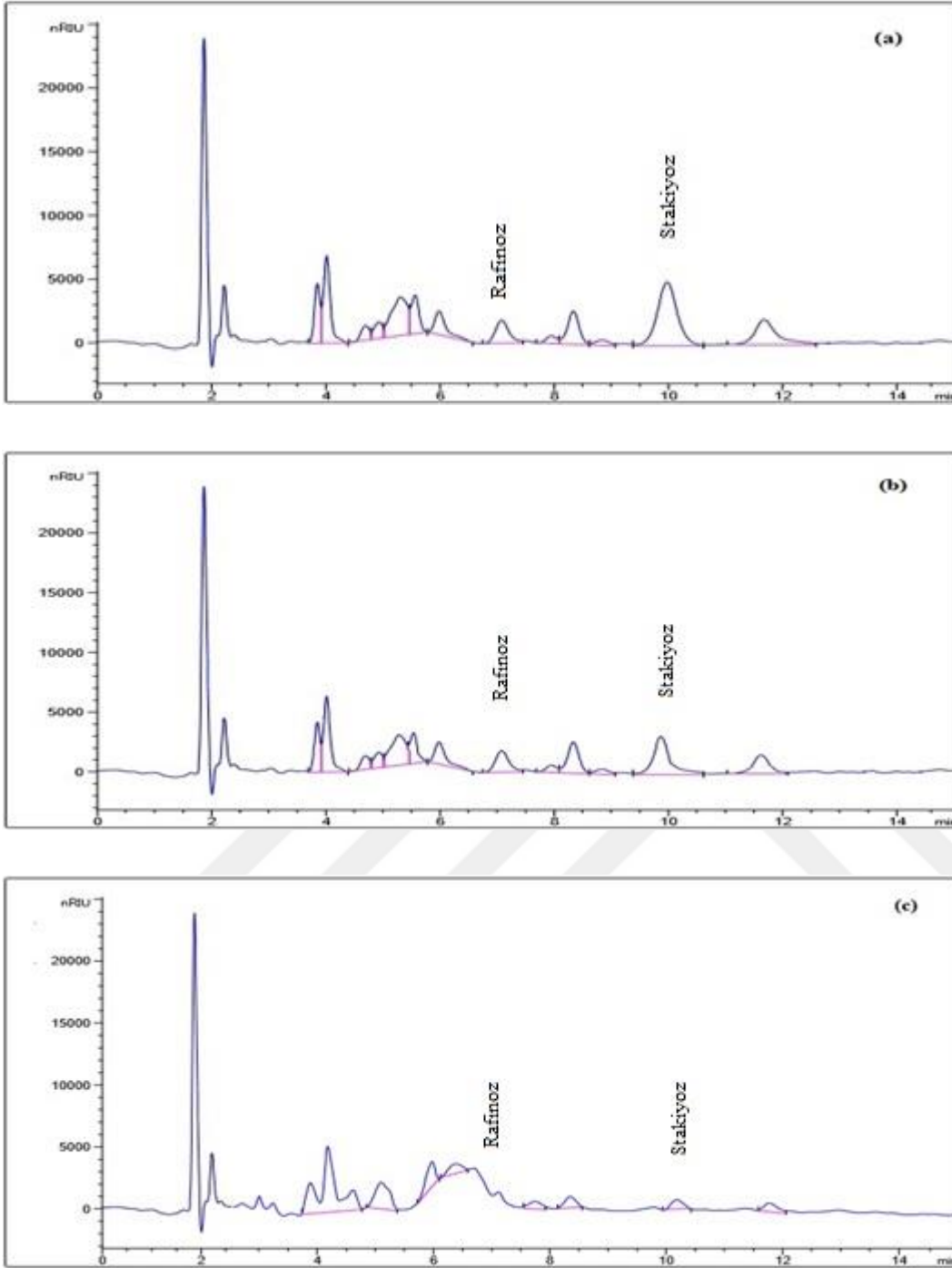
**Şekil 3.32** Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: DAD (200 nm)) **a)** soya sütü  $\alpha$ -galaktozidaz muamelesi **b)** serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an **c)** serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat.



**Şekil 3.33** Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: DAD (200 nm)) a) soya sütü  $\alpha$ -galaktozidaz öncesi b) immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an c) serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat.



**Şekil 3.34** Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: RID **a**) soya sütü  $\alpha$ -galaktozidaz öncesi **b**) serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an **c**) serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat.

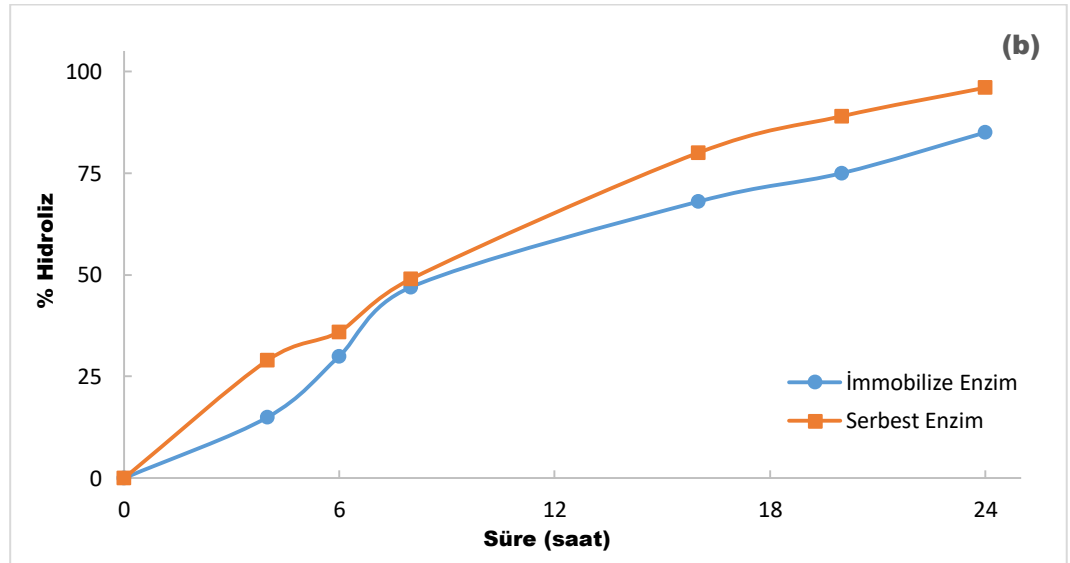
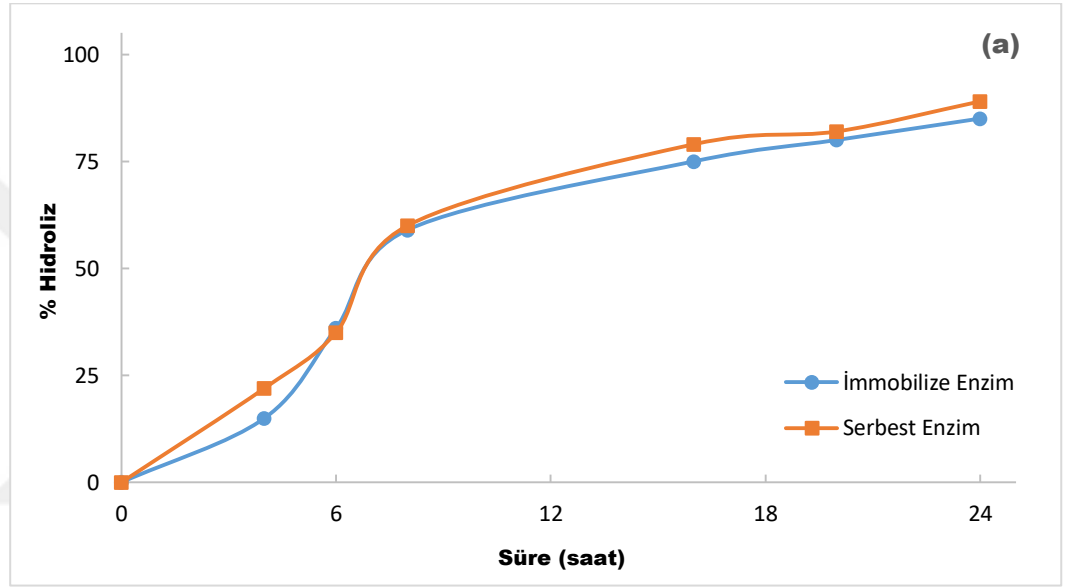


**Şekil 3.35** Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram (Dedektör: RID) a) soya sütü  $\alpha$ -galaktozidaz öncesi b) immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 0.an c) immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile 24 saat.

DAD (200 nm) dedektörün kullanıldığı HPLC sisteminde Şekil 3.32 ve 3.33’ de sırasıyla serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların, RID dedektörün kullanıldığı HPLC sistemde Şekil 3.34 ve 3.35’de sırasıyla serbest ve immobilize  $\alpha$ -

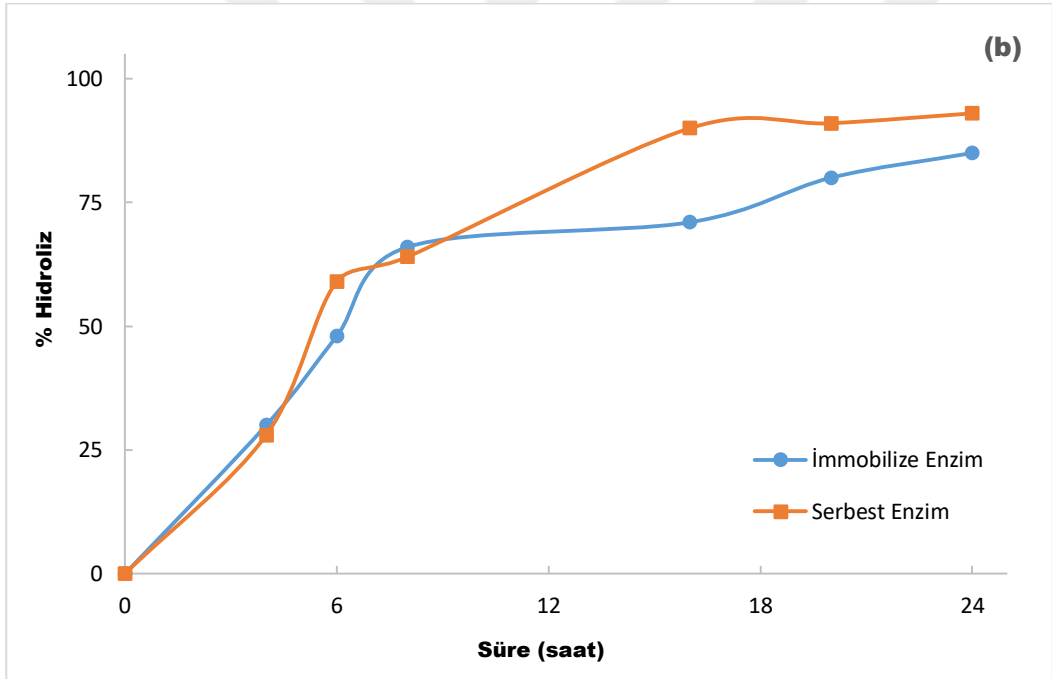
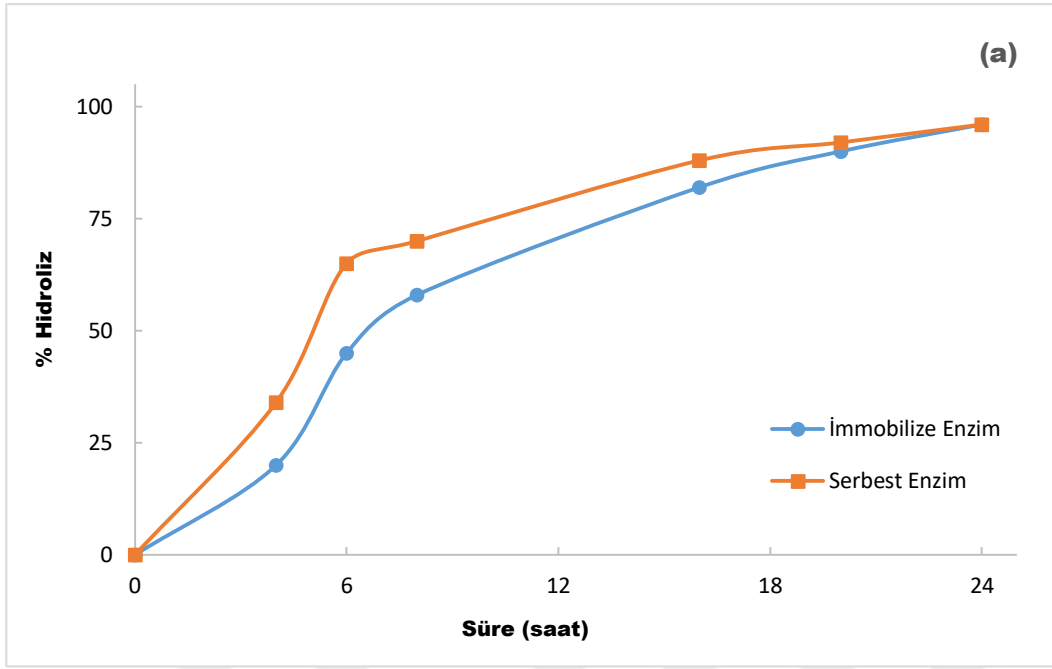


galaktozidazların soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip (stakiyoz) oligosakkaritlerin hidroliz kromatogramları verilmiştir. Bu kromatogramlardan yola çıkılarak soya sütündeki rafinoz (Şekil 3.36) ve stakiyozun (Şekil 3.37) hidroliz dereceleri belirlenmiştir. Şekil 3.36 ve 3.37’ den görüldüğü üzere stakiyoz hem serbest hem de immobilize enzim tarafından yüksek oranda dönüşüme uğratılmıştır. Rafinoz ise stakiyozla nispeten daha düşük oranda dönüştürülmüştür. Bu durum, hidroliz sonrasında bir tetrasakkarit olan stakiyozun parçalanması ile açığa çıkan rafinozdan ileri gelmektedir. Yani sistem bir yandan rafinozu hidrolizlerken diğer yandan da stakiyoz hidrolizi ile ortamda rafinoz birikir (Viana et al., 2006).



Şekil 3.36 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki rafinozun hidrolizi.

a) Dedektör: DAD (200 nm) b) Dedektör: RID.



Şekil 3.37 Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki stakiyozun hidrolizi.

a) Dedektör: DAD (200 nm) b) Dedektör: RID.

Şekil 3.36 (a)' dan görüldüğü üzere, DAD (200 nm) dedektörün kullanıldığı HPLC kromatogramlarından elde edilen sonuçlara göre, 24 saatin sonunda serbest enzim soya sütündeki rafinozun % 89' unu, immobilize enzim ise % 85' ini hidrolizlemiştir. RID dedektörün kullanıldığı HPLC kromatogramlarına ait sonuçları içeren Şekil 3.36 (b)' sonuçlarına göre ise, 24 saatin sonunda serbest

enzim soya sütündeki rafinozun % 96' sını, immobilize enzim ise % 85' ini hidrolizlemiştir. Stakiyozun hidrolizine ait sonuçların verildiği Şekil 3.37 (a)' den, DAD (200 nm) dedektörün kullanıldığı HPLC kromatogramlarından elde edilen sonuçlar, 24 saatin sonunda hem serbest hem de immobilize enzimin soya sütündeki rafinozun % 96' sını hidrolizlediği gözlenmiştir. RID dedektörün kullanıldığı HPLC kromatogramlarına ait sonuçları gösteren Şekil 3.37 (b)' sonuçlarına göre ise, 24 saatin sonunda serbest enzimin soya sütündeki rafinozun % 93' ünü, immobilize enzimin ise % 85' ini hidrolizlediği görülmüştür. Gerek yüksek kararlılıkları gerekse hidroliz proseslerindeki etkili işlevleri sebebiyle mısır  $\alpha$ -galaktozidazı CLEA' larının özellikle şeker endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstri alanında kullanılabilir düzeyde etkili ve kaliteli preparatlar olabilecekleri gösterilmiştir.

Hidroliz çalışmalarında immobilize enzim rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde, muhtemelen difüzyonel kısıtlamaya (immobilizasyon matrisinde dağılmaya karşı alt tabakanın direncine ve ürünlerin dağılmaya direnç göstermesine) bağlı olarak, serbest enzimden daha düşük bir bozunma yüzdesi göstermiştir. Serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin yüksek hidroliz dereceleri ile ilgili birçok çalışma rapor edilmiştir (Thippeswamy and Mulimani, 2002; Prashanth and Mulimani, 2005; Kotiguda et al., 2007; Anisha et al, 2008; Singh and Kayastha, 2012a, 2012b). *P. djamor*  $\alpha$ -galaktozidazının (PDGI) kullanıldığı çalışmada, soya sütündeki rafinoz ve stakiyoz 17 saat içinde tamamen hidrolize edilmiştir (Hu et al., 2017). *N. fischeri* P1  $\alpha$ -galaktozidazı (Gal27A) ve rekombinant enzimin (rGal27A) kullanıldığı çalışmada, Gal27A 50°C' de 3 saat süreyle soya sütüyle muamele edildikten sonra rafinoz ve stakiyoz içeriği sırasıyla % 69.9 ve % 94.5 oranında azalmıştır. Aynı koşullar altında, rGal27A, soya sütündeki rafinozun % 72.5' ini ve stakiyozun % 54.8' ini hidrolizlemiştir (Wang et al., 2014). Immobilize *C. madarasense* AUMC 9376  $\alpha$ -galaktozidazı soya sütü oligosakkaritleri ile muamele edildikten sonra, rafinoz ve stakiyoz sırasıyla % 69.2 ve % 64.3 oranında hidrolizlenmiştir (Abo-Elmagd, 2014). Literatür verileriyle kıyaslandığında, hazırlanan serbest ve immobilize enzimlerin (CLEA) rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizlerinde oldukça etkili olduğu görülmektedir.

Soya sütü, yüksek protein içeriği ve iyi dengelenmiş amino asit yapısından ötürü mükemmel bir besin kaynağıdır. Kolesterol veya laktoz içermez ve yalnızca az miktarda doymuş yağ asitleri içerir ve laktoz intoleransı olan insanlara tedarik edilebilir. Ancak soya sütü rafinoz ve stakiyoz gibi rafinoz ailesi oligosakkaritlerini (RFO' lar) önemli miktarda içermesinden dolayı biyolojik değeri ve kabul

edilebilirliği sınırlanmaktadır. İnsanlar ve diğer monogastrik hayvanlar, gastrik gaza neden olan RFO' ların parçalanması için gerekli olan  $\alpha$ -1,6 galaktozil bağına sindirim sisteminde kesen bir  $\alpha$ -galaktozidaz enzimine sahip olmadığından, bozulmamış oligosakkaritler absorbe edilmez. Bu oligosakkaritler, anaerobik mikroorganizmaların onları fermente edip, gaz oluşumuna yol açtığı kalın bağırsakta birikirler (Scalabrini et al., 1998; Viana et al., 2005).

Soya temelli gıdalar, hipolipidemik, antikolesterolemik ve antiaterojenik özelliklerin yanı sıra indirgenmiş allerjenite nedeniyle tüketicilere bir dizi sağlık faydası sağlayabilir. Ayrıca, hormon ile ilişkili çoğu sağlık bozukluğunun azaltılmış riski ile bağlantılı olan izoflavonları da içerir (Sumarna, 2008).

Singh ve Kayashta (2012b), beyaz nohut (*C. arietinum*)  $\alpha$ -galaktozidaz tedavisi ile soya fasulyesi unlarında rafinoz ve stakiyoz içeriğinin % 80 ve % 85 oranında azaltıldığını bildirmiştir. Kotiguda ve ark. (2007) yaptığı bir çalışmada *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galaktozidazı k-karrajenan ve keçiyoynuzu sakızının bir jel matrisinde tutuklanmış ve soya sütünün hidroliz proseslerinde kullanılmıştır. Serbest  $\alpha$ -galaktozidaz, 50°C' de 2-4 saat inkübasyondan sonra soya sütü rafinoz oligosakkaritlerinin % 80 ve % 88 oranında hidrolize yol açarken, immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz sırasıyla % 68 ve % 77' lik hidroliz sağlamıştır. *P. purpurogenum*  $\alpha$ -galaktozidazının kullanıldığı başka bir çalışmada, soya sütündeki rafinoz ve stakiyoz içeriği yaklaşık 2 saatte tamamen hidrolizlenmiştir (Ramalingam et al., 2010). *A. oryzae*' den izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi soya sütünün 50°C' de yapılan hidroliz çalışmalarında kullanılmış ve rafinoz tip oligosakkaritlerin % 92 oranında parçalanması sağlanmıştır (Girigowda and Mulimani, 2006). *G. fujikuroi*  $\alpha$ -galaktozidazının poliakrilamid jelde tutuklanarak immobilize edildiği başka bir çalışmada, 50°C' de 3 saatlik inkübasyondan sonra rafinoz ailesi oligosakkaritleri serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz ile sırasıyla % 79 ve % 66 oranlarında hidroliz gerçekleştirmişlerdir (Thippeswamy and Mulimani, 2002). Beyaz nohuttan saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz kitosan ve Amberlite' de immobilize edildikten sonra soya sütü hidrolizinde kullanılmıştır. 8 saatin ardından serbest, immobilize ve Amberlite' de immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz sırasıyla % 81, % 70 ve % 60 oranında rafinoz tip oligosakkaritlerin bozunumunu gerçekleştirmişlerdir (Singh and Kayashta, 2012). Prashanth ve Mulimani (2005), kalsiyum aljinatta immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidazın kullanıldığı soya sütü hidrolizinde, 50°C' de 12 saat sonra serbest ve immobilize enzimin, soya sütünün rafinoz ailesi oligosakkarit içeriğinde sırasıyla % 93 ve % 81 oranında azalttığını rapor etmişlerdir. Viana ve ark. (2005), soya fasulyesi  $\alpha$ -galaktozidazını kullanarak soya sütündeki rafinoz tip

oligosakkaritlerin hidroliz çalışmalarını 40°C' de gerçekleştirmişler ve 6 saatte rafinoz ve stakiyozun sırasıyla % 89,2 ve % 72,3' ünü parçalamışlardır.



#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME

$\alpha$ -Galaktozidaz veya melibiyaz ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi galaktooligosakkaritler ve galaktomannanlar gibi dallanmış polisakkaritler de dâhil olmak üzere  $\alpha$ -D-galaktozidlerden  $\alpha$ -1,6-bağlı galaktoz birimlerini kesen bir ekzoglikozidazdır (Naumoff, 2004).  $\alpha$ -Galaktozidazların gıda, yem, tıbbi ve diğer pek çok endüstride uygulamaları iyi bilinmektedir. Uzun yıllardan beri,  $\alpha$ -galaktozidaz, gıdalardan besleyici özelliği olmayan rafinoz tip oligosakkaritleri (RFO) uzaklaştırarak sindirimi iyileştirmek ve gazın tedavisi için takviyeler şeklinde kullanılmaktadır. Öte yandan, besleyici endüstrideki uygulaması bariz ticari potansiyel ve gösterilen faydalar nedeniyle popülerlik kazanmaktadır.  $\alpha$ -Galaktozidazın medikal anlamda en önemli uygulaması şüphesiz, Fabry hastalığının tedavisinde hayat kurtarıcı ürünlerden iki tanesinin (örneğin Fabrazyme ve Replagal) dünya çapında kullanıldığı tıbbi sektörde görülmektedir.

Enzim immobilizasyonu, enzim tekrar kullanılabilirlik sorununu çözmek için ortaya atılan bir gerekliliktir. Bununla birlikte, günümüzde enzim özelliklerini iyileştirmek için güçlü bir hale gelmiştir. Böylece, immobilizasyon sonrasında, enzimler kararlılıklarını artırbilmektedirler. Bu dengeleme, enzim dayanıklılığını artırabilen çok yoğun bir tutunmanın sağlanması durumunda başarılabilir. Öte yandan, eğer enzim multimerik ise, çoklu alt birim immobilizasyonu alt birim ayrışmasını önleyebilir. Dahası, enzim moleküllerini çevreleyen uygun bir nano-çevre ortamı oluşturulursa, enzim kararlılığı iyileştirilebilir. Bundan başka, bazı durumlarda immobilizasyon, enzim aktivitesini (örneğin, enzimin donmuş hiperaktif halleri ile ya da sert bir reaksiyon ortamının zararlı etkilerinden kaçınarak), özgünlük ya da seçiciliğini (konformasyon değişiklikleri yoluyla) artırabilir. Eğer immobilizasyon yöntemleri bu amaca hitap ediyorsa, enzimin saflığı bile arttırılabilir (Fernandez-Lopez et al., 2017).

Bu tez çalışmasında,  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi mısırdan (*Z. mays*) kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi saf enzim preparatının çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlanarak enzimin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon prosedürünün optimizasyonu için immobilizasyona çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir. Yapılan optimizasyonlar sonucunda 100 mM pH 5,0 sitrat tamponu, 1:5 (v/v) enzim:amonyum sülfat oranı (% 75, w/v), % 0,1 (v/v) glutaraldehit konsantrasyonu, 7,5 mg protein ile 4 °C' de 150 rpm' de 6 saatte immobilizasyon işleminin yapılmasının uygun olduğu belirlenmiştir.

Mısır  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi optimize edilen koşullarda % 47 aktivite verimi ve % 99' luk agregasyon verimi ile çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) hazırlanarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyonun optimizasyonunun ardından, immobilize ve serbest enzimlerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık, pH, substrat spesifikliğı ve kinetik parametreler, efektör konsantrasyonu, stabilizatörler, vb. parametrelerin enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Ardından, termal, pH, depo, operasyonel kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik testleri de gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.1** Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyon sonuçları.

	<b>İ. E.</b>	<b>S. E.</b>
<b>Optimum pH</b>	5,5	6,0
<b>Optimum Sıcaklık (°C)</b>	40	40
<b>E<sub>a</sub> (kJmol<sup>-1</sup>)</b>	35,3	35,2
<b>[S] pNPG (mM)</b>	0,75	0,875
<b>K<sub>m</sub> pNPG (mM)</b>	0,62	0,82
<b>V<sub>max</sub> pNPG (U/mg)</b>	5,55	2,05
<b>[S] Rafinoz (mM)</b>	40	40
<b>K<sub>m</sub> Rafinoz (mM)</b>	19,12	12,22
<b>V<sub>max</sub> Rafinoz (U/mg)</b>	1,25	0,63
<b>[S] Melibiyoz (mM)</b>	15	20
<b>K<sub>m</sub> Melibiyoz (mM)</b>	2,66	9,70
<b>V<sub>max</sub> Melibiyoz (U/mg)</b>	2,26	1,73
<b>[S] Stakiyoz (mM)</b>	10	7,5
<b>K<sub>m</sub> Stakiyoz (mM)</b>	1,14	5,14
<b>V<sub>max</sub> Stakiyoz (U/mg)</b>	3,34	1,90
<b>İnhibitör: Galaktoz (% Bağlı Aktivite)</b>	14	12
<b>İnhibitör: Melibiyoz (% Bağlı Aktivite)</b>	29	24
<b>Aktivatör: MgCl<sub>2</sub> (% Bağlı Aktivite)</b>	116	92

**Çizelge 4.1** Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyon sonuçları (devam).

	<b>İ. E.</b>	<b>S. E.</b>
<b>Stabilizatör: %10 (w/v) Sükroz (2 ay) (%Bağlı Aktivite)</b>	123	83
<b>Stabilizatör: %20 (v/v) Gliserol (2 ay) (%Bağlı Aktivite)</b>	100	69
<b>Stabilizatör: %30 (v/v) Gliserol (2 ay) (%Bağlı Aktivite)</b>	60	60
<b>pH Kararlılık</b>	3,0-6,5	3,0-7,5
<b>Termal Kararlılık (120 dk, 37°C) (%Bağlı Aktivite)</b>	85	73
<b>Termal Kararlılık (120 dk, 40°C) (%Bağlı Aktivite)</b>	81	66
<b>Termal Kararlılık (120 dk, 50°C) (%Bağlı Aktivite)</b>	58	53
<b>Depo Kararlılığı (8 ay) (% Bağlı Aktivite)</b>	73	60
<b>t<sub>1/2</sub> (pNPG) (saat)</b>	6,56	-
<b>k<sub>D</sub> (pNPG) (mM)</b>	0,0023	-
<b>Operasyonel Kararlılık (pNPG, 6 saat) (%Bağlı Aktivite)</b>	35	-
<b>t<sub>1/2</sub> (Rafinoz) (saat)</b>	5,4	-
<b>k<sub>D</sub> (Rafinoz) (mM)</b>	0,0057	-
<b>Operasyonel Kararlılık (Rafinoz, 3,5 saat) (%Bağlı Aktivite)</b>	16	-
<b>Tekrar Kullanılabilirlik (pNPG, 9 kez) (%Bağlı Aktivite)</b>	48	-
<b>Tekrar Kullanılabilirlik (Rafinoz, 6 kez) (%Bağlı Aktivite)</b>	22	-
<b>PNPG Hidrolizi (6 saat) (% Dönüşüm)</b>	65	-
<b>Rafinoz Hidrolizi (6 saat) (% Dönüşüm)</b>	90	-
<b>Soya Sütünde Hidroliz (Rafinoz, 24 saat) (MWD) (% Hidroliz)</b>	85	89
<b>Soya Sütünde Hidroliz (Rafinoz, 24 saat) (RID) (% Hidroliz)</b>	85	96
<b>Soya Sütünde Hidroliz (Stakiyoz, 24 saat) (MWD) (% Hidroliz)</b>	96	96
<b>Soya Sütünde Hidroliz (Stakiyoz, 24 saat) (RID) (% Hidroliz)</b>	85	93



Çizelge 4.1' den görüldüğü üzere immobilizasyon sonrasında enzimin optimum pH değeri çok az asidik gölgeye kaymış, ancak sıcaklığında bir değişim olmamıştır. Ancak termal ve depo kararlılığında bariz bir artış gözlenmiştir. Stabilizatör varlığında aktivitesinin büyük kısmını koruduğu hatta kısmi aktivasyon gerçekleştiği gözlenmiştir.

Rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin etkinliğini belirlemek için hidroliz çalışmaları yapılmıştır. 24 saatte sistemdeki rafinoz ve stakiyozun %85' inden fazlasının serbest ve immobilize enzimler tarafından hidrolizlediği belirlenmiştir. HPLC ile karbohidrat analizine yönelik DAD (200 nm) ve RID dedektörler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Immobilize enzim, difüzyonel engel ve daha sterik doğası nedeniyle, serbest enzim kadar yüksek hidroliz derecelerine ulaşamamıştır. Ancak endüstride sürekli sistemlerde serbest enzimlerin maliyet açısından tekrar kullanımlarının olmaması, immobilize ile serbest enzim arasındaki bu farkın göz ardı edilmesine ve serbest enzimlerin yerine alternatif olarak sürekli proseslerde immobilize enzimlerin kullanım kolaylığı sağlayabileceklerine inanılmaktadır.

Sonuç olarak,  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi kullanılarak hazırlanan CLEA' ların yüksek termal ve operasyonel kararlılığının olması, tekrar kullanılabilmesirafinoz tip şekerlerin hidroliz proseslerinde kullanım potansiyellerinin olması nedeniyle özellikle şeker endüstrisinde veya soya sütü işleme proseslerinde sindirilemeyen şekerlerin giderim çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabilceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abo-Elmagd, H. I.**, 2014, Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Chaetomium madarasense* AUMC 9376, Romanian Biotechnological Letters, 19:9028-9041pp.
- Ademark, P., Larsson, M., Tjerneld, F. and Stalbrand, H.**, 2001, Multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificity, Enzyme and Microbial Technology, 29:441-8pp.
- Aduse-Opoku, J., Tao, L., Ferretti, J. J. and Russell, R. B.**, 1991, Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans*  $\alpha$ -galactosidase, Journal of General Microbiology, 137:757-64pp.
- Aehle, W.**, 2007, Enzymes in Industry: Production and Applications. Wiley-VCH/Verlag GmbH and Co., Weinheim, 6.
- Agyei, D. and He, L.**, 2015, Evaluation of cross-linked enzyme aggregates of *Lactobacillus* cell-envelope proteinases, for proteindegradation, Food and Bioproducts Processing, 94:59–69pp.
- Ahumada, K., Martínez-Gil, A., Moreno-Simunovic, Y., Illanes, A. and Wilson, L.**, 2016, Aroma release in wine using co-immobilized enzyme aggregates, Molecules, 21:1485p.
- Ajisaka, K. and Fujimoto, H.**, 1989, Regioselective synthesis of trisaccharides by use of a reversed hydrolysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-galactosidase, Carbohydrate Research, 185:139-46pp.
- Akiba, T. and Horikoshi, K.**, 1976, Properties of  $\alpha$ -galactosidase of alkalophilic bacteria, Agricultural and Biological Chemistry, 40:1851-1855pp.
- Alagoz, D., Tukel, S. S. and Yildirim, D.**, 2015, Enantioselective synthesis of various cyanohydrins using covalently immobilized preparations of hydroxynitrile lyase from *Prunus dulcis*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 177(6):1348-63pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Aleksieva, P., Tchorbanov, B. and Nacheva, L.,** 2010, High yield production of  $\alpha$ -galactosidase extracted from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger*, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24:1620–1623pp.
- Alonso, N., Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2005, Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35: 57–61pp.
- Andualema, B. and Gessesse, A.,** 2012, Microbial lipases and their industrial applications: Review, *Biotechnology*, 11:100-118pp.
- Anisha, G. S.,** 2011,  $\alpha$ -Galactosidase from *Streptomyces griseoloalbus*: an enzyme with versatile applications In: *Proceedings of the First Kerala Women Science Congress*, 19-25pp.
- Anisha, G. S.,** 2017,  $\alpha$ -Galactosidases, 369-394, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, Pandey, A., Negi, S. and Soccol, C. R. (Eds.), Elsevier, Cambridge, United States, 854p.
- Anisha, G. S. and Prema, P.,** 2008, Cell immobilization technique for the enhanced production of  $\alpha$ -galactosidase by *Streptomyces griseoloalbus*, *Bioresource Technology*, 99:3325-30pp.
- Anisha, G. S., John, R. P. and Prema, P.,** 2009, Biochemical and hydrolytic properties of multiple thermostable  $\alpha$ -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus*: obvious existence of a novel galactose-tolerant enzyme. *Process Biochemistry*, 44:327-33pp.
- Anisha, G. S., John, R. P. and Prema, P.,** 2011, Substrate specificities and mechanism of action of multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus*, *Food Chemistry*, 124:349-53pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Anisha, G. S., John, R. P., Prema, P. and Pandey, A.,** 2010, Investigation on  $\alpha$ -galactosidase production by *Streptomyces griseoloalbus* in a forcefully aerated packed-bed bioreactor operating in solid-state fermentation condition, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160:421-7pp.
- Anisha, G. S., Sukumaran, R. K. and Prema, P.,** 2008, Statistical optimization of  $\alpha$ -galactosidase production in submerged fermentation by *Streptomyces griseoloalbus* using response surface methodology, *Food Technology and Biotechnology*, 46:171-7pp.
- Annunziato, M. E., Mahoney, R. R. and Mudgett, R. E.,** 1986, Production of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture, *Journal of Food Science*, 51:1370-1pp.
- Arca-Ramos, A; Kumar, V. V., Eibes, G., Moreira, M. T. and Cabana, H.,** 2016, Recyclable cross-linked laccase aggregates coupled to magnetic silica microbeads for elimination of pharmaceuticals from municipal wastewater, *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(9):8929-39pp.
- Arnaud, N., Bush, D. and Horisberger, M.,** 1976, Study of an intracellular  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Penicillium duponti*, *Biotechnology and Bioengineering*, 18:581-585pp.
- Arsenault, A., Cabana, H. and Jones, J. P.,** 2011, Laccase-based CLEAs: Chitosan as a novel cross-linking agent, *Enzyme Research*, article no: 376015, 10p.
- Aslanidis, C., Schmid, K. and Schmitt, R.,** 1989, Nucleotide sequences of operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 171:6753-63pp.
- Awan, M. S., Jalal, F., Ayub, N., Akhtar, M. W. and Rajoka, M. I.,** 2009, Production and characterization of  $\alpha$ -galactosidase by a multiple mutant of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation, *Food Technology and Biotechnology*, 47:370–380pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ayhan, H., Ayhan, F. and Gulsu, A.,** 2012, Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine, *Turkish Journal of Biochemistry*, 37:14-20pp.
- Aytar, B. S. and Bakir, U.,** 2008, Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates, *Process Biochemistry*, 43:125-131pp.
- Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J. P. and Cabana, H.,** 2013, Laccase immobilization and insolubilization: From fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment, *Critical Reviews in Biotechnology*, 33:404-18pp.
- Ba, S., Haroune, L., Cruz-Morato, C., Jacquet, C., Touahar, I. E., Bellenger, J. P., Legault, C. Y., Jones, J. P. and Cabana, H.,** 2014, Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters, *Science of the Total Environment*, 487:748-755pp.
- Bachmann, M., Matile, P. and Keller, F.,** 1994, Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. cold acclimation, translocation and sink to source transition—discovery of chain elongation enzyme, *Plant Physiology*, 105:1335–1345pp.
- Bahar, T. and Çelebi, S. S.,** 1998, Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles, *Enzyme and Microbial Technology*, 23:301–304pp.
- Bakunina, I. Y., Sova, V. V., Nedashkovskaya, O. I., Kuhlmann, R. A., Likhosherstov, L. M., Martynova, M. D., Mihailov, V. V. and Elyakova, L. A.,** 1998, Alpha-galactosidase of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701, *Biochemistry (Mosco)*, 63:1209-15.
- Barham, D., Dey, P. M., Griffiths, D. and Pridham, J. B.,** 1971, Studies on the distribution of  $\alpha$ -galactosidases in seeds, *Phytochemistry*, 10:1759-1763pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bayraktar, H. and Önal, S.,** 2013, Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning, Separation and Purification Technology, 118:835–841pp.
- Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkas, T., Celem, E. B. and Onal, S,** 2011, Immobilization and stabilization of alpha-galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA. International Journal of Biogical Macromolecules, 49:855–860pp.
- Bei-Zhong, H., Yong, M., Frans, M. R. and Robert, N. M. J.,** 2003, Effects of temperature and relative humidity on growth and enzyme production by *Actinomucor elegans* and *Rhizopus oligosporus* during sufu pehtze preparation, Food Chemistry, 81:27-34pp.
- Berg, J. O., Lindqvist, L. and Nord, C. E.,** 1980, Purification of glycoside hydrolases from *Bacteroides fragilis*, Applied and Environmental Microbiology, 40:40-7pp.
- Berg, J.,** 2007, “Structural Biochemistry/Enzyme/Effects of pH on enzyme activity” [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Enzyme/Effects\\_of\\_pH\\_on\\_enzyme\\_activity](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Effects_of_pH_on_enzyme_activity) (Erişim tarihi: 13 Aralık 2017)
- Beutler, E. and Kuhl, W.,** 1972, Purification and properties of human  $\alpha$ -galactosidases, Journal of Biological Chemistry, 217(22):7195-7200pp.
- Bıçak Çelem, E. and Önal, S.,** 2008, Purification of  $\alpha$ -galactosidase by affinity precipitation with alginate, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 38:348-357pp.
- Bıçak Çelem, E., Bolle, S. S. and Önal, S.,** 2009, Efficient and rapid purification of lentil  $\alpha$ -galactosidase by affinity precipitation with alginate, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 46:366-370pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bidmanova, S., Hrdlickova, E., Koudelakova, T., Damborsky, J. and Prokop, Z.,** 2014, Online monitoring of biodegradation processes using enzymatic biosensors, 155-179, *Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve*, Nojiri, H., Tsuda M., Fukuda, M. and Kamagata, Y. (Eds.), Springer, Japan, 358p.
- Blöchl, A., Peterbauer, T., Hofmann, J. and Richter, A.,** 2008, Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds, *Planta*, 228:99–110pp.
- Bommarius, A. S. and Paye, M. F.,** 2013, Stabilizing biocatalysts, *Chemical Society Reviews*, 42:6534-6565pp.
- Bommarius, A. S., Drauz, K., Klenk, H. and Wandrey, C.,** 1992, Operational stability of enzymes: Acylase-catalyzed resolution of N-acetyl amino acids to enantiomerically pure L-amino acids, *Annals New York Academy of Sciences*, 672:126-136pp.
- Bornscheuer, U. T.,** 2014, Enzymes in lipid modification: Past achievements and current trends, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116:1322-1331pp.
- Bradford, M. M.,** 1976, A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254pp.
- Brady, D. and Jordaan, J.,** 2009, Advances in enzyme immobilization, *Biotechnology Letters*, 31:1639-1650pp.
- Brady D., Steenkamp L., Skein E., Chaplin J. A. and Reddy S.,** 2004, Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR, *Enzyme and Microbial Technology*, 34:283-291pp.
- Brena, B. M. and Batista-Viera, F.,** 2013, Immobilization of enzymes: a literature survey, *Methods in Molecular Biology*, 1051:15-31pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Brena, B., González-Pombo, P. and Batista-Viera, F.,** 2013, Immobilization of enzymes: A literature survey, *Methods in Molecular Biology*, 1051:15-31pp.
- Broun, G., Selegny, E., Avrameas, S. and Thomas, D.,** 1969, Enzymatically active membranes: Some properties of cellophane membranes supporting cross-linked enzymes, *BBA - Enzymology*, 185:260-262pp.
- Brouns, S. J. J., Smits, N., Wu, H., Snijders, A. P. L., Wright, P. C., de Vos, W. M. and van der Oost, J.,** 2006, Identification of a novel  $\alpha$ -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Journal of Bacteriology*, 188:2392-9pp.
- Burgess, R. R.,** 2009, Protein precipitation techniques, *Methods in Enzymology*, 463:331–342pp.
- Cabana, H., Jones, J. P. and Agathos, S. N.,** 2007, Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals, *Journal of Biotechnology*, 132:23-31pp.
- Cabana, H., Jones, J. P. and Agathos, S. N.,** 2009, Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine-disrupting chemicals, *Biotechnology and Bioengineering*, 102:1582-1592pp.
- Çalıcı, E., Demir, T., Bıçak Çelem, E. and Önal, S.,** 2009, Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70:123-127pp.
- Calhoun, D. H. and Abdullahi, A.,** 2016, Purification of Recombinant alpha Galactosidase A, Patent Yayınlanma Numarası: US20160040146 A1.
- Canaba, H., Jones, J. P. and Agathos, S. N.,** 2007, Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals, *Journal of Biotechnology*, 132:23–31pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cao, L.**, 2006, Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 578p.
- Cao, L., van Langen, L. and Sheldon, R. A.**, 2003, Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?, *Current Opinion in Biotechnology*, 14:387-394pp.
- Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R. A.**, 2000, Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase, *Organic Letters*, 2:1361-1364pp.
- Cao, Y., Wang, Y., Luo, H., Shi, P., Meng, K., Zhou, Z., Zhang and Z., Yao, B.**, 2009, Molecular cloning and expression of a novel protease-resistant GH-36 alpha-galactosidase from *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19:1295–1300pp.
- Cao, Y., Xiong, E. M., True, A. D. and Xiong, Y. L.**, 2016, The pH-dependent protection of  $\alpha$ -galactosidase activity by proteins against degradative enzymes during soymilk in vitro digestion, *LWT - Food Science and Technology* 69: 244-250pp.
- Cao, Y., Yang, P., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Meng, K., Zhang, Z., Wu, N., Yao, B. and Fan, Y.**, 2007, Purification and characterization of a novel protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795, *Enzyme and Microbial Technology*, 41:835-41pp.
- Cao, Y., Yuan, T., Shi, P., Luo, H., Li, N., Meng, K., Bai, Y., Yang, P., Zhou, Z., Zhang, Z. and Yao, B.**, 2010, Properties of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Streptomyces* sp. S27 and its potential for soybean processing, *Enzyme and Microbial Technology*, 47:305-12pp.
- Chapanian, R., Kwan, D. H., Constantinescu, I., Shaikh, F. A., Rossi, N. A. A., Withers, S. G., and Kizhakkedathu, J. N.**, 2014, Enhancement of biological reactions on cell surfaces via macromolecular crowding, *Nature Communications*, 5:4683p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chen, Y., Jin, M., Egborge, T., Coppola, G., Andre, J. and Calhoun, D. H.,** 2000, Expression and characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A produced in *Pichia pastori*, Protein Expression and Purification, 20:472–484pp.
- Chen, Z., Wang, Y., Liu, W., Wang, J. and Chen, H.,** 2017, A novel cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of papain and neurase-production, partial characterization and application, International Journal of Biological Macromolecules 95:650–657pp.
- Chen, Z., Yan, Q., Jiang, Z., Liu, Y. and Li, Y.,** 2015, High-level expression of a novel  $\alpha$ -galactosidase gene from *Rhizomucor miehei* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, Protein Expression and Purification, 110:107-14pp.
- Chern, M. K., Li, H. Y., Chen, P. F. and Chien, S. F.,** 2012, Taro  $\alpha$ -galactosidase: a new gene product for blood conversion, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 1:135-9pp.
- Chien, S. F. and Lin-Chu, M.,** 1991, The conversion of group B red blood cells into group 0 by an  $\alpha$ -D-galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*), Carbohydrate Research, 217:191-200pp.
- Chmura, A., Rustler, S., Paravidino, M., van Rantwijk, F., Stolz, A. and Sheldon, R. A.,** 2013, The combi-CLEA approach: enzymatic cascade synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid, Tetrahedron: Asymmetry, 24:1225-1232pp.
- Civas, A., Eberhard, R., Dizet, P. L. and Petek, F.,** 1984, Glycosidases induced in *Aspergillus tamaris*: mycelial  $\alpha$ -D-galactosidases, Biochemical Journal, 219:849-55pp.
- Clarke, J. H., Davidson, K., Rixon, J. E., Halstead, J. R., Fransen, M. P. and Gilbert, H. J.,** 2000, A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase, Applied Microbiology and Biotechnology, 53:661-667pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Clarke, J. H., Davidson, K., Rixon, J. E., Halstead, J. R., Fransen, M. P., Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P.,** 2000, A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53:661-7pp.
- Comfort, D. A., Bobrov, K. S., Ivanen, D. R., Shabalin, K. A., Harris, J. M., Kulminskaya, A. A., Brumer, H. and Kelly, R. M.,** 2007, Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36  $\alpha$ -galactosidase (TmGalA) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases, *Biochemistry*, 46:3319-30pp.
- Coombs, J. and Brenchley, J. E.,** 2001, Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA, *Applied and Environmental Microbiology*, 67:5094-9pp.
- Costa, H. C. B., Romão, B. B., Ribeiro, E. J. and Resende, M. M.,** 2013, Glutaraldehyde effect in the immobilization process of alpha-galactosidase from *Aspergillus niger* in the ion exchange resin duolite A-568, *Chemical Engineering Transactions*, 32:1105-1110pp.
- Cowan, D. A. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2011, Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization, *Enzyme and Microbial Technology*, 49:326-346pp.
- Cruz J., Barbosa O., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R., Torres R. and Ortiz C.,** 2012, Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 80:7-14pp.
- Cui, J. D. and Jia, S. R.,** 2015, Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: Current development and future challenges, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35:15-28pp.
- Cui, J. D., Liu, R. L. and Li, L. L.,** 2015, Imprinted cross-linked enzyme aggregate (iCLEA) of phenylalanine ammonia lyase: A new stable biocatalyst, *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 332:223-231pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cui, J. D., Zhang, S. and Sun, L. M.,** 2012, Cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase: Novel biocatalysts for synthesis of *L*-phenylalanine, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167:835–844pp.
- da Silva Fialho, L, Guimaraes, V. M., Callegari, C. M., Reis, A. P., Barbosa, D. S., de Lima Borges, E. E., Moreira, M. A. and de Rezende, S. T.,** 2008, Characterization and biotechnological application of an acid alpha-galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds, *Phytochemistry*, 69:2579–2585pp.
- Daitx, V. V., Mezzalana, J., Moraes, V. C., Breier, A. C., Ce, J. and Coelho, J. C.,** 2015, Comparing the alpha-galactosidase A biochemical properties from healthy individuals and Fabry disease patients, *Clinica Chimica Acta*, 445:60-4pp.
- Dalal, S., Sharma, A. and Gupta, M. N.,** 2007, A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities, *Chemistry Central Journal*, 1-16pp.
- Daude, D., Remaud-Simeon, M. and Andre, I.,** 2012, Sucrose analogs: an attractive (bio)source for glycodiversification, *Natural Product Reports*, 29:945–960pp.
- Davis, M. O., Hata, D. J., Johnson, S. A., Jones, D. E., Harmata, M. A., Evans, M. L., Walker, J. C. and Smith, D. S.,** 1997, Cloning, sequence, and expression of a blood group B active recombinant  $\alpha$ -D-galactosidase from pinto bean (*Phaseolus vulgaris*), *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42:453-467pp.
- de Rezende, T. S., Guimaraes, V. M., Rodrigues, M. C. and Felix, C. R.,** 2005, Purification and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48:195-202pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- de Vries, R. P., van den Broeck, H. C., Dekkers, E., Manzanares, P., de Graaff, L. H. and Visser, J.,** 1999, Differential expression of three  $\alpha$ -galactosidase genes and a single  $\beta$ -galactosidase gene from *Aspergillus niger*, Applied and Environmental Microbiology, 65:2453-60pp.
- Dean, K. J. and Sweeley, C. C.,** 1979a Purification of  $\alpha$ -galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates, Journal of Biological Chemistry, 254:9994-10000pp.
- Dean, K. J. and Sweeley, C. C.,** 1979b, Studies on human liver  $\alpha$ -galactosidases. III. Partial characterization of carbohydrate-binding specificities, Journal of Biological Chemistry, 254:10006-10010pp.
- Dean, K. J. and Sweeley, C. C.,** 1979c, Studies on human liver  $\alpha$ -galactosidase III., Journal of Biological Chemistry, 254:10006-10010pp.
- Delente, J., Johnson, J. H., Kuo, M. J., O'Connor, R. J. and Weeks, L. E.,** 1974, Production of a new thermostable neutral  $\alpha$ -galactosidase from a strain of *Bacillus stearothermophilus*, Biotechnology and Bioengineering, 16:1227-43pp.
- den Herder, I. F., Rosell A. M. M., van Zuilen C. M., Punt P. J. and van den Hondel C. A. M. J. J.,** 1992, Cloning and expression of a member of the *Aspergillus niger* gene family encoding  $\alpha$ -galactosidase, Molecular and General Genetics, 233:404-10pp.
- Desnick, R. J.,** 2015, Fabry disease:  $\alpha$ -galactosidase A deficiency, Rosenberg, R. N., Pascual, J. M. (Eds.), Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease, Academic Press, 419-430pp.
- Dey, P. M. and Del Campillo, E.,** 1984, Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 56:165-179pp.
- Dey, P. M. and Kauss, H.,** 1981,  $\alpha$ -Galactosidase of *Poterioochromonas malhamensis*, Phytochemistry, 20:45-48pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Dey, P. M. and Pridham, J. B.,** 1969, Substrate specificity and kinetic properties of  $\alpha$ -galactosidases from *Vicia faba*, *Biochemical Journal*, 115:47-54pp.
- Dey, P. M. and Pridham, J. B.,** 1972, Biochemistry of  $\alpha$ -D-galactosidase. In: Meister A. (Ed.), *Advances in enzymology*, New York: Academic, 36:91-130pp.
- Dey, P. M., Del Campillo, E. M. and Lezica, R. P.,** 1983, Characterization of a glycoprotein  $\alpha$ -galactosidase from Lentil seeds (*Lens culinaris*), *Journal of Biological Chemistry*, 258:923-929pp.
- Dey, P. M., Khaleque, A. and Pridham, J. B.,** 1971, Further observations on the  $\alpha$ -galactosidase activity of *Vicia faba* seeds, *Biochemical Journal*, 124:27p.
- Dey, P. M., Pridham, J. B. and Sumar, N.,** 1982, Multiple forms of *Vicia faba*  $\alpha$ -galactosidases and their relationships, *Phytochemistry*, 21:2195-2199 pp.
- Dinh, T. H., Jang, N. Y., McDonald, K. A. and Won, K.,** 2015, Cross-linked aggregation of glutamate decarboxylase to extend its activity range toward alkaline pH, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90: 2100–2105pp.
- Dong T., Zhao L., Huang Y. and Tan X.,** 2010, Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive, *Bioresource Technology*, 101:6569-6571pp.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevica, T. and Shah, N. P.,** 2007,  $\alpha$ -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk, *Food Chemistry*, 104:10-20pp.
- Drago, G. A. and Gibson, T. D.,** 2001, Enzyme stability and stabilisation: Applications and case studies, *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, 4:361-376pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Du, F., Zhu, M., Wang, H. and Ng, T.,** 2013, Purification and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on raffinose family oligosaccharides, *Plant Physiology and Biochemistry*, 69:49-53pp.
- Duffaud, G. D., McCutchen, C. M., Leduc, P., Parker, K. N. and Kelly, R. M.,** 1997, Purification and characterization of extremely thermostable  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068, *Applied and Environmental Microbiology*, 63:169-77pp.
- Elshafei, A. M., Foda, M. S., Aboul-Enein, A., Afify, A. S. and Ali, N. H.,** 1993, Purification and enzymic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium janthinellum*, *Acta Biotechnologica*, 13:351-9pp.
- Elshafei, A. M., Foda, M. S., Mobde, E. A. and Ali, N. H.,** 2001, Optimization of alpha-galactosidase production in *Streptomyces erythrus*, *Acta Microbiologica Polonica*, 50:53-63pp.
- Eng, C. M., Guffon, N., Wilcox, W. R., Germain, D. P., Lee, P. and Waldek, S.,** 2001, Safety and efficacy of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase Adreplacement therapy in Fabry's disease, *New England Journal of Medicine*, 345:9-16pp.
- Fallahpour, M., Moazami, N., Mirdamadi, S., Mesgarian, R., Vossoughi, M. and Bakhtiari M. R.,** 2002, Kinetic behaviour of  $\alpha$ -galactosidase produced by *Absidia griseola*: A comparison between free and immobilized forms of the enzyme, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:649–653pp.
- Farzadi, M., Khatami, S., Mousavi, M. and Amirmozafari, N.,** 2011, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus*, *African Journal of Biotechnology*, 10:1873-1879pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á. and Moldes, D.,** 2013, Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances*, 31:1808-1825pp.
- Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S. G., Lopez-Carrobles, N., Gorines, B. C., Virgen-Ortíz, J. J. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2017, Effect of protein load on stability of immobilized enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 98:18-25pp.
- Ferreira, J. G., Reis, A. P., Guimarães, V. M., Falkoski, D. L., Fialho, L. S. and de Rezende, S. T.,** 2011, Purification and characterization of *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164:1111–1125pp.
- Feurtado, J. A., Banik, M. and Bewley, J. D.,** 2001, The cloning and characterization of  $\alpha$ -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed, *Journal of Experimental Botany*, 52:1239-49pp.
- Foda, M. S., Elshafei, A. M., Aboul-Enein, A., Afify, A. S. and Ali, N. H.,** 1995, Physiological studies on the formation of  $\alpha$ -galactosidase by fungi, *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 17:25-32pp.
- Fredslund, F., Hachem, M. A., Larsen, R. J., Sørensen, P. G., Coutinho, P. M., Leggio, L. L. and Svensson, B.,** 2011, Crystal structure of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: insight into tetramer formation and substrate binding, *Journal of Molecular Biology*, 412:466-80pp.
- Fridjonsson, O. and Mattes, R.,** 2001, Production of recombinant  $\alpha$ -galactosidases in *Thermus thermophilus*, *Applied Environmental Microbiology*, 67:4192-8pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Fridjonsson, O., Watzlawick, H., Gehweiler, A., Rohrhirsch, T. and Mattes, R.,** 1999, Cloning of the gene encoding a novel thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360, Applied and Environmental Microbiology, 65:3955-63pp.
- Gajdhane, S. B., Bhagwat, P. K. and Dandge, P. B.,** 2016, Statistical media optimization for enhanced production of  $\alpha$ -galactosidase by a novel *Rhizopus oryzae* strain SUK, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 8:301-309pp.
- Galas, E. and Miskiewicz, H.,** 1996, Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea* IBT-3, Acta Microbiologica Polonica, 45:143-54pp.
- Galvis, M., Barbosa, O., Ruiz, M., Cruz, J., Ortiz, C., Torres, R. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2012, Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates, Process Biochemistry, 47:2373-2378pp.
- Ganter, C., Bock, A., Buckel, P. and Mattes, R.,** 1988, Production of thermostable recombinant  $\alpha$ -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup, Journal of Biotechnology, 8:301-10pp.
- Gao, X., Yang, J., Li, S. B., Liu, Z. P. and Zhang, Y. P.,** 2003, Fermentation and purification of recombinant alpha-galactosidase from *Pichia pastoris*, Chinese Journal of Biotechnology, 19(2):223-6pp.
- Gao, Z. and Schaffer, A. A.,** 1999, A novel alkaline alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose, Plant Physiology, 119:979-988pp.
- Garcia-Garcia, M. I., Sola-Carvajal, A., Sanchez-Carron, G., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A.,** 2011, New stabilized FastPrep-CLEAs for sialic acid synthesis, Bioresource Technology, 102:6186-6191pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Garman, S. C. and Garboczi, D. N.,** 2004, The molecular defect leading to Fabry disease: Structure of human  $\alpha$ -galactosidase, *Journal of Molecular Biology*, 337:319–335pp.
- Garro, M. S., de Valdez, G. F. and de Giori, G. S.,** 2004, Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk, *Food Microbiology*, 21:511-518pp.
- Garro, M. S., de Valdez, G. F., Oliver, G. and de Giori, G. S.,** 1996, Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*, *Journal of Biotechnology*, 45:103-9pp.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R. and Khare, S. K.,** 2006, Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase, *Food Chemistry*, 97:426-430pp.
- Ghazi, S., Rooke, J. A. and Galbraith, H.,** 2003, Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and alpha-galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks, *British Poultry Science*, 44:410–418pp.
- Gherardini, F., Babock, M., and Salyers, A. A.,** 1985, Purification and characterization of two  $\alpha$ -galactosidases associated with catabolism of guar gum and other  $\alpha$ -galactosides by *Bacteroides ovatus*, *Journal of Bacteriology*, 161:500-6pp.
- Girigowda, K. and Mulimani, V. H.,** 2006, Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by K-carrageenan-entrapped  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22:437–442pp.
- Goetze, D., Foletto, E. F., da Silva, H. B., Silveira, V. C. C., Dal Magro, L. and Rodrigues, R. C.,** 2017, Effect of feather meal as proteic feeder on combi-CLEAs preparation for grape juice clarification, *Process Biochemistry*, 62:122-127pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gogoi, P., Hazarika, S., Dutta, N. N. and Rao, P. G.,** 2010, Kinetics and mechanism on laccase catalyzed synthesis of poly(allylamine)–catechin conjugate, *Chemical Engineering Journal*, 163:86-92pp.
- Golotin, V. A., Balabanova, L. A., Noskova, Y. A., Slepchenko, L. V., Yu Bakunina, I., Vorobieva, N. S., Terenteva, N. A. and Rasskazov, V. A.,** 2016, Optimization of cold-adapted alpha-galactosidase expression in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 123:14-18pp.
- Gomes, J., Gomes, I. I., Terler, K., Gubala, N., Ditzelmuller, G., Steiner, W.,** 2000, Optimization of culture medium and conditions for  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 27:414-22pp.
- Gote, M. M., Khan, M. I., Gokhale, D. V., Bastawde, K. B. and Khire, J. M.,** 2006, Purification, characterization and substrate specificity of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM- 5146), *Process Biochemistry*, 41:1311-7pp.
- Gote, M., Umalkar, H., Khan, I. and Khire, J.,** 2004, Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk, *Process Biochemistry*, 39:1723-9pp.
- Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G. and Gibson, G. R.,** 2009, Expression of four beta-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171 and their contribution on the hydrolysis and synthesis of galactooligosaccharides, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(5):899-907pp.
- Guimaraes, V. M., Tavares, de R. S., Moreira, M. A., Goncalves, de B. E. and Felix, C. R.,** 2001, Characterization of alpha-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides, *Phytochemistry*, 58:67-73pp.
- Gunaratne, H. D. J. G.,** 1988, Immobilization of alpha-galactosidase from coconut endosperm, *University of Colombo UC (MED)*, 9:159p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gupta, K., Jana, A. K., Kumar, S. and Jana, M. M.,** 2015, Solid state fermentation with recovery of amyloglucosidase from extract by direct immobilization in cross linked enzyme aggregate for starch hydrolysis, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:486-492pp.
- Gupta, P., Dutt, K., Misra, S., Raghuwanshi, S. and Saxena, R. K.,** 2009, Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde, *Bioresource Technology*, 100:4074-4076pp.
- Gurkok, S., Cekmecelioglu, D. and Ogel, Z. B.,** 2011, Optimization of culture conditions for *Aspergillus sojae* expressing an *Aspergillus fumigatus*  $\alpha$ -galactosidase, *Bioresource Technology*, 102:4925-9pp.
- Halstead, J. R., Fransen, M. P., Eberhart, R. Y., Park, A. J., Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P.,** 2000,  $\alpha$ -Galactosidase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa: cloning, high level expression and its role in galactomannan hydrolysis, *FEMS Microbiology Letters*, 192:197-203pp.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. and Magner, E.,** 2009, Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38:453-468pp.
- Hansch, C., Leo, A., and Hoekman, D.,** 1995, Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants, American Chemical Society, Washington, DC, 348p.
- Haouz, A., Glandieres, J. M. and Alpert, B.,** 2001, Involvement of protein dynamics in enzyme stability the case of glucose oxidase, *FEBS Letters*, 506:216-220pp.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Okinaga, T. and Kitahata, S.,** 1995, Transglycosylation catalyzed by  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59:61-623pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Henrissat, B. and Bairoch, A.,** 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochemical Journal*, 316:695-6pp.
- Hetrick, E. M., Sperry, D. C., Nguyen, H. K. and Strege, M. A.,** 2014, Characterization of a novel cross-linked lipase: Impact of cross-linking on solubility and release from drug product, *Molecular Pharmaceutics*, 11:1189-1200pp.
- Hilal, N., Nigmatullin, R. and Alpatova, A.,** 2004, Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes, *Journal of Membrane Science*, 238:131-141pp.
- Holmberg, S., Perebikovskiy, A., Kulinsky, L. and Madou, M.,** 2014, 3-D Micro and Nano Technologies for Improvements in Electrochemical Power Devices, *Micromachines*, 5:171-203pp.
- Hormigo, D., García-Hidalgo, J., Acebal, C., Mata, I. and Arroyo, M.,** 2012, Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant poly-3-hydroxybutyrate depolymerase from *Streptomyces exfoliates*, *Bioresource Technology*, 115:177–182pp.
- Hu, X., Liu, L., Chen, D., Wang, Y., Zhang, J. and Shao, L.,** 2016, Co-expression of the recombined alcohol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and cross-linked enzyme aggregates stabilization, *Bioresource Technology*, 224: 531-535pp.
- Hu, Y., Tian, G., Zhao, L., Wang, H. and Ng, T. B.,** 2017, A protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from *Pleurotus djamor* with broad pH stability and good hydrolytic activity toward raffinose family oligosaccharides, *International Journal of Biological Macromolecules*, 94:122–130pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Huston, M. W., Yasuda, M., Pagant, S., St. Martin, S., Sproul, S., Santiago, Y., DeKolver, R., Holmes, M. C., Desnick, R. and Wechsler, T.,** 2017, Liver-based expression of the human alpha-galactosidase A gene (GLA) in a murine Fabry model results in continuous supra-physiological enzyme activity and effective substrate reduction, *Molecular Genetics and Metabolism*, 120:S17–S145pp.
- Illanes, A.,** 2012, Applications of microbial enzymes in organic synthesis, *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 141-174pp.
- Illanes, A., Wilson, L. and Aguirre, C.,** 2009, Synthesis of cephalixin in aqueous medium with carrier-bound and carrier-free penicillin acylase biocatalysts, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157:98-110pp.
- Illanes, A., Wilson, L., Caballero, E., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M.,** 2006, Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics in organic medium, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133:189-202pp.
- Ishiguro, M., Kaneko, S., Kuno, A., Koyama, Y., Yoshida, S., Park, G. G., Sakakibara, Y., Kusakabe, I. and Kobayashi, H.,** 2001, Purification and characterization of the recombinant *Thermus* sp. strain T2  $\alpha$ -galactosidase expressed in *Escherichia coli*, *Applied Environmental Microbiology*, 67:1601-6pp.
- Itoh, T., Uda, Y. and Nakagawa, H.,** 1986, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon, *Journal of Biochemistry*, 99:243-250pp.
- Jin, F., Li, Y., Zhang, C. and Yu, H.,** 2001, Thermostable  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF strain, *Process Biochemistry*, 36:559-64pp.
- Johnson, J. C.,** 1979, Immobilized enzymes – Preparation and engineering - Recent advances, Noyes Data Corp., Park Ridge (Ed.), 383p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kaneko, R., Kusakabe, I., Ida, E. and Murakami, K.,** 1991, Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger* 5-16, Agricultural and Biological Chemistry, 55:109-15pp.
- Kapnoor, S. and Mulimani, V. H.,** 2010, Production of  $\alpha$ -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk galactooligosaccharide hydrolysis, Brazilian Archives of Biology and Technology, 53:211-218pp.
- Kartal, F.,** 2016, Enhanced esterification activity through interfacial activation and cross-linked immobilization mechanism of *Rhizopus oryzae* lipase in a nonaqueous medium, Biotechnology Progress, 32:899-904pp.
- Kartal, F., Janssen, M. H. A., Hollmann, F., Sheldon, R. A. and Kilinc, A.,** 2011, Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 71:85-89pp.
- Katrolia, P., Jia, H., Yan, Q., Song, S., Jiang, Z. and Xu, H.,** 2012, Characterization of a protease-resistant alpha-galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides, Bioresource Technology, 110:578–586pp.
- Katrolia, P., Rajashekhara, E., Yan, Q. and Jian, Z.,** 2013, Biotechnological potential of microbial  $\alpha$ -galactosidases, Critical Reviews in Biotechnology, 34(4):307-17pp.
- Kaul, P., Stolz, A. and Banerjee, U. C.,** 2007, Cross linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis, Advanced Synthesis and Catalysis, 349:2167–2176pp.
- Keerti, Gupta, A., Kumar, V., Dubey, A. and Verma, A. K.,** 2014, Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable  $\beta$ -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice, ISRN Biochemistry, 2014:8p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Keller, F. and Pharr, D. M.**, 1996, Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: Galactosyl-sucrose oligosaccharides, *Source-Sink Relationships*, 7:168-171pp.
- Khanahmadi, S., Yusof, F., Amid, A., Mahmud, S. S. and Mahat, M. K.**, 2015, Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk, *Journal of Biotechnology*, 202:153–161pp.
- Khare, S. K. and Gupta, M. N.**, 1990, An active insoluble aggregate of *E. coli* beta-galactosidase, *Biotechnology and Bioengineering*, 35(1):94-8pp.
- Khare, S. K., Vaidya, S. and Gupta, M. N.**, 1991, Entrapment of proteins by aggregation within sephadex beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 27:205-216pp.
- Kim, M. H., Park, S., Kim, Y. H., Won, K. and Lee, S. H.**, 2013, Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97:209-214pp.
- Kim, W. D., Kaneko, S., Park G. G., Tanaka, H., Kusakabe, I. and Kobayashi, H.**, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from sunflower seeds, *Biotechnology Letters*, 25:353-358pp.
- King, M. R., White, B. A., Blaschek, H. P., Chassy, B. M., Mackie, R. I. and Cann, I. K.**, 2002, Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5676-82pp.
- King, M. R., Yernool, D. A., Eveleigh, D. E. and Chassy, B. M.**, 1998, Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermotoga neapolitana* cloning, sequencing and expression, *FEMS Microbiology Letters*, 163:37-42pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kizhner, T., Azulay, Y., Hainrichson, M., Tekoah, Y., Arvatz, G., Shulman, A., Ruderfer, I., Aviezer, D. and Shaaltiel, Y.,** 2015, Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human  $\alpha$ -galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease, *Molecular Genetics and Metabolism*, 114:259–267pp.
- Knap, I. H., Hjort, C. M., Halkier, T. and Kofod, L. V.,** 2001,  $\alpha$ -Galactosidase enzyme, US Patent 6,197,566 (Assignee: Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, DK).
- Kondoh, K., Morisaki, K., Kim, W. D., Park, G. G., Kaneko, S., Kobayashi, H.,** 2005, Cloning and expression of the gene encoding *Streptomyces coelicolor* A3(2)  $\alpha$ -galactosidase belonging to family 36, *Biotechnology Letters*, 27:641-7pp.
- Kopp, W., Da Costa, T. P., Pereira, S. C., Jafelicci, Jr. M., Giordano, R. C., Marques, R. F. C., Araujo-Moreira, F. M. and Giordano, R. L. C.,** 2014, Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: Catalytic and morphological studies, *Process Biochemistry*, 49:38-46pp.
- Kotiguda, G., Kapnoor, S. S., Kulkarni, D. and Mulimani, V. H.,** 2007, Degradation of raffinose oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase of *Aspergillus oryzae*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:1430–1436pp.
- Kotwal, S. M., Gote, M. M., Khan, M. I., Khire, J. M.,** 1999, Production, purification and characterization of constitutive intracellular  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola* sp, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23:661-7pp.
- Kotwal, S. M., Gote, M. M., Sainkar, S. R., Khan, M. I. and Khire, J. M.,** 1998, Production of  $\alpha$ -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. in solid-state fermentation and its application in soya milk hydrolysis, *Process Biochemistry*, 33:337-43pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kruskall, M. S., AuBuchon, J. P., Anthony, K. Y., Herschel, L., Pickard, C., Biehl, R., Horowitz, M., Brambilla, D. J. and Popovsky, M. A., 2000,** Transfusion to blood group A and O patients of group B RBCs that have been enzymatically converted to group O, *Transfusion*, 40(11):1290-8pp.
- Kumar, H. S. A., Kumar, V. and Vidyavathi, N., 2014,** Optimization of fermentation parameters and enzyme immobilization of alpha-galactosidase isolated from different bacteria, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2):154-167pp.
- Kumar, S. K. P. and Mulimani, V.H., 2010,** Continuous hydrolysis of raffinose family oligosaccharides in soymilk by fluidized bed reactor, *LWT - Food Science and Technology*, 43:220–225pp.
- Kurakake, M., Okumura, T. and Morimoto, Y., 2015,** Synthesis of galactosyl glycerol from guar gum by transglycosylation of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus* sp. MK14, *Food Chemistry*, 172:150-4pp.
- Laemmli, U. K., 1970,** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680–685pp.
- Lai, J. Q., Hu, Z. L., Sheldon, R. A. and Yang, Z., 2012,** Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production, *Process Biochemistry*, 47:2058–2063pp.
- LeBlanc, J. G., Piard, J., Sesma, F. and de Giori, G. S., 2005,** *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active  $\alpha$ -galactosidase activity in the small intestine of rats, *FEMS Microbiology Letters*, 248:177-182pp.
- Leder, S., Hartmeier, W., Marx, S. P., 1999,**  $\alpha$ -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, *Current Microbiology*, 38:101-6pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lee, A., Choi, K. H., Yoon, D., Kim, S. and Cha, J.,** 2017, Characterization of a thermostable glycoside hydrolase family 36  $\alpha$ -galactosidase from *Caldicellulosiruptor bescii*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124:289-295pp.
- Lee, J., Na, H. B., Kim, B. C., Lee, J. H., Lee, B., Kwak, J. H., Hwang, Y., Park, J. G., Gu, M. B., Kim, J., Joo, J., Shin, C. H., Grate, J.W., Hyeon, T. and Kim, J.,** 2009, Magnetically-separable and highly-stable enzyme system based on crosslinked enzyme aggregates shipped in magnetite-coated mesoporous silica, *Journal of Materials Chemistry*, 19:7864-7870pp.
- Lee, J., Park, I and Cho, J.,** 2012, Production and partial characterization of  $\alpha$ -galactosidase activity from an Antarctic bacterial isolate, *Bacillus* sp. LX-1, *African Journal of Biotechnology*, 11:12396-12405pp.
- Lee, J., Park, I. and Cho, J.,** 2013, Immobilization of the antarctic *Bacillus* sp. LX-1  $\alpha$ -galactosidase on Eudragit L-100 for the production of a functional feed additive, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26:552–557pp.
- Lee, K., Jin, X., Zhang, K., Copertino, L., Andrews, L. and Baker-Malcolm, J.,** 2003, A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease, *Glycobiology*, 13:305-13pp.
- Lee, R. H., Lin, M. C. and Chen, S. C.,** 2004, A novel alkaline  $\alpha$ -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence, *Plant Molecular Biology*, 55:281–295pp.
- Lei, Z. and Bi, S.,** 2007, The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization, *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1442–1447pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Li, H., Liang, W. Q., Wang, Z. Y., Luo, N., Wu, X. Y., Hu, J. M., Lu, J. Q., Zhang, X. Y., Wu, P. C. and Liu, Y. H.,** 2006, Enhanced production and partial characterization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase by *Thermotolerant Absidia* sp.WL511 in solid-state fermentation using response surface methodology, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22:1-7pp.
- Li, S., Su, Y., Liu, Y., Sun, L., Yu, M. and Wu, Y.,** 2016, Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates(CLEAs) of recombinant thermostable alkylsulfatase (SdsAP) from *Pseudomonas* sp. S9, *Process Biochemistry*, 51: 2084-2089pp.
- Li, X., Yang, L., Yan, P., Zuo, F. and Jin, F.,** 1997, Factors regulating production of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus* sp. JF2, *Letters in Applied Microbiology*, 25:1-4pp.
- Liebl, W., Wagner, B. and Schellhase, J.,** 1998, Properties of an alpha-galactosidase, and structure of its gene galA, within an alpha- and betagalactoside utilization gene cluster of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *Systematic and Applied Microbiology*, 21:1-11pp.
- Liljestrom-Suominen, P. L., Joutsjoki, V. and Korhola, M.,** 1988, Construction of a stable  $\alpha$ -galactosidase producing baker's yeast strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 54:245-9pp.
- Liu, C., Ruan, H., Shen, H., Chen, Q., Zhou, B., Li, Y. and He, G.,** 2007, Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from *Aspergillus foetidus* ZU-G1 using response surface methodology, *Journal of Food Science*, 72:121-5pp.
- Liu, C-Q., Chen, Q-H., Tang, B., Ruan, H. and He, G-Q.,** 2007, Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of alpha-galactosidase in solid-state fermentation, *Letters in Applied Microbiology*, 45:206-12pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Liu, Q. P., Yuan, H., Bennett, E. P., Levery, S. B., Nudelman, E., Spence, J., Pietz, G., Saunders, K., White, T., Olsson, M. L., Henrissat, B., Sulzenbacher, G. and Clausen, H.,** 2008, Identification of a GH110 Subfamily of  $\alpha$ -1,3-galactosidases novel enzymes for removal of the  $\alpha$ 3Gal xenotransplantation antigen, *Journal of Biological Chemistry*, 283:8545–8554pp.
- Liu, Y., Guo, C. and Liu, C. Z.,** 2015, Enhancing the resolution of (R,S)-2-octanol catalyzed by magnetic cross-linked lipase aggregates using an alternating magnetic field, *Chemical Engineering Journal*, 280:36-40pp.
- Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M.,** 2005, Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase, *Biomacromolecules*, 6:1839-1842pp.
- Lopez-Serrano, P., Cao, L., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.,** 2002, Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases, *Biotechnology Letters*, 24:1379-1383pp.
- Luonteri, E., Alatalo, E., Siika-Aho, M., Penttila, M. and Tenkanen, M.,** 1998,  $\alpha$ -Galactosidases of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGLI, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28:179-88pp.
- Mahmod, S. S., Yusof, F., Jami, M. S. and Khanahmadi, S.,** 2015, Development of an immobilized biocatalyst with lipase and protease activities as a multipurpose cross-linked enzyme aggregate (multi-CLEA), *Process Biochemistry*, 50:2144–2157pp.
- Mahmod, S. S., Yusof, F., Jami M. S. and Khanahmadi, S.,** 2016, Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease, *Bioresources and Bioprocessing*, 3:3-14pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Majumder, A. B., Mondal, K., Singh, T. P. and Gupta M. N.,** 2008, Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts, *Biocatalysis and Biotransformation*, 26:235-242pp.
- Malgas, S., van Dyk, S. J. and Pletschke, B. I.,** 2015,  $\beta$ -Mannanase (Man26A) and  $\alpha$ -galactosidase (Aga27A) synergism - A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates, *Enzyme and Microbial Technology*, 70:1-8pp.
- Manzanares, P., de Graaff, L. H. and Visser, J.,** 1998, Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity, *Enzyme and Microbial Technology*, 22:383-90pp.
- Margolin, A. L.,** 1996, Novel crystalline catalysts, *Trends in Biotechnology*, 14(7):223-203pp.
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Luonteri, E. and Penttila, M.,** 1996, Three  $\alpha$ -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast, *European Journal of Biochemistry*, 240:104-11pp.
- Martinez, Y. N., Cavello, I., Cavalitto, S., Illanes, A. and Castro, G. R.,** 2014, Studies on PVA pectin cryogels containing crosslinked enzyme aggregates of keratinase, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117:284-289pp.
- Maruta, A., Yamane, M., Matsubara, M., Suzuki, S., Nakazawa, M., Ueda, M. and Sakamoto, T.,** 2017, A novel  $\alpha$ -galactosidase from *Fusarium oxysporum* and its application in determining the structure of the gum arabic side chain, *Enzyme and Microbial Technology*, 103:25-33pp.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I. and Lee, Y. C.,** 2005, Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format, *Analytical Biochemistry*, 339:69-72pp.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., Van Rantwijk, F., Stolz, A. and Sheldon, R. A.,** 2006, Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity, *Tetrahedron-Asymmetry*, 17:320-323pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2007, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1451-1463pp.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Van Langen, L. M., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.,** 2004, A New, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates, *Biotechnology and Bioengineering*, 86:273-276pp.
- Matijosyte, I., Arends, I. W. C. E., de Vries, S. and Sheldon, R. A.,** 2010, Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62:142–148pp.
- Matsumoto, M. and Ohashi, K.,** 2003, Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugose*, *Biochemical Engineering Journal*, 14:75-77pp.
- Mazurenko, I., Ghach, W., Kohring, G.-W., Despas, C., Walcarius, A. and Etienne, M.,** 2015, Immobilization of membrane-bounded (S)-mandelate dehydrogenase in sol–gel matrix for electroenzymatic synthesis, *Bioelectrochemistry*, 104:65-70pp.
- McLaughlin, J. E. and Boyer, J. S.,** 2004, Glucose localization in maize ovaries when kernel number decreases at low water potential and sucrose is fed to the stems, *Annals of Botany*, 94: 75-86pp.
- Melton, M. H.,** “Effects of immobilization on enzyme stability and use”, <http://slideplayer.com/slide/7708111/> (Erişim tarihi: 13 Aralık 2017)
- Mi, S., Meng, K., Wang, Y., Bai, Y., Yuan, T., Luo, H. and Yao, B.,** 2007, Molecular cloning and characterization of a novel  $\alpha$ -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*, *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1373–80pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Migneault, I., Dartignuenave, C., Bertarand, M. J. and Waldron, K. C.,** 2004, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques*, 37(5):790-6pp.
- Miletić, N. and Loos, K.,** 2009, Over-Stabilization of chemically modified and cross-linked *Candida antarctica* Lipase B Using Various Epoxides and Diepoxides, *Australian Journal of Chemistry*, 62:799-805pp.
- Miller, G. L.,** 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31:426–428pp.
- Mitsutomi, M., Uchida, Y. and Ohtakara, A.,** 1985, Immobilization of thermostabile  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme, *Journal of Fermentation Technology*, 63(4):325-329pp.
- Miyazaki, M. and Maeda, H.,** 2006, Microchannel enzyme reactors and their applications for processing, *Trends in Biotechnology*, 24:463-470pp.
- Montes, T., Grazu, V., Manso, I., Galan, B., Lopez-Gallego, F., Gonzalez, R., Hermoso, J. A., Garcia, J. L., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2007, Improved stabilization of genetically modified penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents by co-immobilization of the enzyme with polyethyleneimine, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349:459-464pp.
- Montoro-Garcia, S., Gil-Ortiz, F., Navarro-Fernandez, J., Rubio, V., Garcia-Carmona, F. and Sanchez-Ferrer, A.,** 2010, Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl  $\beta$ -lactam antibiotics intermediates, *Bioresource Technology*, 101:331-336pp.
- Moon I. K., Kim J., Lee J., Jia H., Hyon B. N., Jong K. Y., Ja H. K., Dohnalkova A., Grate J. W., Wang P., Grate, J. W., Wang, P., Hyeon, T., Park, H. G. and Chang, H. N.,** 2007, Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization, *Biotechnology and Bioengineering*, 96:210-218pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Moreira, L. R. S. and Filho, E. X. F.,** 2008, An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79:165-78pp.
- Morel, C. F. and Clarke, J. T.,** 2009, The use of agalsidase alfa enzyme replacement therapy in the treatment of Fabry disease, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(5):631-9pp.
- Mulimani, V. H. and Dhananjay, K.,** 2007, Immobilized alpha-Galactosidase in the Biochemistry Laboratory, *Journal of Chemical Education*, 84(12):1974-1975pp.
- Mulimani, V. H. and Ramlingam,** 1995, Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose in soymilk by  $\alpha$ -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 36:897-905pp.
- Muschiol, J., Peters, C., Oberleitner, N., Mihovilovic, M. D., Bornscheuer, U. T. and Rudroff, F.,** 2015, Cascade catalysis-strategies and challenges en route to preparative synthetic biology, *Chemical Communications*, 51:5798-5811pp.
- Nadar, S. S. and Rathod, V. K.,** 2016, Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase, *Enzyme and Microbial Technology*, 83:78-87pp.
- Nadar, S. S., Muley, A. B., Ladole, M. R. and Joshi, P. U.,** 2016, Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of  $\alpha$ -amylase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84:69-78pp.
- Nadkarni, M. A., Nair, C. K. K., Pandey, V. N. and Pradhan, D. S.,** 1992, Characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Corynebacterium murisepticum* and mechanism of its induction, *Journal of General and Applied Microbiology*, 38:23-34pp.
- Naessens, M. and Vandamme, E. J.,** 2003, Multiple forms of microbial enzymes, *Biotechnology Letters*, 25:1119-24pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Naganagouda, K., Prashanth, S. J., Shankar, S. K., Dhananjay, S. K. and Mulimani, V. H.,** 2007, Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase in gelatin and its application in removal of flatulence-inducing sugars in soymilk, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1131–1137pp.
- Nakai, H., Baumann, M. J., Petersen, B. O., Westphal, Y., Hachem, M. A., Dilokpimol, A., Duus, J. Q., Schols, H. A. and Svensson, B.,** 2010, *Aspergillus nidulans*  $\alpha$ -galactosidase of glycoside hydrolase family 36 catalyses the formation of  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides by transglycosylation, *FEBS Journal*, 277(17):3538-51pp.
- Narita, S., Naganishi, H., Yokouchi, A. and Kagaya, I.,** 1976, Method for manufacture of  $\alpha$ -galactosidase by microorganism, US Patent 3,957,578pp.
- Naumoff, D. G.,** 2004, Phylogenetic analysis of  $\alpha$ -galactosidases of the GH27 family, *Molecular Biology*, 38:388-99pp.
- Nguyen, L. T. and Yang, K. L.,** 2017, Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, 100:52-59pp.
- Oh, J. K., Lee, J. Y., Park, H. K. and Kho, H. S.,** 2008,  $\alpha$ -Galactosidase activity in human saliva, *Archives of Oral Biology*, 53:842–848pp.
- Ohtakara, A. and Mitsutomi, M.** 1987, Immobilization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus* on chitosan beads and its application to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses, *Journal of Fermentation Technology*, 65:493-8pp.
- Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y.,** 1984, Purification and enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48:1319-1327pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Olsson, M. L. and Clausen, H.**, 2008, Modifying the red cell surface: towards an ABO-universal blood supply, *British Journal of Haematology*, 140:3–12pp.
- Olsson, M. L., Hill, C. A., de la Vega, H., Liu, Q. P., Stroud, M. R., Valdinocci, J., Moon, S., Clausen, H. and Kruskall, M. S.**, 2004, Universal red blood cells - enzymatic conversion of blood group A and B antigens, *Transfusion Clinique et Biologique*, 11:33–39pp.
- Önal, Tatar, S.**, 2000, Karpuz (*Citrullus vulgaris*)  $\alpha$ -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190s.
- O'Neill, S. P., Dunnill, P. and Lilly, M. D.**, 1971, A comparative study of immobilized amyloglucosidase in a packed bed reactor and a continuous feed stirred tank reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 13:337-352pp.
- Palomo, J. M.**, 2009, Modulation of enzymes selectivity via immobilization, *Current Organic Synthesis*, 6:1-14pp.
- Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M.**, 2002, Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters, *Enzyme and Microbial Technology*, 31:775-783pp.
- Pan, B., Li, D., Piao, X., Zhang, L. and L., Guo**, 2002, Effect of dietary supplementation with  $\alpha$ -galactosidase preparation and stachyose on growth performance, nutrient digestibility and intestinal bacterial populations of piglets, *Archives of Animal Nutrition*, 56:327–337pp.
- Pan, J., Dang, N., Zheng, G., Cheng, B., Ye, Q. and Xu, J.**, 2014, Efficient production of *l*-menthol in a two-phase system with SDS using an immobilized *Bacillus subtilis* esterase, *Bioresources and Bioprocessing*, 1:12p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Pan, J., Kong, X. D., Li, C. X., Ye, Q., Xu, J. H. and Imanaka, T.,** 2011, Crosslinking of enzyme coaggregate with polyethyleneimine: A simple and promising method for preparing stable biocatalyst of *Serratia marcescens* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68:256-261pp.
- Panwar, D., Kaira, G. S. and Kapoor, M.,** 2017, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) and magnetic nanocomposite grafted CLEAs of GH26 endo- $\alpha$ -1,4-mannanase: Improved activity, stability and reusability, *International Journal of Biological Macromolecules*, 105:1289-1299pp.
- Park, J. M., Kim, M., Lee, H. J., Jang, A., Min, J. and Kim, Y.,** 2012, Enhancing the production of *Rhodobacter sphaeroides*-derived physiologically active substances using carbonic anhydrase immobilized electrospun nanofibers, *Biomacromolecules*, 13:3780–3786pp.
- Park, J. M., Kim, M., Park, H. S., Jang, A., Min, J. and Kim, Y. H.,** 2013, Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 54:37-43pp.
- Park, J. M., Kim, M., Park, J. Y., Lee, D. H., Lee, K. H. and Min, J.,** 2010, Immobilization of the cross-linked para-nitrobenzyl esterase of *Bacillus subtilis* aggregates onto magnetic beads, *Process Biochemistry*, 45:259–263pp.
- Pastores, G. M., Arn, P., Beck, M., Clarke, J. T., Guffon, N., Kaplan, P., Muenzer, J., Norato, D. Y., Shapiro, E., Thomas, J., Viskochil, D. and Wraith J. E.,** 2007, The MPS I registry: Design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I, *Molecular Genetics and Metabolism*, 91:37–47pp.
- Patil, A. G. G.,** 2010,  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus megaterium* VHM1 and its application in removal of flatulence-causing factors from soymilk, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:1546–1554pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Patil, A. G. G., Kote, N. V. and Mulimani V.,** 2009, Enzymatic removal of flatulence-inducing sugars in chickpea milk using free and polyvinyl alcohol immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 36:29–33pp.
- Pchelintsev, N. A., Youshko, M. I. and Švedas, V. K.,** 2009, Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 56:202-207pp.
- Peirce, S., Russo, M. E., Isticato, R., Lafuente, R. F., Salatino, P. and Marzocchella, A.,** 2017, Structure and activity of magnetic cross-linked enzyme aggregates of bovine carbonic anhydrase as promoters of enzymatic CO<sub>2</sub> capture, Biochemical Engineering Journal, 127:188-195pp.
- Pessela, B. C., Fernández-Lafuente, R., Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Filho, M., Vian, A., García, J. L., Guisán, J. M. and Carrascosa, A. V.,** 2007, Production of a thermoresistant alpha-galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 for food processing, Food Biotechnology, 21:91–103pp.
- Pessela, B. C., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A. V., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M.,** 2008, Stabilization of the quaternary structure of a hexameric alpha-galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques, Process Biochemistry, 43:193–198pp.
- Petek, F. and Dong, T.,** 1961, Separation and study of 2 alpha-galactosidases from coffee beans, Enzymologia, 23:133-42pp.
- Post, D. A. and Luebke V. E.,** 2005, Purification, cloning and properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Saccharopolyspora erythraea* and its use as a reporter system, Applied Microbiology and Biotechnology, 67:91-6pp.
- Prashanth, S. J. and Mulimani, V. H.,** 2005, Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* alpha-galactosidase immobilized in calcium alginate, Process Biochemistry, 40:1199–1205pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Puchart, V., Vrsanska, M., Bhat, M. K. and Biely, P.,** 2000, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1524:27-37pp.
- Puchart, V., Vrsanska, M., Svoboda, P., Pohl, J., Ögel, Z. B. and Biely, P.,** 2004, Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* IMI 358708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674:239–250pp.
- Pugalenthi, M., Siddhuraju, P. and Vadivel, V.,** 2006, Effect of soaking followed by cooking and the addition of  $\alpha$ -galactosidase on oligosaccharides levels in different *Canavalia* accessions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:512–17pp.
- Quioco, F. A. and Richards, F. M.,** 1964, Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52:833-839pp.
- Quioco, F. A. and Richards, F. M.,** 1966, The enzymic behavior of carboxypeptidase-A in the solid state, *Biochemistry (Mosc)*, 5:4062-4076pp.
- Ramalingam, Panda, R. P., Nachimuthu, S. and Sadasivam, S.,** 2010, Degradation of flatulence-causing oligosaccharides in soymilk by  $\alpha$ -galactosidase—A novel thermotolerant from *Penicillium purpurogenum*, *Indian Journal of Biotechnology*, 9:160-165pp.
- Rattö, M., Siika-aho, M., Buchert, J., Valkeajavi, A. and Viikari, L.,** 1993, Enzymatic hydrolysis of isolated and fibre-bound galactoglucomannans from pinewood and pine kraft pulp, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40:449-454pp.
- Raviyan, P., Tang, J. and Rasco, B. A.,** 2003, Thermal stability of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:5462-5466pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Razavi, B. S., Blagodatskaya, E. and Kuzyakov, Y.,** 2015, Nonlinear temperature sensitivity of enzyme kinetics explains canceling effect—a case study on loamy haplic Luvisol, *Frontiers in Microbiology*, 6:1126p.
- Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., Molinaro, A. and Ansar, A.,** 2013, Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support, *Food Chemistry*, 139:1081–1086pp.
- Rehman, S., Bhatti, H. N., Bilal, M. and Asgher, M.,** 2016, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Penicillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics, *International Journal of Biological Macromolecules*, 91:1161-1169pp.
- Reis, A. P., Guimarães, V. M., Ferreira, J. G., de Queiroz, J. H., Oliveira, M. G. A., Falkoski, D. L., de Almeida, M. N. and de Rezende, S. T.,** 2010, Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soy molasses by  $\alpha$ -galactosidases and invertase from *Aspergillus terreus*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(3):719-729pp.
- Reynolds, J. H.,** 1974, An immobilized  $\alpha$ -galactosidase continuous flow reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 16:135-147pp.
- Rezessy-Szabo, J. M., Nguyen, Q. D., Hoschke, A., Braet, C., Hajos, G. and Claeysens, M.,** 2007, A novel thermostable  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: purification and characterization, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770:55-62pp.
- Ribeiro, M. H. L. and Rabaça, M.,** 2011, Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: novel biocatalysts for naringin hydrolysis, *Enzyme Research*, 2011:8p.
- Ribeiro, R. R. and Vitolo, M.,** 2005, Anion exchange resin as support for invertase immobilization, *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 26:175-179pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Rietra, P. J. G. M., Molenaar, J. L., Hamers, M. N., Tager, J. M. and Borst, P.,** 1974, Investigation of the  $\alpha$ -galactosidase deficiency in Fabry's disease using antibodies against the purified enzyme, *European Journal of Biochemistry*, 46:89-98pp.
- Rigden, D. J.,** 2002, Iterative database searches demonstrate that glycoside hydrolase families 27, 31, 36 and 66 share a common evolutionary origin with family 13, *FEBS Letters*, 523:17-22pp.
- Rivero-Urgell, M. and Santamaria-Orleans, A.,** 2001, Oligosaccharides: application in infant food, *Early Human Development*, 65:43-52pp.
- Roberge, D. M., Zimmermann, B., Rainone, F., Gottsponer, M., Eyholzer, M. and Kockmann, N.,** 2008, Microreactor Technology and Continuous Processes in the Fine Chemical and Pharmaceutical Industry: Is the Revolution Underway?, *Organic Process Research and Development*, 12(5):905–910pp.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2013, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chemical Society Reviews*, 42:6290-6307pp.
- Roy, I., Mukherjee, J. and Gupta, M. N.,** 2017, Cross-linked enzyme aggregates for applications in aqueous and nonaqueous media, *Methods in Molecular Biology*, 1504:109-123pp.
- Roy, J. J. and Abraham, T. E.,** 2006, Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38:31-36pp.
- Sangeetha, K. and Emilia Abraham, T.,** 2008, Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Subtilisin for controlled release applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43:314–319pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Santos, A. M. P., Oliveira, M. G. and Maugeri, F.,** 2007, Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design, *Bioresource Technology*, 98:3142–3148pp.
- Savelev, A. N., Eneyskaya, E. V., Isaeva-Ivanova, L. S., Shabalin, K. A., Golubev, A. M. and Neustroev, K. N.,** 1996, Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei*, *Carbohydrate Research*, 296:261-73pp.
- Scalabrini, P., Rossi, M., Spettoli, P. and Matteuzzi, D.,** 1998, Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 39:213–19pp.
- Schiffmann, R., Kopp, J. B., Austin, H. A. III., Sabnis, S., Moore, D. F. and Weibel, T.,** 2001, Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial, *Journal of the American Medical Association*, 285:2743-9pp.
- Schoevaart, R. T. and Kieboom, T.,** 2002, Galactose dialdehyde as potential protein cross-linker: proof of principle, *Carbohydrate Research*, 337(10):899-904pp.
- Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L. A. M. and Sheldon, R. A.,** 2004, Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *Biotechnology and Bioengineering*, 87:754-762pp.
- Schuler, R.,** 1985, Kinetic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 7:207-11pp.
- Scigelova, M. and Crout, D. H. G.,** 2000, Purification of alpha-galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 8:175-81pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Scigelova, M. and Crout, D. H. G.,** 2000, Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 8:175-181pp.
- Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H. and Önal, S.,** 2011, Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, *Separation and Purification Technology*, 83:130-136pp.
- Shabalin, K. A., Kulminskaya, A. A., Savelev, A. N., Shishlyannikov, S. M. and Neustroev, K. N.,** 2002, Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides, *Enzyme and Microbial Technology*, 30:231-9pp.
- Shah, S., Sharma, A. and Gupta, M. N.,** 2006, Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Analytical Biochemistry*, 351:207-213pp.
- Shankar, S. K. and Mulimani, V. H.,** 2007,  $\alpha$ -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, *Bioresource Technology*, 98:958-61pp.
- Shankar, S. K., Girigouda, K. and Mulimani, V. H.,** 2006, Production of  $\alpha$ -galactosidase by *Aspergillus oryzae* using solid state fermentation, *Indian Journal of Microbiology*, 46:165-7pp.
- Sheldon, R. A.,** 2007, Cross-linked enzyme aggregates (CLEARs): Stable and recyclable biocatalysts, *Biochemical Society Transactions*, 35:1583-1587pp.
- Sheldon, R. A.,** 2011, Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts, *Organic Process Research and Development*, 15:213–223pp.
- Sheldon, R. A.,** 2012, Industrial applications of asymmetric synthesis using cross-linked enzyme aggregates, *Comprehensive Chirality*, 9:353-366pp.
- Sheldon, R. A. and Van Pelt, S.,** 2013, Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how, *Chemical Society Reviews*, 42:6223-6235pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Sheldon, R. A. and van Rantwijk, F.**, 2004, Biocatalysis for Sustainable Organic Synthesis, *Australian Journal of Chemistry*, 57(4):281-289pp.
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R. and Langen, L. M.**, 2005, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization, *Biocatal Biotransform*, 23:141–147pp.
- Sheldon, R. A., van Pelt, S., Kanbak-Aksu, S., Rasmussen, J. A. and Janssen, M. H. A.**, 2013, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in organic synthesis, *Aldrichimica Acta*, 46:81-93pp.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Park, G. G., Komatsu, Y., Sato T., Kaneko, R., Nagasaki, H., Yoshida, S., Kasamo, K. and Kusakabe, I.**, 1995, Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59:2333-5pp.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Sato, T., Kim, W. S., Yoshida, S., Kaneko, S., Kasamo, K. and Kusakabe, I.**, 1997, Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61:592-8pp.
- Simerska, P., Kuzma, M., Monti, D., Riva, S., Mackova, M. and Kren, V.**, 2006, Unique transglycosylation potential of extracellular  $\alpha$ -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39:128-34pp.
- Simerska, P., Monti, D., Cechova, I., Pelantova, H., Mackova, M., Bezouska, K., Riva, S. and Kren, V.**, 2007, Induction and characterization of an unusual  $\alpha$ -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*, *Journal of Biotechnology*, 128:61-71pp.
- Singh, N. and Kayastha, A. M.**, 2012a, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from white chickpea (*Cicer arietinum*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:3253–3259pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Singh, N. and Kayastha, A. M.,** 2012b, Cicer  $\alpha$ -galactosidase immobilization onto chitosan and Amberlite MB-150: Optimization, characterization, and its applications, *Carbohydrate Research*, 358:61–66pp.
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R. and Lee, J. K.,** 2013, From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes, *International Journal of Molecular Sciences*, 14:1232-1277pp.
- Sinirlioglu, Z. A., Sinirlioglu, D. and Akbas, F.,** 2013, Preparation and characterization of stable cross-linked enzyme aggregates of novel laccase enzyme from *Shewanella putrefaciens* and using malachite green decolorization, *Bioresource Technology*, 146:807–811pp.
- Skoronski, E., Fernandes, M., Magalhães, M. L. B., da Silva, G. F., João, J. J., Soares, C. H. L. and Júnior, A. F.,** 2014, Substrate specificity and enzyme recycling using chitosan immobilized laccase, *Molecules*, 19:16794-16809pp.
- Skovgaard, J., Bak, C. A., Snabe, T., Sutherland, D. S., Laursen, B. S., Kragh, K. M., Besenbacher, F., Poulsen, C. H. and Shipovskov, S.,** 2010, Implementation of cross-linked enzyme aggregates of proteases for marine paint applications, *Journal of Materials Chemistry*, 20:7626-7629pp.
- Soh, C.P., Ali, M. and Lazan, H.,** 2006, Characterisation of an  $\alpha$ -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes, *Phytochemistry*, 67:242-254pp.
- Song, D. and Chang, S. K. C.,** 2006, Enzymatic degradation of oligosaccharides in pinto bean flour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:1296–1301pp.
- Sonia, K. G., Chadha, B. S. and Saini, H. S.,** 2005, Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation, *Bioresource Technology*, 96:1561-9pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Sorgedraeger, M. J., Verdoes, D., van der Meer, H. and Sheldon, R. A., 2008,** Cross-linked enzyme aggregates in a membrane slurry reactor-Continuous production of 6-APA by enzymatic hydrolysis of penicillin, *Chimica Oggi-Chemistry Today (Focus on Biocatalysis)*, 26:23–25pp.
- Spangenberg, P., Adre, C., Dion, M., Rabiller, C. and Mattes, R., 2000,** Comparative study of new  $\alpha$ -galactosidases in transglycosylation reactions, *Carbohydrate Research*, 329:65-73pp.
- Srinivas, M. R. S., Padmanabhan, S. and Lonsane, B. K., 1993,** Growth kinetics,  $\alpha$ -galactosidase biosynthesis, and concomitant invertase production by *Aspergillus niger* NCIM 839 in a solid-state fermentation system, *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 15:41-6pp.
- Sripuan, T., Aoki, K., Yamamoto, K., Tongkao, D. and Kumagai, H., 2003,** Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Ganoderma lucidum*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67:1485-91pp.
- St. Clair, N. L. and Navia, M. A., 1992,** Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *Journal of the American Chemical Society*, 114:7314-7316pp.
- Stressler, T., Ewert, J., Eisele, T. and Fischer, L., 2015,** Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of PepX and PepN – production, partial characterization and application of combi-CLEAs for milk protein hydrolysis, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:752–760pp.
- Sulek, F., Fernández, D. P., Knez, Z., Habulina, M. and Sheldon, R. A., 2011,** Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs), *Process Biochemistry*, 46:765–769pp.
- Sumarna, 2008,** Changes of raffinose and stachyose in soy milk fermentation by lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian, *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2):26-34pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Summers, V.**, “The processing and chemistry of sugarcane”, <https://www.decodedscience.org/processing-chemistry-sugarcane/43324> (Erişim tarihi: 13 Aralık 2017)
- Sumner-Smith, M., Bozzato, R. P., Skipper, N., Davies, R. W. and Hopper, J. E.**, 1985, Analysis of the inducible MEL1 gene of *Saccharomyces carlsbergensis* and its secreted product, alpha galactosidase (melibiase), *Gene*, 36:333-40pp.
- Suzuki, H., Kobayashi, H., Ozawa, Y., Kamibayashi, A.**, 1974, Method for manufacture of  $\alpha$ -galactosidase by microorganisms, US Patent 3.795.585.
- Suzuki, H., Li, S. C. and Li, Y. T.**, 1970,  $\alpha$ -Galactosidase from *Mortierella vinacea*: crystallization and properties, *Journal of Biological Chemistry*, 245:781-6pp.
- Suzuki, H., Ozawa, Y. and Tanabe, O.**, 1972, Method of reducing raffinose content of beet molasses, US Patent 3,647,625.
- Suzuki, H., Ozawa, Y., Oota, H. and Yoshida, H.**, 1969, Studies on the decomposition of raffinose by  $\alpha$ -galactosidase of mold. Part-I  $\alpha$ -galactosidase formation and hydrolysis of raffinose by the enzyme preparation, *Agricultural and Biological Chemistry*, 33:506pp.
- Svastits-Dücsö, L., Nguyen, Q. D., Lefler, D. D. and Rezessy-Szabo, J. M.**, 2009, Effects of galactomannan as carbon source on production of  $\alpha$ -galactosidase by *Thermomyces lanuginosus*: fermentation, purification and partial characterization, *Enzyme and Microbial Technology*, 45:367-71pp.
- Taboada-Puig, R., Junghanns, C., Demarche, P., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M. and Agathos, S. N.**, 2011, Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors, *Bioresource Technology*, 102:6593–6599pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Talbot, G. and Sygusch, J.,** 1990, Purification and characterization of thermostable b-mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, Applied and Environmental Microbiology, 56:3505-10pp.
- Talekar, S., Ghodake, V., Ghotage, T., Rathod, P., Deshmukh, P., Nadar, S., Mulla, M. and Ladole, M.,** 2012, Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase, Bioresource Technology, 123:542-547pp.
- Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R. and Kambale, S.,** 2013, Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs), RSC Advances, 3:12485-12511pp.
- Talekar, S., Nadar, S., Joshi, A. and Joshi, G.,** 2014, Pectin cross-linked enzyme aggregates (pectin-CLEAs) of glucoamylase, RSC Advances, 4:59444-59453pp.
- Tandjaoui, N., Tassist, A., Abouseoud, M., Couvert, A. and Amrane, A.,** 2015, Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of Brassica rapa peroxidase, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4:208-213pp.
- Theil, F.,** 2000, Enhancement of selectivity and reactivity of lipases by additives, Tetrahedron, 56:2905-2919pp.
- Thippeswamy, S. and Mulimani, V. H.,** 2002, Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*, Process Biochemistry, 38:635- 640pp.
- Thomas, D., Bourdillon, C., Broun, G. and Kernevez, J. P.,** 1974, Kinetic behavior of enzymes in artificial membranes: Inhibition and reversibility effects, Biochemistry (Mosc), 13:2995-3000pp.
- Thomsen, M. S., Polt, P. and Nidetzky, B.,** 2007, Development of a microfluidic immobilised enzyme reactor, Chemical Communications, 1(2):2527-2529pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Tischer, W. and Kasche, V.,** 1999, Immobilized enzymes: Crystals or carriers?, Trends in Biotechnology, 17:326-335pp.
- Tischer, W. and Wedekind, F.,** 1999, Immobilized Enzymes: Methods and Applications, Biocatalysis - From Discovery to Application, 200:95-126pp.
- Torabizadeh, H., Tavakolib, M. and Safari, M.,** 2014, Immobilization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 108:13–20pp.
- Toral, A. R., de los Rios, A. P., Hernandez, F. J., Janssen, M. H. A., Schoevaart, R., van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.,** 2007, Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, Enzyme and Microbial Technology, 40:1095-1099pp.
- Torres, M. P. G., Foresti, M. L. and Ferreira, M. L.,** 2013, Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*, Biochemical Engineering Journal, 72:18– 23pp.
- Tudorache, M., Nae, A., Coman, S. and Parvulescu, V. I.,** 2013, Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate, RSC Advances, 3:4052-4058pp.
- Tükel, S. S., Hürrem, F., Yildirim, D. and Alptekin, Ö.,** 2013, Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEA) of catalase and its characterization Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 97:252–257pp.
- Turakainen, H., Aho, S. and Korhola, M.,** 1993, MEL gene polymorphism in the genus *Saccharomyces*, Applied and Environmental Microbiology, 2622-30pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Tutar, H., Yilmaz, E., Pehlivan, E. and Yilmaz, M.,** 2009, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*, International Journal of Biological Macromolecules, 45:315–320pp.
- Tzortzis, G., Jay, A. J., Baillon, M. L. A., Gibson, G. R. and Rastall, R. A.,** 2003, Synthesis of  $\alpha$ -galactooligosaccharides with  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri* of canine origin, Applied Microbiology and Biotechnology, 63(3):286–292pp.
- Üçeyler, N., Biko, L., Hose, D., Hofmann, L. and Sommer, C.,** 2016, Comprehensive and differential long-term characterization of the alpha-galactosidase A deficient mouse model of Fabry disease focusing on the sensory system and pain development, Molecular Pain, 12:1–10pp.
- Ulezlo, I. V. and Zaprometova, O. M.,** 1982, Microbial alpha-galactosidase (a review): *Prikladnaia biokhimiia*, Mikrobiologiya, 18:3-15pp.
- Utsumi, K., Mitsuhashi, F., Asahi, K., Sakurazawa, M., Arii, K., Komaba, Y., Katsumata, T., Katsura, K., Kase, R. and Katayama, Y.,** 2005, Enzyme replacement therapy for Fabry disease: Morphologic and histochemical changes in the urinary sediments, Clinica Chimica Acta, 360:103-07pp.
- Vafiadi, C., Topakas, E. and Christakopoulos, P.,** 2008, Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 54:35–41pp.
- Vaidya, B. K., Kuwar, S. S., Golegaonkar, S. B. and Nene, S. N.,** 2012, Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74:184-191pp.
- Valdes, E. C., Soto, L. W. and Arcaya, G. A.,** 2011, Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Burkholderia cepacia*, Electronic Journal of Biotechnology, 14(3):1-7pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- van Laere, K. M., Hartemink, R., Beldman, G., Pitson, S., Dijkema, C., Schols, H. A. and Voragen, A. G.,** 1999, Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 alpha-galactosidase, Applied Microbiology and Biotechnology, 52(5):68-8pp.
- van Pelt, S., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.,** 2009, Synthesis of aliphatic (S)- $\alpha$ -hydroxycarboxylic amides using a one-pot bienzymatic cascade of immobilised oxynitrilase and nitrile hydratase, Advanced Synthesis and Catalysis, 351:397-404pp.
- van Rantwijk, F. and Stolz, A.,** 2015, Enzymatic cascade synthesis of (S)-2-hydroxycarboxylic amides and acids: Cascade reactions employing a hydroxynitrile lyase, nitrile-converting enzymes and an amidase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 114:25-30pp.
- van Rantwijk, F., van Oosterom, M. W. and Sheldon, R. A.,** 1999, Glycosidase-catalyzed synthesis of alkyl glycosides, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 6:511-32pp.
- Varbanets, D. L., Malanchuk, V. M., Buglova, T. T. and Kuhlmann, R. A.,** 2001, *Penicillium* sp. 23  $\alpha$ -galactosidase: purification and substrate specificity, Carbohydrate Polymers, 44:357-363pp.
- Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Mateos-Díaz, J. C. and Favela-Torres, E.,** 2015, Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement—a review, Biocatalysis, 1:166–177pp.
- Velasco-Lozano, S., Lopez-Gallego, F., Vazquez-Duhalt, R., Mateos-Diaz, J. C., Guisan, J. M. and Favela-Torres, E.,** 2014, Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking, Biomacromolecules, 15:1896-1903pp.
- Veldman, A., Veen, W. A. G., Barug, D. and van Paridon, P. A.,** 1993, Effect of  $\alpha$ -galactosides and  $\alpha$ -galactosidase in feed on ileal piglet digestive physiology, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 69:57–65pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Viana, P.A., de Rezende, S.T., Marques, V.M., Trevizano, L.M., Passos, F.M.L., Oliveira, M.G.A., Bemquerer, M.P., Oliveira, J.S. and Guimaraes, V.M.,** 2006, Extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:2385-2391pp.
- Viana, S.F., Guimaraes, V.M., Jose, I.C., Oliveira, M.G.A., Costa, N.M.B., de Barros, E.G., Moreira, M.A. and de Rezende, S.T.,** 2005, Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean  $\alpha$ -galactosidase, *Food Chemistry*, 93:665-670pp.
- Vinoth Kumar, V., Prem Kumar, M. P., Thiruvankadaravi, K. V., Baskaralingam, P., Senthil Kumar, P. and Sivanesan, S.,** 2012, Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes, *Bioresource Technology*, 119:28–34pp.
- Walt, D. R. and Agayn, V. L.,** 1994, The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13(10):425-430pp.
- Wang, A., Zhang, F., Chen, F., Wang, M., Li, H., Zeng, Z., Xie, T. and Chen, Z.,** 2011, A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates using p-benzoquinone as cross-linking agent, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28:1090-1095pp.
- Wang, C. L., Li, D. F., Lu, W. Q., Wang, Y. H. and Lai, C. H.,** 2004, Influence of cultivating conditions on the  $\alpha$ -galactosidase biosynthesis from a novel strain of *Penicillium* sp. in solid-state fermentation, *Letters in Applied Microbiology*, 39:369-75pp.
- Wang, C., Wang, H., Ma, R., Shi, P., Niu, C., Luo, H., Yang, P. and Yao, B.,** 2016, Biochemical characterization of a novel thermophilic  $\alpha$ -galactosidase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with significant transglycosylation activity, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121:7-12pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wang, H., Luo, H., Li, J., Bai, Y., Huang, H., Shi, P., Fan, Y. and Yao, B.,** 2010, An  $\alpha$ -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with  $\beta$ -mannanase, *Bioresource Technology*, 10:8376-82pp.
- Wang, H., Shi, P., Luo, H., Huang, H., Yang, P. and Yao, B.,** 2014, A thermophilic  $\alpha$ -galactosidase from *Neosartorya fischeri* P1 with high specific activity, broad substrate specificity and significant hydrolysis ability of soymilk, *Bioresource Technology*, 153:361–364pp.
- Wang, L., Zheng, Y., Ding, S., Zhang, Q., Chen, Y. and Zhang, J.,** 2017, Molecular cloning, structure, phylogeny and expression analysis of the invertase gene family in sugarcane, *Plant Biology*, 17:109p.
- Wang, M., Jia, C., Qi, W., Yu, Q., Peng, X., Su, R. and He, Z.,** 2011, Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules, *Bioresource Technology*, 102:3541-3545pp.
- Wang, M., Qi, W., Jia, C., Ren, Y., Su, R. and He, Z.,** 2011, Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: Technical development and molecular mechanism, *Journal of Biotechnology*, 156:30–38pp.
- Watier, H., Guillaumin, J.M., Piller, F., Lacord, M., Thibault, G., Lebranchu, Y., Monsigny, M. and Bardos, P.,** 1996, Removal of terminal alpha-galactosyl residues from xenogeneic porcine endothelial cells - Decrease in complement-mediated cytotoxicity but persistence of IgG1-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, *Transplantation*, 62(1):105–113pp.
- Weignerova, L., Hunkova, Z., Kuzma, M. and Kren, V.,** 2001, Enzymatic synthesis of three pNP-agalactobiopyranosides: application of the library of fungal  $\alpha$ -galactosidases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11:219-24pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Williams, S.**, “Transglycosylases”, <https://www.cazypedia.org/index.php/>

Transglycosylases (Erişim tarihi: 13 Aralık 2017)

**Wilson, L., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Illanes, A., Guisan, J. M. and Palomo, J. M.**, 2006, CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties, *Enzyme and Microbial Technology*, 39:750-755pp.

**Wilson, L., Illanes, A., Pessela, B. C. C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M.**, 2004, Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media, *Biotechnology and Bioengineering*, 86:558-562pp.

**Wilson, L., Illanes, A., Romero, O., Vergara, J. and Mateo, C.**, 2008, Carrierbound and carrier-free penicillin acylase biocatalysts for the thermodynamically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam compounds in organic medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 43:442-447pp.

**Wilson, L., Illanes, A., Soler, L. and Henriquez, M. J.**, 2009, Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase, *Process Biochemistry*, 44:322-326pp.

**Wine, Y., Cohen-Hadar, N., Freeman, A. and Frolow, F.**, 2007, Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis, *Biotechnology and Bioengineering*, 98:711-718pp.

**Wong, H., Hu, C., Yeh, H., Su, W., Lu, H. and Lin, C.**, 1986, Production, purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Monascus pilosus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 52:1147-52pp.

**Wong-Leung, Y. L., Fong, W. F. and Lam, W. L.**, 1993, Production of  $\alpha$ -galactosidase by *Monascus* grown on soybean and sugarcane wastes, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9:529-33pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Xiao, M., Tanaka, K., Qian, X. M., Yamamoto, K. and Kumagai, H.,** 2000, High-yield production and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium breve* grown on raffinose, *Biotechnology Letters*, 22: 747-51pp.
- Xu, D. Y. and Yang, Z.,** 2013, Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater, *Chemosphere*, 92:391–398pp.
- Xu, D. Y., Chen, J. Y. and Yang, Z.,** 2012, Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of *L*-DOPA, *Biochemical Engineering Journal*, 63:88–94pp.
- Xu, D. Y. Yang, Y. and Yang, Z.,** 2011, Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media, *Journal of Biotechnology*, 152:30–36pp.
- Yamaguchi, H., Miyazaki, M., Asanomi, Y. and Maeda, H.,** 2011, Poly-lysine supported cross-linked enzyme aggregates with efficient enzymatic activity and high operational stability, *Catalysis Science and Technology*, 1:1256-1261pp.
- Yamashita, A., Hashimoto, H., Fujita, K., Okada, M., Mori, S. and Kitahata, S.,** 2005, Reverse reaction of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -galactosidase in a supersaturated substrate solution: production of  $\alpha$ -linked galactooligosaccharide ( $\alpha$ -GOS), *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69:1381–8pp.
- Yan, E., Cao, H., Zhang, C., Lu, Q., Ye, Y., He, J., Huang, L. and Yin, D.,** 2015, Cross-linked protein crystals by glutaraldehyde and their applications, *RSC Advances*, 33:1-13pp.
- Yan, J., Gui, X., Wang, G. and Yan, Y.,** 2012, Improving stability and activity of cross-linked enzyme aggregates based on polyethylenimine in hydrolysis of fish oil for enrichment of polyunsaturated fatty acids, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166:925-932pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Yang, J., Xu, X., Yang, X., Ye, X. and Lin, J.,** 2016, Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena* laccase: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 65:1-7pp.
- Yang, X., Zheng, P., Ni, Y. and Sun, Z.,** 2012, Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L, Journal of Biotechnology, 161:27-33pp.
- Yu, C. Y., Li, X. F., Lou, W. Y. and Zong, M. H.,** 2013, Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: A highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides, Journal of Biotechnology, 166:12– 19pp.
- Yu, H. W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y. Y. and Ching C. B.,** 2006, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 43:124-127pp.
- Yusof, F., Khanahmadi, S., Amid, A. and Mahmud, S. S.,** 2016 Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate, SpringerPlus, 5:1-18pp.
- Zapater, I. G., Ullah, A. H. J. and Wodzinski, R. J.,** 1990, Extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus ficuum* NRRL3135 purification and characterization, Preparative Biochemistry, 20:263-296pp.
- Zaprometova, O. M., Ulezlo, I. V. and Lakhtin, V. M.,** 1990, Structure and properties of a *Cephalosporium acremonium*  $\alpha$ -galactosidase, Glycoconjugate Journal, 7:287-300pp.
- Zeilinger, S., Kristufek, D., Arisan-Atac, I., Hodits, R. and Kubicek, C. P.,** 1993, Conditions of formation, purification and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30, Applied and Environmental Microbiology, 59:1347-53pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Zhao, H.**, 2005, Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37:16–25pp.
- Zhao, L., Zheng, L., Gao, G., Jia, F. and Cao, S. J.**, 2008, Resolution of *N*-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of *Pseudomonas* sp. Lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54:7-12pp.
- Zheng, G. W., Yu, H. L., Li, C. X., Pan, J. and Xu, J. H.**, 2011, Immobilization of *Bacillus subtilis* esterase by simple cross-linking for enzymatic resolution of DL-menthyl acetate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70:138–143pp.
- Zheng, M., Lu, Y., Huang, F., Wang, L., Guo, P., Feng, Y. and Deng, Q.**, 2013, Lipase Immobilization on hyper-cross-linked polymer-coated silica for biocatalytic synthesis of phytosterol esters with controllable fatty acid composition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1):231–237pp.
- Zhou, Q. Z. K. and Chen, X. D.**, 2001, Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochemical Engineering Journal* 9:33–40pp.
- Zhou, Z., Piepenbreier, F., Marthala, V. R. R., Karbacher, K. and Hartmann, M.**, 2015, Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking, *Catalysis Today*, 243:173-183pp.
- Zhu A, Leng L, Monahan C, Zhang, Z., Hurst, R., Lenny, L. and Goldstein, J.**, 1996, Characterization of recombinant  $\alpha$ -galactosidase for use in seroconversion from blood group B to O of human erythrocytes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 327:324–9pp.
- Zhu, A., Leng, L., Monahan, C., Zhang, Z., Hurst, R., Lenny, L. and Goldstein, J.**, 1996, Characterization of recombinant  $\alpha$ -galactosidase for use in seroconversion from blood group B to O of human erythrocytes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 327:324-329pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R. A., Gerstein, M. and Snyder, M., 2001, Global analysis of protein activities using proteome chips, Science, 293(5537):2101-5pp.**



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad – Soyad** : Hasan BAYRAKTAR  
**Adres** : Yeni Mah. 142. Sok. Osmanlı Yapı Koop. B-Blok No:7  
 KIRIKKALE  
**Tel.** : +90 553 896 03 05  
**Mail** : hbayraktar@ymail.com

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2003-2008
Yüksek Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2008-2011
Doktora	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2011-2018

### Yüksek Lisans Tezi ve Danışmanı:

$\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Üçlü-Faz Ayırma Sistemi (TPP) ile Saflaştırılması.

Prof. Dr. Seçil ÖNAL

### Doktora Tezi ve Danışmanı:

Çapraz Bağlı İmmobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Agregatlarının Hazırlanması, Karakterizasyonu, Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidroliz Proseslerinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması.

Prof. Dr. Seçil ÖNAL

### Yayımlar:

#### A)Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1. Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2011, Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA, International Journal of Biological Macromolecules, 49:855-860pp.
2. Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H. and Önal, S., 2011, Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, Separation and Purification Technology, 83:130–136pp.

3. Bayraktar, H. and Önal, S., 2013, Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three-phase partitioning, *Separation and Purification Technology*, 118:835–841pp.
4. Çamurlu, D., Çavuş, S., Çalışkan Özdemir, S., Bayraktar, H., Uzel, A. and Önal, S., Three-phase partitioning of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus lentulus*: optimization of system and characterization of enzyme, *Process Biochemistry* (incelemede).

### **B)Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler:**

#### **Sözlü Sunumlar:**

1.  $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Saflaştırılması. Bayraktar, H., Önal, S., 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Bornova.
2.  $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Nural, C., Bayraktar, H., Önal, S., Kromatografi 2013 Kongresi, 19-22 Haziran 2013, Bursa.
3. Hint İnciri (*Opuntia Ficus Indica*)  $\alpha$ -Galaktozidazının Üçlü Faz Sistemi ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Hoca, B., Bayraktar, H., Önal, S., 7. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 13-15 Eylül 2013, Çeşme.

#### **Posterler:**

1. Immobilization and stabilization of alpha-galactosidase on aminated Sepabeads (Sepabeads EA and Sepabeads HA). Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., Bıçak Çelem, E., Önal, S., International Enzyme Engineering Symposium, 1-5 October 2008, Kuşadası.
2. Mısırdan  $\alpha$ -glukozidaz enziminin ekstraksiyonu, üçlü-faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu, Bilen, B., Bayraktar, H., Önal, S., 7. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 13-15 Eylül 2013, Çeşme.

3. Bazı termotolerant filamentöz fungus izolatlarının  $\alpha$ -galaktozidaz üretim kapasitelerinin belirlenmesi, Çamurlu, D., Bayraktar, H., Önal, S., 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Dedeman Otel, 18-19 Aralık 2015, Konya.
4. Purification of pineapple (*Ananas comosus*)  $\alpha$ -galactosidase by three-phase partitioning and its characterisation, Önal, S., Kutlugün, A., Konan, S., Bayraktar, H., 1st International Congress On Applied Biological Sciences, 16-20 September 2015, Makedonia.

**C) Panel, Konferans, Çalıştay, Kurs, Açıkoturum Faaliyetleri:**

- Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 7 Mart 2007, İzmir.
- Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 2 Mart 2008, İzmir.
- ISO 22000:2005 (Gıda Güvenliği Yönetimi Sistemi) Eğitimi, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 24 Mayıs 2008, İzmir.
- Kök Hücre Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 16 Mart 2009, İzmir.
- UHPLC-Kromatografiye Giriş, HPLC Kolonları ve İleri Uygulama Teknikleri; GCMS-Yeni Teknolojiler ve Uygulamaları Semineri, Katılımcı, Ege Üni. Fen Fak. Kimya Bölümü, 27 Nisan 2012, İzmir.
- Son Gelişmeler Işığında Teorik ve Uygulamalı HPLC Çalıştayı, Katılımcı, Akdeniz Üni. Fen Fak. Kimya Bölümü, 26-28 Nisan 2013, Antalya.
- Kişiselleştirilmiş Kanser Tedavisinde Hücre Kültürü, Proteomik & Genomik Uygulamalar Kursu, Proteomik Saflaştırma Grubu Eğitimci, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma ve Uygulama Merkezi (ARGEFAR), 1-4 Şubat 2016, İzmir.

## Projeler:

1. Domatesten izole edilen alfa-galaktozidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve Sepabead taşıyıcılarda immobilizasyonu (Lisans Bitirme Tezi) (2007-2008).
2. BAP 2010 FEN 006:  $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Üçlü-Faz Ayırma Sistemi (TPP) ile Saflaştırılması (Yüksek Lisans Tezi) (Eylül 2009 – Haziran 2011).
3. BAP 2013 FEN 022: Çapraz Bağlı İmmobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Agregatlarının Hazırlanması, Karakterizasyonu, Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidroliz Proseslerinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması (Doktora Tezi)(Nisan 2013 – 2018).
4. Akciğer Kanserinde Kullanılmak Üzere iv. Enjeksiyon ve/veya İnhaler Uygulamaya Yönelik Manyetik ve Ultrases Hedefli İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi ve *in vitro/ in vivo/ ex vivo* Araştırmaları (Tubitak 1003 Projesi, Temmuz 2014 – Ekim 2015)(Bursiyer)

## Metodik Uzmanlık

### 1. Protein Kimyası

#### a) Ekstraksiyon ve Pre-Ayırma Teknikleri

- Homojenizasyon, santrifüj, çöktürme ile deriştirme (amonyum sülfat çöktürmesi), filtrasyon, ultrafiltrasyon, diyaliz.

#### b) Ayırma ve Saflaştırma Teknikleri

- Kromatografik teknikler (adsorpsiyon, jel filtrasyonu, iyon değişim, afinite, HPLC)
- Elektroforetik teknikler (jel elektroforezi, ince tabaka elektroforezi)

#### c) Analitik Teknikler

- Spektrofotometri
- Renk ölçümü

#### d) Biyolojik Moleküllerin Yapı Analizi

- Nükleik asitler (DNA, PCR)
- Amino asitler (protein dizilimi, amino asit analizi, N- ve C-terminal belirleme)

## 2. Bio-Fiziko Kimya

- Arrhenius diyagramları ile denge sabitlerinin belirlenmesi
- Michaelis Menten sabitleri

## 3. Mikrobiyoloji

- Mikroskopisi tekniği ile mikroorganizmaların tanınması

### İş Tecrübeleri:

#### 2008 – 2011 Ege Üniversitesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı (Yüksek Lisans):

Bitkisel kaynaklı enzimlerin saflaştırma ve karakterizasyon proseslerinin gerçekleştirilmesi, spektrofotometrik olarak enzimatik analizlerinin yapılması.

#### 2011 – 2017 Ege Üniversitesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı (Doktora):

Enzimatik analizlerin spektrofotometrik olarak tayininin gerçekleştirilmesi, HPLC analizleri için uygun yöntem oluşturma ve analizlerin gerçekleştirilmesi, lisans ve lisansüstü öğrencilere çalışmalarında gözetmenlik yapılması.

### Stajlar :

#### Ankara Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi (18 Haziran-18 Temmuz 2007)

**İş Tanımı:** Enstrümental analiz, gıda ve muhtelif maddeler, toksikoloji, alkolmetri ve narkotik şube laboratuvarlarına gelen numunelerin çeşitli teknik (SPE, TLC) ve cihazlar (HPLC, LC-MS, CEDIA, HG/GS, CO-OXIMETER) yardımıyla analizlerinin gerçekleştirilmesi, sonuçlarının değerlendirilmesi ve raporlama proseslerinin takibinin gerçekleştirilmesi.

#### Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (3-24 Ağustos 2007)

**İş Tanımı:** Tıbbi Biyokimya laboratuvarında kanda rutin biyokimya analizlerinin yanı sıra, koagülasyon faktörlerinin tayininin gerçekleştirilmesi.

### Yabancı Dil:

İngilizce : İyi derecede

Rusça : Başlangıç seviyesi

**Bilgisayar :**

Microsoft Office, Internet

**Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:**

- Kimyagerler Derneği
- Biyokimyagerler Derneği

**Referanslar:**

- Prof. Dr. Seçil ÖNAL, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi

Email: [secil.onal@ege.edu.tr](mailto:secil.onal@ege.edu.tr)

Tel : 0232 311 54 23

- Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi

Email: [erhan.dinckaya@ege.edu.tr](mailto:erhan.dinckaya@ege.edu.tr)

Tel : 0232 311 23 92

