

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**α -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU VE
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN TERS MİSEL
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Kadriye GEZER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 22.11.2012

Bornova - İZMİR

2012

Kadriye GEZER tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “ α -Galaktozidaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması İçin Ters Misel Sistemlerinin Geliştirilmesi” 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 22.11.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı
Raportör Üye

: Prof. Dr. SEGİL BNAZ

: Doç. Dr. Şenay ŞANLIER

Üye

: Doç. Dr. M. Yunus AKGÜL

ÖZET

α -GALAKTOZİD AZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI İÇİN TERS MİSEL SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

GEZER, Kadriye

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Kasım 2012, 124 sayfa

α -D-Galaktozidazlar (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) doğada oldukça yaygın olarak bulunan hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan çok çeşitli teknikler ile izole edilerek saflaştırılan bu enzimler galaktooligosakkaritler ve polisakkaritlerde bulunan α -1,6-galaktoz birimlerini hidrolizlerler. Özellikle şeker endüstrisinde önemli bir potansiyele sahip olan α -galaktozidazlar, kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde ve medikal alanda oldukça önemli uygulama alanları olan enzimlerdir.

Bu çalışmada, mısırdan (*Zea mays*) izole edilen α -D-galaktozidaz enzimi ters misel sistemi (Reverse Micelles Systems; RMs) kullanılarak saflaştırıldı. Ters misel sisteminde misel oluşturmak için surfaktan olarak Aerosol OT (AOT) ve setil trimetil amonyum bromür (CTAB) surfaktanları kullanıldı. Ters misel sistemini optimize etmek ve enzimi iyi bir verimle saflaştırabilmek için sistemi etkileyen temel parametreler (surfaktan tipi ve konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, sisteme eklenen protein miktarı, sulu faz/organik faz oranı) incelendi. Saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi karakterize edildi. Bu amaçla, enzim aktivitesine ve kararlılığına sıcaklık ve pH'ın etkisi incelenerek kinetik sabitler (K_m ve V_{max}) belirlendi. Ayrıca, D-galaktozun enzim aktivitesine etkisi araştırıldı ve inhibisyon kinetiği belirlendi.

Sonuç olarak Aerosol OT (AOT) tabanlı ters misel sistemi için oda sıcaklığında 50 mM'lık sitrat tamponuyla (pH 6), 50 mM KCl tuz çözeltisi ve 1 mg protein içerek şekilde, 1:1 faz oranı (v/v) ile sistem hazırlandı. Setil

trimetilamonyum bromür (CTAB) ters misel sistemi için ise yine oda sıcaklığında 50 mM'lık sitrat tamponuyla (pH 4.5), 2 mg protein içerek şekilde, 1:1 faz oranı (v/v) ile sistem hazırlandı. Optimize edilmiş koşullarda, ters misel sistemi ile α -galaktozidaz enzimi AOT surfaktanı içeren ters misel sistemiyle %47 aktivite verimi ile 4,8 kat saflaştırıldı, CTAB surfaktanı içeren ters misel sistemiyle ise %89 aktivite verimi ile 2,0 kat saflaştırıldı. Her iki ters misel sistemi ile saflaştırılan enzimlerinin optimum sıcaklık ve optimum pH 'sı sırasıyla 37°C ve pH 4,5 olarak belirlendi. Saflaştırılan enzimin, 4-50°C ve pH 4.0-6.5 aralığında oldukça kararlı olduğu belirlendi. α -Galaktozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 4.54 mM ve 0.05 U (AOT tabanlı ters misel sistemi) olarak belirlendi, 2.27 mM ve 0.29 U (CTAB tabanlı ters misel sistemi) olarak hesaplandı. D-Galaktozun α -galaktozidaz enzimi inhibitörü olduğu ve inhibisyon tipinin kompetitif olduğu belirlendi. Geleneksel çok adımlı metodlara kıyasla α -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan bu tek adımı ters misellerle ekstraksiyon metodu bast, ekonomik ve etkili bir metod olup hazırlanan enzim preparatı sahip olduğu katalitik özellikler bakımından endüstriyel alanda kullanılabilecek uygun bir enzim preparatıdır.

Anahtar Kelimeler: Ters misel sistemi, RMS, AOT, CTAB, *Zea mays*, α -galaktozidaz, mısır, protein izolasyon ve saflaştırması.

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF REVERSE MICELLES SYSTEMS FOR THE
EXTRACTION AND PURIFICATION OF α -GALACTOSIDASE**

GEZER, Kadriye

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

November 2012, 124 pages

α -Galactosidases (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) are a common class of hydrolases which are widely distributed in nature. They have been isolated and purified with different techniques from various sources, such as plants, animals and microorganisms. They catalyse the hydrolysis of α -1,6-galactose bonds which found in galactooligosaccharides and polysaccharides. α -Galactosidases which has a significant potential especially in the sugar industry are enzymes having important application areas. These provide to determine the biological functions of complex carbohydrates, organic synthesis, structural analysis and applications in the medical field.

In this study, α -D-galactosidase isolated from corn (*Zea mays*) and purified by reverse micelles systems (RMs). Aerosol OT (AOT) and cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) surfactants were used to create micelle in reverse micelle system. The main parameters (surfactant type and concentration, pH, ionic strength, amount of protein added to the system, the aqueous phase:organic phase ratio) were analyzed to optimize reverse micelles systems and to purify enzyme effeciently. The purified α -Galactosidase was also characterized. For this aim, the effect of pH and temperature on the activity and stability of the enzyme and determination of kinetic parameters (K_m and V_{max}) were also investigated.

As a result, it is decided to prepare the cationic surfactant AOT based reverse micelles system with 1:1 (v/v) phase ratio, 50 mM KCl salt concentration

including 1 mg protein and 50 mM sodium citrate buffer (pH 6) in room temperature. For CTAB based reverse micelles system, it is decided to prepare with 1:1 (v/v) phase ratio, 50 mM sodium citrate buffer (pH 4,5) in room temperature, including 2 mg protein. Under optimised conditions, with AOT based reverse micelles system α -galactosidase enzyme is purified with 4,8 fold and 47% activity recovery. With the CTAB based reverse micelles system α -galactosidase enzyme is purified with 2,0 fold and 89% activity recovery. The optimum temperature and pH were found as 37⁰C and pH 4.5, respectively for the enzyme purified with both reverse micelles system. Purified enzymes were very stable in the temperature range of 4-50⁰C and also pH 4.0-6.5. The K_M and V_{max} values of purified enzyme were calculated as 4.54 mM and 0.05 U (AOT based system) and 2.47 mM and 0.29 U (CTAB based system). It was found that D-galactose was an inhibitor for corn α -galactosidase and the type of inhibition was as competitive. Compared to multi-step methods, extraction with reverse micelles systems is very simple, economic and effective method. Beside of this, according to catalytic properties of the enzyme it can be used for industrial applications.

Key words: Reverse micelles systems, RMS, AOT, CTAB, *Zea mays*, α -galactosidase, corn, isolation and purification of proteins.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın yürütülmesinde, laboratuvar çalışmalarından yazım aşamasının tamamlanmasına kadar teorik ve pratik anlamda her türlü yardımı benden esirgemeyen, kendi yoğun işlerinin arasında bana zaman ayırıp ihtiyaç duyduğum her türlü bilgiyi bana sunan değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Seçil ÖNAL** 'a ve bu aşamaya gelmemde yardımcı olan, üzerimde emeği olan tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü konuda yardımcı olan Sayın Hasan BAYRAKTAR 'a ve Evran BIÇAK ÇELEM 'e, Murat AYDOĞAN'a, İlhan abiye, Eda EVGEN'e ve her türlü desteği ile tüm yaşamım boyunca yanımda olan anneme, babama ve kardeşime ve adını saymadığım tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2011-FEN-073 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
İÇİNDEKİLER	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR	XXI
1. GİRİŞ	1
1.1 Galaktozidazlar	2
1.1.1 α -Galaktozidazlar ve α -galaktozidazların biyokimyası	5
1.1.2 α -Galaktozidazların etki mekanizması	8
1.1.3 α -Galaktozidazların izolasyonu ve saflaştırılması	12
1.1.4 α -Galaktozidazların fiziksel özellikleri	13
1.1.5 α -Galaktozidazların kinetik özellikleri	15
1.1.6 α -Galaktozidazların fizyolojik önemi ve uygulama alanları	23
1.2 Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Sistemleri	29
1.3 Misel Sistemleri	32
1.3.1 Normal misel sistemleri	33
1.3.2 Ters misel sistemleri	34
1.3.3 Ters misel sistemlerinin kullanım alanları	39
1.3.4 Ters misel sistemlerinin avantajları	40
1.3.5 Ters misel sistemlerinin hazırlanması	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.3.6 Ters misel sistemlerinin faz transfer yöntemiyle hazırlanması.....	42
1.3.7 Fazlar arası protein transferini etkileyen faktörler	43
1.3.8 Fazlar arası protein transferini yöneten yürütücü kuvvetler	52
1.3.9 Geri ekstraksiyon	55
2. MATERYAL ve METOD	56
2.1 Materyal	56
2.2 α -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini	56
2.3 Protein Tayini.....	57
2.4 Mısırdan α -Galaktozidaz Enziminin İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.....	58
2.5 Mısır α -Galaktozidazının Ters Misel Sistemi ile Saflaştırılması	59
2.6 Ters Misel Sistemlerinde İleri Ekstraksiyonun Optimizasyonu	60
2.6.1 pH.....	60
2.6.2 İyon şiddeti.....	60
2.6.3 Sürfaktan konsantrasyonu	61
2.6.4 Protein miktarı.....	61
2.6.5 Faz oranı.....	61
2.6.6 Ölçek büyütme	62
2.7 Ters Misel Sistemi ile Mısır'dan Saflaştırılan α -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu	62
2.7.1 α -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi	62
2.7.2 Kararlılık testleri	64

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	66
3.1 α -Galaktozidaz Enziminin Mısırdan (<i>Zea mays</i>)	
İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması	66
3.2 Ters Misel Sistemi (RMS) ile Mısır (<i>Zea mays</i>)	
α -Galaktozidazının Saflaştırılması	67
3.2.1 Ters misel sisteminde ileri ekstraksiyon ve ekstraksiyonun	
optimizasyonu	69
3.2.2 Ters misel sistemleri α -galaktozidaz ayırımının tekrarlanabilirliği.....	82
3.2.3 Ters misel sistemlerinde ölçek büyütme.....	84
3.3 Mısır α -Galaktozidazının Karakterizasyonu.....	85
3.3.1 α -Galaktozidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi	85
3.3.2 α -Galaktozidazın aktivitesine pH'nın etkisi	87
3.3.3 α -Galaktozidazın kinetik sabitlerinin tayini	88
3.3.4 Efektör türü ve konsantrasyonun etkisi	91
3.3.5 Kararlılık testleri.....	96
3.4 α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) Ters Misel Sistemi ile Saflaştırılmasının Genel	
Olarak Değerlendirilmesi	104
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	106
ÖZGEÇMİŞ	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Genel reaksiyon mekanizması	5
1.2 İki adımlı mekanizma	10
1.3 Tek adımlı mekanizma	10
1.4 Sürfaktan şekilleri ve kolloidal çözeltideki oluşumlar	30
1.5 Klasik emülsiyon tiplerinin şematik görünüşü	31
1.6 Ters misel ve normal miselin şematik gösterimi	33
1.7 Normal miselin şematik gösterimi.....	34
1.8 Ters miselin şematik gösterimi.....	34
1.9 Ters misel sistemi	35
1.10 Ters miselin oluşumu.....	36
1.11 Anyonik surfaktan ile oluşturulmuş tek bir ters miselin yapısı ve bölgeleri.....	38
1.12 Ters misel sisteminde 16-hidroksi hegzadekonik asitin lipaz katalizli reaksiyonu	39
1.13 Enjeksiyon yöntemi	41
1.14 Dissolusyon yöntemi	41
1.15 Faz transfer yöntemi	42
1.16 Faz transfer yönteminde ileri ve geri ekstraksiyon adımları	43
1.17 Ters miselde suyun yerleşimi	44
1.18 Sürfaktan molekülünün şematik gösterimi	46
1.19 Sürfaktan sınıflandırılması	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.20 AOT ve CTAB surfaktanlarının kimyasal yapısı.....	50
3.1 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum sıcaklığı	86
3.2 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum sıcaklığı	86
3.3 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum pH'sı.....	87
3.4 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum pH'sı.....	88
3.5 PNPG konsantrasyonunun AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazı aktivitesine etkisi	89
3.6 PNPG konsantrasyonunun CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazı aktivitesine etkisi	89
3.7 AOT tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının Lineweaver-Burk Diyagramı	90
3.8 CTAB tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının Lineweaver-Burk Diyagramı	90
3.9 AOT tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının enzimi aktivitesine D-galaktoz etkisi	94
3.10 CTAB tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının aktivitesine D-galaktoz etkisi	95

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.11 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının termal kararlılığı	97
3.12 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının termal kararlılığı	98
3.13 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılık (37 ⁰ C).....	99
3.14 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılık (50 ⁰ C).....	99
3.15 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin (37 ⁰ C)	100
3.16 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin (50 ⁰ C)	100
3.17 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının pH kararlılığı.....	101
3.18 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının pH kararlılığı.....	102
3.19 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının için depo kararlılığı	103
3.20 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının için depo kararlılığı	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Oligosakkarit yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bazı ekzoglikozidazlar	4
1.2 Bazı α -galaktozidazların molekül kütleleri.....	15
1.3 α -Galaktozidazların substrat spesifiklikleri	18
1.4 α -Galaktozidazların termal kararlılıkları	20
1.5 α -Galaktozidazların optimum pH değerleri.....	22
1.6 Farklı tabanlı ters misel sistemi örnekleri.....	49
1.7 Çeşitli faktörlerin ters misel sistemlerine etkisi	51
1.8 Ters misel sistemleriyle ekstrakte edilen protein örnekleri	53
3.1 pH'ın AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi	71
3.2 pH'ın CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi	73
3.3 KCl konsantrasyonunun AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.....	75
3.4 KCl konsantrasyonunun CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.....	76
3.5 AOT konsantrasyonunun AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.....	77
3.6 CTAB konsantrasyonunun CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.....	78
3.7 AOT tabanlı ters misel sisteminde faz oranının ayırmaya etkisi	79

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.8 CTAB tabanlı ters misel sisteminde faz oranının ayırmaya etkisi.....	80
3.9 Protein miktarının AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.....	81
3.10 Protein miktarının CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi	82
3.11 AOT tabanlı ters misel sistem ile α -galaktozidaz ayırımının tekrarlanabilirliği.....	83
3.12 CTAB tabanlı ters misel sistem ile α -galaktozidaz ayırımının tekrarlanabilirliği	83
3.13 AOT tabanlı ters misel sisteminde ölçek büyütme	84
3.14 CTAB tabanlı ters misel sisteminde ölçek büyütme	85
3.15 Çeşitli şekerlerin AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemlerinde saflaştırılmış enzim aktivitesine etkisi.....	92
3.16 Çeşitli kimyasalların AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemlerinde saflaştırılmış enzimi aktivitesine etkisi.....	93
3.17 AOT tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının enzim aktivitesine D-galaktoz etkisinin kinetik parametreleri	95
3.17 CTAB tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının enzim aktivitesine D-galaktoz etkisinin kinetik parametreleri	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
U	Unit aktivite birimi
μ	mikro

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AOT	Aerosol OT
CTAB	Setil trimetilamonyum bromür
BSA	Sığır serum albumini
PNP	p-Nitrofenil
PNPG	p-Nitrofenil- α -D-galaktopiranozid
oPNG	o-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid
RMS	Ters Misel Sistemi

1. GİRİŞ

α -D-Galaktozidazlar (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), α -bağlı indirgenemeyen terminal galaktoz artıklarını küçük oligosakkaritlere (melibioz, rafinoz ve daha büyük galaktopolisakkaritler ve galaktolipitler) indirgeyen ekzoglikozidazdır. Başka bir deyişle, basit ve kompleks oligo- ya da polisakkaritlerin hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfı glikozidazlardır. Disakkaritler ve disakkarit türevlerinden metanol, fenol ve 4-nitrofenol glikozidlerinden, (örneğin; melibioz, melibionik asit), trisakkaritlerden (örneğin; rafinoz), oligosakkaritlerden (örneğin; stakiyöz) ve galaktolipidlerden terminal α -galaktozil artıklarını hidrolizlerler. Doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadırlar. α -D-galaktozidazlar, çok çeşitli biyokimyasal teknikler kullanılarak bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilerek saflaştırılmaktadırlar.

α -Galaktozidazlar iki karbohidrat artığı arasındaki glikozidik bağı hidrolizleyen glikozil hidrolazlar (EC. 3.2.1 – 3.2.3) arasında önemli bir gruptur. Oligo- ve polisakkaritlerin biyolojik fonksiyonlarının çeşitlendirilmesi glikozil hidrolazların birçok önemli basamakta müdahalesi ile olur : polisakkaritin depolanması, patojenlere karşı savunma, hücre içine patojenlerin penetrasyonu, hücre yüzeyindeki karbohidratların devir hızı vs. (Henrissat et al., 1995). Kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde, medikal alanda ve endüstriyel proseslerde pek çok kullanım alanı bulunan α -D-galaktozidazlar, özellikle şeker endüstrisi için oldukça önemli enzimlerdir. Bu önem, genellikle rafinozun sukrozun kristalizasyonunu engelleyerek kristalize şeker verimini düşüren bir trisakkarit olmasından kaynaklanır. Çeşitli kaynaklardan çıkarak hazırlanan α -D-galaktozidaz preparatları ile rafinozun hidrolizlenmesiyle önemli oranda ekonomi sağlanmaktadır.

1.1 Galaktozidazlar

Galaktozidazlar özellikle hidrolaz aktivitesi taşıyan ve glikozidazların bir alt sınıfı olan hidrolitik enzimlerdendir. Glikozidazlar da glikozil bileşikleri üzerinde etkilidir, basit glikozidler ile kompleks oligo- ve polisakkaritlerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizlerler. Glikozidazların bir kısmı glikozil artıklarını oligosakkaritlere, polisakkaritlere ve diğer alkolik reseptörlere transfer ettikleri halde hidrolazlar sınıfına dahil edilirler. Glikopiranozil grupları ile glikozidik bağların anomerik konfigürasyonlarına karşı oldukça spesifik olan glikozidazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunurlar. Uzun zamandan beri (yaklaşık olarak 150 yıl) 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. Kristal formda elde edilen glikozidaz sınıfı enzimlere örnek olarak amilaz ve lizozim verilebilir.

Glikozidazların bir kısmı glikozil artıklarını oligosakkaritlere, polisakkaritlere ve diğer alkolik reseptörlere transfer ettikleri halde hidrolazlar sınıfına dâhil 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 bağları, 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 bağları, 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-bağlı terminal galaktoz artıklarını hidrolizleyebilirler.

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), hyalürinidaz (EC 3.2.1.45), lizozim (EC 3.2.1.17) ve pullulanaz (EC 3.2.1.41) dır. 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; Agrawell and Bahl, 1968).

Glikozidazlar yapısal karakterizasyonlarda da kullanılan önemli bir enzim grubudur. Nükleer manyetik rezonans (NMR), hızlı atom bombardmanı, 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>	Ma 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-fukozidleri 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

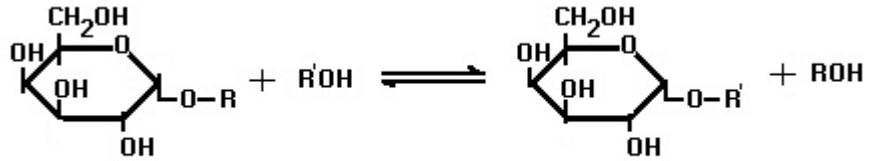
bazısı α -L-arabinozidler de hidrolizlemektedir (Bergmeyer, 1973; Gaudreault and Webb, 1983; Harpaz et al., 1987).

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; mikroorganizmalar (Nadkarni et al., 1992; Wong et al., 1986; Talbot and Sygusch, 1990; Lopez-Gallego et al., 2004; Galili et al., 1985; Zeilinger et al., 1993; Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Telefoncu et al., 1998), hayvansal dokular (Dhar et al., 1993; Dean and Sweely, 1979a; 1979b; Alonso et al., 2005; Bishop and Desnick, 1981) ve bitkilerden (Dey, 1984; Zhu and Goldstein, 1994; Chien and Lin-Chu, 1991; Haibach et al., 1991; Itoh et al., 1986; Kusiak et al., 1978; Burns, 1990; Shivanna, 1990; Balasubramaniam and Mathew, 1986; Cuourtois and Petek, 1988; Dey et al., 1983; Zhu et al., 1995; Naik et al., 1985; Önal and Telefoncu, 1998) farklı biyokimyasal teknikler kullanılarak izole edilip saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma çalışmalarının yanında α -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları ise oldukça az sayıdadır. Mikrobiyal kaynaklı α -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları (Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987) ise daha çok endüstriyel olarak kullanım alanı bulmuştur (Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Mansour and Khalil, 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) ve fasulye (Dey, 1984) α -galaktozidazlarının birer glikoprotein oldukları ve genellikle bitkisel kaynaklı, özellikle de tahıl kaynaklı enzimlerin, glikoprotein karakteri gösterdiği 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 -Galaktozidaz enzimleri substrat spesifikliğine göre iki gruba ayrılabilirler: birinci grup düşük polimerizasyon derecesi ile sadece oligosakkaritler üzerinde aktif olan gruptur, örneğin; melibioz, raffinoz, stakiyöz ve galakto (gluko) mannazın küçük bir parçası. Bu enzimler genellikle aril α -galaktozidaz gibi yapay substratlarda aktiftir. İkinci grup polimerik substratlarda aktif olan gruptur. Fakat yine de birinci gruba benzer olarak yapay α -galaktozidazlar kadar kısa oligosakkaritlere derecelenmiş polimerlerin başlıca fragmanlarına atak yapabilir (Dey, 1978).

Bakteriyel α -galaktozidazların çoğu galaktoz içeren farklı oligosakkaritleri hidrolizleyebilmektedir. Ancak bazı *Penicillium* (Dey et al., 1993) ve *Aspergillus* (Bahl and Agrawal, 1969) türleri, *Trichoderma reesei* (Zeilinger et al., 1993) ve *Cyamopsis tetragonoloba*'nın (Overbeeke et al, 1990) polimerik galaktomannaları hidrolizleyebilen α -galaktozidazları ürettikleri belirtilmiştir.

Bazı organizmaların ürettiği α -galaktozidaz aktivitesine sahip enzimlerin genellikle çoklu formda olduğu belirlenmiştir (Ademark et al., 2001). *Penicillium simplicissimum* (Lounteri et al., 1998), *Aspergillus tamarii* (Civas et al., 1984), *Aspergillus niger* (Manzanares et al., 1998), *Saccharomyces cerevisiae* (Naumov et al.,1996) ve *Trichoderma reesei* (Zeilinger et al., 1993, Margolles-Clark et al., 1996) adlı organizmaların farklı substrat spesifikliğine sahip birden fazla α -galaktozidaz ürettikleri literatürde belirtilmiştir.

α -Galaktozidazlarla yapılan klonlama çalışmaları da oldukça büyük bir önem ve hız kazanmıştır. Saflaştırılan enzimin oldukça büyük miktarda üretilmesi 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 çeşitli 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 (Zhu and Goldstein, 1994; Bergkamp et al., 1992; Watkins et al., 1962).

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, 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

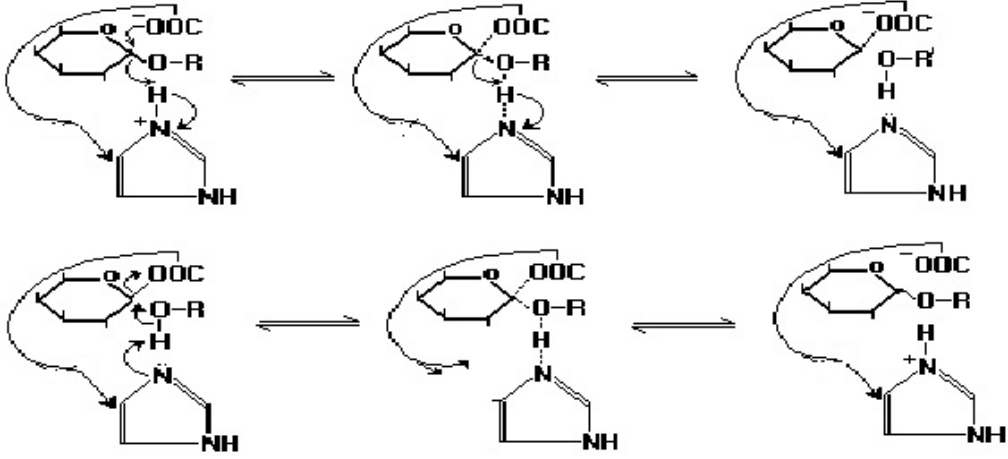
Enzimler spesifik biyokatalizörlerdir. Aktivasyon enerjisini düşürerek geçiş haline varmayı kolaylaştırırlar ve geçiş halinin kararlılığını arttırarak reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimler substrat bağlama merkezlerinin spesifikliği ve katalitik grupların optimal düzenlenişi sayesinde bunu başarırlar. Enzimatik kataliz için asit-baz katalizi, kovalent kataliz, metal iyonu katalizi, çözgen katalizi gibi çeşitli mekanizma tipleri önerilmektedir (Uslan, 1997). Çoğu kaynaktan elde edilen α -galaktozidazların kimyası ve kinetiği hakkındaki bilgilerin yetersizliğinden dolayı α -galaktozidaz etki mekanizmasına ait çok az gerçek bilinmektedir.

α -Galaktozidazlarla ilgili hemen hiç bir bağ kopması çalışması yapılmamıştır. Fakat diğer glikozidazlar düşünüldüğünde, substratın galaktoz-oksijen bağları büyük olasılıkla kopmaktadır. Nükleer 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 nükleofil ile bağlanabilen bir karbonyum iyonu

varsa konfigürasyon korunur. Konfigürasyonun korunması da çok adımlı bir dizi reaksiyondan ibarettir (Mathew and Balasubramaniam, 1987).

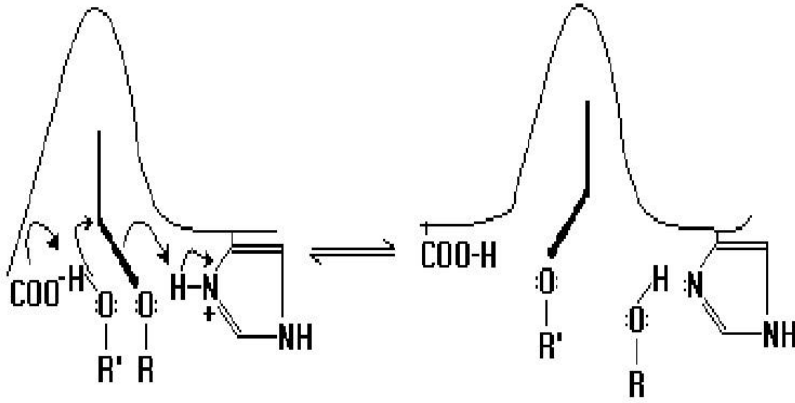
Asit-baz katalizi fumaraz, maltaz, maya invertazı, β -galaktozidaz gibi enzim sistemlerinde etkilidir. Aril- α -galaktozidler ile tatlı badem α -D-galaktozidazında yapılan spesifiklik çalışmaları, aglikonun elektronik yapısının enzimatik hidroliz hızında dikkate değer bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. $\log V_{\max}$, aromatik halka üzerindeki substituentleri Hammett sabitlerine (σ) karşı grafiğe 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 çalışmada p-nitrofenil- α -D-galaktozidin aktif merkeze bağlanmasının asidik bölgedeki grubun pK'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 İki adımlı mekanizma.

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 Tek adımlı mekanizma.

Fenil- α -galaktozidlerinin 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. pozisyonda), 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. *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.

1.1.3 α -Galaktozidazların izolasyonu ve saflaştırılması

Protein olarak 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 en etkili, en hızlı ve en ekonomik proseler 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 enzimi mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kaynaklar seçilerek, bilinen ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilip, saflaştırılmış ve saflaştırılan bu enzimler 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, 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).

α -Galaktozidaz enziminin izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında bitkisel kaynak olarak portakal (Burns, 1990), domates (Önal and Telefoncu, 1998; Pressey, 1984), hindistan cevizi (Lounteri et al., 1998), soya fasulyesi (Porter, 1992), karpuz (Itoh, 1986), kahve tohumu (Weiser, 1992), mercimek (Dey et al., 1983), alacalı at fasulyesi (*Phaseolus vulgaris*) (Dhar et al., 1994), maş fasulyesi (*Vigna radiata*) (Dey, 1984) , hayvansal kaynak olarak insan

plasentası (Kusiak et al., 1978) ve insan karaciğeri (Dean and Sweely, 1979a; 1979b; Alonso et al., 2005), mikrobiyal kaynak olarak *Candida guilliermondii* H404 (Hashimoto et al., 1993), *Pycnoporus cinnabarinus* (Ohtakara, 1984), *Bacillus stearothermophilus* (Talbot and Sygusch, 1990), *Aspergillus niger* (Somari and Balogh, 1993), *Penicillium simplicissimum* (Lounteri et al., 1998), *Mortierella vinacea* (Thanankul et al., 1976), *Escherichia coli* (Nagao et al., 1988), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (Zeilinger et al., 1993; Kristufek et al., 1994), *Candida javanica* (Cavazzoni et al., 1987) ve *Monascus pilosus* (Wong, 1986), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) ve *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1999) kullanılmıştır. Bu kaynaklardan izole edilen α -galaktozidazlar, genellikle tuz çöktürmesi (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 üzere birçok alanda uygulama imkanı bulmuştur (Balasubramaniam and Mathew, 1986; Thanankul et al., 1976).

1.1.4 α -Galaktozidazların fiziksel özellikleri

1.1.4.1 α -Galaktozidazların multimoleküler formları ve molekül kütleleri

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). *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, jel filtrasyonu ile 270 kDa olarak hesaplanmıştır (Hashimoto et al., 1993). *Pycnopus cinnabarinus* α -galaktozidazının molekül kütlesi SDS-PAGE ile 52 kDa, 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 kütesine 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 320 kDa molekül kütesine 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). Çizelge 1.2' de çeşitli kaynaklardan izole edilerek saflaştırılan α -galaktozidazların molekül kütleleri verilmiştir (Önal, 2000).

Çizelge 1.2. Bazı α -galaktozidazların molekül kütleleri.

α -Galaktozidaz Kaynağı	α -Galaktozidaz	Molekül kütlesi(kDa)	Yöntem
<i>Vicia faba</i>	α -Galaktozidaz-I	209	Jel Filtrasyonu
	α -Galaktozidaz-II	38	
<i>Vicia sativa</i>	α -Galaktozidaz-I	166	Jel Filtrasyonu
	α -Galaktozidaz-II	77	
<i>Lens culinaris</i>	α -Galaktozidaz-I	160	SDS-PAGE
	α -Galaktozidaz-II	40	
Portakal	α -Galaktozidaz-I	36,3	SDS-PAGE
	α -Galaktozidaz-II	39,8	
Domates	α -Galaktozidaz-I	44	Jel Filtrasyonu
	α -Galaktozidaz-II	19	
İnsan karaciğeri	α -Galaktozidaz B	90	SDS-PAGE
İnsan plasenta dokusu	α -Galaktozidaz A	103	SDS-PAGE
	α -Galaktozidaz A	117	Jel Filtrasyonu
	α -Galaktozidaz B		

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-gliserol-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 dolayıdır.

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-galaktozidlerin 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, mannanotrioz, 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 hidrasyon derecesini de kapsar.

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

1.1.5.2 α -Galaktozidaz aktivitesi ve kararlılığına sıcaklığın etkisi

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi, enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağımlıdır 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 bağlı olarak çeşitli kararlılık dereceleri gösterirler. Genellikle α -galaktozidazların çoğunun optimum sıcaklık değerleri 37-40°C arasında değişmektedir. Fakat mikrobiyal kaynaklı termostabil α -galaktozidazlar için bu değer 40°C'nin çok üstüne de çıkabilmektedir.

Çizelge 1.3 α -Galaktozidazların substrat şpesifiklikleri (Önal, 2000).

α -Galaktozidaz Kaynağı	α -Galaktozidaz	Substrat	K_m (mM)
<i>Coffea canephora</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galakto piranozid	0,26
<i>Cucurbito pepo</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktozid	1,4
		o-nitrofenil- α -D-galaktozid	1,0
		m-nitrofenil- α -D-galaktozid	2,0
		Rafinoz	36,4
		Stakiyöz	4,5
<i>Colocasia esculenta</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,28
Portakal	α -Galaktozidaz I	p-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,47
	α -Galaktozidaz II	p-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,23
Ananas	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,22
<i>Candida javanica</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	11
<i>Monascus pilosus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,8
<i>Pycnopus cinnabarinus</i>	α -Galaktozidaz	p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	0,31
<i>Candida guilliermondii</i> H404	α -Galaktozidaz I	p-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,6
		o-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,73
		Melibioz	3,6
		Rafinoz	17
		Stakiyöz	11
	α -Galaktozidaz II	o-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,61
		p-nitrofenil- α -D-galaktozid	0,65

Pycnopus cinnabarinus (Ohtakara et al., 1984), *Bacillus thermophilus* (Talbot and Sygusch, 1990), *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, 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 değer rapor edilmiş α -galaktozidazlar arasında en yüksek sıcaklık değeri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, enzimin 100°C’ de bile aktivitesini % 85 koruduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık optimumuna sahip olması ve termostabil olması nedeniyle *T. thermophilus* HB8 α -galaktozidazının yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen 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). Çizelge 1.4’de çeşitli α -galaktozidazların termal kararlılıkları ile ilgili bazı sonuçlar verilmiştir (Önal, 2000).

Çizelge 1.4. α -Galaktozidazların termal kararlılıkları.

α -Galaktozidaz Kaynağı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Aktivite kaybı (%)
<i>Vicia faba</i>	60	30 dk	42
Sığır karaciğeri	55	5 dk	20
<i>Bacillus thermophilus</i>	65	24 sn	30
<i>Candida javanica</i>	60	15 dk	20
	60	15 dk	40
<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	24 sn	20
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	50	60 dk	20

1.1.5.3 α -Galaktozidaz aktivitesi ve kararlılığına pH’in etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden bir diğeri pH’dır. 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, 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 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'ın 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, PNPG ile pH 4,0'de optimum gösterirken pH 4,0-8,0 gibi oldukça yaygın bir aralıkta kararlıdır. Yalnız enzimin düşük pH' larda yüksek pH'lardan 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 optimuma sahiptir (Lounteri et al., 1998). *Citrullus battich* (karpuz) α -galaktozidazına pH'ın etkisi yapay substratlar ve oligosakkaritler kullanılarak incelenmiştir. Yapay substratlardan p-nitrofenil- α -galaktozid ve 4-MU- α -galaktozid kullanıldığında enzimin optimum pH'sı 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 optimum aralığı göstermektedir. Sonuçta karpuz α -galaktozidazının doğal substratları hidrolizlediği ve optimum pH'sının yapay substratlarınkinden daha düşük olduğu belirtilmiştir (Itoh et al., 1986). Çeşitli α -galaktozidazların optimum pH değerleri Çizelge 1.5' de verilmiştir (Önal, 2000).

Çizelge 1.5 α -Galaktozidazların optimum pH değerleri.

α -Galaktozidaz Kaynağı	α -Galaktozidaz	Substrat	Optimum pH
Domates	α -galaktozidaz I	PNPG	5,7
	α -galaktozidaz II		
Ananas	α -galaktozidaz	PNPG	5,5
Portakal	α -galaktozidaz I	PNPG	5,0
	α -galaktozidaz II		4,5
<i>Phaseolus vulgaris</i>	α -galaktozidaz	PNPG	6,4
<i>Lens culinaris</i>	α -galaktozidaz	PNPG	6,1
	α -galaktozidaz	PNPG	4,7
<i>Vigna radiata</i>	α -galaktozidaz	PNPG	5,5-6,0
<i>Citrullus battich</i>	α -galaktozidaz	PNPG	5,8
		4 MU- α -galaktozid	6,0
		Rafinoz	3,5-5,5
		Melibioz	
		Stakiyöz	
Kahve tohumu	α -galaktozidaz	PNPG	6,0
<i>Colocasia esculenta</i>	α -galaktozidaz	PNPG	6,0
<i>Candida guilliermondii</i> H404	α -galaktozidaz I	PNPG	4,5
	α -galaktozidaz II		
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	α -galaktozidaz	PNPG	7,0-7,5
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -galaktozidaz	PNPG	4,5

<i>Aspergillus niger</i>	α -galaktozidaz	PNPG	5,0
<i>Mortierella vinacea</i>	α -galaktozidaz	Melibioz	4,0-6,0
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	α -galaktozidaz	PNPG	4,0
İnsan plasentası	α -galaktozidaz A α -galaktozidaz B	4MU- α -D-galakto- piranozid	4,4
Domuz karaciğeri	α -galaktozidaz	Fenil- α -D-galaktozid	5,2
Fare beyini	α -galaktozidaz	PNP- α -D-galaktozid	4,9
Fare karaciğeri	α -galaktozidaz	2-naftil- α -D-galaktozid	4,0-4,5

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; DeMason 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 galaktozidazları, az da olsa bununla beraber α -(1,1)-, α -(1,2)- ve α -(1,3)- bağlı galaktozidazları, eser miktarda da α -(1,4)-galaktozidazları 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 *Pycnopus 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, 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 artıklarını C3 ve C6 hidroksil gruplarına, sukrozun glukoz artığını C3 hidroksil grubuna transferini katalizler. 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 transglukozilasyon 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 çalışmalarda, 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 çok çok düşük olduğuna karar verilmiştir (Wong et al., 1986).

α -Galaktozidazlar değişik katalitik özellikleriyle çeşitli endüstriyel uygulamalarda yoğun kullanım potansiyeline 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; Gidley et al., 1992; Neustroev et al., 1993; Ibatullin et al., 1993; Takayanagi et al., 1992), enzimatik sentezlerde (Galili et al., 1985; Hashimoto et al., 1993; Cantacuzene and Attal, 1991), transglikolizasyon reaksiyonlarında (Hashimoto et al., 1993; Golubev and Neustroev, 1993; Mitsutomi and Ohtakara, 1988), çeşitli polimerlerin sentezinde (Bulpin et al., 1990) ve hayvanlar ile insanlarda midede gaz oluşumuna neden olan rafinoz oligosakkaritlerin (rafinoz, stakiyöz ve verbaskoz) hidrolizinde (Gaudreault and Webb, 1983; Mansour and Khalil, 1998; Thanankul et al., 1976; Porter et al., 1990; Shivanna et al., 1989; Ohtakara et al., 1984; Somiari and Balogh, 1993) kullanabilecek uygun bir preparattır. Galaktozidazlar değişik katalitik özellikleriyle çeşitli endüstriyel uygulamalarda yoğun kullanım potansiyeline sahiptirler.

Medikal alanda ise α -galaktozidazlar ile 3-O- α -D-galaktopiranozid içeren tip-B eritrositleri O-tip eritrositlere dönüştürebilmektedir (Wong et al., 1986; Maly et al., 1985; Ito et al., 1993). İnsanlarda görülen Fabry hastalığı termolabil lizozomal α -galaktozidaz-A enzimi eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır (Balasubramaniam and Mathew, 1986; Coppola et al., 1994; Ishii et al., 1993). Fabry hastalığı glikosfingolipit metabolizmasının α -Gal A geninde mutasyonundan kaynaklı X-bağlı doğuştan gelen bir hatadır. İki haftada bir sırasıyla 0.2 and 1 mg/kg dozlarıyla verilen iki enzim agalsidase- α (Replagal®) and agalsidase- β (Fabrazyme®) mevcuttur (Topaloğlu et al., 1999, Schiffmann et al., 2000, Germain et al., 2002). α -Galaktozidazların böyle medikal amaçlar için enzim terapisinde kullanılabilecekleri de bilinmektedir (Wong et al., 1986; Balasubramaniam and Mathew, 1986). 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 seramidtrihexozid kullanılarak belirlenir. Enzim eksikliği belirli bir düzeye kadar, seramidtrihexozidin 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 *Coffea canephora* (Haibach et al., 1991) α -galaktozidazları ile de yapılmıştır. A ve B eritrositlerin O-tip eritrositlere dönüşümü ile ilgili olarak Goldstein ve arkadaşları da 20 yıldan beri 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.

Özellikle gıda sanayinde enzimin kullanımı dikkat çekicidir; legüm bazlı gıdaların besin değerini arttırmak için, antinutritiv galakto oligosakkaritlerin (rafinoz ailesi şekerler) ayrıştırılması ve indirgenmesi için (Cristofaro et al., 1974) kullanılabilirler. Pancar sektöründe bu etki melasdan rafinozu ayırmayı kolaylaştırmada ve kristalizasyon ile sukroz verimini arttırmada kullanılır (Kobayashi and Suzuki, 1972). Probiyotik fonksiyonu olan gıdalarda galakto oligosakkaritlerin üretimi α -galaktosidaz enziminin transfer reaksiyonuyla ve transferaz aktivitesiyle sağlanabilmektedir (Rezessy-Szabó et al., 2003).

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 arttırılabilmekte ve aynı zamanda da oldukça önemli bir oranda ekonomi sağlamaktadır (Mitsutomi and Ohtakara, 1984). α -Galaktozidaz melastaki rafinozu hidrolizleyerek kristalize şeker verimini arttırmak amacıyla biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır (Itoh et al., 1986; Slominski, 1994). Biyoteknolojik uygulama alanları nedeniyle α -galaktozidazlar oldukça önemli ve değerli bir enzim grubudur.

α -Galaktozidazlar aynı zamanda ahşap türevi metaryallerin modifikasyonunda da kullanılabilir, çünkü galaktomannazlar ve galaktoglukomannazlar yumuşak ahşaptaki hemiselülozların baş grubudur (Clarke et al., 2000).

1.2 Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Sistemleri

Enzimler canlılardaki biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran suda çözünür spesifik biyokatalizatörlerdir. Canlılardaki öneminin yanı sıra endüstriyel anlamda da büyük öneme sahip moleküllerdir. Özellikle son yıllarda kimya, biyoteknoloji, gıda gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimleri daha kullanışlı ve ekonomik hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir.

Özellikle çok sayıda bileşenden oluşan ham preparatlarda proteinlerin ayırma ve izolasyonu hala oldukça zordur ve bu nedenle günümüzde bu amaçlar için yeni biyoayırma yöntemleri geliştirilmektedir. Mevcut kullanılan geleneksel yöntemlerin çoğu hem oldukça pahalı, hem de zaman alıcıdır. Ayrıca çoğu kez ön işlemlere gereksinim duyulmaktadır. Son elli yıldır, araştırmacılar protein geri kazanımı ve saflaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemlerine ilgi duymaktadırlar. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, yüksek seçicilik ve etkinlik, sürekli işletim modeline uygunluk ve ölçek büyütmenin kolay olması ayrıca düşük maliyet gibi faktörlerden dolayı endüstriyel ayırma sistemlerinin en dikkat çekici olanıdır. Sıvı-sıvı ayırma tekniklerinden olan sulu ikili faz sistemleri (ATPS), üçlü faz ayırma (TPP) sistemleri ve ters misel sistemleri (RMS) biyolojik öneme sahip birçok molekülün ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında etkin bir şekilde kullanılmıştır (Hatti Kaul, 2000; Dennison and Lovrien, 1997; Pires et al., 1996).

Bir sıvının, başka bir sıvı içerisinde dispersiyonu olan ve misel içeren sistemler emülsiyon olarak bilinir. Emülsiyonların özel bir türü olan mikroemülsiyon-ters misel sistemleri (Sun et al., 2005) , termodinamik açıdan kararlı olup, sistem içerisindeki dağılmış sıvı damlacıklarının çapı 100 nm'den küçük ve de görsel olarak homojen görünümlü sistemlerdir. Hidrofilik-hidrofobiklik dengesi, kolloidal dispersiyonların ve kendiliğinden oluşan bir yapının oluşmasında ve oluşan bu yapının kararlılığında önemli rol oynamaktadır. Mikro emülsiyon tekniğinin daha iyi anlaşılabilmesi için emülsiyon ve yüzey aktif madde kavramlarının bilinmesi gerekir. Basit bir tanımlama ile birbiri ile karışmayan en az iki sıvının birbirleri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı

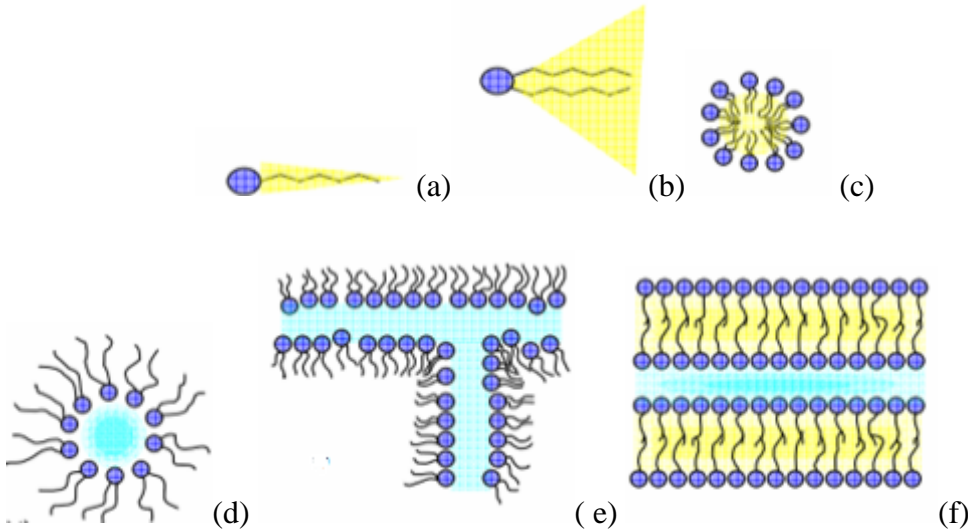
heterojen sistemler emülsiyon olarak adlandırılır (Adachi et al.,1991). Emülsiyonlar üç gruba ayrılır:

Makro emülsiyonlar: En çok bilineni mikroskopla kolayca görülebilen ve partikül büyüklüğü 400 nm (0.4 mm)' den büyük olan opak emülsiyonlardır.

Mikro emülsiyonlar: Partikül büyüklüğü 100 nm (0.1 mm)' den küçük olan saydam dispersiyonlardır.

Mini emülsiyonlar: Partikül büyüklüğü makro ve mikro emülsiyonlar arasında (100-400 nm) olan mavi-beyaz emülsiyonlardır.

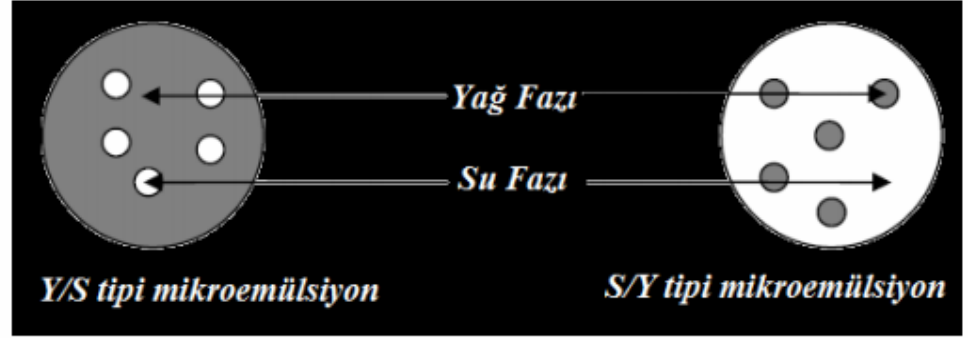
Birbiriyle karışmayan iki saf sıvı bir emülsiyon oluşturamaz. Bir sıvının diğer bir sıvı içerisinde süspansiyon halinde dağılmasıyla elde edilen sistemin emülsiyon olarak nitelendirilebilmesi için sistemi kararlı kılacak üçüncü bir bileşene ihtiyaç vardır. Emülsiyonlar birbiri ile karışmayan en az iki sıvının birbirleri içerisinde surfaktantlar (yüzey aktif madde) yardımıyla damlacıklar halinde dağıldığı homojen görünümlü sistemlerdir. Bu sistemler bir hidrofilik bir de hidrofobik iki fazdan oluşurlar. Bu iki faz, emülsiyonun iç ve dış fazı olarak adlandırılmaktadır. Dış faz sürekli faz olarak da tanımlanır ve iç fazı damlacıklar halinde taşır. Şekil 1.4'te surfaktan şekilleri ve koloidal çözeltide oluşturduğu yapılar verilmiştir.



Şekil. 1.4 Surfaktan şekilleri ve koloidal çözeltideki oluşumlar.

Şekil 1.4'te gösterilen surfaktan şekilleri ve koloidal çözeltideki oluşumlarda (a): tek kuyruklu surfaktan, (b): iki kuyruklu surfaktan, (c):normal misel, (d): ters misel, (e): silindirik oluşumlar, (f): planar lamelli faz'ı ifade etmektedir.

Basit veya klasik emülsiyonlarda en az iki faz bulunur: Eğer yağlı fazın (hidrofobik fazın) damlacıkları su içinde dağılırsa, bu emülsiyona su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu; sulu fazın damlacıkları yağlı faz içinde dağılırsa bu emülsiyona da yağ içinde su emülsiyonu (S/Y) denir (Şekil 1.5). Emülsiyon tipinin hangisi olacağına sistemdeki maddelerin konsantrasyonu, yüzey etkin maddenin yapısı ve üretim işlemleri etki eder (Adachi et al., 1995).



Şekil 1.5 Klasik emülsiyon tiplerinin şematik görünüşü.

Misel ve mikroemülsiyon sistemleri makroskobik homojen ortam olarak görülen sistemler olsa da katalitik reaksiyonlar için yüksek verimli mikroskobik heterojen ortamlardır. Surfaktan sistemleri, reaktantların çözünmesini sağlamak için yüksek kapasiteye sahiptirler. Bu özelliği ile birlikte geniş sıvı-sıvı ara yüzeyi birleşince fazlar arasında hızlı bir difüzyonun olmasını sağlar. Son zamanlarda, termodinamik olarak kararlı bifazik sistemler gibi misel sistemleri ve mikroemülsiyonların uygulamaları, katalitik reaksiyonlar sonucunda çeşitli kimyasalların sentezlenebileceğini göstermiştir.

Ters misel olarak da bilinen yağ içerisinde su mikroemülsiyonu, tek katmanlı yüzey aktif madde ile sağlanmış nanometre boyutundaki su damlacıklarını içeren organik faza verilen addır. pH ve iyon şiddeti ayarlanarak su içeren mikroemülsiyon damlacıkları protein moleküllerini seçici olarak ayırabilmektedir (Stamanis et al., 1999). Böylece mikroemülsiyonlar fermentasyon ortamında yer alan proteinin diğer bileşenlerden sıvı – sıvı ayırma yöntemi kullanılarak ayrılmasını etkileyen bir parametre olarak

kullanılabilmektedir. Bu şekilde bir ekstraksiyon yöntemi enzimin sürekli bir sistemde saflaştırılmasına ve üretim işleminde gereksinim duyulan aşamaların azaltılmasına olanak sağlamaktadır.

1.3 Misel Sistemleri

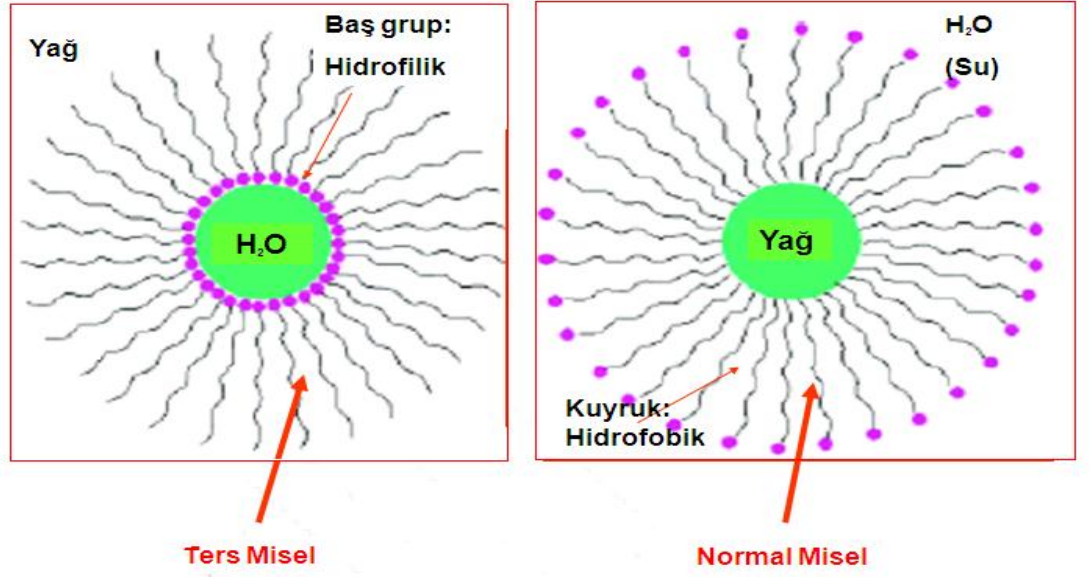
İkili faz arasında yüksek dispersiyon yağ içinde su tipi mikroemülsiyon hazırlanarak elde edilebilir. Bu mikroemülsiyonlar hidratlanmış normal veya ters miseller olup enzim ve suda çözünebilen bileşikleri içeren su damlacıklarıdır. Misel, koloidal çözeltide dağılmış yüzey-aktif (surfaktan) moleküllerin kümelenmiş halidir. Polar gruplarının su içinde çözünmesi ve hidrokarbon kısımların su tarafından itilerek bir arada kümeleşmesi sonucu ortaya çıkan yapıdır.

Miseller basit küresel supramoleküler tanecikler olup, amfifilik moleküller (surfaktanlar) tarafından su veya su benzeri ortamlarda kritik misel konsantrasyonun (CMC) hemen üzerindeki konsantrasyonda oluşur. CMC, misel moleküllerin oluştuğu en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Tipik bir misel, surfaktan molekülünü çevreleyen çözücü ile etkileşim içerisinde olan hidrofilik baş grubu ve misel sisteminin göbeğinde bulunan hidrofobik bir kuyruk kısmından oluşmaktadır. Bu tip misellere normal misel denir ve tanecikler koloidal boyutta olduğu zaman homojenmiş gibi görünür (Motlekar and Bhagwat, 2001; Moroi, 1992; Morrison and Ross, 2002; Everett, 1988).

Miseller sulu ortam içerisindeki reaksiyona eşdeğer bir kimyasal reaksiyonda hızlanmaya veya inhibisyona neden olabilirler. Genel olarak, misel etkisi, bir reaksiyonu hızlandırdığında " misel kataliz" olarak adlandırılır, fakat bu sadece bir yaklaşımdır. Reaksiyon ortamı olarak misel sistemlerinin kullanılmasının en büyük avantajı, katalizör komplekslerinin reaksiyon ortamında, daha birçok işleme gerek kalmadan suda kolay çözünürlük sağlamalarıdır. Misel sistemleri bazı substratlar için sadece düşük miktarlarda çözünür olması ve katalizörün geri kazanımı için uzun zaman gerektirmesi sistemin dezavantajlarındandır.

İki tür misel oluşabilir; normal misel ve ters misel olarak adlandırılırlar. Normal misel oluşumunda hidrofilik baş kısım sulu fazla etkileşime girerken, hidrofobik kısım organik fazla etkileşim içerisindedir. Ters misel oluşumunda ise, hidrofobik kısımlar organik faz ile etkileşim içerisindeyken, hidrofilik baş

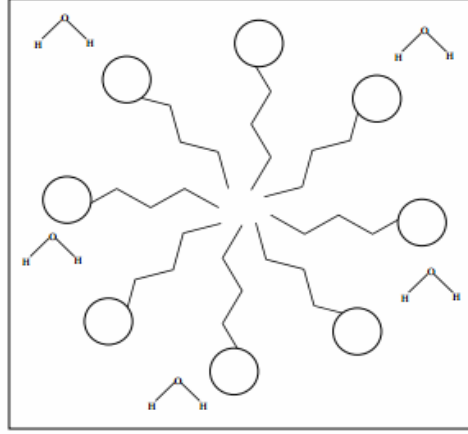
kısımları misel kümesinin içerisine doğru yönelip sulu faz ile etkileşime girmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Ters misel ve normal miselin şematik gösterimi.

1.3.1 Normal misel sistemleri

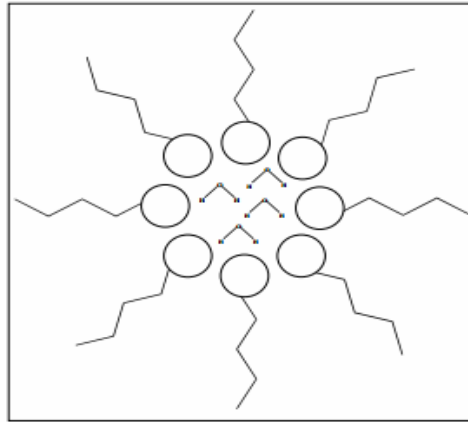
Sulu çevrede, surfaktanlar agregatlaşabilir. Bu agregatlarda iç merkezde apolar sıvılar bulunurken merkezin dışı polar çözücülerle çevrilidir. Polar çözücü ve içteki apolar çözücü kümesi arasında surfaktanlar sıralanmıştır. Surfaktanların hidrofobik kuyruğu içe doğru ve hidrofilik baş grupları da miselin dışına doğru yönelmiştir. Normal misel Şekil 1.7'de gösterilmiştir (Attwood, 1983; Pramauro and Pelizzetti, 1996).



Şekil 1.7 Normal miselin şematik gösterimi.

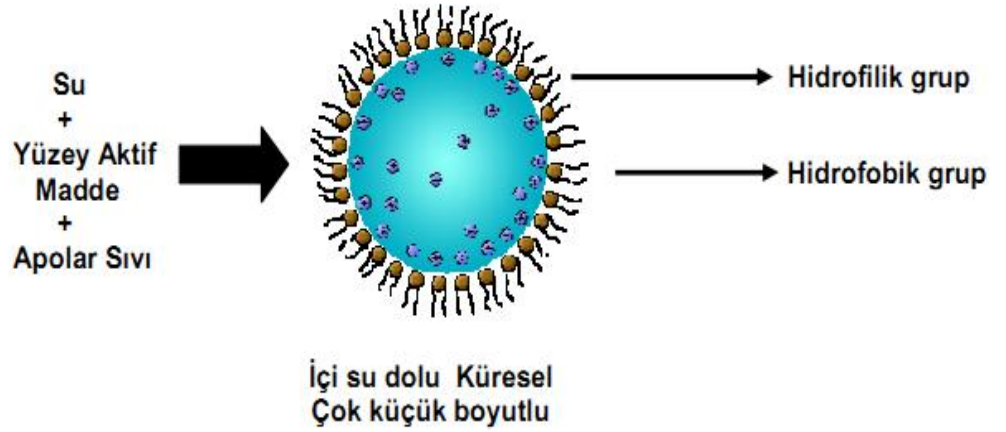
1.3.2 Ters misel sistemleri

Enzimlerin ve/veya proteinlerin ters misel uygulamaları yaklaşık 30 yıl önce başlamış ve zamanla enzimoloji alanında özel bir araştırma konusu haline gelmiştir. İlk yıllarda özellikle biyoteknoloji, biyoorganik sentez ve suda çözünmeyen substratların transformasyonu üzerinde durulmuştur. Ters miseller organik çözücü içinde bulunan, surfaktan tarafından sabitlenmiş su damlacıklarını ifade eder (Şekil 1.8 ve 1.9). Sulu çekirdek, çeşitli hidrofilik çözücüler, biyoaktif maddeler gibi biyoteknolojinin ihtiyacına yönelik biyoayırma ve biyodönüşüm için güvenli bir ortam sağlar (Hinze, 1994;. Jean and Ache, 1978; Luisi et al., 1988; Grandi et al., 1981; Orlich and Scchomacker, 2002).



Şekil 1.8 Ters miselin şematik gösterimi.

Ters misel sisteminde iki ya da daha fazla bileşiğin ya da grubun, tek basamaklı ekstraksiyon ile ayrımı gerçekleştirilir. İki sıvı fazın farklı fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, bu sistemler tek bir ekstraksiyonla iki ya da daha fazla bileşiğin ayrımının yeni olasılıklarını sunmaktadırlar. Konveksiyonel bir biçimde "salting out", izoionik çöktürme, yardımcı çözügenle çöktürme ve osmotik ve kosmotropik çöktürme gibi pek çok tekniği içeren prensipleri ortaklaşa çalıştıran bir biyoayırma tekniğidir. Ters misel sistemi çok geniş kullanım alanı olan yeni sıvı-sıvı biyoayırma tekniklerden birisidir. Bu sistem özellikle enzim ve proteinlerin ayrımında son yıllarda oldukça başarılı bir şekilde kullanılabilen basit ve çoğu kez tek adımlı bir prosedürdür. Bu yöntemde, özel ekipmanlara, yüksek sıcaklık ve basınca gerek duyulmamakta, proste hem tek tepkime hem de birden fazla tepkime kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Teknik kromatografik yöntemlerin zahmetli ve zaman alıcı prosedürlerine de ihtiyaç duymaz. Ayrıca proste elde edilen taneciklerin şekli, büyüklüğü ve kristal yapısı deneysel parametreler ile kontrol altında tutulabilmektedir. Özetle ters misel sistemleri, seçicilik, esneklik, az işlem basamakları içermesi ve düşük enerji tüketimi gibi avantajlara sahip olduğundan özellikle biyokimyasal proseslerde tercih edilen bir ayırma prosesidir (Thien and Hatton, 1988).



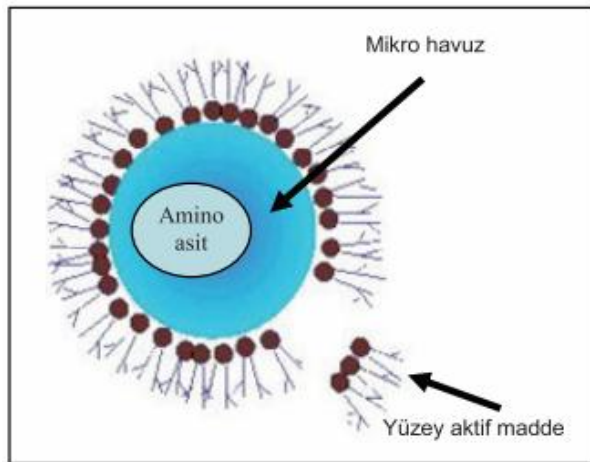
Şekil 1.9 Ters misel sistemi.

Son yıllarda ters misel sistemleri özellikle, amino asitler ve proteinleri seyreltik çözeltilerinden ayırmakta diğer yöntemlere alternatif bir ayırma yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Lye et al., 1995; Kilikan et al., 2000; Gupta et al., 1994; Krei et al., 1992).

Apolar bir çözücü içinde, nanometre büyüklüğünde dağılmış yüzey aktif madde küreciklerine ters misel denir (Şekil 1.9). Ters misel sistemleri tekniğinde

sulu çözeltilerden protein ve enzimleri ayırmak deneysel yöntemlerle optimum şartları belirlenmiş sulu faz ve organik faz kullanılır. Bu küresel yapıların içi sulu mikro havuz içerir ve polar olan amino asit, enzim, protein gibi maddeleri çözer. Bu sulu mikro havuz biyoaktif maddelerin denatüre olmadan çözünmesine ve doğal yapısını korumasına izin verir. Ayrıca ters misel sistemindeki bu havuz organik çözen içinde çözünmeyen maddelerin eşit bir şekilde dağılımını da sağlamaktadır (Krishna et al., 2002; Luisi et al., 1988).

Ters misel sistemlerle ayırma, yüklü bileşikler haline gelebilen maddeler için daha uygundur. Bu yöntemle ayırmada, elektrostatik kuvvetler etkindir ve ayırmayı yüzey aktif maddeler sağlar (Krei and Hustedt, 1992). Yüzey aktif maddenin seçimi, ayırmak istenen amino asit veya proteinin özellikleri dikkate alınarak yapılmaktadır. Amino asitler veya proteinler izoelektrik noktalarından düşük pH' larda katyonik, yüksek pH' larda anyonik, izoelektrik noktalarında ise nötral özellik göstermektedir. Amino asitler ve proteinler Aerosol OT (AOT) gibi anyonik yüzey aktif maddelerle düşük pH' larda ayrılırken, setil trimetilamonyum bromür (CTAB) gibi katyonik yüzey aktif maddelerle yüksek pH' larda ayrılırlar. Bu özellik temel zıt yükler birbirini çeker prensibine dayanmaktadır. Ayrıca bazı yüzey aktif maddeler (aliquat-336, dodmac gibi) kararlı bir ters misel sistemi oluşturabilmek için eş yüzey aktif maddeye (hekzanol, 1-dekanol vb.) ihtiyaç duymaktadır (Changand Chen, 1995; Hilhorst et al., 1995). Eş yüzey aktif maddeler, amino asitlerin veya proteinlerin ters misel fazına ilgisini arttırabilirler ve sistemin kararlılığını sağlarlar (Boyadzhiev and Atanassova, 1991; Ichikawa, 1992; Hossain, 2000).



Şekil 1. 10 Ters miselin oluşumu.

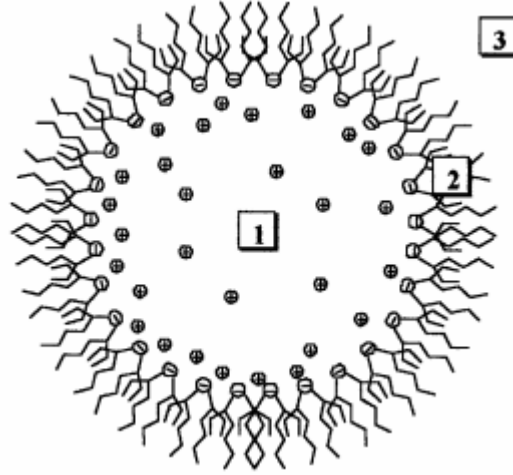
Ters misel sistemlerinde fazlar arası protein dağılımı ve ayırma işlemini etkileyen ve farklılandıran parametreler surfaktan tipi ve konsantrasyonu, organik çözügen türü ve konsantrasyonu, proteinin moleküler ağırlığı, izoelektrik noktası ve fiziksel koşullar (sıcaklık, pH gibi) olarak sayılabilir.

Ters misel sistemleri; proteinlerin sulu çözeltisine, tuz (genellikle potasyum klorür) ve bir organik çözügen (genellikle AOT/izooktan) eklenmesiyle oluşur (Liu et al., 2004; Mathew and Juang, 2005; Kelley et al., 1993; Sun et al., 2008; Talukder et al., 2007; Motlekar and Bhangwat, 2001). Ham ekstrakta önce iyon şiddeti ayarlanmış uygun pH'da tampon eklenir ve ardından organik çözügen eklendikten saniyeler veya duruma göre saatler sonra iki faz oluşur. Organik faz olarak adlandırdığımız üst faz misellerin olduğu fazdır. Bu faz sistemden ayırmak istediğimiz molekül özelliklerine göre ya atılır ya da bu faza geri ekstraksiyon uygulanır. Alt faz tuzca zengin faz olup polar bileşenleri içerir ve yine molekül özelliklerine göre ayırtılmak istediğimiz molekülü ya da dışlanan molekülleri içerir. Bu faz ya atılır ya da analizlenir. Orta faz ise genellikle iki faz arası bozunmuş molekülleri içermektedir ve filmsi ya da bulutsu diye nitelendirilebileceğimiz görünüme sahiptir. Orta faz çözündürülüp analizlenebilir fakat genel olarak analiz sonuçlarında kayda değer bir aktivite gözlenmez (Carvalho and Cabral,2000; Matzke et al., 1992; Lee and Chong, 2011; Pires et al., 1996, Tonova and Lazarova, 2008).

Biyomoleküllerin optimum dağılımını sağlayan verimli bir proses için optimizasyon çalışmalarına gerek duyulur. Bunun için genellikle; tuz türü ve konsantrasyonu, organik çözügen türü, protein miktarının organik çözügene oranı, pH ve sıcaklık gibi parametrelerin sisteme etkisi incelenir.

Ters misel sistemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilebilen ayırma sistemleridir (Regalado et al. 1994; Pileni et al., 1985; Marcozzi et al., 1991; Philips et al., 1991). Teknik oldukça ekonomik olup ölçek büyütme de mümkündür. Ters misel sisteminde kısmi saf protein preparatlarının yanı sıra ham protein ekstraktları da kullanılabilir. Elde edilen saflaştırma katı ve verim genellikle yüksektir.

Ters miseller organik çözücü içinde bulunan, surfaktan tarafından sabitlenmiş su damlacıklarını ifade eder ve organik çözücü içerisinde sulu bir mikroçevre oluşturarak proteinlerin ve diğer hidrofilik moleküllerin organik fazda çözünmesini sağlarlar. Sulu çekirdek, çeşitli hidrofilik çözücüler, biyoaktif maddeler gibi biyoteknolojinin ihtiyacına yönelik biyoayırma ve biyodönüşüm için güvenli bir ortam sağlar (Tonova and Lazarova, 2008; Pires et al., 1996;). Ters miseller dinamik bir yapıya sahiptirler, birbiriyle çarpışırlar ve bazen de içeriklerini değiştirirler. Bu bulgular ters misellerin karışan ve su, surfaktan ve diğer materyaller açısından içeriği değişen dinamik bir yapı olduğunu göstermektedir. Bu özellikleri, etkili bir kütle transferi süreci açısından büyük bir öneme sahiptir (Şekil 1.11).

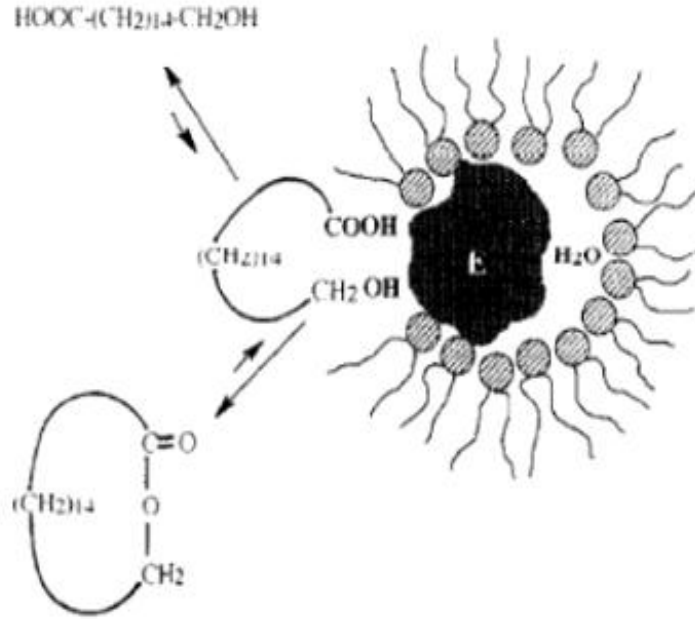


Şekil. 1.11 Anyonik surfaktan ile oluşturulmuş tek bir ters miselin yapısı ve bölgeleri.

Şekil 1.11’de gösterilen ters misel anyonik surfaktanlar tarafından oluşturulmuş bir ters miseldir ve 2 bölgesinde gösterildiği gibi negatif yüklü surfaktanlar küresel bir bölge yani 1 bölgesini oluşturarak katyonik molekülleri bu havuzda su ile birlikte toplamışlardır. 3 ile gösterilen bölgede bu miselin bulunduğu organik faz’ı ifade eder.

1.3.3 Ters misel sistemlerinin kullanım alanları

Ters misel sistemleri; enzimatik kataliz için reaksiyon sistemi olarak, protein saflaştırma ve ekstraksiyonunda (Aires-Barros and Cabral, 1991; Armstrong and Li, 1988; Chang and Chen, 1995), protein yapı analizi için mikroçevre oluşturmada (Andrews et al., 1994; Cardoso et al., 1998), protein geri kazanımı için (Carlson and Nagarajan, 1992; Hashimoto et al., 1998) kullanılabilirler. Birçok durumda biyomoleküler ters misel içinde gelişmiş aktivite gösterdiğinden dolayı biyosentez için de tercih edilebilir. Ayrıca birçok kimyasal reaktantlar su içerisinde düşük çözünürlüğe sahiptir ya da hiç çözünmezler; bu çözünürlüğü sağlamak ya da yükseltmek için de ters misel sistemleri kullanılabilir. Ters miseller nanoreaktor olarak da kullanılabilir. Örneğin uzun zincirli lakton üretiminde (parfüm metaryalleri olarak kullanılır) sulu çözeltiden ziyade ters misel sistemiyle üretimi tercih edilir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Ters misel sisteminde 16-hidroksi hegzadekonik asitin lipaz katalizli reaksiyonu.

1.3.4 Ters misel sistemlerinin avantajları

Ters misel sistemleri kromatografik yöntemlerin zahmetli ve zaman alıcı prosedürlerine ve teknik donanımına ihtiyaç duymaz. Proteinlerin salting out, izoionik çöktürme, çözgenle çöktürme ve ozmolitik ve kozmotropik çöktürme gibi ilkelerin bütününe içermektedir. Proteinin ayrımını hedef alan bu yöntem hidrofilitik ve moleküler kütle gibi fiziksel koşullardan etkilenmesine rağmen, kolaylıkla büyük ölçeklere ve doğrudan ham ekstraktlara uygulanabilir. Gerek büyük ölçeklere uygulanabilirliği gerekse maliyetinin diğer yöntemlere göre düşük olması sebebiyle son yıllarda ters misel sistemleri sıklıkla tercih edilen bir biyoayırma tekniğidir. Bu yöntemde; özel ekipmanlara, yüksek sıcaklık ve basınca gerek duyulmamakta, proseste hem tek tepkime hem de birden fazla tepkime kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca proseste elde edilen taneciklerin şekli, büyüklüğü ve kristal yapısı deneysel parametreler ile kontrol altında tutulabilmektedir. Son yıllarda ters misel sistemler, aminoasitleri ve proteinleri, seyreltik çözeltilerinden ayırmakta sıkça kullanılan ve diğer yöntemlere alternatif bir ayırma yöntemi olarak dikkat çekmektedir. Ters misel sistemleri, seçicilik, esneklik, az işlem basamakları içermesi ve düşük enerji tüketimi gibi avantajlara sahip olduğundan özellikle biyokimyasal proseslerde tercih edilen bir ayırma prosesidir (Thien and Hatton, 1988; Tonova and Lazarova, 2008; Paradkar and Dordick, 1993).

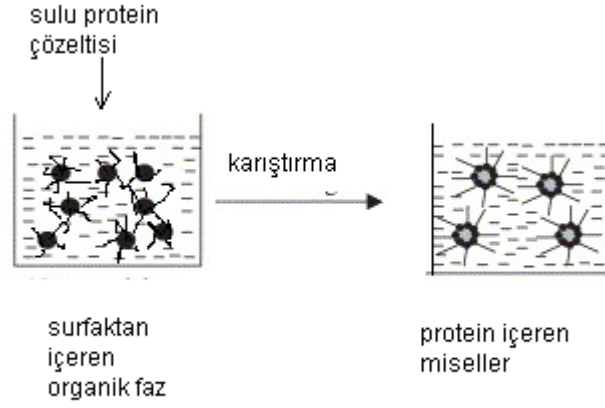
1.3.5 Ters misel sistemlerinin hazırlanması

Proteinler ve/veya enzimler ters misellerin içerisine 3 yolla alınabilir (Luisi, 1985; Cabral and Carvalho; 2000):

1. Enjeksiyon yöntemi
2. Dissolusyon yöntemi
3. Faz transfer yöntemi

Enjeksiyon yöntemi (Sulu protein çözeltisinin direkt enjeksiyonu) :

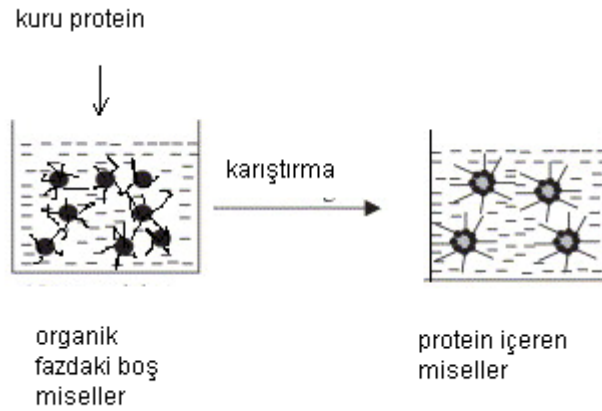
Bu yöntemde düşük miktarda protein, surfaktan içeren organik çözeltiliye kuru ya da hafif sulandırılmış olarak enjekte edilir (hacim oranları şartlara göre belirlenir). Görsel olarak berraklaşınca kadar sistem karıştırılır (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 Enjeksiyon yöntemi.

Dissolusyon yöntemi (Kuru proteinin ortama eklenmesi) :

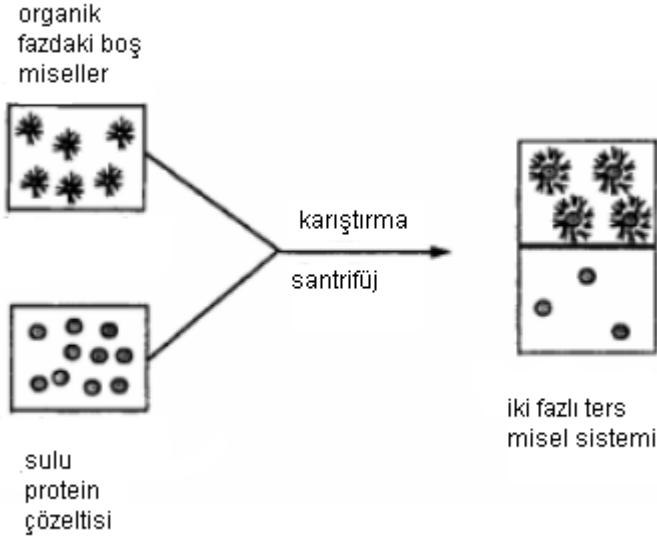
Surfaktan içeren organik çözeltiliye önce yeterli miktarda sulu faz ve sonrasında protein eklenerek karıştırılır, fazla protein ve çözünmeyen maddeler santrifujlenerek uzaklaştırılır. Ardından tekrar belirli miktar protein eklenir, yöntem birçok kez ardışık olarak tekrar edilir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14 Dissolusyon yöntemi.

Faz transfer yöntemi:

Bizim de çalışmamızda seçtiğimiz bu yöntem Luisi ve arkadaşlarının geliştirdiği bir yöntemdir (Luisi et al., 1985). İki fazlı bu sistemler proteinin ara yüzeyler arasında eş zamanlı transferine dayanır. Genel olarak eşit hacimde sulu faz ve organik faz kullanılır (Şekli 1.15). Sistemin dengeye ulaşması günler alabildiği gibi dakikalar içinde de tamamlanabilir. Enzimin ara yüzeyle etkileşmesi durumunda enzim inaktive olabilir.



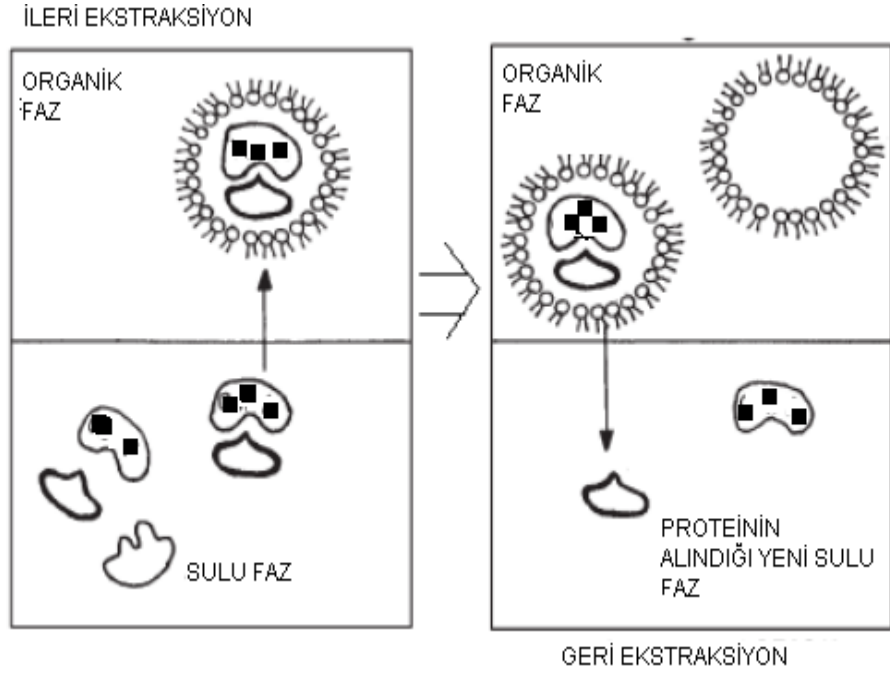
Şekil 1.15 Faz transfer yöntemi.

Genel olarak enjeksiyon yöntemi ve disolusyon yöntemi biyokatalitik uygulamalarda kullanılır. Faz transfer yöntemi ise protein ekstraksiyonunda tercih edilir (Matzke and ark., 1992; Luisi, 1985; Cabral and Carvalho; 2000).

1.3.6 Ters misellerin faz transfer yöntemi ile hazırlanması

α -Galaktozidaz enziminin biyoayırımında kullanılacak olan ters misellerin hazırlanmasında faz transfer yöntemi kullanılmıştır. Faz transfer yönteminde önce ileri ekstraksiyon yapılır. İleri ekstraksiyon için surfaktan ve organik çözücü içeren bir organik faz hazırlanır. Ardından da tampon, protein ve tuz içeren sulu faz hazırlanarak (genellikle eşit hacim oranında) üzerine eklenir. Uygun ortam

koşulları sağlandıktan sonra sistemde iki faz oluşur. Bu iki fazın arasında da genellikle filmsi bir yapı vardır. Üst faz organik fazdır ve miselleri içerir, genel olarak geri ekstraksiyon ile misel içindeki hedef moleküller misel dışına çıkarılmaya çalışılır. Alt faz ise sulu fazdır ve genellikle istenmeyen molekülleri içerir (Şekil 1.16). Bazen hedeflenen biyomolekül alt fazda kalmayı tercih ederek diğer moleküller misel fazına gönderilir (Noh and Imm, 2005). Bu çalışmada da α -galaktozidaz enzimi ters misellerin bulunduğu üst faz yerine alt fazda kalmayı tercih etmiştir. Üst ve alt fazların arasında oluşan filmsi faz atılır.



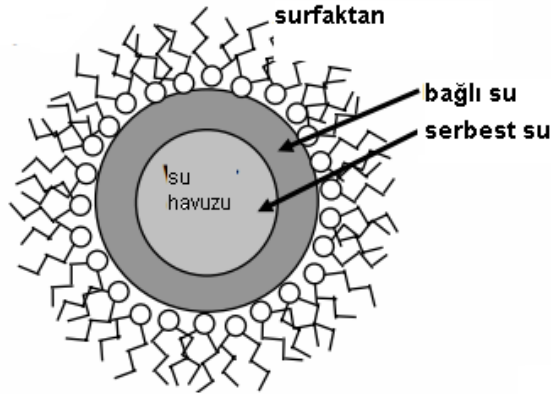
Şekil 1.16 Faz transfer yönteminde ileri ve geri ekstraksiyon adımları.

1.3.7 Fazlar arası protein transferini etkileyen faktörler

Misel içeren organik faz ve sulu faz arasındaki protein dağılımı büyük ölçüde sulu fazın özelliklerine bağlıdır; pH, iyonik şiddet ve tuz türü. Sürfaktanın çeşidi ve konsantrasyonu, ko-sürfaktan varlığı ve çözücü türü gibi organik fazla ilgili özellikler de protein dağılımını etkiler. Bunların dışında iki fazı da ilgilendiren sıcaklıktaki değişimler de biyomoleküllerin çözünürlüğünü etkiler. Ayrıca fazlar arası transfer proteinin spesifik karakterlerine de bağlıdır; izoelektrik nokta, şekil ve büyüklük, hidrofobisite ve yük dağılım gibi (Pires et al., 1996; Noh and Imm, 2004; Lee and Chong, 2011).

pH: Sulu çözeltinin pH'ı proteinin net yüküne karar verir. Protein ile surfaktan grupları arasındaki elektrostatik etkileşim proteinin organik faza transferini destekler (Chong and Chen, 1994; Hasmann et al., 2001) Bu eğilim, surfaktan grubu ile proteinin zıt yüklerde olmasıyla gerçekleşir. İzoelektrik noktanın altında yani protein pozitif yüklü iken protein negatif yüklü surfaktan (anyonik surfaktan) ile etkileşir ve organik faz içindeki misele transfer gerçekleşir. İzoelektrik nokta üzerinde yani protein negatif yüklü iken anyonik surfaktan ile etkileşim olmaz ve transfer gözlenmez dolayısıyla katyonik surfaktan kullanılmalıdır. Tabi bu hedeflenen molekülünün misel içine girmesi sağlamak içindir (Zhou and Weng, 2006; Goklen and Hatton, 1985 ; Hilshort et al., 1992). İzoelektronik noktanın altında yani protein pozitif yüklü iken katyonik surfaktan kullanılır ki surfaktanla hedeflenen proteinimiz etkileşmesin. Ayrıca izoelektronik noktanın üstünde yani protein negatif yüklü iken negatif yüklü surfaktan kullanılarak yine protein ile surfaktanın etkileşimi engellenir. Özetle anlattığımız prensibe dayanarak çalışma tipine göre, protein özelliklerine ve surfaktan çeşidine göre pH ayarlaması yapılmalıdır. Aynı zamanda bu ayarlamayı yaparken çok düşük ve çok yüksek değerlere çıkılmamaya özen gösterilmelidir ki protein denatüre olmasın (Pires et al., 1996).

Ters misel boyutu: Ters misel içindeki su genellikle ikiye ayrılır; birincisi surfaktan tabakasına bağlanmış su (damlacık çekirdeğindeki, organik çözüldüdeçözünmüş su) , ikincisi surfaktan tabakasına bağlanmamış serbest sudur (Şekil 1.17).



Şekil 1.17 Ters miselde suyun yerleşimi.

Sabit sıcaklıkta damlacık boyutunu belirleyen tek parametre W_0 değeridir (Hai and Kong,2008).

$$W_0 = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{surfaktan}]$$

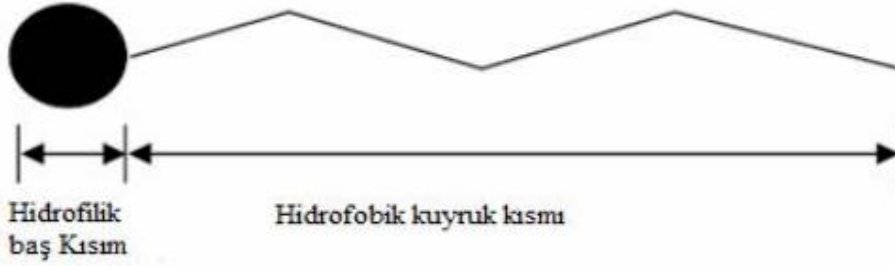
Düşük W_0 değeri, tüm su moleküllerinin surfaktanla hidratlaştığını, mikroçevrenin daha sabit, sert olduğunu ve surfaktan karşıt iyonlarının surfaktan tabakasına bağlı olduğunu gösterir. W_0 arttıkça serbest su bir çekirdekten diğerine rahatlıkla geçebilir. Misel boyutu proteinin üç boyutlu yapısını etkiler. Proteinler ters misellerin ara yüzeyinde çözünebilir, azalan W_0 değeriyle tersiyer ve sekonder yapıları değişebilir. Daha çok hidrofilik özellik gösteren proteinler ise miselin merkezinde yani su havuzunda çözünür düşük W_0 değeriyle sadece tersiyer yapıları değişir. Proteinin miselde bulunduğu bölge ve misel boyutu protein yapısını etkilediği gibi geri kazanım ve aktivitenin iyileştirilmesinde önemlidir (Hai and Kong, 2008).

İyonik şiddet: İyonik şiddetin artmasıyla birlikte sulu faz elektrostatik etkileşimleri azalmaktadır, bu etki büyük iyonlar için daha güçlüdür. Bu nedenle, daha yüksek bir iyonik güçte, hidrofilik biyomoleküller ve surfaktan polar grupları arasındaki etkileşimler azalır ve küçük miseller oluşur. Sulu faz yüksek iyon şiddetine sahip olduğunda yüklü surfaktan grupları birbirine iyice yaklaşır ve küçük boyutta ters misel elde edilir. Bu misel boyutu değişikliğinden dolayı protein miselin su havuzundan dışlanabilir. Bu özellik geri ekstraksiyonun temellerinden birini oluşturur. Sonuç olarak, sulu çözeltinin iyon şiddetinin artmasının etkisiyle organik fazda oluşan miseldeki suda çözünen biyomoleküllerin çözünme kapasitesi azalır (Hatton, 1989; Kelley et al., 1993; Lu et al., 1993; Pires et al., 1996; Sun et al., 1998).

Ters miselli iyonik ikili sistemlerde iyon türleri ters misel içine giriş için yarış içindedir ve bu misel ile proteinin elektrostatik durumunu belirler, daha çok yüksek iyonik şiddet koşullarında meydana gelir. Sulu fazın iyon şiddeti belli bir değer altındayken ters misel faz ayrımı gerçekleşmez. Bu nedenle fazlar arası protein transferi sulu çözeltinin minimum bir iyonik şiddete sahip olmasıyla gerçekleşir. Ayrıca sulu çözelti tamponlanmış ise içerdiği elektrolit iyon şiddeti

için gerekli içeriği sağlayabilir (Yan et al., 1997; Pires et al., 1996; Hatton et al., 1989; Noh and Imm, 2005).

Surfaktan çeşidi ve konsantrasyonu: Surfaktanlar ya da yüzey aktif maddeler farklı nonpolar ve polar bölgelere sahip moleküllerdir (Şekil 1.18) hem hidrofilik bir baş gruba hem de lipofilik (hidrofobik) kuyruk kısmına sahip, amfifilik moleküller olarak da tanımlanabilirler. Genellikle hidrofilik kısmı sülfonat, sülfat ve fosfonat gibi gruplar içerirken, hidrofobik kısımları ise hidrokarbon zincirlerinden oluşur. Tipik bir surfaktan molekülünün, hidrofobik ve hidrofilik kısımları Şekil 1.18’de gösterilmiştir. Surfaktan moleküllerinin apolar kuyruğu tipik olarak 8 veya daha fazla karbon atomundan oluşan bir hidrokarbon zinciridir. Surfaktan yük çeşitleri anyonik, katyonik, zwitteriyonik ve non iyoniktir. Çalışmamızda ters misel eldesinde kullandığımız surfaktanlar AOT ve CTAB surfaktanlarıdır. Bu surfaktan molekülleri birçok biyomolekülün ayrımı ve saflaştırılmasında etkin bir şekilde kullanılmıştır (Liu and ark., 2004; Mathew and Juang, 2005; Kelley et al., 1993; Sun et al., 2008; Talukder et al., 2007; Dong et al., 2008; Shen et al., 2005; Hasmann et al., 2001; Zhang et al., 2000; Motlekar and Bhangwat, 2001).



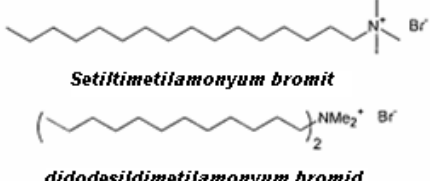
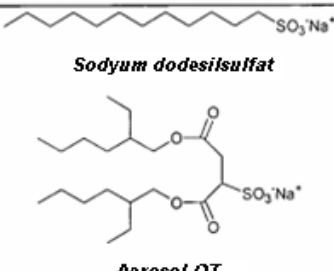
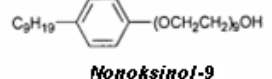
Şekil 1.18 Surfaktan molekülünün şematik gösterimi.

Polar veya iyonik kısmı, güçlü dipol-dipol veya iyon-dipol etkileşimlerine sahip su molekülleri tarafından çevrelenmiştir. Bu durumdan dolayı da buna hidrofilik baş kısım denmektedir. Hidrokarbon kısmı, sulu çözelti içerisindeki su molekülleri ile minimum seviyede bir etkileşime sahip olduğundan, surfaktan moleküllerinin hidrokarbon kısmı hidrofobik kuyruk kısmı olarak nitelendirilmektedir. Ayrıca, dispersiyon kuvvetleri ve hidrojen bağından

kaynaklanan su molekülleri arasındaki güçlü etkileşimler, hidrokarbon kısmı su molekülünden uzaklaştırmaya çalışmaktadır.

Organik fazda artan yüzey aktif madde konsantrasyonu proteinin çözünürlüğünü artırır. Diğer yandan yüksek surfaktan konsantrasyonu proteinin ikinci bir faza geri ekstraksiyonunu zorlaştırır. Bu nedenle, iki fazlı ekstraksiyonda protein transferinde optimuma ulaşmak için minimum organik faz kullanılıp maksimum transfere ulaşılmalıdır. Uygun surfaktan seçilerek ters miselin protein için seçiciliği sağlanır. Örneğin; küçük proteinlerin düşük konsantrasyonda surfaktan seçimi ile ters misele girişi büyük proteinlere göre daha kolaylaştırılmış olur (Lee and Chong, 2011) .

Surfaktan Türleri: Surfaktanlar molekülün hidrofobik bölümü içerisindeki etkileşime göre aşağıdaki (Şekil 1.19) gibi sınıflandırılmaktadır (Yang et al., 2008; Lee and Chong, 2011).

<p>Katyonik surfaktan</p>	 <p>Setilimetilamonyum bromit</p> <p>didodesildimetilamonyum bromid</p>
<p>Anyonik surfaktan</p>	 <p>Sodyum dodesilsulfat</p> <p>Aerosol OT</p>
<p>Noniyonik surfaktan</p>	 <p>Nonoksiol-9</p>

Şekil 1.19 Surfaktan sınıflandırılması.

Genellikle surfaktanların tümünde uzun hidrokarbon zinciri gibi birbirine benzer hidrofobik kuyruk kısmı bulunurken, hidrofilik kısımları birbirinden farklılık göstermektedir.

- a) Anyonik Yüzey Aktifler: Bir lipofilik hidrokarbon grubu bir veya iki hidrofilik grupla bağlantılı olan yüzey aktif maddelerdir. Çözelti içinde bir negatif iyon bir de pozitif yüklü iyon verecek tarzda disosiyasyona uğrarlar. Anyonik kısım yüzey aktif özellik gösterir. Üretimleri ucuz olduğundan özellikle deterjan endüstrisinde oldukça çok kullanılırlar. Bizim de çalışmamızda kullandığımız AOT (Aerosol-OT, bis(2-etil-1-hegzil)sodyumsülfosüksinat) anyonik bir yüzey aktif madde olup, ters misel oluşumunda ve biyomoleküllerin ayırımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu et al., 2004; Mathew nd Juang, 2005; Kelley et al., 1993; Sun et al., 2008; Talukder et al., 2007).
- b) Katyonik Yüzey Aktifler: Bir lipofilik hidrokarbon grubu, bir veya birden fazla hidrofilik grup ihtiva ederken, çözelti içinde katyon ve anyon halde çözünürler. Katyonik kısım yüzey aktif özellik gösterir. Islatıcı, tekstilde yumuşatıcı ve korozyon önleyici olarak yoğun olarak kullanılırlar. Örnek olarak, tetraalkilamonyum klorür (QAC) verilebilir. Bunun dışında bizim de çalışmamızda kullandığımız setil trimetil amonyum bromür (CTAB) katyonik yüzey aktif madde olup sıklıkla literatürde kullanılmıştır (Shen, 2005; Dong et al., 2008; Shen et al., 2005; Hasmann et al., 2001; Zhang et al., 2000).
- c) Noniyonik Yüzey Aktifler: İyonik olmayan bu moleküllerin iyon olmayan grubunda çoğunlukla çok sayıda oksijen, azot veya kükürt atomları vardır. Bu tipteki moleküller suda çözünen kısmında hidroksil gruplar veya bir polioksi etilen zinciri içerebilir. Çözelti içinde iyonlarına ayrılmayan bir şekil sergilerler. Su molekülleri ile H bağı yapmaları hidrofilitiklerinin derecesini gösterir. Proteinlerin yüksek elektrostatik etkileşimler yüzünden deaktive olması sonucu geliştirilmişlerdir. Örnek olarak; Tween 85, Span 60, TX 100 verilebilir (Sawada, 2004; Ichikawa et al., 2000; Shing, 2006).

Bu surfaktan türlerinin yanı sıra değişik surfaktan türleri de geliştirilmektedir. Bu türlere örnek olarak karışık surfaktanlar ve affinite bazlı surfaktanlar verilebilir.

Karışık surfaktanlar: İyonik misellerde protein deaktivasyonu olabilir. Non-iyonik misel kullanımı sonucunda ise düşük ekstraksiyon verimi ve düşük seçicilik gözlenebilir. Bu yüzden iyonik ve noniyonik surfaktanları karıştırma yoluna gidilmiştir. Örneğin; Tween 80 ile AOT karışımı, AOT-DOLPA ve CTAB-TRPO karışımları gibi (Fan et al., 2001; Goto et al., 1998; Shen, 2005).

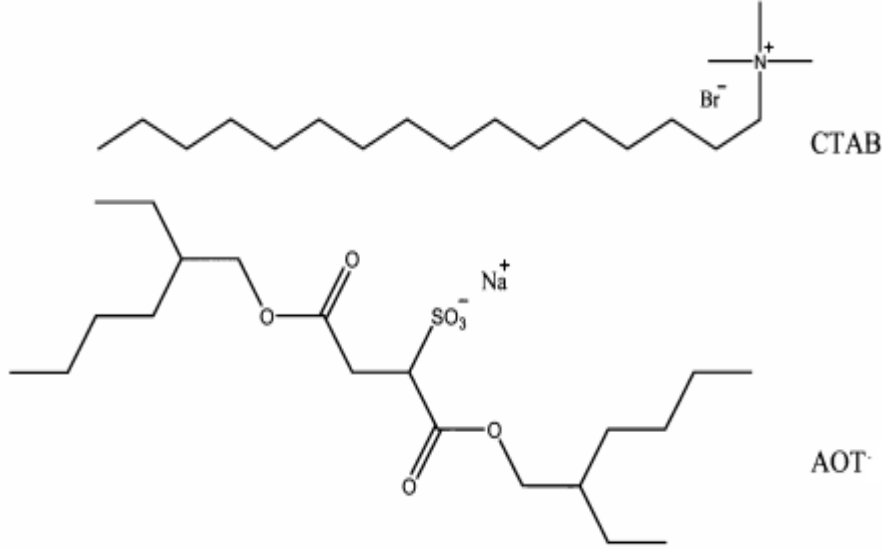
Affinite bazlı surfaktanlar (ARMES): Ters misel sistemlerinde protein ekstraksiyonunun seçiciliğini arttırmak için affinite ligandları organik faza eklenebilir (Liu et al., 2008). Örnek olarak; konkanavalin A'nın ters misele transferi oktil beta-D-glikopiranın) organik faza ilavesiyle artırılmıştır (Woll et al., 1989).

Farklı tip surfaktan ve surfaktan sistemleri kullanılarak çeşitli biyomoleküllerin ayırımı başarıyla gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6 Farklı tabanlı ters misel sistemi örnekleri (Lee and Chong, 2011).

Ters Misel Sistemleri	Surfaktan Örnekleri	Ekstraksiyonun Yürütücü Kuvveti
İyonik surfaktan bazlı ters miseller sistemleri (Liu J., 2004; Shen, 2005)	AOT; CTAB	Elektrostatik etkileşim
Non-iyonik surfaktan bazlı ters misel sistemleri (Sawada, 2004, Ichikawa et al., 2000, Shing, 2006)	Tween 85; Fosfolipitler; TX-100	Hidrofobik ve H-bağı etkileşimleri
Karışık surfaktan kullanımlı ters misel sistemleri (Fan, Ouyang; Wu and Lu, 2001; Goto et al., 1998, Shen, 2005)	AOT-Tween 80; AOT-DOLPA; AOT-OPE4; CTAB-TRPO	Elektrostatik etkileşim baskın olmak üzere ek olarak hidrofobik ve H-bağı etkileşimleri
Affinite bazlı ters misel sistemleri (Liu et al., 2008)	Cibacron modifiye lesitin; Antibadi ligantlaşmış AOT	Protein ve affinite ligantı arasındaki ilgi

Çalışmamızda α -galaktozidaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırmasında kullanılacak olan ters misel sisemlerinin hazırlanmasında iyonik surfaktanlardan AOT ve CTAB kullanılmıştır. Bu surfaktanların kimyasal yapıları Şekil 1.20’de verilmiştir.



Şekil 1.20 AOT ve CTAB surfaktanlarının kimyasal yapısı.

Diğer faktörler: Organik çözügen çeşidinin ters miselin boyutunu dolayısıyla miselin su çözme kapasitesini etkilemesi, ko-surfaktant eklenmesinin organik fazın çözünme kapasitesini arttırabilmesi, sıcaklığın değiştirilmesinin ters misellerin fizikokimyasal özelliklerini etkilemesi, sıcaklığın yükselmesi proteinin organik fazdaki çözünürlüğünü arttırması gibi etkiler de gözlenmektedir (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7 Çeşitli faktörlerin ters misel sistemlerine etkisi (Lee and Chong, 2011).

Faktör	Ters misel sistemi ve protein	Sonuç
Ters misel sisteminin su içeriği (W_0) ve protein	AOT, BSA	<ul style="list-style-type: none"> Tüm proteini çözmek için minimum W_0 gerekmektedir. AOT ters misellerinin çapı ve viskozitesi W_0'ın artmasıyla artmaktadır Miselin içindeki protein miselin yarıçapını önemli oranda etkilememektedir.
Sulu fazın pH'ı ve iyonik şiddeti	AOT, BSA, KCl, NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂	<ul style="list-style-type: none"> W_0 değeri MgCl₂ çözeltisinin pH'ından bağımsızdır. Fakat KCl ve CaCl₂ çözeltisinin konsantrasyonunun artması W_0 'ı düşürür. NaCl konsantrasyonunun artması ise protein verimini artırır.
Surfaktan konsantrasyonu	DODMAC, Lizozim	<ul style="list-style-type: none"> DODMAC konsantrasyonunun lizozim enzimi ekstraksiyonu üzerine etkisi ihmal edilebilir düzeydedir. Ara fazdaki çökeltme sebebiyle lizozim ekstraksiyonunda verim düşmüştür.
Ko-surfaktan çeşidi	AOT, Beta laktoglobulin, Alkol, karboksilik asit	<ul style="list-style-type: none"> Geri ekstraksiyon verimi alkol ve karboksilik asit varlığına bağlıdır. Bu ko-surfaktanların eklenmesi verimi arttırmıştır.

1.3.8 Fazlar arası protein transferi yöneten yürütücü kuvvetler

Çok sayıda proteinle ters misel çalışması yapılmıştır ancak hala ileri ve geri ekstraksiyon basamakları tam olarak aydınlatılmamıştır (Çizelge 1.8). Genel olarak surfaktan ile proteinin zıt yüklerinin elektrostatik etkileşimiyle ekstraksiyonun gerçekleştiği kabul edilmektedir. Elektrostatik etkileşimin yanında hidrofobik etkileşim ve iyon çiftleşme mekanizması gibi başka yürütücü kuvvetler de mevcuttur.

Ters misel sistemiyle ekstraksiyon da faz transfer yöntemi başlıca iki basamaktan (ileri ve geri ekstraksiyon) oluşur. İleri ekstraksiyon boyunca bazı moleküller organik fazdaki ters misellere geçer. Bu işlem sonucunda eğer ters misel içindeki molekül hedeflenen bir molekülse bunun geri alınımı için biyomolekülün ikinci bir sulu faza transferi yani ters misel içinden çıkarılması amaçlanır (Brandani et al.,1996). Fazlar arası transfer bir takım etkileşimler tarafından yönetilmektedir. Bu etkileşimler yürütücü kuvvetler olarak adlandırılır ve 3 sınıf altında toplanır (Hong et al., 2000):

1. Yüklü surfaktan baş grubu ile biyomolekül arasındaki elektrostatik etkileşim
2. Surfaktanın hidrofobik kuyruğu ile biyomolekül ve çözünen arasındaki hidrofobik etkileşim
3. Ters misel boyutundan kaynaklanan sterik etkileşim

Çizelge 1.8 Ters misel sistemleriyle ekstrakte edilen proteinler (Pires et al., 1996).

Protein	pI	Surfaktan	MW(Da)
Albumin	4,6	AOT	65000
Alkol Dehidrogenaz	5,7	TOMAC	68000
Alkalin proteaz	9	TOMAC; AOT	33000
α -Amilaz	4,6	TOMAC; CTAB; BDBAC; CPB; CPC; AOT	55000
Karbonik anhidraz	4,4	DDAB	31000
α -Kimotripsin	6,0	AOT; TOMAC	25000
Sitokrom b5	4,4	CTAB; AOT	13000
Sitokrom c	9,4	DDAB; Tweeb 85/Span 85; AOT	12000
Sitokrom c3	5,2; 7,0; 10,2	AOT	13000
Elastan	7,6	AOT	25000
Flavodoksin	3,7	TOMAC	15000
Hemoglobin	4,4-5,4	TOMAC	60000-64000

Hekzokinaz	4,6-4,0	TOMAC	100000
Tripsin inhibitor	4,5	TOMAC	24500
İnsulin	4,6	TOMAC	12000
Lipaz A	3,6	AOT	120000
Lipaz B	6,3	AOT	30000
Lizozim	11,0	AOT; TOMAC	14400
Parvalbumin	4,3	TOMAC	12000
Pepsin	<1,0	TOMAC	34000
Peroksidaz	5,6	TOMAC	40000
Renin	4,6	AOT	43000
Ribobukleaz A	6,7	DDAB; TOMAC	13700
Robredoksin	3,2	TOMAC	5000
Superoksit dismutaz	4,3	TOMAC	14500
Tripsin	9,4	AOT; TOMAC	25000

1.3.9 Geri ekstraksiyon

Genellikle ters misel sistemlerinde ileri ekstraksiyondan sonra hedeflenen protein ya da koşullara göre istenmeyen moleküller organik faza yani ters misele geçer. Eğer hedeflenen moleküller organik faza geçmiş ise bir sonraki adım proteinin ters miselden geri kazanımıdır, bu da ikinci yeni bir sulu faza ekstraksiyonla (Geri ekstraksiyon) olur (Lee and Chong, 2011; Zhang et al., 1999). Geri ekstraksiyonda genellikle misel çapının küçültülmesi için tuz konsantrasyonunun ya da sıcaklığının arttırılması gerekir. Bazı durumlarda da proteini misel içinden çıkartmak mümkün olmaz; bu da proteinle surfaktan arasındaki yüksek hidrofobik etkileşimden kaynaklanır. Bu durumda, hidrofobik etkileşimi bozmak için polar alkollerin kullanılması önerilir (Daliya and Juang, 2007).

2. MATERYAL ve METOD

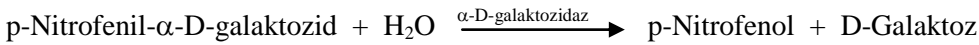
2.1 Materyal

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

Kullanılan kimyasal maddeler; p-Nitrofenil- α -D-galakto-piranozid (PNPG), Sitrik asit, Borik asit, p-Nitrofenol, Amonyum sülfat, NaOH, HCl E. Merck (Darmstadt-FRG) 'den, Sığır Serum Albümini (Albümin Fraksiyon V), Coomassie-Brilliant Blue Bio-Rad Laboratuvarları (Richmond CA) ve BDH Ltd. (Poole, UK) 'den temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan α -galaktozidaz enzimi mısırdan (*Zea Mays*) izole edilmiştir. Enzim kaynağı olarak kullanılan mısır Fethiye'nin Üzümlü kasabasından temin edilmiştir. Ters misel eldesinde kullanılan sodyum di(2-etilhegzil)sülfosüksinat (AOT), 2,2,4-Trimetilpentan (izooktan) ve setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) ve 1-hekzanol Sigma Chem. Co (St. Louis, USA)'den temin edilmiştir.

2.2 α -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini (PNPG ile)

α -Galaktozidaz aktivitesi, 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 sitrat tamponu (50 mM, pH 6,0) ve 0,25 ml PNPG (2 mM ve pH 6,0 sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 0,25 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı, 37°C'de 30 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda (SBS-35, Stuart Scientific, UK) çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon, 3,5 ml sodyum borat tamponu (200 mM, pH 9,8) ilave edilerek durdurulur. Açığa çıkan p-nitrofenol miktarı, 400 nm'de absorbans okunarak (Pharmacia LKB, Novospec II, UK) spektrofotometrik olarak belirlenir.

Enzim aktivite miktarlarının hesaplanmasında, 0,01-0,50 μmol p-nitrofenol konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanıldı.

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

2.3 Protein Tayini

Protein miktarlarının tayini Bradford (Bradford, 1976) metodu ile gerçekleştirilmiştir. 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 albümininin (BSA), distile suda hazırlanmış 1 mg/ml'lik stok standart çözeltisinden 0,02-0,25 mg/ml konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Bradford Reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue G250 %95'lik 50 ml etanolde çözülür. Üzerine 55 ml %88(w/v)'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlanır ve filtre edilir. 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 standart grafiği (0,02-0,2 mg/ml BSA standartları) kullanılarak hesaplanır.

α -Galaktozidaz enziminin izolasyonu ve ters misel sistemleri ile saflaştırılması sırasında gerekli protein tayinleri bu yöntemle göre yapılmıştır.

2.4 Mısırdan α -Galaktozidaz Enziminin İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

α -Galaktozidaz (EC. 3.2.1.22) enzim kaynağı olarak, ülkemizde kolay bulunabilen, ekonomik ve yüksek oranda enzim aktivitesi içeren mısır (*Zea mays*) seçilmiştir. α -Galaktozidaz ile ilgili birçok çalışmada enzim başta mikrobiyal kaynaklar olmak üzere bitkisel ve hayvansal kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma metodları kullanılarak izole edilip, saflaştırılarak, fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada, daha sonraki amacımıza uygun bir protein preparatı hazırlamak için α -galaktozidaz enzimi önce geleneksel tekniklerle mısırdan izole edilerek kısmi olarak saflaştırıldı. Kısmi saf protein preparatı ters misel sistemlerinde α -galaktozidaz enziminin ayırımında ve saflaştırılmasında kullanılmak üzere uygun koşullarda (-20°C) saklandı. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulandı.

Çalışmamızda Fethiye'nin Üzümlü kasabasından temin edilen yeni hasat yaş ve kuru mısır α -galaktozidaz kaynağı olarak kullanıldı. Yapılan ön denemeler sonucunda bu kaynakların enzim aktivitesi ve protein miktarları açısından farklı olmadığı belirlendi. Ayrıca, yaş mısırın koçanından zor ayrıldığı, posasının çok olması ve temin edildikten sonra işleninceye değin soğukta saklanması gerektiği için çalışmanın devamında enzim kaynağı olarak kuru mısırın kullanılmasına karar verildi. 220 g kuru mısır önce öğütücü ile öğütülerek un haline getirildi, ardından üzerine 340 ml 50 mM pH: 6 sodyum sitrat tamponu eklenerek ıslatıldı. Bu suspansiyon önce bir blender (Braun, Almanya) ve ardından homojenizatör (Silverson STL2) yardımı ile homojenize edildi ($V=400$ ml). Homojenat, mısırın kendi yapısından gelen lif ve artıkları uzaklaştırılması amacı ile tülbent bezinden süzülerek filtre edildi. Filtrat (262 ml) 10000 rpm 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk santrifüjlendi (Hettich 30RF, FRG) . Santrifüjatta aktivite (0,024 U/ml) ve protein miktarı (4,21 mg/ml) tayini yapılarak spesifik aktivite (0,006 U/mg) belirlendi. Daha sonra santrifüjatta % 85'lik Amonyum sülfat çöktürmesi yapıp gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Örnek 10000 rpm 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk santrifüjlendi ve amonyum sülfatlı enzimatik aktivite için çökelek ayrıldı. Çökelek uygun hacimdeki sitrat

tamponu (50 mM, pH 6.0) ile çözüldükten sonra gece boyu +4⁰C’de yine aynı tampona karşı diyalizlendi. Diyaliz basamağında diyaliz tamponu ilk bir saat sonunda ve sonrasında birkaç kez değiştirilerek örnek gece boyunca +4⁰C’de diyalize bırakıldı. Diyalizatın aktivite (1,170 U/ml) ve protein miktarı (24,32 mg/ml) tayinleri yapılarak spesifik aktivitesi (0,048 U/mg) hesaplandı. Mısırdan kısmi olarak saflaştırılan α -galaktozidaz preparatı daha sonra ters misel sistemleri ile saflaştırma işlemlerinde kullanılmak -20⁰C ’de üzere derin dondurucuda (Uğur, Nazilli) saklandı. Hazırlanan enzim preparatı hem α -galaktozidaz aktivitesi hem de protein miktarı açısından ters misel sistemleri ile saflaştırma işlemi açısından uygun bir preparattır.

2.5 Mısır α -Galaktozidazının Ters Misel Sistemi ile Saflaştırılması

Ters misel sistemleri 15 ml ’lik tüpler içerisinde hazırlandı. Sistemde surfaktan olarak sodyum di(2-etilhegzil)sülfosüksinat (AOT) ve setildimetilamonyum bromür (CTAB) kullanıldı. Sistemde organik fazın sulu faza oranı 1:1 (v/v) olarak sabit tutuldu. İleri ekstraksiyon basamağında sulu enzim çözeltisi AOT tabanlı sistemde 1 mg protein ve 50 mM pH 6.0 sitrat tamponu, CTAB tabanlı sistemde ise 0,5 mg protein ve 50 mM pH 6.0 sitrat tamponu içermektedir. Organik faz oluşturulmasında AOT tabanlı misel sistemi için 50 mM AOT içerecek şekilde izooktanda hazırlanmıştır. CTAB tabanlı misel sistemi için de organik faz 15 mM CTAB içerecek şekilde izooktan:1-hekzanol; 1:1, v/v çözeltisiyle hazırlanmıştır. Her iki sistem 5 dakika orbital karıştırıcıda 300 rpm’de karıştırıldı. Etkin faz ayırımının sağlanması için sistem 4000 rpm ’de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Alt sulu faz ve ara faz ayrılarak aktivite ve protein miktarı açısından analizlendi. Bu çalışmada, hedef α - galaktozidaz enziminin baskın bir şekilde alt sulu fazda kaldığı ve istenmeyen proteinler üstteki organik fazda bulunan miseller içerisinde gönderildiği için tek adımlı bir proses olarak enzimin saflaştırılması gerçekleştirildi. Böylelikle geri ekstraksiyonun zahmetli ve zor adımlarına da ihtiyaç duyulmadı. Ara fazda herhangi bir aktivite gözlenmedi ve atıldı. Katyonik surfaktan olarak CTAB’ın kullanıldığı bir çalışmada lizozim enzimi benzer bir şekilde alttaki sulu fazda kalmıştır. İleri ekstraksiyondan sonra istenmeyen proteinler organik faza yönelmiştir (Noh and Imm, 2005).

α - Galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak olan AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemlerini optimize etmek ve böylelikle enzimi iyi bir verimle yüksek oranda saflaştırmak için sistemi ve sistemde ileri ekstraksiyonu

etkileyen temel parametreler (pH, iyon şiddeti, surfaktan konsantrasyonu, protein miktarı ve faz oranı) incelendi. Bu parametrelerin analizinde tüm denemeler oda sıcaklığında iki kez gerçekleştirildi. Her misel sistemi için enzim içermeyen uygun kör sistemler hazırlandı. Sistemin optimizasyonunda kullanılan koşullar aşağıda ilgili bölümde detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Optimize edilen koşullarda saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı ve enzimin biyokimyasal özellikleri belirlendi.

2.6 Ters Misel Sistemlerinde İleri Ekstraksiyonun Optimizasyonu

2.6.1 pH

Sıvı-sıvı ayırma sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımını etkileyen önemli parametre pH'dır. pH, hedef proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne, kontaminant yüzey karakteristiğine etki eder. Böylelikle de fazlar arasındaki dağılımın farklılaşmasına neden olur (Mohammadi et al., 2007). AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemlerinde α -galaktozidaz enziminin dağılımına pH'ın etkisinin belirlenmesi için sistemin pH'sı 3.0-10.0 aralığında değiştirilmiştir. Bunun için 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 3.0-6.5), sodyum fosfat tamponu (pH 6.0-8.0) ve glisin/NaOH tamponu (pH 9.0-10.0) kullanılmıştır. Sistemde CTAB (15 mM) ve AOT (50 mM) konsantrasyonları, enzim miktarı (AOT tabanlı ters misel sistemi için 1mg, CTAB tabanlı ters misel sistemi için 0,5 mg) ve sulu fazın organik faza oranı (1:1, v/v) sabit tutulmuştur. Her bir deneme uygun kör hazırlanarak çift çalışılmıştır.

2.6.2 İyon Şiddeti

Ters misel sistemlerinde dağılımda etkili olan bir diğer parametre iyon şiddetidir. Çünkü iyonik şiddetteki değişimler ters misel boyutuna etki eder ve ayırmanın etkinliği değişir. Bu nedenle, iyon şiddetinin enzim ayırımı ve dağılımında etkisini belirlemek için CTAB tabanlı ters misel sistemlerinde 25-250 mM ve AOT tabanlı ters misel sistemlerinde 25-125 mM KCl çözeltisi kullanıldı. Sistemlerde CTAB (15 mM) ve AOT (50 mM) konsantrasyonları, enzim miktarı (AOT tabanlı ters misel sistemi için 1 mg, CTAB tabanlı ters misel sistemi için 0,5 mg) ve sulu fazın organik faza oranı (1:1, v/v) ve pH (CTAB surfaktanı içeren

ters misel sistemi için pH 4.5 ve AOT surfaktanı içeren ters misel sistemi için ise pH 6.0) sabit tutulmuştur. Her bir sette uygun kör hazırlanarak denemeler çift çalışılmıştır.

2.6.3 Surfaktan konsantrasyonu

Surfaktan konsantrasyonu da ters misel sistemlerinde misel boyutunu ve proteinin çözünürlüğünü değiştirerek ayırma etkinliğini farkedirir bir parametredir. Surfaktan konsantrasyonunun enzim ters misel sisteminde dağılımına etkisinin incelenmesi amacıyla CTAB tabanlı sistemde 5-200 mM ve AOT tabanlı sistemde 25-200 mM surfaktan konsantrasyonları ile çalışıldı. Ters misel sistemlerinde enzim miktarı (AOT tabanlı ters misel sistemi için 1 mg, CTAB tabanlı ters misel sistemi için 0,5 mg), sulu fazın organik faza oranı (1:1, v/v) ve pH (CTAB surfaktanı içeren ters misel sistemi için pH 4.5 ve AOT surfaktanı içeren ters misel sistemi için ise pH 6.0) sabit tutuldu. Farklı surfaktan türü ve konsantrasyonları ile hazırlanan sistemler için uygun kör sistemler hazırlanmış ve ayırma işlemleri iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş.

2.6.4 Protein miktarı

α -Galaktozidaz enziminin ayırımı ve saflaştırılmasında kullanılacak olan CTAB ve AOT tabanlı ters misel sistemleri için uygun pH, iyon şiddeti ve surfaktan konsantrasyonu belirlendikten sonra sulu faz içerisindeki protein miktarları farkedirir olarak ayırım gerçekleştirildi. Bunun için AOT tabanlı ters misel sisteminde 0.05-2 mg ve CTAB tabanlı sistemde 0.005-5 mg protein miktarları ters misel sisteminin hazırlanmasında kullanılacak olan sulu faz içerisine eklendi ve ters misel sistemleri oluşturularak enzimin dağılımı izlendi. Tüm protein miktarı ile ilgili optimizasyon denemeleri her bir ters misel sistemi için hazırlanan uygun kör kullanılarak iki set halinde gerçekleştirildi.

2.6.5 Faz oranı

Faz oranı, ters misel sisteminde kullanılan sulu faz ve organik fazın hacimsel oranlarıdır. AOT tabanlı ters misel sistemi için 1:1; 1:2; 2:1; 1:3; 3:1 , CTAB ters misel sistemi için 1:1; 1:1,5; 1,5:1; 1:2; 2:1; 1:3; 3:1 faz oranları kullanılarak her bir misel sistemi için optimize edilen koşullarda protein dağılımı gerçekleştirildi. Uygun kör sistemler hazırlanarak çift çalışıldı.

2.6.6 Ölçek büyüme

Sıvı-sıvı ayırma tekniklerinden birisi olan ters misel sistemlerinde ölçek büyütmek mümkün olduğundan endüstriyel anlamda kullanılabilir bir tekniktir.

Optimizasyon basamağında AOT ve CTAB temelli ters misel sistemleri için 1:1 faz oranının (sulu faz : organik faz, v/v) protein ayırımında etkin olduğu belirlendikten sonra sistem toplam hacmi 2, 4, 6, 8 ve 10 kata çıkarılarak ölçek büyüme çalışmaları yapıldı. Her bir sistem için uygun bir kör hazırlandı ve her bir set iki kez çalışıldı.

2.7 Ters Misel Sistemi ile Mısır'dan Saflaştırılan α -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu

Surfaktan olarak katyonik bir surfaktan olan CTAB ve anyonik bir surfaktan olan AOT kullanılarak hazırlanan ters misel sistemleri ile optimize edilen ileri ekstraksiyon koşulları kullanılarak mısırdan saflaştırılan α -galaktozidaz enzimlerinin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, enzim aktivitesine bazı parametrelerin (pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, efektör türü gibi) etkisi incelenerek kararlılık (pH, , termal ve depo) testleri yapıldı.

2.7.1 α -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi

2.7.1.1 Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

Sıcaklık enzimlerin katalitik aktivitesi için önemli bir parametredir. Belirli çalışma koşullarında enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir.

Ters misel sistemleri ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazlarının aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi ve enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için 4-60°C sıcaklık aralığında (4, 25, 30, 33, 37, 40, 43, 45, 47, 50, 60°C) çalışıldı. Enzim aktivitesi bu sıcaklık değerlerinde standart aktivite tayin yöntemi ile ölçüldü ve sıcaklık-aktivite grafiğinden enzimlerin optimum sıcaklığı belirlendi. Her bir ters misel sistemi için deney seti çift çalışıldı.

2.7.1.2 pH 'ın enzim aktivitesine etkisi

Enzim aktivitesine etki eden önemli bir diğer parametre de ortamın pH'sıdır. Enzimatik reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleştiğinden dolayı pH enzimin yük durumunu dolayısıyla da aktivitesini etkiler. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH optimum pH'dır. Mısır α -galaktozidaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisinin incelenmesi ve enzimin optimum pH'sının belirlenmesi için standart aktivite tayin yönteminde enzimler pH 3.0-6,5 aralığındaki sodyum sitrat tamponu (50 mM), pH 6,0-8,0 aralığında sodyum fosfat (50 mM) tamponu ve pH 9,0-10,0 aralığındaki glisin/NaOH tamponunda (50 mM) 4°C 'de 30 dakika inkübe edildi ve geriye kalan aktivitesi tayin edildi. pH-aktivite profili oluşturularak enzimin optimum pH'sı belirlendi. Her bir ters misel sisteminde her bir pH değeri için iki deney seti hazırlandı.

2.7.1.3 Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

α -Galaktozidaz enziminin sentetik substratı olan PNPg'nin enzim aktivitesine etkisi incelendi. Substrat doygunluk konsantrasyonu belirlenerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu amaçla, 10 mM stok PNPg'den çıkılarak farklı substrat konsantrasyonları ile (0.05-2.5 mM) enzim aktivitesi standart koşullarda tayin edildi. Substrat konsantrasyonuna [S] karşı aktivite (V) grafiğinden substrat doygunluk konsantrasyonu belirlendi. $1/[S]$ ile $1/V$ arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramından kinetik sabitler (K_m ve V_{max}) hesaplandı. Her bir ters misel sistemi için iki deney seti hazırlandı

2.7.1.4 Efektör türünün enzim aktivitesine etkisi

Enzimin aktivitesi yalnızca fiziksel etmenlerden değil kimyasal etmenlerden de etkilenmektedir. Bu etkiler aktiviteyi artırıcı (aktivasyon) veya azaltıcı/yok edici (inhibisyon) yönde olabilir. α -Galaktozidaz enziminin aktivitesine çeşitli kimyasallar ($FeCl_3$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $CuSO_4$, KCl , $NaCl$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, Na_2CO_3) ve şekerlerin (Galaktoz, Glukoz, Sükroz, Fruktoz, Laktoz, Maltoz, Melibioz, Rafinoz) etkileri incelendi. Metaller ve şekerlerin ortamdaki konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde aktivite tayin ortamına ilave edildi. Standart koşullarda tüm örnekler iki kez çalışılarak aktiviteleri tayin edildi.

2.7.1.5 D-Galaktozun enzim aktivitesine etkisi ve inhibisyon kinetiğinin belirlenmesi

Bölüm 2.7.1.4'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen efektör türü ile ilgili çalışma sonunda D-galaktozun α -galaktozidaz enzimi için yüksek oranda inhibisyona neden olduğu görüldü. Bu nedenle D-galaktoz'un inhibisyon etkisinin ve inhibisyon tipinin belirlenmesi amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarında ve farklı D-galaktoz konsantrasyonları ile enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Substrat konsantrasyon aralığı 0,05-2,5 mM ve D-galaktoz konsantrasyonu 1-10 mM olacak şekilde deney setleri hazırlandı ve enzim aktivitesi belirlendi. Çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından kinetik parametreler (K_m , V_{max} ve K_I) hesaplandı ve inhibisyon tipi belirlendi.

2.7.2 Kararlılık testleri

Enzim preparatlarının kararlılığı belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Enzimlerin kararlılığı denilince genellikle proteinin konformasyonel kararlılığından söz edilir. Enzimin termal, pH ve depo kararlılıkları büyük ölçüde konformasyonel kararlılığı ile belirlenir ve denaturasyon sonucu da inaktivasyon gerçekleşir. Bir enzimin kararlılığı; sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, substratın varlığı, ve yokluğu, enzim konsantrasyonu, inkübasyon zamanı, aktivatör ya da inhibitörlerin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak değişim gösteren önemli bir parametredir. Çünkü enzimler oldukça karmaşık yapıya proteinlerdir. Enzimin üç boyutlu yapısına etki edecek bir faktör enzimin aktivitesini de etkiler (Telefoncu, 1997).

2.7.2.1 Termal kararlılık

Enzimler protein yapıda oldukları ve ısıya karşı kararlı olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağımlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulsa bile yalnız inkübasyon süresinin uzaması bile denatürasyon sonucu aktivite kaybına neden olur (Önal, 2000). Özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacak olan ters misel enzim preparatlarının kararlılıkları izlenmesi gereken en önemli parametrelerdendir.

Termal kararlılık tayininde, enzimin 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (4, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80°C) inkübe edilmesinden sonra

standart aktivite ölçüm koşullarında aktivite tayinleri yapıldı. Her bir enzim için sıcaklık denemelerinde örnekler çift çalışıldı.

Ön inkubasyon süresine bağımlı termal kararlılık çalışmasında enzimler önce 37°C ve 50°C'de farklı süreler (5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 ve 180 dakika) inkübe edildi ve ardından geriye kalan aktiviteleri standart aktivite tayin koşullarında ölçüldü. Her bir süre için çift örnek ve bir kontrol deneme gerçekleştirilmiştir.

2.7.2.2 pH kararlılığı

Ortam pH 'sının enzim aktivite ve kararlılığına etkisini incelemek amacı ile düzenlenen deney setinde enzim, 50 mM sodyum sitrat, sodyum fosfat ve glisin/NaOH tamponlarında farklı pH 'larda (sodyum sitrat ; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; sodyum fosfat: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; glisin/NaOH : 8,0; 8,5; 9,0; 9,5) 3 saat boyunca 4°C 'de bekletildi ve ardından ortamın pH 'sı 6,0 'ya ayarlanarak standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi. Her bir enzim için denemeler çift çalışıldı.

Her iki ters misel sistemi ile hazırlanan α -galaktozidaz enzimlerinin zamana bağlı pH kararlılığının belirlenmesi için her bir enzim optimum pH'da (pH 4.5) 1-6 saat boyunca +4°C bekletildi ve ardından standart koşullarda geriye kalan aktiviteleri ölçüldü. Her bir set iki tekrarlı olacak şekilde denemeler gerçekleştirildi.

2.7.2.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı bir enzimin belirli saklama koşullarında ne oranda aktivitesini koruduğunu gösterir. α -Galaktozidaz'ın depo kararlılığını belirlemek için her iki ters misel sistemiyle hazırlanan enzimler 4 °Cde aynı koşullarda saklandı ve belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin aktiviteleri belirlendi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 α -Galaktozidaz Enziminin Mısırdan (*Zea mays*) İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

α -Galaktozidazlar (α -D-Galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) basit ve kompleks oligo- ve polisakkaritlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olan bu enzimlerin farklı kaynaklardan izolasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu ve immobilizasyonu son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Enzim, analitik amaçlı olarak kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde, medikal alanda enzimoterapide ve kan grubu dönüşümlerinde, gıda sanayinde özellikle şeker endüstrisinde önemli uygulama alanları bulmuştur (Filho et al., 2008; Anisha et al., 2008; Blöch et al., 2008; Anisha and Prema, 2007; Simerska et al., 2003; Eto et al., 2005; Owada et al., 2005). α -Galaktozidaz enziminin çok çeşitli uygulama alanlarından dolayı, bu enzimin farklı kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Enzim, bitkisel (Shen et al., 2008; Kang and Lee, 2000; Chrost and Schmitz, 1999; Soh et al., 2005; Chien and Lin-chu, 1991; Dey, 1984; Guimarães et al., 2001; Haibach et al., 1991; Itoh et al., 1986; Kusiak et al., 1978; Shivanna et al., 1990; Balasubramaniam and Mathew, 1986; Courtois and Petek, 1988; Dey et al., 1983, Zhu et al., 1995; Zhu and Goldstein, 1994; Naik et al., 1985; Pressey, 1984; Lounteri, 1998; Weiser et al., 1992; Dhar et al., 1994; Önal and Telefoncu, 1998; Yoon and Hwang, 2008), mikrobiyal (Sirisha et al., 2010; Gote et al., 2006; Nadkarni et al., 1992; Svastits-Dücső et al., 2009; Nadkarni et al., 1992; Wong et al., 1986; Talbot and Syrusch, 1990; Herder et al., 1992; Galili et al., 1985; Zeilinger et al., 1993; Mitsutomi et al., 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Hashimoto et al., 1993; Ohtakara et al., 1984; Somiari and Balogh, 1993; Lounteri et al., 1998; Thanankul et al., 1976; Nagao et al., 1988; Kristufek et al., 1994; Cavazzoni et al., 1987; Kotwal et al., 1999; Sinitsyna et al., 2008) ve hayvansal (Dhar et al., 1993; Dean and Sweeley, 1979a; 1979b; 1979c; Kusiak et al., 1978; Yasuda et al., 2004) kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Her ne kadar oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen tamamen homojen bir α -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az sayıda çalışma mevcut ise de, önemli olan daha sonraki çalışmalarda kullanılacak amaca uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır. α -Galaktozidazlar genellikle hücre içerisinde ve de diğer çeşitli glikozidazlarla bir arada bulunurlar.

Bu nedenle, çoğu kez bu aktiviteleri birbirinden ayırmak zor olmaktadır. Eğer hazırlanan enzim preparatı diğer glikozidazlarca kontamine edilmiyor ve geniş bir aglikon spesifikliğine sahip ise bahsedilen birçok kullanım alanı için uygun olacaktır.

Bu çalışmada, enzim kaynağı olarak mısır (*Zea mays*) seçildi. Mısır, ülkemizde özellikle yaz aylarında oldukça kolay temin edilebilen, ucuz ve bol bulunan bir kaynak olması, α -galaktozidaz aktivitesinin bu kaynakta yüksek oranda bulunması ve güneş altında yetişen mısırdaki enzimlerin termal kararlılığı yüksek olduğundan tercih edilmiştir. Mısır, protein açısından zengin bir kaynaktır. Enzimlerin tamamen saf preparatının hazırlanması hem oldukça zahmetli yöntemlere gerek duyulması hem de sonuçta elde edilen enzim miktarının çok az olması nedeniyle, bu çalışmada α -galaktozidaz enzimin mısırdan izole edilerek ters misel sistemi (Reverse Micelles Systems; RMS) ile saflaştırılması amaçlanmıştır.

α -Galaktozidaz enzimi ‘Metaryal Metod’ bölümünde açıklandığı gibi geleneksel yöntemler ile mısırdan izole edildi ve %85’lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak deriştirildi. Ters misel sistemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan α -galaktozidaz preparatının aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 24,32 mg/ml, 1.17 U/ml, 0,048 U/mg olarak belirlendi. Mısırdan hazırlanan bu ham protein preparatı kullanılarak ters misel sistemlerinde α -galaktozidaz enziminin dağılımı incelendi ve enzim saflaştırılmaya çalışıldı.

3.2 Ters Misel Sistemi (RMS) ile Mısır (*Zea mays*) α -Galaktozidazının Saflaştırılması

α -Galaktozidazlar endüstriyel açıdan özellikle gıda sanayinde önemli uygulama alanı bulan enzimlerdir. Bu nedenle çeşitli bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan tuz çöktürmesi, membran filtrasyonu, iyon değişim, afinite, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyonu gibi geleneksel ayırma ve saflaştırma yöntemleri kullanılarak saflaştırılmışlardır. Söz konusu protokollerin birçoğu çok sayıda adım içeren, zaman alıcı, ölçek büyütmenin zor olduğu ve pahalı sistemlerdir. Ayrıca bu çalışmalarda araştırmacılar α -galaktozidaz enzimini primer bir saflaştırma prosesi ile oldukça yüksek saflıkta elde etmeyi amaçlamışlardır (Sinitsyna et al., 2008; Guimaraes et al., 2001; Yasuda et al., 2004; Cao et al., 2010; Shen et al., 2008; Rezessy-Szabo et al., 2007; Kang and Lee, 2001; Gao and Schaffer, 1999; Appukutan and Barsu, 1987).

Ters misel sistemleri ölçek büyütmenin kolay olması, sürekli işlem için uygun olması, yüksek seçiciliğe sahip olması nedeniyle protein saflaştırmada sıklıkla tercih edilmektedir (Melo et al., 2001; Harikrishna et al., 2002). Ters misel sistemleri birçok enzimin saflaştırılmasında ve ekstraksiyonunda etkin bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin; *Aspergillus niger* 'den setiltriethylamonyum bromür (CTAB) kullanılarak glukoz oksidaz enziminin saflaştırılmasında (Ferreira et al., 2005), sodyum di(2-etilhegzil)sülfosüksinat (AOT) kullanılarak *Kluyveromyces marxianus* 'dan inulinaz enziminin ayrıştırılmasında (Pessoa and Vitolo, 1997), CTAB ile mayadan alkol dehidrogenaz ekstraksiyonunda (Zhang et al., 2000), CTAB ve AOT kullanılarak kırmızı turp peroksidazı saflaştırılmasında (Motlekar and Bhanwat, 2001), TOMAC ile alkalın proteaz ekstraksiyonunda (Rahaman et al., 1986; Wolbert et al., 1989).

Ters misel sistemleri enzimlerin yanı sıra çeşitli proteinlerin de etkin bir şekilde ayırımı ve saflaştırılmasında kullanılmıştır: AOT ters misel sistemi ile albumin (Goklen and Hatton, 1986), Tween85/Span85 ve TOMAC ters misel sistemleri ile hemoglobin (Ayala et al., 1992), CTAB sistemi ile sitokrom b5 (Pires and Cabral, 1993), AOT sistemi ile rennin (Goklen, 1986) ve soya fasulyesinden protein ekstraksiyonunda (Zhao et al., 2009) kullanılmıştır.

Ters misel tekniğinde sulu çözeltilerden protein/enzimlerin ayırımı için uygun bir sulu faz ve organik faz kullanılır. Ham protein ekstraktına önce belirli bir pH, iyonik şiddet, hacime sahip tampon uygulanır ve ardından belli konsantrasyonda surfaktan içeren belirli hacimde organik faz eklenir. Faz ayırımı hemen gözlenebilir (Carvalho and Cabral, 2000). Genellikle 3 faz oluşur. Üst faz organik çözügen ve surfaktan içeren ters misellerin oluşturduğu fazdır. Alt faz ise tuz içeren faz olup proteinler, sakkaritler ve hücre debrisleri gibi polar bileşikler içerir. Ara faz ise organik çözügen ve sulu çözelti ara yüzeyinde oluşan protein denaturasyonundan kaynaklandığı düşünülen filmsi yada bulutsu diye betimleyebileceğimiz agregatlaşma görülen fazdır (Matzke et al., 1992; Lee and Chong, 2011; Pires et al., 1996). Ters misel sistemlerinde moleküllerin fazlar arasındaki dağılım davranışları hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler, yük, sterik etkiler, biyomoleküllerin özellikleri fiziksel koşullar gibi çeşitli faktörlerden dolayı oldukça kompleks bir olaydır (Matzke et al., 1992; Luisi et al., 1988). Kosmotropi, salting-out, ko-solvent çöktürmesi, izoionik çöktürme, ozmolitik çöktürme ve protein hidrasyonu orta fazda proteinlerin çöktürülmesine yardımcı olur. Proteinler bu koşullar altında kaynaklarına, molekül kütlelerine, izoelektrik noktalarına ve pH 'ya bağımlı olarak farklı dağılım davranışları sergilerler (Pike

and Dennison, 1989). Ters misel sistemlerinde moleküllerin fazlar arasındaki dağılım davranışları pek çok faktörden dolayı oldukça kompleks bir olaydır. Uygun sistemlerin dizaynına ve seçimine yol gösterecek kapsamlı ve mekanistik bir teori mevcut değildir. Bu nedenle tekniğin uygulamalarında biyomoleküllerin optimum dağılımını sağlayan en uygun sistemin hazırlanabilmesi için deneysel optimizasyon çalışmalarına gereksinim duyulur. Dolayısıyla, proteinlerin kompleks karışım ortamından ters misel tekniği ile etkin bir şekilde ayırımına çeşitli proses parametrelerinin (ortamın pH'sı, ters misel sisteminin su içeriği, tuz türü ve konsantrasyonu, organik çözügen ve türü, surfaktan türü ve konsantrasyonu, protein miktarı, sulu fazın organik faza hacimsel oranı) etkilerinin incelenmesi gerekir (Hai and Kong, 2008; Shin and Vera, 2002; Lee et al., 2004; Luisi et al., 1988).

α -Galaktozidaz enziminin ters misel sistemi ile saflaştırılmasında söz konusu bu parametrelerin enzimin dağılım davranışına etkisi incelendi. En iyi saflaştırma katı ve verimi sağlanan ters misel sistemi belirlenerek optimize edilen sistemden elde edilen enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilerek biyokimyasal özellikleri belirlendi.

3.2.1 Ters misel sisteminde ileri ekstraksiyon ve ekstraksiyonun optimizasyonu

Ters misel sistemleri ile ayırma işlemlerinde önce ileri ekstraksiyon ve ardından geri ekstraksiyon yapılarak hedef molekülün ayırımı ve dağılımı izlenerek saflaştırma gerçekleştirilir. Genellikle sıvı-sıvı ters misel ekstraksiyon proseslerinde hedef enzim ileri ekstraksiyon işlemi ile organik fazda oluşturulan ters miseller içerisine alınarak seçimli olarak çözümlenir ve ardından geri ekstraksiyon işlemi ile sulu faza çekilerek saflaştırma sağlanır (Matzke et al., 1992; Pires et al., 1996). Ancak bazen hedeflenen enzim üst organik ters misel fazına geçmek yerine alt sulu fazda kalmayı tercih eder ve böylelikle istenmeyen proteinler üst faza çekilerek saflaştırma sağlanır. Bu çalışmada da mısırdan izole edilen α -galaktozidaz enzimi hem AOT hem de CTAB kullanılarak hazırlanan ters misel sistemlerinde baskın bir şekilde alt sulu fazda kalmıştır. Böyle durumlarda geri ekstraksiyona gerek duyulmadığından tek adımda ayırma yapmak mümkün olmaktadır. Neticede geri ekstraksiyonun zahmetli adımlarına gerek duyulmamaktadır. Benzer bir çalışmada (Noh and Imm, 2005) lizozim enzimi ters misel sistemleri ile tek adımda ayrılarak geri ekstraksiyona ihtiyaç duyulmadan saflaştırılmıştır.

Ters misel sistemlerinde sistemi optimize ederek enzimin iyi bir verimle ve yüksek oranda saflaşmasını sağlamak mümkündür. Bunun için önce ileri ekstraksiyon basamağının optimize edilmesi, ardından bu optimize edilmiş koşullarda ters miseller içerisine alınan enzimlerin iyi bir verimle ters misel dışına alınabilmesi için geri ekstraksiyonun optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, ters misel sistemlerinin hazırlanmasında ilk basamak olan ileri ekstraksiyona bazı parametrelerin (surfaktan türü ve konsantrasyonu, pH, iyon şiddeti, protein miktarı, faz oranı gibi) etkisi incelendi ve enzim için en uygun optimize edilmiş ileri ekstraksiyon koşulları belirlendi.

3.2.1.1 Surfaktan türü

Ters misel sistemlerinde ters misel oluşumunda surfaktan seçimi oldukça önemli bir adımdır. Ters misel oluşturucu surfaktan olarak farklı tür surfaktanlar (anyonik, katyonik, noniyonik) kullanılabilir. Anyonik surfaktan olarak AOT (Liu et al., 2004; Mathew and Juang, 2005; Kelley et al., 1993; Sun et al., 2008; Talukder et al., 2007; Motlekar and Bhangwat, 2001) ve katyonik surfaktan olarak da CTAB (Dong et al., 2008; Shen et al., 2005; Hasmann et al., 2001; Zhang et al., 2000; Motlekar and Bhangwat, 2001) bir çok çalışmada etkin bir şekilde kullanılmıştır. α -Galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında surfaktan olarak AOT ve CTAB olarak kullanıldı. Organik fazı oluşturmada görevli olan surfaktanı çözmek amacıyla AOT için genellikle izooktan, CTAB için ise değişik hacim oranlarında izooktan, n-hekzan ve hekzanol çözgen sistemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada, AOT tabanlı ters misel sisteminde izooktan, CTAB tabanlı ters misel sisteminde izooktan ve 1-hekzanol'ün eşit hacimde (1:1) karışımı çözgen olarak kullanıldı.

3.2.1.1 pH

α -Galaktozidaz enziminin ters misel sistemi ile saflaştırılmasında optimum şartları belirlemek için önce hem AOT tabanlı ters misel sistemi için hem de CTAB tabanlı ters misel sistemi için diğer tüm değişkenler sabit tutularak ortamın pH'ı değiştirildi. Sulu çözeltinin pH'ı proteinin net yüküne karar verir (Fadnavis, 1998; Nascimento, 2002; Goklen and Hatton, 1985; Qiang et al., 1998; Pessoa and Vitolo, 1998). Protein ile surfaktan grupları arasındaki elektrostatik etkileşim proteinin fazlar arası transferini destekler. Bu eğilim, surfaktan grubu ile proteinin zıt yüklerde olmasıyla gerçekleşir. İzoelektrik noktanın altında yani protein pozitif

yüklü iken protein negatif yüklü surfaktan (anyonik surfaktan) ile etkileşir ve organik faz içindeki misele transfer gerçekleşir. İzoelektrik nokta üzerinde yani protein negatif yüklü iken anyonik surfaktan ile etkileşim olmaz, transfer gözlenmez dolayısıyla katyonik surfaktan kullanılmalıdır. Ortamın pH'sı ayarlanırken proteinin denaturasyonunu önlemek için pH ayarlaması oldukça dikkatli yapılmalıdır, çok asidik ya da çok bazik pH'larda bölgede protein denaturasyona uğrayabilir (Zhou and Weng, 2006; Wolbert et al.,1989; Dekker, 1991; Goklen and Hatton, 1987; Nishiki et al., 1993; Jarudilokkul et al., 1999).

AOT tabanlı ters misel sisteminde enzimin ayırımına pH'ın etkisinin incelenmesi amacıyla izooktanda hazırlanmış 50 mM AOT, 1 mg protein, 50 mM KCl varlığında 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranında, farklı pH'larda ters misel sistemleri hazırlandı ve ileri ekstraksiyon gerçekleştirildi. Bu amaçla 50 mM sodyum sitrat (3,0-6,5), 50 mM sodyum fosfat (6,0-8,0) ve 50 mM glisin/NaOH (9,0-10,0) tamponları kullanıldı. AOT ters misel sistemi için pH'ın 5.5'tan küçük ve pH 6.5'tan büyük olduğu pH değerlerinde çok düşük aktivite gözlemlendi. Bu nedenle pH 5.5-6.0 aralığındaki sitrat ve sitrat fosfat tamponları ile yapılan ayırımına ait sonuçlar Çizelge 3.1'de verildi. Çizelgeden görüldüğü gibi pH 6.0 sitrat ve sitrat fosfat tamponlarında benzer aktivite verimi ve saflaştırma katı elde edildi. Ayrıca sitrat tamponu enzim aktivitesi tayininde de kullanıldığı için bu tamponla devam etmeye karar verildi.

Çizelge 3.1 pH'ın AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi*.

Tampon Türü ve pH	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
pH:5,5 Sitrat	0,020	0,093	0,215	9,3	447,9	41,7	4,5
pH:6 Sitrat	0,022	0,097	0,232	9,7	483,3	46,9	4,8
pH:6,5 Sitrat	0,019	0,096	0,207	9,6	431,2	41,5	4,3
pH:6 sitrat fosfat	0,021	0,091	0,235	9,4	489,6	44,6	4,9
pH:6,5 sitrat fosfat	0,020	0,098	0,205	9,4	427,1	41,9	4,3

*sisteme eklenen protein 1 mg, 0.048 U

CTAB tabanlı ters misel sistemi için: 50 mM CTAB (1:1 hacimde karıştırılmış izooktan ve 1- hekzanol karışımıyla hazırlandı), 0,5 mg protein, 50 mM KCl varlığında 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranında farklı pH'larda ters misel sistemleri hazırlandı ve ileri ekstraksiyon gerçekleştirildi. Bu amaçla yine AOT tabanlı ters misel sisteminde kullanılan tampon türleri ve pH değerleri kullanıldı. CTAB ters misel sistemi için pH 6,5'dan büyük olduğu durumlarda aktivitenin çok düşük olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.2). Çizelge 3.2'den görüldüğü gibi CTAB tabanlı ters misel sistemi için pH 4.5 sitrat tamponunda enzim % 93.8 aktivite verimi ile 2,0 kat saflaştırılabilmektedir. Diğer tampon türleri ve pH'larında gözlenen aktivite ve saflaştırma katı değerleri bu değere kıyasla oldukça düşüktür.

Çizelge 3.2 pH'ın CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi*.

Tampon	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
pH:3,5 Sitatrat	0,016	0,257	0,061	51,4	135,6	65,4	1,4
pH:4 Sitatrat	0,021	0,251	0,082	50,2	182,2	86,2	1,8
pH:4,5 Sitatrat	0,022	0,223	0,101	44,6	201,4	91,7	2,0
pH:5 Sitatrat	0,020	0,215	0,094	43,0	195,8	84,6	1,9
pH:5,5 Sitatrat	0,019	0,337	0,058	67,4	128,9	81,7	1,3
pH:6 Sitatrat	0,019	0,340	0,056	68,0	124,4	78,7	1,2
pH:6,5 Sitatrat	0,016	0,339	0,046	67,8	95,83	65,0	1,0
pH:6 sitrat fosfat	0,018	0,335	0,054	67,0	120	75,4	1,2
pH:6,5 sitrat fosfat	0,015	0,332	0,044	66,4	97,8	61,2	1,0

*sisteme eklenen protein 0.5 mg, 0.024 U

3.2.1.3 İyon şiddeti

α -Galaktozidaz enziminin ters misel sistemi ile saflaştırılmasında optimum şartları belirlemek için önce her bir sistem için uygun ortam pH'ı belirlendi. Ardından belirlenen optimum pH'larda çalışılmaya devam edilerek diğer parametreler yukarıda anlattığımız gibi sabit tutulmuş ve sulu faz iyon şiddeti değiştirilmiştir. Birçok çalışmada iyonik şiddetin artmasıyla fazlar arası protein transferinin azaldığı görülmüştür (Hatton, 1989; Kelley et al., 1993; Lu et al., 1993; Pires et al., 1996; Sun et al., 1998). Bizim çalışmamızda tuz konsantrasyonunun istediğimiz protein transferine olumlu bir etkisi olmadığı belirlendi (Çizelge 3.3). Diğer çalışmalarda olduğu gibi surfaktan ile protein arasındaki elektrostatik etkileşimleri artan iyonik şiddet ile zayıflatmak amaçlanmıştır (Yan et al., 1997; Pires et al., 1996; Hatton et al., 1989).

AOT tabanlı ters misel sistemi için 50 mM sitrat (pH 6,0) tamponuyla, 1 mg protein, 50 mM AOT (izooktanda hazırlanmış) çözeltisi ve 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranı sabit tutularak değişik konsantrasyonlarda KCl çözeltileri (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mM) ile ileri ekstraksiyon denemeleri yapıldı (Çizelge 3.3). Çizelgeden görüldüğü gibi KCl derişimi α -galaktozidaz enzimi ayırımında önemli bir etki göstermemiştir.

CTAB tabanlı sistem için 50 mM CTAB (eşit hacimde karıştırılmış izooktan ve 1- hekzanol karışımıyla hazırlanmıştır), 0,5 mg protein, 1:1 (v/v) sulu faz: organik faz oranı ve değişik konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mM) KCl ile denemeler gerçekleştirildi (Çizelge 3.4). Çizelgeden görüldüğü gibi KCl varlığında α -galaktozidaz enziminin ayırımı bu sistemde de geliştirilmemiş, aktivite verimi ve saflaştırma katı değerlerinde önemli bir artış olmamıştır.

Çizelge 3.3 KCl konsantrasyonunun AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi*.

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
0	0,022	0,098	0,222	9,8	464,43	45,4	4,6
25	0,022	0,096	0,227	9,6	472,92	45,4	4,7
50	0,023	0,098	0,233	9,8	484,69	47,4	4,8
75	0,022	0,098	0,222	9,8	464,43	45,4	4,6
100	0,021	0,094	0,225	9,4	468,75	44,2	4,7
125	0,022	0,094	0,227	9,4	473,09	45,4	4,7

*sisteme eklenen protein 1 mg, 0.048 U

Çizelge 3.4 KCl konsantrasyonunun CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi*.

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
0	0,020	0,205	0,099	41,0	207,3	83,3	2,1
25	0,018	0,187	0,097	37,4	202,1	75,4	2,0
50	0,018	0,188	0,095	37,6	197,9	78,3	2,0
75	0,017	0,190	0,091	38,0	189,6	72,1	1,9
100	0,020	0,227	0,088	45,4	183,3	83,3	1,8
150	0,020	0,231	0,089	46,2	185,4	83,3	1,8
200	0,018	0,189	0,094	37,8	195,8	74,2	1,9

*sisteme eklenen protein 0,5 mg, 0.024 U

3.2.1.4 Sürfaktan konsantrasyonu

α -Galaktozidaz enziminin ters misel sistemi ile saflaştırılmasında optimum şartları belirlemek için hem CTAB sistemi için hem de AOT sistemi için diğer tüm değişkenler sabit tutularak uygun pH ve iyon şiddeti belirlendikten sonra AOT ve CTAB surfaktan konsantrasyonları değiştirilerek denemeler yapılmıştır. Sürfaktan konsantrasyonu misel boyutunu etkilemektedir (Hentsch et al., 1992; Luisi et al., 1986; Mathew and Juang, 2005; Ferreira et al., 2005).

AOT tabanlı ters misel sistemi için 50 mM sitrat pH 6,0 tamponuyla, 1 mg protein, 50 mM KCl çözeltisi ile 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranı sabit tutularak değişik konsantrasyonlarda AOT çözeltileri (25, 50, 100, 200 mM) ile ileri ekstraksiyon denemeleri yapıldı (Çizelge 3.5). Çizelgeden görüldüğü gibi en yüksek aktivite verimi (%46.8) ve saflaştırma katı (4.9 kat) 50 mM AOT varlığında elde edildi.

Çizelge 3.5 AOT konsantrasyonunun AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi*.

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
25	0,016	0,074	0,211	7,4	439,6	32,5	4,4
50	0,022	0,094	0,234	8,4	487,5	45,8	4,9
100	0,022	0,098	0,229	9,8	477,1	46,7	4,8
150	0,022	0,098	0,226	9,8	470,8	46,2	4,7
200	0,022	0,098	0,225	9,8	468,7	46,2	4,7

*sisteme eklenen protein 1 mg, 0.048 U

CTAB tabanlı sistem için 50 mM sitrat pH 4.5 tamponuyla, 0,5 mg protein, 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranı, KCl'siz ortamda, değişik konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 mM) CTAB ile denemeler gerçekleştirildi (Çizelge 3.6). Çizelgede görüldüğü gibi 15 mM CTAB konsantrasyonu ile enzim yüksek verimle (%99.7) 2.1 kat saflaştırıldı.

Çizelge 3.6 CTAB konsantrasyonunun CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi*.

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
5	0,017	0,219	0,079	43,8	164,6	70,8	1,6
10	0,020	0,219	0,092	43,8	191,7	83,3	1,9
15	0,024	0,249	0,096	45,0	207,1	99,7	2,1
20	0,022	0,231	0,102	46,2	212,5	91,7	2,1
50	0,021	0,242	0,093	48,4	193,7	87,5	1,9
100	0,022	0,239	0,087	47,8	181,3	86,2	1,8
200	0,021	0,244	0,084	48,8	175,0	87,5	1,7

*sisteme eklenen protein 0.5 mg, 0.024 U

3.2.1.5 Faz oranı etkisi

Faz oranı sulu faz ve organik faz oranlarının hacimsel olarak değişimine dayanmaktadır (Zhao et al., 2009; Nishiki et al., 1993). Hacim oranları AOT tabanlı ters misel sistemi için 1:1; 1:2; 2:1; 1:3; 3:1 oranlarında, CTAB tabanlı ters misel sistemi için 1:1; 1:1,5; 1,5:1; 1:2; 2:1; 1:3; 3:1 oranlarında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7 ve 3.8). Çizelgelerden de görüldüğü üzere faz oranlarındaki değişimin her iki ters misel sisteminde ileri ekstraksiyona önemli bir etkisi olmamıştır. Bu nedenle her iki sistem için 1:1 faz oranlarında çalışmaya devam edildi.

Çizelge 3.7 AOT tabanlı ters misel sisteminde faz oranının ayırmaya etkisi*.

Faz Oranları	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
1:1	0,023	0,098	0,223	9,8	484,7	47,5	4,8
1:2	0,023	0,099	0,231	9,9	481,9	47,7	4,8
2:1	0,023	0,099	0,231	19,8	481,9	47,7	4,8
1:3	0,023	0,098	0,232	9,8	481,6	47,3	4,8
3:1	0,023	0,099	0,230	9,8	479,8	47,5	4,8

*sisteme eklenen protein 1 mg, 0.048 U

Çizelge 3.8 CTAB tabanlı ters misel sisteminde faz oranının ayırmaya etkisi*.

Faz Oranları	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
1:1	0,025	0,256	0,096	51,2	200,0	102,5	2,0
2:3	0,025	0,276	0,091	55,2	189,6	104,6	1,9
3:2	0,025	0,279	0,088	55,8	183,3	102,5	1,8
1:2	0,024	0,272	0,088	54,4	183,3	100,4	1,8
2:1	0,025	0,275	0,089	55,0	185,4	102,5	1,8
1:3	0,025	0,273	0,093	54,6	193,5	105,4	1,9
3:1	0,023	0,264	0,088	52,8	183,3	97,1	1,8

*sisteme eklenen protein 0.5 mg, 0.024 U

3.2.1.6 Protein miktarı

Ters misel sistemi ile saflaştırma çalışmalarımızda sisteme eklenen protein miktarının ayırmaya etkisi de incelendi. Sisteme eklenen protein miktarı etkisi çalışmalarına örnek olarak Nishiki ve arkadaşlarının lizozimle ile yaptığı AOT ters misel sistemli çalışma (2005), Hemavathi ve arkadaşlarının *Hordeum vulgare* β -galaktozidaz'I ile yaptığı çalışmalar verilebilir. Aynı doğrultuda hem AOT hem de CTAB ters misel sistemleri için genel optimum koşulları belirlendikten sonra farklı protein miktarları içeren ters misel sistemleri hazırlandı.

AOT tabanlı ters misel sistemi için 50 mM sitrat pH 6,0 tamponuyla, 50 mM AOT çözeltisiyle(izooktanda hazırlandı), 50 mM KCl çözeltisi ile 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranı sabit tutularak değişik miktarlarda protein (0,25-2 mg) eklenerek ileri ekstraksiyon denemeleri yapıldı (Çizelge 3.9). Çizelgeden görüldüğü gibi maksimum saflaştırma katı 1 mg protein miktarında elde edildi. Bu

protein miktarının üzerindeki değerlerde hazırlanan sislerde orta filmsi tabakanın arttığı ve enzimin bu tabakada denatüre olduğu görüldü.

Çizelge 3.9 Protein miktarının AOT tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.

Protein Miktarı (mg)	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Safılaştırma Katı (fold)
0,25	0,005	0,030	0,173	12,0	360,4	41,7	3,6
0,5	0,011	0,050	0,220	8,8	458,3	42,8	4,6
0,75	0,016	0,072	0,220	14,0	468,7	44,4	4,6
1	0,022	0,094	0,234	9,4	487,5	45,8	4,9

CTAB tabanlı ters misel sistemi için 50 mM sitrat pH 4.5 tamponuyla KCl eklemeyen 15 mM CTAB, 1:1 (v/v) sulu faz:organik faz oranı, değişik miktarlarda protein (0,05-5 mg) ile denemeler gerçekleştirildi (Çizelge 3.10). Çizelgeden de görüldüğü üzere CTAB tabanlı ters misel sistemi için uygun protein miktarı 2 mg'dır.

Çizelge 3.10 Protein miktarının CTAB tabanlı ters misel sisteminde α -galaktozidazın ayırımına etkisi.

Protein Miktarı (mg)	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
0,25	0,008	0,099	0,081	39,6	168,7	66,7	1,7
0,5	0,020	0,209	0,096	43,8	200,0	83,7	2,0
1	0,038	0,416	0,091	41,6	189,6	79,2	1,9
2	0,089	0,816	0,109	40,8	227,1	92,7	2,3
3	0,101	1,104	0,091	50,9	189,6	70,1	1,9
4	0,122	1,294	0,094	32,3	195,8	93,7	2,0
5	0,132	1,84	0,089	19,7	185,4	55,0	1,8

3.2.2 Ters misel sistemlerinde α -galaktozidaz ayırımının tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik endüstriyel üretim prosesleri için önemli bir parametredir. Her iki ters misel sistemi için optimize edilen koşullarda sistemler üç farklı kez kurulmuş ve analizler yapılmıştır. AOT ve CTAB tabanlı bu sistemler için elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12’de verilmiştir. Çizelgelerden görüldüğü gibi her iki farklı sistem için ayrı koşullarda hazırlanan her bir tekrar sistemi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.11 AOT tabanlı ters misel sistem ile α -galaktozidaz ayırımının tekrarlanabilirliği.

Sistem Tekrarları	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
A	0,022	0,049	0,226	9,8	470,8	46,2	4,7
B	0,022	0,048	0,231	9,6	481,8	46,2	4,8
C	0,022	0,048	0,233	9,6	485,4	46,7	4,8

*sisteme eklenen protein 1 mg, 0.048 U

Çizelge 3.12 CTAB tabanlı ters misel sistem ile α -galaktozidaz ayırımının tekrarlanabilirliği.

Sistem Tekrarları	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
A	0,086	0,781	0,110	39,1	229,4	89,6	2,3
B	0,087	0,805	0,108	40,2	225,0	90,6	2,3
C	0,085	0,779	0,109	38,9	227,1	88,5	2,3

*sisteme eklenen protein 2 mg, 0.096 U

3.2.3 Ters misel sistemlerinde ölçek büyütme

Ters misel sistemleri için tüm optimum koşullar belirlendikten sonra elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda hacimler 2; 4; 6; 8; 10 kata kadar çıkartılarak ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 3.13 ve 3.14).

Çizelge 3.13 AOT tabanlı ters misel sisteminde ölçek büyütme.

Ölçek Katı	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
2	0,021	0,094	0,228	9,4	474,3	45,8	4,7
4	0,022	0,098	0,226	9,8	470,8	46,2	4,7
6	0,022	0,094	0,264	9,4	487,5	45,2	4,9
8	0,022	0,096	0,231	9,6	481,8	46,2	4,8
10	0,022	0,096	0,233	9,6	485,4	46,7	4,8

*sisteme eklenen protein 1 mg, 0.048 U

Çizelge 3.14 CTAB tabanlı ters misel sisteminde ölçek büyütme.

Ölçek Katı	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
2	0,087	0,805	0,108	40,2	225,0	90,6	2,3
4	0,089	0,816	0,109	40,8	227,1	92,7	2,3
6	0,086	0,811	0,106	40,6	220,9	89,6	2,2
8	0,087	0,805	0,108	40,2	225,0	90,6	2,3
10	0,086	0,801	0,107	40,5	222,9	89,6	2,3

*sisteme eklenen protein 2 mg, 0.096 U

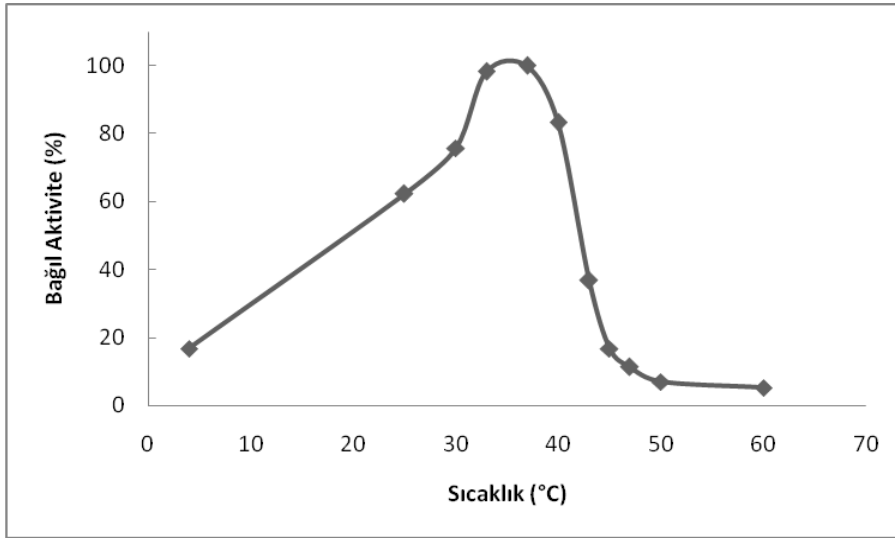
Çizelge 3.13 ve 3.14'den görüldüğü gibi optimizasyon basamağında kullanılan toplam hacmin (4 ml) farklı kat oranları ile her iki misel sistemi için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sıvı-sıvı sistemler ölçek büyütme elverişli sistemler olduklarından endüstriyel boyutta uygulanabilir sistemlerdir.

3.3 Mısır α -Galaktozidazının Karakterizasyonu

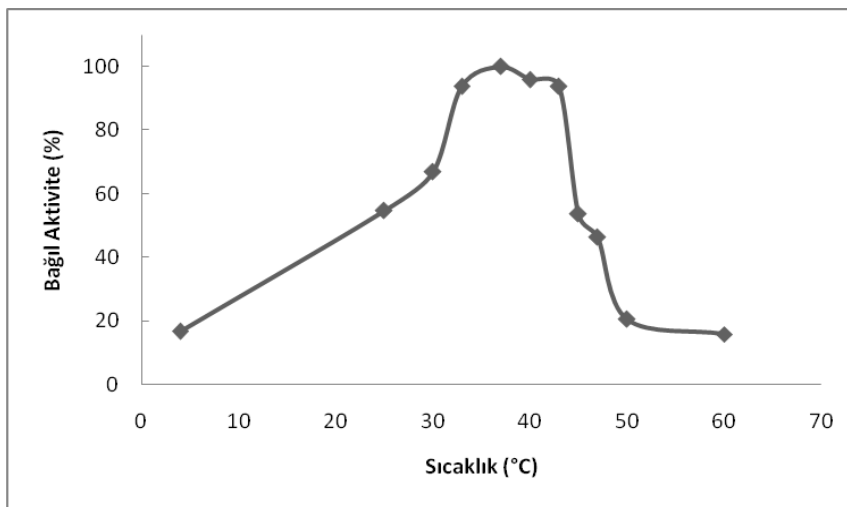
3.3.1 α -Galaktozidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın α -galaktozidaz aktivitesine etkisi “Materyal ve Metod” bölümünde açıklandığı gibi enzimin aktivitesinin farklı sıcaklıklarda standart aktivite ölçüm koşullarında ölçülmesiyle belirlendi ve aktivite-sıcaklık ilişkisi Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de verildi. Şekillerden görüldüğü gibi her iki misel sistemi ile saflaştırılan α -galaktozidazın optimum sıcaklık değerleri 37°C olarak belirlendi.

Enzimler protein yapıdaki büyük ve oldukça komplike moleküllerdir. Aktivitesinin korunması için üç boyutlu yapının korunması gerekir. Aktiviteye etki eden önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar. Fakat belirli sıcaklıktan sonra enzim proteininin denaturasyonundan dolayı aktivitede düşme olur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık (optimum sıcaklık) özellikle operasyonel bir parametre olması açısından önemlidir. Genellikle bitkisel kaynaklı α -galaktozidazların optimum sıcaklıkları enzimin kaynağına ve inkübasyon süresine bağlı olarak 37-40°C arasında değişmektedir (Önal, 2000; Çalcı et al., 2010; Bakunina et al., 2006).



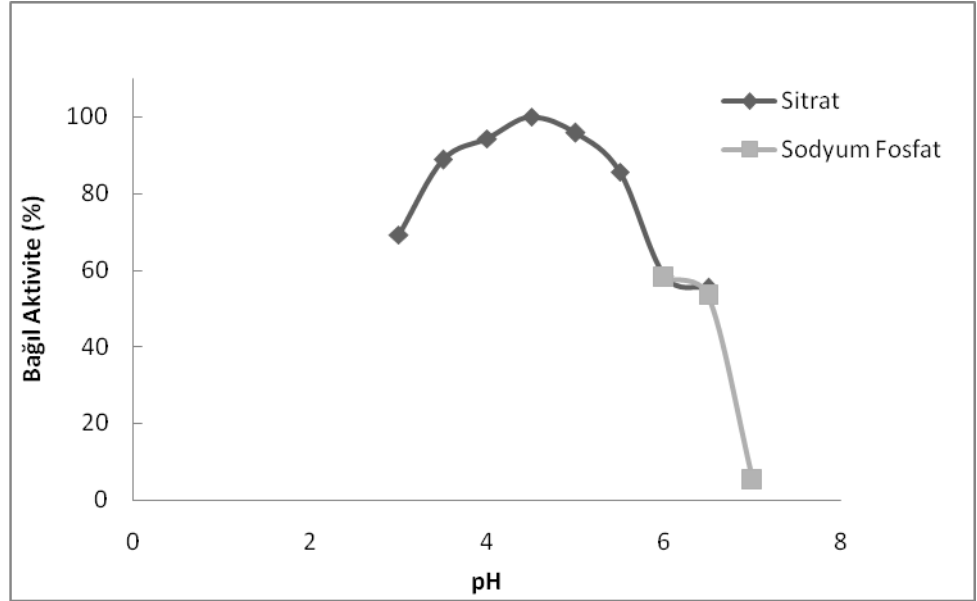
Şekil 3.1 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum sıcaklığı.



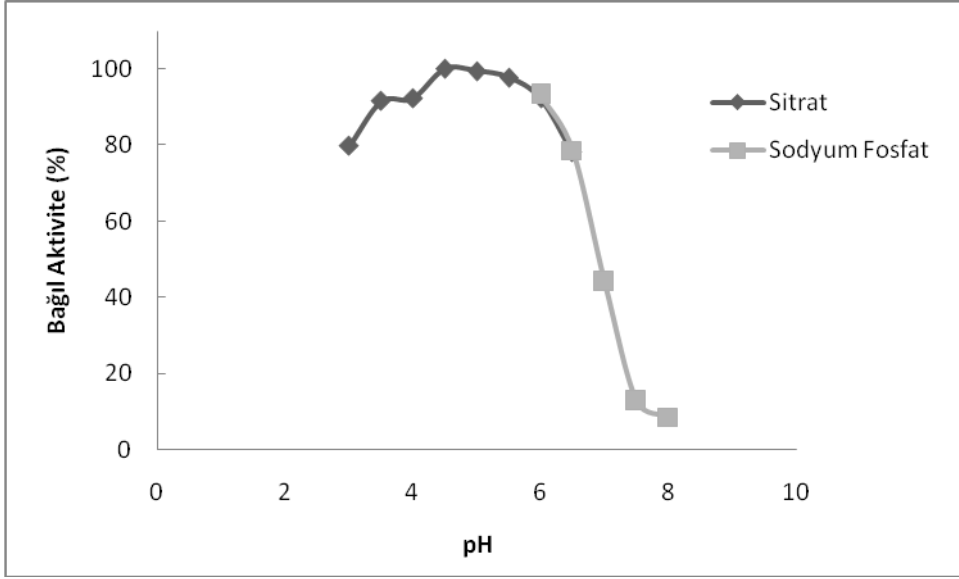
Şekil 3.2 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum sıcaklığı.

3.3.2 α -Galaktozidazın aktivitesine pH 'ın etkisi

Enzim aktivitesini etkileyen önemli parametrelerden bir diğeri pH 'dır. Enzimlerin pH optimumu reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, kullanılan tampon türü ve konsantrasyonu ve iyon şiddeti gibi bir seri parametreye bağlı olarak değişir. Biyokimyasal reaksiyonlar *in vivo* koşullarda sulu ortamda gerçekleştiğinden pH enzim yük durumunu dolayısıyla aktivitesini çok etkiler. AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemleri ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının aktivitesinin pH 'ya bağımlı değişimi sırasıyla Şekil 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. Her iki sistemle saflaştırılan enzimin optimum pH 'sı 6,0 olarak belirlendi. Enzim geniş bir pH aralığında (pH 2-6,0) oldukça aktiftir. α -Galaktozidazlar için enzim kaynağına bağlı olarak değişen farklı pH-aktivite profilleri mevcuttur. Genellikle bitkisel kaynaklı enzimler için optimum pH değerleri pH 3,5-6,5 arasında değişmektedir (Önal, 2000; Çalcı et al., 2010). RMS ile çalışılırken temel parametre pH 'dır, çünkü proteinin net yüküne sonuç olarak da proteinin fazlar arası transferine etki eder (Goklen and Hatton, 1987; Goklen, 1986; van't Riet and Dekker ,1984; Luisi et al., 1979).



Şekil 3.3 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum pH'sı.

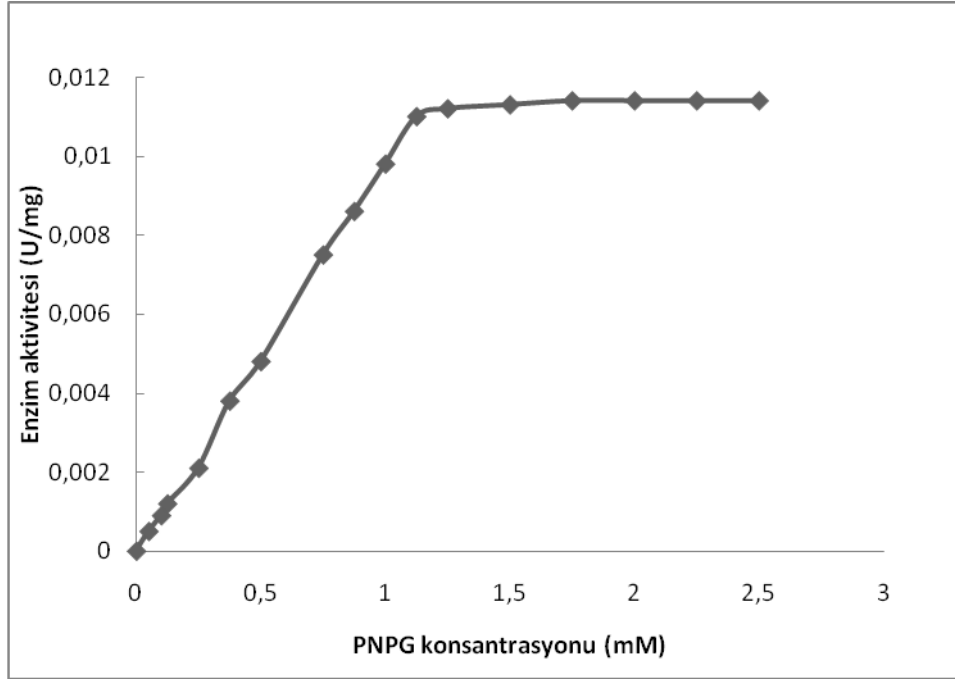


Şekil 3.4 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının optimum pH'sı.

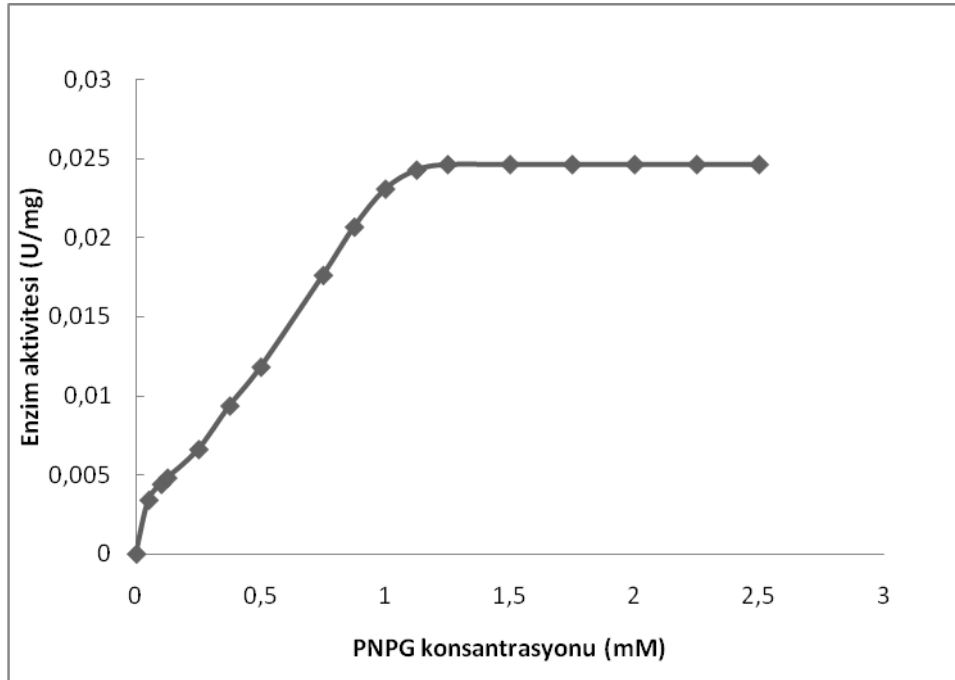
3.3.3 α -Galaktozidazın kinetik sabitlerinin tayini

Substrat (PNPG) konsantrasyonunun α -galaktozidaz aktivitesine etkisi "Materyal ve Metod" bölümünde açıklandığı gibi 0.05-2.5 mM substrat konsantrasyon aralığı kullanılarak belirlendi (Şekil 3.5 ve 3.6). Substrat doygunluk grafiğiklerinden her iki sistemle saflaştırılan enzimin doygunluk substrat konsantrasyonu 1.25 mM olarak belirlendi.

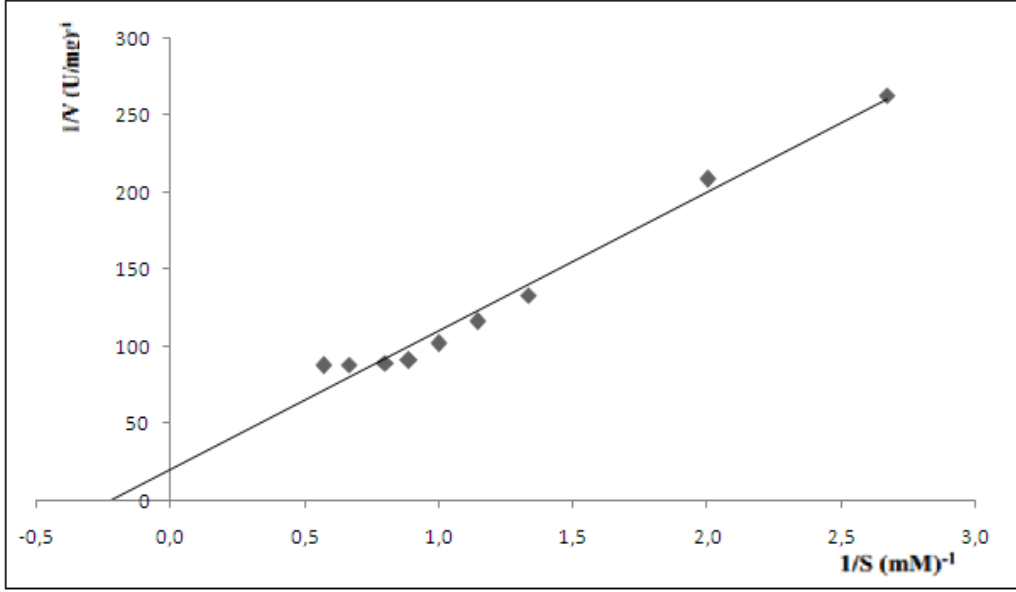
Enzimin kinetik sabitlerini (K_m ve V_{max}) belirlemek için çizilen Lineweaver Burk diyagramından AOT tabanlı ters misel sistemi enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 4,54 mM ve 0,05 U olarak belirlendi (Şekil 3.7). CTAB tabanlı ters misel sistemi enzimi için ise K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,47 mM ve 0,29 U olarak belirlendi (Şekil 3.8). Elde edilen kinetik değerler α -galaktozidazlar ile ilgili diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Önal, 2000; Çalıcı et al., 2010).



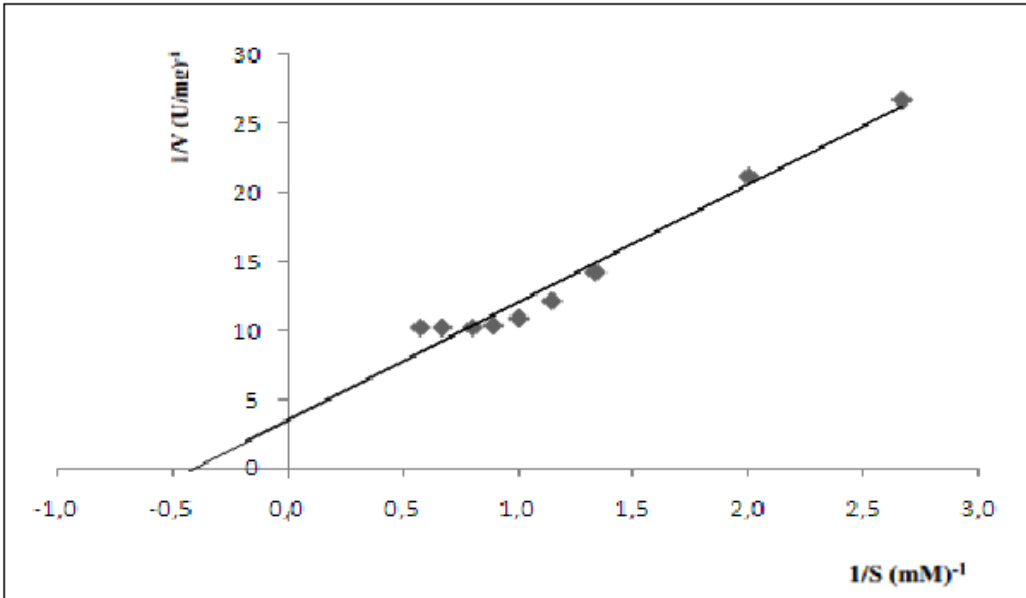
Şekil 3.5 PNPG konsantrasyonunun AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazı aktivitesine etkisi.



Şekil 3.6 PNPG konsantrasyonunun CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazı aktivitesine etkisi.



Şekil 3.7 AOT tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının Lineweaver-Burk Diyagramı.



Şekil 3.8 CTAB tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının Lineweaver-Burk Diyagramı.

3.3.4 Efektör türü ve konsantrasyonunun etkisi

Her iki ters misel sistemiyle saflaştırılan α -galaktozidaz enziminin aktivitesine bazı şekerlerin ve kimyasal maddelerin etkisi incelendi (Çizelge 3.15 ve 3.16). Çizelge 3.15'den görüldüğü gibi 10 mM konsantrasyonundaki şekerlerin tümü enzimi inhibe etmiştir. Bu şekerlerden özellikle galaktoz enzimi kuvvetli bir şekilde inhibe ederek aktiviteyi oldukça düşürmüştür. Galaktozun farklı kaynaklardan saflaştırılan birçok α -galaktozidaz enzimini inhibe ettiği çalışma mevcuttur (King et al., 2002; Guimarães et.al., 2001; Farzadi et al., 2010). 10 mM konsantrasyondaki metallere FeCl₃, FeSO₄ ve ZnSO₄ enzimi aktive ederken KCl ve NaCl'nin enzim aktivitesine bir etkisi olmamıştır. Diğer metallerin enzimi farklı oranlarda inhibe ettiği ve özellikle de CuSO₄ ve Na₂CO₃'ün enzimi oldukça yüksek oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. Soya tohumu, *Bacillus circulans* ve termofilik fungus *Humicola*'dan elde edilen serbest α -galaktozidaz enzimlerinin de metal iyonları tarafından inhibe edildiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Guimarães et.al., 2001; El-Shebawy et. al., 2007; Kotwal et. al., 1999).

Çizelge 3.15 Çeşitli şekerlerin AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemlerinde saflaştırılmış enzim aktivitesine etkisi.

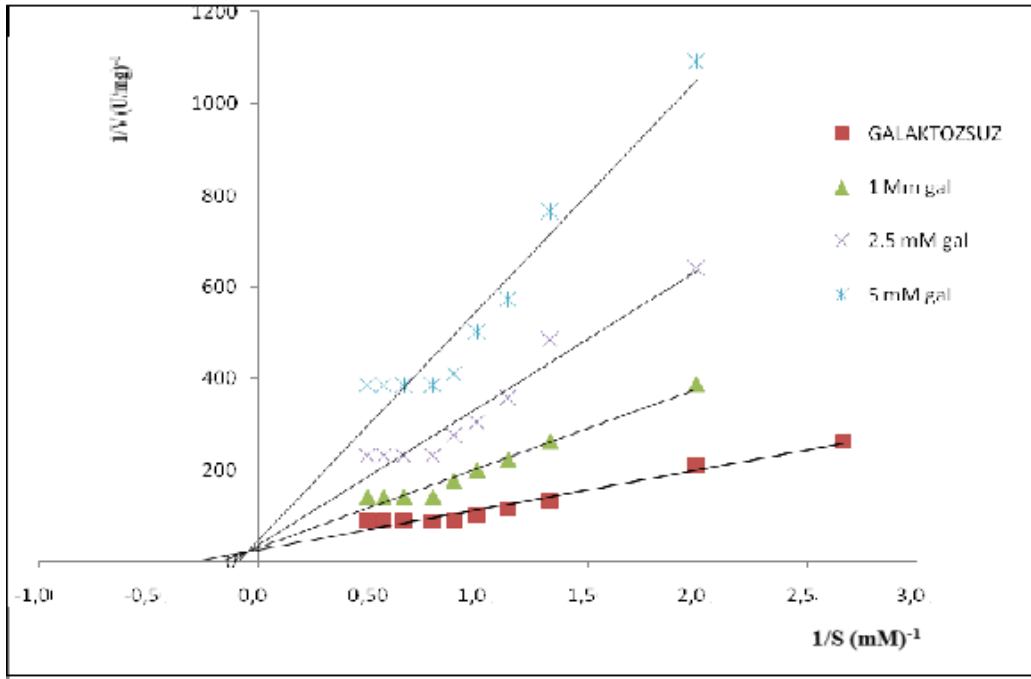
ŞEKER EFEKTÖRLERİ	BAĞIL AKTİVİTE (%)	
	AOT ters misel sistemi enzimi	CTAB ters misel sistemi enzimi
Galaktoz	12,38	10,36
Glukoz	83,33	83,73
Sukroz	88,59	88,01
Fruktoz	85,96	85,57
Laktoz	84,21	83,13
Maltoz	85,08	85,98
Melibioz	49,12	49,79
Raffinoz	83,33	83,33

Çizelge 3.16 Çeşitli kimyasalların AOT ve CTAB tabanlı ters misel sistemlerinde saflaştırılmış enzimi aktivitesine etkisi.

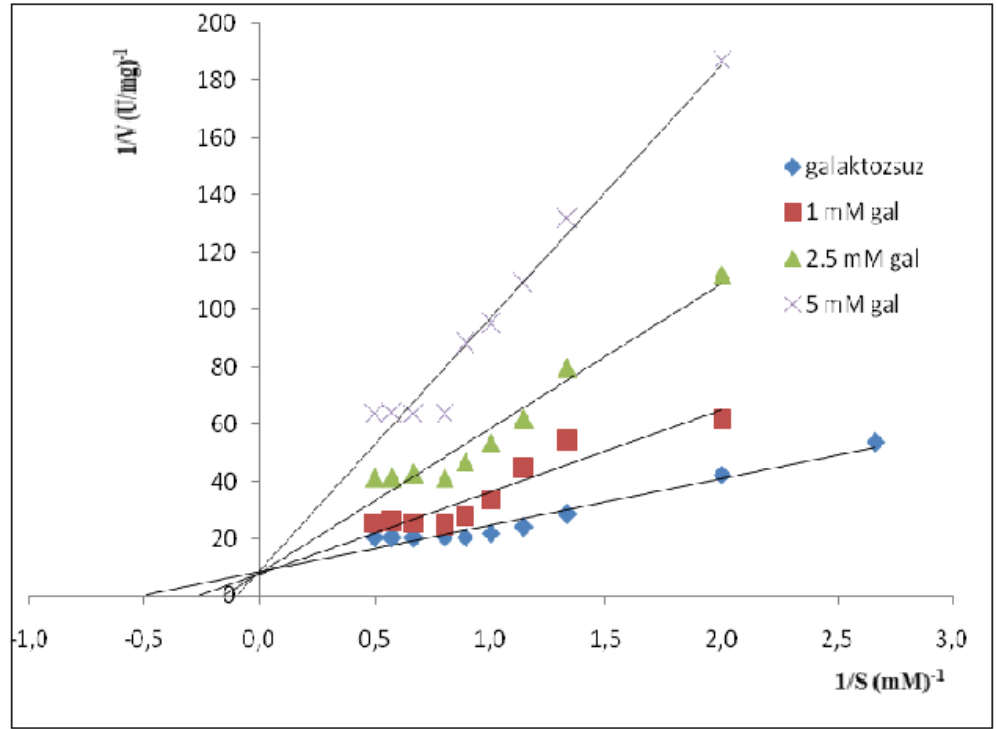
METAL EFEKTÖRLERİ	BAĞIL AKTİVİTE (%)	
	AOT ters misel sistemi enzimi	CTAB ters misel sistemi enzimi
FeCl ₃	142,21	146,14
CaCl ₂	84,46	83,33
MgCl ₂	88,59	84,96
KCl	100	100
NaCl	100	100
CuSO ₄	50	51,42
Fe ₂ SO ₄	185,09	181,91
ZnSO ₄	104,39	101,42
Na ₂ CO ₃	23,68	25,41

3.3.4.1 D-Galaktozun α -galaktozidaz aktivitesine etkisi

Her iki ters misel sistemi α -galaktozidaz enzimi aktivitesi üzerine efektör türü ve konsantrasyonunun etkisini incelediğimiz çalışma sonucunda D-galaktozun (10 mM) yüksek oranda inhibisyona neden olduğu belirlendi. D-galaktoz konsantrasyonları 1-10 mM ve PNPG konsantrasyonları 0,05-2,5 mM aralığında kullanılarak enzim aktivitesi tayin edildi. Lineweaver-Burk diyagramından edilen bilgiler doğrultusunda inhibisyon tipinin yarışmalı (kompetitif) inhibisyon olduğu belirlendi (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Enzimin K_1 değerleri diyagramdan hesaplandı (Çizelge 3.17 ve 3.18)



Şekil 3.9 AOT tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının aktivitesine D-galaktoz etkisi.



Şekil 3.10 CTAB tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının aktivitesine D-galaktoz etkisi.

Çizelge 3.17 AOT tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının enzim aktivitesine D-galaktoz etkisinin kinetik parametreleri.

Kinetik Sabitler	I_0 (mM)	I_1 (mM)	I_2 (mM)	I_3 (mM)
K_m (mM)	2,22	-	-	-
V_{max} (U)	0,027	-	-	-
K_i	-	0,99	4,99	8,79

Çizelge 3.18 CTAB tabanlı ters misel sisteminde saflaştırılan mısır α -galaktozidazının enzim aktivitesine D-galaktoz etkisinin kinetik parametreleri.

Kinetik Sabitler	I ₀ (mM)	I ₁ (mM)	I ₂ (mM)	I ₃ (mM)
K _m (mM)	1,69	-	-	-
V _{max} (U)	0,105	-	-	-
K _i	-	3,71	6,37	11,24

3.3.5 Kararlılık testleri

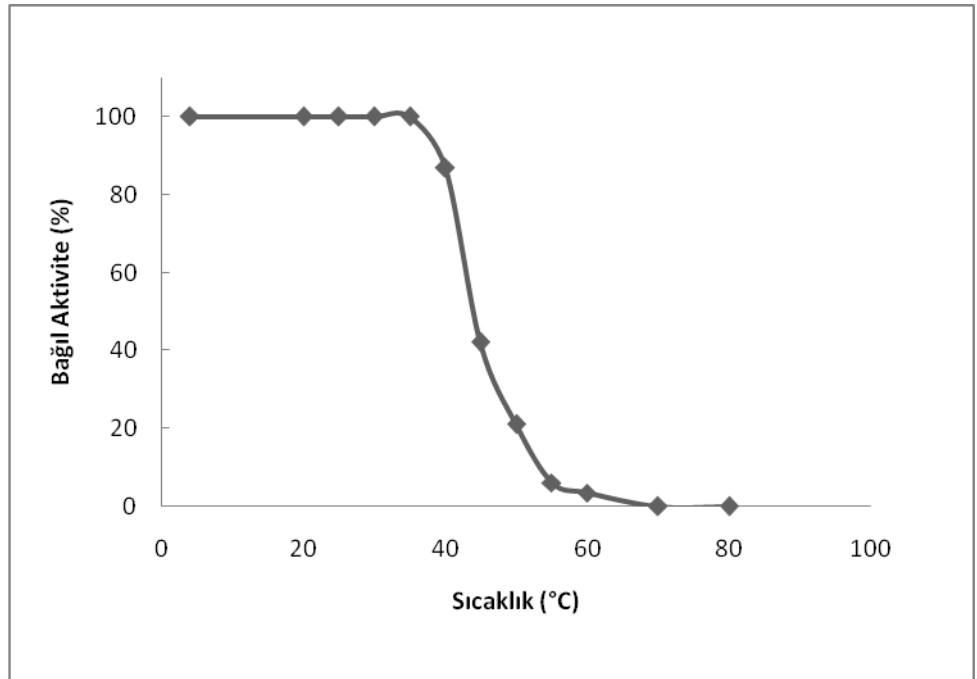
3.3.5.1 α -Galaktozidazın termal kararlılığı

Enzimlerin kararlılığı, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Enzim kararlılığına etki eden en önemli parametrelerden birisi de sıcaklıktır. Termal kararlılık enzimlerin endüstriyel uygulamalar için önemli bir kararlılık türüdür (Önal, 2000).

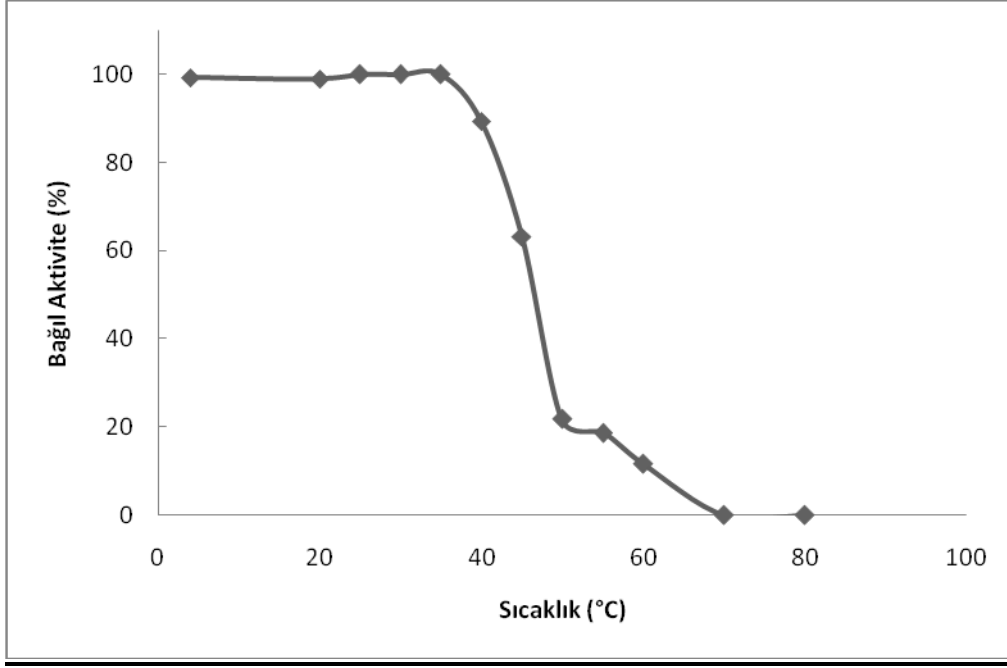
Şekil 3.11 ve 3.12'den görüldüğü gibi AOT ve CTAB ters misel sistemleriyle saflaştırılmış mısır α -galaktozidazının 4-60°C sıcaklık aralığında termal kararlılığı çalışılmış ve enzimin 4-40°C sıcaklık aralığında termal kararlılığının oldukça iyi olduğu gözlenmiştir. AOT tabanlı ters misel mısır α -galaktozidazının 40°C 'de başlangıç aktivitesinin yaklaşık %86,8'ini hala korurken 45°C'de %42'sini korumaktadır. 40°C üzerindeki sıcaklıklarda bağlı aktivite hızla düşmektedir. CTAB tabanlı ters misel mısır α -galaktozidazının 40°C 'de başlangıç aktivitesinin yaklaşık %89,3'ünü hala korurken 45°C'de %63'ünü ve 50°C' de ise %25'ini koruyabilmiştir. Genellikle enzim kaynağına, inkübasyon zamanına, sıcaklığa ve ortama bağlı olarak α -galaktozidazlar için farklı sıcaklık-aktivite ve sıcaklık-kararlılık profilleri elde edilmiştir (Anisha et al., 2008; Çalıcı et al., 2009; Kang and Lee, 2001).

Enzim preparatlarının kararlılığı belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Enzimlerin kararlılığı denilince

genellikle proteinin konformasyonel kararlılığından söz edilir. Enzimin termal, pH ve depo kararlılıkları büyük ölçüde konformasyonel kararlılığı ile belirlenir ve denaturasyon sonucu da inaktivasyon gerçekleşir. Bir enzimin kararlılığı; sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, substratın varlığı ve yokluğu, enzim konsantrasyonu, inkübasyon zamanı, aktivatör ya da inhibitörlerin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak değişim gösteren önemli bir parametredir. Çünkü enzimler oldukça karmaşık yapıları proteinlerdir. Enzimin üç boyutlu yapısına etki edecek bir faktör, enzimin aktivitesini de etkiler (Telefoncu, 1997).



Şekil 3.11 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının termal kararlılığı.



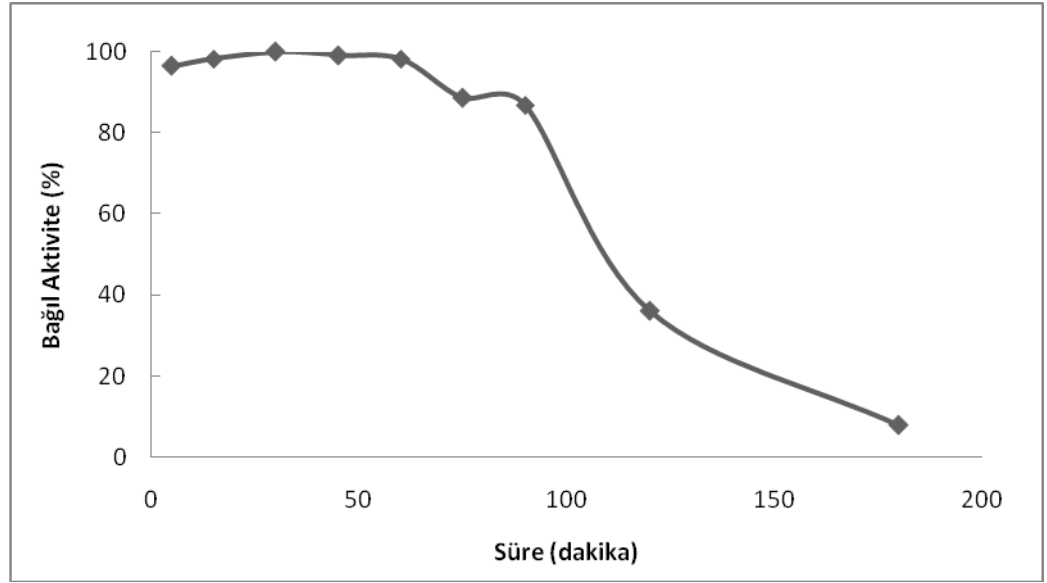
Şekil 3.12 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının termal kararlılığı.

Enzimler protein yapıda oldukları ve ısıya karşı kararlı olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağımlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulsa bile yalnız inkübasyon süresinin uzaması bile denatürasyon sonucu aktivite kaybına neden olur (Önal, 2000). Özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacak olan ters misel enzim preparatlarının kararlılıkları dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerdendir. Ters misel 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. Enzimin uzun süre saklanması durumunda aktivite kaybının ölçüsü enzimin depo kararlılığıdır. Bu süre içinde enzimin katalitik potansiyelinden yararlanılmaz yani enzim iş yapmaz (Önal, 2000).

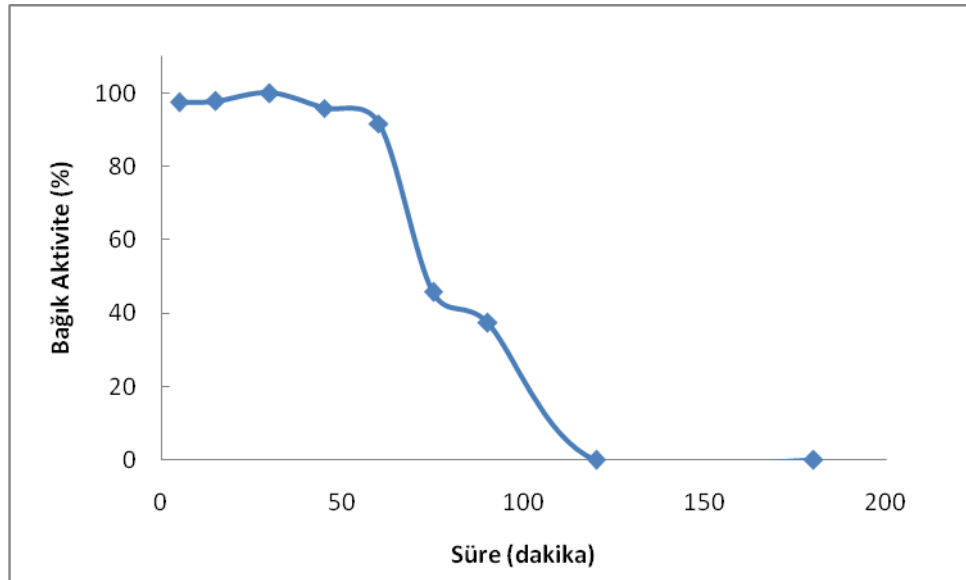
3.3.5.2 Ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılık

Her iki ters misel sistemi ile saflaştırılan enzimler için optimum sıcaklık (37°C) ve genel substrat hidroliz sıcaklığı olan 50 °C'ta mısır α -galaktozidazı 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 dakika bekletildi. Bu sürelerin sonunda standart enzim aktivite ölçüm koşullarında tayin yapıldı ve geriye kalan aktivite miktarı belirlendi. AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi için zamana bağlı termal kararlılık 37 °C ve 50°C için sırasıyla Şekil 3.13 ve

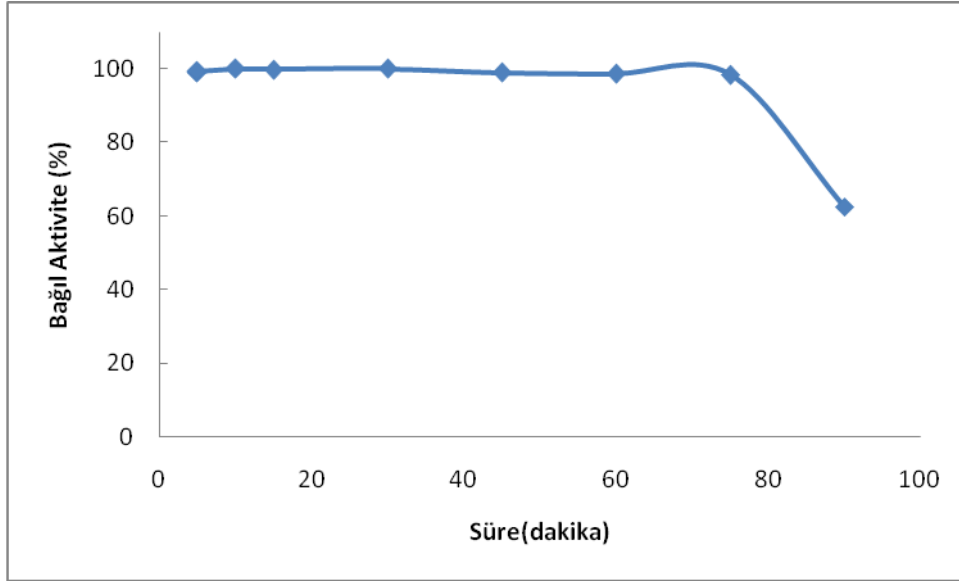
3.14'de, CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi için şekil 3.14 ve 3.15'de verilmiştir.



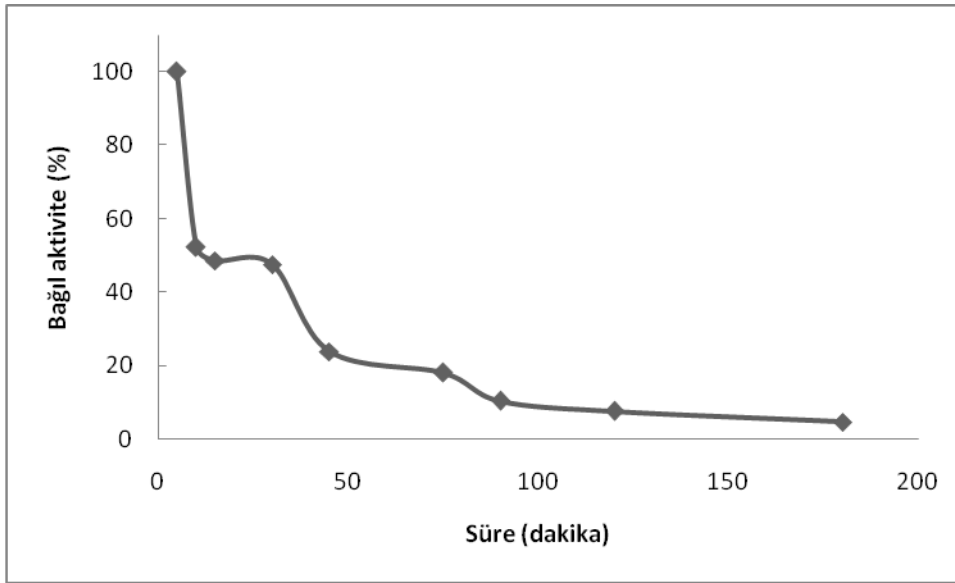
Şekil 3.13 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığı (37⁰C).



Şekil 3.14 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığı (50⁰C).



Şekil 3.15 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığı (37⁰C).

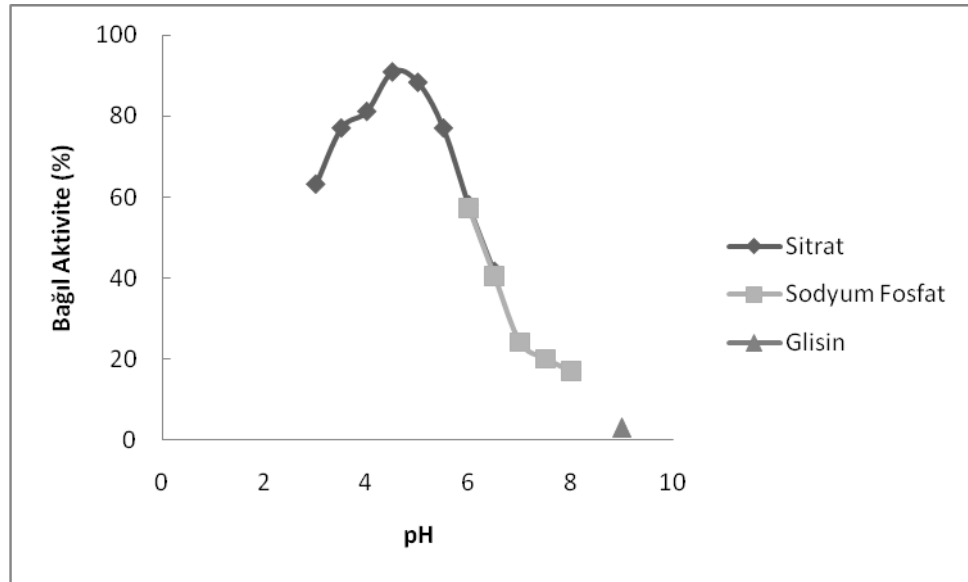


Şekil 3.16 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidaz enziminin ön inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığı (50⁰C).

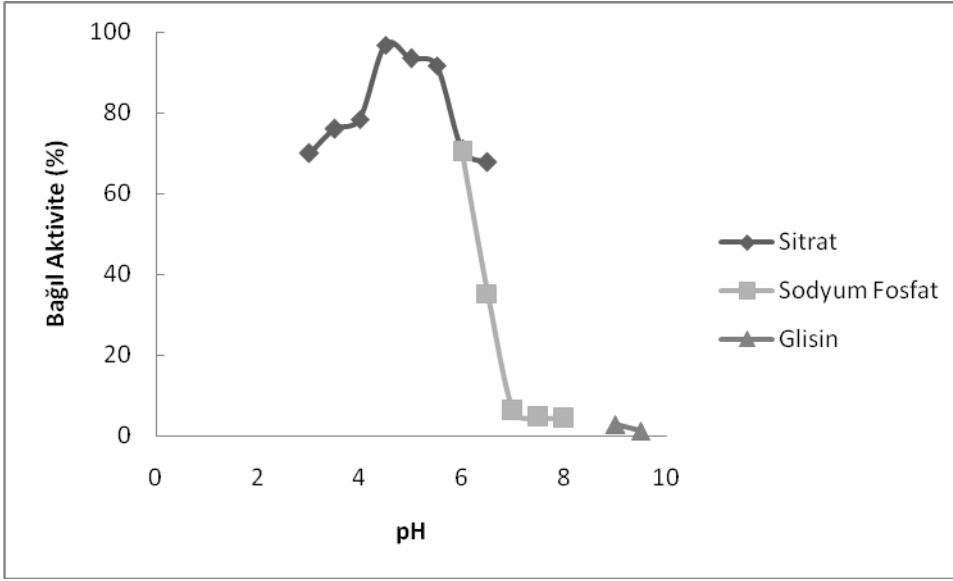
Sonuç olarak AOT ve CTAB ters misel sistemleriyle saflaştırılmış mısır α -galaktozidazının 50⁰C sıcaklıkta termal kararlılığının oldukça düşük olduğu (her iki sistem için de), AOT sistemi için 37⁰C 'da 90 dakikaya kadar aktivitesini koruduğu (başlangıç aktivitesinin %86,84'ünü), CTAB sistemi için ise 120 dakikaya kadar koruduğu ancak 180 dakikada başlangıç aktivitenin %62,60 ye düştüğü görülmüştür.

3.2.5.3 pH kararlılığı

Ortam pH 'sının enzim aktivite ve kararlılığına etkisini incelemek amacı ile düzenlenen deney setinde enzim, 50 mM sitrat, sodyum fosfat, glisin tamponlarında farklı pH 'larda (sitrat ; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; sodyum fosfat: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; glisin : 8,0; 8,5; 9,0; 9,5) 3 saat boyunca 4°C 'de bekletildi ve ardından ortamın pH 'sı 6,0 'ya ayarlanarak standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi (Şekil 3.17 ve 3.18). Her bir ters misel sistem için denemeler çift çalışıldı.



Şekil 3.17 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının pH kararlılığı.



Şekil 3.18 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının pH kararlılığı.

Sonuç olarak AOT ve CTAB ters misel sistemleriyle saflaştırılmış mısır α -galaktozidazının 50 mM'lık sitrat tamponu pH 3-6 aralığında oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir. AOT tabanlı ters misel sistemi için pH:6'da başlangıç aktivitesinin %57,44'ünü hala korumaktadır. CTAB sistemi için ise pH:6'da % 70,36'sını koruduğu tespit edilmiştir. Bu değerlerin üzerindeki pH'larda ise bağıl aktivite hızla düşmektedir(Şekil 3.17 ve 3.18).

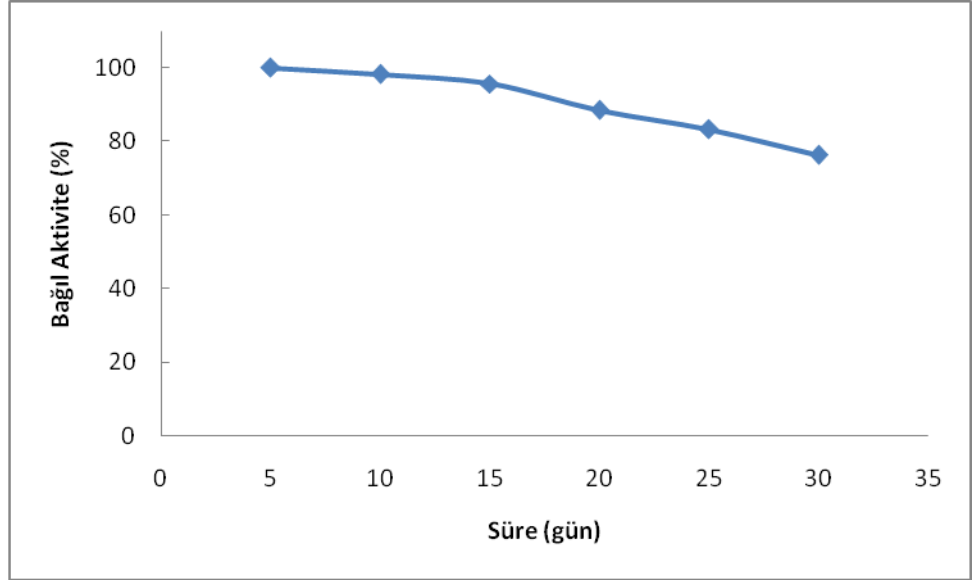
3.3.5.4 Ön inkübasyon zamanına bağlı pH kararlılığı

Her iki misel sistemi ile saflaştırılan α -galaktozidaz enzimi optimum pH'da (pH 4,5) ve enzimimiz 1, 2, 3, 4, 5, 6 saat 37 °C bekletildikten sonra aktivite tayini standart koşullarda ölçüldü ardında da geri kalan aktivite hesaplandı. 6 saat sonun hala aktivitenin % 90'nın korunduğu belirlendi.

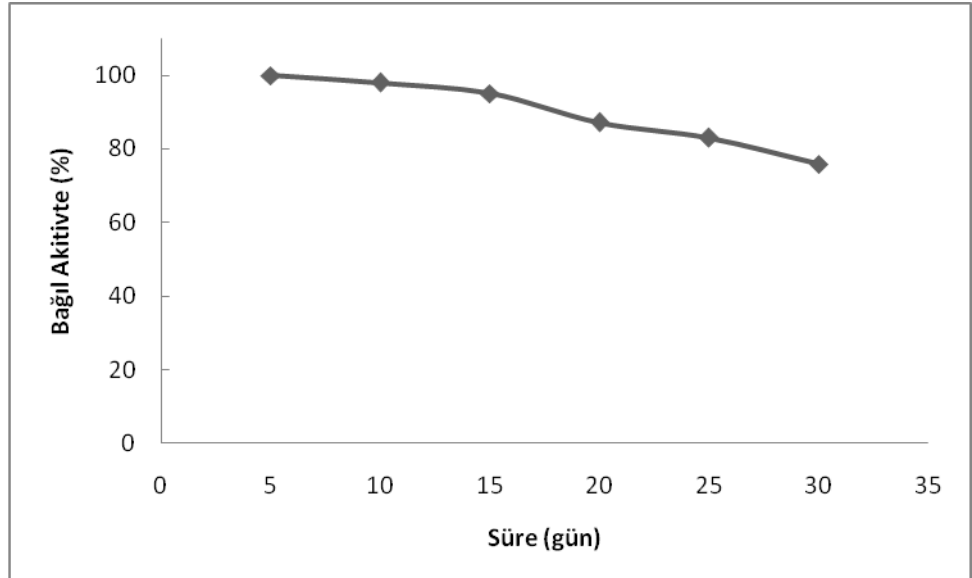
3.3.5.5 Depo kararlılığı

Ters misel sistemi ile saflaştırılan α -galaktozidazların depo kararlılığı metaryal metod bölümünde anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Şekil 3.19 ve 3.20'den anlaşılacağı gibi enzimlerin depo kararlılığı 30 gün izlenmiş ve ters misel α -galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıkları tespit edilmiştir. 30 gün sonunda AOT ters misel enziminin ve CTAB ters misel enziminin sırasıyla % 76,32 ve % 75,87 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Depo kararlılığı

enzimlerin saklanma koşullarına da bağlıdır. Enzimler 4-5 °C' de saklandıkları zaman depolama süresi artmaktadır.



Şekil 3.19 AOT tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının depo kararlılığı.



Şekil 3.20 CTAB tabanlı ters misel sistemi ile saflaştırılan mısır α -galaktozidazının depo kararlılığı.

3.4 α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) Ters Misel Sistemi ile Saflaştırılmasının Genel Olarak Değerlendirilmesi

α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) enzimi ile ilgili izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları çok eski yıllardan beri devam etmektedir. Enzim, *bitkisel* (Chien and Lin-chu,1991; Dey, 1984; Zhu and Goldstein, 1994; Naik et al., 1985; Pressey, 1994; Önal and Telefoncu, 1998; Yoon and Hwang, 2008), *mikrobiyal* (Kotwal et al., 1999; Zeilinger et al., 1993; Mitsutomi et al., 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Ohtakara et al., 1984; Lounteri et al., 1998; Sinitsyna et al., 2008) ve *hayvansal* (Dhar et al., 1993; Dean and Sweeley, 1979a; 1979b; 1979c; Kusiak et al., 1978; Yasuda et al., 2004) kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Bölüm 1.1.6 'da ayrıntılı olarak açıklandığı gibi enzim birçok alanda uygulama olanağı bulmuştur. α -Galaktozidaz medikal alanda (Wong et al., 1986; Shivanna et al., 1989; Dean and Sweley, 1979; Veale et al., 1992, Lenny et al., 1991; Goldstein, 1989; Lenny et al., 1994), şeker endüstrisinde (Itoh et al., 1986; Wong et al., 1986; Somiari and Balong, 1993; Mansour and Khalil, 1998; Slominski, 1994; Shivanna et al., 1989; Mitsutomi and Ohtakara, 1984; Porter et al., 1990; Mitsutomi and Ohtakara, 1988), karbohidrat yapı çalışmaları ile biyolojik fonksiyonların belirlenmesinde (Gidley et al., 1992; Ibatullin et al., 1993), membran modifikasyon çalışmalarında (Dhar et al., 1994), enzimatik sentezlerde (Hashimoto et al., 1993; Galili et al., 1985; Cantacuzene and Attal, 1991; Yanahira et al., 1998), transgalaktozilasyon reaksiyonlarında (Hashimoto et al., 1993; Hashimoto et al., 1995a; Hashimoto et al., 1995b; Naundorf et al., 1998; Wong et al., 1986) ve çeşitli polimer sentezinde (Bulpin and Gidley, 1990) önemli uygulamalara sahiptir.

Sıvı- sıvı ayırma sistemlerinden birisi olan ters misel sistemi (RMS) ile ayırma tekniği protein geri kazanımında hem alt akım hem de üst akım işlemlerinde oldukça kullanışlı olan ve hızla gelişen yeni bir metoddur. Basit, hızlı ve ekonomik bir teknik olan RMS 'de ölçek büyütme de mümkündür. RMS ekstraksiyonu geleneksel saflaştırma teknikleri ile kıyaslandığında oldukça ucuz bir tekniktir. Kromatografik ayırmalardaki çok adımlı işlemlere ve donanımlara gereksinim duyulmaz. Ayrıca ayırma oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmektedir.

Bu çalışmada, mısır (*Zea mays*) 'dan izole edilen α -galaktozidazın ters misel sistemi ile saflaştırılması amaçlanmıştır. Mısır, gerek enzim kaynağı gerekse enzim miktarı açısından α -galaktozidaz enzimi için oldukça ilginç bir

materyaldir. Enzim bu kaynaktan oldukça yüksek aktiviteye sahip ve kararlı bir yapıdadır. Her ne kadar oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen tamamen homojen bir α -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az sayıda çalışma mevcut ise de önemli olan daha sonraki çalışmalarda kullanabileceğimiz uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır. Bu nedenle enzim mısırdan izole edilerek RMS çalışmalarında kullanıldı. RMS sisteminin hazırlanmasında yapılan ön tarama işlemi sonrasında surfaktan olarak Aerosol OT (AOT) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB)'ün kullanılması uygun bulundu. Gerekli optimizasyonlar yapılarak mısır (*Zea mays*)'dan izole edilen α -galaktozidaz enzimi RMS ile AOT tabanlı sistemde 50 mM AOT izooktan sistemi, 1 mg protein çözeltisi kullanılarak, 1:1 (v/v) faz oranı ve 50 mM sodyum sitrat pH 6,0'da yaklaşık %47 aktivite verimi ile 4,8 kat, CTAB tabanlı sistemde ise 15 mM CTAB izooktan:1-hekzanol (1:1, v/v) sistemi ile, 2 mg protein çözeltisi kullanılarak 1:1 (v/v) faz oranı ve 50 mM sodyum sitrat pH 4,5'da yaklaşık %89 aktivite verimi ile 2,3 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, α -galaktozidaz enziminin biyoayırımında RMS sisteminin başlangıç adımı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini ve hazırlanan enzim preparatının enzimin birçok sanayide uygulama alanları için oldukça iyi özelliklere sahip olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ademark, P., Larsson, M., Tjerneld, F., Stålbrand, H.,** 2001, Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities , *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 29, Issues 6–7, 4 October 2001, Pages 441-448.
- 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.
- Ademark, P., Larsson, M., Tjerneld, F., Stalbrand, H.,** 2001, Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 29, Issues 6–7, Pages 441–448.
- 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.
- Alonso, N., Lopez-Gallefo, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Matea, 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. and Prema, P.,** 2007, Production of α -galactosidase by a novel *Actinomycte Streptomyces griseoloalbus* and its application in soymilk hydrolysis, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:859-864.
- Anisha G.S., Rojan P.J., Nicemol J., Niladevi K.N., Prema P.,** 2008, Production and characterization of partially purified thermostable α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications, *Food Chemistry*, Volume 111, Issue 3, 631-635.
- Appukuttan, P.S. and Barsu, D.A.,** 1987, Galactomannan - hydrolysing α -galactosidase from jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) seed: Affinity chromatography purification and properties, *Journal of Bioscience* 12:61 - 69.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Attwood, D. F.**, 1983, Surfactant System: Their chemistry, pharmacy and biology. ed.; *Chapman and Hall*: New York,; 794.
- Balasubramaniam, K. and Mathew, C. D.**, 1986, Purification of α -galactosidase from coconut, *Phytochemistry*, 25(8): 1819-1821.
- 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: 455.
- Bishop, D.F. and Desnick, R.J.**, 1981, Affinity purification of α -galactosidase A from human spleen, placenta and plasma with elimination of pyrogen contamination, *The Journal of Biological Chemistry*, 256(3): 1307-1316.
- Blöch, A., Peterbauer, T., Hofmann, J. and Richter, A.**, 2008, Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds, *Planta* 228:99 -110.
- Boyadzhiev L. and Atanassova I.**, 1991, Extraction of phenylalanine from dilute solutions by rotating film pertraction *Process Biochemistry*, Volume 29, Issue 4, Pages 237-243.
- 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.
- Brandani S., Brandani V., Giacomo G.D., Spera L.**, 1994, A thermodynamic model for protein partitioning in reversed micellar systems, *Chemical Engineering Science*, 49: 3681-3686.
- Brandani V., Giacomo D. G., Spera L.**, 1996, Recovery of α -amylase extracted by reverse micelles *Process Biochemistry*, 31:125-128.
- Brandani V., Giacomo D. G., Spera L.**, 1994, Extraction of α -amylase protein by reverse micelles: II. effect of pH and ionic strength, *Process Biochemistry*, 29: 363-367,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brandani V., Giacomo D. G., Spera L.**, 1993, Extraction of protein α -amylase by reverse micelles, *Process Biochemistry*, 28: 411-414.
- Brandani S., Brandani V., Giacomo G.D., Spera L.**, 1994, A thermodynamic model for protein partitioning in reversed micellar systems, *Chemical Engineering Science*, 49: 3681-3686.
- 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.
- Cantacuzene, D. and Attal, S.**, 1991, Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using α -galactosidase, *Carbohydrate Research*, 211: 327-331.
- Cao, Y., Yuan, P., Shi, P., Luo, H., Li, N., Meng, K., Bai, Y., Yang, P., Zhou, Z., Zang, Z. and Yao, B.**, 2010, Properties of a novel α -galactosidase from *Streptomyces sp. S27* and its potential for soybean processing, *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 305-312.
- Carvalho C.M.L, Cabral J.M.S, Aires-Barros M.R.**, 1999, Cutinase stability in AOT reversed micelles: system optimization using the factorial design methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 24, Issues 8–9, Pages 569-576.
- Carvalho C.M.L, Cabral J.M.S**, 2000, Reverse micelles as reaction media for lipases *Biochimie*, Volume 82, Issue 11, Pages 1063–1085.
- Cavazzoni, V., Adami, A. and Craveri, R.**, 1987, α -Galactosidase from the yeast (*Candida javanica*), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26: 55-559.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Chrost B., Schmitz K.**, 2000, Purification and characterization of multiple forms of α -galactosidase in *Cucumis melo* plants *Journal of Plant Physiology*, Volume 156, Issue 4, Pages 483-491.
- 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.
- Courtois J. E., Petek F.**, 1966, α -Galactosidase from coffee beans *Methods in Enzymology*, Volume 8, 1966, Pages 565-571.
- Cruz, R., Batistela, S.C. and Wosiacki, G.**, 1981, Microbial α -galactosidase for soymilk processing, *Journal of Food Science*, 46: 1196-1200.
- Cuourtois, J.E. and Petek, F.**, 1988, α -Galactosidase from coffea beans, *Methods in Enzymology*, edited by Moshbach, K., *Academic Press, New York*, 137: 565.
- Çalıcı, E., Demir, T., Çelem, E.B. ve Önal, S.**, 2010, Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70, 123-127.
- Daliya, S.M. and Juang R.S.**, 2007, Role of alcohols in the formation of inverse microemulsions and back extraction of proteins/enzymes in a reverse micellar system, *Separation and Purification Technology*, 199-215.
- Dennison, C. and Lovrien, R.**, 1997, Three phase partitioning, concentration and purification of proteins, *Protein Expression and Purification* 11:149-161.
- Dhananjay, S.K. and Mulimani, V.H.**, 2008, Purification of α -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnology Letters*, 30:1565-1569.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dhar, G.M., Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1993, Immobilization of glucoamylases on chitosan beads and application of the conversion of starch to glucose, *Bulletin of Faculty of Agriculture*, 74: 59-68.
- Dhar, G.M., Mitra, M., Hata, J., Butnariu, O. and Smith, D.,** 1994, Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -galactosidase isozymes, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(5): 1052-1055.
- Dean, K.J. and Sweely, C.C.,** 1979, Studies on human liver α -galactosidase I., *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20): 9994-10000.
- Dean, K.J. and Sweely, C.C.,** 1979, Studies on human liver α -galactosidase III., *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20): 10006-10010.
- Dekker M, Van 't Triet. K., Weijers S.R., Baltussen J.W.A., Laane C., Bijsterbosch B.H.,** 1986, Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles *The Chemical Engineering Journal*, 33: 27-33.
- Dekker M, Van 't Triet. K., Bijsterbosch B.H., Fijneman P., Hilhorst.R.,** 1990, Mass transfer rate of protein extraction with reversed micelles, *Chemical Engineering Science*, 45: 2949-2957.
- DeMason, D.A, Madore, M.A., Sekhar, K.N.C. and Harris, M.J.,** 1992, Role of α -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm, *Protoplasma*, 166: 177-184.
- Desnick, R.J., Dean, K.J., Grabowski, G., Bishop, D.F. and Sweely, C.C.,** 1979, Enzyme therapy in Fabry disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(10): 5326-5330.
- Dey, P.M. and Pridham, J.B.,** 1972, Biochemistry of α -galactosidases, In: *Advanced in Enzymology*, ed. 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dey, P.M., 1984**, Characteristic feature of an α -galactosidase from mung beans, *European Journal of Biochemistry*, 140: 385-390.
- Dhananjay, S.K. and Mulimani, V.H., 2008**, Purification of α -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnology Letters*, 30:1565-1569.
- Dhar, G.M., Mitra, M., Hata, J., Butnariu, O. and Smith, D., 1994**, Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -galactosidase isozymes, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(5): 1052-1055.
- Dhar, G.M., Mitsutomi, M. and Ohtakara, A., 1993**, Immobilization of glucoamylases on chitosan beads and application of the conversion of starch to glucose, *Bulletin of Faculty of Agriculture*, 74: 59-68.
- Eto, Y., Ohashi, T., Utsunomiya Y., Fujiwara , M., Mizuna, A., Inui, K., Sakari, N., Kitagawa ,T., Suzuki, Y., Mochizuki, S., Kawakami, M. and Hosoya, T., 2005**, Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: The results of a phase 2 bridging study, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28: 575-583.
- Everett, D. H., 1988**, Basic principles of colloid science; Royal Society of Chemistry: London.
- Ferreira L.F.P., Taqueda M.E., Vitolo M., Converti A., Pessoa A., 2005**, Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles *Journal of Biotechnology*, 116: 411-416.
- 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.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shoet, S.B., 1985**, Human natural anti α -galactosyl IgG, *J.Exq.Med.*, 162: 573-582.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gao, Z. and Schaffer, A. A.**, 1999, A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose, *Plant Physiology*, 119:979-987.
- 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.
- 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.
- Goldstein, J.**, 1989, Conversion of ABO blood groups, *Transfusion Medicine Reviews*, 3(3): 206-212.
- Golubev, A.M. and Neustroev, K.N.**, 1993, Crystallization of α -galactosidase from *Trichoderma reesei*, *Journal of Molecular Biology*, 231: 933-934.
- Grandi, C.; Smith, R.E.; Luisi, P.L.**, 1981, Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents, *Journal of Biological Chemistry*, 256, 837-843.
- Guimaraes, V. M., Rezende S. T., Moreira, M. A., Barros, E. B. and Felix, C. R.**, 2001, Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seeds and their use for hydrolysis of oligosaccharides, *Phytochemistry*, 58:63-67.
- 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 S., Mukhopadhyay L., Moulik S.P.**, 1994, Kinetics in microemulsion medium 2. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate with alkaline phosphatase in w/o microemulsion medium using the surfactant AOT *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3: 191-201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haibach, 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.
- Harpaz, N., Flowers, H.M. and Sharon, N.,** 1978, α -Galactosidase from soybean 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.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Okinago, T. and Kitahata, S.,** 1995, Enzymatic synthesis of α -linked galactooligosaccharides using the reverse reaction of a cell-bound α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(2): 179-183.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Okinago, T. and Kitahata, S.,** 1995, Transgalactosylation catalyzed by α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(4): 619-623.
- Hasmann F. A., Gurpilhares D. B., Roberto I. C., Pessoa Jr A.,** 2007, Response surface methodology for the evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase enrichment process by soybean lecithin reversed micelles, *Journal of Chromatography B*, 7: 262-266.
- Hasmann F.A., Cortez D.V., Gurpilhares D. B., Santos V. C., Roberto I.C., Pessoa-Júnior A.,** 2007, Continuous counter-current purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase using liquid-liquid extraction by reverse micelles, *Biochemical Engineering Journal*, 34: 236-241.
- Hatti-Kaul, R. 2000,** Aqueous Two-Phase Systems, Methods and Protocols, *Humana Press Inc*, New Jersey; Editor: R., Hatti-Kaul, 449 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Ichikawa S., Imai M., Urushiyama S., Shimizu M.,** 1992, Protein Transport between aqueous phase and micellar organic phase using self-assembled amphiphiles, *Process Metallurgy*, 7: 1875-1880.
- Ichikawa S., Sugiura S., Nakajima M., Sano Y., Seki M., Furusaki S.,** 2000, Formation of biocompatible reversed micellar systems using phospholipids, *Biochemical Engineering Journal*, 6: 193-199.
- 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.
- Itoh H., Thien M.P., Hatton T.A., Wang D.I. C.,** 1990, Water transport mechanism in liquid emulsion membrane process for the separation of amino acids *Journal of Membrane Science*, 51: 309-322.
- 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.
- Jean, Y.; Ache, H.J.,** 1978, Study of the micelle formation and the effect of additives on this process in reverse micellar systems by positron annihilation techniques, *Journal of American Chemical Society*, 100,6320-6327.
- Kang, H. C. and Lee, S. H.,** 2001, Characterization of an alpha- galactosidase associated with grape flesh, *Phytochemistry*, 58: 213-219.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- 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.
- Krei G.A., Hustedt H.,** 1992, Extraction of enzymes by reverse micelles, *Chemical Engineering Science*, 47: 99-111.
- Krishna, S. H.; Srinivas, N.D.; Raghavarao, M.S.; Karanth, N.G.,** 2002, Reverse Micellar Extraction for Downstream Processing of Proteins/Enzymes, *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation which is part of the series Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 75: 119-183.
- 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.
- Kusiak, J.W., Quirk, J.M. and Brady, R.O.,** 1978, Purification and properties of the two major isozymes of α -galactosidase from human placenta, *The Journal of Biological Chemistry*, 253(1): 184-190.
- Labuschagne, R.B., Tonder, A. and Litthauer, D.,** 1997, *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization , *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 52-58.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- Liu Y., Dong X., Sun Y.,** 2008, New Development of Reverse Micelles and Applications in Protein Separation and Refolding *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16: 949-955.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee B., Hong D., Lee S., Kuboi R.**, 2004, Analysis of protein back-extraction processes in alcohol- and carboxylic acid-mediated AOT reverse micellar systems based on structural changes of proteins and reverse micelles, *Biochemical Engineering Journal*, 22: 71-79.
- Lee B., Hong D., Lee S., Kuboi R** 2004, Evaluation of carboxylic acid-induced formation of reverse micelle clusters: comparison of the effects of alcohols on reverse micelles, *Biochemical Engineering Journal*, 21:11-18.
- 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 O to 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 subjects of 2 units of red cells enzymatically converted from group B to group O, *Transfusion*, 34:209-214.
- Liljeström, P.L. and Liljeström, P.**, 1987, Nucleotid sequence of the melA gene, coding for α -galactosidase in *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acid Research*, 15(5): 2213-2220.
- Liu J., Xing J., Shen R., Yang C., Liu H.**,2004, Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth *Biochemical Engineering Journal*, 21: 273-278.
- Liu Y., Dong X., Sun Y.**, 2008, New Development of Reverse Micelles and Applications in Protein Separation and Refolding *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16: 949-955.
- Lopez-Gallego, F. ,Betancor, Lo, Hidalgo, A., Matea, 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*, 11: 219-22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lounteri, E., Alatalo, E., Siika-aho, M., Penttilä, M. and Tenkanen, M.,** 1998, α -Galactosidase of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGL1, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: 179-188.
- Luisi, P. L.; Giomini, M.; Pileni, M.P.; Robinson, B.H.,** 1988, Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules, *Biochimica et Biophysica Acta*, 947, 209-246.
- Maly, P., Ticha, M. and Kocourek, J.,** 1985, Studies on lectins, *Journal of Chromatography*, 347(3): 343-350.
- Margolles-Clark, E., Saloheimo, M., Siika-aho, M., Penttilä, M.,** 1996, The α -glucuronidase-encoding gene of *Trichoderma reesei* gene, 172: 171-172
- 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.
- Manzanares, P., Graaff, L., Visse, J.,** 1998, Characterization of Galactosidases from *Aspergillus niger*: Purification of a Novel α -Galactosidase Activity *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 383-390.
- Mathew, C.D. and Balasubramaniam, K.,** 1987, Mechanism of action of α -galactosidase, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 24: 29-32.
- Mathew D.S., Juang R.S ,** 2005, Improved back extraction of papain from AOT reverse micelles using alcohols and a counter-ionic surfactant, *Biochemical Engineering Journal*, 25: 219-225.
- Mathew D.S., Juang R.S,** 2007, Role of alcohols in the formation of inverse microemulsions and back extraction of proteins/enzymes in a reverse micellar system *Separation and Purification Technology*, 53:199-21.
- Mohammedi, H.S, Omidinia, E., Dinarvand, R.,** 2007, Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behaviour in aqueous two-phase partitioning, *Process Biochemistry*, 42, 1296:1301.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.**, 1984, A simplified procedure for purification and crystallization of thermostable α -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(12): 3153-3155.
- Nadkarni, M., Nair, C.K.K., Fandey, V.N. and Pradhan, D.S.**, 1992, Characterization of alpha-galactosidase from *Corynebacterium murisepticum* and mechanism of its induction, *Journal of Genetic and Applied Microbiology*, 38: 23-34.
- 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.
- 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.
- Naundorf, A., Causette, M. and Ajisaka, K.**, 1998, Characterization of the immobilized α -galactosidase C from *Bacillus circulans* and the production of $\alpha(1,3)$ -linked disaccharides, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(7): 1313-1317.
- 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. and Mitsutomi, M.**, 1987, Immobilization of thermostable α -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus* on chitosan beads and its application to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses, *Journal of Fermentation Technology*, 65(4): 493-498.
- Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y.**, 1984, Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(5): 1319-1327.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Orlich, B.; Sechomacker, R., 2002,** Enzyme Catalysis in Reverse Micelles, *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*, 2002, 75, 185-208.
- Owada, M., Sakuraba, H. and Saito, H., 2005,** Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: The results of a phase two bringing study, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28:575- 583.
- Önal, Tatar, S., 2000,** Karpuz (*Citrullus vulgaris*) α -Galaktozidazının Doğal ve Sentetik Polimerlerde İmmobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190s.
- Önal, Tatar S., 1994,** Isolation and purification of α -galactosidase by affinity Ultrafiltration, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 60s.
- 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.
- 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.
- Pires, M.J., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S., 1996,** Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles, *Biotechnology Progress*, 12: 290-301.
- 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., Sarıkaya, A., Herrmann, K.M. and Ladisch, M.R., 1992,** Effect of pH on subunit association protection of soybean α -galactosidase, *Enzyme Microbial Technology*, 14: 609-614.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pra Mauro, E.; Pelizzetti, E., 1996** Surfactants in analytical chemistry: Applications of organized amphiphilic media, Vol. XXXI of Wilson & Wilsons Comprehensive Analytical Chemistry (edited by SG Weber), Elsevier: New York, 521.
- 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, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1770:55-62.
- Rietra, P.J.G.M., Molenaar, J.L., Hamers, M.N., Tager, J.M. and Borst, P., 1974**, Investigation of the α -galactosidase deficiency in Fabry's Disease using antibodies against the purified enzyme, *European Journal of Biochemistry*, 46: 89-98.
- Santos V. C., Hasmann F.A. Converti A., Pessoa Jr A., 2011**, Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth *Biochemical Engineering Journal*, 56: 75-83.
- Saini, H.S., 1988**, Extractability and evaluation of α -galactosidase of sucrose in leguminous seeds, *Food Chemistry*, 28(2): 149-157.
- Schiffmann, R., Altarescu, G., Parker, C., Moore, D., Kreps, C., Brady, R., Barton, N., 2000**, Comparative Efficacy of Dose Regimens in Enzyme Replacement Therapy of Type I Gaucher Disease , *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26: 285-290.
- Shen, W., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J., Deng, L., Chen, H., Yuan, C., Li, D., Li, X., 2008**, New sources of 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*, 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.
- Slominski, B.A.**, 1994, Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of α -galactosidase and -fructofuranosidase: potential for use as dietary additives, *Journal of Science Food Agriculture*, 65: 323-330.
- 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.
- Sundaram, S. and Yarmush, M.L.**, 1993, Affinity Separation, Biotechnology, edited by Rehm, H.J. and Read G.; Verlag, Chemie-Weinheim, 3: 643 p.
- Takayanagi, T., Kushida, K., Itonuma, 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.
- Telefoncu, A.**, 1986, Enzimolojinin prensibleri, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 18s.
- Telefoncu, A.**, 1996, Protein saflaştırma stratejisi ve amacı, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 18s.
- Telefoncu, A., Zihniöglu, F., Önal, Tatar, 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Uslan, A.A.,** 1997, Enzimlerin etki mekanizmaları ve aktif merkez tayini, Enzimoloji (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 30s.
- Veale, R.A., Guiseppin, M.L.F., Van Eijk, H.M.J., Sudbery, P.E. and Verrips, C.T.,** 1992, Development of a strain of *Hansenula polymorpha* for the efficient expression of guar α -galactosidase, *Yeast*, 8: 361-371.
- Watkins, W.M., Zarnitz, M.L. and Kabat, E.A.,** 1962, Development of H activity by human blood group-B, substance treated with coffea bean α -galactosidase, *Nature*, 195: 1204-1206
- Weiser, W., Lehmann, J., Matsui, H., Brewer, C.E. and Hehre, J.E.,** 1992, Stearochemistry of D-galactal and D-galacto-octenikol hydration by coffea bean α -galactosidase: insight to catalytic functioning of the enzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(2): 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 Enviromental Microbiology*, November: 1147-1152.
- Yanahira, S., Yabe, Y., Nakakoshi, M., Miura, S., Matsubara, N. and Ishikawa, H.,** 1998, Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by *Bacillus circulans* α -galactosidase, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(9): 1791-1794.
- Yasuda, K., Chang, H.H., Wu, H.L., Ishii, S. and Fan, J.Q.,** 2004, Efficient and rapid purification of recombinant human α -galactosidases A by affinity column chromatography, *Protein Expression and Purification* 37:499-506.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Kadriye

Soyadı :GEZER

Doğum Tarihi :01/01/1987

Doğum Yeri :Eskişehir

Uyruğu :T. C.

Adrses : İncilipınar mah. No:16/6 Fatih Apt. Denizli-Merkez

GSM :0535 222 37 09

e-mail :kybdrygzs@hotmail.com

Eğitim Durumu:

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı : 2010 - -

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü : 2006 - 20110

Denizli Anadolu Lisesi : 1998 – 2002

Stajlar :

Pamukkale Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı (18 Haziran-18 Ağustos 2009)

Pamukkale Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı (18 Haziran-18 Ağustos 2010)

Yabancı Dil:

İngilizce : İyi derecede

Almanca : Başlangıç seviyesi

İtalyanca : Başlangıç seviyesi

Katıldığı Eğitim ve Seminerler:

- Sorumlu Yöneticilik (07/03/2009)
- İş Güvenliği Uzmanlık (01/08/2012)

Bilimsel Çalışmalar:

1. Application Areas of Ligninolytic Enzymes (2010) (Lisans Bitirme Tezi)

Bilgisayar :

Microsoft Office, Internet.