

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**$\alpha$ -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN  
İMMOBİLİZASYONU İÇİN BİYOAFİNİTE  
TEMELLİ İMMOBİLİZASYON  
PROSEDÜRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Tuğba DEMİR**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu:405.05.01**

**Sunuş Tarihi: 14.09.2012**

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

**Bornova-İZMİR**

**2012**



Tuğba DEMİR tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “ $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için biyoafinite temelli immobilizasyon prosedürlerinin 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 14.09.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : .....

**Raportör Üye** : .....

**Üye** : .....



**ÖZET** **$\alpha$ -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN  
İMMOBİLİZASYONU İÇİN BİYOAFİNİTE TEMELLİ  
İMMOBİLİZASYON PROSEDÜRLERİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

DEMİR, Tuğba

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Eylül 2012, 140 sayfa

$\alpha$ -Galaktozidazlar ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) hidrolazların bilinen bir sınıfı olup rafinoz ailesi şekerlerin galakto oligosakkaritleri ve galaktomannan polisakkaritlerdeki  $\alpha$ -1,6 bağlı D-galaktoz birimlerinin hidrolizini katalizlerler. Doğada oldukça yaygın olarak bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunurlar.  $\alpha$ -Galaktozidazlar çok çeşitli biyoteknolojik ve medikal uygulamalara sahiptir, örneğin; gıda işleme ve hayvan besleme prosedürlerinde, şeker endüstrisinde, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, enzimatik sentezlerde, yapısal analizlerde, kan grubu dönüşümlerinde ve Fabry hastalığının tedavisinde kullanılırlar.

Enzim immobilizasyonu teknolojisi enzimlerin tekrar kullanılabilmesini sağlamak ve kararlılığını geliştirmek için etkin bir araçtır. Enzimlerin immobilizasyonu için bazı protokoller mevcuttur ancak çok azı basit ve/veya enzim özelliklerini geliştirebilir niteliktedir. Bu nedenle yeni immobilizasyon

protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonunda yeni trend enzim ve taşıyıcı arasında çeşitli biyoafinite bağlarının oluşturulmasıdır. Biyoafinite immobilizasyonunda enzim taşıyıcıda biyospesifik etkileşimlerle immobilize edilir.

Bu çalışmada,  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi domatesten (*Lycopersicon esculentum*) izole edildi ve sonra bir biyoafinite protokolü ile kitosan (doğal bir polimer) ve Sepabead EC-EA'da (sentetik bir polimer) immobilize edildi. Bu immobilizasyon protokolünde polimerler önce glutaraldehid ile aktive edildi ve ardından 3-aminofenil boronik asit (AFBA) ile türevlendirildi. Her iki biyoafinite taşıyıcısı  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda kullanıldı. İmmobilizasyon protokolü optimize edildi ve immobilizasyona bazı parametrelerin etkisi araştırıldı. Serbest ve immobilize enzimlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim aktivitesine etki eden bazı parametreler (pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, efektör konsantrasyonları) incelenerek kararlılık testleri yapıldı. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği de test edildi. Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimleri rafinoz hidroliz prosesinde kullanıldı.

**Anahtar kelimeler:**  $\alpha$ -Galaktozidaz, domates, *Lycopersicon esculentum*, immobilizasyon, kitosan, Sepabead EC-EA, aminofenil boronik asit, biyoafinite.

**ABSTRACT**  
**BIOAFFINITY BASED IMMOBILIZATION**  
**PROCEDURES FOR IMMOBILIZATION OF**  
 **$\alpha$ -GALACTOSIDASE**

DEMİR, Tuğba

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

September 2012, 140 pages

$\alpha$ -Galactosidases ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) are a common class of hydrolases that catalyze the hydrolysis of  $\alpha$ -1,6-linked-D-galactose residues present in galactooligosaccharides of sugars of the raffinose family and galactomannan polysaccharides. They are widely distributed in nature and found in plants, animals, microorganisms.  $\alpha$ -Galactosidases have many potential biotechnological and medicinal applications such as in food processing, animal feed processing, sugar producing industry, pulp and paper industry, enzymatic synthesis, structural analysis, conversion of blood type and treatment of Fabry's disease.

Enzyme immobilization technology is an effective means to perform enzyme reuse and to improve its stability. There are many protocols for the immobilization of enzymes but very few are also very simple and/or very capable of improving enzyme properties. Therefore novel immobilization protocols are still

needed. A new trend in enzyme immobilization is to create different bioaffinity bonds between the carrier and enzyme. In bioaffinity immobilization the enzyme is immobilized to a matrix via biospecific interactions.

In this study,  $\alpha$ -galactosidase was isolated from tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*) and then immobilized on chitosan (natural polymer) and Sepabead EC-EA (synthetic polymer) by using a bioaffinity protocol. In this protocol, the polymers activated by glutaraldehyde at first and then derivatized by 3-aminophenyl boronic acid (AFBA). Both the bioaffinity supports were used for the immobilization of  $\alpha$ -galactosidase. The immobilization protocol was optimized and several parameters that effect the immobilization of the enzyme were also investigated. Physical and chemical characterization of free and immobilized enzymes were made. Some parameters effecting to the enzyme activity (pH, temperature, substrate concentration and effector concentration) were searched and stability tests (thermal, pH, storage and operational stability) were also made. Beside of these, usebility of the immobilized enzymes were tested. Free and immobilized  $\alpha$ -galactosidases were also used in the hydrolysis of raffinose.

**Keywords:**  $\alpha$ -Galactosidase, tomato, *Lycopersicon esculentum*, immobilization, chitosan, Sepabead EC-EA, aminophenyl boronic acid, bioaffinity.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım sayın danışman hocam Prof. Dr. Seçil ÖNAL' a ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca yardımlarını ve değerli zamanını benden hiçbir zaman esirgemeyen Araştırma Görevlisi Umut MENGÜLLÜOĞLU' na, her türlü desteği ile tezim boyunca yanımda olan arkadaşlarım Esin ÇALCI' ya, Hasan BAYRAKTAR' a ve Gamze DÜZER' e, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü konuda yardımcı olan doktora öğrencisi Evran ÇELEM' e ve beni eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak destekleyen, her koşulda yanımda olan değerli ailem anneme, babama ve ablama teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2011- FEN- 034 numaralı proje ile desteklenmiştir.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	V
ABSTRACT .....	VII
TEŞEKKÜR .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XXVIII
1. GİRİŞ .....	1
1.1 $\alpha$ -Galaktozidazlar.....	1
1.1.1 $\alpha$ -Galaktozidazlar ve $\alpha$ -galaktozidazların biyokimyası..	4
1.1.2 $\alpha$ -Galaktozidazların etki mekanizması.....	7
1.1.3 $\alpha$ -Galaktozidazların izolasyonu ve saflaştırılması.....	11
1.1.4 $\alpha$ -Galaktozidazların fiziksel özellikleri.....	12
1.1.5 $\alpha$ -Galaktozidazların kinetik özellikleri.....	14

**İÇİNDEKİLER (devam)****Sayfa**

1.1.6	$\alpha$ -Galaktozidazların fizyolojik önemi ve uygulama alanları.....	22
1.2	İmmobilize Enzimler.....	26
1.2.1	Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	28
1.2.2	Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	35
1.2.3	$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin kitosanda biyoafinite temelli immobilizasyon.....	37
1.2.4	$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC-EA'da biyoafinite temelli immobilizasyonu.....	39
1.3	Boronik Asit Türevleri.....	42
1.3.1	Fenil boronik asit (PBA).....	45
1.3.2	Aminofenil boronik asit (AFBA).....	48
1.4	İmmobilize Enzimlerin Uygulama Alanları.....	49
1.5	İmmobilize Enzimler ve $\alpha$ -Galaktozidazlarla İlgili Gelecekte Beklentiler.....	50

**İÇİNDEKİLER (devam)****Sayfa**

2. MATERYAL ve METOD.....	52
2.1 Materyal.....	52
2.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini (PNPG ile).....	52
2.3 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini (Rafinoz ile).....	53
2.4 Protein Tayini.....	54
2.5 Aminofenil Boronik Asit Tayini.....	55
2.6 Domates $\alpha$ -Galaktozidazının İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırması.....	55
2.7 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Kitosan ve Sepabead EC-EA 'da İmmobilizasyonu.....	56
2.8 İmmobilizasyon Ortamının Optimizasyonu.....	57
2.8.1 Glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi.....	57
2.8.2 AFBA konsantrasyonunun etkisi.....	58
2.8.3 İmmobilizasyon ortamının pH' ının etkisi.....	58

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

2.8.4	İmmobilizasyon ortamının iyon şiddetinin etkisi.....	58
2.8.5	İmmobilize enzimin çapraz bağlanması için gerekli glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	59
2.9	İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	59
2.9.1	$\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi..	59
2.9.2	Kararlılık testleri.....	62
2.9.3	Tekrar kullanılabilirlik.....	64
2.10	İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının PNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı.....	65
3.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	66
3.1	$\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Domatesten İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.....	66
3.2	$\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Sepabead EC-EA ve Kitosan'da İmmobilizasyonu.....	67

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.2.1 Glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	69
3.2.2 Aminofenil boronik asit miktarının belirlenmesi.....	72
3.2.3 Protein miktarının belirlenmesi.....	73
3.2.4 İmmobilizasyon ortamının pH' ının ve iyon şiddetinin belirlenmesi.....	76
3.2.5 İmmobilize edilen enzimin çapraz bağlanması için gerekli glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi.	80
3.3 Serbest ve İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	83
3.3.1 Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon.....	82
3.3.2 Kararlılık testleri.....	96
3.3.3 İmmobilize $\alpha$ -galaktozidazların tekrar Kullanılabilirliği.....	111

**İÇİNDEKİLER (devam)****Sayfa**

3.3.4	Kitosan ve Sepabead EC-EA'da immobilize $\alpha$ -galaktozidaz ile PNPG ve Rafinoz hidrolizi.....	115
3.4	$\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Kitosan ve Sepabead EC-EA Taşıyıcılarında İmmobilizasyonunun Genel Olarak Değerlendirilmesi.....	120
	KAYNAKLAR DİZİNİ .....	123
	ÖZGEÇMİŞ .....	139



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1 Genel reaksiyon mekanizması.....	4
1.2 İki adımlı mekanizma.....	9
1.3 Tek adımlı mekanizma.....	9
1.4 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması...	29
1.5 Proteinlerin biyoafinite immobilizasyonu için kullanılan iki farklı strateji.....	35
1.6 Kitosanın kimyasal yapısı.....	37
1.7 Kitosanın glutaraldehit ile aktivasyonu ve Aminofenilboronik asit (AFBA) ile reaksiyonu.....	39
1.8 Boronik asit ve boronik asidin esterleri.....	43
1.9 Boronik asit türevleri.....	43
1.10 Boronat-diol ester oluşumu.....	45
1.11 Fenilboronik asitle diol arasındaki bağlanma.....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.12 Fenil boronik asit türevleri.....	47
1.13 $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile rafinoz hidrolizi.....	51
3.1 Serbest ve kitosanda immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri (substrat: PNPG, inkübasyon süresi: 30 dakika).....	84
3.2 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri (substrat: PNPG, inkübasyon süresi: 30 dakika)...	84
3.3 Serbest ve kitosanda immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum pH'ı (substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, tamponlar: 0,1 M, 2,6- 7,0 sitrat-fosfat; 7,0- 8,0 fosfat; 8,0- 9,0 Tris-HCl ). .....	87
3.4 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum pH'ı (substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, tamponlar: 0,1 M, 2,6- 7,0 sitrat-fosfat; 7,0- 8,0 fosfat; 8,0- 9,0 Tris-HCl ).....	87
3.5 PNPG konsantrasyonunun serbest enzim ve kitosanda immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi enzimi aktivitelerine etkisi.....	89

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.6 PNPG konsantrasyonunun serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi aktivitelerine etkisi.....	89
3.7 Serbest ve kitosanda immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C , inkübasyon süresi: 30 dakika).....	90
3.8 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 37 °C , inkübasyon süresi: 30 dakika).....	90
3.9 Rafinoz konsantrasyonunun serbest enzim ve kitosanda immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi aktivitelerine etkisi.....	92
3.10 Rafinoz konsantrasyonunun serbest enzim ve Sepabead EC-EA' da immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi aktivitelerine etkisi.....	92
3.11 Serbest ve kitosanda immobilize $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50 °C, inkübasyon süresi: 60 dakika).....	93

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)****Şekil****Sayfa**

- 3.12 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50 °C, inkübasyon süresi: 60 dakika). .....93
- 3.13 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık: 37 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika).....98
- 3.14 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık: 37 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika).....98
- 3.15 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık: 37 °C, inkübasyon süresi: 30 dakika).....99
- 3.16 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık 37 °C, inkübasyon süresi: 30 dakika).....99

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)****Şekil****Sayfa**

- 3.17 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 50 °C; inkübasyon süresi: 30 dakika).....100
- 3.18 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 50°C; inkübasyon süresi: 30 dakika).....100
- 3.19 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin pH kararlılıkları (Substrat: PNPG; sıcaklık: 37 °C, inkübasyon süresi: 30 dakika)...102
- 3.20 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin pH kararlılıkları (Substrat: PNPG; sıcaklık: 37 °C, inkübasyon süresi: 30 dakika).....102
- 3.21 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıkları.....104
- 3.22 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıkları....104

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)****Şekil****Sayfa**

- 3.23 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılığı (substrat: PNPG).....109
- 3.24 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılığı (substrat: PNPG).....109
- 3.25 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin operasyonel kararlılığı (substrat: Rafinoz).....110
- 3.26 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidazın operasyonel kararlılığı (substrat: Rafinoz).....110
- 3.27 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 37°C' de tekrar kullanılabilirliği.....112
- 3.28 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 37°C' de tekrar kullanılabilirliği.....112
- 3.29 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 50°C' de tekrar kullanılabilirliği.....114
- 3.30 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 50°C' de tekrar kullanılabilirliği.....114

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)****Sekil****Sayfa**

- 3.31 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından PNPG'nin kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi.....116
- 3.32 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından PNPG' nin kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi...116
- 3.33 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından rafinozun kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi.....117
- 3.34 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından rafinozun kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi..117
- 3.35 PNPG' nin, kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu$ mol).....118
- 3.36 PNPG' nin, Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu$ mol).....118
- 3.37 Rafinozun, kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu$ mol).....119

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)****Şekil****Sayfa**

- 3.38 Rafinozun, Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu\text{mol}$ ).....119



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1 Oligosakkarit yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bazı ekzoglikozidazlar.....	3
1.2 Bazı $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri.....	14
1.3 $\alpha$ -Galaktozidazların substrat spesiflikleri.....	16
1.4 $\alpha$ -Galaktozidazların termal kararlılıkları.....	19
1.5 $\alpha$ -Galaktozidazların optimum pH değerleri.....	21
1.6 İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri....	28
1.7 Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin yarar ve sakıncaları	32
1.8 İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması.....	33
1.9 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılarda aranan genel özellikler.....	36
1.10 Sepabead EC-EA taşıyıcının genel özellikleri.....	41
1.11 Aminofenil boronik asitin biyoafinite gösterdiği moleküller.....	48

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1 Glutaraldehit konsantrasyonunun kitosanda $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi .....	70
3.2 Glutaraldehit konsantrasyonunun Sepabead EC-EA'da $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	71
3.3 AFBA miktarının kitosanda $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	72
3.4 AFBA miktarının Sepabead EC-EA'da $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	73
3.5 Protein miktarının kitosanda $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	74
3.6 Protein miktarının Sepabead EC-EA'da $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	75
3.7 İmmobilizasyon ortamının pH'ının kitosanda $\alpha$ - galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	76

## ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>		<u>Sayfa</u>
3.8	İmmobilizasyon ortamının pH' ının Sepabead EC-EA'da $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi...	77
3.9	İmmobilizasyon ortamının iyon şiddetinin kitosanda $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.....	77
3.10	İmmobilizasyon ortamının iyon şiddetinin Sepabead EC- EA'da $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi .	78
3.11	Kitosan ve Sepabead EC-EA' da $\alpha$ - galaktozidazın büyük ölçekte immobilizasyonu.....	79
3.12	Kitosanda kovalent bağlı $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlanması.....	81
3.13	Sepabead EC-EA' da kovalent bağlı $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çapraz bağlanması.....	82
3.14	Serbest ve immobilize $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin PNPG ve rafinoz substratları için Km ve Vmax değerleri.....	91
3.15	Çeşitli kimyasalların serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelerine etkisi.....	94

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.16 Çeşitli şekerlerin serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelere etkisi.....	95
3.17 Kitosan' da immobilize edilen domates $\alpha$ - galaktozidazının farklı zamanlardaki $k_D$ değerleri (substrat: PNPG).....	106
3.18 Sepabead EC-EA' da immobilize edilen domates $\alpha$ - galaktozidazının farklı zamanlardaki $k_D$ değerleri (substrat: PNPG).....	106
3.19 Kitosan' da immobilize edilen domates $\alpha$ - galaktozidazının farklı zamanlardaki $k_D$ değerleri. (substrat:Rafinoz).....	108
3.20 Sepabead EC-EA' da immobilize edilen domates $\alpha$ - galaktozidazının farklı zamanlardaki değerleri(substrat: Rafinoz).....	108

**SİMGELER VE KISALTMALAR****Simgeler** $t_{1/2}$ **Açıklama**

Yarılanma ömrü

 $k_D$ 

Bozunma sabiti

U

Unit aktivite birimi

**Kısaltmalar**

AFBA

**Açıklama**

3-Aminofenil boronik asit

BSA

Sığır serum albumini

CDI

1-1'-Karbonildiimidazol

CNBr

Siyanojen bromür

SDS-PAGE

Sodyum Dodesil Sülfat

PBA

Fenilboronik asit

PNP

p-Nitrofenil

PNPG

p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid

oPNG

o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid



## 1. GİRİŞ

$\alpha$ -D-Galaktozidazlar ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), basit ve kompleks oligo- ya da polisakkaritlerin hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfı glikozidazlardır. Metanol, fenol ve 4-nitrofenol glikozidlerinden, disakkaritler ve disakkarit türevlerinden (örneğin; melibioz, melibionik asit), trisakkaritlerden (örneğin; rafinoz), oligosakkaritlerden (örneğin; stakiyöz) ve galaktolipidlerden terminal  $\alpha$ -galaktozil artıklarını hidrolizlerler. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan  $\alpha$ -D-galaktozidazlar, çok çeşitli biyokimyasal teknikler kullanılarak bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilerek saflaştırılmışlardır.

Kompleks karbohidratların biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesinde, organik sentezlerde, yapı analizlerinde, medikal alanda ve endüstriyel proseslerde pek çok kullanım alanı bulunan  $\alpha$ -D-galaktozidazlar, özellikle şeker endüstrisi için oldukça önemli enzimlerdir. Rafinoz, sukrozun kristalizasyonunu engelleyerek kristalize şeker verimini düşüren bir trisakkarit olup, çeşitli kaynaklardan çıkararak hazırlanan serbest ve immobilize  $\alpha$ -D-galaktozidaz preparatları ile hidrolizlenerek önemli oranda ekonomi sağlanmaktadır. Bu nedenle  $\alpha$ -D-galaktozidazın çeşitli kaynaklardan en ekonomik ve verimli şekilde izolasyonu, saflaştırılması ve immobilizasyonu oldukça önemlidir.

### 1.1 Galaktozidazlar

Galaktozidazlar, glikozidazların bir alt sınıfı olan hidrolitik enzimlerdir. Glikozidazlar da glikozil bileşikleri üzerinde etkili olan oldukça geniş ve önemli bir enzim grubudur. Basit glikozidler ile kompleks oligo- ve polisakkaritlerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizlerler. Glikopiranozil grupları ile glikozidik bağların anomerik konfigürasyonlarına karşı oldukça spesifik olan glikozidazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunurlar. Yaklaşık olarak 150 yıldan bu yana araştırmacılar glikozidazlarla ilgili farklı çalışmalar yapmaktadırlar. Uzun zamandan beri Biyokimya'nın en ilginç araştırma konularından birisi olmasına rağmen glikozidazların moleküler özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında çok az bilgi edinilebilmiş ve sadece birkaçı kristalize edilebilmiştir. Amilaz ve lizozim kristal formda elde edilen glikozidaz sınıfı enzimlerdir.

Glikozidazların bir kısmı glikozil artıklarını oligosakkaritlere, polisakkaritlere ve diğer alkolik reseptörlere transfer ettikleri halde hidrolazlar

sınıfına dahil edilirler. Glikozidazlar, O-glikozil, N-glikozil ve S-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler (EC 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3) olarak üç gruba ayrılırlar ve çok çeşitli glikozidik bağlar üzerinde etkilidirler. Örneğin;  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2), ekzo-1,4- $\alpha$ -D-glukozidaz (EC 3.2.1.3), sikloheptaglukanaz (EC 3.2.1.12) ve siklohegzaglukanaz (EC 3.2.1.13)  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağlarını, amilopektin-1,6-glukozidaz (EC 3.2.1.9), oligo-1,6-glukozidaz (EC 3.2.1.10) ve dekstranaz (EC 3.2.1.11)  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağlarını,  $\alpha$ -galaktozidaz ise  $\alpha$ -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;  $\alpha$ -galaktozidazlar monosakkarit, oligosakkarit, glikopeptid ve fenole  $\alpha$ -bağlı terminal galaktoz artıklarını,  $\beta$ -galaktozidazlar ise  $\beta$ -1,6-,  $\beta$ -1,4- veya  $\beta$ -1,3-bağlı terminal galaktoz artıklarını hidrolizleyebilirler (Önal, 2000).

Glikozidazlar, genel olarak endo- ve ekzo- glikozidazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Glikoproteinler üzerinde etkili olan endoglikozidazlar; endo- $\beta$ -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;  $\alpha$ -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;  $\beta$ -N-asetil-D-glukozaminidaz (EC 3.2.1.30),  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2), amiloglukozidaz (EC 3.2.1.3),  $\beta$ -fruktozidaz (EC 3.2.1.26),  $\alpha$ -L-fukozidaz (EC 3.2.1.51),  $\alpha$ -galaktozidaz (EC 3.2.1.22),  $\beta$ -galaktozidaz (EC 3.2.1.23),  $\alpha$ -glukozidaz (EC 3.2.1.20),  $\beta$ -glukozidaz (EC 3.2.1.21),  $\beta$ -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).

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

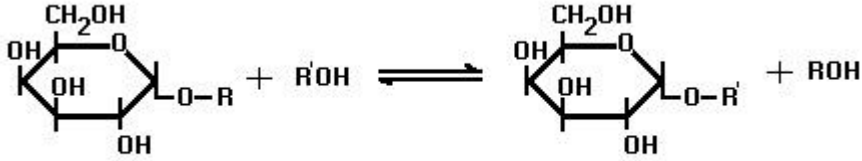
Galaktozidazlar, ekzoglikozidazların en iyi bilinen sınıfıdır. Ekzoglikozidazlar, glikoprotein ve glikolipidlerdeki karbohidrat yapısını modifiye ederler. Bu enzimler O-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler olup  $\alpha$ - ve  $\beta$ -galaktozidazlar olarak iki gruptan oluşurlar.  $\alpha$ -Galaktozidazlar ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22) (melibiaz); galaktoz oligosakkaritleri, galaktolipidleri içeren  $\alpha$ -D-galaktozidlerdeki terminal, indirgen olmayan  $\alpha$ -D-galaktoz artıklarını ve  $\alpha$ -D-fukozidleri de hidrolizlerler.  $\beta$ -Galaktozidazlar ( $\beta$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23) (laktaz);  $\beta$ -D-galaktozidlerdeki terminal indirgen olmayan  $\beta$ -D-galaktoz artıklarını hidrolizlerler. Bu gruptaki enzimlerden bazıları  $\alpha$ -L-arabinozidler de hidrolizlemektedir (Bergmeyer, 1973; Gaudreault and Webb, 1983; Harpaz et al., 1978).

### 1.1.1 $\alpha$ -Galaktozidazlar ve $\alpha$ -galaktozidazların biyokimyası

$\alpha$ -Galaktozidazlar ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), doğada oldukça yaygın olarak bulunan hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Çok sayıda  $\alpha$ -D-galaktopiranozidik bağın hidrolizini katalizlerler (Harpaz et al., 1978; 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*  $\alpha$ -galaktozidazının insan ve tavşan eritrosit membranındaki  $\alpha$ -1,3-galaktozil artıklarına karşı aktif olduğu (Dhar et al., 1994), *Vigna radiata*  $\alpha$ -galaktozidazının yine tavşan eritrositlerindeki  $\alpha$ -galaktozidik bağları hidrolizlediği (Dey, 1984), kahve tohumu  $\alpha$ -galaktozidazının kırmızı hücrelerdeki gliko-konjugatlardan terminal  $\alpha$ -galaktoz artıklarını (Zhu and Goldstein, 1994) ve *Colocasia esculenta*  $\alpha$ -galaktozidazının ise galaktoz içeren konjugatlarda  $\alpha$ -1,4- ve  $\alpha$ -1,6- bağlarını (Chien and Lin-Chu, 1991) hidrolizlediği belirtilmiştir.

$\alpha$ -Galaktozidazlar çok çeşitli kaynaklardan; mikroorganizmalar (Sirisha et al., 2010; Gote et al., 2006; Nadkarni et al., 1992; Svastits-Dücső et al., 2009; Wong et al., 1986; King et al., 2002; Farzadi et al., 2010; Kotwal et al., 1999; El-Shebawy et al., 2007; 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, 1979; Alonso et al., 2005; Bishop and Desnick, 1981) ve bitkilerden (Shen et al., 2008; Kang and Lee, 2000; Dey, 1984; Chrost and Schmitz, 1999; Soh et al., 2006; Zhu and Goldstein, 1994; Guimarães et al., 2001; 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  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları ise oldukça az sayıdadır. Mikrobiyal kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları (Filho et al., 2007; Liu et al., 2007; Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987) ise daha çok endüstriyel olarak kullanım alanı bulmuştur (Linden, 2002; Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Mansour and Khalil, 1998).

$\alpha$ -Galaktozidazlar çok geniş uygulama alanı olan enzimlerdir. Enzim saflaştırılmasında kullanılan metodlarda dikkate değer ölçüde bir gelişme olmasına rağmen kontamine glikozidazların ortamdan uzaklaştırılması hala oldukça güç bir işlemdir. Eğer hazırlanan  $\alpha$ -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; 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 (Linden, 2002; 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.

Şeker endüstrisinde  $\alpha$ -galaktozidazlar, melastaki rafinozu hidrolizleyerek kristalize şeker verimini artırmak amacıyla biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır (Itoh et al., 1986; Slominski, 1994). Biyoteknolojik uygulama alanları nedeniyle  $\alpha$ -galaktozidazlar oldukça önemli ve değerli bir enzim grubudur.

Medikal alanda ise  $\alpha$ -galaktozidazlar ile 3-0- $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidaz-A enzimi eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır (Froissarta et al., 2003; Erdős et al., 2008; Yoshimitsu et al., 2010; Balasubramaniam and Mathew, 1986; Coppola et al., 1994; Ishii et al., 1993).  $\alpha$ -Galaktozidazların böyle medikal amaçlar için enzim terapisinde kullanılabilecekleri de bilinmektedir (Wong et al., 1986; Balasubramaniam and Mathew, 1986).

Farklı kaynaklardan saflaştırılan  $\alpha$ -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)  $\alpha$ -galaktozidazlarının birer glikoprotein oldukları ve genellikle bitkisel kaynakların, özellikle de tahılların, glikoprotein karakteri gösterdiği belirtilmiştir.

*Cyamopsis tetragonolobus*  $\alpha$ -galaktozidazının anyonik karakterli  $\alpha$ -galaktozidaz-A ve katyonik karakterli  $\alpha$ -galaktozidaz-C<sub>2</sub> 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,  $\alpha$ -galaktozidaz-C<sub>2</sub>'nin karbohidrat kısmının galaktoz, ksiloz ve glukozdan ibaret olduğu fakat  $\alpha$ -galaktozidaz-A'nın eser miktarda galaktoz içerirken hiç glukoz ve ksiloz içermediği belirlenmiştir (Shivanna et al., 1990). *Vicia faba*  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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).

$\alpha$ -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*  $\alpha$ -galaktozidazının x-ışınları difraksiyonu gerçekleştirilebilmiştir (Golubev and Neustroev, 1993).

$\alpha$ -Galaktozidazlarla yapılan klonlama çalışmaları da son yıllarda oldukça büyük bir önem ve hız kazanmıştır. Saflaştırılan enzimin oldukça büyük miktarda üretilebilmesi ve enzimatik özelliklerinin geliştirilmesi için  $\alpha$ -galaktozidazdan cDNA klonunun izole edilerek dizisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birisinde kahve çekirdeği  $\alpha$ -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 homoloğu göstermektedir.  $\alpha$ -Galaktozidaz cDNA'sı çok çeşitli kaynaklardan; insan, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cyamopsis tetragonolobus* ve bitki tohumlarından klonlanmıştır. Bu kaynaklardan izole edilen enzim, kahve çekirdeği  $\alpha$ -galaktozidazı ile kıyaslandığında, fizyolojik koşullar altında B-grubu antijenlerinden terminal galaktoz artıklarının uzaklaştırılmasında kahve  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazlar üç glikozil hidrolaz sınıfı altında toplanırlar. Sınıf 4, prokaryot  $\alpha$ -galaktozidazlarını, sınıf 27, ökaryot  $\alpha$ -galaktozidazlarını, sınıf 36 ise her iki orijinli  $\alpha$ -galaktozidazları içermektedir. *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galaktozidazlarından  $\alpha$ -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 $\alpha$ -Galaktozidazların etki mekanizması

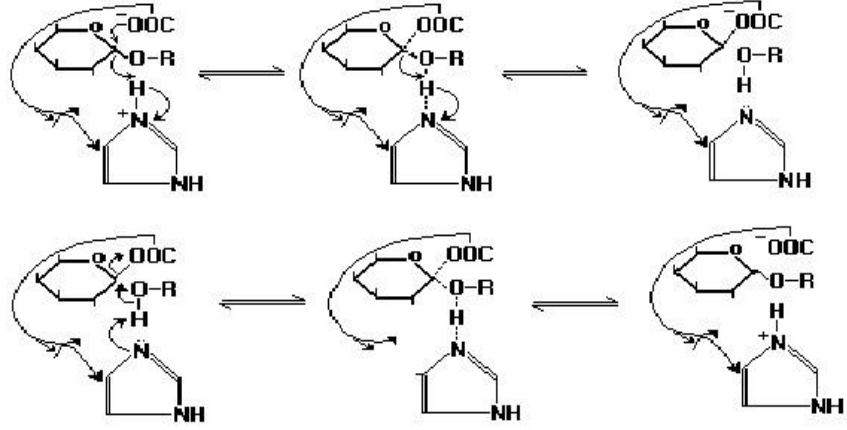
Spesifik biyokatalizörler olan enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek geçiş haline varmayı kolaylaştırırlar ve geçiş halinin kararlılığını arttırarak reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimler bunu substrat bağlama merkezlerinin spesifikliğı ve katalitik grupların optimal düzenlenişi sayesinde başarırlar.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

$\alpha$ -Galaktozidazlarla ilgili hemen hiçbir bađ kopması çalışması yapılmamıştır. Fakat diğer glikozidazlar dūřunūldūđunde, substratın galaktoz-oksijen bağları bŸyŸk olasılıkla kopmaktadır. NŸkleer manyetik rezonans (NMR) ve polarimetri çalışmaları serbest galaktozil artıklarının substrat ile aynı anomerik konfigŸrasyona sahip olduklarını gŸstermiřtir (Dey and Pridham, 1972; Mathew and Balasubramaniam, 1987). Eđer C<sub>1</sub> karbon atomunda iki ardışık inversiyon varsa ya da sadece bir yandaki nŸkleofil ile bağlanabilen bir karbonyum iyonu varsa konfigŸrasyon korunur. KonfigŸrasyonun korunması da çok adımlı bir dizi reaksiyondan ibarettir (Mathew and Balasubramaniam, 1987).

Asit-baz katalizi fumaraz, maltaz, maya invertazı,  $\beta$ -galaktozidaz gibi enzim sistemlerinde etkilidir. Aril- $\alpha$ -galaktozidler ile tatlı badem  $\alpha$ -D-galaktozidazında yapılan spesifiklik çalışmaları, ağlikonun elektronik yapısının enzimatik hidroliz hızında dikkate değer bir etkiye sahip olduğunu gŸstermiřtir.  $\log V_{max}$ , aromatik halka Ÿzerindeki substituentleri Hammet sabitlerine ( $\sigma$ ) karşı grafiğe geçirildiğinde iki dŸz çizgi ( $\rho = -0.054$  ve  $-1.5$ ) elde edilmiştir. Bunlar fenil- $\alpha$ -galaktozide ( $\sigma = 0$ ) karşı gelen noktada kesilir. Bu aril glukozidazlarının alkali ve asit hidrolizine benzer ve bu yŸzden 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<sup>+</sup> iyonları ile inhibisyon da bu yorumları desteklemiştir. Buna benzer bir durum *Vicia faba*  $\alpha$ -galaktozidazında gŸrŸlmŸřtŸr. Tatlı badem  $\alpha$ -galaktozidazı ile yapılan çalışmalarda p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozidin aktif merkeze bağlanmasının asidik bŸlgedeki grubun pK<sub>a</sub>'sını dŸřŸrdŸđŸ, pH optimumunun alkali bŸlgesinde grup ayrılma değerlerini arttırdığı gŸrŸlmŸřtŸr. Enzim molekŸlündeki substrat ile yapılmış değişikliklerin enzimin pH aralığını genişlettiği gŸrŸlmŸřtŸr (Dey and Pridham, 1972).

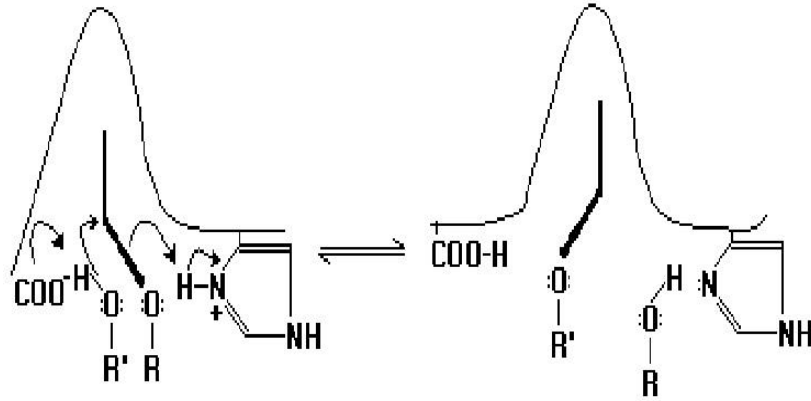
Bu sonuçlara dayanarak tatlı badem  $\alpha$ -galaktozidazının etki mekanizması ile ilgili olarak iki adımlı bir mekanizma Ÿnerilmiřtir. Burada ağlikon, karboksil ve imidazol gruplarının anlaşmalı etkisiyle ayrılır. Sonra su ya da alifatik alkol olabilen bir akseptŸr molekŸlŸn (R' OH) reaksiyonu ile devam eder ve transfer ya da hidroliz ŸrŸnleri oluşumu ile son bulur. BŸyŸk olasılıkla imidazol grubunun elektrofilik bir atağı glikozil-oksijen bağını parçalamak için yeterli olur. Galaktoz kısmının C<sub>1</sub>-karbonunda bir karbonyum iyonu oluşur. TŸm iki adımlı mekanizmada bŸyŸk olasılıkla iki Walden inversiyonu oluşur, son ŸrŸnde anomerik konfigŸrasyonun korunması ile sonuçlanır. Karbonyum iyonu oluşumu ister istemez rasemizasyona gerek duymaz. KonfigŸrasyon bir ara molekŸlŸn

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- $\alpha$ -galaktozidlerin moleküler modelleri incelendiğinde, bu bileşiğin C1 ve 1C sandalye konformasyonlarının ön-yüz atağına izin vermediği görülmüştür. Bu sterik engel B2 ve 3B bot konformasyonlarında yoktur. Teorik olarak 3B konformasyonu tercih edilir. Bu yüzden tek adımlı mekanizmada

galaktoz kısmının konformasyonu enzim-substrat kompleksi oluşumu sırasında C1'den 3B konformasyonuna dönüşebilmektedir (Dey and Pridham, 1972).

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

Hindistan cevizinden saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz için önerilen etki mekanizmasında, 3,8 pK<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sup>+</sup> verici olarak görev yapar.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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*  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazının iki tirozin artığından (105. ve 108. pozisyonda), 108 pozisyonundakinin  $\alpha$ -galaktozidazın katalitik aktivitesi için önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kahve  $\alpha$ -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,  $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 etkili, hızlı ve en ekonomik prosesler belirlenmeye çalışılır. İzolasyon adımı genellikle homojenizasyon ve homojenatın separasyonu gerçekleştirilir. Saflaştırmanın ilk adımlarında ise daha çok deriştirme yöntemleri, daha sonra ise kromatografik teknikler kullanılır (Telefoncu, 1996).

$\alpha$ -Galaktozidaz kaynağı olarak mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kaynaklar seçilerek, bilinen ekstraksiyon yöntemleri ile enzim izole edilip, saflaştırılmış ve saflaştırılan bu enzim karakterize edilerek çeşitli uygulama alanlarına sunulmuştur.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az çalışma mevcuttur. Enzimin ilk kristal formu, bir fungus olan *Mortierella vinacea*'dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazdır (Thanankul et al., 1976).

Literatürde verilen  $\alpha$ -galaktozidaz izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında bitkisel kaynak olarak papaya (Soh et al., 2006), portakal (Burns, 1990), kavun (Gao and Schaffer, 1999) domates ve ananas (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 fasülyesi (*Vigna radiata*) (Dey, 1984) ve legümlü bitki [69], hayvansal kaynak olarak insan plasentası (Kusiak et al., 1978) ve insan karaciğeri (Dean and Sweely, 1979; Alonso et al., 2005), mikrobiyal kaynak olarak *Rhizomucor miehei* (Katrolia, 2012), *Aspergillus parasiticus* (Shivam and Mishra, 2010), *Bacillus stearothermophilus* (Gote et al., 2006), *Candida guilliermondii* H404 (Hashimoto et al., 1993), *Bacillus fragilis* (Liu et al., 2007), *Pycnoporus cinnabarinus* (Ohtakara, 1984), *Bacillus stearothermophilus* (Talbot and Sygusch, 1990), *Aspergillus niger* (Somari and Balogh, 1993), *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), *Penicillium simplicissimum* (Lounteri et al., 1998), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) ve *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1999) enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Bu kaynaklardan izole edilen  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazlar başta biyoteknolojik prosesler olmak üzere birçok alanda uygulama imkanı bulmuşlardır (Thanankul et al., 1976; Balasubramaniam and Mathew, 1986).

#### **1.1.4 $\alpha$ -Galaktozidazların fiziksel özellikleri**

##### **1.1.4.1 $\alpha$ -Galaktozidazların multimoleküler formları ve molekül kütleleri**

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

alternatif bir metod da moleküler boyuta göre ayırma yapan jel filtrasyon kromatografisidir (Zihnioğlu, 1996).

$\alpha$ -Galaktozidazların moleküler kütleleri ve yapıları kaynaktan kaynağa ve kullanılan tayin yöntemine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin; *Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE ile 38,3 ve 39,6 kDa'luk iki izoenzime sahip olduğu bulunmuştur (Dhar et al., 1994). *Aspergillus parasiticus* (Shivam and Mishra, 2010)  $\alpha$ -galaktozidazının molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile 67,5 kDa olduğu belirtilmiştir. *Candida guilliermondii* H-404  $\alpha$ -galaktozidazının  $\alpha$ -galaktozidaz-I ve  $\alpha$ -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). *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -galaktozidazının molekül kütlesi SDS-PAGE ile 79,9 kDa ve jel filtrasyon ile 165,9 kDa olarak belirlenmiştir (Gote et al., 2006). *Pycnoporus cinnabarinus*  $\alpha$ -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*  $\alpha$ -galaktozidazının  $\alpha$ -galaktozidaz-A,  $\alpha$ -galaktozidaz-C<sub>1</sub> ve  $\alpha$ -galaktozidaz-C<sub>2</sub> olmak üzere üç formu vardır. İkinci formun 97 kDa molekül kütlelerine sahip anyonik form olduğu ve 42 kDa'luk iki identik alt birime sahip olduğu bulunmuştur (Shivanna et al., 1990). *Corynebacterium murisepticum*'dan saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidazın ise homotetramerik bir protein olup her bir alt birimin 83 kDa olduğu SDS-PAGE ile belirlenirken, jel filtrasyonu ile 320 kDa molekül kütlelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Nadkarni et al., 1992). *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galaktozidazının üç formu ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri verilmiştir (Önal, 2000).

**Çizelge 1.2.** Bazı  $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri (Önal, 2000).

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

### 1.1.5 $\alpha$ -Galaktozidazların kinetik özellikleri

#### 1.1.5.1 $\alpha$ -Galaktozidazların aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi ve substrat spesiflikleri

$\alpha$ -Galaktozidazların enzimatik aktivitelerinin tayininde yapay veya doğal substratlar kullanılmaktadır. Yapay substratlar substitue fenil- $\alpha$ -D-galaktozidlerdir ve en çok kullanılan aktivite ölçüm substratlarıdır.  $\alpha$ -Galaktozidazlarla etkileşen bu substratların reaksiyonu sonucu galaktoz ve p-nitrofenol artıkları oluşur. Melibioz, rafinoz ve stakiyöz  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi tayininde kullanılan doğal substratlardır.  $\alpha$ -Galaktozidaz, melibiozu galaktoz ve glukoz, rafinozu galaktoz ve sukroza, stakiyözü ise galaktoz, sukroz ve rafinoza hidrolizler. Genellikle fenil- $\alpha$ -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.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -D-galaktoza benzerlik göstermelidir. Diğer glikozidazlarda,  $\beta$ -galaktozidaz,  $\beta$ -glukozidaz ve  $\alpha$ -mannozidaz gibi, substratın glikozil yapısının C-6 karbonundaki değişiklikler genellikle  $\alpha$ -galaktozidazlarca tolere edilir. Bu nedenle  $\beta$ -L-arabinozidler de bazı  $\alpha$ -galaktozidazlarca hidrolizlenebilmektedir. Ayrıca D-galaktoz konfigürasyonuna sahip bir bileşik olan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-fukozit de  $\alpha$ -galaktozidazlarla hidrolizlenebilmektedir. D-gliserol-D-galakto-heptozidlerin de  $\alpha$ -galaktozidazlar için substrat olarak kullanılabilceği 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:  $\alpha$ -D-galaktozid,  $\alpha$ -D-fruktozid ve  $\alpha$ -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  $\alpha$ -D-galaktozidler çeşitli  $\alpha$ -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- $\alpha$ -D-galaktozidler, galaktinol, digalaktozilgliserol ve  $\alpha$ -D-galaktozilflorür. Oligosakkaritler: melibioz, epimelibioz, melibitol, melibiyonik asit, rafinoz, umbelliferoz, planteoz, manninotrioz, stakiyöz ve verbaskoz. Bu polisakkaritler D-galaktozil artıklarının  $\alpha$ -1,6-bağları ile bağlandığı  $\beta$ -1,4-bağlı D-mannozil artıklarından oluşmuşlardır. Bitkisel kaynağa göre de galaktoz içeriği değişmektedir.

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

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

**Çizelge 1.3**  $\alpha$ -Galaktozidazların substrat spesifiklikleri.

$\alpha$ -Galaktozidaz Kaynağı	$\alpha$ -Galaktozidaz	Substrat	$K_m$ (mM)
<i>Coffea canephora</i>	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galakto piranozid	0,26
<i>Cucurbita pepo</i>	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	1,4
		o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	1,0
		m-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	2,0
		Rafinoz	36,4
		Stakiyöz	4,5
<i>Colocasia esculenta</i>	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopironozid	0,28
Portakal	$\alpha$ -Galaktozidaz I	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,47
	$\alpha$ -Galaktozidaz II	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,23
Ananas	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopironozid	0,22
<i>Candida javanica</i>	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopironozid	11
<i>Monascus pilosus</i>	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,8

### 1.1.5.2 $\alpha$ -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).

$\alpha$ -Galaktozidazlar da kaynaklarına bağlı olarak çeşitli kararlılık dereceleri gösterirler. Genellikle  $\alpha$ -galaktozidazların çoğunun optimum sıcaklık değerleri 37-40°C arasında değişmektedir. Fakat mikrobiyal kaynaklı termostabil  $\alpha$ -galaktozidazlar için bu değer 40°C'nin çok üstüne de çıkabilmektedir. Örneğin; *Pycnopus cinnabarinus* (Ohtakara et al., 1984), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (Zeilinger et al., 1993), *Monascus pilosus* (Wong et al., 1986), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 75, 60, 55 ve 80°C olarak belirlenmiştir. *Cladosporium cladosporides*  $\alpha$ -galaktozidazının 40-60°C aralığında, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazlarından  $\alpha$ -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*  $\alpha$ -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*  $\alpha$ -galaktozidazı, p-nitrofenil- $\alpha$ -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*  $\alpha$ -galaktozidazlarından  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazı da başlangıç aktivitesinin % 80' ini koruyabilmiştir (Zeilinger et al., 1993). *Thermus thermophilus* HB-8  $\alpha$ -galaktozidazının optimum sıcaklık değeri 80°C olarak belirlenmiş ve bu değerin rapor edilmiş  $\alpha$ -galaktozidazlar arasında en yüksek sıcaklık değeri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, enzimin 100°C' de bile aktivitesini % 85 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık optimumuna sahip olması ve termostabil olması nedeniyle *T. thermophilus* HB8  $\alpha$ -galaktozidazının yüksek sıcaklıklarda işleyen proseslerde uygun olabileceği öne sürülmüştür (Telefoncu et al., 1998). Soya fasulyesi  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazları düşük sıcaklıklarda saklanabilirken, *Vicia faba* enzimi sıfırın altındaki sıcaklıklarda tamamen inaktive olmaktadır (Dey and Pridham, 1972). *Aspergillus parasiticus*  $\alpha$ -galaktozidazı o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (oPNG) substratı için maksimum aktiviteyi 50°C' de göstermektedir. 65°C' de, 30 dakika süre ile inkübe edildiğinde oldukça termostabil olduğu gözlenmiştir (Shivam and Mishra, 2010). *Tachigali multijuga*  $\alpha$ -galaktozidazı ise maksimum aktiviteyi 50°C' de göstermektedir. 30 ve 40°C' de kararlı yapıdadır ancak 50°C' de 30 dakika bekletildiğinde aktivitesinin %79'unu kaybetmektedir (Fialho et al., 2006). *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -galaktozidazı ise termostabil özellik göstermektedir. Optimum aktiviteyi 65°C' de göstermektedir ve 70°C' de bile 80 dakika sonunda aktivitesinin % 50' nin altına düştüğü belirtilmiştir (Gote et al., 2006). Çizelge 1.4' de çeşitli  $\alpha$ -galaktozidazların termal kararlılıkları ile ilgili bazı sonuçlar verilmiştir (Önal, 2000).



**Çizelge 1.4**  $\alpha$ -Galaktozidazların termal kararlılıkları.

<b><math>\alpha</math>-Galaktozidaz Kaynağı</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Zaman</b>	<b>Aktivite kaybı (%)</b>
<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
<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	24 sn	20
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	50	60 dk	20

### 1.1.5.3 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi ve kararlılığına pH'ın etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden en önemlisi pH etkisidir. İnkübasyon ortamının pH'sı, protein molekülünün tamamının yük ve dissosiyasyon 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<sup>+</sup> 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).

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

Bakteriyel  $\alpha$ -galaktozidazlar pH 6,0-7,5; fungal ve maya  $\alpha$ -galaktozidazları pH 3,5-5,0; hayvansal  $\alpha$ -galaktozidazlar pH 3,5-5,5; bitkisel  $\alpha$ -

galaktozidazlar ise pH 3,5-6,5 arasında pH optimumu verirler. Aşağıda çeşitli  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan çalışmalar sonucu elde edilen optimum pH ve pH kararlılık verileri sunulmuştur.  $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine pH' nın etkisinin anlaşılması, bu pH etkisinin enzim kaynağı ve substrata göre değişiminin incelenmesi açısından oldukça önemlidir (Önal, 2000).

*Cladosporium cladosporioides*  $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH'sı p-nitrofenil- $\alpha$ -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 karardır (Cruz et al., 1981). *Trichoderma reesei* RUT C-30  $\alpha$ -galaktozidazı, PNPG ile pH 4,0'de optimum gösterirken pH 4,0-8,0 gibi oldukça yaygın bir aralıkta karardır. Yalnız enzimin düşük pH' larda yüksek pH'lardan daha kararlı olduğu belirtilmiştir (Zeilinger et al., 1993). *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galaktozidazlarından  $\alpha$ -galaktozidaz I ve II pH 3,0-4,5 aralığında,  $\alpha$ -galaktozidaz III ise pH 4,0-5,0 aralığında geniş bir optimuma sahiptir (Lounteri et al., 1998). *Citrullus battich* (karpuz)  $\alpha$ -galaktozidazına pH' nın etkisi yapay substratlar ve oligosakkaritler kullanılarak incelenmiştir. Yapay substratlardan p-nitrofenil- $\alpha$ -galaktozid ve 4-MU- $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazının doğal substratları hidrolizlediği ve optimum pH'sının yapay substratlarınkinden daha düşük olduğu belirtilmiştir (Itoh et al., 1986). Çeşitli  $\alpha$ -galaktozidazların optimum pH değerleri Çizelge 1.5' de verilmiştir (Önal, 2000).

Çizelge 1.5  $\alpha$ -Galaktozidazların optimum pH değerleri.

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

<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	4,0
İnsan plasentası	$\alpha$ -galaktozidaz A $\alpha$ -galaktozidaz B	4MUP	4,4
Domuz karaciğeri	$\alpha$ -galaktozidaz	Fenil- $\alpha$ -D-galaktozid	5,2
Fare beyini	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	4,9

### 1.1.6 $\alpha$ -Galaktozidazların fizyolojik önemi ve uygulama alanları

$\alpha$ -Galaktozidazlar, doğada oldukça yaygın olarak bulunan glikozidaz sınıfı enzimler olup galaktooligosakkaritler ve polisakkaritlerde bulunan  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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).

$\alpha$ -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).  $\alpha$ -Bağlı galaktozidik bağların hidrolizi kadar  $\alpha$ -bağlı galaktooligosakkaritlerin transgalaktozilasyon veya tersinir reaksiyonlarla sentezi de  $\alpha$ -galaktozidazların önemli bir uygulamasıdır. Transgalaktozilasyon reaksiyonu ile  $\alpha$ -galaktozidazın oluşturduğu  $\alpha$ -bağlı galaktooligosakkaritler, çok az çalışma sonucunda elde edilebilmiştir.  $\alpha$ -Bağlı galaktooligosakkaritler aynı zamanda tersinir reaksiyon ile de oluşturulabilmektedir. Genellikle bu reaksiyonlar ile oluşturulan  $\alpha$ -bağlı galaktooligosakkaritler birbirinden ayrılması güç olan pozisyonel izomerlerin bir karışımıdır. Fakat bu oligosakkaritler  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazdan başka glikozidazların ( $\beta$ -galaktozidaz,  $\alpha$ -glukozidaz ve  $\beta$ -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  $\alpha$ -bağlı galaktooligosakkaritler, transgalaktozilasyon için uygun donör substratlarıdır ve çok çeşitli yeni  $\alpha$ -bağlı galaktooligosakkaritler bu yolla üretilebilmektedir (Hashimoto et al., 1995). Bu organizma, intrasellüler olarak  $\alpha$ -galaktozidazın yanısıra çok az da olsa  $\beta$ -galaktozidaz,  $\alpha$ -glukozidaz ve  $\beta$ -glukozidaz gibi diğer glikozidazları da üretmektedir. Bu glikozidazlar da laktoz hidrolizatını kullanan  $\alpha$ -galaktozidazların tersinir reaksiyonlarına etki ederler. Sağlam hücrelerdeki glikozidazlar,  $\alpha$ -galaktozidaza herhangi bir zarar vermeden ısısal işlemle inaktive edilebilir. Böylece ısısal işlem görmüş hücreler, laktoz hidrolizatlarından tersinir reaksiyon ile  $\alpha$ -bağlı galaktooligosakkaritleri sentezleyecek olan  $\alpha$ -galaktozidaz preparatı olarak kullanılabilir. *C. guilliermondii* H404  $\alpha$ -galaktozidazı, temel olarak  $\alpha$ -(1,6)-bağlı galaktozidazları, az da olsa bununla beraber  $\alpha$ -(1,1)-,  $\alpha$ -(1,2)- ve  $\alpha$ -(1,3)- bağlı galaktozidazları, eser miktarda da  $\alpha$ -(1,4)-galaktozidazları sentezlemektedir. Fakat  $\alpha$ -(1,5)-galaktobiozları sentezleyememektedir. Tersinir reaksiyonlar sonucu oluşan ürün bileşimi büyük ölçüde enzimin substrat spesifikliği ile yakından ilgilidir. Maya  $\alpha$ -galaktozidazının tersinir reaksiyonu ile galaktozdan  $\alpha$ -galaktobioz, *Mortierella vinacea* ve *Pycnoporus cinnabarinus*  $\alpha$ -galaktozidazlarının tersinir reaksiyonu ile galaktoz ve sukrozdan  $\alpha$ -galaktozil-sukroz sentezlenmiştir (Hashimoto et al., 1995). Termotabil bir enzim olan *Candida guilliermondii*  $\alpha$ -galaktozidazı uygun bir akseptör yoksa tek bir transfer ürünü sentezler. Donör substrat olarak melibioz

kullanıldığında ise ana ürün O- $\alpha$ -D-galaktozil-(1,6)-O- $\alpha$ -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  $\alpha$ -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- $\alpha$ -D-galaktozil-(1,6)-O- $\beta$ -D-galaktozil-(1,4)-D-glukoz, O- $\alpha$ -D-galaktozil-(1,6)-O- $\alpha$ -D-galaktozil-(1,4)-D-glukoz ve O- $\alpha$ -D-galaktozil-(1,6)-O- $\alpha$ -D-galaktozil-(1,2)- $\beta$ -D-fruktozid (rafinoz) dir (Hashimoto et al., 1995). Genellikle  $\alpha$ -galaktozidazların galaktozil artıklarını akseptör şekerin primer alkol grubuna tercihen transfer ettiği bilinmektedir. Akseptör olarak rafinoz kullanıldığında transfer ürünü olarak stakiyöz oluşmaktadır. *Pycnopus cinnabarinus*  $\alpha$ -galaktozidazı rafinoz tip oligosakkaritlerin yanısıra  $\alpha$ -(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 (Mitsutomi and Ohtakara, 1988). Kahve çekirdeği  $\alpha$ -galaktozidazı kullanılarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranoziden 1-deoksinojirimisine bir transgalaktozilasyon reaksiyonu yapılmıştır. Ana ürün olarak 6-O- $\alpha$ -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 antihiperglisemik ve tükürük salgısı ajanı olarak önemli bir bileşiktir (Paek et al., 1998). İmmobilize edilmiş *Bacillus circulans*  $\alpha$ -galaktozidazının transglikozilasyon reaksiyonu ile asidik karakterli  $\beta$ -(1,3) bağlı disakkaritler sentezlenmiştir. Galaktozil donörü olarak laktoz, akseptör olarak N-asetilnöraminik asit ve glukuronik asit kullanılmıştır (Naundorf et al., 1998). *Monascus pilosus*  $\alpha$ -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).

Fabry hastalığı, insanlarda görülen ve termolabil lizozomal  $\alpha$ -galaktozidaz A eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. İnsan orijinli lizozomal  $\alpha$ -galaktozidazlar Fabry hastalığı ile ilgili oldukları için ilginç moleküllerdir. Normal insan dokularında enzimin  $\alpha$ -galaktozidaz A ve  $\alpha$ -galaktozidaz B olmak

üzere iki formu bulunur. Fabry hastalığına yakalanan kişide  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazı olan seramidtriheksozidaz enzimi eksik olup, buda enzimin doğal substratı olan seramidtriheksozid kullanılarak belirlenir. Enzim eksikliği belirli bir düzeye kadar, seramidtriheksozidin ve diğer glikolipidlerin bazı dokulardaki lizozomlar içindeki birikimine dek artış gösterir. O nedenle lizozomal bir depolama rahatsızlığıdır. Metabolizmanın doğuştan gelen bu grup bozuklukları özellikle önemlidir. Endositoz ile yönetilen enzim, hücrenin enzim eksikliği olduğu lizozomal sisteme ulaşabilir. Bu kaybolmuş enzim aktivitesi tıropatik 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).

$\alpha$ -Galaktozidazlar çeşitli prokaryot ve ökaryotlardan saflaştırılmışlardır. Terminal  $\alpha$ -D-galaktozid artıkları hem glikoprotein hem de glikolipidlerde bulunur. Çoğu ökaryotik  $\alpha$ -galaktozidaz, benzer düşük molekül kütleli kromojenik substrat spesifikliğine sahiptir, fakat yüksek molekül kütleli oligosakkaritler ve glikokonjugatlara karşı aktivitesi değişkendir. Bazı  $\alpha$ -galaktozidazlar hücre membranı glikokonjugatları üzerindeki  $\alpha$ -D-galaktozil artıklarına karşı aktivite gösterirler. Bu özellikteki galaktozidazlar özellikle karbohidrat yapı çalışmaları ve biyoteknolojik uygulamalar için kullanışlıdır. Diğer glikozidaz aktivitesinden bağımsız  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidazlar belirli karbohidrat membran yapılarını modifiye edebildikleri için immün cevabı modüle ederler. Örneğin, B-kan grubu yapısı terminal bir  $\alpha$ -D-galaktozil artığı içerir ve bu grubun uzaklaştırılması bu determinantın antijenik aktivitesini de yok eder.

*Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ -galaktozidazının insan ve tavşan eritrosit membranındaki  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -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)  $\alpha$ -galaktozidazları ile de yapılmıştır. A ve B eritrositlerin O-tip eritrositlere dönüşümü ile ilgili olarak Goldstein ve arkadaşları da çeşitli çalışmalar yapmaktadırlar (Lenny et al., 1991; Goldstein, 1989; Lenny et al., 1994).

$\alpha$ -Bağlı galaktooligosakkaritler ve rafinoz, stakiyöz gibi  $\alpha$ -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.  $\alpha$ -galaktozidazlar da genellikle bu bileşiklerin metabolik olarak kullanılmasında görev yapan hidrolitik ajanlardır.  $\alpha$ -Galaktozidaz insanlarda salgılanmayan bir enzimdir. Bu nedenle soya fasulyesi gibi bazı baklagiller mideye indikten sonra kalın bağırsağa geçerler. Burada  $\alpha$ -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.

$\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidaz preparatları ile rafinoz hidrolizlenerek verim arttırılabilmekte ve aynı zamanda da oldukça önemli bir oranda ekonomi sağlamaktadır (Mitsutomi and Ohtakara, 1984).

## 1.2 İmmobilize Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları regüle eden, suda çözünür spesifik biyokatalizatörlerdir. Son yıllarda enzimler kimya, biyoteknoloji, gıda ve çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha kullanışlı ve ekonomik hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir.



Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleşmektedir. Bu nedenle katalizatör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istendiği anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için ortama inhibitör katılabilir. Fakat serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün ya da ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok artırmaktadır. Katalizatör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizatörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Tüm bu sorunlardan dolayı enzimleri endüstriyel açıdan daha çekici hale getirmek için, enzimler immobilize edilirler. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak ilave edilmesiyle, suda çözünmeyen bir matris veya mikrokapsülde tutuklanarak immobilize edilirler (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin en eski ve en pratik tekniklerinden birisidir. İmmobilize enzimler ve bunların uygulamaları ile ilgili çalışmalar sürekli olarak gelişmeye devam etmektedir. İmmobilize enzimler, gıda sanayinde, klinikte ve endüstriyel alanda pek çok uygulama alanı bulurlar. Enzimlerin katalitik potansiyellerinden maksimum bir şekilde yararlanabilmek için, en uygun immobilizasyon yönteminin belirlenerek şartların optimize edilmesi gerekmektedir. Her enzim için ideal taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçiminde bilimsel standartların oluştuğunu söylemek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilirken hem immobilize enzimin karakteristikleri ve kullanılacağı alan hem de seçilen yöntem ile taşıyıcı kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliklerinin uyumuna dikkat edilmelidir. İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlı moleküllerdir. Çizelge 1.6' da immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri verilmiştir (Önal, 2000).

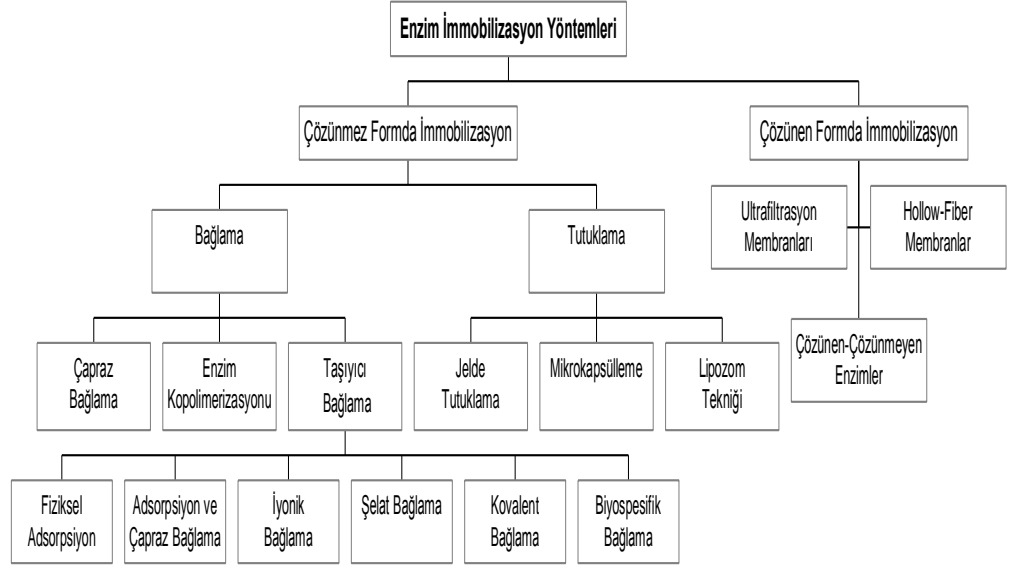
### Çizelge 1.6 İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri.

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

Enzimleri endüstriyel açıdan daha çekici hale getirmek için, özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu üzerine yapılan araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı da yıldan yıla logaritmik olarak artış göstermektedir.

#### 1.2.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri

1960' lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonları için bir çok immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bu yöntemlerin sınıflandırılması için birçok şema hazırlanmıştır. Genel olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler Şekil 1.4' te sınıflandırılmıştır (Telefoncu, 1997).



**Şekil 1.4** Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997).

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Uygun immobilizasyon yönteminin seçiminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır; güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık. Bir enzimin immobilizasyonunda ayrıca enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir.

İmmobilize enzimler suda çözünen ve suda çözünmeyen olmak üzere iki formda hazırlanabilirler. Suda çözünen formda immobilize enzim hazırlanırken enzim çözeltisi bir membran ile ürün ve substrattan ayrılır ve doğal durumda kalması sağlanır. Bu amaçla ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membranlarından yararlanır. Kofaktöre gereksinim duyan enzimlerin immobilizasyonunda enzim, polietilen glikol gibi suda çözünen polimerlere kovalent olarak bağlanır. Suda çözünmeyen formda enzim preparatı hazırlamak için kullanılan immobilizasyon yöntemleri;

- a) taşıyıcıya bağlama yöntemleri,
- b) çapraz bağlama yöntemleri,
- c) kopolimerizasyon yöntemleri
- d) tutuklama yöntemleri olarak sınıflandırılır.

### **1.2.1.1 Taşıyıcıya bağlama yöntemleri**

En eski enzim immobilizasyon tekniğidir. Protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılan yöntemlerdir. Taşıyıcıya bağlama kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel(adsorptif) biçimde gerçekleşir. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar. Adsorbsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, biyospesifik bağlama ve kovalent bağlama en çok kullanılan taşıyıcıya bağlama yöntemleridir. Enzime göre taşıyıcı seçimi önemlidir. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyonundan sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına çok bağlıdır. Genel olarak taşıyıcının hidrofil karakteri ve birim kütle yüzeyi arttıkça bağlı enzim miktarı da artar.

#### **Adsorbsiyon;**

En basit immobilizasyon yöntemidir. Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Vander Waals kuvvetleridir. Adsorban olarak çoğu kez aktif karbon, gözenekli (poröz) cam, diatome toprağı, silika jel ve nişasta kullanılır. İşlemin basit olması, ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi bir yandan immobilizasyon gerçekleşirken diğer yandan enzim saflaştırmasına olanak vermesi açısından adsorbsiyon yöntemi oldukça avantajlı bir yöntemdir. Fakat optimal koşulların sağlanması güç olduğu ve desorbsiyon sonucu enzimin reaksiyon ortamına serbest hale geçerek ürünleri kirlettiği için de sakıncalıdır.

### **İyonik bağlama;**

İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Bazen iyonik bağlama ile birlikte fiziksel adsorbsiyonda etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekteğiğinden enzim konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığı için enzim kaçışı söz konusudur. Bu yöntem iyon değiştirici kalıntı içeren destek katıları üzerine enzim moleküllerinin iyonik bağla bağlanmaları esasına dayanır. Bu şekilde enzimin katıya kıyasla bağlanması fiziksel adsorpsiyondan daha güçlü bir bağlanmadır. Ayrıca bu yöntemde enzimin fiziksel konformasyonel değişimi çok az olduğu için enzim aktivitesi oldukça yüksektir.

### **şelat bağlama;**

Bazı geçiş metallereinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik veya inorganik taşıyıcılara bağlanması söz konusudur.

### **Kovalent bağlama;**

Bu immobilizasyon yöntemi ile enzimler ile taşıyıcılar arasında kovalent bağ oluşmasına dayanır. Enzimler, reaktif taşıyıcılara kovalent olarak bağlanırlar. Bu bağ, taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki aminoasit artıklarına ait gruplar arasında gerçekteşir. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı reaktif ile aktivite edilmeleri gerekir. Kovalent bağlama yöntemleri ile ilgili ayrıntılı bilgi bir sonraki bölümde verilmiştir.

### **Biyospesifik bağlama;**

Enzimler ile enzimlerin ilgi duyduğu moleküller arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanılır.

Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin yararları ve sakıncaları çizelge 1.7' da kıyaslanmıştır (Telefoncu, 1997).

**Çizelge 1.7** Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin yarar ve sakıncaları (Telefoncu, 1997).

<b>Yararları</b>	<b>Sakıncaları</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir,</li> <li>- Ürünleri kirletmez,</li> <li>- Değişik fiziksel formlarda üretilebilirler,</li> <li>- Taşıyıcının yapısına bağlı olarak yeni spesifikler kazanabilirler,</li> <li>- Sürekli sistemlere uygundur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit artıkları üzerinden gerçekleşebilir.</li> <li>- Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı hazırlık gereklidir,</li> <li>- Polimer taşıyıcının neden olduğu sterik engelleme nedeni ile aktivite azalabilir.</li> </ul>

Taşıyıcıya bağlanma sonucu enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi doğaldır. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kimyasal kovalent bağlanma durumunda yükü ve kimyasal yapısı değişir (Telefoncu, 1997). İmmobilizasyon yöntemlerinin çeşitli karakteristik özellikleri açısından kıyası Çizelge 1.8’ de verilmiştir.

**Çizelge 1.8** İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Önal, 2000).

<b>Karakteristik</b>	<b>Kovalent Bağlama</b>	<b>Adsorbsiyon</b>	<b>İyonik Bağlama</b>	<b>Çapraz Bağlama</b>	<b>Tutuklama</b>
<b>Hazırlama</b>	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
<b>Enzim Aktivitesi</b>	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
<b>Bağ Gücü</b>	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli
<b>Substrat Spesifikliğı</b>	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
<b>Rejenerasyon</b>	Mümkün Değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün Değil	Mümkün Değil
<b>Genel Uygulanabilirlik</b>	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Düşük
<b>İmmobilizasyon Masrafı</b>	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük

### **1.2.1.2 Taşıyıcıya kovalent bağlama ile immobilizasyon**

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent olarak bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemlerle ve genellikle sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli, büyük ölçüde hidrofobik karakterli olmamalı, suda ıslanabilmeli ve mekanik olarak da kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından

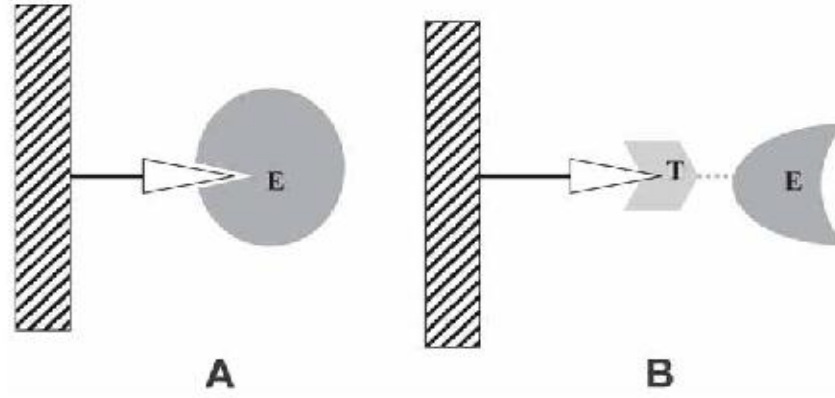
parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997).

### **1.2.1.3 Biyoafinite temelli immobilizasyon**

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında en aktif alanlardan birisi enzimlerin inert ve suda çözünmez materyaller üzerinde immobilizasyonudur. Böyle bir immobilize enzim sisteminin en temel bileşenleri enzim ve taşıyıcı olup bağlanmada enzimin doğası ve yapısı ile immobilizasyon kimyası oldukça önemlidir. Enzim immobilizasyonunda yeni trend taşıyıcı ile enzim arasında çeşitli biyoafinite bağlarının yaratılmasıdır. Afinite sistemlerinin geniş çeşitliliği enzim immobilizasyonu için bir çok olanağın olmasına imkan tanır.

Biyoafinite temelli immobilizasyonda protein/enzim, taşıyıcıya biyospesifik etkileşimlerle bağlanır. Afinite kromatografisinde kullanılan tüm afinite çiftleri afinite ile enzim immobilizasyonunda kullanılır. En bilinen örnekleri lektin-şeker, antijen-antibadi, biyotin-avidin olarak sıralanabilir. Araştırmacılar son yıllarda immobilizasyonun kolaylığı, kimyasal modifikasyonların çoğu kez gerekmediği ve genellikle stabilitenin artmasına neden olduğu için biyoafinite destek materyallerinin geliştirilmesi ve enzim immobilizasyonunda kullanılması üzerinde yoğunlaşmışlardır. Proteinlerin/enzimlerin biyoafinite immobilizasyonunda iki farklı strateji izlenir (Şekil 1.5). Bu stratejilerden ilkinde (A) önce matriks aktivite edilir ve uygun afinite ligandı ile türevlendirilir. Daha sonra hedef protein/enzim ortama eklenir. Enzim sert ortam koşullarına dayanıklı değildir. Afinite ligandı olarak substrat/ürün analogu kullanılmış ise enzimi liganttan ayırmak oldukça zordur. İkinci stratejide (B) enzim önce matrikse afinite gösteren molekülle konjuge edilir ve oluşan biyokonjugat ligant üzerinden matrikse bağlanır.





**Şekil 1.5** Proteinlerin biyoafinite immobilizasyonu için kullanılan iki farklı strateji: (A) Enzim (E), matrikse bağlı olan afinite ligandına duyarlıdır. (B) Enzim, immobilizasyon için matrikse afinite gösteren moleküle konjuge edilir.

Biyolojik moleküllerin biyoafiniteye dayalı immobilizasyonunda artık klasik görüşün dışına çıkmıştır ve daha geniş kapsamda incelenmektedir. Biyoafinite temelli immobilizasyonda hedef protein ile etkileşime girecek olan ligand biyolojik temelli olan ya da olmayan maddeler olabilmektedir; boyalar, metal-iyon kompleksleri veya peptid gibi yapılar afinite ligandı olarak kullanılabilir. Ligand seçeneklerinin artması ile lektin, monoklonal antibadiler gibi yüksek fiyatlı biyolojik afinite ligandlarının yerine kullanılacak daha ucuz alternatifler elde edilmiştir. (Gupta and Roy, 2002) Afinite ortamının elde edilmesi için afinite ligandı genellikle matrikse kovalent olarak bağlanır (Hermanson et al., 1992; Gupta and Roy, 2002). Eğer afinite ligandı biyolojik olarak aktif bir protein örneği ise (antibadi, lektin vb) ligandın matrikse bağlanma basamağında ligandın enzimin bağlanacağı bölgelerinin açık kalması, serbest olması gerekmektedir. Biyolojik ligand kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmaları daha zahmetli ve masraflı olmaktadır. (Bilkova et al., 1997).

### 1.2.2 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

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

Enzimlerin immobilizasyonunda genel olarak doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Genel olarak bir taşıyıcının sahip olması gereken özellikler Çizelge 1.9’ da verilmektedir (Telefoncu, 1997).

**Çizelge 1.9** Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılarda aranan genel özellikler (Telefoncu, 1997).

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

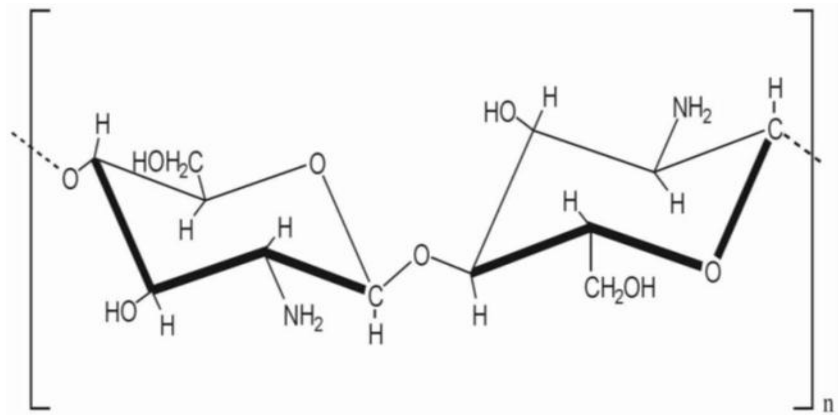
Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar morfolojilerine göre (poröz, poröz olmayan ya da jel tipi) ya da kimyasal kompozisyonlarına göre sınıflandırılırlar. Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak sentetik polimerlerin kullanılması, mikrobiyal ataklara karşı inert olması, yüksek kararlılığa sahip olması ve kompleks tampon bileşenlerinin kullanılmasında çeşitli seçenekler olması gibi bazı avantajlar sağlamaktadır.

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

### 1.2.3 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin kitosanda biyoafinite temelli immobilizasyonu

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip, kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen ve doğada selulozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir (Shepherd, 1997; Terbojevich and Muzzarelli, 2000). Beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partikül veya toz halinde bir madde olan kitosan sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Buna karşın bazı bakteriler tarafından parçalanır. Suda çözünmez. Sadece asidik çözücülerde (pH<6.0) çözünür. Çözmek için asetik asit, formik asit, laktik asit gibi organik asitler kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez). Kitosan solüsyonlarının pH 7.0 ve üzerinde stabilitesi bozulur. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza kitosan solüsyonlarının stabilitesini olumsuz etkilemektedir.

Bir polisakkarit olan kitin kimyasal olarak 2-asetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukoz (N-asetil glukozamin)'dan oluşmaktadır. Kitin'in düşük derecede deasetilasyonu yoluyla elde edilen kitosan ise (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz (glukozamin) olarak bilinmektedir. Kitosan, 3 çeşit reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. C-3, C-6 pozisyonunda birer hidroksil ve C-2 pozisyonunda ise bir amino grubu bulunmaktadır (Terbojevich and Muzzarelli, 2000).



Şekil 1.6 Kitosanın kimyasal yapısı.

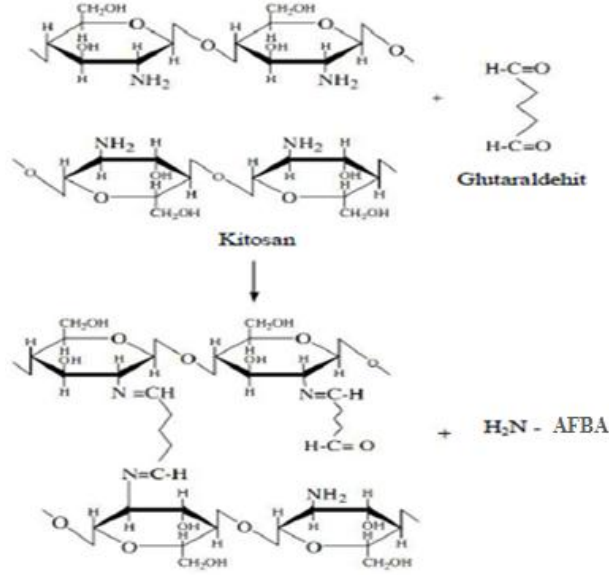
Kitosan, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları nedeniyle ilaç, kozmetik, tıp, tarım gibi çeşitli endüstrilerde birçok kullanım alanlarına sahiptir. Kitosanın bu fonksiyonlarında pozitif iyonik tabiata sahip olmasının önemli bir rolü vardır. Benzer fonksiyonları nedeniyle gıda endüstrisinde de kitosandan yararlanılmaktadır. Kitosan son yıllarda adından sıkça bahsedilen diyetetik yardımcı maddeler arasında yer almaktadır. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememesi, yüksek viskozitesi, jel oluşturma ve yüksek su bağlama yeteneği gibi özelliklerinden dolayı bitkisel diyetetik liflere benzerlik göstermektedir ve canlı organizmada benzer etkiler oluşturmaktadır. Bağırsak hareketlerinin ve sindirim faaliyetlerinin düzenlenmesi, bağırsak mikroflorasının (bifidobakterilerin) desteklenmesi, kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesi (LDL kolesterölün düşürülmesi, HDL kolesterölün artırılması), kanbasıncının düşürülmesi, karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi fonksiyonel etkilerinin yanı sıra sindirim yoluyla alındığında ya da emilimini azaltarak (pozitif yüklü bir bileşik olmasından dolayı negatif yüklü olan yağ asitlerine bağlanarak) kilo kaybını desteklemesi oldukça ilgi çekmiştir (Han et al., 1999; Wuolijoki et al., 1999).

Günümüzde kitosanın doğal özelliklerinden dolayı birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Biyouyumluluğu, toksik olmayan yapısı, fizyolojik olarak kararlı olması, antibakteriyel yapısı, hidrofilik olması, kolay jel oluşturma özelliği ve proteinlere karşı yüksek afinitesinden dolayı da enzim immobilizasyon çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir (Krajewska, 2003).

Çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılarak kitosanda lipaz (Kuo et al., 2011; Rodrigues et al., 2007),  $\omega$ -transaminase (Yi et al., 2007), proteaz (Li et al., 2011), üreaz (Chellapandian and Krishnan, 1997),  $\alpha$ -amilaz (Kumari and Kayastha, 2010),  $\alpha$ -galaktozidaz (Singh and Kayastha, 2012) ve peroksidaz (Monier et al., 2009) gibi enzimler başarıyla immobilize edilmiştir.

Kitosan taşıyıcının aktivasyonu çeşitli reaktifler vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bunlar CNBr, epoksit, CDI, sülfonil klorür, periyodat, triazin, diazonyum, glutaraldehid, N-hidroksisüksinimid, divinil sülfon ve nitrofenil kloroformat olarak sıralanabilir. Bu çalışmada, kitosan taşıyıcının amino grupları önce glutaraldehit ile aktive edilmiş ve ardından aminofenilboronik asit (AFBA) taşıdığı amino grubu üzerinden aktif taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmıştır. Boronik asit ile türevlendirilen kitosan taşıyıcı

protein ve/veya enzim ile bir araya getirildiğinde boronat ligandı gerek karbohidrat artıklarının gerekse aminoasit artıklarının cis diolleri ile etkileşip ester oluşturarak immobilize edilmektedir.



Şekil 1.7 Kitosanın glutaraldehit ile aktivasyonu ve Aminofenilboronik asit (AFBA) ile reaksiyonu.

#### 1.2.4 $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Sepabead EC-EA'da biyoafinite temelli immobilizasyonu


Biyolojik olarak aktif moleküllerin taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasında ilk adım kimyasal olarak inert taşıyıcının aktivasyonudur. İkinci adım ise aktive edilen taşıyıcıya ligandın bağlanmasıdır. Destek materyalinin protein ve diğer polimerlerle minimum Coulombik ve hidrofobik etkileşimde olduğu kabul edilir. Matris geçiren bir por yapısına sahip olmalı ve partiküller basınca dayanıklı olmalıdır.

Uygun bir aktivasyon-bağlama şemasının oluşturulmasında rol oynayan faktörler; oluşturulan kimyasal bağın tipi, ligand ve taşıyıcı arasındaki kovalent bağın kararlılığı ve sterik etkilerdir. Taşıyıcının aktivasyonu çeşitli reaktifler vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bunlar CNBr, epoksit, CDI, sülfonil klorür, periyodat, triazin, diazonyum, glutaraldehid, N-hidroksisüksinimid, divinil sülfon ve nitrofenil kloroformat olarak sıralanabilir.

Taşıyıcının aktivasyon düzeyi ( $\mu\text{mol}$  aktif grup/g taşıyıcı) optimize edilmelidir. Aktivasyon düzeyi ile bağlanan ligant miktarı doğru orantılı olarak değişmeyebilir. O nedenle taşıyıcı için uygun aktivasyon düzeyi ve uygun ligant miktarı belirlenmelidir. Uygun bir yöntemle aktive edilmiş çözünmez, inert taşıyıcıya ligantın kimyasal olarak direkt ya da bir uzatıcı kol (spacer arm) ile bağlanması enzim immobilizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Ligantın bir uzatıcı kol ile aktive edilmiş taşıyıcıya bağlanması genellikle etkinliği artırmaktadır (Stryer et al., 2005).

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda polimetilakrilat tabanlı sentetik taşıyıcılardan Sepabead EC-EA kullanılmıştır. Sepabead EC-EA, etilendiamin aktif grubu taşıyan bir sentetik bir taşıyıcı olup genel özellikleri Çizelge 1.10' da verilmiştir.

**Çizelge 1.10** Sepabead EC-EA taşıyıcının genel özellikleri [Mitsubishi Chemical Co (Resindion S.R.L)].

<b>SEPABEADS® EC-EA</b>	
<i>Görünüş</i>	Küresel yapıda, beyaz, mat tanecikler
<i>Matriks</i>	Polimetilakrilat
<i>Aktif grup</i>	Etilendiamin
<i>Fonksiyonel Grup Yoğunluğu</i>	Min. 0,6 µmol/g ıslak ağırlık
<i>Partikül Boyut Aralığı</i>	150-300 µm
<i>“M” Sınıfı</i>	200-600 µm
<i>Yoğunluğu</i>	>1.1 g/ml
<i>Su Tutma Kapasitesi</i>	55-65%
<i>Gözeneklilik</i>	>25%
<i>Ortalama por çapı</i>	>30 nm
<i>Sıcaklık Stabilitesi</i>	0-60°C
<i>pH Stabilitesi</i>	0-14
<i>Tavsiye Edilen Depolama Sıcaklığı</i>	24°C
<i>Depolama Süresi</i>	6 ay

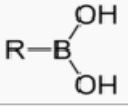
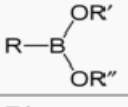
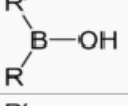
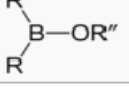
Sepabead taşıyıcıların destek metaryali olarak kullanıldığı çok sayıda enzim immobilizasyon çalışması vardır. *Escherichia coli* penicilin G açılaz enziminin, Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA taşıyıcılarında immobilizasyonu sonucunda enzimin termal ve pH kararlılığının arttığı belirlenmiştir ( Zuza et al., 2008). *Candida rugosa* lipaz enzimi de amino grupları içeren Sepabead EC-HA ile Sepabead EC-EA taşıyıcılarında ve epoksi grubu içeren Sepabead EC-EP’ de kovalent olarak immobilize edilmiştir (Prlainović et al., 2011). Domates α-galaktozidaz enzimi Sepabead EC-EA ve Sepabead EC-HA

taşıyıcılarında kovalent olarak immobilize edilmiş ve yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla daha kararlı olduğu, pH 3.0- 6.0 arasında serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatlarının kararlı olmasına rağmen, aynı koşullarda uzun süre bekletildiğinde immobilize enzimlerin aktivitesinin daha yavaş azaldığı belirtilmiştir (Bayraktar et al., 2011).

Bu tez çalışmasında Sepabead EC-EA' nın amino grupları önce glutaraldehid ile aktive edilmiş ve ardından aminofenilboronik asit (AFBA) ile türevlendirilerek  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmıştır.

### 1.3 Boronik Asit ve Türevleri

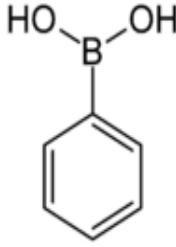
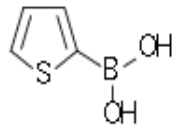
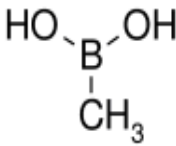
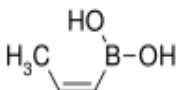
Boronik asitler yapısal olarak trivalent boron içeren organik bileşiklerdir ve yapılarında üç değerlikli bor elementine bağlı alkil sübstitüenti (C-B bağı) ve iki hidroksil grubu içerirler (Şekil 1.8). Boronik asitler kovalent ve dönüşümlü olarak cis 1,2 yada 1,3 dioller ile susuz yada bazik ortamda beş yada altı karbonlu siklik esterleri oluştururlar. Bazik koşullarda, boronat ligandı düzlemsel trigonal konfigürasyondan hidroksil grubu içeren bileşiklerle kovalent olarak etkileştiği tetrahedral boronat anyonu formuna iyonlaşır. Boronik asitler normal koşullarda doğada bulunmayıp, borik asitten genellikle boraksın karbondioksit ile asidifikasyonu sonucu sentetik olarak sentezlenen abiyotik bileşiklerdir. Boronik asitlerin ılımlı organik Lewis asitlerine benzer kimyasal özellikleri, reaksiyon ortamındaki stabilite ve hazırlanma kolaylıkları bu bileşik ve türevlerini sentetik ara bileşikler içerisinde çekici kılmaktadır. Düşük toksisite ve parçalanma ürünlerinin doğaya zarar vermemesinden dolayı da yeşil bileşikler sınıfındadır (Hall, 2006).

Bileşik	Genel Formül	Kimyasal Yapı
Boronik Asit	$RB(OH)_2$	
Boronik Ester (Boronat esteri)	$RB(OR)_2$	
Borinik Asit	$R_2BOH$	
Borinik Ester (Borinat esteri)	$R_2BOR$	

Şekil 1.8 Boronik asit ve borinik asidin esterleri (Hall, 2006).



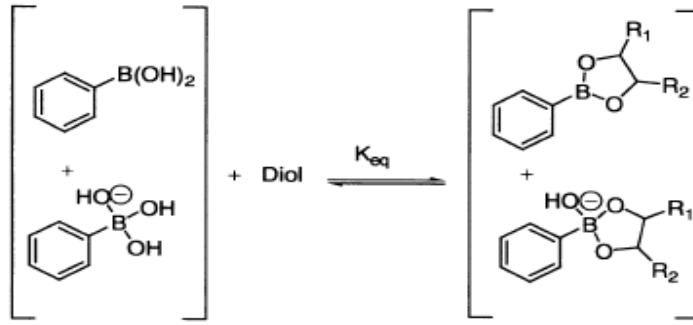
Boronik asit türevlerinin reaktivitesi ve kimyasal özelliği boron atomuna bağlı süstitüent gruba göre farklanır. Reaktif gruplara göre boronik asitler alkil, alkenil ve aril boronik asit olarak sınıflandırılabilirler (Hall, 2006) (Şekil 1.9).

Boronik Asit	R		Molekül Kütle
Fenil Boronik asit	Fenil		121.93
2-Tiyoenilboronik asit	Tiyofen		127.96
Metilboronik asit	Metil		59.86
cis-Propenilboronik asit	propen		85.90

Şekil 1.9 Boronik asit türevleri (Hall, 2006).

Boronat anyonları ile etkileşen hidroksil gruplarının komşu karbon atomlarında ve aynı düzlemsel konfigürasyonda yer alması gerekir. Açık zincirli poliollerde hidroksil grupları C-C bağı etrafında oldukça serbest dönebildikleri için boronat anyonları ile kompleks oluşumunu sağlayan uygun konfigürasyonlar kolayca sağlanır ve etkileşim kuvveti, karbon zincirinin uzunluğu ile artar. Kapalı halka içeren karbohidratlar için hidroksil gruplarının konformasyonu daha az serbestliğe sahiptir. Normal olarak 1,2 cis-diol grubuna sahip olmayan karbohidratlar ise halka esnemesi ve mutarotasyon yolu ile borat ile tepkimeye girerler. Katekoller ve türevleri hem borat hem de boronat ile kompleks oluşturabilir. Aril diollerle oluşturulan boronat kompleksi, şeker cis-diollerini ile oluşturulardan daha karardır. Etkileşime ait bir mekanizmada, trigonal düzlemsel boronik asidin tetrahedral boronat anyonu oluşturacak şekilde iyonlaştığı ve bu anyonun cis-diolla siklik bir boronat esteri oluşturması önerilir. Diğer bir mekanizma, diol oksijen atomlarının boronik aside nükleofilik saldırısı

sonucu birbirleri ile dengede anyonik ve nötral türlerin bir arada oluşması şeklindedir. Ligand kompleksleşmesi ile ilgili B–NMR ve spektroskopik ölçümlere dayalı olarak önerilen mekanizmada ise nötral fenilboronik asidin cis-diollü varlığında kompleksleşmiş bir anyon vererek kompleks oluşturduğu ve bu kompleksin bazik koşullarda ayrılmadığı kabul edilir (Chakka, 2006). (Şekil 1.10) Nötral boronik asit ise bazik koşullarda iyonlaşır. Cis-diollerle etkileşim için gerekli tetrahedral boronat anyonunun kararlılığı, fenil halkasına elektron çeken grupların (nitro gibi) sokulması ile artırılır. Ayrıca fenil halkasının yol açtığı ikincil hidrofobik bağlanmalar azaltılır. Riboz gibi bazı karbohidratlar için uygun cis-dioller hatta cis-trioller boronatlarla kuvvetle etkileşirler. Literatürde fenilboronik asit diesterleri için rapor edilen ayrışma sabiti değerleri azdır. Boronat-hidroksil etkileşiminde ikincil etkileşimler de söz konusudur (Liu, 2007). Bunlar yüksüz boratın amin ve karboksillerle yük transfer tepkimeleri, fenil bileşeninden kaynaklanan hidrofobik etkileşimler, aktif tetrahedral formda boronat anyonundan kaynaklanan iyonik etkileşimler ve boronatların hidroksil gruplarından kaynaklanan hidrojen bağı oluşumudur. Boronatların cis-diollerle oluşturdukları kompleksleri incelemek için, elektrokimyasal ve kalorimetrik titrimetri, iletkenlik, spektrofotometre, NMR, kromatografi, elektroforez, X-ışınları kırınımı, absorpsiyon spektroskopisi, floresans işaretleme ve enzim inhibisyonu gibi teknikler kullanılır (Ramamurthy et al, 1999).



Şekil 1.10 Boronat-diollü ester oluşumu (Springsteen, 2003).

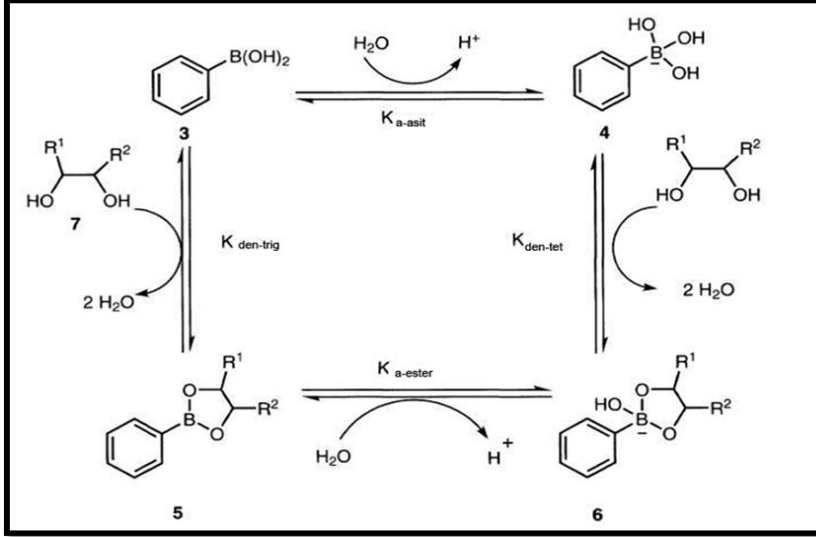
Boronat ligandları ile immobilizasyonda cis/diollü ester oluşumu yanı sıra ikincil etkileşimlerde rol oynamaktadır. Hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler, Hidrojen bağı ve yük transfer etkileşimleri ile de boronat ligandına bağlanmalar gerçekleşmektedir. Boronat immobilizasyon ve kromatografi sistemleri ile karbohidratlar, nükleozid, nükleotid ve nükleik asitler, glikoproteinler ve enzimler ayrıştırılabilir. (Bergold and Scouten, W.H., 1983).

### 1.3.1 Fenilboronik asit (PBA)

İmmobilize boronatların biyomoleküller ile etkileşimi genellikle fenilboronik asidin (PBA) ligand olarak kullanıldığı sistemlerde incelenmiştir. Çünkü PBA'nın kararlılığı yüksektir ve fenil boronik asit türevlerinin şekerlerin, nükleotidlerin ve proteinlerin ayırımında kullanılabilirdiği uzun yıllardır bilinmektedir.

Biyomolekül ayrılmasında boronat ligandlarının birincil etkileşimi hidroksil grupları ile olur. Hidroksil gruplarının konfigürasyonu ve boronat ligandının koordinasyonu kompleks oluşumunda iki önemli faktördür. Bazik koşullarda, fenilboronik asit ligandı (PBA) düzlemsel trigonal konfigürasyondan hidroksil grupları içeren bileşiklerle kovalent olarak etkileştiği tetrahedral boronat anyonu formuna iyonlaşır (Liu et al, 1995). Oluşan siklik diesterden kompleks olarak söz edilir (Şekil 1.10). Nötral koşullarda, hidroksil grupları ve trigonal olarak koordine edilen boronat ligandını içeren nötral kompleksler de oluşabilir. Ancak sulu çözeltilerde nötral komplekslerin çoğu hidrolize karşı yeterince kararlı değildir.

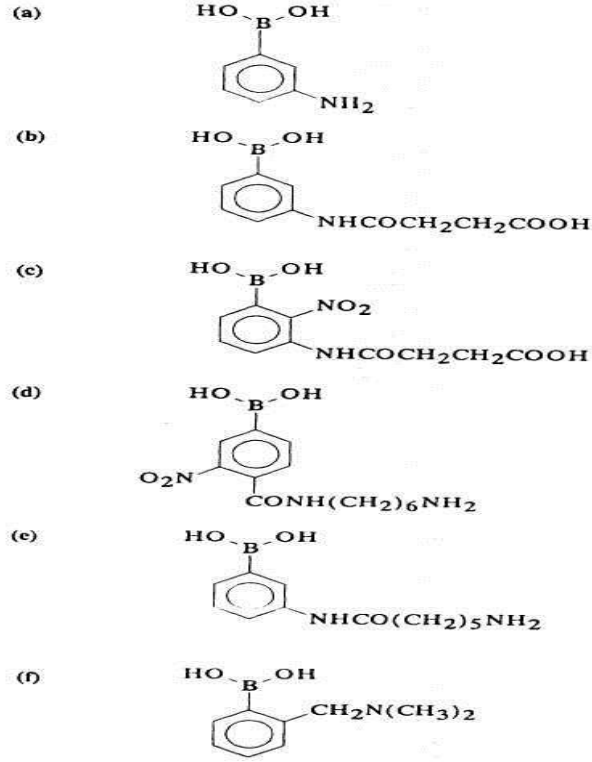
Boronat anyonları ile etkileşen hidroksil gruplarının komşu C atomlarında ve aynı düzlemsel konfigürasyonda yer alması gerekir. Açık zincirli poliollerde hidroksil grupları C-C bağı etrafında oldukça serbest dönebildikleri için boronat anyonları ile kompleks oluşumunu sağlayan uygun konfigürasyonlar kolayca sağlanır ve etkileşim kuvveti karbon zincirinin uzunluğu ile artar. Kapalı halka içeren karbohidratlar için hidroksil gruplarının konformasyonu daha az esnekliğe sahiptir. Normal olarak 1,2 cis diol grubuna sahip olmayan karbohidratlar ise halka esnemesi ve mutarotasyon yolu ile borat ile tepkimeye girerler. Aril diollerle oluşturulan boronat kompleksi, şeker cis diollerle oluşturulan boronat komplekslerinden daha karardır. Nötral boronik asit bazik koşullarda iyonlaşır. Cis diollerin etkileşimi için gerekli tetrahedral boronat anyonunun kararlılığı ancak fenil halkasına elektron çeken grupların (nitro gibi) ilavesiyle artırılır. Ayrıca fenil halkasının yol açtığı ikincil hidrofobik bağlanmalar azaltılabilir. Boronat hidroksil etkileşiminde yüksüz boratın amin ve karboksillerle yük transfer tepkimeleri, fenil bileşeninden kaynaklanan hidrofobik etkileşimler ,aktif tetrahedral formda boronat anyonundan kaynaklanan iyonik etkileşimler ve boronatların hidroksil gruplarından kaynaklanan hidrojen bağı oluşumu gibi ikincil etkileşimlerde söz konusudur (Springsteen, 2002) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Fenilboronik asitle diol arasındaki bağlanma (Springsteen, 2002).

### 1.3.1.1 Fenil boronik asit türevleri

Fenil boronatların hidrofobik yapıda olması nedeni ile protein, glikoprotein ve polinükleotidleri gibi makromoleküllerin ayrılmasında kullanılması zordur. Hidrofobik etkileşimlerle istenmeyen biyomoleküllerin spesifik olmayan bağlanması da gerçekleşir. Bu nedenle fenil halkasına çeşitli sübstitüentlerin takılması ile hidrofobik etkileşimler azaltılmaya çalışılır ya da 2-karboksietan boronik asit gibi fenil halkası içermeyen boronat ligandları sentezlenmiştir. Her biri farklı bağlama bölgeleri ile farklı bağ yapıları oluşturarak çeşitli moleküllerin tanı ve ayrılmasında kullanılmaktadır. Şekil 1.12’ de çeşitli fenil boronik asit türevlerinin kimyasal yapıları verilmiştir (Hall, 2006).



**Şekil 1.12** Fenil boronik asit türevleri, (a) 3-amino fenil boronik asit, (b) N-(3-dihidroksiborilfenil)süksinamik asit, (c) N-(4-nitro-3 dihidroksiborilfenil)süksinamik asit, (d) 3-nitro-4-(6aminoheksilamido)fenil boronik asit, (e) 6-aminokaproil-3-aminofenil boronik asit, (f) O-dimetilaminometil-benzenboronik asit (Hall,2006).

### **1.3.1.2 Fenil boronik asitin uygulama alanları**

Fenil boronik asidin geniş alanda uygulamaları vardır. Bunlar; klinik analizlerde (glikozillenmiş hemoglobin artışı ile oluşan glisemi tanısı), karbohidrat tanınması, nükleozid, modifiye nükleozid, nükleotid, ribonükleotid, oligonükleotid, nükleik asitlerin tanınması, deoksi türevleri seçimi, cAMP'den nükleotid ayırımı, nükleotidil peptid izolasyonu, katekol aminler tanınması, glikoproteinler ve enzimlerin ayrılmasında, biyomolekül izolasyonu, dopamin, laktik asit gibi küçük moleküllerin ayrılmasında, katekol estrogen ve hormon seçimi, proteazlar için inhibitör olarak, diyabetlerde glisemik kontrolde HbA1C saptanmasında, hipoksantin, inosin belirlenerek patolojik bozuklukların saptanmasında, bazı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterimi, sensör yapımı ve kontrollü ilaç salım sistemleri gibi çok çeşitli kullanım alanları mevcuttur.

### 1.3.2 Aminofenil boronik asit (AFBA)

Günümüzde en çok kullanılan boronat ligandı birçok biyomoleküle afinite gösteren 3-aminofenil boronik asittir (AFBA) ve  $pK_a$  değeri 8,8 dir (Çizelge 1.11). Meta-amino grubu katı desteğe bağlanmasında etkilidir. Amino grubu üzerinden aktive edilen taşıyıcıya kovalent olarak bağlanır. Boronik asit ile türevlendirilen taşıyıcı protein ve/veya enzim ile bir araya getirildiğinde boronat ligandı protein üzerindeki gerek karbohidrat artıklarının gerekse aminoasit artıklarının cis diolleri ile etkileşip ester oluşturarak immobilize edilir (Liu and Scouten, 2000). Bu çalışmada, doğal bir taşıyıcı olan kitosan ve sentetik bir taşıyıcı olan Sepabead EC-EA 3-aminofenil boronikasit ile türevlendirildikten sonra  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmıştır. Enzimi iyi bir aktivite verimi ile immobilize etmek için immobilizasyon ortamının optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 1.11** Aminofenil boronik asitin biyoafinite gösterdiği moleküller.

Hedef Molekül	Örnekler
<b>Protein</b>	Eritroprotein (EPO), membran glikoprotein, serum protein-fetuin, transferrin
<b>Karbohidrat</b>	Arabinoz, fruktoz, galaktoz, inositol, laktoz, sorbitol
<b>Nükleotid/ Nükleozid</b>	Adenozin, deoksiadenozin, sitidin, guanozin, üridin, timidin
<b>Nükleik asit</b>	Oligonüklotidler ve RNA

## 1.4 İmmobilize Enzimlerin Uygulama Alanları

Enzimler çok eski yıllardan beri ekmek, peynir, bira, şarap gibi maddelerin yapımında, ilaç yapımında kullanılmaktadır. Enzimlerin izolasyonu, saflaştırılması ve yapılarının tayini ile ilgili yapılan çalışmalarda katalitik potansiyeli ve tabiatı daha iyi bir şekilde anlaşılmalı ve endüstride bu çok faydalı maddelerden geniş ölçüde yararlanmaya başlanmıştır. Endüstriyel katalizatörler olarak enzimler klasik kimyasal katalizatlara göre bazı üstünlüklere sahiptirler. İleri derecede substrat spesifikliğı, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu büyük ölçüde elimine etmekte ve sadece materyal maliyetini düşürmekle kalmayıp çevre sorunu da yaratmaktadır. Bazı stereospesifik reaksiyonlar enzimlerin yardımı olmaksızın gerçekleştirilemezler. Operasyon koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır ve operasyonun korozyon etkilerini ve enerji gereksinmesini düşürür. Reaksiyon hızı yüksek ve maliyet düşüktür. Bu avantajlara rağmen enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması çok pahalıdır. Çoğu enzim canlı hücre dışında oldukça dayanıksızdır ve çözünen formda sulu ortamda kullanılır. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak serbest enzimlerin kullanılması birçok sakınca yarattığı için immobilize enzimler tercih edilirler (Telefoncu, 1986; Telefoncu, 1996) .

İmmobilize enzimler; tıbbi, analitik ve endüstriyel uygulamalar olmak üzere üç alanda kullanım imkanı bulmuştur. Tıbbi uygulamalara tedavi amaçlı kullanımlar, yapay organlar, analitik uygulamalara analiz otomatları, biyosensörlerin hazırlanması, ELISA testleri, endüstriyel uygulamalara L-aminoasit üretimleri, süt şekerinin parçalanması ve rafinoz hidrolizi örnek verilebilir. Endüstriyel açıdan bakıldığında immobilize enzimlerin oldukça geniş bir uygulama alanına sahip oldukları bilinmektedir. Bu uygulama alanları genel olarak, biyotransformasyonlar, gıda sanayi, deterjan sanayi, deri sanayi, tekstil sanayi ve diğer sanayiler olarak sıralanabilir. Endüstriyel uygulama olanağı bulmuş enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Endüstriyel enzimler içerisinde proteolitik enzimlerin payı % 60, glikozidazların payı ise % 20' dir.

Biyotransformasyonlar, enzimler veya bunları içeren mikroorganizmalar tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlerdir. Aminoasit dönüşümleri (aminoasit, rasemik karışımlarından L-aminoasit üretimi, L-aminoasit sentezi, hidroksiasitlerden aminoasit sentezi), antibiyotik dönüşümleri (6-aminopenisilanik asit üretimi, yarı sentetik penisilin üretimi), diğer biyokimyasal dönüşümler (L-Malik asit üretimi, ürokanik asit üretimi), organik sentezler (hidrolitik,

oksidasyon-redüksiyon, glikozil transfer ve halojenleme reaksiyonları) biyotransformasyonların en önemli uygulamalarıdır.

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

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

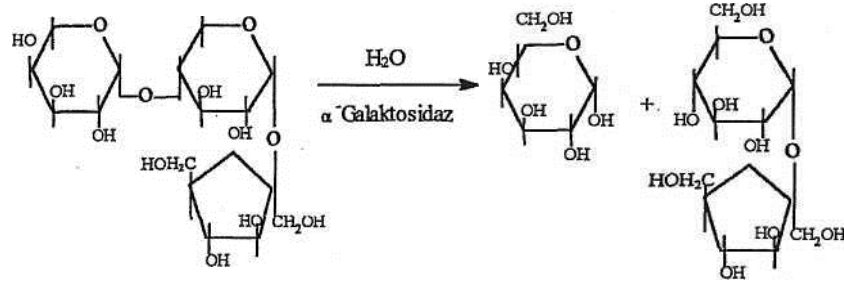
### **1.5 İmmobilize Enzimler ve $\alpha$ -Galaktozidazlarla İlgili Gelecekte Beklentiler**

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları regüle eden spesifik biyolojik katalizatörlerdir. Bu biyokatalizatörlerin kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarda kullanılmaya başlanması bilim çevrelerini bu katalizatörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen spesifik katalizatörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizatör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenildiği an uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü de güçtür. Enzimin reaksiyon ortamında aktivitesini yitirmeden çıkarılabilmesi mümkün olmadığından yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu da enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizatörler olmaları nedeniyle maliyeti artıran önemli bir etmendir. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son otuz yılda enzim



immobilizasyonu araştırmaları yoğunluk kazanmıştır. İmmobilize enzimler de tıbbi, analitik ve endüstriyel alanda uygulamalar bulmuştur (Telefoncu, 1997).

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



şekil 1.13  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile rafinoz hidrolizi.

şeker endüstrisinde, şeker pancarı veya şeker kamışından çıkılarak sakkaroz üretimi yapılmaktadır. Üretim sırasında kristallendirme adımından önce şurup % 0,1 oranında rafinoz içermektedir. Rafinoz; D-galaktoz, D-glukoz ve D-fruktozdan oluşmuş bir trisakkarittir. Sükroz, Steffen prosesi ile melasdan geriye kazanıldığında proses buharında rafinoz içeriği artar. Konsantrasyon % 4-5' e ulaştığında sükroz kristalizasyonu büyük ölçüde engellenir ve sükroz verimi önemli oranda azalır. Bu problem rafinozun  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidrolizi ile çözülmekte ve büyük bir ekonomik yarar sağlanmaktadır.

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

## 2. MATERYAL ve METOD

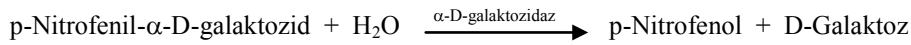
### 2.1 Materyal

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

Kullanılan kimyasal maddeler; p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galakto-piranozid (PNPG), 3-aminofenil boronik asit (AFBA), glutaraldehid ve kitosan, Sigma Chem. Co (St.Louis,USA)'den, Sitrik asit, Borik asit, p-Nitrofenol, Amonyum sülfat, Na/K Tartarat, NaOH, HCl E. Merck (Darmstad-FRG) 'den, Sığır Serum Albümini (Albümin Fraksiyon V), Glisin ve Coomasie-Brilliant Blue Bio-Rad Laboratuvarları (Richmond CA) ve BDH Ltd. (Poole, UK) 'den temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi domatesten (*Lycopersicon esculentum*) izole edilmiştir. Enzim kaynağı olarak kullanılan domates lokal marketlerden satın alınmıştır. İmmobilizasyonda kullanılan Sepabead EC-EA Resindion S.R.L (Mitsubishi Chemical Co., Milan, İtalya) adlı firmadan temin edilmiştir.

### 2.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini (PNPG ile)

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



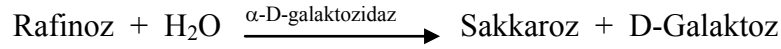
$\alpha$ -Galaktozidazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,5 ml sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 5,0) ve 0,25 ml PNPG (2 mM ve pH 5,0 sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 0,25 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı, 37°C'de 30 dakika boyunca lineer karıştırılmalı 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, 0,02-0,25  $\mu\text{mol}$  p-nitrofenol konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır.

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

### 2.3 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini (Rafinoz ile)

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



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

$\alpha$ -Galaktozidazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,5 ml sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 5,0) ve 0,25 ml rafinoz (100 mM ve pH 5,0 sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 0,25 ml uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı, 50 °C'de 1 saat boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda (SBS-35, Stuart Scientific, UK) çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon ortamından alınan 1 ml örnek üzerine 1 ml DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 10 ml bidistile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Açığa çıkan galaktoz miktarı 546 nm' de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör 0,25 ml enzim çözeltisi yerine 50 mM sitrat tamponu (pH 5.0) içerir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında 2,5- 50  $\mu\text{M}$  galaktoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır.

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

## 2.4 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 yöntemidir. 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 absorbanası okunur.
- e) Protein konsantrasyonları, hazırlanan standart grafiği (0,02-0,2 mg/ml BSA standartları) kullanılarak hesaplanır.

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin izolasyonu ve taşıyıcılarda immobilizasyonu sırasında gerekli protein tayinleri bu yöntemle göre yapılmıştır.

## 2.5 Aminofenil Boronik Asit Tayini

Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcıların amino grupları uygun glutaraldehid konsantrasyonları ile aktive edildikten sonra, taşıyıcılar % 20 (v/v) dioksan içerecek şekilde % 5' lik (w/v) aminofenil boronik asit (AFBA) çözeltisi ile 24 saat boyunca 200 rpm'de karıştırıldı. Taşıyıcılara bağlanmayan AFBA, taşıyıcıların 10 ml, 0,1 M, pH 6 sodyum borat tamponu ile iki kere yıkanması ile ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen santrifüjatlarda distile su ile uygun oranda seyreltilip 295 nm' de absorbansları okunarak, standart grafiğinden AFBA miktarı tayin edildi. İmmobilizasyon ortamına eklenen AFBA miktarından, santrifüjattaki bağlanmayan AFBA miktarının çıkarılmasıyla taşıyıcılara bağlanan AFBA miktarı hesaplandı. Santrifüjattaki AFBA miktarını belirlemek için 0,05-5,0 mg/ml AFBA konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılmıştır (Camlı et. al., 2002).

## 2.6 Domates $\alpha$ -Galaktozidazının İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

$\alpha$ -Galaktozidaz (EC 3.1.3.22) enzim kaynağı olarak yüksek enzim aktivitesi içeren domates seçilmiştir. Birçok  $\alpha$ -galaktozidaz çalışmasında enzim başta mikrobiyal kaynaklar olmak üzere bitkisel ve hayvansal kaynaklardan izole edilip, saflaştırılarak fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada, daha sonraki amacımıza uygun bir enzim preparatı hazırlamak için  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi geleneksel tekniklerle domatesten izole edilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi saf enzim preparatı Sepabead EC-EA ve kitosan taşıyıcılarda biyoafinite ile immobilize edilmiştir. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulanmıştır.

Lokal marketlerden temin edilen domates ilk önce musluk suyu ile daha sonra distile su ile yıkandı. Dış kabuklar çok ince bir şekilde kesilerek uzaklaştırıldı ve domatesler bıçakla parçalara ayrıldı. 1 M NaCl içeren, 50 mM sodyum sitrat tamponunda (pH 5,0) önce blender, sonra homojenizatör ile homojenizasyon yapılarak filtre edildi. Filtratın pH' sı (4.52) 1 M NaOH ile pH 5.7 'e ayarlandı ve 4° C de 1 – 2 saat bekletildi. Filtrat 10,000 rpm, 4° C'de, 15 dakika santrifüjlendi ve santrifüjatta aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Ardından santrifüjata %85' lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı ve 4 °C' de gece boyu

bekletildi. Ertesi gün 30 dakika boyunca, 4 ° C' de manyetik olarak karıştırıldı ve ardından 10,000 rpm'de, 4 ° C'de 30 dakika santrifüjlendi. Enzimatik aktivite içeren amonyum sülfatlı çökelek 50 mM, pH 5.0 sitrat tamponunda çözüldü ve gece boyu aynı tampona karşı diyalizlendi. Diyalizatta aktivite ve protein tayini yapıldıktan sonra, diyalizat immobilizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere -20 ° C'de derin dondurucuda depolandı.

Hazırlanan  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatı hem protein miktarı hem de  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi açısından immobilizasyon için uygun bir protein preparatıdır. Immobilizasyon çalışmalarında kullanılacak enzim preparatının protein miktarı, aktivite ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 2,072 mg/ ml, 0,632 Unit/ml ve 0,305 U/mg'dır.

## **2.7 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Kitosan ve Sepabead EC-EA ' da Immobilizasyonu**

Domatesten kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatı aminofenilboronik asit (AFBA) ile türevlendirilen kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda biyoafinite ile immobilize edildi. Immobilizasyonun optimizasyonu amacıyla uygun glutaraldehid konsantrasyonu, AFBA konsantrasyonu ve protein miktarının belirlenmesi için farklı bileşimlerde deney setleri kuruldu. Her iki taşıyıcıda enzimin yüksek verimle immobilize edildiği koşullar optimizasyon sonucunda belirlendi.

Sepabead EC-EA ve kitosan taşıyıcılar (1 g) 10 ml, 25 mM pH 7.0 sitrat-fosfat tamponu ile yıkandı ve 4000 rpm' de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz ortamdan uzaklaştırıldı. Taşıyıcıların amino gruplarını aktive etmek amacıyla kitosan ve Sepabead EC-EA' ya içerisindeki konsantrasyonu sırasıyla %1,5 (v/v) ve %1,25 (v/v) olacak şekilde 5 ml glutaraldehit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda (IKA Labortechnik, KS/25, basic, FRG) 20-30 dakika 150-200 devir/dakika hızla karıştırıldı. Üst sıvı filtre edildikten sonra taşıyıcılar 5 ml, 25 mM, pH 7.0 sitrat-fosfat tamponu ile iki defa yıkandı. Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılara sırasıyla içerisinde 200 mg ve 10 mg AFBA içeren 25 mM, pH 7.0 sitrat-fosfat tamponunda hazırlanan AFBA çözeltisi eklenerek gece boyu oda sıcaklığında 200 rpm' de karıştırıldı ve ardından filtre edildi. Taşıyıcılar 10 ml, 0,1 M, pH 7.0 sitrat-fosfat tamponu ile iki kere yıkandı. Yıkama sularında ve süpernatantta bağlanmayan AFBA miktarı tayin edildi.

AFBA ile türevlendirilen taşıyıcılardaki aktif kalan boş uçların bloke edilmesi için 5 ml, 3 M Glisin çözeltisi ile gece boyu blokaj yapıldı. Filtre edildikten sonra taşıyıcılar 10 ml, 0,1 M, pH 6 sitrat-fosfat tamponu ile iki kere yıkandı. AFBA ile türevlendirilen taşıyıcılara (Kitosan-AFBA ve Sepabead- AFBA) sırasıyla 2,0 mg ve 1,0 mg protein içerecek şekilde enzim çözeltisi eklenerek 24 saat oda sıcaklığında 200 devir/dakika hızla karıştırıldı. Süre sonunda süpernatantlarda aktivite ve protein tayini yapılarak tekrar oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmadan bekletildi. İmmobilize enzimler 10 ml, 25 mM, pH 6.0 sitrat tamponu ile ikişer kez yıkandı ve filtre edildi. Yıkama suları ve tüm filtratlar birleştirilip aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

Taşıyıcılarda immobilize edilen enzimlerin çapraz bağlanması için immobilize enzimler glutaraldehit çözeltisi ile muamele edildi. Kitosan ve Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzimler sırasıyla içindeki konsantrasyonu % 1,5 ve % 0,005 (v/v) olacak şekilde glutaraldehit çözeltisi ile 25 dakika boyunca orbital karıştırıcıda 160 devir/ dakika hızla karıştırıldı. Ardından 10.000 rpm' de 4 ° C' de santrifüjlenerek süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Çapraz bağlama işlemi sonrasında taşıyıcılar 10 ml, 25 mM, pH 7.0 sitrat-fosfat tamponu ile orbital karıştırıcıda 200 devir/dakika hızla 20 dakika karıştırılarak yıkandı ve filtre edildi. Çapraz bağlı immobilize enzimlerin aktivite tayinleri yapıldı.

Bu aşamadan sonra, kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda immobilize edilen enzimlerin karakterizasyon ve kararlılık çalışmaları yapılarak serbest enzimle kıyaslandı.

## **2.8 İmmobilizasyon Ortamının Optimizasyonu**

### **2.8.1 Glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi**

İmmobilizasyon işlemine başlamadan önce ilk olarak kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcıların glutaraldehit ile aktivasyonu gerçekleştirildi. 1 g kitosan 0.1 M, pH 6 sitrat-fosfat tamponu ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki [% 0,25 - 0,5 - 1,0 - 1,25 - 1,5 - 1,75 - 2,0 - 3,0 (v/v)] 5 ml'lik glutaraldehit çözeltisi ile muamele edilerek aktive edildi. 100 mg AFBA ile türevlendirildikten sonra üzerine 2,072 mg protein içerecek şekilde enzim çözeltisi uygulandı. 1 g Sepabead EC-EA taşıyıcısı ise 0.1 M, pH 6 sitrat-fosfat tamponu ile hazırlanan değişen konsantrasyonlarda [% 0,1- 0,25- 0,5- 1,0- 1,25- 1,5- 1,75- 2,0 (v/v)] 5

ml'lik glutaraldehit çözeltisi ile aktive edildikten sonra 50 mg AFBA çözeltisi (25 mM, pH 7.0 sitrat-fosfat tamponu) ile türevlendirildi ve 2,072 mg protein içeren enzim çözeltisi eklendi. 24 h oda sıcaklığında 200 devir/dakika hızla karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 24 h karıştırmadan bekletildi. İmmobilize enzimler 10 ml, 25 mM pH 6.0 sitrat tamponu ile iki kez yıkandı, filtre edildi, yıkama suyu ve filtratlar birleştirilerek aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

### **2.8.2 AFBA konsantrasyonunun etkisi**

Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda immobilizasyon sırasında taşıyıcıların aktivasyonu için en uygun glutaraldehid konsantrasyonu belirlendikten sonra AFBA miktarı optimize edildi. 1 g kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcıları sırasıyla içerisindeki konsantrasyonu %1,5 ve %1,25 (v/v) olacak şekilde 5 ml glutaraldehit çözeltisi ile aktive edildikten sonra, her iki taşıyıcıya farklı miktarlarda AFBA (kitosan için; 25, 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350 mg, Sepabead EC-EA için; 2, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100 mg) içerecek şekilde pH 7.0 sitrat-fosfat tamponu ile hazırlanan AFBA çözeltileri eklenerek taşıyıcılar türevlendirildi ve uygun AFBA miktarı belirlendi. Türevlendirilen taşıyıcıya 2,072 mg protein içeren 5 ml enzim çözeltisi ilave edilerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi.

### **2.8.3 İmmobilizasyon ortamının pH'ının etkisi**

Optimum glutaraldehid konsantrasyonu ve ABFA miktarı belirlendikten sonra ortam pH'ının immobilizasyon üzerine etkisi incelendi. Her iki taşıyıcı optimize edilen koşullarda hazırlandıktan sonra farklı pH değerlerindeki (pH 4,5–5,0- 5,5– 6,0- 6,5– 7,0) sitrat tamponu 25 mM ortamında  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Enzimin immobilizasyonu için ortamın uygun pH değeri belirlendi.

### **2.8.4 İmmobilizasyon ortamının iyon şiddetinin etkisi**

Glutaraldehid konsantrasyonu, AFBA miktarı ve immobilizasyon ortamının pH'ı belirlendikten sonra, her taşıyıcı için belirlenen bu sabit koşullarda immobilizasyon işlemi farklı iyon şiddetlerindeki ( 5- 10- 20- 25- 50 mM ) sitrat tamponu içerisinde gerçekleştirildi. Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda enzimin immobilizasyonu için en uygun iyon şiddeti değeri belirlendi.



### **2.8.5 İmmobilize edilen enzimin çapraz bağlanması için gerekli glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi**

Biyospesifik etkileşimlerden faydalanarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra istenmeyen aktivite kayıplarını engellemek amacıyla enzim molekülleri arasında çapraz bağlantılar kurulması için, immobilize edilmiş enzimler tekrar glutaraldehit ile muamele edilerek çapraz bağlama gerçekleştirildi. Hem kitosan hem de Sepabead EC-EA taşıyıcılarda optimize edilen koşullarda immobilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra çapraz bağlama için değişen glutaraldehit oranları [% 0,25- 0,5- 0,75-1,0 – 1,25– 1,5– 1,75– 2,0– 3,0 (v/v)] ile çalışıldı.

Bu aşamadan sonra serbest enzim, kitosanda kovalent bağlı immobilize enzim, kitosanda kovalent ve çapraz bağlı immobilize enzim, Sepabead EC-EA'da kovalent bağlı immobilize enzim ve Sepabead EC-EA'da kovalent ve çapraz bağlı immobilize enzim kullanılarak karakterizasyon ve kararlılık çalışmaları yapıldı.

## **2.9 İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karakterizasyonu**

### **2.9.1 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi**

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

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

Domatesten izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazın aktivite ve protein tayinleri daha önceki bölümlerde açıklanan yöntemler ile belirlenmiştir.  $\alpha$ -Galaktozidazların

aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri Sonuçlar ve Tartışma bۆlümünde ilgili tablolarda verilmiştir.

### **2.9.1.1 Sıcaklık**

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

Belirli alışma koşullarında farklı sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir.  $\alpha$ -Galaktozidazların çoğunun optimum sıcaklık değerleri 37-40°C arasında değişmektedir. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğrileri çizilerek izlenir. Bu grafik bağlı aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denatürasyon nedeniyle optimum sıcaklık düşer. İmmobilizasyon sonrasında enzimin optimum sıcaklığı değişimler gözlenir (Önal, 2000).

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacı ile 4-80°C (4, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80°C) sıcaklık aralığında çalışılarak serbest ve immobilize domates  $\alpha$ -galaktozidazlarının optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

### **2.9.1.2 pH**

Ortamın pH' ı enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Çünkü enzimler protein yapıdadırlar ve evre koşullarından etkilenirler. Bunlardan birisi de ortamın pH'ıdır. Bu nedenle immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak ve hidroliz için optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından faydalı olacaktır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH, optimum pH'dır.  $\alpha$ -Galaktozidazın optimum pH değerleri kullanılan enzim kaynağına, substrata, inkübasyon zamanı ve sıcaklığına göre oldukça geniş bir aralıkta farklılık göstermektedir (Önal,2000).

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzim prepatlarının aktivitelere pH'm etkisinin belirlenmesi için standart aktivite tayininde enzimler, pH 1,5-2,0'deki Glisin/HCl tamponu (50 mM), pH'sı 2,6-7,0 aralığındaki sitrat/fosfat tamponu (50 mM), pH 'sı 7,0-8,0 aralığındaki fosfat tamponu (50 mM) ve pH 'sı 8,0-9,0 aralığındaki Tris/HCl tamponunda (50 mM) 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi ve geriye kalan aktiviteleri tayin edildi. pH-aktivite profili oluşturularak serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'sı belirlendi.

### **2.9.1.3 Substrat konsantrasyonu**

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin sentetik bir substratı olan PNPNG' nin ve doğal bir substratı olan rafinozun enzim aktivitesine etkisi incelenerek doyunluk substrat konsantrasyonları ile  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir.

PNPG ile yapılan denemelerde, doyunluk substrat konsantrasyonu ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için 10 mM stok PNPNG' den çıkılarak farklı substrat konsantrasyonlarında (0,05- 2,0 mM) enzim aktivitesi tayin edildi. Serbest ve immobilize enzimler için çift deneme yapılmıştır. Rafinozun substrat olarak kullanıldığı denemelerde ise, doyunluk substrat konsantrasyonu ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlenmesi için 100 mM sitrat tamponunda hazırlanmış stok rafinozdan çıkarak farklı konsantrasyonlarında (2,5- 50 mM) enzim aktivitesi tayin edildi. Her deneme için çift çalışıldı.

Substrat konsantrasyonu ile aktivite arasında çizilen grafikten substrat doyunluk konsantrasyonu belirlendi.  $1/S$  ile  $1/v$  arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

### **2.9.1.4 Efektör türü ve konsantrasyonu etkisi**

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

Çeşitli kimyasallar ( $FeCl_3$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $HgCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaCl$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $MnCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $Na_2CO_3$ ) ve şekerler (Galaktoz, Glukoz, Sükroz, Fruktoz, Laktoz, Maltoz, Melibioz, Rafinoz) enzimatik reaksiyon ortamına eklenerek

enzim aktiviteleri üzerine 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.

### **2.9.2 Kararlılık testleri**

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

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

#### **2.9.2.1 Termal kararlılık**

Enzimler protein yapıdadırlar ve ısıya karşı kararlı değildirler, bu nedenle sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağımlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulsa bile yalnız inkübasyon süresinin uzaması bile denaturasyon sonucu aktivite kaybına neden olur. Eğer bir enzimin termal kararlılığı immobilizasyonla artıyorsa böyle enzimlerin kullanımı pek çok alanda yaygın olacaktır (Önal, 2000).

Termal kararlılık tayininde, aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimler önce 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (4 -25- 37- 40- 50- 55- 60- 65- 70- 80 °C) inkübe edildi ve sonra standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. Her bir sıcaklık için örnekler çift çalışılmıştır.

Öninkübasyon zamanına bağımlı termal kararlılıklarını belirlemek için ise serbest ve immobilize enzim preparatları önce 50°C ve 37°C’de farklı sürelerde ( 15 dk- 30 dk- 45 dk- 60 dk- 90 dk- 120 dk- 180 dk- 240 dk- 24 h ) inkübe edildi ve ardından geriye kalan aktiviteleri standart koşullarda ölçüldü. Her bir zaman için çift örnek ve bir kör deneme yapılmıştır.

### **2.9.2.2 pH kararlılığı**

Ortam pH ’sının enzim aktivite ve kararlılığına etkisini incelemek amacı ile düzenlenen deney setinde enzim, 50 mM sitrat/fosfat ve fosfat tamponlarında farklı pH ’larda (sitrat/fosfat: 2,6; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; fosfat: 7,0; 7,5; 8,0) 2 saat boyunca 4°C ’de bekletildi ve ardından standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi. Her bir deneme çift çalışıldı.

### **2.9.2.3 Depo kararlılığı**

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

Depo kararlılığını belirlemek için, 4°C’ de aynı koşullarda saklanan serbest ve immobilize enzimlerden 16 hafta boyunca belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktiviteleri standart koşullarda tayin edildi.

### **2.9.2.4 Operasyonel kararlılık**

Enzimlerin operasyonel kararlılığı, immobilize sistemlerin endüstriyel uygulamalarında önemli bir parametredir. Operasyonel kararlılık, immobilize enzimin kesikli karıştırılmalı batch sistemden belirli zaman aralığında alınan örneklerin standart koşullarda aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenir. Operasyon

zamanı ile enzim aktivitesindeki azalma arasındaki ilişki belirlenerek biyokatalizörün yarı ömrü ( $t_{1/2}$ ) hesaplanır (Önal, 2000).

Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda kovalent olarak immobilize edilen ve kovalent olarak immobilize edildikten sonra çapraz bağlanan immobilize enzim örneklerinin operasyonel kararlılık denemeleri kesikli karıştırmalı batch sistemde hem PNPG hem de rafinoz substratları kullanılarak gerçekleştirildi.

Substrat olarak PNPG' nin kullanıldığı sistem 400 mg immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz, 2,5 ml 2 mM PNPG ve 7,5 ml 50 mM sitrat tamponu (pH 6.0) içermektedir. Rafinozun substrat olarak kullanıldığı sistemde 400 mg immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz, 0,1 ml 100 mM rafinoz ve 9 ml 50 mM sitrat tamponu (pH 6.0) içermektedir. Operasyon sıcaklığı substrat olarak PNPG' nin kullanıldığı sistemde 37 °C ve rafinozun kullanıldığı sistemde 50 °C olarak seçilmiştir. Sistemden farklı zaman aralıklarında alınan örneklerin aktiviteleri standart koşullarda tayin edilmiştir.

### 2.9.3 Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği özellikle endüstriyel proseslerde oldukça önemlidir. İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidazın tekrar kullanılabilirlik denemesi PNPG substratı kullanılarak 37 ve 50°C 'de gerçekleştirilmiştir.

PNPG'nin substrat olarak kullanıldığı reaksiyon ortamı; 0,5 ml 50 mM sitrat tamponu (pH 6), 0,25ml 2 mM PNPG (sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış) ve 40 mg immobilize enzim preparatı içerir. Bu karışım 37°C 'de 30 dakika inkübe edildikten sonra immobilize enzim ortamdan uzaklaştırıldı ve üst reaksiyon sıvısına 3,5 ml 200 mM borat tamponu (pH 9.8) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Açığa çıkan p-nitrofenol miktarından enzimin aktivitesi belirlendi. Aynı enzim preparatları ile 1 günde 5 olmak üzere 3 günde toplam 15 kez aktivite tayini yapılmıştır. Gece boyunca örnekler 4°C' de saklanmıştır.

## 2.10 İmmobilize $\alpha$ -Galaktozidaz Enzim Preparatlarının PNPG ve Rafinoz Hidrolizinde Kullanımı

İmmobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin enzimatik substrat hidroliz çalışmalarını gerçekleştirmek için substrat olarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (PNPG) ve rafinoz kullanıldı. Hidroliz çalışmaları kesikli karıştırmalı sistemde gerçekleştirildi.

PNPG için kurulan kesikli karıştırmalı sistemde 400 mg immobilize enzim, 7,5 ml, 50 mM sitrat tamponu (pH 6.0) ve 2,5 ml, 2 mM PNPG; rafinoz için kurulan sistemde 400 mg immobilize enzim, 0,1 ml 100 mM rafinoz ve 9 ml 50 mM sitrat tamponu (pH 6.0) bulunur. Rezervuar bileşenleri sürekli manyetik olarak karıştırılır. Hidroliz sıcaklığı PNPG için 37 °C ve rafinoz için 50 °C olarak kullanılmıştır. Başlangıç anında ve reaksiyon devam ettikçe belirli zaman aralıklarında sistemden alınan örneklerin aktivite tayinleri yapılarak % dönüşüm hesaplandı.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Domatesten (*Lycopersicon esculentum*) İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

$\alpha$ -Galaktozidazlar ( $\alpha$ -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 (Fialho et al., 2008; Naik et al., 1985; Galili et al., 1985; Hashimoto et al., 1993; Ito et al., 1993; Yoshimitsu et al., 2010; Anisha et al., 2008).  $\alpha$ -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; Farzadi et al., 2010; Kotwal et al., 1999; Wong et al., 1986; King et al., 2002; El-Shebawy et al., 2007; 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) ve hayvansal (Dhar et al., 1993; Dean and Sweeley,; 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  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az sayıda çalışma mevcut ise de, önemli olan daha sonraki çalışmalarda kullanılacak amaca uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır.  $\alpha$ -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 glikozidazlar tarafından kontamine edilmiyor ve geniş bir aglikon spesifikliğine sahip ise bahsedilen birçok kullanım alanı için uygun olacaktır.

Bu çalışmada, enzim kaynağı olarak domates (*Lycopersicon esculentum*) seçilmiştir. Domatesin, oldukça yüksek  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesine ve uygun protein içeriğine sahip olması nedeniyle immobilizasyon çalışmaları için uygun bir enzim kaynağı olacağı düşünüldü. Ayrıca domates, ülkemizde her mevsim kolaylıkla temin edilebilen, bol bulunan ve ucuz bir kaynak olmasından dolayı da enzim kaynağı olarak tercih edildi. Tamamen saf enzim preparatının hazırlanması için oldukça zahmetli ve yüksek maliyetli yöntemlere ihtiyaç duyulduğundan bu çalışmada, seçilen enzim kaynaklarından  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin domatesten izole edilip kısmi olarak saflaştırılarak immobilizasyon çalışmalarında kullanılmasına karar verildi.

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi “Materyal ve Metod” bölümünde açıklandığı gibi geleneksel yöntemler ile domatesten izole edilip çalışmanın amacına yönelik uygun kısmi saf enzim preparatları hazırlandı. Immobilizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 0,632 U/ml, 2,072 mg/ml ve 0.305 U/mg olarak belirlendi. Her bir immobilizasyon adımında kullanılan  $\alpha$ -galaktozidaz preparatlarının protein içeriği, aktivite ve spesifik aktivite değerleri ilgili bölümlerde ve çizelgelerde verildi.

### **3.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Sepabead EC-EA ve Kitosan’ da Immobilizasyonu**

Domatesten izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin kitosan (doğal polimer) ve Sepabead EC-EA (sentetik polimer) taşıyıcılarda biyoafinite temelli immobilizasyonu gerçekleştirildi. Taşıyıcıların amino grubu glutaraldehid ile aktive edildikten sonra taşıyıcılar Amino fenil boronik asit (AFBA) ile türevlendirildi. Domatesten izole edilerek hazırlanan glikoprotein karakterdeki  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin aminoasit ve şeker artıklarının cis diolleri kitosan ve Sepabead EC-EA üzerindeki AFBA ile etkileşip ester bağı oluşarak immobilize edildi.

Kitosan, enzim immobilizasyonunda kullanılan doğal bir polimerik taşıyıcıdır. Doğada yaygın olarak bulunur, antimikrobiyal özelliğindedir ve maliyetleri düşüktür (Krajewska, 2003; Shepherd,1997; Tebrojevich, 2000). Çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılarak kitosanda lipaz (Kuo et al.,2011; Rodrigues et al., 2007 ),  $\omega$ -transaminase (Yi et al., 2007), proteaz (Li et al.,2011), üreaz (Chellapandian and Krishnan, 1997),  $\alpha$ -amilaz (Kumari and Kayastha, 2010),  $\alpha$ -galaktozidaz (Singh and Kayastha, 2012) ve peroksidaz enzimleri (Monier et al., 2009) başarıyla immobilize edilmiştir. Sepabead taşıyıcılar da enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere sentezlenmiş polimetakrilat-tabanlı sentetik taşıyıcılardır (Resindion S.R.L., Mitsubishi Chemical Co., Milan, Italy). Oldukça yüksek mekanik stabilite, düşük sıkışabilirlik özellikleri ve mikrobiyal ataklara yüksek dayanıklılıkları gibi mükemmel özellikleri nedeniyle özellikle endüstriyel uygulamalar için oldukça uygun taşıyıcılardır (Zuza et al., 2008; Prlainovic et al., 2011; Bayraktar et al., 2012). Farklı fonksiyonel gruplar taşıyan Sepabead taşıyıcılarda D-aminoasit oksidaz (Gallego et al., 2005), epoksit hidrolaz (Mateo et al., 2007), fruktozil transferaz (Ghazi et al., 2005), glutaril açılaz (Alonso et al., 2005), enterokinaz (Kubitzki et al., 2008),  $\beta$ -galaktozidaz (Pessela et al., 2003; Torres and B. Viera,2012) ve amilaz (Nwagu et al., 2012) gibi birçok enzim başarıyla immobilize edilmiştir.

Aminofenil boronik asit (AFBA) ile yapılan çalışmalar günümüzde gittikçe önem kazanmaktadır. AFBA' nın protein, karbohidrat, nükleotid, nükleozid ve nükleik asitlere olan ilgisinden yararlanılarak çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Soya fasülyesi  $\beta$ -amilaz enzimi, AFBA ile türevlendirilen kitosan taşıyıcıda adsorplanarak saflaştırılmıştır (Arruda and Santana, 2003). Antibiyotik direnci açısından önemli olan  $\beta$ - laktamaz enziminin de AFBA ile türevlendirilen agaroz taşıyıcıda yüksek verimle saflaştırıldığı belirtilmiştir (Cartwright and Waley, 1984).

İmmobilize enzimler reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabildikleri, çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklı oldukları, birçok kez ve uzun süre kullanıldıkları, sürekli işlemlere uygulanabildikleri, doğal enzime kıyasla daha kararlı oldukları ve endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlayıp üretim kaybını azalttıkları için tercih edilirler (Önal, 2000).

Bu çalışmada, domatesten kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi bölüm 2.7' de belirtildiği şekilde glutaraldehid ile aktive edilerek ABFA ile

türevlendirilen kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda immobilize edildi. Uygun optimum immobilizasyon koşullarının belirlenebilmesi için sırasıyla glutaraldehit konsantrasyonu, AFBA miktarı, enzim miktarı, çalışma ortamının pH'ı ve iyon şiddetinin  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonuna etkisi incelendi. Immobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra serbest ve immobilize enzimin genel biyokimyasal karakteristik özellikleri belirlendi.

### 3.2.1 Glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi

Biyolojik olarak aktif moleküllerin taşıyıcıya bağlanmasında ilk adım kimyasal olarak inert taşıyıcının aktivasyonudur. İkinci adım ise aktive edilen taşıyıcıya ligandın bağlanmasıdır.  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda immobilize edilmesi için ilk önce taşıyıcıların amino gruplarının glutaraldehid ile aktive edilmesi gerekmektedir. Bunun için her iki taşıyıcının sabit miktarlarına (1g) farklı konsantrasyonlarda glutaraldehid çözeltisi eklendi. Kitosan için % 0,25-3,0 (v/v), Sepabead EC-EA için ise % 0,1-2.0 (v/v)'lik glutaraldehid konsantrasyon aralığı kullanılarak aktivasyon yapıldı. Aktivasyonun ardından her iki taşıyıcıya sabit miktarda AFBA (200 mg) eklendi ve AFBA glutaraldehid vasıtasıyla amino grubu üzerinden taşıyıcıya kovalent olarak bağlandı. Yine her iki taşıyıcıya 2,072 mg protein çözeltisi eklenerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Çizelge 3.1 ve 3.2' de sırasıyla kitosan ve Sepabead EC-EA' da  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonunun sonuçları verilmiştir. Çizelgelerden görüldüğü gibi uygun % glutaraldehid konsantrasyonu kitosan için % 1,5 (v/v) ve Sepabead EC-EA için % 1,25 (v/v) olarak belirlendi.

**Çizelge 3.1** Glutaraldehit (GA) konsantrasyonunun kitosanda  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

<b>Glutaraldehit Konsantrasyonu (%)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivitesi (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
<b>0,25</b>	35,4	31,7	0,109	0,166	54,5	17,2
<b>0,5</b>	47,5	35,0	0,184	0,169	55,4	29,1
<b>1,0</b>	72,2	54,1	0,192	0,171	57,0	30,4
<b>1,25</b>	73,4	52,5	0,248	0,227	75,7	39,2
<b>1,5</b>	77,2	51,4	0,272	0,255	83,6	43,0
<b>1,75</b>	77,2	50,7	0,232	0,218	72,7	36,7
<b>2,0</b>	78,0	50,6	0,224	0,213	71,2	35,4
<b>3,0</b>	78,2	50,3	0,198	0,190	62,3	31,3

\*Kitosan: 1000 mg, AFBA: 200 mg, Protein miktarı: 2.072 mg, Enzim aktivitesi: 0.632 U

% X Glutaraldehit, Tampon: 25 mM (pH=6.0) sitrat.

**Çizelge 3.2** Glutaraldehit konsantrasyonunun Sepabead EC-EA' da  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

Glutaraldehit Konsantrasyonu (%)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Protein (%)	İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivitesi (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)
0,1	89,5	18,2	0,056	0,149	31,1	5,6
0,25	90,3	20,1	0,075	0,180	37,6	7,4
0,5	90,3	20,5	0,077	0,182	38,0	7,7
1,0	91,1	24,7	0,095	0,186	38,3	9,6
1,25	91,9	30,9	0,120	0,188	39,2	12,1
1,5	90,6	24,8	0,096	0,168	35,1	9,6
1,75	90,3	24,1	0,065	0,129	27,0	6,6
2,0	90,0	22,2	0,058	0,127	26,5	5,8

\* Sepabead EC-EA: 1000 mg, AFBA: 50 mg, Protein miktarı: 2.072mg, Enzim aktivitesi: 0.992 U, % X Glutaraldehit, Tampon: 25 mM Sitrata(pH=6.0).

### 3.2.2 Aminofenil boronik asit miktarının belirlenmesi

Aktivasyon düzeyi ile bağlanan ligant miktarı doğru orantılı olarak değişmeyebilir. O nedenle taşıyıcı için uygun aktivasyon düzeyi ve uygun ligant miktarı belirlenmelidir. Bunun için iki taşıyıcısında sabit miktarları (1 g), kitosan için % 1,5 (v/v), Sepabead EC-EA için % 1,25 (v/v) konsantrasyonunda glutaraldehid çözeltisi ile aktive edildi. Aktivasyonun ardından kitosan taşıyıcıya 25 mg-350 mg ve Sepabead EC-EA taşıyıcıya ise 2 mg-100 mg arasında değişen miktarlarda AFBA uygulandı. Her iki taşıyıcıya 2,072 mg protein çözeltisi eklenerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Kitosan ve Sepabead EC-EA için uygun AFBA miktarı sırasıyla 200 mg ve 10 mg olarak belirlendi (Çizelge 3.3 ve 3.4).

**Çizelge 3.3** AFBA miktarının kitosanda  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

<b>AFBA Miktarı (mg)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivitesi (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
25	65,1	36,7	0,120	0,157	51,8	19,9
50	71,8	44,4	0,168	0,182	59,9	27,2
100	80,1	46,7	0,176	0,184	60,6	27,9
150	83,7	44,8	0,208	0,188	61,6	33,6
175	85,4	53,3	0,214	0,193	63,6	32,4
200	86,8	52,5	0,272	0,250	82,0	36,1
250	95,8	54,8	0,233	0,206	67,5	37,0
300	95,9	45,2	0,227	0,207	68,1	36,1
350	96,0	47,9	0,208	0,209	68,8	34,1

\* Kitosan: 1000 mg, Protein miktarı: 2.072 mg, Enzim aktivitesi: 0.632 U, % 1.5 (v/v) Glutaraldehit, X mg AFBA, Tampon: 25 mM sitrat (pH 6.0).

**Çizelge 3.4** AFBA miktarının Sepabead EC-EA'da  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

AFBA Miktarı (mg)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Protein (%)	İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivitesi (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)
5	91,5	30,6	0,119	0,188	39,3	11,9
10	91,9	30,9	0,120	0,189	38,5	12,1
20	91,9	33,4	0,128	0,184	38,7	13,0
25	94,4	34,4	0,127	0,178	37,2	12,8
50	94,7	46,3	0,120	0,125	26,1	12,1
100	94,9	46,4	0,117	0,121	25,2	11,8

\* Sepabead EC-EA: 1000 mg, Protein miktarı: 2.072 mg, Enzim aktivitesi: 0.992 U, % 1.25 (v/v) Glutaraldehit, X mg AFBA, Tampon: 25 mM Sitrat (pH 6.0).

### 3.2.3 Protein Miktarının Belirlenmesi

Kitosan ve Sepabead EC-EA uygun glutaraldehit konsantrasyonu ve AFBA miktarları ile türevlendirildikten sonra AFBA bağlanmayan aktif uçlar glisin ile bloke edildi. Ardından AFBA üzerinden enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Protein miktarının enzimin immobilizasyonuna etkisini incelemek için kitosan taşıyıcıda 0,52- 4,14 mg ve Sepabead EC-EA taşıyıcıda 0,52- 2,072 mg protein immobilize edildi. % 1,5 (v/v) glutaraldehit ile aktive edilerek 200 mg AFBA ile türevlendirilen kitosanda maksimum spesifik aktivite verimi (% 86,53) 2,072 mg protein miktarı ile elde edilirken, % 1,25 (v/v) glutaraldehid ile aktive edilerek 10 mg AFBA ile türevlendirilen Sepabead EC-EA' da en yüksek spesifik aktivite verimi (% 52) 1,036 mg protein miktarı ile elde edildi (Çizelge 3.5 ve 3.6).

**Çizelge 3.5** Protein miktarının kitosanda  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonun etkisi.\*

<b>Protein Miktarı (mg)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivitesi (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
<b>0,52</b>	83,5	100	0,037	0,074	28,5	27,6
<b>1,04</b>	85,8	54,7	0,096	0,170	64,5	35,3
<b>1,55</b>	86,3	45,9	0,150	0,211	80,2	36,9
<b>2,07</b>	88,6	44,8	0,211	0,227	86,5	38,8
<b>3,11</b>	87,2	38,9	0,222	0,184	70,0	27,2
<b>4,14</b>	87,3	36,7	0,222	0,146	55,4	20,4

\* Kitosan: 1000 mg, AFBA: 200 mg, Enzim: 0,305 U/mg, % 1.5 (v/v) Glutaraldehit, Tampon: 25 mM sitrat (pH 6.0).



**Çizelge 3.6** Protein miktarının Sepabead EC-EA' da  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

<b>Protein Miktarı (mg)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivitesi (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
<b>0,52</b>	90,3	47,5	0,043	0,174	36,3	9,0
<b>0,78</b>	92,5	46,0	0,065	0,182	38,0	13,6
<b>1,04</b>	92,4	31,2	0,090	0,250	52,0	18,8
<b>1,30</b>	91,6	31,4	0,100	0,246	51,4	20,9
<b>1,55</b>	90,7	31,7	0,101	0,207	43,2	21,1
<b>2,07</b>	90,2	30,8	0,122	0,190	39,2	25,5

\*Sepabead EC-EA: 1000 mg, Enzim: 0,479 U/mg, AFBA: 10 mg, Enzim: 0,479 U/mg, % 1,25 (v/v) Glutaraldehit, Tampon: 25 mM sitrat (pH 6.0).

### 3.2.4 İmmobilizasyon ortamının pH'ının ve iyon şiddetinin belirlenmesi

İmmobilizasyon işlemine ortam pH' ısı ve iyon şiddetinin etkisinin incelenmesi amacıyla her iki taşıyıcı optimize edilen koşullarda hazırlandıktan sonra 25 mM sitrat tamponunda farklı pH' larda enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi.  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için en uygun pH kitosan taşıyıcı için pH 6.0 (Çizelge 3.7) ve Sepabead EC-EA için pH 5.0 (Çizelge 3.8) olarak belirlendi. Bu optimum pH değerlerinde farklı iyon şiddetindeki tamponlarla yapılan immobilizasyon sonrasında her iki taşıyıcı için 25 mM tampon konsantrasyonunun uygun olduğuna karar verildi (Çizelge 3.9 ve 3.10).

**Çizelge 3.7** İmmobilizasyon ortamının pH' sının kitosanda  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

pH	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Protein (%)	İmmobilize Enzimin Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivitesi (U/mg)	Spesifik Aktivite Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)
4,5	66,1	39,1	0,193	0,238	78,0	30,5
5,0	69,4	41,4	0,236	0,275	90,2	37,3
5,5	71,4	49,2	0,292	0,289	94,8	46,2
6,0	88,5	59,5	0,361	0,293	96,0	57,1
6,5	76,0	59,5	0,332	0,261	85,6	52,5
7,0	72,2	62,1	0,269	0,209	68,5	42,6

\*Kitosan: 1000 mg, AFBA: 200 mg, Protein miktarı: 2.072mg, Enzim aktivitesi: 0.632 U, % 1.5 (v/v) Glutaraldehit, Tampon: 25 mM Sitrat (pH 6.0).

**Çizelge 3.8** İmmobilizasyon ortamının pH' ının Sepabead EC-EA'da  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.\*

<b>pH</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
<b>4,5</b>	59,7	27,4	0,096	0,338	70,7	19,4
<b>5,0</b>	67,9	28,7	0,110	0,339	71,0	22,3
<b>5,5</b>	70,2	29,1	0,103	0,341	71,5	20,7
<b>6,0</b>	86,6	30,4	0,082	0,260	54,4	16,4
<b>6,5</b>	89,3	31,3	0,073	0,224	46,9	14,8
<b>7,0</b>	92,7	57,4	0,066	0,111	23,3	13,3

\*Sepabead EC-EA: 1000 mg, AFBA:10 mg, Protein miktarı: 1.036 mg, Enzim aktivitesi: 0.496 U, % 1.25 (v/v) Glutaraldehit, Tampon: 25 mM Sitrat (pH 6.0).

**Çizelge 3.9** İmmobilizasyon ortamının iyon şiddetinin kitosanda  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.

<b>İyon Şiddeti (mM)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
<b>5</b>	96,6	31,5	0,222	0,258	54,0	35,1
<b>10</b>	90,1	44,0	0,228	0,25	52,3	36,1
<b>25</b>	88,5	59,5	0,361	0,293	96,1	57,1
<b>50</b>	75,8	42,8	0,244	0,275	57,6	38,6

\*Kitosan: 1000 mg, AFBA: 200 mg, Protein miktarı: 2.072 mg, Enzim aktivitesi: 0.632 U, % 1.5 (v/v) Glutaraldehit, Tampon: X mM Sitrat (pH:6.0).

**Çizelge 3.10** İmmobilizasyon ortamının iyon şiddetinin Sepabead EC-EA'da  $\alpha$ -galaktozidaz immobilizasyonuna etkisi.

<b>İyon Şiddeti (mM)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>	<b>Bağlı Protein (%)</b>	<b>İmmobilize Enzimin Aktivitesi (U)</b>	<b>Spesifik Aktivitesi (U/mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite Verimi (%)</b>	<b>Aktivite Verimi (%)</b>
<b>5</b>	89,1	35,0	0,060	0,167	35,0	12,1
<b>10</b>	89,6	34,1	0,083	0,235	49,3	16,8
<b>20</b>	79,0	30,2	0,102	0,324	67,9	20,5
<b>25</b>	67,9	28,7	0,110	0,339	71,0	22,3
<b>50</b>	58,1	28,7	0,090	0,304	63,5	18,2

\*Sepabead EC-EA: 1000 mg, AFBA:10 mg, Protein miktarı: 1.036 mg,

Enzim aktivitesi:0.496 U, % 1.25 Glutaraldehit, Tampon: X mM Sitrat (pH:5.0)

**Çizelge 3.11** Kitosan ve Sepabead EC-EA' da  $\alpha$ -galaktozidazın büyük ölçekte immobilizasyonu.\*

Taşıyıcı	Serbest Enzim			İmmobilize Enzim					
	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Bağlı Protein (%)	Bağlı Aktivite (%)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite Verimi (%)	Spesifik Aktivite Verimi (%)
<b>Kitosan</b>	0,632	2,072	0,305	45,8	82,2	0,259	0,273	41,1	89,5
<b>Sepabead EC-EA</b>	0,496	1,036	0,479	33,1	71,3	0,119	0,220	23,9	71,6

\*Tablodaki değerler 1 g taşıyıcı içindir.

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarında biyoafinite temelli immobilizasyonu için optimizasyon koşulları belirlendikten sonra karakterizasyon işlemleri için büyük ölçekli immobilizasyon gerçekleştirildi. Büyük ölçekli immobilizasyon sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.11’de verilmiştir. Kurulan bu setler ile hazırlanan immobilize enzimler glutaraldehid ile çapraz bağlandıktan sonra kitosan ve Sepabead EC-EA’da kovalent ve çapraz bağlı immobilize enzimler için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

### **3.2.5 İmmobilize edilen enzimin çapraz bağlanması için gerekli glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi**

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi doğal bir taşıyıcı olan kitosanda optimize edilen koşullarda (% 1,5 glutaraldehit (v/v), 200 mg AFBA, 2,072 mg protein, 25 mM pH 6.0 sitrat tamponu ve 1 g kitosan) % 59,5 protein bağlanma ve % 89,5 spesifik aktivite verimi ile immobilize edilmiştir.  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ayrıca sentetik bir taşıyıcı olan Sepabead EC-EA’ da optimize edilen koşullar altında (% 1,25 glutaraldehit (v/v), 10 mg AFBA, 1,036 mg protein, 25 mM pH 5.0 sitrat tamponu ve 1 g Sepabead EC-EA) % 33,1 protein bağlanma ve % 71,6 spesifik aktivite verimi ile immobilize edildi (Çizelge 3.11). Ardından immobilize enzimler farklı konsantrasyonlardaki glutaraldehit çözeltileri kullanılarak çapraz bağlandı. Kitosanda immobilize edilen enzimler için % 0,25- %3,0 (v/v) aralığında Sepabead EC-EA’da immobilize edilen enzimler için %0,001-1,5 (v/v) konsantrasyon aralığında glutaraldehit çözeltisi kullanıldı. En yüksek aktivite verimi kitosanda immobilize enzim için % 1,5 (v/v) glutaraldehit konsantrasyonunda % 76 (Çizelge 3.12) ve Sepabead EC-EA’ da immobilize enzim için % 0,005 (v/v) konsantrasyonunda % 70 olarak belirlendi (Çizelge 3.13).

**Çizelge 3.12** Kitosanda kovalent bağılı  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin çapraz bağlanması.\*

<b>Glutaraldehit Konsantrasyonu (%)</b>	<b>Bağıl Aktivite (%)</b>
0,25	44,4
0,5	59,0
0,75	65,6
1	64,0
1,25	64,3
1,5	76,0
1,75	43,2
2	42,3
3	43,4

\*Kitosan: 1000 mg, AFBA: 200 mg, Protein miktarı: 2.072 mg, Enzim aktivitesi: 0.632 U, % 1.5 (v/v) Glutaraldehit, Tampon: 25 mM sitrat tamponu (pH 6.0) koşullarında immobilize edilen enzimin aktivitesi (0,259 U) % 100 olarak kabul edilmiştir.

**Çizelge 3.13** Sepabead EC-EA' da kovalent bağlı  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin çapraz bağlanması.\*

Glutaraldehit Konsantrasyonu (%)	Bağlı Aktivite (%)
0,001	61,18
0,005	70,0
0,0075	63,42
0,010	56,78
0,050	54,13
0,10	50,03
1,0	43,17
1,25	39,13
1,5	38,11

\*Sepabead EC-EA: 1000 mg, AFBA: 10 mg, Protein miktarı: 1.036 mg, Enzim aktivitesi: 0.496 U, % 1.25 (v/v) Glutaraldehit, 25 mM sitrat tamponu (pH 5.0) koşullarında immobilize edilen enzimin aktivitesi (0.119) % 100 olarak kabul edilmiştir.

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi çok çeşitli immobilizasyon yöntemleri (tutuklama, kovalent bağlama, çapraz bağlama gibi) kullanılarak kitosan ve Sepabead taşıyıcılarda immobilize edilmiştir. Singh ve Kayastha (2012)  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimini kitosan ve Amberlite MB- 150' de kovalent olarak sırasıyla % 62 ve % 51 aktivite verimi ile immobilize etmiş ve immobilize enzimlerin karakterizasyonu gerçekleştirerek soya sütünde rafinoz tip oligosakkaritlerin hidrolizinde kullanılabilirliklerini araştırmışlardır. *Pycnopus cinnabarinus* kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi de kitosan kürelerde tutuklama ile immobilize edilmiş ve melastaki rafinoz tip şekerlerin hidrolizinde kullanılmıştır (Ohtakara and Mitsutomi, 1987). Filho ve arkadaşları (2008),  $\alpha$ -galaktozidaz enzimini Sepabead EC-EP ve Sepabead EC-HA' da kovalent olarak immobilize etmiş ve kararlılık çalışmaları yapmışlardır. Sepabead EC-EA ve EC-HA' nın taşıyıcı



olarak kullanıldığı bir diğer immobilizasyon çalışmasında  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi iki farklı strateji (kovalent bağlama ve adsorpsiyon-çapraz bağlama) ile immobilize edilmiş ve hazırlanan immobilize enzimlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır (Bayraktar et al., 2011).

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

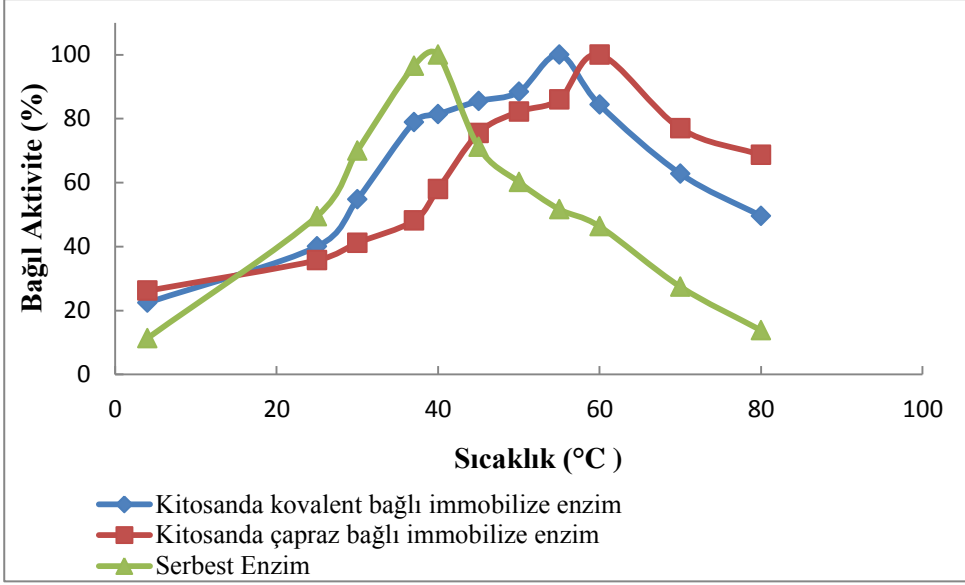
Serbest ve immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin karakterizasyonu bölüm 2.9 başlığı altındaki esaslara göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enzimin aktivitesine ve kararlılığına bazı parametrelerin etkisi incelendi.

#### **3.3.1 Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon**

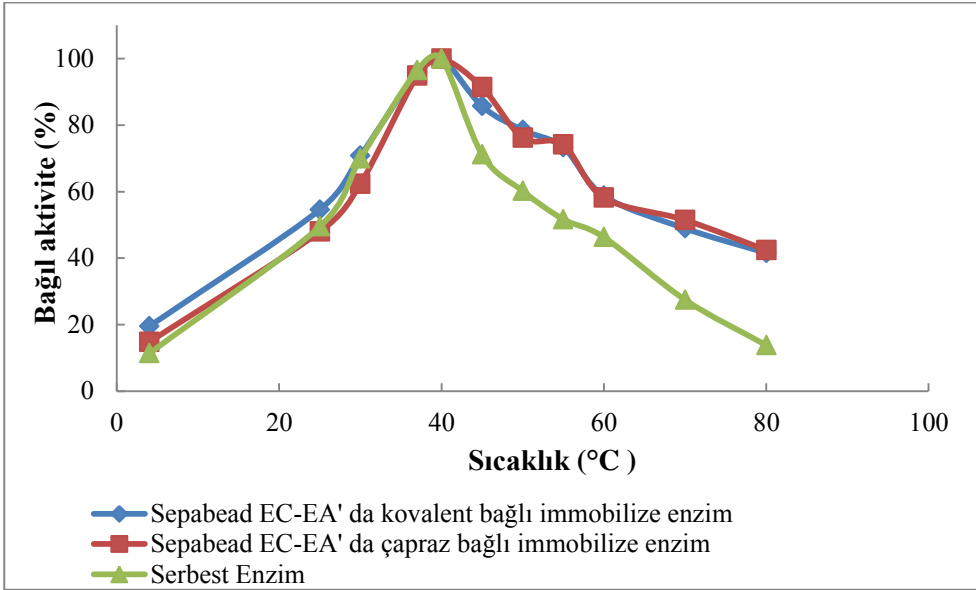
##### **3.3.1.1 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine sıcaklığın etkisi**

Enzimler protein yapıdaki büyük ve oldukça komplike moleküllerdir. Aktivitesinin korunması için üç boyutlu yapının korunması gerekir. Aktiviteye etki eden önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğrileri çizilerek izlenmektedir. Bağlı aktivitenin sıcaklıkla değişimini gösteren bu grafikten enzim için *optimum sıcaklık* değeri belirlenir (Telefoncu, 1997).

Sıcaklığın serbest ve immobilize enzimlere etkisi bölüm 2.9.1.1' de açıklandığı gibi aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim aktivitelerinin farklı sıcaklıklarda standart koşullarda ölçülmesiyle belirlenmiş ve bu ilişki Şekil 3.1' de verilmiştir.



**Şekil 3.1** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri (substrat: PNPG, inkübasyon süresi: 30 dakika).



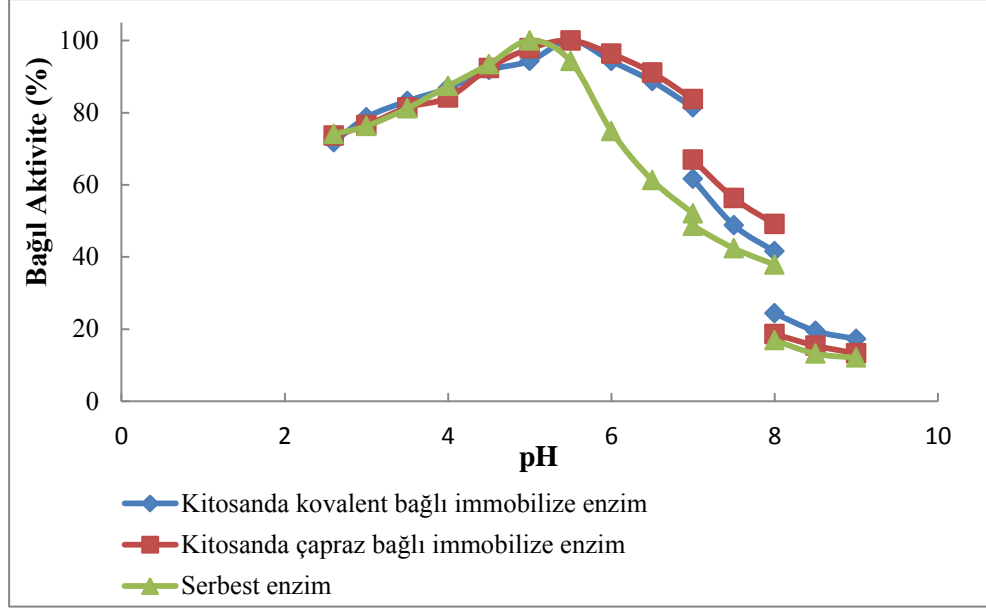
**Şekil 3.2** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri (substrat: PNPG, inkübasyon süresi: 30 dakika).

Optimum sıcaklık denemeleri serbest enzim, Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda kovalent olarak immobilize edilmiş enzim ve bunların çapraz bağlı örnekleri için yapılmıştır. Şekil 3.1' den görüldüğü gibi serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C, kitosan taşıyıcıda kovalent bağlı immobilize enzimin optimum sıcaklığı 55°C, Sepabead EC-EA' da kovalent bağlı immobilize enzimin optimum sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiştir. Kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcıda immobilize enzimlerin çapraz bağlı örneklerinde ise optimum sıcaklık sırasıyla 55°C ve 40°C olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Sepabead EC-EA' da immobilizasyon işleminin  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin optimum sıcaklığında etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Çeşitli taşıyıcılarda immobilize edilmiş glukoz izomeraz, lösin aminopeptidaz, kimotripsin, tripsin, asparaginaz ve proteaz gibi bazı enzimlerin optimum sıcaklıklarının immobilizasyon sonrasında değişmediği örneklerde mevcuttur (Chibata, 1978; Anwar et. al., 2009). Kitosanda kovalent ve çapraz bağlı örneğinde ise optimum sıcaklık değeri serbest enzime kıyasla yükselmiştir. 70°C' de serbest enzim başlangıç aktivitesinin sadece % 25' ini korurken, kitosanda kovalent bağlı immobilize enzim ve çapraz bağlı enzim hala başlangıç aktivitesinin %65 'inden fazlasını korumaktadır. İmmobilize enzimin serbest hareketindeki engelleme dolayısıyla sıcaklıktaki artıştan kaynaklanan kinetik enerji kazancı oldukça sınırlanır ve optimum sıcaklıkta artışla sonuçlanır (Singh and Kayastha, 2012). Genellikle bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazların optimum sıcaklıkları enzimin kaynağına ve inkübasyon süresine bağlı olarak 37-40 °C arasında değişmektedir. (Önal, 2000; Çalcı et al., 2010). Biyoteknolojik proseslerin genelinin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği düşünülürse,  $\alpha$ -galaktozidazların yüksek bir optimum sıcaklık değerine sahip olması önemli bir avantaj sağlayabilecektir.

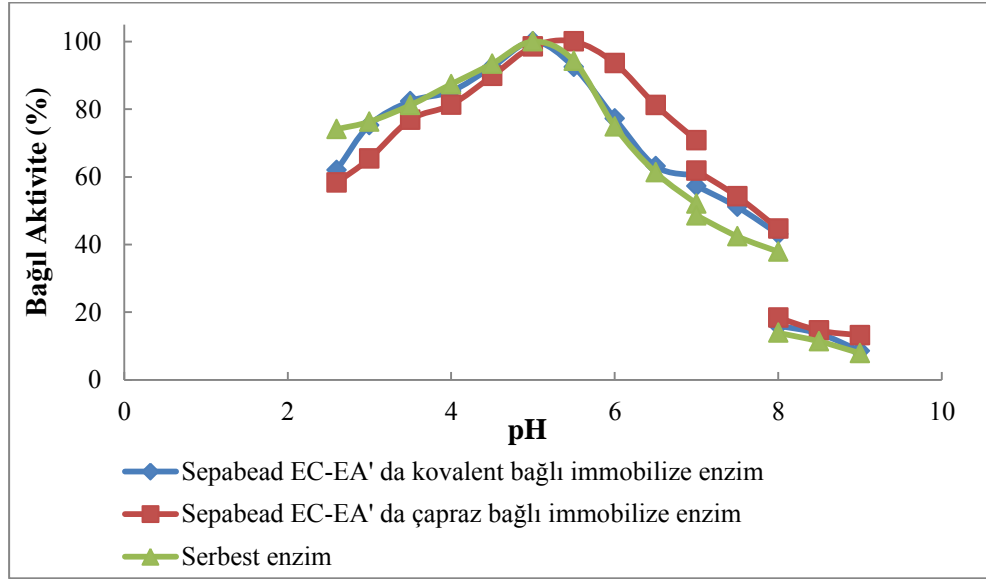
### **3.3.1.2 $\alpha$ -Galaktozidazın aktivitesine pH' ın etkisi**

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden en önemlisi pH etkisidir. Bir enzimin optimum pH' ı, reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve konsantrasyonu, kullanılan tampon türü ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağlıdır. Biyokimyasal reaksiyonlar *in vivo* koşullarda sulu ortamlarda gerçekleştiğinden pH enzimin yük durumunu dolayısıyla aktivitesini çok etkiler. Serbest ve immobilize  $\alpha$ -Galaktozidazın aktivitelerine pH' ın etkisi ve optimum pH bölüm 2.9.1.2' de açıklandığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.2' de verilmiştir.

Şekil 3.2' den görüldüğü gibi domates  $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH'ı serbest enzim ve Sepabead EC-EA taşıyıcıda kovalent bağlı immobilize enzim için pH 5 iken, Sepabead EC-EA taşıyıcının çapraz bağlı immobilize örneğinde optimum pH 5,5 olarak belirlenmiştir. Kitosanda kovalent bağlı immobilize enzimin ve çapraz bağlı örneğinin optimum pH'ı 5,5 olarak belirlenmiştir. Kitosanda immobilize edilen enzimlerin optimum pH'ları arasında gözlenen bu fark kovalent bağlama işleminin amino grupları üzerinden gerçekleşmesi sonucu enzimin pozitif yükünde ki azalmadan kaynaklanmaktadır. Sepabead EC-EA taşıyıcıda immobilize edilen enzimlerde ise taşıyıcıdaki yapısal farklanma nedeniyle pozitif yüklerdeki azalma kitosana göre optimum pH'ı etkileyecek düzeyde değildir.  $\alpha$ -Galaktozidazlar için enzim kaynağına bağlı olarak değişen farklı pH-aktivite profilleri mevcuttur. (Önal, 2000; Çalıcı et al., 2009). Bitkisel  $\alpha$ -Galaktozidazların optimum pH aralığı 3,5-6,5 arasında değişmektedir (bakınız Çizelge 1.4). Serbest enzim ve immobilize örnekler için elde edilen optimum pH değerlerinin bu aralıkta olması immobilizasyon işleminin optimum pH üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığını göstermektedir.



**Şekil 3.3** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum pH'ı (substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, tamponlar: 0,1 M, 2,6- 7,0 sitrat-fosfat; 7,0- 8,0 fosfat; 8,0- 9,0 Tris-HCl ).

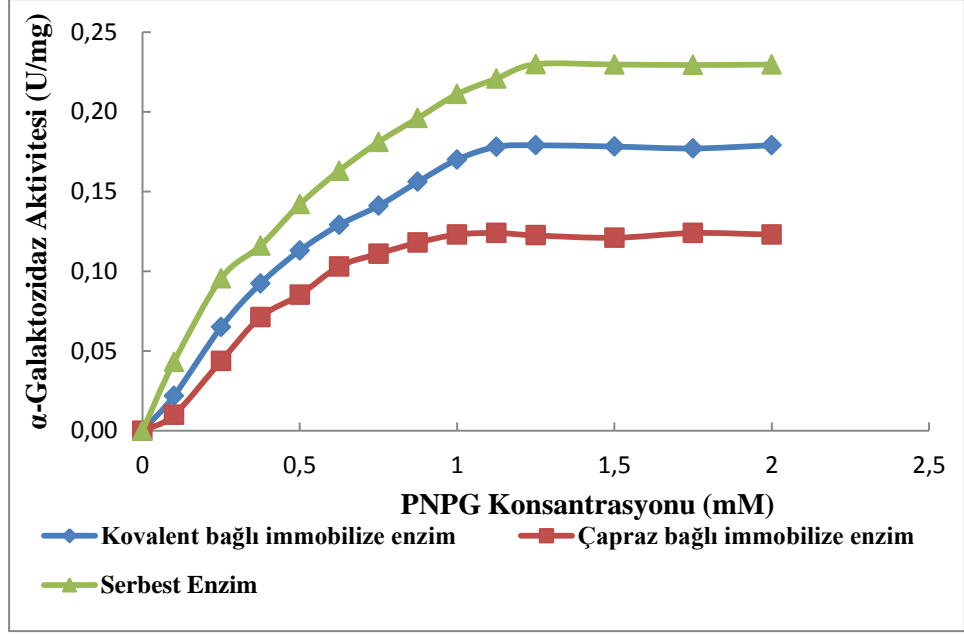


**Şekil 3.4** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin optimum pH'ı (substrat: PNPG, sıcaklık: 37°C, tamponlar: 0,1 M, 2,6- 7,0 sitrat-fosfat; 7,0- 8,0 fosfat; 8,0- 9,0 Tris-HCl ).

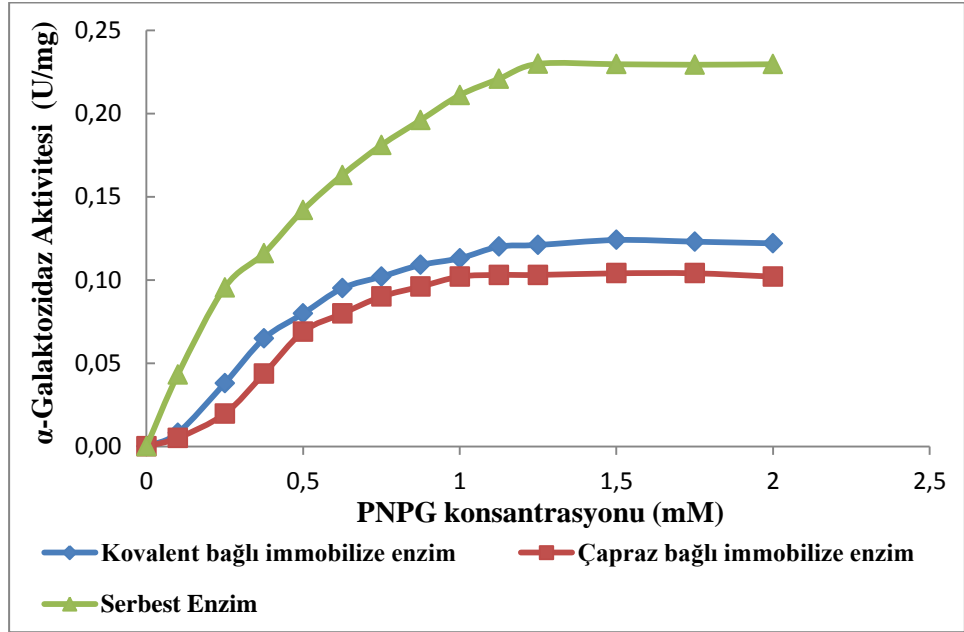
### 3.3.1.3 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi

İmmobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerinin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir çünkü immobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri immobilize enzimlerin serbest enzimden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olur. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri substrat olarak PNPG ve rafinoz kullanılarak bölüm 2.9.1.3' de açıklandığı gibi belirlenmiştir.

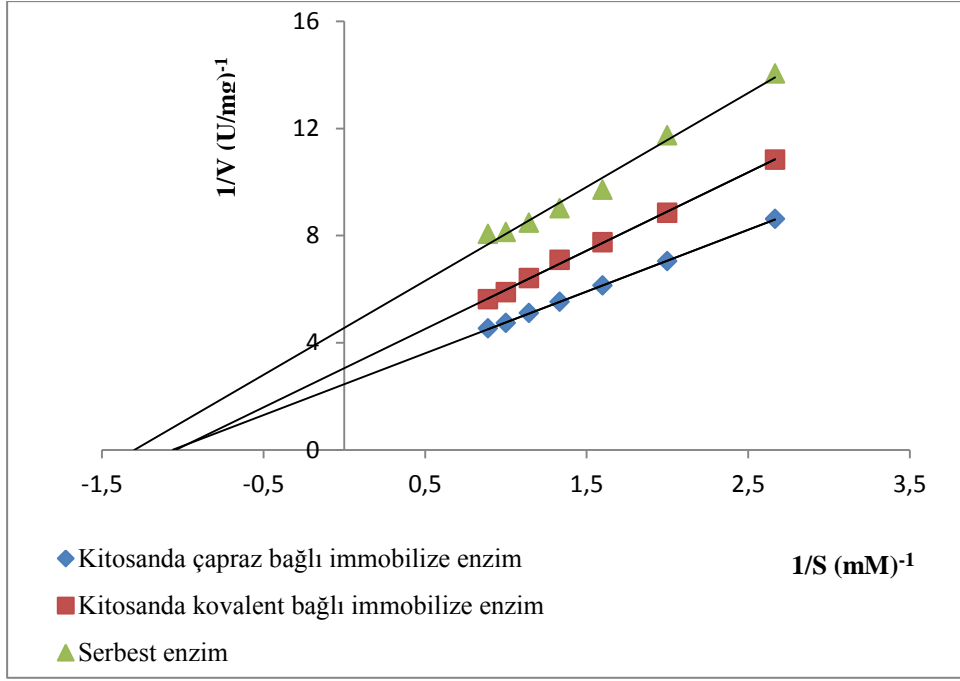
Doygunluk substrat (PNPG) konsantrasyonunu ve  $K_m$  ile  $V_{max}$  değerlerini belirleyebilmek için 0,5-2,0 mM PNPG konsantrasyon aralığı kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri standart koşullarda (37°C' de 30 dakika inkübasyon) ölçülmüştür. Şekil 3.3' ten de görüldüğü gibi doyumluk substrat konsantrasyonu serbest  $\alpha$ -galaktozidaz için 1,25 mM, kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda kovalent olarak immobilize edilen enzim ve çapraz bağlı örnekleri için 1,5 mM olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin üzerindeki konsantrasyonlarda aktivitede belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Şekil 3.4'te, çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından ( $1/S'$  ye karşılık  $1/v$ )  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla serbest enzim için 0,66 mM ve 0,19 U/mg; kitosan taşıyıcıda kovalent bağlı immobilize enzim için 0,96 mM ve 0,33 U/mg, çapraz bağlı örneği için 0,93 mM ve 0,41 U/mg olarak hesaplanmıştır. Sepabead EC-EA taşıyıcıda kovalent bağlı immobilize enzim için değerler sırasıyla 0,71 mM ve 0,18 U/mg, çapraz bağlı örneği için ise sırasıyla 0,89 mM ve 0,39 U/mg olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimlerin  $K_m$  değerlerindeki artışın nedeni, uygulanan immobilizasyon prosedüründe enzimin yapısal bir değişikliğe uğramasının doğal bir sonucu olabileceği ya da substratın immobilize enzimin aktif merkezine yaklaşmasının zor olduğu şeklinde açıklanabilir.



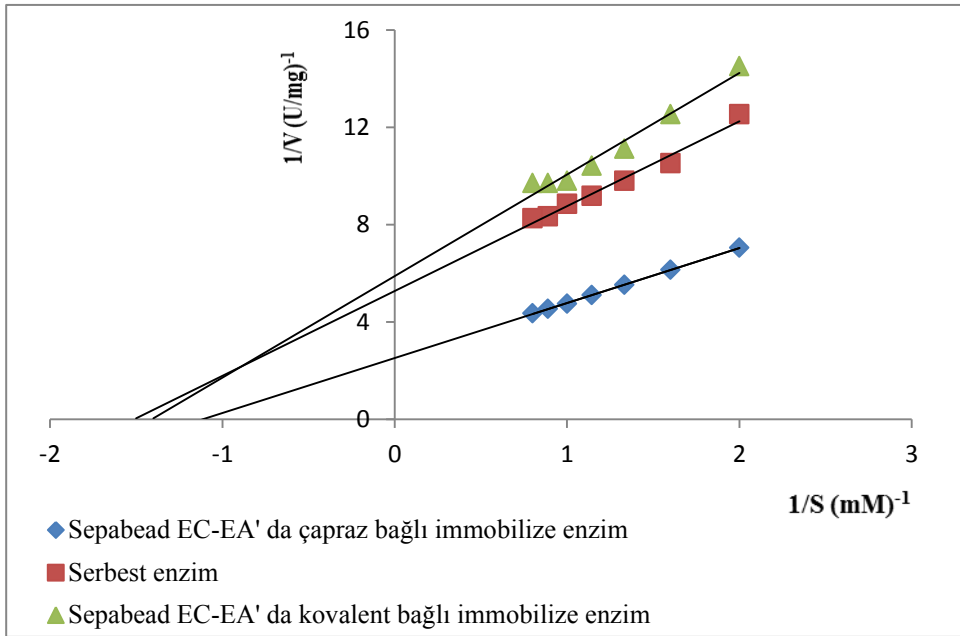
Şekil 3.5 PNPG konsantrasyonunun serbest enzim ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktosidaz enzimi aktivitesine etkisi.



Şekil 3.6 PNPG konsantrasyonunun serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktosidaz enzimi aktivitesine etkisi.



Şekil 3.7 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 37 °C , inkübasyon süresi: 30 dakika).



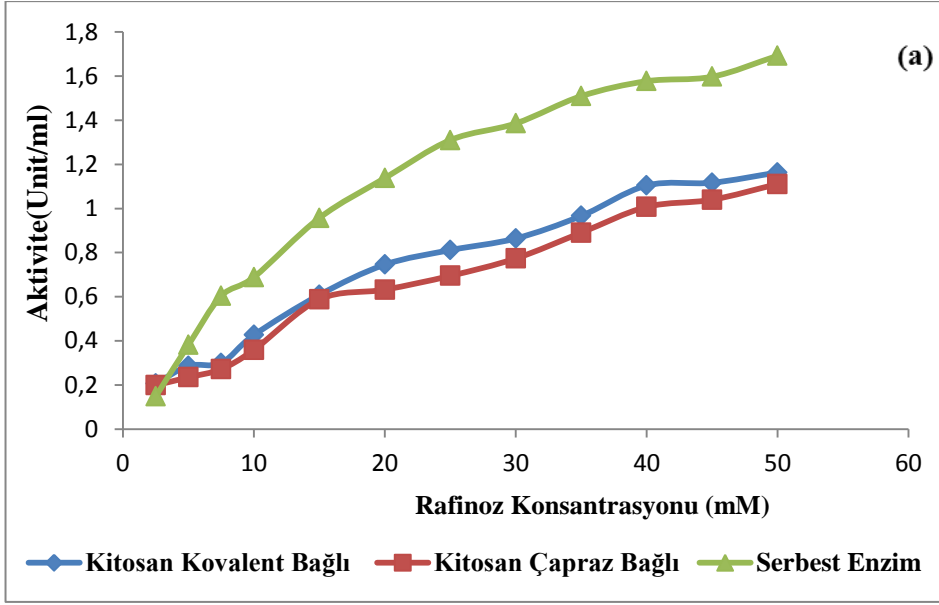
Şekil 3.8 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 37 °C , inkübasyon süresi: 30 dakika).



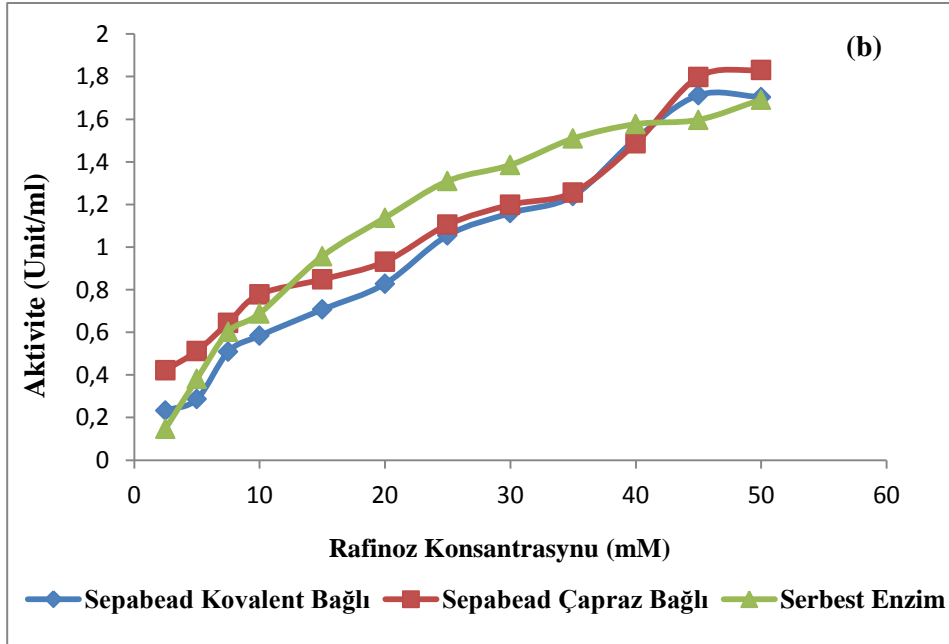
Doygunluk substrat (Rafinoz) konsantrasyonunu ve  $K_m$  ile  $V_{max}$  değerlerini belirleyebilmek için 2,5-50 mM rafinoz konsantrasyon aralığı kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri standart koşullarda (50°C’ de 60 dakika inkübasyon) ölçülmüştür. Şekil 3.5’ ten de görüldüğü gibi doygunluk substrat konsantrasyonu serbest  $\alpha$ -Galaktozidaz için 35 mM, kitosan ve Sepabead taşıyıcılarda immobilize edilen enzim ve çapraz bağlı örnekleri için 40 mM olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin üzerindeki konsantrasyonlarda aktivitede belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Çizilen Lineweaver-Burk diyagramlarından ( $1/S$ ’ ye karşılık  $1/v$ )  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla serbest enzim için 25,06 mM ve 2,547 U/mg; kitosan taşıyıcıda kovalent bağlı immobilize enzim için 58,82 mM ve 2,43 U/mg, çapraz bağlı örneği için 53,47 mM ve 2,55 U/mg; son olarak Sepabead taşıyıcıda immobilize enzim için değerler sırasıyla kovalent bağlı preparat için 29,76 mM ve 2,36 U/mg, çapraz bağlı örneği için ise sırasıyla 26,26 mM ve 3,08 U/mg olarak belirlenmiştir. Kitosan taşıyıcıda kovalent bağlı ve immobilize bağlı enzimlerin  $K_m$  immobilize değerleri serbest enzimin yaklaşık 2 katıdır. Bu değişim enzimin immobilizasyon sırasında yapısal bir değişime uğraması ya da substratın aktif merkeze yaklaşmasının zorlaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

**Çizelge 3.14** Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin PNPG ve rafinoz substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri.

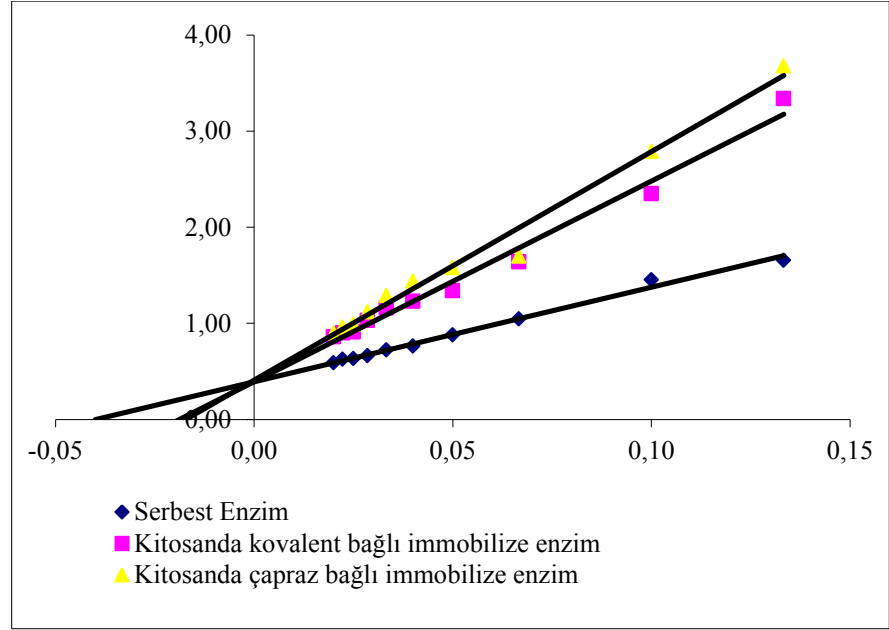
	PNPG		RAFİNOZ	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
<b>Serbest Enzim</b>	0,66	0,19	25,06	2,54
<b>Kitosanda kovalent bağlı immobilize enzim</b>	0,96	0,33	58,82	2,43
<b>Kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim</b>	0,93	0,41	53,47	2,55
<b>Sepabead EC-EA’ da kovalent bağlı immobilize enzim</b>	0,71	0,18	29,76	2,36
<b>Sepabead EC-EA’ da çapraz bağlı immobilize enzim</b>	0,89	0,39	26,26	3,08



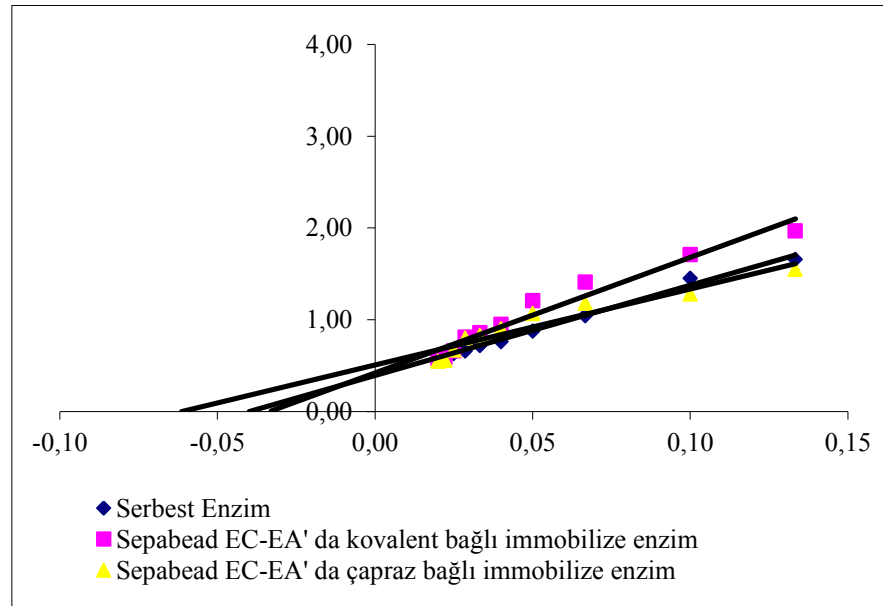
Şekil 3.9 Raffinöz konsantrasyonunun serbest enzim ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi aktivitelerine etkisi.



Şekil 3.10 Raffinöz konsantrasyonunun serbest enzim ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi aktivitelerine etkisi.



**Şekil 3.11** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50 °C, inkübasyon süresi: 60 dakika).



**Şekil 3.12** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramları (Substrat: Rafinoz, sıcaklık: 50 °C, inkübasyon süresi: 60 dakika).

### 3.3.1.4 Efektör türü ve konsantrasyonunun $\alpha$ -galaktozidaz enziminin aktivitesine etkisi

Bölüm 2.9.1.4' te açıklandığı şekilde bazı kimyasal maddeler ve şekerlerin serbest ve immobilize enzim preparatlarının aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Çizelge 3.14' den görüldüğü gibi 10 mM konsantrasyonundaki metallerin tümü serbest enzimi farklı oranlarda inaktive etmiştir. Bazı metaller immobilize enzimleri düşük oranda inhibe ederken bazıları aktive etmiştir. Metallerden  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  serbest enzimi yaklaşık % 44 oranında inhibe ederken, immobilize enzimleri % 10-15 oranında inhibe etmiştir. Soya tohumu, *Bacillus circulans* ve termofilik fungus *Humicola*' dan elde edilen serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin de metal iyonları tarafından inhibe edildiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Guimarães et.al., 2001; El-Shebawy et. al., 2007; Kotwal et. al., 1999). Çizelgeden de görüldüğü gibi kitosan ve Sepabead EC-EA taşıyıcılarda immobilize enzimin aktivitesi serbest enzimin aktivitesine kıyasla metal iyonlarının etkisine karşı daha dirençlidir.

**Çizelge 3.15** Çeşitli kimyasalların serbest enzim ve immobilize enzim aktivitesine etkisi

EFEKTÖR	BAĞIL AKTİVİTE (%)				
	KİTOSAN (Kovalent)	KİTOSAN (Çapraz)	SEPABEAD (Kovalent)	SEPABEAD (Çapraz )	SERBEST ENZİM
<b>Kontrol</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	107,5	90,7	97,5	104,3	93,5
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	100,9	92,7	103,2	99,1	89,5
<b>KCl</b>	107,8	94,7	97,3	102,9	94,4
<b>NaCl</b>	106,3	85,5	101,0	97,4	89,9
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	104,0	91,4	100,9	101,5	97,2
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	104,3	98,2	100,1	106,8	97,9
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	111,9	96,4	96,8	98,6	73,0
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	92,5	91,1	89,0	91,4	88,8
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	90,2	86,7	84,5	85,1	56,3

Çeşitli şekerlerin serbest ve immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi üzerine etkileri incelendiğinde, şekerlerin 10 mM'lık konsantrasyonlarının serbest enzimin aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 3.15). Galaktoz, sadece domatesten saflaştırılan  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi için değil, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerin çoğu içinde inhibitör etkisi göstermektedir (King et. al, 2002; Guimarães et.al., 2001). Soya tohumlarından elde edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin aktivitesine glukoz, galaktoz, sükroz ve melibioz şekerlerinin etkileri incelenmiştir ve tümünün inhibitör etkisi gösterdikleri belirtilmiştir (Guimarães et.al., 2001). Bir başka çalışmada, *Lactobacillus acidophilus*  $\alpha$ -galaktozidazının aktivitesine glukoz, galaktoz, laktoz, fruktoz ve sükroz şekerlerinin inhibe edici etkisi olduğu belirtilmiştir (Farzadi et. al, 2010). Serbest enzim için ve kitosanda kovalent bağlı immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için kullanılan şekerlerin tümü inhibitör etkisi göstermektedir. Sükroz, laktoz ve maltoz kitosan taşıyıcıda çapraz bağlı immobilize enzim ve Sepabead taşıyıcıda immobilize edilen enzimler için düşük bir aktivasyon etkisi göstermektedir.

**Çizelge 3.16** Çeşitli şekerlerin serbest enzim ve immobilize enzim aktivitesine etkisi.

EFEKTÖR TÜRÜ	BAĞIL AKTİVİTE (%)				
	KİTOSAN (Kovalent )	KİTOSAN (Çapraz )	SEPABEAD (Kovalent )	SEPABEAD (Çapraz )	SERBEST ENZİM
<b>Kontrol</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>Galaktoz</b>	88,7	91,3	87,0	89,0	78,2
<b>Glukoz</b>	95,1	93,1	106,6	101,0	83,2
<b>Sükroz</b>	96,1	101,2	113,1	101,9	83,8
<b>Fruktoz</b>	94,5	95,7	108,9	100,6	88,7
<b>Laktoz</b>	92,3	108,0	111,3	108,2	86,8
<b>Maltoz</b>	95,8	101,9	104,5	104,2	83,7
<b>Melibioz</b>	87,4	99,2	101,3	87,3	66,6
<b>Rafinoz</b>	97,1	96,9	99,8	88,3	74,7

### 3.3.2 Kararlılık Testleri

Enzim preparatlarının kararlılığı, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Enzimlerin genellikle immobilizasyon sonucunda kararlılığının arttığı gözlenmektedir. Özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacak immobilize enzimlerde, kararlılıktaki olumlu artış önemli bir avantajdır.

Bir enzimin kararlılığı; sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, substratın konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, inkübasyon zamanı, aktivatör ya da inhibitörlerin varlığı ve yokluğuna bağlı olarak değişim gösterir. Çünkü enzimler oldukça karmaşık yapıya sahiptir ve enzimin üç boyutlu yapısına etki edecek faktörler, enzimin aktivitesine de etki ederler. (Telefoncu, 1997). Serbest ve immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz preparatlarının kararlılıkları ile ilgili sonuçlar ilgili bölümlerde grafiklerle açıklanmıştır.

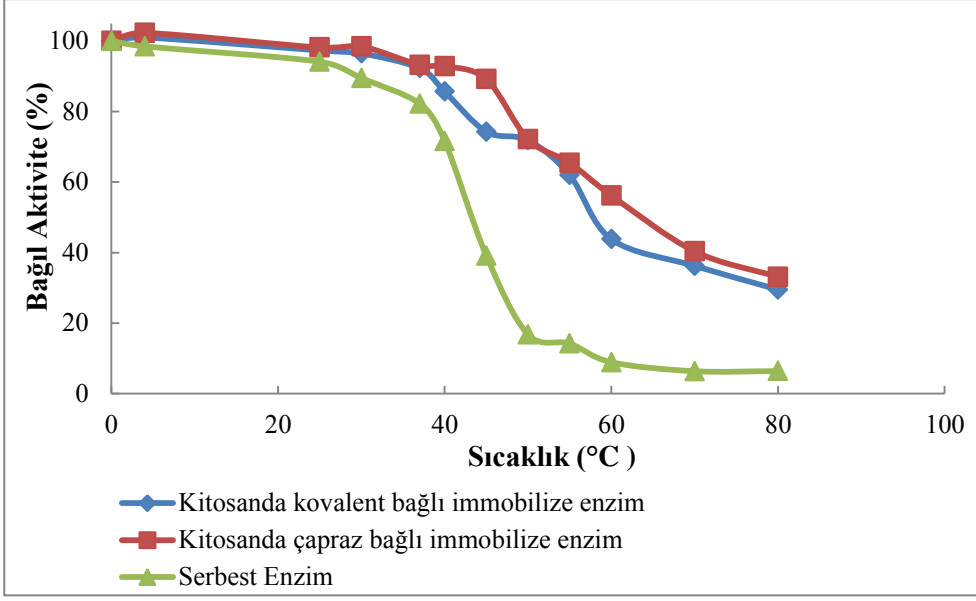
#### 3.3.2.1 Termal kararlılık

Enzimlerin kararlılığına etki eden parametrelerden en önemlisi sıcaklıktır. Özellikle endüstriyel uygulamalar için termal kararlılık dikkate alınmalıdır. Genellikle enzimler düşük sıcaklıklarda daha kararlı olurlarken yüksek sıcaklıklarda termal denaturasyon gerçekleşir. Bölüm 2.9.2.1’de açıklandığı gibi, hazırlanan serbest ve immobilize enzim preparatlarının termal kararlılıkları belirlenmiştir (Şekil 3.7). Bunun için aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzim preparatları farklı sıcaklıklarda (4-70°C) ön inkübasyona tabi tutulmuş sonra standart koşullarda aktiviteleri ölçülmüştür.

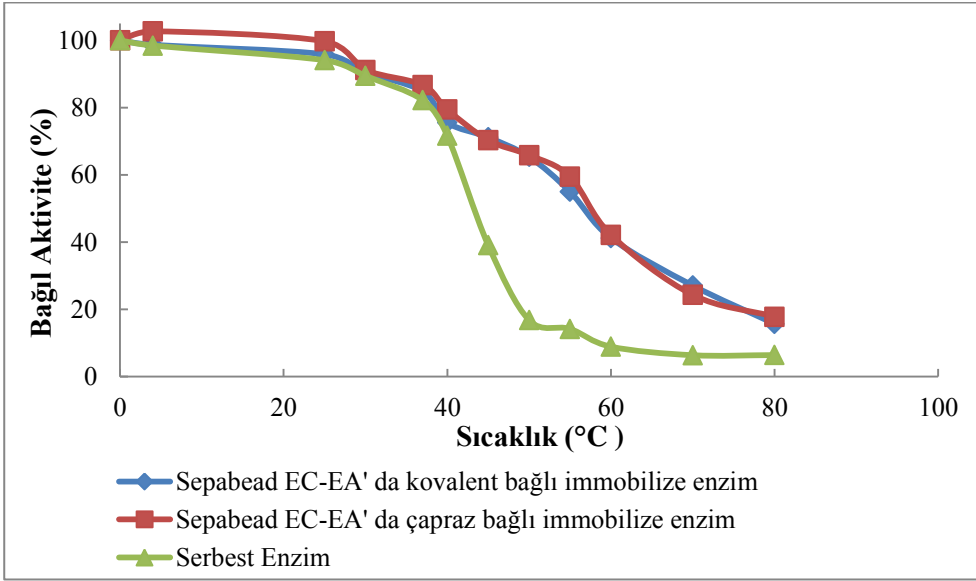
Şekil 3.7’den görüldüğü gibi her iki taşıyıcıda immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatlarının termal kararlılıkları serbest enzimin termal kararlılığına göre daha iyidir. Kitosanda immobilize edilen enzimler, Sepabead EC-EA’da immobilize enzimlere ve serbest enzime göre ısı işlemlere daha da dayanıklıdır. Kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim preparatı ısı karşısında en kararlı olan immobilize enzimdir. 70°C’de serbest enzim başlangıç aktivitesine göre % 18 aktivite gösterirken, kitosanda immobilize enzim % 36, kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim ise % 43 aktivite göstermektedir. Sepabead EC-EA taşıyıcıda immobilize enzim ve çapraz bağlı örneği ise 70°C’de sırasıyla % 27 ve % 31 oranında aktivitelerini korumaktadırlar. Genellikle enzim kaynağına,

inkübasyon zamanına, sıcaklığa ve ortama bağlı olarak  $\alpha$ -galaktozidazlar için farklı sıcaklık-aktivite ve sıcaklık-kararlılık profilleri elde edilmiştir (Anisha et al., 2008; Çalıcı et al., 2009; Kang and Lee, 2001). Serbest  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi 45°C' den itibaren aktivitesini hızla kaybetmeye başlamıştır. Ancak Sepabead EC-EA' da immobilizasyonla 55°C' de, kitosan taşıyıcıda immobilizasyonla 60°C' de enzim aktivitesinin % 50' sinden fazlasını korumaktadır.

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin ısı kararlılığı yani inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılığı 37 ve 50°C 'de belirlendi. Bunun için enzimler önce bu sıcaklıklarda farklı süreler (5, 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika) inkübe edilip ardından standart koşullarda geriye kalan aktiviteleri belirlendi. 37°C ve 50°C' deki ısı kararlılığı sonuçları sırasıyla Şekil 3.8 ve Şekil 3.9 'da verilmektedir. 37 °C 'de inkübe edilen enzimlerden 90 dakika sonunda aktivitesini en iyi koruyan kitosan taşıyıcıda kovalent olarak immobilize edilen ve çapraz bağlanan enzimdir. Süre sonunda enzim başlangıç aktivitesinin % 71 'ini korumaktadır. Serbest enzimin ise 90 dakika sonunda geri kalan aktivitesi % 55 olarak belirlenmiştir. 50 °C 'de, 90 dakikalık inkübasyon süresi sonunda serbest enzimin kalan aktivitesi % 14, Sepabead EC-EA' da immobilize enzim ve çapraz bağlı örneğinde kalan aktivite sırasıyla % 33 ve % 36 iken, kitosan taşıyıcıda immobilize enzim ve çapraz bağlı örneğinde 90 dakika sonra kalan aktivite sırasıyla % 53 ve % 59 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9). Artan sıcaklıkla örneklerin kararlılığında dolayısıyla aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma serbest enzimde immobilize enzim örneklerine kıyasla daha fazladır.

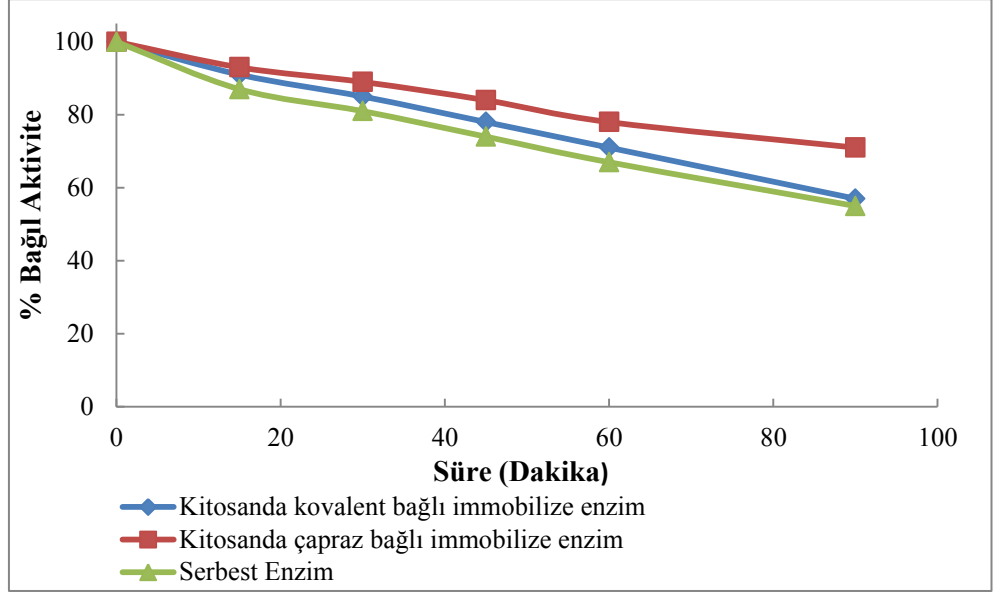


**Şekil 3.13** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık: 37 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika).

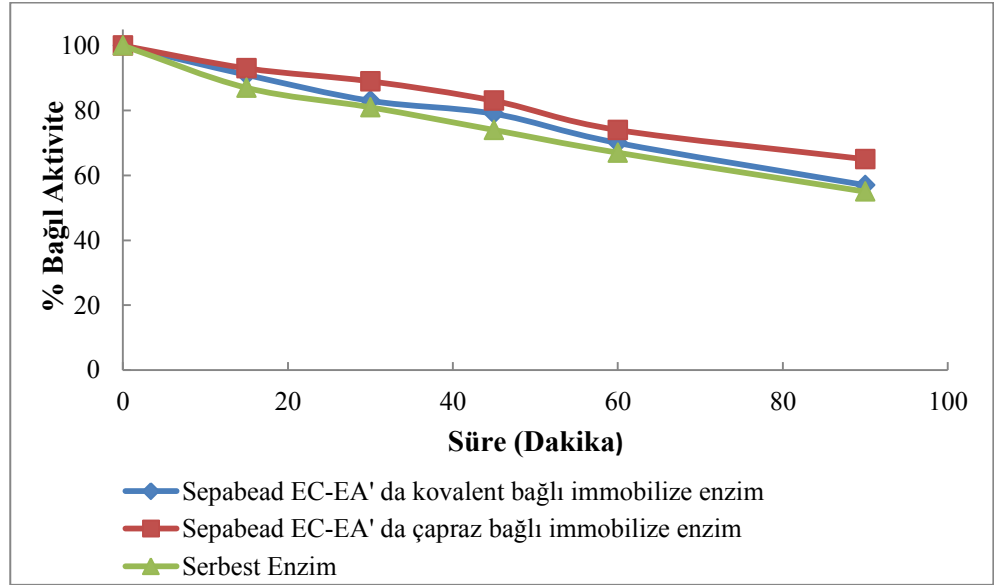


**Şekil 3.14** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık: 37 °C, İnkübasyon süresi: 30 dakika).

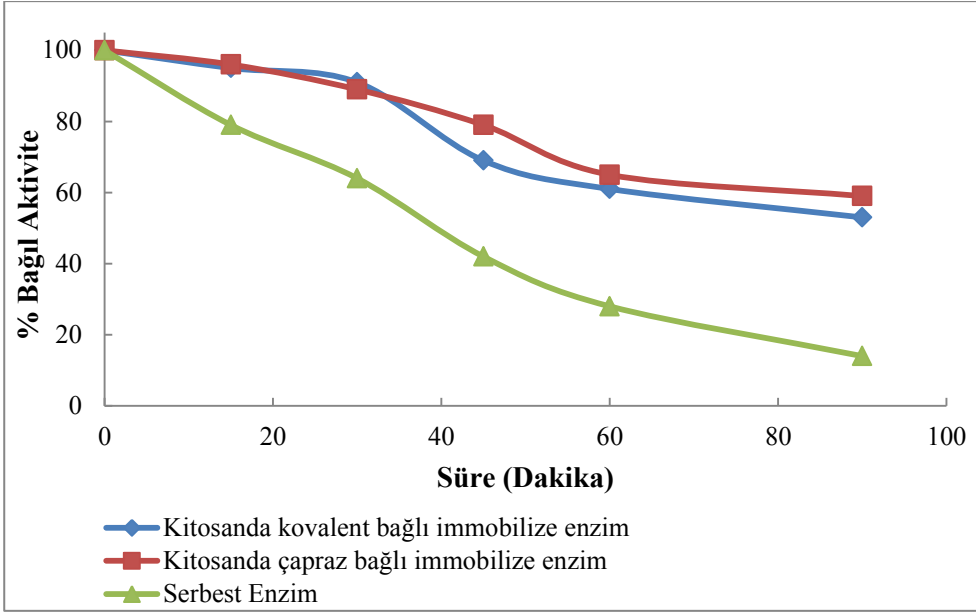




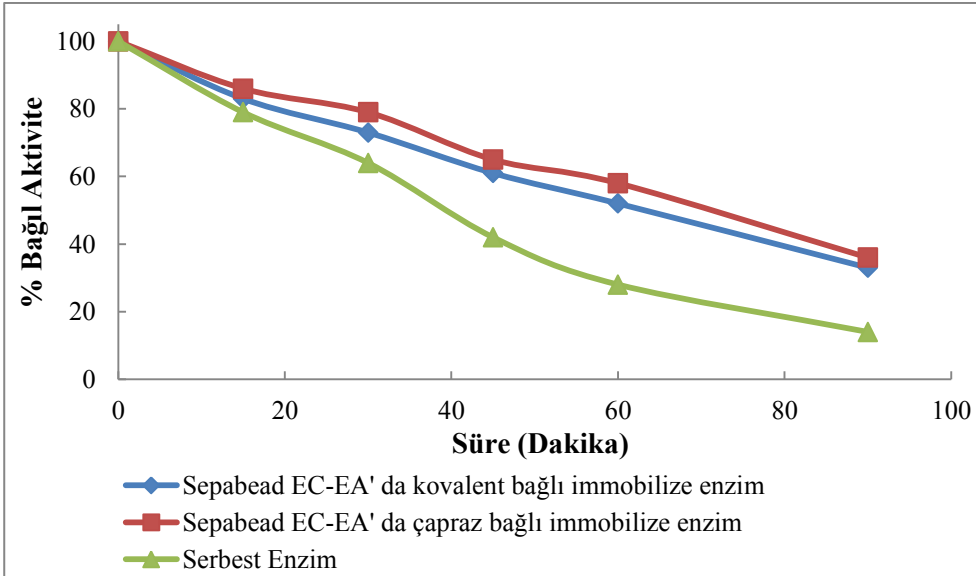
**Şekil 3.15** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık 37°C, inkübasyon süresi: 30 dakika).



**Şekil 3.16** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, Sıcaklık 37°C, inkübasyon süresi: 30 dakika).



**Şekil 3.17** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 50 °C; inkübasyon süresi: 30 dakika).

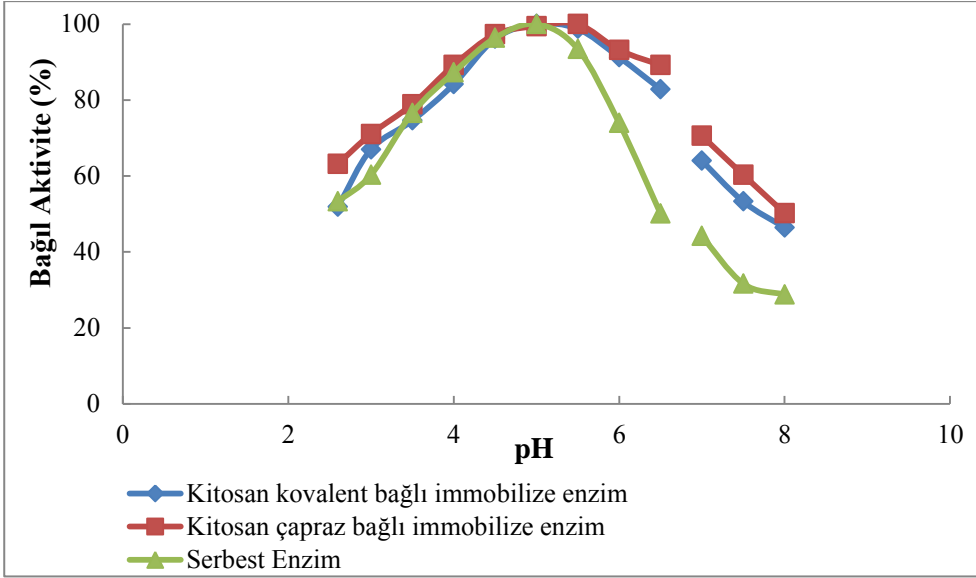


**Şekil 3.18** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları (Substrat: PNPG, sıcaklık: 50°C; inkübasyon süresi: 30 dakika).

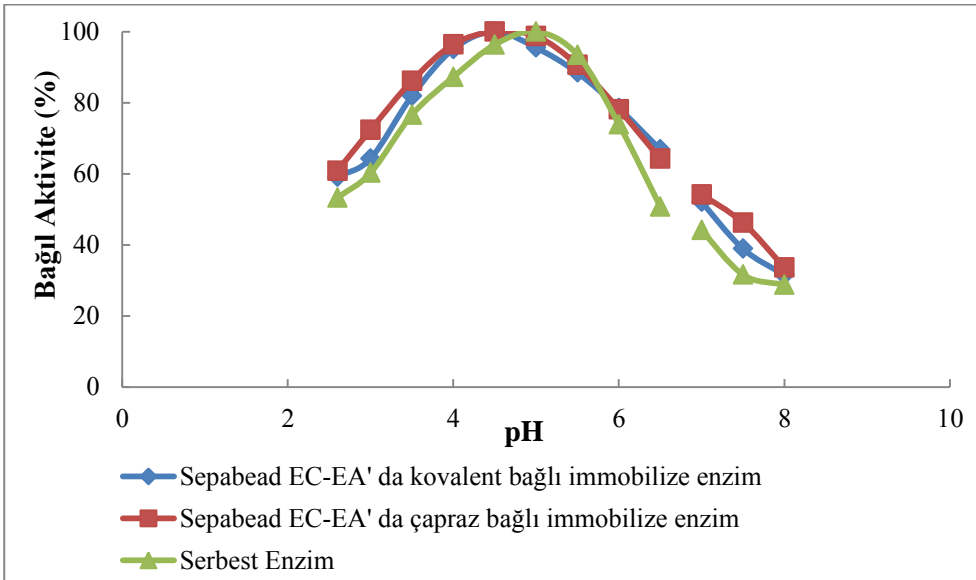
### 3.3.2.2 pH kararlılığı

Tüm enzimler protein yapıdadırlar. Bu nedenle kararlılıklarına etki eden her faktör proteinin sekonder, tersiyer ve/veya kuarter yapılarını etkileyecektir. Çoğu enzim aşırı asidik veya bazik koşullarda tersinmez danaturasyona uğrar. Bir enzimin pH kararlılığı inkübasyon süresi, tampon türü ve konsantrasyonu ve iyon şiddeti gibi birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz pH kararlılığı bölüm 2.9.2.2' de açıklandığı şekilde ölçülmüştür (Şekil 3.10)

Şekil 3.10' dan görüldüğü gibi hem kitosan hem Sepabead EC-EA' da kovalent bağlı immobilize edilen enzim ve çapraz bağlı preparatları, serbest enzime göre pH farklanmasından daha az etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda serbest enzimin pH 2,6' nın altında ve pH 7,0' nin üzerinde aktivitesinde hızlı düşüş olduğu gözlenmiştir. Sepabead taşıyıcıda immobilize edilen enzim preparatları pH 7,5'a kadar yüksek oranda kararlılığını korurken, kitosan taşıyıcıda immobilize enzim preparatları pH 8'e kadar kararlılığını korumaktadır. Bu sonuç özellikle immobilize enzimin endüstriyel uygulamaları için çok önemlidir.  $\alpha$ -Galaktozidazlar oldukça geniş bir pH aralığında kararlı kalabilen enzimlerdir. Benzer pH-kararlılık ve pH-aktivite sonuçları çeşitli  $\alpha$ -galaktozidazlar için rapor edilmiştir. (Önal, 2000; Çalıcı et al., 2010; Anisha et al., 2008; Guimaraes et al., 2001).



**Şekil 3.19** Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin pH kararlılıkları (Substrat: PNPG; sıcaklık: 37 °C, inkübasyon süresi: 30 dakika).

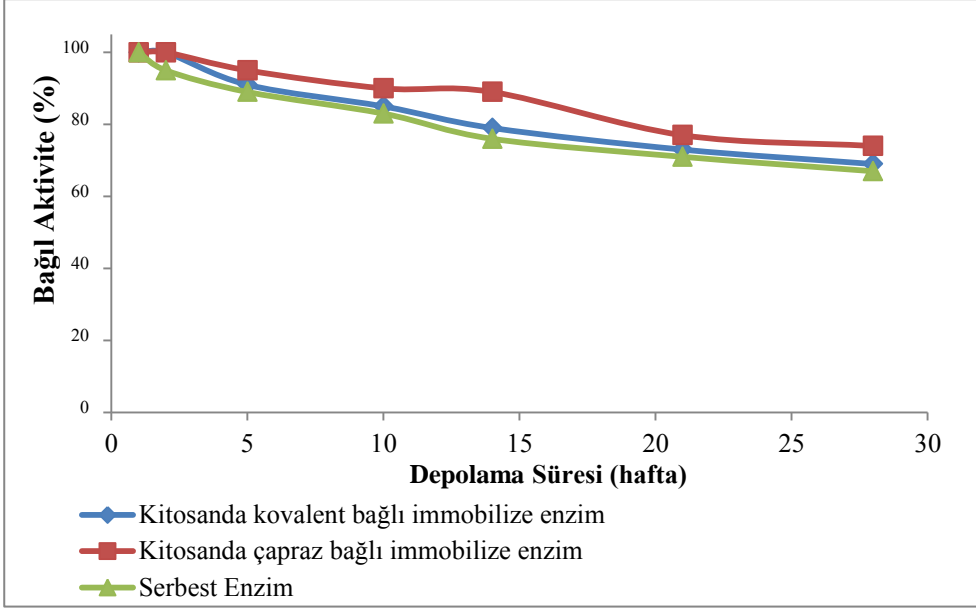


**Şekil 3.20** Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin pH kararlılıkları (Substrat: PNPG; sıcaklık: 37 °C, inkübasyon süresi: 30 dakika).

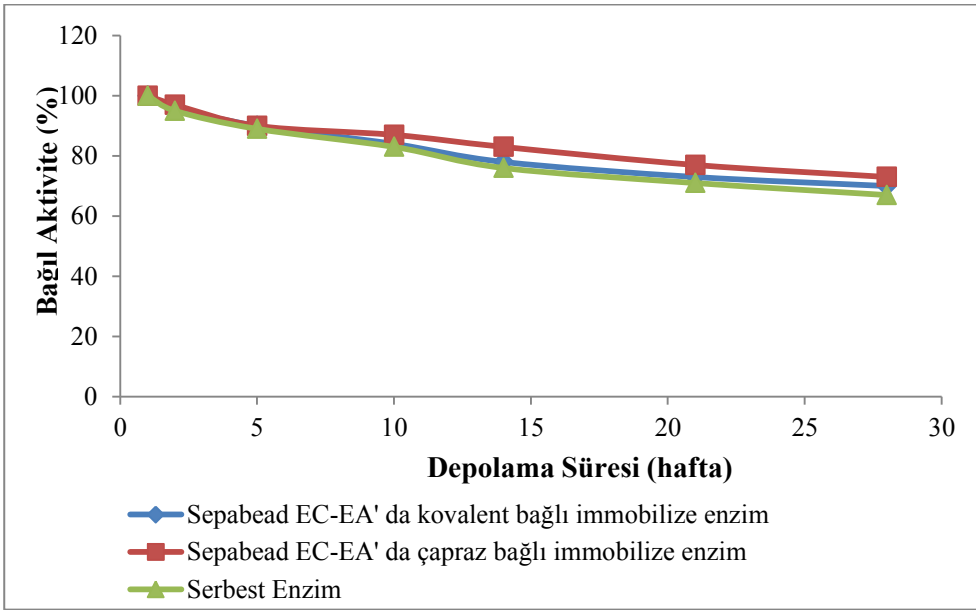
### **3.3.2.3 Depo kararlılığı**

Depo kararlılığı, özellikle immobilize enzimlerin uygulama alanı ile ilgili önemli bir faktördür. Serbest ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidazların depo kararlılığı bölüm 2.9.2.3' de belirtildiği gibi ölçülmüştür.

Şekil 3.11' den görüldüğü gibi enzimlerin depo kararlılığı 28 hafta izlenmiş ve immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıklarının serbest enzime göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. 28 hafta sonunda serbest enzimin kalan aktivitesi % 67 dir. Sepabead taşıyıcıda immobilize edilen enzim ve çapraz bağlı preparatının sırasıyla % 70 ve % 73 oranında aktivitesini koruduğu, kitosan taşıyıcıda immobilize edilen enzim ve çapraz bağlı preparatı ise aktivitesini % 69 ve % 74 oranında koruduğu gözlenmiştir. Depo kararlılığı enzimlerin saklanma koşullarına da bağlıdır. Enzimler 4-5 °C' de saklandıkları zaman depolama süresi artmaktadır.



Şekil 3.21 Serbest ve kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıkları.



Şekil 3.22 Serbest ve Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimlerinin depo kararlılıkları.

### 3.3.2.4 Operasyonel kararlılık

Operasyonel kararlılık enzimin iş yapma süresince aktivitesindeki değişmeyi gösteren bir parametredir ve operasyon süresiyle operasyon sıcaklığına bağımlı olarak değişir. Ayrıca bir enzimin katalitik potansiyeli operasyonel kararlılığı ile orantılıdır. Operasyonel kararlılığın ölçüsü enzimin reaktördeki yarı ömrüdür ve  $t_{1/2}$  ile ifade edilir. Daha doğru bir tanımlama ile enzim aktivitesinin yarısının yitilmesi için geçen zamandır ve şu eşitlik ile hesaplanır:

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

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

İmmobilize  $\alpha$ -galaktozidazlar için operasyonel kararlılık bölüm 2.9.2.4' de açıklandığı gibi belirlenmiştir. Kitosan ve Sepabead EC-EA' da hem kovalent hem de çapraz bağlı immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidazlar için operasyonel kararlılık denemeleri kesikli batch sistem ile gerçekleştirilmiştir. Operasyonel kararlılık denemelerinde örnekler PNPG substratı için 37 °C' de ve rafinoz substratı için ise 50 °C' de inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında sistemden örnekler alınıp standart koşullarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Her iki enzim preparatı için bozunma katsayıları ( $k_D$ ) yukarıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Çizelge 3.16' da substrat olarak PNPG kullanılarak hesaplanan kitosan taşıyıcıda kovalent bağlı ve çapraz bağlı immobilize edilen enzimler için  $k_D$  değerleri, Çizelge 3.17' de ise PNPG kullanılarak hesaplanan Sepabead EC – EA taşıyıcıda kovalent bağlı ve çapraz bağlı immobilize enzim preparatları için  $k_D$  değerleri verilmiştir. Çizelge 3.16' da  $k_D$  değerlerinin ortalaması kitosanda immobilize enzim preparatı için 0,0452; kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim preparatı için ise 0,0414 olarak bulunmuştur. Bu değerler dikkate alınarak enzimin yarı ömrü kitosanda immobilize enzim için 15,33 saat, kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim için ise 16,74 saat olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.17** Kitosan' da immobilize edilen domates  $\alpha$ -galaktozidazının farklı zamanlardaki  $k_D$  değerleri (substrat: PNPG).

<b>Operasyon süresi (Saat)</b>	<b><math>k_D</math> (Kovalent bağlı)</b>	<b><math>k_D</math> (Çapraz bağlı)</b>
1	0,0462	0,0197
2	0,0700	0,0571
5	0,0321	0,0487
8	0,0633	0,0468
16	0,0365	0,0397
18	0,0343	0,0420
20	0,0326	0,0398
26	0,0428	0,0364
30	0,0492	0,0424

**Çizelge 3.18** Sepabead EC-EA' da immobilize edilen domates  $\alpha$ -galaktozidazının farklı zamanlardaki  $k_D$  değerleri (substrat: PNPG).

<b>Operasyon Süresi (Saat)</b>	<b><math>k_D</math> (Kovalent bağlı)</b>	<b><math>k_D</math> (Çapraz bağlı)</b>
1/2	0,0334	0,0421
2	0,0757	0,0492
3	0,0545	0,0566
5	0,0478	0,0493
6	0,0447	0,0456
16	0,0436	0,0336
20	0,0456	0,0367
26	0,0502	0,0460
30	0,0565	0,0448



Çizelge 3.18’ de substrat olarak rafinoz kullanıldığı zaman kitosan taşıyıcıda immobilize enzim ve çapraz bağlı immobilize enzim için  $k_D$  değerleri, Çizelge 3.19’de ise yine substrat olarak rafinoz kullanıldığında Sepabead EC-EA taşıyıcıda immobilize enzim ve çapraz bağlı immobilize enzim için  $k_D$  değerleri verilmiştir. Çizelge 3.18’ de  $k_D$  değerlerinin ortalaması kitosanda immobilize enzim preparatı için 0,0504 ve kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim preparatı için ise 0,0465 olarak bulunmuştur. Bu değerler dikkate alınarak enzimin yarı ömrü hesaplandığında, substrat rafinoz olduğunda kitosanda immobilize enzim için 13,75 saat, kitosanda çapraz bağlı immobilize enzim için ise 14,90 saat olarak hesaplanmıştır. Sepabead EC-EA’ da immobilize enzim için  $k_D$  değerlerinin ortalaması 14,46 saat, aynı taşıyıcıda çapraz bağlı immobilize edilen enzim için 15.0 saat olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.19).

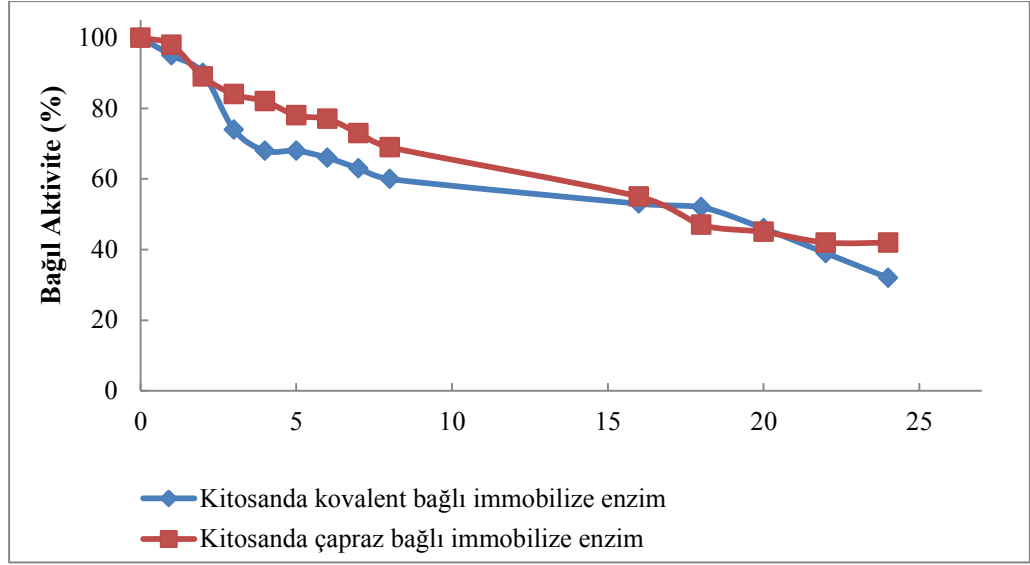
Enzimlerin operasyonel kararlılığı genel yapılarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Kitosanda immobilize enzim, PNPG sistemde substrat olarak kullanıldığında 24 saat sonra aktivitesinin % 32’sini korurken, kitosanda çapraz bağlı immobilize edilen enzim 24 saat sonunda aktivitesinin % 42’ sini korumaktadır (Şekil 3.12). Substrat rafinoz olduğunda kitosanda immobilize enzim ve çapraz bağlı örneği operasyonel kararlılık açısından benzer özellik gösterebilir çapraz bağlı immobilize enzimde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.13). Sepabead EC-EA’ da immobilize enzim, PNPG sistemde substrat olarak kullanıldığında 24 saat sonra aktivitesinin % 33’ ünü, çapraz bağlı immobilize edilen enzim ise 24 saat sonunda aktivitesinin % 45’ ini korumaktadır (Şekil 3.12). Rafinoz substrat olarak kullanıldığında ise 24 saat sonunda Sepabead EC-EA’ da immobilize enzim aktivitesinin % 33’ ünü, çapraz bağlı örneği % 38’ ini korumaktadır (Şekil 3.13). Aljinatta immobilize edilen D.Hansei hücreleri ile substrat olarak rafinozun (10 mM) kullanıldığı operasyonel kararlılık çalışmasında 6 saat sonunda % 61,9 oranında hidrolizin gerçekleştirildiği belirtilmiştir (de Souza Junior et al., 2009). Operasyonel kararlılık enzimin iş yapma sürecinde aktivitedeki değişmeyi gösteren bir parametre olduğu için özellikle endüstriyel uygulamalar için önemli bir parametredir.

**Çizelge 3.19** Kitosan' da immobilize edilen domates  $\alpha$ -galaktozidazının farklı zamanlardaki  $k_D$  değerleri.(substrat: Rafinoz).

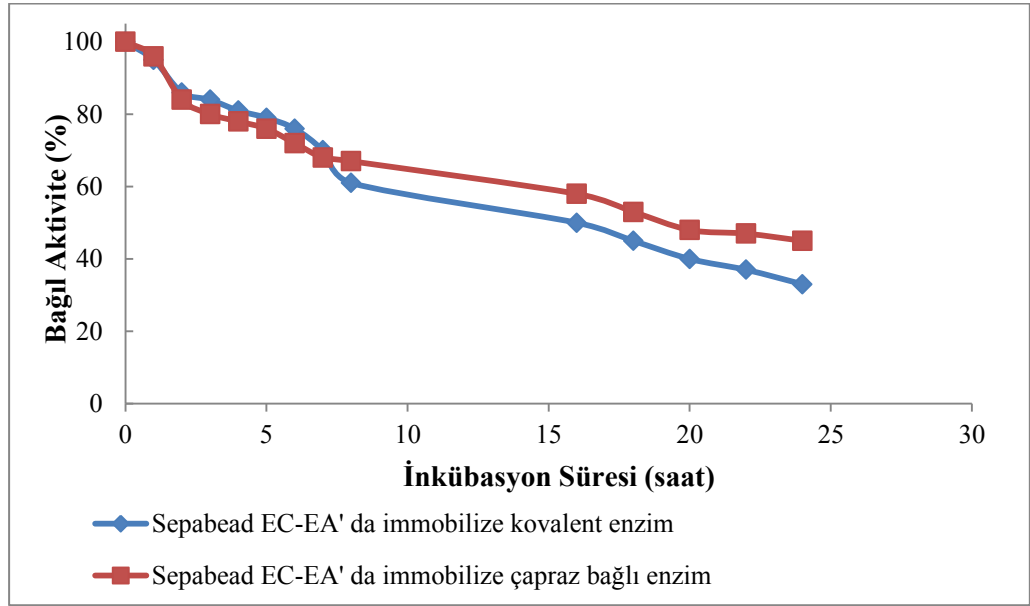
Operasyon Süresi (Saat)	$k_D$ (Kovalent bağlı)	$k_D$ (Kovalent bağlı)
1	0,0496	0,0521
2	0,0513	0,0418
6	0,0448	0,0472
8	0,0577	0,0507
16	0,0441	0,0513
18	0,0378	0,0405
24	0,0503	0,0402

**Çizelge 3.20** Sepabead EC-EA' da immobilize edilen domates  $\alpha$ -galaktozidazının farklı zamanlardaki değerleri (substrat: Rafinoz).

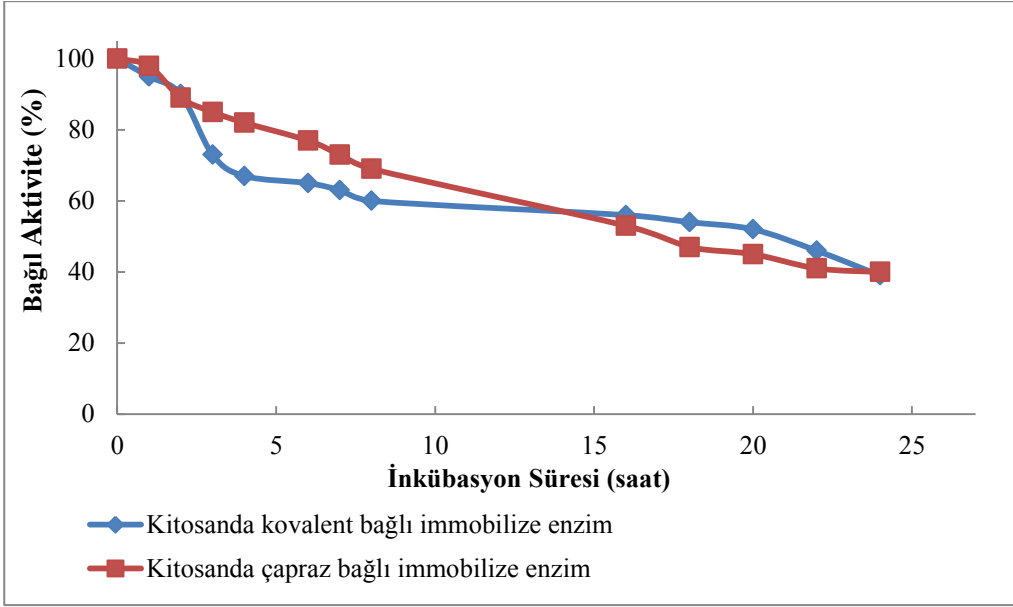
Operasyon Süresi (Saat)	$k_D$ (Kovalent bağlı)	$k_D$ (Kovalent bağlı)
1	0,0246	0,0418
2	0,0759	0,0421
6	0,0685	0,0358
8	0,0449	0,0593
16	0,0522	0,0612
18	0,0475	0,0513
24	0,0398	0,0542



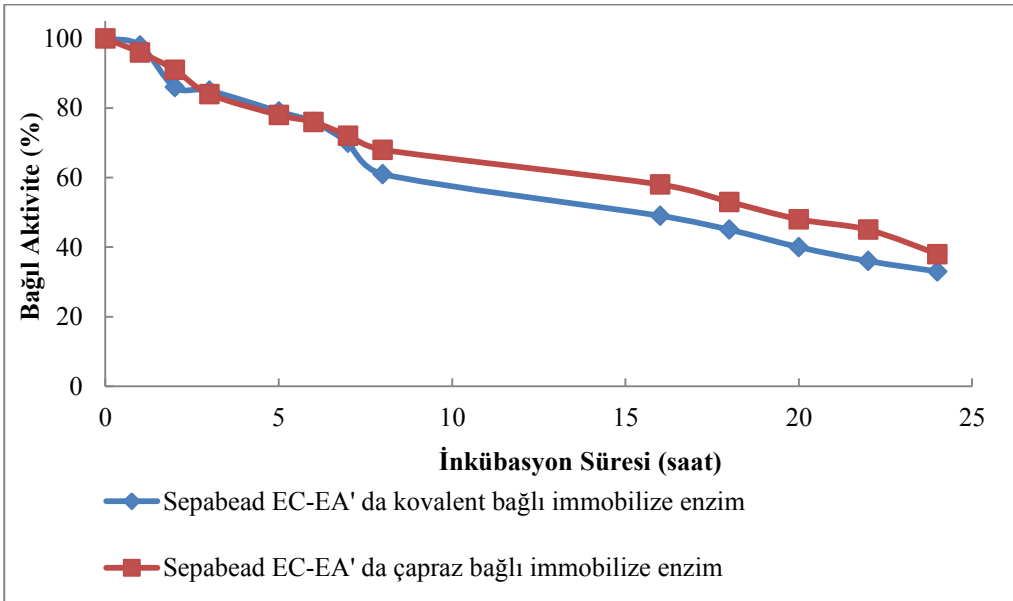
Şekil 3.23 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılığı (substrat: PNPG).



Şekil 3.24 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin operasyonel kararlılığı (substrat: PNPG).



Şekil 3.25 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin operasyonel kararlılığı (substrat: Rafinoz).

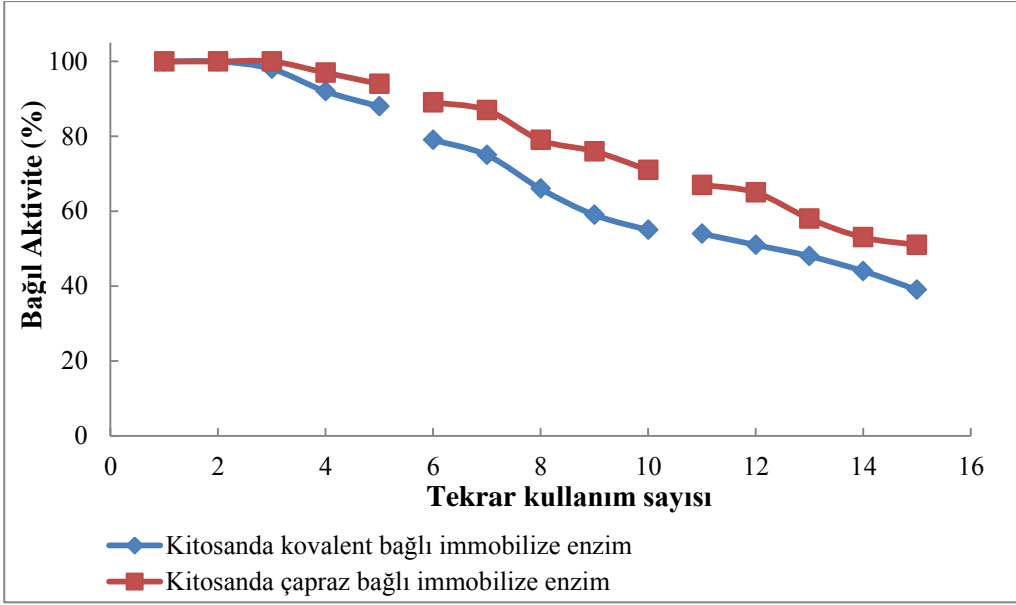


Şekil 3.26 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidazın operasyonel kararlılığı (substrat: Rafinoz)

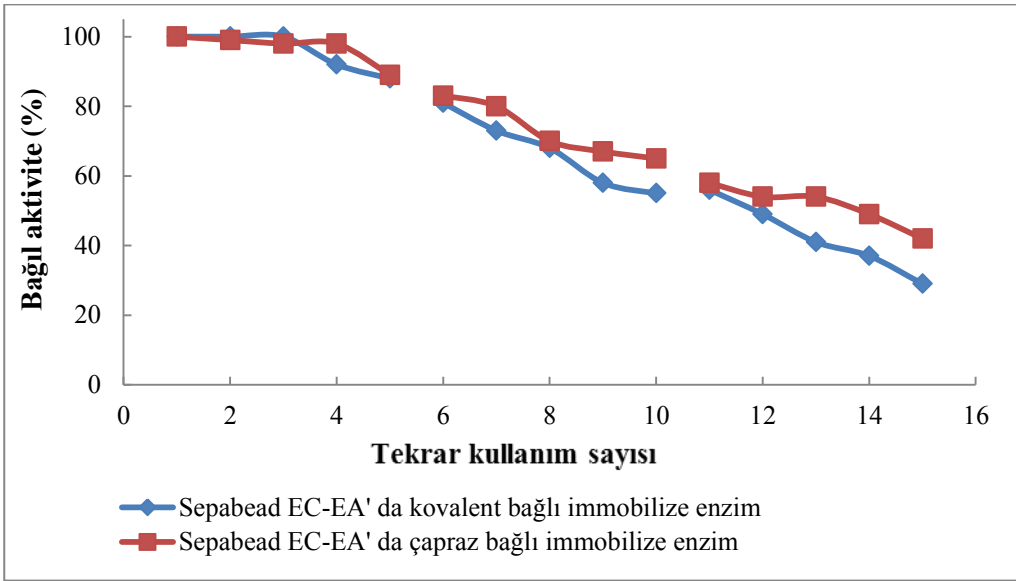
### 3.3.3 İmmobilize $\alpha$ -galaktozidazların tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği endüstriyel prosesler için oldukça önemlidir. Enzim preparatının çok kez ve uzun süre kullanılabilmesi endüstriyel proseslerde avantaj sağlar. Kitosan ve Sepabead taşıyıcılarda kovalent bağlı ve çapraz bağlı immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları bölüm 2.9.2.5' te belirtilen esaslara göre test edilmiştir.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları 37°C ve 50°C' de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar sırasıyla Şekil 3.14 ve 3.15' de verilmiştir. Bir günde aynı enzim preparatıyla maksimum 5 ölçüm alınabilmiş ve gece boyunca 4°C' de saklanıp tekrar ölçüm alınmıştır. Denemeler üç gün boyunca tekrarlanmış ve her bir gün grafikte kesikli olarak belirtilmiştir. 37°C'de gerçekleştirilen tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, kitosanda kovalent bağlı immobilize enzim preparatı üç gün sonunda 15 kez kullanıldığı durumda aktivitesinin % 39' unu, çapraz bağlı immobilize enzim preparatı ise aktivitesinin % 51'ini korumaktadır. Benzer bir çalışmada kitosanda immobilize edilen yabani nohut  $\alpha$ -galaktozidazının da 12 defa kullanılması sonucu aktivitesinin % 52' sini koruduğu belirtilmiştir (Singh and Kayastha, 2012). Sepabead EC-EA'da ise kovalent bağlı immobilize enzim preparatı 15 kullanım sonrasında aktivitesinin % 29' unu korurken, çapraz bağlı immobilize enzim aktivitesinin % 42' sini korumaktadır. Genellikle, tekrar kullanımda substratın aktif merkeze sıklıkla ve ardışık olarak girmesiyle aktif merkez rahatsız edilmekte ve sonuç olarak aktivite düşmektedir.

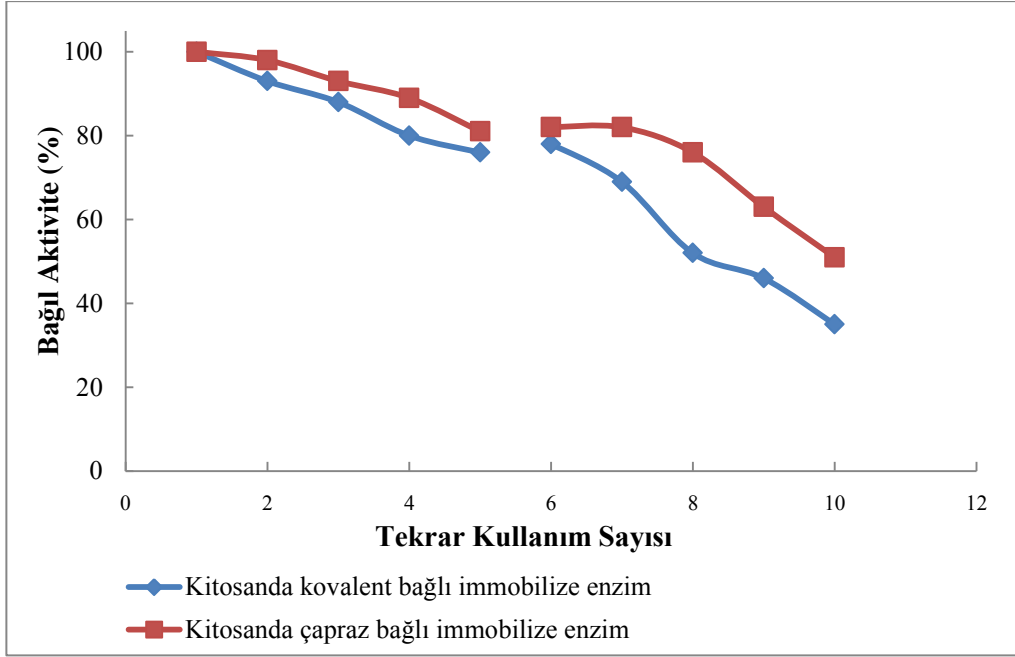


Şekil 3.27 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 37°C' de tekrar kullanılabilirliği.

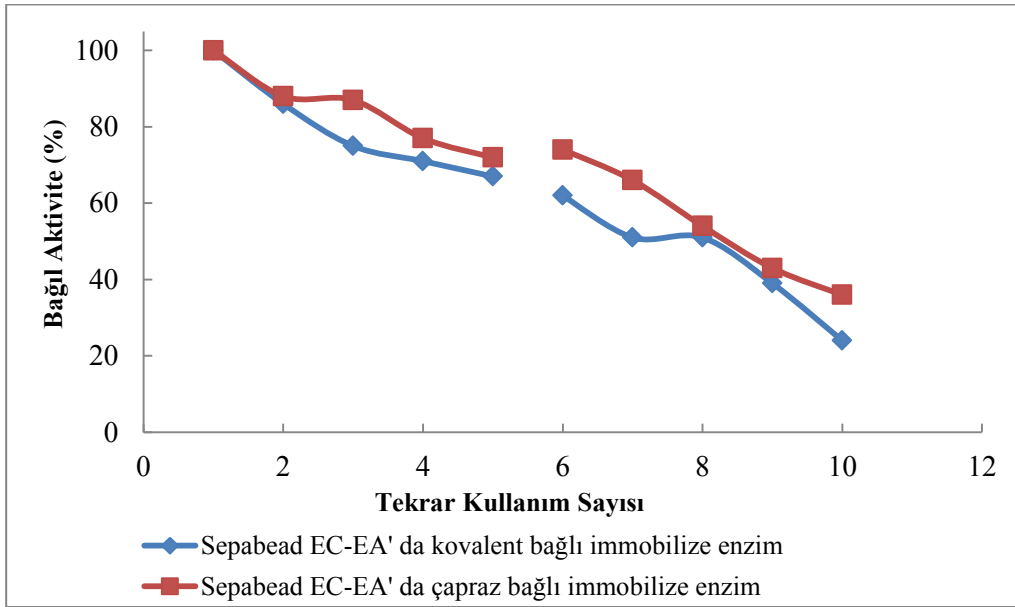


Şekil 3.28 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 37°C' de tekrar kullanılabilirliği.

Hazırlanan immobilize enzimler tekrar kullanılabilirlik çalışmaları için 50°C’ de günde 5 kez olmak üzere toplamda 10 kez kullanılmıştır. 50°C’ de gerçekleştirilen tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, kitosanda kovalent bağlı enzim preparatı iki gün sonunda 10 kez kullanıldığı durumda aktivitesinin % 35’ ini, çapraz bağlı enzim preparatı ise % 51’ini korumaktadır. Bu yüksek sıcaklıkta bile enzimin aktivitesini büyük oranda koruması endüstriyel uygulamalarda kullanım alanı bulması açısından önemlidir. Sepabead taşıyıcıda kovalent bağlı enzim 10 kullanım sonrasında aktivitesinin % 24’ ünü korurken, çapraz bağlı örnek aktivitesinin % 36’ sini korumaktadır. Sepabead EC-EA’ da immobilize enzim preparatlarının, kitosanda immobilize enzim preparatlarına göre tekrar kullanılabilirliği daha düşüktür. Her iki taşıyıcıda da immobilize edilen enzimlerden çapraz bağlı preparatların tekrar kullanımlarında daha uzun süre aktivitelerini koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.29 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 50°C' de tekrar kullanılabilirliği.



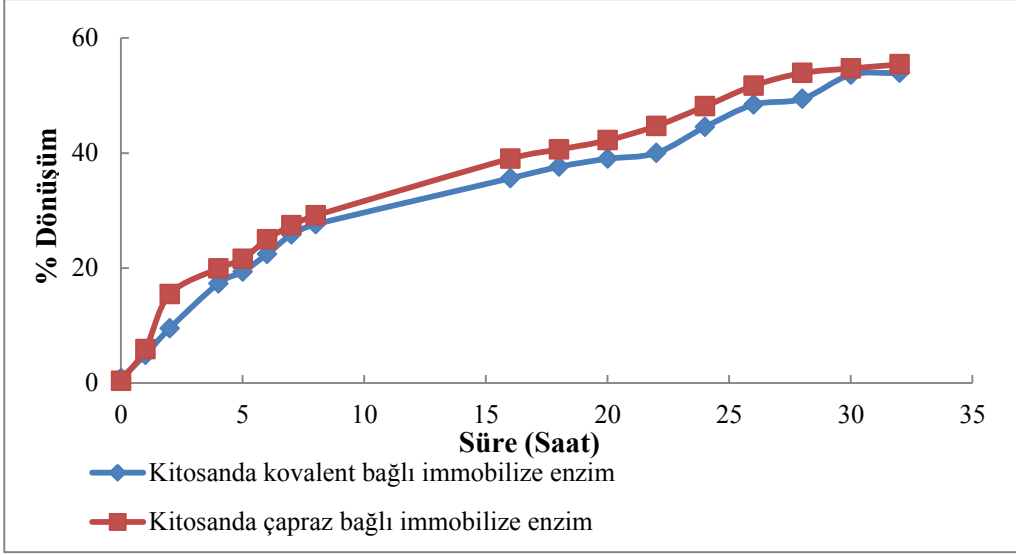
Şekil 3.30 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -galaktozidaz enzimlerinin 50°C' de tekrar kullanılabilirliği.



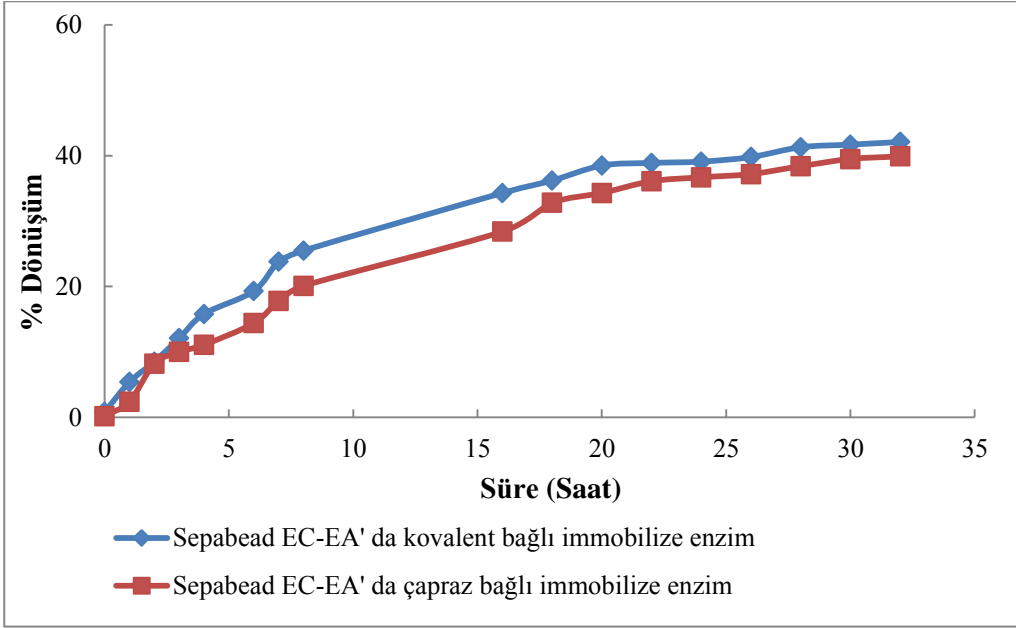
### 3.3.4 Kitosan ve Sepabead EC-EA' da immobilize $\alpha$ - galaktozidaz ile PNPG ve Rafinoz hidrolizi

Deney seti bölüm 2.10' de belirtildiği gibi kurulmuştur. Hidroliz denemeleri hem PNPG için hem de rafinoz için yapılmıştır. Denemede PNPG ile hidroliz çalışması 37°C' de, rafinoz ile hidroliz çalışması 50°C' de zamana bağlı olarak izlenmiştir. Başlangıç anında ve reaksiyon devam ettikçe alınan örneklerde aktivite tayini yapılarak dönüşüm hesaplanmıştır. Substratın dönüşümü, t anında tüketilen substratın oranı olarak  $[X = (S_0 - S_t) / S_0]$  belirlenmiştir. Substrat dönüşümü X, başlangıç ve t anındaki rezervardaki substrat konsantrasyonu ( $S_0 - S_t$ ) ile ifade edilmiştir. Farklı zamanlarda ki X değerleri hesaplanarak % X ile t arasında çizilen grafikten % dönüşüm miktarı belirlenmiştir. Şekil 3.16' da kitosan ve Sepabead EC-EA' da immobilize edilen enzim preparatlarının PNPG hidrolizi sonrası, Şekil 3.17' de ise kitosan ve Sepabead taşıyıcılarda immobilize edilen enzim preparatlarının rafinoz hidrolizi sonrası % dönüşüm oranları verilmiştir.

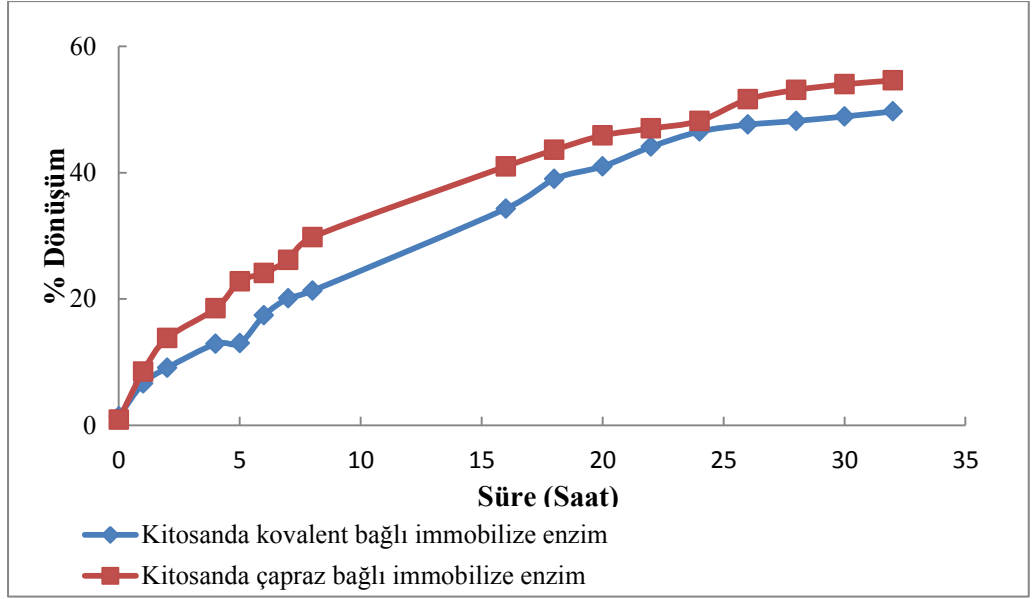
Şekil 3.16 (a)' dan görüldüğü gibi kitosanda kovalent ve çapraz bağlı immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi ile hidroliz sonrası elde edilen % dönüşüm değeri benzerdir. PNPG hidrolizinin ilk saatlerinde hidroliz hızı çapraz bağlı preparat ile daha hızlı iken, ileriki saatlerde hemen hemen eşitlenmiştir. 30 saatin sonunda kovalent bağlı immobilize enzim substratın % 54' ünü hidrolizlerken, çapraz bağlı immobilize enzim ile % 55 oranında hidroliz gerçekleşmiştir. Sepabead taşıyıcıda kovalent bağlı immobilize edilen enzimin hidroliz hızı çapraz bağlı immobilize enzime oranla biraz daha yüksektir. Şekil 3.16 (b)' den görüldüğü gibi Sepabead taşıyıcıya kovalent bağlı immobilize enzim preparatı 30 saat sonrasında % 42 oranında hidroliz gerçekleştirirken, çapraz bağlı immobilize enzim % 40 oranında hidroliz gerçekleştirmiştir. Rafinozun substrat olarak kullanıldığı çalışmada ise inkübasyon sıcaklığı 50°C iken kitosanda kovalent olarak immobilize edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzim preparatı ile 32 saatte rafinozun % 50 oranında hidrolizlendiği gözlenmiştir (Şekil 3.17). Kitosanda çapraz bağlı immobilize edilen enzim preparatının ise 32 saatte substratın % 55' ini hidrolizlediği belirlenmiştir. *P. cinnabarinus*  $\alpha$ -galaktozidazının kitosanda immobilizasyonu sonrası rafinozu 30 günde % 85 oranında hidrolizlediği belirtilmiştir (Ohtakara and Mitsutomi, 1987). Sepabead EC-EA' da kovalent immobilize edilen enzim preparatı ve çapraz bağlı örneği rafinozu 32 saatte sırasıyla % 42 ve % 33 oranında hidrolizlemiştir (Şekil 3.17 b).



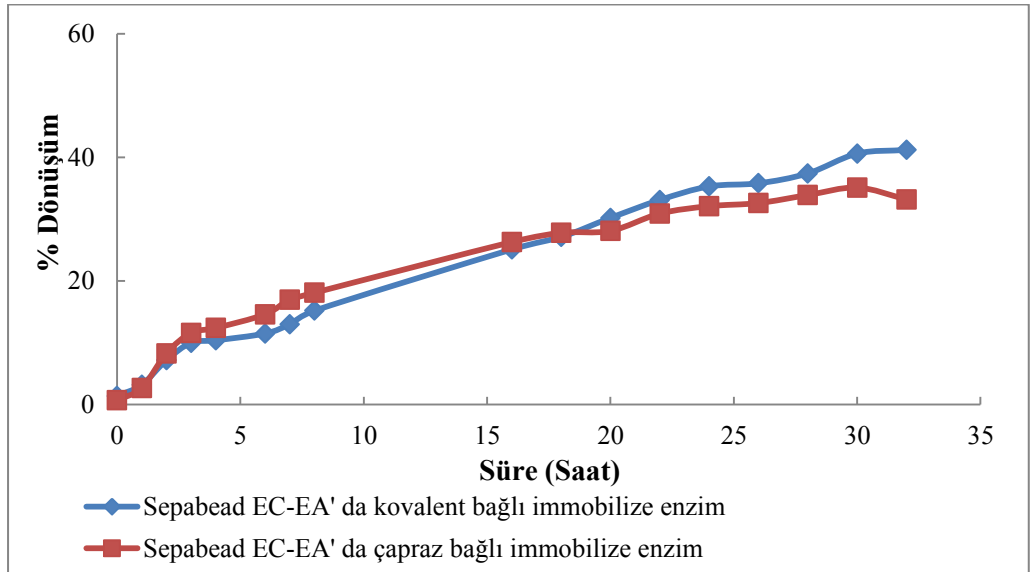
**Şekil 3.31** Kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından PNPg'nin kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi.



**Şekil 3.32** Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından PNPg' nin kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi.

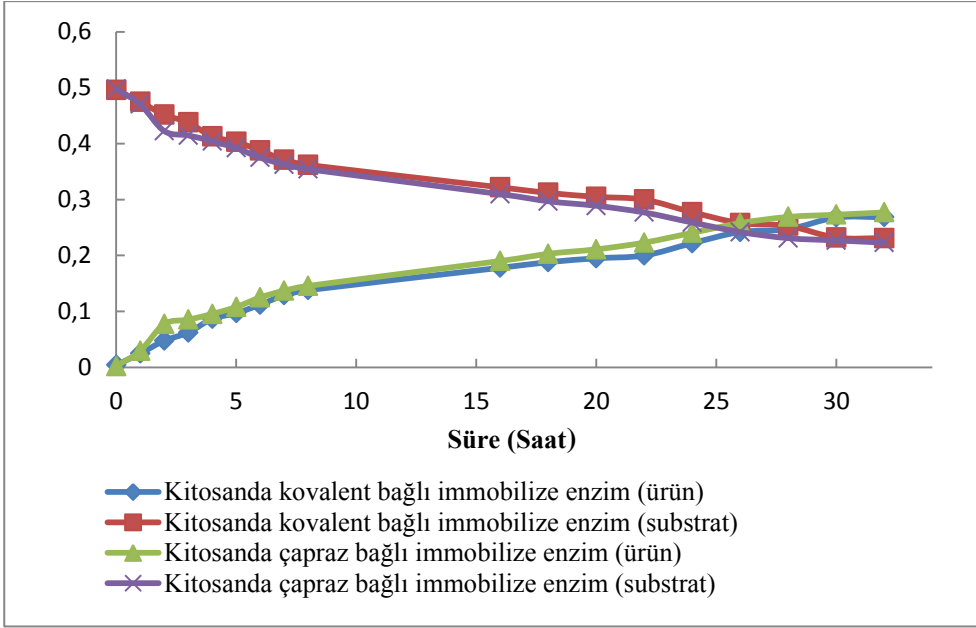


Şekil 3.33 Kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından rafinozun kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi.

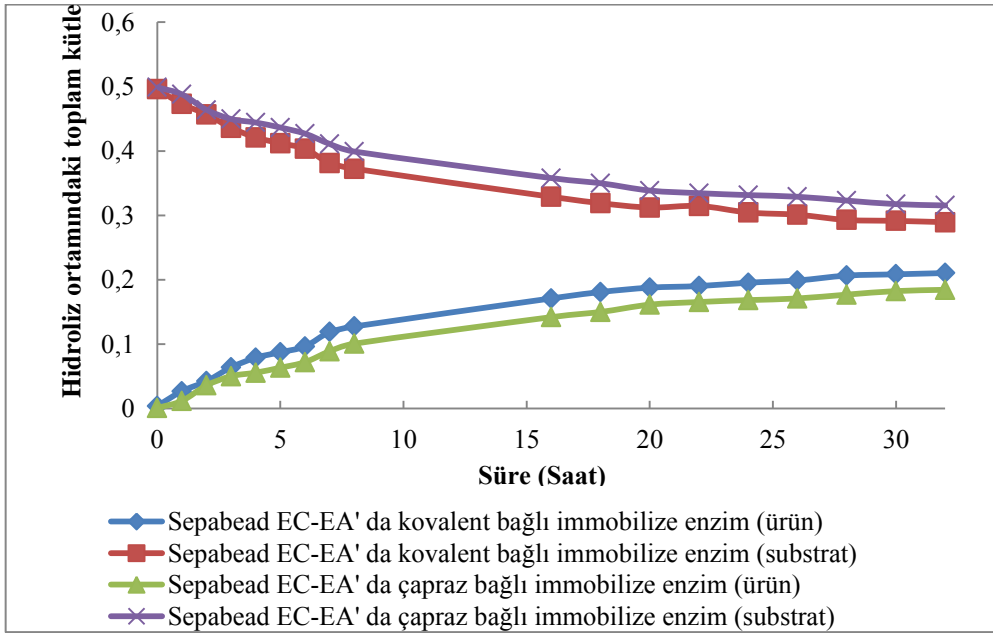


Şekil 3.34 Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimleri tarafından rafinozun kesikli batch sistemde dönüşüm eğrisi.

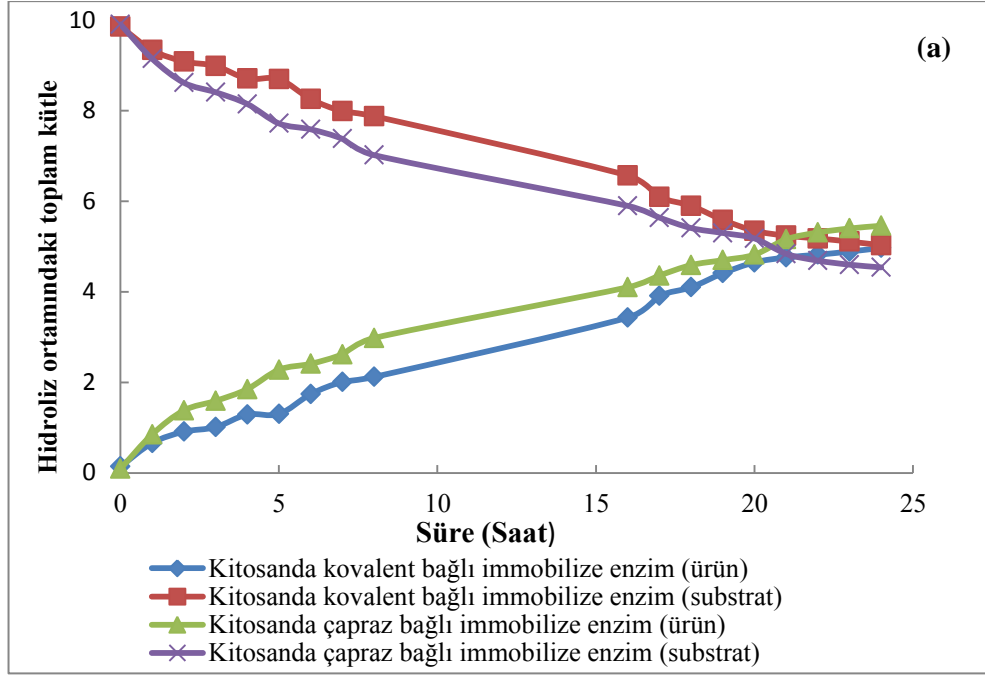
Rafinoz ve PNPG ile gerçekleştirilen hidroliz çalışmalarının yanısıra tüketilen substrat ve ürün miktarlarında izlenmiştir. Substrat olarak PNPG ve rafinozun kullanıldığı çalışmanın sonucunda elde edilen reaktördeki substrat ve ürün miktarları sırasıyla Şekil 3.18 ve Şekil 3.19' da verilmiştir.



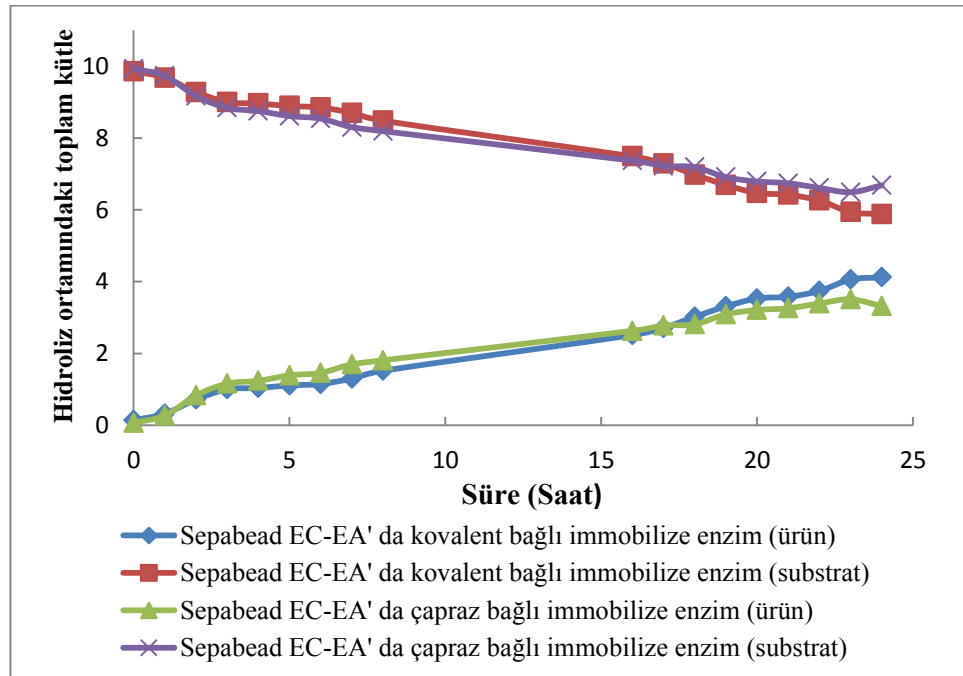
Şekil 3.35 PNPG' nin, kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu\text{mol}$ ).



Şekil 3.36 PNPG' nin, Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu\text{mol}$ ).



Şekil 3.37 Rafinozun, kitosanda immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu\text{mol}$ ).



Şekil 3.38 Rafinozun, Sepabead EC-EA' da immobilize  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları ( $\mu\text{mol}$ ).

### 3.4 $\alpha$ -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) Enziminin Kitosan ve Sepabead EC-EA Taşıyıcılarında İmmobilizasyonunun Genel Olarak Değerlendirilmesi

$\alpha$ -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, 1979; 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.  $\alpha$ -Galaktozidaz medikal alanda (Wong et al., 1986; Shivanna et al., 1989; Dean and Sweeley, 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.

Endüstriyel katalizatörler olarak enzimler klasik kimyasal katalizatörlere göre bazı üstünlüklere sahiptirler. İmmobilize enzimlerin genellikle daha kararlı yapıda olması, reaksiyon ortamından istenildiği zaman uzaklaştırılabilmesi, tekrar tekrar kullanılabilmesi, sürekli işlemlerde kullanılabilmesi gibi endüstriyel açıdan çok önemli avantajları vardır. Bu nedenle immobilizasyon işlemi, son 30 yıldır enzimleri daha çekici hale getirmiştir ve immobilizasyon araştırmaları yoğunluk kazanmıştır. Bu çalışmada, domatesten (*Lycopersicon esculentum*)'dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin biyoafiniteye dayalı immobilizasyon teknikleri ile immobilizasyonu amaçlanmıştır. Domates, gerek enzim kaynağı gerekse enzim miktarı açısından  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için oldukça ilginç bir materyaldir. Enzim

bu kaynakta oldukça yüksek aktiviteye sahip ve kararlı bir yapıdadır. Her ne kadar oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen tamamen homojen bir  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az sayıda çalışma mevcut ise de önemli olan daha sonraki çalışmalarda kullanabileceğimiz uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır. Bu nedenle  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi domatesten izole edilerek hazırlanmış ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Enzimin immobilizasyonu için doğal taşıyıcı olarak kitosan ve sentetik taşıyıcı olarak ise Sepabead EC-EA tercih edilmiş ve taşıyıcıların amino grupları üzerinden türevlendirme yapılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Ligand olarak ise günümüzde karbohidrat, nükleozid, nükleotid, nükleik asitler ve glikoproteinlerin immobilizasyonunda sıkça çalışmalar yapılan 3-aminofenil boronik asit (AFBA) kullanılmıştır. Fenil boronik asit ve türevleri geniş uygulama alanına sahiptirler. Klinik analizlerde (glikozillenmiş hemoglobin artışı ile oluşan glycemia tanısı), karbohidrat tanınması, nükleozid, modifiye nükleozid, nükleotid, ribonükleotid, oligonükleotid, nükleik asitler tanınması, deoksi türevleri seçimi, cAMP'den nükleotid ayırımı, nükleotidil peptid izolasyonu, katekol aminler tanınması, glikoproteinler ve enzimlerin ayrılmasında, biyomolekül izolasyonu, dopamin, laktik asit gibi küçük moleküllerin ayrılmasında, katekol estrogen ve hormon seçimi, proteazlar için inhibitör olarak, diyabetlerde glisemik kontrolde HbA1C saptanmasında, hipoksantin, inosin belirlenerek patolojik bozuklukların belirlenmesi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Ancak fenil boronatların hidrofobik yapısı nedeniyle protein, glikoprotein ve polinükleotidleri gibi makromoleküllerin ayrılmasında kullanılması zordur. Bu nedenle her biri farklı bağlama bölgeleri ile farklı bağ yapıları oluşturarak çeşitli moleküllerin tanı ve ayrılmasında kullanılan fenilboronik asit türevleri sentezlenmiştir. Proteinlere, karbohidratlara, nükleozid ve nükleotidlere afinitesinin yüksek olması nedeni ile 3-aminofenil boronik asiti  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonunda ligand olarak seçildi. AFBA günümüzde en çok kullanılan boronat ligantıdır.

AFBA ile türevlendirilmiş kitosan ve Sepabead EC-EA' da  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu için uygun şartlar optimizasyon yapılarak belirlendi. Kitosan için, 1000 mg kitosan % 1,5 (v/v) glutaraldehit ile aktiflenip, 200 mg AFBA ile türevlendirildikten sonra, 2,072 mg protein, 25 mM pH 6,0'da; Sepabead taşıyıcıda ise 1000 mg taşıyıcı için, % 1,25 (v/v) glutaraldehit, 10 mg AFBA, 1,036 mg protein, 25 mM pH 5.0'da uygulandığında en verimli immobilizasyon sonuçları elde edildi. Kitosan taşıyıcıda immobilizasyon sonrası

% 41,07 aktivite verimi elde edilirken, Sepabead EC-EA'da aktivite verimi % 23,9 olarak belirlendi. İmmobilizasyon için uygun koşullar belirlendikten sonra karakterizasyon çalışmaları yapıldı. İmmobilize enzimler ile serbest enzim karşılaştırıldığında; genel anlamda immobilize enzimlerin daha kararlı olduğu gözlemlendi. Özellikle kitosan taşıyıcıda immobilize edilen enzim preparatları serbest enzimle karşılaştırıldığında aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, optimum pH ve kararlılık testleri bakımından oldukça iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi.

Sonuç olarak; elde edilen veriler hazırlanan immobilize enzim preparatlarının özellikle endüstriyel uygulamalar için oldukça iyi özelliklere ve kararlılıklara sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle maliyet açısından tekrar kullanılabilme sayısını arttırdığı, daha uzun süreler depolanabildiği için avantaj sağlayacağını; çalışmanın bu alanda çalışan kişilere ve literatüre olumlu katkı yapacağını düşünmekteyiz.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Agrawell, K.M.L. and Bahl, O.P.**, 1968, Glycosidases of phaseolus vulgaris II: Isolation and general properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 243, 103-111.
- Alonso, N., Lopez-Gallefo, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Matea, C., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R.**, 2005, Journal of Molecular Catalysis B, 35, 57-61.
- Anisha, G.S., Rojan, P.J., Nicemol, J., Niladevi, K.N. and Prema, P.**, 2008, Production and characterization of partially purified thermostable  $\alpha$ -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications, *Food Chemistry*, 111(3), 631-635.
- Anwar A., Qader A. U., Raiz A., Iqbal S. and Azhar A.**, 2009, Calcium Alginate: A Support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS, *World Applied Sciences Journal*, 7(10): 1281-1286.
- Arruda, E.J. and Santana, C.C.**, 2003, Phenylboronate-chitosan resins for adsorption of  $\beta$ - amylase from soybean extracts, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108, 829-842.
- Balasubramaniam, K. and Mathew, C. D.**, 1986, Purification of  $\alpha$ -galactosidase from coconut, *Phytochemistry*, 25(8): 1819-1821.
- Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., Celem, E. B. and Onal, S.**, 2011, Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4): 855–860.
- Bergkamp, R.J.M., Kool, I.M., Geerse, R.H. and Planta, R.J.**, 1992, Multiple copy integration of the  $\alpha$ -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., 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, New York, 1: 455p.
- Bergold, A. and Scouten, W.H.**, 1983, Borate Chromatography, in Solid Phase Biochemistry, (Scouten, W.H., ed.), Wiley, Newyork, 149-187.
- Bilkova, Z., Churacek, J., Kucerova, Z. and Turkova, J.**, 1997, Purification of anti-chymotrypsin antibodies for the preparation of a bioaffinity matrix with oriented chymotrypsin as immobilized ligand, *Journal of Chromatography B*, 689, 273-279.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bishop, D.F. and Desnick, R.J.**, 1981, Affinity purification of  $\alpha$ -galactosidase A from human spleen, placenta and plasma with elimination of pyrogen contamination, *The Journal of Biological Chemistry*, 256(3): 1307-1316.
- 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.
- 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  $\alpha$ -galactosidase, *Carbohydrate Polymers*, 12, 155-168.
- Burns, J.K.**, 1990,  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities in juice vesicles of stored valencia oranges, *Phytochemistry*, 29(8), 2425-2429.
- Calci, E., Demir, T., Celem, E. B. And Önal, S.**, 2009, Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70(1), 123-127.
- Cantacuzene, D. and Attal, S.**, 1991, Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using  $\alpha$ -galactosidase, *Carbohydrate Research*, 211: 327-331.
- Camli, S. T., Senel, S. and Tuncel, A.**, 2002, Nucleotide isolation by boronic acid functionalized hydrophilic supports, *Colloids and Surfaces*, 207: 127-137.
- Cartwright, S.J. and Waley, S.G.**, 1984, Purification of beta-lactamases by affinity chromatography on phenylboronic acid-agarose, *Biochemical Journal*, 221(2), 505-512.
- Cavazzoni, V., Adami, A. and Craveri, R.**, 1987,  $\alpha$ -Galactosidase from the yeast (*Candida javanica*), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 555-559.
- Chakka, V. M., Altunçevahir, B., Jin, Z. Q., Li, Y. and Liu, J. P.**, 2006, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Journal of Applied Physics*, 99.
- Chellapandian, M. and Krishnan, M.R.V.**, 1993, Chitosan-poly (glycidylmethacrylate) copolymer for immobilization of urease, *Process Biochemistry*, 33(6), 595-600.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chibata I.**, 1978, Immobilized Enzymes, edited by Chibata, I., Halsted Press, 1-144.
- Chien, S.F. and Lin-Chu, M.**, 1991, The conversion of group B red blood cells into group O by an  $\alpha$ -galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*), *Carbohydrate Research*, 217, 191-200.
- Chrost, B. and Schmitz, K.**, 1999, purification and characterization of multiple forms of  $\alpha$ -galactosidase in *Cucumis melo* plants, *Journal of Plant Physiology*, 156(4), 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  $\alpha$ -galactosidase A, using a baculovirus vector, *Gene*, 144: 197-203.
- Cruz, R., Batistela, S.C. and Wosiacki, G.**, 1981, Microbial  $\alpha$ -galactosidase for soymilk processing, *Journal of Food Science*, 46: 1196-1200.
- Cuourtois, J.E. and Petek, F.**, 1988,  $\alpha$ -Galactosidase from coffee beans, *Methods in Enzymology*, edited by Moshbach, K., Academic Press, 137: 565p.
- Dean, K.J. and Sweely, C.C.**, 1979, Studies on human liver  $\alpha$ -galactosidase I., *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20): 9994-10000.
- DeMason, D.A., Madore, M.A., Sekhar, K.N.C. and Harris, M.J.**, 1992, Role of  $\alpha$ -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm, *Protoplasma*, 166: 177-184.
- De Souza Junior, W.C., de Rezende S.T., Viana, P.A., Falkoski, D.L., Reis, A.P., Machado, S.G., de Barros, E.G and Guimaraes, V.M.**, 2009, Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilized in alginate, *Food Chemistry*, 114, 589-593.
- 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., Campillo, E.M. and Lezica, R.P.**, 1983, Characterization of a glycoprotein  $\alpha$ -galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*), *The Journal of Biological Chemistry*, 258(2): 923-929.
- Dey, P.M.**, 1984, Characteristic feature of an  $\alpha$ -galactosidase from mung beans, *European Journal of Biochemistry*, 140: 385-390.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Dey, P.M. and Pridham, J.B.,** 1972, Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases, In: *Advanced in Enzymology*, edited by Meister A., Interscience Publishers, 36: 91-123.
- 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*  $\alpha$ -galactosidase izozymes, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(5): 1052-1055.
- El-Shebawy, K., Saleh, S., Afify, A. and El-sayed, O. H.,** 2007, Production of  $\alpha$ -galactosidase from local isolated strain of *Bacillus circulans*, *Journal of Microbiology*, 17, 224-232.
- Erdős, M., Németh, K., Tóth, B., Constantin, T., Rákóczi, É., Ponyi, A., Dajnoki, A., Grubits, J., Pintér, I., Garzuly, F., Hahn, K., Bencsik, K., Vécsei, L., Fekete, G. and Maródi, L.,** 2008, Novel sequence variants of the  $\alpha$ -galactosidase A gene in patients with Fabry disease, *Molecular Genetics and Metabolism*, 95(4), 224-228.
- Farzadi, M., Khatami, S., Mousavi, M. and Amirmozafari, N.,** 2010, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus*, *African Journal of Biotechnology*, 10(10), 1873-1879.
- Fialho, L., Guimarães, V.M., Callegari, C.M., Reis, A., Barbosa, D.S., Borges, E.E., Moreira, M.A. and Rezende, S.T.,** 2008, Characterization and biotechnological application of an acid alpha-galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. Seeds, *Phytochemistry*, 69(14), 2579-2585.
- Filho, M., Pessela, B.C., Mateo, C., Carrascosa, A., Fernandez-Lafuente, R. and Guisán, J.M.,** 2007, Immobilization-stabilization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy, *Enzyme and Microbial Technology*, 42(3), 265-271.
- Froissarta, R., Guffonb, N., Vanierc, M. T., Desnickd, R. J. and Mairea, I.,** 2003, Fabry disease: D313Y is an  $\alpha$ -galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma, *Molecular Genetics and Metabolism*, 80(3), 307-314.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gallego, F.L., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Lorente, G.F., Guisan, J.M. and Lafuente, R.F.,** 2005, Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on Sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 750-756.
- Gao, Z. and Schaffer, A.,** 1999, A novel alkaline alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose, *Plant Physiology*, 119(3), 979-988.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shohet, S.B.,** 1985, Human natural anti  $\alpha$ -galactosyl IgG, *Journal of Experimental Medicine*, 162, 573-582.
- Gaudreault, P.R. and Webb, J.A.,** 1983, Partial purification and properties of an alkaline  $\alpha$ -galactosidase from mature levels of *Cucurbita pepo*, *Plant Physiology*, 71, 662-668.
- Ghazi, I., Gomez de Segura, A., Fernandez-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J. and Ballesteros, A.,** 2005, Immobilization of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35, 19-27.
- Gidley, M.J.; Eggleston, G. and Morris, E.R.;** 1992, Selective removal of  $\alpha$ -galactosidase side chains from *Rhizobium* capsular polysaccharide by guar  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei*, *Journal of Molecular Biology*, 231, 933-934.
- Gote M.M., Khan M.I., Gokhale D.V., Bastawde K.B. and Khire J.M.,** 2006, Purification, characterization and substrate specificity of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Process Biochemistry*, 41(6), 1311-1317.
- Guimarães, V. M., Rezende, S. T., Moreira, M.A., Barros, E.G. and Felix, C. R.,** 2001, Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides, *Phytochemistry*, 58, 67-63.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Guisseppin, M.L.F.; Almerk, J.W.; Heistek, C.J. and Verrips, C.T., 1993,** Comperative study on the production of guar  $\alpha$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU 50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continious culture, *Applied and Enviromental Microbiology*, 59(1), 52-59.
- Gupta, M.N. and Roy, I., 2002,** Applied Biocatalysis: An overview, *Indian Journal Biochemistry and Biophysics.*, 39, 220-228.
- Haibach, F., Hata, J., Mitra, M., Dhar, M., Harmata, M., Sun, P. and Smith, D., 1991,** Purification and characterization of a *Coffea canephora*  $\alpha$ -D-galactosidase isozyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 1564- 1571.
- Hall, D.G., 2006,** Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine, Wiley-VCH, Canada, 1-24.
- Han, L.K., Kimura, Y. and Okuda, H., 1999,** Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet, *International Journal Obesity*, 23(2),174-179.
- Harpaz, N.; Flowers, H.M. and Sharon, N., 1978,**  $\alpha$ -Galactosidase from soybeans destroying blood-group B antigens, *European Journal of Biochemistry*, 22: 421-428.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M. and Kitahata, S., 1993,** Purification and some properties of  $\alpha$ -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  $\alpha$ -linked galactooligosaccharides using the reverse reaction of a cell-bound  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guillermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(2): 179-183.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Okinago, T. and Kitahata, S., 1995,** Transgalactosylation catalyzed by  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guillermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(4): 619-623.
- Hermanson, G.T., Mallia, A. K., and Smith, P.K., (1992),** Immobilized Affinity Ligand Techniques, *Academic Press*, 28, 90-95.
- 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.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ishii, S., Kase, R., Sakuraba, H. and Suzuki, Y.,** 1993, Characterization of a mutant  $\alpha$ -galactosidase in *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acid Research*, 15(5): 2213-2220.
- 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.
- Itoh, T., Uda, Y. and Nakagawa, H.,** 1986, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon, *Journal of Biochemistry*, 99: 243-250.
- Kang, H. and Lee, S.,** 2000, Characteristics of an  $\alpha$ -galactosidase associated with grape flesh, *Phytochemistry*, 58(2), 441-707.
- Katrolia, P., Jia, H., Yan, Q., Song, S., Jiang, Z. and Xu, H.,** 2012, Characterization of a protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides, *Bioresource Technology*, 110, 578-586.
- Kauchurin, A.M., Neustroev, K.N., Golubev, A.M. and Ibatullin, F.M.,** 1993, Chemical activation of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei*, *Biochemistry*, 58(4): 353-361.
- King, M. R., White, B. A., Blaschek, H. P., Chassy, B. M., Mackie, R. I. and Cann, I. K. O.,** 2002, Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5676-5682.
- Kotwal, S.M., Gote, M.M., Khan, M.I. and Khire, J.M.,** 1999, Production, purification and characterization of a constitutive intracellular  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola sp.*, *Journal of Industrial Microbiology and Technology*, 23: 661-667.
- Krajewska, B.,** 2003, Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials, *Separation and Purification Technology*, 41(3), 305-312.
- Kristufek, D., Hodits, R. and Kubicek, C.P.** 1994, Coinduction of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\alpha$ -D-galactosidase formation in *Trichoderma reesei* RUT C-30, *FEMS Microbiology Letters*, 115: 259-264.
- Kubitzi, T., Noll, T. and Lutz, S.,** 2008, Immobilization of bovine enterokinase and application of the enzyme in fusion protein cleavage, *Bioprocess Biosystems Engineering*, 31, 173-182.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kumari, A. and Kayastha, A.,** 2010, Immobilization of soybean (*Glycine max*)  $\alpha$ -amylase onto chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(1-2), 8-14.
- Kusiak, J.W., Quirk, J.M. and Brady, R.O.,** 1978, Purification and properties of the two major isozymes of  $\alpha$ -galactosidase from human placenta, *The Journal of Biological Chemistry*, 253(1): 184-190.
- Kuo, C.H, Liu, Y.C., Chang, C.J., Chen, J., Chang, C. and Shieh, C.,** 2011, Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2538-2545.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- 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.
- Li, J., Cai, J., Zhong, L. and Du, Y.,** 2011, Immobilization of a protease on modified chitosan beads for the depolymerization of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2697-2705.
- Liljestöm, P.L. and Liljeström, P.,** 1987, Nucleotid sequence of the melA gene, coding for  $\alpha$ -galactosidase in *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acid Research*, 15(5): 2213-2220.
- Linden, J.C.,** 2002, Immobilized  $\alpha$ -D-galactosidase in the sugar beet industry, *Enzyme and Microbial Technology*, 4(3), 130-136.
- Liu, X.C. and Scouten, W.H.,** 2000, Boronate affinity chromatography, *Affinity Chromatography Methods and Protocols*, 147, 119-128
- Liu, X.C., Hubbard, J.L. and Scouten, W.H.,** 1995, Synthesis and structural investigation of two potential boronate affinity chromatography ligands catechol [2-diisopropylamino)carbonyl] phenylboronate and catechol [2-(diethylamino)carbonyl, 4-methyl] phenylboronate, *Journal of Organometallic Chemistry*, 493(1-2), 91-94.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Liu, C., Tan, W., Zhang, D., Wang, Z., and Zhu, D.,** 2007, 4-(N,N-Dimethylamine)benzotrile (DMABN) derivatives with boronic acid and boronate groups: new fluorescent sensors for saccharides and fluoride ion, *Journal of Materials Chemistry*, 17, 1964-1968.
- Lopez-Gallego, F., Betancor, L., 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, 219-227.
- Lounteri, E., Alatalo, E., Siika-aho, M., Penttila, M. and Tenkanen, M.,** 1998,  $\alpha$ -Galactosidase of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGL1, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: 179-188.
- Maly, P., Ticha, M. and Kocourek, J.,** 1985, Studies on lectins, *Journal of Chromatography*, 347(3): 343-350.
- Mansour, E.H. and Khalil, A.H.,** 1998, Reduction of raffinose oligosaccharides in chickpea (*Cicer arietinum*) flour by crude extracellular fungal  $\alpha$ -galactosidase, *Journal of Science and Food Agriculture*, 78: 175-181.
- Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Archelas, A., Guisan, J.M. and Furstoss, R.,** 2007, Preparation of a very stable immobilized *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase, *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 1233-1238.
- Mathew, C.D. and Balasubramaniam, K.,** 1987, Mechanism of action of  $\alpha$ -galactosidase, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 24: 29-32.
- Miller, G.L.,** 1959, Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1985, Immobilization of thermostabile  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme, *Journal of Fermentation Technology*, 63(4), 325-329.
- Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1988, Isolation and identification of oligosaccharides produced from raffinose by transgalactosylation reaction of thermostabile  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cannibarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(9), 2305-2311.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1984, A simplified procedure for purification and crystallization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(12), 3153-3155.
- Monier, M., Ayad, D.M., Wei, Y. and Sarhan, A.A.,** 2009, Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads, *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 324-330.
- Nadkarni, M.A.; Nair, C.K.K.; Pandey, N.V. and Pradhan, D.S.,** 1992, Characterization of alpha-galactosidase from *Corynebacterium muresepticum* and mechanism of its induction, *Journal Genetic Application Microbiology*, 38, 23-34.
- 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  $\alpha$ -galactosidase I from *Vicia faba* seeds, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131(1): 1-7.
- Nagao, Y., Nakada, T., Imato, M., Shimamoto, T., Sakai, S., Tsuda, M. and Tsuchiya, T.,** 1988, Purification and analysis of the structure of  $\alpha$ -galactosidase from *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151(1): 236-241.
- Naundorf, A., Causette, M. and Ajisaka, K.,** 1998, Characterization of the immobilized  $\beta$ -galactosidase C from *Bacillus circulans* and the production of  $\beta$ (1,3)-linked disaccharides, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(7): 1313-1317.
- Nwagu, T.N., Aoyagi, H., Okolo, B.N. and Yoshida, S.,** 2012, Immobilization of a saccharifying raw starch hydrolyzing enzyme on functionalized and non-functionalized sepabeads, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 1-8.
- Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y.,** 1984, Purification and enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(5), 1319-1327.
- Ohtakara, A. and Mitsutomi, M.,** 1987, Immobilization of thermostabile  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus* on chitosan beads and its application to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses, *Journal of Fermentation Technology*, 65(4), 493-498.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Önal, Tatar S.**, 1994, Isolation and purification of  $\alpha$ -galactosidase by affinity ultrafiltration, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 60s.
- Önal, Tatar, S.**, 2000, Karpuz (*Citrullus vulgaris*)  $\alpha$ -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190s.
- Önal, S. and Telefoncu, A.**, 1998, Some properties of  $\alpha$ -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 sythesis of 6-0- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-deoxynojirimycin using  $\alpha$ -galactosidase from green coffea beans, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(3): 588-589.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Guisan, J.M. and Lafuente, R.F.**, 2003, The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. Complete hydrolysis of lactose in dairy products, *Enzyme and Microbial Tcehnology*, 33, 199-205.
- Porter, J.E., Herrmann, K.M. and Ladisch, M.R.**, 1990, Integral kinetics of  $\alpha$ -galactosidase purified from Glycine max from simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose, *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 15-22.
- Porter, J.E., Sarikaya, A., Herrmann, K.M. and Ladisch, M.R.**, 1992, Effect of pH on subunit association protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase, *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 609-614.
- Pressey, R.**, 1984, Tomato  $\alpha$ -galactosidases: Conversion of human type B erythrocytes to type O, *Phytochemistry*, 23(1): 55-58.
- Prlainović, N.Z., Knežević-Jugović, Z.D., Mijin, D.Z. and Bezbradica, D.I.**, 2011, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads(®): the effect of lipase oxidation by periodates, *Bioprocess Biosystem Engineering*, 34(7), 803-810.
- Ramamurthy, B., Data, D., Feng, H., Heritage, J.P. and Mukherjee, B.**, 1999, Impact of transmission impairments on the teletraffic performance of wavelength-routed optical networks, *Journal of Lightwave Technology*, 17(10), 1713 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Rietra, P.J.G.M., Molenaar, J.L., Hamers, M.N., Tager, J.M. and Borst, P.;** 1974, Investigation of the  $\alpha$ -galactosidase deficiency in Fabry's Disease using antibodies against the purified enzyme, *European Journal of Biochemistry*, 46, 89-98.
- Rodrigues, D. S., Mendes, A. A., Adriano, W. S., Goncalves, L. R. B., Raquel and Giordano, LC.,** 2007, Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(3-4), 100-109.
- Saini, H.S.;** 1988, Extractability and evaluation of  $\alpha$ -galactosidase of sucrose in leguminous seeds, *Food Chemistry*, 28(2): 149-157.
- Shen, W., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J., Deng, L., Chen, H., Yuan, C., Li, D. and Li, X.,** 2008, New source of  $\alpha$ -d-galactosidase: Germinating coffee beans, *Food Chemistry*, 110(4), 962-966.
- Shepherd, R., Reader, S. and Falshaw, A.,** 1997, Chitosan functional properties, *Glycoconjugate Journal*, 14(4), 535-42.
- Shivanna, B.D., Ramakrishna, M. and Ramadoss, C.S.,** 1989, Enzymatic hydrolysis of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), *Process Biochemistry*, December: 197-199.
- Shivanna, B.D., Ramakrishna, M. and Ramadoss, C.S.,** 1990, Purification and properties of the anionic form of  $\alpha$ -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), *Plant Science*, 72: 173-180.
- Shivam, K. and Mishra, S.K.,** 2010, Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -galactosidase with transglycosylation activity from *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796, *Process Biochemistry*, 45(7), 1088-1093.
- Singh, N. and Kayastha, M.,** 2012, *Cicer*  $\alpha$ -galactosidase immobilization onto chitosan and Amberlite MB-150: optimization, characterization, and its applications, *Carbohydrate Research*, 358, 61-66.
- Sirisha,E., Naveen, A., Bharghav,V. and Narasu, M.L.,** 2010, , Screening and isolation of intracellular  $\alpha$ -galactosidase producing microorganisms from sugarcane waste soil, *The Bioscan*, 5(4), 579-582.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Slominski, B.A.**, 1994, Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -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  $\alpha$ -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours, *Journal of Science Food Agriculture*, 61, 339-343.
- Soh, C., Mohd Ali, Z. and Lazan, H.**, 2006, Characterisation of an  $\alpha$ -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes, *Phytochemistry*, 67(3), 242-254.
- Springsteen, G. and Wang, B.**; 2002, A detailed examination of boronic acid-diol complexation, *Tetrahedron*, 58(26): 5291-5300.
- Springsteen, G., Yang, W., Yan, J., Deeter, S. and Wang, B.**, 2003, A novel type of fluorescent boronic acid that shows large fluorescence intensity changes upon binding with a carbohydrate in aqueous solution at physiological pH, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(6), 1019-1022.
- Stryer, L., Berg, J.M. and Tymoczko, J.L.**, 2005, *Biochemistry*, Freeman, New York, 190p.
- Sundaram, S. and Yarmush, M.L.**; 1993, Affinity Separation, Biotechnology, edited by Rehm, H.J. and Read G.; Verlag, Chemie-Weinheim, 3, 643 p.
- Svastits-Dücső, L., Nguyen, Q.D., Lefler, D.D. and Rezessy-Szabó, J.M.**, 2009, Effects of galactomannan as carbon source on production of  $\alpha$ -galactosidase by *Thermomyces lanuginosus*: Fermentation, purification and partial characterisation, *Enzyme and Microbial Technology*, 45(5), 367-371.
- Talbot, G. and Sygusch, J.**, 1990, Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11): 3505-3510.
- Takayanagi, T.; Kushida, K.; Idonuma, K. and Ajisaka, K.**; 1992, Novel N-linked oligo-mannose type oligosaccharides containing an  $\alpha$ -D-galactofuranosyl linkage found in  $\alpha$ -D-galactosidase from *Aspergillus niger*, *Glycoconjugate Journal*, 9: 229-234.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Telefoncu, A.;** 1986, Enzimolojinin prensipleri, 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.;** 1997, İmmobilize enzimler, Enzimoloji (Yaz okulu), editor A. Telefoncu, 193s.
- Telefoncu, A., Zihnioğlu, F., Önal, Tatar, S., Dinçkaya, E. and Denizci, A.A.,** 1998, Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus thermophilus* HB8, *Journal of Faculty of Science Ege University*, 21(2): 55-67.
- Terbojevich, M. and Muzzarelli, R.A.A.,** 2000, Chitosan. In G. Phillips & P. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids*, Cambridge, UK: Woodhead, 367–378.
- Thanankul, D., Tanaka, M., Chichester, C.O. and Lee, J.,** 1976, Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*, *Journal of Food Science*, 41: 173-175.
- Torres, P. and Batista-Viera, F.,** 2011, Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, 230-235.
- Uslan, A.A.,** 1997, Enzimlerin etki mekanizmaları ve aktif merkez tayini, Enzimoloji (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 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  $\alpha$ -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 coffee bean  $\alpha$ -galactosidase, *Nature*, 195, 1204-1206.
- Weiser, W., Lehmann, J., Matsui, H., Brewer, C.E. and Hehre, J.E.;** 1992, Stereochemistry of D-galactal and D-galacto-octenikol hydration by coffee bean  $\alpha$ -galactosidase: insight to catalytic functioning of the enzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(2), 493-498.
- Wuolijoki, E., Hirvelä, T. and Ylitalo, P.,** 1999, Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan, *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 21(5), 357-361.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wong, H., Hu, C., Yeh, H., Su, W., Lu, H. and Lin, C.,** 1986, Production, purification and characterization of alpha-galactosidase from *Monascus pilosus*, *Applied and Environmental Microbiology*, November: 1147-1152.
- Yanahira, S., Yabe, Y., Nakakoshi, M., Miura, S., Matsubara, N. and Ishikawa, H.;** 1998, Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(9),: 1791-1794.
- Yasuda, K., Chang, H.H., Wu, H.L. and Ishii S,** 2004, Efficient and rapid purification of recombinant human alpha-galactosidase A by affinity column chromatography, *Protein Expression and Purification*, 37, 499-506.
- Yi, S., Lee, C., Kim, J., Kyung, D., Kim, B. and Lee, Y.,** 2007, Covalent immobilization of  $\omega$ -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 on chitosan beads, *Process Biochemistry*, 42(5), 895-898.
- Yoshida, S., Tan, C.H., Shimakawa, T., Turakainen, H. and Kusakabe, I.,** 1987, Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from yeasts, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(2): 359-361.
- Yoshimitsu, M., Higuchi, K., Miyata, M., Devine, S., Mattman A., Sirrs, S., Medin, J. A., Tei, C. and Takenaka, T.,** 2010, Identification of novel mutations in the  $\alpha$ -galactosidase gene in patients with Fabry disease: Pitfalls of mutationanalyses in patients with low  $\alpha$ -galactosidase activity, *Journal of Cardiology*, 57(3), 345-353.
- Yoon, M.Y. and Hwang, H.J.,** 2008, Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteriodes* JK55, *Food Microbiology*, 25(6), 815-823.
- Zaprometova, O.M. and Ulezlo, I.V.,** 1988, Isolation and purification of a mold  $\alpha$ -galactosidase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10: 232-241.
- Zihniöğlu, F.,** 1996, Elektroforetik yöntemler, Protein Saflaştırması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 150s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Zeilinger, S., Kristufek, D., Atac, L.A, Hodits, R. and Kubicek, C.P.,** 1993, Conditions of formation, purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30, *Applied and Enviromental Microbiology*, 59(5): 1347-1353.
- Zhu, A. and Goldstein, J.,** 1994, Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffea bean  $\alpha$ -galactosidase, *Gene*, 140: 227-231.
- Zhu, A.; Wang, Z.K. and Goldstein, J.,** 1995, Identification of tyrosine 108 in coffea bean  $\alpha$ -galactosidase as an essential residue for the enzyme activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247: 260-264.
- Žuža, M., Milosavić, N. and Knežević-Jugović, Z.,** 2008, Immobilization of modified penicillin G acylase on Sepabeads carriers, *Chemical Papers*, 63(2), 117-124.



**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı** : Tuğba  
**Soyadı** : DEMİR  
**Doğum Tarihi** : 27/11/1986  
**Doğum Yeri** : İzmir  
**Uyruğu** : T. C.  
**Adrses** : 6753/19 sok. No:15 Daire:13 Karşıyaka-İzmir  
**GSM** : 0533 432 00 99  
**e-mail** : [tugba\\_dem86@hotmail.com](mailto:tugba_dem86@hotmail.com)

**Eğitim Durumu:**

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı : 2009 – 2012  
(Yüksek Lisans)  
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü : 2004 – 2009  
Karşıyaka Anadolu Lisesi : 2000-2004

**İş Tecrübesi ve Stajlar :**

Rasyonel Kimya Ltd. Şti (11. 2010 - 05. 2011)  
Pfizer İlaçları Ltd. Şti. (07. 2008 - 09. 2008)  
İzmir Ticaret Borsası Gıda Analiz Laboratuvarı (07. 2007 – 09. 2007)  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı (08. 2006 - 09. 2006)

**Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:**

$\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu için Biyoafinite Temelli İmmobilizasyon Prosedürlerinin Geliştirilmesi (Danışman: Prof. Dr. Seçil ÖNAL).

**Makale ve Poster:**

1. Çalıcı, E., Demir, T., Bıçak Çelem, E., Önal, S., Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70: 123-127, 2009.
2. A.S. Şahutoğlu, T. Demir, Y. Ensari, S. Önal, N. Pazarlıoğlu, *Pycnopus cinnabarinus*' tan derin kültür yöntemi ile  $\alpha$ -D-Galaktozidaz üretimi, XVI.Biyoteknoloji Kongresi, 13- 16 Aralık 2009, Antalya.

**Katıldığı Eğitimler:**

- Intellectual Property Biotechnology and Business

(Justus-Liebig UNIVERSİTAT German - 14.08.2010)

- ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi

(Egesan Ziraat Mühendislik, Danışmanlık Hizmetleri - 08.03.2009)

**Yabancı Dil:**

İngilizce : İyi derecede

**Bilgisayar :**

Microsoft Office, İnternet.