

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**MANDALİNA (*Citrus reticulata*) MEYVESİNDEN  
SAFLAŞTIRILAN BETA-GLUKOSİDAZ ENZİMİNİN  
NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE MEYVE  
SUYU AROMA ARTTIRMA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MESUT ACAR**

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2013**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**MANDALİNA (*Citrus reticulata*) MEYVESİNDEN  
SAFLAŞTIRILAN BETA-GLUKOSİDAZ ENZİMİNİN  
NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE MEYVE  
SUYU AROMA ARTTIRMA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MESUT ACAR**

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2013**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Mesut ACAR** tarafından hazırlanan “**MANDALİNA (*Citrus reticulata*) MEYVESİNDEN SAFLAŞTIRILAN BETA-GLUKOSİDAZ ENZİMİNİN NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE MEYVE SUYU AROMA ARTTIRMA ETKİSİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 29.07.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Doç. Dr. Selma SİNAN

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Seda BEYAZ

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

  
.....  
  
.....  
  
.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013/64 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**MANDALİNA (*CITRUS RETICULATA*) MEYVESİNDEN  
SAFLAŞTIRILAN BETA-GLUKOSİDAZ ENZİMİNİN  
NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE MEYVE SUYU  
AROMA ARTTIRMA ETKİSİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MESUT ACAR  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SELMA SİNAN)  
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. YUSUF TURAN)  
BALIKESİR, TEMMUZ - 2013**

Bu çalışmada, canlılarda önemli fonksiyonlarda görev alan  $\beta$ -glukosidaz enzimi, mandalina meyvesinden saflaştırılmış ve nanopartiküllere immobilize edilmiştir. Saflaştırma işleminde önce amonyum sülfat çöktürmesi ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi metodları kullanılmıştır. Çalışmamızda mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi % 11,3 verimle 196,2 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin Native ve SDS poliakrilamid jel elektroforezlerinde molekül ağırlıkları sırası ile 60 kDa, 30 kDa olarak tek bant şeklinde görüntülenmiştir.

Saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi karbodiimide ile süperparamanyetik  $Fe_3O_4$  nanopartiküllere immobilize edilmiştir. Immobilize edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklığı (40 °C) immobilizasyondan sonra 10 °C artarken, serbest ve immobilize enzimin optimum pH değerleri 5,5 olarak bulunmuştur. Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin saf ve immobilize formlarının pNPG substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiği ile saf enzim için 0,264 mM ve 294 EU olarak immobilize enzim için, 0,222 mM ve 370 EU değerleri belirlenmiştir.

İmmobilize  $\beta$ -glukosidaz, mandalina suyundan Amberlite XAD-2 reçine ile ekstrakte edilen, glikosidik bağlı aroma öncülleri hidroliz edilerek ortaya çıkan glikosidik bağlı uçucular LC-MS ve GC-MS ile analiz edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Mandalina,  $\beta$ -Glukosidaz, Meyve suyu, Aroma arttırma, Manyetik nanopartiküller

## **ABSTRACT**

### **THE ENHANCEMENT EFFECT OF FRUIT JUICE AROMA OF BETA-GLUCOSIDASE ENZYME PURIFIED FROM MANDARIN (*CITRUS RETICULATA*) FRUIT BY IMMOBILIZATION TO NANOPARTICLES**

**MSC THESIS**

**MESUT ACAR**

**BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SELMA SİNAN )**

**(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. YUSUF TURAN )**

**BALIKESİR, JULY 2013**

In this study,  $\beta$ -glucosidase enzyme involved in important functions living organisms, were purified from mandarin fruit and immobilized to nanoparticles. In purification process firstly the ammonium sulfate precipitation, secondly hydrophobic interactions chromatography methods were used. In our study, mandarin  $\beta$ -glucosidase enzyme, purified 196,2 fold with 11,3% yields. The purified mandarin  $\beta$ -glucosidase enzyme, was observed Native and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis a single band with 60 kDa, 30 kDa, respectively.

The purified mandarin  $\beta$ -glucosidase enzyme was immobilized on the superparamagnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles via carbodiimide. The optimum temperature for  $\beta$ -glucosidase (40 °C) was increased by 10 °C after immobilisation, while the optimum pH values for free and immobilised  $\beta$ -glucosidase were both at pH 5,5. The  $K_M$  and  $V_{max}$  values were determined of free and immobilized enzyme by the method of Lineweaver-Burk plots, using *p*NPG as a substrate. The  $K_M$  and  $V_{max}$  of free enzyme were 0,264 mM and 294 EU and immobilized enzyme's  $K_M$  and  $V_{max}$  were 0,222 mM and 370 EU, respectively.

Glycosidic bound aroma precursors from mandarin fruit juice were isolated and extracted with Amberlite XAD-2 resin and then hydrolysed by using immobilised  $\beta$ -glucosidase. The released glycosidic bound volatiles were analysed by using LC-MS and GC-MS.

**KEYWORDS:** Mandarin,  $\beta$ -Glucosidase, Fruit juice, Aroma enhancement, Magnetic nanoparticles

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ .....	viii
SEMBOL LİSTESİ .....	x
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mandalina Meyvesi .....	2
1.2 Beta-Glukosidaz Enziminin Biyokimyası .....	4
1.2.1 Adlandırılması .....	4
1.2.2 Beta-Glukosidaz Enziminin Özellikleri ve İnce Yapısı .....	5
1.2.3 Enzimin İzoenzimleri.....	7
1.2.4 Enzimin Katalizleme Mekanizması .....	7
1.3 Beta-Glukosidaz Enziminin Bitkilerden Saflaştırılması .....	10
1.4 Enzim İmmobilizasyonu.....	10
1.4.1 Enzim İmmobilizasyonun Tarihi .....	13
1.4.2 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destekler .....	14
1.4.3 Manyetik Temelli Destek Materyalleri.....	14
1.5 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....	16
1.5.1 Çözünür Formda İmmobilizasyon Yöntemleri .....	18
1.5.2 Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....	18
1.5.2.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi .....	18
1.6 Beta-Glukosidaz Enziminin İmmobilizasyonu .....	20
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>21</b>
2.1 Materyaller .....	21
2.1.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	21
2.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	22
2.1.2.1 Enzimin Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.1.2.2 SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler.....	24
2.1.2.3 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler .....	27
2.1.2.4 İmmobilize Enzimin Uygulanmasında Kullanılan Çözeltiler .....	27
2.2 Yöntemler .....	28
2.2.1 Enzim Ham Ekstraktının Hazırlanması .....	28
2.2.2 Enzim Aktivite Tayini .....	28
2.2.3 Protein Tayini .....	29
2.2.3.1 Kalitatif Protein Tayini .....	29
2.2.3.2 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	29
2.2.3.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini .....	30
2.2.4 Enzimin Saflaştırılması.....	32
2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi .....	32
2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....	33

2.2.4.3	Doğal/Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (NATIVE/SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü.....	34
2.3	$\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	36
2.3.1	Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	36
2.3.2	Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	36
2.3.3	Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi .....	37
2.3.4	Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Belirlenmesi.....	37
2.3.5	Enzimin Farklı Substratlara Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi .....	37
2.3.6	Saflaştırılan Enzimin Farklı Substratlara Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi.....	38
2.3.7	İnhibitörlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi.....	38
2.3.8	İnhibitörlerin $K_i$ Değerlerinin Bulunması .....	38
2.4	$\beta$ -Glukosidaz Enziminin İmmobilizasyonu.....	39
2.4.1	Enzimin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu.....	39
2.4.2	Enzimin Nanopartiküllere Bağlanmasının FT-IR Analizi ile Belirlenmesi .....	40
2.4.3	İmmobilize Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi .....	40
2.4.4	Enzimin Nanopartiküllere Optimum Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi .....	41
2.5	İmmobilize $\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	41
2.5.1	İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklık ve pH Değerlerinin Belirlenmesi .....	41
2.5.2	İmmobilize Enzimin <i>p</i> NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi.....	42
2.5.3	İmmobilize ve Serbest Enzimin Farklı Şartlarda Saklanma Stabilitésinin Belirlenmesi.....	42
2.6	İmmobilize Enzim ile Meyve Suyunun Muamelesi .....	43
2.6.1	Meyve Suyu Hazırlanması ve Glikosidik Aroma Öncül Bileşiklerin Ekstraksiyonu.....	43
2.6.2	İmmobilize Enzim ile Glikozidik Bağlı Aroma Öncül Bileşiklerin Hidrolizi .....	43
2.6.3	GC-MS Analiz Yöntemi .....	44
2.6.4	LC-MS Analiz Yöntemi.....	44
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>47</b>
3.1	Enzim Aktivite Tayini için Kullanılan Standart Eğri .....	47
3.2	$\beta$ -Glukosidaz Enziminin Saflaştırılması.....	48
3.2.1	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi.....	48
3.2.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması ...	50
3.2.3	Mandalina Beta-Glukosidaz Enziminin NATIVE/SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	54
3.3	$\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri .....	55
3.3.1	Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması .....	55
3.3.2	Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması.....	56
3.3.3	Mandalina Beta-Glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığı.....	56
3.3.4	Mandalina Beta-Glukosidaz Enzimi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisi .....	58
3.3.5	Enzimin Farklı Substratlara Karşı Spesifikliğı .....	60



3.3.6	Farklı Substratların $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	62
3.3.6.1	Enzimin <i>p</i> NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerleri .....	62
3.3.6.2	Enzimin <i>o</i> NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerleri .....	64
3.3.7	$\beta$ -glukosidazların Genel İnhibitörlerinin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	66
3.3.7.1	$\beta$ -Glukosidazların Genel İnhibitörü Olan $\delta$ -Glukonolaktonun $IC_{50}$ Değerinin Belirlenmesi .....	66
3.3.7.2	$\beta$ -Glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Glukozun $IC_{50}$ Değerinin Belirlenmesi .....	68
3.3.8	$\beta$ -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Maddelerin İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	70
3.3.8.1	$\beta$ -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan $\delta$ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	70
3.3.8.2	$\beta$ -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Glukozun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerinin Belirlenmesi .....	73
3.4	$\beta$ -Glukozidaz Enziminin İmmobilizasyonu .....	75
3.4.1	Enzim İmmobilizasyonunun FT-IR Analizi .....	75
3.4.2	Enzimin Nanopartiküllere Optimum Bağlanma Kapasitesi .....	77
3.5	İmmobilize $\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	79
3.5.1	İmmobilize Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması .....	79
3.5.2	İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması .....	81
3.5.3	İmmobilize $\beta$ -Glukosidaz Enziminin <i>p</i> NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değeri .....	82
3.5.4	İmmobilize ve Serbest Enzimin Farklı Şartlarda Saklanma Stabilitesi .....	84
3.6	İmmobilize Enzim ile Meyve Suyunun Muamelesi ve Serbest Aromatik Bileşiklerin Analizi .....	87
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>95</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>109</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Mandalina meyvesi.....	3
Şekil 1.2: Pirinç beta-glukosidazı.....	5
Şekil 1.3: Mısır $\beta$ -glukosidaz Glu1 izoenzimi monomerinin 3D yapısı.....	6
Şekil 1.4: Enzimin katalizleme mekanizması.....	9
Şekil 1.5: Enzim ve matriksin interaksyonu ile ortaya çıkan immobilize enzimin özellikleri.....	12
Şekil 1.6: Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	17
Şekil 2.1: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	30
Şekil 2.2: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	31
Şekil 2.3: Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel.....	33
Şekil 3.1: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 $\mu$ L hacimli <i>p</i> NP standart grafiği.....	47
Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 $\mu$ L hacimli <i>p</i> NP standart grafiği.....	48
Şekil 3.3: Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik.....	50
Şekil 3.4: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan mandalina $\beta$ -glukozidaz enziminin elüsyon grafiği.....	52
Şekil 3.5: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan mandalina beta-glukosidaz enziminin poliakrilamid jel elektroforezleri).....	54
Şekil 3.6: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği.....	55
Şekil 3.7: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	56
Şekil 3.8: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	57
Şekil 3.9: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 1 mM konsantrasyonlarındaki ağır metal iyonlarının etkisi.....	58
Şekil 3.10: Mandalina $\beta$ -glukosidazının farklı substratlara karşı ilgisi.....	60
Şekil 3.11: <i>p</i> NPG Substratının $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	62
Şekil 3.12: <i>o</i> NPG Substratının $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	64
Şekil 3.13: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 1,75 mM <i>p</i> NPG substratı konsantrasyonunda $\delta$ -glukonolaktunun % aktivite-[I] grafiği.....	68
Şekil 3.14: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 1,75 mM <i>p</i> NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği.....	70
Şekil 3.15: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimine, <i>p</i> NPG substratı varlığında, $\delta$ -glukonolaktın inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	71
Şekil 3.16: Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimine, <i>p</i> NPG substratı varlığında, glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	73
Şekil 3.17: İmmobilizasyon destek materyali $Fe_3O_4$ nanopartikül, bağlanan saf $\beta$ -glukosidaz enzimi ve $\beta$ -glukosidaz bağlı nanopartikülün FT-IR spektrumları.....	76

<b>Şekil 3.18:</b> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartikül miktarının enzimin bağlanma yüzdesi ve aktivitesine etkisi.....	77
<b>Şekil 3.19:</b> İmmobilize mandalina β-glukosidaz enziminin optimum pH grafiği .....	79
<b>Şekil 3.20:</b> Serbest ve immobilize mandalina β-glukosidaz enziminin optimum pH grafiği .....	80
<b>Şekil 3.21:</b> İmmobilize mandalina β-glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği .....	81
<b>Şekil 3.22:</b> Serbest ve immobilize mandalina β-glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	82
<b>Şekil 3.23:</b> İmmobilize mandalina β-glukosidazın pNPG substratına karşı K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....	84
<b>Şekil 3.24:</b> Serbest ve immobilize β-glukosidaz enziminin 4 °C’de saklanma stabilitesi grafiği.....	85
<b>Şekil 3.25:</b> Serbest ve immobilize β-glukosidaz enziminin 25 °C’de saklanma stabilitesi grafiği.....	85
<b>Şekil 3.26:</b> LC-MS analizi sonucu elde edilen kromatogramlar.....	88
<b>Şekil 3.27:</b> İmmobilize β-glukosidaz enzimi ile muamele edilen meyve suyundan ekstrakte edilen numunenin GC-MS kromatogramı .....	89
<b>Şekil 3.28:</b> GC-MS’de belirlenen limonenin kütle spektrumu .....	90
<b>Şekil 3.29:</b> GC-MS’de belirlenen benzaldehidin kütle spektrumu .....	90
<b>Şekil 3.30:</b> GC-MS’de belirlenen benzil asetatın kütle spektrumu .....	91
<b>Şekil 3.31:</b> GC-MS’de belirlenen 1,3-dimetil-benzenin kütle spektrumu.....	91
<b>Şekil 3.32:</b> GC-MS’de belirlenen etil-benzenin kütle spektrumu .....	92
<b>Şekil 3.33:</b> GC-MS’de belirlenen benzofenonun kütle spektrumu.....	92
<b>Şekil 3.34:</b> GC-MS’de belirlenen 2-amino-1,3-propenediolün kütle spektrumu .....	93
<b>Şekil 3.35:</b> GC-MS’de belirlenen fenol,2,6 bis (1,1 dimetiletil)-4-metilin kütle spektrumu .....	93

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> İmmobilize enzimlerin tarihsel basamakları .....	13
<b>Tablo 2.1:</b> SDS / NATIVE-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları .....	26
<b>Tablo 2.2:</b> LC-MS analizinde kullanılan mobil faz oranları .....	45
<b>Tablo 2.3:</b> LC-MS’de kalibrasyonu yapılan standart bileşikler .....	46
<b>Tablo 3.1:</b> Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tespit edilen değerler .....	49
<b>Tablo 3.2:</b> Saflaştırma tablosu.....	53
<b>Tablo 3.3:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine ağır metallerin etkisinin belirlenmesinde kullanılan metal çeşitleri ve bu metallerin enzim aktivitesi üzerindeki sonuçları.....	59
<b>Tablo 3.4:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı substratlara karşı ilgisinin belirlenmesinde kullanılan substrat çeşitleri, enzim aktivite ve relative aktivite değerleri .....	61
<b>Tablo 3.5:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin <i>p</i> NPG substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri .....	63
<b>Tablo 3.6:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin <i>o</i> NPG substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	65
<b>Tablo 3.7:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı substratlara karşı $K_M$ , $V_{max}$ ve $V_{max}/K_M$ değerleri.....	66
<b>Tablo 3.8:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren $\delta$ -glukonolaktonun $IC_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar .....	67
<b>Tablo 3.9:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren glukozun $IC_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar .....	69
<b>Tablo 3.10:</b> Mandalina beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\delta$ -glukonolaktonun $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	72
<b>Tablo 3.11:</b> Mandalina beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	74
<b>Tablo 3.12:</b> Mandalina $\beta$ -glukosidaz enzimi immobilizasyonuna nanopartikül miktarının etkisinin belirlenmesinde kullanılan nanopartikül, buna karşılık gelen proteinlerin bağlanma yüzdeleri ve immobilize olan enzimin aktivite sonuçları .....	78
<b>Tablo 3.13:</b> İmmobilize mandalina $\beta$ -glukosidaz enziminin <i>p</i> NPG substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	83
<b>Tablo 3.14:</b> Serbest ve immobilize mandalina $\beta$ -glukosidazının özellikleri.....	86

<b>Tablo 3.15:</b> İmmobilize $\beta$ -glukosidazla hidroliz edilen meyve suyundan tespit edilen bileşikler .....	94
---	----

## SEMBOL LİSTESİ

<b><i>p</i>NPG :</b>	4-Nitrofenil $\beta$ -D-glukopiranosid
<b><i>o</i>NPG :</b>	2-Nitrofenil $\beta$ -D-glukopiranosid
<b><i>p</i>NP :</b>	4-Nitrofenol
<b><i>p</i>NPGal :</b>	4-Nitrofenil $\beta$ -D-galaktopiranosid
<b><i>o</i>NPGal :</b>	2-Nitrofenil $\beta$ -D-galaktopiranosid
<b>Na-Ac :</b>	Sodyum Asetat
<b>EU :</b>	Enzim Ünitesi
<b>SDS :</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>PAGE :</b>	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>TEMED :</b>	N,N,N', N' , -tetrametiletildiamin
<b>APS :</b>	Amonyum Persülfat
<b>BSA :</b>	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
<b>[S] :</b>	Substrat Konsantrasyonu
<b>FT-IR :</b>	Fourier Transform İnfared
<b><math>K_M</math> :</b>	Michaelis-Menten Sabiti
<b><math>V_{max}</math> :</b>	Maksimum Hız
<b>mM :</b>	Milimolar
<b><math>\mu</math>L :</b>	Mikrolitre

## ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans hayatımın her safhasında maddi manevi desteğini aldığım, insanlara yaklaşımı ve bilimsel yönleriyle hayatımı aydınlatan, değerli danışman hocam, Doç. Dr. Selma SİNAN'a, öncelikle teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın her evresinde bilgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA'ya ve eş danışmanım Prof. Dr. Yusuf TURAN'a, çalışmada kullandığım nanopartikülleri sentezleyip, tarafımıza temin eden Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR'a ve Arş. Gör. Dr. Öznur KARAAĞAÇ'a çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi manevi ilgi ve desteklerini benden hiç esirgemeyen Prof. Dr. Gülendam TÜMEN'e, Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, Doç. Dr. Olga SAK'a ve Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim.

Biyoloji alanına gönül vermeme sağlayan, biyoloji öğretmenim Sayın Ayşe ATİK'e minnetle teşekkür ederim.

Hayatım boyunca attığım her adımda koşulsuz destekle yanımda bulunan, annem Fatma ACAR'a, babam Hasan ACAR'a ve kardeşlerim Ayşe ACAR ve Selime ACAR'a, manevi anne ve babam olmalarından dolayı her zaman kendimi şanslı hissettiren Nigar ACAR'a, Hüseyin ACAR'a ve parçası olmakla gurur duyduğum diğer ACAR ailesi üyelerine, sonsuz sevgi ve minnettarlık duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tezi, bu günlere gelmemde maddi manevi büyük katkısı bulunan ve paylaştığımız her anı özlemlerle andığım, merhum dedem Ali ACAR'a ithaf ediyorum.

**Mesut ACAR**

**BALIKESİR, 2013**

# 1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç hepsi protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik etkinlikleri sentetik veya inorganik katalizörlere göre çok daha fazladır ve bu etkinlik metabolizmanın gidişine göre düzenlenebilmektedir [1]. Karbonhidratların yapım ve yıkım metabolizmasında pek çok enzim görev yapmaktadır. Bu enzimlerden birisi de  $\beta$ -glukosidazlardır.  $\beta$ -glukosidaz enzimleri, karbonhidratlardaki  $\beta(1,4)$  glikozidik bağlarını hidroliz ederek, büyüme, gelişme, lignifikasyon ve çimlenme sırasında endospemde hücre duvarı yıkımı gibi birçok biyolojik işlevde anahtar rol oynar [2]. Biyoteknolojik uygulamalarla,  $\beta$ -glukosidaz enzimleri, glikozidik bağlı öncül aroma bileşiklerini serbest hale geçirerek meyve suyu ve alkollü içeceklerde aroma potansiyelini arttırabilir [2,3].

Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı şartlarda çok hızlı ve spesifik olarak katalizliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışında, yeterli koşullar sağlandığında, pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlar. Bu nedenle enzimler tıp alanında, kimya endüstrisinde, gıda teknolojisinde, tarım ve ziraat alanlarında oldukça önemli yere sahiptir. Enzimlerin saflaştırma işlemlerinin pahalı ve zahmetli olmasının yanı sıra biyoteknolojik ve endüstriyel boyutta kullanımındaki bazı dezavantajlarının üstesinden gelebilmek için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Bu çalışmada immobilize edilen mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin meyve suyu aroma arttırma etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

- Mandalina meyvesinden ham ekstraktın hazırlanması
- Ham ekstrakta amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak kısmi saflaştırmanın yapılması



- Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile mandalina meyvesi  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması
- SDS-PAGE/NATIVE-PAGE tekniği ile enzimin saflığının ve alt birimlerinin kontrolü
- Enzimin optimum pH, sıcaklık değerlerinin ve termal kararlılığının belirlenmesi
- Enzimin farklı substratlara (*p*NPG, *o*NPG) karşı kinetik özelliklerinin ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) araştırılması ve bazı substratlara karşı substrat spesifikliğinin tespiti
- Enzimin literatürde geçen inhibitör maddelere karşı aktivitesinin incelenmesi
- Enzimin süperparamanyetik nanopartiküllere karbodiimide ile kovalanet olarak immobilizasyonu (FT-IR analizi ile bağlanmanın kontrolü ve Bradford yöntemi ile bağlanma veriminin araştırılması)
- Enzimin nanopartiküllere optimum bağlanma kapasitesinin belirlenmesi
- İmmobilize ve serbest enzimlerin farklı şartlarda saklanma stabilitesinin araştırılması
- İmmobilize enzimin *p*NPG substratına karşı kinetik özelliklerinin ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) araştırılması
- Mandalina meyve suyu hazırlanması ve Amberlite XAD-2 reçine ile bağlı aroma öncüllerinin izolasyonu ve ekstraksiyonu
- İmmobilize enzim ile bağlı aroma öncüllerinin hidrolizi
- Serbest hale geçen aroma bileşiklerinin LC-MS/ GC-MS analizi

## 1.1 Mandalina Meyvesi

Mandalina (*Citrus reticulata*), ılıman iklimde yetişmekte olan turunçgiller (Rutaceae) familyasına ait bir meyve türüdür. Turuncu, sarı renklerde olan mandalina, etli ve sulu bir yapıya sahiptir. Mandalina, portakala nazaran daha yumuşak olan kabuğu soyulduktan sonra yenebildiği gibi suyu sıkılarak da içilebilir. Mandalina diğer turunçgil türlerine nazaran düşük sıcaklıklara daha dirençli olmasıyla geniş bir adaptasyon yeteneği sağlamıştır. Çöl iklimi, semi tropik ve subtropik iklimlerde yetişebilmektedir. Ancak bazı mandalina çeşitleri kaliteli ürün

için belirli iklimleri istemektedirler. Bu ağacın yetiştiriciliğinin yapıldığı yerde sıcaklıklar -3-4 °C'nin altına düşmemelidir. -9-10 °C'nin altına düşen sıcaklıklarda mandalina ağaçları donup ölebilir. Ülkemize bakıldığında mandalina üretimi Akdeniz Bölgesi, Ege bölgesi, Marmara Bölgesi ve Karadeniz Bölgesinde yapılmaktadır. Türkiye, dünya geneline bakıldığında da mandalina üretimi açısından önemli bir yere sahiptir [4].

Meyve ve sebzelerin sayısız sağlık yararı ve hastalık risklerini düşürücü etkisi onların diyetlerdeki zenginliği ile ilişkilidir. Turunçgil meyveleri çeşitli vitaminleri, mineralleri, lifleri ve fitokimyasalları içerir. Bu fitokimyasallara çeşitli biyolojik aktivitelere ve sağlık yararlarına sahip olan karoteinoidler, flavonoidler ve limonoidler örnek olarak verilebilir. Turunçgil meyvelerinin antioksidan ve antimutajen özelliklerinin yanında bağışıklık, kardiyovasküler ve iskelet sisteminin sağlığına pozitif etkisi olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır [5]. Turunçgil meyvelerinin besinsel ve fitokimyasal bileşimi büyüme şartlarına, çeşidine, olgunluğuna, işleme sürecine ve depolama şartlarına bağlı olarak çeşitlilik gösterir [6].



**Şekil 1.1:** Mandalina meyvesi

## 1.2 Beta-Glukosidaz Enziminin Biyokimyası

### 1.2.1 Adlandırılması

Beta glukosidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan altı sınıflandırma biriminden Hidrolazların bulunduğu 3. sınıfta yer alırlar (EC.3). Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler EC.3.2. alt sınıfında yer alan glikozid hidrolazlardandır [7]. Glikozid hidrolazlar Henrissat tarafından, amino asit dizisi benzerliklerine dayanarak, 82 enzim ailesi olarak sınıflandırılmıştır [7-9]. Bu enzim grubunda yer alanlardan O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler de EC.3.2.1. alt alt sınıfında bulunmaktadır [10-12].

#### EC.3. Hidrolazlar

##### EC.3.2. Glikozid Hidrolazlar (Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler)

###### EC.3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [8,9]

###### EC.3.2.1.21 $\beta$ -glukosidazlar (1,4- $\beta$ -glukosidaz) [13]

###### EC.3.2.2. N-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

###### EC.3.2.3. S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [8,9]

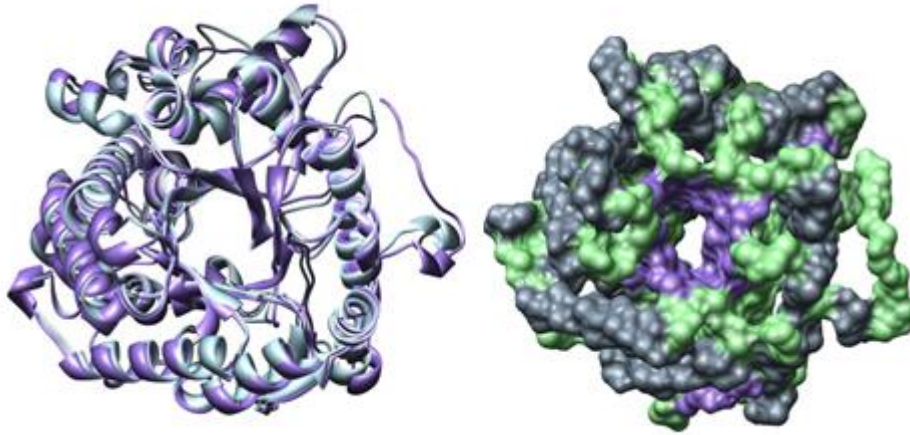
Sistemik adı  $\beta$ -D-glukozid glukohidrolaz, EC3.2.1.21 olan  $\beta$ -glukosidazlar, iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikon ve bir aril veya alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki  $\beta$ -glikozidik bağı hidroliz eden enzimlerdir [8]. Ökaryot, arkea ve bakterilerde bulunan Glikozid Hidrolaz (GH) Aile1 enzimleri G-O-X ya da G-S-X tipindeki substratları hidroliz etmektedirler. Burada G  $\beta$ -bağlı glukozil, galaktozil, mannozil, fukoil, 6-fosfoglukozil ya da 6-fosfagalaktozil rezidüsünü, X ise diğer glikozil rezidüsünü ya da aglikonu temsil eder [14].

$\beta$ -glukosidazlar substrat spesifitesine göre üç alt sınıfa bölünür. Sınıf 1 enzimleri glikozil- $\beta$ -glukosidaz ve aril(alkil)- $\beta$ -glukosidaz aktivitesi ile selobiyoz, laktoz,  $\beta$ -*p*-nitrofenilglikozid,  $\beta$ -*p*-nitrofenilgalaktozil,  $\beta$ -*p*-nitrofenilfruktozil ve diğer benzer substratları hidroliz edebilirler. Sınıf 2 enzimlerinin sadece glikozil- $\beta$ -glukosidaz aktivitesi olduğu için selobiyoz ve laktoz gibi substratları hidroliz

edebilirler. Sınıf 3 enzimleri sadece aril(alkil)- $\beta$ -glukosidaz aktivitesi olduğu için  $\beta$ -*p*-nitrofenilglikozid ve benzer substratları hidroliz edebilirler [15].

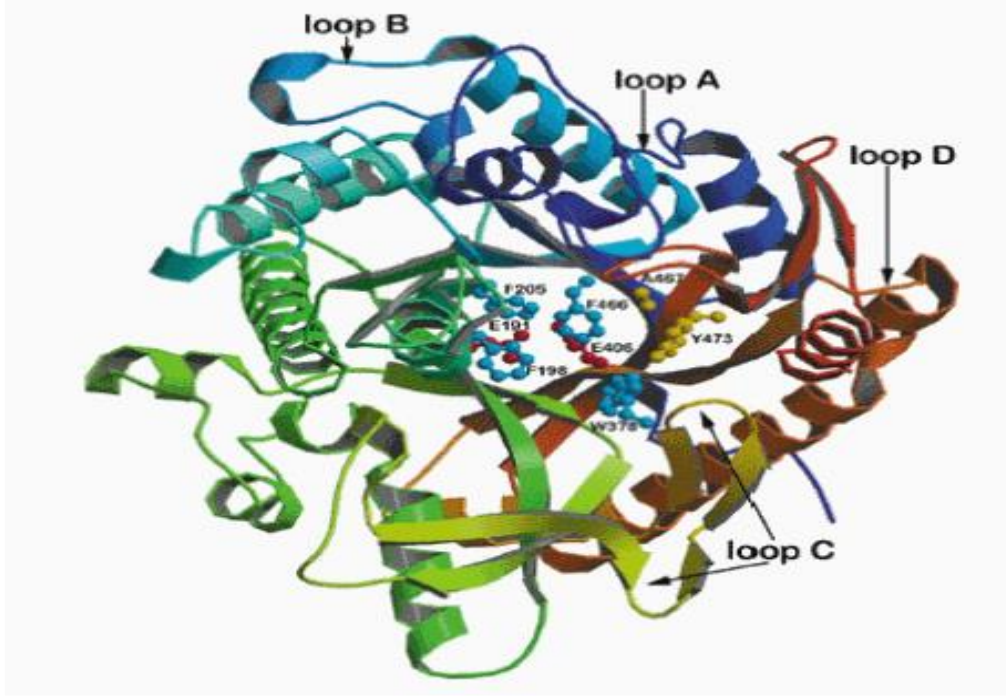
### 1.2.2 Beta-Glukozidaz Enziminin Özellikleri ve İnce Yapısı

Literatürde incelenen Aile1  $\beta$ -Glukosidaz enzimlerinin monomerleri SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında tespit edilmiştir. Belirtilen bu monomerlerin polipeptid uzunluklarının enzimin elde edildiği organizmanın kaynağına göre 447 aminoasitten (*Bacillus polymyxa*) 527 aminoasite (Beyaz hardal mirosinazı) kadar değiştiği belirlenmiştir. Beklenen bir şekilde eubakteria ve arkebakterilerdeki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha kısa ökaryotlardaki enzimlerin polipeptid zincirlerinin ise daha uzun olduğu bulunmuştur. Dikotil bitkilerden ve hayvanlardan saflaştırılan tüm  $\beta$ -Glukosidazlarda hesaplanan monomerlerin molekül büyüklüklerinin, cDNA ya da genomik DNA'dan hesaplanan molekül büyüklüklerine göre 3-5 kDa daha uzun olduğu tespit edilmiştir [2].



Şekil 1.2: Pirinç beta-glukosidazı

Aile 1  $\beta$ -glukosidaz monomerlerinin her birinin temel yapısında yüksek korunumlu peptid motifleri bulunmaktadır. Bunlar SAYQI, YRFSI, TFNEP, LGLNYY, YITENG ve DNFEW'dir. Bunlardan TFNEP ve YITENG enzimin aktif bölgesinin bir parçasını oluştururlar ve iki katalitik glutamat içerirler [16-19]. Şekil 1.3'de aktif merkezdeki motifler görülmektedir.



**Şekil 1.3:** Mısır  $\beta$ -glukosidaz Glu1 izoenzimi monomerinin 3D yapısı

Proteinlerin yapısında bulunan  $\beta$  dizilimleri bir fiçı oluşturacak şekilde düzenlenerek, bir seri  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  halkası ( $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  loop), özellikle kararlı ve yaygın bir motif olan  $\alpha/\beta$  fiçısı olarak isimlendirilen bir yapı oluştururlar. Bu yapıda her paralel  $\beta$  kısım, komşusu olan  $\beta$  kısma  $\alpha$  helikal bir parça ile bağlanır.  $\alpha/\beta$  fiçı motifi birçok enzimde bulunur ve çoğunlukla fiçı motifinin bir ucunda, cebe benzeyen, kofaktör ya da substratın bağlandığı bölge yer alır [1]. Çeşitli kaynaklardan elde edilen ve dizi benzerliği %17-63 olan sekiz farklı Glikozid Hidrolaz Aile 1 enziminin, 3 boyutlu (3D) yapısı aydınlatıldığında bu enzimlerin tamamının aktif bölgesinde aynı ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> fiçısı olduğu (Şekil 1.3) gösterilmiştir [17-18,20-21].

$\beta$ -glukosidazlarla yapılan çalışmalarda enzimin pH 4-10 ve sıcaklık 0-4 °C olduğu değerlerde stabil olduğu tespit edilmiştir. En yüksek stabilitenin ise ~pH 7 civarında olduğu bulunmuştur [2].

Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmalarında da  $\beta$ -glukosidazların 55-60 °C'nin üzerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive oldukları bulunmuş ve bazı çalışmalar sonucunda ise 50-55 °C'lerde en yüksek aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir [22].

### 1.2.3 Enzimin İzoenzimleri

$\beta$ -glukosidazların, farklı canlılarda izoenzimlerinin olduğu belirtilmektedir. Mısırdaki Glu1 ve Glu2 olmak üzere iki izoenzimi mevcuttur. Mısır izoenzimleri klonlanılarak substrat spesifikliği ve fizyolojik fonksiyonları belirlenmiştir [22]. Glu1 izoenziminin karakteristik özellikleri de Esen tarafından ortaya koyulmuştur [23]. Glu1 izoenziminin monomerinin 60 kDa büyüklüğünde, optimum pH değerinin 5,8 ve optimum sıcaklık değerinin de 50 °C olduğu belirtilmiştir. Söz konusu enzimin substrat spesifikliği Babcock ve Esen'in çalışmalarında verilmiştir [24].

Hosel ve ark. süpürge darısı tohumlarından Dhurrinaz1 (Dhr1) ve Dhurrinaz2 (Dhr2) olarak iki farklı dhurrinaz izole etmişlerdir [25]. Yapılan çalışmalarda Dhr1 ile Dhr2'nin aminoasit benzerliğinin %75 olduğu bulunmuştur. Bu iki izoenzim substrat spesifikliğinin de birbirinden farklı olduğu belirtilmiştir. Dhr1 yüksek katalitik etkinlikte sadece nötral substratları hidroliz ederken Dhr2'nin *p*NPG, *o*NPG ve 4MUG gibi yapay substratları da dhurrin gibi hidroliz ettiği bildirilmiştir [26].

### 1.2.4 Enzimin Katalizleme Mekanizması

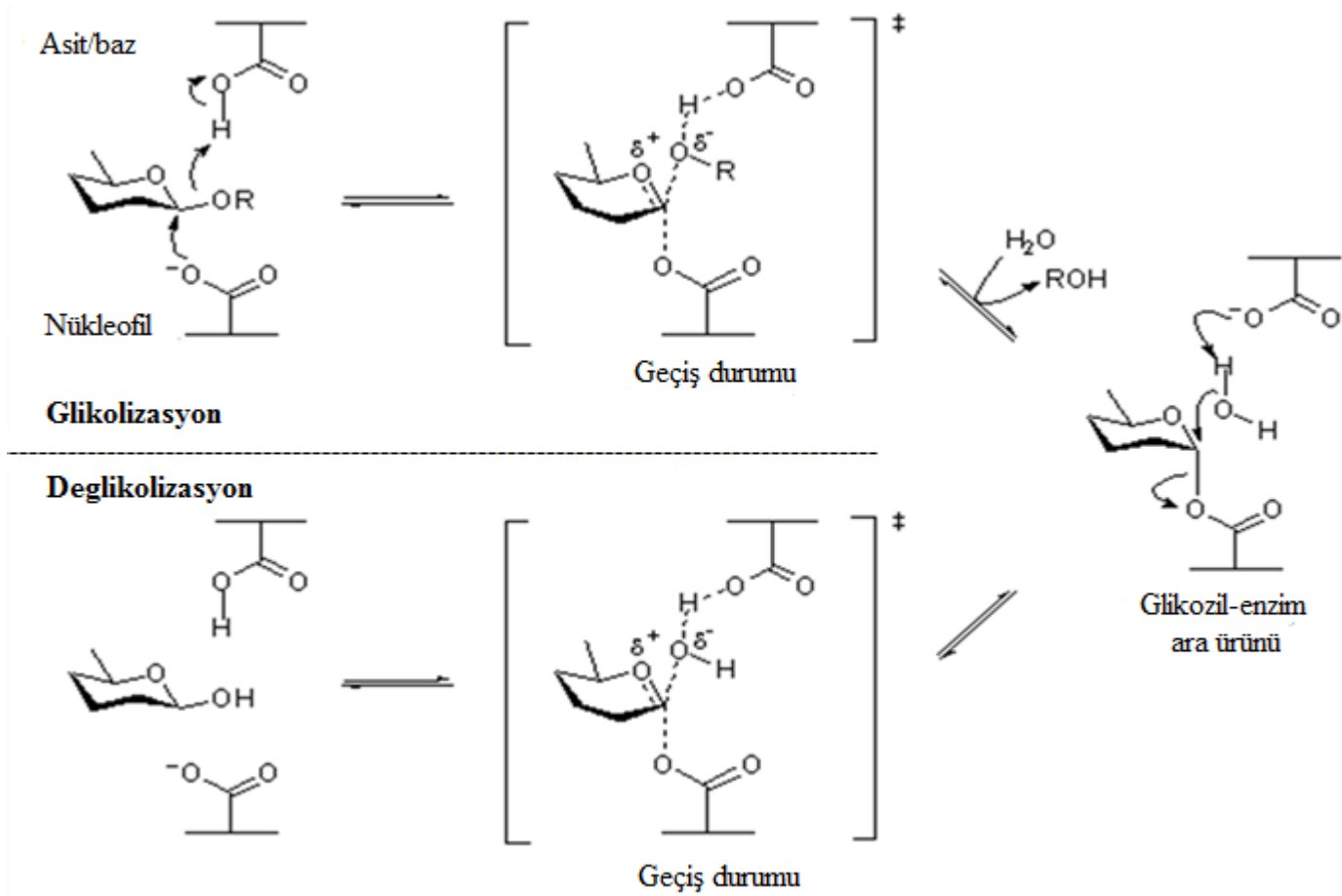
Tüm Aile1  $\beta$ -glukosidazlar, glikozidik oksijen ve anomerik karbon arasındaki  $\beta$ -glukozidik bağın hidrolizini içeren genel bir mekanizma paylaşırlar. Aynı zamanda bütün Aile1  $\beta$ -glukosidazlar etki ettikleri substratın glikozid bağını hidroliz ederken glikonun anomerik konfigürasyonunu korurlar. Yani ürünlerdeki ve substrattaki  $\beta$ -D-glukoz aynıdır. Bir çok organik tepkime, proton veren (genel asit) ve proton alan (genel baz) tarafından katalizlenir. Bazı enzimlerin aktif merkezlerinde proton alarak ve proton vererek katalitik süreçlere katılan amino asit grupları vardır. Bu gruplardan biri olan E (Glu) glutamik asit rezidüsüdür [1].  $\beta$ -glukosidazların aktif merkezinde E191 ve E406 konumunda işlevsel olarak iki glutamik asit kalıntısının olduğu bildirilmektedir [27].

Enzimin substratı hidroliz etmesi iki basamakta gerçekleşir. 1) Enzimin glikolizasyonu (glikozlanması) 2) Enzimin deglikolizasyonu (glikoz kopması). Ayrıca iki glutamik asit rezidüsünün aktif bölgeye katılımıyla hidroliz gerçekleşir [28]. Katalitik glutamat rezidüleri E191 ve E406 Şekil 1.3'de görüldüğü gibi aktif

bölgede yer aldıkları ve yaklaşık 5.5 Å (0.55 nm) uzaklıkta oldukları belirlenmiştir [2].

Enzimin glikolizasyon basamağında YI/VTENG motifindeki nükleofilik glutamat rezidüsü substratın anomerik karbonuna (C<sub>1</sub>) atak yapar (Şekil 1.4). Aglikon bir glutamik asit kalıntısı ile kararlı tutulurken, aynı anda T(F/L/M)NEP motifindeki asit katalizleyici glutamik asit rezidüsü de glikozidik oksijenin protonlanmasını sağlar ve kovalent bağ yapımına katılarak geçiş formunu oluştururlar. Bu esnada glikozil-enzim araürünü oluştur ve aglikon serbest kalır [12,29].

Deglikozilasyon basamağında, aktif merkezdeki anyon ve baz katalizleyici durumunda olan ikinci katalitik glutamat rezidüsü, H<sub>2</sub>O'dan bir proton koparır. Böylece H<sub>2</sub>O'nun nükleofilik gücünü artırır. Bunun sonucunda oluşan OH<sup>-</sup> glikon ve enzim arasındaki kovalent bağa nükleofilik atak yaparak glikonu uzaklaştırır ve nükleofilik glutamat eski haline geri döner [30].



Şekil 1.4: Enzimin katalizleme mekanizması



### 1.3 Beta-Glukosidaz Enziminin Bitkilerden Saflaştırılması

$\beta$ -glukosidaz enzimlerinin bakteri, mantar, bitki ve hayvan dokularında buldukları belirtilmektedir [31]. Canlılar arasında oldukça geniş dağılım gösteren  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin pek çok canlıdan saflaştırılmıştır. Literatüre bakıldığında farklı araştırmacılar tarafından  $\beta$ -glukosidaz enziminin mısır [22], pirinç [32], üzüm [33], kiraz [34], çay [35], süpürge darısı [36], soya [37], portakal [38], vanilya [39] ve zeytin [40], gibi pek çok bitkiden saflaştırıldığı ve özelliklerinin incelendiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda saflaştırma işlemlerinin genelde amonyum sülfat tuz çöktürmesiyle başladığı ve ardı sıra değişik kromatografi yöntemlerinin kullanılarak çok basamaklı saflaştırma işlemi yapıldığı görülmektedir. Çay yaprağından [35], vanilyadan [39] ve kirazdan [34] yapılan enzim saflaştırması çalışmalarında amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve sonra farklı jel filtrasyon kromatografileri uygulanmıştır. Soyadan [37] yapılan bir çalışmada ise tuz çöktürmesi ardından iki farklı iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Portakal meyvesinden [38] yapılan saflaştırma çalışmasında da önce iki ayrı iyon değişim kromatografisi ardından üç farklı jel filtrasyon kromatografisinden oluşan beş aşamalı saflaştırma işlemi yapıldığı görülmektedir. Mısır  $\beta$ -glukosidazlarının saflaştırılmasında ve zeytin meyvesinde yapılan çalışmada amonyum sülfat tuz çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemlerinin uygulanarak saflaştırma yapılmıştır. [40-42].

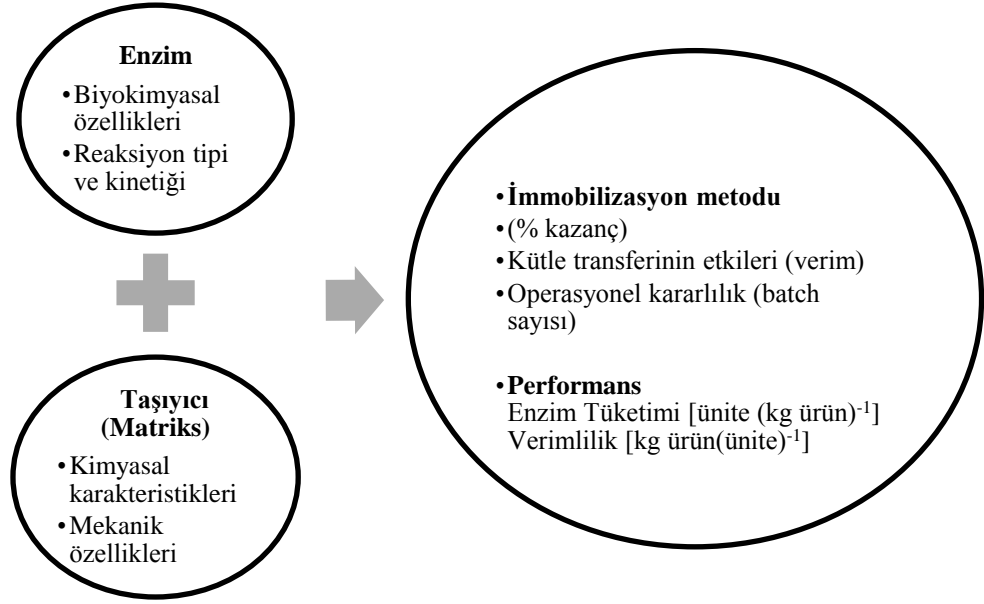
### 1.4 Enzim İmmobilizasyonu

Enzim saflaştırılması özel teknikler gerektirdiğinden maliyeti oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra, endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden reaksiyon ortamından uzaklaştırılması oldukça zordur. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten bir etmendir. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için ortama inhibitör katılması durumunda ise zaten enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru daha eklenmiş olacaktır. Kirlilik unsurlarını ürünlerden ayırmak için daha kompleks ayırma işlemlerine gereksinim olacaktır. Bu

işlemler maliyeti daha da arttırmaktadır. Bahsi geçen teknik ve ekonomik problemlerden dolayı serbest enzim yerine immobilize enzim kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla immobilize enzim sistemlerinin hazırlanması ve teknolojide kullanımını son yıllarda büyük önem kazanmıştır [43].

İmmobilizasyon terimi genellikle hareketi yavaşlatma, durdurma ya da sınırlamayı ifade etmektedir. Fiziksel ve kimyasal işlemlerle biyokatalistlerin (enzimlerin) hareketinin sınırlandırılmasına immobilizasyon denir [44]. İmmobilizasyon kavramı, ilk olarak 1971 yılında ABD’de düzenlenen Enzim Mühendisliği Konferansında tanımlanmıştır. Bu tanıma göre; enzimlerin, katalitik aktivitelerinin sabit kalması koşuluyla, tekrar ve sürekli kullanımına izin verecek şekilde, tanımlanmış belirli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi ve hapsedilmesine immobilizasyon denilmiştir [45].

Enzim immobilizasyonunun ardındaki temel prensip, enzimin geçişini engelleyecek, fakat substrat, ürün ve kofaktörlerin geçmesine izin verecek bir yarı geçirgen destek materyaline enzimin hapsedilmesidir [46]. Bir enzim immobilizasyon sistemindeki temel bileşenler; enzim, matriks ve enzimin matrikse bağlanma yöntemidir. Katı-fazlı destek terimi taşıyıcı ve matriks terimleri ile eş anlamlı olarak kullanılır. İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de destek materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellik kazanır. Bu özellikler de immobilize enzimin verimini ve performansını etkiler [47]. Bu etkileşimden doğan genel özellikler Şekil 1.5’de gösterilmektedir.



**Şekil 1.5:** Enzim ve matriksin interaksyonu ile ortaya çıkan immobilize enzimin özellikleri [47]

İmmobilize enzimler bazı avantajlarından dolayı serbest enzimlere göre daha kullanışlı moleküllerdir [48,49]. Bu avantajları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Birçok kez uzun süre kullanılabilirler.
- Serbest enzimlere kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b) karşı daha dayanıklıdır.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir ve ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterir.
- Enzimlerin kendi kendini parçalaması (otoliz) olasılığını azaltır.
- Mekanistik çalışmalar için uygun ve otomatik işlemlere imkan verir.
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar, üretim kaybı azalır.

İmmobilizasyonun avantajlarının yanında immobilize enzimin aktivitesinde kayıp veya azalma, difüzyonel sınırlamalar, ilave maliyet ve işlem süresinin uzaması gibi dezavantajları da vardır [50].

#### 1.4.1 Enzim İmmobilizasyonunun Tarihi

İmmobilize biyokatalizörlerin gelişimini Tablo 1.1’de özetlendiği gibi üç basamakta göstermek mümkündür. İlk basamakta, 19. yüzyılın başlangıcında, immobilize edilmiş mikroorganizmalar pek çok deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmaların bazıları, sirkenin mikrobiyal ürününün, bakteri üremiş ağaç talaşının üzerine alkol içeren solüsyonların damlatılması ile elde edilmesi ve süzme filtrelerinin geliştirilmesi ile atık su arıtma işlemleridir [51].

Modern enzim immobilizasyonunun tarihine bakmak için 1940’ların sonlarına gitmek gerekir. Ancak o dönemde yapılan ilk çalışmaların pek çoğu diğer disiplinlerin dergilerinde basıldığı için pek çok biyokimyacı tarafından önemsenmez. Güncel teknolojilerin temelleri 1960’larda geliştirilmeye başlamış ve bu tarihten itibaren bu konu ile alakalı pek çok çalışma yayınlanmıştır. İkinci basamakta, sadece tek enzimler immobilize edilerek kullanılmış ancak 1970’lerde canlı hücreler ve kofaktör rejenerasyonu ile iki enzimli reaksiyonları içeren daha kompleks sistemler geliştirilmiştir. Son basamağa örnek olarak L-aminoasit dehidrogenaz enziminin,  $\alpha$ -keto asitlerden, aminasyon reaksiyonu ile L-aminoasit üretimini verebiliriz [52].

**Tablo 1.1:** Immobilize enzimlerin tarihsel basamakları [51]

Basamak	Tarih	Kullanım
<b>Birinci</b>	1815	Asetik asit ve su arıtma işlemleri gibi deneysel kullanım
<b>İkinci</b>	1960’larda	Tek enzim immobilizasyonu: L-aminoasitlerin üretimi, glikozun izomerizasyonu
<b>Üçüncü</b>	1985-1995	Kofaktör rejenerasyonu içeren çoklu enzim ve hücre immobilizasyonu: Membran reaktörleri içinde, keto-asitlerden, L-aminoasitlerin üretimi

### **1.4.2 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destekler**

İmmobilizasyonda üç temel parametre; seçilen enzimin özelliği, taşıyıcı destek materyalinin özelliği ve seçilen immobilizasyon yöntemi, immobilize enzimin verimini ve performansını etkileyen unsurlardır. Bu faktörlere bağlı olarak enzim aktivitesinde kayıplar meydana gelebilir ve tutuklu enzimin aktif bölgesi ve reaksiyon ortamının ara yüzeyinde, substrat ya da ürünlerin taşınmasında difüzyonel dirençten dolayı difüzyonel etkilerin ortaya çıkması söz konusu olabilir. Bu nedenle, oluşabilecek bu sınırlamalar; destek materyalinin küre yapıda hazırlanması ve parçacık boyutunu küçülterek geniş yüzey alanı sağlanması, yüksek spesifik aktiviteye sahip olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak ve enzimi destek materyalinin dış yüzeyine bağlanması yoluyla en minimum düzeyde tutulabilmektedir [53,54].

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal destek olarak kullanılmaktadır. Destek materyal bir membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. İdeal bir destek materyalinde olması gereken özellikler aşağıda belirtilmiştir [55,56].

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Zehirsizlik ve biyolojik uyumluluk,
- Rejenere olabilme,
- Ucuzluk,

### **1.4.3 Manyetik Temelli Destek Materyalleri**

Manyetik taşıyıcılar, laboratuvar koşullarında hazırlanabilir ya da ticari olarak temin edilebilir. Ticari olarak temin edilebilen veya laboratuvar koşullarında hazırlanan manyetik materyaller iki temel yapıdan oluşmaktadır.

İlk yapı  $Fe_3O_4$ ,  $MnFe_2O_4$  ve  $CoFe_2O_4$  gibi inorganik manyetik nanopartiküllerden oluşan manyetik merkezdir. Manyetik materyalleri oluşturan ikinci yapı ise manyetik merkezi çevreleyen polimerik kabuktur. Manyetik merkez materyale manyetik özellik kazandırırken polimerik yapı daha çok saflaştırma ve immobilizasyon gibi amaçlara hizmet etmektedir [57].

Son on yıl içerisinde, enzim immobilizasyon tekniği uygulamalarında manyetik özelliğe sahip destek materyallerinin kullanıldığı manyetik ayırma tekniği, enzim saflaştırılması ve immobilizasyonu uygulamalarında geleneksel yöntemlerle kıyasla sunduğu çeşitli üstünlükler nedeni ile araştırmacıların konu üzerine ilgisi artmıştır [58].

Manyetik ayırma teknolojisinin hızlı ve kolay bir teknik olması, hedef molekülü çok daha az mekanik gerilime maruz bırakması konusunda önemli bir üstünlük sağlaması, enzim immobilizasyon uygulamalarında hedeflenen başarının sağlanmasında temel ilkeleri oluşturmaktadır. Bu yeni kombine yöntemle pahalı saflaştırma sistemlerine, santrifüjlere, filtrelere ya da diğer ekipmanlara gerek olmaması, otomasyona ve mikro-ölçek gerektiren işlemlere daha kolay olarak adapte edilmeleri bu teknolojinin sunduğu diğer avantajları oluşturmaktadır. Manyetik destek malzemelerinin hazırlama yöntemine bağlı olarak partiküller dış manyetik alana karşılık olarak, süperparamanyetik gibi davranırlar, fakat manyetik alanın uzaklaştırılması sonucu hemen sistem içerisine yeniden süspansiyeye olmaları büyük avantaj sağlamaktadır ve manyetik alan yokluğunda kendi aralarında etkileşim olmamaktadır [59].

Farklı destek materyallerinin başarı ile kullanıldığı enzim teknolojisi uygulamalarında, biyokatalistin tutuklanması için manyetik partiküllerin kullanımı, işlenmiş enzim ürünlerin endüstriyel üretimi uygulamalarında artan bir ilgiye neden olmaktadır [60,62]. Çeşitli manyetik destek materyalleri, farklı fonksiyonel gruplar içeren çeşitli polimerlerden üretilmektedir. Manyetik partiküller, hücre ve enzimlerin tutuklanması [60,61], biyoseparasyon sistemleri [62], immunoanalizler [63], ilaç salınımı ve biyosensör [64] uygulamaların alanında yaygın bir kullanıma sahiptir.

Kalıcı manyetik özellik, destek materyalinin dışarıdan uygulanan manyetik alanın uzaklaştırılmış olması durumunda bile, partiküllerin bir araya toplanmasına sebep olabilir. Bu dezavantaj, süperparamanyetik partiküller geliştirilmesi

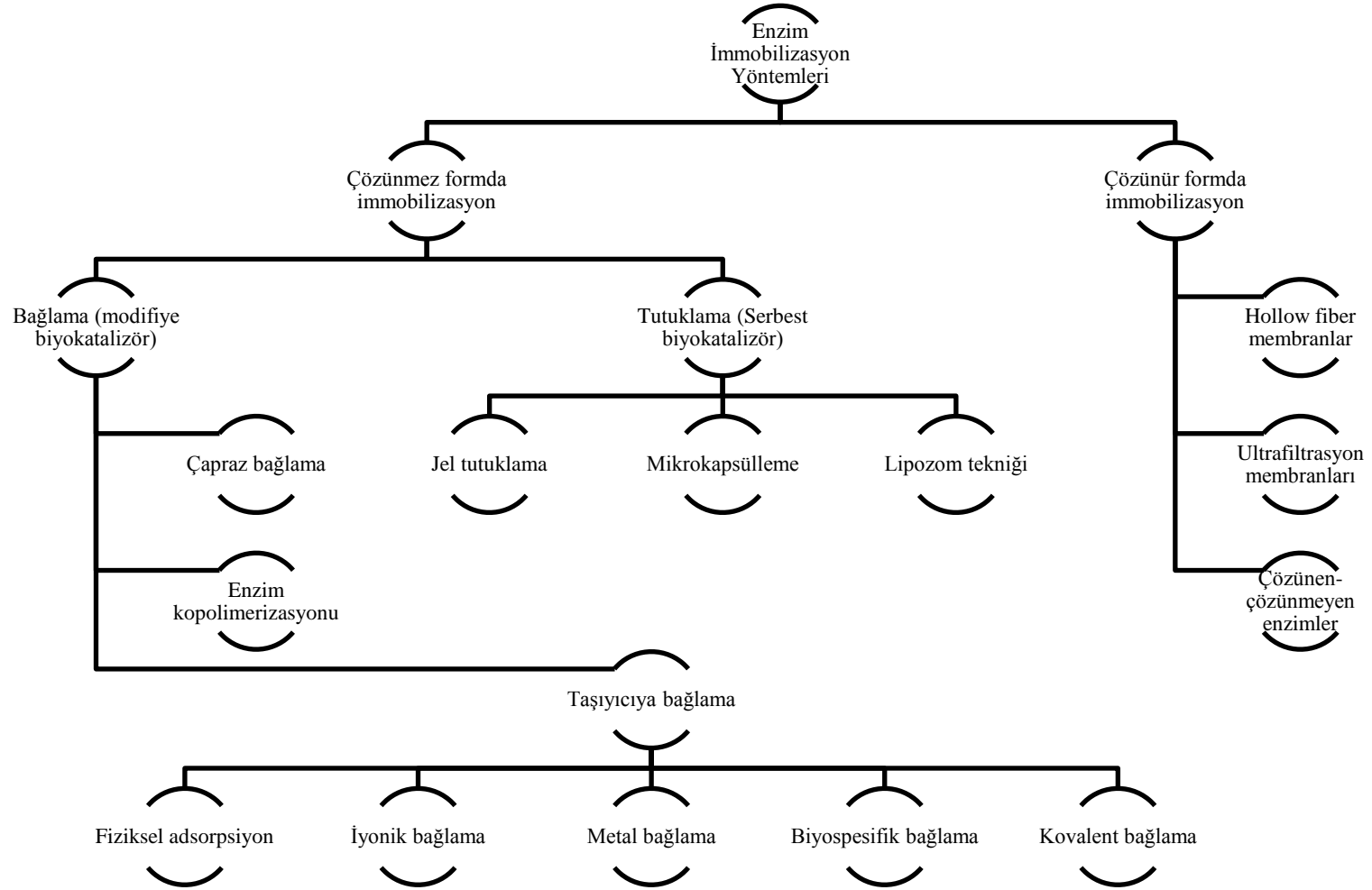
zorunluluğunu beraberinde getirmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> süperparamanyetik materyallerden biridir ve biyoteknolojik ve biyomedikal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [63,65].

## 1.5 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir. Ayrıca üretim için biyokatalizör açısından optimal koşulların saptanmasında yalnız immobilizasyon yöntemi değil aynı zamanda taşıyıcı ve reaktör tipi de önemli rol oynamaktadır [66].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli ya da immobilizasyon işleminde aktif merkez korunmalıdır [67].

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın etkileşim ve kullanılan desteğin özellikleri esas alınarak Şekil 1.6'da gösterildiği gibi bir sınıflandırma yapılabilir [68].



**Şekil 1.6:** Enzim immobilizasyon yöntemleri



### 1.5.1 Çözünür Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmemektedir. Fakat substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalara rastlanmaktadır. Bu nedenle küçük molekülü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir. Bu amaçla ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membranlarından yararlanır. Kofaktöre gereksinim duyan enzimlerin immobilizasyonu söz konusu ise küçük molekülü olan kofaktörlerin yarı geçirgen membrandan çıkmamaları için polietilen glikol (PEG) gibi suda çözünen polimerlere kovalent bağlanması gerekir [69].

### 1.5.2 Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Şekil 1.6'da görüldüğü gibi çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri bağlama ve tutuklama olarak iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Bağlama yöntemleri ise kendi içinde üç alt sınıfa ayrılmıştır.

#### 1.5.2.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi

Taşıyıcıya bağlama; *Adsorpsiyon, iyonik bağlama, metal bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama* olarak beş gruba ayrılmaktadır. Taşıyıcıya bağlama kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel (adsorbif) biçimde gerçekleşir.

#### *Adsorpsiyon Yöntemi*

Adsorpsiyon; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silika jel, CaCO<sub>3</sub>, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortadan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır [70].

### ***İyonik Bağlama Yöntemi***

İyonik bağlama; İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır [71].

### ***Metal Bağlama Yöntemi***

Metal bağlama; Bu yöntemde, bazı geçiş metallerinin (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması esasına dayanmaktadır. [72].

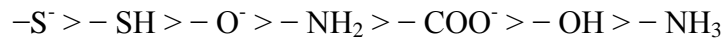
### ***Biyospesifik Bağlama Yöntemi***

Biyospesifik bağlama; Bu yöntem, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak enzimlerin immobilize edilmesi esasına dayanmaktadır [48].

### ***Kovalent Bağlama Yöntemi***

Kovalent bağlama yöntemi enzimlerin immobilizasyonu, immobilizasyon yöntemleri içerisinde en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir [73]. Bu yöntemi kullanmanın avantajlarından birisi, enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olmasıdır. Bundan dolayı enzimin çözeltiye geri kaçışı önlenmiş olmaktadır [74]. Ancak bağlanma aktivite yüzdesini artırmak için kullanılan temel amino asit rezidülerinin taşıyıcıya kovalent bağlanması engellenmelidir. Bu durum bazı durumlarda uygulamanın ne kadar zor şartlar gerektirdiğini gösterir [75].

Kovalent bağların oluşumu genellikle enzimde gösterilen aminoasitlerin yan zincirlerinde görülür. Ancak onların asıl bağ güçlerinin aktiviteleri aşağıda verilen yüklerin sıralamasıyla önemli derecede ilişkilidir:



Bunun yanında sülfid, sülfidril, oksit, amino, karboksil, hidroksil, amonyum, imino, amid, metiltiyol, guanidil ve fenol halkası gibi birçok fonksiyonel grup içeren parçalar kimyasal bağlarda etkin olarak görev alır [76].

Bir enzimin kovalent bağlanması, desteğin reaktif gruplar içeren ajanlarla veya destek ve enzimin arasında köprü vazifesi görecek iki fonksiyonlu ajanların etkileşmesiyle oluşur [77]. Bunun yanında üç boyutlu yapı düşük molekül ağırlıklı iki fonksiyonlu ajanlarla çapraz bağlı yapılar oluşturabilir. Bu durumda enzim inaktif olabilir. Çünkü reaksiyonlar enzimin aktif bölgesinde yerleşmiş olan fonksiyonel gruplarla bağ oluşturabilir. Böylece elde edilen net sonuç enzimin aktivitesinin kaybı şeklindedir. [78].

## 1.6 Beta-Glukosidaz Enziminin İmmobilizasyonu

Ticari olarak temin edilen ya da çeşitli kaynaklardan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı araştırmacılar tarafından çeşitli amaçlarla yapılan immobilizasyon çalışmaları bildirilmektedir.

Ticari badem  $\beta$ -glukosidazının sodyum aljinat üzerine çapraz bağlama metodu ile immobilizasyonu ve immobilize enzimin portakal suyundaki bağlı uçucu bileşiklere etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. [79]. Yine başka bir çalışmada çay içeceğinde aroma arttırmak amacıyla  $\beta$ -glukosidaz enziminin kalsiyum aljinat üzerine çapraz bağlama ile immobilizasyonu yapılmıştır [80]. *Candida molischiana* 35M5N  $\beta$ -glukosidazı Duolite A-568 reçineye immobilize edilerek üzüm şarabında aroma arttırması üzerine çalışmalar bildirilmektedir [81]. Üzüm şarabında aroma arttırmak için *Issatchenka terricola* mantarından izole edilen ekstrasellüler  $\beta$ -glukosidaz Eupergit C üzerine immobilize edilmiştir [82]. Şarap yapma endüstrisi için ticari  $\beta$ -glukosidaz kitosan pelletlere immobilize edilmiş [83] ve sürekli reaktörlerde uygulama stabilitesi çalışılmıştır. Diğer bir çalışmada *Aspergillus niger* endo- $\beta$ -glikosidazı akrilik boncuklara immobilize edilerek, şarap ve çarkıfelek meyve suyundaki aromatik kaliteye etkisi incelenmiştir [84].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyaller

Deneysel çalışmalarda kullanılan, *p*NPG, *o*NPG, *p*NPGal, *o*NPGal, Glukoz,  $\delta$ -Glukonolakton, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, Standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletildiamin (TEMED), Trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), Amonyum sülfat ve Karbodiimide Sigma Chemical'den; Sodyum hidroksit, Glisin, Fosforik asit, Asetik asit, Etil alkol, Hidroklorik asit, Sodyum dihidrojen fosfat,  $\beta$ -Merkaptoetanol, Sodyum dodesil sülfat, Akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, Amonyum persülfat, Bromofenol mavisi, Gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, Sodyum bikarbonat, Sodyum fosfat, Potasyum fosfat, Magnezyum klorür ve kullanılan ağır metaller, FeCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, NiNO<sub>3</sub>, PbNO<sub>3</sub>, ZnNO<sub>3</sub>, ve CrNO<sub>3</sub> formunda olup Merk'den; Amberlite XAD-2 reçine Supelco'dan temin edildi.

Süperparamanyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküller Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR ve Arş. Gör. Dr. Öznür KARAAĞAÇ tarafından sentezlenip tarafımıza temin edildi.

#### 2.1.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon Santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hanna HI 2210
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Thermo Type 1510

Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Peristaltik Pompa	Atta SJ-1211H
Gradient Mikser	Atta C-10 Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Doğrayıcı	Sinbo SHB-3024
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Elektroforez Sistemi	Mini Protean Tetra Cell Bio-Rad
Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Sonikatör	Ceia CP102
Evaporatör	Buchi Rotavapor R-200
Thermo-Block	Biosan TS-100
İnkübatör	Nuare CO <sub>2</sub> -Water Jacket Incubator
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
GC-MS Sistemi	Shimadzu-2010 Plus
LC-MS Sistemi	Agilent-1200 LC

## 2.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

### 2.1.2.1 Enzimin Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

- ✓ **Mandalina ekstraksiyon tamponu:** 1 M NaCl, % 0,02 (w/v) NaN<sub>3</sub> içeren 0,1 M tris tamponu (pH 8,0); 29,22 g (0,5 mol) NaCl, 0,1 g NaN<sub>3</sub> ve 6,057 g (0,05 mol) tris 450 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

- ✓ **Enzim aktivitesinin ölçüldüğü ve substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon:** 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,5); 6,804 g (0,05 mol) Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü. Glacial asetik asit ile pH'sı 5,5'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Substrat çözeltisi:** 5 mM pNPG çözeltisi; 0,0075 g pNPG 5 mL, 50 mM sodyum asetat tamponu içinde vortekste karıştırılarak çözüldü.
- ✓ **Reaksiyon durdurma tamponu:** 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tamponu; 25,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> son hacim 500 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.
- ✓ **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan pelletin alındığı tampon:** 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,8); 132,14 g (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 7,09 g (0,05 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,8); 132,14 g (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 7,09 g (0,05 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Hidrofobik jele bağlanmış β-glukosidaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon:** 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,8) ve 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 132,14 g (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 7,09 g (0,05 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 7,09 g (0,05 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:**

Lowry yöntemi için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

  - **Çözelti A:** 0,1 M NaOH içeren %2'lik (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi; 1 g (0,025 mol) NaOH ve 5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mL distile suda çözüldü ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

- **Çözelti B:** %1'lik (w/v) NaK tartarat; 1 g NaK 90 mL distile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **Çözelti C:** %0.5'lik (w/v) CuSO<sub>4</sub>; 0,5 g CuSO<sub>4</sub> 90 mL distile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **Çözelti D:** 48 mL Çözelti A, 1 mL Çözelti B ve 1 mL Çözelti C alınarak hazırlandı.
- **Çözelti E:** Folin fenol ve distile su (1:1 v/v); 2,5 mL folin fenol 2,5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı.
- **Sığır Serum Albumini (BSA):** 5 mg BSA 5 mL distile suda çözünerek taze olarak hazırlandı.

Bradford yöntemi için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

- **Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 100 mL'lik alüminyum kaplı bir behere alındı ve üstüne 50 mL etanol eklenerek 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözelti daha büyük bir behere alınarak üstüne 100 mL %85'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve iyice karıştırıldı. Çözelti iki kez karanlık ortamda filtre kağıdından geçirildi ve alüminyum kaplı bir şişeye alınarak saklandı.
- **Sığır Serum Albumini (BSA):** 5 mg BSA 5 mL distile suda çözünerek taze olarak hazırlandı.

### 2.1.2.2 SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

#### ✓ SDS-PAGE'de kullanılan alt ayırma ve üst yığma tamponları

- **SDS'li alt ayırma tamponu:** % 0,4'lük (w/v) SDS içeren, 1,5 M Tris-Base tamponu (pH 8,8); 19,8 g (0,15 mol) Tris ve 0,4 g SDS 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **SDS'li üst yığma tamponu:** % 0,4'lük (w/v) SDS içeren, 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8); 6,6 g (0,05 mol) Tris ve 0,4 g SDS 75 mL distile suda

çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

✓ **NATIVE-PAGE'de kullanılan alt ayırma ve üst yığma tamponları**

- **SDS'siz alt ayırma tamponu:** 1,5 M Tris-Base tamponu (pH 8,8); 19,8 g (0,15 mol) Tris 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **SDS'siz üst yığma tamponu:** 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8); 6,6 g (0,05 mol) Tris 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **SDS/NATIVE PAGE'de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS/NATIVE-PAGE tekniklerinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 2.1'de verilmektedir.
- **SDS/NATIVE-PAGE tekniklerinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.
- **SDS/NATIVE-PAGE tekniklerinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5'lik distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.



**Tablo 2.1:** SDS / NATIVE-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları

<b>SDS-PAGE</b>	<b><i>SDS’li Ayırma Jeli (%10)</i></b>	<b><i>SDS’li Yiğma Jeli (%3)</i></b>	<b>NATIVE-PAGE</b>	<b><i>SDS’siz Ayırma Jeli (%10)</i></b>	<b><i>SDS’siz Yiğma Jeli (%3)</i></b>
SDS’li alt tampon	2,5 mL	---	SDS’siz alt tampon	2,5 mL	---
SDS’li üst tampon	---	1,25 mL	SDS’siz üst tampon	---	1,25 mL
Akril amid/Bis (37,5/1)	2,5 mL	625 µL	Akril amid/Bis (37,5/1)	2,5 mL	625 µL
Distile su	4,89 mL	3,07 mL	Distile su	4,89 mL	3,07 mL
%10’luk (w/v) APS	100 µL	50 µL	%10’luk (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL	TEMED	10 µL	5 µL
SDS’li Tank (Yürütme) Tamponu	3 g Tris-HCl, 14,4 g Glisin ve 1 g SDS eklenir ve pH’sı 8,3’e getirildikten sonra son hacim 1 L’ye tamamlanır.		SDS’siz Tank (Yürütme) Tamponu	3 g Tris-HCl ve 14,4 g Glisin eklenir ve pH’sı 8,3’e getirildikten sonra son hacim 1 L’ye tamamlanır.	
Yükleme Tamponu (SDS ve β-merkaptolanol içerir.)	2,5 mL 0,5 M Tris-HCl, (pH’sı 6,8) tamponu, 4 mL %10’luk SDS, 2 mL Gliserol, 1 mL β-merkaptolanol, 0,01 g Bromfenol mavisi ve 0,5 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.		Yükleme Tamponu (SDS ve β-merkaptolanol içermez)	2,5 mL 0,5 M Tris-HCl, (pH’sı 6,8) tamponu, 2 mL Gliserol, 0,01 g Bromfenol mavisi ve 5,5 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.	

### 2.1.2.3 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- ✓ **İmmobilizasyona hazırlık ve immobilizasyonda kullanılan tampon:** *0,1 M NaCl içeren, 0,003 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,0); 2,92 g (0,05 mol) NaCl ve 0,179 g (0,0015 mol) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 450 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,0'ya getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.*
- ✓ **İmmobilizasyondan sonra yıkamada ve depolamada kullanılan tampon:** *50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,5); 6,804 g (0,05 mol) Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü. Glacial asetik asit ile pH'sı 5,5'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.*
- ✓ **Nanopartikülleri aktifleştirmek için kullanılan karbodiimide çözeltisi:** *0,025 g karbodiimide 1 mL 0,1 M NaCl içeren, 0,003 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,0) içinde çözüldü.*

### 2.1.2.4 İmmobilize Enzimin Uygulanmasında Kullanılan Çözeltiler

- ✓ **Serbest uçucu bileşiklerin uzaklaştırma ve konsantre etme tamponu:** *Pentan ve Dietil eter (1:1 v/v); 500 mL pentan ile 500 mL dietil eter karıştırılarak hazırlandı.*
- ✓ **Amberlite XAD-2 reçineye bağlanan glikozidik bağlı fraksiyonun elüsyonu için kullanılan çözelti:** *Glikozidik bağlı fraksiyonun elüsyonu için çalışmamızda 300 mL metanol kullanıldı.*
- ✓ **Metanol içindeki elüatın vakum altında ekstre edildikten sonra glikozidik bağlı kalıntının alındığı tampon:** *30 mL 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,5) içerisinde çözüldü. 6,804 g (0,05 mol) Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü. Glacial asetik asit ile pH'sı 5,5'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.*

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Enzim Ham Ekstraktının Hazırlanması

Ham ekstrakt hazırlamak için mandalina meyvelerinin kabukları soyuldu. 200 g kabukları soyulmuş mandalina meyvesini doğrayıcı kabına koyulup üzerine, önceden +4 °C'ye kadar soğutulmuş olan 100 mL ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Doğrayıcı kabının içeriği buz içinde, 2 dakika boyunca doğrayıcı ile homojenize edildi. Bir tülbent yardımıyla posalı kısım ve homojenat birbirinden ayrıldı. Homojenat 15000 rpm, 30 dakika, +4 °C'de teflon tüplerde santrifüj edildi ve süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

### 2.2.2 Enzim Aktivite Tayini

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 70  $\mu$ L, 5 mM pNPG substrat çözeltisi ve üzerine 70  $\mu$ L enzim çözeltisi 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak ise 70  $\mu$ L 50 mM (pH 5,5) Na-Ac tamponu ve üzerine 70  $\mu$ L enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37 °C'de, 30 dakika inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70  $\mu$ L 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu.

Beta-glukosidaz enzimi, pNPG substratını hidroliz ederek serbest halde *p*-Nitrofenol ve  $\beta$ -D-glukopiranozid ürünlerini ortaya çıkarır.  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi, enzim ünite hesaplamasında okunan absorbansa karşılık gelen *p*Nitrofenol ürün konsantrasyonunun  $\mu$ M cinsinden değeridir. Ürün miktarının belirlenmesinde hazırlanan standart grafik kullanılmıştır. Standart grafik hazırlanırken son hacim 210  $\mu$ L ve 280  $\mu$ L olacak şekilde *p*Nitrofenolün bir seri konsantrasyonunu hazırlandı ve kör olarak aynı miktarda saf suya karşı 405 nm'de absorbansları okundu. Elde edilen değerlerden *p*Nitrofenol standart eğrisi oluşturuldu. Bir Enzim Ünitesi (EU) dakikada oluşan *p*Nitrofenolün  $\mu$ mol'ü olarak hesaplandı.

### **2.2.3 Protein Tayini**

#### **2.2.3.1 Kalitatif Protein Tayini**

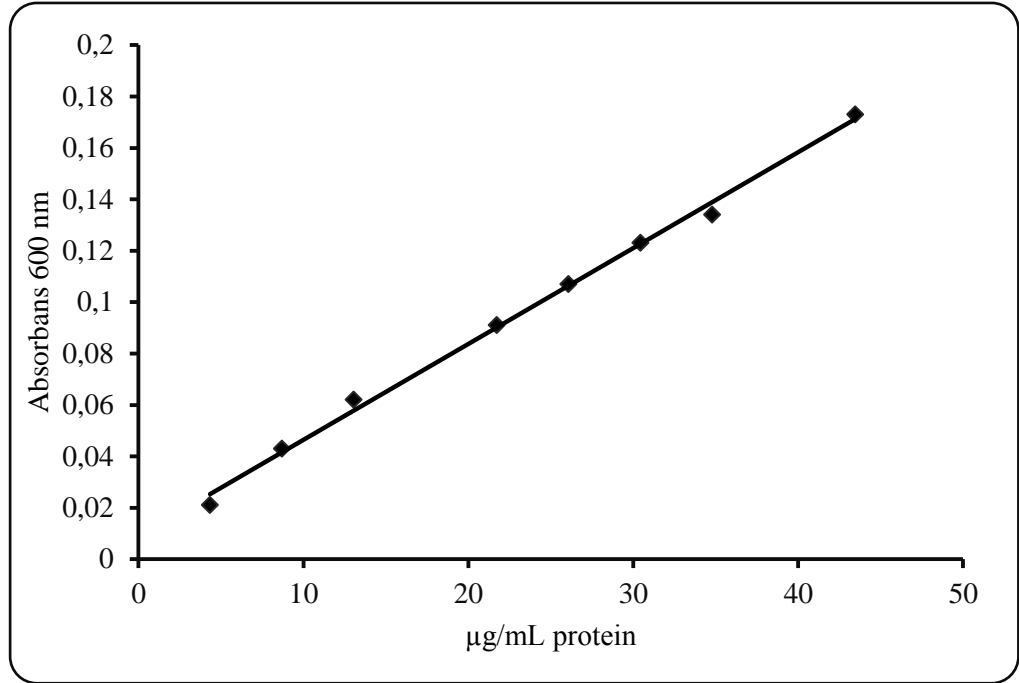
Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de (UV) maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg Metodu [104] olarak bilinen yolla gerçekleştirildi. Hidrofobik etkileşimi kromatografisi işleminden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplere kalitatif protein tayini yapıldı. Her bir tüpten 96'lık kuvarz plakanın (well-plate) her bir kuyusuna 280 µL konuldu. Kör olarak 280 µL saf su konuldu. Spektrofotometrede 280 nm'de köre karşı absorbansları okundu.

#### **2.2.3.2 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini**

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin  $Cu^{+2}$  katalizli oksidasyonundan sonra, ayıraçta bulunan fosfomolibdik, fosfotungisdik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin-Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Özetle yöntemin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturması esasına dayanır [79]. Koyu mavi renk oluşumu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorbans verir. Bu yöntem Bradford yöntemine göre daha duyarlıdır. Ayrıca ayıracın triptofan ve tirozin aminoasitlerine karşı daha yüksek hassasiyet göstermesi bu aminoasitleri içeriğinde fazla olarak barındıran proteinlerin miktar tayini için avantaj sağlar.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve her tüpün son hacmi 100 µL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 2 ml Çözelti D eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dk sonunda tüplere 0,2 mL Çözelti E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er µL koyularak 600 nm'de

absorbansları köre karşı okundu. Kör olarak BSA içermeyen 1. Tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

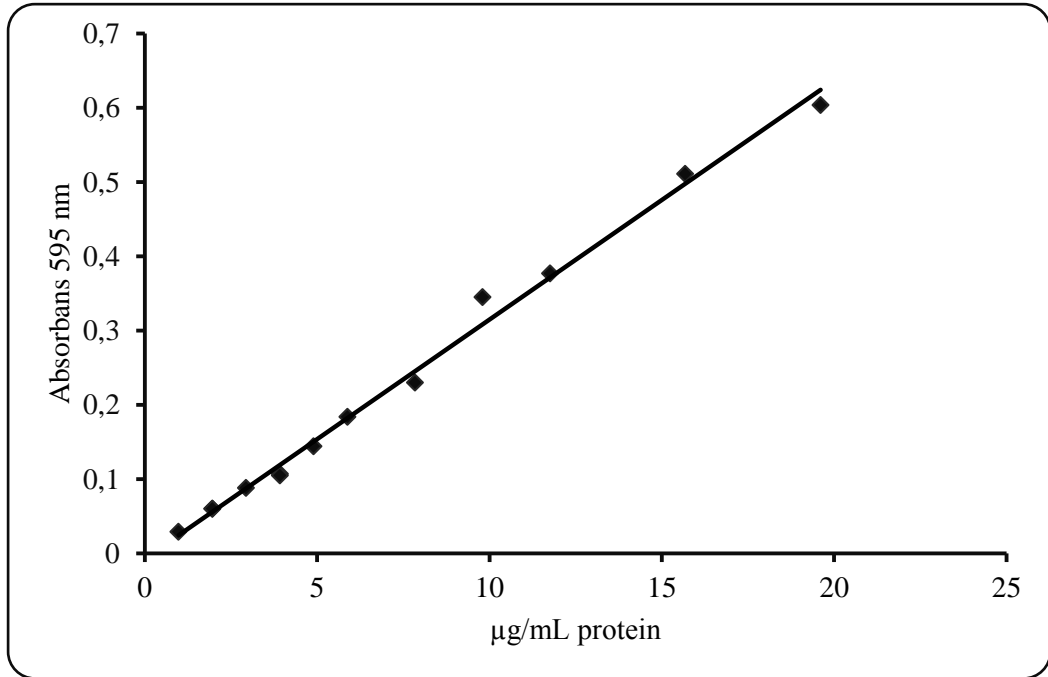
Amonyum sülfat aralıklarında ve saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 100'er  $\mu\text{L}$  tüplere alındı ve Lowry yöntemiyle standart grafik oluşturmak için uygulanan basamaklar aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numunelerin içindeki protein miktarı, standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı.

### 2.2.3.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Enzim immobilizasyonu aşamasında yıkama çözeltilerindeki protein miktarı tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [80]. Bu yöntemin diğer

protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı ve her tüpün son hacmi 100 µL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak BSA içermeyen 1. Tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2:** Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

Enzim immobilizasyonunda protein miktarı belirlenecek numunelerden 100'er µL tüplere alındı ve Bradford yöntemiyle standart grafik oluşturmak için uygulanan basamaklar aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numunelerin içindeki protein miktarı, standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı.

## 2.2.4 Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kısmi saflaştırma için ham ekstrakta kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Ekstrakt hacmi

S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

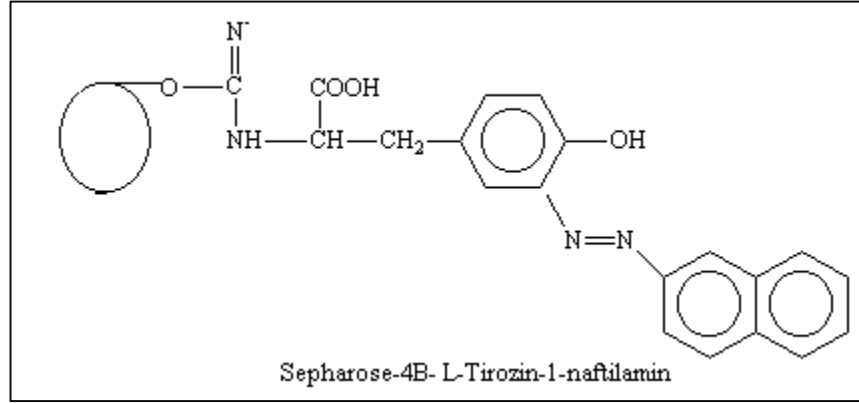
S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 %'lik (w/v) oranlarında çöktürme yapıldı. Her bir %'lik (w/v) aralık için yukarıdaki formüle göre hesaplanan amonyum sülfat miktarları, 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda buz üstünde (0°C'de) yavaşça eklenerek, çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Çökeleklerin her biri 2 mL, 50 mM (pH 6,8) sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

Her bir aralık için çözülen örneklerin enzim aktivitesi ve Lowry metodu ile kantitatif protein miktarları belirlendi. Enzim aktiviteleri belirlenirken, enzim çözeltisi renkli olduğu için her bir aralıkta kör olarak enzim çözeltisi de ortama eklendi. Bu durumda 10 farklı tuz konsantrasyonu aralığı için 10 ayrı kör kullanıldı. 37 °C'de 30 dakika inkübe sonunda reaksiyonlar 70 µL 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile durduruldu ve 405 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir aralığın kantitatif protein miktarları Bölüm 2.2.3.2'de verilen Lowry metoduna göre hesaplandı.

#### 2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılmasında, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından, hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi kullanıldı. Bu saflaştırma basamağı için laboratuvarında sentezlenen ve Şekil 2.1’de verilen hidrofobik jel, sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır [81].



**Şekil 2.3:** Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çökeleği en küçük hacimde 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM, (pH 6,8) sodyum fosfat tamponu çözüldü. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM, (pH 6,8) sodyum fosfat tamponu ve 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Tuz gradienti ile kolondan elüe edilen elüatlar 2 mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 405 nm’de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.4).



### **2.2.4.3 Doğal/Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (NATIVE/SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü**

Beta-glukosidaz enzimin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra iki farklı elektroforez kullanılarak saflığı ve alt birim varlığı/sayısı kontrol edildi. Bunlardan biri proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanların kullanılmadığı ve saflığının tayini içinde kullanılabilen NATIVE-PAGE (Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi). Diğeri ise Proteinlerin doğal yapılarını değiştiren ve onların eşit yük yoğunluğuna sahip olmasını sağlayan bozucu ajanların (Merkaptoetanol ve SDS) kullanıldığı SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel elektroforezi). SDS-PAGE tekniğinde proteinlerin doğal yapıları bozulduğu için proteinler sadece molekül ağırlığına göre ayrılır. Bu yüzden SDS-PAGE proteinlerin, birden fazla alt birime sahip olup olmadığını ve molekül ağırlıklarını belirlenmesinde kullanıldı. SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE tekniklerinde yığma jeli % 3'lük ve ayırma jeli % 10'luk olacak şekilde iki farklı akrilamid konsantrasyonuna sahip kesikli jeller Laemmli [82] tarafından belirtilen yöntemle hazırlandı.

SDS-PAGE tekniğinde jel hazırlamak için elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Tablo 2.1'de belirtildiği şekilde SDS kullanılarak hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar pipet ile döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1-2 saat) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine SDS'li yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına SDS'li yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında SDS ve β-merkaptolanol içeren numune yükleme tamponuyla karıştırıldı. Molekül ağırlık standartları; (β-galaktosidaz (116,0kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), yumurta albumini (45,0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), REase Bsp98I (*E.coli*) (25,0 kDa), β-laktoglobulin (18,4 kDa) ve Lizozim (14,4 kDa) içeren standart protein çözeltisinden (marker) 5 µL alındı. Marker ve numuneler 5 dakika 95 °C'de termoblok da bekletildi. Numuneler ve marker soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune yükleme tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1 cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renk açma çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntüsü bilgisayara aktarıldı.

NATIVE-PAGE Tablo 2.1'de belirtildiği şekilde SDS kullanılmadan hazırlanan jeller SDS-PAGE yönteminde olduğu gibi cam plaklar arasına, sırasıyla SDS'siz ayırma jeli ve SDS'siz yığılma jeli dökülerek hazırlandı. Jel elektroforez tankına yerleştirildikten sonra tankın alt ve üst kısmına SDS'siz yürütme tamponu konuldu. Yüksek aktivite gösteren fraksiyonlar 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında SDS ve β-merkaptolanol içermeyen numune yükleme tamponuyla karıştırıldı. Sadece molekül ağırlık standartlarını içeren standart protein çözeltisinden (marker) 5 µL alındı. Marker 5 dakika 95 °C'de termoblok da bekletildi ve soğutuldu. Daha sonra numuneler kuyucuklara yüklendi. Diğer aşamalara SDS-PAGE tekniğinde belirtildiği şekilde yapıldı. En son olarak jel, renk açma çözeltisinden çıkartıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntüsü bilgisayara aktarıldı.

## 2.3 $\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

### 2.3.1 Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla bir seri farklı pH (2,80-10,75) değerlerine sahip 50 mM Na-Ac tamponu hazırlandı. Hazırlanan Na-Ac tamponlarının her birinde son konsantrasyonu 5 mM olarak şekilde *p*NPG substratı çözüldü. Enzimin farklı pH değerlerindeki substratlara karşı gösterdiği aktivite belirlenirken; 120  $\mu$ L, farklı pH'a sahip 5 mM *p*NPG substrat çözeltisi üzerine 20  $\mu$ L enzim çözeltisi eklenerek 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 120  $\mu$ L 50 mM (pH 5,5) Na-Ac tamponu ve üzerine 20  $\mu$ L enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37 °C'de, 30 dakika inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70  $\mu$ L 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. Absorbans değerlerinden *p*NP standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

### 2.3.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla, 20-60 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık 5 °C artırılarak aktivite tayini yapıldı. Enzimin farklı sıcaklıklarda aktivitesini belirlemek için Bölüm 2.2.2'de aktivite tayininde belirtilen yöntemin sadece inkübasyon sıcaklıkları değiştirildi. Farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonlar dururulduktan sonra 405 nm'de absorbansları alındı ve *p*NP standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

### 2.3.3 Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimin termal kararlılığının belirlenmesi amacı ile enzim çözeltisi 5 °C aralıklı 40-60 °C olan sıcaklıklarda ayrı ayrı inkübe edildi. İnkübasyon süreleri 40-45-50 °C için 5 dakika aralıklı 5-50 dakika, 55-60 °C için 2 dakika aralıklı 1-17 dakika olarak alındı. Isı ile muamele edilmemiş stok enzim çözeltisinden alınan ve aktivitesine bakılan örnek başlangıç enzim aktivitesi olarak kabul edildi. Belirlenen sürelerde inkübasyondan alınan enzim çözeltilerinin pNPG substratı kullanılarak aktivitelere bakıldı. Son olarak 405 nm'de absorbansları alınarak pNP standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

### 2.3.4 Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Belirlenmesi

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini incelemek amacıyla  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+1}$ ,  $Pb^{+1}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+1}$ ,  $Cr^{+1}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Ag^{+1}$  iyonlarını içeren 5 mM stok çözeltiler hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. Metal iyonu içeren enzim çözeltilerinin aktiviteyi, içermeyen çözelti aktivitesi ile kıyaslanarak, % kalan aktivite olarak hesaplandı.

### 2.3.5 Enzimin Farklı Substratlara Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimin farklı substratlara karşı gösterdiği kinetik etkinliği belirlemek için çeşitli substratlar kullanıldı. Bu amaçla konsantrasyonları 5 mM olan para-Nitrofenol  $\beta$ -D-glukopiranozid, orto-Nitrofenol  $\beta$ -D-glukopiranozid, para-Nitrofenol  $\beta$ -D-galaktopiranozid, orto-Nitrofenol  $\beta$ -D-galaktopiranozid, para-Nitrofenol 1-thio- $\beta$ -D-glukopiranosid, para-Nitrofenol  $\beta$ -D-fukopiranozid ve para-Nitrofenol  $\alpha$ -D-glukopiranozid ve substratları kullanıldı. Bu substratların aktivite tayinleri Bölüm 2.2.2'de belirtildiği şekilde yapıldı. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği substratın aktivitesi %100 kabul edilerek diğer substratların aktiviteyi relative olarak belirlendi.

### 2.3.6 Safılaştırılan Enzimin Farklı Substratlara Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG ve *o*NPG substratlarına olan ilgisi  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunarak tespit edildi. Bunun için *p*NPG ve *o*NPG substratlarının farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçüldü.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak bulundu. Bunun için grafiğin  $1/V$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max}$  değerinden  $V_{max}$  değeri ve denklemin eğimi olan  $K_M/V_{max}$  değerinden  $V_{max}$  yerine yazılarak  $K_M$  değeri hesaplandı.

### 2.3.7 İnhibitörlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştıran glukoz ve  $\delta$ -glukonolakton maddelerinin  $IC_{50}$  değerlerini bulmak için, *p*NPG substratının reaksiyon hacminde 1,75 mM konsantrasyonu çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi bulunarak bu değer %100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı.

### 2.3.8 İnhibitörlerin $K_i$ Değerlerinin Bulunması

$\beta$ -glukozidazların yaygın substratı olan *p*NPG substratı kullanılarak mandalina meyvesinden safılaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolakton ve glukozun inhibisyon tipleri ile  $K_i$  değerleri belirlenmiştir.  $K_i$  değerlerinin tespiti için, inhibitörsüz ortamda altı farklı *p*NPG substrat konsantrasyonu varlığında aktivite değerleri bulundu. Bulunan bu aktivitelere  $1/V$  değerleri hesaplandı.  $1/V-1/[S]$  değerleri ile Lineweaver-Burk grafiği çizildiğinde  $I_0$  doğrusu elde edildi. Her bir inhibitör maddenin iki farklı sabit konsantrasyonunda, *p*NPG substratının altı değişik konsantrasyonuna karşılık gelen enzim aktiviteleri belirlendi. İki farklı inhibitör konsantrasyonu varlığında, farklı substrat konsantrasyonuna karşılık gelen aktiviteler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk

grafiginde  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri ile  $I_1$  ve  $I_2$  doğruları oluşturuldu. Lineweaver-Burk grafiklerden yararlanarak  $K_i$  değerleri hesaplandı ve inhibisyon turleri tespit edildi.  $K_i$  değerleri yarişmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde  $1/[S]$  eksenini kestiği nokta olan  $-1/K_M (1+[I]/K_i)$  ifadesinden, yarişmasız (nonkompetitif) inhibisyon için  $1/V$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$  ifadesinden, yariyarişmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için  $1/V$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$  ifadesinden yararlanılarak hesaplandı.  $K_i$  değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemlerdeki  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri inhibitorsüz ortamda bulunan değerlerdir.

## 2.4 $\beta$ -Glukosidaz Enziminin İmmobilizasyonu

### 2.4.1 Enzimin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu

Enzimin immobilizasyonu için süperparamanyetik  $Fe_3O_4$  nanopartiküller kullanıldı.  $\beta$ -glukosidaz enziminin immobilizasyonu için sırası ile aşağıdaki aşamalar izlendi.

İlk olarak biri numune diğeri kör olarak kullanılmak üzere 0,1 g  $Fe_3O_4$  nanopartikül cam tüplere alındı. Üzerine 2 mL 0,1 M NaCl, 0,003 M  $NaH_2PO_4$  tamponu (pH 6,0) eklendi. Karışım 30 dakika sonikatöre bekletildi. Bu karışımın üzerine 0,5 mL karbodiimide çözeltisi eklendi. Karışım 15 dakika sonikatörde bekletildi. Böylece nanopartiküllerin yüzeyleri karbodiimide ile aktifleştirilerek,  $\beta$ -glukozidaz enzimini bağlamaya hazır duruma getirildi.[100-101].

Protein miktarı bilinen stok enzim çözeltisinden, numune olarak kullanılacak tüpe 2 mL ilave edildi. Kör olarak kullanacağımız tüpe ise 2 mL 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponundan eklendi. Her iki tüpte bulunan karışım 30 dakika sonikatörde bekletildi. Daha sonra cam tüplerin dış çeperine mıknatis konularak nanopartiküllerin çepere toplanması sağlandı. Bir pipet yardımıyla tüpün içindeki tüm karışım alındı ve protein tayini yapmak üzere ayrı bir tüpe konuldu. Tüplerden mıknatislar uzaklaştırılarak 2 mL 0,1 M NaCl, 0,003 M  $NaH_2PO_4$  (pH 6,0) tamponu eklenerek iki kez yıkandı ve yıkama suları ayrı bir tüpe konuldu. En son aşamada ise

iki kez 2 mL 50 mM sodyum asetat (pH 5,5) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda saklandı.

#### **2.4.2 Enzimin Nanopartiküllere Bağlanmasının FT-IR Analizi ile Belirlenmesi**

İmmobilizasyon işleminden sonra bağlanmanın kontrolü amacıyla Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin, β-glukosidaz enziminin ve β-glukosidaz ile immobilize edilen nanopartiküllerin IR spektrumları alındı. Numunelerin IR spektrumu katı KBr pelet hazırlama tekniği ile yapıldı. Bu amaçla immobilize nanopartiküllerin ve enzimin tamponu uzaklaştırılarak kurutuldu. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküller kuru olarak temin edildiği için doğrudan analizde kullanıldı. Hazırlanan numunelerin her birinden 0,5-1 mg madde alındı ve iyice kurutulmuş KBr ile karıştırıldı. KBr ve numune karışımı bir agat havanda dövülerek toz haline getirildi. Karışım paslanmaz çelikten bir cihaz içine konularak hidrolitik preste 4500 kg/cm<sup>2</sup>'lik bir basınçta birkaç dakika bekletildi ve KBr pelleti elde edildi. İçinde numune olmayan boş KBr pelleti background olarak okutularak hazırlanan numunelerin IR spektrumları alındı.

#### **2.4.3 Immobilize Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi**

İmmobilize β-glukosidaz enziminin aktivite tayininde serbest enzime uygulanan yöntem referans alındı. Bu amaçla 0,1 g enzim bağlı ve kör olarak hazırlanan nanopartikülleri içeren numunelerin bulunduğu tüplere, konsantrasyonu 2,5 mM olan 1 mL pNPG substratından konuldu. Tüpler çalkalamalı etüvde 37 °C'de 210 rpm'de 30 dakika inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda numune ve kör olan reaksiyonlardan 140'ar µL alınarak 96'lık plakaya (well-plate) konuldu. Üzerlerine 70 µL 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> konularak reaksiyonlar durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. İmmobilize enzimin aktivitesini hesaplamak için 96'lık plakada (well-plate) hazırlanan ve son hacmi 210 µL olan pNP standart grafik denklemi kullanıldı.

#### **2.4.4 Enzimin Nanopartiküllere Optimum Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi**

$\beta$ -Glukosidaz enziminin immobilizasyonu sırasında ortamdaki farklı miktardaki  $Fe_3O_4$  nanopartiküllere bağlanma yüzdesini tespit etmek amacıyla bir seri immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla kör olarak kullanılacak numunelerde aynı miktar nanopartikül içerecek şekilde 25, 50, 75, 100, 125, 150 mg  $Fe_3O_4$  nanopartikül alınarak Bölüm 2.4.1’de açıklanan yöntemle immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. İmmobilizasyon işleminin son basamağında alınan yıkama sularına Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı.

Farklı miktarda  $Fe_3O_4$  nanopartikül içeren numunelerin aktivite tayinleri Bölüm 2.4.3’de anlatılan yöntemle yapıldı. Her numunenin absorbansı kendi körüne karşı 405 nm’de okundu. Enzim aktivitesi son hacmi 210  $\mu$ L olan *p*NP standart grafik denklemi kullanılarak hesaplandı.

#### **2.5 Immobilize $\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

##### **2.5.1 Immobilize Enzimin Optimum Sıcaklık ve pH Değerlerinin Belirlenmesi**

0,2 g  $Fe_3O_4$  nanopartikül üzerine immobilize edilen enzim içeren numune ve 0,2 g  $Fe_3O_4$  nanopartikül içeren kör, son konsantrasyonları 20 mL olacak şekilde Na-Ac tamponunda homojen hale getirildi. Bu homojen hale getirilen tüplerden 1’er mL alınarak 20 farklı tüpe konuldu. Bu tüplerin yan çeperlerine miknatıs konulup nanopartiküller kenarda toplandı ve içindeki tampon pipet yardımıyla alındı. Böylece 11 tanesi optimum pH ve 9 tanesi optimum sıcaklık belirlemede kullanılmak üzere eşit immobilize enzim aktivitesine sahip 20 tüp elde edildi.

İmmobilize enzimin optimum pH’sını belirlemek amacıyla bir seri farklı pH (2,80-10,75) değerlerine sahip 50 mM Na-Ac tamponu hazırlandı. Hazırlanan Na-Ac tamponlarının her birinin son konsantrasyonu 5 mM olarak şekilde *p*NPG substratı



çözüldü. Hazırlanan 11 tane tüpe bu farklı pH da olan substratlardan 1'er mL koyuldu. Aynı işlem kör olarak hazırlanmış tüpler içinde yapıldı. Bölüm 2.4.3'deki yöntemle bu tüplerin körlerine karşı 405 nm'de absorbansları alınarak ve *p*NP standart eğri kullanılarak immobilize enzimin, enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

İmmobilize enzimin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla, 20-60 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık 5 °C artırılarak aktivite tayini yapıldı. Hazırlanan 9 tane tüpün ve onların körlerinin farklı sıcaklıklarda aktivitesini belirlemek için Bölüm 2.4.3'de belirtilen yöntemin sadece inkübasyon sıcaklıkları değiştirildi. Bu tüplerin körlerine karşı 405 nm'de absorbansları alınarak ve *p*NP standart eğri kullanılarak immobilize enzimin, enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

### **2.5.2 İmmobilize Enzimin *p*NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi**

$Fe_3O_4$  nanopartiküller üzerine immobilize edilen mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına olan ilgisi  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunarak tespit edildi. Bunun için *p*NPG substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçüldü.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. İmmobilize enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak bulundu. Bunun için grafiğin  $1/V$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max}$  değerinden  $V_{max}$  değeri ve denklemin eğimi olan  $K_M/V_{max}$  değerinden  $V_{max}$  yerine yazılarak  $K_M$  değeri hesaplandı.

### **2.5.3 İmmobilize ve Serbest Enzimin Farklı Şartlarda Saklanma Stabilitesinin Belirlenmesi**

Serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin saklanma stabilitesinin belirlenmesi için 4 °C ve 25 °C 'de 5 günde bir, ilk zaman diliminde her gün olmak kaydıyla, 30 gün boyunca enzim aktivitelerine bakıldı. Bu amaçla saflaştırılan serbest  $\beta$ -glukosidaz enziminden bir havuz oluşturularak her biri tek ölçümlük steril ependorflara alınarak yarısı 4 °C'de ve diğer yarı ise 25 °C'de saklandı. 0,1 g  $Fe_3O_4$  nanopartikül üzerine immobilize edilen enzim ve onun 0,1 g  $Fe_3O_4$  nanopartikül

içeren körü homojen hale getirilip ikiye bölündü. Biri körü ile 4 °C’de diğeri ise yine körü ile birlikte 25 °C’de saklandı.

## **2.6 İmmobilize Enzim ile Meyve Suyunun Muamelesi**

### **2.6.1 Meyve Suyu Hazırlanması ve Glikosidik Aroma Öncül Bileşiklerin Ekstraksiyonu**

Meyve suyu elde etmek amacıyla birkaç mandalina meyvesinin kabukları soyuldu ve doğrayıcı da parçalandı. Meyvenin posası ve suyu bir tülbent yardımıyla ayrıldı. Daha sonra elde edilen meyve suyu cam şişelere alınarak +4 °C saklandı.

Glikosidik aromada öncül bileşiklerin ekstraksiyonu amacıyla meyve suyu 4 °C’de 10,000 g’de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant filtre edildi. Elde edilen 200 mL meyve suyu 50 x 1 cm boyutlarındaki Amberlite XAD-2 reçine ile dolu bir kolana dakikada 3 mL akış hızıyla tatbik edildi. Meyve suyu geçirme işlemi tamamlandıktan sonra kolon 300 mL distile suyla yıkandı. Daha sonra serbest uçucuları uzaklaştırmak amacıyla kolon dakikada 2 mL akış hızıyla 300 mL (1/1) pentan/dietil eter ile yıkandı. Son olarak glikosidik bağlı fraksiyon 300 mL metanol ile elüte edildi. Metan elüat evaporatör de 35 °C’de konsantre edildi. Konsantre numune 30 mL 50 mM sodyum asetat (pH 5,5) tamponunda çözüldü. Tampon karışımı ayırma hunisinde iki kez 80 mL pentan/dietileter ile yıkanarak olması muhtemel uçucu bileşikler uzaklaştırıldı.

### **2.6.2 İmmobilize Enzim ile Glikozidik Bağlı Aroma Öncül Bileşiklerin Hidrolizi**

Bölüm 2.6.1’de açıklandığı şekilde hazırlanan 30 mL’lik glikosidik bileşiklerin bulunduğu numune, homojen halde üç eşit tüpe ayrıldı. Birinci tüpe glikosidik bileşiklerin hidrolizi amacıyla 0,1 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül üzerine immobilize edilmiş mandalina β-glukosidaz enzimi ilave edildi. Kontrol grubu olarak

İkinci tüpe 0,1 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül eklendi ve üçüncü tüpe hiçbir işlem yapılmadı. Tüpler 50 °C'de 48 saat boyunca 210 rpm'de inkübe edildi.

İnkübasyon işleminden sonra nanopartikül içeren tüplerin çeperlerine miknatis koyularak nanopartiküller kenara toplandı ve meyve suyundan ayrıldı. Nanopartilleri uzaklaştırılmış numunelerden bir miktar örnek LC-MS analizi için ayrıldı. Numuneler içindeki hidroliz sonucu ortaya çıkan serbest aromatik bileşikler üç kez 80 mL (1/1) pentan/dietil eter ile ekstrakte edildi. Ekstrakt susuz sodyum sülfat ile kurutuldu ve saf azot gazı akımı altında son konsantrasyon 1 mL olacak şekilde konsantre edildi. Elde edilen numunelere GC-MS analizi yapıldı.

### **2.6.3 GC-MS Analiz Yöntemi**

Ekstrakte edilen numuneler, 30 m uzunluğunda 0,25 mm çapında ve 0,25 µm kalınlığında silika TRB-5MS kolonunun bağlı olduğu Shimadzu Gaz kromatografisi GC-2010 Plus ile analiz edildi. Kütle spektral iyonlaşma 230 °C'ye ayarlandı Kütle spektrofotometresi elektron iyonlaşma modunda 70 eV'de çalıştırıldı. Kolondan helyumun akış hızı dakikada 1,2 mL olarak ayarlandı ve enjektör sıcaklığı 250 °C'de ve bölmesiz modda gerçekleştirildi. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 3 dakika 40 °C, dakikada 3 °C artacak şekilde 40 °C'den 160 °C'ye, 2 dakika 160 °C, dakikada 8 °C artacak şekilde 160 °C'den 220 °C'ye ve 3 dakika 220 °C olacak şekilde ayarlandı.

Numunelerin GC-MS analizinde belirlenen bileşikler Wiley229 ve Nist27 kütle spektroskopisi kütüphaneleri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

### **2.6.4 LC-MS Analiz Yöntemi**

LC-MS için ayrılan numuneler, (2,1x100 mm 2,7 µm) SB-C18 kolonunun bağlı olduğu Agilent LC-MS sistemi (single quadropole 1200 LC) ile elektrosprey iyonizasyon (Electrospray Ionisation ESI) cihazında analiz edildi. Analiz MS SIM modunda, gaz sıcaklığı 350 °C, kurutucu gaz akışı dakikada 12 L, dağıtıcı basınç 50 psi ve kapiller voltajı 3500 V olacak şekilde gerçekleştirildi. Mobil faz olarak iki ayrı

çözelti kullanıldı. Bu çözeltilerin türleri ve analiz süresinde uygulanan oranları Tablo 2.2’de verilmiştir [103].

**Tablo 2.2:** LC-MS analizinde kullanılan mobil faz oranları

<b>Zaman (dakika)</b>	<b>(% v/v) Çözelti A: <i>10 mM amonyum asetat ve % 0,2’lik formik asit</i></b>	<b>(% v/v) Çözelti B: <i>Metanol</i></b>
0	90	10
0,2	90	10
3	70	30
20	20	80
20,1	5	95
22	5	95
22,1	90	10
25	90	10

LC-MS analiz sonucu elde edilen kromatogramdaki piklerin kalitatif ve kantitatif analizi; önceden kalibrasyonu yapılan, Tablo 2.3’de gösterilen, standart bileşiklere göre yapıldı.

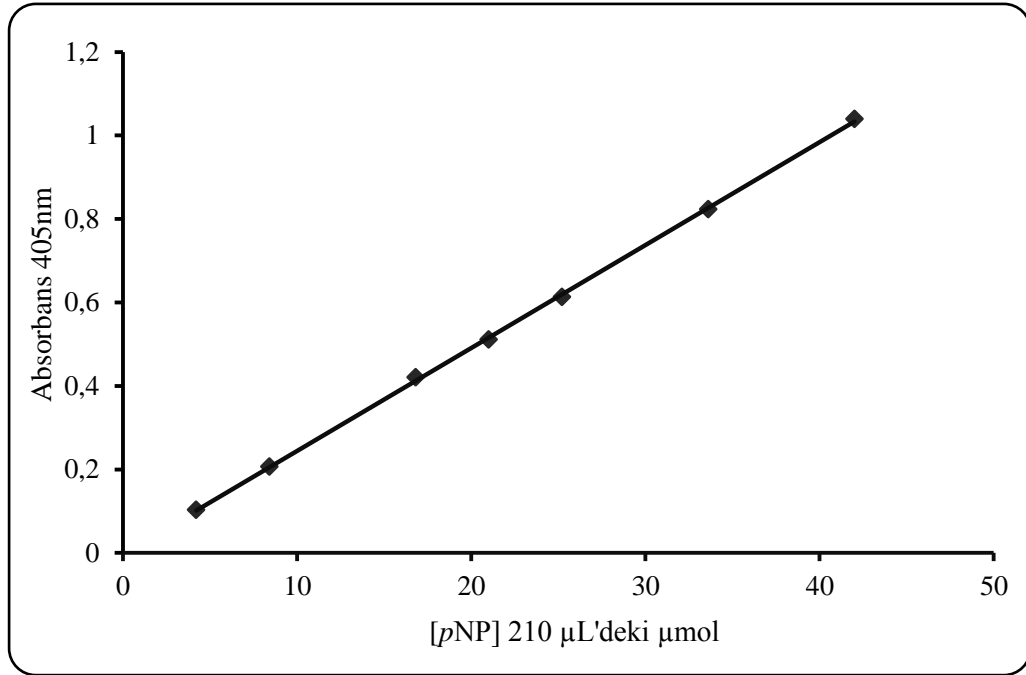
**Tablo 2.3:** LC-MS'de kalibrasyonu yapılan standart bileşikler

<b>Tutulma zamanı (RT)</b>	<b>Bileşik</b>	<b>Aralık</b>	<b>Bölge</b>
1,504	Gallik asit	1,489-1,519	128870,000
6,174	Kloragenik asit	6,112-6,236	66093,000
6,509	Kafeik asit	6,444-6,574	220480,000
8,175	<i>p</i> -Kumarik asit	8,093-8,257	14457,000
10,699	Naringin	10,300-10,806	156410,000
10,789	Rutin hidrat	10,681-10,897	119750,000
11,116	Hesperidin	11,005-11,228	33639,000
11,456	Neohesperidin	11,344-11,574	31373,000
13,531	Quercetin	13,395-13,666	335310,000

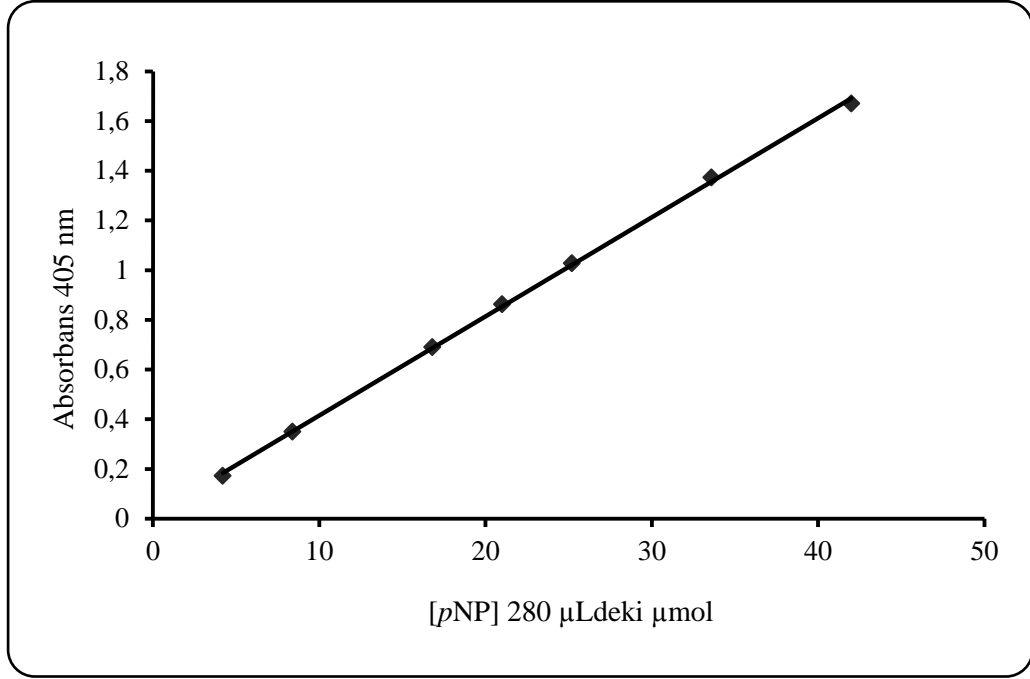
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzim Aktivite Tayini için Kullanılan Standart Eğri

Enzimin aktivite tayini,  $\beta$ -glukosidaz enzim hidrolizi ile glikopiranozide bağı olan *p*Nitrofenolün serbest kalması esası referans olarak yapıldı. Bu amaçla 210  $\mu$ L ve 280  $\mu$ L'lik son reaksiyon hacimlerinde *p*NP standart grafikleri oluşturuldu. Bu grafikleri oluşturmak için *p*Nitrofenol standart olarak kullanıldı. Standart çözeltideki  $\mu$ mol *p*Nitrofenole karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.2'de anlatılan yöntemle bulunarak Şekil 3.1 ve 3.2'deki standart grafikler çizildi.



Şekil 3.1: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210  $\mu$ L hacimli *p*NP standart grafiği



**Şekil 3.2:** Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 µL hacimli pNP standart grafiği

Şekil 3.1 ve 3.2’de verilen grafiklerdeki doğru denklemlerinden ilgili absorbansa karşılık gelen µmol pnitrofenol miktarı hesaplandı.

## 3.2 β-Glukosidaz Enziminin Saflaştırılması

### 3.2.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

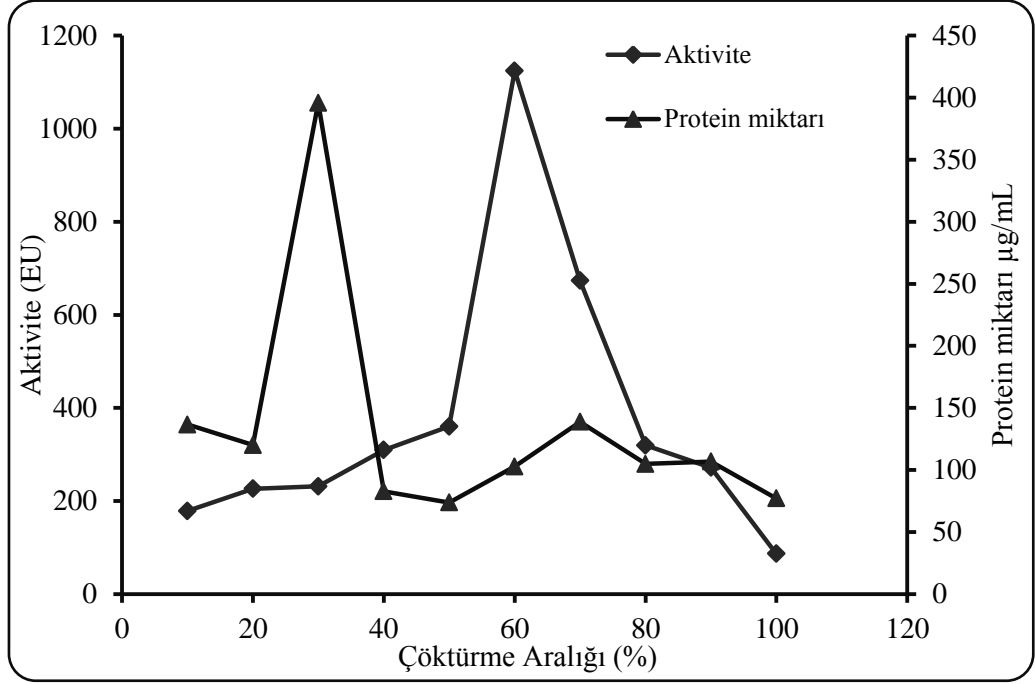
Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta Tablo 3.1’de verilen amonyum sülfat miktarları eklenerek bölüm 2.2.4.1’de açıklanan yöntem uygulandı. Bu işlemler sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1:** Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tespit edilen değerler

<b>Aralık Değeri</b>	<b>Çöktürme Aralığı (% w/v)</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Kullanılan Amonyum sülfat miktarı (g)</b>	<b>Protein Miktarı (µg/mL)</b>	<b>Aktivite (EU)</b>
1	0-10	95	4,88	136,5676	178,72
2	10-20	95	5,03	120,0811	226,42
3	20-30	95	5,18	395,6486	231,57
4	30-40	95	5,35	82,8108	309,75
5	40-50	95,5	5,56	73,7567	360,29
6	50-60	96	5,77	102,8378	1124,25
7	60-70	96	5,98	138,8108	673,44
8	70-80	96,5	6,23	104,9459	319,51
9	80-90	96,5	6,46	106,7838	271,81
10	90-100	97	6,75	77,1351	86,72

Tablo 3.1'deki değerler kullanılarak Şekil 3.5'deki amonyum sülfat çöktürme aralığı-aktivite grafiği çizildi. Çöktürme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük ancak enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmeye çalışılmıştır. Grafikten, enzimin çöktüğü tuz konsantrasyonu % 40-80 aralığı olarak tespit edilmiş ve saflaştırma işlemlerinde % 40-80 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır.





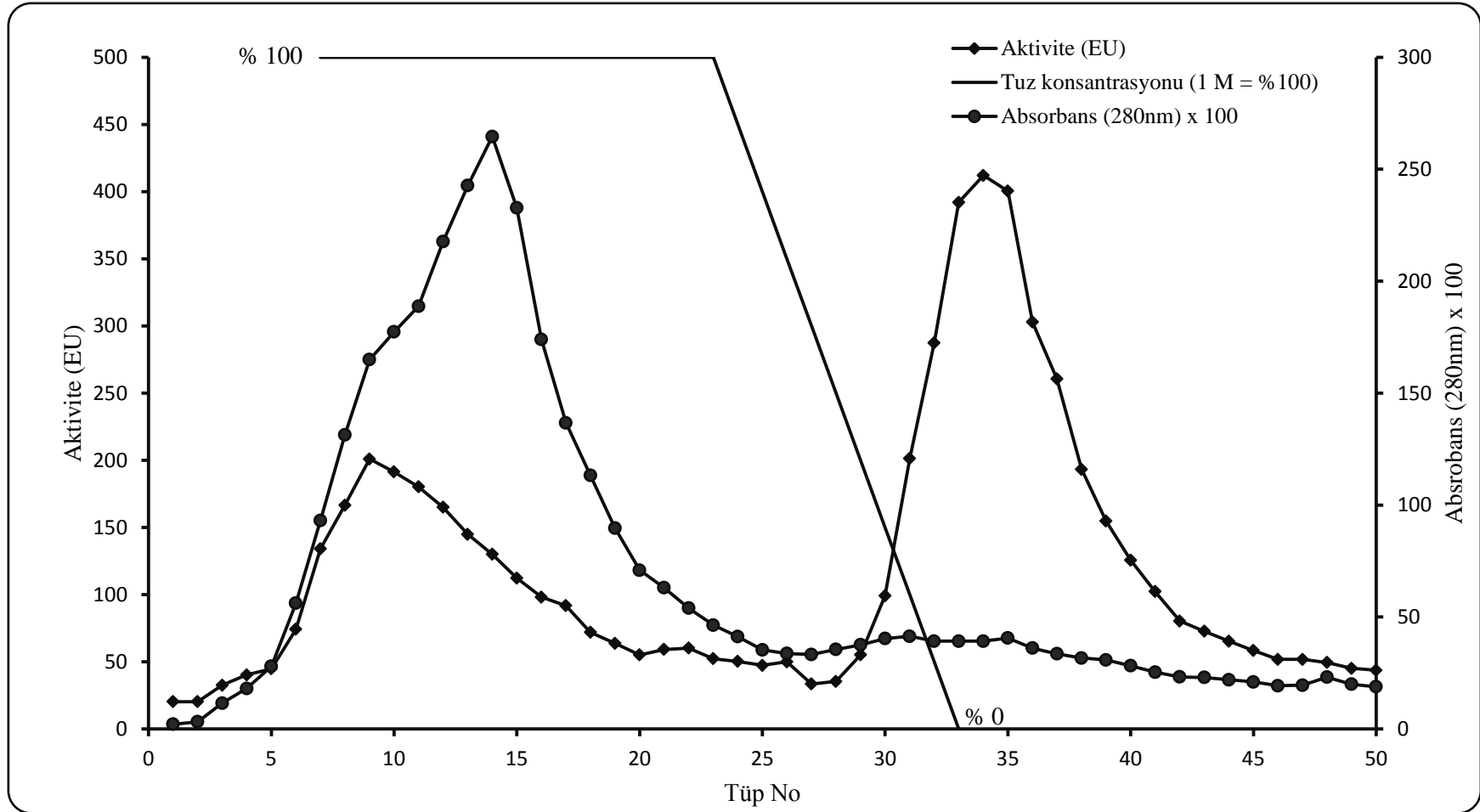
Şekil 3.3: Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik

### 3.2.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

% 40-80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen numune bölüm 2.2.4.2’de belirtildiği gibi herhangi bir diyaliz işlemine gerek kalmaksızın laboratuvarda sentezlenen hidrofobik yapıdaki sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jelini içeren kolona tatbik edildi. Kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm’dir. Kolondan alınan her bir numuneye 50 mM sodyum fosfat pH 6,8 tamponu kör kullanılarak, 280 nm’de kalitatif protein tayini yapıldı. Elüsyondaki her bir tüpün aktivite tayini kendi numunesinden oluşan köre karşı yapıldı. Şekil 3.4’de görüldüğü gibi elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiğinden yüksek aktivite gösteren tüpler belirlendi. Kolona tatbik edilen numune ve yüksek aktivite gösteren elüat için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilmiştir (Tablo3.2).

Tablo 3.2’deki saflaştırma tablosunda gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çözülen çökeleğin toplam aktivitesi 2325,0676 EU/mL ve

toplam protein miktarı 35,88 mg/mL olarak belirlenmiş ve % 175,12 verimle 15,86 kat saflaştırılmış olduğu hesaplanmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda 34. tüpteki saf enzimin % 11,38 verimle 196,23 kat saflaştırılmış olduğu belirlenmiştir. Yapılan hidrofobik etkileşim kromatografisinde 1 M ile 0 M arası amonyum sülfat gradienti uygulanmış ve elüsyonun 33. tüpünde gradient işlemi bitirilmiştir. Bu açıdan incelendiğinde enzimin 30-40. tüplerde gelmesi tuz konsantrasyonunun oldukça azaldığı değerlerde kolona tutunamadığı tespit edildi.



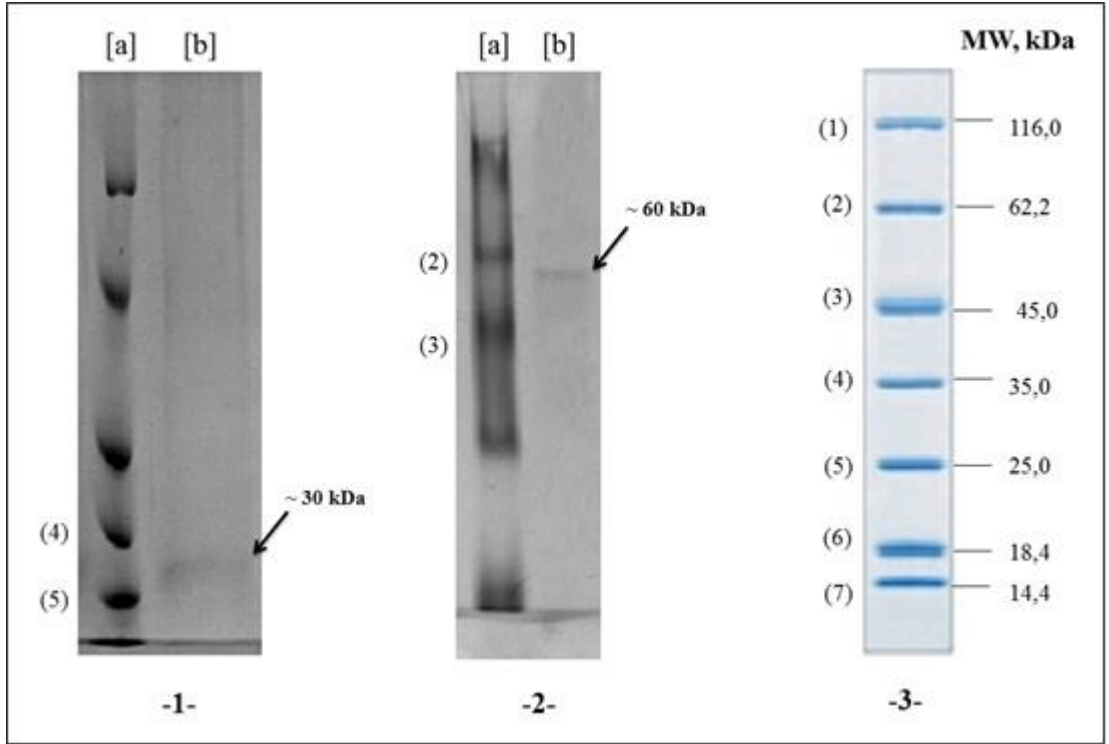
Şekil 3.4: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan mandalina  $\beta$ -glukozidaz enziminin elüsyon grafiği

**Tablo 3.2:** Saflaştırma tablosu

<b>Basamak</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Aktivite (EU/mL)</b>	<b>Toplam Aktivite (EU/mL)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/mL)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (EU/mg)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Ham ekstrakt</b>	90	147,516	13276,44	3,611	324,99	40,8518	100	
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	10	2325,0676	23250,676	3,588	35,88	648,0121	175,12	15,86
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	2	755,962	1511,924	0,0943	0,1886	8016,5641	11,38	196,23

### 3.2.3 Mandalina Beta-Glukosidaz Enziminin NATIVE/SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerin varlığını/sayısını kontrol etmek amacıyla Bölüm 2.2.4.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan NATIVE ve SDS poliakrilamid jel elektrofrezilerine, saflaştırılan enzim numuneleri uygulandı. Protein bantlarını içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5:** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan mandalina beta-glukosidaz enziminin poliakrilamid jel elektrofrezleri 1: SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi [a] protein marker bantları [b] numune bandı 2: NATIVE-poliakrilamid jel elektrofrezisi [a] protein marker bantları [b] numune bandı 3: Protein marker. Molekül ağırlık standartları; ( $\beta$ -galaktosidaz (116,0kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), yumurta albumini (45,0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), REase Bsp98I (*E.coli*) (25,0 kDa),  $\beta$ -laktoglobulin (18,4 kDa) ve Lizozim (14,4 kDa)

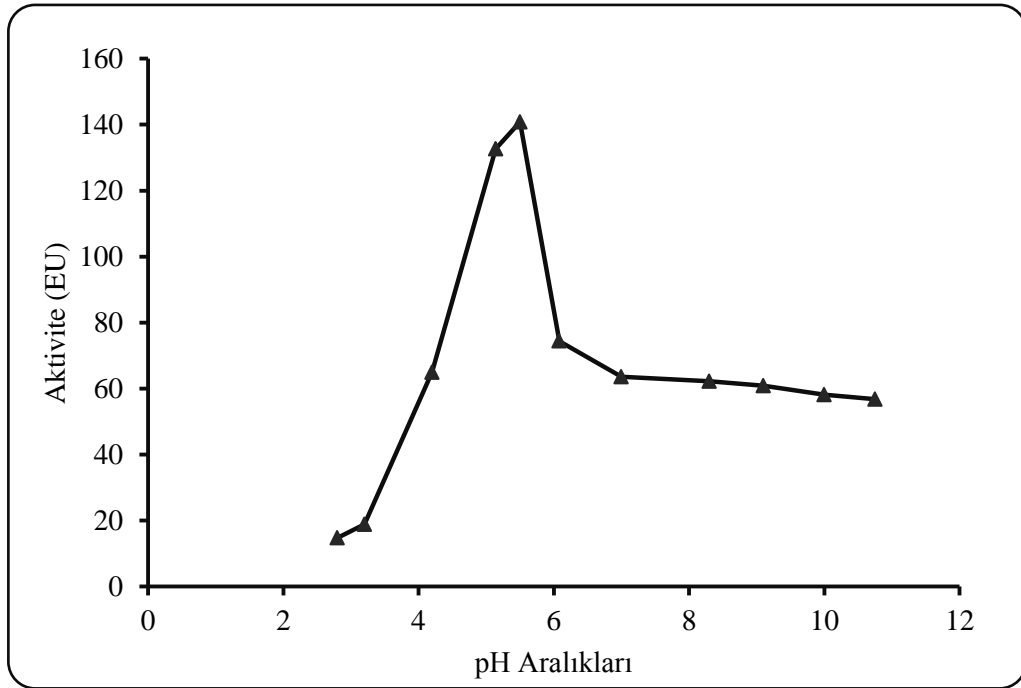
Mandalinadan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi, Şekil 3.5’deki 1. Şekil olan SDS-PAGE’de görüldüğü üzere yaklaşık 30 kDa bölgesinde tek bant verdiği 2. Şekil olan NATIVE-PAGE’de ise yaklaşık 60 kDa bölgesinde tek bant verdiği

görülmektedir. Bu verilerden, 60 kDa molekül ağırlığına sahip mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin, birbirine eşit iki alt birimden oluştuğu belirlenmiştir.

### 3.3 $\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

#### 3.3.1 Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması

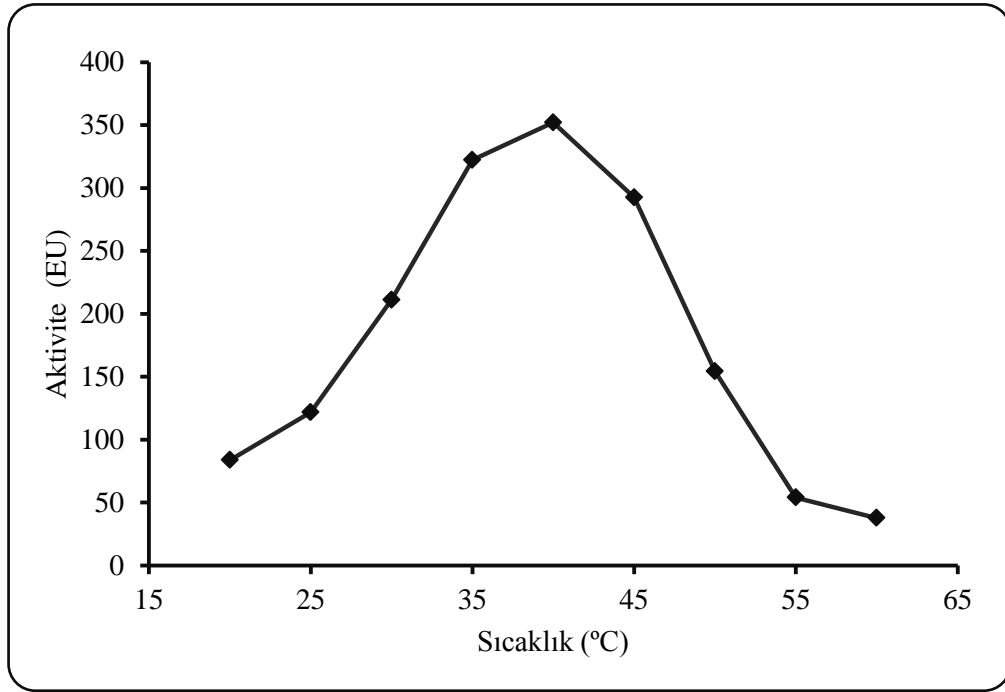
Bölüm 2.3.1’de belirtildiği şekilde, bir seri farklı pH değerlerine sahip *p*NPG substratlarının enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH değerine karşı aktivite grafiği (Şekil 3.6) çizildi. Elde edilen grafikten mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri 5,5 bulunmuştur.



Şekil 3.6: Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği

### 3.3.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması

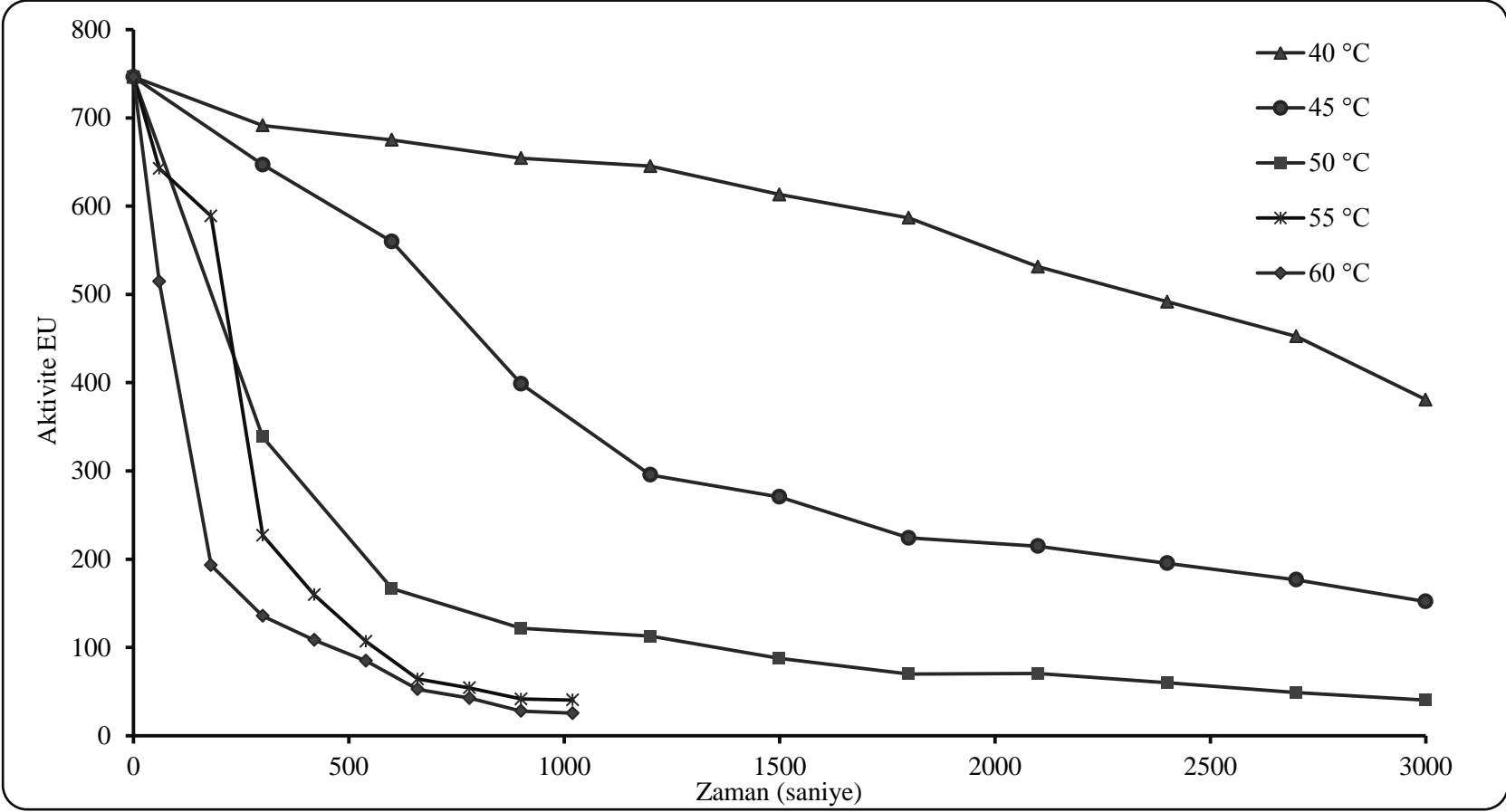
Bölüm 2.3.2’de belirtildiği şekilde saf enzim, farklı sıcaklarda inkübe edildi ve aktivitesi ölçümleri yapıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklık değerine karşı aktivite grafiği (Şekil 3.7) çizildi. Elde edilen grafikten mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 40 °C bulunmuştur.



Şekil 3.7: Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

### 3.3.3 Mandalina Beta-Glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığı

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek amacı ile enzim çözeltisine Bölüm 2.3.3’de belirtilen şekilde işlemler uygulanmış sonuç olarak ısıya belli bir süre muamele edilen stok enzim çözeltisinden alınıp, aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen değerlerden ısıl muamele süresine karşı aktivite grafiği (Şekil 3.8) çizilmiştir. Elde edilen grafikten termal inkübasyonun 3000. saniyesinde (50 dk) enzimin aktivitesini, 40 °C’de % 50, 45 °C’de % 20, 50 °C’de % 5 oranında koruduğu bulunmuştur. Ayrıca 55-60 °C’de 1020. saniyede (17 dk) inkübe edilen enzimin, aktivitesini sırasıyla % 5 ve % 3 koruduğu belirlenmiştir.

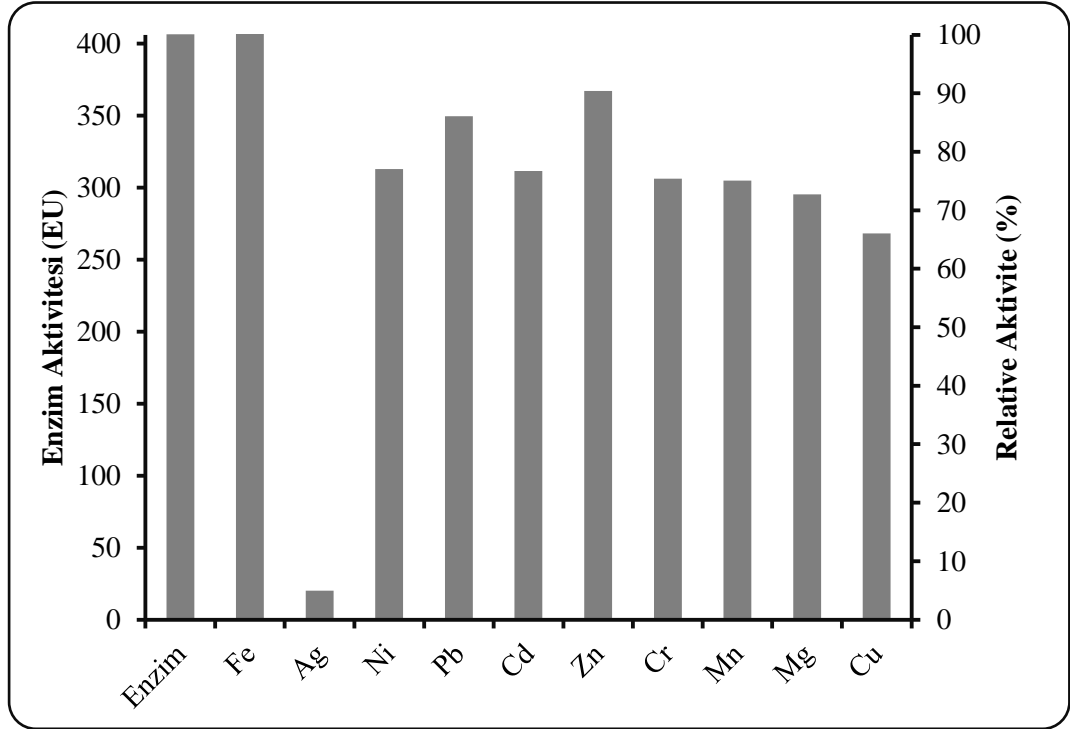


Şekil 3.8: Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği



### 3.3.4 Mandalina $\beta$ -glukosidaz Enzimi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisi

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+1}$ ,  $\text{Pb}^{+1}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+1}$ ,  $\text{Cr}^{+1}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Ag}^{+1}$  ağır metal iyonlarının etkisini Bölüm 2.3.4'de açıklanan yöntemle belirlenmiştir. Reaksiyon ortamında 1,75 mM *p*NPG ve 1 mM ağır metal bulunan örneklerin aktivite tayinleri yapılmış (Tablo 3.3) ve ağır metal içermeyen, enzim çözeltisi ile kıyaslanarak % kalan aktivite belirlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 1 mM konsantrasyonlarındaki ağır metal iyonlarının etkisi

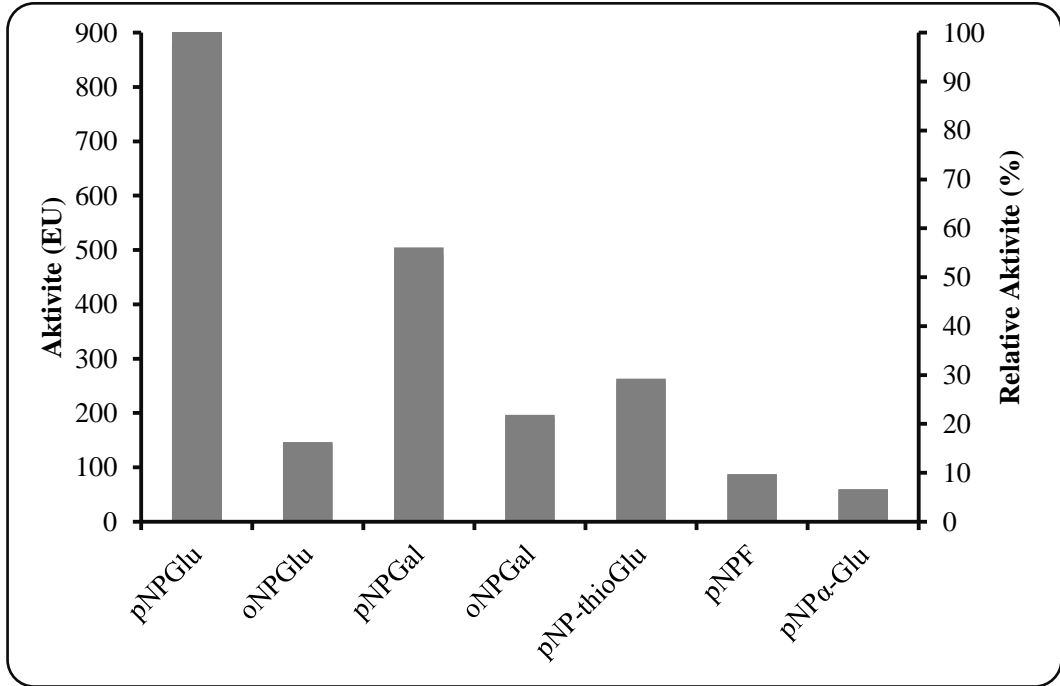
Elde edilen grafikten  $\text{Ag}^{+1}$  iyonunun enzimi güçlü şekilde inhibe ettiği,  $\text{Fe}^{+2}$  iyonunun ise enzim üzerinde aktivatör etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine, orta derecede etkili  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun inhibasyonu hariç diğer metal iyonlarının çok etkili bir inhibitör ya da aktivatör etkisi bulunmamaktadır.

**Tablo 3.3:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine ağır metallerin etkisinin belirlenmesinde kullanılan metal çeşitleri ve bu metallerin enzim aktivitesi üzerindeki sonuçları

Metal İyonu	Kullanıldığı Form (5 mM Çözeltisi)	Kuyucuktaki Metal Kons (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	Kalan Relative Aktivite (%)
-	-	1	0,299	406,369	100
Fe <sup>+2</sup>	FeCl <sub>2</sub>		0,302	410,434	101,003
Ag <sup>+1</sup>	AgNO <sub>3</sub>		0,014	20,189	4,7
Ni <sup>+1</sup>	NiNO <sub>3</sub>		0,230	312,873	76,92
Pb <sup>+1</sup>	PbNO <sub>3</sub>		0,257	349,458	85,95
Cd <sup>+2</sup>	CdCl <sub>2</sub>		0,229	311,518	76,58
Zn <sup>+1</sup>	ZnNO <sub>3</sub>		0,270	367,073	90,30
Cr <sup>+1</sup>	CrNO <sub>3</sub>		0,225	306,098	75,25
Mn <sup>+2</sup>	MnCl <sub>2</sub>		0,224	304,743	74,91
Mg <sup>+2</sup>	MgCl <sub>2</sub>		0,217	295,257	72,57
Cu <sup>+2</sup>	CuCl <sub>2</sub>		0,197	268,157	65,88

### 3.3.5 Enzimin Farklı Substratlara Karşı Spesifikliği

Mandalinadan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.3.5’de belirtilen yöntemle aktivite tayini yapıldı. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği *p*NPGlu substratına göre relative aktiviteler belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Mandalina  $\beta$ -glukosidazının farklı substratlara karşı ilgisi

Elde edilen grafikten mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktiviteyi *p*NPGlu substratına karşı gösterdiği bulundu. Bu yüzden enzimle ilgili diğer kinetik çalışmalarında *p*NPGlu substratı kullanıldı.

$\beta$ -glukosidaz enziminin diğer substratlara karşı ilgisini, sıralı şekilde relative aktivite cinsinden Tablo 3.4’de gösterilmiştir. *p*NPGlu’dan sonra ikinci en yüksek aktiviteyi *p*NPGal göstermiştir. Enzimin en düşük aktivite gösterdiği substrat *p*NPα-Glu olarak belirlenmiştir.

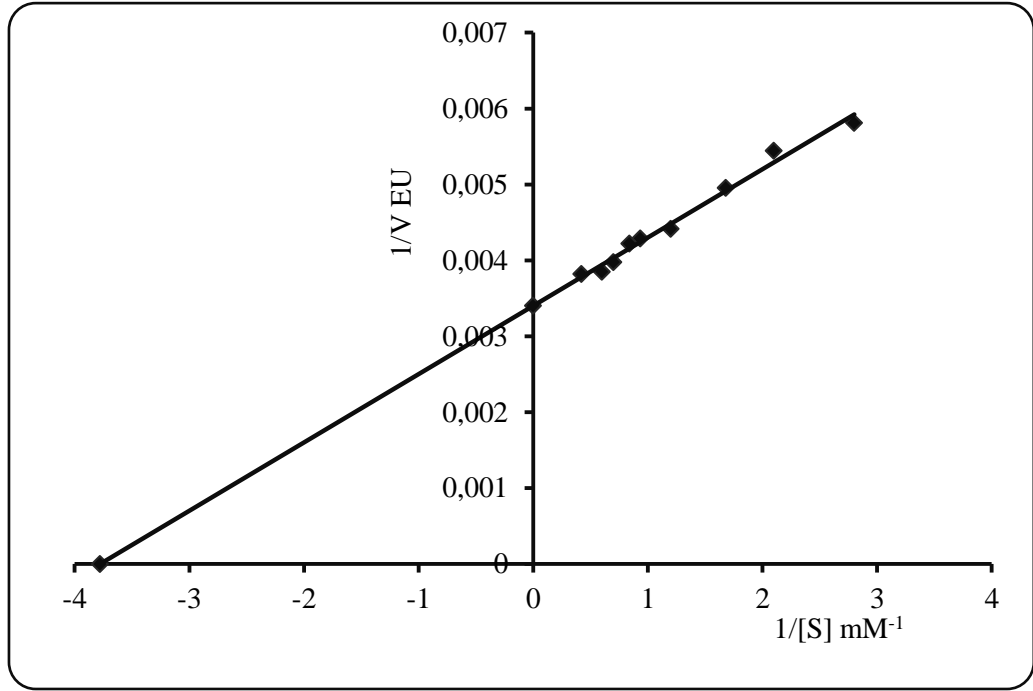
**Tablo 3.4:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı substratlara karşı ilgisinin belirlenmesinde kullanılan substrat çeşitleri, enzim aktivite ve relative aktivite değerleri

Substrat	Adı	Kuyucuktaki Substrat Kons [S] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	Relative Aktivite (%)
<i>p</i> NPGlu	p-Nitrofenol $\beta$ -D glukopiranozid	2,5	0,645	875,203	100
<i>p</i> NPGal	p-Nitrofenol $\beta$ -D galaktopiranozid		0,361	490,379	56,07
<i>p</i> NP-thioGlu	p-Nitrofenol 1-thio- $\beta$ -D glukopiranosid		0,188	255,962	29,23
<i>o</i> NPGal	o-Nitrofenol $\beta$ -D-galaktopiranozid		0,140	190,921	21,85
<i>o</i> NPGlu	o-Nitrofenol $\beta$ -D-glukopiranozid		0,104	142,141	16,31
<i>p</i> NPF	p-Nitrofenol $\beta$ -D-fukopiranozid		0,062	85,230	9,75
<i>p</i> NP $\alpha$ -Glu	p-Nitrofenol $\alpha$ - D-glukopiranozid		0,008	12,059	6,68

### 3.3.6 Farklı Substratların $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

#### 3.3.6.1 Enzimin *p*NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerleri

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla *p*NPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı  $V$  (EU/mL) olarak hesaplandı (bkz. Tablo 3.5).  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri kullanılarak Şekil 3.11'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak mandalina meyvesi  $\beta$ -glukosidaz enzimine ilişkin *p*NPG substratı için  $K_M$  değeri 0,264 mM ve  $V_{max}$  değeri 294,117 EU olarak hesaplandı.



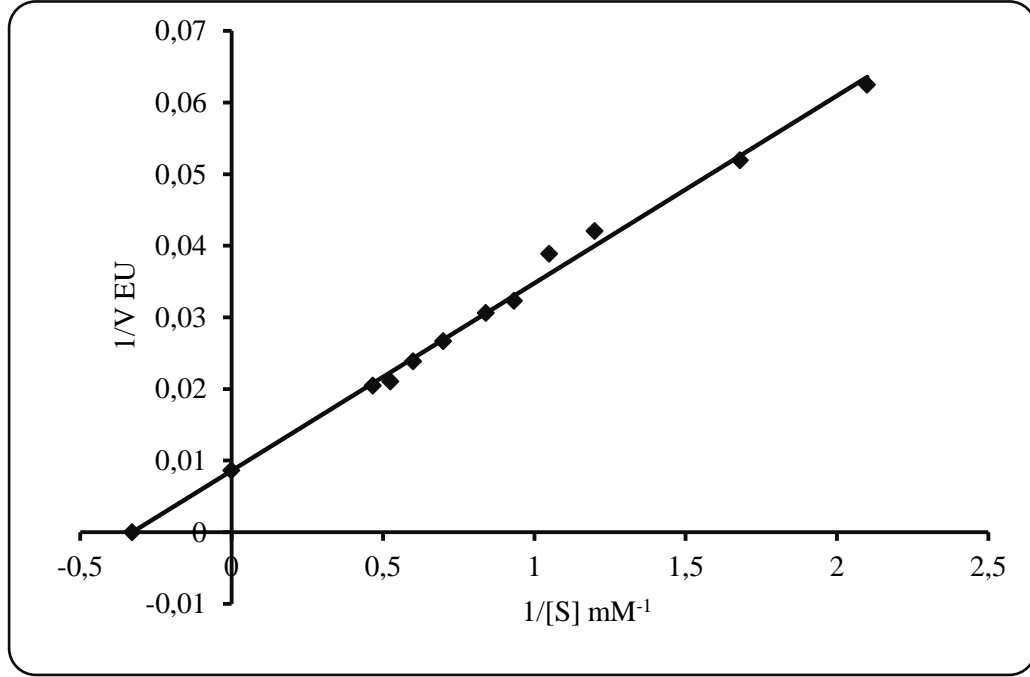
Şekil 3.11: *p*NPG Substratının  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

**Tablo 3.5:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu$ l)	Kuyucuk toplam hacim ( $\mu$ l)	Kuyucuk Substrat Kons [S] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
125	70	15	210	0,357	0,222	172,13	5,81	2,8
120		20		0,476	0,235	183,66	5,44	2,1
115		25		0,595	0,557	201,83	5,95	1,68
105		35		0,833	0,287	226,65	4,41	1,2
95		45		1,071	0,295	233,124	4,29	0,93
90		50		1,190	0,299	236,926	4,22	0,84
80		60		1,428	0,317	251,67	3,97	0,7
70		70		1,66	0,327	259,73	3,85	0,6
40		100		2,38	0,329	261,90	3,82	0,42

### 3.3.6.2 Enzimin *o*NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerleri

Enzimin *o*NPG substratına karşı,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla *o*NPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı  $V$  (EU/mL) olarak hesaplandı (bkz. Tablo 3.6).  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri kullanılarak Şekil 3.12'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak mandalina meyvesi  $\beta$ -glukozidaz enzimine ilişkin *o*NPG substratı için  $K_M$  değeri 3,04 mM ve  $V_{max}$  değeri 116,279 EU olarak hesaplandı.



Şekil 3.12: *o*NPG Substratının  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

**Tablo 3.6:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin *o*NPG substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu$ l)	Kuyucuk toplam hacim ( $\mu$ l)	Kuyucuk Substrat Kons [S] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
120	70	20	210	0,476	0,035	15,99	62,51	2,1
115		25		0,595	0,039	19,25	51,93	1,68
105		35		0,833	0,044	23,76	42,07	1,2
100		40		0,952	0,046	25,73	38,86	1,05
95		45		1,071	0,053	30,95	32,31	0,93
90		50		1,19	0,055	32,66	30,60	0,84
80		60		1,428	0,061	37,51	26,66	0,7
70		70		1,666	0,066	43,93	23,84	0,6
60		80		1,904	0,073	47,53	21,04	0,52
50		90		2,142	0,074	48,87	20,46	0,46



**Tablo 3.7:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı substratlara karşı  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max} / K_M$  değerleri

Substrat	$V_{max}$ (EU)	$K_M$ (mM)	$V_{max} / K_M$
<i>p</i> NPG	294,117	0,264	1114,07
<i>o</i> NPG	116,279	3,04	38,24

### 3.3.7 $\beta$ -glukosidazların Genel İnhibitörlerinin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi

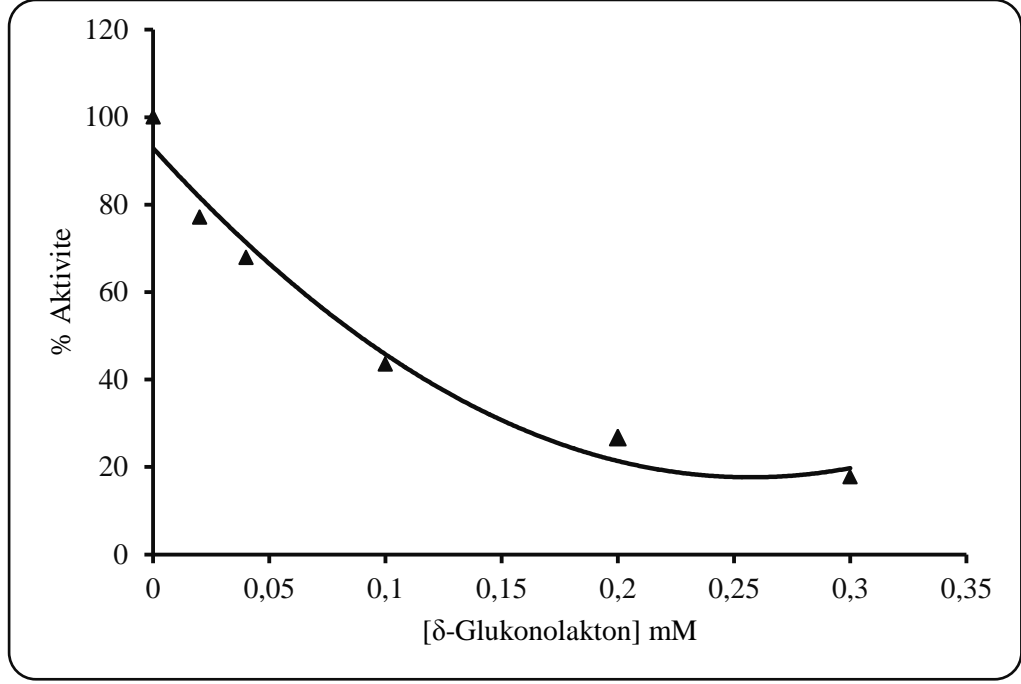
$\beta$ -glukosidaz enzimlerinin literatürde en sık yer alan inhibitörlerinin glukoz ve  $\delta$ -glukonolakton olduğu görülmektedir [105]. Bu sebeple bu iki maddenin mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

#### 3.3.7.1 $\beta$ -Glukosidazların Genel İnhibitörü Olan $\delta$ -Glukonolaktonun $IC_{50}$ Değerinin Belirlenmesi

$\delta$ -glukonolaktonun mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanıldı.  $\delta$ -glukonolakton bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı.  $IC_{50}$  değeri belirlenirken % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan  $\delta$ -glukonolaktonun 0,02-0,3 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki veriler Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.8:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren  $\delta$ -glukonolaktonun  $IC_{50}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi ( $\mu$ l)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
60	$\delta$ - glukonolakton	70	70	-	-	0,378	302,339	100
40				20	0,02	0,2919	230,409	77,0
20				40	0,04	0,256	200,418	67,90
40				20	0,1	0,164	123,559	43,49
20				40	0,2	0,101	70,92	26,74
-				60	0,3	0,067	42,52	17,69



**Şekil 3.13:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 1,75 mM *p*NPG substratı konsantrasyonunda  $\delta$ -glukonolaktonun % aktivite-[I] grafiği

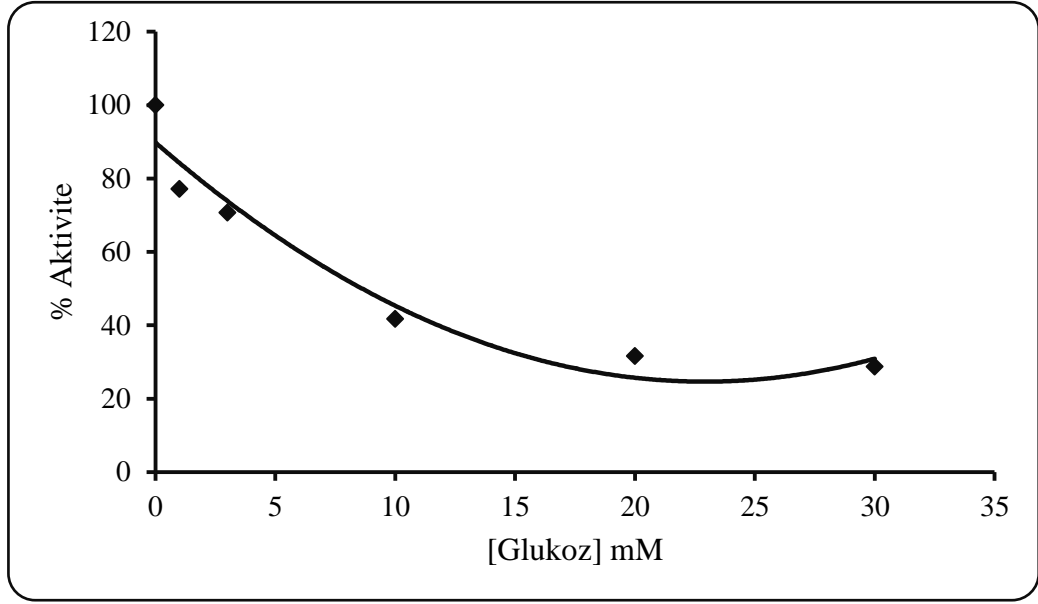
Tablo 3.8'deki veriler kullanılarak  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.13'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolaktonun  $IC_{50}$  değeri, 0,088 mM olarak hesaplanmıştır.

### 3.3.7.2 $\beta$ -Glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Glukozun $IC_{50}$ Değerinin Belirlenmesi

Glukozun mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanıldı. Glukoz bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. Glukozun  $IC_{50}$  değeri belirlenirken, % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan glukozun 1-30 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki veriler Tablo 3.9'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.9:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren glukozun  $IC_{50}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu$ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
60	Glukoz	70	70	-	-	0,378	302,339	100
40				20	1	0,292	230,493	77,13
20				40	2	0,267	209,607	70,69
40				20	10	0,158	118,546	41,77
20				40	20	0,119	85,964	31,58
-				60	30	0,108	76,775	28,72



**Şekil 3.14:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 1,75 mM *p*NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği

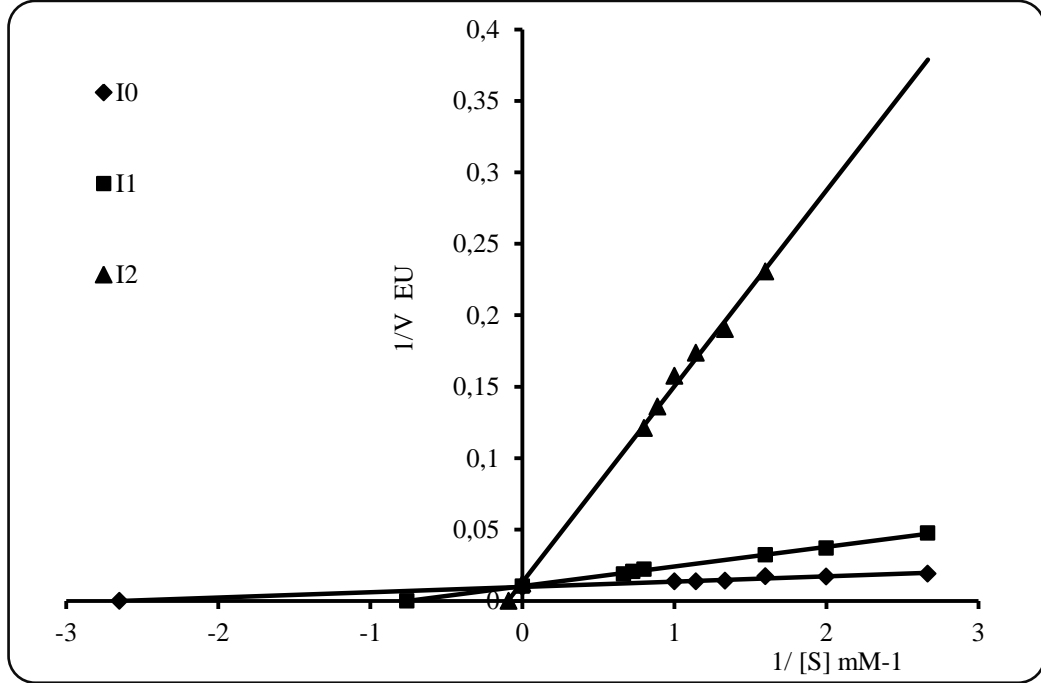
Tablo 3.8'deki veriler kullanılarak glukozun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.14'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun  $IC_{50}$  değeri, 8,619 mM olarak hesaplanmıştır.

### 3.3.8 $\beta$ -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Maddelerin İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi

#### 3.3.8.1 $\beta$ -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan $\delta$ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi

$\delta$ -glukonolaktonun  $K_i$  sabitinin bulunması amacıyla, önce reaksiyon ortamında inhibitör olmadan 6 farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra 0,02 mM ve 1 mM sabit  $\delta$ -glukonolakton konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi (Tablo 3.10). Belirlenen bu değerlerden  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak, Lineweaver–Burk grafiğinde  $I_1$ ,  $I_2$  doğruları

izildi. Bu grafikten yararlanarak  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi.  $K_i$  değerleri bölüm 2.3.8’de anlatıldığı gibi hesaplandı.



**Şekil 3.15:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında,  $\delta$ -glukonolakton inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

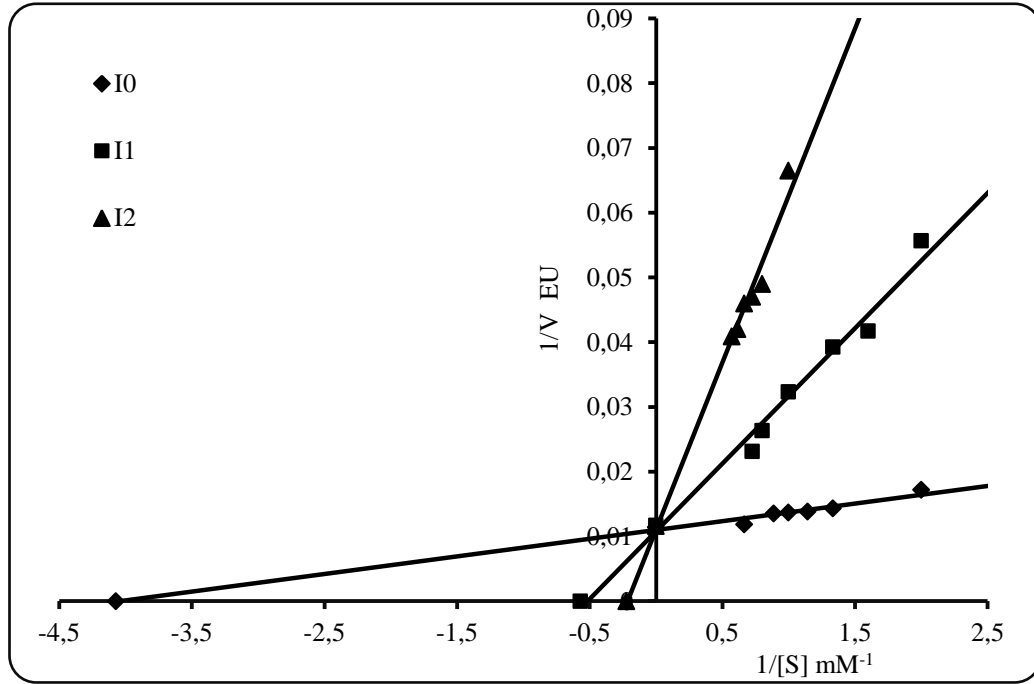
Şekil 3.15.’deki Lineweaver-Burk grafiğinden,  $\delta$ -glukonolakton, *p*NPG substratı varlığında mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.  $\delta$ -glukonolaktonun  $[I_1]= 0,02$  mM ve  $[I_2]= 1$  mM olarak iki farklı konsantrasyondaki aktiviter kullanılarak zilen grafikten  $K_i$  değeri  $0,0175\pm 0,01$  olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 3.10:** Mandalina beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolaktonun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisi Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltisi hacmi ( $\mu$ l)	İnhibitör Çözeltisi Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	1/V	1/[S]
115	70	15	0	200	0,375	0	0,0785	52,130	0,0191	2,6
110		20			0,5		0,0856	58,061	0,0172	2
105		25			0,625		0,0860	58,395	0,0173	1,6
100		30			0,750		0,0996	69,759	0,0143	1,3
95		35			0,875		0,1026	72,264	0,0138	1,14
90		40			1		0,1036	73,099	0,0136	1
95		15			20		0,375	0,02	0,0412	21,052
90		20	0,5			0,0484	27,012		0,0370	2
85		25	0,625			0,0530	30,864		0,0324	1,6
60		50	1,125			0,0700	45,045		0,0222	0,8
55		55	1,375			0,0741	48,543		0,0206	0,72
50		60	1,5			0,0795	53,131		0,0188	0,66
85		25	20			0,625	1		0,0068	4,335
80		30			0,750	0,0079		5,2548	0,190	1,33
75		35			0,875	0,0085		5,7560	0,1737	1,14
70		40			1	0,0092		6,3408	0,1577	1
65		45			1,125	0,0104		7,3433	0,1361	0,88
60		50			1,25	0,0115		8,2623	0,121	0,8

### 3.3.8.2 $\beta$ -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Glukozun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerinin Belirlenmesi

Glukozun  $K_i$  sabitinin bulunması amacıyla, önce reaksiyon ortamında inhibitör olmadan 6 farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra 2 mM ve 10 mM sabit glukoz konsantrasyonlarında aktiviteler Tablo 3.11’de gösterildiği gibi elde edildi. Belirlenen bu değerlerden  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak, Şekil 3.16’daki Lineweaver-Burk grafiğindeki  $I_1$ ,  $I_2$  doğruları çizildi. Bu grafikten yararlanarak  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi.



Şekil 3.16: Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında, glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.16.’deki Lineweaver-Burk grafiğinden, glukozun mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimini, *p*NPG substratı varlığında, kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Glukozun  $[I_1]= 2$  mM ve  $[I_2]= 10$  mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten  $K_i$  değerinin  $1,89\pm 1,28$  olduğu hesaplanmıştır.



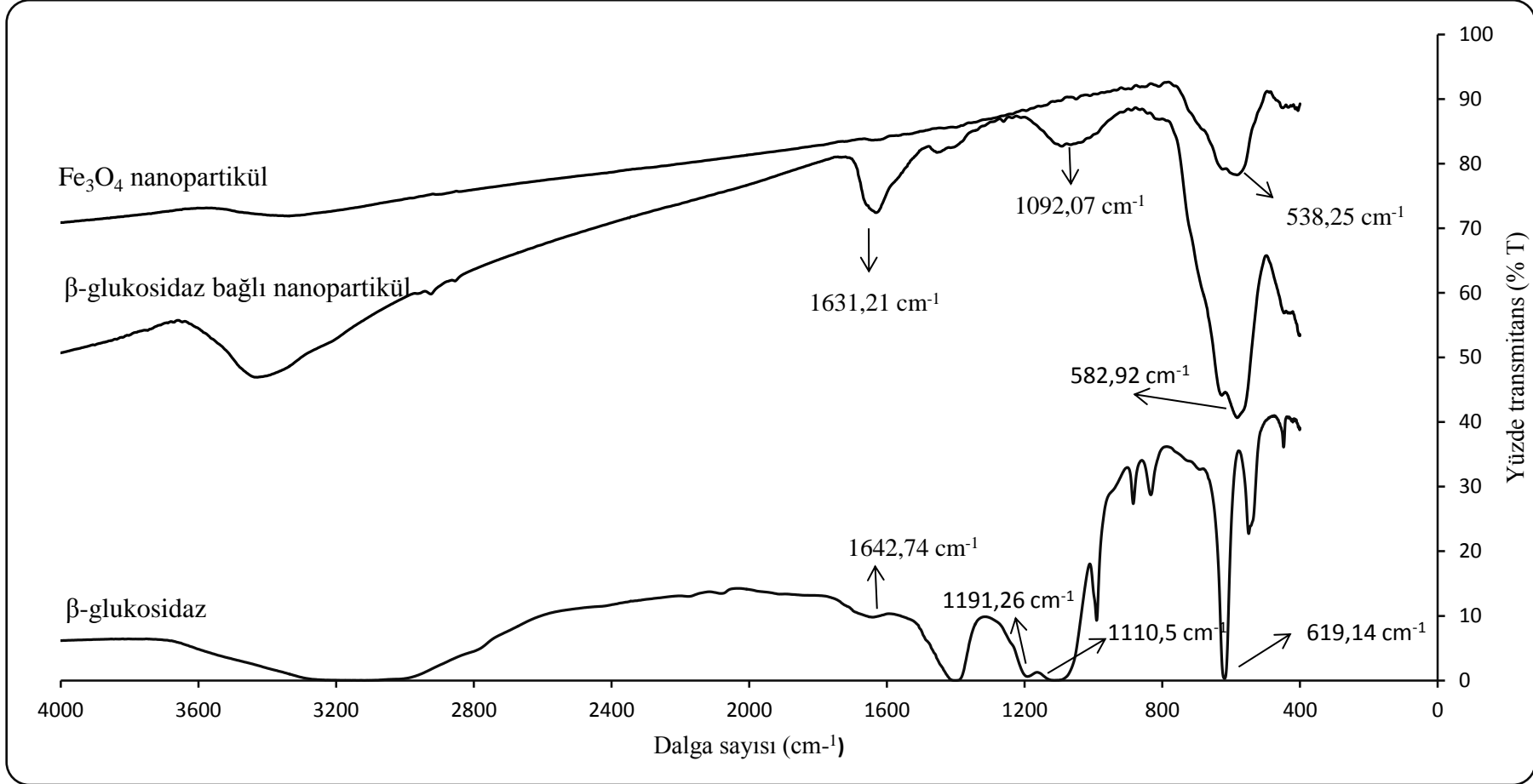
**Tablo 3.11:** Mandalina beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisi Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltisi hacmi ( $\mu$ l)	İnhibitör Çözeltisi Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	1/V	1/[S]
110	70	20	0	200	0,5	0	0,085	58,072	0,01722	2,
100		30			0,75		0,099	69,783	0,01433	1,33
95		35			0,875		0,102	72,264	0,013838	1,142
90		40			1		0,103	73,099	0,01368	1
85		45			1,125		0,104	73,937	0,013525	0,88
70		60			1,50		0,116	84,210	0,011875	0,666
70		20			40		0,5	2	0,037	17,961
65		25	0,625			0,044	23,976		0,041707	1,6
60		30	0,75			0,046	25,480		0,039246	1,33
50		40	1			0,053	30,910		0,032351	1
40		50	1,25			0,061	37,927		0,026366	0,8
35		55	1,375			0,067	43,190		0,023153	0,727
70		40	20			1	10		0,034	15,060
60		50			1,25	0,040		20,40	0,049	0,8
55		55			1,375	0,041		21,27	0,047	0,727
50		60			1,5	0,042		21,73	0,046	0,66
45		65			1,625	0,044		23,80	0,042	0,615
40		70			1,75	0,046		25	0,040	0,571

### 3.4 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

#### 3.4.1 Enzim İmmobilizasyonunun FT-IR Analizi

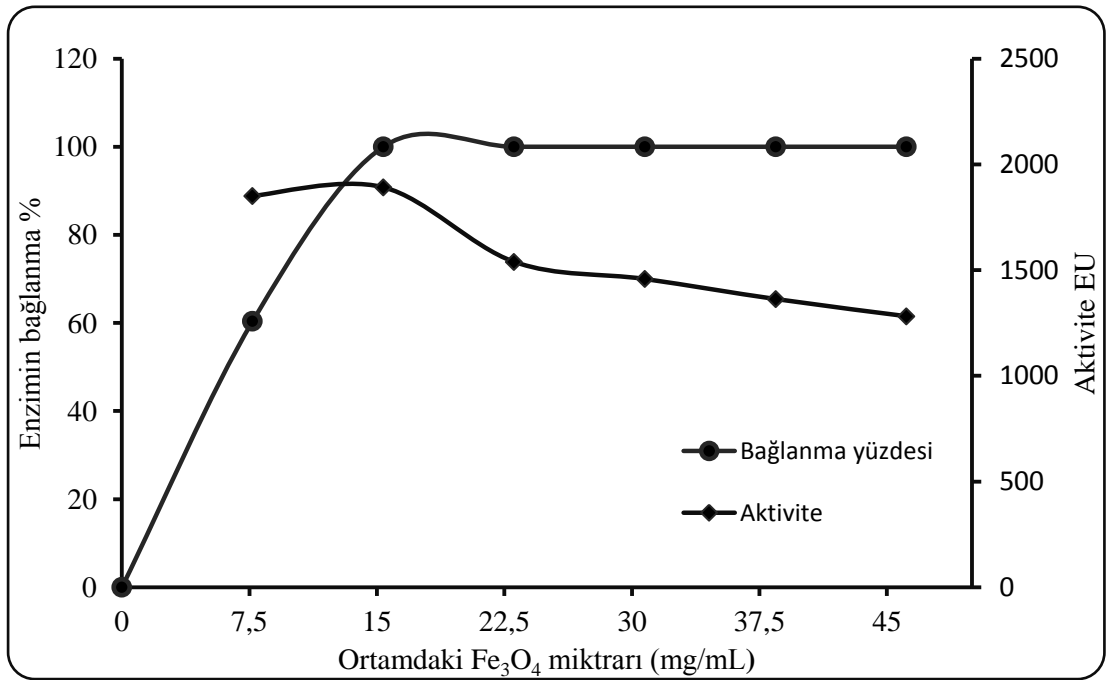
Şekil 3.17’de saf  $\beta$ -glukozidaz enzimi,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartikülü ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartikülüne immobilize edilmiş  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait üç FT-IR grafiği görülmektedir.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartikülüne ait frekans piki  $538,25 \text{ cm}^{-1}$  de tespit edilmiştir. Saf  $\beta$ -glukozidaz enzime ait  $619,14 \text{ cm}^{-1}$  frekansında görülen derin pik protein yapısına özgü sekonder amid grubunu göstermektedir.  $1200 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1000 \text{ cm}^{-1}$  enzimin yapısındaki CN ve NH titreşiminin ortaya koyduğu pirimer amin grubunu yansıtmaktadır. Ayrıca  $1600 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1700 \text{ cm}^{-1}$  frekanslarındaki pikler peptid bağının neden olduğu karakteristik  $\alpha$ -heliks yapısını ortaya koymaktadır [106].  $\beta$ -glukozidaz bağlı nanopartikülde  $582,92 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1092,07 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1631,21 \text{ cm}^{-1}$  frekanslarında çeşitli fonksiyonel gruplara ait pikler gözlenmiştir. Enzim bağlı nanopartikül grafiğinde, saf enzimde de görülen karakteristik piklerin olması,  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartikül yüzeyine immobilize olduğu kanıtlamaktadır.



**Şekil 3.17:** İmmobilizasyon destek materyali Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül, bağlanan saf β-glukosidaz enzimi ve β-glukosidaz bağlı nanopartikülün FT-IR spektrumları

### 3.4.2 Enzimin Nanopartiküllere Optimum Bağlanma Kapasitesi

Enzimin ortamda bulunan nanopartiküllere optimum bağlanma yüzdesi Bölüm 2.4.4'de belirtilen yöntemle belirlendi.  $\beta$ -Glukosidazın mL'sinde 294,59  $\mu\text{g}$  protein içeren stok çözeltisi kullanılarak yapılan deneylerin sonuçları Tablo 3.12'de verilmiştir. Tablo 3.12'deki veriler kullanılarak Şekil 3.18'deki nanopartikül miktarının,  $\beta$ -glukosidaz enziminin bağlanma yüzdesi ve aktivitesi ile olan ilişkinin gösterildiği grafik çizildi.



Şekil 3.18: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül miktarının enzimin bağlanma yüzdesi ve aktivitesine etkisi

Elde edilen verilerden 67,982  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -glukosidaz enziminin bulunduğu reaksiyon ortamında 7,69 mg/mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül tarafından enzimin % 60,4'ün bağlandığı bulundu. Nanopartikül miktarı ikiden altı kata kadar arttırıldığında ise enzimin bağlanma oranının %100'e ulaştığı ve sabit kaldığı bulundu. Aynı miktarda enzimle immobilize edilmiş değişen oranlarda nanopartikül içeren tüplerin enzim aktivite tayinleri yapıldı. Özellikle % 100 verimle bağlanan tüpler incelendiğinde Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül miktarı arttıkça enzim aktivitesinde düşme gözlemlendi.

**Tablo 3.12:** Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi immobilizasyonuna nanopartikül miktarının etkisinin belirlenmesinde kullanılan nanopartikül, buna karşılık gelen proteinlerin bağlanma yüzdeleri ve immobilize olan enzimin aktivite sonuçları

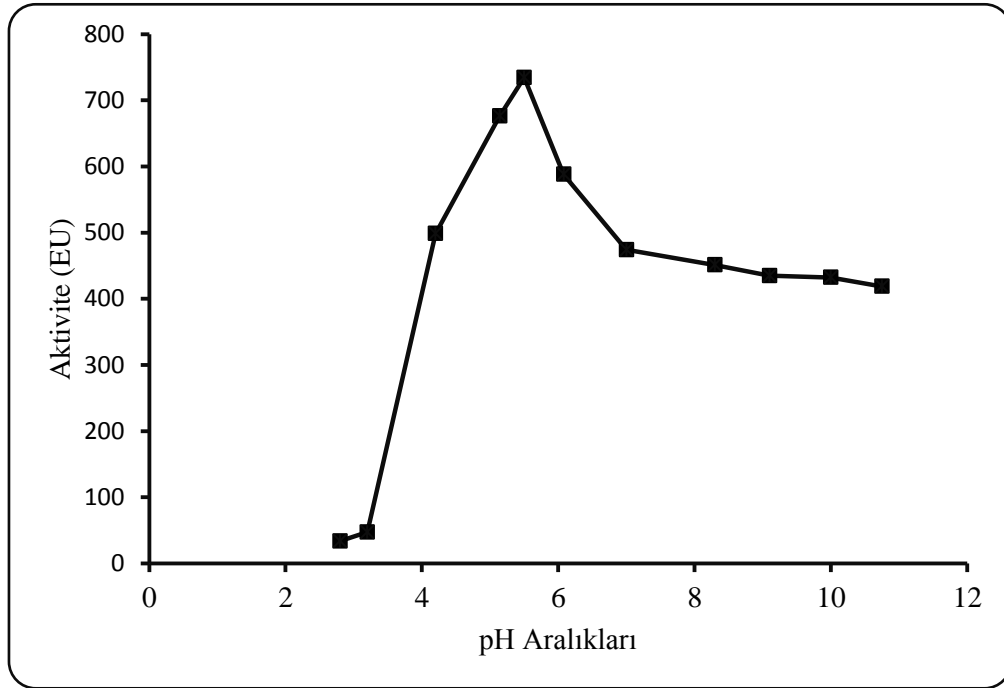
<b>Nanopartikül Miktarı (mg)</b>	<b>Ortamdaki Nanopartikül Miktarı (mg/mL)</b>	<b>294,59<math>\mu</math>g/mL Protein içeren Enzimden Kullanılan Hacim (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Ortamdaki Protein miktarı (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Yıkama Sularındaki Protein Miktarı</b>	<b>Enzimin Bağlanma Oranı (%)</b>	<b><math>\Delta</math>A (405 nm)</b>	<b>Aktivite (U/ml dak)</b>
25	7,69	750	67,982	26,925	%60,4	1,44	1850,813
50	15,38			-	%100	1,47	1891,463
75	23,07			-		1,21	1539,16
100	30,76			-		1,15	1457,859
125	38,46			-		1,08	1363,008
150	46,15			-		1,02	1281,707

### 3.5 İmmobilize $\beta$ -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin Süperparamanyetik  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllere immobilizasyonunun, enzim üzerine etkileri araştırılmıştır.

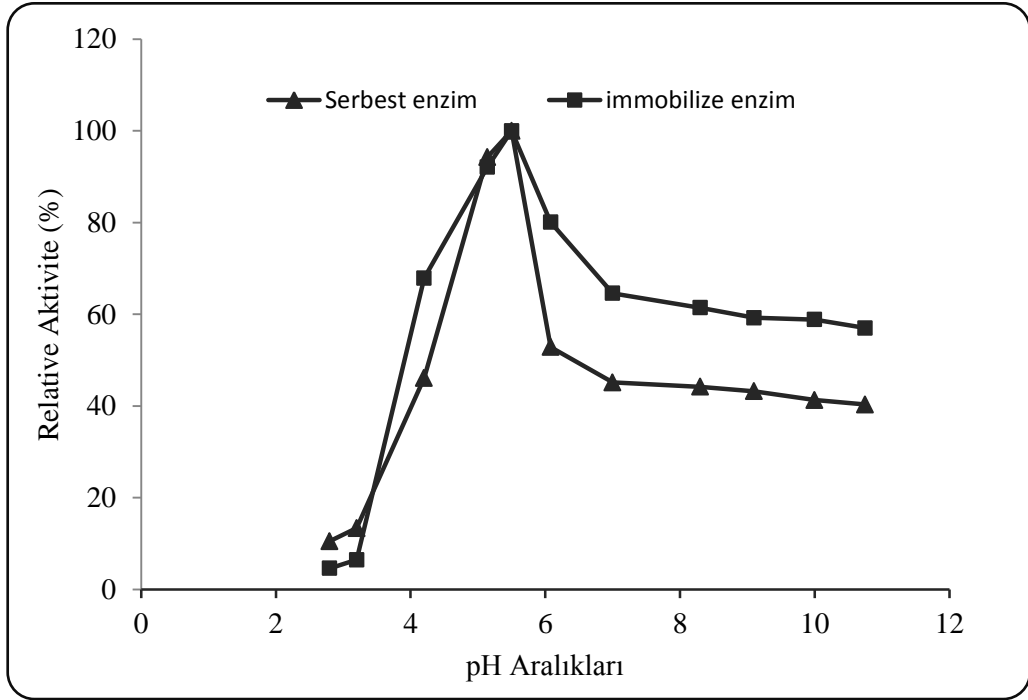
#### 3.5.1 İmmobilize Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması

Bölüm 2.5.1 de belirtildiği şekilde, bir seri farklı pH değerlerine sahip *p*NPG substratlarının enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH değerine karşı aktivite grafiği (Şekil 3.19) çizildi. Elde edilen grafikten Süperparamanyetik  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllere immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri 5,5 bulunmuştur.



Şekil 3.19: İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği

Şekil 3.6'daki serbest ve şekil 3.19'daki immobilize mandalina  $\beta$ -glukozidaz enziminin farklı pH'lardaki enzim aktivitelerini kıyaslamak amacıyla, serbest ve immobilize enzimin en yüksek enzim aktiviteleri %100 kabul edildi ve grafikler pH aralığı-relative aktivite olacak şekilde yeniden düzenlendi (Şekil 3.20)

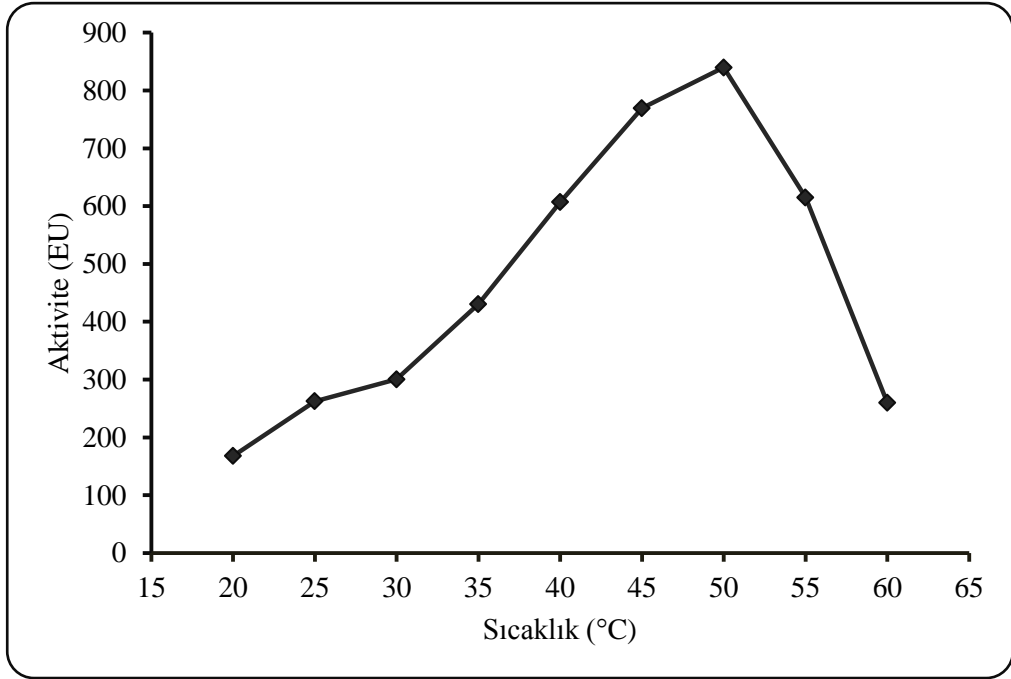


Şekil 3.20: Serbest ve immobilize mandalina  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH grafiği

Elde edilen grafikten serbest ve immobilize mandalina  $\beta$ -glukozidaz enziminin her ikisinde optimum pH değerinin 5,5 olduğu bulundu. Yani immobilizasyon işleminin enzim optimum pH değerini değiştirmedir. Grafikten elde edilen verilere göre; Serbest  $\beta$ -glukozidaz enziminin pH 4-6 aralığındaki düşüş daha keskin olmasına rağmen immobilize  $\beta$ -glukozidaz enziminin bu aralıkta daha stabil ve yüksek aktiviteli olduğu görülmektedir. Ortamın pH değeri arttıkça immobilize enzim serbest enzime nazaran bu stabilite ve yüksek aktiviteyi koruduğu görüldü. Yani immobilizasyon işlemi  $\beta$ -glukozidaz enzimini pH değişimlerine daha stabil ve yüksek aktiviteli hale getirdi.

### 3.5.2 İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması

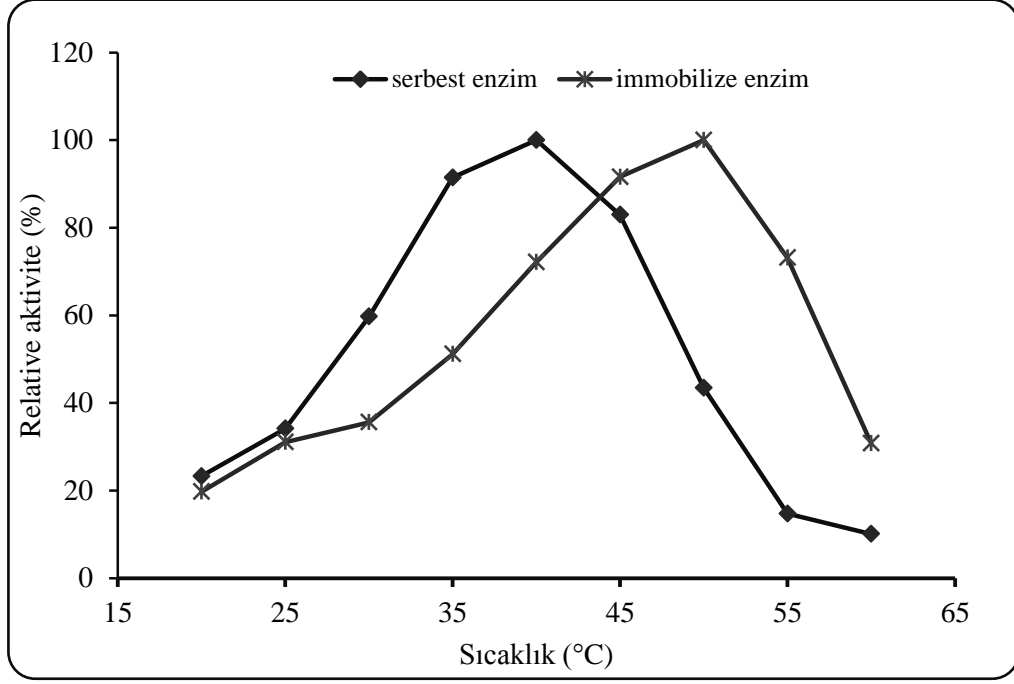
Bölüm 2.5.1’de belirtilen yöntemle immobilize enzim, farklı sıcaklarda inkübe edildi ve aktivitesi hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklık değerine karşı aktivite grafiği (Şekil 3.21) çizildi. Elde edilen grafikten immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 50 °C bulunmuştur.



Şekil 3.21: İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

Şekil 3.7’deki serbest ve şekil 3.21’deki immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin, farklı sıcaklıklardaki enzim aktivitelerini kıyaslamak amacıyla, serbest ve immobilize enzimin en yüksek enzim aktiviteleri %100 kabul edildi ve grafikler sıcaklık aralığı-relative aktivite olacak şekilde yeniden düzenlendi (Şekil 3.22)





**Şekil 3.22:** Serbest ve immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

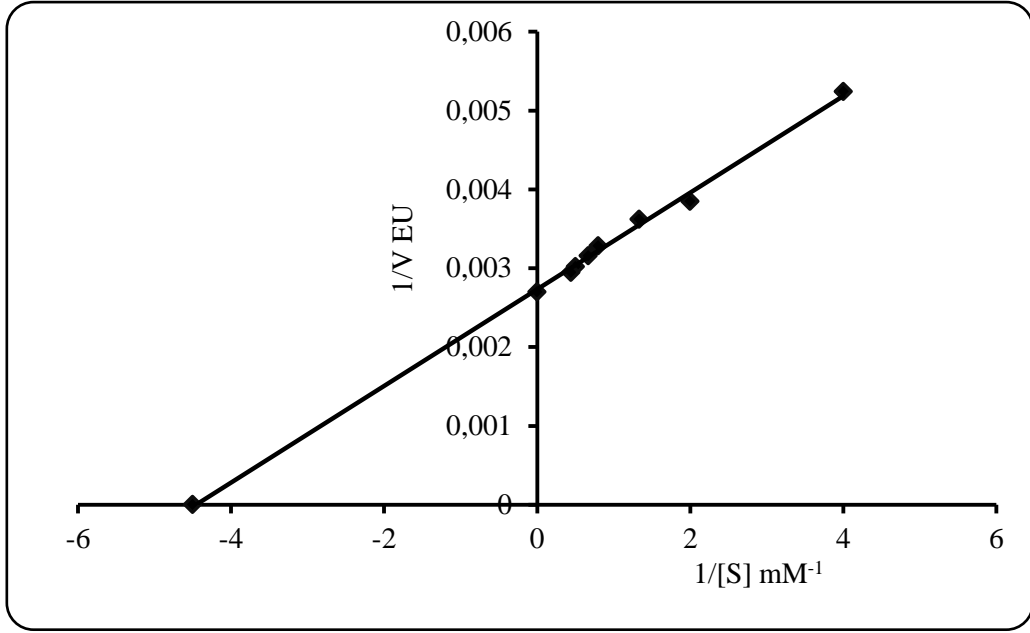
Elde edilen grafikten serbest mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 40 °C, immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi için optimum sıcaklık değerinin 50 °C olduğu bulundu. İmmobilizasyon işlemi, serbest mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin, 40 °C olan optimum sıcaklığını 10°C arttırarak 50 °C'ye çıkarmış ve sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmıştır.

### 3.5.3 İmmobilize $\beta$ -Glukosidaz Enziminin *p*NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değeri

İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla *p*NPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı  $V$  (EU/mL) olarak hesaplandı (bkz. Tablo 3.13).  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri kullanılarak Şekil 3.23'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimine ilişkin *p*NPG substratı için  $K_M$  değeri 0,222 mM,  $V_{max}$  değeri 370,97 EU ve  $V_{max} / K_M$  1666,66 olarak hesaplandı.

**Tablo 3.13:** İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

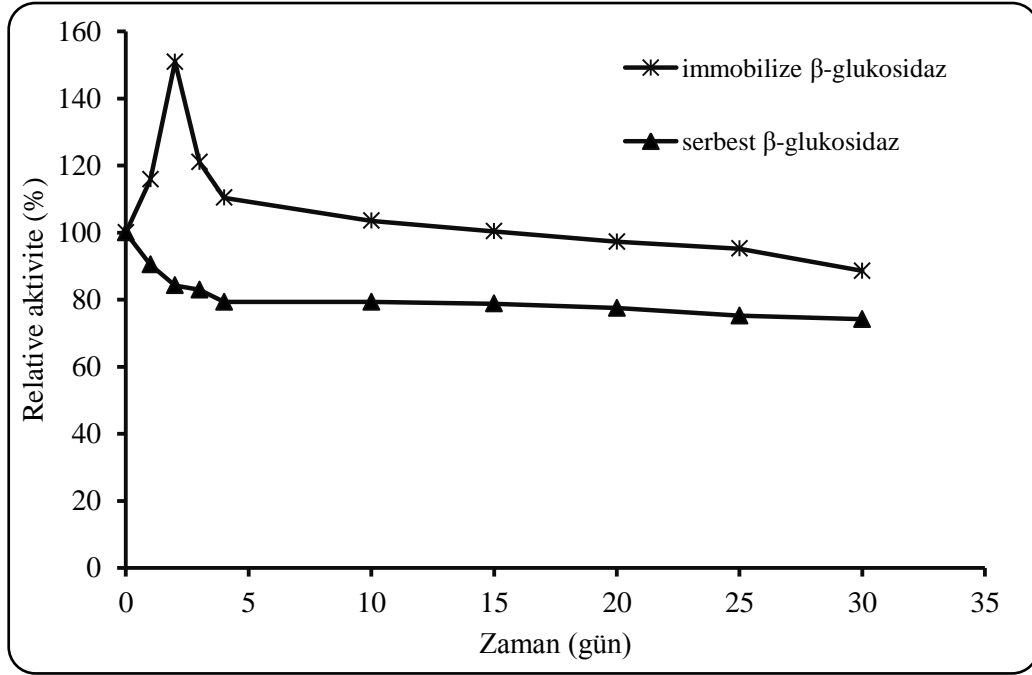
50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzimle immobilize nanopartikül miktarı (mg)	2,5 Mm'lık Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu$ l)	Tüpteki toplam hacim ( $\mu$ l)	Tüp Subs. Kons. [S] (mM)	$\Delta A$ (405 nm)	Aktivite (EU/mL)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
900	0,010	100	1000	0,25	0,093	190,85	5,24	4
800		200		0,50	0,127	259,95	3,84	2
700		300		0,75	0,135	276,21	3,62	1,33
500		500		1,25	0,149	304,67	3,28	0,8
400		600		1,5	0,155	316,86	3,15	0,66
200		800		2	0,162	331,09	3,02	0,5
100		900		2,25	0,166	339,22	2,84	0,44
-		1000		2,5	0,174	355,48	2,81	0,4



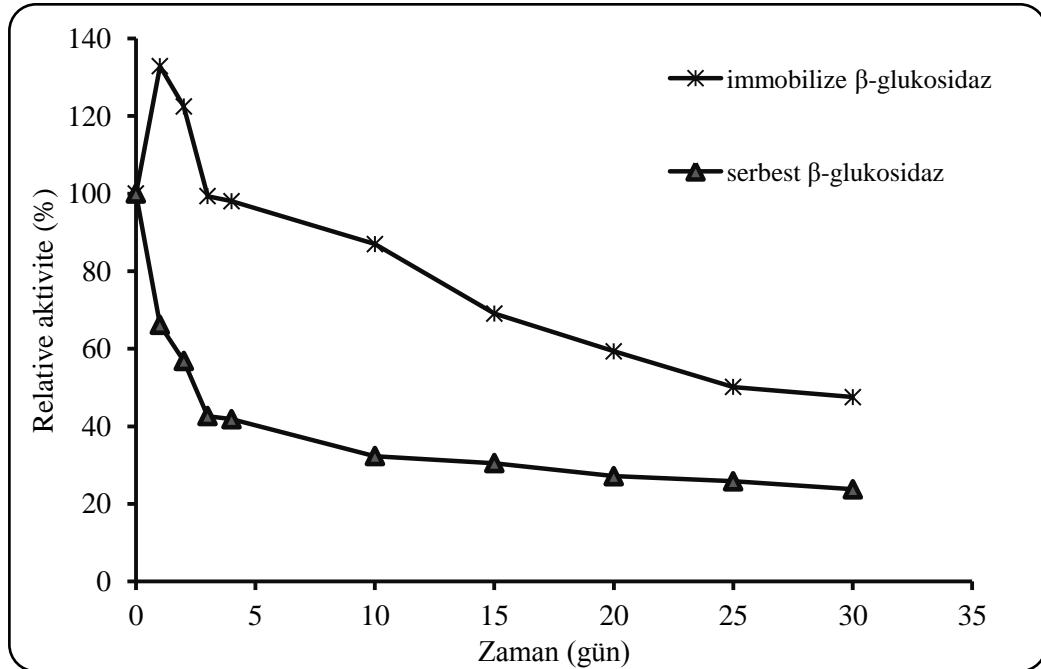
**Şekil 3.23:** İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidazın *p*NPG substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

#### 3.5.4 İmmobilize ve Serbest Enzimin Farklı Şartlarda Saklanma Stabilitesi

Serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin saklanma stabilitesinin belirlenmesi için 4 °C ve 25 °C 'de ilk 5 gün her gün olmak üzere, 30 gün boyunca 5 günde bir aktivitelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar başlangıç aktivitesi %100 kabul edilerek relative aktivite- zaman grafikleri çizildi (şekil 3.25 ve 3.26).



**Şekil 3.24:** Serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin 4 °C’de saklanma stabilitesi grafiği



**Şekil 3.25:** Serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin 25 °C’de saklanma stabilitesi grafiği

Şekil 3.24’deki 4 °C’deki saklama stabilitesi grafiğinden immobilize enzimin aktivitesi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllerden dolayı artan bir eğri ile başladığı ve

immobilizasyondan 1 gün sonra maksimum aktivite gösterdiği noktaya ulaştığı tespit edildi. İmmobilize  $\beta$ -glukosidazın aktivite artışıyla başlayan eğri 15 gün sonra ilk ölçümdeki değerine düşerek 30. güne nisbeten stabil olarak kaldığı görüldü. İmmobilize  $\beta$ -glukosidazın 30. gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 88'ini korurken, serbest enzimin aynı zaman dilimi sonunda aktivitesinin % 74'ünü korumuştur.

Şekil 3.25'deki 25 °C'deki saklama stabilitesi grafiğinden immobilize enzimin aktivitesi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllerden dolayı artan bir eğri ile başladığı ve immobilizasyondan 1 gün sonra maksimum aktivite gösterdiği noktaya ulaştığı görülmektedir. İmmobilize  $\beta$ -glukosidazın aktivite artışıyla başlayan eğri yaklaşık 3. günde ilk ölçümdeki değerine düşerek 30. güne kadar 4 °C'de saklanan immobilize enzime göre daha keskin bir düşüş gösterdiği görüldü. İmmobilize enzim 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 47'sini korurken serbest enzimin aynı zaman dilimi sonunda aktivitesinin % 23'ünü koruduğu tespit edildi.

**Tablo 3.14:** Serbest ve immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidazının özellikleri

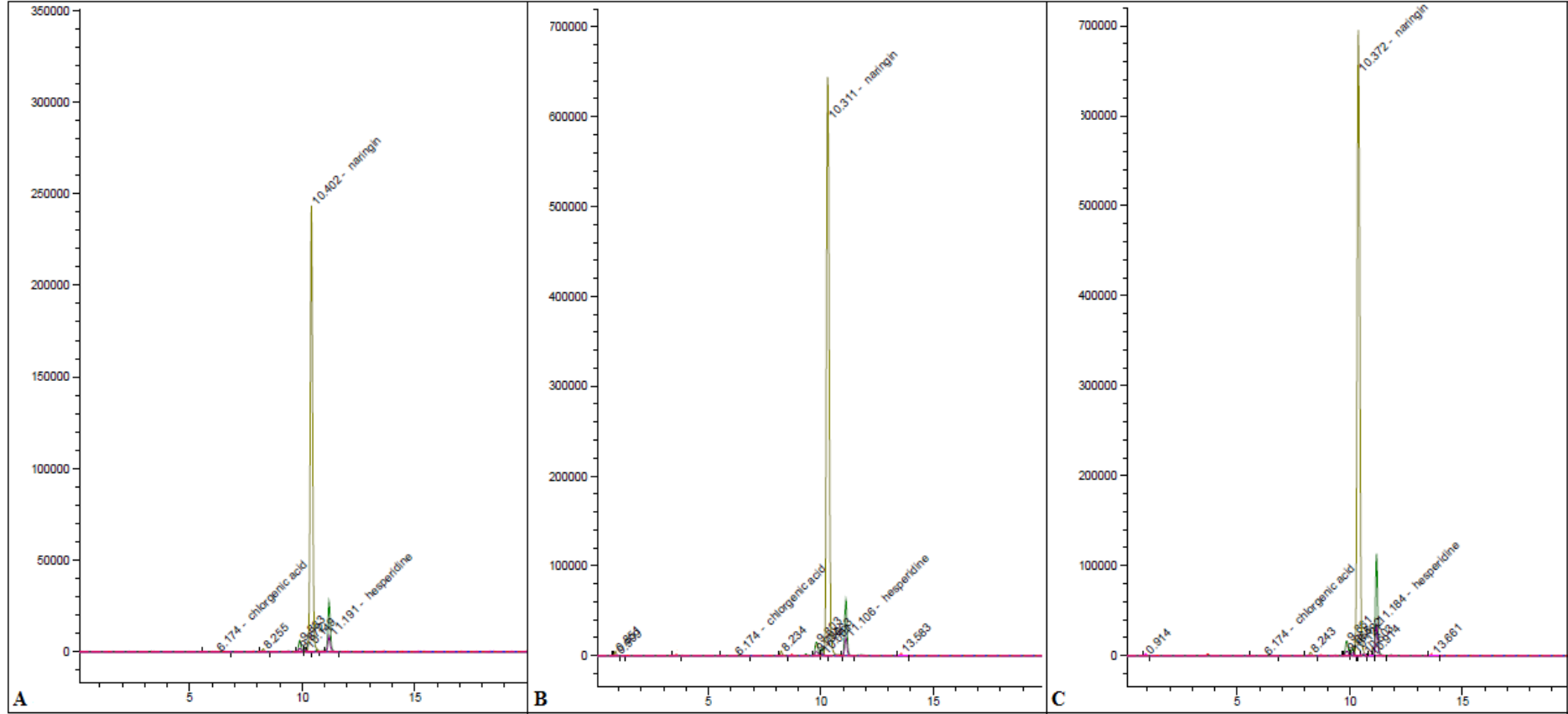
	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	$p\text{NPG}$ $V_{\max}$ (EU)	$p\text{NPG}$ $K_M$ (mM)	Saklama stabilitesi (% kalan)	
					+4 °C	+25 °C
Serbest $\beta$ -glukosidaz	5,5	40	294,117	0,264	% 44	% 23
İmmobilize $\beta$ -glukosidaz	5,5	50	370,97	0,222	% 88	% 47

### 3.6 İmmobilize Enzim ile Meyve Suyunun Muamelesi ve Serbest Aromatik Bileşiklerin Analizi

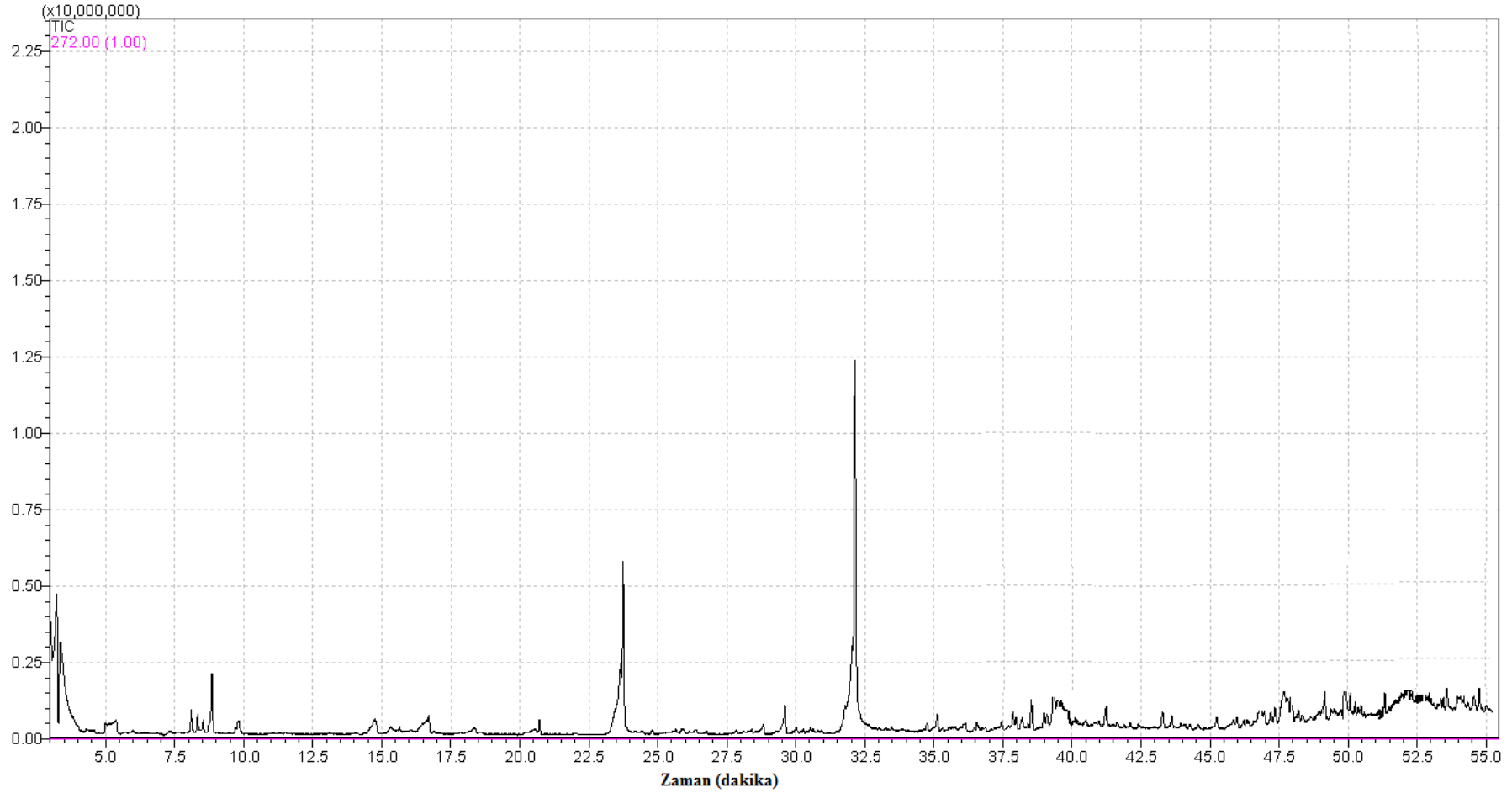
Süperparamanyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllere immobilize edilen mandalina β-glukosidaz enzimi, meyve suyu ile muamele edilerek meyve suyundaki glikosidik bağlı aroma bileşiklerini hidroliz etmesi sağlandı. Hidroliz sonucu ortaya çıkan serbest aromatik bileşikler LC-MS ve GC-MS ile analiz edildi.

LC-MS analizi sonucu Şekil 3.26 gösterilen numunelere ait kromatogramlar incelendiğinde meyve suyu aromatik kalitesinde rol oynayan bileşiklerde artış gözlenmiştir. Meyve suyunda 19,821 ppm düzeyinde olan hesperidin miktarı, kör olarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküle muamele edilmiş örnekte 40,195 ppm düzeyinde ve immobilize β-glukosidazla muamele edilen örnekte 74,23 ppm düzeyinde saptanmıştır. Naringin miktarına ise meyve suyunda 116,74 ppm iken, kör ve immobilize immobilize β-glukosidazla muamele edilen meyve sularında 365,771 ppm ve 371,060 ppm olarak belirlenmiştir.

Bölüm 2.6.2’de anlatılan yöntemlerle hazırlanan numuneler Bölüm 2.6.3’deki belirtilen metodla GC-MS’de kalitatif olarak analiz edildi. Kontrol grubu olarak hazırlanan meyve suyunun ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllere muamele edilen meyve suyunun GC-MS kromatogramlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. İmmobilize β-glukosidaz enzimi ile muamele edilen meyve suyunda Şekil 3.27’de gösterilen kromatogramda çeşitli pikler gözlenmiştir. Bu pikler Wiley229 ve Nist27 kütle spektroskopisi kütüphaneleri ile karşılaştırılarak limonen, benzaldehit, benzil asetat, 1,3-dimetil benzen, etil benzen, benzofenon, 2-amino-1,3-propendiol, ve fenol-2,6-bis(1,1 dimetiletil)-4-metil, bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.28-3.35).

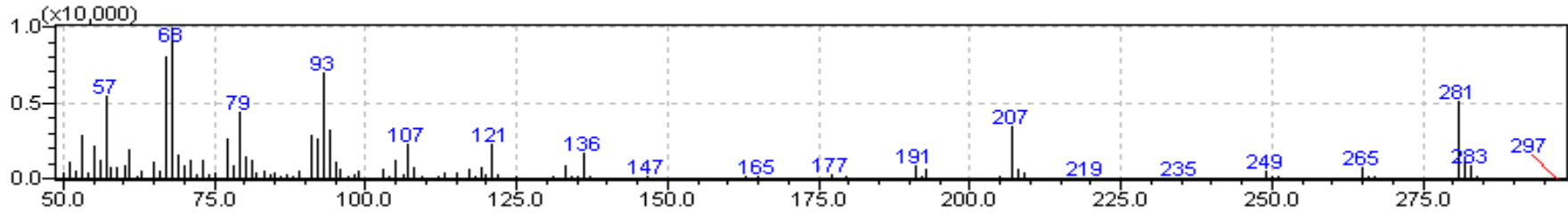


**Şekil 3.26:** LC-MS analizi sonucu elde edilen kromatogramlar a) Mandalina meyve suyu b) Nanopartikülle muame edilen mandalina meyve suyu c) İmmobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi ile muamele edilen mandalina meyve suyu

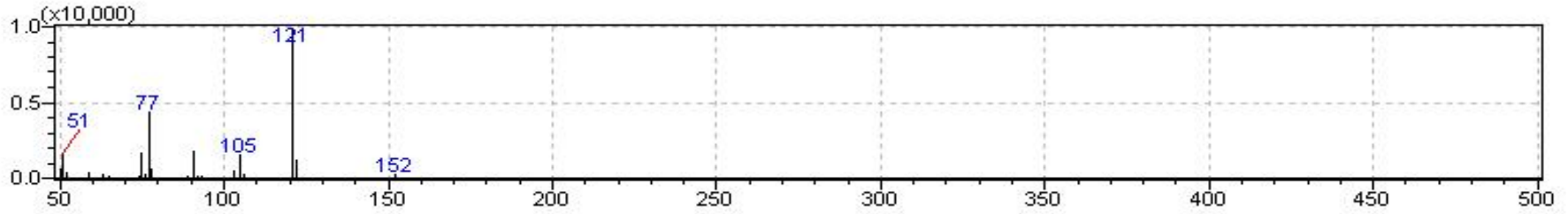


**Şekil 3.27:** İmmobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimi ile muamele edilen meyve suyundan ekstrakte edilen numunenin GC-MS kromatogramı

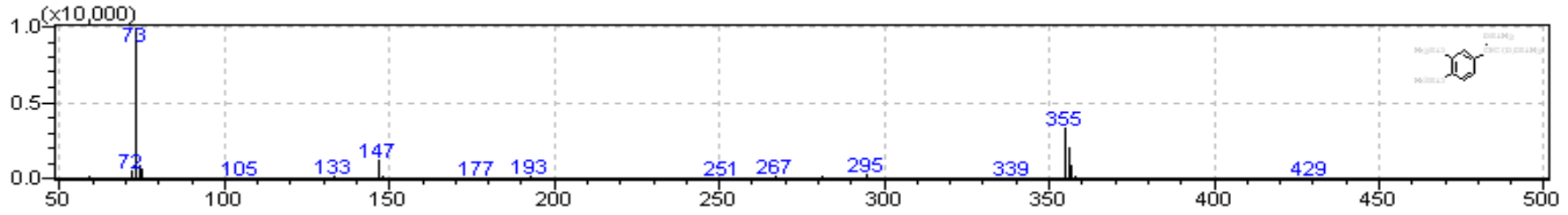




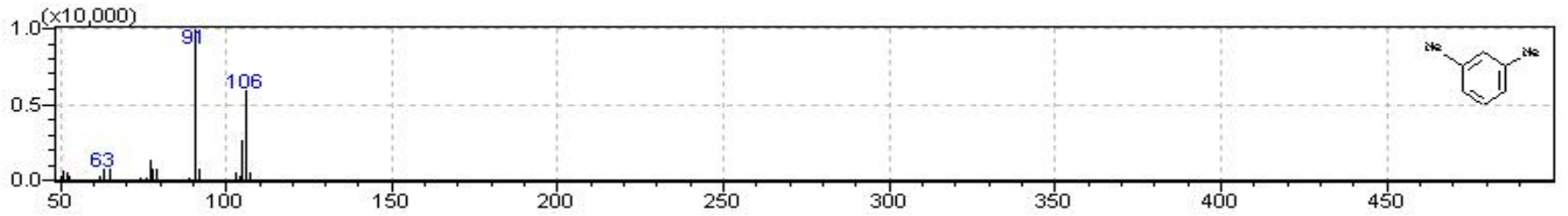
Şekil 3.28: GC-MS’de belirlenen limonenin kütle spektrumu



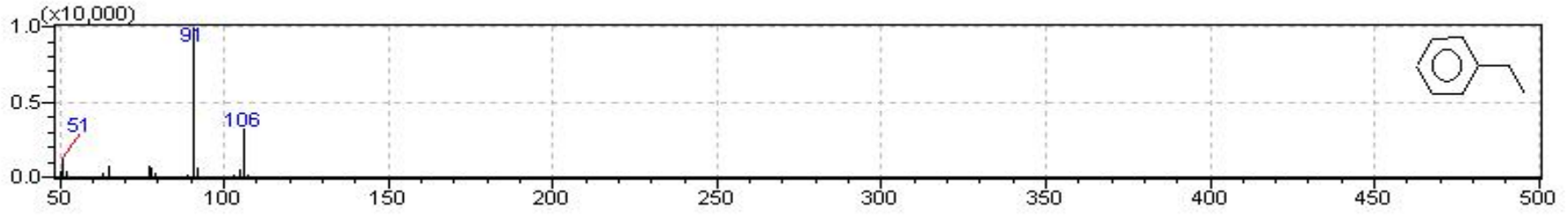
Şekil 3.29: GC-MS’de belirlenen benzaldehidin kütle spektrumu



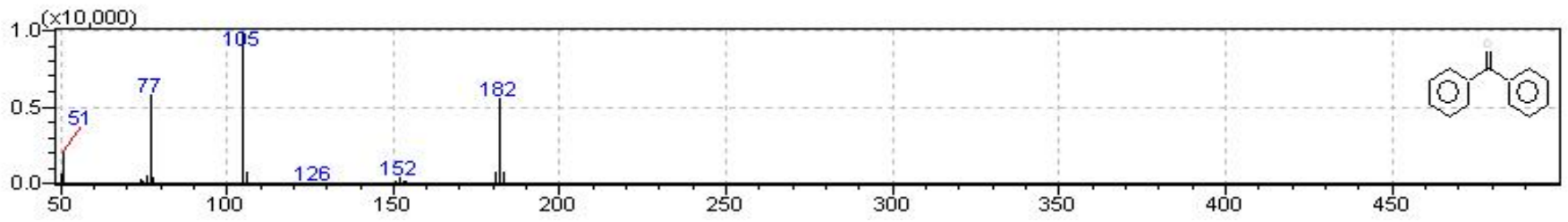
Şekil 3.30: GC-MS’de belirlenen benzil asetatın kütle spektrumu



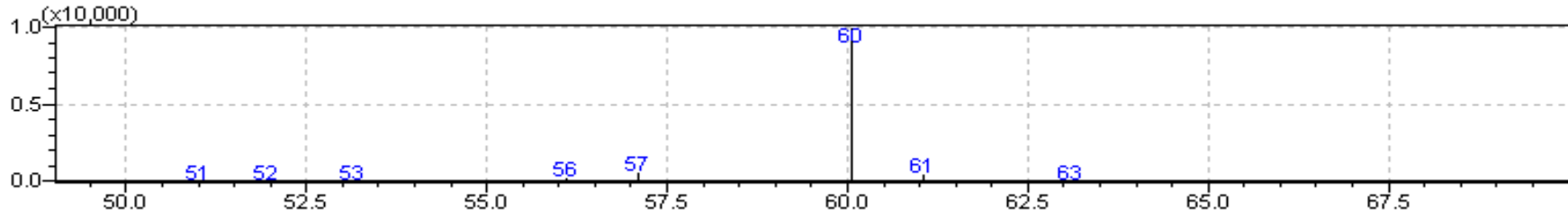
Şekil 3.31: GC-MS’de belirlenen 1,3-dimetil-benzenin kütle spektrumu



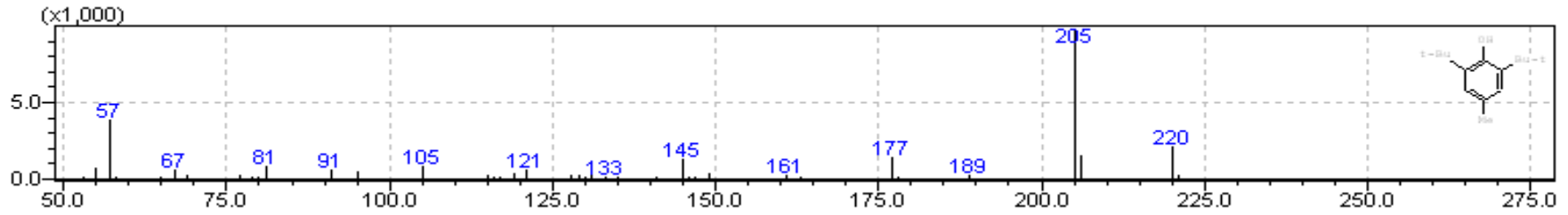
Şekil 3.32: GC-MS’de belirlenen etil-benzenin kütle spektrumu



Şekil 3.33: GC-MS’de belirlenen benzofenonun kütle spektrumu



Şekil 3.34: GC-MS’de belirlenen 2-amino-1,3-propenediolün kütle spektrumu



Şekil 3.35: GC-MS’de belirlenen fenol,2,6 bis (1,1 dimetiletıl)-4-metılın kütle spektrumu

**Tablo 3.15:** İmmobilize  $\beta$ -glukosidazla hidroliz edilen meyve suyundan tespit edilen bileşikler

Bileşik	Analiz Türü	Tutulma Zamanı (RT-Retention Time)	Teşhis Referansı	Kütle spektrumu
Naringin	LC-MS (Kantitatif)	10,699	Tablo 2.3 Kalibre Edilen	-
Hesperidin	LC-MS (Kantitatif)	11,116	Bileşikler	-
Limonen	GC-MS (Kalitatif)	16,695	Wiley7 Lib.	Şekil 3.28'de
Benzaldehit	GC-MS (Kalitatif)	4,295	Wiley229 Lib.	Şekil 3.29'de
Benzil asetat	GC-MS (Kalitatif)	46,840	Wiley229 Lib.	Şekil 3.30'de
1,3-Dimetil benzen	GC-MS (Kalitatif)	8,850	Wiley229 Lib.	Şekil 3.31'de
Etilbenzen	GC-MS (Kalitatif)	8,460	Nist27 Lib.	Şekil 3.32'de
Benzofenon	GC-MS (Kalitatif)	44,580	Nist27 Lib.	Şekil 3.33'de
2-Amino-1,3-propenediol	GC-MS (Kalitatif)	3,235	Nist27 Lib.	Şekil 3.34'de
Fenol,2,6 bis (1,1 dimetiletil)-4-metil	GC-MS (Kalitatif)	39,485	Wiley7 Lib.	Şekil 3.35'de

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada,  $\beta$ -glukosidaz enzimi mandalina (*Citrus reticulata*) meyvesinden saflaştırılarak özellikleri incelenmiş ve  $Fe_3O_4$  nanopartiküller üzerine immobilize edilmiştir. Ayrıca  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin önemli işlevlerinden biri olan meyve sularındaki aromatik kalite faktörlerine etkisi mandalina meyve suyu üzerinde araştırılmıştır. Mandalina meyvesinden  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri uygulanmış ve saflaştırılan enziminin kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir. İmmobilizasyon işlemi karbodiimide ile aktifleştirilen  $Fe_3O_4$  nanopartiküller üzerine  $\beta$ -glukosidaz enziminin kovalent bağlanması yöntemiyle yapılmış ve immobilize enzimin bazı kinetik özellikleri belirlenmiştir. Çalışmanın son basamağında immobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimi mandalina meyve suyu ile muamele edilerek meyve suyundaki aromatik kaliteye etkisi analiz edilmiştir.

Mandalina meyvesinden toplam  $\beta$ -glukosidaz enzimi saflaştırılması için ham ekstrakt hazırlama işlemi tek aşamada gerçekleştirilmiştir. Mandalina meyvesi ekstraksiyon tamponu ile muamele edilerek ekstrakt hazırlanmıştır. Literatürde farklı araştırmacılar tarafından yapılan kiraz meyvesinden [34], çay yapraklarından [35] ve zeytin meyvesinden [40] hazırlanan ekstratların yağı veya fenolik bileşikleri uzaklaştırmak amacıyla aseton tozu kullanılarak yapıldığı görülmektedir. Mandalina ile aynı familyayı paylaşan portakal meyvesinden [38] ekstrakt hazırlama işleminin ise tek aşamada hazırlandığı bildirilmiştir.

Mandalina meyvesinden toplam  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralığı çalışmamızda % 40-80 olarak bulunmuş ve saflaştırma işlemlerinde ham ekstrakta % 40-80'lik amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır.  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması için yapılan çalışmalarda amonyum sülfat çöktürme aralıkları tespit edilmiştir. Örneğin  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılmasında portakal meyvesi için %75 [38], kiraz meyvesi için % 30-70 [34], elma çekirdeği için %40-65 [89], çay yaprağı için % 45-75 [35] ve zeytin meyvesi için % 0-50 [40] amonyum sülfat çöktürme aralıklarının uygulandığı

görülmektedir. Riou ve diğ.'nin yapmış oldukları çalışmada *Aspergillus oryzae* mantarından  $\beta$ -glukosidaz enzimi saflaştırılması için mantar kültür ortamına % 85 [90], *Termonascus aurantiacus* mantarından  $\beta$ -glukosidaz saflaştırılması çalışmasında yine besiyerine %80 [91] amonyum sülfat çöktürmesi uygulandığı belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan amonyum sülfat çöktürmesi aralığının zeytin meyvesi hariç bitki ve mantar  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması için kullanılan değerlere benzer olduğu görülmektedir. Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürmesi işlemi sonunda mandalina meyvesinden  $\beta$ -glukosidaz enziminin % 175,12 verimle 15,86 kat saflaştırılmıştır.  $\beta$ -glukosidaz enzimi saflaştırılması için yapılan farklı çalışmalarda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda, zeytin meyvesinde % 72,25 verimle 7,82 kat [40], çay yaprağından % 50,6 verimle 7,6 kat [35], elma tohumundan % 51,3 verimle 2,6 kat [89] ve soyadan % 120 verimle 3 kat [37] olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürme basamağı sonunda elde edilen saflaştırma katsayısının belirtilen diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi kullanılarak iki aşamalı saflaştırma işlemi yapılmıştır. İki aşamalı saflaştırma yöntemi kullanılarak işlem basamaklarının azaltılması ile enzimin aktivitesini kaybetmemesi amaçlanmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi için ortamdaki tuzun uzaklaştırılması gerekmemekte ve enzim aktivitesinin korunması açısından diyaliz gibi ayrı bir basamağa gerek duyulamaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi işleminde, laboratuvarımızda sentezlenmiş olan sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılmıştır [87]. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saf enzim olarak çalışmalarda kullanılmıştır. Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda söz konusu enzim % 11,38 verimle 196,23 kat saflaştırılmıştır. Kara ve diğ. [40] tarafından yapılan aynı yapıya sahip hidrofobik jelle zeytin  $\beta$ -glukosidaz enziminin iki aşamalı saflaştırmasında % 53,92 verimle 154,93 kat saflaştırdıkları bildirilmektedir. Farklı araştırmacıların değişik bitkilerden yaptıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimi saflaştırmalarında amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda çoğunlukla çok aşamalı işlem kullandıkları görülmektedir. Cameron ve diğ. [38] tarafından portakaldan yapılan saflaştırmada da amonyum sülfat çöktürmesi sonunda önce katyon değiştirici sonra anyon değiştirici

ile iki aşamalı iyon değişim kromotografisi ve ardından üç farklı jel filtrasyon kromotografisi yöntemleri uygulanarak enzimin 489,5 kat saflaştırıldığı gösterilmiştir. Li ve diğ. [35] tarafından çay yaprağından yapılan çalışmada amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda iyon değişim kromotografisi ve ardından iki farklı jel filtrasyon kromotografisi yapılarak enzimi, % 1,26 verimle 117,0 kat saflaştırdıkları belirtilmiştir. Yu ve diğ. [89]'nin yaptığı saflaştırmada elma çekirdeğinden yapılan saflaştırmada amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda iyon değişim kromotografisi, ardından hidrofobik etkileşim kromotografisi ile enzim çözeltisini konsantre ederek jel filtrasyon kromotografisi uygulandığı ve enzimi % 12,8 verimle 46,1 kat saflaştırdıkları bildirilmiştir. Gerardi ve diğ.'nin [34] yaptığı bir çalışmada kiraz meyvesinden  $\beta$ -glukosidaz saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromotografisi ve jel filtrasyon kromotografisi kullanarak enzimin % 26 verimle 6,8 kat saflaştırıldığı görülmektedir. Bir başka çalışmada Odoux ve diğ.[39] vanilya bitkisinden  $\beta$ -glukosidaz enzimi saflaştırmak için amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromotografisi, ardından hidrofobik etkileşim kromotografisi ve sonrasında da jel filtrasyon kromotografisi kullandıklarını ve enzimi % 8,4 verimle 7,2 kat saflaştırdıklarını açıklamışlardır. Soyadan yapılan saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel filtrasyon kromotografisi ile tuz uzaklaştırılmış, daha sonra anyon değiştirici ve katyon değiştirici matrikslerle iki aşamalı iyon değişim kromotografisi yapılarak enzim % 20 verimle 20 kat saflaştırılmıştır [37]. Farklı bir çalışmada Romero ve diğ. [42]'nin yapmış olduğu çalışmada zeytin meyvesinden  $\beta$ -glukosidaz saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon kromotografisi ile tuz uzaklaştırılmış, daha sonra anyon değiştirici matriksle iyon değişim kromotografisi yapılmış ve ardından hidrofobik etkileşim kromotografisi uygulanmıştır. Bu basamakların sonunda araştırmacıların zeytin  $\beta$ -glukosidazını % 8,3 verimle 8,1 kat saflaştırdıkları görülmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin çaydan [35], elma çekirdeğinden [89], kirazdan [34], vanilyadan [39], soyadan ve zeytinden [42] yapılan saflaştırma çalışmalarına göre daha yüksek verimde saflaştırıldığı görülmektedir. Verimin yüksek olmasının en önemli nedenlerinden biri saflaştırmanın iki basamakta yapılmış olmasıdır diye düşünülmektedir



Çalışmamızda iki basamakta saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflığını ve alt birimlerinin varlığını/sayısını kontrol etmek amacıyla NATIVE/SDS poliakrilamid jel elektroforezleri uygulanmıştır. Şekil 3.5’de görüldüğü gibi SDS PAGE’de yaklaşık 30 kDa hizasında, NATIVE PAGE’de yaklaşık 60 kDa hizasında tek bant gözlenmiştir. Bu verilerden 60 kDa molekül ağırlığına sahip mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin, birbirine eşit iki alt birimden oluştuğu düşünülmektedir. Farklı canlılardan yapılan çalışmalarda, saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS PAGE görüntüsü portakalda 64 kDa [38], kirazda 68 kDa [38], zeytinde 65 kDa [40] ve çaydaki  $\beta$ -glukosidaz enzimi, 41 kDa olarak tespit edilerek, enzimin FPLC jel filtrasyonda doğal yapısının 34 kDa olduğu bildirilmiştir [35]. Yapmış olduğumuz çalışmada SDS-PAGE’de mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin yaklaşık 30 kDa hizasında tek bant gözlenmesi, literatürdeki sonuçlarla farklılık göstermektedir. Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin NATIVE-PAGE’de 60 kDa hizasında tek bant göstermesi dimerik yapıda olduğu ve bu yüzden literatürde SDS-PAGE’de çalışılan monomerik yapıdaki  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinden daha düşük bir molekül ağırlığına sahip olduğunu düşündürmektedir.

Saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık parametreleri belirlenmiştir. Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi için optimum pH 5,5 ve optimum sıcaklık 40 °C olarak tespit edilmiştir. Farklı araştırmacıların yaptığı çalışmalarda,  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin çayda [35] pH 5,5, 40 °C, vanilya çekirdeğinde [92] pH 6,5, 39 °C ve zeytinde [40] pH 5,5, 42 °C olduğu belirlenmiştir. Mandalina ile aynı familyayı paylaşan portakaldan [38] yapılan diğer bir çalışmada ise optimum pH'nın 5,0 ve optimum sıcaklığın 40 °C olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda belirlenen optimum sıcaklık ve pH değerleri literatürde yapılan diğer bitki  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin optimum değerlerine yakın olduğu görülmektedir.

$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine termal uygulamanın etkisi belirlenmiştir. Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin 40 °C olan optimum sıcaklığında 50 dakika inkübasyon sonrasındaki aktivitesini % 50 oranında koruduğu ve inkübasyon sıcaklığı arttırıldığında 45 °C’de % 20, 50 °C’de % 5 oranında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Lie ve diğ. [89]’in elma çekirdeği ve badem  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 40 °C, 50 °C ve 60 °C’de yaptıkları termal kararlılık

çalışmasında, badem  $\beta$ -glukosidazı için 60 °C ve elma çekirdeği  $\beta$ -glukosidazı için 70 °C olan optimum sıcaklıklarında enzimlerin hızlıca inaktive olduklarını bildirmişlerdir. Her iki enzimin 2 gün 40 °C'de inkübe edildiğinde önemli bir aktivite kaybı göstermediği bildirilmiştir. Badem ve elma çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin 50 °C'deki yarı ömürleri sırasıyla 14,2 saat ve 42,9 saat olarak bildirilmiştir [89]. Farklı bir çalışmada ham ekstrakt kullanarak vanilya çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı pH ve farklı sıcaklıklarda termal stabilitesi incelenmiştir [92]. Vanilya çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerine yakın olan pH 6,0 da ve farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen termal stabilite çalışmasında; 60 °C'de 3 dakika inkübasyon sonrasında enzimin aktivitesini % 51 oranında kaybettiği, 70 °C'de 90 saniye inkübasyon sonrasında ise enzimin aktivitesini % 48 oranında kaybettiği tespit edilmiştir.

Mandalina meyvesinden saflaştırılan toplam  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+1}$ ,  $Pb^{+1}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+1}$ ,  $Cr^{+1}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Ag^{+1}$  ağır metal iyonlarının etkisi incelendiğinde  $Fe^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini arttırdığı, araştırılan diğer ağır metallerin ise enzimi inhibe ettiği görülmüştür. 1,75 mM *p*NPG substratı ve 1 mM ağır metal bulunan reaksiyon ortamındaki relative aktiviteler;  $Fe^{+2}$  için % 101,  $Zn^{+1}$  için % 90,3  $Pb^{+1}$  için % 85,9,  $Ni^{+1}$  için % 76,9,  $Cd^{+2}$  için % 76,5  $Cr^{+1}$  için 75,2,  $Mn^{+2}$  için % 74,9,  $Mg^{+2}$  için % 72,5,  $Cu^{+2}$  için % 65,8 ve  $Ag^{+1}$  için % 4,7 olarak tespit edilmiştir. Cameron ve diğ. [38] portakal  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine, 1 mM konsantrasyondaki ağır metallerin etkisini incelediklerinde, Fe ve Ca metallerinin enzimi inhibe etmediğini ancak Zn metalinin % 112,0 relative aktivite ile enzimi aktive ettiği belirlenmiştir. Mg metalinin % 98,0 relative aktivite ile enzim üzerindeki inhibisyon etkisinin az olduğunu belirtmişlerdir. Yu ve diğ. [89] elma çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine yaptığı çalışmada konsantrasyonu 5 mM olan ağır metallerin relative aktivitelerini Mg için % 84,1 Mn için %73, Zn için % 47, Cu için % 3 ve Ag için % 0 olarak belirtilmiştir. Başka bir çalışmada Chen ve diğ.[92] erik çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine 5 mM konsantrasyondaki Mn ve Mg ağır metalleri ile yaptıkları çalışmada, sırası ile % 105,3 ve % 97 relative aktivite belirlemişlerdir. Aynı çalışmada konsantrasyonları 1 mM olan Cu için % 63,2, Zn için %64,2, Ag için % 0 relative aktive gösterdiğini belirtmişlerdir. Zeytin meyvesinden Kara ve diğ.'nin yapmış olduğu çalışmada Fe'in zeytin  $\beta$ -glukosidaz aktivitesini arttırdığı, Cu, Ni, Ag, Pb ve Cd ağır metallerinin aktiviteyi düşürdüğü

belirlenmiştir [40]. Hesieh ve diğ. [37]'nin soya bitkisi  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine yaptığı çalışmada, 1 mM ve 10 mM Ag ağır metalinin sırası ile % 35 ve % 0 relative aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızdaki mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine ağır metallerin etkisi,  $Fe^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini arttırması ile zeytin [40] çalışması ve  $Ag^{+1}$  metalinin enzimi güçlü inhibe etmesi elma çekirdeği [89] ve soya bitkisi [37] çalışmalarının sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Literatürde yapılan  $\beta$ -glukosidaz enzimini substrat spesifikliğı çalışmalarında  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesinden ziyade karşılaştırmalı relative enzim aktivitelerinin belirlenmiş olduğu görülmektedir. Araştırmamızda mandalina meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı ilgisinin çalışılan diğ. substratlara oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir. Cameron ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada portakaldan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına ilgisinin en yüksek olduğu belirtilmiştir [38]. Soya bitkisinden yapılan bir başka çalışmada da söz konusu enzimin *p*NPG substratına ilgisinin yüksek olduğu gösterilmiştir [37]. Benzer şekilde vanilyadan [39] ve çaydan [35] saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına ilgisinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak bu sonuçlardan farklı olarak kiraz meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *o*NPG substratına ilgisinin daha yüksek olduğu [34] ve erik çekirdeğinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi ile yapılan çalışmada *p*NPF substrat olarak kullanıldığında *p*NPG substratına göre relative aktivitesinin % 242,5 olduğu belirtilmiştir [92].

Yapmış olduğumuz çalışmada  $\beta$ -glukosidaz enziminin yapay substratlarından olan *p*NPG ve *o*NPG substratlarına karşı ilgisinin bir ifadesi olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Saf enzimle belirlenen kinetik parametreler *p*NPG substratı için  $K_M$  değeri 0,246 mM ve  $V_{max}$  değeri 294,11 EU olarak bulunmuş, katalitik etkinliğin ölçüsü olan  $V_{max}/K_M$  oranı 1114,07 olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin *o*NPG substratı için  $K_M$  değeri 3,04 mM ve  $V_{max}$  değeri 116,27 EU olarak bulunmuş ve  $V_{max}/K_M$  değeri 38,24 hesaplanmıştır. Aynı familyada yer olan portakal  $\beta$ -glukosidazı ile yapılan çalışmada [38] *p*NPG substratı için  $K_M$  değeri 0,1146 mM,  $V_{max}$  5,27 EU ve  $V_{max}/K_M$  oranı 46,06 olduğu gösterilmiştir. Kara ve diğ. [40] tarafından zeytin  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratlarına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 2,22 mM ve 370,37 EU olarak

belirlenmiş,  $V_{max}/K_M$  oranı 166,83 olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada *o*NPG substratının  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 14,11 mM ve 48,54 EU olarak belirlenmiş,  $V_{max}/K_M$  oranı 3,44 olarak hesaplanmıştır. Bir başka çalışmada Chen ve diğ. [92] tarafından erik çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_M$  değeri 3,09 Mm,  $V_{max}$  değeri 219,6 EU ve  $V_{max}/K_M$  oranı 71,06 olarak bulunmuştur. Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda elde edilen sonuçların zeytin [40] meyvesinde yapılan çalışma ile uyumlu olduğu değerlendirilebilir. Aynı çalışmada zeytin  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı ilgisinin *o*NPG substratına karşı ilgisinden daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup çalışmamızdaki sonuçlarla uygunluk göstermektedir.

Araştırmamızda  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği  $IC_{50}$  değerinin 0,088 mM olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca  $\delta$ -glukonolaktonun mandalina meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimini *p*NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhbe ettiği ve  $K_i$  değerinin  $0,0175 \pm 0,01$  mM olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan,  $\delta$ -glukonolaktonun enzimin aktif bölgesine bağlanmada substratla yarıştığı sonucuna varılabilir. Kara ve diğ. [40] tarafından zeytin  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine yaptıkları çalışmada  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki zeytin  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini ve  $IC_{50}$  değerinin 0.23 mM olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada  $\delta$ -glukonolaktonun zeytin  $\beta$ -glukosidaz enzimini *p*NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhbe ettiği ve  $K_i$  değerinin 0,016 mM olduğu gösterilmiştir. Chen ve diğ. [93] tarafından yapılan çalışmada erik çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhbe ettiği ve  $K_i$  değerinin 0,033 mM olduğu bildirilmektedir. Bir başka çalışmada Odoux ve diğ. tarafından vanilya  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada,  $\beta$ -glukosidaz enzimini  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhbe ettiği ve  $K_i$  değerinin 670  $\mu$ M olduğu belirtilmiştir [39].

$\beta$ -glukosidaz enzimini aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolaktonun etkisinin incelendiği literatürdeki diğer çalışmalarda farklı bir yol kullanılmıştır. Cameron ve diğ. tarafından portakaldan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine yapılan bir

çalışmada 10 mM  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki relative aktivitesinin % 9,3 olduğu, 1 mM  $\delta$ -glukonolaktonun aynı şartlarda relative aktivitesinin % 29,4 olduğu belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada, soya bitkisinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolaktonun çok etkili olmadığı, 1 mM  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki relative aktivitesinin % 99, 10 mM  $\delta$ -glukonolaktonun % 93 olduğu gösterilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda genellikle  $\delta$ -glukonolaktonun enzim aktivitesi üzerine etkisi relative aktivite belirlenerek tespit edilmiştir ve ilgili kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin  $\delta$ -glukonolakton tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatüre uygunluk göstermektedir.

$\beta$ -glukosidaz enziminin genel inhibitörlerinden olan glukozun mandalina meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine *p*NPG substratı varlığında etkisi araştırıldığında  $IC_{50}$  değerinin 8,61 mM olduğu hesaplandı. Glukozun *p*NPG substratı varlığındaki  $K_i$  değeri ise  $1,89 \pm 1,28$  olarak hesaplanmıştır. Kara ve diğ. [40] tarafından zeytin  $\beta$ -glukosidaz enzimi ile yaptıkları çalışmada glukozu *p*NPG substratı varlığındaki zeytin  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini ve  $IC_{50}$  değerinin 105,5 mM olduğu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada glukozun zeytin  $\beta$ -glukosidaz enzimini *p*NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhibe ettiği ve  $K_i$  değerinin 6,4 mM olduğu gösterilmiştir. Chen ve diğ. [93] tarafından yapılan çalışmada erik çekirdeği  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun *p*NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhibe ettiği ve  $K_i$  değerinin 4,68 mM olduğu bildirilmektedir. Odoux ve diğ. tarafından vanilya  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada,  $\beta$ -glukosidaz enziminin 2 M glukoz ile inhibe olmadığı gösterilmiştir [39].

$\beta$ -glukosidaz enziminin genel inhibitörleri olan glukoz ve  $\delta$ -glukonolakton maddelerinin mandalina meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında her iki maddenin de enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği fakat  $\delta$ -glukonolaktonun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin glukozu göre daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımızla benzer şekilde, zeytin [40] ve erik çekirdeği [93] çalışmalarında  $\delta$ -glukonolaktonun glukozu göre daha güçlü inhibitör olduğu açıklanmıştır.

Araştırmamızda mandalina meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi karbodiimide aracılığıyla süperparamanyetik  $Fe_3O_4$  nanopartiküllere kovalent olarak bağlanmıştır. Literatürde  $\beta$ -glukosidaz enzimi için geliştirilen çeşitli teknikler mevcuttur. Zheng ve diğ. [94] tarafından ticari *A. niger*  $\beta$ -glukosidaz enziminin kullanıldığı bir çalışmada, glutaraldehit aracılığıyla manyetik kitosan mikrokürelere üzerine immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Fan ve diğ. [79] ticari badem  $\beta$ -glukosidaz enzimini glutaraldehit ile çapraz bağlayarak sodyum aljinat boncuklara immobilizasyon yapmışlardır. Başka bir çalışmada Karagulyan ve diğ. [95] fungal kaynaklı  $\beta$ -glukosidaz enzimini kovalent bağlama ve adsorbsiyonla silika jel ve koalin destekler üzerine immobilize ettiklerini bildirmektedir. Diğer bir çalışmada Chang ve ark. ticari badem  $\beta$ -glukosidaz enzimini, glutaraldehit ile çapraz bağlayarak kitosan-kalay bileşiminden oluşan desteğe immobilize etmişlerdir [96]. Farklı bir çalışmada ticari *A. niger*  $\beta$ -glukosidaz enziminin Eupetgit C akrilamid polimer üzerine immobilizasyonu bildirilmektedir [97]. Gueguen ve diğ. [81] tarafından *Candida molischiana* 35M5N  $\beta$ -glukosidazı Duolite A-568 reçine üzerine immobilize edilmiştir. Lee ve diğ. [98] tarafından ticari  $\beta$ -glukosidaz enzimi polimer nonofibriller üzerine immobilize edilmiştir. Singh ve diğ. *Agaricus arvensis*  $\beta$ -glukosidaz enzimini kullanarak, glutaraldehit ile silikon oksit nanopartiküller üzerine immobilizasyon çalışmaları bildirilmektedir [99]. Farklı enzimlerle yapılan immobilizasyon çalışmalarında, Sinan ve diğ. [100] tarafından paraoksanaz enzimi ve Liao ve Chen [101] maya alkol dehidrogenaz enzimini, karbodiimide ile  $Fe_3O_4$  nanopartiküllere kovalent olarak bağlanmıştır.

Literatürde genellikle ticari ya da fungal kaynaklı  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin immobilizasyon çalışmalarına rastlanmaktadır. Çalışmamızda mandalina (*Citrus reticulata*) meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi, diğer yapılan immobilizasyon çalışmalardan farklı olarak, enzimin elde edildiği kaynak ve immobilizasyon yöntemi ile literatürdeki  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin immobilizasyon çalışmalarından farklılık göstermektedir.

$Fe_3O_4$  nanopartiküllere immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH 5,5 olarak tespit edilmiştir. Serbest mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin de pH'ı 5,5 olduğu için immobilizasyon işleminin enzimin pH değeri üzerinde bir değişikliğe neden olmadığı söylenebilir. Ancak serbest enzimin pH 4,0-6,0

aralığındaki aktivite yükselmesi ve düşmesi daha keskin gerçekleşirken, immobilize enzimin bu aralıkta daha stabil ve yüksek aktiviteli olduğu belirlenmiştir. Fan ve diğ. tarafından serbest ve immobilize badem  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerlerinin her ikisinde 5,0 olduğu tespit edilmiş ancak pH 4-6 aralığında immobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimi serbest  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine göre daha stabil ve yüksek aktiviteli olduğunu tespit etmişlerdir [79]. *Agaricus arvensis*  $\beta$ -glukosidazı üzerine yapılan bir çalışmada serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimin optimum pH'ı 4,5 bildirilmiştir [99]. Su ve diğ.'nin yaptığı çalışmada ticari serbest ve immobilize enzimin her ikisinde optimum pH'ı 6,0 olarak belirtilmiş ancak pH 4,0-7,0 aralığında serbest enzimin daha yüksek aktiviteli ve stabil olduğu, pH değeri arttıkça serbest enzimin aktivitesinin düşerken immobilize enzimin aktivitesinin daha stabil ve yüksek olduğunu açıklamışlardır [80]. Diğer bir çalışmada Chang ve diğ. pH 2,5-6,0 aralığında serbest badem  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivitesine pH 6,0 değerinde ulaştığını ıslak ve kuru kompozitle immobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin optimum pH'ları sırası ile 4,5 ve 5,5 olarak belirlemişlerdir [96]. Literatürde immobilizasyon işleminin enzimlerin optimum pH değerlerinin farklı yönlerde değiştirebileceği veya sabit kalabileceği görülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak belirlendi. Serbest mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak tespit edildiği için immobilizasyon işleminin mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklığını 10 °C arttırdığına ulaşılmıştır. Singh ve diğ. tarafından *Agaricus arvensis*  $\beta$ -glukosidazı üzerine yapılan bir çalışmada serbest  $\beta$ -glukosidaz enzimin optimum sıcaklığı 65 °C, immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin 70 °C olarak belirlenmiştir [99]. Su ve diğ. [80] tarafından ticari enzimle yapılan bir çalışmada serbest  $\beta$ -glukosidaz enziminin 55 °C olan optimum sıcaklığı 45 °C'ye düştüğünü göstermişlerdir. Fan ve diğ.[79] tarafından yapılan çalışmasında ticari serbest badem  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklığı 65 °C'den immobilizasyon sonrasında 55 °C'ye düştüğü bildirilmiştir [79]. Çalışmamızda immobilize edilen mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin sıcaklığa karşı dayanıklılığının artması Singh ve diğ. [99]'nin yaptığı çalışma sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

İmmobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı ilgisinin bir değeri olan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 0,222 mM, 370 EU olarak tesbit edilmiştir. Serbest mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 0,264 mM, 294 EU olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre immobilizasyon işlemi,  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  değerini düşürerek substratına karşı ilgisinin artmasına ve  $V_{max}$  değerini yükselterek enzimin maksimum kataliz hızına ulaşmasını sağlamıştır. Fan ve diğ. [79] tarafından yapılan bir çalışmada serbest ve immobilize badem  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_M$  değerleri sırası 14,89 M 0,59 M olarak gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışma sonucu Su ve diğ.'nin ticari serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin immobilizasyonda belirtilmiştir. Araştırmacılar serbest ve immobilize enzimin  $K_M$  değerlerini,  $10,7 \times 10^{-3}$  mol/L ve  $1,97 \times 10^{-3}$  mol/L hesaplamışlardır [80]. Bu çalışmalardan farklı olarak ticari *A. niger*  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine yapılan immobilizasyon çalışmasında, serbest ve immobilize enzimin  $K_M$  değerleri 4,94 mmol/L ve 6,46 mmol/L olarak, serbest ve immobilize enzim için  $V_{max}$  değerleri 215  $\mu$ mol/dk/mg ve 396  $\mu$ mol/dk/mg olarak hesaplanmıştır. Ticari *A. niger*  $\beta$ -glukosidaz enziminin kullanıldığı farklı bir çalışmada, immobilizasyonun  $K_M$  değerini 1,1 mM'dan 11 mM'ye yükselttiğini,  $V_{max}$  değeri 296  $\mu$ mol/mg/dk 'dan 2430  $\mu$ mol/mg/dk'ya yükselttiğini belirtmişlerdir [97]. Başka bir çalışmada serbest ve immobilize *Agaricus arvensis*  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  değerlerinin 2,5 mM ve 3,8 mM olduğu,  $V_{max}$  değerlerinin ise 3,028 U/mg ve 3,347 U/mg olduğu tespit edilmiştir [99]. Çalışmamızda immobilize  $\beta$ -glukosidazın substratına karşı ilgisinin artması Fan ve diğ. [79] ile Su ve diğ. [80]'nin yaptığı çalışma sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir.

Araştırmamızda +4 °C'de 30 gün saklanan serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin kalan aktiviteleri % 44 ve % 88 olarak belirlenmiştir. Aynı süre boyunca +25 °C'de saklanan serbest ve immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin kalan aktiviteleri % 23 ve % 47 olarak hesaplanmıştır. Fan ve diğ. [79]'nin yaptıkları çalışmada 20. günün sonunda immobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimi %72,2 aktivitesini korurken serbest enzim yaklaşık olarak %10 aktivitesini sürdürmüştür. Su ve diğ. [80]'nin yaptığı çalışmada +4 °C'de 42 gün sonunda immobilize  $\beta$ -glukosidaz enzimi aktivitesini % 73,3 korumuş serbest enzimin 20. gün sonunda % 5,1 aktivitesi kalmıştır. Chen ve diğ. [102] immobilize ticari *A. niger*  $\beta$ -glukosidaz enzimi çalışmalarında ilk 10 gün sonunda enzim % 95 aktivitesini korumuş 25. güne



kadar aktivitesini % 60 oranının üstünde devam ettirmiş, 40. günde aktivitesi % 15'e düşmüştür. immobilize  $\beta$ -glukosidaz enziminin saklama kapasitesini yaklaşık 20 gün olarak belirlenmiştir. Benzer nanopartikül ve immobilizasyon yöntemi ile farklı enzimlerin çalışıldığı çalışmalarda mevcuttur. Sinan ve diğ. [100] paraoksanaz enzimi üzerine yaptıkları çalışmada, +4 °C'de 250 saat sonra immobilize paraoksanaz enzimi aktivitesini yaklaşık % 70 oranında devam ettirirken, serbest paraoksanaz enziminin aktivitesinde keskin düşüşler gözlenmiştir. Aynı çalışmada 250 saat sonra immobilize paraoksanaz enziminde aktivite artışı olduğu bildirilmektedir. Liao ve diğ. [101] tarafından alkol dehidrogenaz ile yapılan çalışmada, +4 °C ve +25 °C'de 120 saat saklanan enzimin immobilize enzim aktivitesini sırası ile % 60, % 30 oranında koruduğunu, serbest enzim aynı sıcaklık ve süre sonunda % 20 ve % 4,5 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler diğer çalışmalara göre Fan ve diğ. [79] ve Su ve diğ. [80] +4 °C'de enzimin stabilitesinin daha kararlı ve yüksek olmasıyla farklılık göstermektedir. Bu farklılık immobilize enzimler için istenilen yüksek aktivite ve stabilite kararlılığı yönünde olduğu için çalışmamız için olumlu bir sonuçtur. Immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin 1. gün sonunda aktivite yükselmesi, hem çalışmamızda Fe'in enzimin üzerine aktivivatör etkisi bulunduğu verisi hemde sinan ve diğ. [100] çalışmasındaki verilerle uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllere immobilize edilen mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin meyve suyu üzerindeki etkileri incelendiğinde, LC-MS analizi sonuçlarına göre işlem görmemiş meyve suyu ile kıyaslandığında hesperidin miktarında 54,41 ppm, naringin miktarında ise 254,32 ppm düzeyinde artış olduğu belirlenmiştir. GC-MS kalitatif analiz sonuçlarına bakıldığında 8 tane maddenin (limonen, benzaldehit, benzil asetat, 1,3-dimetil benzen, etil benzen, benzofenon, 2-amino-1,3-propendiol, ve fenol-2,6-bis(1,1 dimetiletil)-4-metil) ortaya çıktığı gözlenmiştir. Literatürde farklı araştırmacılar tarafından çeşitli desteklere immobilize edilen ticari veya mantar kaynaklı  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin portakal suyu [79], çay [80], üzüm şarabı [81,82] ve çarkıfelek meyvesi suyu [84] üzerinde aroma arttırma etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda mandalina meyvesinden elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> süperparamanyetik nanopartiküllere immobilizasyonu ve aynı meyvenin suyundaki aromatik kaliteye etkisi literatür için yeni bir araştırmadır. Araştırma bulgularımızla immobilize  $\beta$ -glukosidazların, endüstriyel boyutta meyve

sularında aroma arttırıcı olarak kullanılmasında yeni bir basamak oluşturacağı kanaatindeyiz.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- ✓ Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile saflaştırılmıştır.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan mandalina meyvesi  $\beta$ -glukosidaz enzimi NATIVE-PAGE tekniğinde yaklaşık 60 kDa, SDS-PAGE tekniğinde ise 30 kDa molekül ağırlığında tek bant gözlenmiş ve enzimin birbirine eşit iki alt birimden oluştuğu belirlenmiştir.
- ✓ Saflaştırılan mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi için optimum pH 5,5 ve optimum sıcaklık 40 °C olarak tespit edilerek enzimin 40-45-50-55-60 °C'deki termal kararlılıkları bulunmuştur.
- ✓ Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+1}$ ,  $Pb^{+1}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+1}$ ,  $Cr^{+1}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Ag^{+1}$  ağır metal iyonlarının etkisi incelendiğinde  $Fe^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini arttırdığı,  $Ag^{+1}$  metal iyonunun güçlü bir inhibitör olduğu ve diğer metallerin ise enzimi inhibe ettiği görülmüştür.
- ✓ *p*NPG, *p*NPGal, *p*NP-thioGlu, *o*NPGal, *o*NPG, *p*NPF ve *p*NP $\alpha$ -Glu substratları arasından mandalina  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek spesifiteyi *p*NPG substratına karşı gösterdiği belirlenmiştir.
- ✓ Mandalina meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG ve *o*NPG, substratlarına olan ilgisi araştırılmış ve en yüksek katalitik etkinliğinin *p*NPG substratı varlığında olduğu tespit edilmiştir.
- ✓  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden glukoz ve  $\delta$ -glukonolaktonun saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış, her iki maddenin de

enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği ve  $\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon etkisinin glukoza göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

- ✓ Mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi %100 verimle süperparamanyetik  $Fe_3O_4$  nanopartiküllere immobilize edilmiş ve FT-IR analizi enzimin nanopartiküle bağlandığı gösterilmiştir.
- ✓ Immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak, optimum sıcaklık ise 60 °C olarak tespit edilmiş ve immobilizasyon işleminin enzimi daha kararlı hale getirdiği sonucuna ulaşılmıştır.
- ✓ Söz konusu immobilize enzimin *p*NPG substratlarına olan ilgisi araştırılmış ve immobilizasyon işleminin enzimin katalitik gücünü arttırdığı belirlenmiştir.
- ✓ Serbest ve immobilize mandalina  $\beta$ -glukosidaz enzimi 4 °C ve 25 °C’de saklama stabilitesine bakılmış ve her iki tip enzim için +4 °C en uygun saklama sıcaklığı olarak belirlenmiştir.
- ✓ Immobilize enzimle, mandalina suyundan Amberlite XAD-2 reçine ile ekstrakte edilen, glikosidik bağlı aroma öncülleri muamele edilmiş ortaya çıkan glikosidik maddeler LC-MS ve GC-MS ile analiz edilmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Nelson, D. L. and Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company, 183-186, (2008).
- [2] Esen, A., “ $\beta$ -Glucosidase”, (eds: J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen and D. W. S. Wong), *Handbook of Food Enzymology*, New York: Marcel Dekker, 791-803, (2002).
- [3] Li, Y., Jiang, C. J., Wan, X. C., Zhang, Z. Z. and Li, D. X., “Purification and Partial Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37 (6), 363-370, (2005).
- [4] Turgutoglu, E., Demir, G., Kurt, Şenay ve Kaya, N., “Mandarinler [online]”, (05 Ağustos 2013), <http://www.batem.gov.tr/urunler/meyvelerimiz/mandarin/mandarin.htm>, (2012).
- [5] Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., et al., “Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases”, *Eur. J. Nutr.*, 51, 637-663, (2012).
- [6] Fraser, P. D. and Bramley, P. M., “The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids.”, *Prog. Lipid Res*, 43, 228-265, (2004).
- [7] Henrissat, B., “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities”, *Biochem. J.*, 280, 309-316, (1991).
- [8] Henrissat, B. and Bairoch, A., “Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases”, *Biochem J*, 316, 695-696, (1996).
- [9] Henrissat, B. and Davies, G. J., ”Structural and sequencebased classification of glycoside hydrolases”, *Curr Opin Struct Biol*, 7, 637-644, (1997).

- [10] Lee, Y. C. and Lang, D., “Automatic analysis of sugar components of glycoproteins”, *J. Biol Chem*, 243, 677-700, (1968).
- [11] Wardi, A. H., Allen, W. S., Turner D. L. and Stary, Z., “Hyaluronate-peptide linkage group”, *Biochim Biophys Acta*, 192, 151-155, (1969).
- [12] Henrissat, B. and Davies, G. J. “Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics”, *Plant Physiol*, 124, 1515-1519, (2000).
- [13] Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C, and Schulein, M., “Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose.”, *Bio technology*, 3, 722-726, (1985).
- [14] Xu, Z., Escamilla-Trevino, L. L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D. R., Winkel, B. S. J., Mohamed, A., Cheng, C., Shih, M., Poulton, J. E., Esen, A., et al., “Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1”, *Plant Molecular Biology*, 55, 343-367, (2004).
- [15] Terra, W. R. and Ferreira, C., “Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function”, *Comp. Biochem. Physiol.*, 109, 1-62, (1994).
- [16] Wiesmann, C., Beste, G., Hengstenberg, W. and Schulz, G., “The three-dimensional structure of 6-phospho- $\beta$ -galaktosidaz from *Lactococcus lactis* ”, *Structure*, 3, 961-968, (1995).
- [17] Barrett, T., Suresh, C. G., Tolley, S. P., Dodson, E. J. and Hughes, M. A., “The crystal structure of a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase from white sweet clover, a family 1 glycosyl hydrolase.”, *Structure*, 3, 951-960, (1995).
- [18] Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., Henrissat, B., et al., “The crystal structure of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active site machinery of an S-glycosidase.”, *Structure*, 5, 663-675, (1997).

- [19] Sanz-Aparicio, J., Hormoso, J. A., Martinez-Ripoll, M. and Lequerica, J., "Crystal structure of  $\beta$ -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights in to the catalytic activity in family1 glycosyl hydrolases.", *J. Mol. Biol.*, 275, 491-502, (1998).
- [20] Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W. P., Bevan, D. R., Henrissat, B., et al., "The mechanism of substrate (aglycone) specificity in  $\beta$ -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize  $\beta$ -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 13555-13560, (2000).
- [21] Verdoucq, L., Moriniere, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B., et al., "Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate.", *J. Biol. Chem.*, 279, 31796-31803, (2004).
- [22] Esen A., "Purification and partial characterization<sup>1</sup> of maize.", *Plant Physiol*, 98, 174-182, (1992).
- [23] Esen A., and Cokmuş, C., "Maize genotypes classified as null at the glu locus have  $\beta$ -glucosidase activity and immunoreactive protein", *Biochemical Genetics*, 28, 319-336, (1990).
- [24] Babcock, G. D. and Esen, A., "Substrate specificity of maize b-glucosidase.", *Plant Sci.*, 101, 31-39, (1994).
- [25] Hosel, W. and Todenhagen, R., "Characterization of a  $\beta$ -glucosidase from Glycine max which hydrolyses coniferin and syringin.", *Phytochemistry*, 19, 331-339, (1980).
- [26] Cicek, M., and Esen, A., "Expression of soluble catalytically active plant (monocot) b-glucosidases in E. coli.", *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 392-40, (1999).
- [27] Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W. P., Bevan, D. R., Henrissat, B., Esen, A., et al., "Crystal structure of a monocotyledon (maize

- ZMGlul)  $\beta$ -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl  $\beta$ -D-thioglucoside”, *Biochem J.*, 354, 37-46, (2001).
- [28] Withers, S. G., Warren, R. A. J., Street, I. P., Rupitz, K., Kempton, J. B., Aebersold, R., et al., ”Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a “retaining” glycosidase.”, *J Am Chem Soc.*, 112, 5887-5889, (1990).
- [29] Wang, Q. D., Trimbur, R., Graham, R., Warren, R. A. J. and Withers, S. G., “Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis*  $\beta$ -glucosidase by kinetic analysis of mutants.”, *Biochemistry*, 34, 14554-14562, (1995).
- [30] Davies, G. and Henrissat, B., “Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.”, *Structure*, 3, 853-859, (1995).
- [31] Woodward, J. and Wiseman, A., “Fungal and other  $\beta$ -D- glucosidases, their properties and applications.”, *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 73-93, (1982).
- [32] Opassiri, R., Hua, Y., Wara-Aswapati, O., Akiyama, T., Svasti, J., Esen, A., et al., “  $\beta$ -Glucosidase, exo- $\beta$ -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlul”, *Biochem J*, 379, 125-131, (2004).
- [33] Lecas, M., Gunata, Z. Y., Sapic, J. C. And Bayonove, C. L., “Purification and partial characterization of  $\beta$ -glucosidase from grape.” *Phytochemistry*, 30, 451-454, (1991).
- [34] Gerardi, C., Blando, F., Santino, A. and Zacheo, G., “Purification and characterisation of a  $\beta$ -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit”, *Plant Sci*, 160, 795-805 (2001).
- [35] Li, Y., Jiang, C. J., Wan, X. C., Zhang, X. and Li, D., “Purification and Partial Characterization of Beta-Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37 (6), 363-370, (2005).

- [36] Hosel, W., Tober, I., Eklund, S. H. and Conn, E. E., "Characterization of beta-glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seedlings.", *Arch. Biochem. Biophys.*, 252, 152-162, (1987).
- [37] Hsieh, M. C. and Graham, T. L., "Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates", *Phytochemistry*, 58, 995-1005, (2001).
- [38] Cameron, R. G., Manthey, J. A., Baker, R. A. and Grohmann, K., "Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue.", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4457-4462, (2001)
- [39] Odoux, E., Chauwin, A. and Brillouet, J. M., "Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)  $\beta$ -glucosidase" *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3168-3173, (2003).
- [40] Kara, H., Sinan, S., Turan, Y., "Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme", *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512, (2001).
- [41] Cicek, M., Blanchard, D. R. and Esen, A., "The aglikon specificity determining sites are in dhurrinase.", *J. Biol Chem*, 275, 20002-20011, (2000).
- [42] Romero-Segura, C., Sanz, C. and Perez A. G., "Purification and characterization of an olive fruit  $\beta$ -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics", *J. Agric. Chem*, 57, 7983-7988, (2009).
- [43] Bickerstaff, G. F., *Immobilization of enzymes and cells*, New Jersey: Humana press, 33, 199-205, (1997).
- [44] Danial, E. N., Elnashar, M. M. and Awad, G. E., "Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 3120-3127, (2010).



- [45] Katchalski-Katzir, E. and Kraemer, D. M., "Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 157-176, (2000).
- [46] Bhat, M. K., "Cellulases and related enzymes in biotechnology", *Biotechnology Advances*, 18 (5), 355-383, (2000).
- [47] Wilhelm Tischer, W. and Wedekind, F., "Immobilized Enzymes: Methods and Applications", *Topics in Current Chemistry*, 200, 96-118, (1999).
- [48] Telefoncu, A., *immobilize enzimler*, (ed: A. Telefoncu), Enzimoloji (Yaz Okulu), 193, (1997).
- [49] Monsan, P. and Combes, D., *Methods in enzymology*, New York: Academic press, 137-584, (1988).
- [50] Clark, D. S., "Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity?", *Trends Biotechnol.*, 12, 439-443, (1994).
- [51] Hartmeier, W., *Immobilized Biocatalysts*, Berlin: Springer Verlag, (1988).
- [52] Fessner, W. D. and Anthonsen, T., *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Berlin: Wiley-VCH, (2008).
- [53] Tischer, W. and Kasche V., "Immobilized Enzymes: Crystals or Carriers", *Tibetech*, 17, (1999).
- [54] Schulz, B., Riedel, A. and Abel, P. U., "Influence of polymerization parameters and entrapment in poly (hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD", *Jour. of Molec. Catal. B: Enzymatic*, 7, 85-90, (1999).
- [55] Shan, Y. and Shan, D., "Immobilized enzymes; industrial biocatalysts", *Indian Journal of Hospital Pharmacy*, 29 (2), 51-58, (1992).
- [56] Monsan, P. and Combes, D., *Enzyme Stabilization by Immobilization, Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 137, (1988).

- [57] Gouda, D., Thakur, M. S. and Karanth, N. G., "Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology", *Electroanal.*, 17, 18-849, (2001).
- [58] Krizov, J., Spanova, A., Rittich, B. and Horak, D., "Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation", *Jour. of Chromatog. A*, 1064, 247-253, (2005).
- [59] Bayramoğlu, G. and Arica, M. Y., "Kinetics of mercury ions removal from synthetic aqueous solutions using by novel magnetic p(GMA-MMAEGDMA)", *Jour. Hazard. Material.*, 144, 449-457, (2007).
- [60] Horozova, E. and Dimcheva, N., "Kinetic study of catalase adsorption on disperse carbonaceous matrices", *Cent. Eur. J. Chem.*, 2, 627-637, (2004).
- [61] Phadtare, S., Vyas, S., Palaskar, D. V., Lachke, A., Shukla, P. G., Sivaram, S., Sastry, M., et al., "Enhancing the reusability of endoglucanase-gold nanoparticle bioconjugates by tethering to polyurethane microspheres", *Biotechnol Progress*, 20, 1840-1846, (2004).
- [62] Phadtare, S., D'Britto, V., Pundle, A., Prabhune, A. and Sastry, M., "Bgalactosidase- lipid biocomposite films: Preparation, characterization, and enzymatic activity", *Biotechnol Progress*, 20, 156-161, (2004).
- [63] Yamada, K., Nakasone, T., Nagano, R. and Hirata, M., "Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto coated polyethylene plate", *J.Appl.Polym.Sci.*, 89, 3574-3581, (2003).
- [64] Zhou, Q. Z. K., Chen, X. D. and Xuemeli, L., "Kinetics of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric", *Biotechnol Bioeng.*, 81, 127-133, (2003).
- [65] Retama, J. R., Lopez, M. S. P., Perez, J. P. H., Abanillas, G. F., Lopez-Cabarcos, E. and Lopez-Ruiz, B., *Biosens Bioelectron* , 2220, 2268, (2005).
- [66] Cao, L., "Immobilised enzymes: science or art?", *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217-226, (2005).

- [67] Chase, H. A. and Yang, Y., "Immobilization of  $\alpha$ -amilase on poly(vinylalcohol)-coated perfluoro polymer supports for use in enzyme reactors", *Biotechnology and Biochemistry*, 28, 145-154, (1998).
- [68] Rosevear, A., Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S., *Immobilised enzymes and cells*, Bristol: Adam Hilger, (1987).
- [69] Wichmann, R., Wandrey, C., Buchmann, A. F. and Kula M. R., "Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration", *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 2789-2802, (1981).
- [70] Griffen, E.G., "Adsorption of Invertase" *Journal of the American Chemical Society*, 38, 1109–1115 (1916).
- [71] Wang, S. S., *Chemistry of Protein Congution and Cross Linking*, USA: CRC Press, (1993).
- [72] Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S. and Scouten, W. H., *Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry*, New York: John Wiley and Sons, 253–392, (1983).
- [73] Rosell, C. M., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M., "Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment", *Biocatal. Biotransform.*, 12, 67-76, (1995).
- [74] Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M., "Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilisation of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage", *Biomacromolecules*, 1, 739-745, (2000).
- [75] López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., Guisán, J.M., et al., "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports", *J. Biotechnol.*, 116, 1-10, (2005).

- [76] Kar, A. and Sambamurthy K., *Pharmaceutical Biotechnology*, New Delhi: New Age, (2006).
- [77] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. and Guizan, J.M., "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment", *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 509-515, (2000).
- [78] Varian, A. R. and Sansen, W., "Covalent enzyme immobilisation on paramagnetic polyacrolein beads", *Biosens. Bioelectron.*, 11, 443-448, (1996).
- [79] Fan, G., Xu, Y., Zhang, X., Lei, S., Yang, S. and Pan, S., "Characteristics of immobilized  $\beta$ -glucosidase and its effect on bound volatile compounds in orange juice", *International journal of food science and technology*, 46, 2312-2320, (2011).
- [80] Su, E., Xia, T., Gao, L., Dai, Q. And Zhang,Z., "Immobilization of  $\beta$ -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage", *Food and Bioproducts Processing*, 88, 83-89, (2010).
- [81] Gueguen, Y., Chemardin, P., Pien, S., Arnaud, A. and Gaizy, P., "Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized  $\beta$ -glucosidase", *Journal of Biotechnology*, 55, 151-156, (1997).
- [82] Pombo, P. G., Farina, L., Carrau, F., Viera, F. B. and Berna, B. M., "A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine", *Process Biochemistry*, 46, 385-389, (2011).
- [83] Gallifuoco, A., Alfani, F., Cantarella, M., Spagna, G. And Pifferri, P. G., "Immobilized  $\beta$ -glucosidase for winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors", *Process biochem.*, 35, 179-185, (1999).

- [84] Shoseyov, O., Bravdo, B. A., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L. Et al., "Immobilized Endo- $\beta$ -glucosidase Enriches Flavor of Wine and Passion Fruit Juice", *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1387-1390, (1990).
- [85] Lowry, O. H., Rosgrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., "Protein measurement with the folin phenol reagent", *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275, (1951).
- [86] Bradford, M. M., " A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, 248-251, (1976).
- [87] Sinan, S., Kockar, F. and Arslan, O., "Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics", *Biochimie*, 88, 565-574, (2006).
- [88] Laemmli, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage-T4", *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- [89] Yu, H. L., Xu, J. H., Lu, W. Y. And Lin, G. L., " Identification, purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of *O*-glucosides.", *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 354-361, (2007).
- [90] Riou, C., Salmon, j. M., Vallier, M. J., Gunata, Z. and Barre, N., "Purification, Characterization and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*", *Applied and Environmental Microbiology*, 3607-3614, (1998).
- [91] Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I. and Beeumen, J. V., "Biochemical characterization and mechanism of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus auranticus*", *Biochem J.*, 353, 117-127, (2001).
- [92] Marquez, O. and Waliszewski K. N., "The effect of thermal treatment on  $\beta$ -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)", *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, 43, 1993-1999, (2008).

- [93] Chen, L., Li, N. and Zong M. H., “A glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization”, *Process Biochemistry*, 47, 127-132, (2012).
- [94] Zheng, P., Wang, J., Lu, C., Xu, Y. and Sun, Z., “Immobilized  $\beta$ -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose”, *Process Biochemistry*, 48, 683-687, (2013).
- [95] Karagulyan, H. K., Gasparyan, V. K. and Decker, S. R., “Immobilization of fungal  $\beta$ -glucosidase on silica gel and kaolin carriers” *Appl Biochem Biotechnol*, 146, 39-47, (2008).
- [96] Chang, M. Y. and Juang, R. S., “Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of  $\beta$ -glucosidase”, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 93-98, (2007).
- [97] Tu, M., Zhang, X., Kurabi, A., Gilkes, N., Mabee, W. and Saddler, J., “Immobilization of beta-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis” *Biotechnol Lett*, 28, 151-156, (2006).
- [98] Lee, S. M., Jin, L. H., Kim, J. H., Han, S. O., Na, H. B., Hyeon, T. et al., “ $\beta$ -Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production”, *Bioprocess Biosyst Eng*, 33, 141-7 (2010).
- [99] Singh, R. K., Zhang, Y. W., Nguyen, N. P., Jeya, M. and Lee, J. K., “Covalent immobilization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 89, 337-344, (2011).
- [100] Sinan, S., Beyaz, S., Kockar, H., Demir, D., Eryılmaz, S., Kockar, F., et al., “Paraoxonase 1-bound magnetic nanoparticles: preparation and characterizations”, *Nanosci and nanotechnol*, 10, 1-6, (2010).
- [101] Liao, M. H. and Chen, D. H., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability” *Biotechnol letters*, 23, 1729-1727, (2001).

- [102] Chen, K. I., Lo, C. Y., Liu, C. W., Yu, C.R., Chou, C. C., et al., “Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for b-glucosidase”, *Food Chemistry*, 139, 79-85, (2013).
- [103] Perez-Magarino, S., Revilla, I., Gonzalez-SanJose, M. L. and Beltran, S., “Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds”, *Journal of chromatography. A*, 847, 75-81, (1999).
- [104] Warburg, O. And Christian, W., “Isolation and crystallization of enolase.”, *Biochem Z*, 310, 384-421, (1942).
- [105] Günata, Z., “Flavor Enhancement in Fruit Juices and Derived Beverages by Exogenous Glycosidases and Consequences of the Use of Enzyme Preparations”, (eds: J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen and D. W. S. Wong), *Handbook of Food Enzymology*, New York: Marcel Dekker, 326-352, (2002).
- [106] Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., et al., “Production, Purification and Characterization of Novel Beta-Glucosidase from Newly Isolated *Penicillium Simplicissimum* H-11 in Submerged Fermentation”, *EXCLI Journal*, 12, 528-540, (2013).