

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.Hakan BERKKAN

**ASPERGİLLUS FLAVİPES'İN İNDÜKLENEBİLEN
 α -GALAKTOZİDAZ İZOENZİMLERİ**

DOKTORA TEZİ

Uzm.Ecz.Nurten ÖZSOY

88303

İSTANBUL - 1999

TEŞEKKÜR

Bu tezin konusunu veren ve tez çalışmalarımı özenle yöneten, karşılaştığım güçlüklerin giderilmesinde değerli katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr.Hakan BERKKAN'a,

Deneysel çalışmalarım için laboratuvar olanaklarını sağlayan Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.İnci KUŞÇU'ya,

Gerek teorik gerek pratik alanda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Biokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ayşe CAN ve Sayın Prof.Dr. Nuriye AKEV ile diğer çalışma arkadaşlarıma,

Mikrobiyolojik çalışmalarım sırasında içten ilgi ve yardımlarını gördüğüm Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Gülten ÖTÜK'e, Arş.Gör.Seher BİRTEKSÖZ'e ve diğer çalışanlara içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ	1
GEREÇ ve YÖNTEM	13
<i>Aspergillus flavipes</i> 'in İndüklenebilen Bazı Glikozidazlarının İncelenmesi	14
İnokulum hazırlanması	14
Besiyerleri bileşiminin ve optimum koşulların belirlenmesi	15
Besiyerlerin hazırlanması, inokülasyonu ve inkübasyonu	16
<i>Aspergillus flavipes</i> Ekstraselüler α -Galaktozidazlarının Elde Edilmesi	16
Hidroksilapatit kolon kromatografisi	17
DEAE-selüloz kolon kromatografisi	17
Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	18
α -Galaktozidaz, α -glukozidaz ve β -glukozidaz aktivitelerinin ölçülmesi	18
Aktivite deneyinin yapılışı	18
4-Nitrofenol standart eğri denkleminin elde edilmesi	19
α -Amilaz aktivitesinin ölçülmesi	19
Ayıraçlar	19
Aktivite deneyinin yapılışı	20
Maltoz standart eğri denkleminin elde edilmesi	20
İnvertaz aktivitesinin ölçülmesi	21
Aktivite deneyinin yapılışı	21
Glukoz ve fruktoz standart eğri denkleminin elde edilmesi	21
Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	22
Protein Miktar Tayini	23
Ayıraçlar	23
Deneyin yapılışı	23
Sığır serum albumini standart eğri denkleminin elde edilmesi	24

<i>Aspergillus flavipes</i> 'ten Elde Edilen Ekstraselüler α -Galaktozidaz	
İzoenzimlerinin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi	24
Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin incelenmesi	24
Enzim aktivitesi üzerine temperaturün etkisinin incelenmesi	24
Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi	25
BULGULAR	28
TARTIŞMA	43
ÖZET	47
SUMMARY	49
KAYNAKLAR	51



GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlar, hiçbir bilgiye sahip olmadıkları halde, enzimatik olaylardan çeşitli besin maddelerinin üretilmesi için binlerce yıl yararlanmışlardır. Gerçekten, mayalı ekmek, peynir, yoğurt ve şarap yapımı çok eski çağlardan beri bilinmektedir. Ancak, biokimyasal olaylardan, daha sonra enzim olarak adlandırılan bazı maddelerin sorumlu olduğu düşüncesi geçen yüzyılın ortalarına doğru gelişmiştir. 1833 yılında Payen ve Persoz (57), malt ekstresinden alkol ile çöktürdükleri kısımda, ısıya dayanaksız olan ve nişastayı şekere dönüştüren bir madde bulmuşlar ve günümüzde amilaz adıyla bilinen bu maddeye, çözünmeyen nişastayı suda çözünebilen dekstrinleri meydana getirme özelliğinden dolayı, yunanca "ayırma" anlamına gelen diastaz adını vermişlerdir. 1850 yılında ise, diastazdan başka, laktaz, üreaz, emülsin, pepsin, tripsin gibi enzimler karışımlar halinde de olsa bilinmektedir (51).1878 yılında Willy Kühne (36) metabolik reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizatörler için "mayada bulunan" anlamına gelmek üzere ilk kez "enzim" sözcüğünü kullanmıştır. Canlı hücreler tarafından sentezlenmekle birlikte, enzimlerin, bir kere meydana geldikten sonra, canlı ortam dışında aktivite gösterebileceklerini Eduard Büchner (58) 1897 de ispatlamış ve maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başarmıştır.

Enzimler genellikle bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilirler. Bitkisel kaynaklı enzimlere örnek olarak malt diyastazı, papain, bromelin ve fisin, hayvansal kaynaklı olanlara pankreas enzimleri, pepsin, katalaz ve rennin verilebilir. Amilaz, çeşitli proteazlar, lipazlar, invertaz ve selülaz daha çok mikroorganizmalardan elde edilirler.

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler, bilimsel ve ticari önemlerine karşın, büyük miktarlarda elde edilemezler. Özellikle bitkisel kaynaklı enzim aktivitesinin çoğu kez mevsimlere bağımlı olması, ayrıca diğer ekonomik ve çevresel faktörler, bunların endüstriyel enzim üretiminde kullanılmalarını sınırlar. Bu nedenle enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanılmasına doğru gittikçe artan bir eğilim vardır. Enzim elde edilmesinde mikroorganizmaların önem kazanmasının başlıca nedenleri, mikroorganizmaların çok hızlı büyüme ve üreme güçleri dolayısıyla aktivitelerinin çok fazla olması, fermentasyonun kısa sürmesi ve fermentasyon ortamlarının hazırlanmasındaki maliyet düşüklüğü nedeniyle büyük ölçekteki fermentasyon işlemlerinin ekonomik olmasıdır. Bugün peynir yapımında kullanılan kimozin *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica* adlı mantarlardan, nişasta endüstrisinde dekstrin, glukoz ve maltoz şurubu üretiminde kullanılan α -amilaz *Bacillus subtilis* ve *Aspergillus oryzae*'den, süt ve peynir suyunda bulunan laktozun hidrolizlenmesinde kullanılan β -galaktozidaz *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragilis* adlarındaki mayalardan veya *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'den, şeker üretiminde verimin artırılmasında kullanılan α -galaktozidaz ise *Mortierella vinacea*'dan elde edilmektedir (27).

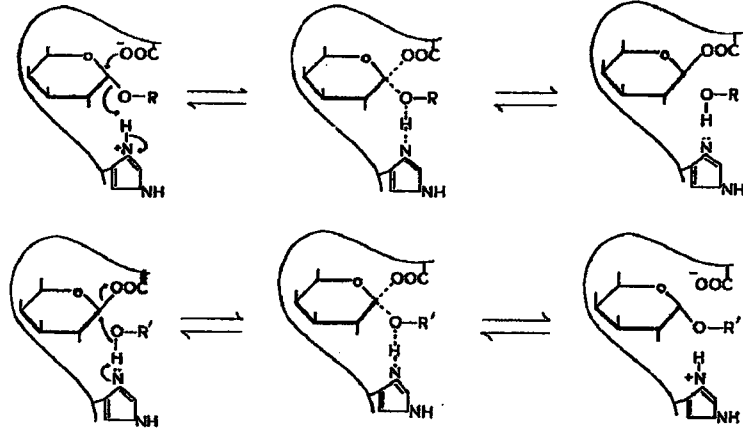
Enzimlerin uygulama alanlarının her geçen gün artması, daha ekonomik ve etkin tekniklerle üretilmelerini daha da önemli kılmıştır. Özellikle son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinde kaydedilen hızlı gelişmeler biyoteknoloji uygulamalarında yeni ufuklar açmıştır. Endüstriyel önemi olan proteinlerin çoğu canlı organizmada oldukça düşük miktarlarda bulunurlar ve bu nedenle ticari açıdan kendi doğal kaynaklarından elde edilmeleri elverişli olmaz. Enzimlerin üretim düzeylerinin artırılması, ancak rekombinant DNA teknolojisinin kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. Bu amaçla ya enzimi kodlayan genin kopya sayısının artırılmasına (gen klonlanması), ya da genin güçlü bir promotörün kontrolünde ekspresyonunun gerçekleşmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (75,76).

Endüstriyel uygulama olanağı bulmuş enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfındadır ve büyük ölçüde mikroorganizma kaynaklıdır.

α -Galaktozidaz (EC 3.2.1.22, α -D-galaktozid galaktohidrolaz) (8) α -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebildiği gibi galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösterebilir (22). α -Galaktozidaz birçok doğal (melibioz, rafinoz, stakiyoz, verbaskoz, galaktomannanlar, B kan gurubu oligosakkaritleri) ve sentetik (p-nitrofenil- α -D-galaktopiranoz, metil- α -D-galaktopiranoz) substrat üzerinde etki gösterir (22,73). Substratın piranoz halkasına sahip olması ve C-1, C-2, C-3 ve C-4 sayılı karbon atomlarındaki H ve OH gruplarının konfigürasyonunun α -galaktozidazın etki edebileceği α -D-galaktoz konfigürasyonuna uyması gerekir. α -Galaktozidazın substrat üzerine etki ederek gösterdiği aktiviteye göre substratlar p-NPG >> rafinoz, stakiyoz > metil- α -D-galaktopiranozid şeklinde sıralanabilir (73).

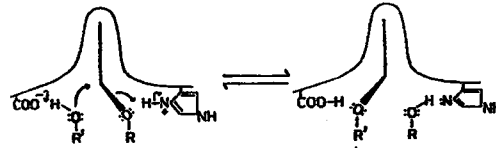
α -Galaktozidazın etki tarzı ile ilgili farklı mekanizmalar ileri sürülmüştür. α -Galaktozidaz substrat molekülünün galaktoz-oksijen bağına hidroliz eder ve substratla aynı anomerik konfigürasyonu gösteren galaktozil kalıntıları meydana getirir. Dey'e (23) göre α -galaktozidazın hidrolitik etkisi, aktif bölgesinde karboksil ve imidazol gruplarının, Mathew ve Balasubramaniam'a (43) göre ise iki karboksil ve birer tirozin ve triptofan gruplarının bulunması ile açıklanmaktadır.

Tatlı badem α -galaktozidazının aktif bölgesinde karboksil ve imidazol gruplarının yer aldığı fotooksidasyon ve Ag^+ inhibisyonu ile saptanmış olup, tatlı badem α -galaktozidazının etki mekanizmasının iki basamakta gerçekleştiği ileri sürülmüştür (23). İmidazol grubu galaktozun C-1 atomunda karbonyum iyonu oluşumu ile glikozid bağına kopmasını sağlar. Aglikonun uzaklaştırılmasından sonra su veya şeker gibi bir akseptör molekülün ($R'OH$) reaksiyona girmesi sonucunda son ürün oluşur ve karboksil grubu akseptör molekülünden ($R'OH$) protonu uzaklaştırır (Şekil 1).



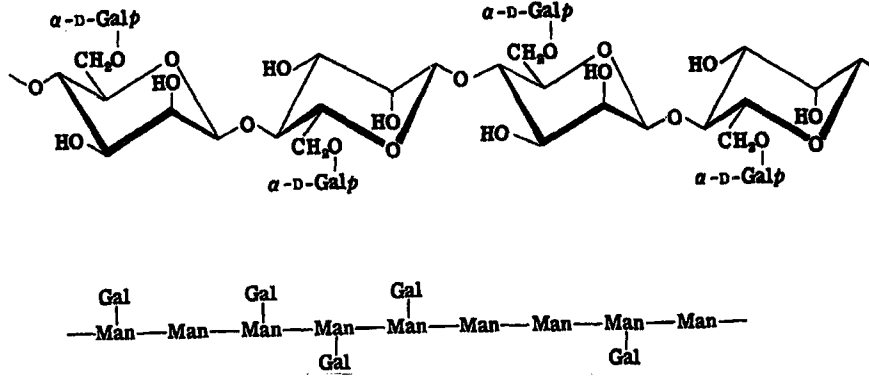
Şekil 1. İki basamaklı mekanizma

Tek basamaklı mekanizmaya göre enzim, substrat ve akseptör bir üçlü kompleks oluştururlar (Şekil 2). Karboksil ve imidazol gruplarının etki tarzı iki basamaklı mekanizmada açıklanan ile aynıdır (23).



Şekil 2. Tek basamaklı mekanizma

α -Galaktozidazın doğal substratı ve bitkilerin yedek polisakaridi olan galaktomannanlar β -(1 \rightarrow 4) glikozid bağlarıyla bağlı β -D-mannozil kalıntılardan oluşan zincirden başka, bu zincire α -(1 \rightarrow 6) glikozid bağlarıyla bağlı α -D-galaktozil yan zincirlerini içerirler (18,24). Galaktomannanların yapısı Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Galaktomannanların yapısı

Galaktomannanlar ve bunların oligosakkarid kısımlarındaki glikozid bağları üç enzim tarafından hidroliz edilebilir: (1→6)- α -D-galaktoz yan zincirini uzaklaştıran α -galaktozidaz (EC 3.2.1.22) (24), (1→4)- β -D-mannan iskeletini oligosakkaritlere hidroliz eden β -mannanaz (EC 3.2.1.78, mannan endo-1,4- β -mannozidaz)(45) ve β -D-mannooligosakkaridleri D-mannozlara hidroliz eden *exo*- β -mannozid mannohidrolaz (EC 3.2..1.25, β -mannozidaz; *exo*- β -mannanaz) (45,46).

Bitkiler dünyasında *Leguminosae* familyası galaktomannan bakımından zengin olmakla birlikte (7,24,43) *Palmae*, *Anonaceae*, *Rubiaceae* ve *Convolvulaceae* türlerinin tohumlarında da galaktomannanlara rastlanmıştır (24,45).

Cyamopsis tetragonobola (guar) ve *Ceratonia siliqua* (keçiboynuzu) galaktomannanlarının gıda, kozmetik, ilaç gibi çeşitli endüstri alanlarında kıvam verici, süspansiyon yapıcı ve yapıştırıcı olarak geniş kullanım alanları bulunmaktadır (13).

Galaktomannanların yapısındaki galaktoz içermeyen bölgeler karrageenan, agar ve ksantan gibi jel yapıcı polisakkaridlerle etkileşerek adı

etkileşirler. Bu nedenle guar zankı daha az etkili jel promotörü olarak bilinir. α -Galaktozidazın etkisiyle guar galaktomannanlarının yapılarındaki galaktoz kalıntılarının uzaklaştırılması ile jelleşmeyi artırıcı özellikleri keçiyoynuzu zankına benzeyen modifiye galaktomannanlar elde edilir (25). Guar galaktomannanlarının α -galaktozil kalıntılarını hidroliz edebilen az sayıda α -galaktozidaz bildirilmiştir. Agrawal ve Bahl (2), *Aspergillus niger* ve *Phaseolus vulgaris* α -galaktozidazlarının guar ve keçiyoynuzu galaktomannanlarındaki toplam α -D-galaktozil kalıntılarının %30-40'nı uzaklaştırdıklarını bildirmişlerdir. *Penicillium ochrochloron*' dan yüksek aktiviteli ekstraselüler α -galaktozidaz homojen halde elde edilmiş ve modifiye galaktomannaların üretiminde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (25). Son yıllarda guar α -galaktozidaz geni *Hansenula polimorfa* ve *Saccharomyces cerevisiae* adlı mayalarda klonlanmıştır (32).

α -Galaktozidazın diğer substratı olan rafinoz [α -D-galaktopiranozido-(1 \rightarrow 6)- α -D-glukopiranozido-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranozid], şeker pancarında, pamuk tohumunda ve soya fasulyesinde bol miktarda bulunan indirgen olmayan bir trisakkariddir (24). Rafinoz, stakiyoz, verbaskoz ve ajugoz gibi α -D-galaktoziloligosakkaridler *Leguminosae* familyasının birçok türünün tohum, kök ve yapraklarında değişik miktarlarda bulunmaktadır. Örneğin soya fasulyesi tohumları %5 sakkaroz, %1 rafinoz, %4 stakiyoz ve eser miktarda verbaskoz içermektedir (34). İnsan ince barsak mukozasının epitel hücreleri α -galaktozidaz salgılamadıkları için (31), α -D-galaktoziloligosakkaridler sindirilemezler ve kalın barsaktaki bakterilerin etkisiyle fermentasyona uğrarlar, açığa çıkan çeşitli gazlar flatulansa neden olurlar. Flatulansta baş dönmesi, konsantrasyon bozukluğu, hafıza zayıflaması gibi belirtiler de görülebilir (70). Flatulansa neden olan faktörlerin azaltılması için birçok araştırma yapılmıştır (16,24):

- a. genetik manipulasyonla yeni türlerin geliştirilmesi ve oligosakkarid oranının azaltılması
- b. oligosakkaridlerin solventlerle uzaklaştırılması
- c. tohumların suda bekletilmesi ve filizlendirilmesi
- d. oligosakkaridleri hidroliz eden enzimlerin kullanılması

Günümüzde, rafinozu D-galaktoz ve sakkarozu hidroliz eden α -galaktozidazı içeren, Talactase ve Beano (Lactaid, USA) ticari adlar altında piyasaya sunulan enzim preparatları flatulansın tedavisinde kullanılmaktadır (42).

Melibioz [$6\text{-}\alpha\text{-D-glukopiranoz-}\alpha\text{-D-galaktopiranozid}$] rafinoz yapısında bulunan ve invertazın rafinoz üzerine etkisiyle meydana gelen bir disakkariddir (24). Melibioz α -galaktozidaz tarafından en kolay hidroliz edilen substrat olarak bildirilmiştir (6).

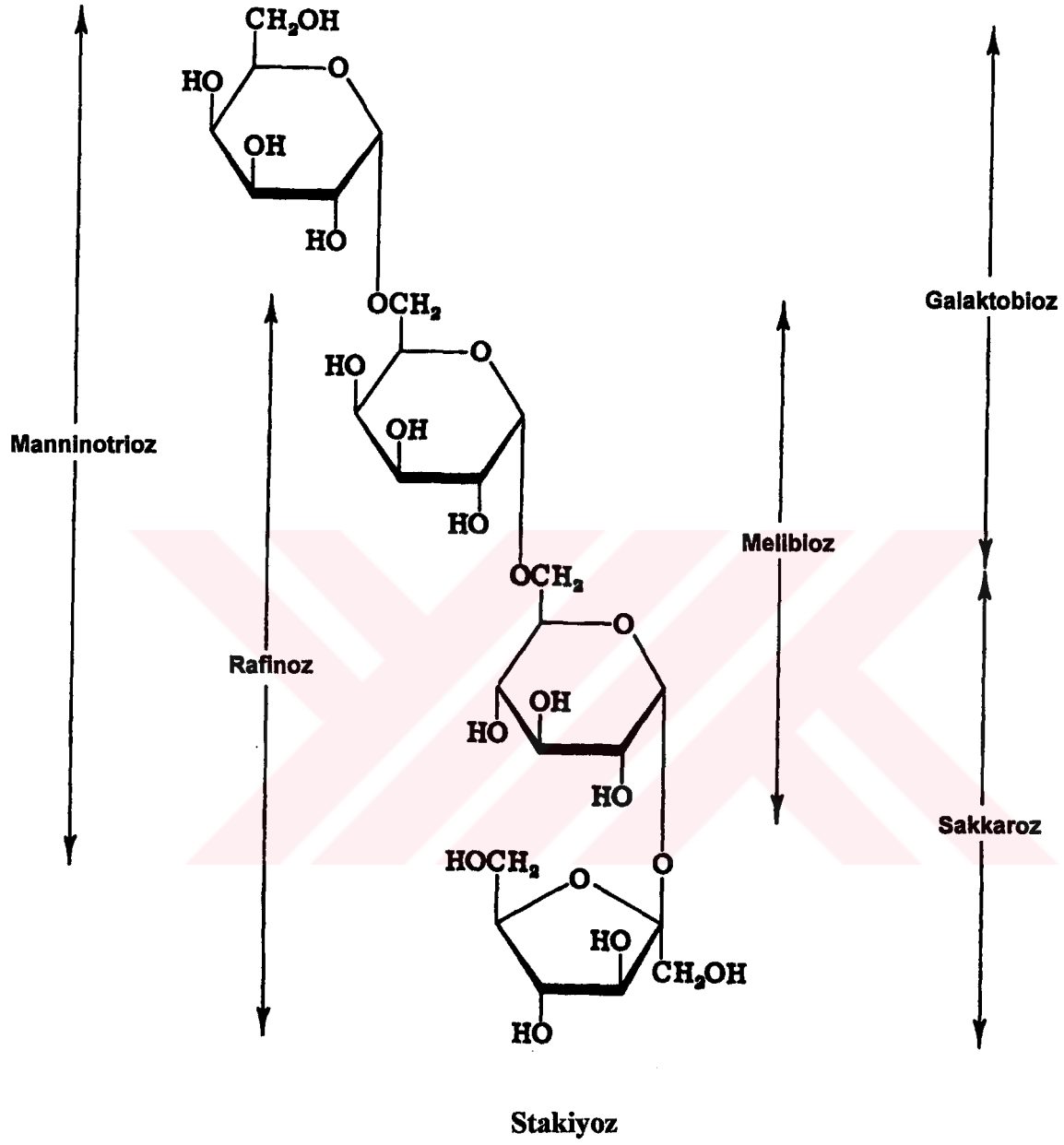
Stakiyoz [$\alpha\text{-D-galaktopiranozido-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-galaktopiranozido-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-glukopiranozido-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fruktofuranozid}$] indirgen olmayan bir tetrasakkarid olup ilk kez Japon enginarı kökünden kristal halde elde edilmiştir (24).

Melibioz, rafinoz ve stakiyoz'un kimyasal yapıları Şekil 4'de gösterilmiştir.

Bir pentasakkarid olan verbaskoz ve heksasakkarid olan ajugoz rafinoz ile birlikte bitkilerde bulunur.

Bazı α -galaktozidazlar B kan grubu oligosakkaridlerinden terminal $\alpha\text{-D-galaktozil}$ grupları uzaklaştırır (21). 3-O- $\alpha\text{-D-galaktopiranozid}$ kalıntısı içeren tip B eritrositleri, tip O eritrositlere α -galaktozidazın etkisiyle dönüşebilirler (73).

Bitkisel α -galaktozidazlar, tohumların filizlenmesi sırasında karbohidrat depolarının tüketilmesinde ve osmoregulasyonda görev alırlar (73). α -Galaktozidazın bitkilerin galaktolipid metabolizmasında da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (72). Bitkiler dünyasında *Leguminosae* familyasından arpa fiği (59), fasulye (2), bakla (20), bezelye (7), tıfıl (78), kaba yonca, soya fasulyesi, guar ve keçiboynuzu (44) tohumlarından α -galaktozidaz elde edilmiş ve ileri derecede saflaştırılmıştır.



Şekil. 4. Stakiyozun yapısı

Mikroorganizma kaynaklı α -galaktozidazlar maya (32,37,73) ve çeşitli bakteriler (26,56,65,69) dışında, *Aspergillus niger* (1,6,12,41,66), *Aspergillus oryzae* (3,4), *Aspergillus tamarii* (14,15), *Aspergillus nidulans* (61), *Aspergillus ficuum* (80) gibi başta *Aspergillus* türleri olmak üzere *Penicillium jantinelium* (28), *Penicillium purpurogenum* (63), *Penicillium duponti* (5) gibi çeşitli küf mantarlarından elde edilmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Bunların yanısıra *Monascus pilosus* (79), *Pycnopus cinnabarinus* (55), *Cephalosporium acremonium* (81), *Trichoderma reesei* (82), *Mortierella vinacea* (68) gibi mantarlardan saf olarak elde edilmiştir. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ve *Mortierella vinacea* mantarları gıda endüstrisinde fermentasyon ürünlerinde kullanılırlar ve GRAS (generally recognised as safe) kabul edilirler (60).

Çağımızda hızla gelişen biyoteknoloji uygulamalarında büyük önem taşıyan ısıya dayanıklı α -galaktozidazlar, *Thermotoga neapolitana* (26), *Bacillus stearothermophilus* (69) gibi bakterilerden ve *Aspergillus niger* (12), *Pycnopus cinnabarinus* (49) adlı mantarlardan elde edilmişlerdir. Termofilik organizmalardan elde edilen α -galaktozidazlar yüksek optimum temperatüre sahip olmaları ve termostabil özellik göstermeleri nedeniyle, özellikle yüksek sıcaklık gerektiren işlemlerde kullanılırlar.

Küf mantarları ile yapılan araştırmalarda β -D- fruktofuranozidaz (invertaz) ve α -D-galaktozidaz aktivitelerinin hücre zarının dış kısmında görüldüğü bildirilmiştir (9). Ekstraselüler, bir başka deyişle hücre tarafından dışarıya salgılanan enzimler, izolasyonları ve elde edilişleri kolay olduğu için, endüstride daha ileri saflaştırma işlemine gerek kalmadan kullanılabilirler. *Aspergillus niger* (1,66), *Aspergillus oryzae* (1,17), *Penicillium brevicompaktum* (48) küf mantarlarından ekstraselüler α -galaktozidazlar elde edilmiştir.

Günümüzde rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılarak *Escherichia coli*'den saf α -galaktozidaz elde edilmektedir (64). Bunun yanısıra *Saccharomyces cerevisiae* (32), *Hansenula polymorpha* (74) gibi mayalar klonlanmış genlerin ekspresyonunda kullanılmaktadır. Genetik yöntemlerin uygulanmasıyla istenilen ürünü daha yüksek verimle üretebilen mutantlar geliştirilmektedir. Örneğin düşük üretkenliğe sahip olan *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* ve *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*

suşlarında α -galaktozidaz sentezinden sorumlu MEL 1 geninin kopya sayısının artırılması ile α -galaktozidaz üretiminde artış elde edilmesi mümkün olmuştur (38).

İnsan ve memelilerin çeşitli organ, doku ve biyolojik sıvılarından α -galaktozidaz elde edilmesi ve özelliklerin incelenmesiyle çok sayıda araştırma yapılmıştır (11,19).

α -Galaktozidaz elde edilmesinde çeşitli saflaştırma yöntemlerinden yararlanılmıştır. α -Galaktozidaz amonyum sülfat ya da aseton ve etanol gibi organik çözücülerle çöktürme, kolon kromatografisi (iyon değiştirici ve hidroksilapatit), jel filtrasyon gibi ayırma yöntemlerinin kullanılmasıyla çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir (1,2,4-6,12,14,15,21,25,26,28,48,49,55,66,73). Son yıllarda affinite kromatografisinin uygulanması α -galaktozidazın saflaştırma işleminin hızlandırılmasına olanak sağlamıştır. Adsorban olarak Sepharose 4B ve 6B veya concanavalin A, ligand olarak α -D-galaktopiranozilaminin kullanılmasıyla insan dalak, plazma ve plasentasından spesifik aktivitesi yüksek olan α -galaktozidaz A elde edilmiştir (11).

Lizozomlarda bulunan ve glikolipidleri hidroliz eden α -galaktozidaz biosentezinde meydana gelen genetik bir kusur globotriozilseramid'in lizozom içinde birikimine yol açar ve X-bağlı ressesif bir kalıtsal hastalık olan ve deri döküntüleri, böbrek ve kalp yetmezliği, alt ekstremitelerde ağrı ile karakterize olan Fabry hastalığı ortaya çıkabilir (53).

Enzimler, kalıtsal hastalıkların tedavisinde de gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile kusurlu genin düzeltilmesi, ya da başka genin onun yerine yerleştirilmesi ve ekspresyonun gerçekleşmesi ile bu hastalığın tedavisi mümkün olabilir, fakat bu yaklaşımlar hala gelişmelerinin başlangıç safhasındadır (77).

Bilimsel araştırmalarda, α -galaktozidaz glikoprotein ve glikolipidlerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır (33). α -Galaktozidaz oligosakkarid zincirinin ucunda yer alan monosakkaridin katıldığı glikozid bağına spesifik olarak hidroliz ederek serbest kalan monosakkaridin tanınmasına olanak sağlar.

α -Galaktozidazın besin endüstrisinde yaygın bir kullanılma alanı vardır. Pancar veya şeker kamışından şeker elde edilmesi sırasında, kristallendirme işleminden önce şurupta %0.05-1 düzeyinde bulunan rafinoz, sakkarozun kristallendirilmesini kısmen engelleyeceği ve verim düşmesine neden olabileceği için, α -galaktozidaz ile hidroliz edilir ve önemli ölçüde ekonomik yarar sağlanır. Ancak, söz konusu işlemde kullanılan α -galaktozidaz preparatının, sakkarozu glukoz ve fruktoza parçalayan invertazı, safsızlık olarak içermemesi son derece önemli olduğu için (54), şeker endüstrisinde, saf enzim yerine, α -galaktozidaz aktivitesi yüksek ancak invertaz aktivitesi düşük olan *Mortierella vinacea*'nın ölü miselyumu immobilize edilerek kullanılmaktadır (68).

α -Galaktozidaz soya sütü üretiminde de kullanılmaktadır. Soya tohumlarından elde edilen soya sütünün, bileşimi inek sütüne benzediği için, özellikle laktoz intoleransı olan bebeklere veya barsaklarındaki laktaz seviyesi düşük olan yetişkinlere inek sütü yerine verilmesinin önemi yıllarca vurgulanmıştır. Ayrıca protein bakımından çok zengin olduğu için bazı ülkelerde inek sütü yerine kullanılmaktadır (70). Yukarıda sözü edilen avantajlara karşın soya sütü bol miktarda rafinoz ve stakioz gibi sindirilmeyen oligosakkaridleri içerir ve adları geçen oligosakkaridlere karşı duyarlılık gösteren kişilerde flatulansa neden olur. Bu nedenle, böyle durumlarda soya sütüne α -galaktozidaz ilave edilerek oligosakkaridlerin hidrolizi sağlanır. *Aspergillus oryzae* (17), *Mortierella vinacea* (70), *Cladosporium cladosporioides* (16) ve *Lactobacillus fermenti*'den (65) elde edilen α -galaktozidaz preparatların soya sütüne ilavesiyle oligosakkaridleri hidroliz ettikleri bildirilmiştir.

Günümüzde çeşitli fermentasyon ürünlerine olan gereksinimin artması ile mikroorganizmalardan fermentasyon işlemi sonucu saf enzim elde etme yöntemlerini geliştirmek ve bu alandaki maliyeti düşürmek amacıyla yapılan çalışmalar hızlanmıştır. Enzimlerin elde edilmesinde küf mantarlarının önem kazanmalarının başlıca nedenleri, patojen olmayan türlerinin bulunması, süratle çoğalmaları, birçok substratı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmalarındır (58,60).

Aspergillus türleri, toprakta, çürümüş bitkisel materyelde çoğalan ve onların degradasyonunda rol alan canlılardır. Küf şeklinde mantarlar olan

Aspergillus türlerinden *Aspergillus flavipes* ile yapılan çalışmalarda proteinaz (10) ve ksilanaz (62) gibi enzimler elde edilmiş ve saflaştırılmıştır. Ancak, literatürde, *Aspergillus flavipes* glikozidazları ile yapılmış herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada *Aspergillus flavipes*'ten besin endüstrisinde ve tıpta kullanılan, ayrıca oligosakkaridlerin yapılarının aydınlatılması gibi bilimsel araştırmalarda yararlanılan α -galaktozidaz aktivitesi gösteren enzimlerin elde edilmeleri ve kısmen saflaştırıldıktan sonra bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan *Aspergillus flavipes* ATCC 11013 küf mantarı İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından sağlandı.

Hidroksilapatit kolon kromatografisinde laboratuvarımızda elde edilen hidroksilapatit, dietilaminoetilselüloz (DEAE-selüloz) kolon kromatografisinde dietilaminoetilselüloz (Sigma D-3764) kullanıldı.

Santrifüj işlemlerinde, HETTICH 16R soğutuculu santrifüj, kolorimetrik ölçümler ve UV alandaki incelemelerde SHIMADZU UV 1208 spektrofotometre, pH ölçümlerinde RADIOMETER 92 pH metre, kolon kromatografilerinde STALPRODUKTOR fraksiyon toplayıcı, enzim aktivitesi tayinlerinde THERMOMIX su banyosu, poliakrilamid jel elektroforezinde PLEUGER ACRYLOPHOR 142 cihazı ve LKB-3371 E güç kaynağı kullanıldı. Besiyerlerin sterilizasyonunda HIRAYAMA otoklav, besiyerlerin inkübasyonunda HERAEUS etüvden yararlanıldı. Hidroksilapatit hazırlanmasında $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6573), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 2380), NaOH (Merck 6482); hidroksilapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografilerinde kullanılan tamponların hazırlanmasında $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 105101), KH_2PO_4 (Merck 4871); protein miktar tayinlerinde standart olarak sığır serum albumini (Fluka 05470) ile Na_2CO_3 (Merck 106398), Na-K tartarat (Merck 8085), CuSO_4 (Riedel 12849), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6672), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6521), %85 H_3PO_4 (Merck 564), derişik HCl (Merck 314), $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck 5695), brom (Merck 1945); α -galaktozidaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz aktivitelerinin tayininde substrat olarak sırasıyla 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (Fluka 73653), 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (Fluka 73673), 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozid (Fluka 73674) ve

standart olarak 4-nitrofenol (Fluka 73560), enzim aktivitesi tayini sırasında kullanılan Mc Ilvaine tamponun hazırlanmasında sitrik asid (Merck 242) ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6573), enzim aktivitesinin durdurulmasında Na_2CO_3 (Merck 106398); amilolitik aktivitenin tayininde substrat olarak nişasta (Merck 1253), standart olarak maltoz (Serva 28390), invertaz aktivitesinin tayininde substrat olarak sakkaroz (Difco 0176-17), standart olarak glukoz (Fluka 49140) ve fruktoz (Merck 5320) kullanıldı.

Poliakrilamid jel elektroforezi için, jellerin hazırlanmasında: N,N'-metilenbisakrilamid (Merck 805968), akrilamid (Merck 800830), 3-dimetilaminopropionitril (Merck 803224) , potasyum ferrisiyanür (Merck 4971), amonyum persülfat (Merck 1200); elektroforez tamponunun hazırlanmasında Tris (hidroksimetil) aminometan(Fluka 93350), glisin (Merck 500188), jellerin boyanması için Coomassie brilliant blue R-250 (BDH Chemicals 42660), dekolorasyon işleminde metanol (Merck 6008), asetik asit (Merck 56) kullanıldı.

Besiyerinin hazırlanmasında pepton (Difco 0118-17-0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck 55826) ve KCl (4935) kullanıldı.

ASPERGILLUS FLAVIPES'İN İNDÜKLENEBİLEN BAZI GLİKOZİDAZLARININ İNCELENMESİ

Aspergillus flavipes'in bazı glikozidazlarının indüksiyonu için optimum şartların belirlenmesinde, besiyeri bileşimi, substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, pH gibi bazı parametrelerin, enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı.

İnokulum hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Aspergillus flavipes* ATCC 11013 suşunun eğik Sabouraud dekstroz agar besiyerinde üretilen kültürü, Petri kutusundaki Sabouraud dekstroz agar besiyeri üzerine yayılarak 22°C de 7 gün inkübe edildi. Inkübasyon sonrası oluşan sporlar steril fizyolojik tuzlu su ile toplanarak mililitrede 5×10^7 spor içeren süspansiyon hazırlandı.

Besiyerleri bileşiminin ve optimum koşulların belirlenmesi

İncelenen glikozidazların indüksiyonu için aşağıdaki substratlar belirtilen konsantrasyonlarda kullanıldı.

α -amilaz	%1 nişasta
α -glukozidaz	%1 maltoz
β -glukozidaz	%0.4 sellobioz
α -galaktozidaz	%0.2 melibioz

Besiyerlerinin hazırlanmasında organik azot kaynağı olarak pepton, anorganik azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, fosfat kaynağı olarak KH_2PO_4 , Mg kaynağı olarak $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanıldı. Besiyerlerinin pH'ları KCl ile ayarlandı. Yukarıda sayılan maddeleri değişik oranlarda içeren besiyerlerinin kullanılmasıyla elde edilen glikozidazların aktiviteleri ölçülerek besiyeri bileşimindeki maddelerin ideal konsantrasyonları saptandı.

Aspergillus flavipes'in incelenen glikozidazlarının inkübasyon süresine bağlı olarak gösterdikleri aktiviteleri saptamak amacıyla, inkübasyon süresince her besiyerinden her gün 1ml'lik örnekler alındı ve aktiviteleri ölçülerek en yüksek aktivitenin görüldüğü gün saptandı.

α -Galaktozidaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz ve α -amilaz indüksiyonu için besiyerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'ları 3; 3.5; 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5; 7 olan besiyerleri hazırlandı. Inkübasyon süresince her gün alınan örneklerde adı geçen glikozidazların aktiviteleri araştırıldı.

Yukarıda belirtilen çalışmaların sonucunda her glikozidaz için ayrı, ayrı besiyeri bileşimi belirlendi.

α -Glukozidaz için

pepton	5 g/L
KH_2PO_4	8 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	2 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/L
maltoz	10 g/L

β -Glukozidaz için

pepton	5 g/L
KH_2PO_4	7 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	3 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/L
sellobioz	4 g/L

α -Amilaz için

pepton	5	g/L
KH ₂ PO ₄	7	g/L
(NH ₄) ₂ PO ₄	3	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	g/L
Nişasta	10	g/L

α -Galaktozidaz için

pepton	15	g/L
KH ₂ PO ₄	15	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	5	g/L
KCl	5	g/L
Melibioz	2	g/L

Besiyerlerin hazırlanması ,inokülasyonu ve inkübasyonu

Besiyerlerinin bileşimine giren maddeler tartıldı, distile suda iyice çözüldürüldü ve 250 ml lik erlenmayerlere 100 ml lik miktarlarda dağıtılarak otoklavda 120°C de 20 dakika sterilize edildi. Her birine *Aspergillus flavipes* süspansiyonundan bir ml inoküle edildi ve 30° C'lik etüvde inkübe edildi.

ASPERGILLUS FLAVIPES EKSTRASELÜLER

α -GALAKTOZİDAZLARININ ELDE EDİLMESİ

Pepton (15 g/L), KH₂PO₄ (15 g/L), MgSO₄ (5 g/L) ve KCl (5 g/L) içeren besiyeri hazırlandı. Substrat olarak % 0.2 oranında melibioz ilave edilerek 250 ml'lik erlenmayerlere 100'er ml lik kısımlar halinde aktarıldı. Otoklavda 120°C de 20 dakika süreyle sterilize edildikten sonra 1 ml *Aspergillus flavipes* süspansiyonu (5×10^7 spor/ml) ile inoküle edildi ve 13 gün 30°C'lik etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kültür +4°C de 5000xg devirde 15 dakika süreyle santrifüje edildi. Daha sonra supernatant miktarı ve enzim aktivitesi ölçüldü. α -Galaktozidaz izoenzimleri, ortamdaki tuzlar bir gün süreyle +4°C de distile suya karşı dializ edilmesiyle uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla, hidrosilapatit ve DEAE-selüloz kolonlarından geçirilmek suretiyle elde edildi.

Hidroksilapatit kolon kromatografisi

Laboratuvarımızda Tiselius, Hjerten ve Levin'e (71) göre hazırlanan hidroksilapatit, alt ucu ince bir cam pamuğu ile kapatılmış 2 cm çapında cam kolona yüksekliği 15 cm olacak şekilde dolduruldu. Kolon, hacminin üç katı kadar pH'sı 6.8 olan 5 mM potasyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. α -Galaktozidaz aktivitesi gösteren dializ edilmiş supernatant kolona uygulandı. Kolondan önce ortamdaki peptonu uzaklaştırmak için 5mM tampon geçirildi. Elüsyon, sütundan sırasıyla 20 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM ve 1M pH'sı 6.8 olan potasyum fosfat tamponları geçirilerek gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 3.2 ml lik hacımlar halinde, 38 ml/saat akış hızı ile toplandı. α -Galaktozidaz aktivitesi gösteren tüplerin içerikleri, elüe oldukları tamponlara göre ayrı ayrı, biraraya getirildi ve distile suya karşı dializ edildi. Enzim çözeltilerinin konsantrasyonu, dializ kesesine konulan çözeltilerin +4°C de bir gece sakkaroz içinde bekletilmesiyle sağlandı. Hidroksilapatit kolon kromatografisiyle elde edilen ve α -galaktozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonlardan herbirine DEAE-selüloz kolon kromatografisi uygulandı.

Dietilaminoetilselüloz (DEAE-selüloz) kolon kromatografisi

Öngörülen kolon hacminin her 2.5 ml'si için 1g DEAE-selüloz tartıldı ve distile su içinde 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra karışım bir gece +4°C de bekletildi. Daha sonra alt ucu küçük bir parça cam pamuğu ile kapatılmış 2 cm çapında cam kolonlara yüksekliği 12 cm oluncaya kadar dolduruldu. Bu suretle hazırlanan kolonlar, pH'sı 6.8 olan 10 mM potasyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. Hidroksilapatit kolon kromatografisiyle elde edilen fraksiyonlardan herbiri ayrı DEAE-selüloz kolonlarına uygulandı. Bundan sonra, her kolondan önce, pH sı 6.8 olan 10 mM potasyum fosfat tamponunun, daha sonra adı geçen tampona sırasıyla konsantrasyonları 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM ve 1M olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponların geçirilmesiyle elüsyon gerçekleştirildi ve fraksiyonlar 2,8 ml'lik hacımlar halinde toplandı. En yüksek α -galaktozidaz

aktivitesi gösteren tüp içerikleri biraraya getirildikten sonra distile suya karşı dializ edildi ve deneylerde kullanılmak üzere +4°C de saklandı.

ENZİM AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Bu çalışmada gerek α -galaktozidaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz ve α -amilaz aktivitesi gösteren kültürlerde, gerekse α -galaktozidaz izoenzimlerinin saflaştırma aşamalarında elde edilen çözeltilerde aşağıda belirtilen aktivite tayini yöntemleri uygulandı.

α -Galaktozidaz, α -glukozidaz ve β -glukozidaz aktivitesinin ölçülmesi

Enzim aktivitesi, 37°C de, dakikada açığa çıkan μ mol 4-nitrofenol (μ mol 4-nitrofenol/dakika) olarak, spesifik aktivite ise 37°C de, dakikada 1 mg enzim proteinin açığa çıkardığı μ mol 4-nitrofenol (μ mol 4-nitrofenol/ dak./mg protein) olarak belirtildi.

α -Galaktozidaz, α -glukozidaz ve β -glukozidaz aktivitelerin ölçümlerinde, substrat olarak sırasıyla, 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid, 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid ve 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozidin 1/50 M çözeltileri ve tampon olarak pH'sı 4.8 olan Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponu (47) kullanıldı.

Aktivite deneyinin yapılışı

Bir deney tübünde Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponu (pH 4.8) ve substrat çözeltilisinden 100 μ l Vorteks mikser de karıştırıldı ve tüp 37°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletildi. Daha sonra, 100 μ l enzim çözeltilisi ilave edildi ve karışım 30 dakika süreyle 37°C'lik su banyosunda bırakıldı. Bu sürenin sonunda tübe 3 ml 0.2 M Na₂CO₃ ilavesiyle enzim reaksiyonu durduruldu.

Diğer taraftan enzim ve substrat kontrol deneyleri, enzim ve substrat çözeltileri yerine aynı miktarda distile su kullanılması suretiyle gerçekleştirildi.

α -Galaktozidazın substrat üzerine etkisiyle açığa çıkan 4-nitrofenole ait sarı rengin absorbansı ile enzim ve substrat kontrol deneylerinin absorbansları

spektrofotometrede , ayrı ayrı, 0.2 M Na₂CO₃'a karşı , 420 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen değer, 4-nitrofenolün regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkartılan 4-nitrofenol miktarı µmol olarak belirlendi.

4-Nitrofenol standart eğri denkleminin elde edilmesi

4-Nitrofenol standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce 4-nitrofenolün sudaki 2000 µmol'lük çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1600 µmol, 1200 µmol, 800 µmol, 400 µmol, 200 µmol ve 100 µmol olan çözeltiler elde edildi ve absorbanları 0.2 M Na₂CO₃'a karşı 420 nm'de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla 4-nitrofenolün regresyon denkleminin elde edildi ve standart eğrisi çizildi (Şekil 5).

α-Amilaz aktivitesinin ölçülmesi

α-Amilaz aktivitesinin incelenmesinde Somogyi (67) ve Nelson (52) yönteminden yararlanıldı. Enzim aktivitesi reaksiyon ortamının ml sinde bir dakikada hidroliz edilen µM α-1,4-glukozid bağı olarak belirtildi.

α-Amilaz aktivitesinin ölçülmesinde gerekli substrat, %1g lık nişasta çözeltisinin pH sı 5.9 olan fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltilmesiyle, her gün yeniden hazırlandı.

Ayırıcılar

A- 25 g susuz sodyum karbonat, 25 g sodyum potasyum tartarat, 25 g sodyum bikarbonat ve 200 g susuz sodyum sülfat 800 ml distile su içinde çözüldü ve 1 litreye tamamlandı.

B- 30 g bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O) 200 ml distile suda çözüldü ve çözeltilere 4 damla derişik sülfürik asid ilave edildi.

C- 25 g amonyum molibdat 450 ml distile suda çözüldü ve 21 ml derişik sülfürik asid ilave edildi. Bu çözeltilere 3 g sodyum arsenat (NaHAsO₄.7H₂O)'ın

25 ml distile sudaki çözeltisi, yavaş yavaş ve sürekli olarak karıştırarak eklendi. Karışım distile su ile 500 ml ye tamamlandı ve 1 gece 37°C lik etüvde bekletildi.

D- 1.0 ml B ayırıcının 25 ml A ayırıcına ilave edilmesiyle hazırlandı.

Aktivite deneyinin yapılışı

200 µl substrat, bir deney tübü içinde , 37°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletildi ve üzerine 200 µl enzim çözeltisi ilave edildi. Tam 10 dakika sonra karışıma 1 ml D ayırıcı eklendi ve tübün ağzı yağlı pamukla kapatılarak kaynar su banyosunda 20 dakika bırakıldı ve bu sürenin sonunda soğuk su içinde soğutuldu. Bundan sonra üzerine 1 ml C ayırıcı eklendi ve karışım çalkalandı, 10 dakika bekletildi ve 10 ml distile su ilavesi ile seyreltildi. Meydana gelen rengin absorbansı spektrofotometre de 520 nm dalga boyunda ölçüldü. Aynı işlemler enzim çözeltisi yerine 0.2 ml distile su kullanılarak kontrol deney yapıldı. α-Amilaz aktivite ölçmelerinde spektrofotometrede okunan değer, standart maltoz eğrisine ait değerlerle karşılaştırılmasıyla, 0.4 ml enzim-substrat karışımındaki maltoz miktarı "a" µg olarak saptandı.

$$1 \text{ U} = \frac{a \text{ } \mu\text{g maltoz/dakika}}{360.3(\text{maltoz molekül ağırlığı})} \times 2.5$$

eşitliğinden yararlanılarak, 1dakikada 1 ml hidrolizatta koparılan µM glukozid bağı sayısı bulundu.

Maltoz standart eğri denkleminin elde edilmesi

Maltoz standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce maltozun 1800 µg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1440 µg/ml, 1080 µg/ml, 720 µg/ml, 360 µg/ml ve 90 µg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere Somogyi-Nelson yöntemi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 520 nm de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla, regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizildi (Şekil 6).

İnvertaz aktivitesinin ölçülmesi

İnvertaz aktivitesinin incelenmesinde Somogyi-Nelson mikro-metodu uygulandı (14).

İnvertaz aktivitesi, 37°C de dakikada açığa çıkan μmol heksoz (glukoz ve fruktoz) miktarı olarak belirtildi. Substrat olarak 4000 μmol 'lük sakkaroz çözeltisi kullanıldı.

Aktivite deneyinin yapılışı

Bir deney tübünde enzim ve substrat çözeltilerinden 100 μl , Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponundan (pH 4.8) 50 μl karıştırıldı ve tüp 37°C lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Enzim reaksiyonu 0.5 ml D ayırıcı eklenerek durduruldu. 0.5 ml distile su ilave edildi ve tübün ağzı pamukla kapatılarak kaynar su banyosunda 20 dakika bırakıldıktan sonra soğuk su içinde soğutuldu. Bundan sonra üzerine 0.25 ml C ayırıcı eklenen karışım iyice çalkalandı ve 3 ml distile su ile seyreltildi. Meydana gelen rengin absorbansı spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda ölçüldü. Aynı işlemler enzim çözeltisi yerine 100 μl distile su kullanılarak kontrol deney yapıldı.

Glukoz ve fruktoz standart eğri denkleminin elde edilmesi

Glukoz ve fruktoz standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce glukoz ve fruktoz'un 4mM'lık ekimolar çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0.5 mM ve 0.25 mM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere Somogyi-Nelson yöntemi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 650 nm de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla, regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizildi (Şekil 7).

POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Aspergillus flavipes'ten elde edilen ekstraselüler α -galaktozidazların saflık derecelerinin incelenmesi için yapılan poliakrilamid jel elektroforezinde Acrylophor 142 (Pleuger) elektroforez kabini, LKB-3371 güç kaynağı, 6 mm çap ve 60 mm boyunda elektroforez tüpleri, 100 ml'sinde 3 g tris ve 14.4 g glisin içeren stok çözeltinin distile su ile 10 kez seyreltilmesiyle hazırlanan ve pH'sı 8.3 olan tris-glisin tamponu kullanıldı.

Poliakrilamid jel oluşumu için aşağıdaki stok çözeltiler hazırlandı.

A - 100 ml sinde 30 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilenbisakrilamid içeren akrilamid çözeltisi

B - 2.5 kez seyreltilmiş stok tris-glisin tampon çözeltisinin 100 ml sinde 1.6 g β -dimetilaminopropionitril içeren β -dimetilaminopropionitril çözeltisi

C - %3 lük potasyum ferrisiyanür çözeltisi

D - %0.7 lik amonyum persülfat çözeltisi

Poliakrilamid jeller A, B, C ve D çözeltilerin eşit hacimlerde karıştırılarak elektroforez tüplerine doldurulması ve oda temperaturünde bir saat bekletilmesiyle hazırlandı.

Örneklerden 70-120 μ g protein ve %40 sakkaroz içeren 200'er μ l, poliakrilamid jellere ayrı ayrı uygulandı ve jel başına 5 mA akımla 40 dakika süreyle elektroforez yapıldı. Her fraksiyon iki ayrı jele uygulandı.

Elektroforez bitiminde jellerden biri 2 mm lik kısımlara dilimlendi . Her bir kısım, ayrı ayrı 1'er ml distile su içeren tüplere aktarıldı ve tüpler +4°C de bir gece buzdolabında bekletildi. Ertesi günü her bir tüpte α -galaktozidaz ve invertaz aktiviteleri "enzim aktivitesinin ölçülmesi" kısmında belirtildiği gibi incelendi.

Diğer jel % 0.25'lik Coomassie brilliant blue R-250'nin metanol:su:asetik asid (45.5:45.4:9.2) karışımındaki çözeltisinde 15 dakika boyandıktan sonra asetik asid:metanol:su (7.5:5:87.5) karışımından oluşan dekoloran çözeltide 2 gün süreyle, çözelti her gün değiştirilerek, bekletildi. Buradan alınan jeller asetik asid:metanol:su (10:5:85) karışımı içeren tüplere yerleştirilerek saklandı.

PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

α -Galaktozidaz izoenzimlerinin saflaştırma aşamalarında elde edilen çözeltilerde protein miktar tayinleri Lowry (40) yöntemine göre gerçekleştirildi.

Ayıraçlar

1-A Ayıracı: % 2 Na₂CO₃ çözeltisi (0.1 N NaOH'te)

2-B Ayıracı: % 2 Na-K tartarat çözeltisi 1 ml

% 1 CuSO₄ 1 ml

A Ayıracı 98 ml

3-Folin Ayıracı: 2N Folin Ayıracı (29)

1500 ml'lik yuvarlak dipli balona 100g sodyum tungstat (Na₂WO₄.2H₂O), 25 g sodyum molibdat (Na₂MoO₄.2H₂O), 700 ml distile su, 50 ml %85 fosforik asid ve 100 ml derişik HCl aktarıldı. Geri soğutucu altında 10 saat ısıtıldı ve karışıma 150 g lityum sülfat, 50 ml su ve birkaç damla brom ilave edildi. Brom fazlasını bertaraf etmek için 15 dakika ısıtıldı, soğutuldu ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

4-%0.9 NaCl çözeltisi

Deneyin yapılışı

Bir deney tübüne 100 μ l örnek ve 100 μ l %0.9 NaCl çözeltisi alındı. Üzerine 2 ml B ayıracı ilave edildi. On dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 100 μ l Folin ayıracı eklendi. Oda temperaturünde, 45 dakika bırakıldı. Oluşan mavi mor renkli çözeltinin 660 nm'deki absorbansı, ayıraç körüne karşı spektrofotometrede okundu. Bu absorbans değerinin, sığır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı mg/ml olarak belirlendi.

Sığır serum albumini standart eğri denkleminin elde edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 1 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml ve 0.8 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Lowry deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizildi (Şekil 8).

ASPERGİLLUS FLAVİPES'TEN ELDE EDİLEN EKSTRASELÜLER α - GALAKTOZİDAZ İZOENZİMLERİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

α -Galaktozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonların optimum pH'larını, optimum temperatürlerini ve 4-nitrofenol- α -D-galaktopiranozide karşı Km değerlerini saptamak amacıyla aşağıda belirtilen incelemeler gerçekleştirildi.

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin incelenmesi

α -Galaktozidaz izoenzimlerinin optimum pH'larını saptamak için pH sınırları 2.2-7.6 olan Mc Ilvaine sitrat-fosfat tampon çözeltileri kullanılarak, değişik pH değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri ordinatta, pH değerleri absiste gösterilerek α -galaktozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonlardan her birine ait pH eğrileri çizildi.

Enzim aktivitesi üzerine temperatürün etkisinin incelenmesi

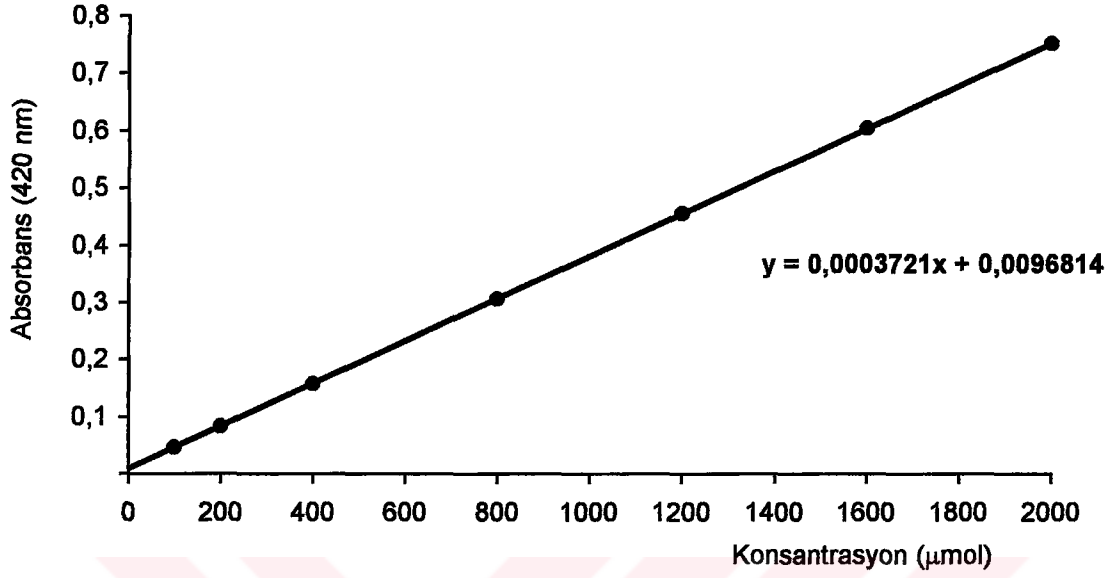
α -Galaktozidaz izoenzimlerinin optimum temperatürlerini belirlemek amacıyla enzim aktivitesi 15-75°C arasında değişen temperatürlerde, her defasında 5°C'er, optimum temperatür dolaylarında ise 1°C'er derece artırmak suretiyle, "enzim aktivitesi ölçülmesi" başlığı altında belirtildiği şekilde

gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi ordinatta, temperatur ise absiste gösterilmek suretiyle α -galaktozidaz izoenzimlerine ait temperatur eğrileri çizildi.

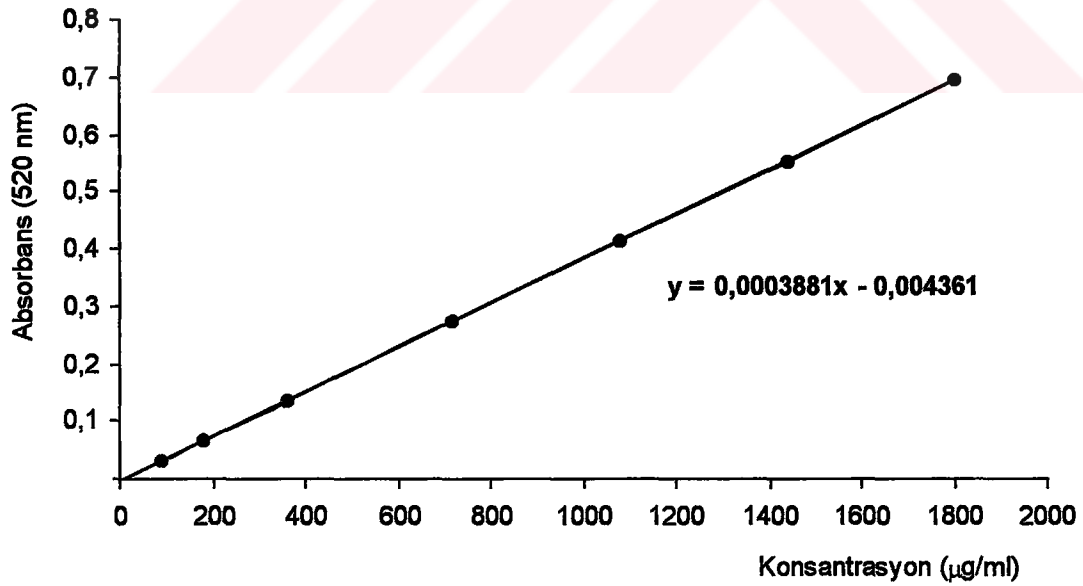
Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi

α -Galaktozidaz izoenzimlerinin aktiviteleri, enzim konsantrasyonu sabit tutularak, 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozidin sudaki 0.02 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.0025 M ve 0.00125 M lık çözeltilerinde, bundan önce aktivite ölçme deneylerinde uygulanan yöntemle tayin edildi. En küçük kareler yöntemi uygulanarak izoenzimlerin Lineweaver-Burk doğrusu çizildi ve adı geçen doğrunun denklemi elde edildi. Bu denklemden yararlanılarak α -galaktozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonların K_m ve V_{max} ları hesaplandı.

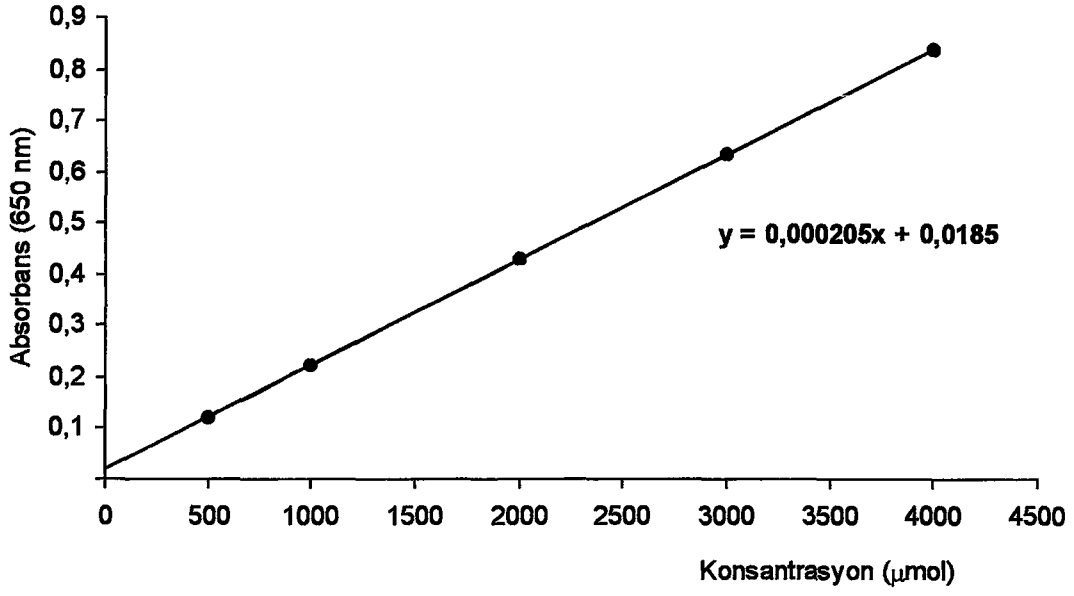




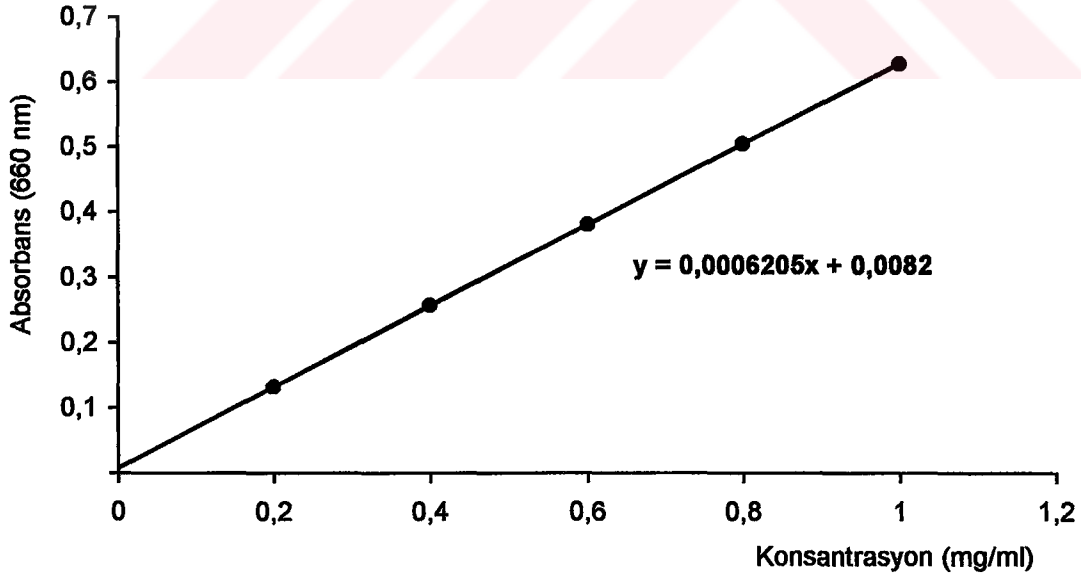
Şekil 5. 4-Nitrofenol standart eğrisi ve regresyon denklemleri.



Şekil 6. Maltoz standart eğrisi ve regresyon denklemleri.



Şekil 7. Glukoz ve fruktoz standart eğrisi ve regresyon denklemleri



Şekil 8. Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemleri.

BULGULAR

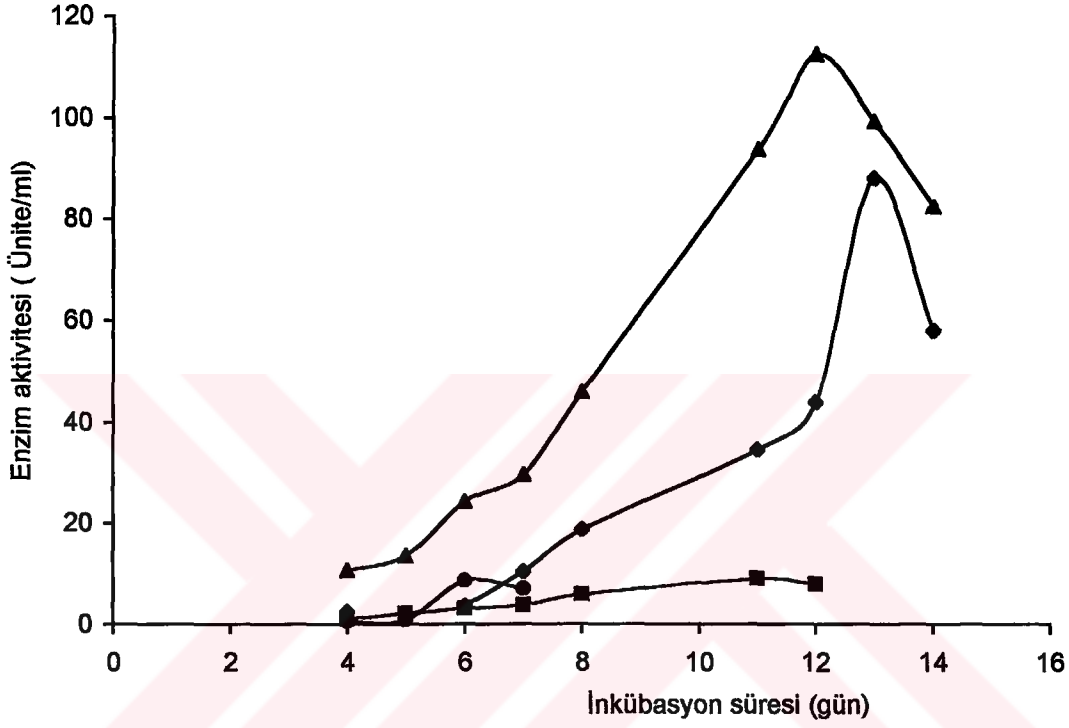
Aspergillus flavipes tarafından α -galaktozidaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz ve α -amilaz'ın indüksiyonu Tablo 1'de bileşimi verilen besiyerlerine sırasıyla %0.2 melibioz, %1 maltoz, % 0.4 sellobioz ve %1 nişasta substratları ilave edilerek gerçekleştirildi.

Besiyerlerin optimum pH'larını saptamak amacıyla pH'ları 3; 3.5; 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5; 7 olan besiyerlerinde adları geçen glikozidazların aktiviteleri ölçüldü ve α -glukozidaz ile β -glukozidazın pH'sı 6, α -amilazın pH'sı 6.5, α -galaktozidazın pH'sı 5 olan besiyerlerinde en yüksek aktivite gösterdikleri belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. *Aspergillus flavipes*'ten α -glukozidaz, β -glukozidaz, α -amilaz ve α -galaktozidaz indüksiyonu için kullanılan besiyeri bileşimleri (g/L) ve optimum pH'ları.

Enzim	pepton	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	KCl	pH
α -Glukozidaz	5	8	2	0.5	–	6
β -Glukozidaz	5	8	2	0.5	–	6
α -Amilaz	5	7	3	0.5	–	6.5
α -Galaktozidaz	15	15	–	5	5	5

İnkübasyon süresince ortamdaki enzim aktiviteleri ölçülerek α -glukozidazın 11. günde, β -glukozidazın 12. günde, α -galaktozidazın 13. günde ve α -amilazın 6. günde en yüksek aktiviteyi gösterdikleri saptandı (Şekil 9).



Şekil 9. *Aspergillus flavipes*'ın indüklenebilen bazı glikozidazlarının inkübasyon süresine bağlı olarak gösterdikleri aktiviteleri.

β -glukozidaz - —▲—; α -galaktozidaz - —◆—;
 α -glukozidaz —■—; α -amilaz - —●—

Aspergillus flavipes suşundan hazırlanan spor süspansiyonu ile inoküle edilen ve % 0.2 g melibioz içeren besiyerinin 13 gün 30°C de inkübe edilmesiyle oluşan miselyumun santrifüjle uzaklaştırılmasıyla elde edilen ve α -galaktozidaz aktivitesi gösteren 44.2 mg protein içeren 74 ml hacimdeki supernatant hidroksilapatit kromatografi sütununa uygulandı. Artan molaritedeki fosfat tamponlarıyla gerçekleştirilen elüsyon sonucunda 20 mM, 100 mM ve 500 mM

tamponlarla elüe olan fraksiyonlarda üç ayrı α -galaktozidaz aktivitesi görüldü (Şekil 10). Sırasıyla Fla, Fib ve F1c olarak adlandırılan bu fraksiyonlar, poliakrilamid jel elektroforezi ile incelendikten sonra ayrı ayrı dializ ve konsantre edildi ve DEAE-selüloz kolonlarına uygulandı.

6.3 mg protein içeren 47 ml Fla'nın, DEAE-selüloz kolonundan 300 mmol NaCl içeren pH'sı 6.8 olan 10 mM potasyum fosfat tamponuyla elüe olan fraksiyonlarında α -galaktozidaz aktivitesi görüldü ve en yüksek aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek FIIa olarak adlandırıldı (Şekil 11).

1.43 mg protein içeren 35 ml Fib'nin, DEAE-selüloz kolonundan 200 mmol NaCl içeren pH'sı 6.8 olan 10 mM potasyum fosfat tamponuyla elüe olan ve α -galaktozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek FIIf olarak adlandırıldı (Şekil 12).

3.2 mg protein içeren 64 ml F1c fraksiyonunun, yapılan DEAE kolon kromatografisinde biri 200 mmol NaCl içeren diğeri 1 mol NaCl içeren pH'sı 6.8 olan potasyum fosfat tamponuyla elüe olan iki α -galaktozidaz aktivitesi gözlemlendiği saptandı ve en yüksek aktivite gösteren tüp içerikleri birleştirilerek sırasıyla FIIf₁ ve FIIf₂ olarak adlandırıldı (Şekil 13).

Aspergillus flavipes α -galaktozidazlarının elde edilme aşamalarındaki protein miktarları ve aktiviteleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

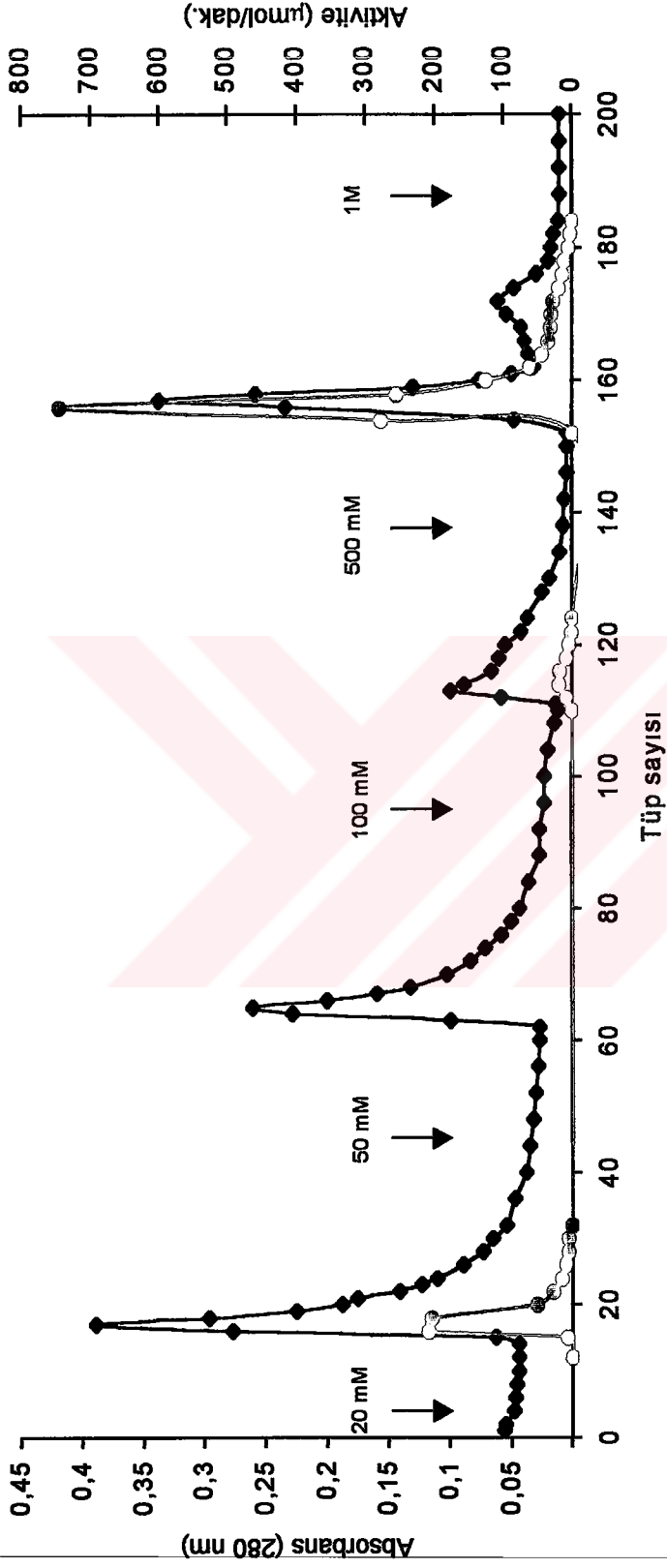
20 mM, 100 mM ve 500 mM tamponlarıyla hidroksilapatit kolondan elüe edilen α -galaktozidaz izoenzimlerin saflıklarını saptamak amacıyla yapılan poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sonucunda α -galaktozidaz aktivitesi gösteren protein bandlarının yanısıra, invertaz aktivitesi gösteren protein bandlarının da bulunduğu görüldü (Şekil 14). En yüksek aktivite gösteren F1c fraksiyonunun DEAE-selüloz kolonundan geçirilmesiyle elde edilen FIIf₁ fraksiyonunun poliakrilamid jel elektroforezinde biri α -galaktozidaz diğeri invertaz olmak üzere birbirlerine çok yakın iki band gözlemlendi (Şekil 15).

Tablo 2. *Aspergillus flavipes* α-galaktozidaz izoenzimlerinin elde edilme aşamaları

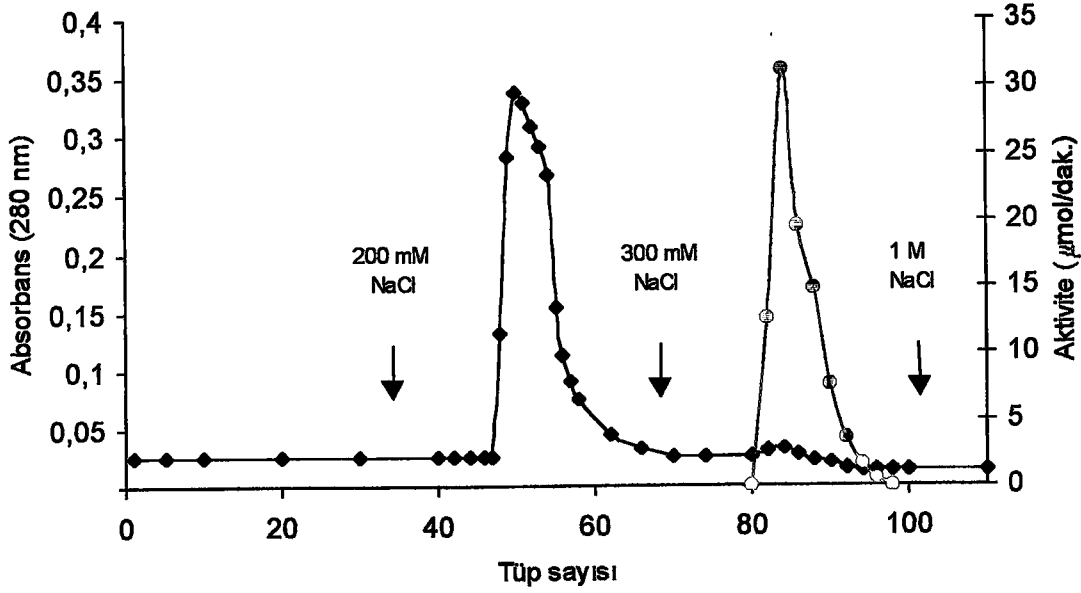
Fraksiyon	Hacim (ml)	Protein (mg)	Total aktivite* (U)	Spesifik aktivite** (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma oranı
Supernatant	74	44.20	4629.0	104.73	100	1
F Ia	47	6.30	944.5	149.92	20.4	1.43
F Ib	35	1.43	107.6	75.24	2.32	0.72
F Ic	64	3.20	2128.9	665.28	45.99	6.4
F IIa	43	0.13	155.3	1194.62	3.35	11.4
F IIb	7.6	0.045	4.8	106.66	0.10	1
F IIc ₁	35	0.24	762.9	3178.75	16.48	30.4
F IIc ₂	14.7	0.097	26.4	272.16	0.57	2.6

* - μmol 4-nitrofenol/dak.

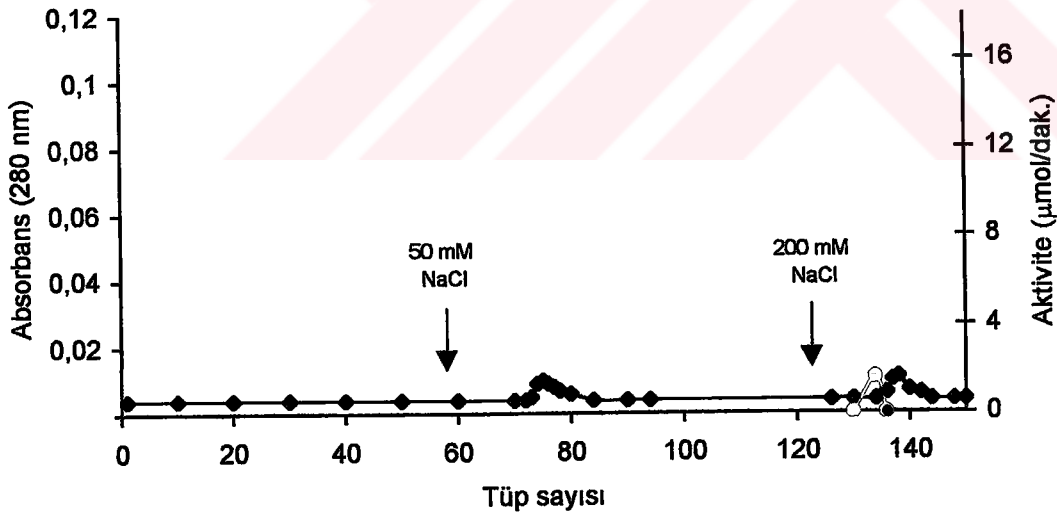
** - μmol 4-nitrofenol/dak./mg protein



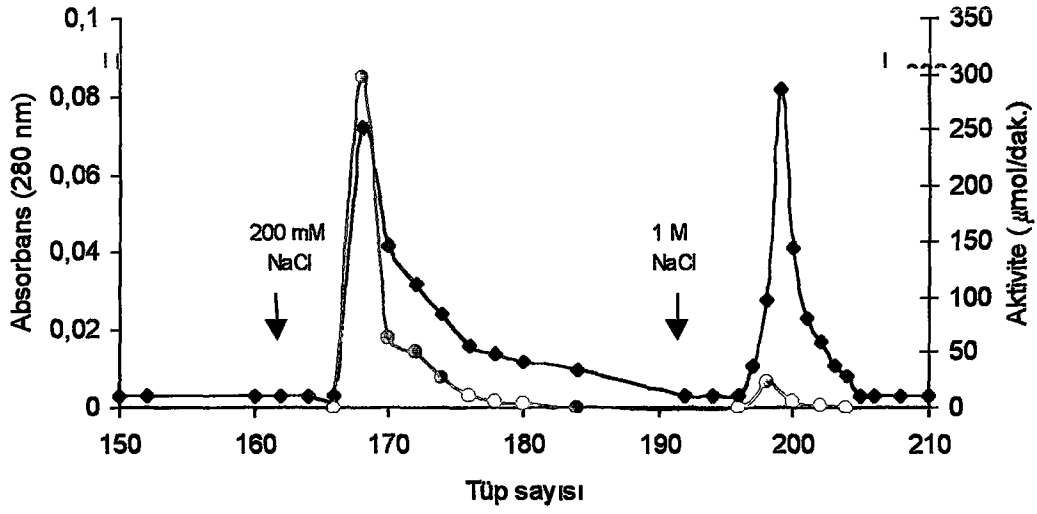
Şekil 10. *Aspergillus flavipes* α-galaktozidaz izoenzimlerinin hidroksilapatit kolon kromatografisi elüsyon grafiği. Kolon: 2x15 cm, örnek hacmi: 74 ml (44.2 mg protein), akış hızı: 38 ml/saat, tamponlar: 20 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM ve 1M olan potasyum fosfat tamponları . Proteinlerin 280 nm'deki absorbansları (---○---), enzim aktivitesi (—●—).



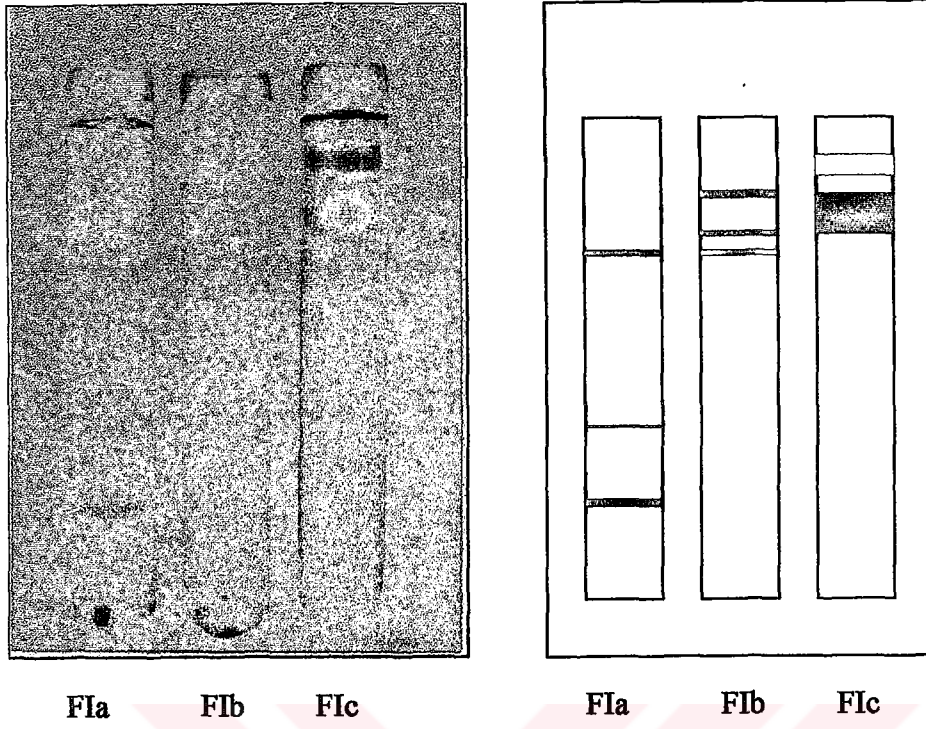
Şekil 11. Fla fraksiyonunun DEAE-selüloz kromatografisi elüsyon grafiği.
Kolon: 2x12cm, örnek hacmi: 7 ml (6 mg protein), akış hızı: 36 ml/saat.
Proteinlerin 280 nm'deki absorbansları (—♦—), enzim aktivitesi (—●—).



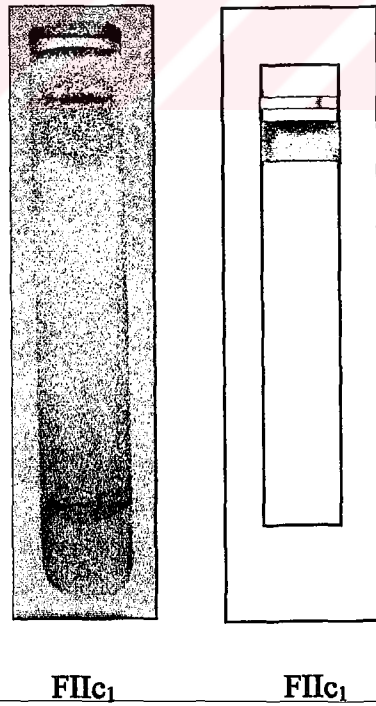
Şekil 12. Flb fraksiyonunun DEAE-selüloz kromatografisi elüsyon grafiği.
Kolon: 2x12 cm, örnek hacmi: 2.8 ml (1 mg protein), akış hızı: 34 ml/saat.
Proteinlerin 280 nm'deki absorbansları (—♦—), enzim aktivitesi (—●—).



Şekil 13. Flc fraksiyonunun DEAE-selüloz kolon kromatografisi elüsyon grafiği. Kolon: 2x12 cm, örnek hacmi: 10 ml (3.2 mg protein), akış hızı 34 ml/saat .
Proteinlerin 280 nm'deki absorbanları (—◆—), enzim aktivitesi (—○—).



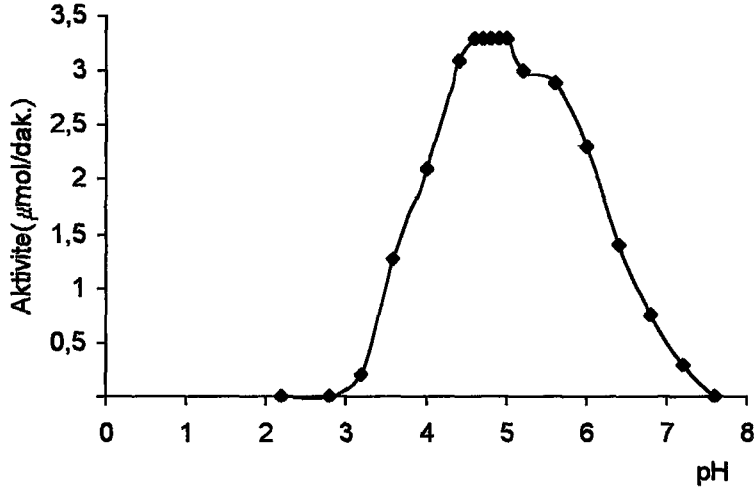
Şekil 14. Hidroksilapatit kromotografisiyle elde edilen fraksiyonların poliakrilamid jel elektroferogramları. — α -galaktozidaz; — invertaz



Şekil 15. FIIc₁ fraksiyonunun poliakrilamid jel elektroferogramı.

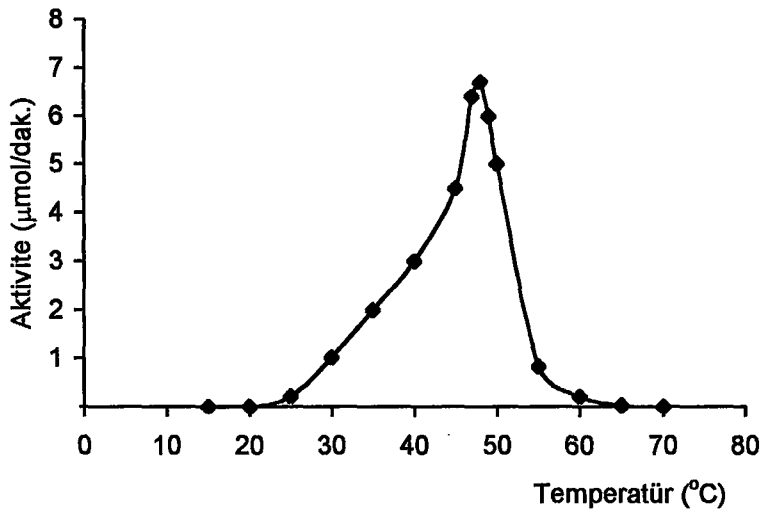
— α -galaktozidaz — invertaz

FIIa fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesinin değişik pH larda incelenmesinde, enzimin pH 4.5-5.0 arasında en yüksek aktiviteyi gösterdiği görüldü (Şekil 16).



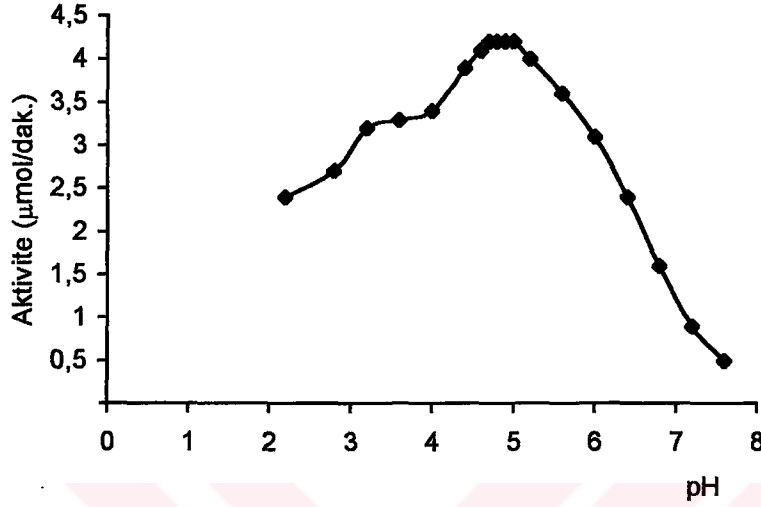
Şekil 16. FIIa fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

Temperatürün FIIa fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine olan etkisinin incelenmesinde, değişik temperatürlerde yapılan aktivite ölçmelerinde, enzimin 48°C de en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptandı (Şekil 17).



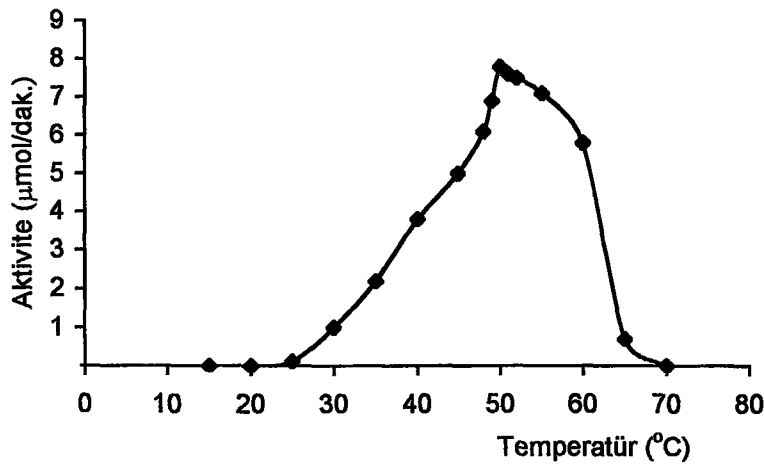
Şekil 17. FIIa fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine temperaturün etkisi.

FIIb fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin incelenmesinde, enzimin pH 4.5-5.0 arasında en yüksek aktiviteyi gösterdiği gözlemlendi (Şekil 18).



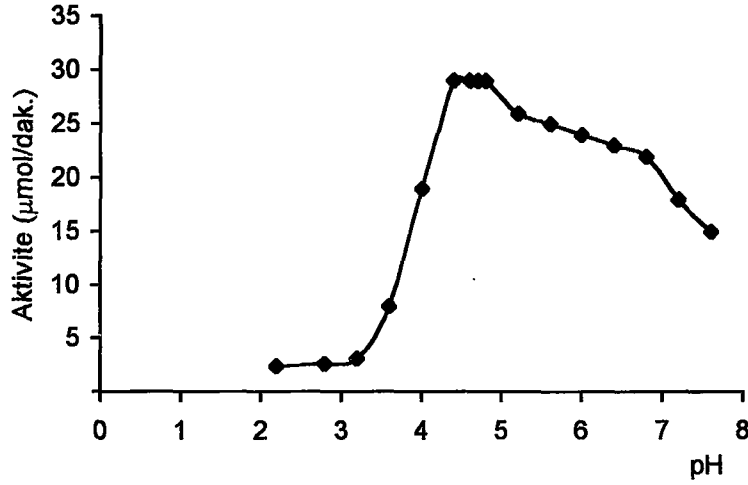
Şekil 18. FIIb fraksiyonun α -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

Temperatürün FIIb fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine olan etkisinin incelenmesinde, enzimin 50°C de maksimum aktivite gösterdiği saptandı (Şekil 19).



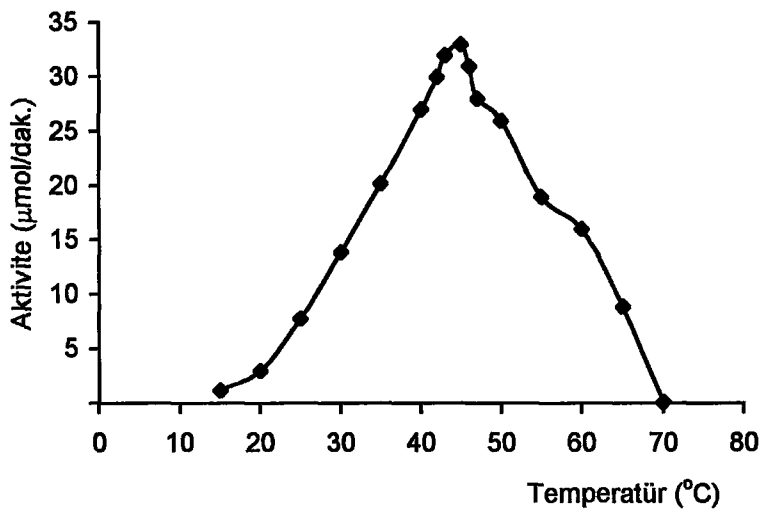
Şekil 19. FIIb fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine temperaturün etkisi.

FIIc₁ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesinin pH ya bağılı olarak değişmesinin incelenmesinde, enzimin pH 4.4-4.8 arasında en yüksek aktiviteyi gösterdiği görüldü (Şekil 20).



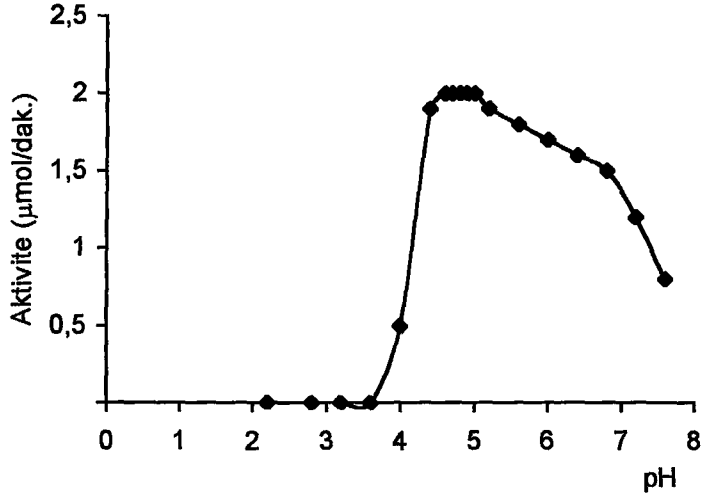
Şekil 20. FIIc₁ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

FIIc₁ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine temperaturün etkisinin araştırılması sonucunda, enzimin optimum temperaturünün 45°C olduğu saptandı (Şekil 21).



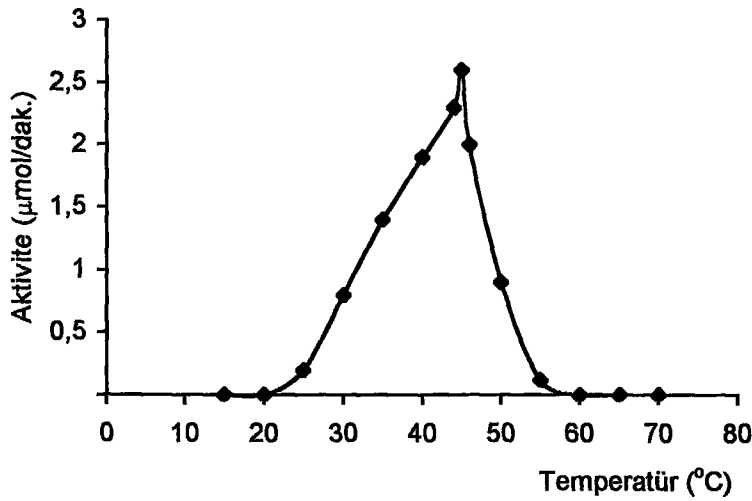
Şekil 21. FIIc₁ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine temperaturün etkisi.

FIIc₂ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH nın etkisinin incelenmesinde, enzimin pH 4.5-5.0 arasında en yüksek aktiviteyi gösterdiği görüldü (Şekil 22).



Şekil 22. FIIc₂ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine pH nın etkisi.

FIIc₂ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine temperaturün etkisinin incelenmesinde, optimum temperaturünün 45°C olduğu belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23. FIIc₂ fraksiyonu α -galaktozidaz aktivitesi üzerine temperaturün etkisi.

Substrat konsantrasyonunun FIIa fraksiyonundaki α -galaktozidazın aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesinde, bu enzimin 4-nitrofenol- α -D-galaktopiranozide karşı Km ve Vmax değerleri sırasıyla 3.16×10^{-3} M ve 2.6 mM 4-nitrofenol/dak. olarak saptandı (Şekil 24).

FIIb fraksiyonu enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin araştırılması sonucunda , Km ve Vmax değerleri sırasıyla 4.17×10^{-3} M ve 2.4 mM 4-nitrofenol/dak. bulundu (Şekil 25).

Substrat konsantrasyonunun FIIc₁ fraksiyonundaki α -galaktozidazın aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesinde, Km ve Vmax değerleri sırasıyla 1.9×10^{-3} M ve 11.5 mM 4-nitrofenol/dak. bulundu (Şekil 26).

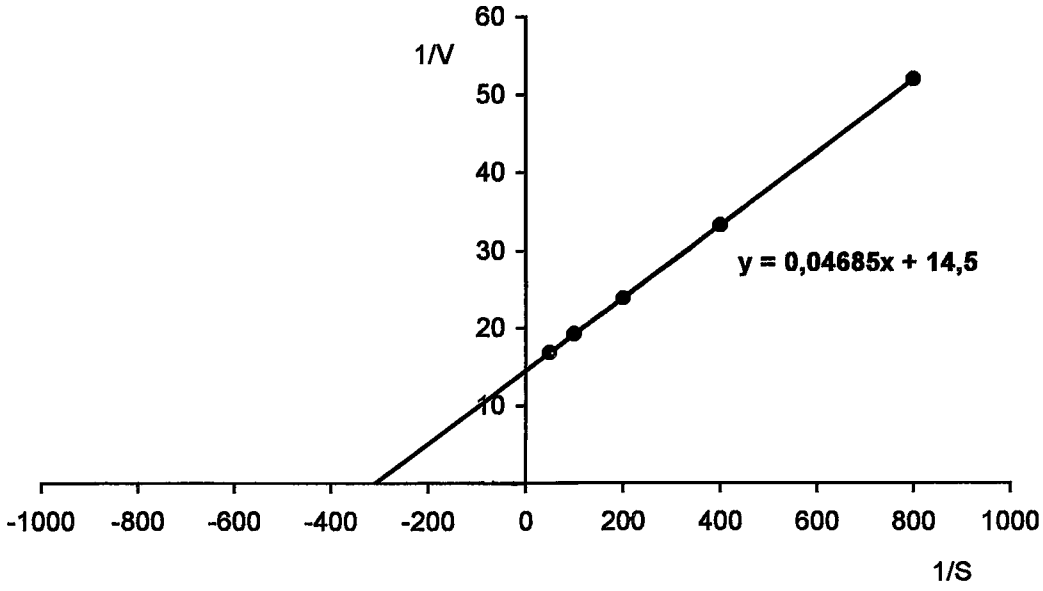
FIIc₂ fraksiyonundaki α -galaktozidazın 4-nitrofenole karşı Km'i 1.7×10^{-3} M, Vmax değeri 1.2 mM 4-nitrofenol/dak. bulundu (Şekil 27).

Aspergillus flavipes'ten elde edilen α -galaktozidaz izoenzimlerinin kinetik özellikleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

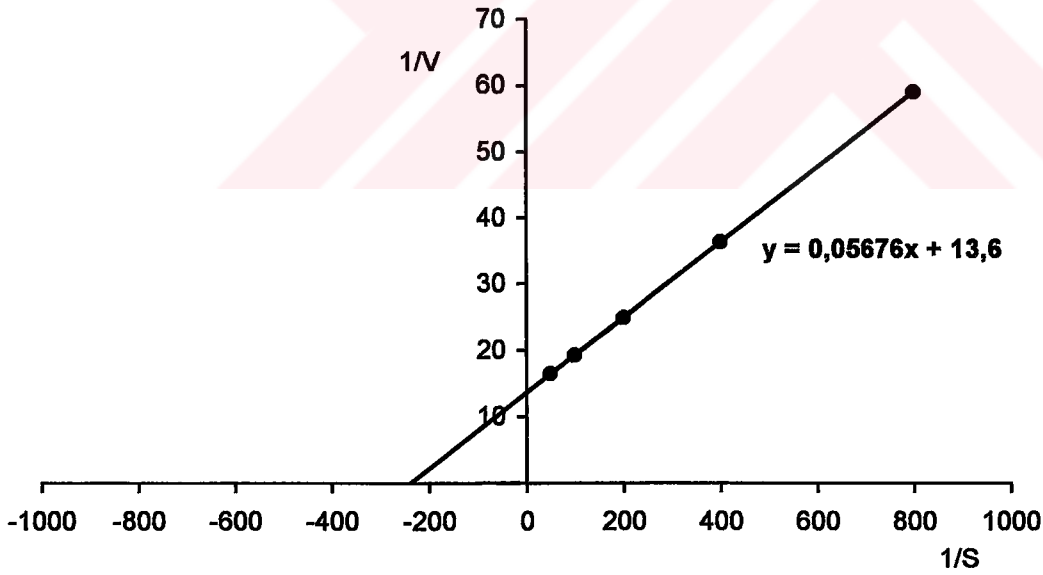
Tablo 3. *Aspergillus flavipes* α -D-galaktozidaz izoenzimlerinin özellikleri.

Fraksiyonlar	Optimum pH	Optimum temperatur(C°)	Km (M)	Vmax (U) *
FIIa	4.5-5.0	48	3.16×10^{-3}	2.6
FIIb	4.5-5.0	50	4.17×10^{-3}	2.4
FIIc ₁	4.4-4.8	45	1.9×10^{-3}	11.5
FIIc ₂	4.5-5.0	45	1.7×10^{-3}	1.2

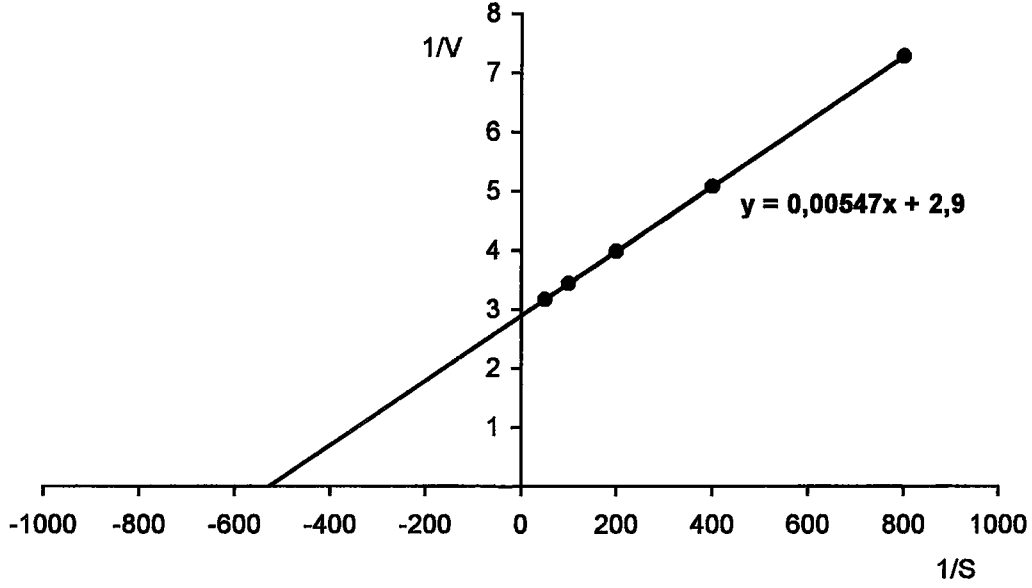
* mM 4-nitrofenol/dakika



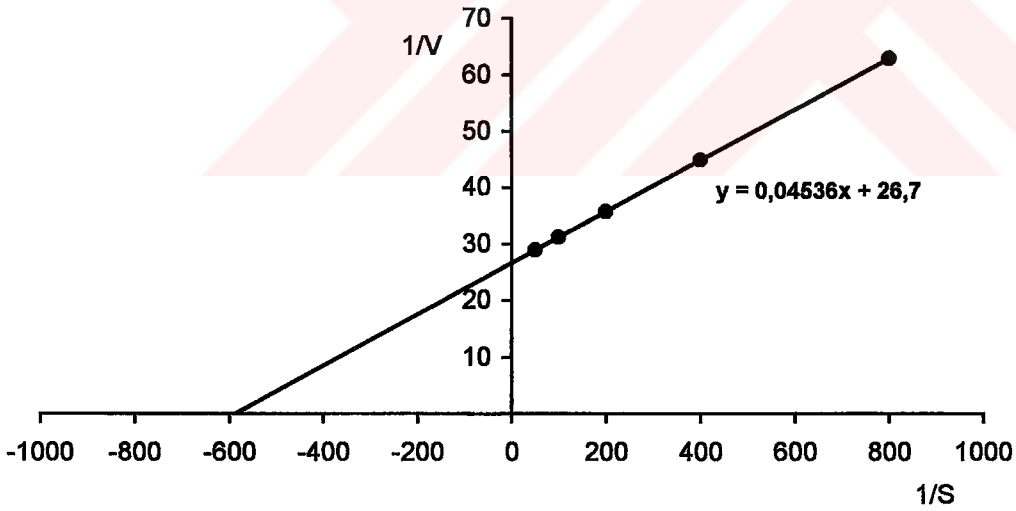
Şekil 24. FIIa fraksiyonunun 4-nitrofenil α -D-galaktopiranozide karşı K_m değerinin saptanması ($-1/K_m = -316.46$)



Şekil 25. FIIb fraksiyonunun 4-nitrofenil α -D-galaktopiranozide karşı K_m değerinin saptanması ($-1/K_m = -239.8$)



Şekil 26. FIIc₁ fraksiyonunun 4-nitrofenil α -D-galaktopiranozide karşı Km değerinin saptanması (-1/Km = -526)



Şekil 27. FIIc₂ fraksiyonunun α -D-galaktopiranozide karşı Km değerinin saptanması (-1/Km = -588)

TARTIŞMA

α -Galaktozidaz tıpta flatulansın tedavisinde, besin endüstrisinde ve oligosakkaridlerin yapılarının aydınlatılması gibi bilimsel araştırmalarda kullanmak amacıyla memeli dokuları, mikroorganizmalar ve bitkiler gibi birçok değişik kaynaklardan elde edilmiştir (1,2,4,5,7,11,14,19,20,22,24,26,32,34). Bu çalışmada ise *Aspergillus flavipes*'ten α -galaktozidaz, dört ayrı izoenzimi halinde ilk kez elde edilmiş ve izoenzimlerin başlıca kinetik özellikleri incelenmiştir.

Bilindiği gibi fermentasyon işlemlerinin başlıca amacı mümkün olan en kısa sürede ve en az hammadde kullanarak en fazla ürünün elde edilmesidir. Kullanılan mikroorganizmaya ve indüklenen enzime bağlı olarak gerek besiyeri bileşimi ve indükleyici olarak kullanılan substratlar, gerekse inkübasyon süresi, optimum pH, sıcaklık gibi fermentasyon parametreleri farklılık gösterirler. α -Galaktozidazın substrat spesifitesinin geniş sınırlar içinde değiştiği bilinmektedir. *Vicia faba* ve *Mortierella vinacea* α -galaktozidazlarının p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid gibi küçük molekülü substratları hidroliz edebildiği, ancak galaktomannanlar üzerine etkili olmadığı, *Phaseolus vulgaris* α -galaktozidazlarının ise her iki substratı hidroliz edebildiği bildirilmiştir (2,59,68). α -Galaktozidazların doğal substratlara (melibioz, rafinoz, stakiyoz) karşı ilgilerinin sentetik substratlara karşı gösterdikleri ilgilerinden daha az olduğu bildirilmiştir (21). Yüksek ekstraselluler α -galaktozidaz aktivitesi doğal substratlardan rafinoz ve stakiyoz bakımından zengin olan soya fasulyesi ve buğday kepeği kullanıldığı zaman elde edilmiştir (3,17). Melibioz α -galaktozidaz tarafından en kolay hidroliz edilebilen doğal substrat olarak bildirilmiştir (6).

Yukarıdaki literatür bulguları gözönünde bulundurularak bu çalışmada besiyerinde indükleyici olarak melibioz kullanılmış ve sonuç olarak *Aspergillus flavipes*'ten dört ayrı α -galaktozidaz izoenzimi elde edilmiştir.

Corynebacterium murisepticum ile inoküle edilen (50) ve karbon kaynağı olarak rafinoz içeren besiyerinden miselyumun uzaklaştırılması suretiyle elde edilen supernatantın ince tabaka kromatografisinde, α -galaktozidazın rafinoz üzerine etkisi sonucu sakkaroz ve galaktoza ait lekeler görülmesi beklenirken, substrat olarak kullanılan rafinoz üzerine α -galaktozidaz ile birlikte salgılanan invertazın etkisiyle meydana gelen melibioz ile fruktoz saptanmıştır. Bu araştırmacılara göre, *C.murisepticumdan* α -galaktozidaz indüksiyonu rafinoz tarafından değil, α -galaktozidaz ile birlikte salgılanan invertazın rafinoz üzerine etkisiyle meydana gelen melibioz tarafından gerçekleştirilmektedir (50). *Cladosporium cladosporoides* (16), *Aspergillus tamarisii* (14,15) ve *Aspergillus oryzae* (4,17) ile yapılan araştırmalarda da benzeri sonuçlar bildirilmiş, adları geçen mikroorganizmalar tarafından ekstraselüler α -galaktozidaz yanında invertaz aktivitesi de saptanmış, invertazın rafinoz ve stakioz üzerine etkisiyle meydana gelen melibioz ve manninotriozun α -galaktozidaz indüksiyonunu arttırdığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada kolon kromatografisiyle belirlenen α -galaktozidaz izoenzimleri dışında poliakrilamid jel elektroforezinde invertaz bandlarının bulunması literatür bulguları ile uyum içindedir.

α -Galaktozidazların, elde edilen kaynaklara göre, farklı sayıda izoenzimlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Örneğin bitkiler dünyasında *Leguminosae* familyasından *Vicia sativa* (59) ve *Phaseolus vulgaris* (2) tohumlarında bir tek α -galaktozidaz bulunmuş ve ileri derecede saflaştırılmıştır. Buna karşın *Vicia faba* (20), *Pisum sativum* (7), *Trifolium repens* (78), kaba yonca, soya fasulyesi, guar ve keçiboynuzu (44) tohumlarında α -galaktozidazın birden fazla izoenzim halinde bulunduğu belirlenmiştir. Mc Cleary ve Matheson (44) keçiboynuzu ve soya fasulyesi tohumlarından, DEAE-selüloz kromatografisi ile α -galaktozidaz aktivitesi gösteren üç fraksiyon elde etmişler ve bunlardan birinin Sephadex G-200 kolonuna uygulanmasıyla iki ayrı α -galaktozidaz aktivitesi saptamışlardır. Bu çalışmamızda hidroksilapatit kolon

kromatografisi ile α -galaktozidazın üç izoenziminin (F1a, F1b ve F1c) bulunması ve bunlardan birinin (F1c) DEAE-selüloz kolonundan elüsyonu ile iki ayrı α -galaktozidaz aktivitesi görülmesi literatür bulguları ile ileri derecede benzerlik göstermektedir.

Küf mantarlarıyla yapılan araştırmalarda, α -galaktozidazın değişik sayıda izoenzimi halinde bulunduğu halde (82), bunlardan en yüksek aktivite gösteren fraksiyon ileri derecede saflaştırılmış ve incelenmiştir. Örnek olarak *Mortierella vinacea* (68) ve *Aspergillus niger* (66)'den elde edilen üç α -galaktozidaz izoenziminden en yüksek aktivite gösterenlerin ileri derecede saflaştırıldığı ve kinetik özelliklerinin incelendiği söylenebilir. Bu çalışmada, hidroksilapatit kolon kromatografisi ile elde edilen ve en yüksek aktivite gösteren F1c₁ fraksiyonunun, DEAE-selüloz kolonundan geçirilmesi ile izole edilen F11c₁ fraksiyonunun, spesifik aktivitesi, optimum pH, optimum sıcaklık ve 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı afinitesi bakımından, diğer *Aspergillus* türlerinden izole edilen α -galaktozidazlarla benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Küf mantarlarından elde edilen α -galaktozidazların optimum pH'ları asidiktir (73). Örneğin *Aspergillus niger* (6) α -galaktozidazı pH 3.8-4.2, *Aspergillus niger* (12) α -galaktozidazı 3.5-4.0, *Aspergillus oryzae* (4,17) α -galaktozidazı pH 4.0, *Aspergillus tamarii* (15) α -galaktozidazı pH 4.8, *Mortierella vinacea* (68) α -galaktozidazı pH 6.0, *Monascus pilosus* (79) α -galaktozidazı pH 5 te en yüksek enzimatik aktiviteyi göstermektedir. Bu çalışmada *Aspergillus flavipes*'ten elde edilen α -galaktozidaz izoenzimlerinin 4.5-5.0 olarak belirlenen optimum pH'ları yukarıda belirtilen α -galaktozidazlara ait optimum pH değerleriyle asidik olmaları bakımından uygunluk göstermektedir.

Bu çalışmada *Aspergillus flavipes* α -galaktozidaz izoenzimlerinin optimum sıcaklıklarının 45°C - 50°C arasında değiştikleri saptanmıştır. Bu bulgular *Aspergillus oryzae* (17), *Saccharomyces carlsbergensis* (37), *Aspergillus niger*' den (66) elde edilen α -galaktozidazların 50 °C olarak bildirilen optimum sıcaklıkları ile ilgili araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Diğer taraftan enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklığın belirlenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda, optimum sıcaklıkları oldukça

yüksek enzimlere de rastlanmıştır, örneğin *B. stearotermophilus*, *Penicillium jantinelum*, *Thermotoga neapolitana*, *Aspergillus niger* α -galaktozidazın optimum sıcaklıklarının sırasıyla 60°C, 60°C, 75°C ve 65°C oldukları bildirilmiştir (69, 28, 26, 12).

Küf mantarlarından elde edilen α -galaktozidazların 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı Km değerlerinin 10^{-4} - 6.10^{-3} M arasında değiştiği bildirilmiştir (65). Örneğin *Aspergillus niger* den izole edilen α -galaktozidazların 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı Km değerleri 0.35 mM (6), 0.44mM (1,12) olarak bulunmuş, *Aspergillus oryzae* (4), *Aspergillus nidulans* (61), *Monascus pilosus* (79), *Mortierella vinacea* (68), *Picnoporus cinnabarinus* (55) α -galaktozidazların Km değerleri sırasıyla 0.27mM, 0.4mM, 0.80 mM, 0.36 mM, 1.15 mM olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen α -galaktozidaz izoenzimlerinin 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı Km değerleri sırasıyla 3.16 mM, 4.17mM, 1.9 mM ve 1.7 mM olarak saptanmıştır. Bu değerler yukarıda belirtilen mantar α -galaktozidazlarına ait Km sınırları arasındadır.

ÖZET

***Aspergillus flavipes*'ın indüklenebilen α -galaktozidaz izoenzimleri**

Bu çalışmada, α -galaktozidaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz ve α -amilazın *Aspergillus flavipes*'ten elde edilmeleri için optimal üreme koşulları araştırıldı. Bu nedenle besiyeri bileşiminin ve pH'sının, inkübasyon süresinin ve substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. α -Glukozidaz ve β -glukozidaz indüksiyonu pepton (5g/L), KH_2PO_4 (8g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5g/L) içeren ve pH'sı 6 olan besiyerine sırasıyla %1 oranında maltoz ve %0.4 oranında sellobioz; α -amilaz indüksiyonu pepton (5g/L), KH_2PO_4 (7g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (3g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L) içeren ve pH'sı 6,5 olan besiyerine %1 oranında nişasta; α -galaktozidaz indüksiyonu ise pepton (15g/L), KH_2PO_4 (15g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5g/L) ve KCl (5g/L) içeren ve pH'sı 5 olan besiyerine %0.2 oranında melibioz ilavesi ile hazırlanan ortamlarda gerçekleştirildi ve α -glukozidazın 11. günde, β -glukozidazın 12. günde, α -amilazın 6. günde ve α -galaktozidazın 13. günde en yüksek enzim aktivitesini gösterdikleri saptandı.

Aspergillus flavipes'ten α -galaktozidaz izoenzimlerinin elde edilmesi için besiyeri otoklavda steril edildi ve *Aspergillus flavipes*'in spor süspansiyonu (5×10^7 spor/ml) ile inoküle edilerek 13 gün 30°C de inkübe edildi. Daha sonra santrifüj işlemiyle miselyum uzaklaştırıldı ve elde edilen supernatant'tan hidroksilapatit kolon kromatografisi ile Fla, Flb, Fic olarak adlandırılan α -

galaktozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar, daha sonra, adları geçen fraksiyonlara ayrı ayrı DEAE-selüloz kromatografisi uygulanmasıyla, sırasıyla FIIa, FIIb, FIIC₁ ve FIIC₂ olarak adlandırılan ve α -galaktozidaz aktivitesi gösteren dört fraksiyon elde edildi ve izoenzimlere ait bazı kinetik özellikler belirlendi.

FIIa fraksiyonundaki α -galaktozidazın en yüksek aktivitesini pH 4.5-5.0 arasında gösterdiği, optimum temperaturünün 48°C olduğu saptandı. 4-Nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızının ve Km değerinin sırasıyla 2.6 mM 4-nitrofenol/dak. ve 3.16×10^{-3} M olduğu bulundu.

α -Galaktozidaz aktivitesi gösteren FIIb fraksiyonu ile yapılan deneyler sonucunda, enzimin optimum pH'sının 4.5-5.0 arasında, optimum temperaturünün 50°C, 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı Km ve Vmax değerlerinin sırasıyla 4.17×10^{-3} M ve 2.4 mM nitrofenol/dak. olduğu saptandı.

FIIC₁ fraksiyonundaki α -galaktozidazın optimum pH'sının 4.4-4.8 arasında, optimum temperaturünün 45°C, 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı Km ve Vmax değerlerinin sırasıyla 1.9×10^{-3} M ve 11.5 mM nitrofenol/dak. olduğu saptandı.

FIIC₂ fraksiyonundaki α -galaktozidazın optimum pH'sının 4.5-5.0 arasında, optimum temperaturünün 45°C, 4-nitrofenil- α -D-galaktopiranozide karşı Km ve Vmax değerlerinin sırasıyla 1.7×10^{-3} M ve 1.2 mM nitrofenol/dak. olduğu bulundu.

SUMMARY

Induced α -galactosidase isoenzymes of *Aspergillus flavipes*

In the present study the effect of composition and pH of culture medium, incubation time and substrate concentration was examined so that optimum conditions for mycelial growth of *Aspergillus flavipes* and induction of α -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase and α -amylase from this fungus could be determined, then α -galactosidase was induced and some of its properties were studied. α -Glucosidase and β -glucosidase production were induced by addition of 1% maltose and 0.4% cellobiose, respectively to the medium consisted of peptone (5g/L), KH_2PO_4 (8g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5g/L), at pH 6; α -amylase production was induced by addition of 1% starch to the medium consisted of peptone (5g/L), KH_2PO_4 (7g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (3g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5g/L), at pH 6,5 and α -galactosidase production was induced by addition of 0.2% melibiose to the medium consisted of peptone (15g/L), KH_2PO_4 (15g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5g/L) ve KCl (5g/L) at pH 5. α -Glucosidase, β -glucosidase, α -amylase and α -galactosidase showed maximum activity at 11 th, 12 th, 6 th and 13 th days respectively.

The culture medium prepared for induction of α -galactosidase from *Aspergillus flavipes* was autoclaved, inoculated with spores at concentration of 5×10^7 per ml and incubated at 30°C for 13 days. Culture medium was centrifuged and the supernatant was fractionated on hydroxylapatite column, which resulted in three protein fractions containing α -galactosidase activity, called Fla, Fib and Fic. These fractions were further purified by DEAE-cellulose

chromatography, four α -galactosidase activities FIIa, FIIb, FIIc₁ and FIIc₂ were separated, some kinetic properties of these isoenzymes were examined.

It was determined that optimum pH of α -galactosidase in FIIa fraction existed between pH 4.5-5.0 and optimum temperature at 48°C. Km and Vmax values for 4-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside were found 3.16×10^{-3} M and 2.6 mM nitrophenol/min., respectively.

Experiments on the α -galactosidase of FIIb fraction showed that optimum pH of the enzyme was in the range 4.5-5.0 and optimum temperature at 50°C. Km and Vmax values for 4-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside were found 4.17×10^{-3} M and 2.4 mM 4-nitrophenol/min., respectively.

α -Galactosidase isoenzyme in FIIc₁ fraction exhibited optimum pH between 4.4-4.8, optimum temperature at 45°C, Km and Vmax values 1.9×10^{-3} M and 11.5 mM 4-nitrophenol/min. respectively, if 4-nitrophenyl α -D-galactopyranoside is the substrate.

It was found that α -galactosidase isoenzyme in FIIc₂ fraction had optimum pH in the range 4.5 - 5.0, optimum temperature at 45°C, Km and Vmax values 1.7×10^{-3} M and 1.2 mM nitrophenol/min., respectively.

KAYNAKLAR

1. Agnantiari, G., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J. A purified α -galactosidase from *Aspergillus niger* with enhanced kinetic characteristics. *Acta Biotechnol.* 1991; 11(5): 479-484.
2. Agrawal, K.M.L., Bahl, O.P. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 1968; 243: 103-111.
3. Annunziato, M.E., Mahoney, R.R., Mudgett, R.E. Production of α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *J.Food Sci.* 1986; 51(5): 1370-1371.
4. Annunziato, M.E., Mahoney, R.R. Partial purification and characterization of α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J.Food Biochem.* 1987; 11(4): 263-277.
5. Arnaud, N., Bush, D.A., Horisberger, M. Study of an intracellular α -galactosidase from the thermophilic fungus *Penicillium duponti*. *Biotechnol.Bioeng.* 1976; 18: 581-585.
6. Bahl, O.P., Agrawal, K.M.L. Glycosidases of *Aspergillus niger*. Purification and characterization of α - and β -galactosidases and β -N-acetylglucosaminidase. *J.Biol.Chem.* 1969; 244: 2970-2978.

7. Barham, D., Dey, P.M., Griffiths, D., Pridham, J.B. Studies on the distribution of α -galactosidases in seeds. *Phytochemistry*. 1971; 10: 1759-1763.
8. Barman, T.E. *Enzyme Handbook*, Verlag, Berlin. 1969 : 580.
9. Barnett, J.A. The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1981; 39: 347-404.
10. Beshkova, D.M., Latov, V.K., Gracheva, I.M., Belikov, V.M. Coordination immobilization of fungal proteinases. *Prikl. Biochim. Microbiol.* 1981; 17(2):254-260.
11. Bishop, D.F., Desnick, R.J. Affinity purification of α -galactosidase A from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogen contamination. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 1307-1316.
12. Christakopoulos, P., Macris, B.J., Kekos, D. Exceptionally thermostable α - and β - galactosidases from *Aspergillus niger* separated in one step. *Process. Biochem. Int.* 1990; 25(6): 210-212.
13. Chudzikowski, R.J. Guar gum and its applications. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1971; 22: 43-60.
14. Civas, A., Eberhard, R., Le Dizet, P., Petek, F. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Mycelial α -D-galactosidases. *Biochem.J.* 1984; 219: 849-855.
15. Civas, A., Eberhard, P., Le Dizet, P., Petek, F. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted α -galactosidase and β -D-mannanase. *Biochem. J.* 1984; 219: 857-863.

16. Cruz, R., Batistela, J.C., Wosiacki, G. Microbial α -galactosidase for soymilk processing. *J. Food Sci.* 1981; 46: 1196-1200.
17. Cruz, R., Park, Y.K. Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. *J. Food Sci.* 1982; 47: 1973-1975.
18. Dea, I.C.M., Morrison, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1976; 31: 241-312.
19. Dean, K.J., Sweeley, C.C. Studies on human liver α -galactosidases. Purification of α -galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 9994-10000.
20. Dey, P.M., Pridham, J.B. Substrate specificity and kinetic properties of α -galactosidases from *Vicia faba*. *Biochem. J.* 1969; 115: 47-54.
21. Dey, P.M., Pridham, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. *Adv. Enzymol.* 1972; 36: 91-130.
22. Dey, P.M. Transgalactosylation activity of sweet almond α -galactosidase: synthesis of saccharides. *Phytochemistry.* 1979; 18(1): 35-38.
23. Dey, P.M. Inhibition, transgalactosylation and mechanism of action of sweet almond α -galactosidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1969; 191: 644-652.
24. Dey, P.M. Biochemistry of α -D-galactosidic linkages in the plant kingdom. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1980; 37: 283-372.
25. Dey, P.M., Patel, S.P., Brownleader, M.D. Induction of α -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonobola*) gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993; 17: 361-371.

26. Duffaud, G.D., Mc Cutchen, C.M., Leduc, P., Parker, K.N., Kelly, R.M. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63(1): 169-177.
27. Dziezak, J.D. Enzymes: Catalysts for food processes. *Food Technology*. 1991; 45:78-85.
28. Elshafei, A.M., Foda, M.S., Aboul-Enein, A., Afify, A.S., Ali, N.H. Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Penicillium janthinellum*. *Acta Biotechnol.* 1993; 13(4): 351-359.
29. Folin, O., Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 1927: 73, 627-650.
30. Garro, M.S., de Giori, G.S., de Valdez, G.F., Oliver, G. Characterization of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *J. Appl. Bacteriol.* 1993; 75: 485-488.
31. Gitzelman, R., Auricchio, S. The handling of soya alpha-galactosides by a normal and a galactosemic child. *Pediatrics*. 1965; 36 (2): 231-236.
32. Guiseppin, M.L.F., Almkerk, J.W., Heistek, J.C., Verrips, C.T. Comparative study on the production of guar α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59(1): 52-59.
33. Hughes, R.C. Glycoproteins . Chapman and Hall, London. 1983; 11: 35.

34. Kawamura, S., Kasai, T. Tanusi, S. Purification and properties of α -galactosidase from *Escherichia coli* subsp. *Communior* IAM 1272. Agric. Biol. Chem. 1976; 40(4): 641-648.
35. Kobayashi, H., Suzuki, H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. J. Ferment. Technol. 1972; 50(9): 625-632.
36. Kühne, W. Unters.a.d.Phisiol.Institut der Univ.Heidelberg 1878;1: 291. Ref. Dixon, M., Webb, C.E. Enzymes. Longman Green and Co ltd., London. 1966;1.
37. Lazo, P.S., Ochoa, A.G., Gascon, S. α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cellular localization, and purification of the external enzyme. Eur. J. Biochem. 1977; 77: 375-382.
38. Liljeström-Suominen, P.L., Joutjoki, V., Korhola, M. Construction of stable α -galactosidase - producing baker's yeast strain. Appl. Environ. Mikrobiol. 1988; 54(1): 245-249.
39. Lineweaver, H., Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 1934; 56: 658-666.
40. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
41. Manzanares, P., de Graaff, L.H., Visser, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*. Purification of a novel alpha-galactosidase activity. Enzyme Microb. Technol. 1998; 22(5): 383-390.
42. Martindale, W. The Extra Pharmacopoeia. 30th Edition. The Pharmaceutical Press. London. 1993; 1421, 1474.

43. Mathew, D.C., Balasubramaniam. Mechanism of action of α -galactosidase. *Phytochemistry*. 1987; 26(5): 1299-1300.
44. Mc Cleary, B.V., Matheson, N.K. α -Galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry*. 1974; 13: 1747-1757.
45. Mc Cleary, B.V., Matheson, N.K. Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds. *Phytochemistry*. 1975; 14: 1187-1194.
46. Mc Cleary, B.V. Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. *Phytochemistry*. 1983; 22(3): 649-658.
47. Mc Ilvaine, T.C. *J. Biol. Chem.* 1921; 49: 183-185. Ref: Sober, H.A. *Handbook of Biochemistry Selected Data for Molecular Biology*. 2 nd. edition. The Chemical Rubber Co. Ohio. 1970:J-234.
48. Mc Kay, A.M. Production of extracellular β -glucosidase and α -galactosidase during fungal growth on polygalacturonate. *J. Food Sci.* 1991; 56(6): 1749-1750.
49. Mitsutomi, M., Ohtakara, A. A simplified procedure for purification and crystallization of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.* 1984; 48(12): 3153-3155.
50. Nadkarni, M.A., Nair, C.K.K., Pandey, V.N., Pradhan, D.S. Characterization of alpha-galactosidase from *Corynebacterium murisepticum* and mechanism of its induction. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1992; 38(1): 23-34.

51. Neidleman, S.L. Enzymes in the food industry: a backward glance. Food Technology. 1991; 45:88-91.
52. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem.1944; 153: 375-380.
53. Neyzi, O., Ertuğrul, T. Pediatri. Nobel Tıp Kitabevleri .1993; 787.
54. Obara, J., Hashimoto, S. Enzyme applications in the sucrose industries. Sugar Technol. Rev. 1977; 4: 209-258.
55. Ohtakara, A., Mitsutomi, M., Uchida, Y. Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*. Agric. Biol. Chem. 1984; 48(5): 1319-1327.
56. Oishi, K., Aida, K. Sugar specificity in the induction and on the activity of *Streptomyces* α -D-galactosidases. Agric. Biol. Chem. 1975; 39(11): 2129-2135.
57. Payen, A., Persoz, J.F., Ann. Chim (Phys.), 53, 73 (1833).- Ref., Dixon, M., Webb, C.E. Enzymes. Longman Green and Co Ltd. London.1966; 1.
58. Pekin, B. Enzimler. Endüstriyel mikrobiyoloji (Enver Tali Çetin) İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı-BAYDA. 1983.
59. Petek, F., Villaroya, E., Courtois, J.E. Purification et propriétés de l' α -galactosidase des graines germées de *Vicia sativa* . Eur. J. Biochem. 1969; 8: 395-402.
60. Reichelt, J.R. Toxicology. In Industrial Enzymology. (Godfrey, T., Reichelt, J. eds.). Nature Press. New York. 1983; 138-156.

61. Rios, S., Pedregosa, A.M., Monistrol, I., F., Laborda, F. Purification and molecular properties of an α -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 1993;112(1): 35-42.
62. Sherief, A.A. Separation and some properties of an endo-1,4-beta-D-xylanase from *Aspergillus flavipes*. Acta Microbiol.Hung. 1990; 37(3):301-306
63. Shibuya, H., Kobayashi, H., Park, G.G., Komatsu, Y., Sato, T., Kaneko, R., Nagasaki, H., Yoshida, S., Kasamo, K., Kusakabe, I. Purification and some properties of α -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. Biosci. Biotech. Biochem. 1995; 59(12): 2333-2335.
64. Schmid, K., Schmitt, R. Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Purification and properties of a new α -galactosidase specified by a transmissible plasmid. Eur. J. Biochem. 1976; 67:95-104.
65. Schuler, R., Mudgett, R.E., Mahoney, R.R. Kinetic properties of α -D-galactosidase from *Lactobacillus fermenti*. Enzyme Microb. Technol. 1985; 7: 207-211.
66. Somiari, R.I., Balogh, E. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. Enzyme Microb. Technol. 1995;17:311-316.
67. Somogyi, M. Notes on sugar determination . J. Biol. Chem. 1952; 195: 19-23.
68. Suzuki, H., Li, S.C., Li, Y.T. α -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. Crystallization and properties. J. Biol. Chem. 1970; 245: 781-786.

69. Talbot, G., Sygusch, J. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56(11): 3505-3510.
70. Thananunkul, D., Tanaka, M., Chichester, C.O., Lee, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. J. Food Sci. 1976; 41: 173-175.
71. Tiselius, A., Hjerten, S., Levin, Ö. Protein chromatography on calcium phosphate columns. Arch. Biochem. Biophys. 1956; 65: 132-155.
72. Thomas, B., Webb, J.A. Multiple forms of α -galactosidase in mature leaves of *Cucurbita pepo*. Phytochemistry. 1977; 16:203-206
73. Ulezlo, I.V., Zaprometova, O.M. Microbial α -galactosidases (a review). Prikl. Biokhim. Mikrobiol.1982; 18:3-15.
74. Veale, R.A., Giuseppin, M.L.F., van Eijk, H.M.J., Sudbery, P.E., Verrips, C.T. Development of a strain of *Hansenula polymorpha* for the efficient expression of α -galactosidase. Yeast 1992; 8: 361-372
75. Wasserman, B.P., Montville, T.J., Korwek, E.L. Food Biotechnology. Food Technology. 1988; 42: 133-143.
76. Watson, J., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. Recombinant DNA in medicine and industry. In: Recombinant DNA. 2 ed. Scientific American Books, New York. 1992; 453-468.
77. Watson, J., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. Working toward human gene therapy. In: Recombinant DNA. 2 ed. Scientific American Books, New York. 1992; pp. 567-578.

78. Williams, J., Villaroya, H., Petek, F. α -Galactosidase II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*. Purification, physicochemical properties and mode of galactomannan hydrolysis *in vitro*. *Biochem. J.* 1978; 1069-1077.
79. Wong, H.C., Hu, C.A., Yeh, H.L., Su, W., Lu, H.C., Lin, C.F. Production, purification, and characterization of α -galactosidase from *Monascus pilosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 52(5): 1147-1152.
80. Zapater, I.G., Ulah, A.H.J., Wodzinski, V.M. Extracellular α -galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135. Purification and characterization. *Prep. Biochem.* 1990; 20: 263-296.
81. Zaprometova, O..M., Ulezlo, I.V. Isolation and purification of a mold α -galactosidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1988; 10(3): 232-341.
82. Zelinger, S., Kristufek, D., Arısan-Ataç, I., Hodits, R., Kubicek, C.P. Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59(5): 1347-1353.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Nurten ÖZSOY
Doğum Tarihi : 11.7.1964
Doğum Yeri : Dobriç-Bulgaristan

Öğrenim Durumu

İlk Okul : Bulgaristan (1971-1974)
Orta Okul : Bulgaristan (1974-1979)
Lise : Bulgaristan (1979-1982)
Ön Lisans : Bulgaristan- Varna Sağlık kadroları Yetiştirme
Enstitüsü -Tıp Laborantı (1982-1984)
Yükseköğretim : Sofiya Tıp Akademisi Eczacılık Fakültesi
(1987-1989)
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(1989 - 1991)
Yüksek Lisans : Sağlık Bilimleri Enstitüsü
(1993 - 1995)
Bildiği Yabancı Dil : Bulgarca, Rusça, İngilizce