

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**$\alpha$ -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ  
SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

**Hasan BAYRAKTAR**

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

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu:405.05.01**

**Sunuş Tarihi:13.06.2011**

**Bornova - İZMİR**

**2011**

Hasan BAYRAKTAR tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “ $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Üçlü Faz Sistemi İle Saflaştırılması” 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 13/06/2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza**

**Jüri Başkanı** : .....  
**Raportör Üye** : .....  
**Üye** : .....

**ÖZET** **$\alpha$ -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

BAYRAKTAR, Hasan

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Seçil ÖNAL

Haziran 2011, 75 sayfa

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

Bu çalışmada, karpuzdan (*Citrullus vulgaris*) izole edilen  $\alpha$ -D-galaktozidaz enzimi üçlü faz ayırma (Three Phase Partitioning; TPP) sistemi kullanılarak saflaştırıldı. TPP sisteminde organik çözügen olarak t-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat kullanıldı. TPP sistemini optimize etmek ve enzimi iyi bir verimle saflaştırabilmek için sistemi etkileyen temel parametreler (amonyum sülfat doygunluğu, enzim/t-bütanol oranı ve pH) incelendi. Saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi karakterize edildi. Bu amaçla, enzim aktivitesine ve kararlılığına sıcaklık ve pH'ın etkisi incelenerek kinetik sabitler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) belirlendi. Enzimin saflığını belirlemek ve molekül kütlelerini tayin etmek için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı.

Optimize edilen koşullarda (%50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:1ham ekstrakt/t-bütanol oranı (v/v) ve pH 5,5) hazırlanan TPP sistemi ile  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi %76.7 aktivite verimi ile 2.67 kat saflaştırıldı. TPP sisteminden elde edilen enzimin molekül kütleleri SDS-PAGE analizi ile 45 kDa olarak belirlendi. Enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH 'sı sırasıyla 60°C ve pH 6 olarak belirlendi. Saflaştırılan enzimin, 4-50°C ve pH 4.0-6.5 aralığında

oldukça kararlı olduğu belirlendi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk diyagramından sırasıyla 0.22 M ve 0.14 U olarak hesaplandı. TPP,  $\alpha$ -galaktozidazların saflaştırılmasında kullanılabilir basit, hızlı, ekonomik ve oldukça ilgi çekici bir prostestir.

**Anahtar Kelimeler:** Üçlü-faz sistemi, TPP, *Citrullus vulgaris*,  $\alpha$ -galaktozidaz, karpuz, protein izolasyon ve saflaştırması.

**ABSTRACT****PURIFICATION OF  $\alpha$ -GALACTOSIDASE BY THREE-PHASE PARTITIONING**

BAYRAKTAR, Hasan

Msc. in Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Seçil ÖNAL

June 2011, 75 pages

$\alpha$ -Galactosidases ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) are a common class of hydrolases which are widely distributed in nature. They have been isolated and purified with different techniques from various sources, such as plants, animals and microorganisms. These enzymes catalyses the hydrolysis of  $\alpha$ -1,6-galactose bonds which found in galactooligosaccharides and polysaccharides. They are very useful enzymes, especially for elucidation of the biological functions of complex carbohydrates, for organic synthesis, for structural analysis, for medical purpose and in sugar industry.

In this study,  $\alpha$ -D-galactosidase isolated from watermelon (*Citrullus vulgaris*) was purified by three-phase partitioning (TPP). In this TPP system, t-butanol was used as organic solvent and ammonium sulfate was as a salt. Various parameters (ammonium sulfate saturation, enzyme/t-butanol ratio and pH) required for the efficient purification of the enzyme were optimized to get highest yield. The purified enzyme was also characterized. For this aim, the effect of pH and temperature on the activity and stability of the enzyme and determination of kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were also investigated. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis was performed to determine the purity and molecular weight of the enzyme.

Under optimised conditions (50% (w/v) ammonium sulfate saturation, 1:1 crude extract to t-butanol ratio (v/v) and pH 5,5)  $\alpha$ -galactosidase was purified to

2.6-fold with 76.68% activity recovery. The enzyme obtained from TPP showed considerable purification on SDS-PAGE with a molecular weight of 45 kDa. The optimum temperature and pH were determined as 60°C and pH 6, respectively. The purified enzyme was also very stable at a temperature range of 4-50°C and a pH range of 4-6.5. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were calculated from Lineweaver-Burk plot as 0.22 M and 0.14 U, respectively. TPP, is a simple, quick, economical and very attractive process for purification of  $\alpha$ -galactosidases.

**Key words:** Three-phase partitioning, TPP, *Citrullus vulgaris*,  $\alpha$ -galactosidase, watermelon, isolation and purification of proteins

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın yürütülmesinde, laboratuvar çalışmalarından yazım aşamasının tamamlanmasına kadar teorik ve pratik anlamda her türlü yardımı benden esirgemeyen, kendi yoğun işlerinin arasında bana zaman ayırıp ihtiyaç duyduğum her türlü bilgiyi bana sunan değerli danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Seçil ÖNAL** 'a çok teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü konuda yardımcı olan Sayın **Taylan KARKAŞ** 'a ve **Evrans BİÇAK ÇELEM** 'e, SDS-PAGE analizlerinde bana yardımcı olan Araş. Gör. **Ali ZEYTUNLUOĞLU** 'na, her türlü desteği ile tezim boyunca yanımda olan arkadaşlarım Mecit SHAKIROV 'a, Nemet ŞAKİROV 'a, Eray Metin GÜLER 'e, Tuğba DEMİR 'e, Esin ÇALCI 'ya ve İsmail BAYSAL 'a, yüksek lisans eğitimim boyunca bana en iyi biyokimya eğitimini verdiğine inandığım değerli bölüm hocalarıma ve her an desteğini hissettiğim saygıdeğer aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafında 2010 FEN 006 nolu proje ile desteklenmiştir.

**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 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
1.1.6 $\alpha$ -Galaktozidazların fizyolojik önemi ve uygulama alanları.....	22
1.2 Üçlü Faz Ayırma (Three Phase-Partitioning, TPP) Sistemleri .....	26
1.2.1 TPP'nin kullanım alanları.....	28



**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
1.2.2 TPP'nin avantajları.....,	28
1.2.3 TPP'yi etkileyen parametreler.....	28
1.2.4 TPP'nin optimizasyonu.....	29
2. MATERYAL ve METOD.....	30
2.1 Materyal.....	30
2.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini.....	30
2.3 Protein Tayini.....	31
2.4 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.....	32
2.5 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının Üçlü Faz Ayırma Sistemi ile Saflaştırılması.....	32
2.6 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının Karakterizasyonu.....	33
2.6.1 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül kütle tayini.....	33
2.6.2 $\alpha$ -Galaktozidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	36
2.6.3 $\alpha$ -Galaktozidazın optimum pH 'ının belirlenmesi.....	37
2.6.4 $\alpha$ -Galaktozidazın kinetik sabitlerinin tayini.....	37
2.6.5 Kararlılık testleri.....	37

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
3.1 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karpuzdan ( <i>Citrullus vulgaris</i> ) İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.....	39
3.2 Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Karpuz ( <i>Citrullus vulgaris</i> ) $\alpha$ - Galaktozidazının Saflaştırılması.....	40
3.3 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının Karakterizasyonu.....	51
3.3.1 SDS-PAGE analizi.....	51
3.3.2 $\alpha$ -Galaktozidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi .....	52
3.3.3 $\alpha$ -Galaktozidazın optimum pH 'ının belirlenmesi.....	53
3.3.4 $\alpha$ -Galaktozidazın kinetik sabitleri.....	54
3.3.5 Kararlılık Testleri.....	55
3.4 $\alpha$ -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) TPP Sisteminin Genel Olarak Değerlendirilmesi.....	58
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Genel reaksiyon mekanizması.....	4
1.2 İki adımlı mekanizma.....	9
1.3 Tek adımlı mekanizma.....	9
1.4 Genel TPP metodu.....	27
3.1 $\alpha$ -Galaktozidazın TPP ile saflaştırılmasında farklı tuzların etkisi (Ham enzim ekstraktına(2 ml, 0.373 U) önce %50 (w/v) doygunlukta tuz ve ardından 1:1 (v/v) oranında t-bütanol eklendi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı).....	43
3.2 $\alpha$ -Galaktozidazın TPP ile saflaştırılmasında farklı organik çözenlerin etkisi (Ham enzim ekstraktına (2 ml, 0.373 U) önce %50 (w/v) doygunlukta amonyum sülfat ve ardından 1:1 (v/v) oranında organik çözen eklendi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı).....	44
3.3 Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U), % 20 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayrımı gerçekleştirildi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].....	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U), % 30 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].....	46
3.5 Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U), % 40 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].....	46
3.6 Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U), % 50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].....	47
3.7 Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U), % 60 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2,	

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].....	48
3.8 $\alpha$ -Galaktozidazın üçlü faz ayırma sisteminde ayırımına sistem pH 'sının etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U) % 50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve sistemin pH'sı 3; 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5 ve 7 değerlerine ayarlanarak enzim:t-bütanol oranı 1:1 (v/v) olacak şekilde bütanol eklendi ve faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].....	49
3.9 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE analizi [A; Moleküler kütle standartları (14-66 kDa), B; TPP ile saflaştırılan $\alpha$ -galaktozidaz (orta faz), C; Ham enzim ekstraktı (%85 'lik amonyum sülfat fraksiyonu)].....	50
3.10 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının optimum sıcaklık grafiği.....	53
3.11 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH grafiği.....	54
3.12 PNPG konsantrasyonunun karpuz $\alpha$ -galaktozidazının aktivitesine etkisi.....	55
3.13 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının Lineweaver-Burk diyagramı.....	55
3.14 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının termal kararlılığı .....	56
3.15 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının ön inkübasyon süresine bağımlı Termal kararlılığı.....	57

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.16 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının pH kararlılığı .....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Oligosakkarit yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bazı ekzoglikozidazlar.....	3
1.2 $\alpha$ -Galaktozidazların molekül kütleleri.....	14
1.3 $\alpha$ -Galaktozidazların substrat spesifiklikleri.....	16
1.4 $\alpha$ -Galaktozidazların termal kararlılıkları.....	19
1.5 $\alpha$ -Galaktozidazların optimum pH değerleri.....	20
2.1 Polimerizasyon protokolü (İki jel için).....	35
3.1 Karpuz $\alpha$ -galaktozidazının üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırma sonuçları (% 50 (w/v) amonyum sülfat, 1:1 enzim:t-bütanol oranı, pH 5.5).....	50

## 1. GİRİŞ

$\alpha$ -D-Galaktozidazlar ( $\alpha$ -D-galaktozil 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 çıkılarak hazırlanan  $\alpha$ -D-galaktozidaz preparatları ile hidrolizlenerek önemli oranda ekonomi sağlamaktadır. Bu nedenle  $\alpha$ -D-galaktozidazın çeşitli kaynaklardan en ekonomik ve verimli şekilde izolasyonu ve saflaştırılması 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-glukoz 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-glukoz bağlarını,  $\alpha$ -galaktozidaz ise  $\alpha$ -1,6-galaktoz bağını 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.

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), hyaluronidaz (EC 3.2.1.45), lizozim (EC 3.2.1.17) ve pullulanaz (EC 3.2.1.41) dir. Ekzoglikozidazlar ise sadece terminal artıklar üzerinde etkilidirler. Bunlar;  $\beta$ -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) dir (Önal, 1994; Agrawall and Bahl, 1968).

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

<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

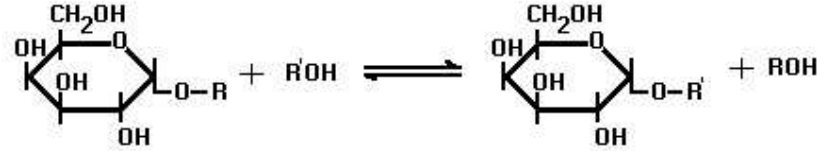
bazısı  $\alpha$ -L-arabinozidler de hidrolizlemektedir (Bergmeyer, 1973; Gaudreault and Webb, 1983; Harpaz et al., 1987).

### 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., 1987; Guiseppin et al., 1993):

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

Şekil 1'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 (Nadkarni et al., 1992; Wong et al., 1986; Talbot and Sygusch, 1990; Lopez-Gallego et al., 2004; Galili et al., 1985; Zeilinger et al., 1993; Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Telefoncu et al., 1998), hayvansal dokular (Dhar et al., 1993; Dean and Sweely, 1979a; 1979b; Alonso et al., 2005; Bishop and Desnick, 1981) ve bitkilerden (Dey, 1984; Zhu and Goldstein, 1994; Chien and Lin-Chu, 1991; Haibach et al., 1991; Itoh et al., 1986; Kusiak et al., 1978; Burns, 1990; Shivanna, 1990; Balasubramaniam and Mathew, 1986; Cuourtois and Petek, 1988; Dey et al., 1983; Zhu et al., 1995; Naik et al., 1985; Önal and Telefoncu, 1998) farklı biyokimyasal teknikler kullanılarak izole edilip saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma çalışmalarının yanında  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları ise oldukça az sayıdadır. Mikrobiyal kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları (Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987) ise daha çok endüstriyel olarak kullanım alanı bulmuştur (Mitsutomi and Ohtakara, 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Mansour and Khalil, 1998).

$\alpha$ -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; Neustroev et al., 1993; Ibatullin et al., 1993; Takayanagi et al., 1992), enzimatik sentezlerde (Galili et al., 1985; Hashimoto et al., 1993; Cantacuzene and Attal, 1991), transglukozilasyon reaksiyonlarında (Hashimoto et al., 1993; Golubev and Neustroev, 1993; Mitsutomi and Ohtakara, 1988), çeşitli polimerlerin sentezinde (Bulpin et al., 1990) ve hayvanlar ile insanlarda midede gaz oluşumuna neden olan rafinoz oligosakkaritlerin (rafinoz, stakiyöz ve verbaskoz) hidrolizinde (Gaudreault and Webb, 1983; Mansour and Khalil, 1998; Thanankul et al., 1976; Porter et al., 1990; Shivanna et al., 1989; Ohtakara et al., 1984; Somiari and Balogh, 1993) kullanabilecek uygun bir preparattır.

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 (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 oldukça büyük bir önem ve hız kazanmıştır. Saflaştırılan enzimin oldukça büyük miktarda üretilmesi 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 homologluğu 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 spesifikliği 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 kinetiği hakkındaki

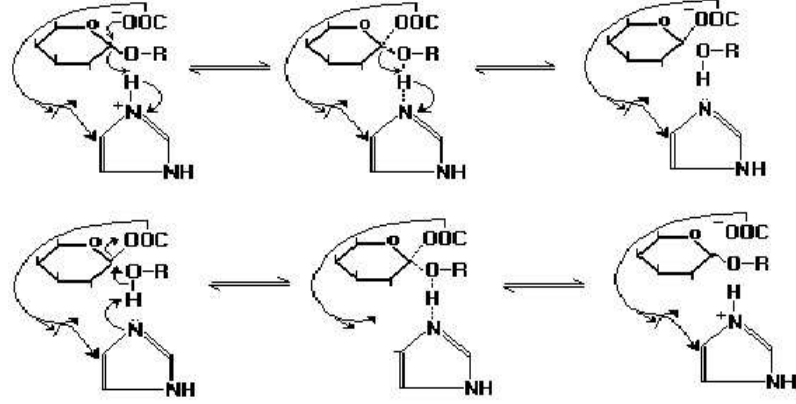
bilgilerin yetersizliğinden dolayı  $\alpha$ -galaktozidaz etki mekanizmasına ait çok az gerçek bilinmektedir.

$\alpha$ -Galaktozidazlarla ilgili hemen hiçbir bağ kopması çalışması yapılmamıştır. Fakat diğer glikozidazlar düşünüldüğünde, substratın galaktoz-oksijen bağları büyük olasılıkla kopmaktadır. Nükleer manyetik rezonans (NMR) ve polarimetri çalışmaları serbest galaktozil artıklarının substrat ile aynı anomerik konfigürasyona sahip olduklarını göstermiştir (Dey and Pridham, 1972; Mathew and Balasubramaniam, 1987). Eğer  $C_1$  karbon atomunda iki ardışık inversiyon varsa ya da sadece bir yandaki nükleofil ile bağlanabilen bir karbonyum iyonu varsa konfigürasyon korunur. Konfigürasyonun korunması da çok adımlı bir dizi reaksiyondan ibarettir (Mathew and Balasubramaniam, 1987).

Asit-baz katalizi fumaraz, maltaz, maya invertazı,  $\beta$ -galaktozidaz gibi enzim sistemlerinde etkilidir. Aril- $\alpha$ -galaktozidler ile tatlı badem  $\alpha$ -D-galaktozidazında yapılan spesifiklik çalışmaları, aglikonun elektronik yapısının enzimatik hidroliz hızında dikkate değer bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.  $\log V_{max}$ , aromatik halka üzerindeki substituentleri Hammett sabitlerine ( $\sigma$ ) karşı grafiğe geçirildiğinde iki düz çizgi ( $\rho = -0.054$  ve  $-1.5$ ) elde edilmiştir. Bunlar fenil- $\alpha$ -galaktozide ( $\sigma = 0$ ) karşı gelen noktada kesilir. Bu arilglukozidazlarının alkali ve asit hidrolizine benzer ve bu yüzden aktif merkezdeki bazik ve asidik grupların varlığı olarak yorumlanabilir. Yapılan kinetik çalışmalarda bu grupların sırasıyla karboksil ve imidazol olduğu belirlenmiştir. Metilen mavisi varlığındaki fotooksidasyon ve  $Ag^+$  iyonları ile inhibisyon da bu yorumları desteklemiştir. Buna benzer bir durum *Vicia faba*  $\alpha$ -galaktozidazında görülmüştür. Tatlı badem  $\alpha$ -galaktozidazı ile yapılan çalışmalarda p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozidin aktif merkeze bağlanmasının asidik bölgedeki grubun  $pK'$ 'sını düşürdüğü, pH optimumunun alkali bölgesinde grup ayrılma değerlerini arttırdığı görülmüştür. Enzim molekülündeki substrat ile yapılmış değişikliklerin enzimin pH aralığını genişlettiği görülmüştür (Dey and Pridham, 1972).

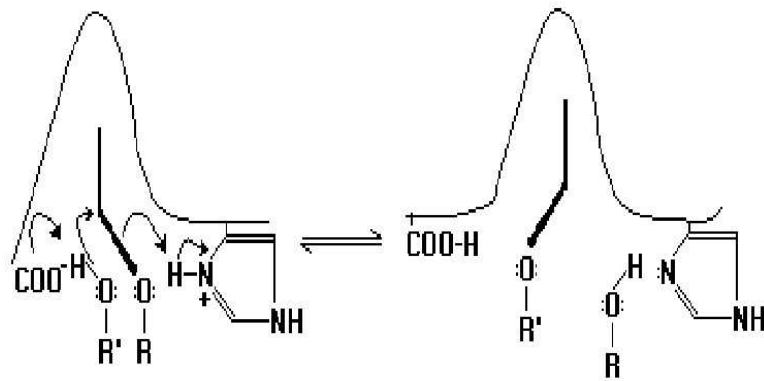
Bu sonuçlara dayanarak tatlı badem  $\alpha$ -galaktozidazının etki mekanizması ile ilgili olarak iki adımlı bir mekanizma önerilmiştir. Burada aglikon, karboksil ve imidazol gruplarının anlaşılabilir etkisiyle ayrılır. Sonra su ya da alifatik alkol olabilen bir akseptör molekülün ( $R' OH$ ) reaksiyonu ile devam eder ve transfer ya da hidroliz ürünleri oluşumu ile son bulur. Büyük olasılıkla imidazol grubunun elektrofilik bir atağı glikozil-oksijen bağını parçalamak için yeterli olur. Galaktoz kısmının  $C_1$ -karbonunda bir karbonyum iyonu oluşur. Tüm iki adımlı

mekanizmada büyük olasılıkla iki Walden inversiyonu oluşur, son üründe anomerik konfigürasyonun korunması ile sonuçlanır. Karbonyum iyonu oluşumu ister istemez rasemizasyona gerek duymaz. Konfigürasyon bir ara molekülün enzime spesifik olarak bağlanması ile stabilize edilebilir (Şekil 1.2) (Dey and Pridham, 1972).



Şekil 1.2 İki adımlı mekanizma.

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



Şekil 1.3 Tek adımlı mekanizma.

Fenil- $\alpha$ -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. pozisyonunda), 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 en etkili, en 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 odaklama 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 portakal (Burns, 1990), domates (Önal and Telefoncu, 1998; Pressey, 1984), hindistan cevizi (Lounteri et al., 1998), soya fasulyesi (Porter, 1992), karpuz (Itoh, 1986), kahve tohumu (Weiser, 1992), mercimek (Dey et al., 1983), alacalı at fasulyesi (*Phaseolus vulgaris*) (Dhar et al., 1994), maş fasüyesi (*Vigna radiata*) (Dey, 1984) ve legümlü bitki [69], hayvansal kaynak olarak insan plasentası (Kusiak et al., 1978) ve insan karaciğeri (Dean and Sweely, 1979a; 1979b; Alonso et al., 2005), mikrobiyal kaynak olarak *Candida guilliermondii* H404 (Hashimoto et al., 1993), *Pycnopus cinnabarinus* (Ohtakara, 1984), *Bacillus stearothermophilus* (Talbot and Sygusch, 1990), *Aspergillus niger* (Somari and Balogh, 1993), *Penicillium simplicissimum* (Lounteri et al., 1998), *Mortierella vinacea* (Thanankul et al., 1976), *Escherichia coli* (Nagao et al., 1988), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (Zeilinger et al., 1993; Kristufek et al., 1994), *Candida javanica* (Cavazzoni et al., 1987) ve *Monascus pilosus* (Wong, 1986), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) ve *Humicola sp.* (Kotwal et al., 1999) 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 (Balasubramaniam and Mathew, 1986; Thanankul et al., 1976).

#### **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 Laemmler tarafından geliştirilen Sodyum Dodesil Sülfat PoliAkrilamid Jel Elektroforezidir (SDS-PAGE) (Laemmler, 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). *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). *Pycnopus 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 külesine 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 külesine 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.

$\alpha$ -Galaktozidaz Kaynağı	$\alpha$ -Galaktozidaz	Molekül kütlesi(kDa)	Yöntem
<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 kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir (Yoshida et al., 1987).

Enzimlerin substrata olan afinitesi ( $1/K_m$ ), büyük ölçüde glikon yapısındaki yapısal değişikliklere bağlıdır ve yapıya göre şu sıra izlenir:  $\alpha$ -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 hidrasyon 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 arttırılarak 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>Cucurbito 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
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	$\alpha$ -Galaktozidaz	p-nitrofenil- $\alpha$ -D- galaktopironozid	0,31

<i>Candida guilliermondii</i> H404	$\alpha$ -Galaktozidaz I	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,6
		o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,73
	$\alpha$ -Galaktozidaz II	Melibioz	3,6
		Rafinoz	17
		Stakiyöz	11
		o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,61
		p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktozid	0,65

### **1.1.5.2 $\alpha$ -Galaktozidaz aktivitesi ve kararlılığına sıcaklığın etkisi**

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi, enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağlıdır ve reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış gösterir. Fakat bu artış sürekli değildir. Özellikle 40°C' nin üzerinde inkübasyon süresine bağımlı olarak önce bir duraklama, daha sonra da gerileme gösterir. Ana yapısı protein olan enzimler sıcaklıkla denaturasyona uğrarlar. Belirli çalışma koşullarında farklı sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Optimum sıcaklık inkübasyon süresine bağımlı bir parametredir (Telefoncu, 1986).

$\alpha$ -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), *Bacillus thermophilus* (Talbot and Sygusch, 1990), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (Zeilinger et al., 1993), *Monascus pilosus* (Wong et al., 1986), *Thermus thermophilus* HB8 (Telefoncu et al., 1998) için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 75, 60, 60, 55 ve 80°C olarak belirlenmiştir. *Cladosporium cladosporides*  $\alpha$ -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-galaktopyranozid (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 değer rapor edilmiş  $\alpha$ -galaktozidazlar arasında en yüksek sıcaklık değeri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, enzimin 100°C’ de bile aktivitesini % 85 koruduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık optimumuna sahip olması ve termostabil olması nedeniyle *T. thermophilus* HB8  $\alpha$ -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). Çizelge 1.4’de çeşitli  $\alpha$ -galaktozidazların termal kararlılıkları ile ilgili bazı sonuçlar verilmiştir (Önal, 2000).

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

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

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

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden en önemlisi pH etkisidir. İnkübasyon ortamının pH'sı, protein molekülünün tamamının yük ve dissosiasyon durumu yanında aktif merkezi de etkilemektedir. pH etkisi özellikle şu sonuçlara neden olmaktadır: enzim proteinin tersinir olmayan denaturasyonu ve optimum pH bölgesi dışında koenzim veya prostetik grupların aktif merkezden ayrılması. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH, optimum pH'dır. H<sup>+</sup> iyonu konsantrasyonundaki değişme özellikle aktif merkezinde asidik veya bazik gruplar taşıyan anzimler, 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'ın 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 kararlıdır (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 kararlıdır. 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'ın 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 substratlarından 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	PNP- $\alpha$ -galaktozid	5,7
Ananas	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	5,5
Portakal	$\alpha$ -galaktozidaz I $\alpha$ -galaktozidaz II	PNP- $\alpha$ -galaktozid	5,0 4,5

<i>Phaseolus vulgaris</i>	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	6,4
<i>Lens culinaris</i>	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	6,1
	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	4,7
<i>Vigna radiata</i>	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	5,5-6,0
<i>Citrullus battich</i>	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	5,8
		4 MU- $\alpha$ -galaktozid	6,0
		Rafinoz	3,5-5,5
		Melibioz	
		Stakiyöz	
Kahve tohumu	$\alpha$ -galaktozidaz	PNP- $\alpha$ -galaktozid	6,0
<i>Colocasia esculenta</i>	$\alpha$ -galaktozidaz	PNPG	6,0
<i>Candida guilliermondii</i> H404	$\alpha$ -galaktozidaz I	PNP- $\alpha$ -galaktozid	4,5
	$\alpha$ -galaktozidaz II		
<i>Bacillus</i> <i>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	4MU- $\alpha$ -D-galakto- piranozid	4,4
Domuz karaciğeri	$\alpha$ -galaktozidaz	Fenil- $\alpha$ -D-galaktozid	5,2
Fare beyni	$\alpha$ -galaktozidaz	PNP- $\alpha$ -D-galaktozid	4,9
Fare karaciğeri	$\alpha$ -galaktozidaz	2-naftil- $\alpha$ -D-galaktozid	4,0-4,5

### 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 adımında 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)-galaktozidazları 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 [45]. Kahve çekirdeği  $\alpha$ -galaktozidazı kullanılarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozidden 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 antihiperlipidemik ve tükürük salgısı ajanı olarak önemli bir bileşiktir (Paek et al., 1998). İmmobilize edilmiş *Bacillus circulans*  $\beta$ -galaktozidazının transglükosilasyon 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 tōropatik 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 çalışmalarını 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 kullanılabilecektir. 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 20 yıldan beri 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 Üçlü Faz Ayırma (Three Phase Partitioning, TTP) Sistemleri

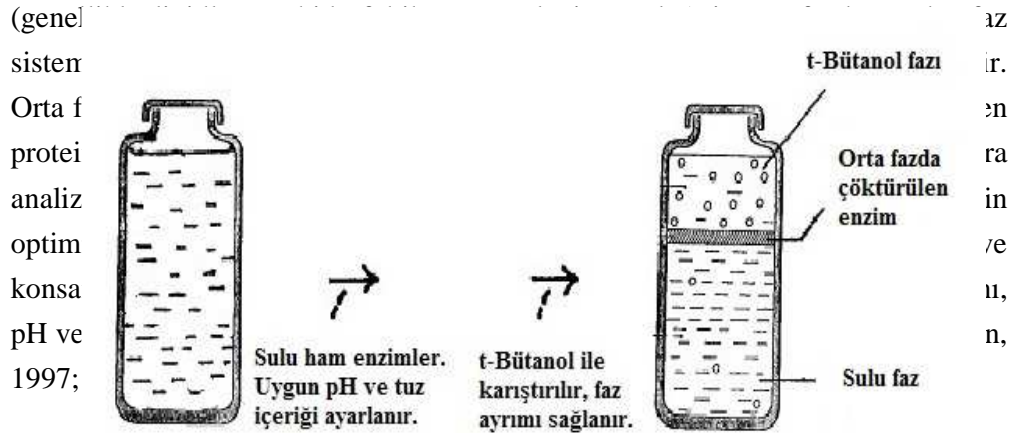
Özellikle çok sayıda bileşenden oluşan ham preparatlarda proteinlerin ayırma ve izolasyonu hala oldukça zordur ve bu nedenle günümüzde bu amaçlar için yeni biyoayırma yöntemleri geliştirilmektedir. Mevcut kullanılan geleneksel yöntemlerin çoğu hem oldukça pahalı, hem de zaman alıcıdır. Ayrıca çoğu kez ön işlemlere gereksinim duyulmaktadır. Son elli yıldır, araştırmacılar protein geri kazanımı ve saflaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemlerine ilgi duymaktadırlar. İkili ve üçlü faz ayırma sistemleri proteinlerin etkin bir şekilde yüksek verimle saflaştırılabilmesine olanak sağlayan ve çok geniş kullanım alanı olan yeni sıvı-sıvı biyoayırma teknikleridir.

Üçlü faz ayırma (TPP) tekniği özellikle enzim ve proteinlerin ayırımında son yıllarda oldukça başarılı bir şekilde kullanılabilen basit ve çoğu kez tek adımlı bir prosedürdür. Teknik kromatografik yöntemlerin zahmetli ve zaman alıcı prosedürlerine ihtiyaç duymaz. TPP 'de sulu çözeltilerden protein ve enzimleri ayırmak için bir tuz ve organik çözen kullanılır.

TPP, iki ya da daha fazla bileşiğin ya da grubun, tek basamaklı ekstraksiyon ile ayırımını gerçekleştirir. Üç sıvı fazın farklı fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, bu sistemler tek bir ekstraksiyonla iki ya da daha fazla bileşiğin ayırımının

Yeni olasılıklarını sunmaktadırlar. Konveksiyonel bir biçimde "salting out", proteinleri izoionik çöktürme, yardımcı çözgenle çöktürme ve osmotik ve kosmotropik çöktürme gibi pek çok tekniği içeren prensipleri ortaklaşa çalıştıran bir biyoayırma tekniğidir.

Sıvı-sıvı üçlü faz sistemleri, proteinlerin sulu çözeltisine, tuz (genellikle amonyum sülfat) ve bir organik çözgen (genellikle bütanol) eklenmesiyle oluşur. Ham ekstrakta önce tuz ve ardından organik çözgen eklendikten yaklaşık 1 saat sonra üç faz oluşur (Şekil 1.4). Bütanolce zengin üst faz polar olmayan bileşenleri



Şekil 1.4 Genel TPP metodu (Dennison and Lovrien, 1997).

Değişen amonyum sülfat doygunluğu, enzim/t-bütanol oranı ve pH ile hedef proteinin ara yüzey tabakasında birikimi oldukça seçimli bir biçimde gerçekleştirilebilir. Bazen TPP iki kez ardışık olarak uygulanır. İlk TPP adımı, kontaminant proteini/proteinleri uzaklaştırır ve sulu faz istenen proteini içerir. İkinci TPP adımı, hedef proteinin etkin bir şekilde saflaştırılması ile sonuçlanır.

Üçlü faz ayırma sistemleri oda sıcaklığında ve kolay gerçekleştirilebilen ayırma sistemleridir. Teknik oldukça ekonomik olup ölçek büyütme mümkündür. Teknikte kısmi saf protein preparatlarının yanı sıra ham protein ekstraktları da kullanılabilir. Elde edilen saflaştırma katı ve verim genellikle yüksektir.

Proteinler bütanol-su karışımında biyolojik aktivitelerini kaybetmedikleri için proteinlerin konsantre edilmesinde ve izolasyonunda kullanılan TPP sistemleri aynı zamanda, proteinlerin inaktif kompleks karışımlarından

renaturasyonunda, metal ve organik bileşikleri içeren kompleks sistemlerin analizi ve ayırımında, farmasötik endüstrisinde ve atık su arıtımında, bitkisel materyallerden yağ ekstraksiyonunda, enzimatik reaksiyonların hızlarının hesaplanmasında oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

Bütün proteinlerin fazlar arasındaki tabakada toplanmaları beklenmez. Bu dağılma ve ayırma işlemini etkileyen ve farklandıran parametreler hidrofobisite, proteinin moleküler ağırlığı ve fiziksel koşullar (sıcaklık, pH gibi) olarak sayılabilir. Amonyum sülfat konsantrasyonu, ekstraktın bütanol fazına oranı, pH ve sıcaklık gibi faktörlerin değişik kombinasyonları denenerek selektif koşullar elde edilebilir.

Fizikokimya esaslı TPP tekniğinin kompleks bir yapıda olduğu, iyonik kuvvet, kosmotropi, ara yüzey gerilimi, osmotik stres ve yığılma etkileşimleri gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği düşünülmektedir. Proteinlerin TPP prosesi içerisinde farklı davranışları olduğu görüşü de mevcuttur. Proteinlerin ara yüzeye absorblanması, karışmaz fazlar arasındaki gerilimin düşmesinden kaynaklanır. Bu şekilde bir korelasyon gözlenir. Bu iki faz arasında oluşan ara yüz tabakasında proteinin elde edilmesi bir çöktürme işleminden çok, bir bölümlendirme prosesidir (Dennison and Lovrien, 1997).

TPP tekniği birçok enzimin ve proteinin çeşitli kaynaklardan ayırımı ve saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır; *Escherichia coli* 'den yeşil floresan proteini (Jain et al., 2004), *ragi* 'den proteaz inhibitörü (Saxena et al., 2007), soyadan tripsin inhibitörü (Roy and Gupta, 2002), *Aspergillus oryzae* 'den invertaz (Dhananjay and Mulimani, 2008) ve  $\alpha$ -galaktozidaz (Çalcı et al., 2009), domatesten pektinaz (Sharma and Gupta, 2001a), *Dacus carota* 'dan fosfolipaz D (Sharma and Gupta, 2001a), *Aspergillus niger* 'den ksilonaz (Roy et al., 2004), domates (Özer et al., 2010) ve ekmek mayasından (Akdere et al., 2010) invertaz, papaya ve *Calotropis procera* lateksinden proteaz (Chaiwut et al., 2010; Rawdkuen et al., 2010), *Ganoderma sp. WR-1* 'den lakkaz (Rajeeva and Lele, 2011) ve şalgamdan peroksidaz (Singh and Singh, 2003).

## **2. MATERYAL ve METOD**

### **2.1 Materyal**

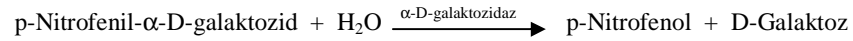
Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve yöntemlere ait bilgiler ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Kullanılan kimyasal maddeler; p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-galakto-piranozid (PNPG) ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Moleküler Ktle Standartları (MW SDS-70L Kit, MW; 24000-66000 Dalton)

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), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Akrilamid, N,N'-Metilenbisakrilamid, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED), Amonyum persülfat, Bromfenol mavisi, 2-merkaptetanol, glisin ve Coomasie-Brilliant Blue Bio-Rad Laboratuvarları (Richmond CA) ve BDH Ltd. (Poole, UK) 'den temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi karpuzdan (*Citrullus vulgaris*) izole edilmiştir. Enzim kaynağı olarak kullanılan karpuzlar lokal marketlerden satın alınmıştır.

## 2.2 $\alpha$ -Galaktozidaz Aktivitesi Tayini

$\alpha$ -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 hazırlanmıştır) 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  $\mu$ mol p-nitrofenol konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır.

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

## 2.3 Protein Tayini

Protein miktarlarının tayini Bradford (Bradford, 1976) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford

tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Yöntem, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır.

Sığır serum albümininin (BSA), distile suda hazırlanmış 1 mg/ml'lik stok standart çözeltisinden 0,02-0,25 mg/ml konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

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

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

- a) 0,1 ml standart protein, bilinmeyen protein örneği ve distile su (kör için) tüplere pipetlenir.
- b) 2 ml Bradford reaktifi eklenir ve vorteks ile karıştırılır.
- c) Tüm tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
- d) Her bir örneğin 595 nm'de absorbansı okunur.
- e) Protein konsantrasyonları, hazırlanan standart grafiği (0,02-0,2 mg/ml BSA standartları) kullanılarak hesaplanır.

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin izolasyonu ve sulu üçlü faz sistemi ile saflaştırılması sırasında gerekli protein tayinleri bu yöntemle göre yapılmıştır.

## **2.4 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması**

$\alpha$ -Galaktozidaz (EC 3.2.1.21) enzim kaynağı olarak, ülkemizde oldukça bol bulunan, ekonomik ve yüksek enzim aktivitesi içeren karpuz (*Citrullus vulgaris*) seçilmiştir. Bir çok  $\alpha$ -galaktozidaz çalışmasında enzim, bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaktan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma

metodları kullanılarak izole edilip, saflaştırılarak, fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir (Haibach et al., 1991; Itoh et al., 1986).

Karpuzun kabukları ve çekirdekleri uzaklaştırıldıktan sonra tartılmış (2200 gram) ve ardından küçük parçalar halinde doğranmıştır. Blender (Braun, Almanya) ile homojenize edilerek filtre edilmiştir. Elde edilen filtrat (2000 ml), karpuzun kendi yapısından gelen lif ve artıkları uzaklaştırılması amacı ile tülbent bezi ile dikkatlice süzülmüştür. Filtrat 10000 rpm 15 dakika, 4°C 'de santrifüjlenmiştir (Hettich 30RF, FRG). Santrifüjatin aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır (0,419 mg/ml, 0,162 U/ml, 0,39 U/mg). Santrifüjate %85 lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulanarak, 4°C 'de gece boyu bekletilmiştir. 10000 rpm 30 dakika 4°C 'de santrifüjlenen amonyum sülfatlıenzim çözeltisinden enzimatik aktivite içeren çökelek ayrılmıştır. Bu çökelek 50 mM pH 6,0 sitrat tamponunda çözülerek gece boyunca tampona karşı diyalizlenmiştir. Diyalizatta aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır (1,34 mg/ml, 0,997 U/ml, 0,74 U/mg). Karpuz  $\alpha$ -galaktozidaz ekstraktı TPP 'de kullanılmak üzere derin dondurucuda (Uğur, Nazilli) -20°C 'de saklanmıştır.

## **2.5 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının Üçlü Faz Ayırma Sistemi ile Saflaştırılması**

Üçlü faz ayırma sistemleri 15 ml 'lik tüpler içerisinde hazırlandı. Çöktürme sonrası elde edilen karpuz  $\alpha$ -galaktozidaz ekstraktının 2 ml 'sine (0,373 Unit ve 0,5 mg protein) içerisindeki konsantrasyonu %50 (w/v) olacak şekilde amonyum sülfat eklendi ve vorteksle karıştırılarak çözüldü. Sistemin pH 'sı der. HCl ile 6,0 ayarlandı. 1:1 (v/v) oranında t-bütanol eklendi ve vorteksle 1 dakika karıştırılarak oda sıcaklığında faz ayrımı için 1 saat bekletildi. Fazların etkin bir şekilde ayrımı için sistem 4000 rpm 'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Üst t-bütanol fazı bir pasteur pipeti ile dikkatli bir şekilde ayrıldı ve atıldı. Alt sulu faz orta fazdaki protein çökeleğinden ayrıldı ve protein çökeleği 1 ml sodyum sitrat tamponunda (0.05 M, pH 6,0) çözüldü. Her iki fazda aktivite ve protein tayini yapıldı. TPP tekniğinde saflaştırma katı ve verime etki eden bazı parametreler incelendi. Bu amaçla tuz ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl) ve organik çözügen (t-bütanol, n-bütanol, n-propanol, dioksan ve izo-propanol) türü, amonyum sülfat doygunluğu (%20, 30, 40, 50 ve 60, w/v), ham ekstrakt/t-bütanol oranı (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) pH 'ın (2,6; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0)  $\alpha$ -galaktozidazın ayırımına etkisi incelendi. Sisteme eklenen ham  $\alpha$ -galaktozidaz ekstraktının aktivitesi (0,373 U)

%100 olarak alındı. Her bir TPP sistemi için uygun oranlarda amonyum sülfat, t-bütanol ve su içeren bir kör hazırlandı. Tüm TPP sistemleri çift çalışıldı.

Optimize edilen koşullarda saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı ve enzimin kimyasal özellikleri belirlendi.

## **2.6 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının Karakterizasyonu**

### **2.6.1 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve moleküler kütle tayini**

SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektroforezinin en yaygın olarak kullanılanı olup, protein karışımlarının özelliklerini analizlemek açısından önemlidir. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve proteinin molekül boyutuna göre bir ayırım yapması nedeniyle bağıl molekül kütlesi tayininde de kullanılır. O nedenle, karpuzdan izole edilen ve TPP tekniği ile saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini belirlemek için Biorad Mini Protean II elektroforez ünitesinde SDS-PAGE analizi yapıldı.

Poliakrilamid jel elektroforezi %0,1 SDS varlığında plaka jel cihazında Laemmli (Laemmli, 1970) tarafından geliştirilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Yöntem heterojen tampon sistemi temeline dayanır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jele girmeden önce düzenleyici jelde, elektroforez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenerek konsantre edilirler.

#### ***Tayin için gerekli olan çözeltiler:***

***Akrilamid/bis(A/B):***

29,2 g Akrilamid ve 0.8 g bis-N, N-Metilenbis-akrilamid çözümlenerek 100 ml 'ye tamamlanır, filtre edilir ve kahverengi şişede 4°C'de saklanır.



<b><i>Alt Tris (LT):</i></b>	18,2 g Tris hidroksi aminometan, 2 ml %20 SDS distile suda çözülür, pH 'sı derişik HCl ile 8,8 'e ayarlanır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 4°C 'de saklanır.
<b><i>Üst Tris (UT) :</i></b>	6,06 g Tris, 2 ml %20'lik SDS distile suda çözülür, pH 'sı derişik HCl ile 6,8 'e ayarlanır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 4°C 'de saklanır.
<b><i>Amonyum persülfat(AP) :</i></b>	100 mg/ml'lik sulu çözeltisi, taze hazırlanır.
<b><i>Rezervuar tamponu:</i></b>	15 g Tris, 72 g glisin ve 5 g SDS 5 litre distile suda çözülerek hazırlanır.

### **2.6.1.1 Polimerizasyon protokolü**

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

Kaliteli bir SDS-PAGE için şu faktörlere dikkat etmek gerekir: Oldukça yüksek saflıktaki reaktifler, doğru başlangıç konsantrasyonları (yürütücü jel için

%0,04 ve düzenleyici jel için %0,1), sıcaklık (polimerizasyon için genellikle 23°C), çözeltilerin gazsızlaştırılması (oksijen polimerizasyonun inhibitörüdür) ve jel oluşturma tamponlarının pH'sı.

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

**Çizelge 2.1** Polimerizasyon protokolü (iki jel için).

Reaktif	Yürütücü Jel (% 12)	Düzenleyici Jel (% 4)
Distile su (ml)	3,4	6,1
AB (ml)	4,0	1,3
LT (ml)	2,5	2,5
AP ( $\mu$ l)	50	50
TEMED ( $\mu$ l)	5	10

Çözelti 1, 2 ve 3 karıştırılarak oda sıcaklığına getirilir. 5 dakikalık gazsızlaştırma işleminin ardından çözelti 4 ve 5 sırasıyla eklenerek, yavaşça karıştırılır. Yürütücü jel dökülerek 1–1,5 saat bekletilir.

### **2.6.1.2 Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması**

SDS-PAGE'de ayrılacak tüm örnekler doğru protein yüklemesi yapabilmek için önce 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8) ile seyreltilir. Seyreltilmiş örnekler 2:1 oranında ön işlem tamponu ile karıştırılır. Bu tampon; 200  $\mu$ l Tris/Bromfenol mavisi, 200  $\mu$ l %60'luk sukroz, 400  $\mu$ l %20'lik SDS ve 200  $\mu$ l 2-merkaptolanol içerir. Merkaptolanol proteinin tersiyer yapısını birarada tutan disülfit bağlarını indirger. SDS proteini denature ederek kuvvetlice bir SDS molekülü her bir iki aminoasit artığına bağlanarak yük maskelenir. Bromfenol mavisi, iyonize olabilen

bir boyadır ve elektroforezin kolay izlenebilmesi için ortama ilave edilir. Sükroz ise örnek çözeltiye bir yoğunluk kazandırır ve örneğin elektroforez tamponunda kolayca çökmesini sağlar.

50 µl örnek, 100 µl örnek tamponu ile karıştırılıp 100°C 'lik su banyosunda 10 dakika kaynatılır. Genel olarak yürütücü jelin her aralığına 20 µl örnek uygulanır. Boş aralıklar ise, elektroforez sırasında proteinlerin dağılmasını önlemek için 20 µl 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8) ve ön işlem tamponu ile doldurulur.

Anod ve katod rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütülür. Proteinlerin elektroforezinde düzenleyici jelde 25 mA/jel ve yürütücü jelde 35 mA/jel akım uygulanır. Bromfenol mavisinin oluşturduğu bant jele ulaşmadan 0,5 cm önce elektroforez işlemine son verilir.

### **2.6.1.3 Protein bantlarının boyanması**

Jellerin boyanmasında Coomassie-Brilliant Blue metodu kullanılmıştır. Bu boyama metodunda esas, boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanmasıdır. Jeller, Coomassie Blue (%45 metanol/ %9 asetik asitte hazırlanmış %25 'lik çözeltisi) çözeltisi ile 1 saat boyunca yavaşça çalkalanır. Jelde oluşan mavi zemin, jelin %10 metanol ve %14 asetik asitten oluşan sulu çözeltisi ile gece boyunca yıkanarak boyadan temizlenir.

### **2.6.2 $\alpha$ -Galaktozidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi**

Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için 4-95°C sıcaklık aralığında (4, 20, 30, 37, 40, 50, 60, 65, 70, 80, 90°C) çalışıldı. Saflaştırılan enzim bu sıcaklıklarda inkübe edilerek standart aktivite ölçüm koşullarında geri kalan aktivitesi tayin edildi ve enzimin optimum sıcaklığı belirlendi. Her bir deney seti çift çalışıldı.

### **2.6.3 $\alpha$ -Galaktozidazın aktivitesine pH 'ın etkisi**

Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının aktivitesine pH'ın etkisinin belirlenmesi için standart aktivite tayininde enzim 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 aktivitesi tayin edildi. pH-aktivite profili oluşturularak enzimin optimum pH'sı belirlendi. Her bir pH değeri için iki deney seti hazırlandı.

#### **2.6.4 $\alpha$ -Galaktozidazın kinetik sabitlerinin tayini**

Substrat doygunluk konsantrasyonu ile  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için düzenlenen deney setinde, 50 mM sitrat tamponunda hazırlanan stok PNPG (5 ve 10 mM) çözeltisi kullanılarak farklı PNPG konsantrasyonları ile (0.05-2.5 mM) enzim aktivitesi standart koşullarda tayin edildi. Substrat konsantrasyonu ile aktivite arasında çizilen grafikten substrat doygunluk konsantrasyonu belirlendi.  $1/[S]$  ile  $1/V$  arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramından kinetik sabitler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) hesaplandı. Her bir PNPG konsantrasyonu için iki deney seti hazırlandı

#### **2.6.5 Kararlılık testleri**

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

##### **2.6.5.1 Termal kararlılık**

Enzimler protein yapıda oldukları ve ısıya karşı kararlı olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağımlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulsa bile yalnız inkübasyon süresinin uzaması bile denatürasyon sonucu aktivite kaybına neden olur (Önal, 2000).

Termal kararlılık tayininde, enzimin 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (4, 20, 30, 37, 40, 50, 60, 65, 70°C) inkübe edilmesinden sonra

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

### **2.6.5.2 pH kararlılığı**

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

## **3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA**

### **3.1 $\alpha$ -Galaktozidaz Enziminin Karpuzdan (*Citrullus vulgaris*) 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 (Filho et al., 2008; Anisha et al., 2008; Blöch et al., 2008; Anisha and Prema, 2007; Simerska et al., 2003; Eto et al., 2005; Owada et al., 2005).  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin çok çeşitli uygulama alanlarından dolayı, bu enzimin farklı kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Enzim, bitkisel (Chien and Lin-chu, 1991; Dey, 1984; 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., Zhu et al., 1995; Zhu and Goldstein, 1994; Naik et al., 1985; Pressey, 1994; Lounteri, 1998; Weiser et al., 1992; Dhar et al., 1994; Önal and Telefoncu, 1998; Appukuttan and Barsu, 1987; Yoon and Hwang, 2008), mikrobiyal (Nadkarni et al., 1992; Wong et al., 1986; Talbot and Syrusch, 1990; Herder et al., 1992; Galili et al., 1985; Zeilinger et al., 1993; Mitsutomi et al., 1985; Ohtakara and Mitsutomi, 1987; Hashimoto et al., 1993; Ohtakara et al., 1984; Somiari and Balogh, 1993; Lounteri et al., 1998; Thanankul et al., 1976; Nagao et al., 1988; Kristufek et al., 1994; Cavazzoni et al., 1987; Kotwal et al., 1999; Sinitsyna et al., 2008) ve hayvansal (Dhar et al., 1993; Dean and Sweeley, 1979a; 1979b; 1979c; Kusiak et al., 1978; Yasuda et al., 2004) kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Her ne kadar oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen tamamen homojen bir  $\alpha$ -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 glikozidazlarca kontamine edilmiyor ve geniş bir aglikon spesifikliğine sahip ise bahsedilen birçok kullanım alanı için uygun olacaktır.

Bu çalışmada, enzim kaynağı olarak karpuz (*Citrullus vulgaris*) seçilmiştir. Karpuz, ülkemizde özellikle yaz aylarında oldukça kolay temin edilebilen, ucuz ve bol bulunan bir kaynak olması,  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesinin bu kaynakta yüksek oranda bulunması ve güneş altında yetişen karpuzdaki enzimlerin termal kararlılığı yüksek olduğundan tercih edilmiştir. Karpuz, protein açısından değerlendirildiğinde çok zengin bir kaynak olmamakla beraber oldukça

yüksek oranda  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesi içermektedir. Daha önce enzimin karpuzdan saflaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda (Önal, 1994; Itoh, 1986), tamamen saf preparatının hazırlanması hem oldukça zahmetli yöntemlere gerek duyulması hem de sonuçta elde edilen enzim miktarının çok az olması nedeniyle, bu çalışmada enzimin karpuzdan izole edilerek üçlü faz ayırma sistemi (Three-phase partitioning; TPP) ile saflaştırılması amaçlanmıştır.

$\alpha$ -Galaktozidaz enzimi bölüm 2.4 'de açıklandığı gibi geleneksel yöntemler ile karpuzdan izole edildi ve %85 'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak deriştirildi. Üçlü faz ayırma sistemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 1,34 mg/ml, 0,997 U/ml, 0,74 U/mg olarak belirlendi. Karpuzdan hazırlanan bu ham protein preparatı kullanılarak üçlü faz ayırma sistemlerinde  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin dağılımı incelendi ve enzim saflaştırılmaya çalışıldı.

### **3.2 Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Karpuz (*Citrullus vulgaris*) $\alpha$ -Galaktozidazının Saflaştırılması**

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

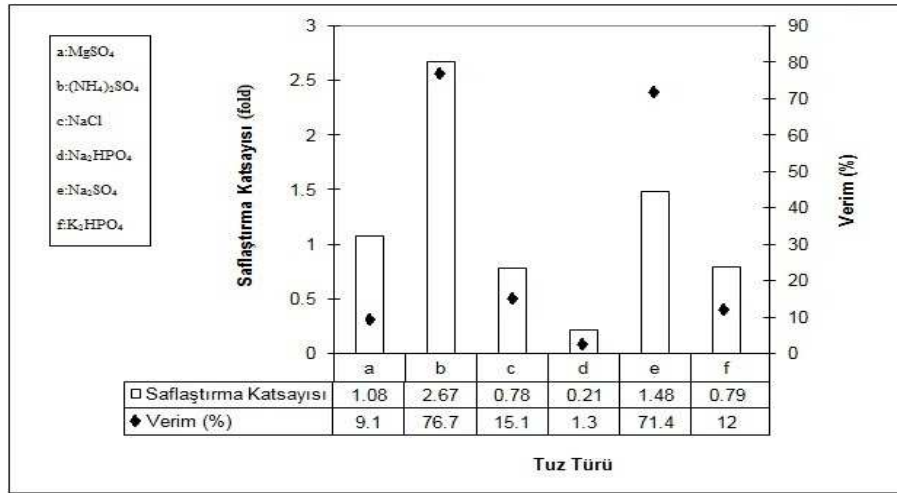
Üçlü faz ayırma sistemleri birçok enzimin saflaştırılmasında etkin bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin; *Aspergillus oryzae* 'den invertaz (Dhananjay and Mulimani, 2008) ve  $\alpha$ -galaktozidaz (Çalcı et al., 2009), domatesten pektinaz (Sharma and Gupta, 2001a), *Dacus carota* 'dan fosfolipaz D (Sharma and Gupta, 2001a), *Aspergillus niger* 'den ksilanaz (Roy et al., 2004), domates (Özer et al., 2010) ve ekmek mayasından (Akdere et al., 2010) invertaz, papaya ve *Calotropis procera* lateksinden proteaz (Chaiwut et al., 2010; Rawdkuen et al., 2010), *Ganoderma sp. WR-1* 'den lakkaz (Rajeeva and Lele, 2011) gibi.

Üçlü faz sistemleri enzimlerin yanısıra çeşitli proteinlerin de etkin bir şekilde ayırımı ve saflaştırılmasında kullanılmıştır: *Eleusine coracana* 'dan amilaz/proteaz inhibitörleri (Saxena et al., 2007), soya tripsin inhibitörü (Roy and Gupta, 2002), legümlü tohumlardan tripsin inhibitörü (Wati et al., 2009), buğday tohumundan amilaz/proteaz inhibitörü (Sharma and Gupta, 2001) ve rekombinant yeşil floresan proteini (Jain et al., 2004) gibi.

TPP tekniğinde sulu çözeltilerden protein enzimlerin ayırımı için uygun bir tuz ve organik çözgen kullanılır. Ham protein ekstraktına önce tuz ve ardından organik çözgen eklendikten yaklaşık 1 saat sonra üç faz oluşur. Üst faz organik çözgen zengin fazdır ve pigmentler, lipidler ve diğer hidrofobik maddeler gibi polar olmayan bileşikler bu fazda toplanır. Alt faz ise tuzca zengin faz olup proteinler, sakkaritler ve hücre debrisisi gibi polar bileşikler içerir. Orta faz ise organik çözgen ve sulu çözelti ara yüzeyinde oluşan proteince zengin fazdır (Dennison and Lovrien, 1997; Roy and Gupta, 2002; Dhananjay and Mulimani, 2008). Üçlü faz ayırma sistemlerinde moleküllerin fazlar arasındaki dağılım davranışları hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler, yük, sterik etkiler, biyomoleküllerin özellikleri fiziksel koşullar gibi çeşitli faktörlerden dolayı oldukça kompleks bir olaydır. Kosmotropi, salting-out, ko-solvent çöktürmesi, izoionik çöktürme, ozmolitik çöktürme ve protein hidrasyonu orta fazda proteinlerin çöktürülmesine yardımcı olur. Proteinler bu koşullar altında kaynaklarına, molekül kütlelerine, izoelektrik noktalarına ve pH 'ya bağımlı olarak farklı dağılım davranışları sergilerler (Pike and Dennison, 1989). TPP sistemlerinde moleküllerin fazlar arasındaki dağılım davranışları pek çok faktörden dolayı oldukça kompleks bir olaydır. Uygun sistemlerin dizaynına ve seçimine yol gösterecek kapsamlı ve mekanistik bir teori mevcut değildir. Bu nedenle tekniğin uygulamalarında biyomoleküllerin optimum dağılımını sağlayan en uygun sistemin hazırlanabilmesi için deneysel optimizasyon çalışmalarına gereksinim duyulur. Bu nedenle, proteinlerin kompleks karışımın ortamından TPP tekniği ile etkin bir şekilde ayırımına çeşitli proses parametrelerinin (tuz türü ve konsantrasyonu, organik çözgen ve türü, enzim miktarının organik çözgene oranı ve pH) etkilerinin incelenmesi gerekir (Dennison and lovrien, 1997; Pike and Dennison, 1989; Roy and Gupta, 2002).  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin TPP sistemi ile saflaştırılmasında sözkonusu bu parametrelerin enzimin dağılım davranışına etkisi incelendi. En iyi saflaştırma katı ve verim sağlanan TPP sistemi belirlenerek optimize edilen sistemden elde edilen enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilerek fizikokimyasal özellikleri belirlendi.

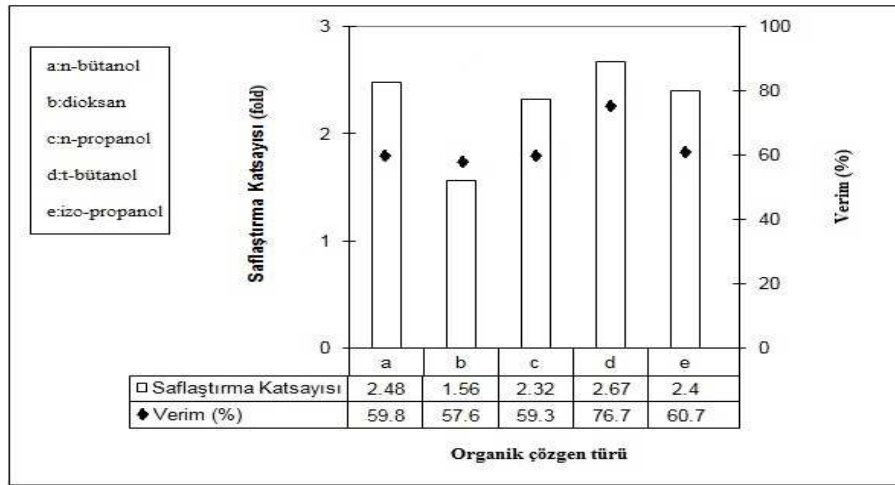


TPP sistemlerinde faz oluşturan tuz ve organik çözügen seçimi oldukça önemli bir adımdır. Faz oluşturucu tuz olarak farklı tür tuzlar kullanılabilir; fakat genellikle etkin bir kozmotropik ajan olan amonyum sülfat tercih edilmektedir. Faz oluşturucu organik çözügen olarak da çeşitli C<sub>4</sub> alkollerini kullanılabilir. Bu alkollerden t-bütanolün oda sıcaklığında kozmotropik ve kümelenme ajanı olarak oldukça etkin bir çözügen olduğu rapor edilmiştir (Pike and Dennison, 1989; Dhananjay and Mulimani, 2008).  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin TPP sistemi ile saflaştırılmasında en uygun faz oluşturucu tuz ve organik çözügen türünün belirlenmesi amacıyla çeşitli tuzlar ve organik çözügenler kullanılarak üçlü faz sistemleri hazırlandı. Kaotropik tuz olarak magnezyum sülfat, kozmotropik tuz olarak sodyum sülfat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, amonyum sülfat ve nötral tuz olarak da sodyum klorür (%50, w/v) kullanılarak t-bütanol (1:1, v/v) varlığında üçlü faz sistemleri hazırlandı ve  $\alpha$ -galaktozidazın dağılımına tuz türünün etkisi incelendi (Şekil 3.1). Şekilden görüldüğü gibi kozmotropik tuzlardan amonyum sülfat ile etkin bir dağılım (2.67 kat ve %76.7 aktivite verimi) sağlandı. Diğer tuzların enzimin dağılımında amonyum sülfat kadar etkili olmadığı belirlendi. Literatürde TPP sistemlerinde amonyum sülfat haricinde birçok tuzun test edildiği, fakat çoğu kez amonyum sülfatın en etkin ayırmayı sağlayan tuz olduğu belirtilmiştir (Dennison and Lovrien, 1997; Szamos and Kiss, 1995; Dhananjay and Mulimani, 2008).



**Şekil 3.1**  $\alpha$ -Galaktozidazın TPP ile saflaştırılmasında farklı tuzların etkisi (Ham enzim ekstraktına (2 ml, 0,373 U) önce %50 (w/v) doygunlukta tuz ve ardından 1:1 (v/v) oranında t-bütanol eklendi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı).

TPP sistemlerinde proteinlerin ara yüzeyde çöktürülmesinde etkili olan bir diğer faktör kullanılan organik çözügenin türüdür. Bu nedenle  $\alpha$ -galaktozidazın TPP sistemi ile saflaştırılmasında uygun organik çözügeni belirleyebilmek için amonyum sülfat (%50, w/v) ve farklı organik çözügenler (t-bütanol, n-bütanol, dioksan, n-propanol ve izo-propanol)(1:1, v/v) kullanılarak üçlü faz sistemleri hazırlandı ve  $\alpha$ -galaktozidazın dağılımına organik çözügen türünün etkisi belirlendi (Şekil 3.2). Şekil 3.2 'den görüldüğü gibi kullanılan organik çözügenlerden t-bütanolün 2.67 kat saflaştırma faktörü ve %76.7 aktivite verimi ile  $\alpha$ -galaktozidazın dağılımı için en uygun organik çözügen olduğu belirlendi. t-bütanol, kozmotropik ve kümeleyici bir ajan olarak  $\alpha$ -galaktozidazın daha yoğun olan sulu tuz tabakasının üzerinde toplanmasına imkan vermiştir. Ayrıca t-bütanolün büyüklüğü ve dallanmış yapısı nedeniyle katlanmış protein moleküllerinin içerisine nüfuz edemediği ve bu yüzden de protein denatürasyonuna neden olmadığı bilinmektedir (Dennison et al., 2000; Dhananjay and Mulimani, 2008).

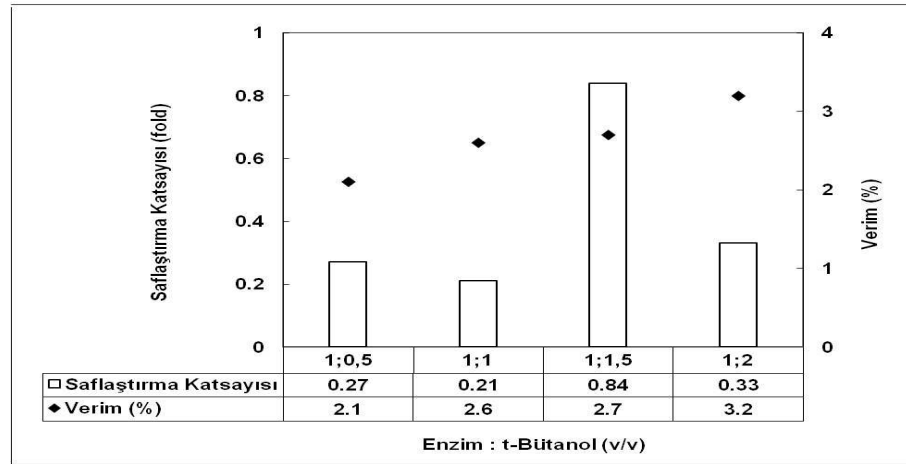


**Şekil 3.2**  $\alpha$ -Galaktozidazın TPP ile saflaştırılmasında farklı organik çözügenlerin etkisi (Ham enzim ekstraktına (2 ml, 0.373 U) önce %50 (w/v) doyumlukta amonyum sülfat ve ardından 1:1 (v/v) oranında organik çözügen eklendi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı).

$\alpha$ -Galaktozidazın TPP ile saflaştırılmasında faz oluşturucu tuz olarak amonyum sülfat ve organik çözügen olarak t-bütanolün etkin bir ayırma sağladığının belirlenmesinin ardından sistemde ayırmayı etkileyen diğer parametrelerin (amonyum sülfat doyumluğu, ham ekstraktın t-bütanole oranı ve pH) etkisi incelendi. Bu amaçla farklı amonyum sülfat doyumluğu (%20, 30, 40,

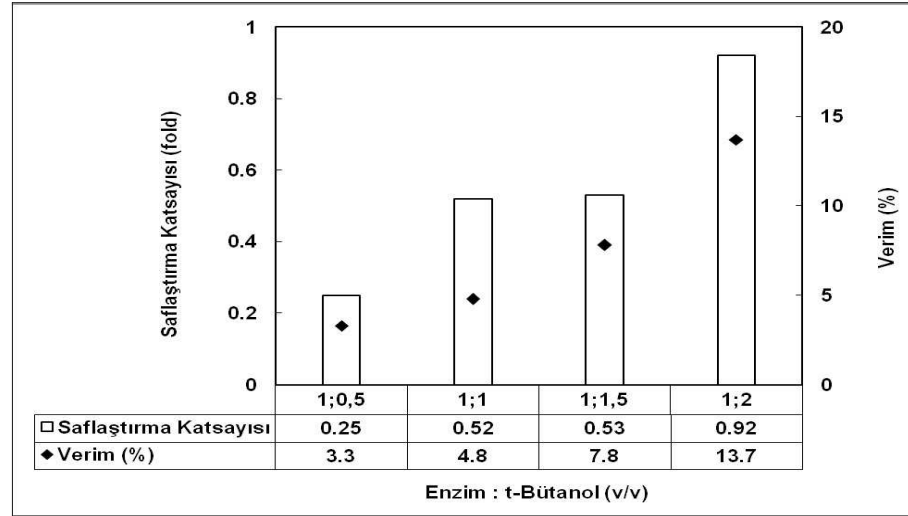
50 ve 60, w/v), ham enzim ekstraktı:t-bütanol oranı (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) ve pH (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 ve 7,0) 'daki TPP sistemleri hazırlanarak enzimin dağılımı incelendi.

TPP sistemlerinde proteinleri ara yüzeyde etkin bir şekilde toplayabilmek için amonyum sülfat ve t-bütanol arasındaki karşılıklı ilişkiden yararlanılır (Dennison and Lovrien, 1997; Pike and Dennison, 1989). Proteinlerin salting-out etkinliği sülfat konsantrasyonu ve proteinlerin net yüküne bağlıdır. Bu nedenle amonyum sülfat doygunluğu önemli bir parametre olup optimize edilmelidir. Farklı amonyum sülfat ve enzim:t-bütanol oranlarında hazırlanan TPP sistemleri ile ilgili sonuçlar sırasıyla Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7 'de verilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi  $\alpha$ -galaktozidazın TPP sistemlerinde ayırımı amonyum sülfat doygunluğu ve t-bütanol miktarı ile yakından ilişkilidir. Eğer t-bütanol miktarı düşük ise, t- bütanol amonyum sülfat ile yeterince sinerjize olamamakta, yüksek ise genellikle protein denaturasyonuna yol açabilmektedir (Dennison and Lovrien, 1997; Sharma and Gupta, 2001). TPP, konformasyonel sıkılaşmayı ve protein hidrasyonundaki değişimleri de içeren çoklu etkinin bir arada olduğu koşullarda gerçekleşen bir sistemdir. Sıcaklık bu değişimlere etki eden önemli bir parametre olduğu için TPP sistemleri genellikle oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmektedir (Dhananjay and Mulimani, 2008; Sharma and Gupta, 2001a; 2001b; 2001c; Doğan and Tarı, 2008; Jain et al., 2004; Sharma et al., 2001).

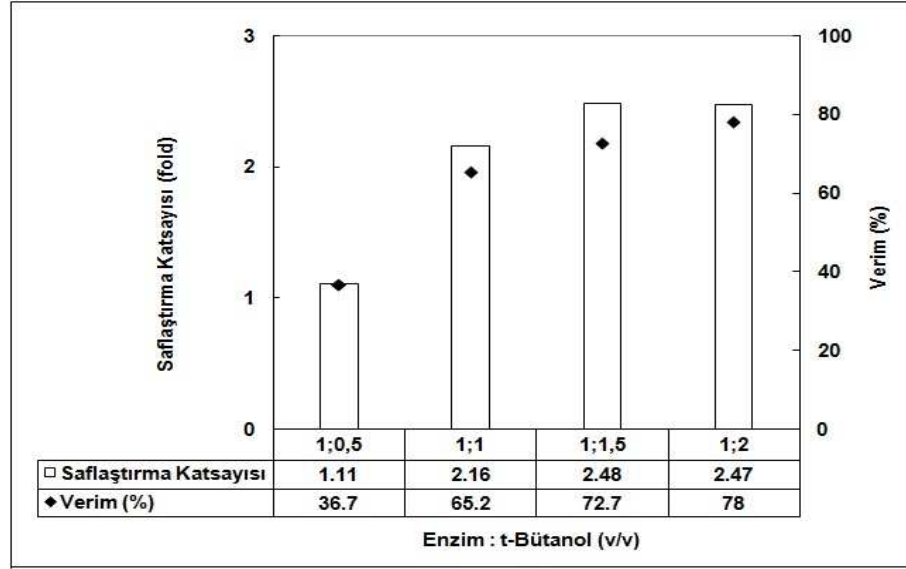


**Şekil 3.3** Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim:t-bütanol oranının  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0,373 U) %20 (w/v) amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi.

Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].

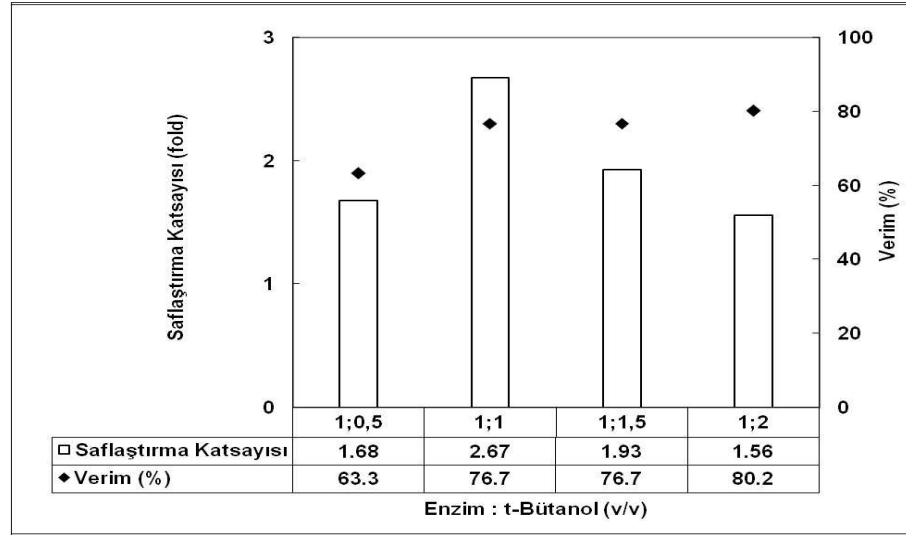


**Şekil 3.4** Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0,373 U) %30 (w/v) amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5,1:1, 1:1.5,1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayrımı gerçekleştirildi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].

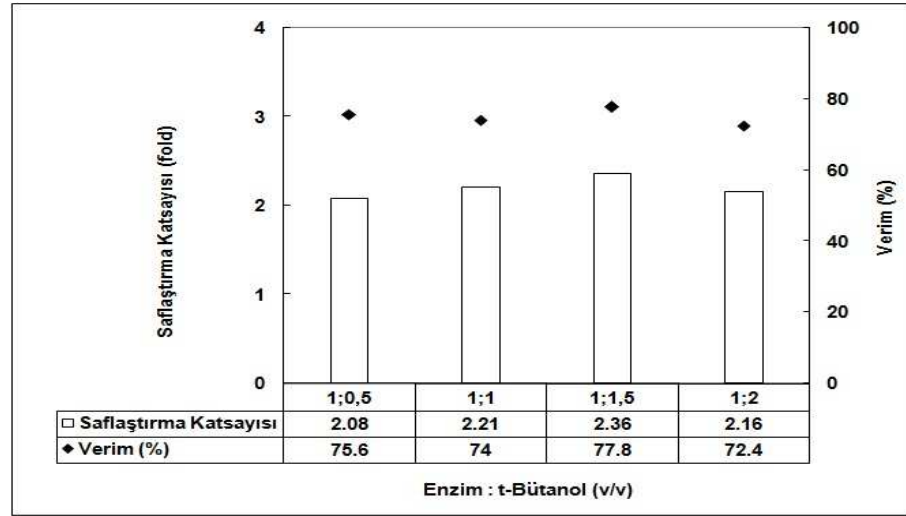


**Şekil 3.5** Amonyum sülfat doygunluğu ve enzim: t-bütanol oranının  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0,373 U) % 40 (w/v) amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].

$\alpha$ -Galaktozidaz için hazırlanan TPP sistemlerinde amonyum sülfat doygunluğu %20 (w/v) iken enzim baskın bir şekilde alt sulu fazda kalmayı tercih etmiştir. Böyle sonuçlar elde edildiğinde genellikle ilk TPP sistemindeki alt faz kullanılarak ikinci bir yeni TPP adımı uygulanır (Dhananjay and Mulimani, 2008; Sharma and Gupta, 2001). Fakat bu genellikle maliyeti arttırmakta, işlem süresini uzatmakta ve daha çok analiz işlemlerine gerek duyulmaktadır. Bu nedenle, ikinci TPP adımından kurtulmak için sistemde amonyum sülfat doygunluğu %20 'den (w/v) %60 'a (w/v) dek arttırıldı. %20 (w/v) doygunluğun üzerindeki doygunluklarda hazırlanan TPP sistemlerinde enzim alt fazdan üst faza doğru hareket etmektedir. Özellikle %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ile hazırlanan sistemde enzim baskın bir şekilde orta fazda kalarak %76,7 aktivite verimi ile 2.67 kat saflaştırılmıştır (Şekil 3.6).



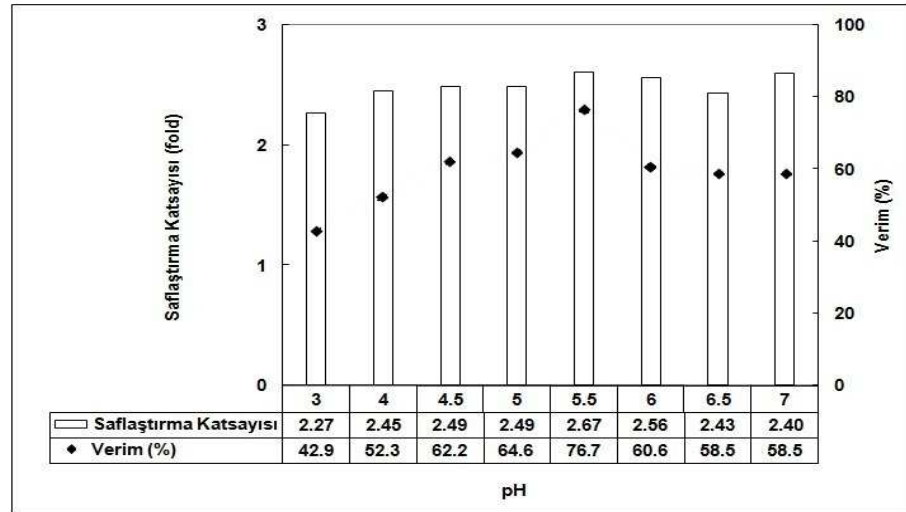
**Şekil 3.6** Amonyum sülfat doymunluğu ve enzim: t-bütanol oranının  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U) % 50 (w/v) amonyum sülfat doymunluğuna getirildi ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].



**Şekil 3.7** Amonyum sülfat doymunluğu ve enzim: t-bütanol oranının  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasında saflaştırma katı ve aktivite verimine etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U) % 60 (w/v) amonyum sülfat doymunluğuna getirildi ve farklı miktarlarda bütanol (1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, v/v) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].

Bir TPP sistemi gerçekleştirilirken önemli bir diğer parametre de sistemin pH 'sı ve hedef proteinin izoelektrik noktasıdır. Ortamın pH 'sı sistemde kullanılacak olan biyolojik preparat içerisindeki biyomoleküllerin dağılımını önemli ve etkin bir şekilde değiştirmektedir. Bu nedenle sistem pH'sının optimize edilmesi gerekir. Protein ayırımlarında eğer hedef proteinin izoelektrik noktası biliniyorsa öncelikle proteinin izoelektrik nokta değerinden 2-4 pH birimi aşağısındaki pH'larda sistem kurulur. Birbirinden farklı izoelektrik noktaya sahip proteinleri içeren bir ekstrakt durumunda çoğu kez dört ya da beş pH değerinde (genellikle pH 3-7 arasında) TPP sistemi hazırlanmaktadır (Dennison and Lovrien, 1997; Pike and Dennison, 1989). İsoelektrik noktasının altındaki pH 'da protein pozitif yüklüdür ve TPP ile çöktürülür. Fakat izoelektrik noktasının üzerindeki pH 'larda protein negatif yüklüdür ve çökmez. O nedenle TPP sistemlerinin davranışı çoğu kez proteinlerin izoelektrik noktası civarında keskin bir değişim gösterir. Bunun sebebi, sülfat anyonunun katyonik proteinlere bağlandığında reaksiyondaki elektrostatik komponentlerin varlığıdır (Pike and Dennison, 1989).

Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının üçlü faz sistemleri ile ayırımında sistem pH'sının aktivite verimi ve saflaştırma katına etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.8 'de verilmiştir.



**Şekil 3.8**  $\alpha$ -Galaktozidazın üçlü faz ayırma sisteminde ayırımına sistem pH 'sının etkisi [Enzim ekstraktı (2 ml, 0.373 U) %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve sistemin pH'sı 3, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 ve 7 değerlerine ayarlanarak enzim:t-bütanol oranı 1:1(v/v) olacak şekilde bütanol eklendi ve faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra orta ve alt fazlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı].

pH 'ın TPP sistemine etkisini belirlemek için her bir sistemde %50 (w/v) amonyum sülfat ile doyurulmuş enzim ekstraktına 1:1 (v/v) oranında bütanol eklenmiş ve sistemin pH 'sı 3-7 arasındaki pH değerlerine ayarlanarak oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.8 'de görüldüğü gibi  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi yukarıda belirtilen sistem koşulları altında pH 5,5 'de %76,7 verimle 2,67 kat saflaştırılmıştır. Sistem pH 'sının 5,5 'in altında ve üzerinde olduğu koşullarda enzim aktivite verimi (%) değerlerinde daha düşüktür.

$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin karpuzdan optimize edilen koşullarda hazırlanan üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırılması sonuçları Çizelge 3.1 'de verilmektedir. %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:1 (v/v) enzim :t-bütanol oranı ve pH 5.5 'de enzim %76.7 'lik bir aktivite verimi ile TPP sisteminin orta fazından saflaştırıldı ve karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı.

**Çizelge 3.1** Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırma sonuçları (% 50 (w/v) amonyum sülfat, 1:1 enzim:t-bütanol oranı, pH 5.5) (% 85 'lik amonyum sülfat sonrası).

ADIM	Aktivite (Unit)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katı (fold)	Aktivite Verimi (%)
<b>Ham Enzim Ekstraktı</b>	0,373	0,500	0,75	1,00	100,00
<b>TPP-Orta Faz</b>	0,287	0,143	2,00	2,67	76,7
<b>TPP-Alt Faz</b>	0,012	0,084	0,14	0,19	3,2

TPP sistemleri kullanılarak çeşitli enzimler farklı saflaştırma katı ve verim değerleri ile saflaştırılmıştır (Dhananjay and Mulimani, 2008; Sharma and Gupta, 2001; Çalıcı et al., 2009; Sharma and Gupta, 2001a; Roy et al., 2004; Özer et al., 2010; Akdere et al., 2010; Chaiwut et al., 2010; Rawdkuen et al., 2010; Rajeeva et al., 2011).  $\alpha$ -Galaktozidaz enzimi *Aspergillus oryzae* 'den iki adımlı bir TPP prosesi ile %50 aktivite verimi ile 15 kat saflaştırılmıştır. Çalıcı ve arkadaşlarının



bir çalışmada ise  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi tek adımlı bir TPP prosesi ile domatesten %81 aktivite verimi ile 4,3 kat saflaştırılmıştır.

TPP temelli ayırma metodunu geleneksel kullanılan saflaştırma teknikleri ile kıyasladığımızda önemli avantajlara sahip olduğu görülmektedir. TPP proseslerinde hedeflenen enzim ya da protein seçimli olarak bir fazda toplanırken diğer kontaminant proteinler ve moleküller diğer fazda toplanmaktadır. Böylelikle TPP sistemleri sadece proteini saflaştırmakla kalmaz aynı zamanda fazlardan birisinde deriştirilmesine de imkan verir. TPP 'de tek bir adımla ayrılan protein genellikle geleneksel yöntemle ayrılanı kıyasla daha konsantredir. TPP ekstraksiyonu kromatografik metodlara kıyasla daha ucuz bir prosestir. Kromatografik protokollerdeki adım sayısı bu teknikte azalmıştır. Ayrıca, organik çözügen olarak t-bütanol kullanılan TPP sistemleri genellikle oda sıcaklığında gerçekleştirilir ve sistemden elde edilen t-bütanol içeren üst faz tekrar kullanılabilir. Kromatografik işlemlerin gereksinim duyduğu donanımlara TPP sistemlerinde ihtiyaç duyulmaz. Bu avantajlarının yanı sıra, protein geri kazanımında hem alt akım hem de üst akım işlemlerinde kullanışlı olması, basit, hızlı, ucuz, ölçek büyütmenin mümkün olması TPP sistemlerini enzim ve proteinlerin biyoayırımında başlangıç adımı olarak dikkat çekici kılmaktadır (Dhananjay and Mulimani, 2008; Singh and Singh, 2003; Jain et al., 2004; Sharma and Gupta, 2001; Doğan and Tarı, 2008; Sharma et al., 2000; Özer et al., 2010; Çalcı et al., 2009; Akdere et al., 2010).

### 3.3 Karpuz $\alpha$ -Galaktozidazının Karakterizasyonu

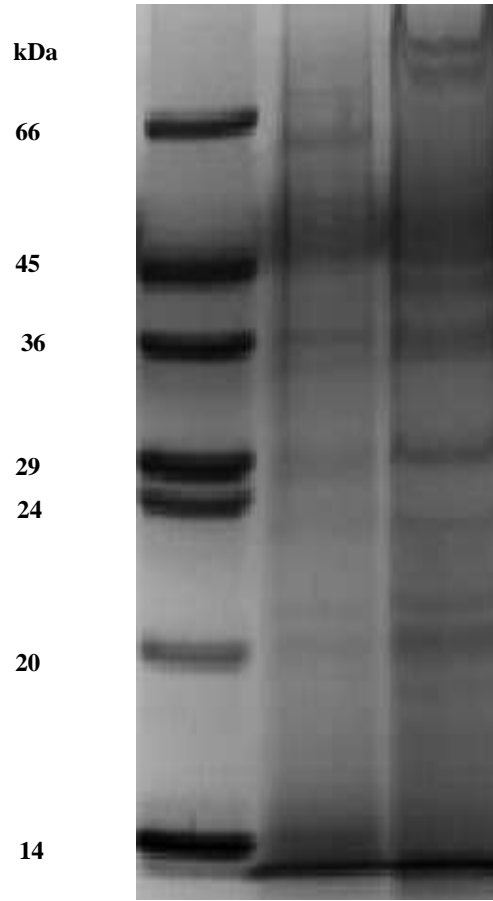
#### 3.3.1 SDS-PAGE analizi

Karpuzdan izole edilerek TPP sistemi (%50 amonyum sülfat doygunluğu, 1:1 enzim/t-bütanol oranı ve pH 5,5) ile saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini belirlemek, saflaştırılan enzimi ham enzim ekstraktı ile kıyaslamak için SDS-PAGE analizi yapıldı (Şekil 3.9). Şekildeki elektroforegramdan görüldüğü gibi karpuzdan TPP ile hazırlanan  $\alpha$ -galaktozidaz preparatı ham ekstrakta kıyasla oldukça homojen bir band vermektedir. Enzimin molekül kütlesi Vilber Lournat Capt software Ver. 12.8 programı ile 45 kDa olarak hesaplandı. Aynı koşullarda hazırlanan bir diğer jelde glikoprotein boyaması (periyodat Schiff boyası) yapıldı ve 45 kDa 'luk protein bandı pembe

renge boyandı. Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazları glikoprotein yapıdaki proteinlerdir (Itoh et al., 1986).

$\alpha$ -Galaktozidazların molekül kütleleri ve yapıları kullanılan tayin metodu ve enzim kaynağına göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin; *Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE ile 38,3 ile 36,9 kDa 'luk iki izoenzimi olduğu (Dhar et al., 1994), *Pycnopus cinnabarinus*  $\alpha$ -galaktozidazın molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile 52 kDa, jel filtrasyonu ile 210 kDa olarak belirlendiği ve enzimin dört identik alt birime sahip olduğu (Ohtakara et al., 1984) ve *Penicilium simplicissimum*  $\alpha$ -galaktozidazının üç izoenziminin bulunduğu ve sırasıyla 61, 84 ve 61 kDa molekül kütlelerine sahip oldukları (Lounteri et al., 1998) belirlenmiştir. Bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazların molekül kütleleri genellikle 30-100 kDa arasında değişmektedir. Karpuz enziminin molekül kütlesi bitkisel kaynaklı diğer  $\alpha$ -galaktozidazlarla ilgili literatür verileri ile uyumludur (Önal, 2000; Çalcı et al., 2010).

**A            B            C**

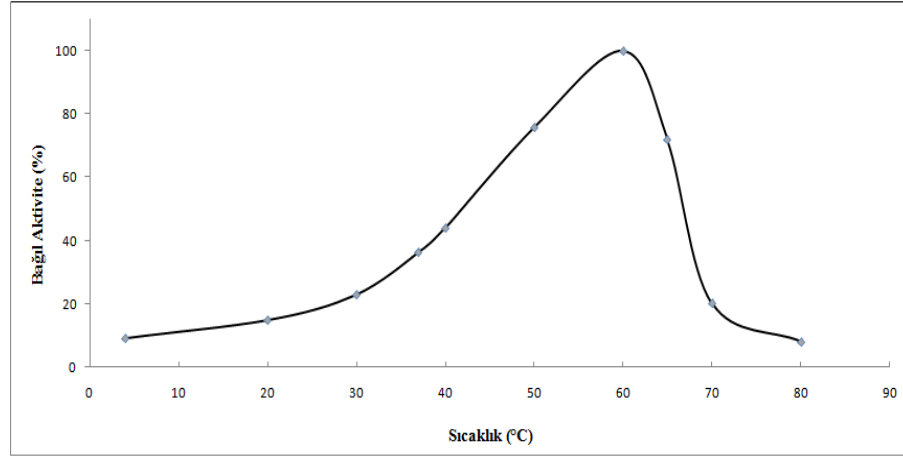


**Şekil 3.9** Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının SDS-PAGE analizi [A; Moleküler kütle standartları (14-66 kDa), B; TPP ile saflaştırılan  $\alpha$ -galaktozidaz (orta faz), C; Ham enzim ekstraktı (%85 'lik amonyum sülfat fraksiyonu)].

### 3.3.2 $\alpha$ -Galaktozidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi

Sıcaklığın  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesine etkisi “Materyal ve Metod” bölümünde açıklandığı gibi enzimin aktivitesinin farklı sıcaklıklarda standart aktivite ölçüm koşullarında ölçülmesiyle belirlendi ve aktivite-sıcaklık ilişkisi Şekil 3.10 'da verildi. Şekilden görüldüğü gibi  $\alpha$ -galaktozidazın optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlendi. Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazı oldukça geniş bir sıcaklık aralığında (40-65°C) aktif olup, 65°C'de hala başlangıç aktivitesinin %71 'ini korumaktadır. Enzimler protein yapıdaki büyük ve oldukça komplike moleküllerdir. Aktivitesinin korunması için üç boyutlu yapının korunması gerekir. Aktiviteye etki eden önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar. Fakat belirli sıcaklıktan sonra enzim proteininin denaturasyonundan dolayı aktivitede düşme olur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık (optimum sıcaklık) özellikle operasyonel bir parametre olması

açısından önemlidir. Genellikle bitkisel kaynaklı  $\alpha$ -galaktozidazların optimum sıcaklıkları enzimin kaynağına ve inkübasyon süresine bağlı olarak 37-40°C arasında değişmektedir (Önal, 2000; Çalıcı et al., 2010; Bakunina et al., 2006). Biyoteknolojik proseslerin bir çoğunun yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği düşünülürse, karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının yüksek bir optimum sıcaklık değerine sahip olması önemli bir avantaj sağlamaktadır. Karpuzun sıcak iklimlerde yetiştiği ve gündüzleri tarlada güneş altında karpuzun sıcaklığının 70°C 'lere çıktığı düşünülürse meyve enzimlerinin optimum sıcaklıklarının yüksek olması beklenen bir durumdur (Önal, 2000; Itoh et al., 1986).

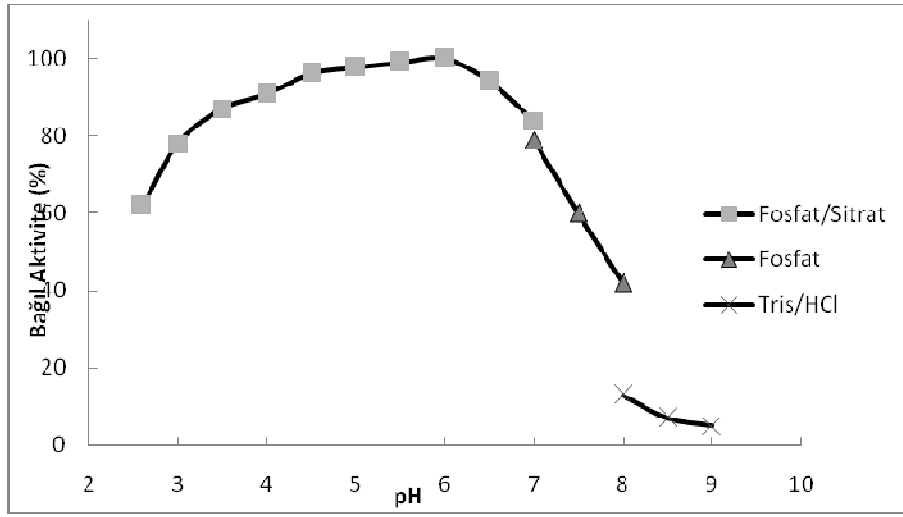


Şekil 3.10 Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının optimum sıcaklık grafiği.

### 3.3.3 $\alpha$ -Galaktozidazın optimum pH 'ının belirlenmesi

Enzim aktivitesini etkileyen önemli parametrelerden bir diğeri pH 'dır. Enzimlerin pH optimumu reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, kullanılan tampon türü ve konsantrasyonu ve iyon şiddeti gibi bir seri parametreye bağlı olarak değişir. Biyokimyasal reaksiyonlar *in vivo* koşullarda sulu ortamda gerçekleştiğinden pH enzim yük durumunu dolayısıyla aktivitesini çok etkiler. Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının aktivitesinin pH 'ya bağımlı değişimi Şekil 3.11 'de verilmiştir. Enzimin optimum pH 'sı 6,0 olarak belirlendi. Enzim geniş bir pH aralığında (pH 2-7,5) oldukça aktiftir.  $\alpha$ -Galaktozidazlar için enzim kaynağına bağlı olarak değişen farklı pH-aktivite profilleri mevcuttur. Genellikle bitkisel kaynaklı enzimler için optimum pH değerleri pH 3,5-6,5 arasında değişmektedir (Önal, 2000; Çalıcı et al., 2010). TPP ile çalışılırken temel parametre pH 'dır. TPP sistemin davranışı, katyonik proteinlere anyonik sülfat bağlandığı zaman

reaksiyonun elektrostatik bileşeni nedeniyle genellikle proteinin izoionik noktası çevresinde keskin değişimler şeklindedir (Dennison and Lovrien, 1997).

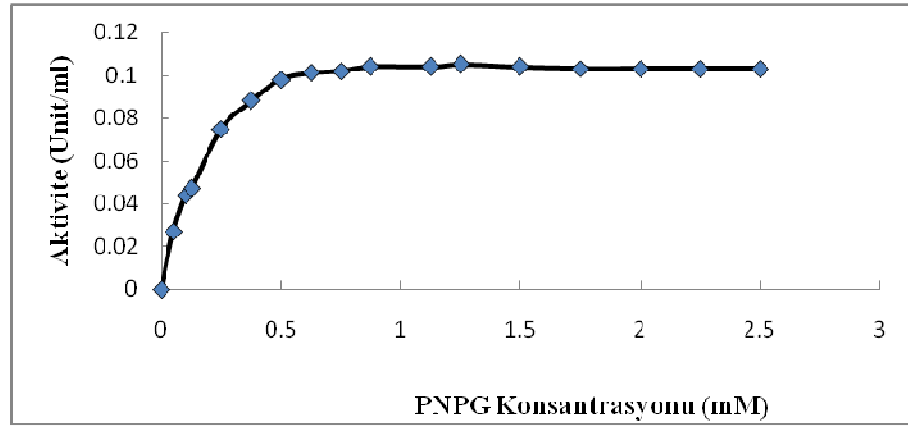


Şekil 3.11 Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının optimum pH grafiği.

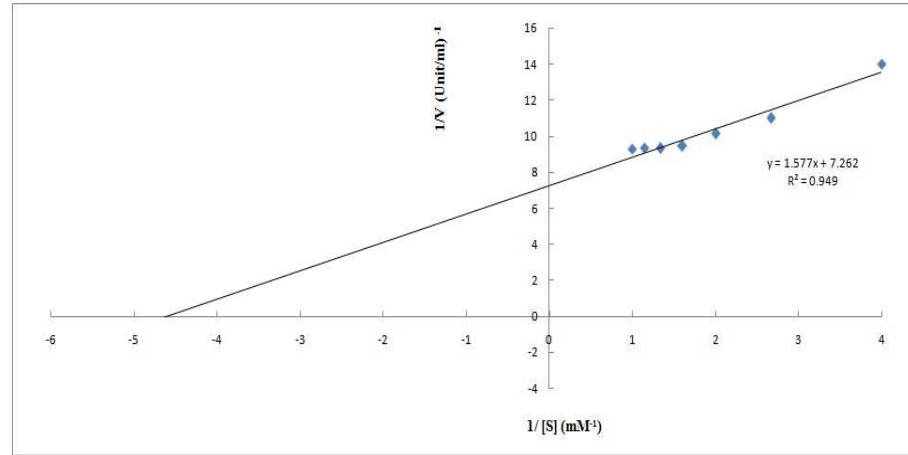
### 3.3.4 $\alpha$ -Galaktozidazın kinetik sabitleri

Substrat (PNPG) konsantrasyonunun  $\alpha$ -galaktozidaz aktivitesine etkisi Materyal ve Metod bölümünde açıklandığı gibi 0.05-2.5 mM substrat konsantrasyon aralığı kullanılarak belirlendi (Şekil 3.12). Substrat doygunluk grafiğinden enzimin doygunluk substrat konsantrasyonu 1.25 mM olarak belirlendi.

Enzimin kinetik sabitlerini ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) belirlemek için çizilen Lineweaver Burk diyagramından  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,22 mM ve 0,14 U olarak belirlendi (Şekil 3.13). Elde edilen kinetik değerler  $\alpha$ -galaktozidazlar ile ilgili diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Önal, 2000; Çalcı et al., 2010).



Şekil 3.12 PNPg konsantrasyonunun karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının aktivitesine etkisi.



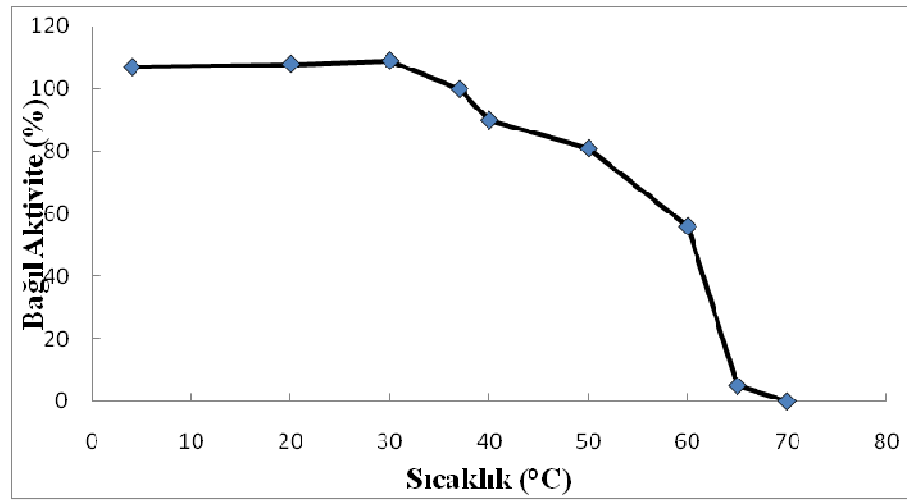
Şekil 3.13 Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının Lineweaver-Burk diyagramı.

### 3.3.5 Kararlılık testleri

#### 3.3.5.1 $\alpha$ -Galaktozidazın termal kararlılığı

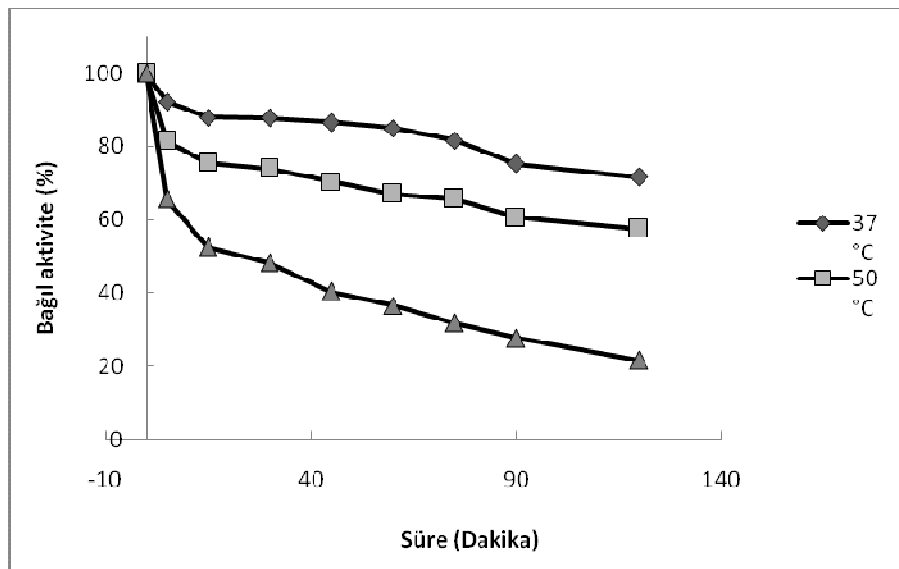
Enzimlerin kararlılığı, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Enzim kararlılığına etki eden en önemli parametrelerden birisi de sıcaklıktır. Termal kararlılık enzimlerin endüstriyel uygulamalar için önemli bir kararlılık türüdür (Önal, 2000). Şekil 3.14 'den görüldüğü gibi karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının 4-60°C sıcaklık aralığında termal kararlılığı oldukça iyi olup, 60°C 'de başlangıç aktivitesinin %57 'sini korumaktadır. 60°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda bağlı aktivite hızla düşmektedir. 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).



Şekil 3.14 Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının termal kararlılığı.

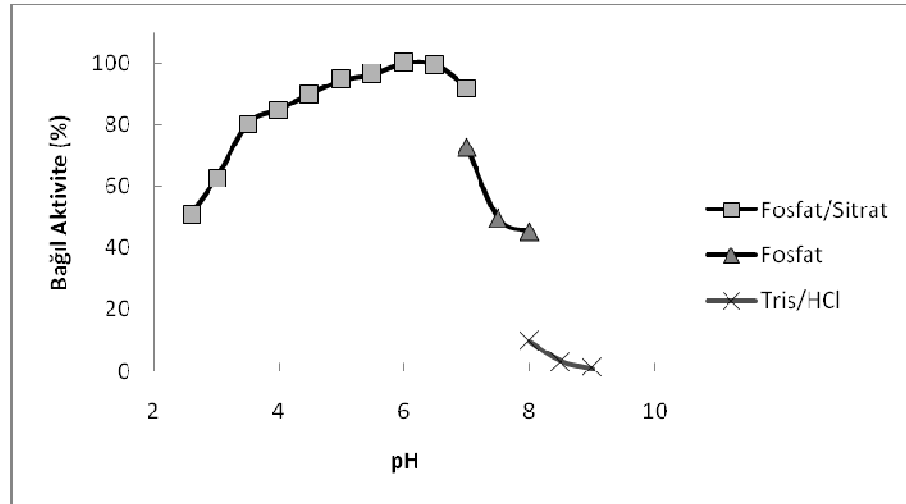
$\alpha$ -Galaktozidaz enziminin ısı kararlılığı yani inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılığı 37, 50 ve 60°C 'de belirlendi. Bunun için enzimler önce bu sıcaklıklarda farklı süreler (5, 15, 30, 45, 60, 75, 90 ve 120 dakika) inkübe edilip ardından standart koşullarda geriye kalan aktiviteleri belirlendi. Isı kararlılığı sonuçları Şekil 3.15 'de verilmektedir. 37, 50 ve 60°C 'de inkübe edilen enzimlerin 120 dakika sonunda geri kalan aktiviteleri sırasıyla %71,7, %57,6 ve %21,7 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.15 Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı

### 3.3.5.2 $\alpha$ -Galaktozidazın pH kararlılığı

Bir enzimin pH kararlılığı inkübasyon süresi, tampon türü ve konsantrasyonu ve iyon şiddeti gibi birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının pH kararlılığı ile ilgili sonuçlar Şekil 3.16 'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi enzim pH 4,5-7,0 arasında oldukça kararlı olup başlangıç aktivitesinin % 80 'inden fazlasını korumaktadır. Bu sonuç özellikle 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; Bakunina et al., 2006).



Şekil 3.16 Karpuz  $\alpha$ -galaktozidazının pH kararlılığı.

## 3.4 $\alpha$ -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22) TPP Sisteminin 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, 1979a; 1979b; 1979c; Kusiak et al., 1978; Yasuda et al., 2004) kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Bölüm 1.1.6 'da ayrıntılı olarak açıklandığı gibi enzim birçok alanda uygulama olanağı bulmuştur.  $\alpha$ -Galaktozidaz medikal alanda (Wong et al., 1986; Shivanna et al., 1989; Dean and Sweley, 1979; Veale et al., 1992, Lenny et al., 1991; Goldstein, 1989; Lenny et al., 1994), şeker endüstrisinde (Itoh et al., 1986; Wong et al., 1986; Somiari and Balong, 1993; Mansour and Khalil, 1998; Slominski, 1994; Shivanna et al., 1989; Mitsutomi and Ohtakara, 1984; Porter et al., 1990; Mitsutomi and Ohtakara, 1988), karbohidrat yapı çalışmaları ile biyolojik fonksiyonların belirlenmesinde (Gidley et al., 1992; Ibatullin et al., 1993), membran modifikasyon çalışmalarında (Dhar et al., 1994), enzimatik sentezlerde (Hashimoto et al., 1993; Galili et al., 1985; Cantacuzene and Attal, 1991; Yanahira et al., 1998), transgalaktozilasyon reaksiyonlarında (Hashimoto et al., 1993; Hashimoto et al., 1995a; Hashimoto et al., 1995b; Naundorf et al., 1998; Wong et al., 1986) ve çeşitli polimer sentezinde (Bulpin and Gidley, 1990) önemli uygulamalara sahiptir.

Üçlü-faz ayırma tekniği protein geri kazanımında hem alt akım hem de üst akım işlemlerinde oldukça kullanışlı olan ve hızla gelişen yeni bir metoddur. Basit, hızlı ve ekonomik bir teknik olan TPP 'de ölçek büyütmek de mümkündür. TPP ekstraksiyonu geleneksel saflaştırma teknikleri ile kıyaslandığında oldukça ucuz bir tekniktir. Kromatografik ayırmalardaki çok adımlı işlemlere ve donanımlara gereksinim duyulmaz. Ayrıca ayırım oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmekte ve ayırım sonrası elde edilen organik faz tekrar geri dönüştürülerek kullanılabilir. Ayrıca ayırım oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmekte ve ayırım sonrası elde edilen organik faz tekrar geri dönüştürülerek kullanılabilir.

Bu çalışmada, karpuz (*Citrullus vulgaris*) 'dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazın üçlü-faz ayırma tekniği ile saflaştırılması amaçlanmıştır. Karpuz, gerek enzim kaynağı gerekse enzim miktarı açısından  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi için oldukça ilginç bir materyaldir. Enzim bu kaynaktan oldukça yüksek aktiviteye sahip ve kararlı bir yapıdadır. Her ne kadar oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen tamamen homojen bir  $\alpha$ -galaktozidaz preparatının hazırlanabildiği çok az sayıda çalışma mevcut ise de önemli olan daha sonraki çalışmalarda kullanabileceğimiz uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır. Bu nedenle enzim karpuzdan izole edilerek TPP çalışmalarında kullanıldı. TPP sisteminde yapılan ön tarama işlemi sonrasında organik çözügen olarak t-bütanolün ve tuz olarak da amonyum sülfatın kullanılması uygun bulundu. Gerekli optimizasyonlar

yapılarak karpuz (*Citrullus vulgaris*)'dan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidaz enzimi TPP sistemi ile %50 (w/v) amonyum sülfat doyunluğu, 1:1 (v/v) enzim/t-bütanol oranı ve pH 5,5 'de %76,7 aktivite verimi ile 2,67 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar,  $\alpha$ -galaktozidaz enziminin biyoayırımında TPP sisteminin başlangıç adımı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini ve hazırlanan enzim preparatının enzimin gıda sanayindeki uygulama alanları için oldukça iyi özelliklere sahip olduğu belirlendi.

**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 p.
- Akardere, E., Özer, B., Çelem, E.B. and Önal, S.**, 2010, Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast, *Separation and Purification Technology*, 72, 335-339.
- Alonso, N., Lopez-Gallefo, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Matea, C., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R.**, 2005, Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method, *Journal of Molecular Catalysis B;Enzymatic*, 35; 57-61.
- Anisha, G.S. and Prema, P.**, 2007, Production of  $\alpha$ -galactosidase by a novel *Actinomycte Streptomyces griseoloalbus* and its application in soymilk hydrolysis, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:859-864.
- Anisha, G.S., Rojan P.J., Nicemol, J., Niladevi, K.N. and Prema, P.**, 2008, Production and characterization of partially purified thermostable  $\alpha$ -galactosidases from *Streptomyces griseoloalus* for food industrial applications, *Food Chemistry*, 111:631-635.
- Appukuttan, P.S. and Barsu, D.A.**, 1987, Galactomannan - hydrolysing  $\alpha$ -galactosidase from jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) seed: Affinity chromatography purification and properties, *Journal of Bioscience* 12:61 -69.
- Balasubramaniam, K. and Mathew, C. D.**, 1986, Purification of  $\alpha$ -galactosidase from coconut, *Phytochemistry*, 25(8): 1819-1821.
- Bergkamp, R.J.M., Kool, I.M., Geerse, R.H. and Planta, R.J.**, 1992, Multiple copy integration of the  $\alpha$ -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.
- 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.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Blöch, A., Peterbauer, T., Hofmann, J. and Richter, A.,** 2008, Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds, *Planta* 228:99 - 110.
- 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.
- Cantacuzene, D. and Attal, S.,** 1991, Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using  $\alpha$ -galactosidase, *Carbohydrate Research*, 211: 327-331.
- Cao, Y., Yuan, P., Shi, P., Luo, H., Li, N., Meng, K., Bai, Y., Yang, P., Zhou, Z., Zang, Z. and Yao, B.,** 2010, Properties of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Streptomyces sp. S27* and its potential for soybean processing, *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 305-312.
- Cavazzoni, V., Adami, A. and Craveri, R.,** 1987,  $\alpha$ -Galactosidase from the yeast (*Candida javanica*), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26: 555-559.
- Chaiwut, P., Pintathang and P., Rawdkuen, S.,** 2010, Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels, *Process Biochem.* 45, 1172-1175.
- 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.
- 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.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cuourtois, J.E. and Petek, F.**, 1988,  $\alpha$ -Galactosidase from coffea beans, *Methods in Enzymology*, edited by Moshbach, K., Academic Press, New York, 137: 565p.
- Çalçı, E., Demir, T., Çelem, E.B. ve Önal, S.**, 2010, Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70, 123-127.
- Dean, K.J. and Sweely, C.C.**, 1979, Studies on human liver  $\alpha$ -galactosidase I., *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20): 9994-10000.
- Dean, K.J. and Sweely, C.C.**, 1979, Studies on human liver  $\alpha$ -galactosidase III., *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20): 10006-10010.
- 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.
- Dennison, C. and Lovrien, R.**, 1997, Three phase partitioning , concentration and purification of proteins, *Protein Expression and Purification* 11:149-161.
- Dennison, C., Moolman, L., Pillay, C.S. and Meinesz, R. E.**, 2000, t-Bütanol: Nature gift for protein isolation, *S. Afr J. Sci*, 96:159-160.
- Desnick, R.J., Dean, K.J., Grabowski, G., Bishop, D.F. and Sweely, C.C.**, 1979, Enzyme therapy in Fabry disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(10): 5326-5330.
- Dey, P.M. and Pridham, J.B.**, 1972, Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases, In: *Advanced in Enzymology*, ed. Meister A., Interscience Publishers, New York, USA, 36: 91-123.
- Dey, P.M., Campillo, E.M. and Lezica, R.P.**, 1983, Characterization of a glycoprotein  $\alpha$ -galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*), *The Journal of Biological Chemistry*, 258(2): 923-929.
- Dhananjay, S.K. and Mulimani, V.H.**, 2008, Purification of  $\alpha$ -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnology Letters*, 30:1565-1569.
- Dhar, G.M., Mitra, M., Hata, J., Butnariu, O. and Smith, D.**, 1994, Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ -galactosidase isozymes, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(5): 1052-1055.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dhar, G.M., Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1993, Immobilization of glucoamylases on chitosan beads and application of the conversion of starch to glucose, *Bulletin of Faculty of Agriculture*, 74: 59-68.
- Doğan, N. and Tari, F.,** 2008, Characterization of three-phase partitioned exopolygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties, *Biochemical Engineering Journal* 39:43-50.
- Eto, Y., Ohashi, T., Utsunomiya Y., Fujiwara, M., Mizuna, A., Inui, K., Sakari, N., Kitagawa, T., Suzuki, Y., Mochizuki, S., Kawakami, M. and Hosoya, T.,** 2005, Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: The results of a phase 2 bridging study, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28: 575-583.
- Filho, M. Pessela, B.C., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M.,** 2008, 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 : 265-271.
- Gao, Z. and Schaffer, A. A.,** 1999, A novel alkaline  $\alpha$ -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose, *Plant Physiology*, 119:979-987.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shoet, S.B.,** 1985, Human natural anti  $\alpha$ -galactosyl IgG, *J.Exq.Med.*, 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.
- 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.
- Guimaraes, V. M., Rezende S. T., Moreira, M. A., Barros, E. B. and Felix, C. R.,** 2001, Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seeds and their use for hydrolysis of oligosaccharides,

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Phytochemistry*, 58:63-67.
- Guiseppein, M.L.F., Almerk, J.W., Heistek, C.J. and Verrips, C.T.**, 1993, Comparative study on the production of guar  $\alpha$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU 50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1): 52-59.
- 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.
- Harpaz, N., Flowers, H.M. and Sharon, N.**, 1978,  $\alpha$ -Galactosidase from soybean destroying blood-group B antigens, *European Journal of Biochemistry*, 22: 421-428.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M. and Kitahata, S.**, 1993, Purification and some properties of  $\alpha$ -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 guilliermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(2): 179-183.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Okinago, T. and Kitahata, S.**, 1995, Transgalactosylation catalyzed by  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guilliermondii* H404, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(4): 619-623.
- Ibatullin, F.M., Golubey, A.M., Firsov, L.M. and Neustroev, K.N.**, 1993, A model for cleavage of O-glycosidic bond in glycoproteins, *Glycoconjugate Journal*, 10: 214-218.
- Ishii, S., Kase, R., Sakuraba, H. and Suzuki, Y.**, 1993, Characterization of a mutant  $\alpha$ -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

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon, *Journal of Biochemistry*, 99: 243-250.
- Jain, S., Singh, R. and Gupta, M.N.**, 2004, Purification of recombinant green fluorescent protein by three – phase partitioning, *Journal of Chromatography A.*, 1035: 83-86.
- Kang, H. C. and Lee, S. H.**, 2001, Characterization of an alpha- galactosidase associated with grape flesh, *Phytochemistry*, 58:213-219.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Labuschagne, R.B., Tonder, A. and Litthauer, D.**, 1997, *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization , *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 52-58.
- Laemmli, U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- 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.
- 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.
- Liljeström, P.L. and Liljeström, P.**, 1987, Nucleotide sequence of the melA gene, coding for  $\alpha$ -galactosidase in *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acid Research*, 15(5): 2213-2220.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lopez-Gallego, F., Betancor, Lo, Hidalgo, A., Matea, C., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R.,** 2004, Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads, *Journal of Biotechnology*, 11: 219-22.
- 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.
- Mathew, C.D. and Balasubramaniam, K.,** 1987, Mechanism of action of  $\alpha$ -galactosidase, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 24: 29-32.
- 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.
- Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1985, Immobilization of thermostable  $\alpha$ -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 thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(9): 2305-2311.
- Nadkarni, M., Nair, C.K.K., Fandey, V.N. and Pradhan, D.S.,** 1992, Characterization of alpha-galactosidase from *Corynebacterium murisepticum* and mechanism of its induction, *Journal of Genetic and Applied Microbiology*, 38: 23-34.
- Nagao, Y., Nakada, T., Imato, M., Shimamoto, T., Sakai, S., Tsuda, M. and Tsuchiya, T.,** 1988, Purification and analysis of the structure of  $\alpha$ -galactosidase from *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical*

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Research Communications*, 151(1): 236-241.
- Naik, S., Oates, J.E., Dell, A., Taylor, G.W., Dey, P.M. and Pridham, J.B.,** 1985, A novel mass spectrometric procedure for the rapid determination of the types of carbohydrate chains present in glycoproteins: application to  $\alpha$ -galactosidase I from *Vicia faba* seeds, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131(1): 1-7.
- Narayan, A.V., Madhusudhan, M.C. and Raghavarao K.S.M.S.,** 2008, Extraction and purification of *Ipomoea* peroxidase employing three-phase partitioning, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 151, 263-272.
- Naundorf, A., Causette, M. and Ajisaka, K.,** 1998, Characterization of the immobilized  $\alpha$ -galactosidase C from *Bacillus circulans* and the production of  $\alpha(1,3)$ -linked disaccharides, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(7): 1313-1317.
- Neustroev, K.N., Golubev, A.M., Ibatullin, F.M. and Moseichuk, A.V.,** 1993, Microheterogeneity in O type sugar chains of carbohydrates secreted by *Aspergillus awamori*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 30(1): 107-113.
- Ohtakara, A. and Mitsutomi, M.,** 1987, Immobilization of thermostable  $\alpha$ -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.
- 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.
- Owada, M., Sakuraba, H. and Saito, H.,** 2005, Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: The results of a phase two bringing study, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28:575- 583.
- Önal, Tatar S.,** 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 İmmobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Özer, B., Akardere, E., Çelem, E.B. and Önal, S.**, 2010, Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, 50, 110-115.
- Paek, N.S., Kang, D.J., Lee, H.S., Lee, J.J., Chai, Y.I., Kim, T.H. and Kim, W.K.**, 1998, Enzymatic synthesis of 6-0- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-deoxynojirimycin using  $\alpha$ -galactosidase from green coffee beans, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(3): 588-589.
- Pike, R.N. and Dennison, C.**, 1989, Protein fractionation by three-phase partitioning in aqueous/ t-bütanol mixtures, *Biotechnology and Bioengineering* 33: 221-228.
- 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., Sarıkaya, A., Herrmann, K.M. and Ladisch, M.R.**, 1992, Effect of pH on subunit association protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase, *Enzyme 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.
- Rajeeva, S., Lele, S. S.**, 2011, Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp. WR-1*, *Biochem. Eng. J.* 54, 103-110.
- Rawdkuen, S., Chaiwut, P., Pintathang, P., Benjakul, S.**, 2010, Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex, *Biochem. Eng. J.* 50, 145-149.
- Rezessy-Szabo, J. M., Nguyen, Q. D., Hoschke, A., Braet, C., Hajos, G. and Claeysens, M.**, 2007, A novel thermostable alpha-galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395. 62/b : purification and characterization, *Biochemica Biophysica Acta*, 1770:55-62
- Rietra, P.J.G.M., Molenaar, J.L., Hamers, M.N., Tager, J.M. and Borst, P.**, 1974, Investigation of the  $\alpha$ -galactosidase deficiency in Fabry's Disease using antibodies against the purified enzyme, *European Journal of*

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biochemistry*, 46: 89-98.
- Roy, I. and Gupta, M. N.**, 2002, Three-phase affinity of proteins, *Analytical Biochemistry*, 300:11- 14.
- Roy, I., Sharma, A. and Gupta, M. N.**, 2004, Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial purification of *Aspergillus niger* xylanase, *Biochem. Biophys. Acta*, 1698: 107-110.
- Saini, H.S.**, 1988, Extractability and evaluation of  $\alpha$ -galactosidase of sucrose in leguminous seeds, *Food Chemistry*, 28(2): 149-157.
- Saxena, L., Iyer, B.K. and Ananthanarayan, L.**, 2007, Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor, *Process Biochemistry* 42:491-495.
- Sharma, A. and Gupta, M.N.**, 2001, Purification of pectinases by three – phase partitioning, *Biotechnology Letters*, 23:1625- 1627.
- Sharma, A. and Gupta, M.N.**, 2001, Three phase partitioning as a large – scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease /amylase inhibitor, *Process Biochemistry*, 37:193-196.
- Sharma, A., Sharma, S. and Gupta, M.N.**, 2001, Purification of alkaline phosphatase from chicken intestine by three-phase partitioning and use of phenyl –Sepharose 6B in the batch mode, *Bioseparation*, 9:155-161.
- Sharma, S. and Gupta, M.N.**, 2001, Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three phase partitioning and its characterization , *Protein Expression and Purification* 21:310-316.
- Shen, W., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J., Deng, L., Chen, H., Yuan, C., Li, D., Li, X.**, 2008, New sources of galactosidase: germinating coffee beans, *Food Chemistry*, 110:962-966.
- Shivanna, B.D., Ramakrishna, M. and Ramadoss, C.S.**, 1989, Enzymatic hydrolysis of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -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.
- Simerska, P., Kuzma, M., Pisvejcova A., Weignerova, L., Mackova, M., Riva, S. and Kren, V.**, 2003, Application of selectively acylated

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- glycosides for the  $\alpha$ -galactosidase catalyzed synthesis of disaccharides, *Folia Microbiologia* 48:329-327.
- Sinitsyna, O.A., Fedorova, E.A., Vakae, I.M., Kondratieva, E.G., Rozhkova, A.M., Sokolova, L.M., Bubnova, T.M., Okuney, O.N., Chulkin, A.M., Vinetsky, Y.P. and Sinitsyn, A.P.**, 2008, Isolation and characterization of extracellular  $\alpha$ -galactosidases from *Penicillium canescens*, *Biochemistry* 73:97- 106.
- Slominski, B.A.**, 1994, Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial -fructofuranosidase: potential for use in preparations of  $\alpha$ -galactosidase and 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.
- Sundaram, S. and Yarmush, M.L.**, 1993, Affinity Separation, Biotechnology, edited by Rehm, H.J. and Read G.; Verlag, Chemie-Weinheim, 3: 643 p.
- Szamos, J., and Kiss, E.**, 1995, Interfacial behavior of proteins in three phase partitioning using salt containing water/tert-butanol systems, *J. Colloid Interface Sci*, 170:290-292.
- 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.
- 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.
- Telefoncu, A.**, 1986, Enzimolojinin prensibleri, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 18s.
- Telefoncu, A.**, 1996, Protein saflaştırma stratejisi ve amacı, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 18s.
- Telefoncu, A., Zihnioglu, 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.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- 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.
- Wati, R. K., Theppakorn, S., Benjakul, S. and Rawdkuen, S.,** 2009, Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds, *Process Biochemistry*, 44:1307-1314.
- 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.
- 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*  $\alpha$ -galactosidase, *Bioscience, Biotechnology and Bioengineering*, 62(9): 1791-1794.
- Yasuda, K., Chang, H.H., Wu, H.L., Ishii, S. and Fan, J.Q.,** 2004, Efficient and rapid purification of recombinant human  $\alpha$ -galactosidases A by affinity column chromatography, *Protein Expression and Purification* 37:499-506.
- Yoon M.Y. and Hwang H.J.,** 2008, Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* RO8 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55, *Food Microbiology* ,25:815-823.
- 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.
- Zaprometova, O.M. and Ulezlo, I.V.,** 1988, Isolation and purification of a

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- mold  $\alpha$ -galactosidase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10: 232-241.
- 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 Environmental Microbiology*, 59(5): 1347-1353.
- Zhu, A. and Goldstein, J.**, 1994, Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase, *Gene*, 140: 227-231.
- Zhu, A., Wang, Z.K. and Goldstein, J.**, 1995, Identification of tyrosine 108 in coffee bean  $\alpha$ -galactosidase as an essential residue for the enzyme activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247: 260-264.
- Zihnioğlu, F.**, 1996, Elektroforetik yöntemler, Protein Saflaştırması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), editör A.Telefoncu, 150s.

**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı** : Hasan  
**Soyadı** :BAYRAKTAR  
**Doğum Tarihi** :01/08/1984  
**Doğum Yeri** :Kırıkkale  
**Uyruğu** :T. C.  
**Adrses** : Erzene Mah. 51 Sok. No:17 K:1 D:1 Bornova - İZMİR  
**GSM** :0505 696 12 63  
**e-mail** :hbayraktar@ymail.com

**Eğitim Durumu:**

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bölümü : 2008 - 2011

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü : 2003 - 2008

Kırıkkale Anadolu Lisesi : 1998 - 2002

**Stajlar :**

Ankara Adli Tıp Kurumu (18 Haziran-18 Temmuz 2007)

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



**Yabancı Dil:**

İngilizce : İyi derecede

Almanca : Başlangıç seviyesi

Rusça : Başlangıç seviyesi

**Katıldığı Eğitim ve Seminerler:**

- Kanser Biyokimyası Sempozyumu (07/03/2007)
- Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu (02/03/2008)
- ISO 22000:2005 (Gıda Güvenliği Yönetimi Sistemi) (24/05/2008)
- Kök Hücre Sempozyumu (16/03/2009)

**Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildirilerin Listesi**

1. "Immobilization and stabilization of alpha-galactosidase on Aminated Sepabeads (Sepabeads EA and Sepabeads HA)". Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., Bıçak Çelem, E., Önal, S., International Enzyme Engineering Symposium, 1-5 October 2008, Kuşadası

**Bilimsel Çalışmalar:**

1. Domatesten izole edilen alfa-galaktozidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve Sepabead taşıyıcılarda immobilizasyonu (2007-2008) (Lisans Bitirme Tezi)

2.  $\alpha$ -Galaktozidaz enziminin üçlü-faz sistemi (TPP) ile saflaştırılması (Yüksek Lisans Tezi) (Eylül 2009 – Haziran 2011)
3. Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkaş, T., Bıçak Çelem, E., Önal, S., Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA, ABAB-3425 Applied Biochemistry and Biotechnology (Değerlendirme Aşamasında)
4. Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H., Önal, S., Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, SEPPUR-D-11-00578 Separation and Purification Technology (Değerlendirme Aşamasında)

**Bilgisayar :**

Microsoft Office, Internet.

**Aktiviteler :**

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Türk Halk ve Türk Sanat Müziği Korusu (2004-2005)

14. Gazimir Belediyesi Uluslararası Çocuk Festivali – İngilizce Tercüman (2011)

**İlgi Alanları:**

İnternet, gezmek, müzik dinlemek, yüzmek.