

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**α -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE
ENDÜSTRİYEL PROSESLERDE KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Evran BIÇAK ÇELEM

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 08/03/2013

Bornova-İZMİR

2013

Evran ÇELEM tarafından Doktora tezi olarak sunulan “ **α -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Proseslerde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Seçil ÖNAL
Raportör Üye	:
Üye	:
Üye	:
Üye	:

ÖZET

α -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL PROSESLERDE KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

ÇELEM, Evran

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Mart, 2013, 215 sayfa

α -Galaktozidazlar (Melibiaz, EC 3.2.1.22), basit ve kompleks oligo- ve polisakkaritlerin (rafinoz, stakiyöz, melibiöz, galaktomannan) α -1,6-bağlı D-galaktozil artıklarını hidrolizleyen ekzoglikozidazlardır. Çok çeşitli tekniklerle bitkilerden, hayvanlardan ve çeşitli mikrobiyal organizmalardan saflaştırılmışlardır. Özellikle şeker endüstrisinde önemli bir yere sahip olan α -galaktozidazlar, medikal alanda (Fabry hastalığının tedavisi, doku nakli ve kan grubu dönüşümlerinde), kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde ve yapı analizlerinde çeşitli uygulamalara sahiptirler. Bu enzim ile yapılan çok sayıda saflaştırma ve karakterizasyon çalışması olmasına rağmen immobilizasyon çalışmaları oldukça azdır.

İmmobilize enzimler, geleneksel kimyasal yöntemlere alternatif olarak yenilikçi biyoteknolojik proseslerin kalpleridirler. α -Galaktozidazın endüstriyel uygulamaları serbest enzime kıyasla yüksek aktivite ve kararlılıkta biyokatalist immobilize enzim elde etmek için etkili yöntemlere gereksinim duyar.

Bu çalışmada, α -galaktozidaz enzimi önce karpuzdan (*Citrullus vulgaris*) izole edilerek kısmi olarak saflaştırıldı ve ardından Sepabead EC- serisi (Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA) taşıyıcılarda kovalent bağlama, adsorpsiyon ve çapraz bağlama teknikleri kullanılarak immobilize edildi. Her bir immobilizasyon protokolünün optimizasyonu için immobilizasyona çeşitli parametrelerin etkisi (tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ı, protein miktarı, glutaraldehid konsantrasyonu, aktivasyon süresi gibi) incelendi. Hazırlanan immobilize ve serbest enzimlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim aktivitesine etki eden bazı parametreler (pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, efektör konsantrasyonları) incelenerek kararlılık testleri (pH, termal, operasyonel

ve depo kararlılığı) yapıldı. Bunların yanı sıra immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği de test edildi. Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapıldı.

Anahtar sözcükler: Karpuz (*Citrullus vulgaris*), α -galaktozidaz, soya sütü, immobilizasyon, Sepabead EC-EP, Sepabead EC-EA, Sepabead EC-HA, rafinoz hidrolizi.

ABSTRACT**IMMOBILIZATION, CHARACTERIZATION AND
DETERMINATION OF THE POTENTIAL USAGE OF
 α -GALACTOSIDASE IN INDUSTRIAL PROCESSES**

ÇELEM, Evran

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

March, 2013, 215 pages

α -Galactosidases (Mellibiase, EC 3.2.1.22) are the exoglycosides that catalyses the hydrolysis of α -1,6- bounded D-galactosyl residues of basic and complex oligo- and polysaccharides (raffinose, stachyose, mellibiose, galactomannans). They have been purified with different techniques from plants, animals and various microorganisms. They have great importance in especially sugar industry, elucidation of the biological functions of complex carbohydrates, structural analysis, organic synthesis and medical purpose (cure of Fabry disease, xenotransplantation). Because of these, there has been many purification and characterization studies with α -galactosidases but in contrast to this, there are only few immobilization studies.

Immobilized enzymes are the hearth of innovative biotechnological processes as alternatives to traditional chemical Technologies. Industrial applications of α -galactosidase requires efficient methods to immobilize enzyme, yielding a biocatalyst with high activity, stability compared to free enzyme.

In this study α -galactosidase was isolated and partially purified from watermelon (*Citrullus vulgaris*) and then immobilized on Sepabead EC- carriers (Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA) by covalent coupling, adsorption and crosslinking. For optimization of immobilization protocols, effects of some parameters (buffer type, concentration and pH of buffer, protein amount, concentration of glutaraldehyde, activation time, etc...) to immobilization were tested. Physical and chemical characterization of free and immobilized enzymes were made. Some parameters effecting to the enzyme activity (pH, temperature, substrate concentration and effector concentration) were searched and stability tests (thermal, pH, storage and operational stability) were also done. Beside of

these, useability of the immobilized enzymes were tested. Finally the usage of free and immobilized enzymes in the hydrolysis of raffinose and raffinose type oligosaccharides present in soymilk were determined.

Keywords: Watermelon (*Citrullus vulgaris*), α -galactosidase, immobilization, Sepabead EC-EP, Sepabead EC-EA, Sepabead EC-HA, soy milk, hydrolysis of raffinose.

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. Şenol ALPAT' a ve özellikle HPLC çalışmalarında bana yol gösteren Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU' na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca bana vermiş oldukları destek, göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için ANNE ve BABAMA, eşim Onat ÇELEM' e, manevi desteğini hep hissettiğim UĞURUM' a ve hep yanımda olan DOSTLARIMA, çalışma arkadaşlarıma minnettarım.

Doktora çalışmam için bana burs imkânı sağlayan Tübitak-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı' na ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2009 FEN 010 no' lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxix
1. GİRİŞ	1
1.1 Galaktozidazlar	2
1.1.1 α -Galaktozidazlar ve α -galaktozidazların biyokimyası	5
1.1.2 α -Galaktozidazların etki mekanizması	10
1.1.3 α -Galaktozidazların izolasyonu ve saflaştırılması	14
1.1.4 α -Galaktozidazların fiziksel özellikleri	17
1.1.5 α -Galaktozidazların kinetik özellikleri	20
1.1.6 α -Galaktozidazların fizyolojik önemi ve uygulama alanları	32
1.2 İmmobilize Enzimler	37
1.2.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri	39
1.2.2 Enzimlerin çapraz bağlanması	46
1.2.3 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar	49

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
1.2.4 α -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC- serisi sentetik taşıyıcılarda immobilizasyonu	50
1.2.5 İmmobilize enzimlerin uygulama alanları	56
1.2.6 İmmobilize enzimler ve α -galaktozidazlarla ilgili gelecekte beklenenler	58
2. MATERYAL VE METOD	62
2.1 Materyal	62
2.2 Cihaz ve Sistemler	62
2.3 α -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini	63
2.3.1 p-Nitrofenil- α -D-galaktopiranozid ile aktivite tayini	63
2.3.2 Rafinoz ile aktivite tayini	64
2.4 İnvvertaz Aktivitesi Tayini	65
2.5 Protein Tayini	65
2.6 Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini.....	66
2.6.1 Polimerizasyon protokolü	67
2.6.2 Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması	68
2.6.3 Protein bantlarının boyanması	69
2.7 Karpuz α -Galaktozidazının İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması	69
2.8 α -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu	70

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.8.1 Sepabead EC-EP taşıyıcıda kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu	71
2.8.2 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu	72
2.8.3 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu	74
2.9 α -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu	77
2.9.1 α -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi	77
2.9.2 Kararlılık testleri	80
2.10 İmmobilize α -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının PNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı	83
2.11 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi	84
2.11.1 Soya sütünün hazırlanması	84
2.11.2 Soya sütünde toplam oligosakkarit miktarının tayini	85
2.11.3 Kesikli karıştırmalı tank reaktörde (Batch Stirred-Tank Reactor) hidroliz	85
2.11.4 HPLC ile ayırım ve hidroliz derecesinin belirlenmesi	85

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	87
3.1 α -Galaktozidaz Enziminin Karpuzdan İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.	87
3.2 α -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu	94
3.2.1 Sepabead EC-EP taşıyıcıda kovalent bağlama yöntemi ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu	95
3.2.2 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında kovalent bağlama yöntemi ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu	102
3.2.3 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu	109
3.2.4 α -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda immobilizasyonunun değerlendirilmesi	118
3.3 Serbest ve İmmobilize α -Galaktozidaz Enzimlerinin Karakterizasyonu	120
3.3.1 α -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi	121
3.3.2 Kararlılık Testleri	136
3.4 İmmobilize α -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının PNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı	156

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5 Soya Sütündeki Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi	164
3.5.1 Soya sütünde toplam oligosakkarit miktarının tayini	164
3.5.2 HPLC ile rafinoz tip oligosakkaritlerin ayırımı ve hidroliz derecelerinin belirlenmesi	164
4. GENEL DEĞERLENDİRME	179
KAYNAKLAR DİZİNİ	183
ÖZGEÇMİŞ	210

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Genel reaksiyon mekanizması	5
1.2 Tatlı badem α -galaktozidazının etki mekanizması: İki adımlı mekanizma ...	11
1.3 Tatlı badem α -galaktozidazının etki mekanizması: Tek adımlı mekanizma ...	12
1.4 Pirinç α -galaktozidazının kristal yapısı	15
1.5 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	39
1.6 Glutaraldehidin oligomerizasyonu	48
1.7 Sepabead EC-EP'nin kimyasal yapısı	51
1.8 Epoksi taşıyıcılarda enzim immobilizasyon mekanizması	53
1.9 İmmobilizasyonun enzim kararlılığına etkisi	53
1.10 Sepabead EC-EA' nın kimyasal yapısı	55
1.11 Sepabead EC-HA' nın kimyasal yapısı	55
1.12 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda enzim immobilizasyon mekanizması.....	55
1.13 Sepabead EC-EA taşıyıcıda adsorpsiyon sonrası glutaraldehid ile çapraz bağlanma	56
1.14 α -Galaktozidaz enzimi ile rafinoz hidrolizi	60
1.15 α -Galaktozidaz ve invertaz ile şeker hidrolizi	60
3.1 Amonyum sülfat konsantrasyonunun α -galaktozidaz enziminin saflaştırma katına etkisi	90

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 Amonyum sülfat konsantrasyonunun α -galaktozidaz enziminin saflaştırma verimine etkisi	90
3.3 Amonyum sülfat konsantrasyonunun invertaz enziminin saflaştırma katına etkisi	91
3.4 Amonyum sülfat konsantrasyonunun invertaz enziminin saflaştırma verimine etkisi	91
3.5 Karpuz α -galaktozidazının SDS-PAGE elektroforegramı	93
3.6 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine pH' ın etkisi ve optimum pH	122
3.7 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine sıcaklığın etkisi ve optimum sıcaklık	124
3.8 Serbest ve immobilize α -galaktozidazların Arrhenius diyagramları	127
3.9 PNPG konsantrasyonunun serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktiviteleri üzerine etkisi	129
3.10 Serbest ve immobilize enzimlerin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG)	130

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.11 Rafinoz konsantrasyonunun serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkisi	132
3.12 Serbest ve immobilize enzimlerin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz)	133
3.13 Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılığı	138
3.14 Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılığı	141
3.15 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (37°C)	142
3.16 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (50°C)	143
3.17 Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılıkları	145
3.18 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılıkları (Substrat: PNPG)	150
3.19 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılıkları (Substrat: Rafinoz)	151
3.20 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri (Substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C)	153
3.21 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50°C)	155

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.22 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları (Substrat: PNPG, kovalent immobilizasyon)	157
3.23 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları (Substrat: PNPG, adsorbsiyon ve çapraz bağlama)	158
3.24 PNPG' nin kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki dönüşüm eğrisi	159
3.25 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50°C)	161
3.26 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50°C)	162
3.27 Rafinozun kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki dönüşüm eğrisi	163
3.28 Karbohidratların RID ile analizine yönelik kromatogram	165
3.29 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC(EA-GA-E) ile hidrolizine ait kromatogram	167
3.30 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC(HA-GA-E) ile hidrolizine ait kromatogram	168
3.31 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC-EP ile hidrolizine ait kromatogram	169

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.32 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC(EA-E-GA) ile hidrolizine ait kromatogram	170
3.33 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC(HA-E-GA) ile hidrolizine ait kromatogram	171
3.34 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin serbest α -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram	172
3.35 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki rafinozun hidrolizi	174
3.36 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki stakiozun hidrolizi	175

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Oligosakkarit yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bazı ekzoglikozidazlar	4
1.2 Bazı α -galaktozidazların molekül kütleleri	19
1.3 α -Galaktozidazların substrat spesifiklikleri	22
1.4 α -Galaktozidazların termal kararlılıkları	26
1.5 α -Galaktozidazların optimum pH değerleri	28
1.6 α -Galaktozidaz aktivitesine çeşitli inhibitörlerin etkisi	31
1.7 İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri	38
1.8 İmmobilizasyon yönteminin seçiminde dikkat edilmesi gereken parametreler	41
1.9 Enzim immobilizasyonu planlanırken dikkate alınması gereken faktörler.....	42
1.10 İmmobilizasyon tekniği seçimi için bazı öneriler	43
1.11 İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	43
1.12 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılarda aranan genel özellikler	49
1.13 Sepabead EC-EP taşıyıcının genel özellikleri	52
1.14 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarının genel özellikleri	54
3.1 Kısmi saf enzim preparatının (% 85' lik, w/v amonyum sülfat çöktürmesi sonrası) α -galaktozidaz ve invertaz içeriği	87

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 α -Galaktozidaz enziminin gradient amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları ...	89
3.3 İnvertzaz enziminin gradient amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	89
3.4 α -Galaktozidaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	92
3.5 İnvertzaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	92
3.6 Enzim preparatlarının α -galaktozidaz ve invertaz içeriği	96
3.7 Sepabead EC-EP' de α - galaktozidaz enzimlerinin immobilizasyonu	97
3.8 Sepabead EC-EP' de invertaz enzimlerinin immobilizasyonu	98
3.9 Sepabead EC-EP' de karpuz α -galaktozidazının kovalent immobilizasyonuna tampon türü, konsantrasyonu ve pH' in etkisi	100
3.10 Sepabead EC-EP' de karpuz α -galaktozidazının kovalent immobilizasyonuna sitrat tamponunun (pH 6,0) etkisi.....	101
3.11 Sepabead EC-EP' de karpuz α -galaktozidazının immobilizasyonuna protein miktarının etkisi	102
3.12 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent α -galaktozidaz immobilizasyonuna glutaraldehid konsantrasyonunun etkisi	105

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.13 Sepabead EC-EA' da kovalent bağlama ile α -galaktoz immobilizasyonuna protein miktarının etkisi	106
3.14 Sepabead EC-HA' da kovalent bağlama ile α -galaktozidaz immobilizasyonuna protein miktarının etkisi	107
3.15 Sepabead EC-EA ve EC-HA' da kovalent bağlama ile α -galaktozidaz immobilizasyonuna taşıyıcı türü ve aktivasyon süresinin etkisi	108
3.16 Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna adsorbsiyon pH' ının etkisi	110
3.17 Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna iyon şiddetinin etkisi	111
3.18 Sepabead EC-EA ve HA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna protein miktarının etkisi	112
3.19 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna adsorbsiyon süresinin etkisi	113
3.20 Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon sonuçları (Tampon türü ve pH' ın çapraz bağlamaya etkisi)	115

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.21 Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon sonuçları (Glutaraldehid konsantrasyonunun çapraz bağlamaya etkisi)	116
3.22 Sepabead EC-HA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon sonuçları (Glutaraldehid konsantrasyonunun çapraz bağlamaya etkisi)	117
3.23 Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için belirlenen koşullarının optimum koşullar	118
3.24 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktiviteleri üzerine PNPG konsantrasyonunun etkisi	128
3.25 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktiviteleri üzerine rafinoz konsantrasyonunun etkisi	130
3.26 Efektör olarak çeşitli şekerlerin serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelerine (% aktivite) etkisi	134
3.27 Efektör olarak çeşitli kimyasalların serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelerine (% aktivite) etkisi	136
3.28 İmmobilize enzimlerin farklı zamanlardaki k_D değerleri (PNPG)	147
3.29 İmmobilize enzimlerin farklı zamanlardaki k_D değerleri (Rafinoz)	147

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.30 İmmobilize enzimlerin ortalama k_D değerleri	148
3.31 İmmobilize enzimlerin yarı ömürleri	148
3.32 Karbohidratların kolonda alıkonma süreleri	166
3.33 Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için belirlenen koşullarının optimum koşullar	179
3.34 Serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyon sonuçları	180

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Acıklama</u>
$t_{1/2}$	Yarılanma ömrü
k_D	Bozunma sabiti
U	Unite aktivite birimi
k_{cat}	Turnover sayısı
K_m	V_{max} ' ın yarısına denk gelen hızdaki substrat konsantrasyonu
V_{max}	Doygun substrat konsantrasyonundaki reaksiyon hızı
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
kDa	Kilodalton
μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre
mM	Milimolar
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

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BSA	Sığır serum albumini
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamin
DEAE-	Dietilaminoetil
PNPG	p-Nitrofenil- α -D-galaktopiranozid
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
RID	Refraktif İndeks Dedektör
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
PCMB	p-Kloro Merkür Benzoik Asit
GA	Glutaraldehid
Ç.B.	Çapraz Bağlama
E	Enzim
EA-GA-E	EA taşıyıcıda kovalent immobilizasyon
HA-GA-E	HA taşıyıcıda kovalent immobilizasyon
EA-E-GA	EA taşıyıcıda adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyon
HA-E-GA	HA taşıyıcıda adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyon

1. GİRİŞ

α -Galaktozidazlar (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), basit ve kompleks oligo- ve polisakkaritlerin (rafinoz, stakiyöz, melibiöz, galaktomannan) α -1,6-bağlı D-galaktozil artıklarını hidrolizleyen ekzoglikozidazlardır. Ayrıca glikoprotein ve glikosfingolipidleri de hidrolizlerler. α -Galaktozidazlar hidrolaz sınıfı enzimlere dahil edilmelerine rağmen özellikle yüksek substrat konsantrasyonlarında transgalaktozilasyon aktivitesi de göstermektedirler. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan α -galaktozidazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilerek saflaştırılmışlardır.

α -Galaktozidazlar; kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde, medikal alanda (kan grubu dönüşümlerinde, Fabry hastalığının tedavisinde) ve endüstriyel proseslerde pek çok kullanım alanına sahiptir. Endüstriyel proseslerde kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, soyalı gıdaların ve hayvan yemlerinin işlenmesinde kullanım alanı bulan α -galaktozidazlar özellikle şeker endüstrisi için önemlidirler. Rafinoz, sukrozun kristallenmesini engelleyerek kristalize şeker verimini düşüren D-galaktoz, D-glukoz ve D-fruktozdan oluşmuş bir trisakkarittir ve çeşitli kaynaklardan hazırlanan serbest ve immobilize α -galaktozidaz preparatları ile hidrolizi şeker endüstrisinde ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır.

α -Galaktozidazlar, rafinozun yanı sıra rafinoz tip oligosakkaritleri de sindirilebilir oligosakkaritlere hidrolizleyebilmektedir. Soya fasulyesi, yüksek protein içeriği ve dengeli aminoasit dağılımı ile mükemmel bir besindir ve Japonlar tarafından "tarlaların eti" olarak adlandırılır ancak içerdiği sindirilemeyen oligosakkaritler kullanımını sınırlandırmaktadır. Sindirilemeyen oligosakkaritler (rafinoz tip oligosakkaritler) iki veya daha fazla polimerizasyon derecesine sahip olan ve pankreatik enzimlerce sindirilemeyen karbohidratlar olarak tanımlanmaktadır. Soya fasulyesinin kuru ağırlığının yaklaşık % 4-6 kadarı bu tip şekerlerden oluşmaktadır ki ortalama % 4-5 oranında sukroz, % 1-2 oranında rafinoz, % 4,5-5,5 oranında stakiyöz ve küçük miktarlarda verbaskoz ile melibiöz içermektedir. İnsanlarda α -galaktozidaz enzimi bulunmaması nedeniyle soya fasulyesi gibi baklagiller tüketildikten sonra kalın bağırsağa geçer ve

buradaki mikroflora tarafından fermente edilirler. Bunun sonucunda gaz ve bazı barsak problemleri oluşur. Soya fasulyesindeki sindirilemeyen oligosakkaritlerin parçalanması için en etkili yöntem bitkisel veya mikrobiyal kaynaklı α -galaktozidazlarla enzimatik hidrolizdir. Legüm bazlı gıdaların α -galaktozidaz ile muamele edilmesi sindirilemeyen oligosakkaritlerin neden olduğu gastrik stresi azaltır ve besinlerin gıda değerinin arttırılmasını sağlar.

Ülkemizde kolay bulunabilmesi, ekonomik olması ve α -galaktozidaz aktivitesi açısından zengin olması nedeniyle bu çalışmada enzim kaynağı olarak karpuz (*Citrullus vulgaris*) seçildi.

İmmobilize enzimler reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabildikleri, çevre koşullarına (pH, sıcaklık) karşı daha dayanıklı oldukları, tekrar tekrar ve uzun süre kullanılabildikleri ve de sürekli işlemlere uygulanabilir oldukları için serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlı moleküllerdir. Bu çalışmada, karpuzdan izole edilerek kısmi saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi Sepabead EC serisi (EC-EA, EC-HA ve EC-EP) taşıyıcılarda kovalent bağlama ve adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemleri kullanılarak immobilize edildi. Kullanılan immobilizasyon yöntemleri ve immobilizasyon ortamları optimize edilerek Sepabead EC serisi taşıyıcıların α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için uygunluğu kıyaslandı. Serbest ve immobilize enzimler karakterize edilerek kıyaslandı ve immobilize enzim preparatları soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanıldı. Hidroliz öncesi toplam karbohidrat miktarı spektrofotometrik olarak ve hidroliz sonrası ürünler ise HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) ile tayin edildi.

1.1 Galaktozidazlar

Galaktozidazlar, glikozidazların bir alt sınıfı olan hidrolitik enzimlerdir. Glikozidazlar da glikozil bileşikleri üzerinde etkili olan oldukça geniş ve önemli bir enzim grubudur. Basit glikozidler ile kompleks oligo- ve polisakkaritlerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizlerler. Glikopiranozil grupları ile glikozidik bağların anomerik konfigürasyonlarına karşı oldukça spesifik olan glikozidazlar,

hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunurlar. Uzun zamandan beri Biyokimya'nın en ilginç araştırma konularından birisi olmasına rağmen glikozidazların moleküler özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında çok az bilgi edinilebilmiş ve sadece birkaçı kristalize edilebilmiştir. Amilaz ve lizozim kristal formda elde edilen glikozidaz sınıfı enzimlerdir.

Glikozidazların bir kısmı glikozil artıklarını oligosakkaritlere, polisakkaritlere ve diğer alkolik reseptörlere transfer ettikleri halde hidrolazlar sınıfına dahil edilirler. Glikozidazlar, O-glikozil, N-glikozil ve S-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler (EC 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3) olarak üç gruba ayrılırlar ve çok çeşitli glikozidik bağlar üzerinde etkilidirler. Örneğin; α -amilaz (EC 3.2.1.1), β -amilaz (EC 3.2.1.2), ekzo-1,4- α -D-glukozidaz (EC 3.2.1.3), sikloheptaglukanaz (EC 3.2.1.12) ve siklohegzaglukanaz (EC 3.2.1.13) α -1,4-glikozidik bağlarını, amilopektin-1,6-glukozidaz (EC 3.2.1.9), oligo-1,6-glukozidaz (EC 3.2.1.10) ve dekstranaz (EC 3.2.1.11) α -1,6-glikozidik bağlarını, α -galaktozidaz ise α -1,6-glikozidik bağı hidrolizler. Temel olarak yüklü grup içermeyen substratlarla ilgilidirler. Tüm belirleyici gruplar ya hidroksil grupları ya da hidrojen atomlarıdır. Bu nedenle de spesifiklikleri bir model ile belirlenmelidir. Genel olarak belirli bir monosakkarit halkasına spesifiktirler, fakat bağlı aglikon grubu yüksek ya da düşük bir etkiye sahiptir ve bazen de enzim aglikona spesifik olabilir. Glikozidazlar özellikle şeker halkasının konfigürasyonuna spesifiktirler. Örneğin; α -galaktozidazlar monosakkarit, oligosakkarit, glikopeptid ve fenole α -bağlı terminal galaktoz artıklarını, β -galaktozidazlar ise β -1,6-, β -1,4- veya β -1,3- bağli terminal galaktoz artıklarını hidrolizleyebilirler (Önal, 2000).

Glikozidazlar, genel olarak endo- ve ekzo- glikozidazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Glikoproteinler üzerinde etkili olan endoglikozidazlar; endo- β -galaktozidaz (EC 3.2.1.103), endoglikozidaz D (EC 3.2.1.96), endoglikozidaz F (EC 3.2.1.96), endoglikozidaz H (EC 3.2.1.96) ve glikopeptidaz F (EC 3.2.1.18) dir. Polisakkaritler üzerinde etkili olan endoglikozidazlar; α -amilaz (EC 3.2.1.1), selülaz (EC 3.2.1.4), hyaluronidaz (EC 3.2.1.45), lizozim (EC 3.2.1.17) ve pullulanaz (EC 3.2.1.41) dir. Ekzoglikozidazlar ise sadece terminal artıklar üzerinde etkilidirler. Bunlar; β -N-asetil-D-glukozaminidaz (EC 3.2.1.30),

β -amilaz (EC 3.2.1.2), amiloglukozidaz (EC 3.2.1.3), β -fruktozidaz (EC 3.2.1.26), α -L-fukozidaz (EC 3.2.1.51), α -galaktozidaz (EC 3.2.1.22), β -galaktozidaz (EC 3.2.1.23), α -glukozidaz (EC 3.2.1.20), β -glukozidaz (EC 3.2.1.21), β -glukuronidaz (EC 3.2.1.31) ve nöraminidaz (EC 3.2.1.18) dır (Önal, 1994, 2000; Agrawell and Bahl, 1968).

Glikozidazlar yapısal karakterizasyonlarda da kullanılan önemli bir enzim grubudur. Nükleer manyetik rezonans (NMR), hızlı atom bombardımanı, elektropray-kütle spektrometrisi gibi analitik metodların gelişmesiyle beraber yapı tayinlerinde enzimlerin kullanımı büyük olasılıkla azalacaktır. Fakat bu tekniklerin elde edilemediği durumlarda enzimler hala oldukça güçlü ve etkili bir araç olmaya devam edecektir. Oligosakkaritlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bazı ekzoglikozidazlar Çizelge 1.1 'de verilmiştir (Önal, 2000).

Çizelge 1.1 Oligosakkarit yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bazı ekzoglikozidazlar (Önal, 2000).

Enzim	Kaynak	Hidrolizlenen Bağ
α -Mannozidaz- I	<i>A. saitoi</i>	Man α 1-2 Man
Hegsozaminidaz	Baklagil tohumu	GalNAc/GlcNAc β 1-2,3,4,6
β -Galaktozidaz	Baklagil tohumu	Gal β 1-3,4,6
α -Fukozidaz	<i>C. lampas</i>	Fuc α 1-2GalGal β 1-3(Fuc1-4) GlcNAc
α -Galaktozidaz	Kahve tohumu	Gal α 1-3,4,6
α -Nörominidaz	<i>A. ureafaciens</i>	NeuAc/NeuGc α 2-3/6Gal
α -Glukozidaz- I	Domuz karaciğeri	Glc α 1-2Glc
α -Glukozidaz- II	Domuz karaciğeri	Glc α 1-3Glc ve Glc α 1-3Man

Galaktozidazlar, ekzoglikozidazların en iyi bilinen sınıfıdır. Ekzoglikozidazlar, glikoprotein ve glikolipidlerdeki karbohidrat yapısını modifiye ederler. Bu enzimler O-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler olup α - ve

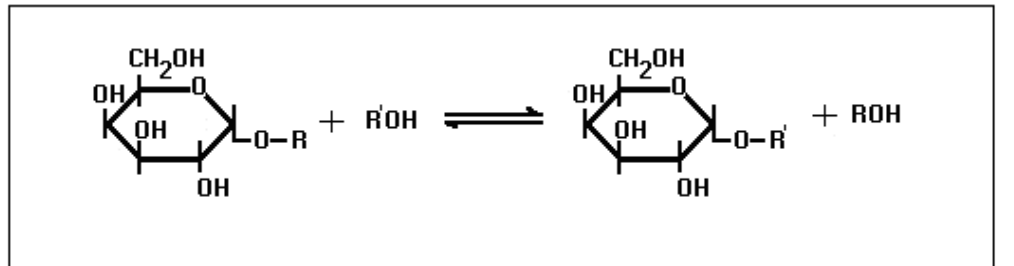
β -galaktozidazlar olarak iki gruptan oluşurlar. α -Galaktozidazlar (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) (melibiaz); galaktoz oligosakkaritleri, galaktolipidleri içeren α -D-galaktozidlerdeki terminal, indirgen olmayan α -D-galaktoz artıklarını ve α -D-fukozydleri de hidrolizlerler. β -Galaktozidazlar (β -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23) (laktaz); β -D-galaktozidlerdeki terminal indirgen olmayan β -D-galaktoz artıklarını hidrolizlerler. Bu gruptaki enzimlerden bazısı α -L-arabinozidleri de hidrolizlemektedir (Bergmeyer, 1973; Gaudreault and Webb, 1983; Harpaz et al., 1987).

1.1.1 α -Galaktozidazlar ve α -galaktozidazların biyokimyası

α -Galaktozidazlar (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), doğada oldukça yaygın olarak bulunan hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Çok sayıda α -D-galaktopiranozidik bağın hidrolizini katalizlerler (Harpaz et al., 1987; Guiseppin et al., 1993):

- Metanol, fenol ve 4-nitrofenollerin glikozidleri,
- Disakkaritler ve disakkarit türevleri; melibioz, epimelibioz, melibiyonik asit,
- Trisakkaritler; rafinoz,
- Oligosakkaritler; stakiyöz.

Şekil 1.1' de enzimin genel hidroliz reaksiyonu verilmiştir.



Şekil 1.1 Genel reaksiyon mekanizması.

Yapılan çalışmalarda *Phaseolus vulgaris* α -galaktozidazının insan ve tavşan eritrosit membranındaki α -1,3-galaktozil artıklarına karşı aktif olduğu (Dhar et al., 1994), *Vigna radiata* α -galaktozidazının yine tavşan eritrositlerindeki α -galaktozidik bağları hidrolizlediği (Dey, 1984), kahve tohumu α -galaktozidazının kırmızı hücrelerdeki gliko-konjugatlardan terminal α -galaktoz artıklarını (Zhu and Goldstein, 1994) ve *Colocasia esculenta* α -galaktozidazının ise galaktoz içeren konjugatlarda α -1,4- ve α -1,6- bağlarını (Chien and Lin-Chu, 1991) hidrolizlediği belirtilmiştir.

α -Galaktozidazlar çok çeşitli kaynaklardan; *bitkisel* (Dey, 1984; Itoh et al., 1986; Balasubramaniam and Mathew, 1986; Cuourtois and Petek, 1988; Burns, 1990; Shivanna et al., 1990; Chien and Lin-Chu, 1991; Haibach et al., 1991; Somiari and Balogh, 1993; Dhar et al., 1994; Önal and Telefoncu, 1998; Önal, 2000; Guimaraes et al., 2001; Kang and Lee, 2001; Kim et al., 2002; Bryant et al., 2004; Viana et al., 2005; Soh et al., 2006; Gupta and Saleemuddin, 2006; Bıçak Çelem and Önal, 2008; Bıçak Çelem et al., 2009; Şen et al., 2011; Singh and Kayastha, 2012), *mikrobiyal* (Thanankul et al., 1976; Mitsutomi et al., 1985; Wong et al., 1986; Nagao et al., 1988; Talbot and Sygusch, 1990; Nadkarni et al., 1992; Zeilinger et al., 1993; Lounteri et al., 1998; Kotwal et al., 1999; Xiao et al., 2000; Varbanets et al., 2001; Thippeswamy and Mulimani, 2002; King et al., 2002; Gote et al., 2004; Prashanth and Mulimani, 2005, Viana et al., 2006; Rezessy-Szabo et al., 2007; Yoon and Hwang, 2008; Sinitsyna et al., 2008; Shankar et al., 2009) ve *hayvansal* (Kusiak et al., 1978; Galili et al., 1985; Dean and Sweeley, 1979a; 1979b; 1979c; Yasuda et al., 2004) bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Bu saflaştırma çalışmalarının yanında α -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları ise oldukça az sayıdadır. (Linden, 1982; Mitsutomi et al., 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Bakunina et al., 2006; Naganagouda and Mulimani, 2006; Girigowda and Mulimani, 2006; Filho et al., 2008; Falkoski et al., 2009; Okutucu et al., 2010; Singh and Kayastha, 2012).

α -Galaktozidazlar; galaktoz içeren oligo ve polisakkaritlerden α -1,6 bağı D-galaktozil artıklarını hidrolizleyebildikleri için biyoteknoloji, gıda ve yem sanayinde oldukça geniş uygulama alanına sahiptirler. Enzim saflaştırılmasında kullanılan metodlarda dikkate değer ölçüde bir gelişme olmasına rağmen kontamine glikozidazların ortamdaki uzaklaştırılması hala oldukça güç bir işlemdir. Eğer hazırlanan α -galaktozidaz preparatı diğer glikozidazlar tarafından kontamine edilmiyor ve geniş bir aglikon spesifikliğine sahipse, yapısal analizlerde ve kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde (Naik et al., 1985; Zaprometova et al., 1990; Kusakabe, 1990; Gidley et al., 1992; Neustroev et al., 1993; Ibatullin et al., 1993; Takayanagi et al., 1992), enzimatik sentezlerde (Galili et al., 1985; Cantacuzene and Attal, 1991; Hashimoto et al., 1993), transglikolizasyon reaksiyonlarında (Ajisaka and Fujimoto, 1989; Hashimoto et al., 1993; Golubev and Neustroev, 1993; Mitsutomi and Ohtakara, 1988), çeşitli polimerlerin sentezinde (Bulpin et al., 1990) ve hayvanlarda gaz oluşumuna neden olan rafinoz tip oligosakkaritlerin (rafinoz, stakiyöz ve verbaskoz) hidrolizinde (Thanankul et al., 1976; Gaudreault and Webb, 1983; Ohtakara et al., 1984; Shivanna et al., 1989; Porter et al., 1990; Somiari and Balogh, 1993; Kotwal et al., 1998; Mansour and Khalil, 1998) kullanabilecek uygun bir preparattır.

α -Galaktozidazlar kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde endo-1,4-mannanazların ağartıcı etkisini arttırmakta kullanılırlar (Rattö et al., 1993; Clarke et al., 2000).

Rafinoz, sukrozun kristallenmesini engelleyerek kristalize şeker verimini düşüren D-galaktoz, D-glukoz ve D-fruktozdan oluşmuş bir trisakkarittir ve çeşitli kaynaklardan hazırlanan α -galaktozidaz preparatları ile hidrolizlenmesi ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Şeker endüstrisinde α -galaktozidazlar, melastaki rafinozu hidrolizleyerek kristalize şeker verimini artırmak amacıyla biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır (Linden, 1982; Itoh et al., 1986; Slominski, 1994; Cronin et al., 2002).

Medikal alanda ise bazı α -galaktozidazlar tip-B eritrositlerinin yüzey glikoproteinlerindeki terminal 1,3-bağı D-galaktozil artıklarını kopararak tip-B

eritrositleri tip-O eritrositlere dönüştürebilmektedirler (Maly et al., 1985; Wong et al., 1986; Chien and Lin-Chu, 1991; Ito et al., 1993; Lenny et al., 1994; Varbanets et al., 2001). İnsanlarda görülen Fabry hastalığı termolabil lizozomal α -galaktozidaz-A enzimi eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. α -Galaktozidazların medikal amaçlar için enzim terapisinde kullanılabilecekleri bilinmektedir (Balasubramaniam and Mathew, 1986; Ishii et al., 1993; Coppola et al., 1994; Breunig et al., 2003; Froissarta et al., 2003; Erdős et al., 2008; Yoshimitsu et al., 2010). Enzim, ayrıca organ ve doku nakillerinde doku/organ reddinin engellenmesinde de kritik bir role sahiptir (Stone et al., 1998).

Farklı kaynaklardan saflaştırılan α -galaktozidazların bir kısmının glikoprotein karakterinde olduğu tesbit edilmiştir. *Cephalosporium/Acremonium* (Zaprometova and Ulezlo, 1988), hindistan cevizi (Balasubramaniam and Mathew, 1986), karpuz (*Citrullus battich*) (Itoh et al., 1986), mercimek (*Lens culinaris*) (Dey et al., 1983) , fasulye (Dey, 1984) ve papaya (Soh et al., 2006) α -galaktozidazlarının birer glikoprotein oldukları ve genellikle bitkisel kaynakların, özellikle de tahılların, glikoprotein karakteri gösterdikleri belirtilmiştir.

Cyamopsis tetragonolobus α -galaktozidazının anyonik karakterli α -galaktozidaz-A ve kationik karakterli α -galaktozidaz-C₂ formlarının glikoprotein yapıda olduğu ve her iki formun karbohidrat içeriğinin sırasıyla % 32 ve % 28 olduğu belirlenmiştir. Gaz-sıvı kromatografisi analizine göre önemli oranda ramnoz, fukoz ve arabinoz içerdikleri, α -galaktozidaz-C₂'nin karbohidrat kısmının galaktoz, ksiloz ve glukozdan ibaret olduğu fakat α -galaktozidaz-A'nın eser miktarda galaktoz içerirken hiç glukoz ve ksiloz içermediği belirlenmiştir (Shivanna et al., 1990). *Vicia faba* α -galaktozidazı da ksiloz, mannoz, glukoz ve glukozaminden oluşmuş bir glikoproteindir. Glikoprotein yapısındaki enzim dinlenme halindeki tohumlarda aktif formda bulunabilir. Tohumun çimlenmesi sırasında açığa çıkan şekerler konjugatı agregatlaştırmaz ve enzim tekrar aktive edilir (Dey et al., 1983). *Thermus thermophilus* HB8 α -galaktozidazı iki alt birimden oluşmuş bir protein olup, düşük molekül kütleli (74,1 Da) alt birimin bir

glikoprotein olduğu Schiff-periyodat boyaması ile belirlenmiştir (Telefoncu et al., 1998).

α -Galaktozidazların yapısı ve moleküler etki mekanizmaları üzerine çok az sayıda araştırma mevcuttur (Dey and Pridham, 1972; Mathew and Balasubramaniam, 1987). Bu amaçla yapılan çalışmalardan birisinde *Trichoderma reesei* α -galaktozidazının x-ışınları difraksiyonu gerçekleştirilebilmiştir (Golubev and Neustroev, 1993).

α -Galaktozidazlarla yapılan klonlama çalışmaları da oldukça büyük bir önem ve hız kazanmıştır. Saflaştırılan enzimin oldukça büyük miktarda üretilebilmesi ve enzimatik özelliklerinin geliştirilmesi için α -galaktozidazdan cDNA klonunun izole edilerek dizisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birisinde kahve çekirdeği α -galaktozidazını kodlayan cDNA önce klonlanmış ve ardından dizisi aydınlatılmıştır. cDNA klonu 378 aminoasitlik bir proteini kodlayan tek bir okuma sistemi içermektedir. Diğer kaynaklardan elde edilen cDNA klonları ile % 52-80 arasında bir dizi homologluğu göstermektedir. α -Galaktozidaz cDNA'sı çok çeşitli kaynaklardan; insan, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cyamopsis tetragonolobus* ve bitki tohumlarından klonlanmıştır. Bu kaynaklardan izole edilen enzim, kahve çekirdeği α -galaktozidazı ile kıyaslandığında, fizyolojik koşullar altında B-grubu antijenlerinden terminal galaktoz artıklarının uzaklaştırılmasında kahve α -galaktozidazının daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Watkins et al., 1962; Bergkamp et al., 1992; Zhu and Goldstein, 1994).

Primer yapılarındaki benzerlik ve hidrofobik grup analizlerine dayalı olarak α -galaktozidazlar üç glikozil hidrolaz sınıfı altında toplanırlar. Sınıf 4, prokaryot α -galaktozidazlarını, sınıf 27, ökaryot α -galaktozidazlarını ve sınıf 36 ise her iki orijinli α -galaktozidazları içermektedir. *Penicillium simplicissimum* α -galaktozidazlarından α -galaktozidaz I'i kodlayan gen üretilerek, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Klonlanan bu gen, agII, sinyal dizisini de kapsayan 435 aminoasidi kodlamaktadır (Lounteri et al., 1998).

1.1.2 α -Galaktozidazların etki mekanizması

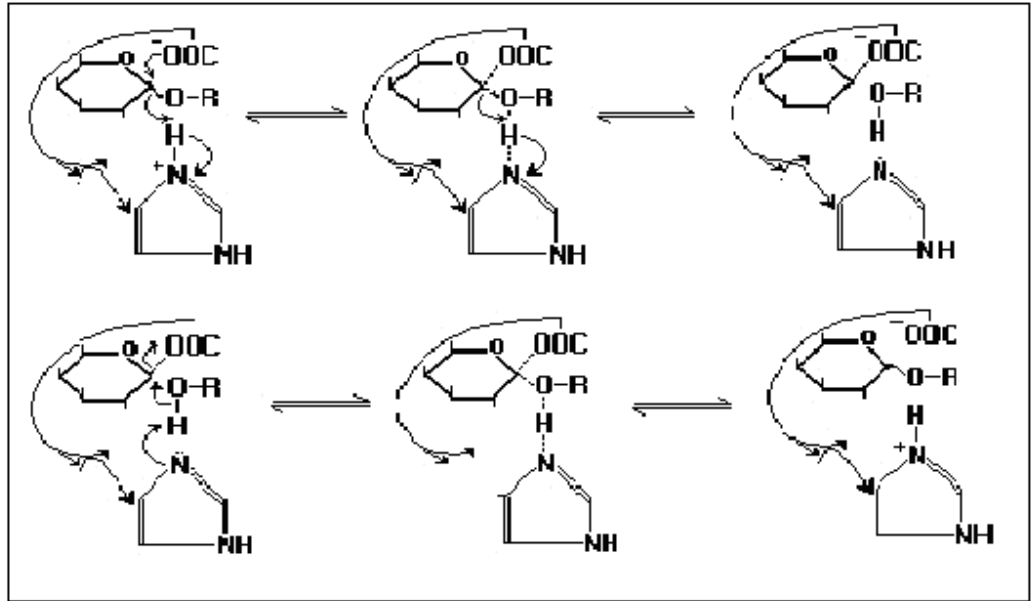
Spesifik biyokatalizörler olan enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek geçiş haline varmayı kolaylaştırırlar ve geçiş halinin kararlılığını arttırarak reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimler bunu substrat bağlama merkezlerinin spesifikliğı ve katalitik grupların optimal düzenlenişi sayesinde başarırlar. Enzimatik kataliz için asit-baz katalizi, kovalent kataliz, metal iyonu katalizi, çözen katalizi gibi çeşitli mekanizma tipleri önerilmektedir (Uslan, 1997). Çoğu kaynaktan elde edilen α -galaktozidazların kimyası ve kinetiğı hakkındaki bilgilerin yetersizliğınden dolayı α -galaktozidaz etki mekanizmasına ait çok az gerçek bilinmektedir (Önal, 2000).

α -Galaktozidazlarla ilgili hemen hiçbir bağ kopması çalışması yapılmamıştır. Fakat diğere glikozidazlar düşünöldüğünde, substratın galaktoz-oksijen bağları büyük olasılıkla kopmaktadır. Nökleer manyetik rezonans (NMR) ve polarimetri çalışmaları serbest galaktozil artıklarının substrat ile aynı anomerik konfigürasyona sahip olduklarını göstermiştir (Dey and Pridham, 1972; Mathew and Balasubramaniam, 1987). Eğer C₁ karbon atomunda iki ardışık inversiyon varsa ya da sadece bir yandaki nökleofil ile bağlanabilen bir karbonyum iyonu varsa konfigürasyon korunur. Konfigürasyonun korunması da çok adımlı bir dizi reaksiyondan ibarettir (Mathew and Balasubramaniam, 1987).

Asit-baz katalizi fumaraz, maltaz, maya invertazı, β -galaktozidaz gibi enzim sistemlerinde etkilidir. Aril- α -galaktozidler ile tatlı badem α -D-galaktozidazında yapılan spesifiklik çalışmaları, aglikonun elektronik yapısının enzimatik hidroliz hızında dikkate değere bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. $\log V_{max}$, aromatik halka üzerindeki substituentleri Hammet sabitlerine (σ) karşı grafiğıe geçirildiğinde iki düz çizgi ($p = -0.054$ ve -1.5) elde edilmiştir. Bunlar fenil- α -galaktozide ($\sigma = 0$) karşı gelen noktada kesilir. Bu arilglukozidazlarının alkali ve asit hidrolizine benzer ve bu yüzden aktif merkezdeki bazik ve asidik grupların varlığı olarak yorumlanabilir. Yapılan kinetik çalışmalarda bu grupların sırasıyla karboksil ve imidazol olduğu belirlenmiştir. Metilen mavisi varlığındaki fotooksidasyon ve Ag⁺ iyonları ile inhibisyon da bu yorumları desteklemiştir.

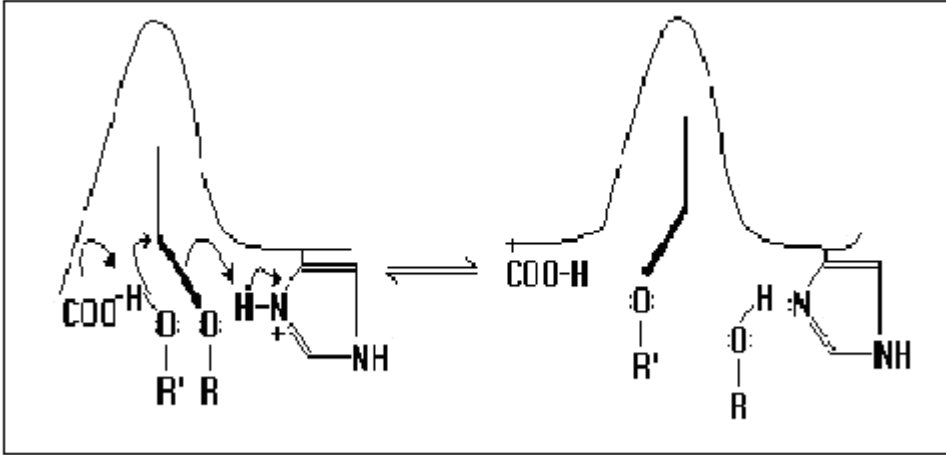
Buna benzer bir durum *Vicia faba* α -galaktozidazında görülmüştür. Tatlı badem α -galaktozidazı ile yapılan çalışmalarda p-nitrofenil- α -D-galaktozidin aktif merkeze bağlanmasının asidik bölgedeki grubun pK_a 'sını düşürdüğü, pH optimumunun alkali bölgesinde grup ayrılma değerlerini arttırdığı görülmüştür. Enzim molekülündeki substrat ile yapılmış değişikliklerin enzimin pH aralığını genişlettiği görülmüştür (Dey and Pridham, 1972).

Bu sonuçlara dayanarak tatlı badem α -galaktozidazının etki mekanizması ile ilgili olarak iki adımlı bir mekanizma önerilmiştir. Burada aglikon, karboksil ve imidazol gruplarının anlaşmalı etkisiyle ayrılır. Sonra su ya da alifatik alkol olabilen bir akseptör molekülün ($R' OH$) reaksiyonu ile devam eder ve transfer ya da hidroliz ürünleri oluşumu ile son bulur. Büyük olasılıkla imidazol grubunun elektrofilik bir atağı glikozil-oksijen bağına parçalamak için yeterli olur. Galaktoz kısmının C_1 -karbonunda bir karbonyum iyonu oluşur. Tüm iki adımlı mekanizmada büyük olasılıkla iki Walden inversiyonu oluşur, son üründe anomerik konfigürasyonun korunması ile sonuçlanır. Karbonyum iyonu oluşumu ister istemez rasemizasyona gerek duymaz. Konfigürasyon bir ara molekülün enzime spesifik olarak bağlanması ile stabilize edilebilir (Şekil 1.2) (Dey and Pridham, 1972).



Şekil 1.2 Tatlı badem α -galaktozidazının etki mekanizması: İki adımlı mekanizma (Dey and Pridham, 1972).

Ayrıca bir alternatif olarak tek adımlı bir etki mekanizması önerilmiştir. Bu model, enzim, substrat ve akseptörün karboksil ve imidazol grupları ile üçlü bir kompleks oluşumunu kapsamaktadır. Galaktoz kısmının karbon atomundaki bir ön-yüz atağı ile konfigürasyonu korunmuş bir ürün oluşur (Şekil 1.3) (Dey and Pridham, 1972).



Şekil 1.3 Tatlı badem α -galaktozidazının etki mekanizması: Tek adımlı mekanizma.

Fenil- α -galaktozidlerin moleküler modelleri incelendiğinde, bu bileşiğin C1 ve 1C sandalye konformasyonlarının ön-yüz atağına izin vermediği görülmüştür. Bu sterik engel B2 ve 3B bot konformasyonlarında yoktur. Teorik olarak 3B konformasyonu tercih edilir. Bu yüzden tek adımlı mekanizmada galaktoz kısmının konformasyonu enzim-substrat kompleksi oluşumu sırasında C1'den 3B konformasyonuna dönüşebilmektedir (Dey and Pridham, 1972).

Enzimlerin reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında en önemli adım enzim aktif merkezinde yer alan aminoasit yan zincirlerinin ve bunların konumlarının belirlenmesidir. Bu aminoasitler bağlanma merkezi ve katalitik merkezde aktif olarak görev alırlar. Çoğu kez x-ışınları yöntemi uygundur. Fakat en çok kullanılan yöntem seçimli olarak reaksiyon veren reaktiflerle yapılan modifikasyon çalışmalarıdır (Uslan, 1997).

Hindistan cevizinden saflaştırılan α -galaktozidaz için önerilen etki mekanizmasında, 3,8 pK_a değerine sahip olan grup karboksil grubudur ve iyonize formda bulunur. Bu karboksilat anyonu sadece karbonyum aracı iyonunu stabilize

etmekle kalmaz, aynı zamanda nükleofilik atağı bir taraftan karbonyum iyonuna yöneltir. Bu yüzden ürün substrat ile aynı konfigürasyonu korur. Galaktoz molekülü karbonyum iyonu oluştuğunda yarım sandalye konformasyonuna sahip olabilir. pK_a 6,5 değerine sahip olan grup ise ya protonlanmış formda bulunan bir imidazol grubudur ya da lizozimde olduğu gibi bir karboksil grubudur. Bu grup, etrafındaki triptofan ve tirozin artıklarının varlığı ile oluşan hidrofobik çevreden dolayı korunmuştur ve katalizde H^+ verici olarak görev yapar. α -Galaktozidazların etki mekanizması ile ilgili yapılan tüm çalışmalar sonucunda, triptofan, tirozin ve karboksil gruplarının genellikle aktif merkezde ya da aktif merkezin yakınında bulunduğu sonucuna varılmıştır (Mathew and Balasubramaniam, 1987).

Trichoderma reesei kaynaklı α -galaktozidazlarla yapılan bir çalışmada, enzimin aktif merkezinde prostetik bir $-SH$ grubunun bulunduğu belirtilmiştir. Hidrojen peroksit, prostetik $-SH$ grubunu aktif merkezdeki mikroçevre ile stabilize edilen $S-OH$ grubuna yükseltgeyebilir ve etkin bir şekilde glikozid hidrolizini de katalizler (Kauchurin et al., 1993).

Vigna radiata α -galaktozidazının aktif merkezinde ise büyük olasılıkla bir enzim molekülü başına 12 adet karboksil grubu ile 9 adet histidin imidazol grubu bulunduğu ve bu grupların enzimin etki mekanizmasında önemli bir rol oynadığı tesbit edilmiştir (Dey, 1984).

Kahve çekirdeği α -galaktozidazının iki tirozin artığından (105. ve 108. pozisyonunda), 108. pozisyonundakinin α -galaktozidazın katalitik aktivitesi için önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kahve α -galaktozidazının katalitik mekanizmasında görev alan diğer önemli artıkların belirlenebilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalar da yapılmaktadır (Zhu et al., 1995).

Thermus thermophilus HB8 ile yapılan kimyasal modifikasyon çalışmaları sonunda, α -galaktozidazın aktif merkezde veya aktif merkez yakınında serbest karboksil grupları ve triptofan artıkları içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca yine aktif merkezde veya yakınında yer alan histidin ve sistein artıklarının da enzimatik aktivite açısından gerekli olabileceği tesbit edilmiştir (Telefoncu et al., 1998).

1.1.3 α -Galaktozidazların izolasyonu ve saflaştırılması

Enzimler çok çeşitli biyokimyasal teknikler kullanılarak izole edilip saflaştırılabilirler. Saflaştırmanın amacı daha sonraki çalışmalarda kullanılacak uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır. Bunun için öncelikle gereksinim duyulan protein miktarı, ne düzeyde bir saflık istendiği, ne düzeyde bir aktivite kaybının tolere edilebileceği, ne kadar zaman ve para harcanabileceği belirlenmelidir. Saflaştırılacak olan enzim seçilen kaynaktan hem kararlı olmalı, hem de bol miktarda bulunmalıdır. Ayrıca kolay sağlanabilir, bol ve ucuz kaynaklar daima tercih edilirler. Enzimlerin izolasyon ve saflaştırılmasında her zaman etkili, hızlı ve en ekonomik prosesler belirlenmeye çalışılır. İzolasyon adımı genellikle homojenizasyon ve homojenatın separasyonu gerçekleştirilir. Saflaştırmanın ilk adımlarında ise daha çok deriştirme yöntemleri, daha sonra ise kromatografik teknikler kullanılır (Telefoncu, 1996).

α -Galaktozidaz kaynağı olarak mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kaynaklar seçilerek, bilinen ekstraksiyon yöntemleri ile enzim izole edilip, saflaştırılmış ve saflaştırılan bu enzim karakterize edilerek çeşitli uygulama alanlarına sunulmuştur. α -Galaktozidazlar genellikle hücre içerisinde ve de diğer glikozidazlarla birarada bulunurlar. O nedenle bu aktiviteleri çoğu kez birbirinden ayırmak oldukça zor olmaktadır. İzolasyon ve saflaştırmada kullanılan teknikler; amonyumsülfat ve organik çözügen ile fraksiyonlama, ısı muamelesi, asidifikasyon, iyon değişim kromatografisi, jel kromatografisi ve izoelektrik fokuslama olarak sıralanabilir. Oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen homojen bir α -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az çalışma mevcuttur. Enzimin ilk kristal formu, bir fungus olan *Mortierella vinacea*'dan izole edilen α -galaktozidazdır (Thanankul et al., 1976).



Şekil 1.4 Pirinç α -galaktozidazının kristal yapısı (Fujimoto et al., 2003).

Pirinç α -galaktozidazının kristal yapısı 1,5 Å çözünürlük altında çoklu izomorf yerleştirme tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 1.4). Pirinç α -galaktozidazı, glikozil hidrolaz Sınıf 27 üyesi α -N-asetilgalaktozaminidaza benzer şekilde bir katalitik merkeze ve bir C-terminal merkeze sahiptir. Katalitik merkez, 8- fiçı (β/α) yapısında iken C-terminal merkezi Grek anahtar motifine sahip 8- β -katlanmış tabaka yapısındadır. Yapı çözümlenirken D-galaktoz kullanılarak substrat bağlama detayları belirlenmiştir. D-galaktoz molekülü katalitik merkezde yer alan ve C-terminale yakın yerde bulunan merkezi β -fiçidaki aktif merkeze bağlanmaktadır (Fujimoto et al., 2003).

Literatürde verilen α -galaktozidaz izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında bitkisel kaynak olarak mercimek (Dey et al., 1983; Bıçak Çelem et al., 2009), bakla (Bıçak Çelem and Önal, 2008), maş fasulyesi (Dey, 1984); karpuz (Itoh et al., 1986), hindistan cevizi (Balasubramaniam and Mathew, 1986; Lounteri et al., 1998), ananas (Önal and Telefoncu, 1998; Gupta and Saleemuddin, 2006) kahve tohumu (Cuourtois and Petek, 1988; Haibach et al., 1991; Weiser, 1992), portakal (Burns, 1990), alacalı at fasulyesi (Dhar et al., 1994), kavun (Gao and Schaffer, 1999), üzüm (Kang and Lee, 2001), pirinç (Kim

et al., 2002), b r lce (Somari and Balogh, 1993), fistic (Bryant et al., 2004), papaya (Soh et al., 2006), domates (Pressey, 1984; Chien and Lin-Chu, 1991;  nal and Telefoncu, 1998; alcı et al., 2009; Bayraktar et al., 2011), soya fasulyesi (Porter, 1990; 1992; Guimaraes et al., 2001; Viana et al., 2005), pepino (Şen et al., 2011), nohut (Singh and Kayastha, 2012); mikrobiyal kaynak olarak *Mortierella vinacea* (Thanankul et al., 1976), *Monascus pilosus* (Wong, 1986), *Escherichia coli* (Nagao et al., 1988), *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1999), *Bifidobacterium breve* (Xiao et al., 2000), *Candida guilliermondii* H404 (Hashimoto et al., 1993), *Rhizomucor miehei* (Katrolia et al., 2012), *Aspergillus parasiticus* (Shivam and Mishra, 2010), *Bacillus stearothermophilus* (Gote et al., 2004; 2006), *Pycnopus cinnabarinus* (Ohtakara, 1984; Mitsutomi et al., 1985), *Bacillus stearothermophilus* (Talbot and Sygusch, 1990), *Corynebacterium murisepticum* (Nadkarni et al., 1992), *Aspergillus niger* (Somari and Balogh, 1993), *Aspergillus oryzae* (Prashanth and Mulimani, 2005; Naganagouda and Mulimani, 2006; Girigowda and Mulimani, 2006), *Debaryomyces hansenii* (Viana et al., 2006; 2007), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (Zeilinger et al., 1993; Kristufek et al., 1994), *Candida javanica* (Cavazzoni et al., 1987), *Penicillium sp.* (Lounteri et al., 1998; Varbanets et al., 2001; Sinitsyna et al., 2008), *Rhizopus sp.* (Cao et al., 2007), *Gibberella fujikuroi* (Thippeswamy and Mulimani, 2002), *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* (King et al., 2002), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) ve *Thermomyces lanuginosus* (Rezessy-Szabo et al., 2007); hayvansal kaynak olarak insan plasentasi (Kusiak et al., 1978) ve insan karaciğeri (Dean and Sweely, 1979a; 1979b; 1979c; Alonso et al., 2005) enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Bu kaynaklardan izole edilen α -galaktozidazlar, genellikle tuz okt rmesi (Dhar et al., 1994; Lounteri, 1998), anyon ya da katyon değişim kromatografisi (Itoh et al., 1986), affinite kromatografisi (Sundaram and Yarmush, 1993), hidrofobik etkileşim kromatografisi (Talbot and Sygusch, 1990; Lounteri, 1998) ve jel filtrasyon teknikleri (Itoh et al., 1986; Ohtakara et al., 1984) kullanılarak saflaştırılmışlardır. Saflaştırılan α -galaktozidazlar başta biyoteknolojik prosesler olmak  zere birçok alanda uygulama imkanı bulmuŐlardır (Thanankul et al., 1976; Balasubramaniam and Mathew, 1986).

1.1.4 α -Galaktozidazların fiziksel özellikleri

1.1.4.1 α -Galaktozidazların multimoleküler formları ve molekül kütleleri

Genel olarak proteinlerin saflığının kontrolü, saf proteinin alt birim yapılarının incelenmesi ve molekül kütlesi tayini için poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezinin en yaygın kullanılanı Laemmli tarafından geliştirilen Sodyum Dodesil Sülfat PoliAkrilamid Jel Elektroforezidir (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). SDS-PAGE ile proteinler biyolojik ve biyokimyasal aktivitelerini yitirdikleri için bu durumda doğal koşullar altında elektroforez (PAGE) tercih edilmektedir. Proteinlerin moleküler kütlelerinin belirlenmesinde kullanılan SDS-PAGE'ne alternatif bir metod da moleküler boyuta göre ayırma yapan jel filtrasyon kromatografisidir (Zihnioğlu, 1996).

α -Galaktozidazların moleküler kütleleri ve yapıları kaynaktan kaynağa ve kullanılan tayin yöntemine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin; *Phaseolus vulgaris* α -galaktozidazının SDS-PAGE ile 38,3 ve 39,6 kDa'luk iki izoenzime sahip olduğu bulunmuştur (Dhar et al., 1994). *Aspergillus parasiticus* (Shivam and Mishra, 2010) α -galaktozidazının molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile 67,5 kDa olarak hesaplandığı belirtilmiştir. *Candida guilliermondii* H-404 α -galaktozidazının α -galaktozidaz-I ve α -galaktozidaz-II olarak iki formu bulunduğu ve bu iki enzimin de aynı moleküler kütleyle sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile 64 kDa ve jel filtrasyonu ile 270 kDa olarak hesaplanmıştır (Hashimoto et al., 1993). *Bacillus stearothermophilus* α -galaktozidazının molekül kütlesi SDS-PAGE ile 79,9 kDa ve jel filtrasyonu ile 165,9 kDa olarak bulunmuştur (Gote et al., 2006). *Pycnoporus cinnabarinus* α -galaktozidazının molekül kütlesi SDS-PAGE ile 52 kDa ve jel filtrasyonu ile 210 kDa olarak bulunmuş ve enzimin dört identik alt birime sahip olduğu belirtilmiştir (Ohtakara et al., 1984). *Cyamopsis tetragonolobus* α -galaktozidazının α -galaktozidaz-A, α -galaktozidaz-C₁ ve α -galaktozidaz-C₂ olmak üzere üç formu vardır. İkinci formun 97 kDa molekül kütlelerine sahip anyonik form olduğu ve 42 kDa'luk iki identik alt birime sahip olduğu

bulunmuştur (Shivanna et al., 1990). *Corynebacterium murisepticum*'dan saflaştırılan α -galaktozidazın ise homotetramerik bir protein olup her bir alt birimin 83 kDa olduğu SDS-PAGE ile belirlenirken, jel filtrasyonu ile enzimin 320 kDa molekül kütlesine sahip olduğu belirlenmiştir (Nadkarni et al., 1992). *Penicillium simplicissimum* α -galaktozidazının üç formu (α -galaktozidaz I, II ve III) saflaştırılarak molekül kütlelerinin sırasıyla 61, 84 ve 61 kDa olduğu bulunmuştur (Lounteri et al., 1998). Papaya α -galaktozidazının ise üç formu olduğu belirlenmiştir. Jel filtrasyonu ile α -galaktozidaz 1' in 57 kDa, α -galaktozidaz 2' nin 170 kDa ve α -galaktozidaz 3' ün 29 kDa molekül kütlesine sahip olduğu bulunmuştur. SDS-PAGE ile α -galaktozidaz 2 ve α -galaktozidaz 3 sırasıyla 52 ve 29 kDa' luk tek bant vermiştir. Schiff-periyodat ile boyama sonucunda papaya α -galaktozidazının glikoprotein yapısında olduğu PAGE ve SDS-PAGE çalışmaları α -galaktozidaz 2' nin 170 kDa molekül kütleli olduğu ve yapısının 52 kDa' luk alt birimlere sahip bir tetramer olduğu belirlenmiştir (Soh et al., 2006). Çizelge 1.2' de çeşitli kaynaklardan izole edilerek saflaştırılan α -galaktozidazların molekül kütleleri verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı α -galaktozidazların molekül kütleleri.

Enzim Kaynağı	α -Galaktozidaz	Molekül Kütle (kDa)	Yöntem	Kaynak
<i>Vicia faba</i> (bakla)	α -Galaktozidaz I	209	Jel Filtrasyonu	Dey and Pridham, 1972.
	α -Galaktozidaz II	38		
<i>Lens culinaris</i> (mercimek)	α -Galaktozidaz I	160	SDS-PAGE	Dey et al., 1983.
	α -Galaktozidaz II	40		
<i>Phaseolus vulgaris</i> (fasulye)	α -Galaktozidaz I	38,3	SDS-PAGE	Dhar et al., 1994.
	α -Galaktozidaz II	39,6		
<i>Coffea canephora</i> (kahve çekirdeği)	α -Galaktozidaz	36,7	SDS-PAGE	Haibach et al., 1991.
<i>Solanum muricatum</i> (pepino)	α -Galaktozidaz	38	SDS-PAGE	Şen et al., 2011.
<i>Carica papaya</i> (papaya)	α -Galaktozidaz I	57	Jel Filtrasyonu	Soh et al., 2006.
	α -Galaktozidaz II	170		
<i>Ananas comosus</i> (ananas)	α -Galaktozidaz	23,8	SDS-PAGE	Gupta and Saleemuddin, 2006.
<i>Vitis venifera</i> (üzüm)	α -Galaktozidaz	40-45	SDS-PAGE	Kang and Lee, 2001.
<i>Glycine max</i> (soya fasulyesi)	α -Galaktozidaz	150	Jel Filtrasyonu	Harpaz et al., 1978.
<i>Citrullus vulgaris</i> (karpuz)	α -Galaktozidaz	36	SDS-PAGE	Önal, 2000.
<i>Citrus cinensis</i> (Portakal)	α -Galaktozidaz I	36,3	SDS-PAGE	Burns, 1990.
	α -Galaktozidaz II	39,8		
<i>Debaryomyces hansenii</i>	α -Galaktozidaz	60	Jel Filtrasyonu	Viana et al., 2006.
<i>Lycopersicon esculentum</i> (domates)	α -Galaktozidaz	34	SDS-PAGE	Çalcı et al., 2009.
<i>Escherichia coli</i>	α -Galaktozidaz	51	SDS-PAGE	Nagao et al., 1988.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	α -Galaktozidaz	82	SDS-PAGE	Talbot and Sygusch, 1990.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	α -Galaktozidaz	93	SDS-PAGE	Rezessy-Szabo et al., 2007.
İnsan plesanta dokusu	α -Galaktozidaz A	103	SDS-PAGE	Kusiak et al., 1978.
	α -Galaktozidaz B	117	Jel Filtrasyonu	
İnsan karaciğeri	α -Galaktozidaz B	90	SDS-PAGE	Wiley, 1987.

1.1.5 α -Galaktozidazların kinetik özellikleri

1.1.5.1 α -Galaktozidazların aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi ve substrat spesiflikleri

α -Galaktozidazların enzimatik aktivitelerinin tayininde yapay veya doğal substratlar kullanılmaktadır. Yapay substratlar substitue fenil- α -D-galaktozidlerdir ve en çok kullanılan aktivite ölçüm substratlarıdır. α -Galaktozidazlarla etkileşen bu substratların reaksiyonu sonucu galaktoz ve p-nitrofenol artıkları oluşur. Melibioz, rafinoz ve stakiyöz α -galaktozidaz aktivitesi tayininde kullanılan doğal substratlardır. α -Galaktozidaz, melibiozu galaktoz ve glukoz, rafinozu galaktoz ve sukroza, stakiyözü ise galaktoz, sukroz ve rafinoza hidrolizler. Genellikle fenil- α -D-galaktozidlerin yüksek konsantrasyonları enzimi inhibe ederken melibioz, rafinoz ve stakiyöz gibi galaktoz içeren oligosakkaritler böyle bir inhibisyon göstermemektedir.

Genellikle glikozid substratların tek bir karbon atomundaki hidrojen ve hidroksil gruplarının konfigürasyonlarındaki değişme, ilgili hidrolazın hidrolitik karakterini ya tamamen inhibe eder, ya da hızını düşürür. α -Galaktozidazlarda substratın hidroliz hızına etki eden iki faktör vardır. Bunlardan birincisi, halka yapısı piranoid yapıda olmalı, ikincisi ise 1, 2, 3 ve 4 nolu C atomlarındaki H ve OH gruplarının konfigürasyonu α -D-galaktoza benzerlik göstermelidir. Diğer glikozidazlarda, β -galaktozidaz, β -glukozidaz ve α -mannozidaz gibi, substratın glikozil yapısının C-6 karbonundaki değişiklikler genellikle α -galaktozidazlarca tolere edilir. Bu nedenle, β -L-arabinozidler de bazı α -galaktozidazlarca hidrolizlenebilmektedir. Ayrıca, D-galaktoz konfigürasyonuna sahip bir bileşik olan p-nitrofenil- α -D-fukozit de α -galaktozidazlarla hidrolizlenebilmektedir. D-gliser-D-galakto-heptozidlerin de α -galaktozidazlar için substrat olarak kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir (Yoshida et al., 1987).

Enzimlerin substrata olan afinitesi ($1/K_m$), büyük ölçüde glikon yapısındaki yapısal değişikliklere bağlıdır ve yapıya göre şu sıra izlenir: α -D-galaktozid, α -D-fruktozid ve α -D-arabinozid. Bu da, substratın enzime

bağlandığı spesifik noktalardan birisi galaktozun primer alkol grubundan dolaydır.

Bir substratın aglikon grubu glikozidazlarla hidrolizde belirli bir etkiye sahip olabilir ya da olmayabilir. Normal olarak bu grup, hidrolizi tamamen inhibe etmez. Doğal olarak oluşan sentetik α -D-galaktozidler çeşitli α -galaktozidazlarla hidrolizlenebildiği bilinmektedir. Galaktozidler: metil-, etil-, n-propil-, fenil-, o-nitrofenil-, m-nitrofenil-, p-nitrofenil-, o-kresil-, m-kresil-, m-klorofenil-, 1-naftil-, 2-naftil- ve 6-bromo-2-naftil- α -D-galaktozidler, galaktinol, digalaktozilgliserol ve α -D-galaktozilflorür. Oligosakkaritler: melibioz, epimelibioz, melibitol, melibiyonik asit, rafinoz, umbelliferoz, planteoz, manninotrioz, stakiyöz ve verbaskoz. Bu polisakkaritler D-galaktozil artıklarının α -1,6-bağları ile bağlandığı β -1,4-bağlı D-mannozil artıklarından oluşmuşlardır. Bitkisel kaynağa göre de galaktoz içeriği değişmektedir.

Genel olarak aril- α -D-galaktozidler alkil türevlerinden ve disakkaritlerden daha iyi substratlardır. K_m ve V_{max} değerleri arasındaki ilişki aglikonların değişimi ile oldukça düzensizdir ve enzimin substrata olan yüksek ilgisinin yüksek V_{max} değerleri ile paralel olması gerekmez. İlgiye etki eden faktörler büyük olasılıkla oldukça komplekstir ve aromatik substituentin pozisyonunu, büyüklüğünü, elektronik etkisini ve hidratasyon derecesini de kapsar.

Galaktoz içeren oligosakkaritlere (melibioz, manninotrioz gibi) bağlı olarak, terminal indirgen ucun indirgenmesi enzimatik hidroliz hızını düşürür. İndirgen grubun oksidasyonu, melibiozun melibiyonik aside dönüşümünde, hidroliz hızını etkilemediği tesbit edilmiştir. α -Galaktozidler homolog serilerinde hidroliz hızı, zincir uzunluğu arttırılarak düşürülebilir (Dey and Pridham, 1972). Çizelge 1.3'de çeşitli kaynaklardan saflaştırılan α -galaktozidazların substrat spesifiklikleri ile ilgili sonuçlar verilmiştir (Önal, 2000).

Çizelge 1.3 α -Galaktozidazların substrat spesifiklikleri.

Enzim Kaynağı	α -Galaktozidaz	Substrat	K_m (mM)	Kaynak
<i>Phaseolus vulgaris</i> (fasulye)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,75	Dhar et al., 1994.
		m-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,1	
		o-nitrofenil α -D-galaktopiranozid	2,27	
<i>Lens culinaris</i> (mercimek)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,4	Dey et al., 1983.
		p-nitrofenil- α -D-fukozid	1,8	
		Rafinoz	23,8	
		Stakiyoz	47,6	
		Galaktinol	94,6	
<i>Coffea canephora</i> (kahve çekirdeği)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,26	Haibach et al., 1991.
<i>Carica papaya</i> (papaya)	α -Galaktozidaz 1	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,36	Soh et al., 2006.
	α -Galaktozidaz 2	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,35	
	α -Galaktozidaz 3	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,09	
<i>Solanum muricatum</i> (pepino)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,37	Şen et al., 2011.
<i>Glycine max</i> (soya fasulyesi)	P1	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,55	Guimaraes et al., 2001.
	P2	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,76	
		Rafinoz	5,53	
		Melibioz	5,34	
<i>Penicillium sp. 23</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,0	Varbanets et al., 2001.
		Rafinoz	5,7	
		Melibioz	4,0	
		Stakiyoz	3,5	
<i>Ananas comosus</i> (ananas)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,22	Önal and Telefoncu, 1998.
<i>Citrullus vulgaris</i> (karpuz)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,32	Önal, 2000.
		Rafinoz	12,6	
<i>Lycopersicon esculentum</i> (domates)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,07	Okutucu et al., 2010.

Çizelge 1.3 α -Galaktozidazların substrat spesifiklikleri (devam).

Enzim Kaynağı	α -Galaktozidaz	Substrat	K_m (mM)	Kaynak
<i>Debaryomyces hansenii</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,30	Viana et al., 2006.
		Rafinoz	16	
		Stakiyoz	9,66	
		Melibioz	2,01	
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,83	Prashanth and Mulimani, 2005.
		Rafinoz	5,5	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,625	Gote et al., 2004.
		Rafinoz	6,66	
		Stakiyoz	3,33	
		Melibioz	13,33	
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	1,13	Rezessy-Szabo et al., 2007.
		Rafinoz	1,61	
		Stakiyoz	1,17	
<i>Aspergillus terreus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,1	Shankar et al., 2009.
		o-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,28	
		Rafinoz	0,42	
		Stakiyoz	0,33	
<i>Candida javanica</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	11	Cavazzoni et al., 1987.

1.1.5.2 α -Galaktozidaz aktivitesi ve kararlılığına sıcaklığın etkisi

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi, enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağlıdır ve reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış gösterir. Fakat bu artış sürekli değildir. Özellikle 40°C' nin üzerinde inkübasyon süresine bağımlı olarak önce bir duraklama, daha sonra da gerileme gösterir. Ana yapısı protein olan enzimler sıcaklıkla denaturasyona uğrarlar. Belirli çalışma koşullarında farklı sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir.

Optimum sıcaklık inkübasyon süresine bağımlı bir parametredir (Telefoncu, 1986).

α -Galaktozidazlar da kaynaklarına bağılı olarak çeşitli kararlılık dereceleri gösterirler. Genellikle α -galaktozidazların çoğunun optimum sıcaklık değerleri 37-60°C arasında değişmektedir. Fakat mikrobiyal kaynaklı termostabil α -galaktozidazlar için bu değer 40°C'nin çok üstüne de çıkabilmektedir. Örneğin; *Pycnopus cinnabarinus* (Ohtakara et al., 1984), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (Zeilinger et al., 1993), *Monascus pilosus* (Wong et al., 1986), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 75, 60, 55 ve 80°C olarak belirlenmiştir. *Cladosporium cladosporides* α -galaktozidazının 40-60°C aralığında, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* α -galaktozidazlarının 40-50°C aralığında 30 dakika süreyle inkübe edildiğinde oldukça termostabil oldukları gözlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında enzim aktivitesinde bir azalma olurken, *C. cladosporides* için 70°C' de, *A. niger* ve *A. oryzae* için 65°C' de tamamen bir aktivasyon gerçekleşmektedir (Mansour and Khalil, 1998). *Candida guilliermondii* H404 α -galaktozidazlarından α -galaktozidaz I ve II için optimum sıcaklık 75°C olarak belirlenmiştir. Bu enzimlerin sırasıyla 70°C ve 45°C'nin altındaki sıcaklıklarda kararlı oldukları belirlenmiştir (Hashimoto et al., 1993). *Pycnopus cinnabarinus* α -galaktozidazı için optimum sıcaklık değeri 75°C olup enzim pH 5,0' de kararlıdır. pH 3,5 ya da 90°C' de enzim tamamen aktivitesini kaybetmektedir. 75°C' nin altındaki sıcaklıklarda aktivitede pek kayda değer bir kayıp olmazken, 80°C ve üzerindeki sıcaklıklarda enzim inaktive olmaktadır (Ohtakara et al., 1984). *Candida javanica* α -galaktozidazı, p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (PNPG) ve melibioz için maksimum aktiviteyi 70°C' de göstermektedir. Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi incelendiğinde, 15 dakikada 30°C' de inkübasyon sonucu enzim başlangıç aktivitesini % 100 korurken, 60°C' de % 80'ini, 80°C' de ise % 60' ını koruyabilmektedir (Cruz et al., 1981). *Penicillium simplicissimum* α -galaktozidazlarından α -galaktozidaz II, pH 5,0 ve 60°C' de ve aynı zamanda pH 8,0 ve 50°C' de 24 saat boyunca başlangıç aktivitesinin % 80'ini korurken (Lounteri et al., 1998), 50°C' nin üzerinde 60 dakika inkübasyona maruz kalan

Trichoderma reesei RUT C-30 α -galaktozidazı da başlangıç aktivitesinin % 80' ini koruyabilmiştir (Zeilinger et al., 1993). *Thermus thermophilus* HB-8 α -galaktozidazının optimum sıcaklık değeri 80°C olarak belirlenmiş ve bu değerin rapor edilmiş α -galaktozidazlar arasında en yüksek sıcaklık değeri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, enzimin 100°C' de bile aktivitesini % 85 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık optimumuna sahip olması ve termostabil olması nedeniyle *T. thermophilus* HB8 α -galaktozidazının yüksek sıcaklıklarda işleyen proseslerde uygun olabileceği öne sürülmüştür (Telefoncu et al., 1998). Soya fasulyesi α -galaktozidazının 70°C' de dahi ısıya dayanıklı bir enzim olduğu ve de oligosakkarit hidroliz prosesleri için gerekli ısı şartını (50°C) sağladığı için kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir (Porter et al., 1992). *Aspergillus niger*, *Saccharomyces olivaceus*, *Prunus amygdalus*, *Candida ensiformis* ve sığır karaciğeri α -galaktozidazları düşük sıcaklıklarda saklanabilirken, *Vicia faba* enzimi sıfırın altındaki sıcaklıklarda tamamen inaktive olmaktadır (Dey and Pridham, 1972). *Aspergillus parasiticus* α -galaktozidazı o-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (OPNG) substratı için maksimum aktiviteyi 50°C' de göstermektedir. 65°C' de, 30 dakika süre ile inkübe edildiğinde enzimin oldukça termostabil olduğu gözlenmiştir (Shivam and Mishra, 2010). *Tachigali multijuga* α -galaktozidazı ise maksimum aktiviteyi 50°C' de göstermektedir. 30 ve 40°C' de oldukça kararlı yapıdadır ancak 50°C' de 30 dakika bekletildiğinde aktivitesinin % 79'unu kaybetmektedir (Filho et al., 2006). *Bacillus stearothermophilus* α -galaktozidazı ise termostabil özellik göstermektedir. Optimum aktiviteyi 65°C' de göstermektedir ve 70°C' de 80 dakika sonunda aktivitesinin % 50' nin altına düştüğü belirtilmiştir (Gote et al., 2003). Çizelge 1.4' de çeşitli α -galaktozidazların termal kararlılıkları ile ilgili bazı sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 1.4. α -Galaktozidazların termal kararlılıkları.

Enzim Kaynağı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Aktivite kaybı (%)	Kaynak
<i>Vicia faba</i> (bakla)	60	30 dk	42	Dey and Pridham, 1972.
<i>Lens culinaris</i> (mercimek)	65	30 dk	42	Bıçak Çelem et al., 2009.
<i>Solanum muricatum</i> (pepino)	45	30 dk	40	Şen et al., 2011.
<i>Rhizopus sp.</i> Aga-F78	60	20 dk	82	Cao et al., 2007.
<i>Aspergillus terreus</i>	70	20 dk	30	Shankar et al., 2009.
<i>Glycine max</i> (soya fasulyesi)	50	30 dk	78	Harpaz et al., 1978.
<i>Aspergillus oryzae</i>	50	12 sa	12	Prashanth and Mulimani, 2005.
<i>Lycopersicon esculentum</i> (domates)	45	30 dk	40	Çalcı et al., 2009.
<i>Bacillus thermophilus</i>	65	24 sn	30	Dey and Pridham, 1972.
Sığır karaciğeri	50	60 dk	20	Zeilinger et al., 1993.

1.1.5.3 α -Galaktozidaz aktivitesi ve kararlılığına pH'nin etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden en önemlisi pH etkisidir. İnkübasyon ortamının pH'sı, protein molekülünün tamamının yük ve dissosiasyon durumu yanında aktif merkezi de etkilemektedir. pH etkisi özellikle şu sonuçlara neden olmaktadır: enzim proteinin tersinir olmayan denaturasyonu ve optimum pH bölgesi dışında koenzim veya prostetik grupların aktif merkezden ayrılması. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH, optimum pH'dır. H⁺ iyonu konsantrasyonundaki değişme özellikle aktif merkezinde asidik veya bazik gruplar taşıyan enzimler, özellikle de hidrolazlar için çok etkindir ve enzimin aktivite gösterdiği pH skalası da oldukça dardır (Telefoncu, 1986).

α -Galaktozidazların optimum pH değerleri kullanılan enzim kaynağına, substrata, inkübasyon zamanı ve sıcaklığa göre oldukça geniş bir aralıkta farklılık göstermektedir. Bazen α -galaktozidazlar iki optimum pik verirken, çoğu tek bir optimum piki verir. α -Galaktozidazların çoğu geniş bir asidik pH aralığında kararlıdır.

Bakteriyel α -galaktozidazlar pH 6,0-7,5; fungal ve maya α -galaktozidazları pH 3,5-5,0; hayvansal α -galaktozidazlar pH 3,5-5,5; bitkisel α -galaktozidazlar ise pH 3,5-6,5 arasında pH optimumu verirler. Aşağıda çeşitli α -galaktozidazlarla yapılan çalışmalar sonucu elde edilen optimum pH ve pH kararlılık verileri sunulmuştur. α -Galaktozidaz aktivitesine pH' nın etkisinin anlaşılması, bu pH etkisinin enzim kaynağı ve substrata göre değişiminin incelenmesi açısından oldukça önemlidir (Önal, 2000).

Cladosporium cladosporioides α -galaktozidazının optimum pH' sı p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (PNPG) için pH 7,0; melibioz, rafinoz ve stakiyöz için pH 5,0 olarak bulunmuştur. pH 6,3' de tüm substratlar için bağıl aktivite % 90 olup, bu pH' da enzim oldukça kararlıdır (Cruz et al., 1981). *Trichoderma reesei* RUT C-30 α -galaktozidazı, substrat olarak PNPG ile pH 4,0' de bir optimum verirken pH 4,0-8,0 gibi oldukça yaygın bir aralıkta kararlıdır. Ancak enzimin yüksek pH değerlerine karşın düşük pH' larda daha kararlı olduğu belirtilmiştir (Zeilinger et al., 1993). *Penicillium simplicissimum* α -galaktozidazlarından α -galaktozidaz I ve II pH 3,0-4,5 aralığında, α -galaktozidaz III ise pH 4,0-5,0 aralığında geniş bir pH aralığına sahiptir (Lounteri et al., 1998). *Citrullus battich* (karpuz) α -galaktozidazına pH etkisi yapay substratlar ve oligosakkaritler kullanılarak incelenmiştir. Yapay substratlardan p-nitrofenil- α -galaktozid ve 4-MU- α -galaktozid kullanıldığında enzimin optimum pH' ı sırasıyla pH 5,8 ve 6,0 olarak bulunmuştur. Oligosakkaritlerden melibioz, rafinoz ve stakiyöz ise pH 3,5-5,5 aralığında oldukça geniş bir pH aralığı göstermektedir. Sonuçta karpuz α -galaktozidazının doğal substratları hidrolizlediği ve optimum pH' ının yapay substratlarıinkinden daha düşük olduğu belirtilmiştir (Itoh et al., 1986). Çeşitli α -galaktozidazların optimum pH değerleri Çizelge 1.5' de verilmiştir.

Çizelge 1.5 α -Galaktozidazların optimum pH değerleri.

Enzim Kaynağı	α -Galaktozidaz	Substrat	Optimum pH	Kaynak
<i>Phaseolous vulgaris</i> (fasulye)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	6,4	Dhar et al., 1994.
<i>Lens culinaris</i> (mercimek)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	6,1	Dey et al., 1983.
<i>Coffea canephora</i> (kahve çekirdeği)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	4,7	Yagi et al., 1990.
	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	6,0	
<i>Carica papaya</i> (papaya)	α -Galaktozidaz 1	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,5	Soh et al., 2006.
	α -Galaktozidaz 2	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	3,0	
<i>Citrus cinensis</i> (Portakal)	α -Galaktozidaz 3	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,5	Burns, 1990.
	α -Galaktozidaz I	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,0	
	α -Galaktozidaz II		4,5	
<i>Solanum muricatum</i> (pepino)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,5	Şen et al., 2011.
<i>Glycine max</i> (soya fasulyesi)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,0	Viana et al., 2005.
<i>Ananas comosus</i> (ananas)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,5	Önal and Telefoncu, 1998.
<i>Citrullus vulgaris</i> (karpuz)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	6,0	Önal, 2000.
<i>Lycopersicon esculentum</i> (domates)	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	4,0	Okutucu et al., 2010.
<i>Debaryomyces hansenii</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,0	Viana et al., 2006.
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	4,8	Prashanth and Mulimani, 2005.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	6,5-7,0	Gote et al., 2004.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,0-5,5	Rezessy-Szabo et al., 2007.
<i>Aspergillus terreus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	5,0	Shankar et al., 2009.
<i>Trichoderma reesi</i> RUT C-30	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	4,0	Zeilinger et al., 1993.
<i>Mortierella vinacea</i>	α -Galaktozidaz	Melibioz	4,0-6,0	Dey and Pridham, 1972.
Fare beyni	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil - α -D-galaktopiranozid	4,9	Dey and Pridham, 1972.
İnsan plesantası	α -Galaktozidaz A	4-MU- α -D-galaktopiranozid	4,4	Kusiak et al., 1978.
	α -Galaktozidaz B			

1.1.5.4 α -Galaktozidaz aktivitesine çeşitli kimyasalların ve inhibitörlerin etkisi

Enzimatik reaksiyonun hızını azaltan maddeler inhibitör olarak adlandırılırlar. Enzimatik reaksiyonların inhibisyonu incelenerek önemli bilgiler edinilebilir. İnhibisyon yaratan maddelerin etki şekillerinin belirlenmesine söz konusu enzimlerin metabolizmadaki önemlerini aydınlatılmak için ihtiyaç duyulur. Birçok enzim için spesifik inhibitörler üretilir ve bu inhibitörler kontaminasyona neden olan, ana enzim preparatından ayrılması güç veya imkansız olan enzim aktivitelerinin ortadan kaldırılmasında kullanılır (Telefoncu, 1986).

α -Galaktozidazlarla yapılan inhibisyon çalışmalarında üç sınıf inhibitör kullanılmaktadır. Bunlar grup spesifik reaktifler, metal iyonları ve şekerler ile bu şekerlerin türevleridirler. Grup spesifik reaktiflerden en çok sülfidril reaktifleri (p-kloromerküribenzoat, N-etil maleimid ve iyodoasetamid...) metal iyonlarından Ag^+ , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , Ba^{+2} ile inhibisyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Şeker ve şeker türevi olarak da D-galaktozun yapısal analogu olan L-arabinozun ve D-fukozun inhibitör etkileri sıklıkla araştırılmıştır (Dey and Pridham, 1972; Zambau et al., 1993).

Metal iyonlarının α -galaktozidaz aktivitesi üzerine ne tip bir inhibisyon gerçekleştirdiği belirlenmiştir. *Pycnopus cinnabarinus* α -galaktozidazı Hg^{+2} ile yarışmasız (Ohtakara et al., 1984), *Prunus amygdalus* ve *Vicia faba* α -galaktozidazları Ag^+ ve Hg^{+2} iyonları ile yarışmalı ve *Mortierella vinacea* α -galaktozidazı da yarışmasız olarak inhibe edilmektedir (Dey and Pridham, 1972).

Pycnopus cinnabarinus α -galaktozidazı şekerlerden galaktoz, melibioz, glukoz, maltoz ve stakiyoz ile kuvvetlice inhibe olurken rafinoz enzim üzerinde çok zayıf bir inhibisyon etkisi yaratmaktadır. D-galaktoz ve Hg^{+2} ile oluşan inhibisyonların yarışmasız tipte olduğu belirlenmiştir (Ohtakara et al., 1984).

Cucurbita pepo enziminin divalent katyonlardan Ca^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} ile kısmen, Cu^{+2} , Ag^{+2} , Hg^{+2} iyonları ve p-merküribenzoat ile oldukça yüksek oranda inhibe edildiği belirlenmiş ve bunun da enzimin aktif merkezinde bir sülfidril grubunun varlığına işaret ettiği belirtilmiştir. Ayrıca enzim için D-galaktoz oldukça kuvvetli inhibitör etkisi göstermektedir (Gauderault and Webb, 1983).

Aspergillus terreus α -galaktozidazının EDTA ve 1,10-fenantrolin ile inhibe olmaması enzimin metaloenzim olmadığını göstermektedir. Enzimin N-bromosüksinamid ile inhibe olması aktif merkezinde ya da aktif merkez yakınında triptofan varlığına işaret etmektedir. Ayrıca enzimin yine PMSF ile inhibe olmaması aktif merkez yakınlarında serin grubuna sahip olmadığını bir göstergesidir. Enzim esansiyel sülfidril grubu içerdiği için Hg^{+2} ile inhibe olmaktadır (Shankar et al., 2009).

Citrullus battich (karpuz) α -galaktozidazı 1 mM Ag^{+} ve Hg^{+2} iyonları ve p-merküribenzoat ile oldukça yüksek oranda inhibe olmaktadır ve enzimin aktif merkezinin bir sülfidril grubunun içerdiği belirlenmiştir (Itoh et al., 1986).

Debaryomyces hansenii α -galaktozidazı galaktoz ve melibioz ile yarışmasız olarak inhibe olmaktadır. EDTA ve iyodoasetamid ile inhibe olmadığı için enzimin bir metaloenzim olmadığı ve aktif merkezinde sülfidril gruplarının yer almadığı belirtilmiştir (Viana et al., 2006).

Bacillus stearothermophilus (NCIM-5146) α -galaktozidazı 1 mM Ag^{+} , Hg^{+2} , PCMB ve Cu^{+2} ile tamamen inhibe olmaktadır. Bu inhibisyon aktif merkezde tiyol grupları ve/veya karboksil, amino ve histidinin imidazol gruplarının var olduğunu göstermektedir (Gote et al., 2006).

Çizelge 1.6' da çeşitli kaynaklardan izole edilen α -galaktozidazlar, inhibitörleri ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkileri verilmiştir.

Çizelge 1.6 α -Galaktozidaz aktivitesine çeşitli inhibitörlerin etkisi.

Enzim Kaynağı	İnhibitör	İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Kaynak
<i>Citrullus battich</i> (karpuz)	Ag ⁺	1	3,8	Itoh et al., 1986.
	Hg ⁺²	1	3,8	
	PCMB	1	5,8	
	Galaktoz	10	20,8	
<i>Vicia faba</i> (bakla)	Ag ⁺	0,001	23	Dey and Pridham, 1972.
	Hg ⁺²	25	46	
<i>Candida guiliermondii</i> H404	Ag ⁺	1	2,8 (α -Gal I)	Hashimoto et al., 1993.
			1,9 (α -Gal II)	
	Hg ⁺²	1	12(α -Gal I)	
			13 (α -Gal II)	
<i>Penicillium canescens</i>	Cu ⁺²	1	97(α -Gal I)	SinitSYna et al., 2008.
			74 (α -Gal II)	
	Cu ⁺²	100	80 (α -Gal A)	
	Cu ⁺²	200	0 (α -Gal C)	
	Zn ⁺²	100	20 (α -Gal C)	
<i>Aspergillus terreus</i>	N-bromosüksinamid		0	Shankar et al., 2009.
	Hg ⁺²		0	
	Zn ⁺²		68	
	Cu ⁺²		0	
	Ag ⁺		0	
<i>Rhizops sp.</i> F78	Cr ⁺³		63,9	Cao et al., 2007.
	Mn ⁺²		49,5	
	SDS		0	
	Hg ⁺²		0	
	Ag ⁺		0	
	Al ⁺³		66,7	
	Fe ⁺²		75,1	

1.1.6 α -Galaktozidazların fizyolojik önemi ve uygulama alanları

α -Galaktozidazlar, doğada oldukça yaygın olarak bulunan glikozidaz sınıfı enzimler olup galaktooligosakkaritler ve polisakkaritlerde bulunan α -1,6-bağlı galaktoz birimlerini hidrolizler. Bu enzimin ana fizyolojik fonksiyonu, galaktooligosakkaritleri hidrolizlemesi ve oluşan serbest şekerlerin de hazır enerji kaynağı olarak kullanılabilmesidir (Shivanna et al., 1990; Ohtakara et al., 1984). Tohumlardaki α -galaktozidazlar, polisakkaritlerin kullanımından önce, çimlenmenin başlangıç adımı D-galaktoz içeren oligosakkaritleri mobilize ederler. Sonuçta D-galaktoz oluşur ve bu da glikolitik yola gönderilerek burada tüketilir. Böylece fide oluşumu için gerekli olan başlangıç enerjisi de bu şekilde sağlanmış olur (Dey et al., 1983). Ayrıca α -galaktozidazların bazı besin maddelerinin (hurma, hindistan cevizi gibi) hücre duvarlarının gelişmesinde ve çimlenme aşamasında önemli bileşenler oldukları belirlenmiştir (Balasubramaniam and Mathew, 1986; de Mason et al., 1992).

α -Galaktozidazların pek çok kullanım alanı mevcuttur. Diğer glikozidaz aktivitelerinden yoksun galaktozidaz preparatları ile yapılan karbohidrat yapı çalışmaları ve membran modifikasyon çalışmaları oldukça önemlidir (Dhar et al., 1994).

Glikozidazlar, hem hidrolitik aktiviteleri nedeniyle glikozidik bağların hidrolizinde kullanılabilirler, hem de transglikolizasyon aktiviteleri nedeniyle karbohidrat yapılarını çeşitli bileşiklerin hidroksil gruplarına transfer edebilirler. Glikozidazların bu transglikozilasyon aktivitesi çeşitli oligosakkaritlerin enzimatik sentezinde kullanılabilir (Yanahira et al., 1998). α -Bağlı galaktozidik bağların hidrolizi kadar α -bağlı galaktooligosakkaritlerin transgalaktozilasyon veya tersinir reaksiyonlarla sentezi de α -galaktozidazların önemli bir uygulamasıdır. Transgalaktozilasyon reaksiyonu ile α -galaktozidazın oluşturduğu α -bağlı galaktooligosakkaritler, çok az çalışma sonucunda elde edilebilmiştir. α -Bağlı galaktooligosakkaritler aynı zamanda tersinir reaksiyon ile de oluşturulabilmektedir. Genellikle bu reaksiyonlar ile oluşturulan α -bağlı galaktooligosakkaritler birbirinden ayrılması güç olan pozisyonel izomerlerin bir

karışımıdır. Fakat bu oligosakkaritler α -galaktozidazların transgalaktozilasyonu için donör substratlar olarak uygundur (Hashimoto et al., 1995). Başlangıç materyali olarak ucuz ve kolay elde edilebilmesi nedeniyle, tersinir reaksiyonlar kullanılarak yapılan oligosakkarit sentezlerinde, laktoz hidrolizatları (galaktoz ve glukoz karışımı) kullanılabilir. Yalnız bu durumda önemli olan, reaksiyonda kullanılan enzim preparatında α -galaktozidazdan başka glikozidazların (β -galaktozidaz, α -glukozidaz ve β -glukozidaz gibi) bulunmaması gerekmektedir (Hashimoto et al., 1993). *C. guilliermondii* H404 enzimi oldukça kuvvetli bir transgalaktozilasyon aktivitesine ve oldukça geniş bir akseptör spesifikliğine sahiptir. Enzimin tersinir reaksiyonu ile laktoz hidrolizatlarından sentezlenen α -bağlı galaktooligosakkaritler, transgalaktozilasyon için uygun donör substratlarıdır ve çok çeşitli yeni α -bağlı galaktooligosakkaritler bu yolla üretilebilmektedir (Hashimoto et al., 1995). Bu organizma, intrasellüler olarak α -galaktozidazın yanısıra çok az da olsa β -galaktozidaz, α -glukozidaz ve β -glukozidaz gibi diğer glikozidazları da üretmektedir. Bu glikozidazlar da laktoz hidrolizatını kullanan α -galaktozidazların tersinir reaksiyonlarına etki ederler. Sağlam hücrelerdeki glikozidazlar, α -galaktozidaza herhangi bir zarar vermeden ısısal işlemle inaktive edilebilir. Böylece ısısal işlem görmüş hücreler, laktoz hidrolizatlarından tersinir reaksiyon ile α -bağlı galaktooligosakkaritleri sentezleyecek olan α -galaktozidaz preparatı olarak kullanılabilir. *C. guilliermondii* H404 α -galaktozidazı, temel olarak α -(1,6)-bağlı galaktozları, az da olsa bununla beraber α -(1,1)-, α -(1,2)- ve α -(1,3)- bağlı galaktozları, eser miktarda da α -(1,4)-bağlı galaktozları sentezlemektedir. Fakat α -(1,5)-galaktobiozları sentezleyememektedir. Tersinir reaksiyonlar sonucu oluşan ürün bileşimi büyük ölçüde enzimin substrat spesifikliği ile yakından ilgilidir. Maya α -galaktozidazının tersinir reaksiyonu ile galaktozdan α -galaktobioz, *Mortierella vinacea* ve *Pycnoporus cinnabarinus* α -galaktozidazlarının tersinir reaksiyonu ile galaktoz ve sukrozdan α -galaktozil-sukroz sentezlenmiştir (Hashimoto et al., 1995). Termostabil bir enzim olan *Candida guilliermondii* α -galaktozidazı uygun bir akseptör yoksa tek bir transfer ürünü sentezler. Donör substrat olarak melibioz kullanıldığında ise ana ürün O- α -D-galaktozil-(1,6)-O- α -D-galaktozil (1,6)-D-glukoz'dur. Enzim oldukça geniş bir akseptör spesifikliğine sahiptir. D-Glukoz,

D-galaktoz, maltoz, maltitol ve 1,4-bütandiol bu enzimin katalizlediği transgalaktozilasyon reaksiyonlarında en etkin akseptörlerdir.

Enzim aynı zamanda α -galaktozil artıklarını pentozlara (L-arabinoz, D-ksiloz ve D-riboz) ve metil pentozlara (D-fukoz ve D-ramnoz) transfer edebilir. Akseptör laktoz, maltoz ve sukroz iken ana transfer ürünü sırasıyla O- α -D-galaktozil-(1,6)-O- β -D-galaktozil-(1,4)-D-glukoz, O- α -D-galaktozil-(1,6)-O- α -D-galaktozil-(1,4)-D-glukoz ve O- α -D-galaktozil-(1,6)-O- α -D-galaktozil-(1,2)- β -D-fruktozid (rafinoz) dir (Hashimoto et al., 1995). Genellikle α -galaktozidazların galaktozil artıklarını akseptör şekerin primer alkol grubuna tercihen transfer ettiği bilinmektedir. Akseptör olarak rafinoz kullanıldığında transfer ürünü olarak stakiyöz oluşmaktadır. *Pycnopus cinnabarinus* α -galaktozidazı rafinoz tip oligosakkaritlerin yanısıra α -(1,3)-bağlı galaktozidik bağlar içeren oligosakkaritleri de sentezler, fakat miktar olarak daha azdır. Enzim, rafinoz sınıfı oligosakkaritlerin terminal galaktoz artıklarının C3 ve C6 hidroksil gruplarına, sukrozun glukoz artığının C3 hidroksil grubuna transferini katalizler (Mitsutomi and Ohtakara, 1988). Kahve çekirdeği α -galaktozidazı kullanılarak p-nitrofenil- α -D-galaktopiranoziden 1-deoksinojirimisine bir transgalaktozilasyon reaksiyonu yapılmıştır. Ana ürün olarak 6-O- α -D-galaktopiranozil-1-deoksinojirimisin oluşmuştur. Bunun da fizyolojik önemi kan-glukoz düzeyinin regülasyonunda etkin bir bileşik olmasıdır. Ayrıca yine aynı enzim ile transgalaktozillenmiş 1-deoksinojirimisin sentezlenebilmektedir. Bu da antihiperглиsemik ve tükürük salgısı ajanı olarak önemli bir bileşiktir (Paek et al., 1998). İmmobilize edilmiş *Bacillus circulans* β -galaktozidazının transglikozilasyon reaksiyonu ile asidik karakterli β -(1,3) bağli disakkaritler sentezlenmiştir. Galaktozil donörü olarak laktoz, akseptör olarak N-asetilnöraminik asit ve glukuronik asit kullanılmıştır (Naundorf et al., 1998). *Monascus pilosus* α -galaktozidazı ile yapılan bir diğer çalışmada, enzimin melibioz, rafinoz ve stakiyözü kendi temel bileşenlerine hidrolizlediği ve yeni bir oligosakkarit oluşmadığı tesbit edilmiştir. Bu nedenle, enzimin transferaz aktivitesine sahip olmadığına ya da aktivitenin çok çok düşük olduğuna karar verilmiştir (Wong et al., 1986).

Fabry hastalığı, insanlarda görülen ve termolabil lizozomal α -galaktozidaz A enziminin eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. İnsan orijinli lizozomal α -galaktozidazlar Fabry hastalığı ile ilgili oldukları için ilginç moleküllerdir. Normal insan dokularında enzimin α -galaktozidaz A ve α -galaktozidaz B olmak üzere iki formu bulunur. Fabry hastalığına yakalanan kişide α -galaktozidaz A aktivitesi eksikken, B aktivitesi ya normal ya da yüksek bir değerdedir (Wong et al., 1986; Dean and Sweely, 1979). Lizozomal bir depolama hastalığı olarak sınıflandırılan bu hastalıkta bir asit α -galaktozidazı olan seramidtriheksozidaz enzimi eksik olup, bu da enzimin doğal substratı olan seramidtriheksozid kullanılarak belirlenir. Enzim eksikliği belirli bir düzeye kadar, seramidtriheksozidin ve diğer glikolipidlerin bazı dokulardaki lizozomlar içindeki birikimine dek artış gösterir. O nedenle lizozomal bir depolama rahatsızlığıdır. Metabolizmanın doğuştan gelen bu grup bozuklukları özellikle önemlidir. Endositoz ile yönetilen enzim, hücrenin enzim eksikliği olduğu lizozomal sisteme ulaşabilir. Bu kaybolmuş enzim aktivitesi töropatik değerde olabilir. Fabry hastalığı da özellikle bu tip terapide uygundur. Depolanmış materyalin ana lokalizasyonu merkezi sinir sistemi dışındadır ve hastalık yavaş bir iyileşme gösterir. Fabry hastalığında terapi amacı ile enzimin kullanılması immünolojik komplikasyonlara da neden olabilir (Rietra et al., 1974; Desnick et al., 1979; Veale et al., 1992).

α -Galaktozidazlar çeşitli prokaryot ve ökaryotlardan saflaştırılmışlardır. Terminal α -D-galaktozid artıkları hem glikoprotein hem de glikolipidlerde bulunur. Çoğu ökaryotik α -galaktozidaz, benzer düşük molekül kütleli kromojenik substrat spesifikliğine sahiptir, fakat yüksek molekül kütleli oligosakkaritler ve glikokonjugatlara karşı aktivitesi değişkendir. Bazı α -galaktozidazlar hücre membranı glikokonjugatları üzerindeki α -D-galaktozil artıklarına karşı aktivite gösterirler. Bu özellikteki galaktozidazlar özellikle karbohidrat yapı çalışmaları ve biyoteknolojik uygulamalar için kullanışlıdır. Diğer glikozidaz aktivitesinden bağımsız α -galaktozidazlar ise özellikle membran modifikasyon çalışmalarında önemlidirler. Glikoprotein ve glikolipidlerdeki kompleks şeker zincirleri, ökaryotların büyüme ve gelişmesinde, immün sistemde kendini tanıma önemli rol oynarlar.

Bazı α -galaktozidazlar belirli karbohidrat membran yapılarını modifiye edebildikleri için immün cevabı modüle ederler. Örneğin, B-kan grubu yapısı terminal bir α -D-galaktozil artığı içerir ve bu grubun uzaklaştırılması bu determinantın antijenik aktivitesini de yok eder.

Phaseolus vulgaris α -galaktozidazının insan ve tavşan eritrosit membranındaki α -(1,3)-galaktozil artıklarına karşı aktif olduğu belirlenmiştir. Membran glikokonjugatlarına karşı gösterdiği enzimatik aktiviteden dolayı bu enzim, doğal eritrositlerdeki membran yapılarının modifikasyonunda kullanılabilir. Membrandan terminal α -D-galaktozid artığını hidrolizlediği için enzim tip-B eritrositlerinin tip-O eritrositlerine dönüşümünde uygun olacaktır (Dhar et al., 1994; Liljeström and Liljeström, 1987). Yine böyle bir uygulama domates (Pressey, 1984), karpuz (Itoh et al., 1986), taro (Chien and Lin-Chu, 1991) ve kahve (Haibach et al., 1991) α -galaktozidazları ile de yapılmıştır. A ve B eritrositlerin O-tip eritrositlere dönüşümü ile ilgili olarak Goldstein ve arkadaşları da çeşitli çalışmalar yapmaktadırlar (Lenny et al., 1991; Goldstein, 1989; Lenny et al., 1994).

α -Bağlı galaktooligosakkaritler ve rafinoz, stakiyöz gibi α -galaktozidik bağlar içeren oligosakkaritler bitkilerde ve özellikle de soya fasulyesi, şeker kamışı ve baklagillerin depo organlarında (tohum, kök, yumru gibi) bolca ve yaygın olarak bulunurlar. Bu oligosakkaritler kuvvetli büyüme faktörleridir ve bazı besinlerde bulunurlar. α -galaktozidazlar da genellikle bu bileşiklerin metabolik olarak kullanılmasında görev yapan hidrolitik ajanlardır. α -Galaktozidaz insanlarda salgılanmayan bir enzimdir. Bu nedenle soya fasulyesi gibi bazı baklagiller mideye indikten sonra kalın bağırsağa geçerler. Burada α -galaktozidaz üreten bakteriler tarafından anaerobik olarak fermente edilir ve gaz oluşur. Bu da uzun zamandır bilinen ciddi bir problemdir. Kalın bağırsak sonunda bulunan gazın basıncında meydana gelen bir artış, baş ağrısı, baş dönmesi, göz kararması, mental karışıklık ve konsantrasyon bozukluğu gibi şikayetlere yol açar.

α -Galaktozidazların en önemli uygulama alanlarından birisi de şeker endüstrisinde rafinozun hidrolizinde kullanılmasıdır. Rafinoz, sukrozun kristalizasyonunu engelleyerek kristalize şeker verimini düşüren bir trisakkarittir. Çeşitli kaynaklardan hazırlanan α -galaktozidaz preparatları ile rafinoz hidrolizlenerek verim artırılabilen ve aynı zamanda da oldukça önemli bir oranda ekonomi sağlamaktadır (Mitsutomi and Ohtakara, 1984).

1.2 İmmobilize Enzimler

Katalizörler; reaksiyon ortamında büyük ölçüde harcanmadan reaksiyon hızını artırırlar. Enzimler; canlılardaki reaksiyonları etkili ve hassas bir şekilde düzenleyen suda çözünür spesifik biyokatalizörlerdir. Çoğu zaman yüksek bölge- ve kimyasal seçicilik göstererek biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlarlar. Enzimler; sulu ortamda yüksek aktivite gösterdikleri, yüksek substrat ve ürün spesifikliğine sahip oldukları için endüstriyel, ticari ve laboratuvar proseslerinde sıklıkla kullanılırlar (Telefoncu 1986; Telefoncu, 1997; Hanefeld et al., 2009; Cowan and Fernandez-Lafuente, 2011).

Enzimlerin eşsiz katalitik potansiyeli henüz tam olarak keşfedilmekten uzaktır. Genel kanı bugüne kadar doğadaki mikroorganizmaların % 1' den daha azının kültürünün yapıldığı ve enzimlerinin tanımlandığı yönündedir. Birçoğu henüz keşfedilmemiş olmasına rağmen, çok çeşitli reaksiyonların katalizini gerçekleştiren çok sayıda enzimin tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çoğu enzimin ticari olarak elde edilmesi mümkündür, fiyatları ise enzim izolasyonunun zorluk derecesine ve/veya rekombinant kaynaklardan elde edilip edilmemesine bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir. Organik sentezlerde ve endüstride kullanılan çoğu enzim günümüzde büyük ölçekte üretilmektedir. Bunlardan bazıları deterjan sanayi ve diğer büyük ölçekli proseslerde kullanılabilir kadar ucuzdur.

Biyokatalizörlerin pratikteki kullanımları, ılımlı koşullarda çok yönlü olarak bölge-, kimyasal-, ve enantio-, seçimli olarak kataliz gerçekleştirmeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Bu özelliklerin çevresel açıdan da tercih edilecek

proseslere aktarılması gereklidir. Ancak genel kanı enzimlerin duyarlı, kararsız oldukları, sulu ortamda kullanılabildikleri için ideal katalizörler olmadıkları ve sentezlerde istenmedikleri yönündedir. Katalizör tanımı tekrar kullanılabilirliği içermektedir. Bir katalizör, enzim olsun ya da başka çeşit katalizör olsun reaksiyon ortamında çözünür olduğu için reaksiyon ortamından uzaklaştırılmaları zordur. Bu olumsuz özelliklerin üstesinden gelmenin bir yolu enzimlerin immobilizasyonudur. Sürekli proseslere imkan tanıdığından endüstriyel ölçekteki uygulamalarda immobilize enzimlerin kullanılması uygundur (Hanefeld et al., 2009).

İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlı moleküllerdir. Çizelge 1.7' de immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri verilmiştir (Önal, 2000).

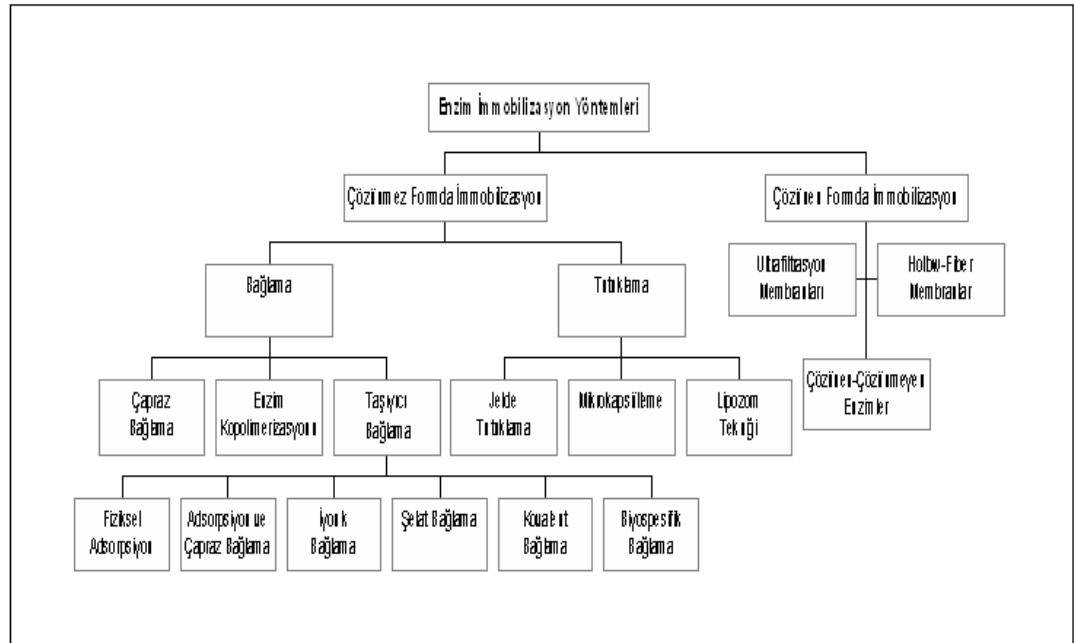
Çizelge 1.7 İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri (Önal, 2000) .

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün 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 çalışmalar için uygundur.
- Otomatik işlemlere imkan verir.
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar, üretim kaybı azalır.

İmmobilizasyon işlemi ile enzimler genellikle stabilize edilirler ve bu stabilizasyon enzimlerin çevrelerine karşı olan hassasiyetlerini azaltır. Enzimlerin çözünmeden süspansiyon olduğu hidrofobik organik ortam için dahi enzimin substratıyla bağlanmasını maksimum düzeye çıkarmak için enzim dağılımının optimize edilmesi ve enzim üzerindeki hidrofilik kısımların agregasyonunun önlenmesi için enzimin immobilizasyonuna ihtiyaç duyulur, böylece enzimin geri kazanımı da sağlanmış olur (Hanefeld et al., 2009).

1.2.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri

1960' lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonu için birçok immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bu yöntemlerin sınıflandırılması için birçok şema hazırlanmıştır. Genel olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler Şekil 1.5' te şematize edilmiştir (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.5 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997).

Taşıyıcıda gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu iki türün, yani taşıyıcı ve enzimin etkileşimini gerektirir. Çizelge 1.8' de bir immobilizasyon işlemi planlanırken dikkate alınması gereken parametreler özetlenmiştir. Enzim immobilizasyonunda hem taşıyıcının hem de enzimin yüzey özellikleri önemlidir. Enzim için polar gruplar (lizin amino grupları, glutamik asidin asit grupları gibi), apolar yüzey alanları ya da şeker artıkları yüzey özelliklerini etkiler. Taşıyıcı, enzimin bu yüzey özelliklerinden herhangi birine uygun olarak seçilebilir. Herhangi bir taşıyıcı için esansiyel olan özellik geniş yüzey alanına sahip olmasıdır. Ortamdan ayırmayı zorlaştırmasına rağmen küçük partikül boyutuna sahip, materyalin kullanılması ya da porları substrat difüzyonunu engellemeyecek kadar yeterli büyüklüğe sahip çok sayıda pora sahip materyallerin kullanımı ile geniş yüzeylerin eldesi mümkündür. Taşıyıcı olarak kullanılan materyalin kimyasal ve mekanik olarak kararlı olması da istenir (Hanefeld et al., 2000).

Etkili bir immobilizasyon yöntemi seçilirken Çizelge 1.9' daki özellikler göz önüne alınmalıdır. Immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Uygun immobilizasyon yönteminin seçiminde beş ana kriter göz önüne alınmalıdır; güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması, kararlılık ve kolay uygulanabilirlik. Bir enzimin immobilizasyonunda ayrıca enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin de seçimi önemlidir (Önal, 2000; Hanefeld et al., 2009).

Çizelge 1.8 İmmobilizasyon yönteminin seçiminde dikkat edilmesi gereken parametreler (Hanefeld et al., 2009).

Enzim ile ilgili faktörler	Taşıyıcı ile ilgili faktörler	Reaksiyon sistemi ile ilgili faktörler
Enzim boyutu	Organik / inorganik	Reaksiyon ortamı
Reaksiyon mekanizması için gerekli olan konformasyonel esneklik	Hidrofobik / hidrofilik karakter	Difüzyon problemleri
İzoelektrik noktası	Yüzeyindeki yüklü gruplar	Ürünün eldesi
Yüzey fonksiyonel grupları/yük yoğunluğu	Yüzeyindeki fonksiyonel gruplar	Reaksiyon ortamının vizkozitesi
Glikozilasyon	Kimyasal ve mekanik kararlılık	Reaksiyonun termodinamiği
İmmobilizasyon koşullarındaki kararlılık	Yüzey alanı	Non-spesifik çözelti/destek etkileşimleri
Hidrofobik bölgelerin varlığı	Porozite	
Hidrofilik bölgelerin varlığı	Partikül büyüklüğü	
Enzim preparatının içerdiği katkı maddeleri		

Çizelge 1.9 ve Çizelge 1.10 bugüne dek yapılan enzim immobilizasyon çalışmalarından elde edilen genel bilgiler özetlenmiştir. İmmobilizasyonda en sık kullanılan, farklı avantaj ve dezavantajları olan teknikler beş grupta toplanabilir.

Bunlar:

- 1) Non-kovalent adsorbsiyon
- 2) İyonik bağlama
- 3) Kovalent bağlama
- 4) Polimerik jel ya da kapsül içinde tutuklama
- 5) Çapraz bağlama

Çizelge 1.9 Enzim immobilizasyonu planlanırken dikkate alınması gereken faktörler (Hanefeld et al., 2009).

İmmobilizasyon tekniği	Dikkate alınacak faktörler
Genel	Enzimin hazırlanması İmmobilizasyonda enzimin kararlılığı İşlem sırasında taşıyıcının kararlılığı İşlem sırasında proteinin ayrılması Spesifik olmayan enzim-taşıyıcı etkileşimleri Maliyet, taşıyıcının uygunluğu
Adsorbsiyon/desorpsiyon	
1) Hidrofobik organik taşıyıcı	Enzimin hidrofobik bölgeler içermesi İmmobilizasyon tamponunun iyon şiddetinin adsorbsiyona olanak sağlaması
2) Hidrofilik organik taşıyıcı	Enzimin hidrofilik bölgeler içermesi
İyonik etkileşimler	Enzimin pI değeri Enzim yüzeyindeki yüklü artıklar (tipleri ve yoğunlukları) İmmobilizasyon tamponunun iyon şiddeti ve pH' ı
Kovalent bağlama/çapraz bağlama	Bağlanma için gerekli artıkların yerleşimi Nükleofilik atak için uygun immobilizasyon pH' ı Katalitik mekanizma için konformasyonel esneklik
Enkapsülasyon	Enzim boyutu Polimer sentezlenme koşulları

Çizelge 1.10 İmmobilizasyon tekniği seçimi için bazı öneriler (Hanefeld et al., 2009).

Reaksiyon sistemi	İmmobilizasyon yöntemi
Seyreltik sulu çözelti	Kovalent Çapraz bağlama Enkapsülasyon
Seyreltik organik çözgen	Hepsi
Viskoz/konsantre organik/anorganik karışımlar	Kovalent Çapraz bağlama

Literatürlerde enzim immobilizasyonları için farklı gruplamalar yer almasına rağmen Çizelge 1.11’ de verilen immobilizasyon yöntemlerinin kıyası çok daha önemlidir.

Çizelge 1.11 İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Önal, 2000).

Karakteristik	Adsorbsiyon	Kovalent bağlama	Tutuklama	Membranda tutuklama
Hazırlık	Basit	Zor	Zor	Basit
Maliyet	Düşük	Yüksek	Değişken	Yüksek
Bağlanma gücü	Değişken	Güçlü	Zayıf	Güçlü
Enzim kaçı	Var	Yok	Var	Yok
Uygulanabilirlik	Geniş	Seçimli	Geniş	Oldukça geniş
Sürekli kullanımda problem	Fazla	Az	Fazla	Fazla
Martriiks etkisi	Var	Var	Var	Yok
Difüzyon problemi	Yok	Yok	Var	Var
Mikrobiyal koruma	Yok	Yok	Var	Var

1.2.1.1. Taşıyıcıya kovalent bağlama ile immobilizasyon

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent olarak bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemlerle ve genellikle sulu ortamda gerçekleştirilir. Kovalent immobilizasyon, enzimle taşıyıcı arasında güçlü ve kararlı bağlar oluşmasını sağlar. Böylelikle sulu reaksiyon ortamında enzim kaçıışı minimize edilir ve ürün kirliliği önlenir. Enzim sulu reaksiyon ortamında kullanılacaksa ya da denatüre edici koşullar söz konusuysa, kovalent bağlama tekniği ile immobilizasyon tercih edilmelidir. Enzimin birden fazla noktadan kovalent olarak bağlanması konformasyonel esnekliğini ve termal vibrasyonlarını azaltır, böylece protein katlanmasının açılması ve denatürasyonu engellenir (Telefoncu, 1997; Torres et al., 2008).

Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir ki çoğunlukla enzim amino grupları kullanılır. Ancak enzim yüzeyindeki diğer fonksiyonel gruplar ve şeker artıkları da kullanılabilir (Mateo et al., 2007; Cao, L., 2005; Basso et al., 2007). Kovalent immobilizasyon için nükleofilik amino grubu örneğin bir epoksi ya da aldehit grubuna saldırır. Aldehit olması durumunda bir imin meydana gelir, NaBH_4 ile indirgenerek geri dönüşümsüz bağlanmayı sağlar. Karbodiimidler de kullanılabilir, enzim amino grubu ile taşıyıcı üzerindeki asidik grup (ya da tam tersi) arasında amid bağı oluşumu ile kovalent bağlanmayı sağlar. Kovalent immobilizasyon yöntemi geliştirilirken doğal enzim preparatının tüm bileşenleri dikkate alınmalıdır. Çoğu zaman doğal enzimler poliol, şeker gibi stabilizatörleri içeren ham preparatlar olarak bulunurlar ve gerçek protein içeriği oldukça düşük olabilir (< % 5). İmmobilizasyon yöntemine bu reaktif katkı maddelerinin girişim etkisi mutlaka dikkate alınmalıdır.

Çapraz bağlı dekstranlar (sefaroze), polisakkaritler (agaroz) ya da poröz silika kovalent bağlanma için aktiflenebilir. Eupergit C ya da Sepabead EC-EP gibi epoksi aktif taşıyıcılar yüksek reaktif grup yoğunlukları ve enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasındaki kolay kimyaları ile bu konuda çok ilgi çekici materyallerdir (Torres et al., 2008).

Enzimin taşıyıcıya bağlandığı reaktif kolun uzunluğu da immobilize enzimin etkinliği açısından önemli bir parametredir. Uzun fonksiyonel kollar, proteinin konformasyonel açıdan esnek olabilmesine olanak sağlar. Diğer taraftan kısa fonksiyonel kollar enzim hareketini kısıtladıkları ve protein katlanmasının açılmasını engelledikleri için enzimin termal açıdan daha kararlı hale gelmelerine olanak sağlarlar. Örneğin, amino grupları ile türevlendirilmiş metakrilik polimerlere daha kısa fonksiyonel kollar (glutaraldehid) ile bağlanan *E.coli* penisilin G açılaz enziminin daha kararlı bir hale geldiği gözlenmiştir. İlginç bir şekilde uzun fonksiyonel kollarla amino grubu taşıyan Sepabead üzerine immobilize edilen *Pichia pastoris* de eksprese edilmiş *Pseudomonas rettgeri* açılazının, kısa fonksiyonel kollarla immobilize edilen formula benzer kararlılığa sahip olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni muhtemelen enzim glikozillenmiş bölgelerinin taşıyıcı ile yaptığı ekstra kovalent bağlanmalardan kaynaklandığı öne sürülmüştür (Basso *et al.*, 2007).

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanmanın önemli bir dezavantajı, enzimin kimyasal olarak modifiye olmasıdır. Modifikasyonun kontrolü oldukça zordur ve tüm enzim molekülleri aynı şekilde immobilize olmaz.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli, büyük ölçüde hidrofobik karakterli olmamalı, suda ıslanabilmeli ve mekanik olarak da kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997).

1.2.1.2 Adsorbsiyon ile immobilizasyon

Enzimlerin taşıyıcı üzerine adsorbsiyonu çok çeşitli etkileşimlerle meydana gelir. Yüzeyinde büyük lipofilik/hidrofobik yüzeyler içeren enzimler hidrofobik taşıyıcılarla sıkı etkileşimler kurarlar. Van der Waals kuvvetleri ve entropi değişimi, enzimin taşıyıcı yüzeyine immobilizasyonunu sağlar. Glikozillenmiş enzimlerin şeker artıkları hidrojen bağları ile adsorbsiyonu sağlarken, enzim yüzeyindeki hidrofilik bölgeler hidrofilik taşıyıcıya adsorbsiyonu sağlar. Adsorbsiyonla immobilizasyonun avantajı, enzimin ön muamelesine ya da kimyasal modifikasyonuna ihtiyaç duyulmamasıdır, ham enzim preparatının dahi kullanılması mümkündür. Immobilizasyon koşullarının farklılaştırılması immobilizasyon prosesini etkiler ve enzim özelliklerinin de farklılaşmasına neden olur (Cao, 2005).

Adsorbsiyonla immobilizasyonun dezavantajı sulu reaksiyon ortamında enzimin kolayca desorpsiyonudur. Organik çözümden enzim çözünür olmadığından enzim kaçıışı söz konusu değildir. Kaplama metodunda ise taşıyıcı enzimin sulu çözeltisine eklendikten sonra, enzim presipitasyon ile ya da sulu fazın evaporasyonu ile immobilize edilir. Enzim katı destek materyal üzerinde birikir. Bu yöntemde hidrofobik etkileşim ya da entropi değişiminden kaynaklanan bir etki söz konusu değildir. Selit üzerine yapılan immobilizasyonların çoğu bu şekilde gerçekleştirilmektedir (Ferrer et al., 2002).

1.2.2 Enzimlerin çapraz bağlanması

Taşıyıcıya bağlı immobilizasyon yöntemlerinde enzim iki boyutlu olarak bir yüzeye bağlanır, ancak enzimlerin taşıyıcısız olarak çapraz bağlanmasında enzim üç boyutlu olarak stabilize hale gelir. Çapraz bağlı enzim kristallerinde enzimler çapraz bağlandığında meydana gelen kristal etkileşimleri, özellikle organik çözümlerde meydana gelen denatürasyonun engellenmesinde önemlidir. Kristal yapıda enzimlerin birbirleri ile olan etkileşimleri ve çapraz bağlanmanın etkisiyle termal ya da organik çözümlerle meydana gelecek deaktivasyona karşı protein 100–1000 kat daha kararlı hale gelir. Molekül içi ya da moleküller arası çapraz bağlanma enzimin deaktivasyonunu daha güç hale getirmektedir. Çapraz bağlama

sonucu enzim molekülleri mikrokristal parçacıkları içinde etkin bir şekilde immobilize hale gelirler.

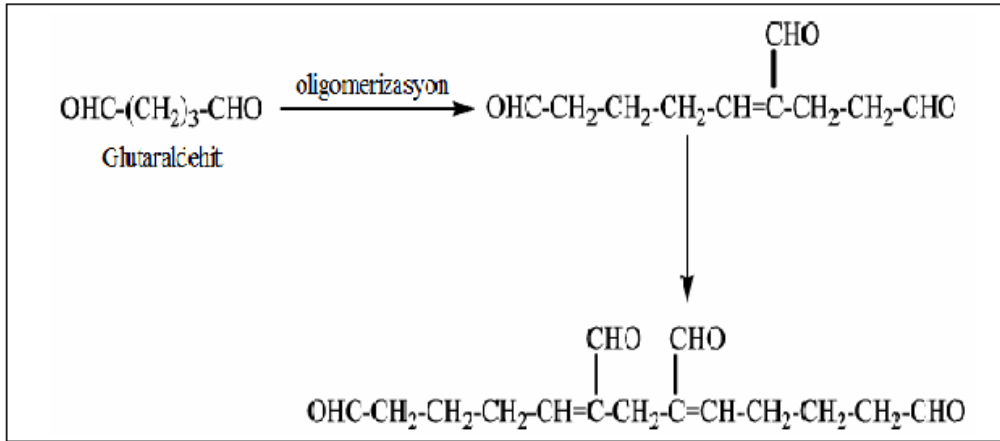
Enzim kristalinin kimyasal çapraz bağlanması, birbirine yakın konumdaki enzimlerin çapraz bağlanması ile kristal yapısını kararlı kılar. Bu şekilde doğal enzim için uygun olmayan bir reaksiyon ortamında enzimin kullanılabilirliğini sağlar. Kristalizasyon aşaması enzim molekülünün yeniden düzenlenmesine neden olurken, bunu takip eden çapraz bağlama aşaması proteinin, yer aldığı boşlukta stabil şeklini almasını sağlar (Lalonde, 1997).

1.2.2.1 Çapraz bağlayıcı ajanlar

Enzimlerin çapraz bağlanması için pek çok yeni metod ve kimyasal reaktif mevcuttur. Biyomolekülün çapraz bağlanması (Margolin and Navia, 2001) için iki tip kimyasal çapraz bağlayıcı reaktif kullanılır: Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ve heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar. Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar aynı fonksiyonel grupları birbirine bağlamak için kullanılır. Çapraz bağlamada kullanılan bu fonksiyonel gruplar iki aldehit, iki amino ya da iki tiyol grubu olabilir. Sıklıkla kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar dialdehitler (glioksal, glutaraldehid, süksinaldehit), diaminler (etilendiamin, heksametilendiamin, oktandiamin), bis(imidoesterler) ve bis(süksinimidil esterler)'dir. Heterobifonksiyonel reaktifler farklı fonksiyonel gruplar arasında çapraz bağlanmayı sağlarlar. Genellikle enzim-antibadi, nükleik asit-ilaç ya da peptid gibi birbirinden farklı iki molekülün bağlanması için kullanılırlar. Çapraz bağlayıcı ajanın zincir uzunluğunun artışı çapraz bağlı enzimin esnekliğinde rol oynar (Wong and Wong, 1992). Ortam pH' ı, sıcaklığı, protein konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı reaktifin konsantrasyonu, çapraz bağlama süresi ve reaktifin eklenme hızı gibi çapraz bağlama koşullarının optimizasyonu yapılmalıdır. Reaksiyon süresinin azaltılması amacıyla çapraz bağlama işlemi aseton (David et al., 2001) ya da dimetil sülfoksit (DMSO) (Susan et al., 1996) gibi organik çözümlerde gerçekleştirilebilir ve bu çözümlerde çapraz bağlama için yalnızca birkaç dakika yeterlidir. Çapraz bağlamanın aşırısı, kristal yapının agregasyonuna, protein presipitasyonuna, aktivite kaybına ve kristal yapının bozulmasına neden olabilir (Margolin, 1996).

1.2.2.2 Glutaraldehid ile çapraz bağlama

Glutaraldehid, enzim kristallerinin çapraz bağlanması için en popüler dialdehid reaktiftir. Glutaraldehidin bu amaçla kullanılması için farklı olasılıklar mevcuttur. Glutaraldehid ile aktiflenmiş taşıyıcıya enzim immobilize edilebilir ya da primer amino grubu içeren taşıyıcılara protein adsorpsiyonu sonrası glutaraldehid muamelesi gerçekleştirilebilir. Her iki durumda da ilk adım iyonik değişim olduğu için enzim taşıyıcıya Lys artıkları üzerinden bağlanır. Güvenli, ucuz ve kolay uygulanabilirdir. Glutaraldehidin sulu ortamlarda meydana getirdiği farklı uzunlukta ve yapıdaki oligomerler, bu reaktifin kullanımının, tahmin edilemeyecek sonuçlar ortaya koymasına neden olur (Tashima et al., 1991, Alonso et al., 2005, Filho et al., 2008). Glutaraldehidin sulu çözeltide oluşturduğu oligomerler Şekil 1.6' da verilmiştir.



Şekil 1.6 Glutaraldehidin oligomerizasyonu.

Glutaraldehidle çapraz bağlama sonucu ϵ -amino grupları üzerinden molekül içi ve moleküller arası güçlü kovalent bağlanmalar meydana gelir (de Santis and Jones, 1999). Yan yana moleküllerin bağlanması ile çapraz bağlanma gerçekleşir ve çapraz bağlanma geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle, basit bir imin oluşumu ya da Schiff bazı oluşumu ile açıklanamaz ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Vaghjani et al., 2000).

Glutaraldehid ile çapraz bağlanan moleküller çözünmez hale gelirken, çözeltinin çapraz bağlı moleküllerin içine girişi mümkündür. Ayrıca çapraz bağlama ile meydana gelen kararlı yapı pH ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez. Çapraz bağlama koşulları farklı glutaraldehid konsantrasyonları ve farklı çapraz bağlama süreleri denenerek optimize edilmelidir. Aşırı miktarda glutaraldehid ile çapraz bağlama sarı-kahverengi renkte ve sert yapıda ürün oluşumuna neden olur (Klaus, 1976).

1.2.3 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

Bir immobilize enzim sisteminin en önemli üç bileşeni enzim, taşıyıcı ve immobilizasyonda kullanılan yöntemdir. Taşıyıcı materyal bir membran, suda çözünür bir katı ya da polimer bir matriks olabilir.

Enzimlerin immobilizasyonunda genel olarak doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Genel olarak bir taşıyıcının sahip olması gereken özellikler Çizelge 1.12' de verilmektedir (Telefoncu, 1997).

Çizelge 1.12 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılarda aranan genel özellikler (Telefoncu, 1997).

-Mekanik stabilite ve uygun partikül formu	-Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların ılımlı koşullarda reaksiyon veren fonksiyonel gruplar taşıması
-Hidrofilik karakter	-Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
-Suda çözünmeme	-Ucuz olması
-Gözenekli (poröz) yapı	-Rejenere olabilmesi
-Zehirsizlik	-Kimyasal ve termal kararlılık

Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar morfolojilerine göre (poröz, poröz olmayan ya da jel tipi) ya da kimyasal kompozisyonlarına göre sınıflandırılırlar. Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak sentetik polimerlerin kullanılması, mikrobiyal ataklara karşı inert olması, yüksek kararlılığa sahip

olması ve kompleks tampon bileşenlerinin kullanılmasında çeşitli seçenekler olması gibi bazı avantajlar sağlamaktadır.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıların seçiminde bazı kriterlere dikkat edilmelidir. Bunlar; immobilizasyon yöntemi, substratın yapısı, reaktör tipi ve mekanik özellikleridir. Immobilizasyon iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilecekse taşıyıcının fonksiyonel gruplar içermesi gerekir. Substrat büyük molekül ise özellikle tutuklama yöntemleri ve poröz taşıyıcılar difüzyon ve sterik engellemeden dolayı pek uygun değildirler (Önal, 2000).

1.2.4 α -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda immobilizasyonu

Bu tez çalışmasında, polimetakrilat tabanlı Sepabead EC serisi sentetik taşıyıcılardan Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanıldı. Sepabead EC-EP, aktif epoksi grubu taşıyan sentetik bir taşıyıcıdır. Sepabead EC-EA etilamino fonksiyonel grubuna sahipken Sepabead EC-HA heksametilamino grubu taşımaktadır. Sepabead EC-EA ve EC-HA arasındaki fark taşıyıcıların sahip olduğu kol uzunluğudur.

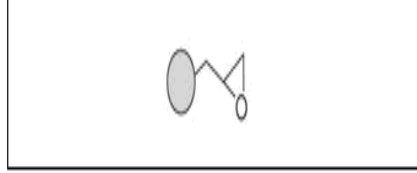
Sepabead serisi taşıyıcıların genel özellikleri [Mitsubishi Chemical Co (Resindion S.R.L.)] :

- fiziksel ve kimyasal yöntemlerle ve de mikroorganizmalarla parçalanmayan polimerik yapı
- yüksek protein bağlama kapasiteleri
- yüksek derişimli çözeltilerde ve genel çözenlerde düşük şişme eğilimi
- yüksek mekanik kararlılık
- farklı partikül boyutu ve porozite derecelerinde bulunabilmedir.

Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA yukarıda bahsedilen özellikleri ve doğa dostu ürün hedefleri ile diğer Sepabead EC- serisi taşıyıcılardan ayrılmaktadırlar.

1.2.4.1 Sepabead EC-EP

Sepabead EC-EP taşıyıcının kimyasal yapısı Şekil 1.7' de, genel karakteristik özellikleri Çizelge 1.13' de ve bu taşıyıcıda enzim immobilizasyon mekanizması Şekil 1.8' de verilmiştir. Şekil 1.7' den ve Çizelge 1.13' den görüldüğü gibi Sepabead EC-EP polimetakrilat tabanlı ve fonksiyonel grup olarak epoksit grubu içeren sentetik bir taşıyıcıdır.



Şekil 1.7 Sepabead EC-EP'nin kimyasal yapısı (www.resindion.com).

Epoksi grubu içeren taşıyıcılar enzim immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi için hemen hemen ideal sistemlerdir. Epoksit grupları nötral pH' da sulu ortamda bile oldukça kararlıdır. Bundan dolayı, çok uzun süre depolanabilmektedir. Uzun enzim-taşıyıcı reaksiyon periyotlarına uygundur. Ayrıca epoksit grubu içeren taşıyıcılar protein yüzeyindeki farklı nükleofilik gruplarla (amino, hidroksil veya tiyol) reaksiyon verebilmektedir. Bu reaksiyonlar sırasında proteinin kimyasında minimal değişiklikler yaparak son derece kuvvetli bağlar (sekonder amino, eter ve tiyoeter) oluşturmaktadır. Fakat, ılımlı deneme koşullarında (nötral pH, düşük iyon şiddeti) epoksi grupları enzim immobilizasyonu için çok zor aktive olmaktadır (Mateo et al., 2003; Pessela, 2003). Bunların yanı sıra, bu fonksiyonel grubu içeren taşıyıcıların üretiminde kullanılan hammaddeler Avrupa Birliği tarafından gıda maddesi işlenmesi için de uygun bulunmuştur (Ghazi et al., 2005).

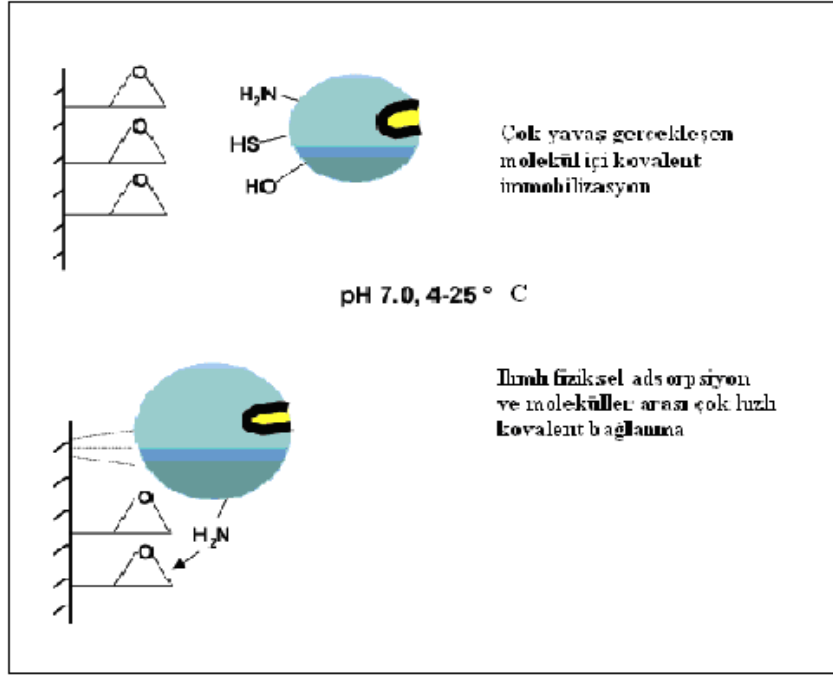
Çizelge 1.13 Sepabead EC-EP taşıyıcının genel özellikleri

[Mitsubishi Chem. Co. (Resindion S.R.L, İtalya)].

Görünüş	Küresel yapıda, beyaz, opak tanecikler
Matriks	Polimetilakrilat
Aktif Grup	Epoksit
Fonksiyonel Grup Yoğunluğu	min.110 $\mu\text{mol/g}$ ıslak ağırlık
Partikül Boyut Aralığı	150–300 μm
“M” Sınıfı	200–600 μm
Yoğunluğu	> 1,1g/mL
Su Tutma Kapasitesi	55–65%
Porozite	> 25%
Ortalama Por Çapı	> 30 nm
Sıcaklık Stabilitesi	0–10°C
pH Stabilitesi	5–8
Tavsiye Edilen Depolama Sıcaklığı	5–6°C
Depolama Süresi	6 ay

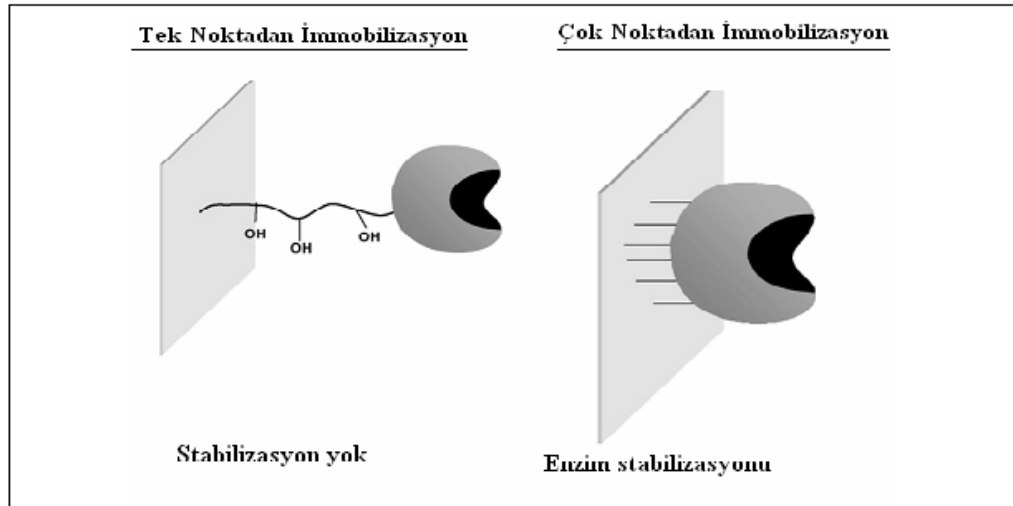
Epoksit grubu içeren taşıyıcılarda enzim immobilizasyonu iki basamakta gerçekleştirilir. İlk basamakta protein adsorpsiyonu ile enzimin taşıyıcı yüzeyine tutunması sağlanır. Enzim immobilizasyonu için tasarlanan çoğu ticari taşıyıcı oldukça hidrofobik karakterdedir ve immobilizasyonun yüksek iyon şiddeti (proteinlerin hidrofobik adsorpsiyonunu sağlar) koşullarında gerçekleştirilmesi önerilir. İkinci adımda ise, taşıyıcıya adsorblanan proteinin epoksi gruplarıyla kovalent olarak bağlanması sağlanır (Şekil 1.8) (Mateo et al., 2003).

Bu immobilizasyon metodu ile proteinleri değişik oryantasyonlarda immobilize edebilmek için heterofonksiyonel epoksi taşıyıcılar geliştirilmiştir. Bu taşıyıcılar, yüksek yoğunluklu epoksi gruplarının birlikte aktif olması ile proteinleri adsorbe edebilecek yapıya sahiptirler (Bolivar et al., 2009). Enzim oryantasyonu ile kimyasal reaktiflerin inaktivasyonundan korunarak daha kararlı immobilize enzimler elde edilebilir (Lopez-Gallego et al., 2004).



Şekil 1.8 Epoksi taşıyıcılarda enzim immobilizasyon mekanizması (Mateo et al., 2003).

Bazen immobilize enzimlerin kararlılıkla ilgili sorunları ortaya çıkabilir ki bunlar kısmen uygun kimyasal ajanlarla blokajla ortadan kaldırılabilir. Bu kısıtlamalara rağmen epoksi taşıyıcılar çok noktadan kovalent bağlanma yoluyla enzim stabilizasyonunda başarıyla kullanılabilir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 İmmobilizasyonun enzim kararlılığına etkisi (Mateo et al., 2007).

Taşıyıcı ile enzim arasında oluşabilecek kontrolsüz reaksiyonları önlemek için epoksi grupları ılımlı koşullarda farklı tiyol veya amin bileşikleri ile reaksiyona sokularak kolayca bloke edilebilirler (Mateo et al., 2003).

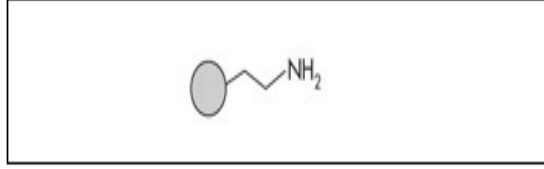
Sepabead EC-EP' de lakkaz (Kunamneni et al., 2008), lipaz (Hilterhaus et al., 2008), glukoz oksidaz (Betancor et al., 2006), fruktozil transferaz (Platkova et al., 2006) ve glutaril açilaz (Lopez-Gallego et al., 2004) gibi bir çok enzim yüksek verim ile immobilize edilmiştir.

1.2.4.2 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarının genel kimyasal yapısı sırasıyla Şekil 1.10 ve 1.11' de, karakteristik özellikleri Çizelge 1.14' de ve bu taşıyıcılarda enzim immobilizasyon mekanizması Şekil 1.12' de verilmiştir. Şekil 1.10, 1.11 ve Çizelge 1.14' den görüldüğü gibi Sepabead EC-EA ve EC-HA taşıyıcılar polimetilakrilat tabanlı ve aktif grup olarak sırasıyla etilendiamin ve hegzametilendiamin fonksiyonel gruplarını taşıyan sentetik taşıyıcılardır.

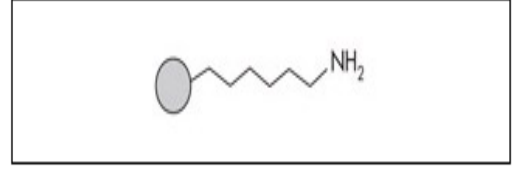
Çizelge 1.14 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarının genel özellikleri.

Özellik	Sepabead EC-EA	Sepabead EC-HA
Görünüş	Küresel yapıda, beyaz, opak tanecikler	Küresel yapıda, beyaz, opak tanecikler
Matriks	Polimetilakrilat	Polimetilakrilat
Aktif Grup	Etilendiamin	Hekzametilendiamin
Fonksiyonel Grup Yoğunluğu	min.0,6 mmol/g ıslak ağırlık	min.0,7 mmol/g ıslak ağırlık
Partikül Boyut Aralığı	150–300µm	150–300µm
“M” Sınıfı	200–600µm	200–600µm
Yoğunluğu	> 1,1g/mL	> 1,1g/mL
Su Tutma Kapasitesi	55–65%	55–65%
Porozite	> 25%	> 25%
Ortalama Por Çapı	> 30 nm	> 30 nm
Sıcaklık Stabilitesi	0–60°C	0–60°C
pH Stabilitesi	0–14	0–14
Tavsiye Edilen Depolama Sıcaklığı	5–6°C	5–6°C



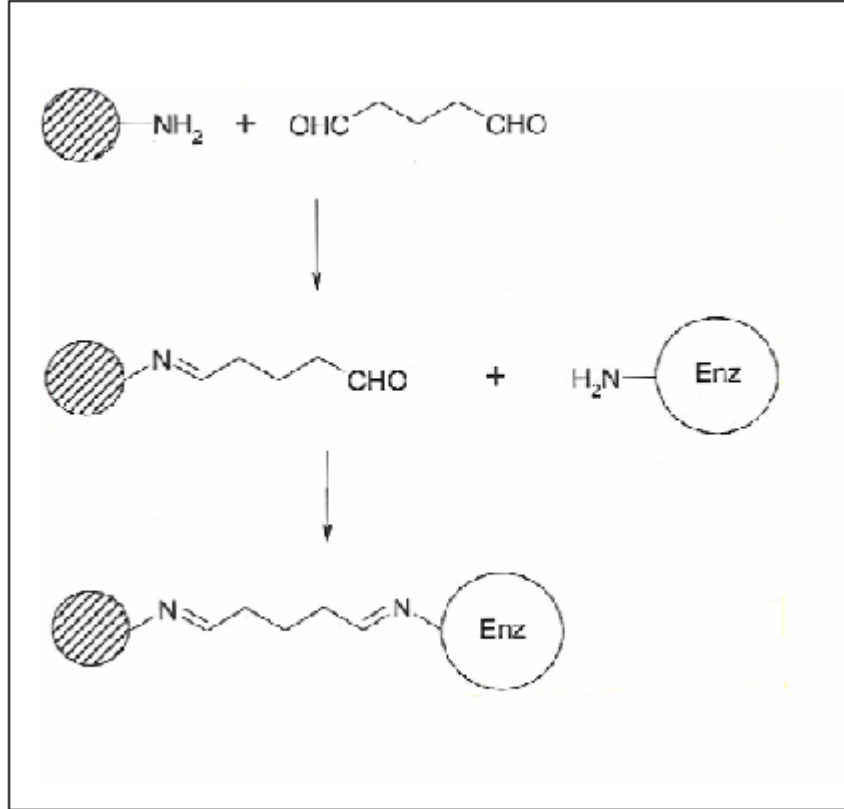
Şekil 1.10 Sepabead EC-EA' nın kimyasal yapısı

(www.resindion.com)



Şekil 1.11 Sepabead EC-HA' nın kimyasal yapısı

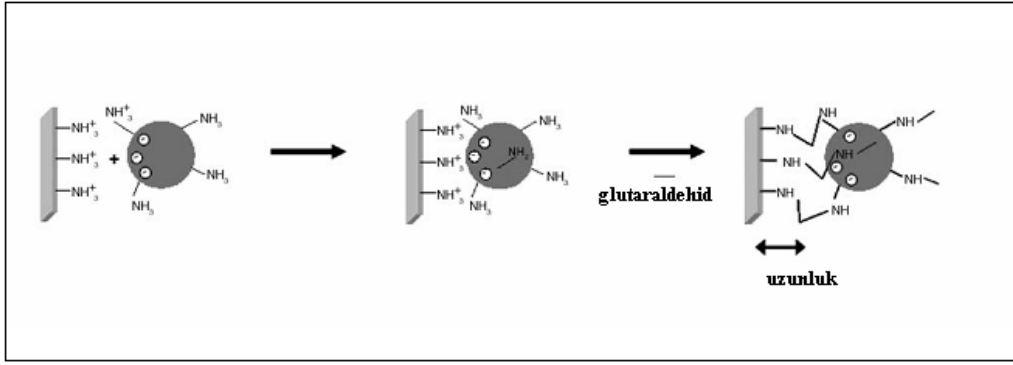
(www.resindion.com)



Şekil 1.12 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda enzim immobilizasyon mekanizması [Mitsubishi Chem. Co.(Resindion S.R.L, İtalya)].

Sepabead EC-EP' de iki adımlı enzim immobilizasyonun ilk adımı proteinin taşıyıcı yüzeyine hidrofilik adsorbsiyonu idi. Bunun için epoksi taşıyıcıların hidrofobik karakterde olmaları gerekir. Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da immobilizasyon için taşıyıcı çekirdeğinin hidrofilikliğine ihtiyaç yoktur ancak, optimizasyon sırasında hidrofiliklik göz ardı edilmemelidir. Bu taşıyıcılarda immobilizasyon için glutaraldehyd kullanımı iyi bir tekniktir. Glutaraldehyd, taşıyıcının ön aktivasyonu için kullanılabilceği gibi protein

adsorplanmış taşıyıcıda protein-taşıyıcı çapraz bağlanmasının oluşturulmasında da kullanılabilir. Bu durumda, enzimin ve taşıyıcının tüm primer amino grupları glutaraldehid ile aktiflenir. Glutaraldehid gruplarının (her amino grubu başına bir molekülün) değişik reaksiyon koşullarında güçlü çapraz bağlar oluşturduğu bilinmektedir (Klaus, 1976; Tashima et al., 1991; de Santis and Jones, 1999; Vaghjiani et al., 2000; Alonso et al., 2005; Filho et al., 2008). Şekil 1.13' den görüldüğü gibi enzimin ϵ -amino grupları iki glutaraldehid molekülü ile taşıyıcının primer amino gruplarına bağlanır (Lopez-Gallego et al., 2005).



Şekil 1.13 Sepabead EC-EA taşıyıcıda adsorbsiyon sonrası glutaraldehid ile çapraz bağlanma (Lopez-Gallego, et al., 2005).

Sepabead EC-EA' da lipaz (Hilterhaus et al., 2008), β -galaktozidaz (Pessela et al., 2006), glutaril açılaz (Alonso et al., 2005) ve Sepabead EC-HA' da fruktozil transferaz (Platkova et al., 2006), enterokinaz (Kubitzki et al., 2008) gibi bir çok enzim yüksek verimle immobilize edilmiştir.

1.2.5 İmmobilize Enzimlerin Uygulama Alanları

Enzimler çok eski yıllardan beri ekmek, peynir, bira, şarap gibi maddelerin yapımında, ilaç yapımında kullanılmaktadır. Enzimlerin izolasyonu, saflaştırılması ve yapılarının tayini ile ilgili yapılan çalışmalarda katalitik potansiyeli ve tabiatı daha iyi bir şekilde anlaşılmiş ve endüstride geniş ölçüde yararlanmaya başlanmıştır.

Endüstriyel katalizatörler olarak enzimler klasik kimyasal katalizatlara göre bazı üstünlüklere sahiptirler. İleri derecede substrat spesifikliği, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu büyük ölçüde elimine etmekte ve sadece materyal maliyetini düşürmekle kalmayıp çevre sorunu da yaratmamaktadır. Bazı stereospesifik reaksiyonlar enzimlerin yardımı olmaksızın gerçekleştirilemezler. Operasyon koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır ve operasyonun korozyon etkilerini ve enerji gereksinimini düşürür. Reaksiyon hızı yüksek ve maliyet düşüktür. Bu avantajlara rağmen enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması hala çok pahalıdır. Çoğu enzim canlı hücre dışında oldukça dayanıksızdır ve çözünen formda sulu ortamda kullanılır. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak serbest enzimlerin kullanılması birçok sakınca yarattığı için immobilize enzimler tercih edilirler (Telefoncu, 1986; 1997) .

İmmobilize enzimler; tıbbi, analitik ve endüstriyel uygulamalar olmak üzere üç alanda kullanım imkânı bulmuştur. Tıbbi uygulamalara tedavi amaçlı kullanımlar yapay organlar, analitik uygulamalara analiz otomatları, biyosensörlerin hazırlanması, ELISA testleri, endüstriyel uygulamalara L-aminoasit üretimleri, süt şekerinin parçalanması ve rafinoz hidrolizi örnek olarak verilebilir.

Endüstriyel açıdan bakıldığında immobilize enzimlerin oldukça geniş bir uygulama alanına sahip oldukları bilinmektedir. Bu uygulama alanları genel olarak, biyotransformasyonlar, gıda sanayi, deterjan sanayi, deri sanayi, tekstil sanayi ve diğer sanayiler olarak sıralanabilir.

Endüstriyel uygulama olanağı bulmuş enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Endüstriyel enzimler içerisinde proteolitik enzimlerin payı % 60, glikozidazların payı ise % 20' dir.

Biyotransformasyonlar, enzimler veya bunları içeren mikroorganizmalar tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlerdir. Aminoasit dönüşümleri (aminoasit, rasemik karışımlarından L-aminoasit üretimi, L-aminoasit sentezi, hidroksiasitlerden aminoasit sentezi), antibiyotik dönüşümleri (6-aminopenisilanik

asit üretimi, yarı sentetik penisilin üretimi), diğer biyokimyasal dönüşümler (L-malik asit üretimi, ürokanik asit üretimi), organik sentezler (hidrolitik, oksidasyon-redüksiyon, glikozil transfer ve halojenleme reaksiyonları) biyotransformasyonların en önemli uygulamalarıdır.

Gıda sanayinde immobilize enzimler oldukça geniş bir uygulama alanı bulurlar. Genellikle hidrolaz, oksidoredüktaz ve izomeraz sınıfı enzimler (α - ve β -amilaz, glukoamilaz, glukonaz, selülaz, laktaz, glukoz oksidaz, pektinaz, proteaz, glukoz izomeraz gibi) kullanılırlar. Süt teknolojisi (laktozun hidrolizi), protein modifikasyonu (soya protein hidrolizatlarının hazırlanması), nişasta sanayi (yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi, maltoz üretimi), bira sanayi, lipid modifikasyonu (yağların enzimatik interesterifikasyonu), meyve suyu sanayi, ekmek sanayi ve aspartam üretimi immobilize enzimlerin kullanıldığı endüstriyel proseslerdir. Gıda sanayisinde kullanılacak enzimlerin güvenilirliği ve sağlık açısından toksik olup olmadığı test edilmelidir.

Deterjan sanayinde, yıkama etkinliğinin artırılmasında, deri sanayinde deri işleme prosesinin yıkama adımında, şeker sanayinde rafinozun hidrolizinde, selülozun parçalanmasında, tekstil sanayisinde iplik kalitesinin artırılmasında yine immobilize enzimlerden yararlanılmaktadır (Önal, 2000).

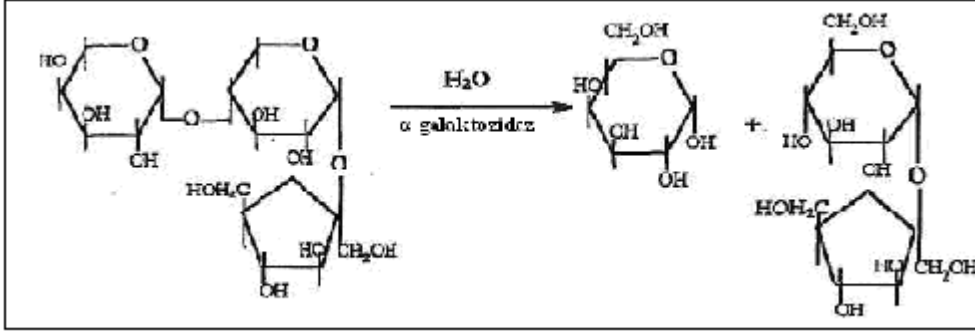
1.2.6 İmmobilize enzimler ve α -galaktozidazlarla ilgili gelecekte beklenenler

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları regüle eden spesifik biyolojik katalizatörlerdir. Bu biyokatalizatörlerin kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlar için kullanılmaya başlanması bilim çevrelerini bu katalizatörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen spesifik katalizatörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizatör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenildiği an uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü de güçtür. Enzimin reaksiyon

ortamında aktivitesini yitirmeden çıkarılabilmesi mümkün olmadığından yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu da enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizatörler olmaları nedeniyle maliyeti artıran önemli bir etmendir. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu araştırmaları yoğunluk kazanmıştır. Böylelikle immobilize enzimler de tıbbi, analitik ve endüstriyel alanda farklı uygulamalar bulmuştur (Telefoncu, 1997).

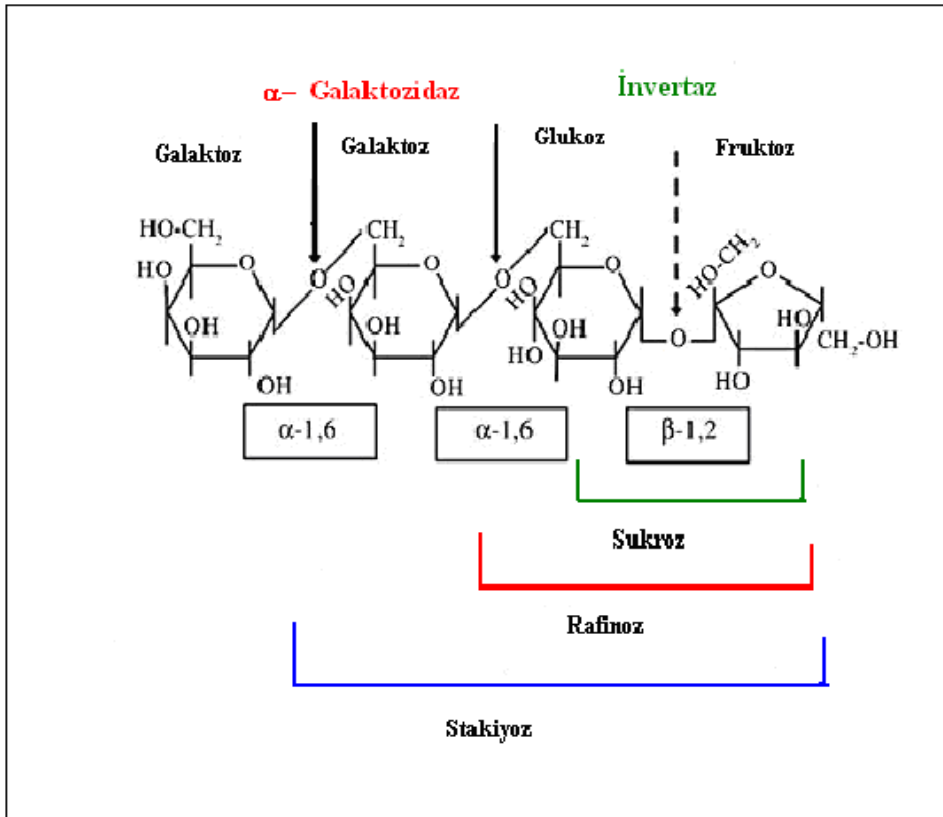
α -Galaktozidazlar (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) basit ve kompleks, oligo ve polisakkaritlerin (rafinoz tip oligosakkaritlerin) hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Çok çeşitli kaynaklardan (bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal) farklı yöntemlerle izole edilerek saflaştırılan bu enzimlerin birçok uygulama alanı mevcuttur. Özellikle şeker endüstrisinde önemli bir potansiyele sahip olan α -galaktozidazlar, analitik amaçlı olarak kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerle, yapı analizlerinde ve medikal alanda önemli uygulama alanları bulmuştur.

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 sukroz kristalizasyonu büyük ölçüde engellenir ve sukroz verimi önemli oranda azalır. Bu problem rafinozun α -galaktozidaz enzimi ile hidrolizi ile çözülmekte ve büyük bir ekonomik yarar sağlanmaktadır (Şekil 1.14).



Şekil 1.14 α -Galaktozidaz enzimi ile rafinoz hidrolizi.

Burada önemli bir nokta α -galaktozidaz enzim preparatının safsızlık olarak invertaz aktivitesi içermemesi gerekmektedir (Şekil 1.15). Şeker sanayinde sukrozun kristalizasyonunu engelleyerek verimi düşüren rafinoz, çeşitli çalışmalarda hazırlanan serbest ve immobilize α -galaktozidazlarla hidrolizlenerek biyoteknolojik prosesler için uygun olacak koşullar ve sistemler belirlenmiştir (Önal, 2000).



Şekil 1.15 α -Galaktozidaz ve invertaz ile şeker hidrolizi.

Soya sütü yüksek protein içeriğine sahip olan, esansiyel amino asitleri dengeli ve yeterli miktarda bünyesinde bulunduran soya fasulyesinden elde edilmektedir. Özellikle ocuklar için inek sütü yerine önerilen bir içecektir. Ayrıca soya sütü gelişmekte 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 legml bitkiler gibi yüksek oranda α -galakto-oligosakkaridler (stakiyoz ve rafinoz) içermektedir. Memelilerde pankreatik α -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, 2004; Naganagouda et al., 2007; Cowan and Fernandez-Lafuente, 2011).

Bu projede, karpuzdan izole edilerek amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enziminin Sepabead EC- serisi sentetik taşıyıcılarda (EC-EP, EC-EA ve EC-HA)eşitli immobilizasyon yöntemleri (kovalent bağlama, adsorbsiyon ve çapraz bağlama) kullanılarak immobilizasyonu amaçlanmıştır. İmmobilize edilen α -galaktozidaz enziminin karakterizasyonu yapılarak serbest enzimle kıyaslanmıştır. Ayrıca, soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde immobilize ve serbest α -galaktozidaz enzimlerinin kullanılabilirliği amaçlanmıştır.

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- α -D-galaktopiranozid (PNPG), Sitrik asit, Borik asit, Glutaraldehyd, KCl, NaCl, FeSO₄.7H₂O, 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, MgCl₂.6H₂O, CaCl₂, ZnSO₄.7H₂O, NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ 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, MnSO₄.H₂O, Galaktoz, Glukoz, Fruktoz, Laktoz, Maltoz, Melibioz ve H₂SO₄ Fluka' dan, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O ve Etanol Riedel' den temin edilmiştir.

İmmobilizasyonda kullanılan Sepabead EC serisi taşıyıcılar Mitsubishi Chemical Co. (Resindion S.R.L., Milan)' dan hibe yolu ile temin edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan α -galaktozidaz enzimi karpuzdan (*Citrullus vulgaris*) izole edilmiştir. Ticari α -galaktozidaz enzimlerinden Validase AGS; Valley Research Inc.(South Bend)' den ve α -Galactosidase DS30; Amano Enzyme Inc.(Japonya)' den sağlanmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılan karpuz ile soya sütü hazırlanmasında kullanılan soya unu yerel marketlerden satın alınmıştır.

2.2 Cihaz ve Sistemler

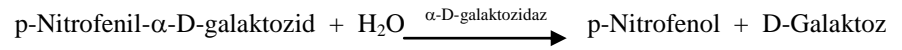
Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılan araç ve gereç aşağıda verilmiştir: Blender (Arzum, Türkiye), homojenizatör (Silverson STL 2, UK), santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Almanya), mini jel sistemi (Biorad, Amerika), derin dondurucu (Uğur, Türkiye), orbital karıştırıcı (IKA Labortechnik KS 260

basic, Almanya), vorteks (IKA MS 2, Almanya), lineer karıştırılmalı su banyosu (Memmert, Almanya), spektrofotometre (Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis, ABD) inkübatör (New Brunswick Scientific, ABD), pH-metre (Hana Instrument, ABD), yüksek performans sıvı kromatografisi-refraktif indeks dedektör (HPLC-RI) (Agilent HP1100, Hewlett and Packard, ABD), HPLC kontrol programı (HP-Chemstation, Agilent, Almanya), HPLC kolonu (Thermo Syntific APS-2 Hypersil-NH₂ 5,0 µm), tek kullanımlık şırınga filtre (Millipore Millex-GN, Naylor, 0,20 µm), distile su cihazları (Fistream, England ve Milli-Q Milipore, ABD).

2.3 α-Galaktozidaz Aktivitesi Tayini

2.3.1 p-Nitrofenil-α-D-galaktopiranozid ile aktivite tayini

α-Galaktozidaz aktivitesi, enzimin sentetik bir substratı olan p-nitrofenil-α-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:



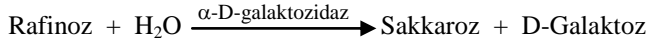
α-Galaktozidazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,5 mL sodyum sitrat tamponu (50 mM; pH 6,0) ve 0,25 mL 2 mM PNPG (pH 6,0 ve 50 mM sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 0,25 mL uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. İmmobilize enzimin aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı 0,25 mL serbest enzim yerine aynı hacimde tamponda süspansiyon edilmiş 20 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 (50 mM, pH 6,0) içerir. Enzim aktivite miktarlarının hesaplanmasında, 0,01–0,25 µmol

p-nitrofenol konsantrasyon aralığı ile hazırlanan p-nitrofenol standart grafiği kullanılır.

Bir α -galaktozidaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1 μ mol p-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarıdır (Unite).

2.3.2 Rafinoz ile aktivite tayini

α -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:



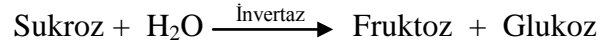
DNS Reaktifi: 1 g DNS, 20 mL 2 N NaOH çözeltisine eklenir ve üzeri kapalı olarak ısıtılarak çözülür. Son hacim distile su ile 50 mL' ye tamamlanır. Üzerine 30 g Na/K tartarat ilave edilir ve çözüldükten sonra son hacim 100 mL' ye tamamlanır.

α -Galaktozidazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,5 mL sodyum sitrat tamponu (50 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 50 mM sitrat tamponu (pH 5,0) içerir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında 2,5-50 μ M galaktoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır.

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

2.4 İvertaz Aktivitesi Tayini

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



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 μ mol glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Unite).

2.5 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.

2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (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, karpuzdan izole edilen α -galaktozidaz preparatının saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini belirlemek için SDS-PAGE kullanıldı.

Poliakrilamid jel elektroforezi, Laemmli (1970) tarafından geliştirilen yöntemle göre mini jel sistemi ile gerçekleştirildi. Yöntem heterojen tampon sistemi temeline dayanır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jele girmeden önce düzenleyici jelde, elektroforez 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.

2.6.1 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.

Karpuz α -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.

2.6.2 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 mavisini) 950 μ L' sine 50 μ L β -merkaptotenol eklendi. Örnekler 95°C' de 5 dakika inkübe edilerek jel kuyucuklarına 20 μ L 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.

2.6.3 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.

2.7 Karpuz α -Galaktozidazının İzolasyonu ve 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 karpuz (*Citrullus vulgaris*) seçildi. Enzim başta mikrobiyal kaynaklar (Shankar et al., 2010; Katroliya et al., 2012; Sinitsyna et al., 2008) olmak üzere birçok çalışmada bitkisel (Bıçak Çelem and Önal, 2008; Çalcı et al., 2009; Bıçak Çelem et al., 2009; Singh and Kayastha, 2012) 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 karpuzdan izole edilerek tuz çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Hazırlanan bu ham enzim preparatı kullanılarak α -galaktozidaz enzimi Sepabead EC-serisi taşıyıcılarda kovalent bağlama ile adsorbsiyon ve çapraz bağlama teknikleri kullanılarak immobilize edildi. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulandı.

Yerel marketlerden temin edilen karpuz dış kabukları ve çekirdekleri uzaklaştırıldıktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Önce bir blender ve sonrasında da homojenizatör ile homojenize edildi. Karpuzun kendi yapısından gelen lif ve artıkları uzaklaştırmak için çift kat tülbenkten süzüldü. Filtrat 10.000 rpm' de 30 dakika 4°C' de santrifüjlendi. Santrifüjata % 85' lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak gece boyunca 4°C' de bekletildi. Amonyum sülfatlı preparat 10.000

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 0,77 U/mL, 0,8 mg protein/mL, 0,96 U/mg olarak belirlendi.

İmmobilize α -galaktozidazların endüstriyel hidroliz proseslerinde kullanımında preparatın içerdiği invertaz enziminin α -galaktozidaz ile yarışmaması için invertaz oranı mümkün olduğunca düşük bir enzim preparatına ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, karpuzdan hazırlanan protein preparatına gradient amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı ve her iki enzimin (α -galaktozidaz ve invertaz) baskın olarak bulunduğu tuz fraksiyonları belirlendi. α -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 diyalizatu immobilizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere derin dondurucuda -20°C' de saklandı. Enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivitesi sırasıyla 1,38 U/mL, 1,59 mg protein/mL, 0,87 U/mg olarak belirlendi. Hazırlanan bu preparat hem protein miktarı hem de α -galaktozidaz aktivitesi açısından immobilizasyon işlemleri için oldukça uygun bir enzim preparatıdır. Enzim preparatının saflığı ve enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile belirlendi.

2.8 α -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

Karpuzdan izole edilerek Bölüm 2.7' de anlatıldığı gibi tuz çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enzim preparatı Sepabead EC- serisi sentetik ticaritaşyıcılarda immobilize edildi. Enzim, Sepabead EC-EP, EC-EA ve

EC-HA taşıyıcılarda kovalent bağlama ile, Sepabead EC-EA ve EC-HA taşıyıcılarda adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. İmmobilizasyon işlemlerinin optimizasyonu amacıyla her bir taşıyıcıda α -galaktozidaz enziminin farklı yöntemlerle immobilizasyonuna çeşitli parametrelerin etkisi incelendi. Hazırlanan immobilize enzimler, kullanılan immobilizasyon yöntemleri ve elde edilen immobilizasyon verimleri açısından kıyaslanarak karakterize edildi.

2.8.1 Sepabead EC-EP taşıyıcıda kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu

Karpuzdan izole edilerek saflaştırılan ve ticari (Validase AGS ve α -Galactosidase DS30) olarak temin edilen α -galaktozidaz enzimleri Sepabead EC-EP' de aşağıda verilen prosedür kullanılarak immobilize edildi: 1 g Sepabead EC-EP taşıyıcı 50 mM sitrat tamponuyla (pH 6,0) yıkandıktan sonra üzerine sırasıyla 0,5, 1,0 ve 1,5 mg protein içerecek şekilde α -galaktozidaz enzim çözeltileri eklendi. Toplam hacim sitrat tamponuyla (50 mM, pH 6,0) 10 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 160 devir/dakika hızla 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra pH \pm 0,1 olacak şekilde pH kontrolü yapıldı ve yine orbital karıştırıcıda 16 saat boyunca 160 devir/dakika hızla karıştırıldı. Ardından 24 saat boyunca karıştırılmadan oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bağlanmayan proteinler filtre edilerek uzaklaştırıldıktan sonra immobilize enzimler 30 mL, 50 mM pH 6,0 sitrat tamponuyla yıkandı. Filtrat ve yıkama suları birleştirilip aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimler 3 M (pH 6,0) glisin çözeltisi ile oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilerek taşıyıcı üzerindeki bağlanmada kullanılmayan diğer aktif epoksi gruplarının blokajı gerçekleştirildi (Grazu et al., 2003).

İmmobilize enzimlerin aktiviteleri tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı. Hazırlanan immobilizasyon prosedüründe her aşamada hem α -galaktozidaz hem de invertaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapıldı.

2.8.1.1 Tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ının immobilizasyon verimine etkisi

Enzimin taşıyıcıya maksimum verimle bağlanması için immobilizasyon koşulları (tampon türü, konsantrasyonu ve pH) optimize edildi. Bu amaçla 0,25; 0,50; 0,75 ve 1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ tamponlarında pH 6,0; 7,0 ve 8,0' de, 1 M Na₂CO₃/NaHCO₃ tamponunda pH 9,0 ve 10,0' da ve 0,1; 0,25; 0,50 ve 0,75 M sitrat tamponunda pH 6,0' da (1 mg protein/g taşıyıcı) karpuzdan kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi yukarıda Bölüm 2.8.1' de belirtilen prosedür kullanılarak immobilize edildi.

2.8.1.2 Protein miktarının etkisi

İmmobilizasyon verimine protein miktarının etkisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.8.1.1' de optimize edilen koşullarda 1 g Sepabead EC-EP taşıyıcıya 0,5-6,0 mg protein içeren enzim çözeltisi eklenerek Bölüm 2.8.1' de açıklanan prosedür ile immobilizasyon gerçekleştirildi. En yüksek aktivite verimi gösteren protein miktarı ile büyük ölçekteki immobilizasyon çalışmalarına devam edildi.

2.8.2 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu

Karpuzdan hazırlanan α -galaktozidaz enzim preparatı aşağıda verilen prosedür ile Sepabead EC-EA ve EC-HA taşıyıcılarda immobilize edildi. Sepabead EC-EA ve EC-HA taşıyıcılar önce glutaraldehyd ile aktive edildi. 1' er gram taşıyıcı alınarak üzerlerine 20 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda hazırlanmış % 0,05-1 (v/v) konsantrasyon aralığındaki glutaraldehyd çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında, orbital karıştırıcıda, 160 devir/dakika hızla 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra glutaraldehydin aşırısı tamponla yıkanarak uzaklaştırıldı. Bu aktivasyon işleminden sonra glutaraldehydle aktiflenmiş taşıyıcıya 0,5 mg protein ilave edildi. Toplam hacim sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0) ile 10 mL'ye tamamlandı. Orbital karıştırıcıda 20 saat boyunca oda sıcaklığında 160 devir/dakika hızla karıştırıldı. Bağlanmayan proteinler filtre edilerek uzaklaştırıldıktan sonra immobilize enzimler 20 mL, 50 mM pH 6,0 sitrat

tamponuyla yıkandı. Filtrat ve yıkama suları birleştirilip aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktiviteleri belirlenerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.8.2.1 Önaktivasyon için glutaraldehid konsantrasyonunun belirlenmesi

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda immobilizasyon verimini arttırmak için glutaraldehid konsantrasyonu optimize edildi. Bunun için literatür verilerinden yararlanılarak çalışmalar % 0,01-0,10 (v/v) aralığındaki glutaraldehid konsantrasyonunda ve 20 mM pH 7,0 sitrat-fosfat tamponunda gerçekleştirildi. 1' er gram taşıyıcı alınarak üzerlerine 20 mM sitrat fosfat (pH 7,0) tamponunda hazırlanmış % 0,01-0,10 (v/v) konsantrasyon aralığındaki glutaraldehid çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 160 devir/dakika hızla 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra glutaraldehidin aşırısı sitrat-fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0) ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Bu aktivasyon işleminden sonra glutaraldehidle aktiflenmiş taşıyıcıya 0,5 mg protein içeren enzim çözeltisi ilave edildi. Toplam hacim sitrat-fosfat tamponu ile 10 mL'ye tamamlandı. Orbital karıştırıcıda 20 saat boyunca, oda sıcaklığında, 160 devir/dakika hızla karıştırıldı. Bağlanmayan proteinler filtre edilerek uzaklaştırıldıktan sonra immobilize enzimler 20 mL, 50 mM pH 6,0 sitrat tamponuyla yıkandı. Filtrat ve yıkama suları birleştirilip aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktiviteleri belirlenerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.8.2.2 Glutaraldehid ile taşıyıcıların aktivasyonunda pH' ın ve aktivasyon süresinin immobilizasyona etkisi

Sepabead EC-EA ve EC-HA taşıyıcılar 20 mM pH 7,5 fosfat tamponunda uygun konsantrasyondaki glutaraldehid çözeltisi ile aktive edildi ve glutaraldehidin aşırısı yine aynı tamponla yıkama yapılarak uzaklaştırıldı. Glutaraldehid ile aktivasyon süresinin de enzim immobilizasyonuna etkisi incelendi. Bu amaçla, Sepabead EC-EA taşıyıcı % 0,01' lik (v/v) ve Sepabead EC-HA taşıyıcı % 0,02' lik (v/v) glutaraldehid çözeltisi ile 20, 30 ve 60 dakika

boyunca inkübe edilerek aktivasyon işlemi gerçekleştirildi. 1 g taşıyıcıya 0,5 mg protein içeren enzim çözeltisi ilave edilerek bağlanma 20 mM sitrat-fosfat tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirildi. Bağlanmayan proteinler filtre edildikten sonra immobilize enzimler 20 mL, 20 mM sitrat fosfat tamponuyla (pH 7,0) yıkandı. Filtrat ve yıkama suları birleştirilip aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Immobilize enzimlerin aktiviteleri belirlenerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.8.2.3 Protein miktarının immobilizasyon verimine etkisi

Uygun protein miktarı/g taşıyıcı oranını belirlemek amacıyla sabit miktardaki taşıyıcılar (1g) Bölüm 2.8.2.1' de belirlenen uygun konsantrasyonlardaki glutaraldehid ile aktive edilerek farklı miktarlarda protein (0,25-4,0 mg) içeren enzim çözeltisi kullanılarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

2.8.3 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda enzim immobilizasyonu için glutaraldehid kullanımı iyi bir tekniktir. Glutaraldehid, taşıyıcının ön aktivasyonu için kullanılabileceği gibi protein adsorplanmış taşıyıcıda protein-taşıyıcı çapraz bağlanmasının eldesinde de kullanılabilir (Klaus, 1976; Tashima et al., 1991; de Santis and Jones, 1999; Vaghjani et al., 2000; Alonso et al., 2005; Filho et al., 2008).

2.8.3.1 Adsorbsiyon ile enzim immobilizasyonuna pH' ın etkisi

İlk olarak adsorbsiyon ile enzim immobilizasyonuna pH' ın etkisi incelendi. Bu amaçla, Sepabead EC-EA taşıyıcıda enzim immobilizasyonu farklı pH' lardaki (pH 3,0-7,0) 20 mM sitrat-fosfat tamponlarında gerçekleştirildi. 1 mg protein/ g taşıyıcı olacak şekilde farklı immobilizasyon setleri kuruldu. Adsorbsiyon 25°C' de orbital karıştırıcıda (200 rpm) 1 saatte gerçekleştirildi. Bağlanmayan proteinler adsorbsiyonda kullanılan tamponlar ile yıkılarak

uzaklaştırıldı. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktiviteleri tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA aynı fonksiyonel gruba (amino) sahip taşıyıcılar oldukları için enzimin adsorbsiyon ile immobilizasyonuna pH' ın etkisinin incelendiği optimizasyon sadece taşıyıcılardan Sepabead EC-EA kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.8.3.2 Tampon konsantrasyonunun enzim immobilizasyon verimine etkisi

Enzimin taşıyıcıya daha yüksek verimle adsorbsiyonunu sağlamak için adsorbsiyon tamponunun konsantrasyonu optimize edildi. Bu amaçla, immobilizasyon işleminde 5, 10, 20, 25 ve 50 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) kullanıldı. Adsorbsiyon, Sepabead EC-EA taşıyıcıda 1 mg protein/ g taşıyıcı olacak şekilde 25°C' de 1 saat orbital karıştırıcıda 200 rpm' de karıştırma yapılarak gerçekleştirildi. Bağlanmayan proteinler adsorbsiyonda kullanılan tamponlar aracılığıyla yıkanarak uzaklaştırıldı. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA aynı fonksiyonel gruba (amino) sahip taşıyıcılar oldukları için enzimin adsorbsiyon ile immobilizasyonuna tampon konsantrasyonunun etkisinin incelendiği optimizasyon taşıyıcılardan sadece Sepabead EC-EA kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.8.3.3 Enzim immobilizasyonunda uygun protein/ g taşıyıcı oranının belirlenmesi

Adsorbsiyonla immobilizasyonda uygun protein/g taşıyıcı oranının belirlenmesi için Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda sırasıyla 0,5-4,0 ve 0,25-4,0 mg protein/g taşıyıcı olacak şekilde enzim immobilize edildi. Adsorbsiyon basamağında ve bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) kullanıldı. Adsorbsiyon 25°C' de 1 saat

orbital karıştırıcıda 200 rpm' de karıştırma yapılarak gerçekleştirildi. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.8.3.4 Enzim immobilizasyonunda uygun adsorbsiyon süresinin belirlenmesi

Adsorbsiyon süresinin belirlenmesi için yukarıda anlatıldığı gibi optimize edilen koşullarda Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcı için 0-60 dakikalık immobilizasyon setleri 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) varlığında kuruldu. Adsorbsiyon; Sepabead EC-EA taşıyıcıda 1 mg protein/ g taşıyıcı ve Sepabead EC-HA' da 0,5 mg protein/ g taşıyıcı olacak şekilde 25 °C' de, orbital karıştırıcıda 200 rpm' de gerçekleştirildi. Bağlanmayan proteinler adsorbsiyonda kullanılan tampon vasıtasıyla yıkanarak uzaklaştırıldı. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.8.3.5 Glutaraldehyd ile çapraz bağlamada tampon türünün ve pH' ının immobilizasyon verimine etkisi

Glutaraldehyd ile immobilize enzimlerin çapraz bağlaması ve glutaraldehydin aşırısının uzaklaştırılması literatür verileri doğrultusunda farklı türlerde ve farklı pH' lardaki tamponlarla (20 mM sitrat-fosfat tamponu pH 5,0-7,5; 20 mM sodyum fosfat tamponu pH 6,0-8,0) gerçekleştirildi (Kubitzki et al., 2008; Filho et al., 2008; Lopez-Gallego et al., 2005). Çapraz bağlama için oldukça düşük glutaraldehyd konsantrasyonuyla (% 0,001; v/v) çalışıldı. Adsorbsiyon; Sepabead EC-EA taşıyıcıda 1 mg protein/ g taşıyıcı olacak şekilde 25 °C' de 30 dakika orbital karıştırıcıda 200 rpm' de gerçekleştirildi. Adsorbsiyon işlemi ile immobilizasyon ve bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) kullanıldı. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.8.3.6 Çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehid konsantrasyonunun belirlenmesi

Çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehidin konsantrasyonu her iki taşıyıcı (Sepabead EC-EA ve EC-HA) için belirlendi. Sepabead EC-EA taşıyıcıda 1 mg protein/ g taşıyıcı ve Sepabead EC-HA' da 0,5 mg protein/ g taşıyıcı olacak şekilde 25°C' de 30 dakika orbital karıştırıcıda 200 rpm' de enzim adsorbsiyonu gerçekleştirildi. Adsorbsiyon basamağında ve bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılmasına 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) kullanıldı. % 0,001–0,020 (v/v) konsantrasyon aralığındaki glutaraldehid çözeltileri 20 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6,0) hazırlandı. Glutaraldehidle çapraz bağlama işlemi 25°C' de 30 dakika orbital karıştırıcıda 200 rpm' de gerçekleştirildi. Glutaraldehidin aşırısı 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,0) ile yıkama yapılarak uzaklaştırıldı. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

2.9 α -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu

2.9.1 α -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi

Taşıyıcıya bağlanma sonucu enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişme gözlenebilir. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kimyasal kovalent bağlanma durumunda yükü ve kimyasal yapısı değişir. Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktivitesinde düşme beklenir ancak hiç değişmediği veya arttığı durumlar da söz konusudur.

İmmobilize ve serbest enzimlerin aktivitelerinin kıyaslanabilmesi için taşıyıcıya 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. Taşıyıcıda immobilize edilmiş protein miktarı da ilave edilen

protein ile yıkama sularındaki bağlanmayan protein miktarı arasındaki farktan hesaplanarak belirlenir.

Karpuzdan izole edilen ve ticari olarak temin edilen α -galaktozidazın aktivite ve protein miktar tayinleri Bölüm 2.3 ve 2.5' de açıklanan yöntemler ile belirlendi. α -Galaktozidazların aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri Sonuçlar ve Tartışma bölümünde ilgili tablolarda verildi.

2.9.1.1 pH

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH, optimum pH'dır. α -Galaktozidazın optimum pH değerleri kullanılan enzim kaynağına, substrata, inkübasyon zamanı ve sıcaklığına göre oldukça geniş bir aralıkta farklılık göstermektedir.

Ortamin pH' ı enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Çünkü enzimler protein yapıdadırlar ve çevre koşullarından etkilenirler. Bu nedenle immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak ve hidroliz için optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından faydalı olacaktır.

Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzim prepatlarının aktivitelerine pH'm etkisinin belirlenmesi için inkübasyon tamponunun pH' ı 2,6-7,5 (50 mM Sitrat/Fosfat tamponu) 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.

2.9.1.2 Sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin katalitik aktivitesi için önemli bir parametredir. Belirli sıcaklık limitlerinin üzerindeki değerlerde enzim proteinin denaturasyonundan dolayı aktivitede düşme gözlenir. Bu nedenle, immobilizasyonun sebep olduğu sıcaklığa bağımlılık çalışmaları enzimler ve kimyasal katalizatörlerin kıyaslanmasında faydalı bilgiler verebilir (Önal, 2000).

Belirli çalışma koşullarında farklı sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Bitkisel α -galaktozidazların çoğunun optimum sıcaklık değerleri 37-40°C arasında değişmektedir. 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 optimum sıcaklığı genellikle değişir.

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

2.9.1.3 Substrat konsantrasyonu

α -Galaktozidazın sentetik bir substratı olan PNPG ve doğal substratlarından rafinozun enzim aktivitesine etkisi incelenerek doygunluk substrat konsantrasyonları ile K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (PNPG):

Doygunluk 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 doygunluk konsantrasyonu belirlenerek $1/[S]$ ile $1/v$ arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Rafinoz:

Doygunluk substrat (Rafinoz) konsantrasyonu ve K_m ile V_{max} değerlerinin belirlenmesi için sitrat tamponunda hazırlanmış (50 mM, pH 6,0) 100 mM stok rafinozdan çıkılarak 2,5-50 mM rafinoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi tayin edildi. Her deneme seti çift tekrarlı çalışıldı.

2.9.1.4 Efektör konsantrasyonunun etkisi

Bir enzimin aktivitesi yalnızca fiziksel etmenlerden değil kimyasal etmenlerden de etkilenmektedir. Bu etkiler aktiviteyi artırıcı (aktivasyon) veya düşürücü (inhibisyon) yönde olabilir.

Çeşitli kimyasallar ($CaCl_2$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, KCl , $NaCl$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2CO_3) ve şekerler (galaktoz, glukoz, sukroz, fruktoz, laktoz, maltoz, melibiöz, 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. Farklı efektörlerin serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine etkisi Sonuçlar ve Tartışma bölümünde tablolar halinde verildi.

2.9.2 Kararlılık testleri

Özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacak olan immobilize enzim preparatlarının kararlılıkları dikkate alınması gereken en önemli parametrelerdendir. Immobilize enzimin kararlılığından anlaşılan belirli çalışma koşullarında enzimin aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Bu sıradaki enzim aktivite kaybı çeşitli nedenlere dayanır. Bunlar, mikrobiyal yıkım ve termik, pH veya kimyasal inaktivasyon olarak sıralanabilir. Bunun dışında taşıyıcının parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzim kaçıışı da aktivite kaybına neden olur.

İmmobilize enzimin depo ve operasyonel kararlılıkları da endüstriyel açıdan önemli parametrelerdir. Genellikle immobilize enzimlerin depo kararlılıkları serbest enzimlerinkinden daha iyidir. Ancak tersi durumlarla da karşılaşılabilir. Depo kararlılığı uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Bu süre içinde enzimin katalitik potansiyelinden yararlanılmaz yani enzim iş yapmaz. Operasyonel kararlılık ise enzimin iş yapma süresince aktivitesindeki değişmeyi gösteren bir parametredir. Operasyonel kararlılık ne kadar yüksekse enzimin katalitik potansiyelinden o ölçüde yararlanılabilir. Operasyonel kararlılığın ölçüsü ise enzimin reaktördeki yarı ömrüdür ($t_{1/2}$). Yani enzim aktivitesinin yarısının kaybolması için geçen süredir (Önal, 2000).

2.9.2.1 pH kararlılığı

Ortam pH'nın serbest ve immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığına etkisini incelemek amacı ile düzenlenen deney setinde, aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimler için inkübasyon tamponunun pH'ı, pH 2,6-7,5 (sitrat-fosfat tamponu, 50 mM) aralığında değiştirilerek 3 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Standart koşullarda geriye kalan aktiviteleri tayin edildi. Her bir set çift çalışıldı.

2.9.2.2 Termal kararlılık

Termal kararlılık tayininde, aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimler önce 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (4, 25, 37, 40, 50, 60, 65, 70, 80°C) inkübe edildi ve standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. Her bir sıcaklık değeri için örnekler çift çalışılmıştır.

Serbest ve immobilize enzim preparatlarının ön inkübasyon zamanına bağımlı termal kararlılıklarını belirlemek için aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim preparatları 37°C ve 50°C' de farklı sürelerde (15-30-45-60-75-90-105 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.

2.9.2.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize enzimlerin uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametredir ve uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür (Önal, 2000).

Depo kararlılığını belirlemek için, 4°C’ de aynı koşullarda saklanan serbest ve immobilize enzimlerden 8 ay boyunca belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda tayin edildi.

2.9.2.4 Operasyonel kararlılık

Enzimlerin operasyonel kararlılığı, immobilize sistemlerin endüstriyel uygulamaları için önemli bir parametredir. Operasyonel kararlılık, reaktörden belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin standart koşullarda aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenir.

Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda kovalent ve adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen α -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılık denemeleri substrat olarak hem PNPG hem de rafinoz kullanılarak gerçekleştirildi. PNPG ile yapılan operasyonel kararlılık denemelerinde reaktöre 20 mg immobilize enzim, 0,25 mL 2 mM PNPG ve 0,75 mL sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) ilave edilerek 37°C’ de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin üst sıvı fazı ayrılarak immobilize enzimin aktivitesi standart α -galaktozidaz aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Sistem 52 saat boyunca sürekli olarak çalıştırıldı.

Rafinoz ile operasyonel kararlılık çalışması PNPG ile yapılan kararlılık çalışmasına benzer şekilde gerçekleştirildi. Reaktöre 20 mg immobilize enzim 0,9 mL sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) 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 52 saat boyunca sürekli olarak çalıştırıldı.

2.9.2.5 Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği özellikle endüstriyel uygulamaları için oldukça önemli bir parametredir. İmmobilize α -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 50 mM sitrat tamponu (pH 6,0), 0,25mL 2 mM PNPG (sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 20 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 10 kez olmak üzere 3 gün içerisinde 30 kez aktivite tayini yapılmış ve enzim preparatları gece boyunca 4°C'de saklanarak tekrar ölçümlerde kullanılmıştır.

Substrat olarak rafinozun kullanıldığı reaksiyon ortamı; 0,9 mL 50 mM sitrat tamponu (pH 6,0), 0,1 mL 10 mM rafinoz (sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 20 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 olmak üzere 3 gün içerisinde 18 kez aktivite tayini yapılmış ve enzim preparatları gece boyunca 4°C'de saklanarak tekrar ölçümlerde kullanılmıştır.

2.10 İmmobilize α -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının PNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı

Substrat olarak p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (PNPG) ve rafinoz kullanılarak kesikli karıştırmalı batch sistemde α -galaktozidaz enziminin substrat hidroliz çalışmaları gerçekleştirildi.

Substrat hidroliz hızının belirlenmesi için 52 saat boyunca belirli zaman aralıklarında ortamdaki örnek alınarak aktivite tayini yapıldı. PNPG için kurulan sistemlerde 20 mg immobilize enzim 0,25 mL, 2 mM PNPG ve 0,75 mL sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) ilave edilerek 37°C’ de inkübe edildi. Rafinoz için kurulan sistemler ise 0,10 mL, 100 mM rafinoz; 0,9 mL sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) ve 20 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.

2.11 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi

2.11.1 Soya sütünün hazırlanması

Soya sütü, soya fasulyesinin öğütülmesi ile elde edilen soya unundan iki farklı metod kullanılarak hazırlandı. Bu metodlardan ilki; Mulimani ve Ramalingam (1995) tarafından önerilen metod olup soya unu önce yağlı kısımların uzaklaştırılması için n-hegzan ile (1:1 w/v) muamele edildi. Unun üzerinde oluşan yağlı faz Pasteur pipeti yardımıyla uzaklaştırıldı. Geriye kalan soya unu önce 10 hacim distile su ile süspanse edildi ve ardından enzimatik aktivitenin sonlandırılması için 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Çözünmeyen kısımların uzaklaştırılması için preparat oda sıcaklığında 5 dakika 5.000 rpm’ de santrifüjlendi. Santrifüj 4°C’ de 24 saat bekletildikten sonra tekrar oda sıcaklığında 5 dakika 5000 rpm’ de santrifüjlendi. Santrifüj soya sütü olup oligosakkarit miktar tayini ve enzimatik hidroliz çalışmalarında kullanılmak üzere 4°C’ de depolandı.

Guimaraes ve arkadaşlarının (2001) önerdiği ikinci yöntemde; soya unu distile su ile (1:8 w/v) 80° C’ de homojenize edildi. 10 dakika 85° C’ de inkübe edildikten sonra tülben bezinden süzülde. Sıvı kısım soya sütü olup oligosakkarit miktar tayini ve hidroliz çalışmalarında kullanılmak üzere 4°C’ de depolandı.

Her iki yöntemle hazırlanan soya sütüne alternatif bir metod olarak etanol ekstraksiyonu da uygulandı. 15 mL soya sütü 35 mL etanolle muamele edildikten sonra 6.000 rpm' de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Çökelek yine 15 mL distile suda çözüldü. Hazırlanan tüm soya sütlerinde toplam oligosakkarit miktarı tayin edilerek HPLC' de karbohidrat analizleri yapıldı.

2.11.2 Soya sütünde toplam oligosakkarit miktarının tayini

Hazırlanan soya sütlerinde toplam karbohidrat miktarının tayini için Fenol-Sülfürik Asit yöntemi kullanıldı (Masuko et al., 2005). 50 µL soya sütü üzerine 150 µL derişik sülfürik asit ilave edildikten sonra hemen 30 µL % 5 fenol (d. H₂O içinde) eklendi. 10-15 dakika 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.

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

Hidroliz reaksiyonları kesikli karıştırmalı sistemlerde hem serbest hem de immobilize enzim preparatları ile gerçekleştirildi. 250 mL' lik erlenlerde 10 mL soya sütüne içerisinde 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 yürütülen 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.

2.11.4 HPLC ile ayırım ve hidroliz derecesinin belirlenmesi

HPLC ile karbohidratların ayırımında Hypersil NH₂ kolon kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 100 µL ve kolon sıcaklığı 35°C olarak ayarlandı. Mobil faz olarak asetonitril:su (75:25; v/v) ve akış hızı olarak 1,0 mL/dak. kullanıldı. Refraktif indeks dedektör (RID) kullanılarak karbohidratlar analizlendi. Galaktoz,

fruktoz, sukroz, rafinoz ve stakiyoz HPLC-RID 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 HPLC-RID sistemine uygulanarak hazırlanan enzim preparatları ile soya sütünde rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizlenebilirliği araştırıldı.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 α -Galaktozidaz Enziminin Karpuzdan İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

α -Galaktozidaz enzimi özellikle şeker endüstrisinde rafinozun hidrolizinde ve gıda işleme proseslerinde soya sütü oligosakkaritlerinin hidrolizinde önemli bir potansiyele sahiptir. Ayrıca enzim, kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde ve medikal alanda kan grubu dönüşümleri ve Fabry hastalığının tedavisinde önemli uygulama alanlarına sahip olması nedeniyle çeşitli kaynaklardan izolasyonu, saflaştırılması ve immobilizasyonu son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Enzim, *bitkisel* (Dey, 1984; Itoh et al., 1986; Balasubramaniam and Mathew, 1986; Cuourtois and Petek, 1988; Burns, 1990; Shivanna et al., 1990; Chien and Lin-Chu, 1991; Haibach et al., 1991; Somiari and Balogh, 1993; Dhar et al., 1994; Önal, S. and Telefoncu, A., 1998; Önal, 2000; Guimaraes et al., 2001; Kang and Lee, 2001; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003; Bryant et al., 2004; Viana et al., 2005; Soh et al., 2006; Gupta and Saleemuddin, 2006; Bıçak Çelem and Önal, 2008; Bıçak Çelem et al., 2009; Şen et al., 2011; Singh and Kayastha, 2012), *mikrobiyal* (Thanankul et al., 1976; Mitsutomi et al., 1985; Wong et al., 1986; Nagao et al., 1988; Talbot and Sygusch, 1990; Nadkarni et al., 1992; Zeilinger et al., 1993; Lounteri et al., 1998; Kotwal et al., 1999; Xiao et al., 2000; Varbanets et al., 2001; Thippeswamy and Mulimani, 2002; King et al., 2002; Gote et al., 2004; Prashanth and Mulimani, 2005, Viana et al., 2006; Rezessy-Szabo et al., 2007; Sinitsyna et al., 2008; Shankar et al., 2009) ve *hayvansal* (Kusiak et al., 1978; Galili et al., 1985; Dean and Sweeley, 1979a; 1979b; 1979c; Yasuda et al., 2004) kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Özellikle bitkisel kaynaklardan yüksek saflıkta ve tamamen homojen α -galaktozidaz eldesi oldukça zor olsa da önemli olan daha sonraki çalışmalarda kullanılabilir nitelikte bir protein preparatının hazırlanmasıdır. Shen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çimlenen kahve tohumlarının α -galaktozidaz kaynağı olarak mevcut ticari ürün kaynağına (yeşil kahve tohumları) alternatif ve avantajlı olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, enzim amonyum sülfat

çöktürmesi, aseton çöktürmesi ve DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır (Shen et al., 2008). *Streptomyces griseoloalbus*’ tan üretilerek kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi karakterize edilmiş ve gıda sanayindeki çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek nitelikte bir enzim olduğu belirtilmiştir (Anisha et al., 2008). *Aspergillus parasiticus* α -galaktozidazı aseton çöktürmesi ve anyon değişim kromatografisi ile % 4,4 verimle 16,59 kat saflaştırılmıştır (Shivam and Mishra, 2010). Bir başka çalışmada, domatesten izole edilen α -galaktozidaz enzimi üçlü faz ayırma tekniği ile % 80 verimle 4,3 kat saflaştırmıştır (Çalcı et al., 2009).

Bu çalışmada, enzim kaynağı olarak ülkemizde bol yetişen, kolay temin edilebilen, ucuz ve α -galaktozidaz aktivitesi ile termal kararlılığı oldukça yüksek olan karpuz seçilmiştir. Daha önce karpuzdan çıkılarak α -galaktozidaz enziminin saflaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalarda (Önal, 1994; 2000) enzimin saflaştırılması ve tamamen saf bir preparatının eldesinin oldukça zor olduğu ayrıca elde edilen enzim miktarının az olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında immobilizasyon işlemlerinde kullanılacak enzimin amaca uygun şekilde kısmi olarak saflaştırılmasına karar verilmiştir. Enzim, “Materyal ve Metod” bölümünde detaylı olarak açıklandığı gibi bilinen genel ve geleneksel yöntemler kullanılarak karpuzdan izole edilip amaca uygun şekilde kısmi olarak saflaştırılmıştır. % 85’ lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak hazırlanan kısmi saf enzim preparatının içerdiği α -galaktozidaz ve invertaz enzimlerinin aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kısmi saf enzim preparatının [% 85’ lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonrası] α -galaktozidaz ve invertaz içeriği.

ENZİM	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (Unit/mg)
α-Galaktozidaz	23,1	24	0,963
İnvertaz	8,6	24	0,358

İmmobilize α -galaktozidazların rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin endüstriyel hidroliz proseslerinde kullanımında enzim preparatının içerdiği invertaz enziminin α -galaktozidaz enzimi ile yarışmaması için mümkün olduğunca invertaz oranı düşük bir enzim preparatına ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, karpuzdan izole edilen protein preparatına gradient (% 0-80, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış ve her iki enzimin baskın olarak bulunduğu tuz fraksiyonları belirlenmiştir. Tuz çöktürmesi ile ilgili sonuçlar α -galaktozidaz ve invertaz enzimleri için sırasıyla Çizelge 3.2 ve 3.3’de verilmiştir.

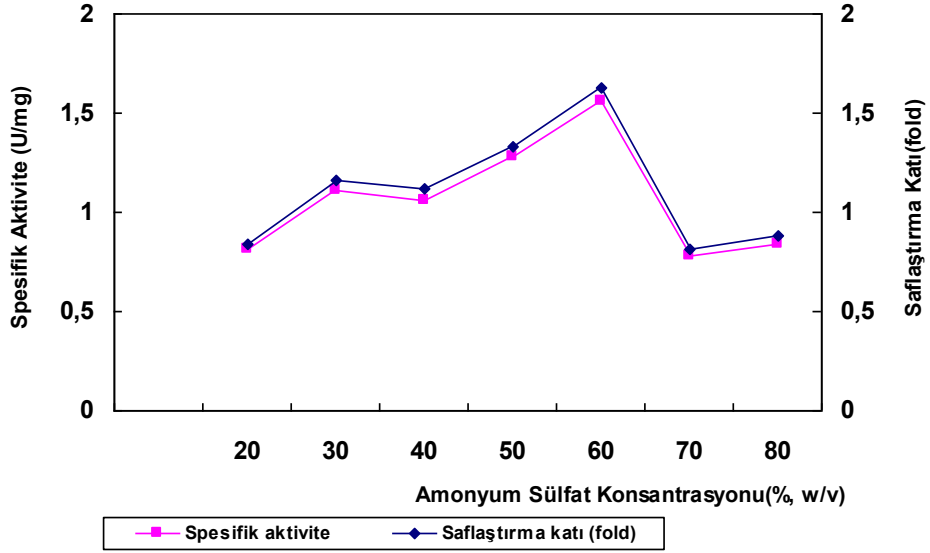
Çizelge 3.2 α -Galaktozidaz enziminin gradient amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.

Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%) (w/v)	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katı (fold)	Verim (%)
0- 20	2,0	2,46	0,81	0,84	8,66
20- 30	0,3	0,27	1,11	1,16	1,30
30- 40	0,52	0,49	1,06	1,12	2,25
40- 50	2,25	1,76	1,28	1,33	9,74
50- 60	4,48	2,87	1,56	1,03	19,4
60- 70	2,5	3,2	0,78	0,81	10,8
70- 80	1,77	2,1	0,84	0,88	7,7

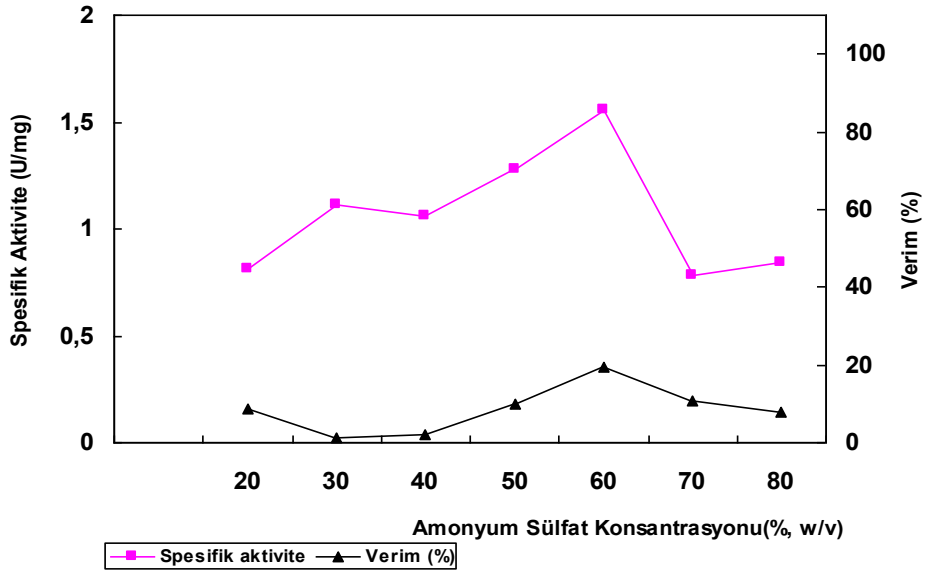
Çizelge 3.3 İvertaz enziminin gradient amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.

Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%) (w/v)	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katı (fold)	Verim (%)
0- 20	2,84	2,46	1,15	3,2	33
20- 30	0,26	0,27	0,96	2,7	3,02
30- 40	0,65	0,49	1,33	3,7	7,54
40- 50	0,62	1,76	0,35	0,97	7,2
50- 60	0,84	2,87	0,30	0,83	9,8
60- 70	0,58	3,2	0,18	0,5	6,74
70- 80	0,51	2,1	0,24	0,67	5,92

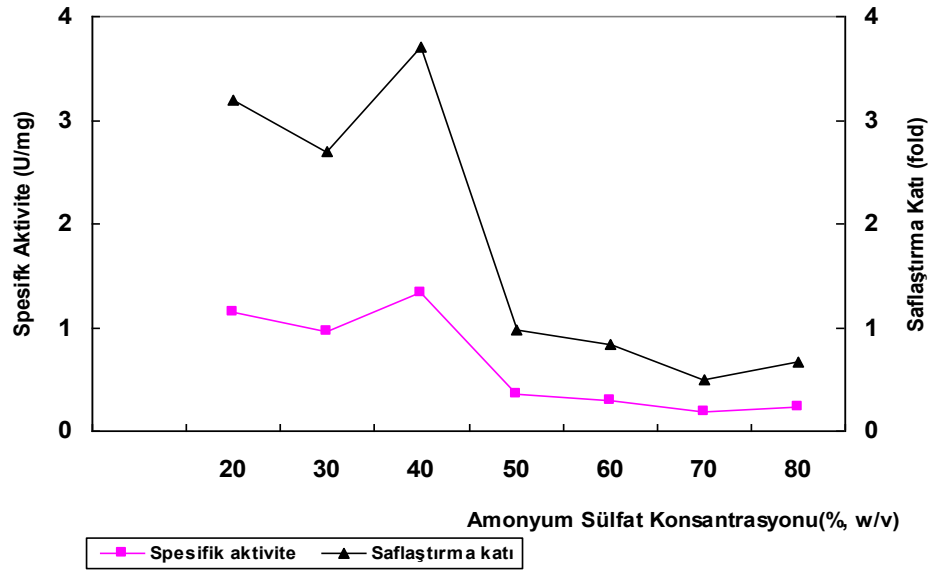
Gradient amonyum sülfat çöktürmesinin α -galaktozidaz ve invertaz enzimlerinin saflaştırma katı ile aktivite verimine etkisi sırasıyla α -galaktozidaz için Şekil 3.1 ve 3.2’de ve invertaz için Şekil 3.3 ve 3.4’de verilmiştir.



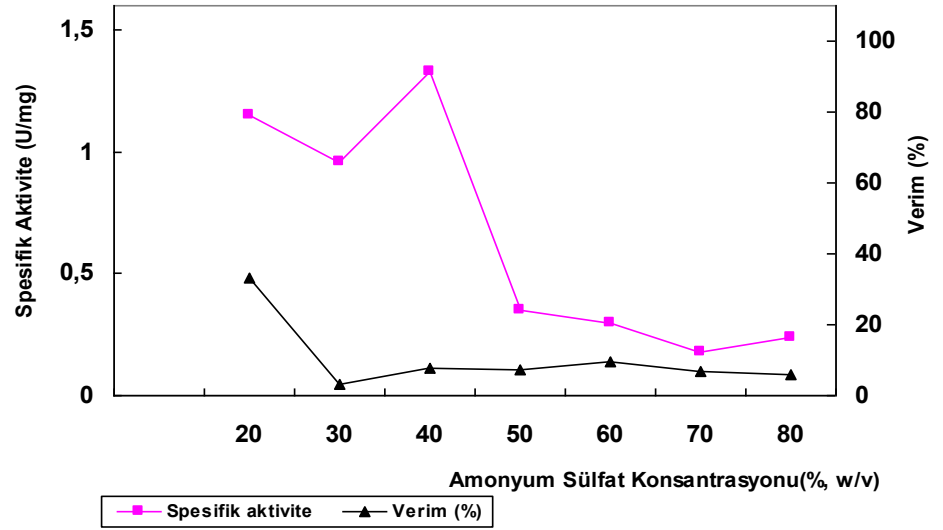
Şekil 3.1 Amonyum sülfat konsantrasyonunun α -galaktozidaz enziminin saflaştırma katına etkisi.



Şekil 3.2 Amonyum sülfat konsantrasyonunun α -galaktozidaz enziminin saflaştırma verimine etkisi.



Şekil 3.3 Amonyum sülfat konsantrasyonunun invertaz enziminin saflaştırma katına etkisi.



Şekil 3.4 Amonyum sülfat konsantrasyonunun invertaz enziminin saflaştırma verimine etkisi.

Gradient tuz çöktürmesi ile elde edilen sonuçlar protein preparatında her iki enzimin bir arada bulunduğunu gösterdiğinden bir sonraki adımda farklı bir çöktürme işlemi yapıldı. Çizelge 3.2 ile Şekil 3.1 ve 3.2' den görüldüğü gibi, α -galaktozidaz enzimi % 40'ın (w/v) üzerindeki amonyum sülfat konsantrasyonlarında, Çizelge 3.3 ile Şekil 3.3 ve 3.4' den görüldüğü gibi invertaz enzimi ise % 40'ın (w/v) altındaki tuz konsantrasyonlarında baskın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, iki enzimi fraksiyonlamak ve birbirinden ayırmak için % 85' lik (w/v) amonyum sülfat ile çöktürülerek deriştirilen protein preparatına önce % 35' lik (w/v) ve ardından % 85' lik (w/v) gradient amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Çökelelerde her iki enzimin aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi. Gradient tuz çöktürmesi ile ilgili sonuçlar α -galaktozidaz ve invertaz enzimleri için sırasıyla Çizelge 3.4 ve 3.5' de verilmiştir.

Çizelge 3.4 α -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)	Saflaştırma Katı (fold)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
35	0,7	1,4	0,5	0,59	6,4
85	8,03	9,22	0,87	1,04	73,4

* α -Galaktozidaz; 10,94 U, 13,04 mg protein, 0,84 U/mg.

Çizelge 3.5 İvertaz enziminin gradient (% 35 ve % 85, w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.*

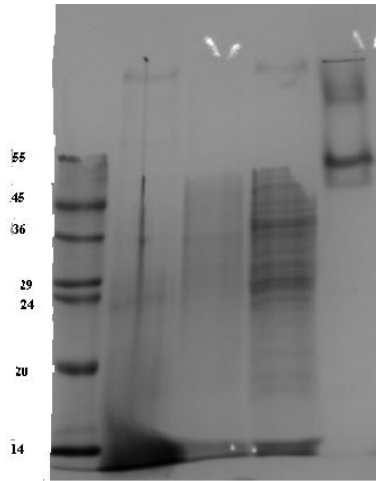
Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%) (w/v)	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katı (fold)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
35	1,22	1,40	0,87	1,78	19,12
85	1,60	9,22	0,17	0,35	25,08

* İvertaz; 6,38 U, 13,04 mg protein, 0,49 U/mg.

Çizelge 3.4 ve 3.5' den görüldüğü gibi % 85' lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen protein preparatı α -galaktozidazca zengin olup invertaz içeriği kabul edilebilir minimum miktardadır. Bu nedenle, % 85' lik (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi ile deriştirilmiş ve ardından % 35-% 85' lik (w/v) gradient tuz çöktürmesi yapılmış enzim fraksiyonu immobilizasyon çalışmaları için uygun bir preparat olarak kabul edilmiş ve büyük ölçekte hazırlanarak immobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere 4°C' de depolanmıştır.

İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere karpuzdan kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enziminin saflık kontrolünü yapmak ve molekül kütesini tayin etmek için SDS-PAGE (Laemmli, 1970) gerçekleştirildi. İmmobilizasyon işlemlerinde kullanılan α -galaktozidaz enzim preparatlarının protein içeriği, aktivite ve spesifik aktivite değerleri ilgili bölümlerde ve çizelgelerde yeri geldikçe verildi.

Karpuzdan izole edilerek amonyum sülfat çöktürmesi ile fraksiyonlanarak kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi için % 12' lik SDS-PAGE uygulandı. Elektroforez sonrasında jel Coomassie Brilliant Blue metodu ile boyandı. Elektroforogramdan (Şekil 3.5) görüldüğü gibi α -galaktozidaz enziminin molekül kütesi 45 kDa olarak bulundu.



Şekil 3.5 Karpuz α -galaktozidazının SDS-PAGE elektroforegramı. (L1:Protein molekül kütle standartları, L5: α -galaktozidaz).

α -Galaktozidazların molekül kütleleri ve yapıları enzim kaynağına ve kullanılan tayin yöntemine göre farklılıklar göstermektedir. *Aspergillus terreus*_{gr} α -galaktozidazının molekül kütlesi 108 kDa (Shankar et al., 2009), *Humicola* sp α -galaktozidazının molekül kütlesi 87,1 kDa (Kotwal et al., 1999), *Pycnoporus cinnabarinusun* (Mitsutomi et al., 1985) 52 kDa olarak bulunmuştur. Funguslardan izole edilen α -galaktozidazların molekül kütleleri diğer mikrobiyal kaynaklardan elde edilen α -galaktozidazlara oranla daha düşüktür (Shankar et al., 2009). Karpuz α -galaktozidazının molekül kütlesi diğer bitkisel kaynaklı α -galaktozidazlarla uyumludur. Bitkisel kaynaklı α -galaktozidazların molekül kütleleri genellikle 30-100 kDa arasında değişim göstermektedir (bkz. Çizelge 1.2) (Dey, 1984; Shivanna et al., 1990, Önal, 2000; Guimaraes et al., 2001; Kang and Lee, 2001; Kim et al., 2002; Soh et al., 2006; Bıçak Çelem and Önal, 2008; Bıçak Çelem et al., 2009).

3.2 α -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

α -Galaktozidaz enziminin çeşitli kaynaklardan izole edilerek saflaştırıldığı ve karakterize edildiği çok sayıda çalışma olmasına rağmen immobilizasyon çalışmalarının sayısı oldukça azdır (Mitsutomi et al., 1985; Bakunina et al., 2006; Naganagouda and Mulimani, 2006; Girigowda and Mulimani, 2006; Falkoski et al., 2009; Okutucu et al., 2010; Liu et al., 2011; Rajan and Nair, 2010; Filho et al., 2008; Singh and Kayastha, 2012; Bayraktar et al., 2012). Sepabead serisi taşıyıcılar *endoglukanaz* (Hilterhaus et al., 2008), *lakkaz* (Kunamneni et al., 2008), *lipaz* (Palomo et al., 2003; Mateo et al., 2003; Hilterhaus et al., 2008; Hernandez and Fernandez-Lafuente, 2011), *benzoilformat dekarboksilaz* (Hilterhaus et al., 2008), *enterokinaz* (Kubitzki et al., 2008), β -galaktozidaz (Mateo et al., 2003; Pessela et al., 2003; 2006; 2007; Torres and Batista-Viera, 2012), *glukoz oksidaz* (Betancor et al., 2006), *fruktoziltransferaz* (Ghazi et al., 2005; Platkova et al., 2006), *glutaril açilaz* (Mateo et al., 2003; Lopez-Gallego et al., 2004; Alonso et al., 2005), *D-amino asit oksidaz* (Lopez-Gallego et al., 2005; Dib and Nidetzky, 2008), *invertaz* (Mateo et al., 2003), *inulaz* (Ricca et al., 2010), *glukoamilaz* (Mateo et al., 2003), *fitaz* (Bıçak Çelem and Önal, 2009a; 2009b), *epoksit hidrolaz* (Mateo et al., 2007), *asetil esteraz* (Pasta et al., 2004), *arginaz*

(Könst et al., 2011), *ornitin dekarboksilaz* (Könst et al., 2010) ve *fosfolipaz* (Anthonsen et al., 1999) gibi birçok enzimin immobilizasyonunda başarıyla kullanılmıştır. Son yıllarda Sepabead serisi taşıyıcılar ile yapılan α -galaktozidaz immobilizasyon çalışmaları da dikkat çekmektedir (Pessela et al., 2007; Filho et al., 2008; Bayraktar et al., 2011). *Thermus sp. T2*' den saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EP ve amino-epoksi EC-HFA' da sırasıyla % 85 ve % 91 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir (Filho et al., 2008).

3.2.1 Sepabead EC-EP taşıyıcıda kovalent bağlama yöntemi ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu

Karpuzdan izole edilerek saflaştırılan ve ticari olarak temin edilen α -galaktozidaz enzimleri (Validase AGS ve α -Galactosidase DS 30) Sepabead EC-EP' de kovalent olarak immobilize edildi. Validase AGS enzimi Valley Research Inc.'den ve α -Galactosidase DS 30 enzimi ise Amano Enzyme Inc.' den hibe yoluyla temin edilmiştir. Her iki ticari enzim *Aspergillus niger* kaynaklıdır. Üç enzim preparatının içerdiği α -galaktozidaz ve invertaz aktiviteleri ile protein miktarları belirlendi ve spesifik aktiviteleri hesaplandı (Çizelge 3.6). Ticari enzimlerin aktivite ve protein miktarlarının tayinlerinde 2,5 mg katı enzim/mL'lik çözeltileri kullanıldı. Çizelge 3.6' dan görüldüğü gibi ticari α -galaktozidaz enzimleri karpuzdan hazırlanan enzime kıyasla oldukça yüksek oranda α -galaktozidaz ve invertaz aktiviteleri içermektedirler.

Sepabead EC-EP polimetakrilat tabanlı, epoksi aktif fonksiyonel gruba sahip sentetik bir taşıyıcıdır. Sepabead EC-EP' de lakkaz (Kunamneni et al., 2008), lipaz (Hilterhaus et al., 2008), glukoz oksidaz (Betancor et al., 2006), fruktozil transferaz (Platkova et al., 2006), glutaril açilaz (Lopez-Gallego et al., 2004) ve fitaz (Bıçak Çelem and Önal, 2009a; 2009b) gibi bir çok enzim yüksek verimle immobilize edilmiştir. Epoksi grupları pH'a bağlı olarak proteinlerdeki farklı nükleofillerle reaksiyona girebilirler. Nötral ya da hafif alkali pH' larda tiyol grupları ile, pH 9' un üzerinde amino grupları ile, pH 11' in üzerinde tirozinin fenolik gruplarıyla ve hafif asidik pH' larda karboksil grupları ile reaksiyon verebilirler (Ghazi et al., 2005). Epoksi aktif taşıyıcılar nötral pH' da oldukça kararlı olmaları, uzun süre saklanabilmeleri, enzim-taşıyıcı bağının

yüksek kararlılığı ve geride kalan aktif boş uçlarının bloke edilebilmesi nedeniyle enzim immobilizasyonunda tercih edilmektedirler (Mateo et al., 2003).

Karpuzdan izole edilerek saflaştırılan ve ticari olarak temin edilen α -galaktozidaz enzimleri Sepabead EC-EP' de Bölüm 2.8.1' de verilen prosedür kullanılarak immobilize edildi: 1 g Sepabead EC-EP taşıyıcıya her bir enzim preparatından 0,5, 1,0 ve 1,5 mg protein içerecek şekilde α -galaktozidaz enzimi ilave edilerek immobilize edildi. Immobilize enzimlerin aktiviteleri tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı. Hazırlanan immobilizasyon prosedüründe her aşamada hem α -galaktozidaz hem de invertaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapıldı.

Çizelge 3.6 Enzim preparatlarının α -galaktozidaz ve invertaz içeriği.

ENZİM/KAYNAĞI	α -GALAKTOZİDAZ			İNVERTAZ		
	Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite
	(U/mL)	(mg/mL)	(U/mg)	(U/mL)	(mg/mL)	(U/mg)
Karpuz α-galaktozidazı (<i>Citrullus vulgaris</i>)	1,51	1,61	0,94	0,26	1,61	0,16
Validase-AGS (<i>Aspergillus niger</i>)	17,3	0,1	173	29,51	0,1	295,1
α-Galactosidase DS 30 (<i>Aspergillus niger</i>)	70,7	0,52	136	130,14	0,52	250,3

Karpuz ve ticari enzim preparatlarındaki α -galaktozidaz ve invertaz enzimlerinin Sepabead EC-EP' de kovalent olarak immobilizasyonu ile ilgili sonuçlar sırasıyla Çizelge 3.7 ve 3.8' de verilmiştir. Çizelge 3.7' den görüldüğü gibi immobilizasyonda Validase AGS ve α -Galactosidase DS 30 adlı ticari α -galaktozidaz enzim preparatları kullanıldığında enzim immobilizasyon verimleri karpuz α -galaktozidazının immobilizasyon veriminden çok daha düşüktür. Ayrıca Çizelge 3.8' den de görüldüğü gibi karpuzdan hazırlanan enzim preparatının

invertaz içeriğinin çok düşük olduğu ve invertaz aktivitesi tayininde kullanılan yöntemin (DNS metodu) bu miktarı hassas bir şekilde tayin edebilecek duyarlılıkta olmaması nedeniyle de immobilizasyon çalışmalarına ticari enzimler yerine karpuzdan elde edilen α -galaktozidaz enzimi ile devam edilmesine karar verildi. Enzimlerin iyi bir verimle immobilize edilebilmesi için enzim immobilizasyon ortamının optimize edilmesi gerekir. Bu nedenle, çalışmanın bu adımında karpuz α -galaktozidaz enziminin Sepabead EC-EP taşıyıcıda immobilizasyonuna bazı parametrelerin (tampon türü, konsantrasyonu, pH, protein miktarı) etkisi incelendi.

Çizelge 3.7 Sepabead EC-EP' de α - galaktozidaz enzimlerinin immobilizasyonu. *

Serbest Enzim					İmmobilize Enzim		
Aktivite	Protein	Spesifik	Bağlı	Protein	Aktivite	Spesifik	Spesifik
(Unit)	(mg)	Aktivite	Protein	Bağlanma	(Unit)	Aktivite	Aktivite
		(U/mg)	(mg)	Verimi		(U/mg)	(%)
KARPUZ α-GALAKTOZİDAZI							
0,47	0,5	0,94	0,409	81,83	0,076	0,186	19,8
0,94	1	0,94	0,830	83	0,164	0,198	21,1
1,41	1,5	0,94	1,101	73,42	0,24	0,218	23,2
α-GALACTOSIDASE DS 30							
67,6	0,5	135,2	-	-	0,148	-	-
135,2	1,0	135,2	0,476	47,61	0,116	0,244	0,20
20,8	1,5	135,2	0,673	44,87	0,204	0,303	0,22
VALIDASE AGS							
89,07	0,5	178,14	0,165	33	0,233	1,236	0,70
178,14	1,0	178,14	0,157	15,7	0,286	1,822	1,02
267,21	1,5	178,14	0,665	44,33	0,308	0,463	0,30

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başımadır.

Çizelge 3.8 Sepabead EC-EP' de invertaz enzimlerinin immobilizasyonu. *

Serbest Enzim					İmmobilize Enzim		
Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
KARPUZ α-GALAKTOZİDAZI							
0,092	0,5	0,184	0,409	81,83	-	-	-
0,184	1,0	0,184	0,830	83,00	-	-	-
0,276	1,5	0,184	1,101	73,42	-	-	-
α-GALACTOSIDASE DS 30							
124,42	0,5	248,84	-	-	2	-	-
248,84	1,0	248,84	0,476	47,61	4,3	9,03	3,63
373,26	1,5	248,84	0,673	44,87	5,26	7,82	3,14
VALIDASE AGS							
152,11	0,5	304,22	0,165	33,00	4,4	26,67	8,80
304,22	1,0	304,22	0,157	15,70	10,38	66,11	21,7
456,33	1,5	304,22	0,665	44,33	16,35	24,59	8,10

* Tablodaki değerler g taşıyıcı başımadır.

3.2.1.1 Tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ının immobilizasyon verimine etkisi

α -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC-EP taşıyıcıya maksimum verimle kovalent olarak bağlanması için immobilizasyon ortamında kullanılan tamponun türü, konsantrasyonu ve pH' ı optimize edildi. Bu amaçla, farklı tampon türleri (sodyum fosfat ve sodyum karbonat), konsantrasyonları (0,25-1 M) ve pH' larında

(pH 6,0-10,0) 1 g taşıyıcıya 1 mg protein eklenerek enzim immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Her bir deney seti için aktivite, spesifik aktivite ve spesifik aktivite verimleri hesaplandı (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9' dan görüldüğü gibi α -galaktozidaz enzimi için en iyi spesifik aktivite verimi (% 32) 0,25 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ tamponu (pH 6,0) ile elde edildi. Genellikle Sepabead EC-EP ile yapılan immobilizasyon çalışmalarında üretici firmanın önerdiği protokol düşük iyonik şiddetteki fosfat tamponlarında enzimlerin immobilizasyonlarının gerçekleştirilmesi yönündedir. Ancak, α -galaktozidaz enziminin enzimatik aktivite tayininde sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) kullanıldığından enzim farklı konsantrasyonlardaki sitrat tamponunda (pH 6,0) tekrar immobilize edildi. Bu amaçla, immobilizasyon ortamına eklenen sitrat tamponu konsantrasyonu 0,1-0,75 M aralığında değiştirilerek enzim taşıyıcıda kovalent olarak immobilize edildi. Çizelge 3.10' dan görüldüğü gibi 0,25 M sitrat tamponu (pH 6,0) ile yapılan enzim immobilizasyon çalışması sonucunda α -galaktozidaz enzimi için % 55,85' lik spesifik aktivite verimi elde edildi.

Çizelge 3.10' dan görüldüğü gibi 0,5 ve 0,75 M sitrat tamponu ile yapılan immobilizasyon çalışmalarında bağlı protein miktarı hesaplanamayacak kadar düşük değerlerdedir. 0,25 M, pH 6,0 sodyum fosfat tamponunda 1 mg protein/g taşıyıcı ile yapılan α -galaktozidaz immobilizasyonunda % 32 spesifik aktivite verimi elde edilmişti (Çizelge 3.9). Aynı immobilizasyon ortamı koşullarında sitrat tamponu ile daha yüksek immobilizasyon verimi (% 55,85) elde edildiği için immobilizasyon işlemine 0,25 M sodyum sitrat tamponu (pH 6,0) ile devam edilmesine karar verildi.

Çizelge 3.9 Sepabead EC-EP' de karpuz α -galaktozidazının kovalent immobilizasyonuna tampon türü, konsantrasyonu ve pH' ın etkisi.*[†]

Tampon/pH	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
			(Unit)	(U/mg)	(%)
0,25 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄					
6	0,57	57	0,172	0,301	32,0
7	0,64	64	0,134	0,21	22,3
8	0,66	66	0,131	0,2	21,2
0,50 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄					
6	0,686	68,6	0,149	0,217	23,1
7	0,571	57,1	0,151	0,264	28,1
8	0,667	66,7	0,134	0,201	21,4
0,75 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄					
6	0,657	65,7	0,152	0,231	24,6
7	0,648	64,8	0,136	0,210	22,3
8	0,657	65,7	0,096	0,146	15,5
1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄					
6	0,676	67,6	0,151	0,223	23,7
7	0,524	52,4	0,128	0,244	26,0
8	0,543	54,3	0,106	0,195	20,8
1 M Na₂CO₃/NaHCO₃					
9	0,581	58,1	0,009	0,015	1,6
10	0,571	57,1	0,005	0,009	1,0

* Tablodaki değerler g taşıyıcı başmadır.

[†] α -Galaktozidaz; 0,94 U, 1 mg protein, 0,94 U/mg.

Çizelge 3.10 Sepabead EC-EP' de karpuz α -galaktozidazının kovalent immobilizasyonuna sitrat tamponunun (pH 6,0) etkisi.*¹

Tampon Konsantrasyonu (M)	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
0,1	0,497	49,7	0,135	0,272	28,94
0,25	0,899	89,90	0,472	0,525	55,85
0,5	-	-	0,145	-	-
0,75	-	-	0,124	-	-

* Tablodaki değerler g taşıyıcı başnadır.

¹ α -Galaktozidaz; 0,94 U, 1 mg protein, 0,94 U/mg.

3.2.1.2 Protein miktarının immobilizasyona etkisi

İmmobilizasyon ortamına eklenen protein miktarının α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon verimine etkisinin incelenmesi amacıyla 1 g Sepabead EC-EP taşıyıcıya farklı miktarlarda protein (0,5-6,0 mg) ilave edilerek 0,25 M sodyum sitrat tamponunda (pH 6,0) immobilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. İmmobilizasyon işleminden sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11' de verilmektedir.

Çizelgeden görüldüğü gibi α -galaktozidaz enzimi için en yüksek spesifik aktivite verimi (% 55,85) 1 mg protein varlığında elde edildi. Taşıyıcıya ilave edilen protein miktarı arttıkça bağlanan protein miktarı artmakta ancak protein bağlanma yüzdesi azalmaktadır. Protein bağlanma veriminin azalması ile immobilize enzimin aktivitesinde bir artış gözlenmektedir. Daha az proteinin bağlanması sterik engellemenin azalmasına ve immobilize enzimin daha iyi aktivite göstermesine neden olmaktadır.

Sepabead EC-EP' de α -galaktozidaz enziminin kovalent olarak immobilizasyonu ile ilgili yapılan optimizasyon çalışması sonucunda Sepabead EC-EP taşıyıcıda 0,25 M sodyum sitrat tamponu (pH 6,0) varlığında 1 mg protein (karpuzdan hazırlanan α -galaktozidaz enzim preparatı) immobilize edildiğinde % 55,85' lik spesifik aktivite verimi elde edildi.

Çizelge 3.11 Sepabead EC-EP' de karpuz α -galaktozidazının kovalent immobilizasyonuna protein miktarının etkisi.*

Serbest Enzim					İmmobilize Enzim		
Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
(Unit)	(mg)	(U/mg)	(mg)	(%)	(Unit)	(U/mg)	(%)
0,47	0,5	0,94	0,463	92,60	0,213	0,460	48,94
0,94	1	0,94	0,899	89,90	0,472	0,525	55,85
1,88	2	0,94	1,6	80,00	0,524	0,328	34,89
3,76	4	0,94	2,715	67,88	0,705	0,260	27,66
5,64	6	0,94	3,984	66,40	0,761	0,191	20,32

* Tablodaki değerler g taşıyıcı başıdır.

3.2.2 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında kovalent bağlama yöntemi ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu

Sepabead EC-EP' de kovalent bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için immobilizasyon ortamının optimizasyonu çalışmaları tamamlandıktan sonra aynı serinin diğer taşıyıcılarından Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent olarak enzim immobilizasyonu çalışmaları yapıldı.

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da immobilizasyon için taşıyıcı çekirdeğinin hidrofiliğine ihtiyaç yoktur ancak optimizasyon sırasında

hidrofiliklik göz ardı edilmemelidir. Sırasıyla etilendiamino ve heksametilendiamino reaktif uçlara sahip bu taşıyıcıların kovalent enzim immobilizasyonundan önce aktif hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu taşıyıcılarda immobilizasyonda taşıyıcı fonksiyonel gruplarının aktivasyonu için aktivasyon ajanı olarak glutaraldehydin kullanımı genel ve kullanışlı bir tekniktir. Bu durumda, enzimin ve taşıyıcının tüm primer amino grupları glutaraldehyd ile aktiflenir (Klaus, 1976; Tashima et al., 1991; de Santis and Jones, 1999; Vaghjiani et al., 2000; Alonso et al., 2005; Filho et al., 2008).

Sepabead EC-EA' da lipaz (Hilterhaus et al., 2008), β -galaktozidaz (Pessela et al., 2006), glutaril açılaz (Alonso et al., 2005) ve Sepabead EC-HA' da fruktozil transferaz (Platkova et al., 2006) ve enterokinaz (Kubitzki et al., 2008) yüksek verimle immobilize edilmiştir.

3.2.2.1 Taşıyıcı fonksiyonel gruplarının önaktivasyonu için glutaraldehyd konsantrasyonunun belirlenmesi

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda taşıyıcıların amino gruplarının aktivasyonu için kullanılacak uygun glutaraldehyd konsantrasyonu belirlendi. İmmobilizasyon işlemleri için her iki taşıyıcıya (1 g) 0,5 mg protein/g olacak şekilde enzim çözeltisi ilave edildi. İmmobilizasyon basamağında ve bağlanmayan proteinlerin yıkanmasında 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 7,0) kullanıldı. Aşırı miktarda glutaraldehyd ile çapraz bağlama sarı-kahverengi renkte, sert yapıda ürün oluşumuna neden olduğu için literatür verilerinden yararlanılarak çalışmalar % 0,01-0,10 (v/v) aralığındaki glutaraldehyd konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Enterokinaz enziminin heksametilamino grubu taşıyan Sepabead' de (Sepabead EC-HA 203) immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bir literatürde (Kubitzki et al., 2008) glutaraldehyd konsantrasyonunun % 2,0' den (v/v) % 0,5' e (v/v) düşürülmesi ile aktivite veriminde 14 katlık bir artış olduğu hatta glutaraldehyd yüzdesinin % 0,01' e (v/v) indirilmesi ile bu oranın % 60' a ulaştığı belirtilmiştir. Farklı glutaraldehyd konsantrasyonları ile aktive edilen Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna ait sonuçlar Çizelge 3.12 de verilmiştir.

Çizelge 3.12' den görüldüğü gibi % 0,01 (v/v) glutaraldehid konsantrasyonu ile aktive edilen Sepabead-EC-EA' da α -galaktozidaz enzimi % 58,7 spesifik aktivite ve % 46,08 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. % 0,02 (v/v) glutaraldehid konsantrasyonu ile aktive edilen Sepabead EC-HA' da ise enzim % 38,03 spesifik aktivite ve % 32,7 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. Elde edilen değerler literatür verileri ile uyumludur. Kubitzki ve arkadaşları enterokinaz enzimini Sepabead EC-HA 203 taşıyıcısında % 0,01 (v/v) glutaraldehid konsantrasyonunda % 60 verimle immobilize etmişlerdir (2008). Bayraktar ve arkadaşları 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında domatesten izole ettikleri α -galaktozidaz enzimini % 0,25 (v/v) glutaraldehid konsantrasyonu ile aktive ettikleri Sepabead EC-EA' da % 47,6 ve Sepabead EC-HA taşıyıcıda ise % 52,3 verimle immobilize etmişlerdir.

Çizelge 3.12 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent α -galaktozidaz immobilizasyonuna glutaraldehid konsantrasyonunun etkisi.*

Glutaraldehid Konsantrasyonu	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	İmmobilize Enzim		
			Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
(%)	(mg)	(%)	(Unit)	(U/mg)	(%)
Sepabead EC-EA					
0,01	0,393	78,6	0,306	0,779	58,70
0,02	0,420	84,00	0,285	0,679	51,10
0,03	0,437	87,40	0,276	0,632	47,60
0,04	0,464	92,80	0,271	0,584	44,00
0,05	0,5	100	0,237	0,474	35,70
0,10	0,269	53,8	0,150	0,557	41,90
Sepabead EC-HA					
0,01	0,373	74,60	0,145	0,389	29,29
0,02	0,430	86,00	0,217	0,505	38,03
0,03	0,377	83,60	0,178	0,472	35,54
0,04	0,368	73,60	0,171	0,465	35,02
0,05	0,352	70,40	0,163	0,463	34,86
0,10	0,304	60,80	0,079	0,260	19,58

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başımadır.

[†] α -Galaktozidaz; 0,664 U, 0,5 mg protein, 1,328 U/mg.

3.2.2.2 Protein miktarının immobilizasyona etkisi

İmmobilizasyon verimini etkileyen parametrelerden bir diğeri taşıyıcıya yüklenecek protein miktarıdır. Uygun mg protein/g taşıyıcı oranının bulunması için taşıyıcılar optimize edilen konsantrasyonlardaki glutaraldehid ile (EC-EA için % 0,01 (v/v), EC-HA için % 0,02 (v/v) aktiflendikten sonra farklı miktarlarda protein ile muamele edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.13 (Sepabead EC-EA) ve Çizelge 3.14' de (Sepabead EC-HA) verilmiştir.

Çizelge 3.13 Sepabead EC-EA' da kovalent bağlama ile α -galaktozidaz immobilizasyonuna protein miktarının etkisi.*

Serbest Enzim				İmmobilize Enzim			
Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
(Unit)	(mg)	(U/mg)	(mg)	(%)	(Unit)	(U/mg)	(%)
0,332	0,25	1,328	0,177	70,8	0,025	0,141	10,62
0,664	0,5	1,328	0,393	78,6	0,328	0,835	62,9
1,328	1,0	1,328	0,693	69,3	0,471	0,680	51,20
2,656	2,0	1,328	1,354	67,7	0,724	0,535	40,29
5,312	4,0	1,328	2,191	54,8	0,853	0,389	29,3

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başıdır.

Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14' den görüldüğü gibi α -galaktozidaz enzimi için en yüksek spesifik aktivite verimi Sepabead EC-EA için 0,5 mg protein ile % 62,9 ve Sepabead EC-HA için 0,25 mg protein ile % 44 olarak bulundu. Sonuç olarak, Sepabead EC-HA Sepabead EC-EA' ya kıyasla daha uzun bir kola sahip olduğundan sterik engellemeler ortadan kaldırılmış ve proteini daha iyi bir şekilde bağlanmıştır. Bu sayede daha düşük protein miktarı ile daha yüksek immobilizasyon verimi elde edilebilmiştir.

Çizelge 3.14 Sepabead EC-HA’ da kovalent bağlama ile α -galaktozidaz immobilizasyonuna protein miktarının etkisi.*

Serbest Enzim					İmmobilize Enzim		
Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
(Unit)	(mg)	(U/mg)	(mg)	(%)	(Unit)	(U/mg)	(%)
0,199	0,150	1,328	0,092	61,3	0,047	0,511	38,5,
0,266	0,200	1,328	0,127	63,5	0,070	0,551	41,50
0,332	0,25	1,328	0,166	66,4	0,097	0,584	44,00
0,664	0,5	1,328	0,430	86	0,217	0,505	38,03
1,328	1,0	1,328	0,726	72,6	0,376	0,518	39,01
2,656	2,0	1,328	1,310	65,5	0,585	0,447	33,66
5,312	4,0	1,328	2,591	64,8	0,803	0,310	23,34

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başıdır.

3.2.2.3 Glutaraldehid aktiflenme pH’ ının ve süresinin immobilizasyona etkisi

Glutaraldehid, taşıyıcıların amino grubu üzerinden aktiflenme yaparak proteinin Lizin ϵ -amino grubu üzerinden enzimi aktif taşıyıcıya bağlar. Bölüm 3.2.2.1’ de aktivasyon ajanı olarak glutaraldehid konsantrasyonunun belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmada aktivasyon işlemi 20 mM, pH 7,0 sitrat-fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehid aktiflenme pH’ ının artırılması halinde buna kıyasla daha iyi bir aktivasyon yapılıp yapılamayacağı ve enzimin daha yüksek verimle immobilize edilip edilemeyeceği sorusuna karşı farklı pH ve sürelerde taşıyıcı aktivasyon işlemi gerçekleştirildi.

Bu amaçla, glutaraldehid ile taşıyıcının aktivasyonu 20 mM fosfat tamponu (pH 7,5) ile gerçekleştirildikten sonra enzim immobilizasyonu 20 mM fosfat tamponu (pH 7,0) varlığında gerçekleştirildi. Taşıyıcıların glutaraldehid ile aktiflenme pH' ı genellikle literatürde aktivasyon için kullanılan pH 7,5 değerine çıkarıldığında taşıyıcıların daha fazla fonksiyonel grubunun aktif hale geçtiği ve proteini yoğun bir şekilde bağlandığı, dolayısı ile immobilize enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.15). Glutaraldehid ile aktivasyon için 20, 30 ve 60 dakikalık aktivasyon süresinin enzim immobilizasyon verimini farklandırmadığı görüldü. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda glutaraldehid ile aktifleme pH' ının pH 7,0 ve aktifleme süresinin 20 dakika olmasına karar verildi.

Çizelge 3.15 Sepabead EC-EA ve EC-HA' da kovalent bağlama ile α -galaktozidaz immobilizasyonuna taşıyıcı türü ve aktivasyon süresinin etkisi.*¹

Taşıyıcı Türü ve Glutaraldehid Aktiflenme Süresi (dak)	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
Sepabead EC-EA					
20 dak.	0,5	100	0,074	0,148	11,1
30 dak.	0,5	100	0,074	0,148	11,1
60 dak.	0,5	100	0,071	0,142	10,7
Sepabead EC-HA					
20 dak.	0,5	100	0,136	0,272	20,4
30 dak.	0,5	100	0,136	0,272	20,4
60 dak.	0,5	100	0,134	0,268	20,2

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başındır.

¹ α -Galaktozidaz; 0,664 U, 0,5 mg protein, 1,328 U/mg.

3.2.3 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu

3.2.3.1 Enzim immobilizasyonuna pH' ın etkisi

Aktif grup olarak Sepabead EC-EA etilendiamino ve Sepabead EC-HA ise hegzametilendiamio gruplarına sahip polimetakrilat tabanlı taşıyıcılardır. Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılar benzer aktif gruplara (amino) sahip oldukları için adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna pH' ın etkisi Sepabead EC-EA taşıyıcı kullanılarak gerçekleştirildi. 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 3,0-7,0) içeren ortamda 1 mg protein/ g taşıyıcı olacak şekilde 25°C' de 1 saat orbital karıştırıcıda 200 rpm' de karıştırılarak adsorbsiyonla enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bağlanmayan proteinler adsorbsiyon işleminde kullanılan tampon ile yıkanarak uzaklaştırıldı.

Çizelge 3.16' dan görüldüğü gibi pH 6,5 ve 7,0' de 1 mg protein/g taşıyıcı için aynı immobilize enzim aktivitesi elde edilmiştir. Spesifik aktivite verimi açısından kıyaslandığında pH 6,5' da spesifik aktivite veriminin pH 7,0' ye kıyasla yaklaşık iki kat fazla olduğu görülmektedir. pH'daki bu değişim immobilize enzim aktivitesinde bir farklanma yaratmadığı halde bağlı protein miktarından da görüldüğü gibi proteinin taşıyıcıya bağlanmasına etki etmektedir. Sonuç olarak pH 7,0' de immobilize enzimin aktivitesi pH 6,5' da elde edilen aktivite değeri ile aynı olmasına rağmen pH 7,0' de bağlı protein miktarı daha yüksek olduğundan enzimin spesifik aktivitesi dolayısı ile de spesifik aktivite verimi daha düşüktür. O nedenle, enzim adsorbsiyonu pH 6,5 sitrat-fosfat tamponunda (20 mM) gerçekleştirildi.

Çizelge 3.16 Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna adsorbsiyon pH' ının etkisi.*¹

pH	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
3,0	0,83	83	0,04	0,05	5,95
4,0	0,75	75	0,10	0,13	15,48
4,5	0,75	75	0,10	0,13	15,48
5,0	0,72	72	0,12	0,17	20,23
5,5	0,70	70	0,12	0,17	20,23
6,0	0,65	65	0,12	0,18	21,43
6,5	0,38	38	0,14	0,36	42,86
7,0	0,76	76	0,14	0,18	21,43

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başınadır.

¹ α -Galaktozidaz; 0,84 U, 1 mg protein, 0,84 U/mg.

3.2.3.2 Tampon konsantrasyonunun immobilizasyona etkisi

Enzimin taşıyıcıya daha yüksek verimle adsorbsiyonunu sağlamak için adsorbsiyon tamponunun konsantrasyonu farklılaştırılarak Sepabead EC-EA' da immobilize edildi. 5-50 mM konsantrasyon aralığındaki sitrat-fosfat (pH 6,5) tamponu ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. En yüksek aktivite ve spesifik aktivite verimi (% 42,86) 20 mM sitrat-fosfat tamponunda elde edildi (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17 Sepabead EC-EA’ da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna iyon şiddetinin etkisi.*¹

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
5	0,77	77	0,19	0,25	29,76
10	0,66	66	0,17	0,26	30,95
20	0,38	38	0,14	0,36	42,86
25	0,62	62	0,13	0,21	25,00
50	0,45	45	0,07	0,16	19,05

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başımadır.

¹ α -Galaktozidaz; 0,84 U, 1 mg protein, 0,84 U/mg.

3.2.3.3 Uygun protein/g taşıyıcı oranının belirlenmesi

Adsorbsiyonla enzimin immobilizasyonunda uygun protein/g taşıyıcı oranının belirlenmesi için Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılara sırasıyla 0,50-4,0 ve 0,25-4,0 mg protein/g taşıyıcı olacak şekilde enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.18). Adsorbsiyon işleminde ve bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) kullanıldı. Adsorbsiyon 25°C’ de 1 saat orbital karıştırıcıda 200 rpm’ de gerçekleştirildi. Filtrat ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tayin edilerek aktivite verimleri hesaplandı.

Çizelge 3.18 Sepabead EC-EA ve HA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna protein miktarının etkisi.*

Serbest Enzim					İmmobilize Enzim		
Aktivite	Protein	Spesifik Aktivite	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
(Unit)	(mg)	(U/mg)	(mg)	(%)	(Unit)	(U/mg)	(%)
Sepabead EC-EA							
0,42	0,5	0,84	0,23	46	0,04	0,17	20,23
0,84	1,0	0,84	0,36	38	0,14	0,36	42,86
1,68	2,0	0,84	1,09	54,5	0,18	0,17	20,23
3,36	4,0	0,84	2,49	62,25	0,29	0,12	14,29
Sepabead EC-HA							
0,21	0,25	0,84	0,17	68	0,02	0,12	14,29
0,42	0,50	0,84	0,39	78	0,08	0,21	25,00
0,84	1,0	0,84	0,79	79	0,13	0,16	19,04
1,68	2,0	0,84	1,66	83	0,25	0,15	17,86
3,36	4,0	0,84	2,76	69	0,36	0,13	15,48

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başındadır.

Çizelgeden görüldüğü gibi immobilize enzimlerin aktivite, spesifik aktivite ve spesifik aktivite verimleri ile ilgili sonuçlar kıyaslandığında Sepabead EC-EA için uygun protein/g taşıyıcı oranı 1 mg protein/ g taşıyıcı iken Sepabead EC-HA için 0,5 mg protein/g taşıyıcı olarak belirlendi. Sepabead EC-HA' nın EC-EA' ya kıyasla daha uzun bir kola sahip olması proteinin taşıyıcıya daha kolay yaklaşmasına ve sterik engellerden daha az etkilenmesine neden olmaktadır.

3.2.3.4 Uygun adsorbsiyon süresinin belirlenmesi

α -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında adsorbsiyonla immobilizasyonuna adsorbsiyon süresinin etkisi incelendi. Bu amaçla hazırlanan immobilizasyon setlerinde adsorbsiyon süresi her iki taşıyıcı için 15-60 dakika aralığında farklılaştırıldı. Adsorbsiyon süresinin α -galaktozidaz enziminin taşıyıcılarda adsorbsiyon ile immobilizasyonuna etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.19' da verilmiştir.

Çizelge 3.19 Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da adsorbsiyon ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna adsorbsiyon süresinin etkisi.*¹

Adsorbsiyon Süresi	Bağlı Protein	Protein Bağlanma Verimi	İmmobilize Enzim		
			Aktivite	Spesifik Aktivite	Spesifik Aktivite Verimi
(dakika)	(mg)	(%)	(Unit)	(U/mg)	(%)
Sepabead EC-EA					
15	0,42	42	0,14	0,33	39,29
30	0,45	45	0,16	0,36	42,86
45	0,40	40	0,14	0,35	41,67
60	0,38	38	0,14	0,36	42,86
Sepabead EC-HA					
15	0,10	20	0,05	0,5	59,52
30	0,13	26	0,06	0,46	54,76
45	0,33	78	0,07	0,21	25,00
60	0,33	78	0,08	0,24	28,57

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başımadır.

¹ α -Galaktozidaz; 0,84 U, 1 mg protein, 0,84 U/mg.

Çizelge 3.19' dan anlaşılacağı üzere adsorbsiyon işleminin ilk yarım saatinde α -galaktozidaz enzimi etkin bir şekilde her iki taşıyıcıda da immobilize olurken daha sonraki zaman zarfında bağlanan proteinlerin immobilize enzim aktivitesine olumlu bir etkisinin olmadığına karar verildi. 30 dakikalık adsorbsiyon süresi sonunda α -galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EA' da % 42,86 ve Sepabead EC-HA' da % 54,76 spesifik aktivite verimi ile immobilize edildi. Her iki taşıyıcı için de yarım saatlik adsorbsiyon süresinin uygun olduğu belirlendiğinden sonraki çalışmalarda bu sürede enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3.5 Glutaraldehyd ile çapraz bağlamada kullanılan tamponun immobilizasyona etkisi

Enzimlerin optimize edilen koşullarda Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da adsorbsiyon ile immobilizasyonunun ardından glutaraldehydle çapraz bağlama yapıldı. 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 6,5) varlığında glutaraldehydle çapraz bağlanma sonrasında enzim aktivitelerinde belirgin bir düşüş gözlemlendi. Bu sorunu gidermek için literatür verilerinden de yararlanarak çapraz bağlama adımında farklı türlerde ve farklı pH' lardaki tamponlarda (sitrat-fosfat tamponu pH 5,0-7,5; sodyum fosfat tamponu pH 6,0-8,0) glutaraldehyd ile çapraz bağlama işlemi yapıldı. Deney setlerinde Sepabead EC-EA için daha önce optimize edilen koşullarda ve düşük glutaraldehyd konsantrasyonu (% 0,001, v/v) çapraz bağlama işlemi gerçekleştirildi.

Sepabead EC-EA' da adsorblanarak immobilize edilen enzimin glutaraldehyd ile çapraz bağlanmasında en yüksek aktivite değerleri literatür verileri ile de uyumlu olan sodyum fosfat tamponu ile elde edildi (Çizelge 3.20). Ancak literatürlerde farklı enzimlerle yapılan çapraz bağlama ile ilgili çalışmalarda en iyi aktivite sonuçları pH 7,0-8,0 aralığında elde edilmişken (Lopez-Gallego et al., 2007; Hiltarhaus et al., 2008; Kubitzki et al., 2008) bu çalışmada enzim kaynağına ve türüne bağlı olarak pH 6,0' da en yüksek immobilizasyon verimi elde edildi (Çizelge 3.20). Yukarıda bahsedilen çalışmalarda adsorbsiyon sonrasında immobilize enzim glutaraldehydle çapraz bağlandığında (20 mM sitrat-fosfat tamponu, pH 6,5) immobilize enzim

aktivitesinin yaklaşık % 75' ini kaybederken bu koşullarda (20 mM sodyum fosfat tamponu, pH 6,0) yapılan çapraz bağlama çalışmalarında çapraz bağlama sonrası immobilize enzim aktivitesinin sadece % 35' ini kaybetmiştir. Adsorbsiyon sonrası çapraz bağlamanın amacı soya sütündeki rafinoz tip oligosakkaritlerin hidroliz çalışmalarında kullanılabilir daha kararlı enzim preparatları elde etmektir. Enzimatik aktivitedeki bu düşüş enzimin artabilecek kararlılığının yanında kabul edilebilir düzeydedir.

Çizelge 3.20 Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon sonuçları (Tampon türü ve pH' ın çapraz bağlamaya etkisi).^{*1}

Tampon Türü ve pH	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
Sitrat-Fosfat Tamponu (20 mM)					
5,0	0,60	60	0,02	0,03	3,57
5,5	0,60	60	0,03	0,05	5,95
6,0	0,60	60	0,04	0,07	8,33
6,5	0,60	60	0,06	0,10	11,90
7,0	0,60	60	0,05	0,08	9,52
7,5	0,60	60	0,03	0,03	3,57
Sodyum Fosfat Tamponu (20 mM)					
6,0	0,60	60	0,09	0,15	17,85
6,5	0,60	60	0,08	0,13	15,48
7,0	0,60	60	0,07	0,12	14,29
7,5	0,60	60	0,07	0,12	14,29
8,0	0,60	60	0,06	0,10	11,90

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başına dır.

¹ α -Galaktozidaz; 0,84 U, 1 mg protein, 0,84 U/mg.

3.2.3.6 Çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehid konsantrasyonunun etkisi

Glutaraldehidin protein üzerindeki serbest lizin ϵ -amino grupları ile reaksiyon verdiği bilinmektedir. Birçok çalışmada çapraz bağlı protein kristallerinin aminoasit kompozisyonları incelenmiş ve analizler, proteinin sadece lizin artıklarının glutaraldehidle çapraz bağlama reaksiyonuna katıldıklarını göstermiştir (Quiocho and Richards, 1966; Ferrier et al., 1971).

Elde edilen veriler doğrultusunda çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehidin konsantrasyonu her iki taşıyıcı (Sepabead EC-EA ve EC-HA) için optimize edilerek belirlendi. Optimize edilen koşullarda çapraz bağlayıcı ajanın % 0,001–0,020 (v/v) konsantrasyon aralığı ile çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirildi (Çizelge 3.21 ve 3.22).

Çizelge 3.21 Sepabead EC-EA’ da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon sonuçları (Glutaraldehid konsantrasyonunun çapraz bağlamaya etkisi).*

Glutaraldehid Kons. (%)	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
0,0010	0,60	60	0,09	0,15	17,85
0,0025	0,60	60	0,04	0,07	8,33
0,0050	0,60	60	0,03	0,05	5,95
0,0075	0,60	60	0,02	0,03	3,57
0,0100	0,60	60	0,01	0,02	2,38
0,0200	0,60	60	0,01	0,02	2,38

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başındır.

[†] α -Galaktozidaz; 0,84 U, 1 mg protein, 0,84 U/mg.

Çizelge 3.22 Sepabead EC-HA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile α -galaktozidaz enziminin immobilizasyon sonuçları (Glutaraldehid konsantrasyonunun çapraz bağlamaya etkisi).[†]

Glutaraldehid Kons. (%)	Bağlı Protein (mg)	Protein Bağlanma Verimi (%)	İmmobilize Enzim		
			Aktivite (Unit)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
0,0010	0,39	78	0,10	0,26	31
0,0025	0,39	78	0,07	0,18	21,43
0,0050	0,39	78	0,07	0,18	21,43
0,0075	0,39	78	0,05	0,13	15,48
0,0100	0,39	78	0,03	0,08	9,52
0,0200	0,39	78	0,01	0,03	3,57

*Tablodaki değerler g taşıyıcı başına düşmektedir.

[†] α -Galaktozidaz; 0,42 U, 0,5 mg, protein 0,84 U/mg.

Çizelge 3.21 ve 3.22' den görüldüğü gibi her iki taşıyıcıda adsorbsiyon sonrası çapraz bağlama için % 0,0010' luk (v/v) glutaraldehid konsantrasyonu yeterli olmaktadır. Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da adsorblanan α -galaktozidaz enzimlerinin çapraz bağlanması ile sırasıyla % 17,85 ve % 31 spesifik aktivite verimi elde edilmektedir. Glutaraldehid konsantrasyonu arttıkça immobilize enzimin substratla reaksiyona girmesi zorlaşmaktadır.

3.2.4 α -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda immobilizasyonunun değerlendirilmesi

Karpuzdan izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz enzim preparatı Sepabead EC- serisi sentetik taşıyıcılarda çeşitli yöntemler kullanılarak immobilize edildi. Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA taşıyıcılarda enzim kovalent bağlama ile immobilize edildi. Ayrıca, Sepabead EC-EA ve EC-HA taşıyıcılarda adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile de enzim immobilize edildi. Her bir taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi için enzim immobilizasyonunun optimizasyonu çalışmaları yapıldı. İmmobilize enzim preparatlarının hazırlanması için belirlenen optimum koşullar Çizelge 3.23’ de verilmiştir.

Çizelge 3.23 Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için belirlenen optimum koşullar.

Parametre	Sepabead EC-EA (kovalent)	Sepabead EC-HA (kovalent)	Sepabead EC-EP (kovalent)	Sepabead EC-EA (adsorbsiyon)	Sepabead EC-HA (adsorbsiyon)
Önaktivasyon: GA Konsantrasyonu	% 0,01 (v/v)	% 0,02 (v/v)	-	-	-
Önaktivasyon: Tampon türü/pH	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	-	-	-
İmmobilizasyon: Protein miktarı	0,5mg	0,25 mg	1mg	1mg	0,5 mg
İmmobilizasyon: Tampon türü/pH	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat 0,25 M pH 6,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5
İmmobilizasyon: Tampon türü/pH	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat 50 mM pH 6,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5
Çapraz Bağlama: GA Konsantrasyonu	-	-	-	% 0,001 (v/v)	% 0,001 (v/v)
Çapraz Bağlama: Tampon türü/pH (bağlanma)	-	-	-	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0
Çapraz Bağlama: Tampon türü/pH (yıkama)	-	-	-	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0

Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda optimize edilen koşullarda α -galaktozidaz enzimi büyük ölçekte immobilize edilmiş ve bu enzimler ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan immobilize enzimler ve serbest enzimlerin, soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

α -Galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EP' de optimize edilmiş koşullarda (0,25 M sodyum sitrat tamponu, pH 6,0, 1mg protein/g taşıyıcı) kovalent olarak % 55,9 spesifik aktivite ve % 50 aktivite verimi ile immobilize edildi (Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.23). Filho ve arkadaşlarının (2008) yaptığı bir çalışmada *Thermus sp.* T2' den izole edilen α -galaktozidaz enzimi yine aynı taşıyıcıda % 85 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. *Aspergillus aculeatus* kaynaklı fruktoziltransferaz enzimi epoksi grubu taşıyan Sepabead EC-EP 3 ve Sepabead EC-EP 5 taşıyıcılarında yine kovalent olarak immobilize edilmiş ve immobilize enzimlerin frukto-oligosakkaritlerin sentezinde kullanılabilirliği araştırılmıştır (Ghazi et al., 2005). Bir başka çalışmada termofilik β -galaktozidaz enzimi kobalt ve boranat ile türevlendirilen Sepabead EC-EP' de immobilize edilerek immobilize enzimin süt ürünlerindeki laktozun hidrolizinde kullanılabilirliği araştırılmıştır (Pessela et al., 2003).

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda da α -galaktozidaz enzimi optimize edilmiş koşullarda (Çizelge 3.23) kovalent olarak immobilize edildi. Çizelge 3.12' den görüldüğü gibi α -galaktozidaz enzimi % 58,7 spesifik aktivite verimi ile Sepabead EC-EA' da ve % 38 spesifik aktivite verimi ile Sepabead EC-HA' da immobilize edilmiştir. Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent bağlama yöntemi ile birçok enzimin immobilizasyonunun yapıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Kubitzki ve arkadaşlarının çalışmasında enterokinaz enzimi hegzametilamino grubu taşıyan Sepabead EC-HA 203' de kovalent olarak immobilize edilmiş ve immobilize enzim füzyon proteinlerin parçalanmasında etkin bir şekilde kullanılmıştır. Fruktoziltransferaz enzimi Sepabead serisi taşıyıcılardan EC-EP, EC-HA ve EC-HFA' da immobilize edilmiş ve en yüksek enzim aktivitesi Sepabead EC-HA taşıyıcısında yapılan immobilizasyon ile elde edilmiştir (Platkova et al., 2006).

α -Galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EA ve EC-HA' da adsorbsiyon yöntemi de kullanılarak immobilize edildi. Optimize edilen koşullar altında (Çizelge 3.23) enzim Sepabead EC-EA' da % 42,9 ve EC-HA' da % 54,8 spesifik aktivite verimi ile immobilize edildi (Çizelge 3.19). Adsorblanan enzimlerin uygun glutaraldehid konsantrasyonları ile çapraz bağlanması sonrasında immobilize enzimler için EC-EA' da % 17,9 ve EC-HA' da % 31 spesifik aktivite verimi elde edildi (sırasıyla Çizelge 3. 21 ve çizelge 3.22). D-amino asit oksidazın Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve ardından çapraz bağlama ile gerçekleştirilen immobilizasyonunda benzer aktivite sonuçları elde edilmiştir (Lopez-Gallego et al., 2005). Alonso ve arkadaşlarının bir çalışmasında glutaril açilaz enzimi Sepabead EC-EA' da glutaraldehidle çapraz bağlama metodu ile immobilize edilmiş ve immobilizasyon sonrasında enzim kararlılığını arttığı belirtilmiştir (Alonso et al., 2005). Bir başka çalışmada β -galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EA 3 taşıyıcısında adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilmiştir (Pessela et al., 2006).

Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA' da optimize edilen koşullarda hazırlanan immobilize enzimlerden en iyi immobilizasyon etkinliği % 58,7 spesifik aktivite verimi ile Sepabead EC-EA' da ve % 55,9 spesifik aktivite verimi ile Sepabead EC-EP' de kovalent olarak immobilize edilen enzimler ile elde edildi.

3.3 Serbest ve İmmobilize α -Galaktozidaz Enzimlerinin Karakterizasyonu

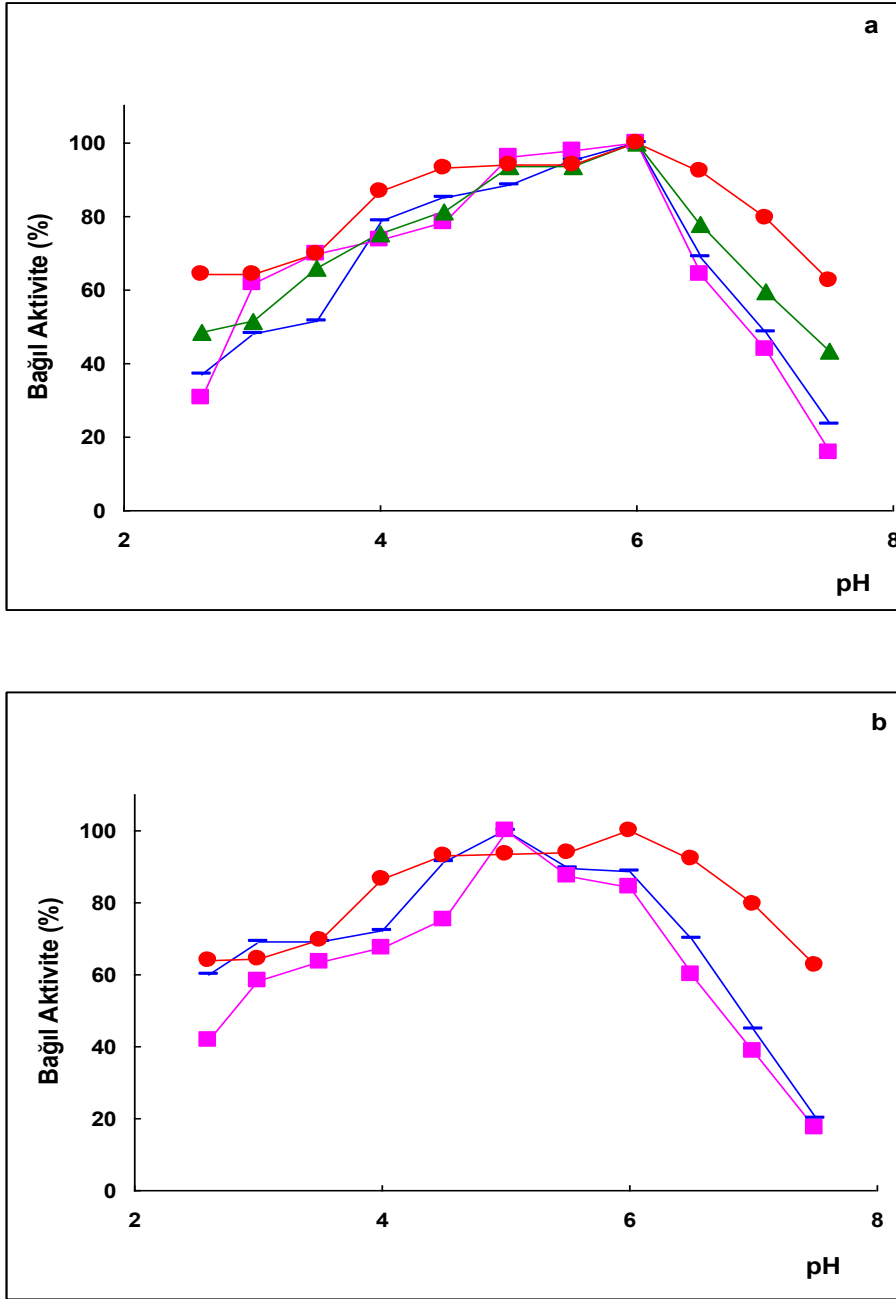
Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyonu Bölüm 2.9 başlığı altında verilen açıklamalar doğrultusunda gerçekleştirildi. Enzimlerin karakterizasyonu amacıyla enzimlerin aktivitelerine ve kararlılıklarına çeşitli parametrelerin etkisi incelendi.

3.3.1 α -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi

3.3.1.1. pH

Enzimler protein yapısındaki moleküller oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından önemli oranda etkilenmektedir. Bunlardan birisi de ortamın pH değeridir. Bir enzimin optimum pH' ı, reaksiyon süresi, sıcaklık, substratın yapısı ve konsantrasyonu, kullanılan tampon türü ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağlıdır. Biyokimyasal reaksiyonlar *in vivo* koşullarda sulu ortamlarda gerçekleştiğinden pH enzimin yük durumunu dolayısıyla aktivitesini çok etkiler. Bu nedenle immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak açısından önem taşır. Serbest ve Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA' da immobilize α -galaktozidazların aktivitelerine pH' ın etkisi ve optimum pH Bölüm 2.9.1.1' de açıklandığı gibi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.6' da verilmiştir.

Şekil 3.6' dan görüldüğü gibi karpuzdan kısmi saflaştırma ile elde edilen serbest α -galaktozidaz enziminin optimum pH' ı 6,0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuç daha önce yapılan çalışmalar ile uyumludur (Önal, 2000). Sepabead EC-EA (EA-GA-E), Sepabead EC-HA (HA-GA-E) ve Sepabead EC-EP taşıyıcıda kovalent olarak immobilize edilen enzimin optimum pH' ında bir farklanma olmamıştır (Şekil 3.6 a). Sepabead EC-EA (EA-E-GA) ve Sepabead EC-HA (HA-E-GA) taşıyıcılarda absorblanarak immobilize edilen α -galaktozidaz enzimlerinin optimum pH' ı 5,0 olarak bulunmuştur (Şekil 3.6 b). Bitkisel α -galaktozidazların optimum pH' ları genellikle 3,0-6,5 (Çizelge 1.5) arasında değişmektedir. Optimum pH' lardaki bu küçük değişimler taşıyıcı matriksi ile enzim arasındaki ikincil etkileşimlerden kaynaklanabilir (Önal, 2000). Genellikle, enzimlerin davranışları mikro çevreleri tarafından modifiye edilir matriksin yüzeyine, artıkların yüklerine ve enzimin yapısına bağlı olarak enzim molekülünün yakın çevresindeki pH değişebilir ki bu da enzimin pH optimumunu değiştirir (Singh and Kayastha, 2012).



Şekil 3.6 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine pH' ın etkisi ve optimum pH (substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, tampon: pH 2,6-7,5 sitrat-fosfat).

- a)** İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-), Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).
- b)** İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

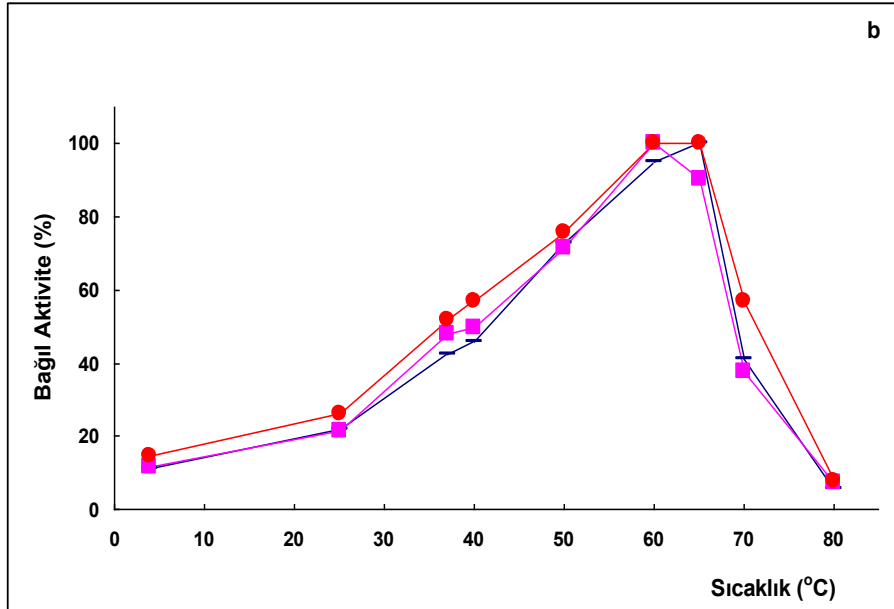
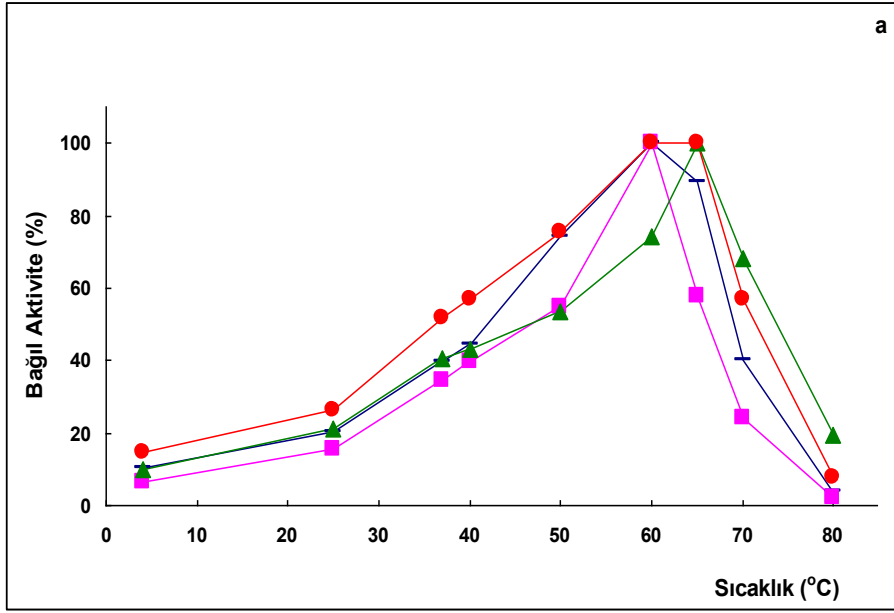
3.3.1.2 Sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin katalitik aktivitesi için önemli bir parametredir. Belirli sıcaklık limitlerinin üzerindeki değerlerde enzim proteinin denaturasyonundan dolayı aktivitede düşme gözlenir. Bu nedenle immobilizasyonun sebep olduğu sıcaklığa bağımlılık çalışmaları enzimler ve kimyasal katalizatörlerin kıyaslanmasında faydalı bilgiler verebilir.

Belirli çalışma koşullarında farklı sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. 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. Immobilizasyon sonrasında enzimin optimum sıcaklığı genellikle değişir.

Serbest ve immobilize α -galaktozidazların aktivitelerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 4-80°C sıcaklık aralığında çalışılarak optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Sıcaklığın serbest ve immobilize enzimlere etkisi bölüm 2.9.1.2' de açıklandığı gibi aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim aktivitelerinin farklı sıcaklıklarda standart koşullarda ölçülmesiyle belirlendi. Ayrıca bu değerlerden çıkılarak çizilen Arrhenius diyagramlarından ($1/T'$ ye karşılık log aktivite) aktivasyon enerjileri hesaplandı.

Serbest enzimin optimum sıcaklığı 65°C olarak bulunmuştur (Şekil 3.7). Bitkisel α -galaktozidazların çoğunun optimum sıcaklık değerleri 37-40°C arasında değişmektedir. Ancak optimum sıcaklık enzimin kaynağına ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Literatürlerde yüksek optimum sıcaklığa sahip bitkisel kaynaklı α -galaktozidazlara ilişkin veriler mevcuttur (Bayraktar et al., 2011; Şen et al., 2011).



Şekil 3.7 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin aktivitesine sıcaklığın etkisi ve optimum sıcaklık (substrat: PNPG, inkübasyon süresi: 30 dak.).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

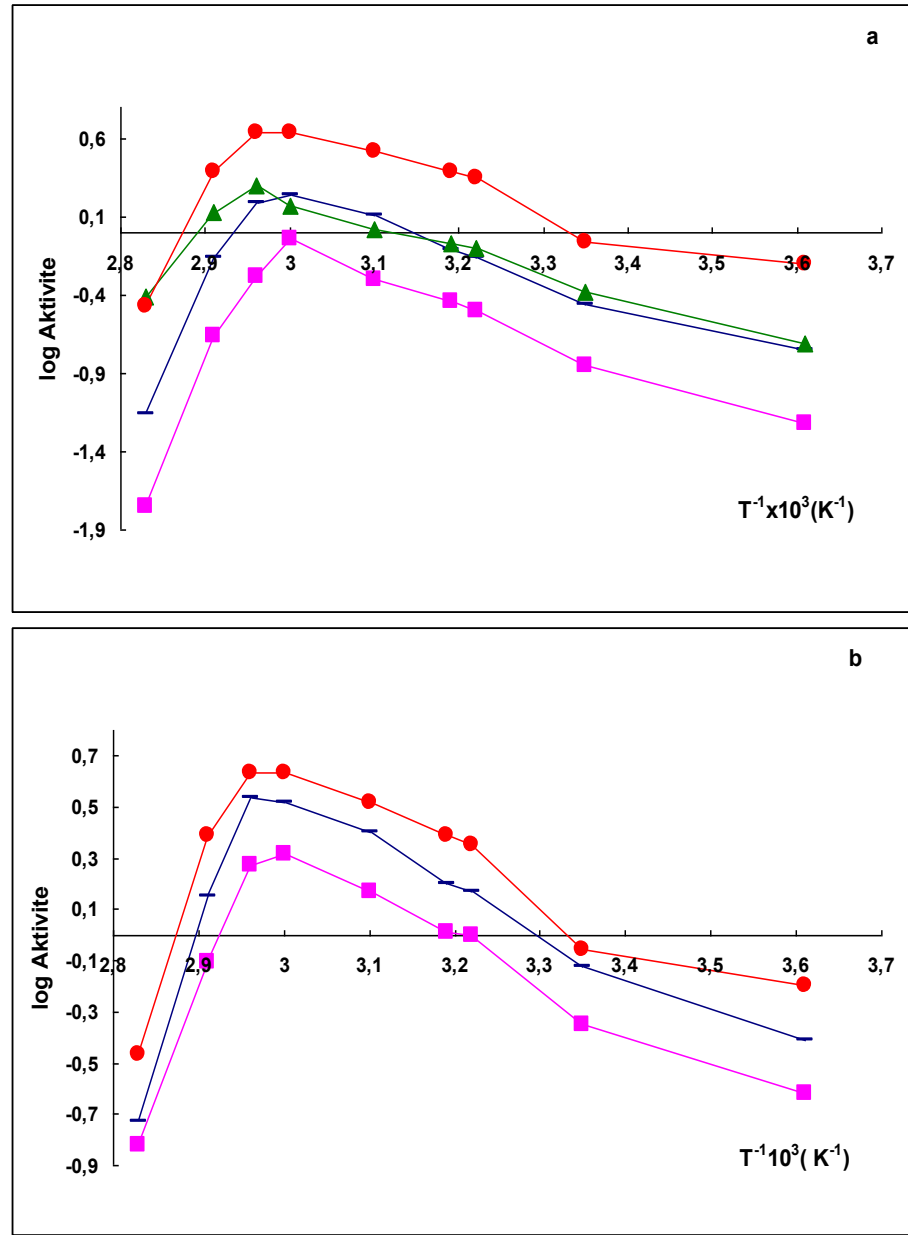
Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

Şekil 3.7' den görüldüğü gibi enzim immobilizasyonundan sonra α -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklıklarında bir farklanma olmamıştır. Literatürlerde Sepabead ve diğer farklı taşıyıcılarda çeşitli enzimler ile yapılan immobilizasyon çalışmalarından sonra optimum sıcaklığın değişmediği örnekler bulunmaktadır. Bunlar; glukoz izomeraz, lösin aminopeptidaz, kimotripsin, tiripsin, asparaginaz (Chibata,1978), fitaz (Bıçak Çelem and Önal, 2009a, 2009b), α -galaktozidaz (Okutucu et al., 2010), lakkaz (Kunamneni et al., 2008) olarak özetlenebilir. Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent olarak immobilize edilen α -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C iken epoksi aktif taşıyıcı Sepabead EC-EP' de bu değer 65°C' dir. Adsorbsiyon ile immobilize edilen α -galaktozidaz enzimlerinden Sepabead EC-EA' da immobilize enzim için optimum sıcaklık 65°C iken Sepabead EC-HA' da immobilize edilen α -galaktozidaz enzimi için 60°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7). Genellikle enzim molekülü ile matriks arasındaki etkileşimler optimum sıcaklığa etki eden en önemli anahtar faktörlerdir. Optimum sıcaklıktaki değişimler genellikle konformasyonel rigidliğin bir göstergesidir. Sıcak iklimde ve güneş altında yetişen karpuz α -galaktozidazının optimum sıcaklığının yüksek olması beklenen bir durumdur ve enzimin biyoteknolojik uygulamalarının yüksek sıcaklıklarda (genellikle 50°C' de) gerçekleşiyor olması enzimin bu alanda kullanılabilirliği açısından önemli bir avantajdır. Hazırlanan tüm enzim preparatları (HA-GA-E hariç, % 25) 70°C' de bile aktivitelerinin ortalama % 40' ını korumaktadır.

İmmobilizasyondan sonra yapılan sıcaklık etkisi ile ilgili çalışmalarda daha iyi yorum yapabilmek için genellikle Arrhenius diyagramları oluşturulur. Bağlı aktivitenin logaritması ile $1/T$ arasında çizilen bu grafikten aktivasyon enerjileri (E_a) hesaplanır. E_a , bu grafiğin eğimi ve genel gaz sabiti (R) ile doğru orantılıdır ve reaktant molekülün ürüne çevrilebilmesi için sahip olması gereken minimum enerji miktarıdır. Aktivasyon enerjisi immobilizasyon sonucu artabilir veya azalabilir. Serbest ve immobilize α -galatozidazlar için çizilen Arrhenius diyagramlarından (Şekil 3.8) aktivasyon enerjisi serbest enzim için $24,74 \text{ kJ mol}^{-1}$, Sepabead EC-EA' da adsorbsiyonla immobilize edilen enzim için $27,33 \text{ kJ mol}^{-1}$, Sepabead EC-HA' da adsorbsiyonla immobilize edilen enzim için $27,78 \text{ kJ mol}^{-1}$, Sepabead EC-EA' da kovalent immobilize edilen enzim için $37,87 \text{ kJ mol}^{-1}$, Sepabead EC-HA' da kovalent immobilize edilen enzim için $44,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve Sepabead EC-EP' de kovalent immobilize edilen enzim için $28,80 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kovalent immobilizasyon sonrasında aktivasyon enerjisinde belirgin bir artış olmamıştır. Kovalent bağlama ile Sepabead EC-Ea ve Sepabead EC-HA' da immobilize edilen örneklerin aktivasyon enerjileri serbest enzime göre daha yüksektir. İmmobilize enzimin aktivasyon enerjisinin yüksek olması immobilizasyon sırasında enzim moleküllerinin yapısında meydana gelen değişiklikler nedeniyle reaksiyonun engellenmesinden kaynaklanır (Önal, 2000). Arrhenius sabitlerinin aldığı değerler dikkate alındığında değerin $20'$ nin üzerinde olması kovalent bağlanmayı, $40'$ in üzerinde olması ise adsorbsiyonu ifade etmektedir.

3.3.1.3 Substrat konsantrasyonu

İmmobilizasyon sırasında enzim proteininde meydana gelen konformasyonel değişiklikler ve immobilizasyon ortamından kaynaklanan sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri immobilize enzimin kinetik özelliklerini farklılaştırabilir. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri sentetik substratı olan PNPG ve doğal substratı olan rafinoz kullanılarak bölüm 2.9.1.3' de belirtildiği gibi test edilmiştir.



Şekil 3.8 Serbest ve immobilize α -galaktozidazların Arrhenius diyagramları.

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

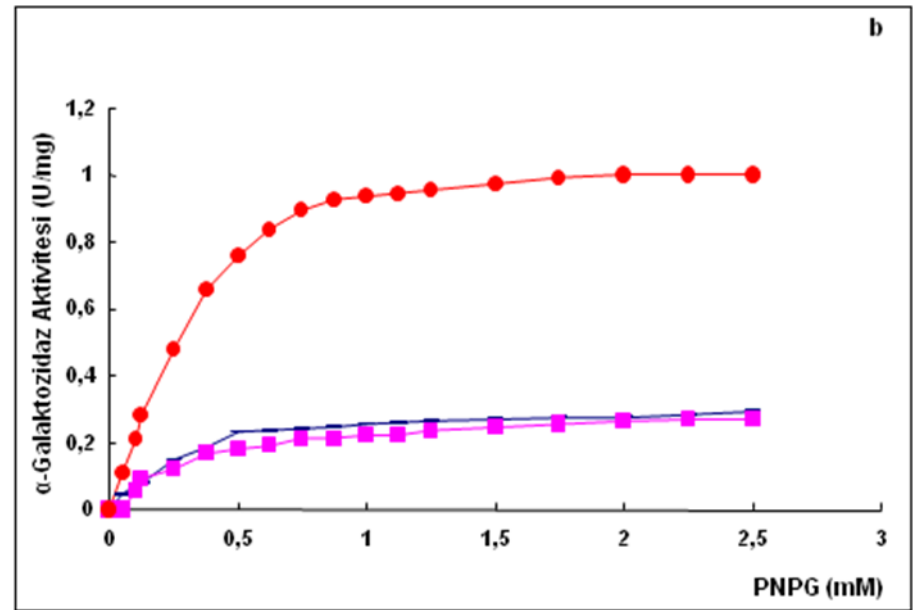
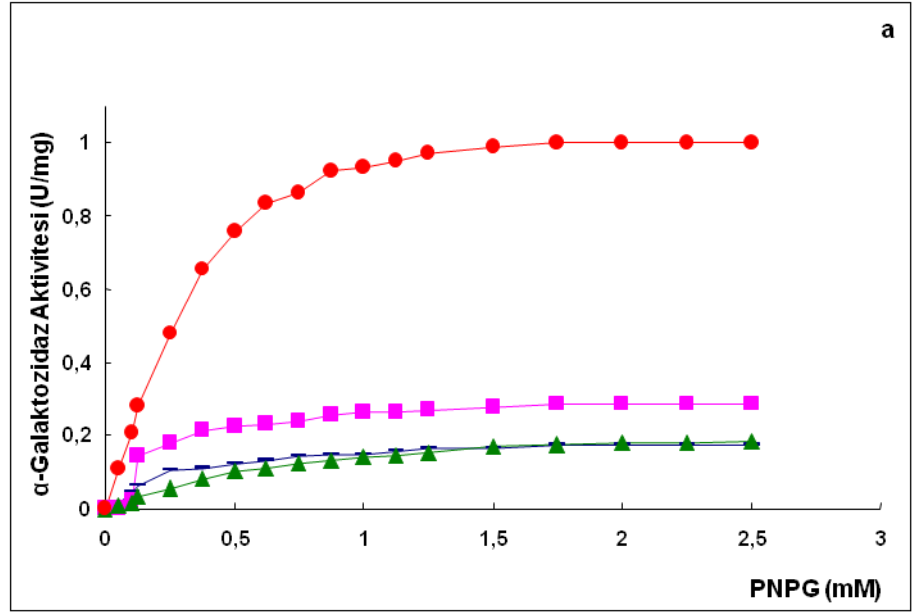
p-Nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (PNPG):

α -Galaktozidaz aktivitesine sentetik substrat PNPG' nin etkisi bölüm 2.9.1.3' de anlatıldığı gibi belirlendi. Şekil 3.9' dan görüldüğü gibi doyunluk substrat konsantrasyonu serbest enzim için 1,75 mM olarak bulundu. Kovalent bağlama ile Sepabead taşıyıcılarda α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu sonrasında tüm immobilize enzim preparatlarının da doyunluk substrat konsantrasyonu değişmemiş ve 1,75 mM olarak belirlenmiştir. Sepabead taşıyıcılarda adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimlerin doyunluk substrat konsantrasyonu tüm immobilize enzimler için 1,25 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9).

Substrat olarak PNPG' nin kullanıldığı koşullarda çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından ($1/S'$ a karşılık $1/v$) K_m ve V_{max} değerleri serbest enzim için sırasıyla 0,346 mM ve 1,28 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 3.10a). Sepabead EC-EA' da kovalent bağlama ile immobilize edilen enzim için K_m ve V_{max} değerleri değerleri sırasıyla 0,292 mM ve 0,197 U/mg; Sepabead EC-HA' da immobilize enzim için 0,159 mM ve 0,299 U/mg, Sepabead EC-EP' de immobilize edilen enzim için 0,779 mM ve 0,252 U/mg olarak bulundu (Şekil 3.10a). Adsorbsiyon ile Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,278 mM ve 0,328 U/mg iken Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim için sırasıyla 0,260 mM ve 0,281 U/mg olarak bulundu (Şekil 3.10b).

Çizelge 3.24 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktiviteleri üzerine PNPG konsantrasyonunun etkisi.

	Sepabead EC-EA (kovalent)	Sepabead EC-HA (kovalent)	Sepabead EC-EP (kovalent)	Sepabead EC-EA (ads+çb)	Sepabead EC-HA (ads+çb)	Serbest Enzim
[S] (mM)	1,75	1,75	1,75	1,25	1,25	1,75
K_m (mM)	0,292	0,159	0,779	0,278	0,260	0,346
V_{max} (U/mg)	0,197	0,299	0,252	0,328	0,281	1,28



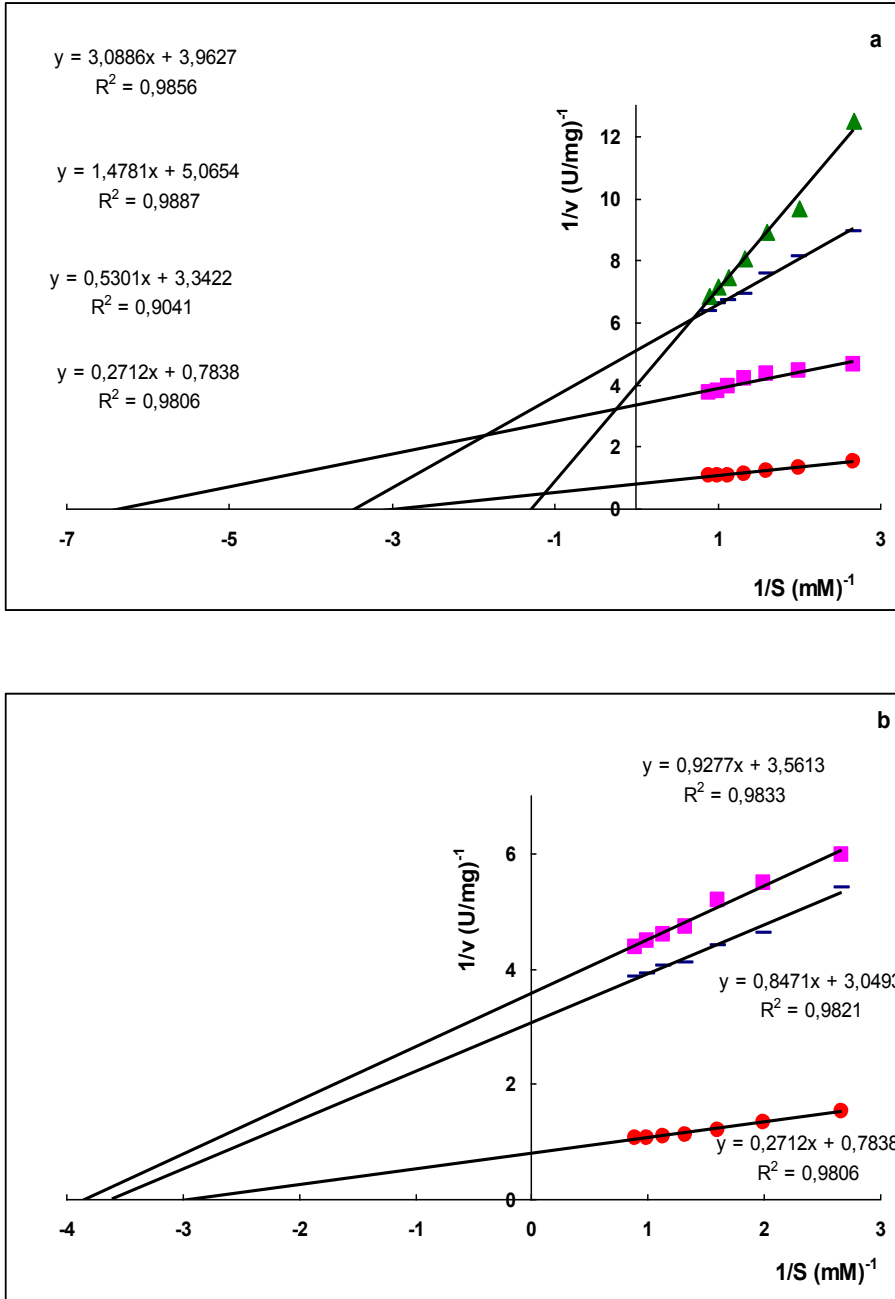
Şekil 3.9 PNP konsantrasyonunun serbest ve immobilize α -galaktosidaz aktiviteleri üzerine etkisi.

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).



Şekil 3.10 Serbest ve immobilize enzimlerin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG).

a İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA)(-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■), Serbest enzim (●).

Rafinoz:

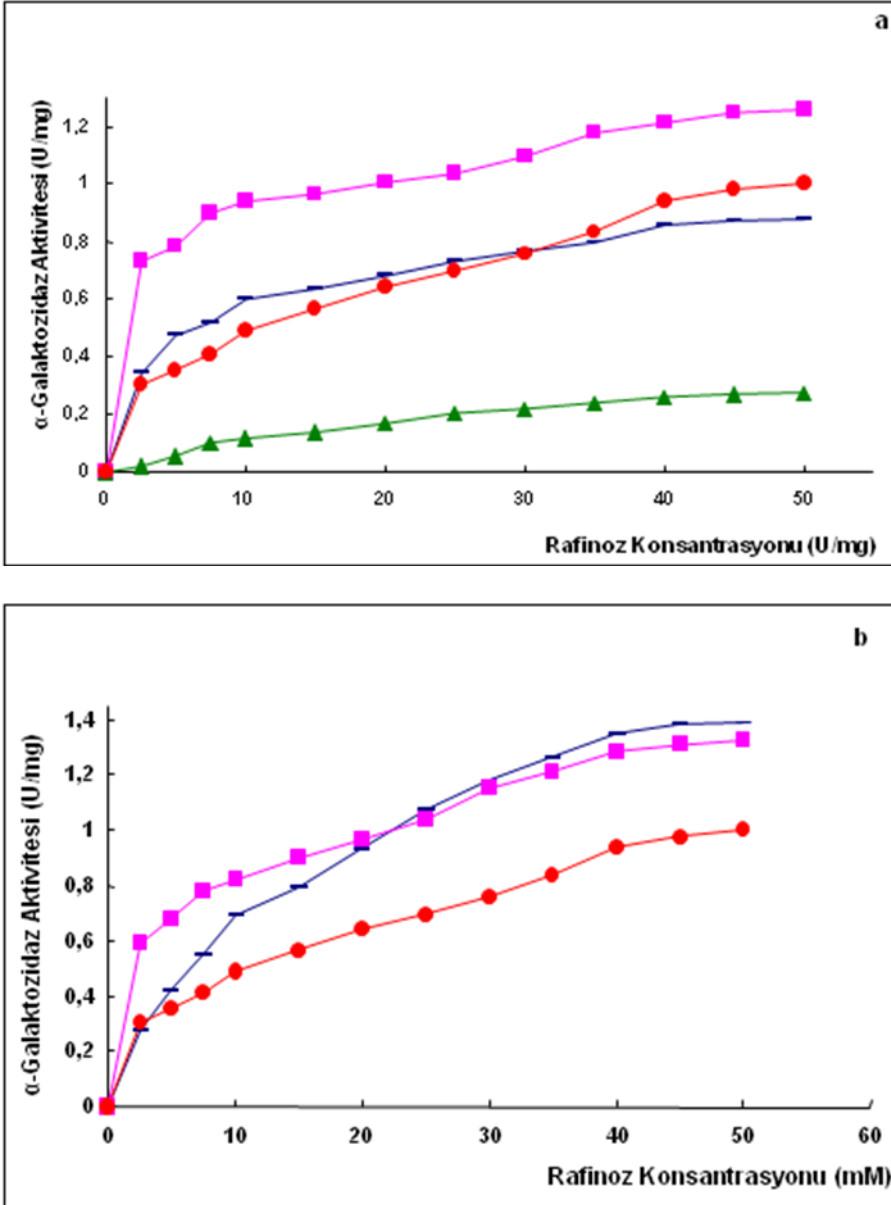
Rafinoz α -galaktozidaz enziminin en iyi bilinen doğal substratıdır. Rafinoz kullanıldığında enzimin doygunluk substrat konsantrasyonu ile K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek için 2,5-50 mM rafinoz konsantrasyon aralığı kullanılarak bölüm 2.9.1.3' de belirtilen koşullarda serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri tayin edildi.

Doygunluk substrat konsantrasyonu serbest ve tüm immobilize enzimler için aynı olup 40 mM olarak belirlendi (Şekil 3.11). Bu değer üzerindeki konsantrasyon değerlerinde aktivitede belirgin bir değişiklik olmamaktadır. Rafinoz için çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından (Şekil 3.12) serbest enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,84 mM ve 0,945 U/mg olarak bulundu. Sepabead EC-EA ile yapılan kovalent immobilizasyonda immobilize enzimin K_m ve V_{max} değerleri 4,32 mM ve 0,856 U/mg, Sepabead EC-HA için bu değerler sırasıyla 2,15 mM ve 1,13 U/mg olarak belirlendi. Epoksi aktif taşıyıcı Sepabead EC-EP için K_m ve V_{max} değerleri 18,20 mM ve 0,335 U/mg' dır. Adsorbsiyon ile immobilize edilip glutaraldehidle çapraz bağlanan Sepabead EC-EA taşıyıcıda K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 15,95 mM ve 1,744 U/mg iken Sepabead EC-HA taşıyıcıda immobilize enzimler için bu değerler sırasıyla 4,34 mM ve 1,242 U/mg' dır. Immobilizasyondan sonra K_m değerinde gözlenen farklanma enzimin katalitik bölgesinin immobilizasyondan etkilendiğini göstermektedir.

Çizelge 3.25 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktiviteleri üzerine rafinoz konsantrasyonunun etkisi.

	Sepabead EC-EA (kovalent)	Sepabead EC-HA (kovalent)	Sepabead EC-EP (kovalent)	Sepabead EC-EA (ads+çb)	Sepabead EC-HA (ads+çb)	Serbest Enzim
[S] (mM)	40	40	40	40	40	40
K_m (mM)	4,32	2,15	18,20	15,95	4,34	8,84
V_{max} (U/mg)	0856	1,130	0,355	1,744	1,242	0,945

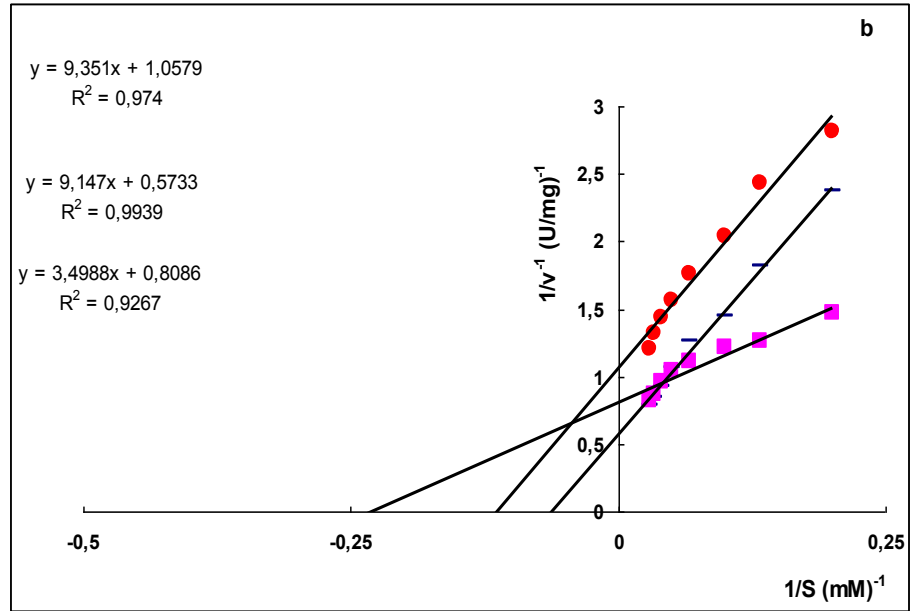
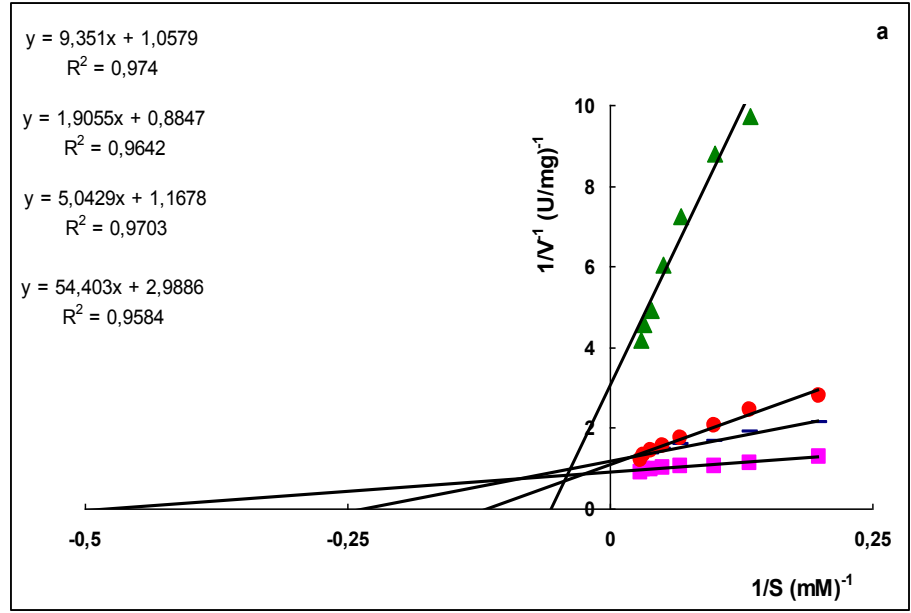
Elde edilen K_m değerleri literatürler ile uyumludur (Çizelge 1.3). Substrat olarak rafinoz kullanılarak yapılan çalışmalarda genellikle yapay substrata göre daha yüksek K_m değerleri elde edilmiştir (Dey et al., 1983; Guimaraes et al., 2001; Varbanets et al., 2001; Önal, 2000).



Şekil 3.11 Rafinoz konsantrasyonunun serbest ve immobilize α -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkisi.

a İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-), Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC (HA-E-GA) (■), Serbest enzim (●).



Şekil 3.12 Serbest ve immobilize enzimlerin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz).

a) İmmobilize enzimler (kovalent), Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama);

Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

3.3.1.4 Efektör konsantrasyonunun etkisi

Reaksiyon ortamına çeşitli metaller ve şekerler ilave edilerek (CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 ve galaktoz, glukoz, sukroz, fruktoz, laktoz, maltoz, melibioz, rafinoz) bunların serbest ve immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Metallerin ve şekerlerin ortamdaki konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde Bölüm 2.9.1.4’ de belirtilen şekilde ortama ilave edildi. Standart koşullar altında serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri ölçülerek aktivatör ve inhibitörleri belirlendi.

Çizelge 3.26 Efektör olarak çeşitli şekerlerin serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelerine (% aktivite) etkisi.

Efektör	Sepabead	Sepabead	Sepabead	Sepabead	Sepabead	Serbest Enzim
	EC-EA (Kovalent)	EC-HA (Kovalent)	EC-EP (Kovalent)	EC-EA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)	EC-HA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)	
Kontrol	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Galaktoz	6,34	13,31	28,71	17,74	14,38	9,80
Glukoz	80,69	65,91	88,43	107	99,27	98,19
Sukroz	76,51	56,82	93,67	97,63	112,73	97,47
Fruktoz	83,72	73,70	60,04	78,31	83,80	97,63
Laktoz	80,26	73,70	76,64	85,89	79,53	74,78
Maltoz	68,30	95,45	71,07	74,47	84,40	101,63
Melibioz	68,01	67,21	77,51	65,15	70,70	54,41
Rafinoz	80,54	81,19	90	81,37	85,44	77,23

Çizelge 3.24' den görüldüğü gibi efektör olarak kullanılan şekerlerden galaktoz, hazırlanan tüm immobilize enzim preparatları ve serbest enzim için kuvvetli inhibitör görevi görmektedir. Galaktozun, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı α -galaktozidaz enzimleri için inhibitör etkisi gösterdiği çeşitli çalışmalarda da belirtilmiştir (King et al, 2002; Guimaraes et al., 2001; Demir, 2012). *Citrullus battich* (karpuz) α -galaktozidazı ile yapılan bir efektör çalışmasında 10 mM galaktozun enzim aktivitesini yaklaşık olarak % 80 oranında düşürdüğü belirtilmiştir (Itoh et al., 1986). Bir başka çalışmada laktozun *Bacillus stearothermophilus* α -galaktozidazını yüksek oranda inhibe ettiği ortaya konmuştur (Gote et al., 2004). *Debaryomyces hansenii* ekstraselüler α -galaktozidazı için melibioz ve galaktozun kuvvetli inhibitör özellik gösterdiği bilinmektedir (Viana et al., 2006). Yine bir başka çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* α -galaktozidazının glukoz, galaktoz, laktoz ve fruktoz tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği belirtilmiştir (Farzadi et al., 2010). Çizelge 3.23' den görüldüğü gibi galaktoz haricindeki diğer şekerlerin tümünün serbest ve immobilize enzimler için galaktoza kıyasla daha düşük oranda inhibisyon yarattıkları belirlenmiştir.

Çeşitli metallerin serbest ve immobilize α -galaktozidazların aktivitesine etkisi de incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.25' de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi FeSO_4 ve Na_2CO_3 tüm serbest ve immobilize enzim preparatları için inhibitörsi etki göstermiştir. Literatürde Fe^{+2} ' nin üzümde elde edilen α -galaktozidaz enziminin aktivitesini % 46 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir (Kang and Lee, 2001). *Bacillus stearothermophilus* α -galaktozidazının Ca^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} ile inhibe olduğu çalışmalar mevcuttur (Gote et al., 2004). Domatesten saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi de Na_2CO_3 ile % 44 oranında inhibe olmuştur (Demir, 2012). Soya tohumu, *Bacillus circulans* ve termofilik fungus *Humicola* α -galaktozidaz enzimlerinin de metal iyonları ile inhibe olduğu çeşitli çalışmalar mevcuttur (Guimaraes et al., 2001; El-Shebawy et al., 2007; Kotwal et al., 1999). Tüm bu sonuçlara bakıldığında immobilizasyonun enzimi inhibisyona karşı daha dirençli hale getirdiği gözlenmektedir.

Çizelge 3.27 Efektör olarak çeşitli kimyasalların serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelere (% aktivite) etkisi.

Efektör	Sepabead	Sepabead	Sepabead	Sepabead	Sepabead	Serbest Enzim
	EC-EA (Kovalent)	EC-HA (Kovalent)	EC-EP (Kovalent)	EC-EA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)	EC-HA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)	
Kontrol	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
CaCl₂	74,48	63,96	101,85	97,68	95,36	94,17
CuSO₄.5H₂O	87,18	104,54	130,35	111,16	92,27	96,76
KCl	94,38	85,39	128,60	112,47	112,10	96,99
NaCl	98,56	105,19	115,50	121,89	87,17	96,72
MgCl₂.6H₂O	118,59	71,43	130,56	107,52	88,44	95,85
MnSO₄	105,19	127,27	135,48	107,78	92,90	92,76
FeSO₄	12,54	63,96	77,40	86,58	45,40	86,55
ZnSO₄.7H₂O	74,10	63,96	62,33	101,37	95,36	91,81
Na₂CO₃	45,96	33,11	84,39	88,15	81,98	62,08

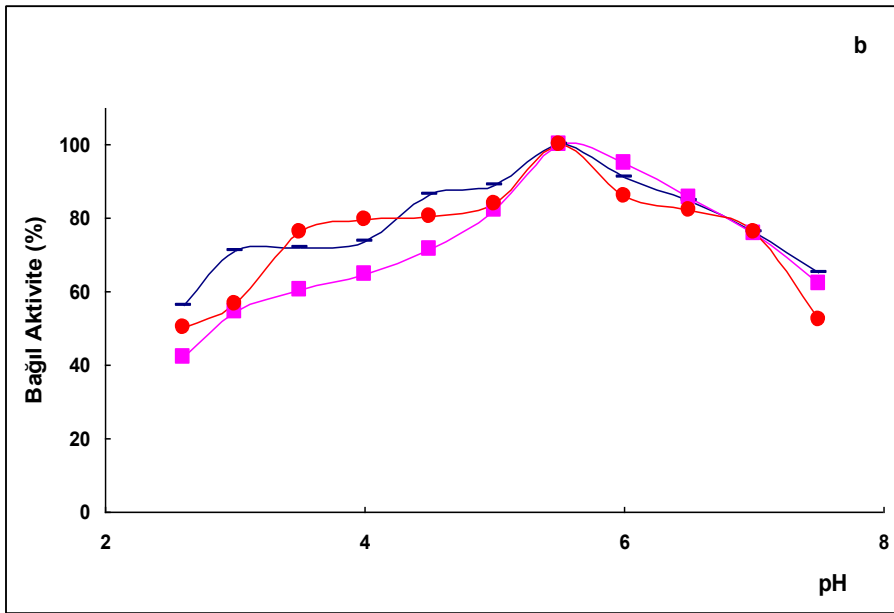
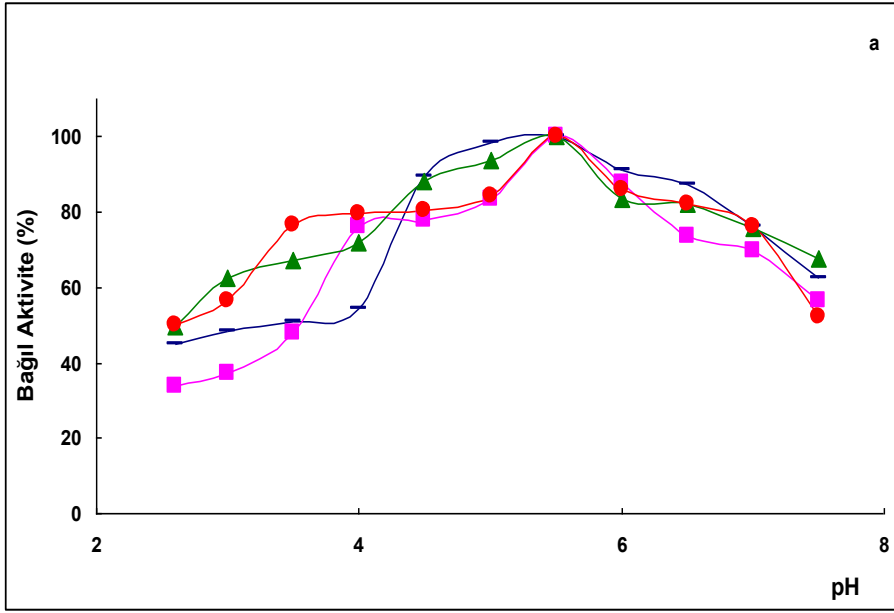
3.3.2 Kararlılık Testleri

Enzimlerin kararlılığı proteinlerin konformasyonel kararlılığı ile ilgili bir parametredir ve sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, inkübasyon zamanı, aktivatör veya inhibitör varlığı, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu gibi diğer parametrelere bağımlı olarak değişkenlik gösterir. Enzim preparatlarının kararlılığı, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Enzimlerin immobilizasyon sonucunda kararlılıklarının arttığı gözlenmektedir. Kararlılıktaki bu artış immobilize enzimlerin endüstriyel proseslerde kullanılabilirliği açısından önemlidir (Önal, 2000). Serbest ve immobilize α -galaktozidaz preparatlarının kararlılıkları ile ilgili sonuçlar ilgili bölümlerde grafiklerle açıklanmıştır.

3.3.2.1 pH kararlılığı

Bir enzimin pH kararlılığı inkübasyon süresi, tampon türü ve konsantrasyonu, iyon şiddeti, substrat konsantrasyonu gibi birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Serbest ve immobilize α -galaktozidazların pH kararlılığı Bölüm 2.9.2.1’ de açıklandığı şekilde ölçülmüştür. Bunun için aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim preparatları farklı pH’ lardaki sitrat tamponlarında (pH 2,6-7,5) 3 saat boyunca 4°C’ de bekletildi ve ardından ortamın pH’ı 6,0’ ya ayarlanarak standart koşullarda aktivite tayinleri yapıldı. Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılığı ile ilgili sonuçlar Şekil 3.13’ de verilmiştir..

Şekil 3.13’ den görüldüğü gibi hem serbest hem de immobilize tüm enzimler geniş bir pH aralığında oldukça kararlıdır. Şekil 3.13’ den görüldüğü gibi Sepabead EC-EA (Sepabead EC EA-E-GA) ve Sepabead EC-HA (Sepabead EC HA-E-GA) taşıyıcılarda adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimler düşük pH değerlerinde aynı taşıyıcılara kovalent bağlama (Sepabead EC EA-GA-E ve Sepabead EC HA-GA-E) ile immobilize edilen enzimlerden daha kararlıdır. Sepabead EC-EP’ de kovalent olarak immobilize edilen enzim (Sepabead EC-EP) diğer immobilize enzimlere kıyasla bu pH aralığında (pH 3,5-7,5) daha kararlıdır. İmmobilizasyon işleminin enzimin pH kararlılığında artışa sebep olduğu görülmektedir. Bu sonuç özellikle immobilize enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği açısından oldukça önemlidir.



Şekil 3.13 Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılığı (substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, tampon: pH 2,6-7,5 sitrat-fosfat).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

Benzer pH-kararlılık sonuçları çeşitli α -galaktozidazlar için rapor edilmiştir. (Önal, 2000; Guimaraes et al., 2001; Anisha et al., 2008; Çalıcı et al., 2010). *P. canescens* α -galaktozidazının pH 3,0-6,0 arasında aktivitesinin % 80' inden fazlasını koruduğu belirtilmiştir (Sinitsyna et al., 2008). Domatesten izole edilerek Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent olarak immobilize edilen α -galaktozidaz ile adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen α -galaktozidazların pH 3,0-6,0 arasında serbest enzime kıyasla daha kararlı oldukları ve aktivitelerinin % 85'den fazlasını korudukları rapor edilmiştir (Bayraktar et al., 2011).

3.3.2.2 Termal kararlılık

Sıcaklık ve ön inkübasyon süresi enzimlerin kararlılığını etkileyen en önemli faktörlerdir. Enzim molekülleri protein yapısında oldukları için sıcaklık ve ön inkübasyon süresindeki artış genellikle denatürasyona ve sonuç olarak enzim aktivitelerinde düşüşe neden olmaktadır. Termal kararlılık tayininde, aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimler önce 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (4-80°C) inkübe edildi ve ardından standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. Serbest ve immobilize α -galaktozidazların kararlılığına sıcaklığın etkisi Şekil 3.14' de verilmiştir.

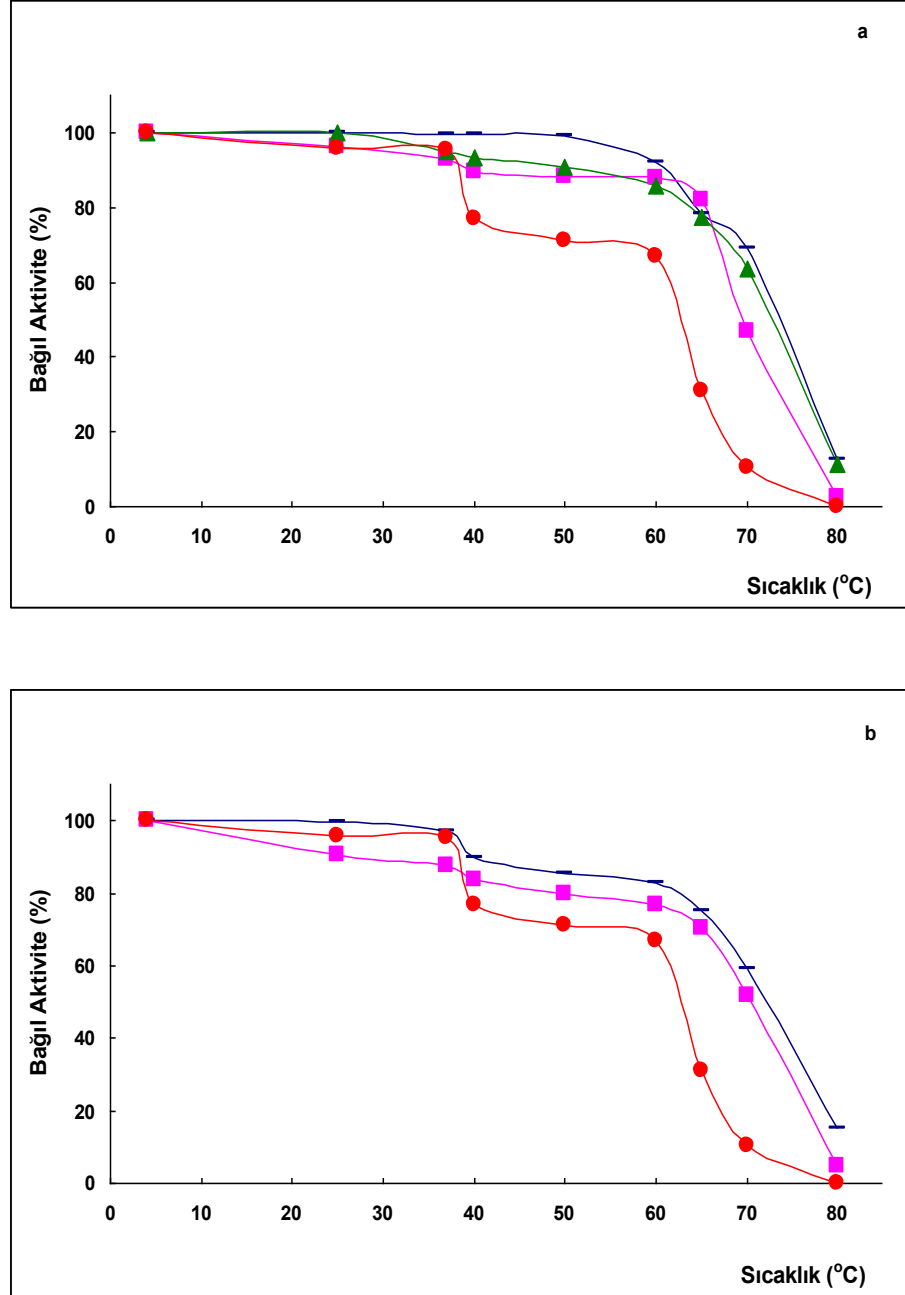
Şekil 3.14' den görüldüğü gibi tüm immobilize α -galaktozidaz enzim preparatlarının termal kararlılıkları serbest enzimin termal kararlılığına göre daha iyidir. Sepabead EC-EA' da farklı yöntemlerle immobilize edilen enzimlerin diğer immobilize enzimlere kıyasla daha yüksek termal kararlılığa sahip oldukları görülmektedir. Tüm immobilize enzimler 70°C' ye kadar aktivitelerinin ortalama % 50' sini korumaktadırlar. Immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin yüksek termal kararlılıkları endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyellerini arttırmaktadır. Şeker endüstrisinde rafinoz hidrolizi 50°C' de gerçekleştirilmektedir. Karpuzdan elde edilen enzim 50°C' de aktivitesinin % 70' ini korurken bu oran immobilizasyon sonrasında % 85' in üzerine çıkmaktadır. Benzer şekilde soya fasulyesi α -galaktozidazının 70°C' de dahi ısıya dayanıklı bir enzim olduğu ve de oligosakkarit hidroliz prosesleri için gerekli ısı şartını (50°C)

sağladığı için endüstriyel kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir (Porter et al., 1992). Genellikle α -galaktozidaz enziminin kaynağına, inkübasyon zamanına sıcaklığa, ortam koşullarına ve immobilizasyon yöntemlerine bağlı olarak serbest ve immobilize α -galaktozidazlar için farklı sıcaklık-aktivite ve sıcaklık-kararlılık profilleri elde edilmiştir (Anisha et al., 2008; Çalcı et al., 2009; Kang and Lee, 2001).

Serbest ve immobilize enzim preparatlarının sıcaklığa bağımlı termal kararlılıklarını belirledikten sonra enzimin endüstriyel proseslerde kullanım potansiyelini belirlemede önemli olan ön inkübasyon zamanına bağımlı termal kararlılıkları belirlendi. Bunun için aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim preparatları 37°C (Şekil 3.15) ve 50°C' de (Şekil 3.16) farklı sürelerde (0-120 dakika) inkübe edildi ve ardından geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda ölçüldü.

Şekil 3.15' den görüldüğü gibi 37 °C 'de inkübe edilen enzimlerden 120 dakikanın sonunda aktivitesini en iyi koruyan Sepabead EC-EA taşıyıcıda adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimdir(Sepabead EC EA-E-GA) ve 120 dakikalık sürenin sonunda başlangıç aktivitesinin % 87' sini korumaktadır. Serbest enzimin ise aynı süre sonunda geri kalan aktivitesi % 69 olarak belirlendi. 50 °C 'de, yapılan ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılık çalışmalarında (Şekil 3.16) 120 dakikalık inkübasyon süresi sonunda serbest enzim aktivitesinin % 63' ünü hala korumaktadır. Kovalent bağlama yöntemi ile üç taşıyıcıda (Sepabead EC-EA, Sepabead EC-HA ve Sepabead EC-EP) immobilize edilen enzimlerin bu süre sonunda geriye kalan enzim aktiviteleri benzer olup yaklaşık % 70 civarındadır (Şekil 3.16a). Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzim bu süre sonunda aktivitesinin % 81' ini korurken bu oran aynı yöntemle Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim için % 75' tir (Şekil 3.17b). Adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılıkları kovalent bağlama ile immobilize edilen enzimlere kıyasla daha iyidir. Bunun nedeni, enzim ve taşıyıcıda bulunan amino grupları arasında gerçekleşen çapraz bağlar olabilir. Bu sayede proteinin konformasyonel sağlamlığı sağlanarak yapı daha kararlı hale gelmektedir (Bayraktar et al., 2011).

İmmobilizasyon ile α -galaktozidaz enziminin termal kararlılığının arttığı pek çok çalışma mevcuttur (Naganagouda et al., 2006; Filho et al., 2008; Okutucu et al., 2010; Bayraktar et al., 2011).



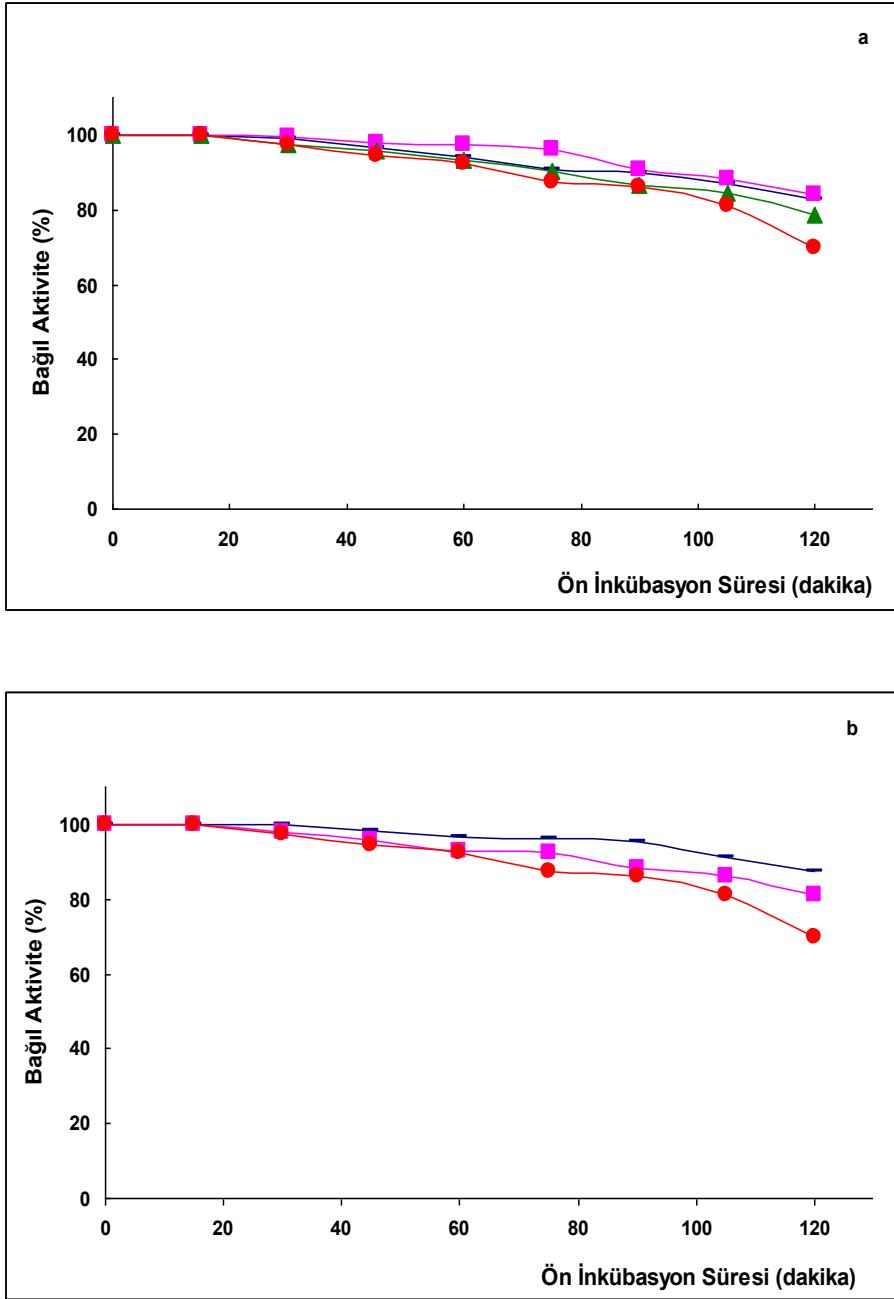
Şekil 3.14 Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılığı (substrat: PNPG, inkübasyon süresi: 30 dak.).

a İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).



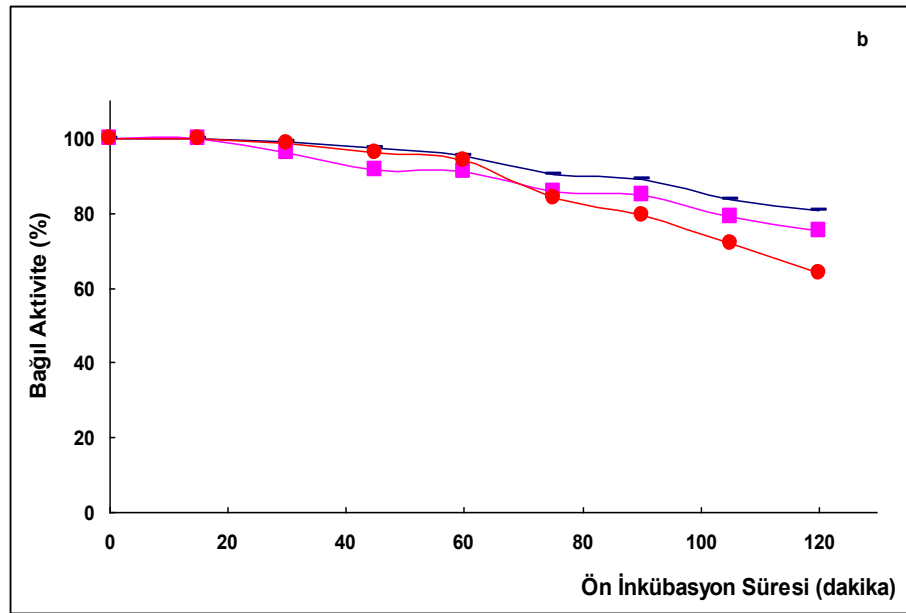
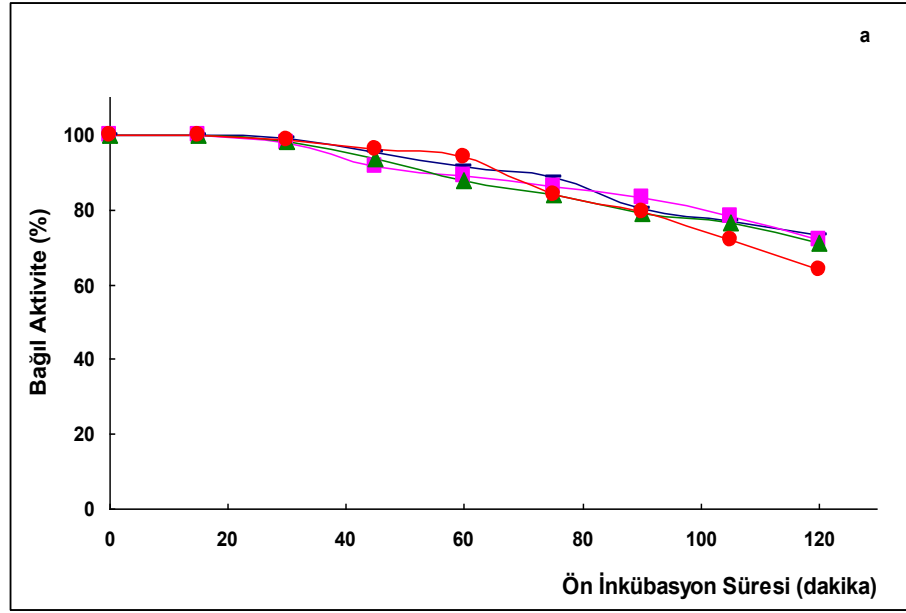
Şekil 3.15 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (substrat: PNPg, sıcaklık: 37°C).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama);

Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).



Şekil 3.16 Serbest ve immobilize enzimlerin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (substrat: PNPG, sıcaklık: 50°C).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-), Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

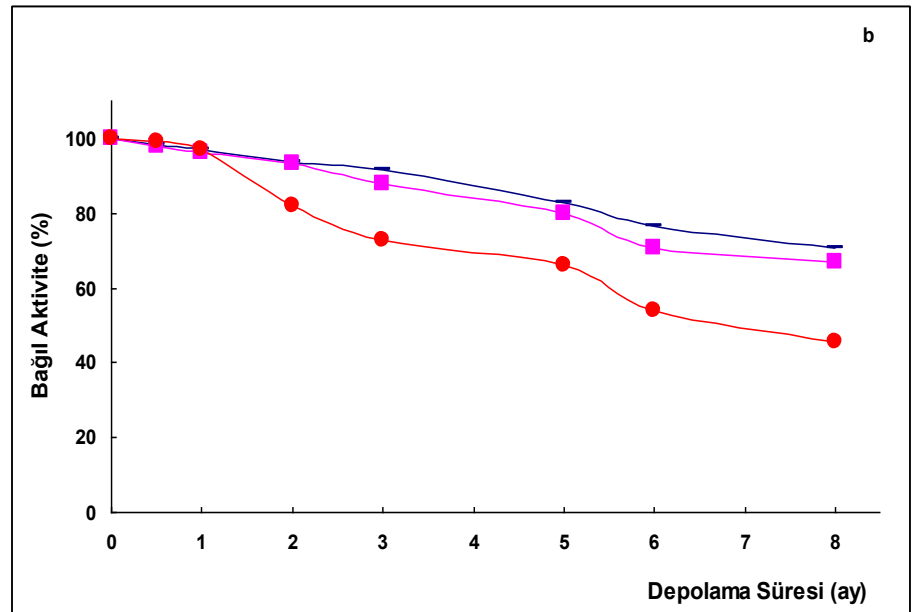
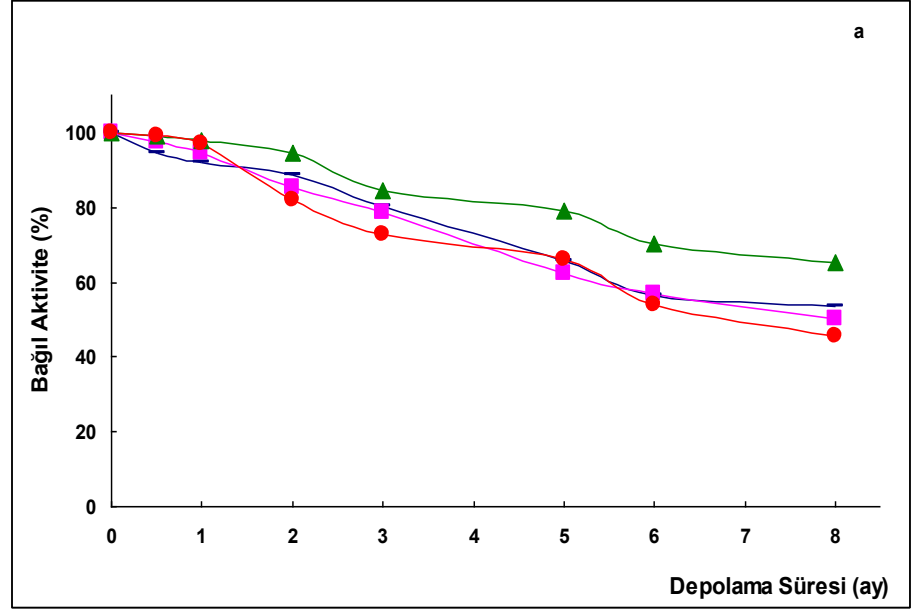
3.3.2.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize enzimlerin uygulamalarını ve kullanılabilirliklerini ilgilendiren önemli bir parametredir ve depolama ortamının sıcaklığı, depolama şekli, enzimin depolama formu gibi çeşitli faktörlerden etkilenir.

Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılığı Bölüm 2.9.2.3' de anlatıldığı gibi 4°C' de aynı koşullarda saklanan enzimlerden 8 ay boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde standart koşullarda aktivite tayini yapılarak belirlendi. Şekil 3.17' de serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılıkları ile ilgili sonuçlar verilmiştir.

Şekil 3.17' den görüldüğü gibi immobilizasyon işlemi ile α -galaktozidaz enziminin depo kararlılığında serbest enzime kıyasla artış olmuştur. Serbest enzim 8 ay sonunda aktivitesinin % 46' sını korurken bu oran kovalent immobilizasyon yöntemi ile Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzim için (EA-GA-E) % 54, Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim için ise % 51' dir (Şekil 3.17a). Kovalent immobilizasyonda en yüksek depo kararlılığına Sepabead EC-EP taşıyıcıda immobilize edilen enzimle (% 66) ulaşılmıştır (Şekil 3.17a). Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve glutaraldehidle çapraz bağlama ile immobilize edilen enzim 8 ay sonunda aktivitesinin % 71' ini, aynı yöntemle Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim ise % 67' sini korumaktadır (Şekil 3.17b). Depo kararlılıklarında bu farklanmalar kullanılan taşıyıcıya, immobilizasyon yöntemine ve enzimin yapısına bağlıdır. Avokado fitazının Sepabead EC-EP' de immobilize edildiği çalışmada serbest enzim 8 ay sonunda aktivitesinin % 49' unu korurken bu oran immobilize enzimde % 78 olarak bulunmuştur (Bıçak Çelem and Önal, 2009). Domatesten izole edilen α -galaktozidaz enzimi ile yapılan çalışmada serbest enzimin 6 ay sonunda aktivitesinin % 65' ini kaybettiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA' da kovalent immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzimlerde aktivite kaybının sırasıyla % 26 ve % 31 olduğu, aynı taşıyıcılarda adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimlerde ise bu oranın sırasıyla % 22 ve % 28 olduğu belirtilmiştir (Bayraktar et al., 2011). İmmobilizasyon sonrasında α -galaktozidaz enzimi için artmış depo

kararlılıkları Singh ve Kayastha tarafından da elde edilmiştir. Kitosanda immobilize edilen enzim 120 gün sonunda aktivitesinin % 54' ünü, Amberlite' de immobilize edilen enzim ise % 32' sini kaybetmiştir (Singh and Kayastha, 2012).



Şekil 3.17 Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılıkları (4°C).

- a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-), Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).
- b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

3.3.2.4 Operasyonel kararlılık

Operasyonel kararlılık enzimlerin büyük ölçekli proseslerde kullanılabilirliğini belirleyen en önemli parametredir. Enzimlerin reaktördeki yarı ömrü ($t_{1/2}$), enzim aktivitesinin yarısının yitilmesi için geçen zamandır ve operasyonel kararlılığın ölçüsüdür. Yarı ömür aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanır:

$$t_{1/2}=0,693/k_D \quad k_D=2,303/t \times \log (A_0/A_t)$$

t: operasyon süresini, k_D : bozunma katsayısını, A_0/A_t ise sırasıyla başlangıç ve t anındaki enzimatik aktiviteyi göstermektedir (Telefoncu, 1997).

Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda kovalent ve adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzim örneklerinin operasyonel kararlılık denemeleri Bölüm 2.9.2.4' de belirtildiği gibi hem PNPG hem de rafinoz substratları kullanılarak gerçekleştirildi.

PNPG ile yapılan operasyonel kararlılık denemelerinde reaktöre 20 mg immobilize enzim, 0,25 mL 2 mM PNPG ve 0,75 mL sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) ilave edilerek 37°C' de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin üst sıvı fazı ayrılarak immobilize enzimin aktivitesi standart α -galaktozidaz aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Rafinoz ile operasyonel kararlılık çalışması PNPG ile yapılan kararlılık çalışmasına benzer şekilde gerçekleştirildi. Reaktöre 20 mg immobilize enzim 0,9 mL sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) ve 0,10 mL 10 mM rafinoz eklenerek 50°C' de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan örnekler ile DNS metodu ile enzim aktivite tayini gerçekleştirildi. Her iki substratla hazırlanan sistemler 52 saat boyunca çalıştırıldı.

İmmobilize enzimlerin bozunma katsayıları (k_D) her iki substrat için yukarıdaki formüle göre hesaplanmıştır. PNPG kullanılarak hesaplanan k_D değerleri Çizelge 3.25 ve rafinoz kullanılarak hesaplanan k_D değerleri Çizelge 3.26' da verilmiştir.

Çizelge 3.28 İmmobilize enzimlerin farklı zamanlardaki k_D değerleri (Substrat: PNPG).

Operasyon Süresi (saat)	k_D				
	Sepabead EC-EA	Sepabead EC-HA	Sepabead EC-EP	Sepabead EC-EA	Sepabead EC-HA
	(Kovalent)	(Kovalent)	(Kovalent)	(Adsorbsiyon ve Ç. B.)	(Adsorbsiyon ve Ç. B.)
2	0,0115	0,0161	0,0288	0,0173	0,0224
4	0,0161	0,0236	0,0207	0,0173	0,0227
6	0,0246	0,0192	0,0192	0,0188	0,0282
7	0,0293	0,0217	0,0184	0,0210	0,0312
22	0,0277	0,0208	0,0112	0,0153	0,0226
26	0,0339	0,0261	0,0140	0,0182	0,0284
30	0,0365	0,0312	0,0184	0,0224	0,0293
52	0,0501	0,0454	0,0204	0,0421	0,0425

Çizelge 3.29 İmmobilize enzimlerin farklı zamanlardaki k_D değerleri (Substrat: Rafinoz).

Operasyon Süresi (saat)	k_D				
	Sepabead EC-EA	Sepabead EC-HA	Sepabead EC-EP	Sepabead EC-EA	Sepabead EC-HA
	(Kovalent)	(Kovalent)	(Kovalent)	(Adsorbsiyon ve Ç. B.)	(Adsorbsiyon ve Ç. B.)
1	0,0391	0,0414	0,0253	0,0322	0,0472
5	0,0368	0,0484	0,0271	0,0447	0,0552
7	0,0378	0,0523	0,0300	0,0464	0,0549
18	0,0280	0,0276	0,0218	0,0285	0,0345
20	0,0272	0,0266	0,0245	0,0305	0,0374
22	0,0307	0,0277	0,0260	0,0318	0,0359
28	0,0341	0,0354	0,0290	0,0372	0,0419
30	0,0404	0,0391	0,0300	0,0365	0,0432

İmmobilize enzimlerin Çizelge 3.26 ve Çizelge 3.27' dan belirlenen k_D değerlerinin ortalamaları ve yukarıda verilen formül yardımıyla hesaplanan yarı ömürleri ($t_{1/2}$) sırasıyla Çizelge 3.28 ve Çizelge 3.29' de verilmiştir. Hem PNPG hem de rafinozun substrat olduğu koşullarda Sepabead EC-EP' de immobilize edilen enzimin bozunma katsayısı en düşük dolayısı ile yarı ömrü en uzundur. Substrat olarak rafinozun kullanıldığı denemede Sepabead EC-EA taşıyıcıda kovalent immobilizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan enzim ile aynı taşıyıcıda adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilen enzimin yarı ömürleri arasında belirgin bir farklanma olmamıştır.

Çizelge 3.30 İmmobilize enzimlerin ortalama k_D değerleri.

Substrat	k_D				
	Sepabead EC-EA (Kovalent)	Sepabead EC-HA (Kovalent)	Sepabead EC-EP (Kovalent)	Sepabead EC-EA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)	Sepabead EC-HA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)
PNPG	0,0287	0,0255	0,0189	0,0216	0,0284
Rafinoz	0,0343	0,0373	0,0267	0,0360	0,0438

Çizelge 3.31 İmmobilize enzimlerin yarı ömürleri ($t_{1/2}$, saat).

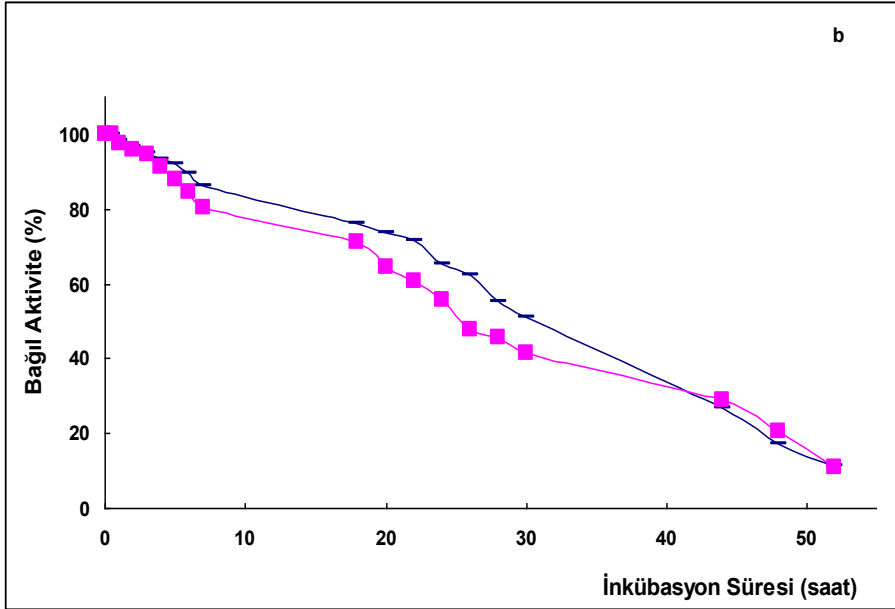
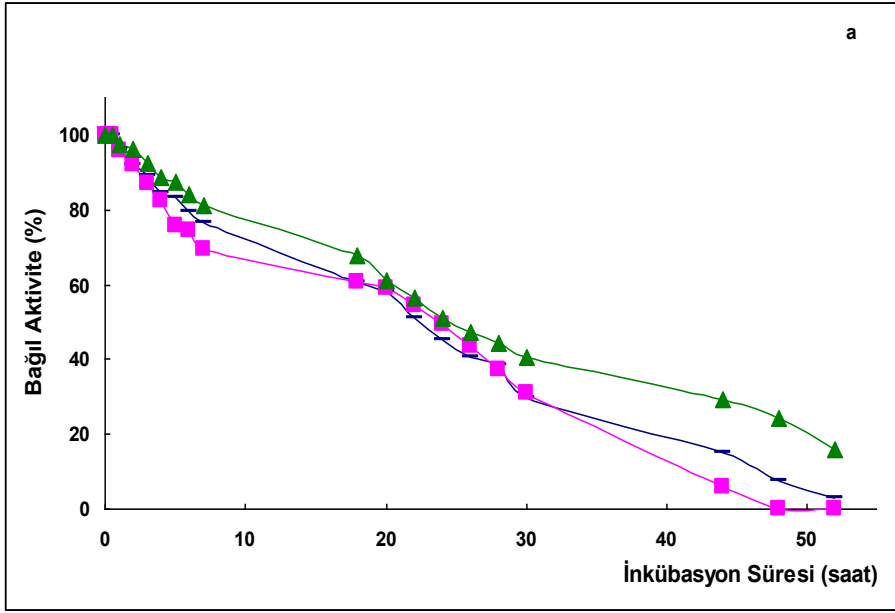
Substrat	$t_{1/2}$				
	Sepabead EC-EA (Kovalent)	Sepabead EC-HA (Kovalent)	Sepabead EC-EP (Kovalent)	Sepabead EC-EA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)	Sepabead EC-HA (Adsorbsiyon ve Ç. B.)
PNPG	24,16	27,18	36,67	32,08	24,40
Rafinoz	20,20	18,58	25,96	19,25	15,82

Her bir immobilize enzim için bağıl aktivite ile inkübasyon süresi arasında çizilen operasyonel kararlılık grafikleri PNPG ve rafinoz substratları için sırasıyla Şekil 3.18 ve Şekil 3.19' da verilmiştir.

PNPG' nin substrat olarak kullanıldığı sistemlerde 30 saat sonunda kovalent immobilizasyon yöntemi ile Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzim aktivitesinin yaklaşık % 29' unu korumaktadır. Bu oran Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim için % 39, Sepabead EC-EP' de immobilize edilen enzim için ise % 58' dir. Adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile Sepabead EC-EA taşıyıcıda immobilize edilen enzim 30 saatin sonunda aktivitesinin % 51' ini ve Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim ise % 42' sini korumaktadır (Şekil 3.18).

Substrat olarak rafinozun kullanıldığı sürekli sistemlerde Sepabead EC-EA' da kovalent olarak immobilize edilen enzim 30 saatin sonunda aktivitesinin % 30' unu, aynı yöntemle Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim aktivitesinin % 31' ini ve Sepabead EC-EP' de immobilize edilen enzim ise % 41' ini korumaktadır. Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyon sonucu enzim aktivitesinin % 34' ünü ve Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim ise % 27' sini korumaktadır (Şekil 3.19).

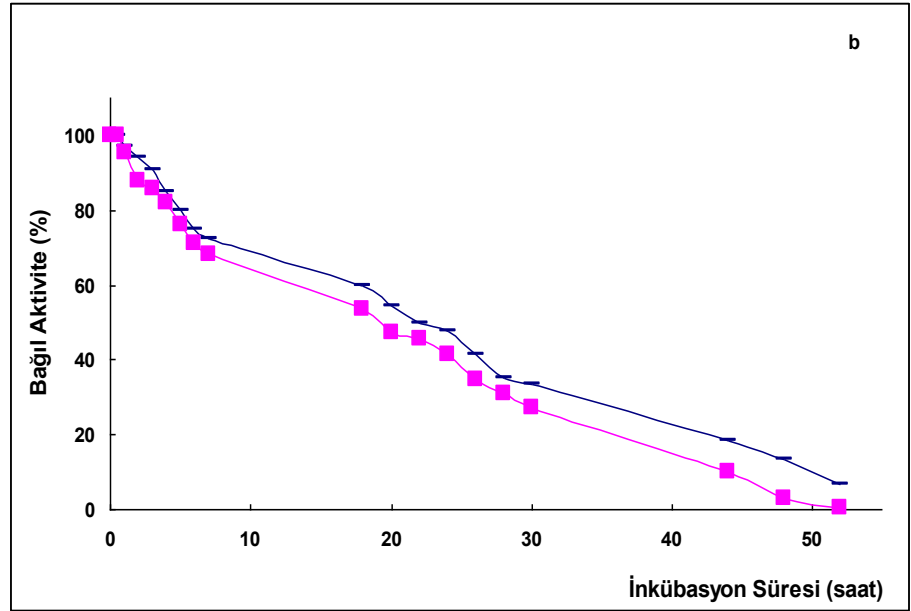
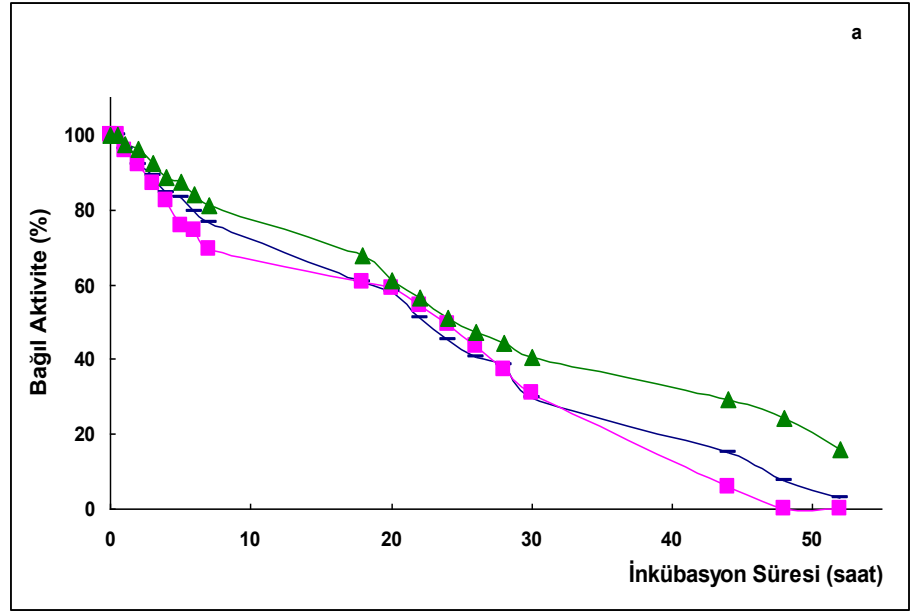
Operasyonel kararlılık enzimlerin iş yapma süresince aktivitedeki değişmeyi gösteren önemli bir parametre olup özellikle immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamaları açısından önemlidir. Hazırlanan enzim preparatlarının bu süre sonunda bile kararlılıklarını korumaları endüstriyel açıdan kullanılabilirliklerini arttırmaktadır.



Şekil 3.18 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılıkları (Substrat: PNPG).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),
Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EA-E-GA (-),
Sepabead HA-E-GA (■).



Şekil 3.19 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılıkları (Substrat: Rafinoz).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲)

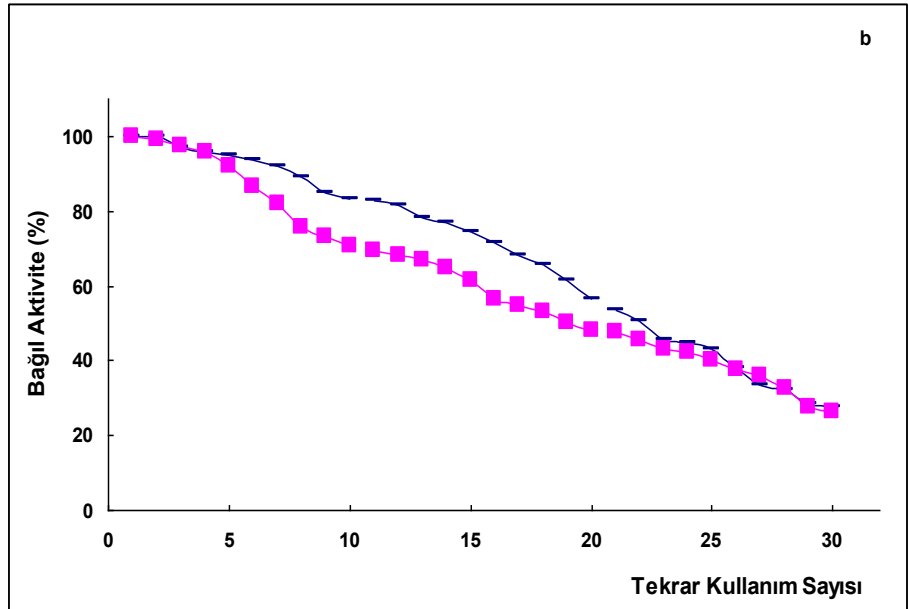
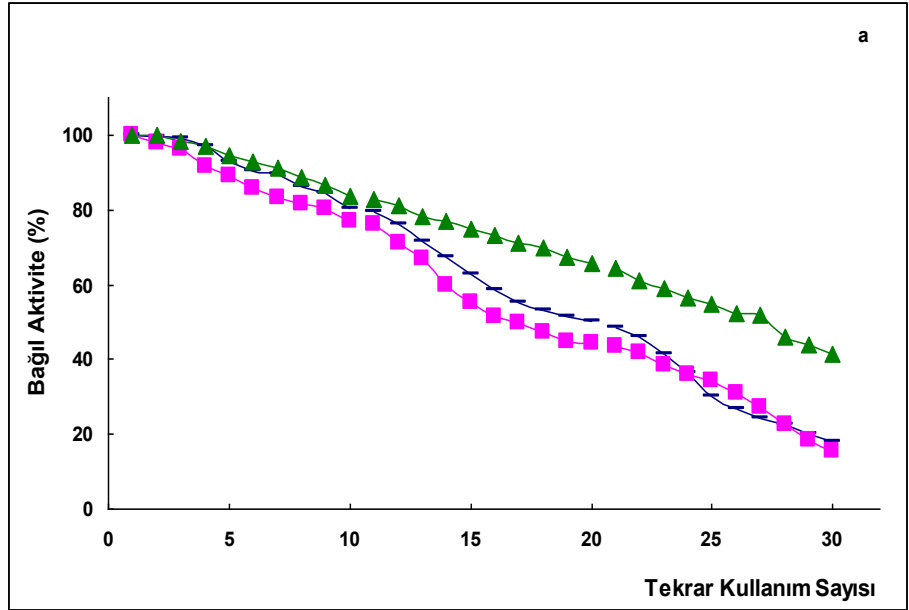
b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama);

Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC(HA-E-GA) (■).

3.3.2.5 Tekrar kullanılabilirlik

Tekrar kullanılabilirlik denemeleri Bölüm 2.9.2.5’ de anlatıldığı gibi substrat olarak PNPG’ nin kullanıldığı sistemde 37°C’ de ve rafinozun kullanıldığı sistemde 50°C’ de gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sırasında gün boyu kullanılan enzimler gece boyunca 4°C’ de saklanmıştır. Denemeler üç gün boyunca sürdürülmüş ve her bir gün grafikte kesikli olarak belirtilmiştir. PNPG kullanılan sistemde bir günde 10 ölçüm, üç gün sonunda toplam 30 ölçüm alınmıştır. Rafinoz kullanılarak yapılan denemelerde enzim günde 6 kez, üç gün sonunda ise toplam 18 kez çalıştırılmıştır.

Şekil 3.20’ de immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin 37°C’ deki tekrar kullanılabilirlik sonuçları verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi 25 kez kullanım sonucunda kovalent immobilizasyon yöntemi ile Sepabead EC-EA’ da immobilize edilen enzim aktivitesinin % 30’ unu, Sepabead EC-HA’ da immobilize edilen enzim aktivitesinin % 34 ‘ ünü ve Sepabead EC-EP’ de immobilize edilen enzim aktivitesinin % 55’ ini korumaktadır. Adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyonda ise Sepabead EC-EA’ da immobilize edilen enzimin 25 kez kullanım sonucu aktivitesinin % 43’ ünü ve Sepabead EC-HA’ da immobilize edilen enzimin aktivitesinin % 40’ ını koruduğu belirlenmiştir. Domates α -galaktozidazının galaktoz içeren moleküler damgalı polimerde immobilize edildiği bir çalışmada 37°C’ de 17 kez kullanıldığında aktivitesinin % 50’ sini koruduğu belirtilmiştir (Okutucu et al., 2010).

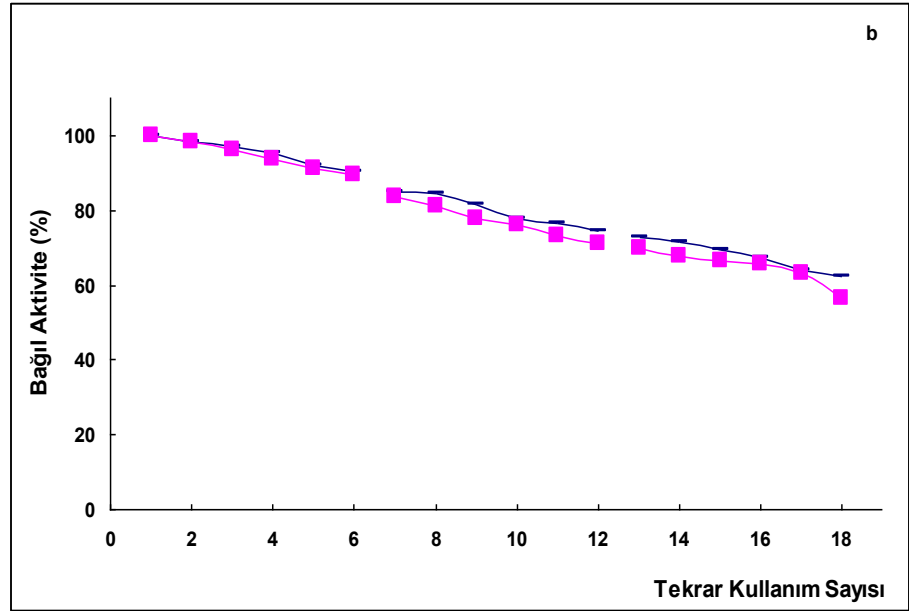
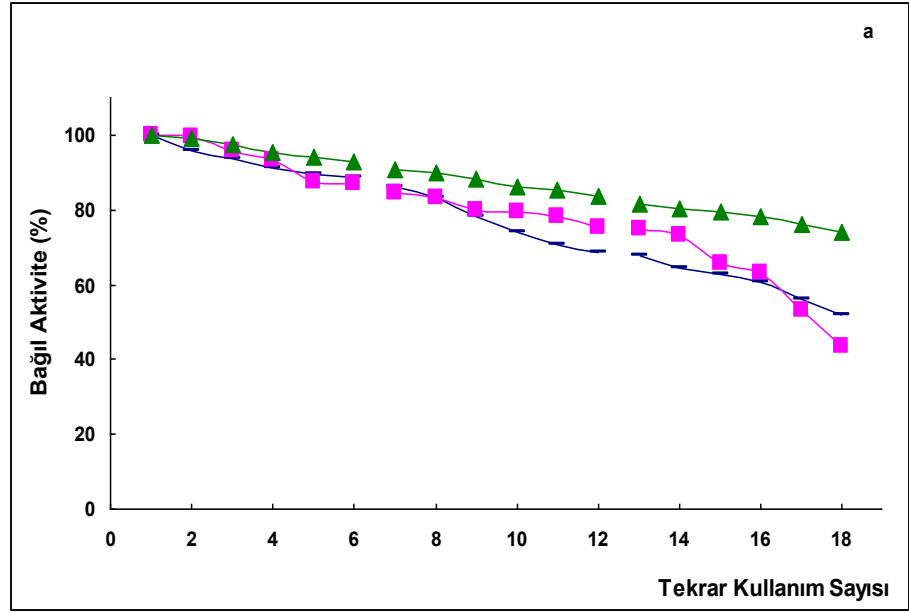


Şekil 3.20 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri (Substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, inkübasyon süresi: 30 dak.).

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-), Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC(HA-E-GA) (■).

50°C’ de gerçekleştirilen tekrar kullanılabilirlik denemeleri özellikle rafinoz hidroliz prosesleri açısından önemlidir. Şekil 3.21’ den görüldüğü gibi 18 kez kullanım sonucunda Sepabead EC-EA’ da kovalent immobilizasyon yöntemi ile hazırlanan enzim aktivitesinin % 52’ sini korumaktadır. Yine aynı yöntemle Sepabead EC-HA’ da immobilize enzim 18 kez kullanıldığında aktivitesinin % 44’ n, Sepabead EC-EP’ de hazırlanan enzim ise aktivitesinin % 74’ n korumaktadır. Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA’ da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimler 18 kez kullanıldıklarında aktivitelerinin sırasıyla % 63’ n ve % 57’ sini korumaktadırlar. 37°C’ de ve 50°C’ de gerçekleştirilen denemelerde adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzimlerin aktivitelerini kovalent immobilizasyon yöntemi ile hazırlanan enzimlerden daha iyi korudukları belirlenmiştir. Buna benzer bir sonuç domatesten izole edilen α -galaktozidaz enzimi için rapor edilmiştir (Bayraktar et al., 2011). Denemeler sırasında taşıyıcıdan enzim ayrılması olmamıştır. Her iki sıcaklıkta elde edilen tekrar kullanılabilirlik sonuçları hazırlanan immobilize enzimlerin endüstriyel proseslerde kullanımı için avantaj oluşturmaktadır.



Şekil 3.21 İmmobilize α -galaktozidaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50°C, inkübasyon süresi: 60 dak.).

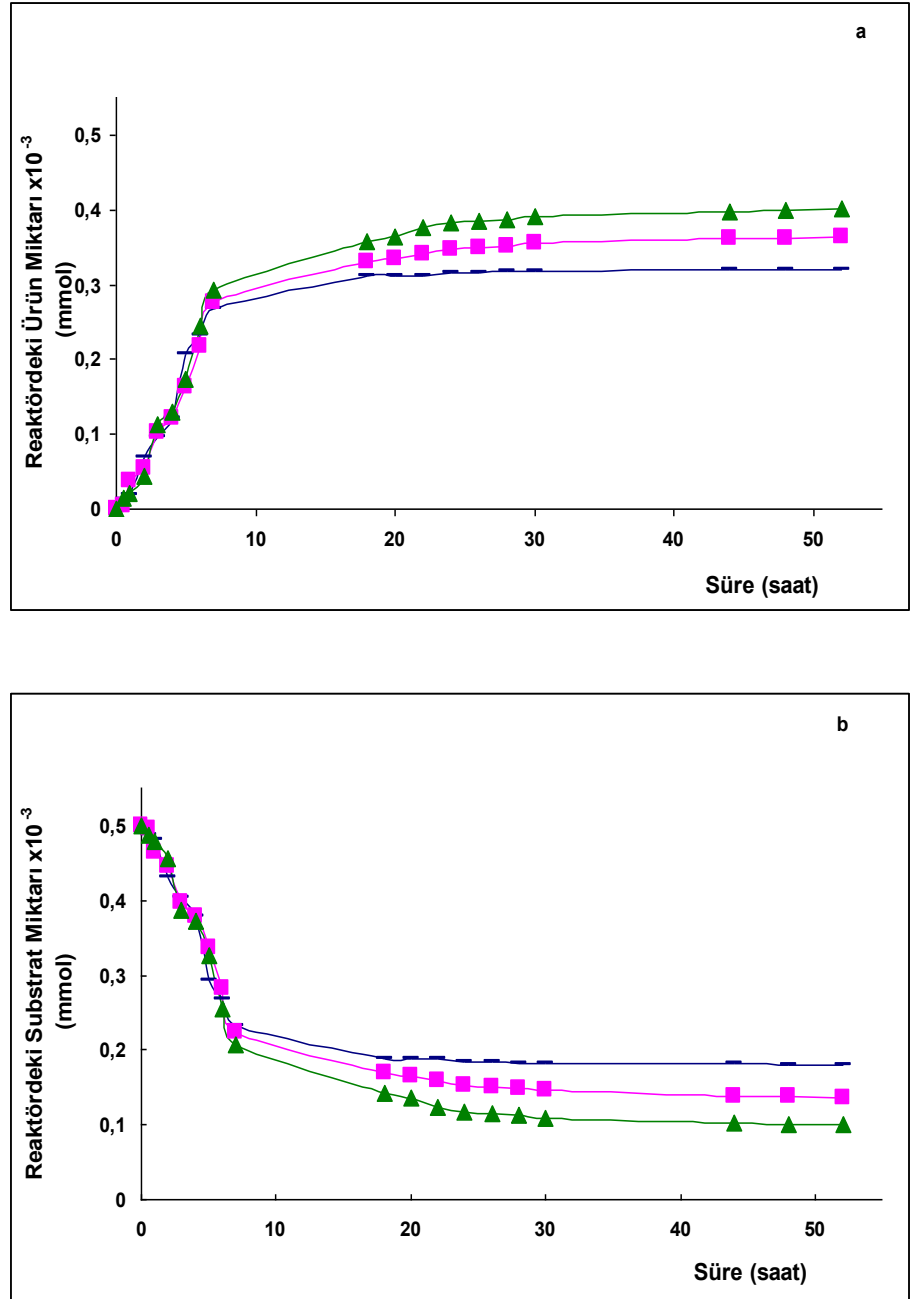
a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-), Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-), Sepabead EC(HA-E-GA) (■).

3.4 İmmobilize α -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının PNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı

α -Galaktozidaz enziminin hidroliz çalışmaları substrat olarak p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (PNPG) ve rafinoz kullanılarak kesikli karıştırmalı batch sistemde Bölüm 2.10' da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Sistem PNPG için 37°C' de ve rafinoz için 50°C' de çalıştırıldı. Hidroliz hızının belirlenmesi için 52 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnek alınarak aktivite tayini yapıldı. Oluşan ürün konsantrasyonu p-nitrofenol ve rafinoz için çizilen standart grafikleri kullanılarak hesaplandı. Substratın dönüşümü, t anında tüketilen substratın oranı olarak $[X = (S_0 - S_t) / S_0]$ belirlendi. Substrat dönüşümü X, başlangıç ve t anındaki rezervardaki substrat konsantrasyonu ($S_0 - S_t$) ile ifade edilmiştir. Farklı zamanlarda ki X değerleri hesaplanarak % X ile t arasında çizilen grafikten % dönüşüm miktarı belirlendi.

PNPG için hazırlanan sistemde kesikli karıştırmalı tank reaktördeki substrat ve ürün konsantrasyonları Şekil 3.22 ve 3.23' de, PNPG' nin reaktördeki dönüşüm eğrisi ise Şekil 3.24' de verilmiştir. Dönüşüm eğrilerine bakıldığında kovalent immobilizasyon yöntemi ile Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzimin 7 saat sonunda substratın % 54' ünü, bu süre sonunda Sepabead EC-HA' da aynı yöntemle immobilize edilen enzimin substratın % 55' ini ve Sepabead EC-EP' de immobilize edilen enzimin ise substratın % 58' ini dönüşüme uğrattığı belirlenmiştir. Adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyonda ise Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzim 7 saatin sonunda substratın % 56' sını ve Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzim ise % 63' ünü dönüşüme uğrattır. 7 saatlik sürede enzimlerin hidroliz hızında belirgin bir farklanma olmadığı görülmüştür.

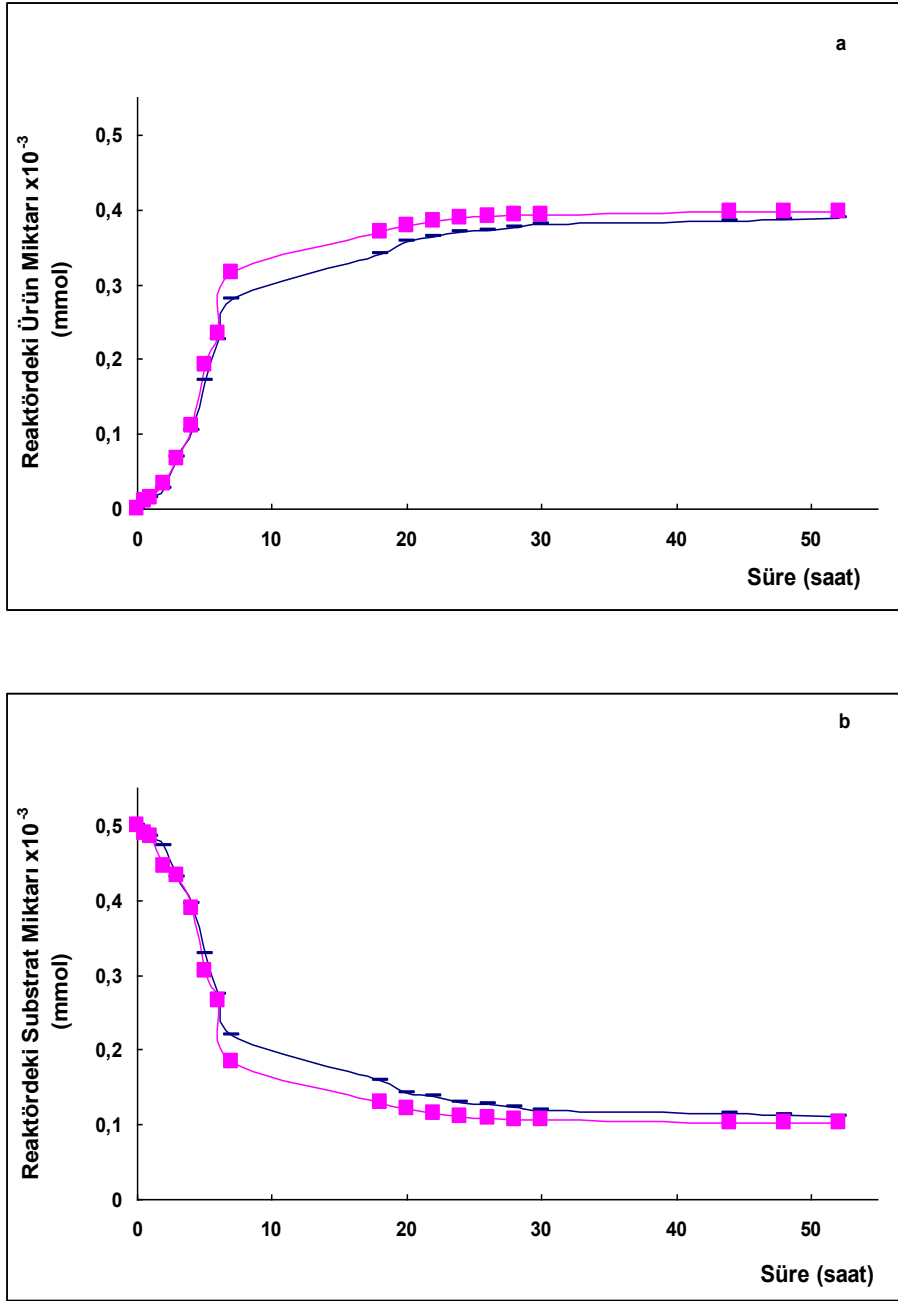


Şekil 3.22 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları.

(Substrat: PNPG, Sıcaklık: 37°C, PNPG C₀: 0,5 µmol)

Kovalent İmmobilize enzimler; Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■) ve Sepabead EC-EP (▲).

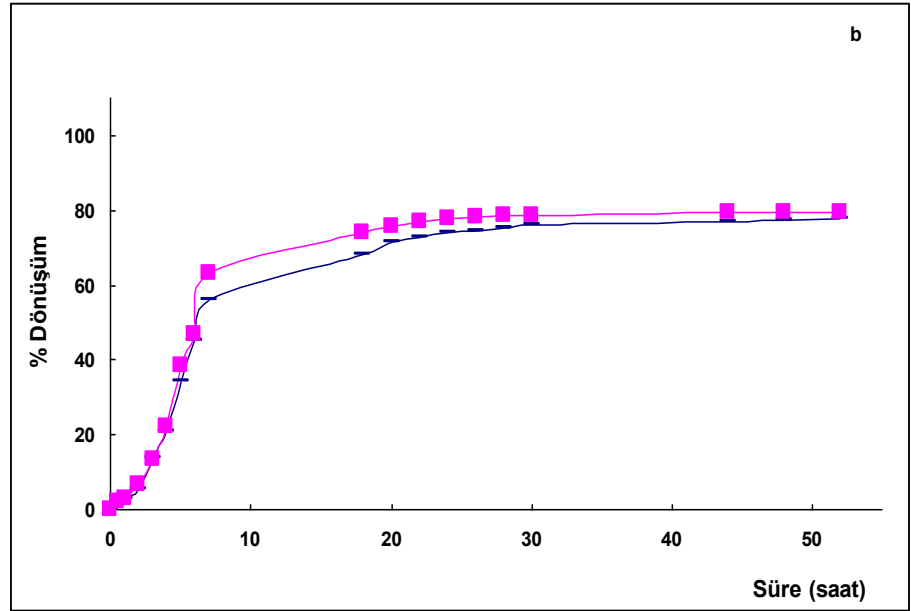
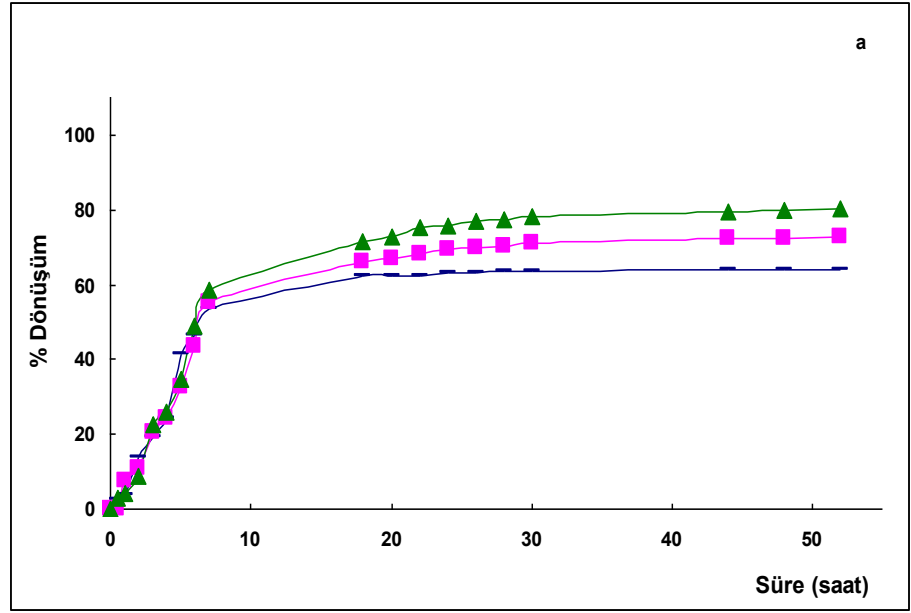


Şekil 3.23 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları.

(Substrat: PNPg, Sıcaklık: 37°C, PNPg C_0 : 0,5 μmol)

İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■).



Şekil 3.24 PNPg' nin kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki dönüşüm eğrisi.

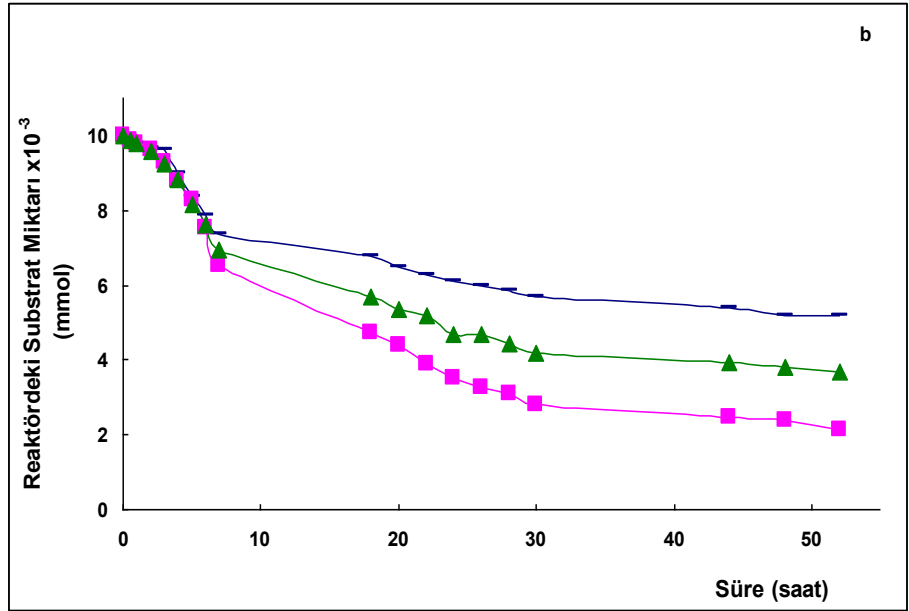
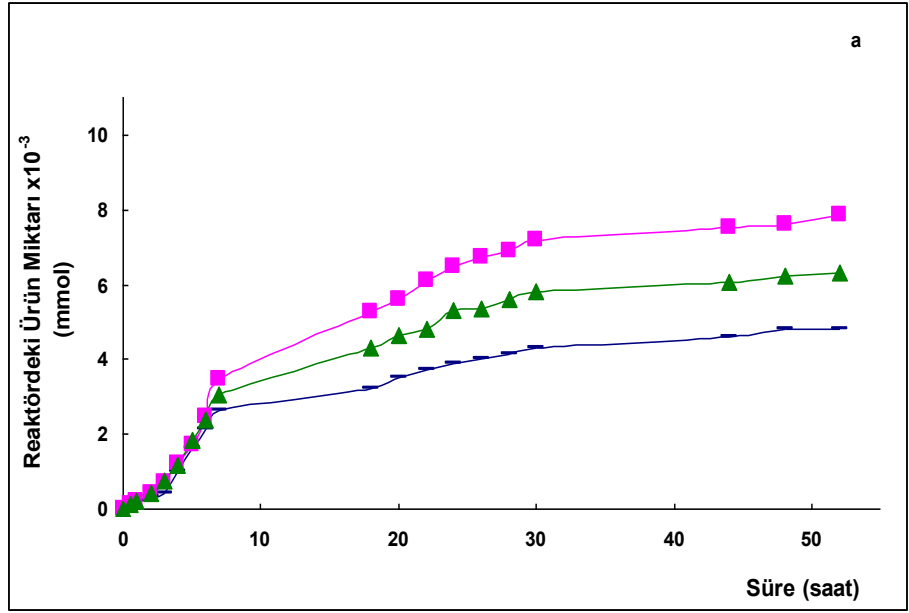
a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲).

b) İmmobilize enzimler (adsorbisyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA)(-),

Sepabead EC(HA-E-GA) (■).

Rafinoz için kurulan sistemde kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki substrat ve ürün konsantrasyonları Şekil 3.25 ve 3.26' da, rafinozun reaktördeki dönüşüm eğrisi ise Şekil 3.27' de verilmiştir. 50°C' de kurulan sistemlerde 7 saat sonunda immobilize enzimlerin dönüşüme uğrattığı rafinoz miktarları birbirine çok yakındır. Sistem 52 saat için kurulduğunda kovalent immobilizasyon yöntemi ile Sepabead EC-EA' da hazırlanan enzim bu sürenin sonunda substratın % 48' ini, Sepabead EC-HA' da hazırlanan enzim % 77' sini ve Sepabead EC-EP' de hazırlanan enzim substratın % 63' ünü dönüşüme uğratmıştır. 52 saatin sonunda Sepabead EC-EA' da adsorbsiyon ve çapraz bağlama ile immobilize edilen enzim rafinozun % 70' ni ve Sepabead EC-HA' da aynı yöntemle hazırlanan enzim substratın % 64' ünü dönüşüme uğratmıştır.

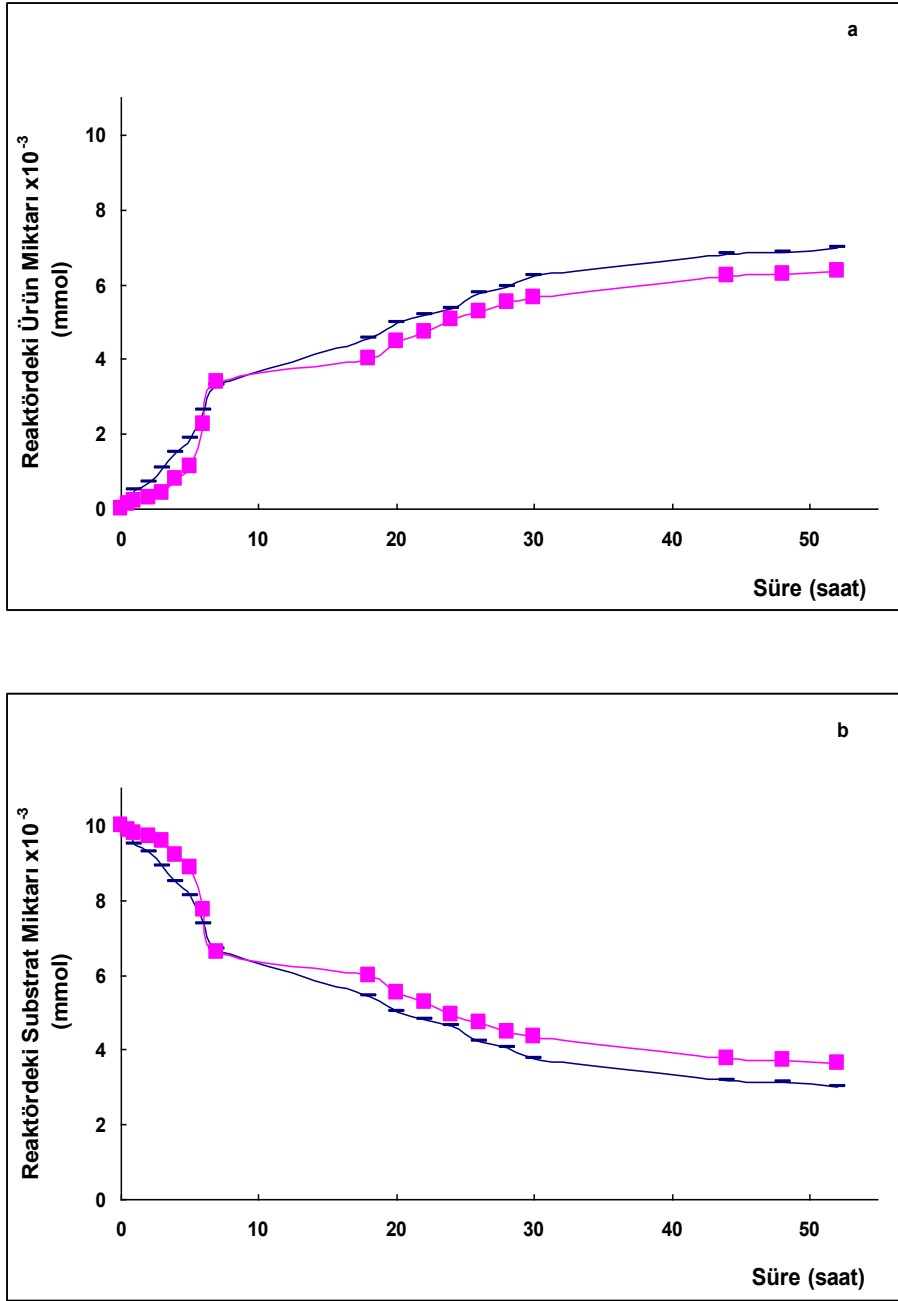


Şekil 3.25 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları.

(Substrat: Rafinoz, Sıcaklık: 50°C, Rafinoz C₀: 10 µmol)

İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲).

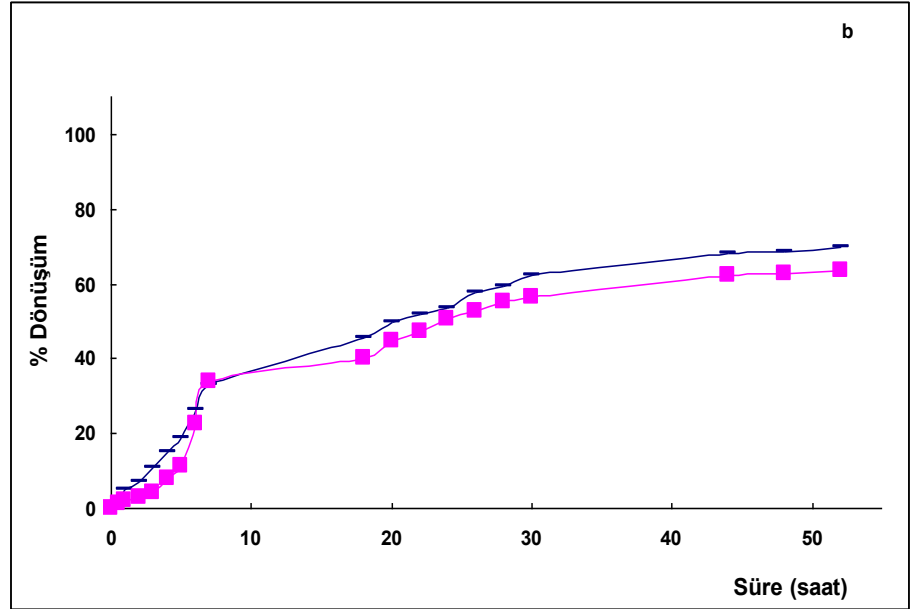
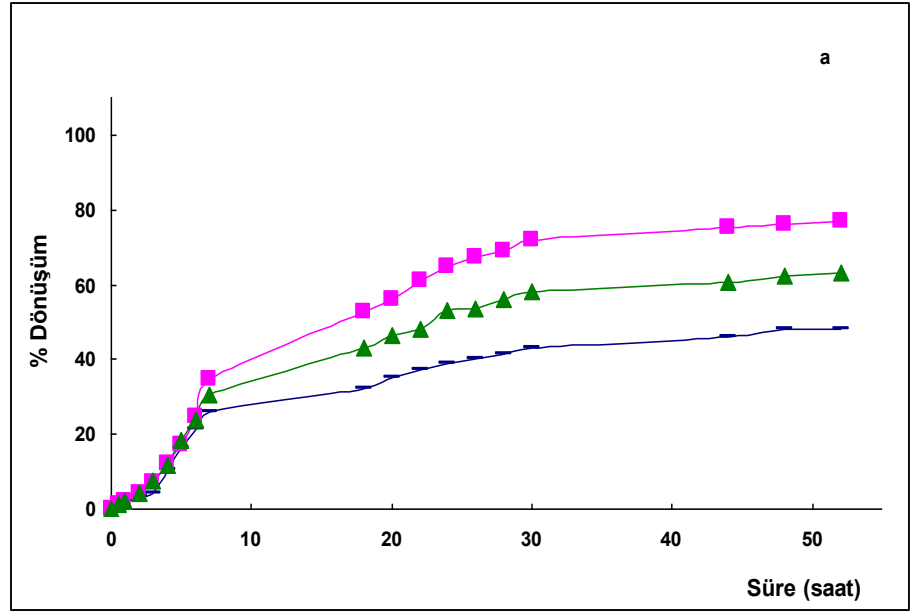


Şekil 3.26 Kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki ürün (a) ve substrat (b) miktarları.

(Substrat: Rafinoz, Sıcaklık: 50°C, Rafinoz C_0 : 10 μmol)

İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

SepabeadEC (HA-E-GA) (■).



Şekil 3.27 Rafinozun kesikli karıştırılmalı tank reaktördeki dönüşüm eğrisi.

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA)(-),

Sepabead EC(HA-E-GA) (■).

3.5 Soya Sütündeki Rafinoz ve Rafinoz Tip Oligosakkaritlerin Hidrolizi

3.5.1 Soya sütünde toplam oligosakkarit miktarının tayini

Bölüm 2.11.1' de belirtildiği gibi iki farklı yöntemle hazırlanan soya sütlerinde ve soya sütlerinin etanolle ekstrakte edilmiş formlarında fenol sülfirik asit yöntemi ile toplam oligosakkarit miktarı tayini gerçekleştirildi.

Mulimani ve Ramalingam (1995) tarafından önerilen, soya sütünün n-hegzanla yağlı kısımlarından ayrıldığı yöntemle hazırlanan soya sütünde fenol sülfirik asit yöntemi ile toplam oligosakkarit miktarı 54 mg/mL olarak belirlendi. Bu yöntemle ilave olarak etanol ekstraksiyonu uygulandığında belirlenen toplam oligosakkarit miktarı 8,12 mg/mL' dir. Literatürde n-hegzanlı ortamda hazırlanan ve etanol ekstraksiyonu yapılan soya sütünün 5,74 mg/mL toplam oligosakkarit içerdiği belirtilmiştir (Prashanth and Mulimani, 2005).

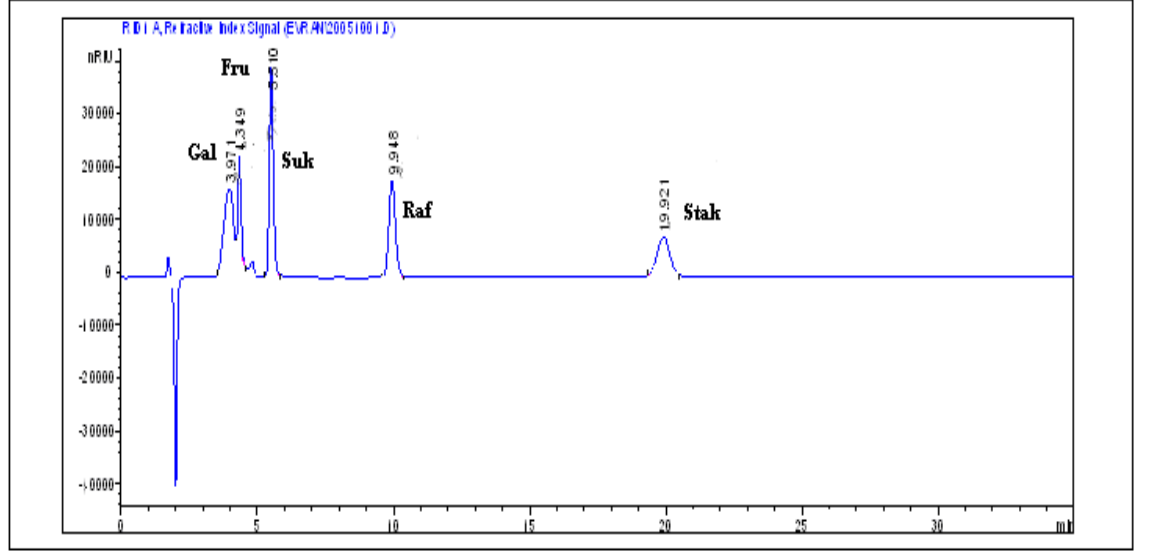
Guimaraes ve arkadaşlarının (2001) önerdiği yöntemle göre n-hegzan içermeyen sulu sistemde hazırlanan soya sütünde toplam oligosakkarit miktarı 16,23 mg/mL olarak bulunmuştur. Etanol ekstraksiyonu sonucu bulunan toplam oligosakkarit miktarı 1,34 mg/mL' dir.

Dört farklı şekilde hazırlanan soya sütleri HPLC' ye uygulandığında en iyi karbohidrat ayrımı n-hegzan ile yağlı kısımları uzaklaştırılan soya sütünde görülmüş ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinin bu örnekte yapılmasına karar verilmiştir.

3.5.2 HPLC ile rafinoz tip oligosakkaritlerin ayrımı ve hidroliz derecelerinin belirlenmesi

Optimize edilen koşullarda hazırlanan immobilize enzim preparatlarının soya sütü hidrolizinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Öncelikle refraktif indeks dedektör (RID) kullanılarak HPLC ile karbohidratların (galaktoz, fruktoz, sukroz, rafinoz, stakiyöz) doğrusal tayin aralıkları ve alıkonma süreleri belirlendi (Şekil 3.28). Ayırma işlemleri sırasında akış hızı 1,0 mL/dak ve kolon sıcaklığı 35 °C

olarak kullanıldı. Mobil faz 25:75 oranında su:asetonitril içermektedir. HPLC ile ayırım sonrasında kolondan sırasıyla galaktoz, fruktoz, sükroz, rafinoz ve stakiyöz elüe olmaktadır (Şekil 3.28).

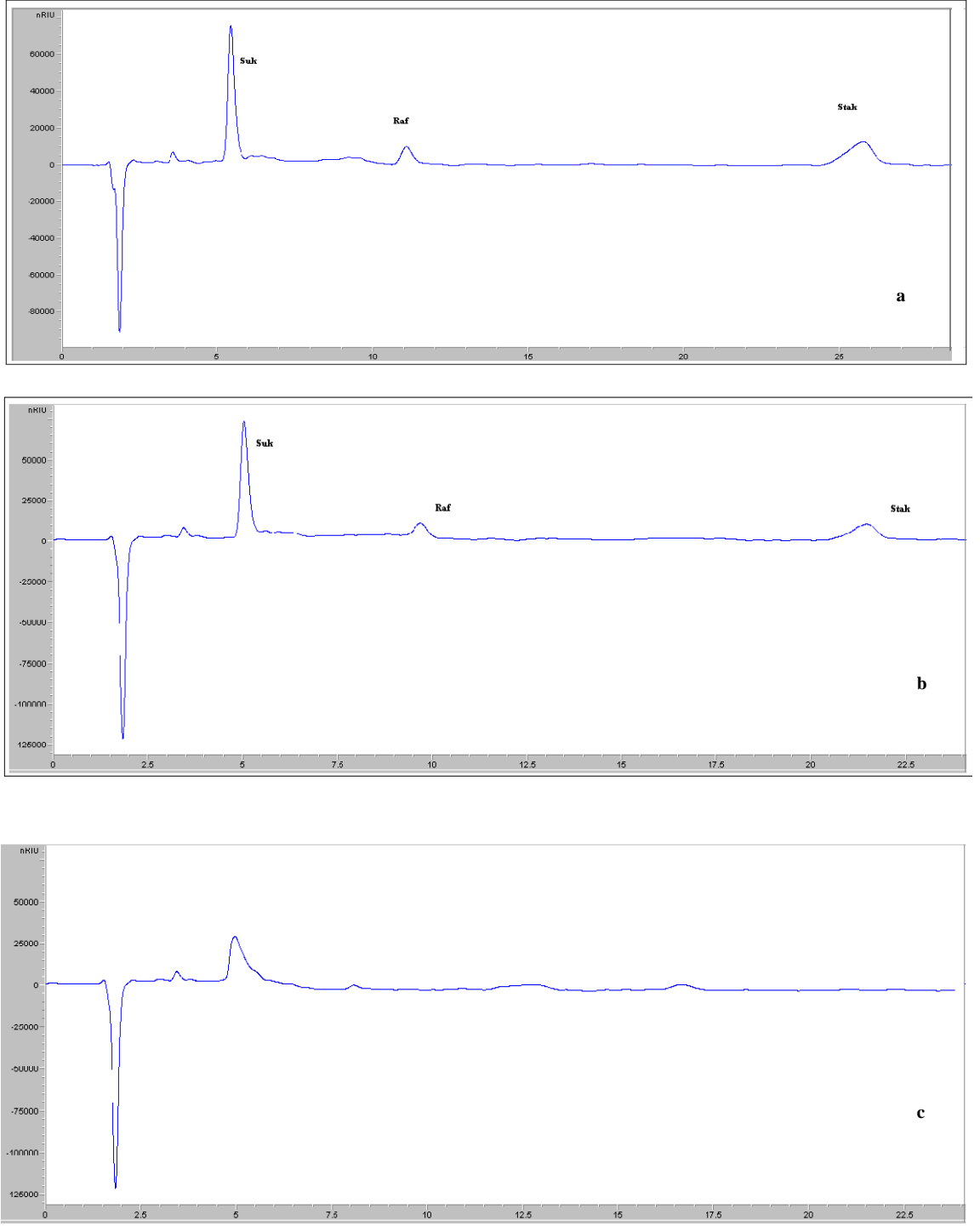


Şekil 3.28 Karbohidratların RID ile analizine yönelik kromatogram [Karbohidrat konsantrasyonu 1,5 mM, Kolon: NH₂ hypersil, Akış hızı: 1,0 mL/dakika; Kolon sıcaklığı 35 °C, Mobil faz: asetonitril: su 75:25 (v/v)].

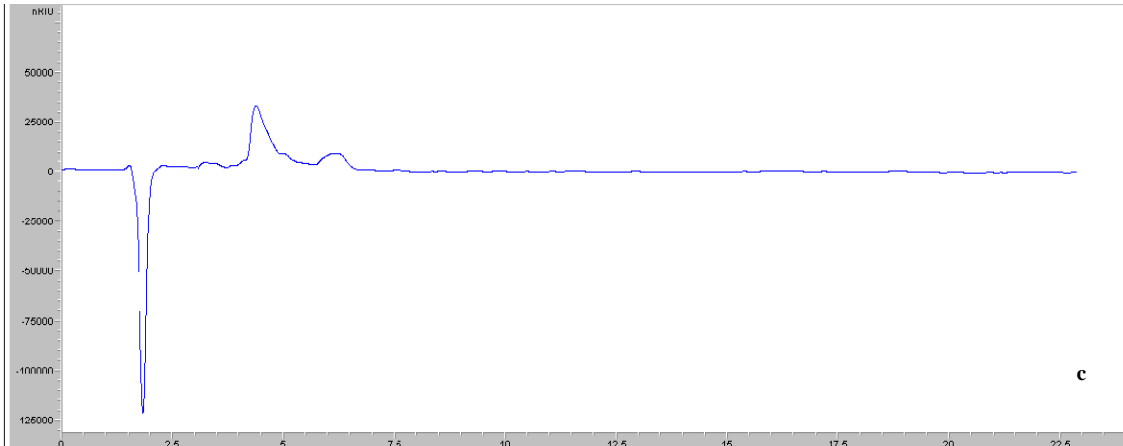
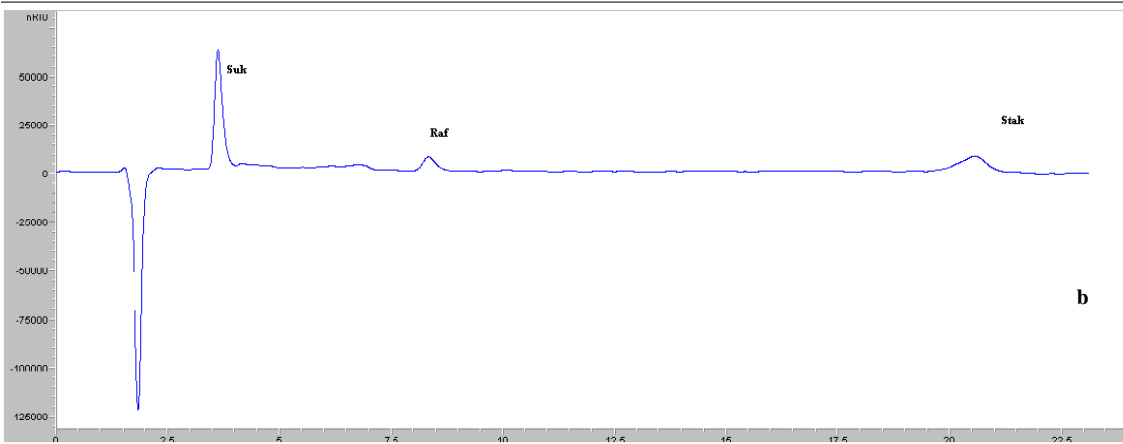
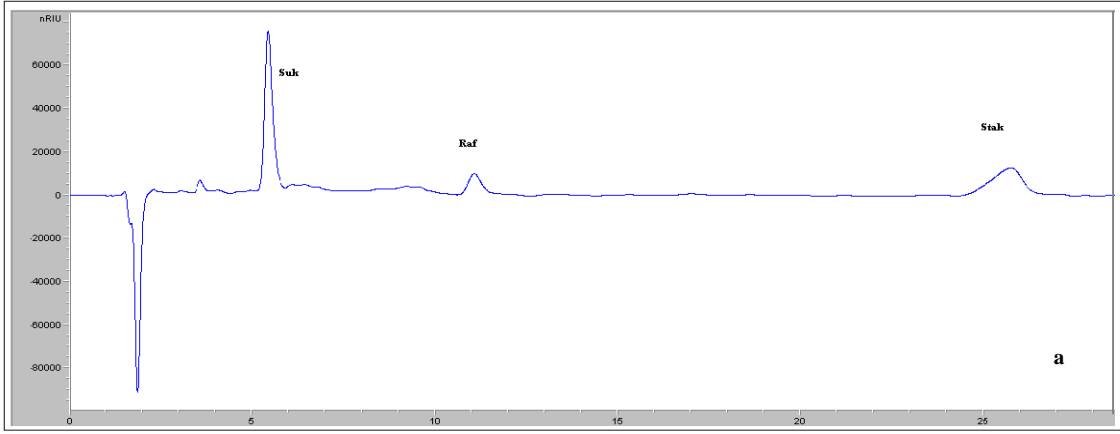
Çizelge 3.32 Karbohidratların kolonda alıkonma süreleri.

Karbohidrat	Alıkonma Süresi (dak)
Galaktoz	3.971
Fruktoz	4.349
Sükroz	5.510
Rafinoz	9.48
Stakiyöz	19.921

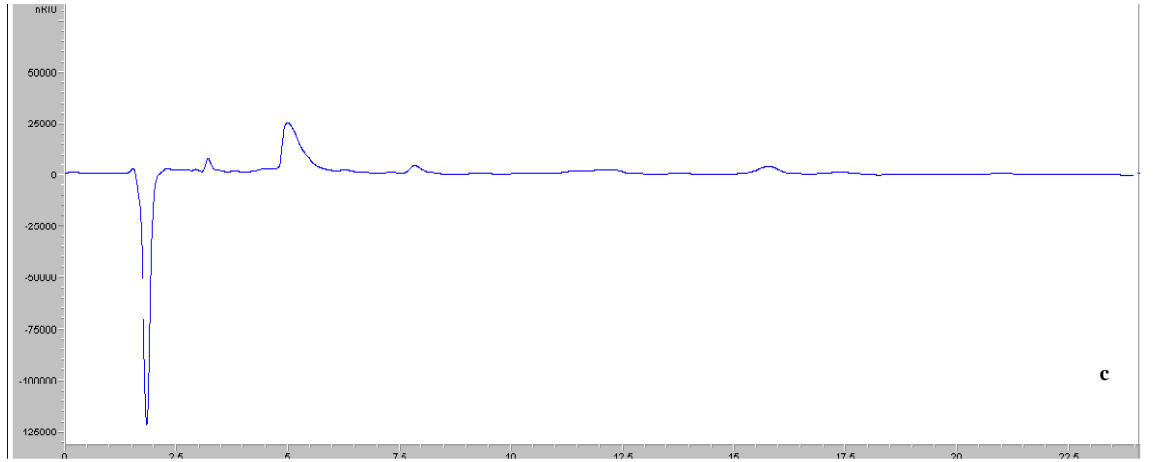
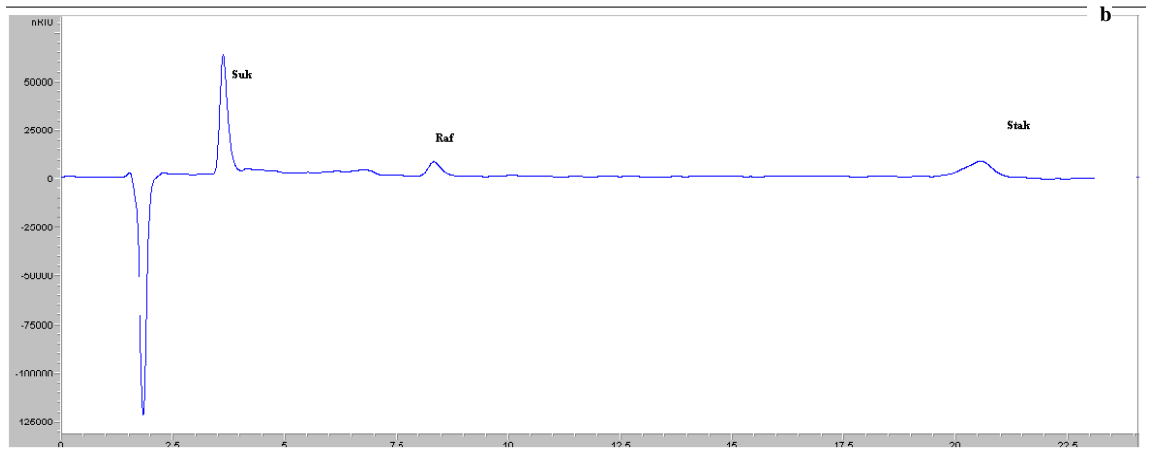
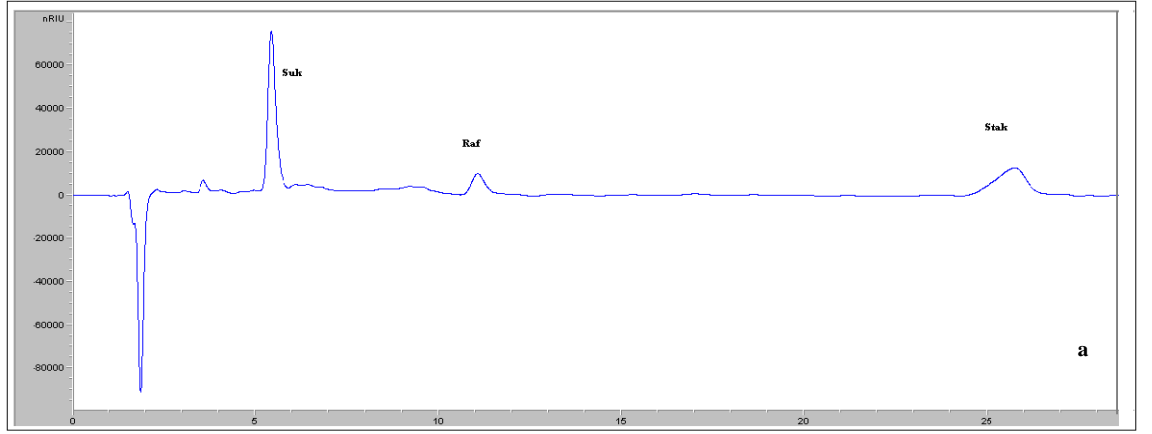
Hidroliz reaksiyonları Bölüm 2.11.3' de belirtildiği gibi kesikli karıştırmalı sistemde 50°C' de 200 rpm' de çalkalama yapılarak inkübatörde gerçekleştirildi. Soya sütü ve enzimatik hidroliz sonrası örnekler HPLC-RID sistemine uygulanarak hazırlanan enzim preparatları ile soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizlenebilirliği araştırıldı. Oligosakkaritlerin hidrolizine ait kromatogramlar Şekil 3.29-3.33' de verilmiştir.



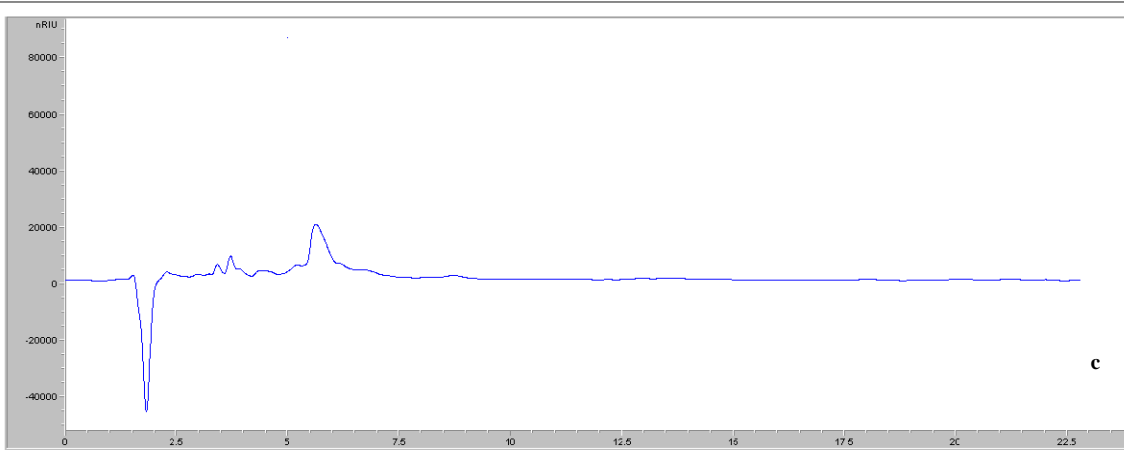
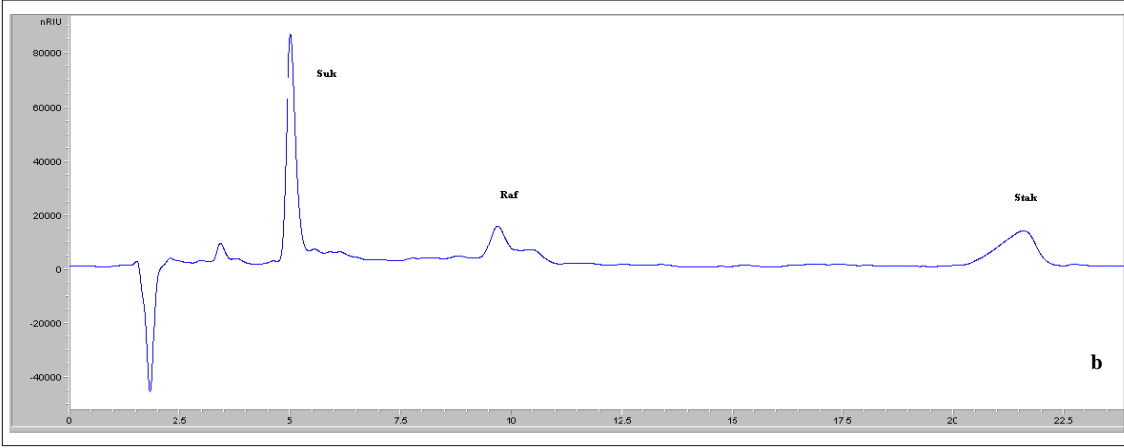
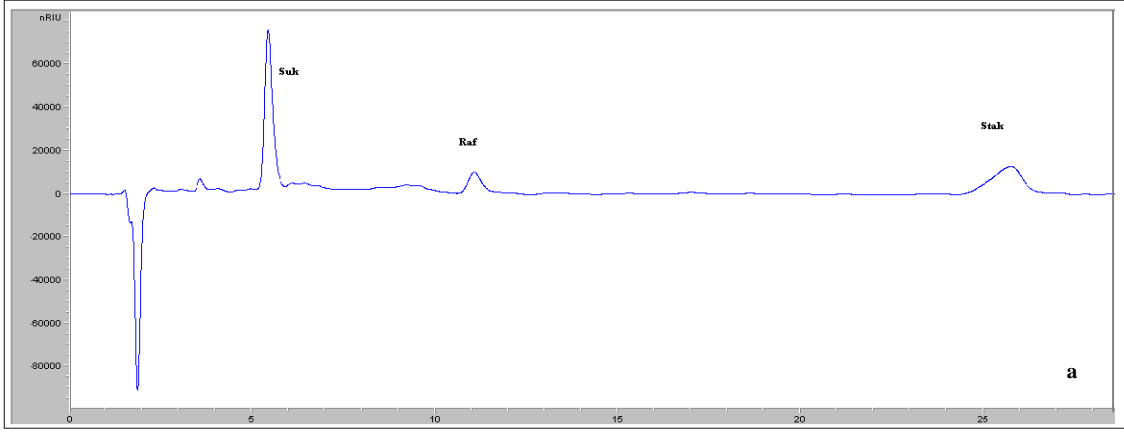
Şekil 3.29 Soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC (EA-GA-E) ile hidrolizine ait kromatogram **a)** Soya sütü α -galaktozidaz muamelesi öncesi **b)** Sepabead EC (EA-GA-E) ile muamele 0. an **c)** Sepabead EC (EA-GA-E) ile muamele 24 saat.



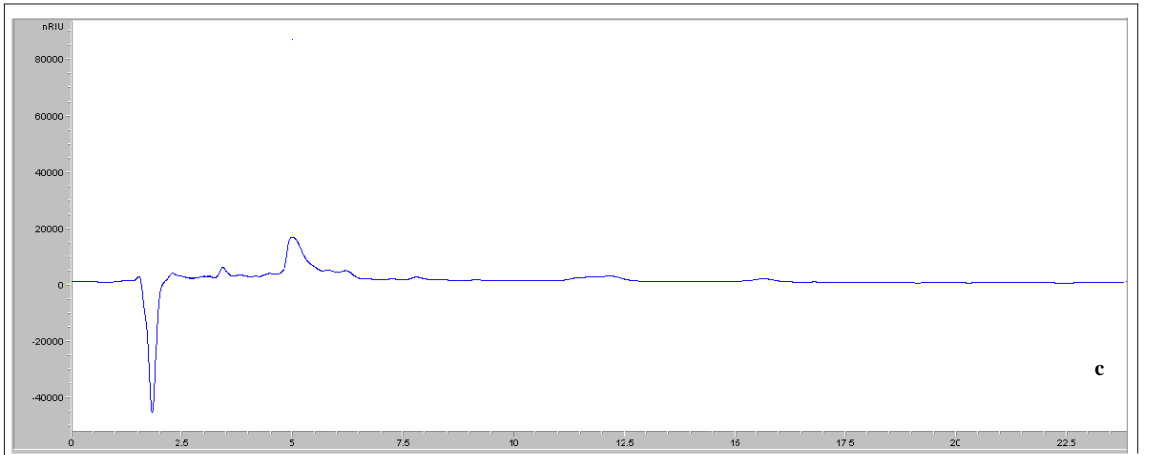
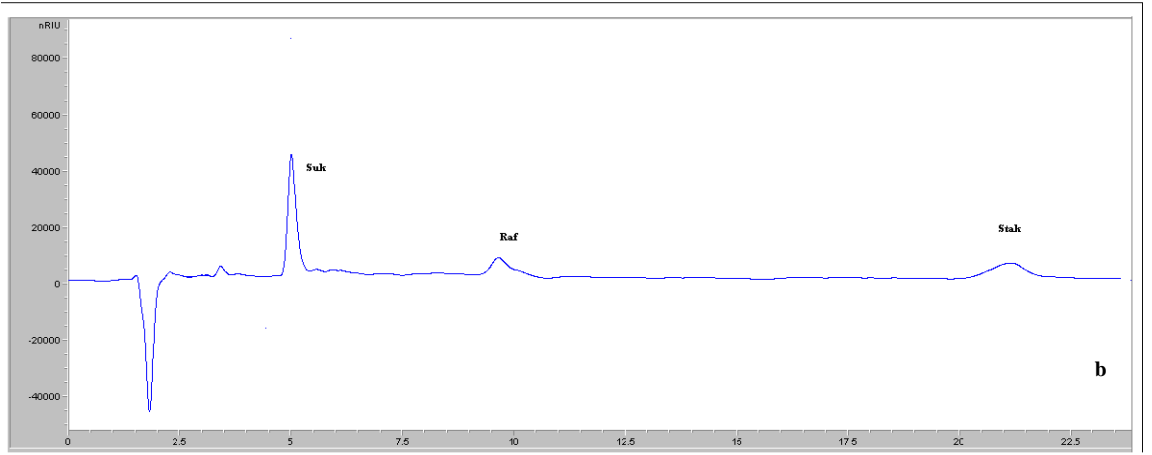
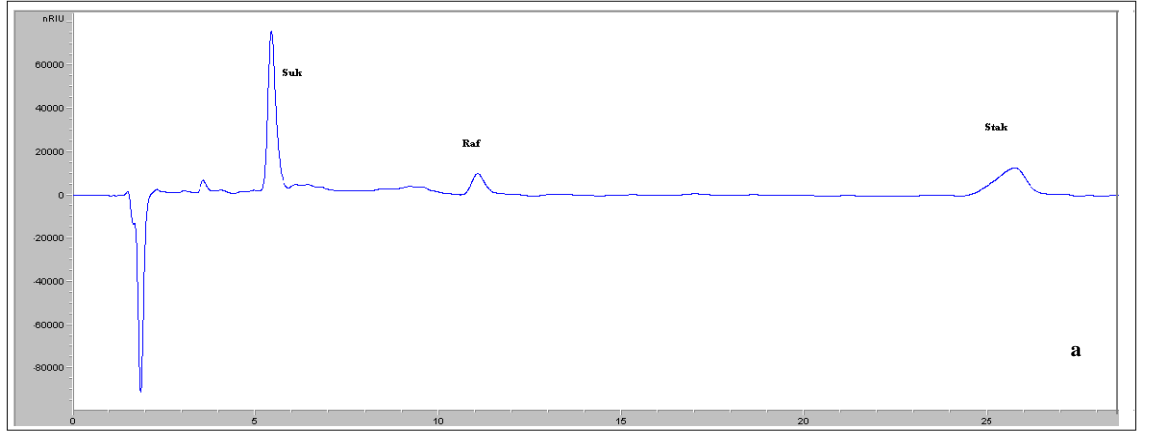
Şekil 3.30 Soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC (HA-GA-E) ile hidrolizine ait kromatogram **a)** Soya sütü α -galaktozidaz muamelesi öncesi **b)** Sepabead EC (HA-GA-E) ile muamele 0. an **c)** Sepabead EC (HA-GA-E) ile muamele 24 saat.



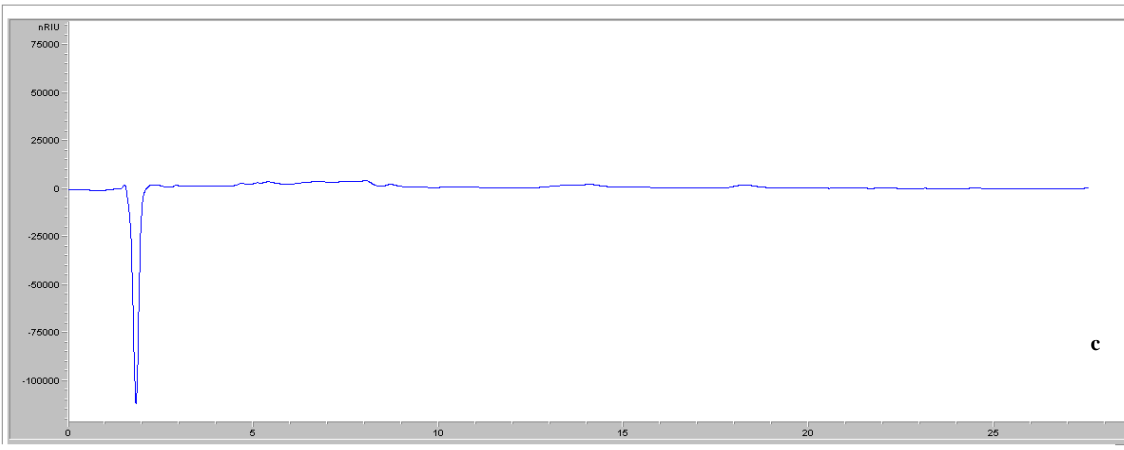
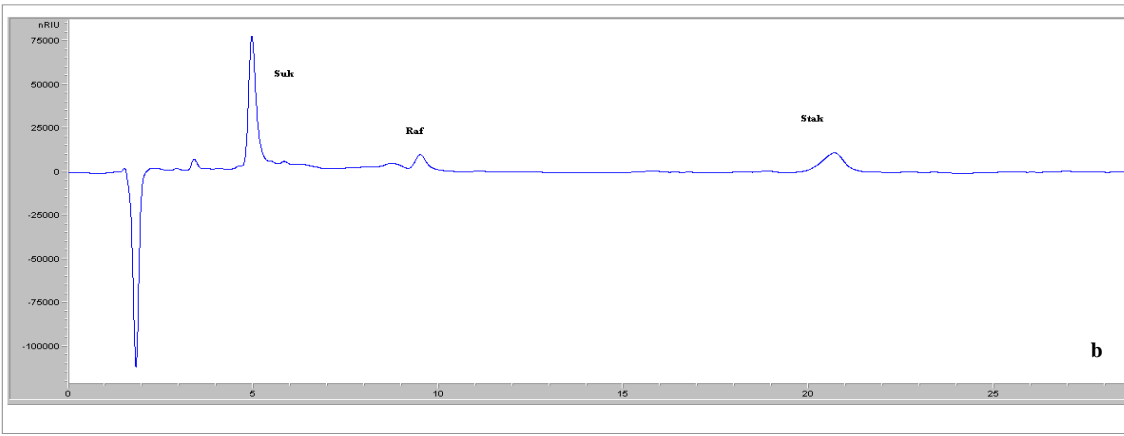
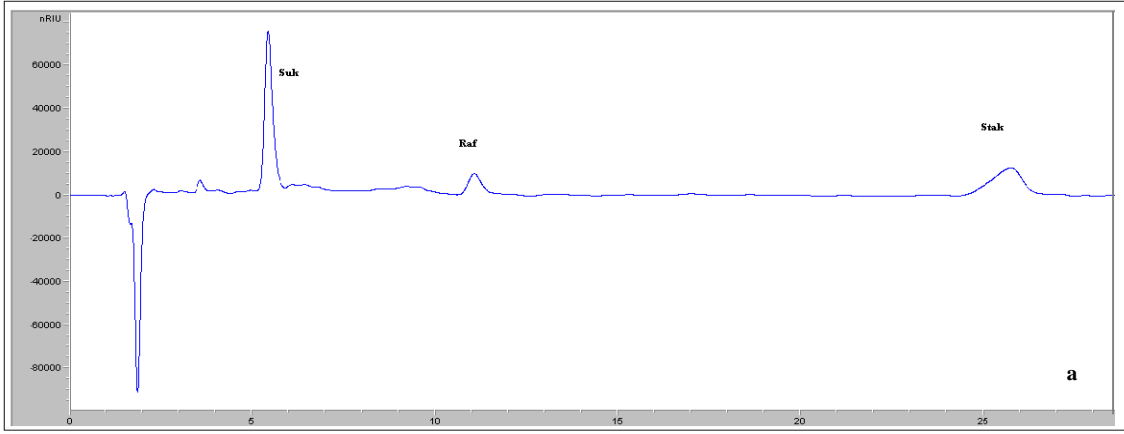
Şekil 3.31 Soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC-EP ile hidrolizine ait kromatogram **a)** Soya sütü α -galatozidaz muamelesi öncesi **b)** Sepabead EC-EP ile muamele 0. an **c)** Sepabead EC-EP ile muamele 24 saat.



Şekil 3.32 Soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC (EA-E-GA) ile hidrolizine ait kromatogram **a)** Soya sütü α -galatozidaz muamelesi öncesi **b)** Sepabead EC (EA-E-GA) ile muamele 0. a n **c)** Sepabead EC (EA-E-GA) ile muamele 24 saat.



Şekil 3.33 Soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin Sepabead EC (HA-E-GA) ile hidrolizlenmesine ait kromatogram **a)** Soya sütü α -galatozidaz muamelesi öncesi **b)** Sepabead EC (HA-E-GA) ile muamele 0. an **c)** Sepabead EC (HA-E-GA) ile muamele 24 saat.

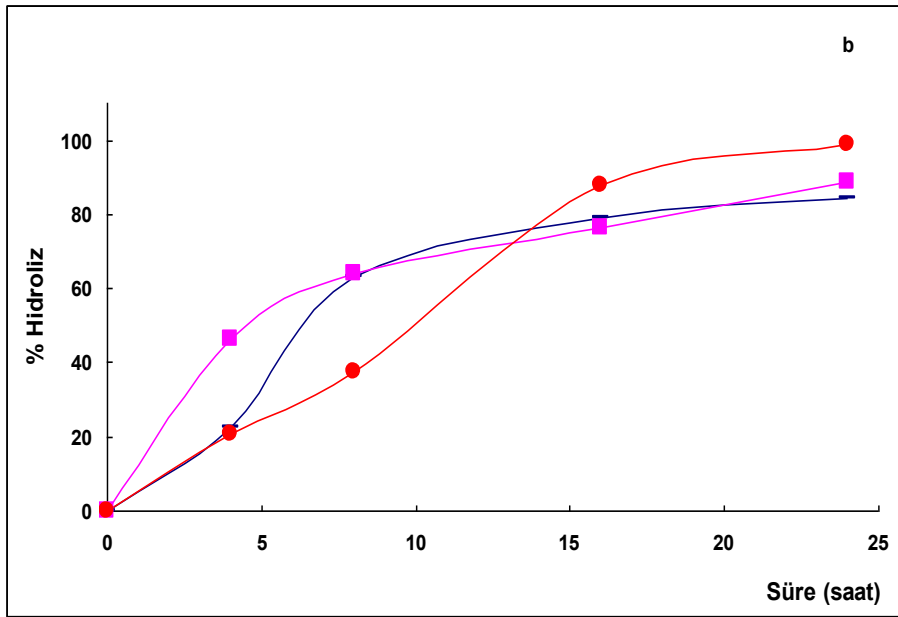
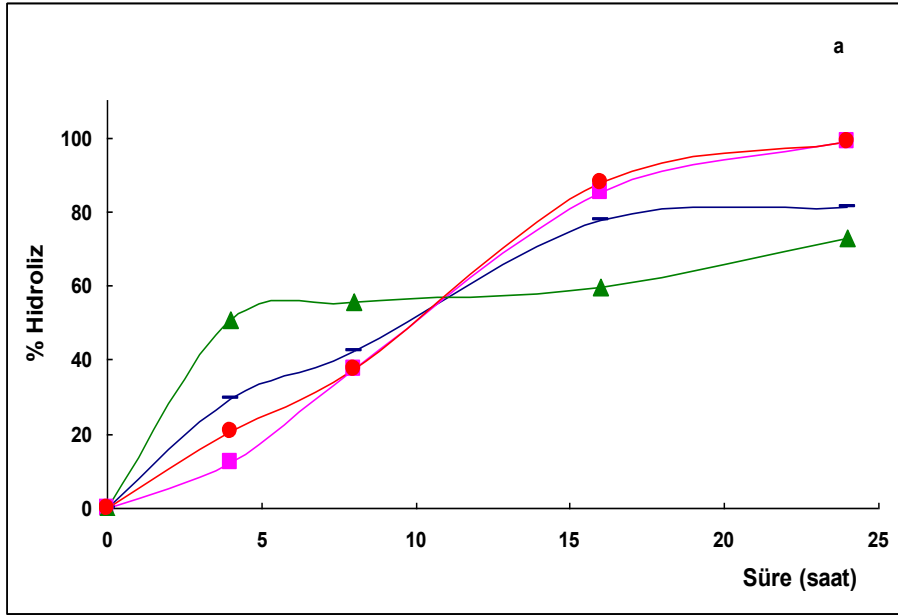


Şekil 3.34 Soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin serbest α -galaktozidaz enzimi ile hidrolizine ait kromatogram **a)** soya sütü α -galaktozidaz muamelesi öncesi **b)** serbest α -galaktozidaz enzimi ile muamele 0.an **c)** serbest α -galaktozidaz enzimi ile muamele 24 saat.

Şekil 3.29, 3.30 ve 3.31' de sırasıyla Sepabead EC-EA, EC-HA ve EC-EP' de kovalent immobilizasyon olarak immobilize edilen α -galaktozidazlarla soya sütündeki rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizine ait kromatogramlar verilmiştir. Bu kromatogramlardan yola çıkılarak immobilize enzimler ile soya sütündeki rafinoz ve stakiozun hidroliz dereceleri belirlenmiştir (Şekil 3.35a ve 3.36a). Adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilen edilen α -galaktozidazlara ait kromatogramlar Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA için sırasıyla Şekil 3.32 ve Şekil 3.33' de ve hidroliz derecelerine ait sonuçlar ise rafinoz için Şekil 3.35b ve stakioz için Şekil 3.36b' de verilmiştir. Immobilize enzim preparatları ile serbest enzimin hidroliz dereceleri kıyaslanmıştır. Şekil 3.35 ve Şekil 3.36' dan görüldüğü gibi stakioz tüm immobilize enzim preparatlarınca rafinoza kıyasla daha fazla oranda dönüşüme uğratılmıştır. Hidroliz sonrası ortamda, stakiozun rafinozdan daha fazla kalmasının nedeni stakiozun degradasyonu ile oluşan rafinozdur (Viana et al, 2006; de Souza Junior et al., 2007).

Serbest enzim genel olarak rafinoz tip oligosakkaritleri immobilize enzimlere kıyasla daha iyi hidrolizlemiştir. Bunun nedeni, immobilize enzimlerin karşılaştığı difüzyon problemi olabilir. Difüzyonel limitasyonlar, substratın immobilizasyon matriksine bir direnç ya da ürünün dışarı difüzyonuna karşı bir direnç olarak karşımıza çıkabilir. Literatürde α -galaktozidazın jelatin ve κ -karajenanda immobilize edildiği çalışmalarda da benzer sorunla karşılaşmıştır (Girigowda and Mulimani, 2006; Naganagouda and Mulimani, 2006; Naganagouda et al., 2007). Ancak serbest enzimin tekrar kullanım olanağı olmadığı için endüstride kullanımı ekonomik açıdan bir yarar sağlamamaktadır.

Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzimler Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzimlere kıyasla rafinoz tip oligosakkaritleri daha yüksek oranda hidrolizlemiştir. Sepabead EC-HA sahip olduğu uzun fonksiyonel kol ile substratlarla daha iyi etkileşebilmektedir.



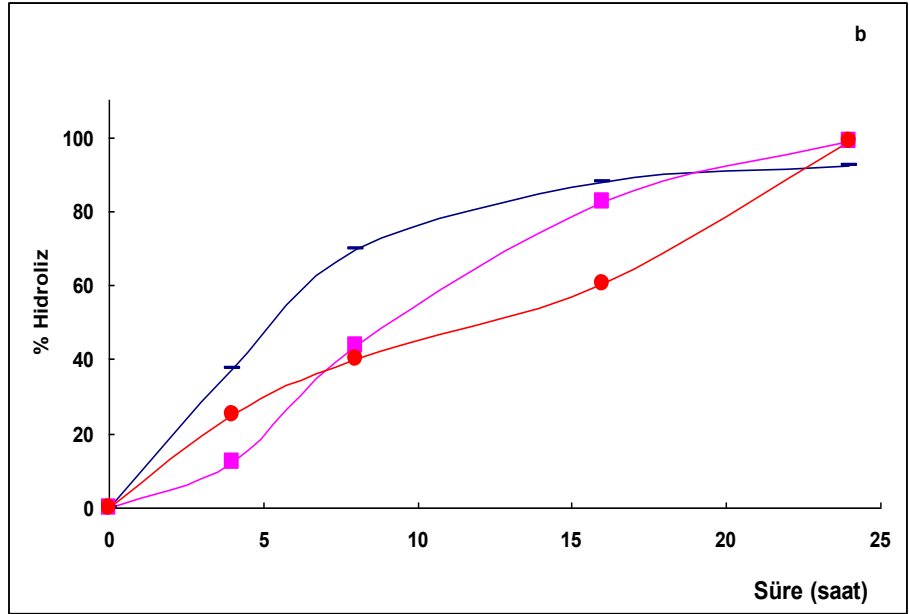
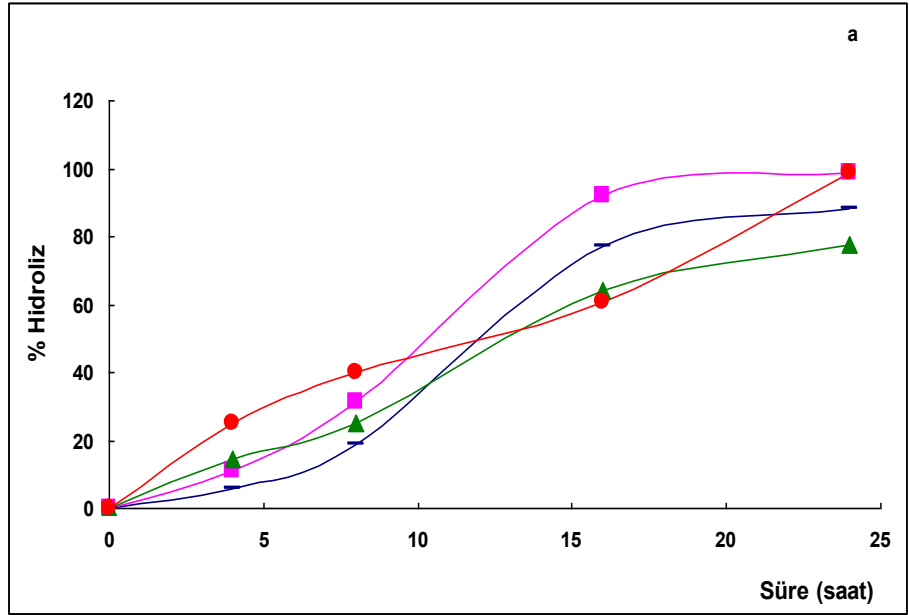
Şekil 3.35 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki rafinozun hidrolizi.

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorpsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA) (-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).



Şekil 3.36 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimleri ile soya sütündeki stakiyozun hidrolizi.

a) İmmobilize enzimler (kovalent); Sepabead EC (EA-GA-E) (-),

Sepabead EC (HA-GA-E) (■), Sepabead EC-EP (▲) ve Serbest enzim (●).

b) İmmobilize enzimler (adsorbsiyon ve çapraz bağlama); Sepabead EC (EA-E-GA)(-),

Sepabead EC (HA-E-GA) (■) ve Serbest enzim (●).

Serbest ve tüm immobilize enzim preparatları ile 16 saatin sonunda ortamdaki rafinoz tip oligosakkaritlerin yaklaşık % 80' inden fazlası hidrolizlenmiştir. Hazırlanan immobilize enzimler yüksek termal kararlılıkları, hidroliz yetenekleri ve tekrar kullanılabilirlikleri ile özellikle gıda proseslerinden şeker endüstrisinde ve soya işleme proseslerinde kullanım olanağına sahiptirler.

Soya ve soya ürünleri, yüksek protein içerikleri ve dengeli amino asit dağılımından dolayı diğer protein kaynaklarına kıyasla mükemmel besin değerine sahiptirler. Soya proteinleri önerilen düzeyde alındıklarında biyolojik ihtiyacı karşılayacak düzeyde tüm esansiyel amino asitleri içerirler. Ancak, soya ve soya ürünlerinin içeriğinde bulunan sindirilemeyen oligosakkaritler olarak adlandırılan α -galaktozidazlar (rafinoz ve stakiyoz gibi) nedeniyle insanlar tarafından tüketimi oldukça sınırlıdır. Bu oligosakkaritler geleneksel soya işleme prosesleri ile elimine edilememektedir. Rafinoz (galaktoz- α -1,6-sukroz) galaktozun α -1,6 glikozidik bağla glukoz ve fruktoza bağlanmasıyla oluşmuş bir trisakkarittir. Stakiyoz (galaktoz- α -1,6-rafinoz) iki mol galaktoz artığının α -1,6 glikozidik bağla glukoz ve fruktoza bağlanmasıyla oluşmuş bir tetrasakkarittir. Memelilerin çoğu α -1,6-bağlı şekerleri hidrolizlemek için gereken pankreatik α -galaktozidaz enzimine sahip olmadıklarından ince barsakta bu oligosakkaritlerin hidrolitik olarak parçalanması oldukça düşük düzeydedir. İnsanlarda, sindirilemeyen bu oligosakkaritler kalın barsakta metabolize edilirler ve çok yüksek oranda gaz oluşur. Bu da, hassas kişilerde çeşitli gastrointestinal sorunlara yol açar. Rafinoz ve stakiyozda galaktozun bağlandığı α -1,6 glikozidik bağlar α -galaktozidaz enzimi ile kolaylıkla hidrolizlenebilmektedir (Rajan and Nair, 2010; Naganagouda and Mulimani, 2006; Yoon and Hwang, 2008).

Soya sütü, proteince zengin olması ve dengeli amino asit içeriğine sahip olması nedeniyle laktoz intolerant kişiler için inek sütüne bir alternatiftir. Soya sütünün izoflavonlar ve progesteron içermesinden dolayı bazı kanser türlerini önlediği, osteoporoz ve ateroskleroza engellediğini belirten çeşitli çalışmalar literatürlerde mevcuttur (Jacobsen et al., 1998; Goldwyn et al., 2000). Soya sütünün besin değeri ve tüketici tarafından kabul edilebilirliği α -galaktozidaz enzimi ile bileşimindeki oligosakkaritlerin seçimli olarak monosakkaritlerine

hidroliziyle arttırılabilmektedir (Gote et al., 2004; Prashanth and Mulimani, 2005; Naganagouda et al., 2006; Cowan and Fernandez-Lafuente, 2011).

Rajan ve Nair (2010) tarafından yapılan bir çalışmada α -galaktozidaz enzimi yer fıstığından izole edilerek kısmi olarak saflaştırılmış ve enzim aljinatta tutuklama ile immobilize edilmiştir. Immobilize enzim batch ve dolgulu-yatak reaktörlerinde soyadaki rafinoz ve stakiyozun hidrolizinde 50°C’ de kullanılmıştır. Bu çalışmada batch sistem ile 12 saatin sonunda soya sütündeki oligosakkaritler serbest enzim tarafından % 97 ve immobilize enzim tarafından % 96 oranında hidrolizlenmiştir.

Aspergillus oryzae kaynaklı α -galaktozidazın aljinatta tutuklama ile immobilize edildiği ve soya sütü şekerlerinin hidrolizinde kullanıldığı bir başka çalışmada 50°C’ de 12 saat sonunda serbest enzimle % 93 ve immobilize enzimle % 81 oranında hidroliz gerçekleştiği belirtilmiştir (Prashanth and Mulimani, 2005).

Thanankul ve arkadaşlarının (1976) yaptığı bir çalışmada *Mortierella vinacea*’ dan hazırlanan α -galaktozidaz enzimi poliakrilamid jelde tutuklama ile immobilize edilmiş ve immobilize enzim batch sistemde % 50 oranında ve akışkan yatak reaktörde % 60 oranında rafinoz tip şekerleri hidrolizleyebilmiştir.

Thippeswamy ve Mulimani (2002) akışkan yatak reaktörde soya sütü oligosakkaritlerinin % 83,9’ unu hidrolizleyebilmiştir. Kitosan küreler ve Amberlite MB 150’ de α -galaktozidaz enzimi % 62 ve % 51 immobilizasyon etkinliği ile immobilize edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize enzimler soya sütündeki rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanılmıştır. 8 saatin sonunda serbest enzim, kitosanda immobilize enzim ve Amberlite’ de immobilize enzim sırasıyla % 81, % 70 ve % 60 oranında şekerleri hidrolizleyebilmiştir. Bu çalışmada da immobilize enzime kıyasla serbest enzimle daha yüksek hidroliz oranları elde edilmiş ve bunun difüzyonel limitasyondan kaynaklandığı belirtilmiştir (Singh and Kayastha, 2012).

Kalsiyum aljinatta immobilize edilen *Debaryomyces hansenii* hücreleri ile soya sütündeki galaktooligosakkaritlerin hidrolizi gerçekleştirilmiştir. 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda soya sütündeki rafinoz % 25,7 ve stakiyoz % 93,23 oranında hidrolizlenirken 6 saatin sonunda bu oranın her iki şeker için % 100 olduğu belirlenmiştir (Junior et al., 2009). Viana ve arkadaşlarının *D. hansenii* α -galaktozidazı ile yaptığı bir çalışmada 6 saat sonunda soya sütündeki rafinozun % 70' i ve stakiyozun % 100' ü hidrolizlenmiştir (Viana et al., 2007).

4. GENEL DEĞERLENDİRME

α -Galaktozidaz enzimi (α -D- galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) şeker endüstrisi başta olmak üzere kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde ve medikal alanda oldukça önemli uygulama alanlarına sahip enzimlerdir.

Bu çalışmada, α -galaktozidaz enzimi önce karpuzdan (*Citrullus vulgaris*) kısmi olarak saflaştırıldı ve ardından Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda (EC-EP, EC-EA ve EC-HA) kovalent bağlama, adsorbsiyon ve çapraz bağlama teknikleri kullanılarak immobilize edildi. Her bir immobilizasyon protokolünün optimizasyonu için immobilizasyona çeşitli parametrelerin etkisi incelendi.

Çizelge 3.33 Sepabead EC- serisi taşıyıcılarda α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için belirlenen optimum koşullar.

Parametre	Sepabead EC-EA (kovalent)	Sepabead EC-HA (kovalent)	Sepabead EC-EP (kovalent)	Sepabead EC-EA (adsorbsiyon)	Sepabead EC-HA (adsorbsiyon)
Önaktivasyon: GA Konsantrasyonu	% 0,01 (v/v)	% 0,02 (v/v)	-	-	-
Önaktivasyon: Tampon türü/pH	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	-	-	-
İmmobilizasyon: Protein miktarı	0,5mg	0,25 mg	1mg	1mg	0,5 mg
İmmobilizasyon: Tampon türü/pH	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat 0,25 M pH 6,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5
İmmobilizasyon: Tampon türü/pH	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 7,0	Sitrat 50 mM pH 6,0	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5	Sitrat-fosfat 20 mM, pH 6,5
Çapraz Bağlama: GA Konsantrasyonu	-	-	-	% 0,001 (v/v)	% 0,001 (v/v)
Çapraz Bağlama: Tampon türü/pH (bağlanma)	-	-	-	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0
Çapraz Bağlama: Tampon türü/pH (yıkama)	-	-	-	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0	Sodyum fosfat 20 mM pH 6,0

α -Galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EP' de optimize edilmiş koşullarda (0,25 M sodyum sitrat tamponu, pH 6,0, 1mg protein/g taşıyıcı) kovalent olarak % 55,9 spesifik aktivite ve % 50 aktivite verimi ile immobilize edildi.

Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarda da α -galaktozidaz enzimi optimize edilmiş koşullarda kovalent olarak sırasıyla % 58,7 ve % 38 spesifik aktivite verimi ile immobilize edildi.

α -Galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EA ve EC-HA' da adsorbsiyon yöntemi kullanılarak da immobilize edildi. Optimize edilen koşullar altında enzim Sepabead EC-EA' da % 42,9 ve EC-HA' da % 54,8 spesifik aktivite verimi ile immobilize edildi. Adsorblanan enzimlerin uygun glutaraldehid konsantrasyonları ile çapraz bağlanması sonrasında immobilize enzimler için EC-EA' da % 17,9 ve EC-HA' da % 31 spesifik aktivite verimi elde edildi

Sepabead EC-EP, EC-EA ve EC-HA' da optimize edilen koşullarda hazırlanan immobilize enzimlerden en iyi immobilizasyon etkinliği % 58,7 spesifik aktivite verimi ile Sepabead EC-EA' da ve % 55,9 spesifik aktivite verimi ile Sepabead EC-EP' de kovalent olarak immobilize edilen enzimler ile elde edildi.

Hazırlanan immobilize ve serbest enzimlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim aktivitesine etki eden bazı parametreler (pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, efektör konsantrasyonları) incelenerek kararlılık testleri (pH, termal, operasyonel ve depo kararlılığı) yapıldı. Bunların yanı sıra immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği de test edildi.

Çizelge 3.34 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyon sonuçları.

	Sepabead EC-EA (kovalent)	Sepabead EC-HA (kovalent)	Sepabead EC-EP (kovalent)	Sepabead EC-EA (ads+çb)	Sepabead EC-HA (ads+çb)	Serbest Enzim
Opt. pH	6,0	6,0	6,0	5,0	5,0	6,0
Opt. Sıcaklık	60	60	65	65	60	65
E_a (kJmol⁻¹)	37,87	44,48	28,80	27,33	27,78	24,74
[S] PNPG (mM)	1,75	1,75	1,75	1,25	1,25	1,75
K_m PNPG (mM)	0,292	0,159	0,779	0,278	0,260	0,346
V_{max} PNPG (U/mg)	0,197	0,299	0,252	0,328	0,281	1,28

Çizelge 3.34 Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyonu (devam).

	Sepabead EC-EA (kovalent)	Sepabead EC-HA (kovalent)	Sepabead EC-EP (kovalent)	Sepabead EC-EA (ads+çb)	Sepabead EC-HA (ads+çb)	Serbest Enzim
[S] Rafinoz (mM)	40	40	40	40	40	40
K_m Rafinoz (mM)	4,32	2,15	18,20	15,95	4,34	8,84
V_{max} Rafinoz (U/mg)	0,856	1,13	0,335	1,744	1,242	0,945
İnhibitör						
Galaktoz	6,34	13,31	28,71	17,74	14,38	9,80
Na ₂ CO ₃	45,96	33,11	84,39	88,15	81,98	62,08
pH Kararlılık	3,5-7,5	3,5-7,5	3,5-7,5	3,5-7,5	3,5-7,5	3,5-7,5
Termal						
Kararlılık (Sıcaklık 70°C)	69,22	46,92	63,68	59,3	51,7	10,28
Termal						
Kararlılık (120 dak., 37°C)	82,64	83,87	78,74	87,43	80,99	69,88
Termal						
Kararlılık (120 dak., 50°C)	73,18	72,04	71,06	80,66	75,44	63,82
Depo						
Kararlılığı (8 ay)	54	51	66	71	67	46
$t_{1/2}$ (PNPG)	24,16	27,18	36,67	32,08	24,40	-
k_D (PNPG)	0,0287	0,0255	0,0189	0,0216	0,0284	-
Operasyonel						
Kararlılık (PNPG, 30 saat)	29	39	58	51	42	-
$t_{1/2}$ (Rafinoz)	20,20	18,58	25,96	19,25	15,82	-
k_D (Rafinoz)	0,0343	0,0373	0,0267	0,0360	0,0438	-
Operasyonel						
Kararlılık (Rafinoz, 30 saat)	30	31	41	34	27	-
Tekrar						
Kullanılabilirlik (PNPG, 25 kez)	30	34	55	43	40	-
Tekrar						
Kullanılabilirlik (Rafinoz, 18 kez)	52	44	74	63	57	-
PNPG Hidrolizi (7 saat)	54	55	58	56	63	-
Rafinoz						
Hidrolizi (52 saat)	48	77	63	70	64	-
Soya Sütünde						
Hidroliz (Rafinoz, 24 sa.)	81,07	100	72,74	84,42	88,59	100
Soya Sütünde						
Hidroliz (Stakiyoz, 24 sa.)	88,43	100	77,53	92,28	100	100

Çizelge 3.34' den de görüleceği gibi immobilizasyon işlemi ile enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığında belirgin bir değişim olmamış ancak termal kararlılığında önemli derecede artış olmuştur. Sepabead EC-EP' de immobilize enzim özellikle operasyonel kararlılık, tekrar kullanılabilirlik ve inhibitörlere karşı daha dirençli olması açısından diğer immobilize enzimlere kıyasla daha üstündür.

Serbest ve immobilize α -galaktozidaz enzimlerinin soya sütünde rafinoz ve rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapıldı. Hazırlanan serbest ve immobilize enzimlerin soya sütünde bulunan rafinoz tip oligosakkaritlerin tamamına yakını 24 saat içinde hidrolizlediği belirlendi. Serbest enzim genel olarak rafinoz tip oligosakkaritleri immobilize enzimlere kıyasla daha iyi hidrolizlemiştir. Ancak, serbest enzimin tekrar kullanım olanağı olmadığı için endüstride kullanımı ekonomik açıdan bir yarar sağlamamaktadır. Sepabead EC-HA' da immobilize edilen enzimler Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzimlere kıyasla rafinoz tip oligosakkaritleri daha yüksek oranda hidrolizlemişlerdir. Bunun nedeni Sepabead EC-HA' nın sahip olduğu uzun fonksiyonel kol ile substratlarla daha iyi etkileşebilmesidir.

Sonuç olarak, hazırlanan immobilize enzimlerin yüksek termal kararlılıkları, operasyonel kararlılıkları, hidroliz yetenekleri ve tekrar kullanılabilirlikleri ile özellikle özellikle gıda proseslerinden şeker endüstrisinde ve soya işleme proseslerinde yüksek kullanım olanağına sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Agrawell, K.M.L. and Bahl, O.P., 1968, Glycosidases of *Phaseolus vulgaris* II: Isolation and general properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 243: 103-111.

Ajisaka, K. and Fujimoto, H., 1989, Regioselective synthesis of trisaccharides by use of reverse hydrolysis activity of α - and β -galactosidase, *Carbohydrate Research*, 185: 139-146.

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: 57–61.

Anisha, G.S., Rojan, P.J., Nicemol, J., Niladevi, K.N. and Premo, P., 2008, Production and characterization of partially purified thermostable α -galactosidase from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications, *Food Chemistry*, 3: 631-635.

Anthonsen, T., D'Arrigo, P., Pedrocchi-Fantoni, G., Secundo, F., Servi, S. and Sundby, E., 1999, Phospholipids hydrolysis in organic solvents catalysed by immobilised phospholipase C, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6: 125-132.

Basso, A., Braiuca, P., Cantone, S., Ebert, C., Linda P., Spizzo, P., Caimi, P., Hanefeld, U., Degrassi, G. and Gardossi, L., 2007, In silico analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of Cal B and PGA on Sepabeads®, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(6): 877-886.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Zvyagintseva, T.N. and Shchipunov, Y.A., 2006, Immobilization of α -galactosidase inside hybrid silica nanocomposites containing polysaccharides, *Macromolecular Chemistry and Polymeric Materials*, 79 (5): 827-832.

Balasubramaniam, K. and Mathew, C.D., 1986, Purification of α -galactosidase from coconut, *Phytochemistry*, 25 (8): 1819-1821.

Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2011, Immobilization and stabilization of α -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49: 855-860.

Bergkamp, R.J.M., Kool, I.M., Geerse, R.H. and Planta, R.J., 1992, Multiple copy integration of the α -galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonolobus* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*, *Current Opinion in Genetics*, 21: 365-370.

Bergmeyer, H.U., 1973, *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer, H.U., 2nd edition, Academic Press, New York, 1: 455p.

Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2006, Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Journal of Biotechnology*, 121: 284-289.

Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2008, Purification of α -galactosidase by affinity precipitation with alginate, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38: 348-357.

Bıçak Çelem, E., Bolle, S.S. and Önal, S., 2009, Efficient and rapid purification of lentil α -galactosidase by affinity precipitation with alginate, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46: 366-370.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2009a, Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61: 150-156.

Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2009b, Immobilization of avocado phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP and its application in soymilk phytate hydrolysis, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 37: 195-202.

Bolivar, J. M., Mateo, C., Godoy, C., Pessela, B.C.C., Rodrigues, D.S., Giordano, R.L.C., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., 2009, The cooperative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports, *Process Biochemistry*, 44: 757-763.

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: 248-254.

Breunig, F., Knoll, A. and Wanner, C., 2003, Enzyme replacement therapy in Fabry disease: clinical implications, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 12: 491-495.

Bryant, R.J., Rao, D.R. and Ogutu, S., 2004, α - and β -Galactosidase activities and oligosaccharide content in peanuts, *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 213-223.

Bulpin, P.V., Gidley, M.J., Jeffcoat, R. and Underwood, D.R., 1990, Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase, *Carbohydrate Polymers*, 12: 155-168.

Burns, J.K., 1990, α - and β -Galactosidase activities in juice vesicles of stored valencia oranges, *Phytochemistry*, 29 (8): 2425-2429.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cantacuzene, D. and Attal, S., 1991, Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using α -galactosidase, *Carbohydrate Research*, 211: 327-331.

Cao, L., 2005, Carrier-bound Immobilized Enzymes, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim.

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 α -galactosidase from *Rhizopus sp.* F78 ACCC 30795, *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 835-841.

Cavazzoni, V., Adami, A. and Craveri, R., 1987, α -Galactosidase from the yeast (*Candida javanica*), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26: 555-559.

Chibata, I., 1978, Immobilized Enzymes, Edited by Chibata, I., Halsted Pres, 1-144.

Chien, S.F. and Lin-Chu, M., 1991, The conversion of group B red blood cells into group O by an α -galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*), *Carbohydrate Research*, 217: 191-200.

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 α -galactosidase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 661-667.

Coppola, G., Yan, Y., Hantzopoulos, P., Segura, E., Stroh, J.G. and Calhoun, D.H., 1994, Characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human α -galactosidase A, using a baculovirus vector, *Gene*, 144: 197-203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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: 326-346.

Cronin, C.E., Giannouli, P., Mc Cleary, B.V., Brooks, M. and Morris, E.R., 2002, Formation of strong gels by enzymic debranching of guar gum in the presence of ordered xanthan, *Royal Society of Chemistry, (Gums and Stabilizers for The Food Industry, Special Publication)*, 278: 289-296.

Cuourtois, J.E. and Petek, F., 1988, α -Galactosidase from coffea beans, *Methods in Enzymology*, Edited by Mosbach, K., Academic Press, New York, 137: 565 p.

Çalçı, E., Demir, T., Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2009, Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70: 123-127.

David, C., Ernst, W. and Patrick, A., 2001, Cross-linked crystals of hydroxynitrile lyase as catalyst for the synthesis of optically active cyanohydrins, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 607-612.

Dean, K.J. and Sweeley, C.C., 1979a, Studies on human liver α -galactosidase I., *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (20): 9994-10000.

Dean, K.J. and Sweeley, C.C., 1979b, Studies on human liver α -galactosidase II., *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (20): 10001-10005.

Dean, K.J. and Sweeley, C.C., 1979c, Studies on human liver α -galactosidase III., *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (20): 10006-10010.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

De Santis, G.D. and Jones, J.B., 1999, Chemical modification of enzymes for enhanced functionality, *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 324-330.

De Souza Junior, W.C., de Rezende, S.T., Viana, P.A., Falkoski, D.L., Reis, A.P., Machado, S.G., de Barros, E.G. and Guimaraes, V.M., 2009, Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilized in alginate, *Food Chemistry*, 114: 589-593.

Demir, T., 2012, α -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için biyoafinite temelli immobilizasyon prosedürlerinin geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 140s (yayımlanmamış).

Dey, P.M. and Pridham, J.B., 1972, Biochemistry of α -galactosidases, In: *Advanced in Enzymology*, Edited by Meister A., Interscience Publishers, New York, USA, 36: 91-123.

Dey, P.M., Campillo, E.M. and Lezica, R.P., 1983, Characterization of a glycoprotein α -galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*), *The Journal of Biological Chemistry*, 258 (2): 923-929.

Dey, P.M., 1984, Characteristic features of an α -galactosidase from mung beans, *European Journal of Biochemistry*, 140: 385-390.

Dhar, G.M., Mitra, M., Hata, J., Butnariu, O. and Smith, D., 1994, Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -galactosidase izozymes, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34 (5): 1052-1055.

Dib, I. and Nidetzky, B., 2008, The stabilizing effects of immobilization in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *BMC Biotechnology*, 8: 72.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

El-Shebawy, K., Salen, S., Afify, A. and El-Sayed, O.H., 2007, Production of α -galactosidase from local isolated strain of *Bacillus circulans*, *Journal of Microbiology*, 17: 224-232.

Erdős, M., Nemeth, K., Toth, B., Constantin, T., Rakoczi, E., Ponyi, A., Dajnoki, A., Grubits, J., Pinter, I., Garzuly, F., Hahn, K., Bencsik, K., Vecsei, L., Fekete, G. and Marodi, L., 2008, Novel sequence variants of the α -galactosidase A gene in patients with Fabry disease, *Molecular Genetics and Metabolism*, 95 (4): 224-228.

Falkoski, D.L., Guimaraes, V.M., de Queiroz, M.V., de Araujo, E.F., de Almeida, M.N., de Barros, E.G. and de Rezende, S.T., 2009, Covalent immobilization of α -galactosidase from *Penicillium griseoroseum* and its application in oligosaccharide hydrolysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158: 540-551.

Farzadi, M., Khatami, S., Mousavi, M. and Amirmozafari, N., 2010, Purification and characterization of α -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus*, *African Journal of Biotechnology*, 10 (10): 1873-1879.

Ferrer, M., Plou, F.J., Fuentes, G., Angeles-Cruces, M., Andersen, L., Kirk, O., Christense, M. and Ballesteros, A., 2002, Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation, *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(1): 63-71.

Ferrier, L.K., Richardson, T. and Olson, N.F., 1971, Crystalline catalase insolubilized with glutaraldehyde, *Enzymologia*, 42: 273-283.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Filho, M., Pessela, B.C., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., 2008, Immobilization-stabilization of an α -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy, *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 265–271.

Froissarta, R., Guffonb, N., Vanierc, M.T., Desnickd, R.J. and Mairea, I., 2003, Fabry disease: D313Y is an α -galactosidase A sequence variant that causes pseudoefficient activity in plasma, *Molecular Genetics and Metabolism*, 80 (3): 307-314.

Fujimoto, Z., Kaneko, S., Momma, M., Kobayashi, H. and, Mizuno, H., 2003, Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (22): 20313-20318.

Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shohet, S.B., 1985, Human natural anti α -galactosyl Ig G, *Journal of Experimental Medicine*, 162: 573-582.

Gao, Z. and Schaffer, A., 1999, A novel alkaline alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose, *Plant Physiology*, 119 (3): 979-988.

Gaudreault, P.R. and Webb, J.A., 1983, Partial purification and properties of an alkaline α -galactosidase from mature levels of *Cucurbita pepo*, *Plant Physiology*, 71: 662-668.

Ghazi, I., De Segura, A. G., Fernandez-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J. and Ballesteros, A., 2005, Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabead EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35: 19-27.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gidley, M.J., Eggleston, G. and Morris, E.R., 1992, Selective removal of α -galactosidase side chains from *Rhizobium* capsular polysaccharide by guar α -galactosidase: Effect on conformational stability and gelatin, *Carbohydrate Research*, 231: 185-196.

Girigowda, K. and Mulimani, V.H., 2006, Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by k-carrageenan-entrapped α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 437-442.

Goldwyn, S., Lazinsky, A. and Wei, H., 2000, Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17: 261-289.

Golubev, A.M. and Neustroev, K.N., 1993, Crystallization of α -galactosidase from *Trichoderma reesi*, *Journal of Molecular Biology*, 231: 933-934.

Gote, M., Umalkar, H., Khan, I. and Khire, J., 2004, Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk, *Process Biochemistry*, 39: 1723-1729.

Gote, M., Khan, M.I., Gokhale, D.V., Bastawde, K.B. and Khire, J.M., 2006, Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146), *Process Biochemistry*, 41: 1311-1317.

Grazu, V., Abiyan, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., 2003, Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry, *Biomacromolecules*, 4: 1495-1501.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Guimaraes, V.M., de Rezende, S.T., Moreira, A., de Barros, E.G. and Felix, C.R., 2001, Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides, *Phytochemistry*, 58: 67-73.

Guisseppin, M.L.F., Almerk, J.W., Heistek, C.J. and Verrips, C.T., 1993, Comparative study on the production of guar α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU 50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1): 52-59.

Gupta, P. and Saleemuddin, M., 2006, Bioaffinity based oriented immobilization of stem bromelain, *Biotechnology Letters*, 28: 917-922.

Hailbach, F., Hata, J., Mitra, M., Dhar, M., Harmata, M., Sun, P. and Smith, D., 1991, Purification and characterization of a *Coffea canephora* α -D-galactosidase isozyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3): 1564-1571.

Hanefeld, U., Gardossi, L. and Magner, E., 2009, Understanding enzyme immobilisation, *Chemical Society Reviews*, 38: 453-468.

Harpaz, N., Flowers, H.M. and Sharon, N., 1978, α -Galactosidase from soybeans destroying blood-group B antigens, *European Journal of Biochemistry*, 22: 421-428.

Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M. and Kitahata, S., 1993, Purification and some properties of α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(3): 372-378.

Hernandez, K. and Fernandez-Lafuente, R., 2011, The lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl sephabeads: a very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide, *Process Biochemistry*, 46: 873-878.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hilterhaus, L., Minow, B., Müller, J., Berheide, M., Quitmann, H., Katzer, M., Thum, O., Antranikian, G., Zeng, A.P. and Liese, A., 2008, Practical application of different enzymes immobilized on sephabeads, *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 31: 163-171.

Ibatullin, F.M., Golubev, A.M., Firsov, L.M. and Neustroev, K.N., 1993, A model for cleavage of O-glycosidic bond in glycoproteins, *Glycoconjugate Journal*, 10: 214-218.

Ishii, S., Kase, R., Sakuraba, H. and Suzuki, Y., 1993, Characterization of a mutant α -galactosidase in *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acid Research*, 15(5): 2213-2220.

Itoh, T., Uda, Y. and Nakagawa, H., 1986, Purification and characterization of α -galactosidase from watermelon, *Journal of Biochemistry*, 99:243-250.

Ito, N., Tabata, S., Kawahara, S., Hirano, Y., Nakajima, K., Uchida, K. and Hirota, T., 1993, Histochemical analysis of blood group antigens, in human sublingual glands and pancreas, *Histochemical Journal*, 25(3): 242-249.

Jacobsen, B.K., Knutsen, S.F. and Fraser, G.E., 1998, Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence, *The Adventist Health Study (United States)*, *Cancer Causes and Control*, 9: 553-557.

Junior, W.C.S., Rezende, S.T., Viana, P.A., Falkoski, D.L., Reis, A.P., Machado, S.G., Barros, E.G. and Guimaraes, V.M., 2009, Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilized in alginate, *Food Chemistry*, 114: 589-593.

Kang, H.C. and Lee, S.H., 2001, Characteristics of an α -galactosidase associated with grape flesh, *Phytochemistry*, 58: 213-219.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Katrolia, P., Jia, H., Yan, Q., Song, S., Jiang, Z. and Xu, H., 2012, Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides, *Bioresource Technology*, 110: 578-586.

Kauchurin, A.M., Neustroev, K.N., Golubev, A.M. and Ibatullin, F.M., 1993, Chemical activation of α -galactosidase from *Trichoderma reesei*, *Biochemistry*, 58(4): 353-361.

Kim, W.D., Kobayashi, O., Kaneko, S., Sakakibara, Y., Park, G.G., Kusakabe, I., Tanaka, H. and Kobayashi, H., 2002, α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells, *Phytochemistry*, 61: 621-630.

Kim, W.D., Kaneko, S., Park, G.G., Tanaka, H., Kusakabe, I. and Kobayashi, H., 2003, Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds, *Biotechnology Letters*, 25: 353-358.

King, M.R., White, B.A., Blaschek, H.P., Chassy, B.M., Mackie, R.I. and Cann, I.K.O., 2002, Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 5676-5682.

Klaus, M., 1976, In *Methods in Enzymology*, Eds. Colowich, S.P. and Kaplan, N.O., *Academic Press*, New York, Vol XLIV: 548-552.

Kotwal, S.M., Gote, M.M., Sainkar, S.R., Khan, M.I. and Khire, J.M., 1998, Production of α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola sp.* in solid-state fermentation and its application in soy milk hydrolysis, *Process Biochemistry*, 33: 337-343

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kotwal, S.M., Gote, M.M., Khan, M.I. and Khire, J.M., 1999, Production, purification and characterization of a constitutive intracellular α -galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola sp.*, *Journal of Industrial Microbiology and Technology*, 23: 661-667.

Könst, P.M., Turras, P.M., Franssen, M.C., Scott, E.L. and Sanders, J.P., 2010, Stabilized and immobilized *Bacillus subtilis* arginase for the biobased production of nitrogen-containing chemicals, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 352: 1493-1502.

Könst, P.M., Franssen, M.C., Scott, E.L. and Sanders, J.P.M., 2011, Stabilization and immobilization of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase for the biobased production of 1,4-diaminobutane, *Green Chemistry*, 13: 1167-1174.

Kristufek, D., Hodits, R. and Kubicek, C.P., 1994, Coinduction of α -L-arabinofuranosidase and α -D-galactosidase formation in *Trichoderma reesei* RUT C-30, *FEMS Microbiology Letters*, 115: 259-264.

Kubitzki, T., Noll, T. and Lütz, S., 2008, Immobilisation of bovine enterokinase and application of the immobilized enzyme in fusion protein cleavage, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31: 173-182.

Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. and Alcalde, M., 2008, Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, *Process Biochemistry*, 43: 169-178.

Kusakabe, I., Kaneko, R., Takada, N., Zamora, A.F., Fernandez, W.L. and Murakami, K., 1990, A simple method for elucidating structures of galactomanno-oligosaccharides by sequential action of β -mannosidase and α -galactosidase, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 1081-1083.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kusiak, J.W., Quirk, J.M. and Brady, R.O., 1978, Purification and properties of the two major isoenzymes of α -galactosidase from human placenta, *The Journal of Biological Chemistry*, 253(1): 184-192.

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.

Lalonde, J., 1997, Practical catalysis with enzyme crystals, *Chemical Technology*, 27: 38-45.

Le Blanc, J.G., Silvestroni, A., Connes, C., Juillard, V., de Giori, G.S., Piard, J.C. and Sesma, F., 2004, Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: Application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase, *Genetics and Molecular Research*, 3: 432-440.

Lenny, L.L., Hurst, R., Goldstein, J., Benjamin, L.L. and Jones, R.L., 1991, Single-unit transfusions of RBC enzymatically converted from group B to group A and O, normal volunteers, *Blood*, 77 (6): 1383-1388.

Lenny, L.L., Hurst, R., Goldstein, J. and Galbraith, R.A., 1994, Transfusions to group O subjects of 2 units of red cells enzymatically converted from group B to group O, *Transfusion*, 34: 209-214.

Liljestöm, P.L. and Liljeström, P., 1987, Nucleotide sequence of the melA gene, coding for α -galactosidase in *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acid Research*, 15(5): 2213-2220.

Linden, J.C., 1982, Immobilized α -D-galactosidase in sugar beet industry, *Enzyme and Microbial Technology*, 4(3): 130-136.

Liu, Y., Sun, Y., Li, Y., Xu, S., Tang, J., Ding, J. and Xu, Y., 2011, Preparation and characterization of α -galactosidase-loaded chitosan nanoparticles for use in foods, *Carbohydrate Polymers*, 83: 1162-1168.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2004, Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads, *Journal of Biotechnology*, 111: 219-227.

Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2005, Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeads supports using glutaraldehyde crosslinking method, *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 750-756.

Lounteri, E., Alatalo, E., Siika-Aho, M., Penttila, M. and Tenkanen, M., 1998, α -Galactosidase of *Penicillium simplicissium*: production, purification and characterization of the gene encoding AGL1, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: 179-188.

Maly, P., Ticha, M. and Kocourek, J., 1985, Studies on lectins, *Journal of Chromatography*, 347(3): 343-350.

Mansour, E.H. and Khalil, A.H., 1998, Reduction of raffinose oligosaccharides in chickpea (*Cicer arietinum*) flour by crude extracellular fungal α -galactosidase, *Journal of Science and Food Agriculture*, 78: 175-181.

Margolin, A.L. and Navia, M.A., 2001, Protein crystals as novel catalytic materials, *Angewandte Chemie International Edition*, 40: 2204-2222.

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: 69-72.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mateo, C., Torres, R., Fernandez-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., Lopez-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J.M., Betancor, L., Pessela, B.C.C., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2003, Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method, *Biomacromolecules*, 4: 772-777.

Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J.M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., 2007, Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports, *Nature Protocols*, 2: 1022-1033.

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 (6):1451-1463.

Mathew, C.D. and Balasubramaniam, K., 1987, Mechanism of action of α -galactosidase, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 24: 29-32.

Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

Mitsutomi, M., Uchida, Y. and Ohtakara, A., 1985, Immobilization of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme, *Journal of Fermentation Technology*, 63 (4): 325-329.

Mitsutomi, M. and Ohtakara, A., 1988, Isolation and identification of oligosaccharides produced from raffinose by transgalactosylation reaction of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(9): 2305-2311.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mulimani, V.H. and Ramalingam, 1995, Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose present in soymilk by crude α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 36: 897-905.

Nadkarni, M., Nair, C.K.K., Fandey, V.N. and Pradnan, D.S., 1992, Characterization of alpha-galactosidase from *Corynebacterium murispectrum* and mechanism of its induction, *Journal of Genetic and Applied Microbiology*, 38: 23-24.

Nagao, Y., Nakada, T., Imato, M., Shimamoto, T., Sakai, S., Tsuda, M. and Tsuchiya, T., 1988, Purification and analysis of the structure of α -galactosidase from *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 (1): 236-241.

Naganagouda, K. and Mulimani, V.H, 2006, Gelatin blends with alginate: Gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk, *Process Biochemistry*, 41: 1903-1907.

Naganagouda, K., Prashanth, S.J., Shankar, S.K., Dhananjay, S.K. and Mulimani, V.H., 2007, Immobilization of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase in gelatin and its application in removal of flatulence-inducing sugars in soymilk, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1131-1137.

Naik, S., Oates, J.E., Dell, A., Taylor, G.W., Dey, P.M. and Pridham, J.B., 1985, A novel mass spectrometric procedure for the rapid determination of the types of carbohydrate chains present in glycoproteins: application to α -galactosidase I from *Vicia faba* seeds, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131(1): 1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Neustroev, K.N., Golubev, A.M., Ibatullin, F.M. and Moseichuk, A.V., 1993, Microheterogeneity in O type sugar chains of carbohydrates secreted by *Aspergillus awamori*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 30(1): 107-113.

Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y., 1984, Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(5): 1319-1327.

Ohtakara, A. and Mitsutomi, M., 1987, Immobilization of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitosan beads and its application to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses, *Journal of Fermentation Technology*, 65(4): 493-498.

Okutucu, B., Bıçak Çelem, E. and Önal, S., 2010, Immobilization of α -galactosidase on galactose-containing polymeric beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 200-205.

Önal, S. and Telefoncu, A., 1998, Some properties of α -galactosidase extracted from tomato and pineapple, *Journal of Faculty of Science Ege University*, 121 (1): 113-124.

Önal, Tatar S., 1994, Isolation and purification of α -galactosidase by affinity ultrafiltration, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 60 s.

Önal, Tatar S., 2000, Karpuz (*Citrullus vulgaris*) α -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 190 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Paek, N.S., Kang, D.J., Lee, H.S., Lee, J.J., Chai, Y.I., Kim, T.H. and Kim, W.K., 1998, Enzymatic synthesis of 6-*O*- α -D-galactopyranosyl-1-deoxynojirimycin using α -galactosidase from green coffee beans, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(3): 588-589.

Palomo, J.M., Munoz, G., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2003, Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins. Hydrolytic resolution of (*R,S*)-2-butyryl-2-phenylacetic acid, *Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic*, 21: 201-210.

Pasta, P., Verga, R., Zambianchi, F. and Daminati, M., 2004, Acetyl esterase from Mediterranean oranges: Partial purification, immobilization and biotransformations, *Biocatalysis and Biotransformations*, 2: 221-224.

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Vian, A., Garcia, J.L., Rivas, Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2003a, One-step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy Sepabeads, *Biomacromolecules*, 4: 107-113.

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2003b, The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. Complete hydrolysis of lactose in dairy products,

Pessela, B.C.C., Fuentes, M., Mateo, C., Munilla, R., Carrascosa, A.V., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., 2006, Purification and very strong reversible immobilization of large proteins on anionic exchangers by controlling the support and the immobilization conditions, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 909-915.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M., 2007, Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α - and β -galactosidases, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 242-248.

Platkova, Z., Polakovic, M., Stefuca, V., Vandakova, M. and Antosova, M., 2006, Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*, *Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences*, 60 (6): 469-472.

Porter, J.E., Herrmann, K.M. and Ladisch, M.R., 1990, Integral kinetics of α -galactosidase purified from Glycine max from simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose, *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 15-22.

Porter, J.E., Sarikaya, A., Herrmann, K.M. and Ladisch, M.R., 1992, Effect of pH on subunit association protection of soybean α -galactosidase, *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 609-614.

Prashanth, S.J. and Mulimani, V.H., 2005, Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate, *Process Biochemistry*, 40: 1199-1205.

Pressey, R., 1984, Tomato α -galactosidases: conversion of human type B erythrocytes to type O, *Phytochemistry*, 23 (1): 55-58.

Quioco, F.A. and Richards, F.M., 1966, The enzyme behaviors of carboxypeptidase-A in the solid state, *Biochemistry*, 5: 4062-4076.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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: 449-454.

Rajan, A. and Nair, G.R., 2010, production of soya milk containing low flatulence-causing oligosaccharides in a packed bed reactor using immobilised α -galactosidase, *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 2023-2031.

Rezessy-Szabo, J.M., Nguyen, Q.D., Hoschke, A., Braet, C., Hajos, G. and Claeysens, M., 2007, A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 55-62.

Ricca, E., Calabro, V., Curcio, S., Basso, A., Gardossi, L. and Iorio, G., 2010, Fructose production by inulinase covalently immobilized on Sepabeads in batch and fluidized bed bioreactor, *International Journal of Molecular Science*, 11: 1180-1189.

Shankar, S.K., Dhananjay, S.K. and Mulimani, V.H., 2009, Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Aspergillus terreus*_{GR}, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152: 275-285.

Shen, W., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J., Deng, L., Chen, H., Yuan, C., Li, D. and Li, X., 2008, New source of α -galactosidase: Germinating coffee beans, *Food Chemistry*, 110: 962-966.

Shivanna, B.D., Ramakrishna, M. and Ramadoss, C.S., 1989, Enzymatic hydrolysis of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), *Process Biochemistry*, 24 (6): 197-199.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Shivanna, B.D., Ramakrishna, M. and Ramadoss, C.S., 1990, Purification and properties of the anionic form of α -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), *Plant Science*, 72: 173-180.

Shivam, K. and Mishra, S.K., 2010, Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase with transglycosylation activity from *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796, *Process Biochemistry*, 45 (7): 1088-1093.

Singh, N. and Kayastha, A.M., 2012, Cicer α -galactosidase immobilization onto chitosan and Amberlite MB-150: optimization, characterization and its applications, *Carbohydrate Research*, 358: 61–66.

Sinitsyna, O.A., Federova, E.A., Vakar, I.M., Kondratieva, E.G., Rozhkova, A.M., Sokolava, L.M., Bubnova, T.M., Okunev, O.N., Chulkin, A.M., Vinetsky, Y.P. and Sinitsyn, A.P., 2008, Isolation and characterization of extracellular α -galactosidases from *Penicillium canescens*, *Biochemistry (Moscow)*, 73: 97-106.

Slominski, B.A., 1994, Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of α -galactosidase and β -fructofuranosidase: potential for use as dietary additives, *Journal of Science Food Agriculture*, 65: 323-330.

Soh, C.P., Ali, M. and Lazan, H., 2006, Characterisation of an α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes, *Phytochemistry*, 67: 242-254.

Somiari, R. and Balogh, E., 1993, Effect of soaking, cooking and crude α -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours, *Journal of Science Food Agriculture*, 61: 339-343.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Stone, K.R., Ayala, G., Goldstein, J., Hurst, R., Walgenbach, A. and Galili, U., 1998, Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey. Transplantation of α -galactosidase-treated porcine cartilage, *Transplantation*, 65: 1577-1583.

Sundaram, S. and Yarmush, M.L., 1993, Affinity Separation, Biotechnology, Edited by Rehm, H.J. and Read G.; Verlag, Chemie-Weinheim, 3: 643 p.

Susan, B., Sobolov, S.B., Leonida, M.D., Bartoszko-Malik, A., Voivodov, K.I., Mckinney, F., Kim, J. and Fry, A.J., 1996, Cross-linked LDH crystals for lactate synthesis coupled to electroenzymatic regeneration of NADH, *Journal of Organic Chemistry*, 61: 2125-2128.

Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H. and Önal, S., 2011, Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, *Separation and Purification Technology*, 83:130-136.

Takayanagi, T., Kushida, K., Idonuma, K. and Ajisaka, K., 1992, Novel N-linked oligo-mannose type oligosaccharides containing an α -D-galactofuranosyl linkage found in α -D-galactosidase from *Aspergillus niger*, *Glycoconjugate Journal*, 9: 229-234.

Talbot, G. and Sygusch, J., 1990, Purification and characterization of thermostabile β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (11): 3505-3510.

Tashima, M., Imai, Y., Kuroda, S. and Yagi, T.N., 1991, Structure of a new oligomer of glutaraldehyde produced by aldol condensation reaction, *Journal of Organic Chemistry*, 56: 694-697.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Telefoncu, A., 1986, Enzimolojinin prensipleri, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Yaz Okulu), Editör: A. Telefoncu, 18 s.

Telefoncu, A., 1997, İmmobilize enzimler, Enzimoloji (Yaz Okulu), Editör: A. Telefoncu, 193 s.

Telefoncu, A., Zihnioğlu, F., Önal, S., Dinçkaya, E. and Denizci, A.A., 1998, Purification and characterization of α -galactosidase from *Thermus thermophilus* HB8, *Journal of Faculty of Science Ege University*, 21(2): 55-67.

Thanankul, D., Tanaka, M., Chichester, C.O. and Lee, J., 1976, Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*, *Journal of Food Science*, 41: 173-175.

Thippeswamy, S. and Mulimani, V.H., 2002, Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*, *Process Biochemistry*, 38: 635-640.

Torres, P., Datla, A., Rajasekar, V. W., Zambre, S., Ashar, T., Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., Calero-Rueda, O., Barba, V., Martinez, M. J., Ballesteros, A. and Plou, F. J., 2008, Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dilbeads™), *Catalysis Communications*, 9: 539-545.

Torres, P. and Batista-Viera, F., 2012, Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74: 230-235.

Uslan, A.A., 1997, Enzimlerin etki mekanizmaları ve aktif merkez tayini, Enzimoloji (Yaz Okulu), Editör A. Telefoncu, 30 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Vaghjiani, J.D., Lee, T.S., Lye, G.J. and Turner, M.K., 2000, Production and characterisation of cross-linked enzyme crystals (CLECs®) for application as process scale biocatalysts, *Biocatalysis and Biotransformation*, 18: 151-175.

Varbanets, L.D., Malanchuk, V.M., Buglova, T.T. and Kuhlmann, R.A., 2001, *Penicillum* sp. 23 alpha-galactosidase: purification and substrate specificity, *Carbohydrate Polymers*, 44: 357-363.

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 α -galactosidase, *Food Chemistry*, 93: 665-670.

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 α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2385-2391.

Viana, P.A., de Rezende, S.T., Falkoski, D.L., de Almida Leite, T., Jose, I.C., Moreira, M.A. and Guimaraes, V.M., 2007, Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidase, *Food Chemistry*, 103: 331-337.

Watkins, W.M., Zarnitz, M.L. and Kabat, E.A., 1962, Development of H activity by human blood group-B, substance treated with coffee bean α -galactosidase, *Nature*, 195: 1204-1206.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Weiser, W., Lehmann, J., Matsui, H., Brewer, C.E. and Hehre, J.E., 1992, Stereochemistry of D-galactal and D-galacto-octenikol hydration by coffee bean α -galactosidase: insight to catalytic functioning of the enzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292: 493-498.

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*, November: 1147-1152.

Wong, S.S. and Wong, L.J., 1992, Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 866-874.

Xiao, M., Tanaka, K., Qian, X.M., Yamamoto, K. and Kumagai, H., 2000, High-yield production and characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* grown on raffinose, *Biotechnology Letters*, 22: 747-751.

Yagi, F., Eckhardt, A.E. and Goldstein, I.J., 1990, Glycosidases of Erlich ascites tumor cells and ascitic fluid-purification and substrate specificity of α -N-acetylgalactosaminidase and α -galactosidase: Comparison with coffee bean α -galactosidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280 (1): 61-67.

Yasuda, K., Chang, H.H., Wu, H.L. and Ishii, S., 2004, Efficient and rapid purification of recombinant human alpha-galactosidase A by affinity column chromatography, *Protein Expression and Purification*, 37: 499-506.

Yoshimitsu, M., Higuchi, K., Miyata, M., Devine, S., Mattman, A., Sirrs, S., Medin, J.A., Tei, C. and Takenaka, T., 2010, Identification of novel mutations in the α -galactosidase gene in the patients with Fabry disease: Pitfalls of mutation analyses in patients with low α -galactosidase activity, *Journal of Cardiology*, 57 (3): 345-353.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yoon, M.Y. and Hwang, H.J., 2008, Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55, *Food Microbiology*, 25 (6): 815-823.

Zambau, K., Spyropoulos, C.G., Chinou, I. and Kontos, F., 1993, Saponin like substances inhibit α -galactosidase production in the endosperm of *fenugreek seeds*, *Planta*, 189: 207-212.

Zaprometova, O.M. and Ulezlo, I.V., 1988, Isolation and purification of a mold α -galactosidase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10: 232-241.

Zaprometova, O.M., Ulezlo, I.V. and Lakhtin, V.M., 1990, Structure and properties of a *Cephalosporium acremonium* α -galactosidase, *Glycoconjugate Journal*, 7: 287-300.

Zeilinger, S., Kristufek, D., Atac, I.A., Hodits, R. and Kubicek, C.P., 1993, Conditions of formation, purification and characterization of α -galactosidase of *Trichoderma reesi* RUT C-30, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5): 1347-1353.

Zihnioğlu, F., 1996, Elektroforetik yöntemler, Protein Saflaştırması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), Editör A.Telefoncu, 150 s.

Zhu, A. and Goldstein, J., 1994, Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffea bean α -galactosidase, *Gene*, 140: 227-231.

Zhu, A., Wang, Z.K. and Goldstein, J., 1995, Identification of tyrosine 108 in coffea bean α -galactosidase as an essential residue for the enzyme activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247: 260-264.

<http://www.resindion.com>, Mitsubishi Chemical Co, İtalya, (Erişim Tarihi: 18.06.2009).

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Evran ÇELEM

Doğum Tarihi : 27/ 10/ 1980

Doğum Yeri : Bornova / İZMİR

Cinsiyeti : Bayan

Uyruğu : T.C

Medeni Hali : Evli

Ev Adresi : Çetin Emeç Mah. Basketbol Sok.
33 Blok D: 12 Olimpiyat Köyü
Balçova / İZMİR

Cep Tel : 0532 672 94 96

e-mail : elvi28@hotmail.com

Eğitim Durumu

Okul	Derece	Yıl
Dokuzeylül İlkokulu, İzmir	Diploma	1986–1991
Özel Türk Lisesi, İzmir	Diploma	1991–1998
Ege Üniversitesi, İzmir	B. Sc. (Biyokimya Bölümü)	1998–2002
Ege Üniversitesi, İzmir	M. Sc. (Biyokimya Bölümü)	2002–2005
Ege Üniversitesi, İzmir	Ph. D. (Biyokimya Bölümü)	2006-

Yabancı Diller : İngilizce

Staj : İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü (Temmuz-Eylül 2001)

Uzmanlık Alanları : Protein izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyonu, afiniteye dayalı biyoayırma, enzim immobilizasyonu ve karakterizasyonu, enzimlerin endüstriyel alandaki uygulamaları.

Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Çiğlendirilen Çeşitli Tahıllardan α -Galaktozidaz Enziminin İzolasyonu, Kısmi Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi (Danışman: Öğr. Gör. Dr. Seçil TATAR ÖNAL), 2002.

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Fitaz Enziminin Immobilizasyonu, Karakterizasyonu ve Fitat Degradasyonunda Kullanımı (Danışman: Doç. Dr. Seçil ÖNAL), 2005.

Doktora Tez Başlığı ve Danışmanı:

α -Galaktozidaz Enziminin Immobilizasyonu, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Proseslerde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması (Danışman: Prof. Dr. Seçil ÖNAL), 2013.

Projeler:

1. “Fitaz enziminin immobilizasyonu, karakterizasyonu ve fitat degradasyonunda kullanımı”.

Bıçak, E., Önal, S., Araştırma Fonu Projesi, 2004 Fen 003, Proje Yürütücüsü, 2006.

2. “ α -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonu, karakterizasyonu ve endüstriyel proseslerde kullanım potansiyelinin araştırılması”

Bıçak Çelem, E., Önal, S., Araştırma Fonu Projesi, 2009 Fen 010, Proje Yürütücüsü, 2008 – devam ediyor.

3. “Karbohidrat tanınmasına yönelik moleküler damgalı polimerlerin hazırlanması”

Okutucu, B., **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** Araştırma Fonu Projesi, 2009 Fen 011, Proje Araştırmacısı, 2009 – 2010.

Burslar:

1. Tübitak-BİDEB Yurt İçi Doktora Bursu, 2006–2011.

Seminerler:

1. “Fitaz enziminin biyokimyasal önemi ve uygulama alanları”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2004.
2. “Genetiği değiştirilmiş gıdalar ve bitkiler”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2008.
3. “ α -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonu, karakterizasyonu ve endüstriyel proseslerde kullanım potansiyelinin araştırılması”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü”, 2010.

ESERLER

A. SCI Tarafından Taranan Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Baran, A., **Bıçak, E.,** Baysal, Ş., Önal, S., 2007, Comparative studies on the adsorption of Cr(VI) ions on to various sorbents, *Bioresource Technology*, 98: 661- 665.

2. **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2008, Purification of α -galactosidase by affinity precipitation with alginate, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38: 1-10.
3. **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2009, Immobilization of avocado phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP and its application in soymilk phytate hydrolysis, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 37: 195-202.
4. **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2009, Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61: 150–156.
5. **Bıçak Çelem, E., Bolle, S.S., Önal, S.,** 2009, Efficient and rapid purification of lentil α -galactosidase by affinity precipitation with alginate, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46: 366-370.
6. Çalçı, E., Demir, T., **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2009, Purification of tomato(*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70: 123-127.
7. Okutucu, B., **Bıçak Çelem, E.,** 2010, Önal, S., Immobilization of α -galactosidase on galactose-containing polymeric beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 200- 205.
8. Özer, B., Akardere, E., **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2010, Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, *Biochemical Engineering Journal*, 50, 110-115.
9. Akardere, E., Özer, B., **Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2010, Three-phase partitioning and characterization of invertase from Baker's yeast, *Separation and Purification Technology*, 72, 335-339.

10. Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., **Bıçak Çelem, E.**, Önal, S., 2011, Immobilization and stabilization of α -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 855-860.

B. Bildiriler

B1. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

1. **Bıçak, E.**, Baran, A., Önal, S., Baysal Hamarat, Ş., “Removal of Cr(VI) Ions From Aqueous Solution on to Immobilized *Chryseomonas luteola* Biomass” XIII. Balkan Biochemical Biophysical Days and to a Meeting on Metabolic Disorders, Kuşadası-Aydın, 12-15 October 2003.

2. Baran, A., **Bıçak, E.**, Baysal Hamarat, Ş., Önal, S., “Comparative Studies on the Adsorption of Cr(VI) Ions on to Chitosan” XIII. Balkan Biochemical Biophysical Days and to a Meeting on Metabolic Disorders, Kuşadası-Aydın, 12-15 October 2003.

3. Okutucu, B., **Bıçak Çelem, E.**, Önal, S., “Immobilization of tomato α -galactosidase on galactose imprinted polymer and properties of the immobilized biocatalyst”, International Enzyme Engineering Symposium IEES’2008, Kuşadası-Aydın, 1-5 October 2008.

4. **Bıçak Çelem, E.**, Okutucu, B., Önal, S., “Galactose imprinted polymer as an matrix for the immobilization of α -galactosidases”, International Enzyme Engineering Symposium IEES’2008, Kuşadası-Aydın, 1-5 October 2008.

5. Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., **Bıçak Çelem, E.**, Önal, S., “Immobilization and stabilization of α -galactosidase on aminated Sepabeads (Sepabead EA and Sepabead HA)”, International Enzyme Engineering Symposium IEES’2008, Kuşadası-Aydın, 1-5 October 2008.

B2. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Bıçak, E.**, Bolle, S.S., Önal, S., “Çimlendirilen Çeşitli Baklagillerden α -Galaktozidaz Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması”, XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale.

2. **Bıçak, E.**, Bolle, S.S., Önal, S., “Çimlendirilen Bakladan (*Vicia faba*) α -Galaktozidazın Aljinatta Çöktürme ile Saflaştırılması”, XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale.

3. **Bıçak, E.**, Önal, S., Zihnioğlu, F., “Soya Sütündeki Fitatın Enzimatik Degradasyonu”, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, 15-19 Mayıs 2004, Trabzon.

4. **Bıçak, E.**, Önal, S., “Fitatın İmmobilize Avakado Fitazı İle Degradasyonu”, 19. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-4 Ekim 2005, Kuşadası-Aydın.

5. **Bıçak, E.**, Önal, S., “Sepabead(EC-EP) Taşıyıcıda Fitaz İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu”, 19. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-4 Ekim 2005, Kuşadası-Aydın.

6. Özer, B., Akardere, E., **Bıçak Çelem, E.**, Önal, S., “Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile İnvvertaz Enziminin Domatesten(*Lycopersicon esculentum*) Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya.

7. Akardere, E., Özer, B., **Bıçak Çelem, E.**, Önal, S., “Maya(*Saccharomyces cerevisiae*) İnvvertazının Saflaştırılması İçin Üçlü-Faz Ayırma Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Enzimin Karakterizasyonu”, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya.

8. Okutucu, B., **Bıçak Çelem, E.**, Önal, S., “Karbhidratların tanınmasına yönelik kovalent moleküler damgalı polimerlerin hazırlanması”, Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum.