

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



**İMMOBİLİZE ZEYTİN BETA-GLUKOZİDAZININ  
OLEUROPEİN HİDROLİZİNDE KULLANILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİHRAP YAŞAR KAYA**

**BALIKESİR, HAZİRAN – 2014**

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



**İMMOBİLİZE ZEYTİN BETA-GLUKOZİDAZININ  
OLEUROPEİN HİDROLİZİNDE KULLANILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİHRAP YAŞAR KAYA**

**BALIKESİR, HAZİRAN – 2014**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Mihrap Yaşar KAYA** tarafından hazırlanan “**İMMOBİLİZE ZEYTİN BETA-GLUKOZİDAZİNİN OLEUROPEİN HİDROLİZİNDE KULLANILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.06.2014 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  
Yrd.Doç.Dr. Elif SAVAŞ

Eş Danışman  
Prof.Dr. Feray KÖÇKAR

Üye  
Doç.Dr. Ekrem DÜNDAR

Üye  
Doç.Dr. Canan Ece TAMER

Üye  
Yrd.Doç.Dr. Semra IŞIK



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

**Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından 110O778 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tez çalışması Balıkesir Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından  
2014/112 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**İMMOBİLİZE ZEYTİN BETA-GLUKOZİDAZININ OLEUROPEİN  
HİDROLİZİNDE KULLANILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MİHRAP YAŞAR KAYA  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. ELİF SAVAŞ)  
(EŞ DANIŞMAN: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR )  
BALIKESİR, HAZİRAN – 2014**

Bu çalışmada, Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile %16,80 verim ile 20,91 kat saflaştırılmış olan  $\beta$ -glukozidaz enziminin süperparamanyetik  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  (demir oksit ) nanoparçacıklara kovalent bağlanma reaksiyonuyla immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve enzim sofralık zeytin üretiminde acılık giderme işlemi amacıyla kullanılmıştır. Zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin Para-nitrophenyl- $\beta$ -d-glukopiranozidaz substratına karşı serbest enzim optimum sıcaklığı 55 °C, immobilize enzimin 37 ° C olarak belirlenirken, optimum pH'ları, serbest ve immobilize zeytin  $\beta$ -glukozidazı için 5,5 olarak belirlenmiştir. Zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin saf ve immobilize formlarının pNPG substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Linewear-Burk grafiği ile saf enzim için 0,8 mM ve 192 EU/ml olarak immobilize enzim için 1,26 mM ve 333,3 EÜ/ml olarak belirlenmiştir.  $\beta$ -glukozidaz süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilizasyonunda en yüksek aktivite 22,9  $\mu$ g enzim/25 mg Fe +2 süperparamanyetik nanoparçacık ile elde edilmiştir. Zeytin meyvesinden saflaştırılarak süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin sofralık zeytin üretiminin en önemli basamağı olan acılık giderme aşamasında kullanımıyla ilgili olarak ham ve enzim uygulanmış zeytin örneklerinde oleuropein analizleri HPLC ile gerçekleştirilmiştir. 6 ve 12 saatlik denemelerde immobilize enzimin oleuropeinin başlangıçtaki miktarına göre % 43,56 , 24 saat sonunda %100 oranında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Denemeler göstermiştir ki, 4 kullanım sonunda aktivitesini koruyan immobilize enzim oleuropein hidrolizinde nerdeyse %100 düzeyinde etkili olmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Zeytin, *Olea europaea L.*, immobilizasyon, manyetik nanoparçacık,  $\beta$ -Glukozidaz

## ABSTRACT

### THE USING IMMOBILIZED OLIVE BETA-GLUCOSIDASE IN THE HYDROLIZATION OF OLEUROPEIN

MSC THESIS

MIHRAP YASAR KAYA

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSİST. PROF. DR. ELİF SAVAŞ )

(CO-SUPERVISOR: PROF.DR. FERAY KOÇKAR )

BALIKESİR, JUNE 2014

This study,  $\beta$ -glucosidase which was purified with hydrophobic interactions chromatography from *Olea europea* L. of fruit, immobilized with covalent binding reaction to superparamagnetic  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$  nanoparticles. In the production of eating olives,  $\beta$ - glucosidase used for debittering process. The optimum temperature of free and immobilized  $\beta$ - glucosidase was determined 55 °C and 37 °C against *p*NPG substrate, respectively. The optimum pH for free and immobilized  $\beta$ -glucosidase was determined as 5.5. The  $K_M$  and  $V_{\max}$  values of free and immobilized  $\beta$ -glucosidase were determined 0,8 mM (192 EU/ml) and 1,26 mM (333,3 EÜ/ml) by the method of Lineweaver-Burk plots. The highest activity was obtained by 22,9  $\mu\text{g}$  enzyme/25 mg  $\text{Fe}^{+2}$  in immobilisation with superparamagnetic nanoparticles. Oleuropein analysis which were related with using  $\beta$ -glucosidase for debittering process, were performed by HPLC in crude and enzyme-treated olive samples. At 6 and 12 hour trials immobilized enzymes caused a decrease of 43.56 % compared to the initial amount of oleuropein, caused a decrease of 100% after 24 hours. Trials have shown that the immobilized enzyme which protects own activity at the end of 6 experiments, is effective 100% in the hydrolysis of oleuropein.

**KEYWORDS:** Olive, *Olea europaea* L, immobilization, magnetic nanoparticles,  $\beta$ - glucosidase.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ .....	xii
SEMBOL LİSTESİ .....	xiv
ÖNSÖZ.....	xvi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>17</b>
1.1 Zeytin.....	18
1.2 Sofralık Zeytin Üretimi .....	24
1.3 $\beta$ -Glukozidaz .....	27
<b>1.3.1 <math>\beta</math>-Glukozidaz Enziminin Biyokimyası.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2 <math>\beta</math>-Glukozidaz Enziminin Özellikleri ve Yapısı .....</b>	<b>29</b>
1.3.2.1 Enzimin Katalitik Mekanizması.....	30
1.3.2.2 Katalizlediği Reaksiyonları ve Substratları.....	31
1.3.2.3 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Önemi .....	34
1.4 İmmobilizasyon .....	37
<b>1.4.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....</b>	<b>38</b>
1.4.1.1 Kovalent Bağlanma .....	42
1.4.1.2 Carbodiimide ile Nanoparçacık Aktifleştirilmesi .....	44
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>46</b>
2.1 Materyaller .....	46
<b>2.1.1 Zeytin .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1.2 Ticari Enzim .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....</b>	<b>47</b>
<b>2.1.4 Kullanılan Alet ve Cihazlar .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1.5 Kullanılan Çözeltiler.....</b>	<b>50</b>
2.2 Yöntemler .....	55
<b>2.2.1 Enzimin Saflaştırılması .....</b>	<b>55</b>
2.2.1.1 Zeytinden Aseton Tozu Hazırlanması.....	55
2.2.1.2 Enzim Ekstraktının Hazırlanması .....	55
2.2.1.3 Enzim Aktivite Tayini.....	55
2.2.1.4 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	56
2.2.1.5 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzim Saflaştırılması.....	56



2.2.2	<b>Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Miktar Tayini</b> .....	57
2.2.3	<b>Enzim Ünitesi İçin Kullanılan Standart Grafikler</b> .....	58
2.2.4	<b>Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE) ile enzim saflığının kontrolü</b> .....	59
2.3	<b>Enzim İmmobilizasyonu</b> .....	60
2.3.1	<b><math>\beta</math>-Glukozidazın Süperparamanyetik Nanoparçacıklara İmmobilizasyonu</b> .....	60
2.3.2	<b>FTIR analizi</b> .....	61
2.3.3	<b>İmmobilize Enzim Aktivite Tayini</b> .....	62
2.4	<b>Zeytin Tatlandırma Yöntemleri</b> .....	63
2.4.1	<b>NaOH ile Zeytin Tatlandırma</b> .....	63
2.4.2	<b>Serbest enzim ile zeytin tatlandırma</b> .....	63
2.4.3	<b>İmmobilize Enzim ile Tatlandırma</b> .....	63
2.4.4	<b>Musluk Suyu ile Tatlandırma</b> .....	64
2.4.5	<b>Çizme yöntemi ile tatlandırma</b> .....	64
2.5	<b>HPLC analizi</b> .....	64
2.5.1	<b>HPLC Analizi İçin Ekstrakt Hazırlanması</b> .....	64
2.5.2	<b>HPLC ile oleuropein analizi</b> .....	64
2.6	<b>Antioksidan aktivite</b> .....	65
2.6.1	<b>Ekstraktların Hazırlanması</b> .....	65
2.6.1.1	Su Ekstraktının Hazırlanması.....	65
2.6.1.2	Etanol Ekstraktının Hazırlanması .....	65
2.6.1.3	Metanol Ekstraktının Hazırlanması .....	65
2.6.2	<b>Antioksidan Aktivite Yöntemleri</b> .....	66
2.6.2.1	Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi .....	66
2.6.2.2	DPPH Giderme Aktivitesi Belirlenmesi .....	66
2.6.2.3	DMPD Radikal Giderme Aktivitesi .....	67
2.6.2.4	Toplam Demir İndirgeme Gücünün Belirlenmesi.....	68
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>69</b>
3.1	<b>Serbest Enzim Çalışmaları</b> .....	69
3.1.1	<b><math>\beta</math>-Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması</b> .....	69
3.1.1.1	Ham Ekstraktın Hazırlanması .....	69
3.1.1.2	$\beta$ -Glukozidaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi.....	70
3.1.1.3	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması .....	73

3.1.2	<b>Zeytin <math>\beta</math>-Glukozidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi.....</b>	<b>76</b>
3.1.3	<b><math>\beta</math>-Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>77</b>
3.1.3.1	$\beta$ -Glukozidaz Enziminin <i>p</i> NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	77
3.1.3.2	$\beta$ -glukozidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....	80
3.1.3.3	$\beta$ -Glukozidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....	81
3.2	<b>İmmobilize <math>\beta</math>-Glukozidaz Enzim Çalışmaları.....</b>	<b>82</b>
3.2.1	<b>FT-IR analizi .....</b>	<b>82</b>
3.2.2	<b>Enzimin Süperparamanyetik Nanoparçacıklara Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi.....</b>	<b>84</b>
3.2.3	<b>İmmobilize <math>\beta</math>-Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>87</b>
3.2.3.1	İmmobilize $\beta$ -glukozidaz Enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerinin Belirlenmesi .....	87
3.2.3.2	İmmobilize Enzim Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....	89
3.2.3.3	İmmobilize enzim Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi....	90
3.3	<b>Ticari enzim çalışmaları .....</b>	<b>91</b>
3.3.1	<b>FTIR Analizi.....</b>	<b>92</b>
3.3.2	<b>Ticari Enzimin Nanoparçacıklara bağlanma kapasitesinin Belirlenmesi .....</b>	<b>94</b>
3.3.3	<b>Ticari Enzim <i>p</i>NPG Substratına Karşı <math>K_M</math> ve <math>V_{max}</math> Değerlerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>97</b>
3.4	<b>Serbest ve İmmobilize Enzim Farkının Belirlenmesi.....</b>	<b>100</b>
3.4.1	<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Saflaştırılan Serbest Zeytin <math>\beta</math>- Glukozidazı ve İmmobilize Zeytin <math>\beta</math>- Glukozidazı Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....</b>	<b>100</b>
3.4.2	<b>Serbest Ticari Enzim ve İmmobilize Ticari Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....</b>	<b>101</b>
3.4.3	<b>Serbest <math>\beta</math>-Glukozidaz , İmmobilize <math>\beta</math>-Glukozidaz ve İmmobilize Ticari Enzim <math>K_M</math> ve <math>V_{max}</math> Değerlerinin Karşılaştırılması.....</b>	<b>103</b>

3.4.4	Serbest $\beta$ -Glukozidaz Enzimi ve İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enzimi Optimum pH Değerlerinin Karşılaştırılması .....	104
3.4.5	Serbest $\beta$ -Glukozidaz Enzimi ve İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enzimi Optimum Sıcaklık Değerlerinin Karşılaştırılması.....	104
3.4.6	Serbest $\beta$ -Glukozidaz Enzimi ve İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Bekleme Koşullarının Belirlenmesi .....	105
3.4.7	Serbest Ticari ve İmmobilize Ticari Enziminin Bekleme Koşullarının Belirlenmesi.....	106
3.5	Zeytin Tatlandırma Deneyleri .....	107
3.5.1	Zeytin tatlandırmada en uygun yöntemin belirlenmesi .....	107
3.5.2	Optimum uygulama saatinin belirlenmesi .....	113
3.5.3	İmmobilize $\beta$ -glukozidaz enziminin kullanım sayısının belirlenmesi.....	114
3.5.4	Tatlandırma işlemi sonrası zeytin meyvesinin salamuraya alınması .....	131
3.6	Zeytin Meyvesinde Antioksidan Aktivite Belirlenmesi .....	131
3.6.1	Total Fenol İçeriğinin Belirlenmesi.....	131
3.6.2	DPPH Giderme Aktivitesi Belirlenmesi.....	132
3.6.3	DMPD Radikal Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi .....	135
3.6.4	Toplam İndirgeme Gücü Belirlenmesi.....	137
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	144
6.	KAYNAKLAR.....	145

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : Türkiye'nin İhraç Ettiği Siyah Zeytin (kg) [3].....	20
Şekil 1.2 : Türkiye'nin İhraç Ettiği Yeşil Zeytin (kg) [3].....	20
Şekil 1.3 : Zeytinin olgunlaşma aşamaları . 1. Temmuz-Ağustos, 2. Eylül-Ekim, .....	21
Şekil 1.4 : Zeytin meyvesinin kısımlarını gösteren dikey kesit [8]. .....	22
Şekil 1.5 : $\beta$ – Glukozidaz Enziminin Oleuropein Hidrolizi. ....	23
Şekil 1.6 : Glikozidik bağın gösterilmi [28]. ....	28
Şekil 1.7 : $\beta$ -Glukozidaz enzimlerinin genel üç boyutlu yapısı [57]. ....	30
Şekil 1.8 : $\beta$ -glukozidaz enziminin katalizleme mekanizması [45]. ....	31
Şekil 1.9 : $\beta$ -glukozidazın doğal substratlarından bazıları [45]. ....	32
Şekil 1.10 : $\beta$ -glukozidazın bazı yapay substratları [45]. ....	33
Şekil 1.11 : Selülozun moleküler yapısı [55].....	34
Şekil 1.12 : Selülozun enzim ile hidrolizi [56] .....	35
Şekil 1.13 : Lignin Biyosentezi .....	36
Şekil 1.14 : Kovalent bağlanma şematik gösterimi [69].....	42
Şekil 1.15 : Karbodiimid ile nanoparçacığın aktive edilmesi [75]. ....	44
Şekil 2.1 : Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin [50]. ....	56
Şekil 2.2 : Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 $\mu$ L hacimli pNPG standart grafığı. ....	59
Şekil 3.1 : Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	69
Şekil 3.2 : Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	70
Şekil 3.3 : Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik. ....	72
Şekil 3.4 : Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kolonundan zeytin $\beta$ - glukozidaz enziminin elusyon grafığı. ....	74
Şekil 3.5 : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntüsü. ....	76
Şekil 3.6 : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enziminin pNPG substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafığı. ....	79
Şekil 3.7 : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enziminin pNPG substratı ile elde edilmiş optimum pH grafığı. ....	80
Şekil 3.8: Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enziminin pNPG substratı ile elde edilmiş optimum sıcaklık grafığı. ....	81
Şekil 3.9: Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklara İmmobilize edilmiş zeytin $\beta$ -glukozidazının FT-IR spektrumu. ....	83
Şekil 3.10 : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enziminin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesi. ....	86
Şekil 3.11 : Farklı miktarlarda süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş zeytin $\beta$ -glukozidazının aktivite ve yüzeye	

tutunan protein ( $\beta$ -Glu/Fe, $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) miktarlarındaki değişim grafiği. ....	86
<b>Şekil 3.12</b> : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan vesüperparamanyetik nanoparçacıklaraimmobilize edilen $\beta$ -glikozidaz enziminin <i>p</i> NPG substratı ile elde edilmiş Lineweaver-Burk (Km ve Vmax) grafiği.89	
<b>Şekil 3.13</b> : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan ve süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş $\beta$ -glikozidaz enziminin <i>p</i> NPG substratı ile elde edilmiş optimum pH grafiği. ....	90
<b>Şekil 3.14</b> : Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan ve süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş $\beta$ -glikozidaz enziminin <i>p</i> NPG substratı ile elde edilmiş optimum sıcaklık grafiği. ....	91
<b>Şekil 3.15</b> : Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklara İmmobilize edilmiş ticari enzim FT-IR spektrumu. ....	93
<b>Şekil 3.16</b> : Ticari enzimin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesinin belirlenmesi .....	96
<b>Şekil 3.17</b> : Farklı miktarlarda süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş ticari enzim aktivite ve yüzeye tutunan protein ( <i>T.E/Fe</i> , $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) miktarlarındaki değişim grafiği. ....	96
<b>Şekil 3.18</b> : İmmobilize ticari enzimin <i>p</i> NPG substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği. ....	99
<b>Şekil 3.19</b> : Serbest ve immobilize zeytin $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitelerinin karşılaştırılması. ....	101
<b>Şekil 3.20</b> : Serbest ve immobilize ticari enziminin aktivitelerinin karşılaştırılması. ....	102
<b>Şekil 3.21</b> : Serbest ve immobilize Zeytin $\beta$ -glukozidaz enziminin +4 °C’de depolma kararlılığının belirlenmesi. ....	105
<b>Şekil 3.22</b> : Serbest ve immobilize Zeytin $\beta$ -glukozidaz enziminin +25 °C’de depolma kararlılığının belirlenmesi. ....	105
<b>Şekil 3.23</b> : Serbest ve immobilize ticari enzimin bekleme +4 °C’de depolma kararlılığının belirlenmesi. ....	106
<b>Şekil 3.24</b> : Serbest ve immobilize ticari enzimin bekleme +25 °C’de depolma kararlılığının belirlenmesi. ....	107
<b>Şekil 3.25</b> : Farklı acılık giderme işlemlerinin sofralık zeytin üretiminde oleuropein düzeylerine etkisi. ....	108
<b>Şekil 3.26</b> : Zeytinde farklı tatlandırma uygulamalarının kullanılması ile oleuropein düzeylerindeki azalma etkisi. ....	112
<b>Şekil 3.27</b> : İmmobilize zeytin $\beta$ -glikozidaz enziminin (İE) farklı sürelerde oleuropein düzeylerine olan etkisi. ....	113
<b>Şekil 3.28</b> : İmmobilize zeytin $\beta$ -glikozidaz enziminin zeytin tatlandırmada birden fazla kullanılması sonucu oleuropein hidrolizini belirlenmesi. ....	114
<b>Şekil 3.29</b> : Tablo 3.17’de belirtilen Ham zeytin örneğinin uygulamalar öncesi metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	115
<b>Şekil 3.30</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 1 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının	240

	nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	115
<b>Şekil 3.31</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 2 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	116
<b>Şekil 3.32</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 3 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	116
<b>Şekil 3.33</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 4 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	117
<b>Şekil 3.34</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 5 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	117
<b>Şekil 3.35</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 6 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	118
<b>Şekil 3.36</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 7 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	118
<b>Şekil 3.37</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 8 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	119
<b>Şekil 3.38</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 9 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	119
<b>Şekil 3.39</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 10 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	120
<b>Şekil 3.40</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 11 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	120
<b>Şekil 3.41</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 12 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	121
<b>Şekil 3.42</b>	: İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 13 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	121

<b>Şekil 3.43</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 14 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	122
<b>Şekil 3.44</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 15 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	122
<b>Şekil 3.45</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 16 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	123
<b>Şekil 3.46</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 17 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	123
<b>Şekil 3.47</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 14 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	124
<b>Şekil 3.48</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 14 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	124
<b>Şekil 3.49</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 20 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	125
<b>Şekil 3.50</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 21 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	125
<b>Şekil 3.51</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 22 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	126
<b>Şekil 3.52</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 23 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	126
<b>Şekil 3.53</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 24 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	127
<b>Şekil 3.54</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 25 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	127
<b>Şekil 3.55</b> : İmmobilize $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 26 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının	

240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı. ....	128
<b>Şekil 3.56</b> : Tatlandırma sonrası zeytin meyvesi salamurası. ....	131
<b>Şekil 3.57</b> : Total fenol içeriğinin belirlenmesinde kullanılan gallik asit standart grafiği. ....	132
<b>Şekil 3.58</b> : Su, etanol ve metanol ekstraktlarında DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi .....	133
<b>Şekil 3.59</b> : Su ekstraktlarında % DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi .....	134
<b>Şekil 3.60</b> : Etanol ekstraktlarında % DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi .....	134
<b>Şekil 3.61</b> : Metanol ekstraktlarında % DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi .....	135
<b>Şekil 3.62</b> : Su, etanol ve metanol ekstraktlarında DMPD radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi .....	136
<b>Şekil 3.63</b> : Su, etanol, metanol ekstraktlarından toplam indirgeme gücünün belirlenmesi .....	137



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1 :</b> Dünya Zeytin Üretimi [3] .....	18
Tablo 1.2 : Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri. ....	40
<b>Tablo 1.3 :</b> İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması [70]. ....	43
<b>Tablo 2.1 :</b> SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları .....	53
<b>Tablo 2.2 :</b> İmmobilize enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti miktarları. ....	62
<b>Tablo 3.1 :</b> Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri ve amonyum sülfat miktarı. ....	71
Tablo 3.2 : Saflaştırma Tablosu .....	75
<b>Tablo 3.3 :</b> Zeytin $\beta$ -glukosidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri. ....	78
<b>Tablo 3.4 :</b> Zeytin $\beta$ -glukosidaz enziminin pNPG substratlara karşı $K_M$ , $V_{max}$ ve $V_{max} / K_M$ değerleri.....	79
<b>Tablo 3.5 :</b> Zeytin ( <i>Olea europea L.</i> ) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan $\beta$ -glikozidaz enziminin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan protein ve nanoparçacık miktarları. ....	85
<b>Tablo 3.6 :</b> Zeytin $\beta$ -glukosidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	88
<b>Tablo 3.8 :</b> Ticari Enzimin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan protein ve nanoparçacık miktarları .....	95
<b>Tablo 3.9 :</b> İmmobilize ticari enzimin pNPG substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	98
<b>Tablo 3.10 :</b> İmmobilize ticari enziminin pNPG substratlara karşı $K_M$ , $V_{max}$ ve $V_{max} / K_M$ değerleri.....	99
<b>Tablo 3.11 :</b> Serbest enzim ve immobilize $\beta$ -glukozidaz enzimin protein miktarları ve aktiviteleri. ....	100
<b>Tablo 3.12 :</b> Serbest enzim ve immobilize ticari enzimin protein miktarları ve aktiviteleri.....	102
<b>Tablo 3.13 :</b> Serbest $\beta$ -glukozidaz, immobilize $\beta$ -glukozidaz ve immobilize ticari enziminin pNPG substratlara karşı $K_M$ , $V_{max}$ ve $V_{max} / K_M$ değerleri. ....	103
<b>Tablo 3.14:</b> Serbest ve immobilize zeytin $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değerlerinin Karşılaştırılması. ....	104
<b>Tablo 3.15:</b> Serbest ve immobilize zeytin $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklıklarının karşılaştırılması. ....	104
<b>Tablo 3.16 :</b> Zeytin tatlandırma için kullanılan farklı yöntemlerle oleuropein hidrolizinin karşılaştırılması.....	110

- Tablo 3.17 :** İmmobilize  $\beta$ -glukozidaz enziminin zeytin tatlandırma işleminde tekrar kullanılması sonucu oleuropein hidrolizi miktarları. .... 129
- Tablo 3.18 :** Denemelerde kullanılan Edremit çeşidi yeşil zeytin örneklerinin su, etanol ve metanol ekstraktlarına ait total fenol miktarları. .... 132

## SEMBOL LİSTESİ

SDS-PAGE : Soydum dedosilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi

EÜ : Enzim Ünitesi

DNA : Deoksiribonükleik Asit

RNA : Ribonükleik Asit

UV : Ultra Viole

IR : Infra Red

TEMED : N,N,N',N',-tetrametilemetilendiamin

*p*NPG : Para-nitrophenyl- $\beta$ -d-glukopiranozid

*o*NPG : Orto-nitrophenyl- $\beta$ -d-glukopiranozid

*p*NPGal : Para-nitrophenyl- $\beta$ -d-galaktopiranozid

*o*NPGal : Orto-nitrophenyl- $\beta$ -d-galaktopiranozid

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

DTT : Dithiothreitol

BSA : Sığır Serum Albumini

DMPD : N, N-dimethyl-p-phenylenediamine

DPPH	: Di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
Tris	: Trihidroksi metil aminometan
FTIR	: Fourier transform infrared spectroscopy
KBr	: Potasyum bromür
S.E.	: Serbest enzim
T.E.	: Ticari enzim
İ.E.	: İmmobilize ezim
T.İ. E.	: Ticari immobilize enzim
[S]	: Substrat Konsantrasyonu
[K <sub>M</sub> ]	: Michaelis- Menten Sabiti
[V <sub>max</sub> ]	: Maksimum Hız
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: Kilogram

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimde hep yanımda olan, önümde aşmam gereken birçok engelimin olduğunu ve bu engelleri aşmamda yardımcı olan, tecrübelerini esirgmeden aktaran, üzerimde büyük emeği olan, her zaman daha fazla çalışmamı söyleyen, ilim ve tecrübelerinden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm kıymetli hocalarım Sayın Yrd.Doç.Dr. Elif SAVAŞ'a ve Sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın deneysel aşamalarında engin bilgilerinden faydalandığım maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen Prf. Dr.Hakan KÖÇKAR ve Doç. Dr. Öznur KARAAĞAÇ 'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince beni hep destekleyen hocalarım Yrd.Doç.Dr Hatice YILDIRIM, Yrd.Doç.Dr Sümeyye AYDOĞAN, Dr.Ayla SOLMAZ AVCIKURT, Yrd.Doç.Dr.Fatma Bahar SUNAY, Dr.Meltem ALPER ve Dr.Esra TOKAY'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında hoşgörü ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof..Dr. Selma SİNAN, Yrd.Doç.Dr. Hatibe KARA, Prof.Dr.Turgut KILIÇ'a çok teşekkür ederim.

Çalışma Arkadaşlarım Tuğşen AYDEMİR, Derya OKUYAN, Gizem GÜLER, Serhat ONAT, Fatma POYRAZLI, Sinem GÜLTEKİN, Gamze GÜNGÖR, Sevgi BAYSALA'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans boyunca her zaman yanımda olan, mutluluğumu ve sıkıntılarımı paylaştığım hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Merve KARAMAN, Ceylan TOPRAK, Kadriye ZENGİN, Fatma GÜNGÖR, Nurten GÜNGÖR ve Fatih Sultan KAZDAL'a desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans dönemi boyunca her türlü sıkıntımı üzüntümü zsevincimi paylaştığım, emeklerini hiçbir zaman ödeyemegeceğim Annem Turunç KAYA, Babam Saim KAYA, Abim ve Hocam Yrd. Doç. Dr. M. Oğuzhan KAYA, Kardeşim Zeynep KAYA ve Yeşim KAYA, Yeğenim M. Onurhan KAYA'ya her zaman benimle birlikte oldukları ve olacakları için çok teşekkür ederim.

Son olarak bu tezi hayatlarımı bizim eğitimimize adayan, Anneme ve Babama armağan etmek isterim...

## 1. GİRİŞ

Zeytin binlerce yıllık geçmişi ile mitolojiye konu olmuş önemli bir meyvedir. Zeytinyağı ve sofralık zeytine işlenerek tüketimi gerçekleştirilen bu meyvenin güçlü antioksidant etkisi ile birçok hastalığın önlenmesinde besinsel önemi bulunmaktadır. Sahip olduğu antioksidant özellikteki maddeler arasında zeytinde en çok bulunan ve taze zeytine acı tat veren oleuropein bulunmaktadır. Oleuropein nedeniyle zeytin taze olarak tüketilemeyecek derecede acılık içermektedir. Zeytinin sofralık zeytine işlenmesinde geleneksel olarak günümüze kadar gelen yöntemlerin birçoğu oleuropeinin hidrolize edilerek dönüşüm ürünlerinin aroma özelliklerini iyileştirmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemlerden birçoğu NaOH ile zeytine acılık veren oleuropeinin hidrolizini içermektedir. Ancak ne yazık ki bu uygulama hem zeytinin besin bileşenlerine ve hem de aroma özelliklerine zarar vermekte, böylelikle bu ürünlerden beklenen faydalar ortadan kalkmaktadır.

Doğallıktan uzaklaşmaksızın tüketilebilir nitelikte sağlıklı besin üretimi ile ilgili araştırmalar gıda sanayiinde enzimatik yöntemlere olan ilgiyi artırmaktadır. Özellikle besinlerin içerdiği doğal enzimlerin kullanımı, besin kalitesinin artışı yanı sıra doğal olma özelliğinin kazandırılması anlamında büyük önem taşımaktadır. Bu durumdan hareketle sofralık zeytin üretiminde doğal yöntem arayışlarının bir sonucu olarak zeytin meyvesinin doğasında bulunan bir enzim olan  $\beta$ -glukozidaz enziminin oleuropein hidrolizinde kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Laboratuvar denemelerinde farklı araştırmacılar tarafından  $\beta$ -glukozidaz enziminin saf, liyofilize enzim preparatı olarak sofralık zeytin üretiminde kullanımı ile ilgili başarılı sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Bitkinin olgunlaşma sürecinde benzer kimyasal mekanizma ile aroma oluşumunu sağlayan bu enzimin saflaştırılarak konsantre formda sofralık zeytin üretiminde kullanılması son derece doğal sonuç verecektir. Enzim katalizli süreç, daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler. Ancak, serbest enzimin aktivitesini ve kararlılığını hızlı bir şekilde kaybetmesi, kullanılan enzimin uygulama sonrası geriye kazanımının oldukça güç olması endüstriyel boyutta enzim

kullanımını sınırlayan nedenlerden bazılarını oluşturmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda tekrar kullanılabilirlik büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla geliştirilmiş teknikler arasında yer alan enzim immobilizasyonu, enzim üç boyutlu yapısını değiştirerek enzim kararlılığında ve aktivitesinde önemli değişiklikler yaratan bir uygulamadır. Immobilizasyonda kullanılan nanoparçacıklar özellikle immobilize enzimin geri kazanımında önemlidir. Nanoparçacıklarla yapılan çalışmalarda manyetik nanoparçacıklar bu nedenle hedeflemenin yapılabilmesi ve geri kazanım düşünüldüğünde oldukça önem kazanmıştır.

## 1.1 Zeytin

Etimolojik kökeni yağ olan zeytin ağacının geçmişi 12 bin yıl öncesine dayanmaktadır [1,8]. Kökeni mezopotamyanın üst bölgeleri olan zeytin, dünya genelinde 30° ve 40° enlemleri arasında Kuzey Yarım Kürede yetiştirilmektedir. Oldukça dayanıklı yapıya sahip olup, deniz seviyesinden 700 m yüksekliğe kadar olan ve en düşük sıcaklığın -8°C olduğu yerlerde bile yetişebilmektedir. Zeytin üretiminin % 98 'i Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri kaynaklıdır (Tablo 1.1) [2].

**Tablo 1.1 : Dünya Zeytin Üretimi [3]**

Ülkeler	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/2012	2012/2013	2013/2014
<b>Cezayir</b>	91.000	98.000	136.000	128.000	145.500	175.000	168.500
<b>Fas</b>	100.00	100.000	90.000	120.000	100.000	100.000	100.000
<b>Suriye</b>	100.000	120.000	135.000	142.000	172.000	172.000	172.000
<b>Türkiye</b>	200.000	300.000	390.000	330.000	400.000	410.000	430.000
<b>İspanya</b>	553.000	485.700	492.600	608.600	521.500	487.700	513.100
<b>Yunanistan</b>	95.000	105.000	107.000	135.000	130.000	160.000	94.000
<b>İtalya</b>	55.700	68.500	58.600	69.700	75.700	76.000	74.000

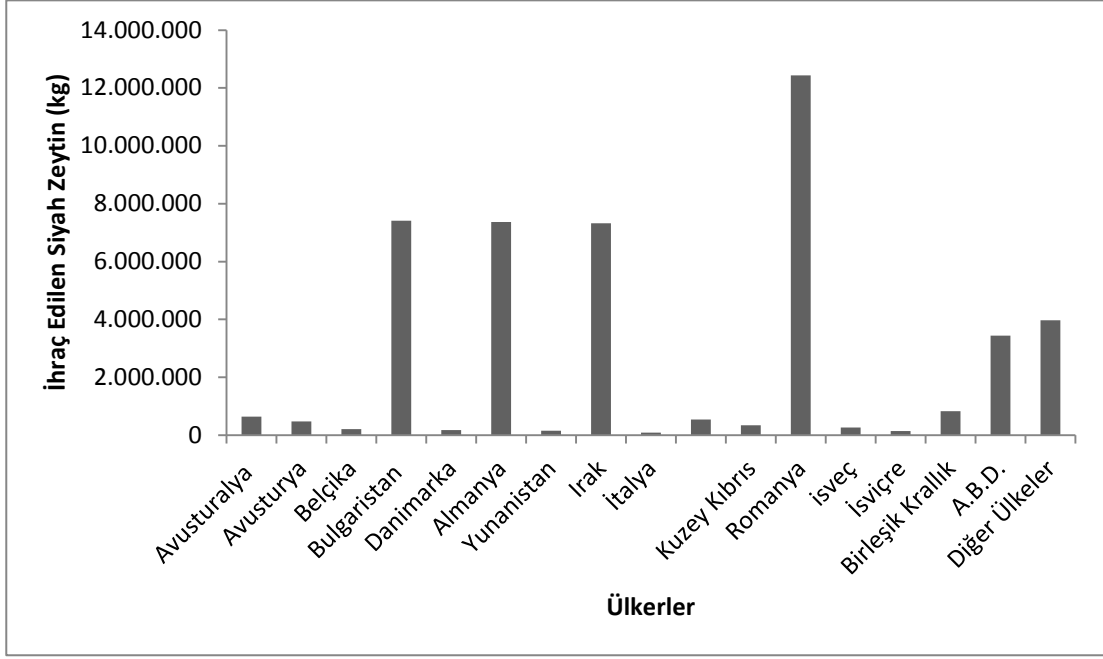
Zeytin meyvesi kültüre alınan 180 tür ve 30 cinsi içeren Oleaceae familyasına dahildir [4]. Tek yenilebilir özelliğe sahip türü olan *Olea europaea L.* dir. *Olea europaea L.*'nin sistematigi aşağıda belirtilmiştir.

Alem : Yeşil bitkiler  
Alt Alem : Tracheobionata  
Superdivision : Spermatophyta  
Division : Magnoliophyta  
Sınıf : Magnoliopsida  
Altsınıf : Asteridae  
Ordo : Lamiales  
Aile : Oleacea  
Cins : Olea  
Tür : *Olea europaea*

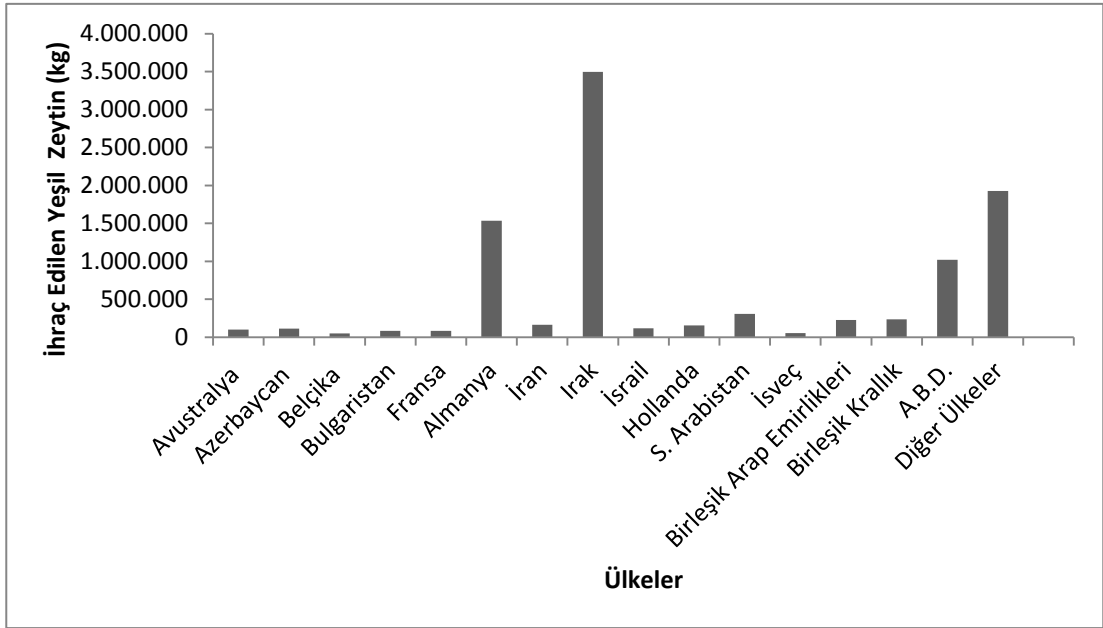
Türkiye'de 88 çeşit zeytin bulunduğu ve bunların %74'ünü Memecik oluştururken, ikinci önemli zeytin çeşidinin ise Ayvalık çeşidinin oluşturduğu belirtilmektedir. Diğer önemli zeytin çeşitleri arasında Gemlik, Domat, Uslu, Memeli, İzmir Sofralık, Yamalak, Edincik Su, Çelebi, Halhalı, Karamürsel Su, Çilli, Kaba, Erkence, Trilya çeşitleri bulunmaktadır [5].

Türkiye de zeytin üretiminin % 65'i zeytinyağı olarak işlenirken % 35'i sofralık zeytin olarak işlenmektedir [2]. Türkiye de sofralık olarak işlenen zeytinlerin % 85 siyah ve % 15 i yeşil ve rengi dönük zeytin oluşturmaktadır. Türkiye zeytin ticareti ekonomimizde büyük önem taşımaktadır (Şekil 1.1 ve Şekil 1.2) [3].





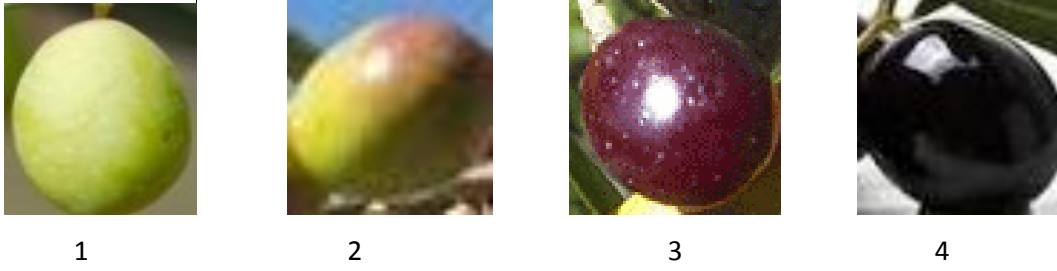
Şekil 1.1 : Türkiye'nin İhraç Ettiği Siyah Zeytin (kg) [3]



Şekil 1.2 : Türkiye'nin İhraç Ettiği Yeşil Zeytin (kg) [3]

Zeytin meyvesinin şeker miktarı, % 2,5-6 oranında diğer çekirdekli meyvelere nispeten daha azdır [8-11]. Yağ oranı ise % 15-30 civarı olmasıyla birlikte diğer tek çekirdekli meyvelerde bu oran % 1,5 dur [6]. Zeytinde yağ birikimi

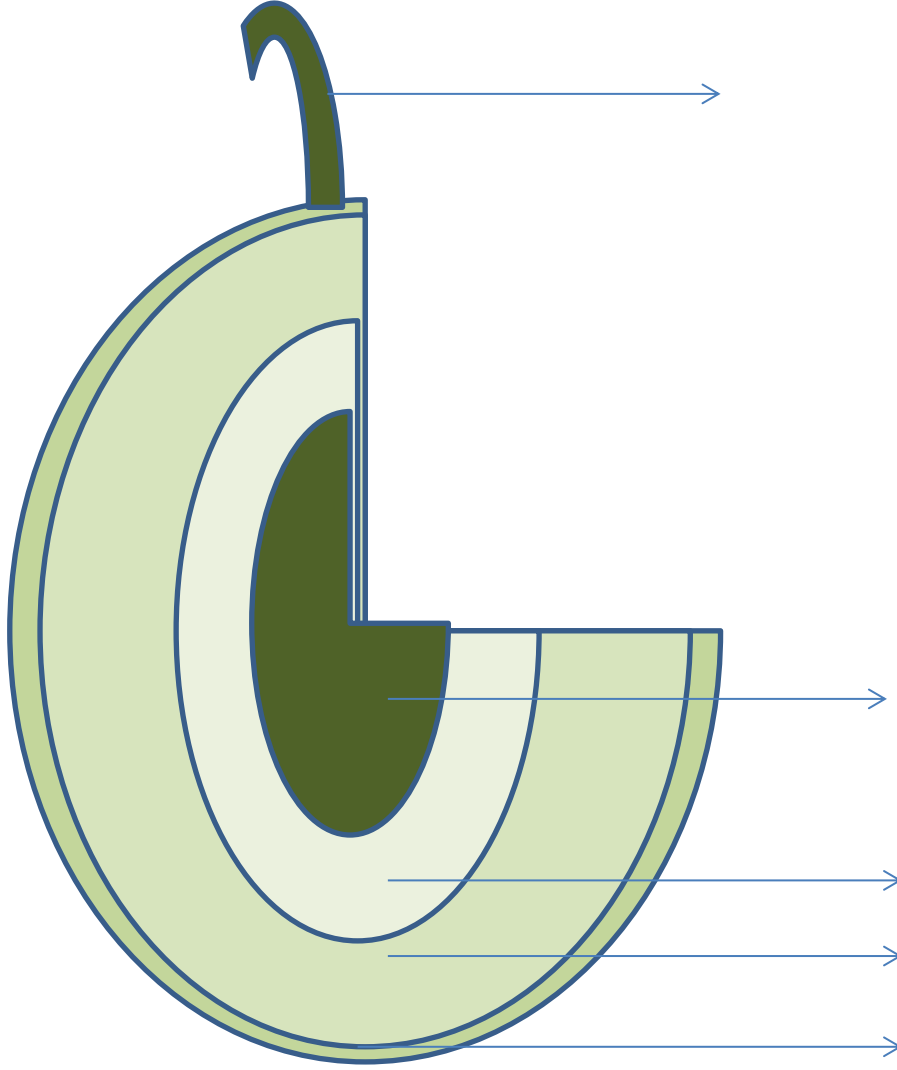
hücrelerin gelişimiyle (Temmuz - Ağustos) başlar ve olgunluğa kadar (Ekim - Aralık) devam eder [12]. Meyvenin yağ içeriği, olgunluk ilerledikçe artar ve ağaç üzerinde yeşil meyve kalmayınca en yüksek seviyeye ulaşır. Bu zamandan sonra ağırlığına göre, meyvenin toplam yağ içeriği pratik olarak sabit kalmakla birlikte, toplam yağın yüzdesi meyvenin su kaybetmesiyle artar [13].



**Şekil 1.3 :** Zeytinin olgunlaşma aşamaları . 1. Temmuz-Ağustos, 2. Eylül-Ekim, 3. Kasım, 4. Aralık. [5]

Olgunlaşmanın ilk aşamalarında klorofil birikimi nedeniyle kabuk rengi parlak yeşildir, daha sonra solgun yeşil, saman sarısı, pembe, mor-pembe ve siyaha dönüşür. Bu renk değişimine klorofillerin, karotenoidlerin ve antosiyaninlerin dengesiz ve değişken konsantrasyonları sebep olmaktadır (Şekil 1.3) [14].

Zeytin meyvesi epikarp (kabuk), mezokarp (et), endokarp (çekirdek) olmak üzere 3 kısımdan oluşur (Şekil 1.4) [8]. Koruyucu doku olan epikarp, zeytin ağırlığının % 1-3 ünü oluşturur. Kabuktaki kitin ve mumsu tabaka suyun meyve içerisine girmesini engelleyip, meyveyi fiziksel hasarlardan, küf ve böceklerden koruduğu için epikarp sofralık zeytin üretiminde büyük önem taşır. Mezokarp zeytinin kabukla beraber yenilebilir kısmını teşkil etmekte ve tüm meyvenin %70-80'nini oluşturmaktadır [14]. Zeytinde kabuk/et kısmı parankimatik hücrelerden oluşmuştur. Meyve etinin (mezokarp) parankimatik hücreleri, doymamış yağ asitleri ile A, D, E ve K vitaminlerini ve bazı temel mineralleri de yapısında bulundurması dolayısıyla insan için besleyici ve biyolojik değeri büyüktür [2].

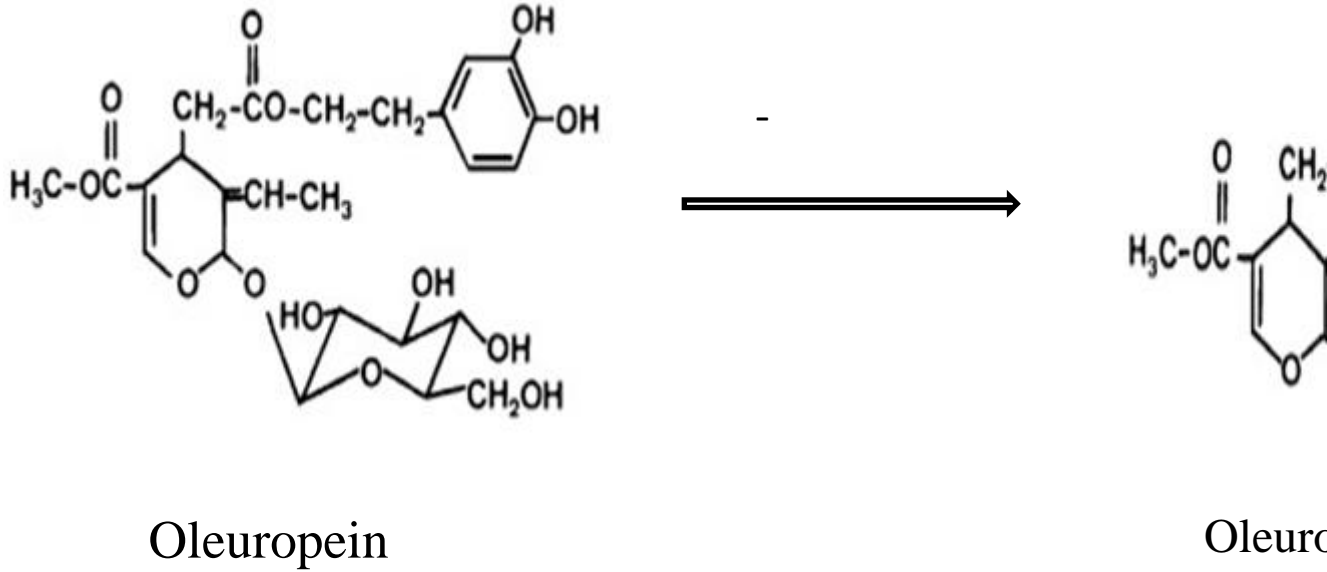


**Şekil 1.4 :** Zeytin meyvesinin kısımlarını gösteren dikey kesit [8].

Akdeniz Beslenme Kültürü'nün en önemli bileşeni olan zeytin ve zeytinyağı, içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle, başta kalp ve damar hastalıkları olmak üzere, safra kesesi hastalıkları ve bağırsak kanseri [15,16] gibi sindirim sistemi hastalıklarını önleyici etkisi ile son yıllarda pek çok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Zeytin; oleuropein, luteolin, verbaskosit, dimetil oleuropein, elenolik asit, rutin, tirosol ve hidrokstirosol basta olmak üzere yaklaşık 40 adet fenolik bileşen içermekte ve bunlar yüksek oranda antioksidan aktivite göstermektedir [17].

Elenolik asit ve hidrokstirosolün bir esteri olan oleuropein, taze zeytinin en önemli fenolik bileşenlerindendir [18]. Bu önemli fenolik bileşik, zeytine özgü olup, bitkinin bütün kısımlarında bulunur [19] ve diğer çekirdekli meyvelerin yanı sıra tüm meyvelerden ayırt edici bir özelliğe sahip olmasını sağlar [8]. Meyvenin

olgunlaşması sırasında dönüşüme uğrayan fenolik yapıda bir bileşik [20] olmasına ve olgunlaşma ile miktarının azalmasına [21] karşın oleuropeinin zeytin meyvesine verdiği acılık olgunluk hatta aşırı olgunluk sürecinde dahi devam etmektedir [8]. Zeytin meyvesi bu sebepten dolayı direkt olarak tüketilmeyen tek meyvedir. Zeytin meyve taneleri tüketilmeden önce oleuropeinin hidroliz edilmesini esas alan acılık giderme işleminden geçmektedir. Bu acılık giderme işlemleri farklı yöntemler uygulanarak yapılabilir. Zeytinin işlenmesi ile oleuropein bulunan meyvede işleme sonrası sonrası hidroksitirozol bulunur. Ham meyvenin ilk gelişim dönemi, oleuropeinin en bol bulunduğu dönemdir ve kuru maddenin % 14 ünü oluşturur. Olgun yeşil meyvede % 14 den az olmasına rağmen oleuropein miktarı yine de çok fazladır [14]. Olgunlaşmanın devamı ile siyaha dönen meyvelerde oleuropein miktarı düşmeye devam eder.



**Şekil 1.5 :**  $\beta$  – Glukozidaz Enziminin Oleuropein Hidrolizi.

Olgunlaşma süresindeki acılığın azalması meyve dokusunda bulunan  $\beta$ -glukozidazın oleuropeini hidrolizi ile gerçekleşmektedir (Şekil 1.5). Bu durumdan yola çıkarak enzimatik oleuropein hidrolizi ile sofralık zeytin üretiminde acılık giderme yapılabilmektedir [22].

Uluslararası Zeytin Konseyinin (IOC) sofralık zeytin tanımına göre zeytinler, et/çekirdek oranı, et kalınlığı, tadı, sertliği, çekirdekte ayrılma kolaylığı özelliklerine göre seçilir. Yeme olgunluğundaki zeytin meyvesi pazar talepleri dikkate alınarak yeşil ya da siyah olgunluk döneminde farklı yöntemlerle sofralık zeytine işlenir. Sofralık zeytin üretiminde en çok uygulanan yöntemler; Kaliforniya Yöntemi, İspanyol Yöntemi ve doğal fermente salamura yöntemidir. Bu yöntemler temelde NaOH (kostik) uygulaması, salamura değişimi ya da musluk suyu ile acılık giderme basamaklarını içermektedir. Oleuropein hidrolizinde hızlı sonuç veren ve uygulama kolaylığı nedeniyle birçok yöntem NaOH (kostik) ile acılık giderme işlemini içermektedir. Ancak NaOH içeren yıkama sularında zeytinin bekleme süresi ve kostikleme sayısı zeytinin besin bileşenlerine büyük ölçüde zarar vermektedir [22].

## 1.2 Sofralık Zeytin Üretimi

Sofralık zeytin üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir:

İspanyol Yöntemi;

Bu yöntem, yeşil zeytinlerin işlenmesinde kullanılmaktadır. İşlem; alkali uygulaması ile acılık giderme, yıkama ve fermentasyon aşamalarından oluşmaktadır [28]. Alkali uygulaması; meyvenin çeşidine, olgunluğuna ve sıcaklığa bağlı olarak 8-22 saat süreyle (Meyve etinin %70'ine difüze oluncaya dek) %1-2,5 w/v sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi içinde bekletilmesiyle oleuropeinin hidrolizi esasına dayanmaktadır. Ardından meyve etinin büyük bölümüne (3/4 üne) alkali etki ettikten sonra alkali uygulaması sonlandırılarak, zeytinler alkali kalıntılarının giderilmesi için su ile yıkanır. Yıkama işleminde alkali kalıntılarının nötürlenmesini sağlamak ve yıkama işleminin süresini kısaltabilmek için asitlendirilmiş su ile yıkama işlemi de uygulanabilmektedir. Bu amaçla asetik asit ve hidroklorik asit kullanılan asitler arasındadır. Yıkama sonunda işlem görmüş zeytinler farklı şeker, tuz (% 5-9 w/v) içeriğine sahip, salamura içinde kontrollü veya doğal fermentasyona bırakılır. Bu yöntemin farklı bir versiyonu olan Sevilla sisteminde işlem sonunda fermentasyon

salamuralarına klorofil a ve klorofil b'nin sulu çözeltileri ilave edilerek yeşil renk kayıpları giderilmeye çalışılır.

#### Kaliforniya Yöntemi (Ripe Olive) ;

Bu yöntem, rengi yeşilden siyaha kadar değişen, her olgunluk dönemindeki zeytinlerin işlenmesinde uygulanmaktadır [14]. Bu yöntemde alkali ile acılık giderme; yıkama ve havalandırma ile fermentasyon aşamaları mevcuttur. Ayıklama ve boylamanın ardından zeytinler %1-2 (w/v) sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinde, yaklaşık 22 saat, meyve etinden çekirdeğine kadar olan bölüme işleyinceye kadar bekletilir. Alkali uygulamasının ardından zeytin meyveleri su ile yıkanır ve havalandırılır. Böylelikle renk koyulaşır. Zeytin meyvesinin yüzeyinde buruşmalar ve yumuşama oluşur. Fermentasyon aşaması İspanyol Yöntemi'nden farklı olarak yıkama işleminin ardından ferroglyukonat bileşikleri ile renk sabitlemesi ve sterilizasyon aşamalarını içermektedir. Sterilize edilen zeytinler, anaerobik koşullarda %5-9 (w/v) NaCl içeren salamura içerisinde birkaç ay depolanır. Bu yöntem meyve dokusunda dramatik değişikliklere sebep olmaktadır. Özellikle yüzeyde yumuşama son ürünün pazarlanmasında problemlere neden olmaktadır. Koyu renk sabitlemesi amacıyla zeytin havuzlarına ilave edilen ferroglyukonat bileşikleri, demir ( $Fe^{+2}$ ) içeren bileşikler olup zeytinde bulunan fenolik bileşiklerin havadaki oksijenle oksidasyonunu artırarak, renkte koyulaşma meydana gelmesini sağlamaktadırlar. Havalandırmanın etkisi olarak karşılaşılan bu durum sonrasında renkte meydana gelen değişikliğin homojenizasyonu için ferroglyukonat bileşikleri salamuraya ilave edilerek zeytin tanesinin her yerinde eşit olarak siyahlaşma sağlanmaya çalışılır. Son olarak ürünlerin raf ömrünü artırmak amacıyla otoklavlanarak steril hale getirilir.

#### Gemlik Yöntemi;

Daha çok sofralık siyah zeytin üretimi için uygulanan geleneksel bir yöntem olup, ticari olarak da geniş uygulama alanına sahiptir (Uylaşer ve Şahin, 2003). Bu yöntem yıkama, salamuralama, fermentasyon ve renk sabitleme yöntemlerinden oluşmaktadır. Yıkama sonrası zeytin meyveleri kap hacminin yaklaşık % 60'ını kaplayacak şekilde %5-9 (w/v) tuz içeren salamuraya yerleştirilerek hava almayacak şekilde kapatılarak birkaç ay fermentasyona bırakılır. Sağlıklı bir fermentasyonda salamurada pH 4.5-4.0'e düşerek zararlı, zar yapıcı mayaların ve fermentasyonu

bozacak diğerk unsurların gelişmesi engellenmiş olur. Acılık giderme işlemlerinin ardından oluşan koyu renk sabitlenmesi amacıyla zeytin havuzlarına ferro-glukonat bileşikleri ilave edilmektedir. Bahsedilen bileşikler demir (Fe <sup>+2</sup>) içeren bileşikler olup, zeytinde bulunan fenolik bileşiklerin havadaki oksijenle oksidasyonunu artırarak, renkte koyulaşma meydana gelmesini sağlamaktadırlar.

#### Çizme Yöntemi;

Bu yöntemle daha çok sofralık yeşil zeytin üretimi gerçekleştirilmektedir [28]. Çizme, acılık giderme, fermentasyon aşamalarından oluşan bu yöntemde; ön işlemlerini tamamlamış (seçme, ayıklama, sınıflandırma, yıkama) yeşil zeytinler iki ya da üç bıçaklı çizme makinaları ile çizilerek, % 3-5 (w/v) tuz içeren salamura ya da su içine bırakılır. Çizilen yeşil zeytinlerin içinde buldukları salamura haftada 2 kez değiştirilerek acılık giderme işlemi gerçekleştirilir. Bu amaçla salamura kullanımı daha iyi sonuç verdiği için tercih edilmektedir. Bu işleme birkaç hafta acılık tamamen ya da büyük ölçüde giderilinceye kadar devam edilir. Acılık giderme işleminin ardından % 5-9 (w/v) tuz içeren salamura içinde fermentasyona bırakılan zeytinler, 1 ay süreyle anaerobik koşullarda (havasız ortam) kapakları açılmaksızın bekletilerek, fermentasyonun gerçekleşmesi sağlanır. Bu yöntemle elde edilen zeytinler kimyasal kullanımına gerek duyulmadan elde edildikleri için, bahsedilen yöntem doğal fermentasyon olarak da bilinir. Çizme yöntemiyle acılık giderme işlemi ile zeytinler doğal renge sahip, aromatik ve kendine has yeşil renkte zeytinlerdir. Ancak salamuradan çıkarılıp tüketime sunulduğunda bu zeytinlerin rengine koyulaşma olmaktadır. Bu durum havadaki oksijenle temas sonrası doğal fenolik bileşiklerin oksidasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

#### Enzimatik Acılık Giderme;

“Hızlı yöntem” olarak da bilinmektedir. Enzimle acılık giderme işlemi, kısa sürede sonuç veren bir yöntem olmasına rağmen, enzimin tekrar kullanılamaması (tek kullanımlık) sonucu, maliyet yükselmektedir. Yöntem detayları aşağıda belirtilmiştir [24]. Zeytinler; yıkama, ayıklama ve sınıflandırma işlemlerinin ardından, enzimle acılık giderme işlemi amacıyla havuzlara alınır. Farklı konsantrasyonlarda ticari enzim preparatı zeytin kütlesi veya kap hacmi üzerinden hesaplanarak, önceden belirlenmiş miktarlarda zeytin üzerine uygulanır. Enzim preparatları toz halde bulunur. Uygulama sırasında sulandırılarak kullanılmaktadır.

Enzimle acılık giderme işlemi yine önceden saptanan sürelerde 6-24 saat süre ile uygulanmaktadır. Enzim uygulamasının ardından enzim çözeltisi bulunan havuzlardan alınan zeytinler belirli tuz (w/v) ve şeker içeren salamuralarda fermentasyona bırakılır. Kontrollü şartlarda laktik asit bakterileri ile gerçekleştirilen fermentasyon, doğal şartlarda zeytin meyvesine asit doğal flora (bakteri yükü) ile de gerçekleştirilebilmektedir.

### 1.3 $\beta$ -Glukozidaz

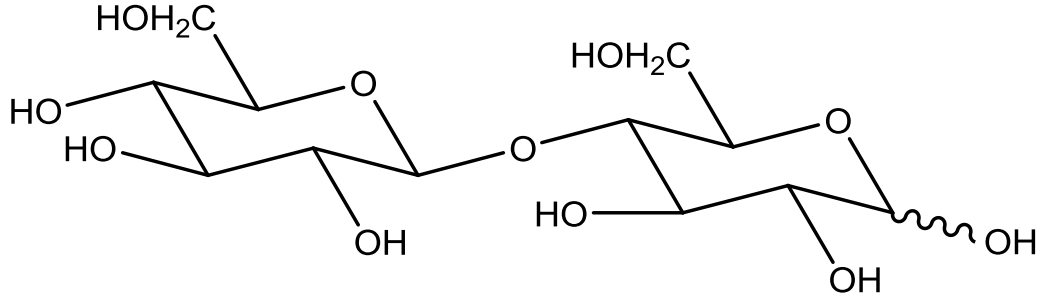
#### 1.3.1 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Biyokimyası

$\beta$ -glukozid glukohidrolazlar (EC 3.2.1.21) olarak adlandırılan, mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi oldukça geniş çapta bir canlı grubunda bulunan  $\beta$ -glukozidazlar, iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikoz ve bir aril veya alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki  $\beta$ -glikozidik bağı hidroliz eden enzimlerdir [57] (Şekil 1.6).

$\beta$ -glukozidik bağ







**Şekil 1.6 :** Glikozidik bağın gösterilmi [28].

$\beta$ -glukozidazlar, 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. Glikozid hidrolazlar Henrissat tarafından 95 enzim ailesi olarak sınıflandırılmıştır. Bu enzim grubunda yer alanlardan O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler de EC.3.2.1. alt sınıfında bulunmaktadır [29-33].

### EC 3. Hidrolazlar

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

##### EC 3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [29-30]

##### EC 3.2.1.21 $\beta$ -glukozidazlar (1,4- $\beta$ -glukozidaz) [34]

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

##### EC 3.2.3. S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler[30,31]

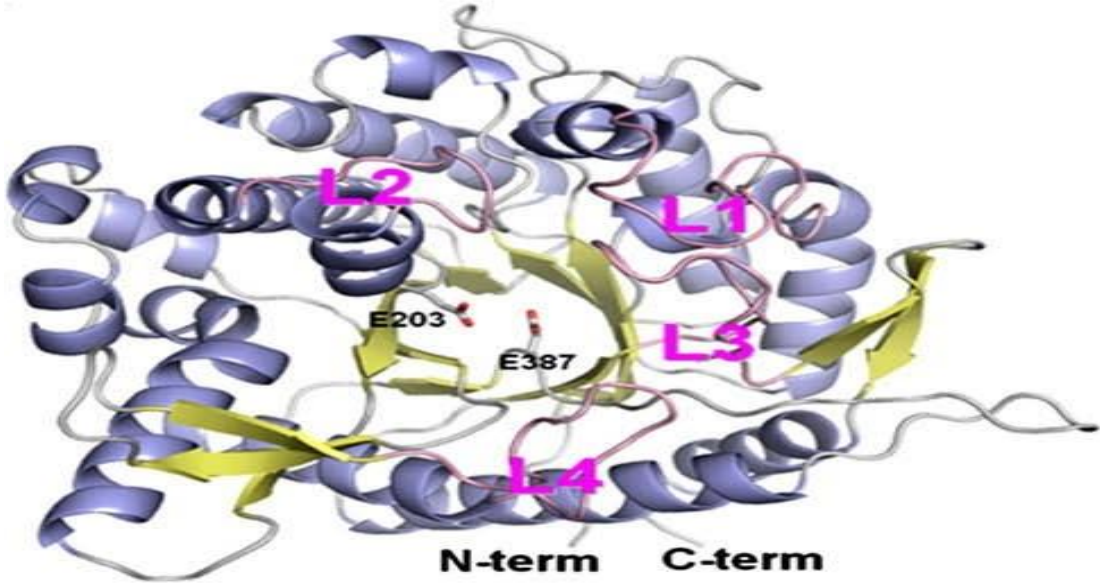
Ökaryot, arkea ve bakterilerde bulunan Glikozid Hidrolaz (GH) Aile1 enzimleri GO- X ya da G-S-X tipindeki substratları hidroliz etmektedirler. Burada G  $\beta$ -bağlı glukozil, galaktozil, mannozil, fukoil, 6-fosfoglukozil ya da 6-fosfagalaktozil rezidüsünü, X ise diğer glikozil rezidüsünü yada aglikonu temsil eder [35].

Aile 1  $\beta$ -glukozidaz 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 oluşturlar [36-39].

### 1.3.2 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Özellikleri ve Yapısı

Literratür de Aile 1  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin monomerleri sodyum dedosilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi page elektroforezinde 55 – 60 kDa büyüğünde olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen bu monomerlerin polipeptid uzunlukları 447 aminoasitten (*Bacillus polymixia*'da olduğu gibi) 527 aminoasite (Beyaz hardal mirosinazı) kadar değisebilmektedir. Dikotil bitkilerden ve hayvanlardan saflaştırılan tüm  $\beta$ -glukozidazlarda hesaplanan monomerlerin molekül büyüklüklerinin, cDNA ya da genomik DNA'dan hesaplanan molekül büyüklüklerine göre 3-5 kDa daha uzun olduğu tespit edilmistir [40]

$\beta$ -glukozidazlar pH 4-10 arasında kararlı olduğu ve en yüksek stabilitenin ise ~pH 7 civarında olduğu bulunmuştur. Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmalarında da ise 0-4°C arası en kararlı durumda olduğu, 55-60 °C'nin üzerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive oldukları ve 50-55 °C'lerde en yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir [40].

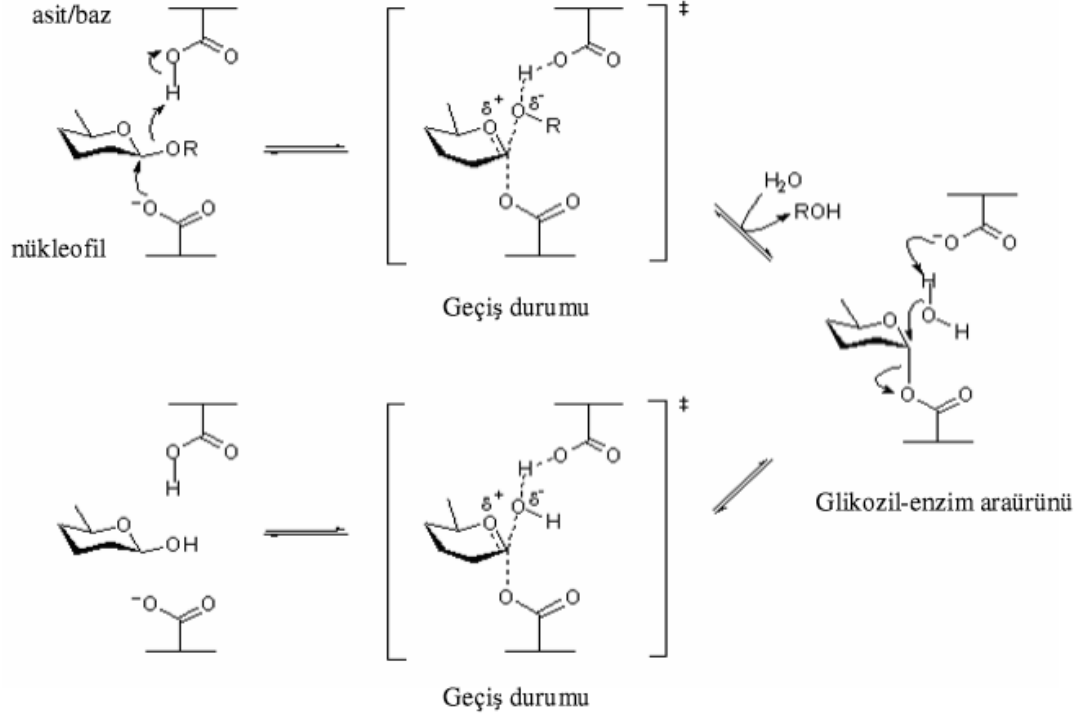


Şekil 1.7 :  $\beta$ -Glukozidaz enzimlerinin genel üç boyutlu yapısı [57].

### 1.3.2.1 Enzimin Katalitik Mekanizması

Tüm Aile 1  $\beta$ -Glukozidazları, bir anomerik karbon ve glikozidik oksijen arasındaki  $\beta$ -glukozidik bağları hidroliz mekanizmaları benzerlik gösterir. Bir  $\beta$ -glukozidin glikon ve aglikon kısımları arasındaki  $\beta$ -bağlantının hidrolizi için kabul gören iki farklı hidrolitik mekanizma vardır. Bu mekanizmalar; şeker kalıntısındaki anomerik merkezde bulunan ters dönmeye ya da tutmaya (bağlı olarak isimlendirilir. Selülazların ve ksilinazların da büyük bir kısmını da içine alan  $\beta$ -Glukozidazların substratı genel olarak şekerin anomerik konfigürasyonunu tutarak hidrolize ettiği bilinir [57] Yani ürün olarak açığa çıkan  $\beta$ -D-glukoz ile substrattaki  $\beta$ -D-glukozid aynıdır. Enzim tarafından substratın hidrolizi iki basamakta gerçekleşir:

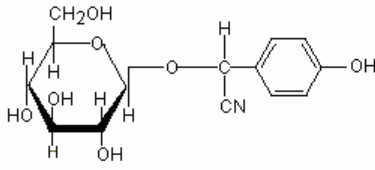
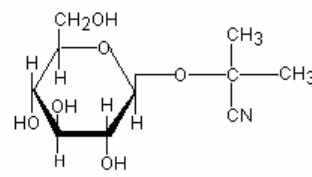
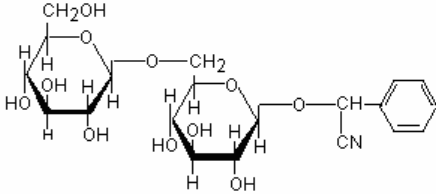
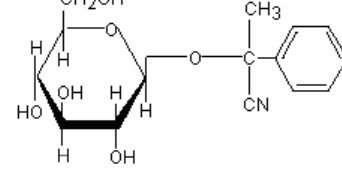
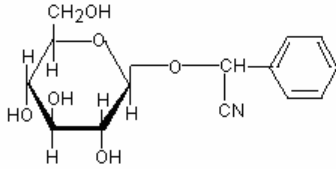
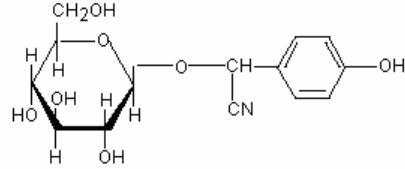
- 1) Enzim glikolizasyonu (glikozlanması)
- 2) Deglikozilasyon (glikoz kopması) [43] (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 :  $\beta$ -glukozidaz enziminin katalizleme mekanizması [45].

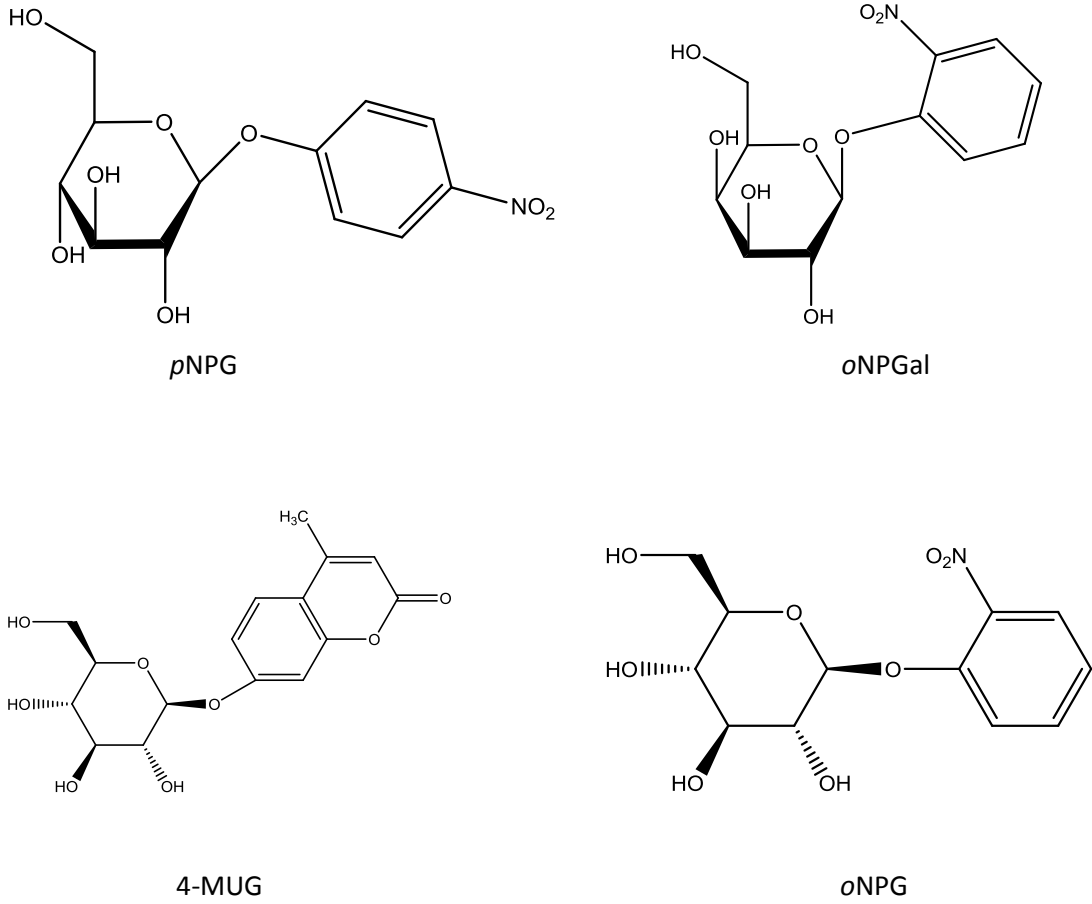
### 1.3.2.2 Katalizlediği Reaksiyonları ve Substratları

$\beta$ -glukozidaz substratlarında bulunan sabit monosakkarite bağlı kimyasal grupların çeşitliliği  $\beta$ -glukozidazların substrat çeşitliliğinin esasını oluşturur. Glikoza bağlanan grup ya disakkaritlerde ve oligosakkaritlerde olduğu gibi farklı bir glikon ya da glikokonjugatlarda olduğu gibi bir aglikondur. Bu aglikon kısım linamarinde olduğu gibi bir alkil grup veya prunasın, durrin ve DIMBOAGlc'da olduğu gibi bir aril grup olabilir [45].

**Dhurrin****Linamarin****Amygdalin****Lotaustralin****Prunasin****Taxiphyllin****Şekil 1.9 :  $\beta$ -glukozidazın doğal substratlarından bazıları [45].**

Enzimin doğal substratları (Şekil 1.9) yanısıra yapay substratları da bulunmaktadır (Şekil 1.10). Mısır  $\beta$ -glukozidaz izoenzimi ile yapılan çalışmada, Glu1'in, aglikon parçası olarak p- ve o-NP, 4-metilumbelliferil, 6-bromo-2-naftil, indoksil, 5-bromo-4-kloro-3-indolil ve sitokinin içeren bileşikleri hidroliz ettiği belirlenmiştir [11,12]. Ergöçen (2013) kayısı  $\beta$ -glukozidaz'ı ile yaptığı çalışmada p-NPG (4-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid) substrat olarak kullanıldığında 23 kDa ağırlığında özdeş 5 alt üniteye sahip oldukları belirlenmiştir [46].

Yapılan birçok çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin katalitik etkinliğinin belirlenmesinde en fazla p-NPG substrat olarak kullanılmıştır, diğer substratların enzime olan ilgilerinin daha düşük bulunduğu kaydedilmiştir [47].

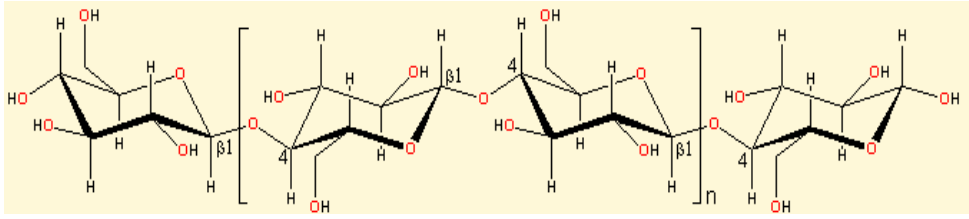


**Şekil 1.10 :**  $\beta$ -glukozidazın bazı yapay substratları [45].

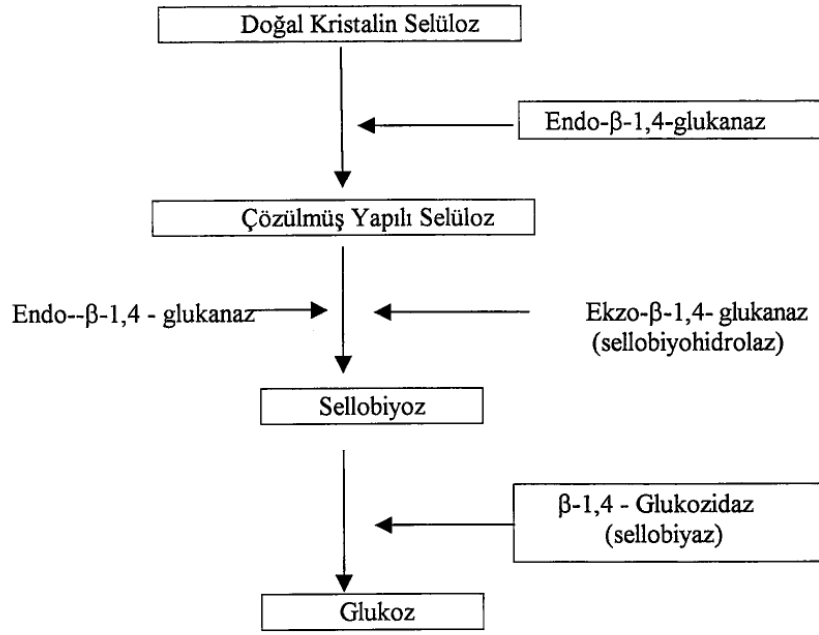
Örneğin, Odoux ve ark., (2003), *Vanilla planifolia* (vanilya) tohumundan izole ettikleri  $\beta$ -glukozidaz'ın *p*-Nitrofenil-  $\beta$ -D-glukopiranozit ve glukovanilin için katalitik aktiviteyi yüksek bulurken, *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-fukopiranozit, *p*-nitrofenil- $\beta$ -Dgalaktopiranozit ve *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranozit ile enzimin azalan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Diğer taraftan Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı  $\beta$ -glukozidaz enzimini izole ettikleri araştırmalarında *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit enzimin katalitik etkinliğini belirlemede daha etkili bulurlarken, *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-fukopiranozit biraz daha düşük bulunmuştur [48].

### 1.3.2.3 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Önemi

Bitki ve hayvan hücresi yanı sıra maya, mantar ve küf hücrelerinde de bulunan  $\beta$ -glukozidaz enzimi, yaşamsal birçok metabolik olayda yer almaktadır [45]. Bu görevlerden birisi, bakteri ve mantarlarda bulunan  $\beta$ -glukozidazların selülaz enzim sisteminin (selobiohidrolaz, endo- $\beta$ -glukonaz ve  $\beta$ -glukozidaz) bir parçası olarak selüloz (Şekil 1.11) ve sellobiyoz yıkımındaki rolüdür (Şekil 1.12) [49,52].



Şekil 1.11 : Selülozun moleküler yapısı [55].



**Şekil 1.12 :** Selülozun enzim ile hidrolizi [56]

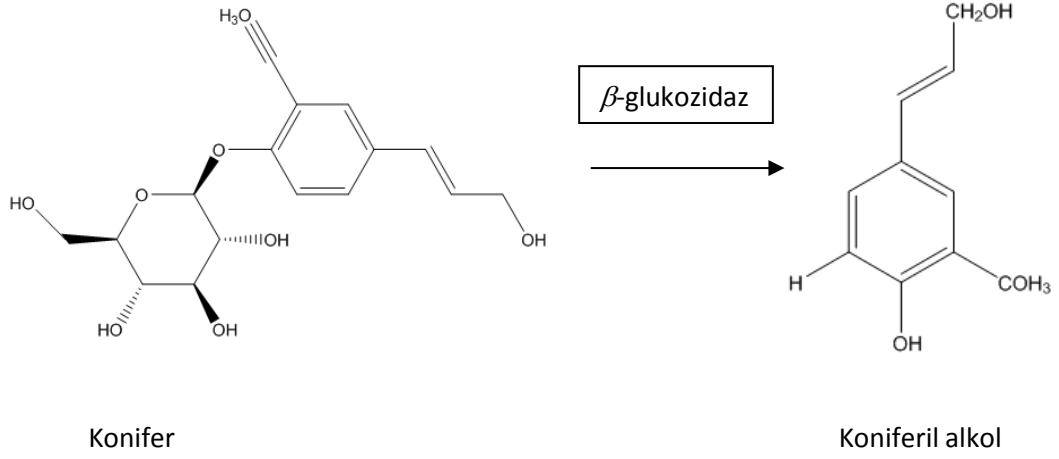
Bitkilerde herhangi bir patojen ve herbivorların bitki dokusunda oluşturduğu zarar substratın ve  $\beta$ -glukozidaz enziminin karşılaşmasına ve substratın hidrolizine sebep olur. Hidroliz sonucu oluşan tiyosiyonatlar, izotiyosiyonatlar, nitriller, HCN, belzaldehitler gibi maddeler herbivorların ve bitki zararlılarının bitkiye girişini, bitkide gelişmesini ve dağılmasını engelleyici etki gösterir. Böylece  $\beta$ -glukozidaz enzimleri bitki savunmasında yer almış olur [53-55].

Günümüzde enzim katalizli işlemler, daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler. Enzim katalizli işlemlere duyulan bu ilgi, zamanla dünya genelinde bir enzim pazarının ortaya çıkmasına ve bu alanda yapılan çalışmaların da artmasına neden olmuştur [57].

$\beta$ -glukozidaz enziminin bir diğer katalitik etkinliği ise biyosferde selülozdan sonra en çok bulunan bileşik olan lignin biyosentezinde rol almasıdır. Lignin biyosentezi,  $\beta$ -glukozidaz enzimi sayesinde koniferinin konifenil alkola hidrolizi



sonucu oluşmaktadır [58,59]. Özellikle kaliteli kağıt üretimi için çok önemli olan bu durum enzimin sanayideki önemini artırmaktadır [57] (Şekil 1.13).



**Şekil 1.13 :** Lignin Biyosentezi

Sanayinin diğer kolları yanısıra Gıda Sanayisi açısından da önemli bir enzim olan  $\beta$ -glukozidaz enzimi, bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili olduğu belirlenmiş oldukça fazla sayıda  $\beta$ -glukozidik ürün aglikon parçalarının,  $\beta$ -glukozidaz tarafından uğraması yoluyla oluşabilmektedir. Bu yöntem, meyve suyu ve meşrubat üretiminde ve meyve tatlandırma sıklıkla kullanılmaktadır [60]. Üretim sırasında ya da sonrasında  $\beta$ -glukozidaz enziminin eklenmesi; ürünlerin tat, lezzet, aroma ve diğer kalite faktörlerinde artış gözlenmesi [61] ile birlikte üretimi yapılan gıdanın besin değerinin de korunmasını da sağlar. Oleuropein'nin enzimatik hidrolizi  $\beta$ -Glukozidaz enzimi ile gerçekleştirilerek, aglikon ve glukoz oluşmaktadır. Bu çalışmada oleuropein'nin  $\beta$ -Glukozidaz enzimi ile hidrolize uğratarak fermantasyonu olumsuz etkileyen antimikrobiyal etkisinin ortadan kaldırılması ve NaOH ile kimyasal hidroliz uygulanmaksızın tüketilebilir özelliklere sahip zeytin üretilmesi amaçlanmıştır.

$\beta$ -Glukozidazların meyvelerin tatlanması üzerine etkili oldukları birçok çalışma ile belirlenmiştir. Vanilya tanelerinde bulunan bir  $\beta$ -glukozidaz enziminin vanilin- $\beta$ -glukozid (glukovanilin) olarak bilinen aroma öncüllerinin hidrolizinden sorumlu olduğu ve vanilya aromasının bu substratın hidroliziyle açığa çıkan

ürünlerle ilgili olduğu bildirilmiştir [62]. Ayrıca çay yaprağı ile yapılan çalışmada da  $\beta$ -glukozidaz enziminin aromatik tat ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir[63].

#### 1.4 İmmobilizasyon

İmmobilizasyon kavramı ilk olarak 1971 yılında ABD de düzenlenen bir konferansta Katchalski Katzir tarafından şu şekilde tanımlanmıştır;

“İmmobilizasyon; enzimlerin katalitik aktivitelerinin sabit kalması koşuluyla, tekrar ve sürekli kullanımına izin verecek şekilde tanımlanmış belirli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi ve hapsedilmesidir”[64].

Enzim bir yüzeye immobilize edilirken materyaller, kimyasallar ve yöntem çok önemlidir. Enzimin aktif merkezindeki kimyasal yapıyı ve reaktif gruplara zarar vermemelidir. Yani enzim immobilizasyonu enzime en az hasar vererek yapılmalıdır.

Yeterli koşulların sağlanması koşulu ile doğal ortamları dışında da etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden pek çok alanda yararlanma imkanı vermektedir. Bu imkan doğrultusunda enzimler endüstriyel, analitiksel, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarımı gibi birçok farklı alanda geniş uygulama alanı bulunmaktadır [65]. Enzim üretiminde ham madde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görülmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Enzimlerin ekonomik olarak kullanılmasının ve daha fazla yararlanabilmenin en uygun yolu immobilize edilmeleridir.

Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması veya reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılarak kontrol edilmesi amacıyla uzaklaştırılması mümkün değildir. Bu yüzden enzimin tek seferde kullanılması ve istenilen süre zarfında kullanılamaması endüstride maliyetin fazla olmasına sebep olmaktadır. İmmobilize edilen enzim endüstride bu sorunu aşarak enzimi kontrol altına alabilme ve enzimi tekrar tekrar kullanabilme imkanı sunabilir.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre avantajları;

- ❖ Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler
- ❖ Çevre koşullarına göre daha dayanıklıdırlar
- ❖ Doğal enzime göre daha kararlıdırlar
- ❖ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler
- ❖ Sürekli işlemlere uygulanabilirler
- ❖ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir
- ❖ Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur
- ❖ Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilirler
- ❖ Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır [66].

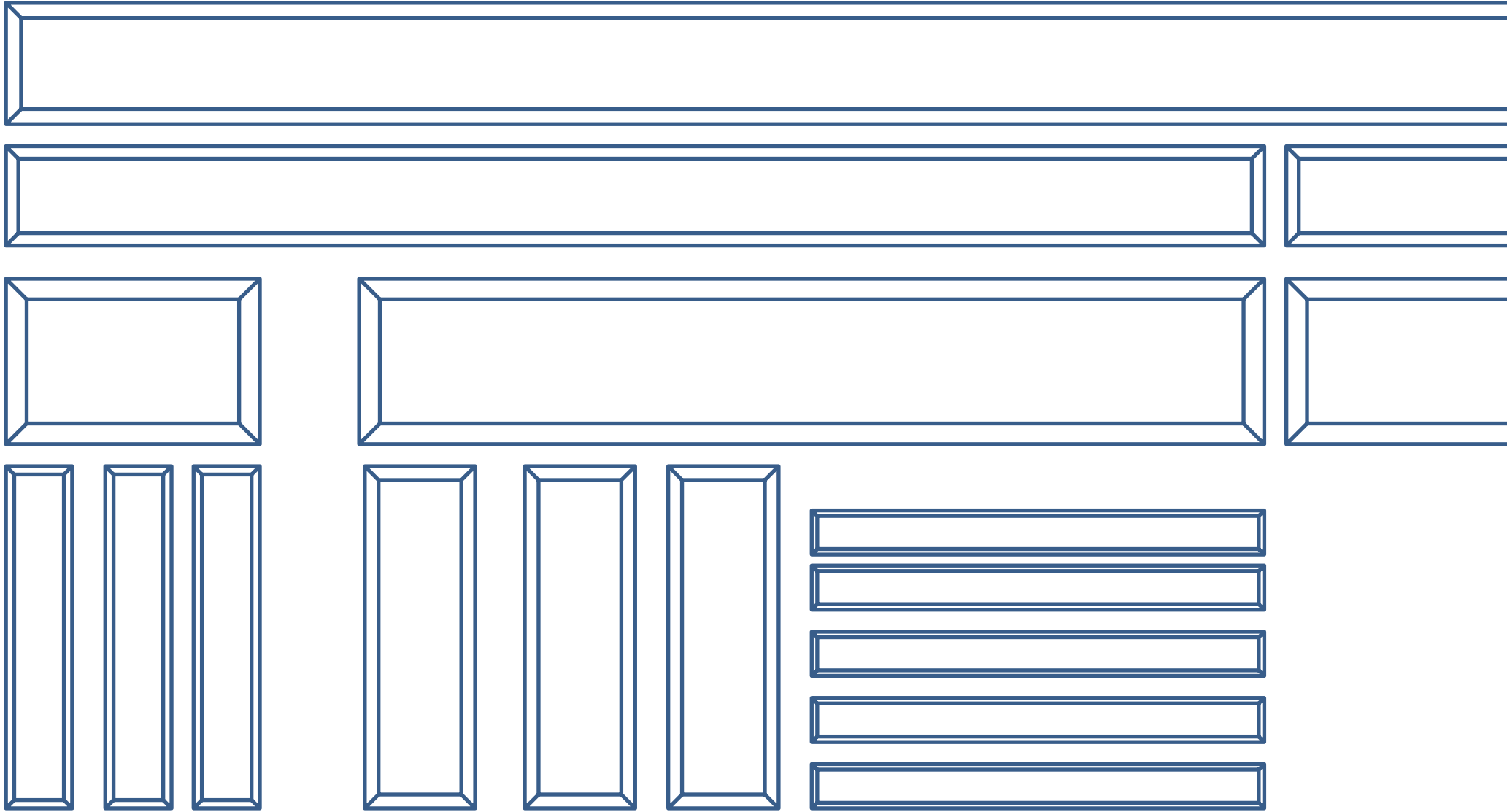
Bu amaçla çeşitli immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

#### **1.4.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri**

Enzimlerin immobilizasyon yöntemlerini Tablo1.2' de ki gibi sınıflandırmak mümkündür.



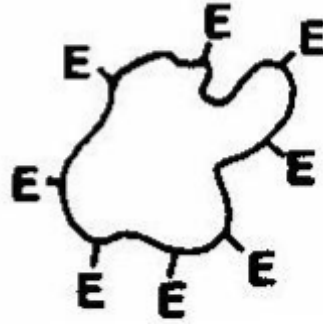
Tablo 1.2 : Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri.



### 1.4.1.1 Kovalent Bağlanma

Kovalent bağlama yöntemlerinin uygulanması protein molekülünün doğrudan kimyasal modifikasyonu ile sonuçlanır. Enzimin kovalent bağ ile katı bir taşıyıcıya bağlanması, proteinin yan zincirlerindeki kalıntılarla destek yüzeyindeki reaktif gruplar arasında kovalent bağ oluşumu ile gerçekleşmektedir (Şekil 1.14). Bağlanmanın enzimin aktif merkezi dışında kalan kalıntılar üzerinden gerçekleştirilmesi ile aktivite kaybının minimuma indirgenmesi sağlanır. Kovalent bağlanmada en çok yer alan fonksiyonel gruplar arasında nükleofilik amino (lizin, histidin ve arginin), tiol (sistein), hidroksil grupları (serin, treonin ve tirozin) ve elektrofilik karboksilat grupları (aspartik asit ve glutamik asit) sayılabilir [67].

Kovalent bağlama ile enzim veya hücre immobilizasyonu yönteminde aktive edilen dayanak maddesine enzim kimyasal olarak bağlanır. Bu teknikte enzimlerin immobilizasyonu oldukça zordur ve diğer yöntemlere göre daha fazla aktivite kaybı meydana gelir [68].



**Şekil 1.14 :** Kovalent bağlanma şematik gösterimi [69].

Tablo 1.3’de görüldüğü gibi enzimin kovalent bağlama yöntemimde hazırlığın zor, immobilizasyon maliyeti yüksek olmasına rağmen yüksek bağlanma gücüne sahip olması, bağlı enzim aktivitesinin yüksek olması ve kararlılığının yüksek olması açısından diğer bağlanma yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha avantajlıdır. Ayrıca desteğin tekrar kullanılabilmesi literatürde nadir olsada günümüzde geniş bir alanda tekrar tekrar kullanılması mümkündür. Enzimin mikrobiyal ataklara karşı korunabilmesi enzimin kaynağının değişkenliğine göre farklılık gösterir.

**Tablo 1.3 :** İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması [70].

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorbsiyon	İyonik Bağlama	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlama	Hapsetme
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Mümkün



### 1.4.1.2 Carbodiimide ile Nanoparçacık Aktifleştirilmesi

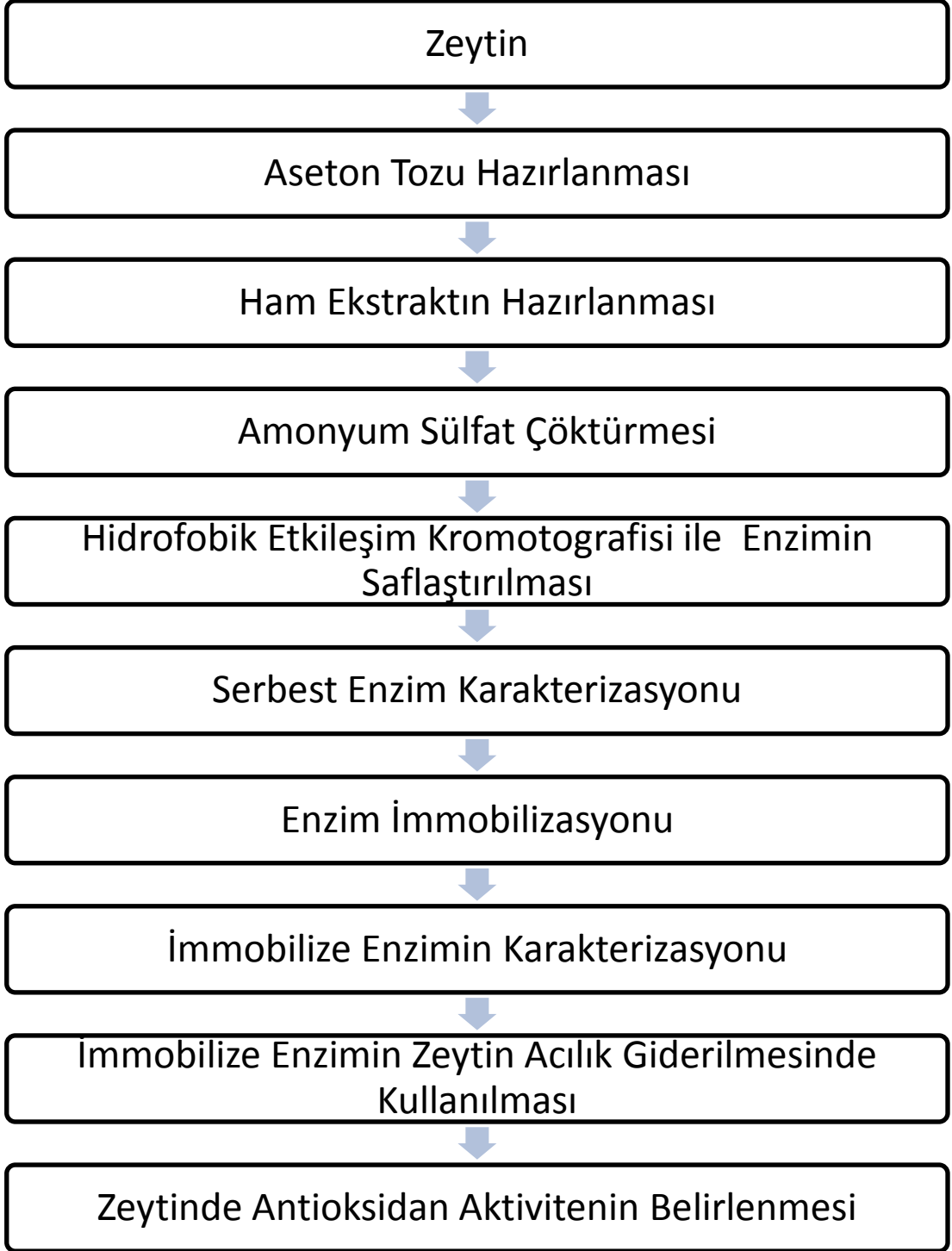
Süperparamanyetik nanoparçacıklar carbodiimide ile aktifleştirilerek enzimin nanoparçacığa bağlanması için bir köprü oluşturur (Şekil 1.15).



Şekil 1.15 : Karbodiimid ile nanoparçacığın aktiveştirilmesi [75].

### 1.5. Deney Planı

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile zeytinden saflaştırılarak  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin sofralık zeytin üretiminde acılık giderme işlemi amacıyla kullanılmasını içeren araştırmaya ait deney planı aşağıda verilmiştir.



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Zeytin

Araştırmamızda enzim saflaştırılması amacıyla Balıkesir bölgesinden temin edilen Edremit çeşidi siyah olgunlukta zeytin (*Olea europea L.*) örnekleri toplanarak bekletilmeksizin laboratuarda aseton tozu haline getirilerek -20 °C’de depolanmıştır. Acılık giderme deneylerinde kullanılacak olan Balıkesir bölgesinden temin edilen yeşil olgunlukta zeytin örnekleri, polietilen kaplar içerisinde +4 °C’de laboratuara getirilerek gerekli çalışmalarda kullanılmışlardır.

#### 2.1.2 Ticari Enzim

Zeytin acılık giderme deneylerinde serbest (E) ve süperparamanyetik nanoparçacıklara karbodiimid reaksiyonu ile kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilerek elde edilen immobilize enzim (İE) ile karşılaştırma yapmak üzere gıda sanayinde kullanılan liyofilize  $\beta$ -glükozidaz enzimi olarak Rapidase AR 2000, DSM Product, France firmasından temin edilmiştir.

### 2.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan kimyasallar ve ait olduğu firmalar.

Kimyasallar	Üretici Firma
Borik Asit	Sigma
DTT	Sigma – Aldrich
EDTA	Riedel- de Haen
PMSF	Sigma
Sodyum Asetat	Sigma
Sodyum Fosfat	Sigma- Aldrich
Amonyum Sülfat	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma
pNP-G	Sigma
NaCl	Sigma
Tris Base	Sigma
Hidroklorik asit	Sigma
Sodium Hidroksit	Sigma
Metanol	Sigma
Etanol	Sigma
TEMED	Sigma
$\beta$ -merkaptotanol	Sigma
Sığır Serum Albumini(BSA)	Sigma
Aseton	Sigma
Fosforik Asit	Sigma
Commassie Brilliant Blue G25	Sigma

Folin-Ciocalte	Sigma
Gallik asit	Sigma
DMPD	Sigma
Demir Klorür FeCl <sub>2</sub>	Sigma
Potasyum Ferriksiyonid	Sigma
Triklorasetik Asit	Sigma
FeCl <sub>3</sub>	Sigma
Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma
Carbodiimide	Sigma
Sepharose 4-B, 1-Naftiamin, L-tirozin	Sigma
Akrilamit	Sigma
N,N'- metilen bisakrilamit	Sigma
Glisin	Sigma
Asetik asit	Sigma
Formik asit	Sigma
Fosforik asit	Sigma
Trihidroksi metil aminometan (Tris)	Sigma
SDS	Sigma
Amonyum Persülfat	Merck
Page Ruler Plus Prestained Protein Lader (26616)	Thermo
X-Ray Film	Kodak
Amonyum persülfat	Merck
DPPH	Sigma
Trisklorasetikasit	Sigma

#### 2.1.4 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışma için kullanılan kimyasallar ve ait olduğu firmalar.

<b>Kullanılan Alet</b>	<b>Modeli</b>
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Germany
Otoklav	Hıramaya, Japonya
-80 °C Ultralow Freezer	Thermo
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	She-Lab, USA
pH Metre	WTW, Almanya
Saf Su Cihazı	Destilasyon 3.1 (Coomecta Sa)
Vortex	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
96 well plate okuyucu spektrofotometre	Bio-Tek
Otomatik Pipetler	Finnpipet
UVP Jel Görüntüleme	UVP
SDS Page Aparatları	BioRad
Homojenizatör	Micra
Sonikatör	Selecte
Sıcak Su Banyosu	Consort, İngiltere
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Spektrofotometre	Thermo – Multiskan Go
Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör	GFL, Almanya

Evaporatör	Heidolph
------------	----------

### 2.1.5 Kullanılan Çözeltiler

**Stok ekstraksiyon tamponu:** 100 mM borik asit, %25 ditiotreitol (DTT), 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Bunun için 6,18 g borik asit tartıldı ve 950 mL distile suda çözülerek, 1M NaOH ile pH'sı 9'a getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Günlük ekstraksiyon tamponu:** 0,25 g DTT, 0,1461 g EDTA 90 mL stok 100 mM borik asit tamponunda çözüldü, 100 mM stok PMSF çözeltisinden 1mL ilave edildi ve borik asit tamponu ie 100 mL ye tamamlanarak günlük kullanılan ekstraksiyon tamponu hazırlandı.

**PMSF çözeltisi:** 100 mM PMSF çözeltisi için; 0,174 g PMSF 10 mL izopropanolde çözülür. -20 °C'de saklanabilir.

**Sodyum asetat tamponu :** 50 mM enzim aktivite tamponu için 6,084 g Sodyum asetat 900 ml suda çözülür pH 5,5'e ayarlanarak distiler su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Substrat çözeltisi:** 5mM pNPG substratı için 0,0075 g pNPG 5 ml Sodyum asetat tamponunda çözüldü

**Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan tampon çözelti:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon çözelti:** 1M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ , 50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu için; 132,14 g  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  ve 8,889 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  950 mL distile suda çözülerek 1M NaOH ile pH 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli için dengeleme tampon çözeltisi:** 1 M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ , 50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu için; 132,14 g  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  ve 8,889 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  950 mL distile suda çözülerek 1 M NaOH ile pH 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli için elüsyon tampon çözeltisi:** 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu için; 8,889 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  950 mL distile suda çözülerek 1 M NaOH ile pH 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Reaksiyon durdurma tamponu:** 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi için; 26.498 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  distile suda çözüldü ve 500 mL'ye tamamlandı.

**İmmobilizasyon tamponları:**

**Solusyon A:** 0,003 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 M NaCl tampon için; 0,18 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 2,92 g NaCl 400 mL distile suda çözüldü ve pH 6'ya getirilerek son hacim distile su ile 500 mL ye tamamlandı.

**Karbodiimid çözeltisi:** 0,025 g/mL karbodiimid çözeltisi için; 0,025 g carbodiimide 1 ml solüsyon A'da çözüldü.

**Antioksidan Aktivite için kullanılan tamponlar;**

**$\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi:** %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi için 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 mL distile suda çözüldü.

**DPPH çözeltisi:** 0,1 mM DPPH çözeltisi için 0,039432 g DPPH tartılır ve 95 ml de çözüldü. Daha sonra distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

**DMPD çözeltisi:** 105 g DMPD 5 mL distile suda çözüldü.

**Asetat Tamponu:** 0,1 M Asetat tamponu için; 0,82 g Sodyum asetat 90 mL distile suda çözüldü pH 5,3'e ayarlandı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**Demir Klorür:** 0,05 M demir klorür için; 0,8 g demir klorür 95 mL distile suda çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.



**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
$\beta$ -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS-	1,0 g

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 2.1'de verilmektedir.

**SDS-PAGE elektroforezinde 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-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

**Tablo 2.1 : SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları**

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<b><u>Akril amid/Bis</u></b> Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
<u>Distile su</u>	20,1 mL	12,2 mL
<b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b> Tris-HCl 11.82 Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 mL	–
<b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b> Tris-HCl 3,94 g Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<b><u>%10 'luk SDS</u></b> SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µL

<b>TEMED</b>	25 µL	20 µL
<b><u>%10'luk amonyum persulfat</u></b> Amonyum persulfat 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Enzimin Saflaştırılması

#### 2.2.1.1 Zeytinden Aseton Tozu Hazırlanması

Zeytin taneleri ağaçtan taze alınarak çekirdeklerinden ayıklandı. 100 g zeytin meyve eti 300 mL -20 °C asetonda 2 dk laboratuvar tipi parçalayıcı ile parçalandı. Parçalanmış zeytin bulamacı Whatman No 1 filtre kâğıdı yardımıyla süzdürüldü. Bulamaç başka bir Whatman No 1 filtre kâğıdına alınarak -20 °C aseton ile yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrarlanarak zeytinin yağı uzaklaştırıldı. Son olarak filtre üzerinde kalan kalıntı çeker ocakta kurutuldu ve aseton tozu hazırlandı aseton tozu kullanılana kadar – 20 °C’de muhafaza edildi [45].

#### 2.2.1.2 Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Ham ekstrakt için; 1 g aseton tozu 100 ml ekstraksiyon tamponu ile homojenizatörde 2 dakika homojenize edildi. Homojenize edilen aseton tozu 15000 rpm’de +4 °C’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı kısım alınarak deneysel çalışmalarda kullanıldı [45].

#### 2.2.1.3 Enzim Aktivite Tayini

$\beta$ -glukozidaz enziminin aktivite tayini spektrofotometrik olarak tayin edildi. 70  $\mu$ l 5 mM pNPG substrat çözeltisi 96 çukur plaka kuyucuğuna konuldu ve üzerine 70  $\mu$ l enzim eklendi. 30 dk 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Üzerine 70  $\mu$ l 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tampon çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 405 nm de absorbansı köre karşı okutuldu. Kör olarak enzim yerine tampon çözeltisi kullanıldı [45].

#### 2.2.1.4 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur [72]. Bu yöntem ile aşağıdaki formül kullanılarak enzim de amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Amonyum sülfat aralığı belirlendi. Yüzde aralığına göre belirlenen tuz miktarı ham enzim çözeltisine yavaş yavaş eklenerek çözüldü ve +4°C'de 15.300 rpm'de santrifüj edildi.

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

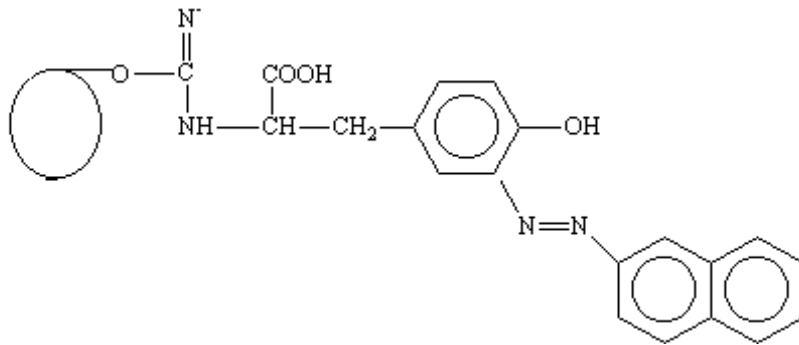
V : Serum hacmi

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

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

#### 2.2.1.5 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzim Saflaştırılması

Zeytinden  $\beta$ -glukozidazını amonyum sülfat çöktürmesi sonrası hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemi tamamlandı. Saflaştırma işlemi için sepharose-4B-L-Tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezi yapıldı [45] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 : Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin [50].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli yükleme öncesi 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bulunduran 1 M (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (pH 6,8) tamponunu ile yıkandı ve dengelendi. Dengeleme işlemi için tamponun ve jelden akan tamponun 280 nm de absorbansı alındı ve absorbans farkı 0 oluncaya kadar yıkamaya devam edildi. Dengeleme sonrası Bölüm 2.2.1.4'de belirtilen yöntem ile hazırlanan amonyum sülfat sonrası çözelti kolona tatbik edildi. 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bulunduran 1 M (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (pH 6,8) tamponunu ile yıkama işlemine başlandı. Yıkama işlemi yapılırken 2 mL'lik ependorflara elüe edildi. Tamponun ve elüatların 280 nm'de absorbansı alınarak absorbans farkı 0 oluncaya kadar devam edildi. Yıkama işlemi tamamlanınca 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bulunduran 1 M (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (pH 6,8) tamponuna gradiyent mikser yardımı ile 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,8) tamponu yüksek derişimden seyreltiğe doğru gradiyet oluşturulacak şekilde ilave edildi. Ve iyon gradiyent farkıyla ayrılan enzimler 2 mL'lik ependorflara elüe edildi. Elüsyon işlemi tampon ve elüatların 280 nm de absorbans farkı 0 oluncaya kadar devam edildi. Tüm elüatların kör e karşı 280 nm absorbansı alındı ve kalitatif protein miktarları ve 405 nm'de aktiviteleri belirlendi. Elde edilen verilere göre tüm tüplerin aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi.

## 2.2.2 Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Miktar Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar 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. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 10-100 µg arasında ve 1-10 µg arasında yapıldı.

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. Distile su ile tüm tüplerin hacimleri 0,1mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik

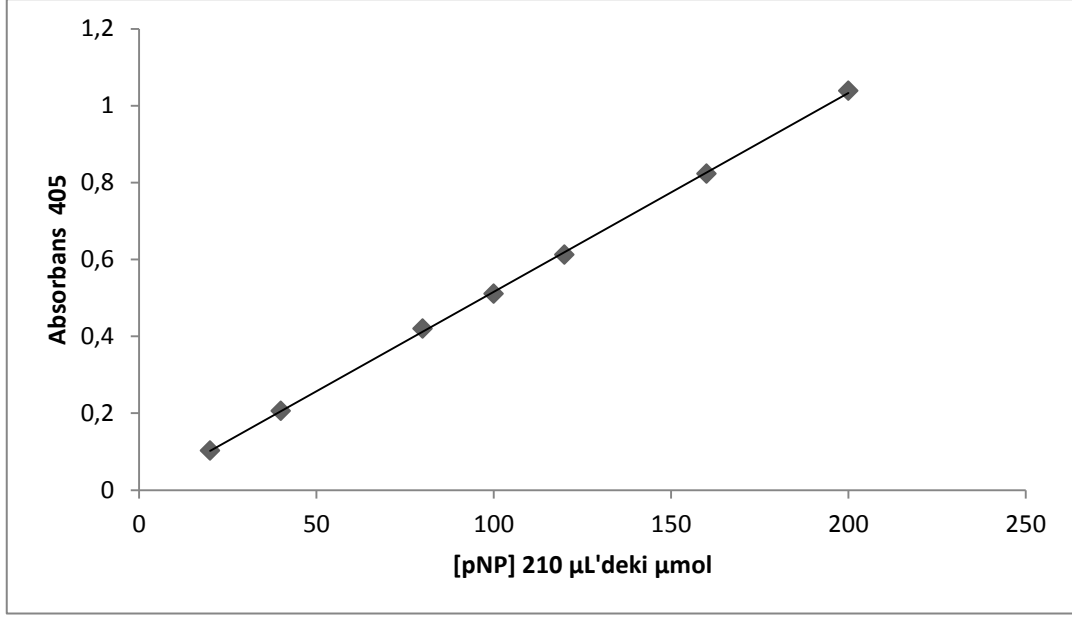
distile su bulunan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.2).

Aynı işlem 1 mL'sinde 0,1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisi ile yapıldı ve okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile daha hassas 2. standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Örneklerin protein miktarı tayini için örnekten 0,1 mL alınarak üzerine 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ileve edildi. Vorteks sonrası karanlık ortamda 10 dk bekletildi ve 595 nm'de absorbansı köre karşı alındı. Kör olarak örneğin bulunduğu tampon çözelti kullanıldı. Ölçümün absorbansına karşılık gelen protein standart grafik yardımıyla hesaplandı.

### 2.2.3 Enzim Ünitesi İçin Kullanılan Standart Grafikler

Enzimin aktivite tayini,  $\beta$ -glukozidaz enzim hidrolizi ile glikopiranozid bağlı olan *p*Nitrofenolün serbest kalması esası referans alınarak yapıldı. Bu amaçla 210 µL son reaksiyon haciminde *p*NPG standart grafiği oluşturuldu. Bu grafiği oluşturmak için *p*Nitrofenol standart olarak kullanıldı. Standart çözeltideki µmol *p*Nitrofenole karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.1.3'de belirtilen yöntemle bulunarak Şekil 2.2'deki standart grafik çizildi.



**Şekil 2.2** : Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 μL hacimli pNPG standart grafiği.

Şekil 2.2’de verilen grafiklerdeki doğru denklemlerinden ilgili absorbansa karşılık gelen μmol pnitrofenol miktarı hesaplandı.

#### **2.2.4 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü**

$\beta$ -glukozidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid derişiminde; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemli [72] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla 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 hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar pipet yardımıyla döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst yüzeydeki n-bütanol döküldü.



Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine Tablo 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi. Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına Tablo 2.2 de belirtilen yöntemle hazırlanan yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlara ait en yüksek aktivite gösteren tüpler SDS-PAGE için kullanıldı. Standart protein çözeltisi 1:3 oranında Tablo 2.1’ de belirtilen yöntem ile hazırlanan numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 5 dakika 95 °C’de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volta yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1 cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 20 dk kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı [72].

## **2.3 Enzim İmmobilizasyonu**

### **2.3.1 $\beta$ -Glukozidazın Süperparamanyetik Nanoparçacıklara İmmobilizasyonu**

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmış  $\beta$ -Glukozidaz enzimi süperparamanyetik  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklara immobilize edildi. İmmobilizasyon sırasında aşağıda belirtilen yöntem kullanıldı.

0,1 g nanoparçacık tartılarak cam tüpe alındı. Üzerine 2 mL solusyon A ( 0,1 M NaCl, 0,003 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eklendi ve sonikatörde +4 °C de 30 dk sonikasyon ardından 0,5 mL karbodiimid çözeltisi (0,025g /Solusyon A 1 mL) eklenerek tekrar +4 °C de 30 dk sonikasyon yapılarak nanoparçacıkların aktifleşmesi sağlandı. İstenilen enzim miktarı aktif nonaparçacıklara tatbik edilerek +4°C de 60 dk sonikatörde sonikasyon ile immobilizasyon gerçekleştirildi. Miknatis yardımı ile nanoparçacıklar tüp duvarına çekilerek tüp içindeki sıvı temiz bir falkona alındı. 2 mL solusyon A (2 mL 0,1 M NaCl, 0,003 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eklenerek nanoparçacık çözüldü ve miknatis yardımı ile nanoparçacıklar tüp duvarına çekildikten sonra, sıvı temiz bir falkona alındı. Bu işlem solusyon A ile bir kez daha tekrarlanarak nanoparçacıklar solusyon A ile yıkandı [73]. Son olarak 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu ile iki kez yıkandı. Kör için kullanılan örnek olarak, enzim yerine 50 mM, (pH 6,8) sodyum fosfat tamponu kullanılarak aynı işlemler tekrarlandı.

Üstten alınan yıkama sıvısında tutunmayan enzim miktarı ( $\mu$ g) Bradford yöntemi ile belirlenerek yüklenen enzim miktarından çıkarıldı ve nanoparçacığa tutunan enzim miktarı belirlendi.

### 2.3.2 FTIR analizi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllere immobilize edilen enzimin bağlandığının kontrolü amacı ile serbest  $\beta$ -glukozidazın, nanoparçacığın, aktifleştirilmiş nanoparçacığın, ve enzim immobilize edilmiş nanoparçacığın IR spektrumları alındı. Numunelerin IR spektrumları alınırken KBr pelet hazırlama tekniği kullanıldı. KBr pelet hazırlamak için tüm numunelerin sıvıları uzaklaştırılarak kurutuldu. Numunelerden 1 mg alınarak kuru KBr ile havanda iyice karıştırıldı. Karışım 200 kg/cm<sup>2</sup> basınçta 5 dk bekletildi ve KBr peleti hazırlandı. İçinde numune bulunmayan KBr peleti background olarak okutuldu. Hazırlanan numunelerin IR spektrumları alındı.

### 2.3.3 İmmobilize Enzim Aktivite Tayini

Bölüm 2.3.1’de belirtilen yöntem ile enzim immobilize edilmiş süperparamanyetik nanoparçacıklar mıknatis yardımı ile tüp duvarına çekilerek içinde ki tampon çözelti tamamen pipet yardımı ile çekildi. Enzim İmmobilize edilmiş nanoparçacıkların bulunduğu tüpe ve kör olarak kullanılan enzim ihtiva etmeyen nanoparçacıkların bulunduğu tüpe 5 mM *p*NPG substrat çözeltisinden 0,5 mL ve 50 mM pH 5,5 Sodyum asetat çözeltisinden 0,5 mL eklendi. Pipet yardımıyla nazikçe nanoparçacıklar çözüldü. 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mıknatis yardımı ile nanoparçacıklar tüp duvarına çekildi. Oluşan ürün pipet yardımı ile temiz ependorfa alındı üzerine 0,5 mL reaksiyon durdurma tamponu eklenerek reaksiyon durduruldu( Tabl o2.2). Ependor içinde bulunan üründen ve körden 210 µl çekilerek 96’lık çukur plaka kuyucuğuna alındı. 405 nm de absorbansı köre karşı okutuldu. Şekil 2.4’de bulunan 210 µl hacimli *p*NPG standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi hesaplandı.

**Tablo 2.2 :** İmmobilize enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti miktarları.

	Sodyum asetat tamponu	<i>p</i> NPG (5mM)	İnkübasyon	Reaksiyon Durdurma Çözeltisi	Aktivite
İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enzimi	0,5 mL	0,5 mL	37 °C- 30 dk	0,5 mL	A 405

## **2.4 Zeytin Tatlandırma Yöntemleri**

### **2.4.1 NaOH ile Zeytin Tatlandırma**

Bu amaçla %1 NaOH (kostik) içeren çözelti kullanılmıştır. Yıkanan ve çürük, ezik, sinek lekesi gibi kusurlu olan zeytinler ayıklandıktan sonra boylama işlemine tabi tutularak aynı büyüklükteki zeytin örnekleri çizilmeksizin 300 mL'lik toplam hacimli cam kavanozlar içerisine toplam kap hacminin %60'ını teşkil edecek şekilde yerleştirildi. %1 NaOH çözeltisi kavanoza eklendi ve oda sıcaklığında kalevi (NaOH) zeytin meyvesinin %60'ına difüze oluncaya kadar yaklaşık 24 saat işleme devam edildi.

### **2.4.2 Serbest enzim ile zeytin tatlandırma**

Zeytinler, yıkama, ayıklama ve boylama işleminin ardından toplam kap hacminin %60'ını teşkil edecek şekilde cam kavanozlara yerleştirildi. Serbest enzim 50 mM pH 6,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu içinde kavanoza eklenerek oda sıcaklığında 24 saat bekletildi.

### **2.4.3 İmmobilize Enzim ile Tatlandırma**

Yıkama, ayıklama ve boylama işlemlerinin ardından zeytinler toplam kap hacminin %60'ı olacak şekilde cam kavanozlara yerleştirildi. Bölüm 2.3.1'de belirtilen yöntem ile süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilen zeytin  $\beta$ -glukozidaz enzimi destile su içerisinde çözündürülerek kavanozlara ilave edildi. Oda sıcaklığında, 200 rpm de çalkalanarak değişik bekleme sürelerinde uygulama yapıldı. Bekleme süresi sonrasında süperparamanyetik nanoparçacıklar güçlü mıknatıs yardımı ile kavanozun duvarına çekildi. Uygulama sonrası zeytin örnekleri HPLC ile oleuropein analizi için ayrılarak analiz süresine kadar -80 °C'de depolandı. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirildi.

#### **2.4.4 Musluk Suyu ile Tatlandırma**

Diğer denemelerde olduğu gibi yıkanan, ayıklanan ve boylanan zeytinler cam kavanozlarda toplam kap hacminin %60'ını teşkil edecek şekilde yerleştirildikten sonra musluk suyu ile tatlandırılmaya bırakıldı. Uygulamaya 24 saat süre ile devam edildi.

#### **2.4.5 Çizme yöntemi ile tatlandırma**

Yıkama, ayıklama, boylama işlemlerinin ardından Edremit çeşidi yeşil zeytin örnekleri (*Olea europea* L.) çizildikten sonra %1 sitrik asit içeren musluk suyu içerisinde kavanoza eklendi ( $\frac{3}{4}$  kap hacmi) ve oda sıcaklığında 24 saat bekletildi.

### **2.5 HPLC analizi**

#### **2.5.1 HPLC Analizi İçin Ekstrakt Hazırlanması**

HPLC analizi için Bölüm 2.4.'da belirtilen yöntemler kullanılarak tatlandırılan 5 gram zeytin numunesi (çekirdekleri hariç) homojen hale getirildikten sonra üzerine 50 mL metanol eklenerek manyetik karıştırıcıda 2 saat masere edilmiştir. Süre sonunda kaba filtre kağıdından evaporatör balonuna süzölmüş ve 40 ° C'de metanol evapore edilmiştir. Daha sonra kalıntı tekrar 50 mL metanol içinde çözöndürölmüş ve 0,45 mikronluk filtreden geçirilerek viallenmiştir.

#### **2.5.2 HPLC ile oleuropein analizi**

Bölüm 2.5.1.'de belirtilen yöntem ile hazırlanan zeytin ekstraktlarının oleuropein analizleri HPLC analizleri Bursa Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İl Müdürlüğü, Gıda, Yem Kontrol Araştırma Merkez Müdürlüğü tarafından gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örneklerde oleuropein analizlerini gerçekleştirilmek üzere kullanılan HPLC cihazının şartları 20 µL enjeksiyon hacmi, 1,2 ml/dk akış

hızı, 30°C kolon sıcaklığı, 28 dk duruş zamanı, 400 bar kolon içi basınç, ile NC100-5C18-3848 HICHROM kolon kullanılarak, DAD dedektörü ile 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak %0,4 Formik asit içeren %84,6 HPLC saflığında su kullanılmıştır [80].

## **2.6 Antioksidan aktivite**

### **2.6.1 Ekstraktların Hazırlanması**

#### **2.6.1.1 Su Ekstraktının Hazırlanması**

Örneklere ait ekstraktların hazırlanmasında Salihoğlu ve ark. (2010) tarafından belirtilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. 10 gr zeytin (çekirdekleri hariç) 100 mL distile su ile homojenizatörde parçalandı ve 100 °C de 35 dk kaynatıldı. Elde edilen bulamaç Whatman No 1 filtre kâğıdı yardımıyla filtre edildi. Süzüntü antioksidan aktivite belirlemek üzere ekstrakt olarak kullanıldı [81].

#### **2.6.1.2 Etanol Ekstraktının Hazırlanması**

5 g zeytin (çekirdekleri hariç) 50 mL etanol ile homojenizatörde parçalandı ve 3 dk bekleme sonrası Whatman No 1 filtre kâğıdı yardımıyla filtre edildi. Kağıt üzerinde kalan pellet üzerinden 50 mL daha etanol eklenerek 100 mL süzüntü ekstrakt olarak kullanıldı [81].

#### **2.6.1.3 Metanol Ekstraktının Hazırlanması**

5 g zeytin 50 mL metanol ile homojenizatörde parçalandı ve 3 dk bekleme sonrası Whatman No 1 filtre kâğıdı yardımıyla filtre edildi. Kağıt üzerinde kalan pellet üzerinden 50 mL daha metanol eklenerek 100 mL süzüntü ekstrakt olarak kullanıldı [81].

## **2.6.2 Antioksidan Aktivite Yöntemleri**

### **2.6.2.1 Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi**

Gallik asit substrat olarak kullanıldı. 1 mg su ekstraktı hacimli küçük bir şişede 23 ml distile su ile çözüldü. Sonra 0,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek tüp içeriği karıştırıldı. 3 dk sonra 1,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (%2) ilave edilir ve karışım 2 saat çalkalayıcıda çalkalamaya bırakıldı. Spektrofotometre ile absorbansı 760 nm de köre karşı okutuldu. Kör olarak su kullanıldı. Su ekstraktlarının total fenol içeriği gallik asit eşdeğeri olarak (mg) standart gallik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi [74].

### **2.6.2.2 DPPH Giderme Aktivitesi Belirlenmesi**

Zeytin meyvesinin su ekstraktlarının DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine) serbest radikal giderme aktivitesini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) su ekstraktı 3 mL dH<sub>2</sub>O hacmine ilave edildikten sonra 0,1 mM alkolik DPPH çözeltisi örneklerle ilave edildi. Bu örnekler vortekslenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 517 nm'de köre karşı absorbas alındı. Kör olarak örnek yerine distile su kullanıldı [ 74].

Zeytin meyvesinin etanol ekstraktlarının DPPH serbest radikal-giderme aktivitesini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) etanol ekstraktı 3 mL etanol hacmine ilave edildikten sonra 0,1 mM alkolik DPPH çözeltisi örneklerle ilave edildi. Bu örnekler vortekslenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 517 nm'de köre karşı absorbas alındı. Kör olarak örnek yerine etanol kullanıldı [74].

Zeytin meyvesinin metanol ekstraktlarının DPPH serbest radikal-giderme aktivitesini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) metanol ekstraktı 3 mL metanol hacmine ilave edildikten sonra 0,1 mM alkolik DPPH çözeltisi örneklerle ilave edildi. Bu örnekler

vortekslenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 517 nm'de köre karşı absorbas alındı. Kör olarak örnek yerine metanol kullanıldı [74].

### **2.6.2.3 DMPD Radikal Giderme Aktivitesi**

Zeytin meyvesinin su ekstraktında DMPD radikal giderme aktivitesi belirlemek için, 105 mg/5 mL DMPD çözeltisinden 1 mL, 100 mL (0,1 M pH 5.3) asetat tamponuna ilave edildi. DMPD, bu çözeltiye 0.3 mL demir klorür çözeltisinden (0.05M) ilave edilerek elde edildi. Farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) su ekstraktları ilave edilerek toplam hacim distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. 0,5 mL DMPD çözeltisi direkt reaksiyon karışımına ilave edildi. Bu örnekler vortekslenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk inkübe edildi. 505 nm de absorbası köre karşı okutuldu. Kör olarak örnek yerine tampon çözelti kullanıldı [74].

Zeytin meyvesinin etanol ekstraktında DMPD radikal giderme aktivitesi belirlemek için, 105 mg/5 mL DMPD çözeltisinden 1 mL, 100 mL (0,1 M pH 5.3) asetat tamponuna ilave edildi. DMPD, bu çözeltiye 0.3 mL demir klorür çözeltisinden (0.05M) ilave edilerek elde edildi. Farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) etanol ekstraktları ilave edilerek toplam hacim etanol ile 0,5 mL'ye tamamlandı. 0,5 mL DMPD çözeltisi direk reaksiyon karışımına ilave edildi. Bu örnekler vortekslenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk inkübe edildi. 505 nm de absorbası köre karşı okutuldu. Kör olarak örnek yerine tampon çözelti kullanıldı [74].

Zeytin meyvesinin metanol ekstraktında DMPD radikal giderme aktivitesi belirlemek için, 105 mg/5 mL DMPD çözeltisinden 1 mL, 100 mL (0,1 M pH 5.3) asetat tamponuna ilave edildi. DMPD, bu çözeltiye 0,3 mL demir klorür çözeltisinden (0,05M) ilave edilerek elde edildi. Farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) metanol ekstraktları ilave edilerek toplam hacim metanol ile 0,5 mL'ye tamamlandı. 0,5 mL DMPD çözeltisi direk reaksiyon karışımına ilave edildi. Bu örnekler vortekslenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk inkübe edildi. 505 nm'de absorbası köre karşı okutuldu. Kör olarak örnek yerine tampon çözelti kullanıldı [74].



#### 2.6.2.4 Toplam Demir İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

Zeytin meyvesinin su ekstraktında demir indirgeme antioksidan gücünü belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) su ekstraktlarının içine 0,75 mL distile su, 1mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6.6) ve 1 mL (%1) potasyum ferriksiyaniür  $[K_3Fe(CN)_6]$  ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 1 mL triklorasetikasit (%10) ile asitlendirildi. Sonunda, 0,25 mL  $FeCl_3$  ilave edildi ve köre karşı 700 nm de absorbansı alındı. Kör olarak distile su kullanıldı [74].

Zeytin meyvesinin etanol ekstraktında demir indirgeme antioksidan gücünü belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) etanol ekstraktlarının içine 0,75 mL etanol, 1mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6.6) ve 1 mL (%1) potasyum ferriksiyaniür  $[K_3Fe(CN)_6]$  ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 1 mL triklorasetikasit (%10) ile asitlendirildi. Sonunda, 0,25 mL  $FeCl_3$  ilave edildi ve köre karşı 700 nm de absorbansı alındı. Kör olarak etanol kullanıldı [74].

Zeytin meyvesinin metanol ekstraktında demir indirgeme antioksidan gücünü belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL ) metanol ekstraktlarının içine 0,75 mL metanol, 1mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6.6) ve 1 mL (%1) potasyum ferriksiyaniür  $[K_3Fe(CN)_6]$  ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 1 mL triklorasetikasit (%10) ile asitlendirildi. Sonunda, 0,25 mL  $FeCl_3$  ilave edildi ve köre karşı 700 nm de absorbansı alındı. Kör olarak metanol kullanıldı [74].

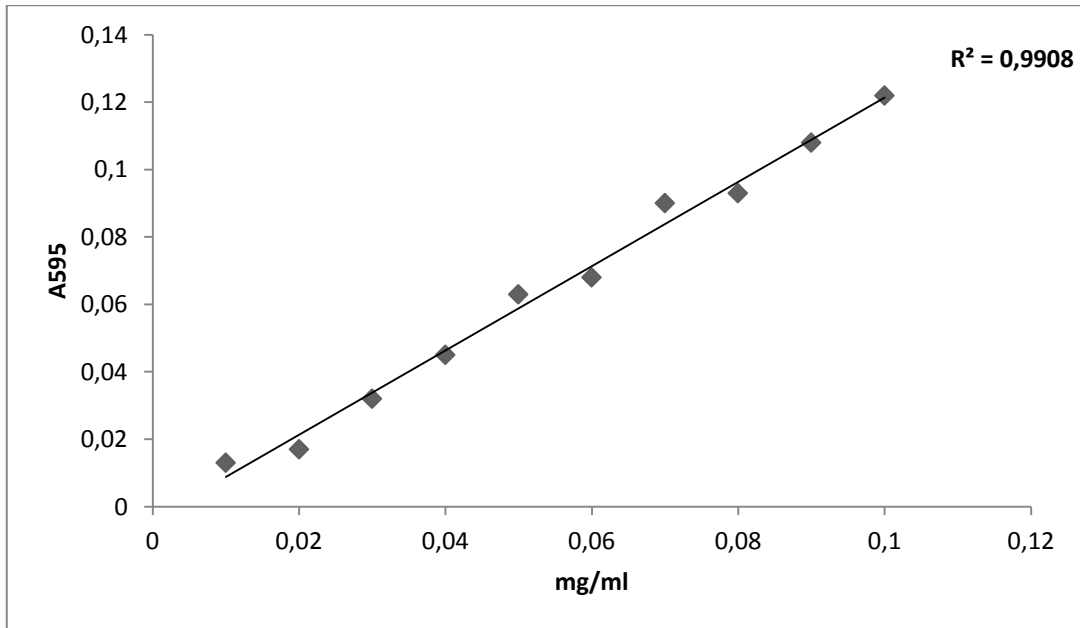
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Serbest Enzim Çalışmaları

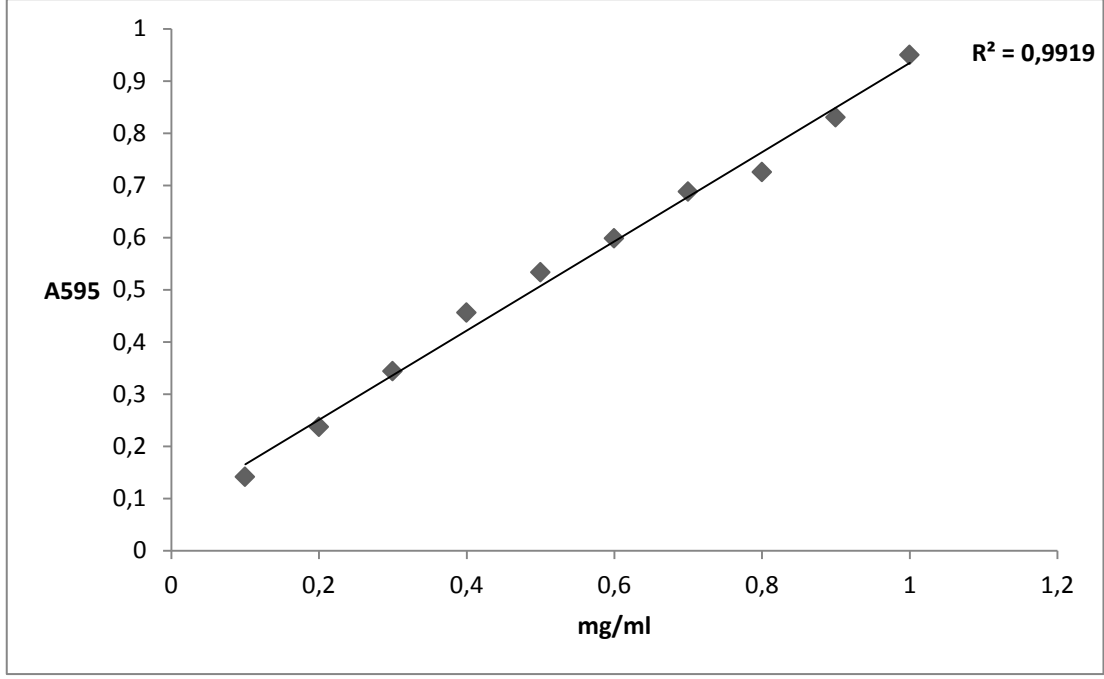
##### 3.1.1 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

###### 3.1.1.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Bölüm 2.2.1.2’de belirtilen yöntem ile ham ekstrakt hazırlandı ve Bölüm 2.2.1.3’de belirtilen yöntem ile aktivite bakıldı. Bölüm 2.2.2’de belirtilen Bradford yöntemi ile biri daha hasas (Şekil 3.1) olmak üzere 2 adet standart grafik çizildi (Şekil 3.2). Bu standart grafik yardımı ile rotein miktarları tayin edildi (Tablo 3.2).



**Şekil 3.1** : Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.



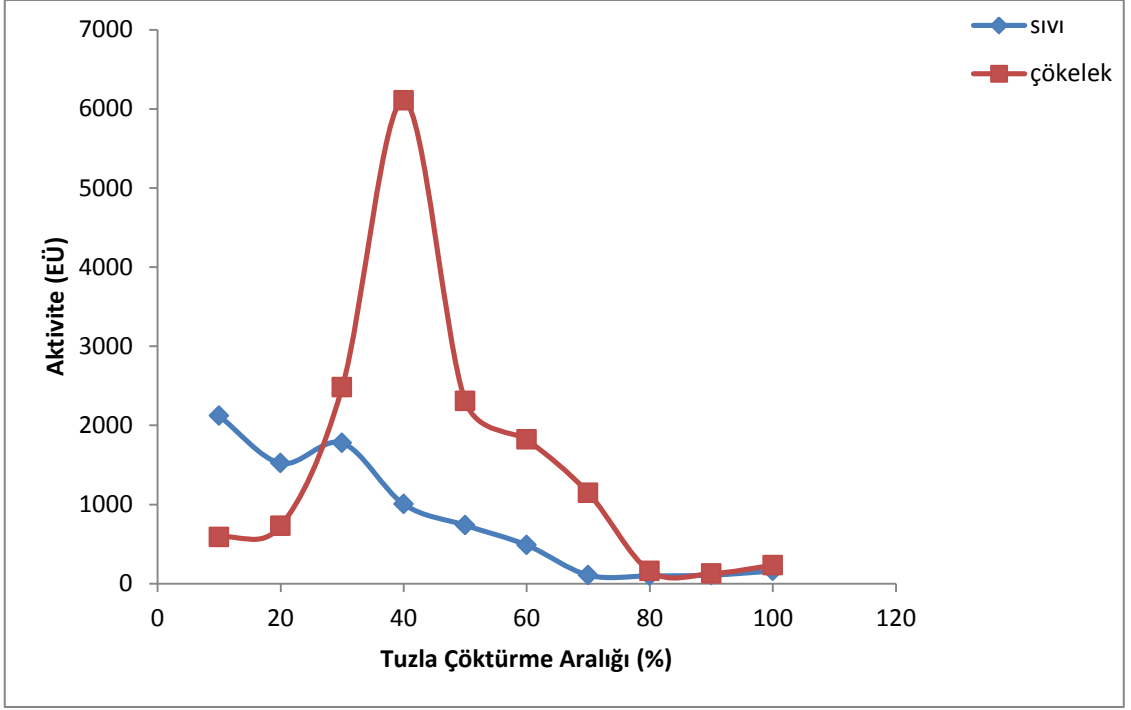
**Şekil 3.2** : Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.

### **3.1.1.2 $\beta$ -Glukozidaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi**

Amonyum sülfat çöktürmesi aralığı belirlemek amacı ile Tablo 3.1 deki belirtilen tuz konsantrasyonlarında Bölüm 2.2.1.4’de belirtilen yöntem kullanılarak %0-%100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı ve aktivitenin % 10 ile % 60 amonyum sülfat aralığında elde edilen çökelelerde en yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3.3).

**Tablo 3.1 :** Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri ve amonyum sülfat miktarı.

<b>Aralık Değeri</b>	<b>Çöktürme Aralığı (%W/V)</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Kullanılan Amonyum Sülfat (g)</b>	<b>Sıvı Aktivite (EÜ)</b>	<b>Çökelti Aktivite (EÜ)</b>
<b>1</b>	0-10	100	5,14	2119,8	586,5
<b>2</b>	10-20	100	5,28	1521,7	729,4
<b>3</b>	20-30	100	5,46	1776,9	2481,4
<b>4</b>	30-40	100	5,62	1005,1	6105,1
<b>5</b>	40-50	100	5,82	737,8	2306,4
<b>6</b>	50-60	100	6,02	487,1	1881,1
<b>7</b>	60-70	100	6,23	107,6	1146,1
<b>8</b>	70-80	100	6,45	98,7	159,6
<b>9</b>	80-90	100	6,70	108,3	126,9
<b>10</b>	90-100	100	6,96	159,6	232,1

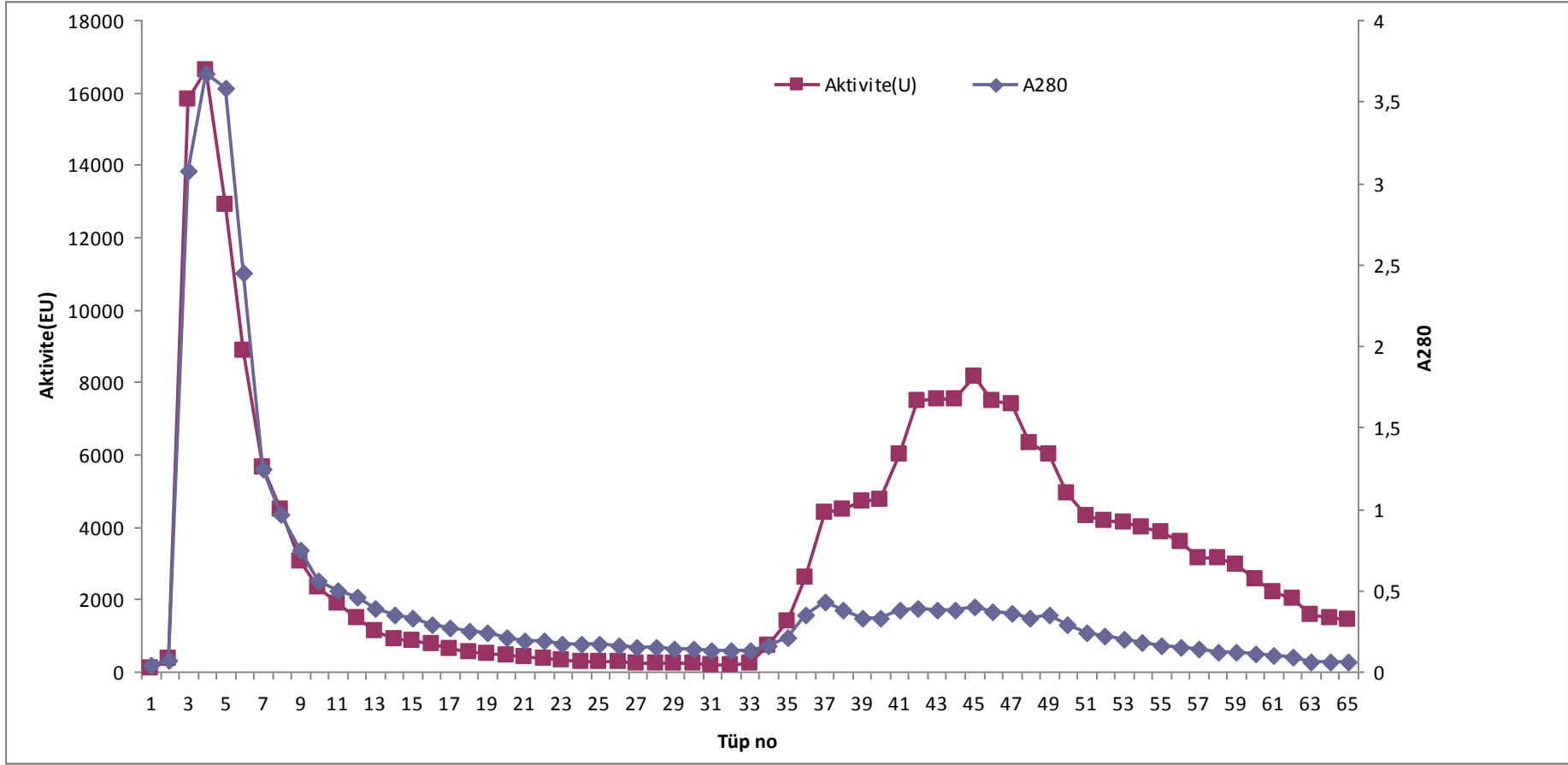


**Şekil 3.3 :** Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik.

### 3.1.1.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen çökelek 1 M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ , 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.8) tamponunda çözüldü ve Bölüm 2.2.1.5’de belirtilen yöntem ile hidrofobik etkileşim kromatografi kolonuna tatbik edildi. Bölüm 2.2.1.5’de belirtilen yöntemle toplanan tüm elüatların köre karşı 405 nm de aktiviteleri ve 280 nm absorbanlar alınarak kalitatif proteini belirlendi. Elde edilen verilere göre tüm tüplerin aktivite (EÜ) ve protein miktarı grafiği çizildi ( Şelkil 3.4).

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler belirlendi. Ham ekstrakt, kolona tatbik edilen amonyum sülfat çöktürmesi sonrası numune ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma sonrası aktivite gösteren elüat çözeltilerinin Bölüm 2.2.2’de belirtilen Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve Bölüm 2.2.1.3’de belirtilen yöntem kullanılarak aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Tablo 3.2’de verildi. Buna göre % 16,84 verim ile 20,91 kat saflaştırılan zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin spesifik aktivitesi 169800 (EÜ) olarak belirlendi.



Şekil 3.4 : Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kolonundan zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin elusyon grafiği.

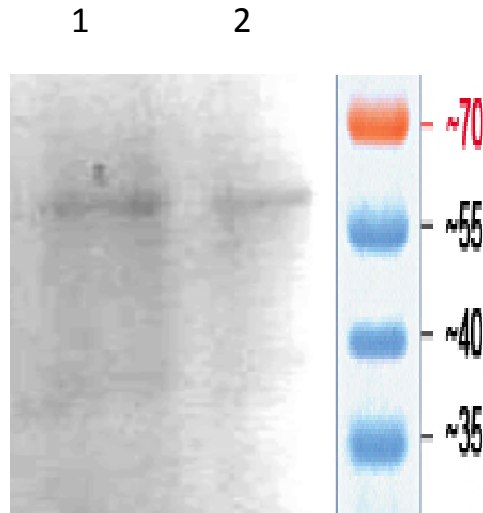
Tablo 3.2 : Saflaştırma Tablosu

<b>Basamak</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Aktivite (U/mL)</b>	<b>Toplam Aktivite (U/mL)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/mL)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Ham ekstrakt</b>	100	1932	359900	0,238	23,9	8117	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	3	23086	69258	0,826	2,478	27949	361	1,84
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	2	6792	13584	0,040	0,08	169800	16,8	20,91



### 3.1.2 Zeytin $\beta$ -Glukozidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 2.2.4’de belirtildiği şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine zeytinden saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.5). Buna göre zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin 55-60 kDa hizasında tek bant verildiği görüldü.



**Şekil 3.5** : Zeytin (*Olea europea* L.) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntüsü.

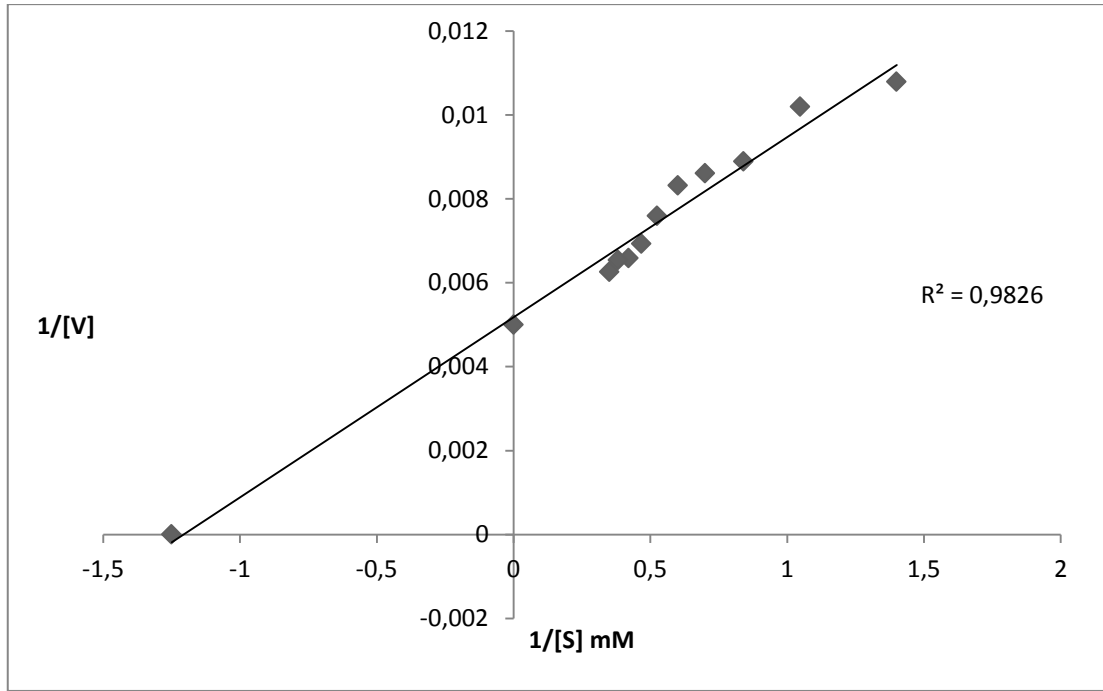
### 3.1.3 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 3.1.3.1 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin *p*NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmış zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için Tablo 3.3'de belirtilen konsantrasyonlarda *p*NPG substrat çözütisine karşı Bölüm 2.2.1.3'de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.6).  $K_M$  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 (Tablo 3.4.).

**Tablo 3.3 :** Zeytin  $\beta$ -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 Sodyum asetat Tamponu ( $\mu$ l)	<i>p</i> NPG Çözeltisi ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisi ( $\mu$ l)	Kuyucuk Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyucuk Substrat Derişimi (mM)	A405	Aktivite EÜ/mL	$1/V$ ( $\times 10^{-4}$ )	$1/[S]$
120	20	70	210	0,47	0,127	92,64	107	1,40
110	30	70	210	0,71	0,1335	98,07	101	1,04
100	40	70	210	0,95	0,1507	112,4	88	0,84
90	50	70	210	1,19	0,1551	116,1	86	0,70
80	60	70	210	1,42	0,16	120,2	83	0,60
70	70	70	210	1,66	0,1737	131,6	75	0,52
60	80	70	210	1,90	0,1889	144,3	69	0,46
50	90	70	210	2,14	0,1978	151,7	65	0,42
40	100	70	210	2,38	0,1992	152,9	65	0,38
30	110	70	210	2,61	0,2074	159,8	62	0,35



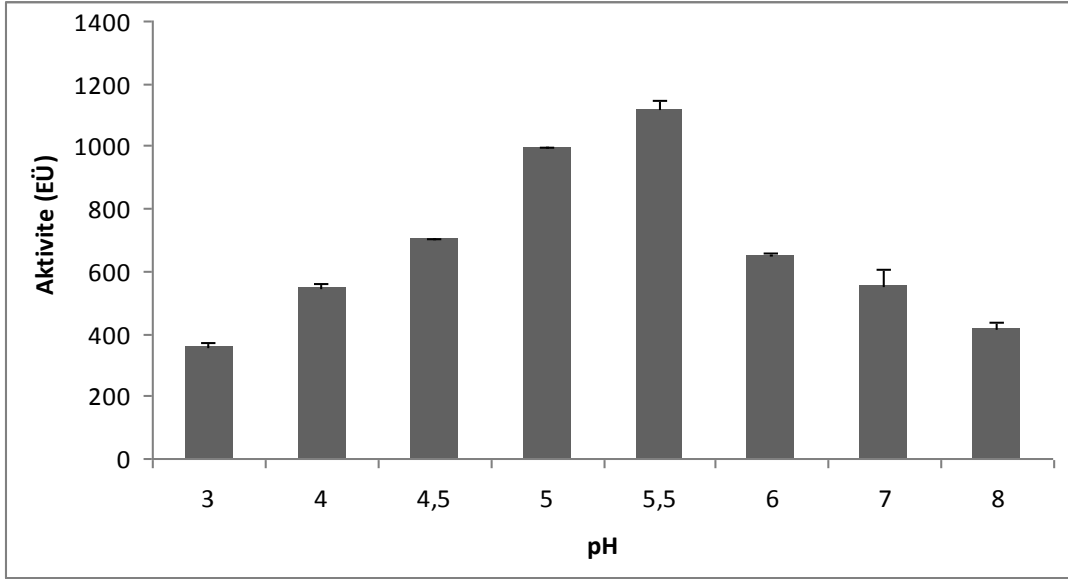
**Şekil 3.6** : Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan  $\beta$ -glikozidaz enziminin *p*NPG substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Tablo 3.4** : Zeytin  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratlara karşı  $K_M$ ,  $V_{\max}$  ve  $V_{\max} / K_M$  değerleri

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{\max}$ (EU/mg)	$V_{\max}/K_M$
<i>p</i> NPG	0,8	192	256

### 3.1.3.2 $\beta$ -glukozidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

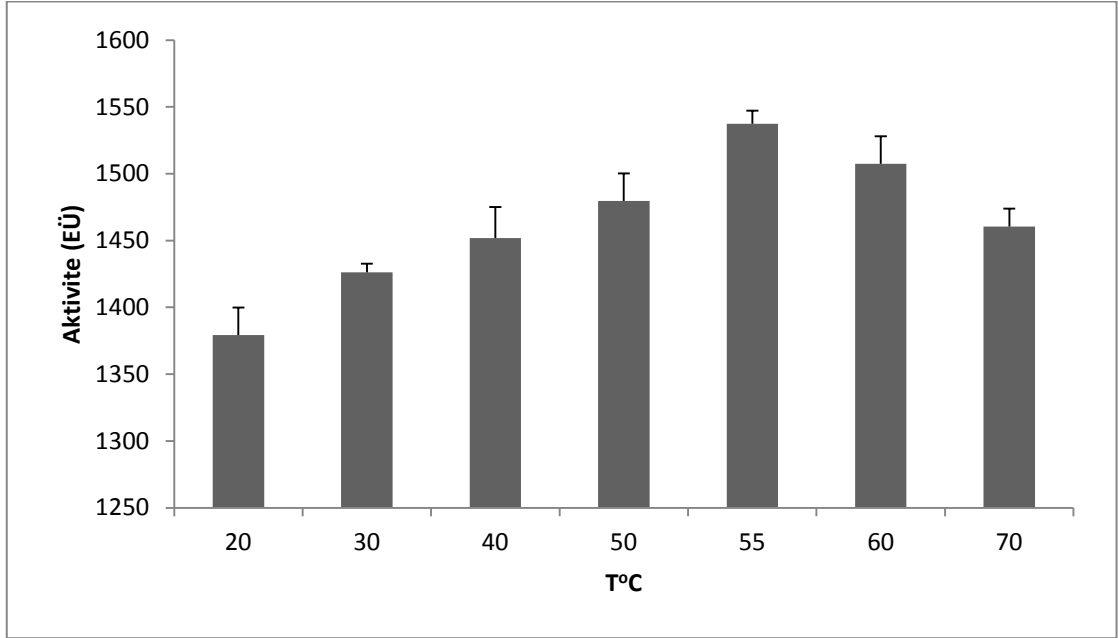
Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırmış zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için farklı pH değerlerinde Sodyum asetat tamponları ve bu tamponlar ile son konsatrasyon 5 mM *p*NPG substrat çözeltileri hazırlandı. Bölüm 2.2.1.3’de belirtilen yöntem ile  $\beta$ - Glukozidaz enziminin aktivitesi tayin edildi. Her pH değeri için o pH değerinde substratı kullanıldı. Denemeler 3 tekerrürlü yapıldı ve standart sapmaları hesaplanarak reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH değerine karşı grafik çizildi. Buna göre enzimin pH 5,5’de en yüksek aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7** : Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin *p*NPG substratı ile elde edilmiş optimum pH grafiği.

### 3.1.3.3 $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmış zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklıklarda Bölüm 2.2.1.3’de belirtilen yöntemle aktivite tayini belirlendi. Deneyler 3 tekerrürlü yapıldı ve standart sapmaları hesaplanarak reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklık değerine karşı grafik çizildi. Buna göre enzimin 55°C’de en yüksek aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 3.8).



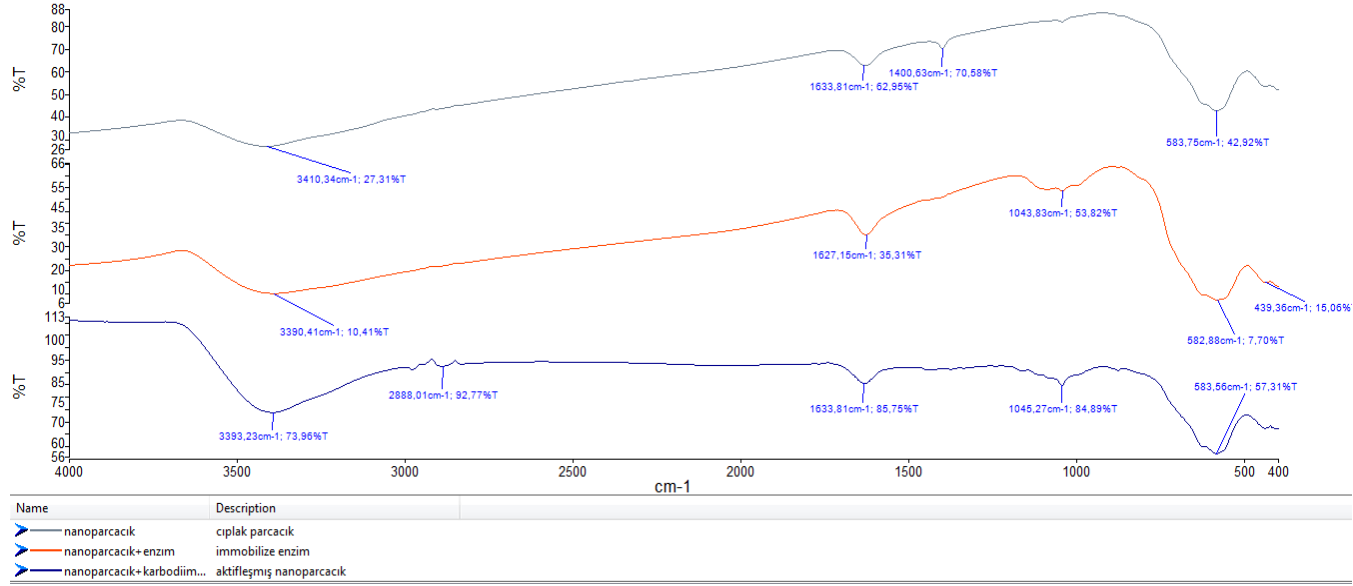
**Şekil 3.8:** Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin *p*NPG substratı ile elde edilmiş optimum sıcaklık grafiği.

## 3.2 İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enzim Çalışmaları

### 3.2.1 FT-IR analizi

Manyetik nanoparçacıklara immobilize edilen zeytin  $\beta$ -glukozidazının, aktifleştirilmiş nanoparçacığın ve çıplak nanoparçacığın Bölüm 2.3.2’de belirtilen yöntem kullanılarak FT-IR analizleri ile manyetizma karakterizasyonu belirlendi. FTIR analiz sonucu Şekil 3.9’de görülmektedir.

Buna göre; yapılan FT-IR analizinde O-H bağı piki olduğunu düşündüğümüz piki çıplak nanoparçacık  $3410\text{ cm}^{-1}$ ’de, karbodiimid ile aktifleştirilmiş nanoparçacık  $3393\text{ cm}^{-1}$ ’de,  $\beta$ -glukozidaz enzimi immobilize edilmiş nanoparçacık ise  $3390\text{ cm}^{-1}$ ’de vermiştir. C=O bağı piki olduğunu düşündüğümüz piki çıplak nanoparçacık  $1633\text{ cm}^{-1}$ ’de, carbodiimide ile aktifleştirilmiş nanoparçacık  $1633\text{ cm}^{-1}$ ’de,  $\beta$ -glukozidaz enzimi immobilize edilmiş nanoparçacık ise  $1627\text{ cm}^{-1}$ ’de vermiştir. C-O bağı piki olduğunu düşündüğümüz piki, carbodiimide ile aktifleştirilmiş nanoparçacık  $1045\text{ cm}^{-1}$ ’de,  $\beta$ -glukozidaz enzimi immobilize edilmiş nanoparçacık ise  $1043\text{ cm}^{-1}$ ’de vermiştir. Çıplak nanoparçacık C-O piki olduğunu düşündüğümüz piki vermemiştir.



Şekil 3.9: Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklara İmmobilize edilmiş zeytin  $\beta$ -glukozidazının FT-IR spektrumu.

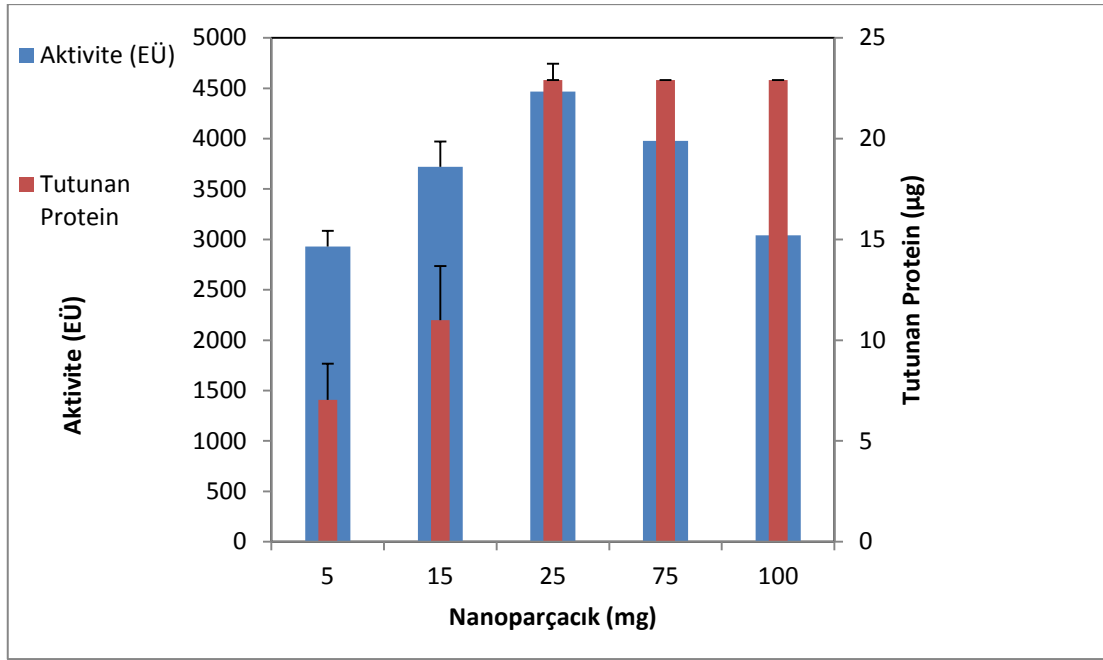


### **3.2.2 Enzimin Süperparamanyetik Nanoparçacıklara Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi**

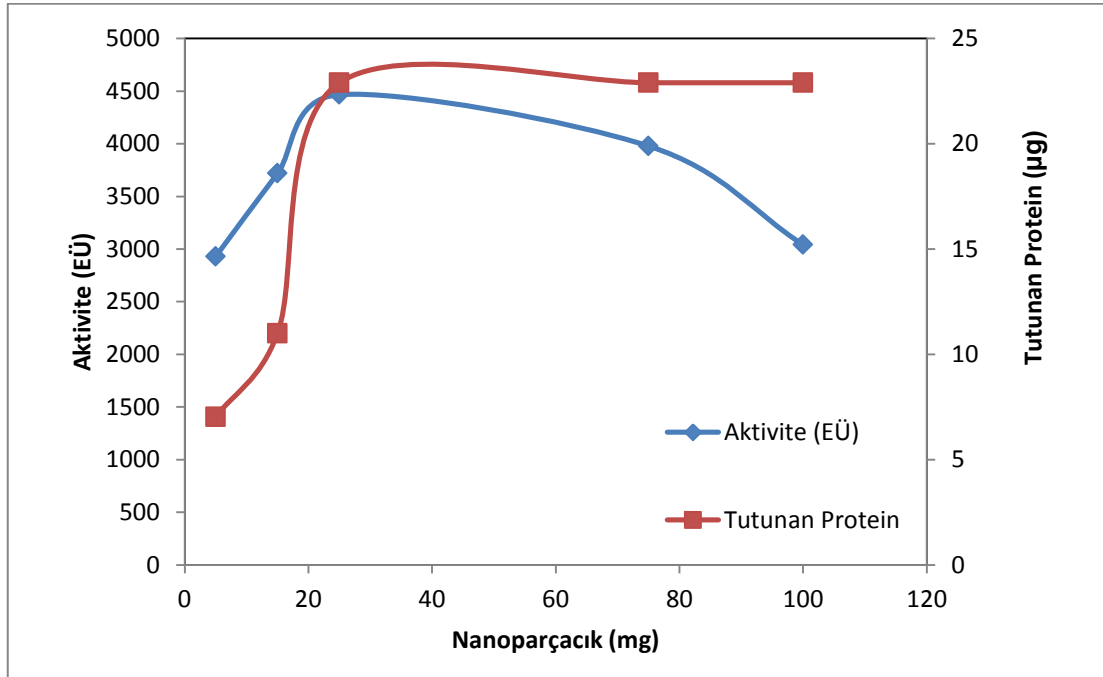
Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırmış zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin nanoparçacıklara bağlanma kapasitesini belirlemek amacıyla Bölüm 2.3.1’de belirtilen yöntem ile Tablo 3.5’de belirtilen nanoparçacık miktarlarına 22.9  $\mu\text{g}$  enzim yüklendi. Bölüm 2.3.3’deki yöntem ile aktivite tayini yapıldı. 210  $\mu\text{l}$  pNPG standart eğri grafiği kullanılarak enzim ünitesi hesaplandı. Üstten alınan yıkama sıvılarında tutunmayan protein miktarları Bölüm 2.2.2’de belirtilen Bradford Yöntemi ile belirlendi. Deney 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi ve standart sapmaları hesaplanarak nanoparçacık miktarına (mg) karşı gelen enzime ait protein miktarı ( $\mu\text{g}$ ) ile aktivite grafiği çizildi. Buna göre 22.9  $\mu\text{g}$  enzim 25 mg nanoparçacığa tam doygunluk konsantrasyonunda bağlandı. Bu değerden daha yüksek nanoparçacık miktarlarıyla yapılan denemelerde ortamda enzim tutunmamış nanoparçacık miktarı arttıkça aktivitenin düştüğü belirlendi (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).

**Tablo 3.5 :** Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan  $\beta$ -glikozidaz enziminin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan protein ve nanoparçacık miktarları.

<b>Nanopartikül mg</b>	<b>Yüklenen protein <math>\mu</math>g</b>	<b>Tutunmayan protein <math>\mu</math>g</b>	<b>Tutunan protein <math>\mu</math>g</b>	<b>Enzim bağlanma oranı (%)</b>	<b>A405</b>	<b>Aktivite (EÜ)</b>
<b>5</b>	22,9	16	6,9	30,13	0,438	2820,51
<b>15</b>	22,9	9	13,9	60,69	0,606	3897,65
<b>25</b>	22,9	0	22,9	100	0,725	4662,39
<b>75</b>	22,9	0	22,9	100	0,644	4140,17
<b>100</b>	22,9	0	22,9	100	0,498	3206,62



**Şekil 3.10** : Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesi.



**Şekil 3.11** : Farklı miktarlarda süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş zeytin  $\beta$ -glukozidazının aktivite ve yüzeye tutunan protein ( $\beta$ -Glu/Fe,  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) miktarlarındaki değişim grafiği.

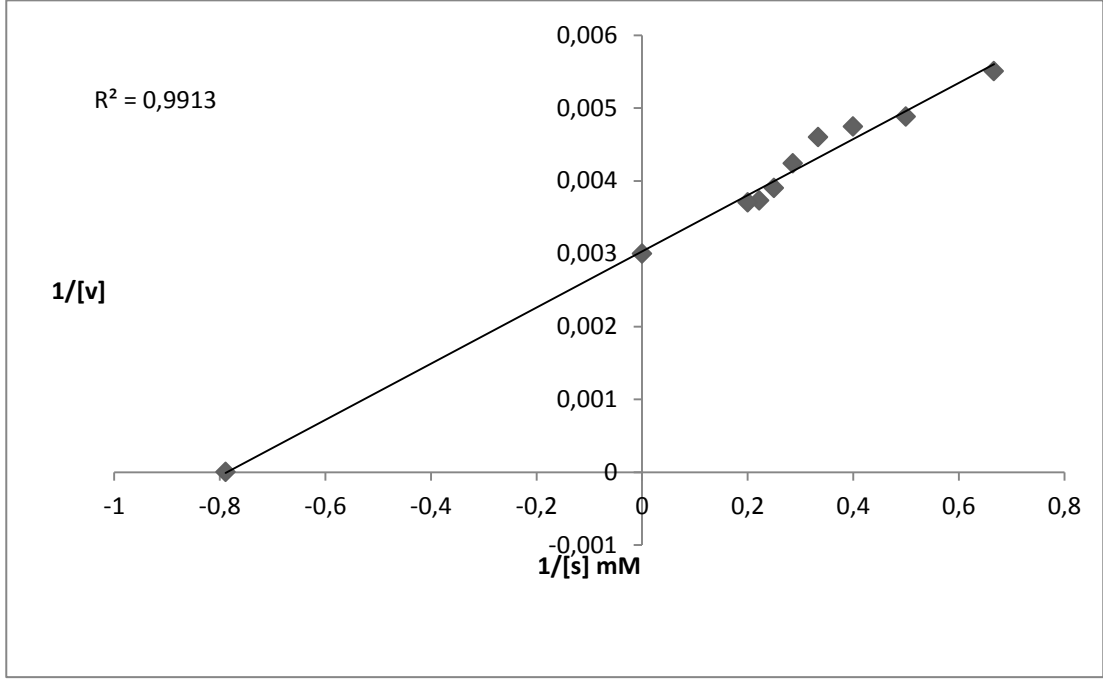
### 3.2.3 İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 3.2.3.1 İmmobilize $\beta$ -glukozidaz Enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerinin Belirlenmesi

Hidrofobik etkileşim kromotografisi ile saflaştırmış zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerinin belirlenmesi için Bölüm 2.3.1'de belirtilen yöntem ile 0,2 g nanoparçacığa enzim immobilize edildi. 0,2 g nanoparçacık 50 mL sodyum asetat tamponunda homojen olarak karıştırıldı. Her tüpe 5 mL örnekten alındı ve nanoparçacıklar 10 eşit hacme bölündü. 10 tüpte bulunan enzim ihtiva eden nanoparçacıklarda Bölüm 2.3.3'de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı. Hepsinin aynı aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. İmmobilize enzimim  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerini belirlemek amacı ile eşit miktarlarda aktivite gösteren tüplerde Tablo 3.6'de belirtilen farklı substrat konsantrasyonunda Bölüm 2.3.3'de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.12). İmmobilize enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak sırası ile 1,26 mM ve 333,3 EU/mL olarak bulundu (Tablo 3.9).

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

50 mM Sodyum asetat Tamponu ( $\mu$ l)	pNPG Çözeltisi ( $\mu$ l)	İmmobilize Enzim Miktarı (g)	Tüpteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Tüpteki Substrat Derişimi (mM)	A 405	Aktivite EÜ/mL	$1/V$ ( $\times 10^4$ )	$1/[S]$
700	300	0,020	1000	1,5	0,133	181,7	5,50	0,66
600	400	0,020	1000	24	0,150	204,8	4,88	0,5
500	500	0,020	1000	2,5	0,155	210,8	4,74	0,4
400	600	0,020	1000	3	0,160	217,4	4,59	0,33
300	700	0,020	1000	3,5	0,173	235,3	4,24	0,28
200	800	0,020	1000	4	0,188	256,30	3,90	0,25
100	900	0,020	1000	4,5	0,197	268,2	3,72	0,22
0	1000	0,020	1000	5	0,200	270,1	3,70	0,2



**Şekil 3.12** : Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan vesüperparamanyetik nanoparçacıklaraimmobilize edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin *p*NPG substratı ile elde edilmiş Lineweaver-Burk ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) grafiği.

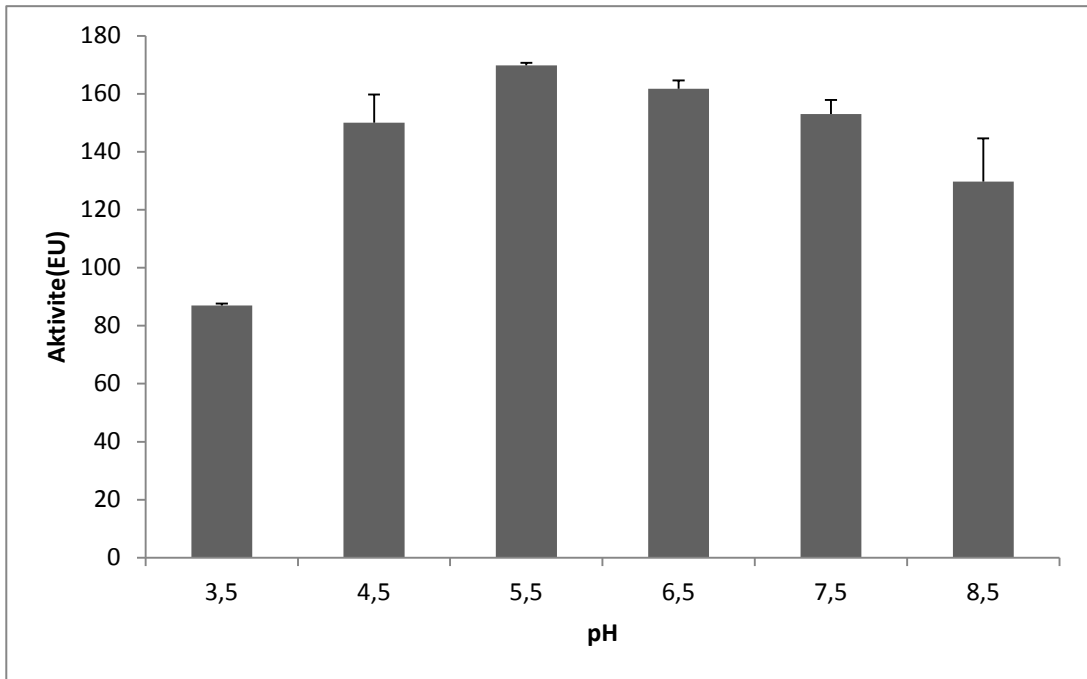
**Tablo 3.9** : Zeytin meyvesinden saflaştırılan immobilize  $\beta$ -glukozidaz enzimin optimum şartlarda  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $K_M/V_{max}$  değerleri

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (EU/mL)	$V_{max}/K_M$
<i>p</i> NPG	1,26	333,3	263

### 3.2.3.2 İmmobilize Enzim Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

0,3 g nanoparçacığa Bölüm 2.3.1’de belirtilen yöntem ile enzim immobilize edildi. İmmobilize edilmiş nanoparçacık 150 mL sodyum asetat tamponunda homojen olarak karıştırıldı. Her tüpe 5 mL örnekten alındı ve nanoparçacıklar 18 eşit parçaya bölündü. 18 tüpte bulunan enzim ihtiva eden nanoparçacıkların Bölüm

2.3.3'de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı. Hepsinin aynı aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. İmmobilize enzimim optimum pH aktivitesini belirlemek amacı ile eşit miktarlarda aktivite gösteren 6 tüp'te farklı pH'larda Bölüm 2.3.3'de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı. Her bir Aktivite tayininde kullanılan substratlar uygun pH sodyum asetat tamponunda *p*NPG substratında çözülerek hazırlandı. Deneyler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirildi ve standart sapmaları hesaplanarak ortam pH değerine karşılık aktivite değişimi grafiği çizildi. Buna göre immobilize enzim optimum pH değeri 5,5 olarak belirlendi (Şekil 3.13).

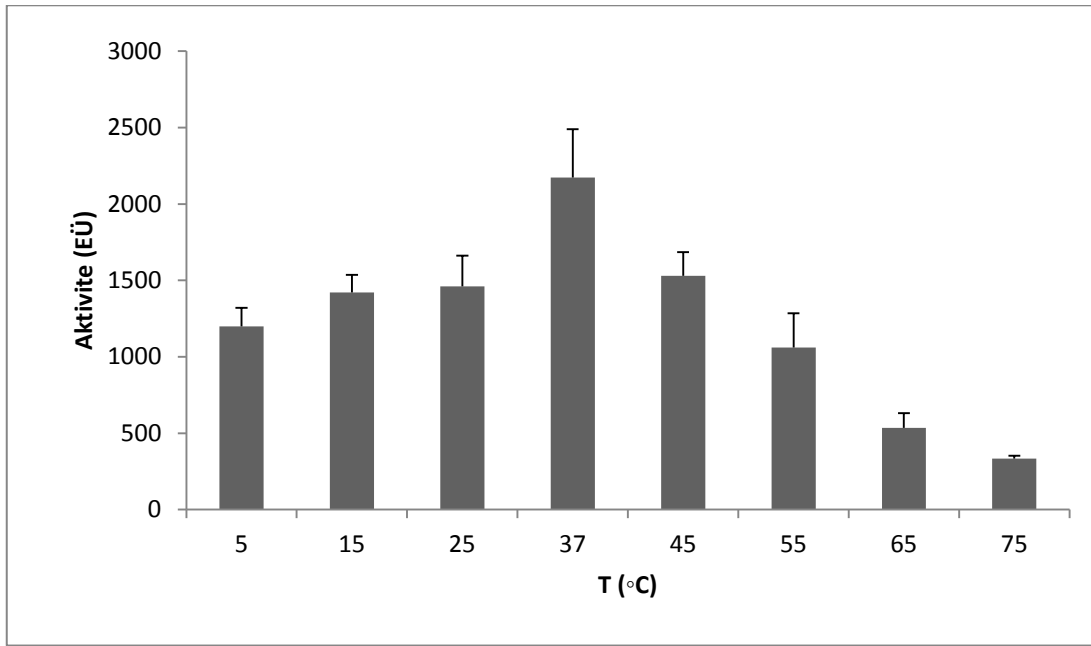


**Şekil 3.13:** Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan ve süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş  $\beta$ -glikozidaz enziminin *p*NPG substratı ile elde edilmiş optimum pH grafiği.

### 3.2.3.3 İmmobilize enzim Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

0,3 g nanoparçacığa Bölüm 2.3.1'de belirtilen yöntem ile enzim immobilize edildi. İmmobilize edilmiş nanoparçacık 150 mL sodyum asetat tamponunda homojen olarak karıştırıldı. Tüplere 5'er mL örnek alınarak, nanoparçacıklar 18 eşit

parçaya bölündü. 18 tüpte bulunan enzim ihtiva eden nanoparçacıkların Bölüm 2.3.3'de de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı. Tüp içeriklerinin aynı aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. İmmobilize enzimim optimum sıcaklık değerini belirlemek amacı ile eşit miktarlarda aktivite gösteren 6 tüpte farklı sıcaklıklarda Bölüm 2.3.3'de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı. Deneyler üç tekerrürlü çalışıldı ve standart sapmaları hesaplanarak ortam sıcaklığına karşı aktivite değişim grafiği çizildi (Şekil 3.14). Buna göre immobilize enzim optimum sıcaklık değeri 37°C olarak belirlendi.



**Şekil 3.14** : Zeytin (*Olea europea L.*) meyvesinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılan ve süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş  $\beta$ -glikozidaz enziminin pNPG substratı ile elde edilmiş optimum sıcaklık grafiği.

### 3.3 Ticari enzim çalışmaları

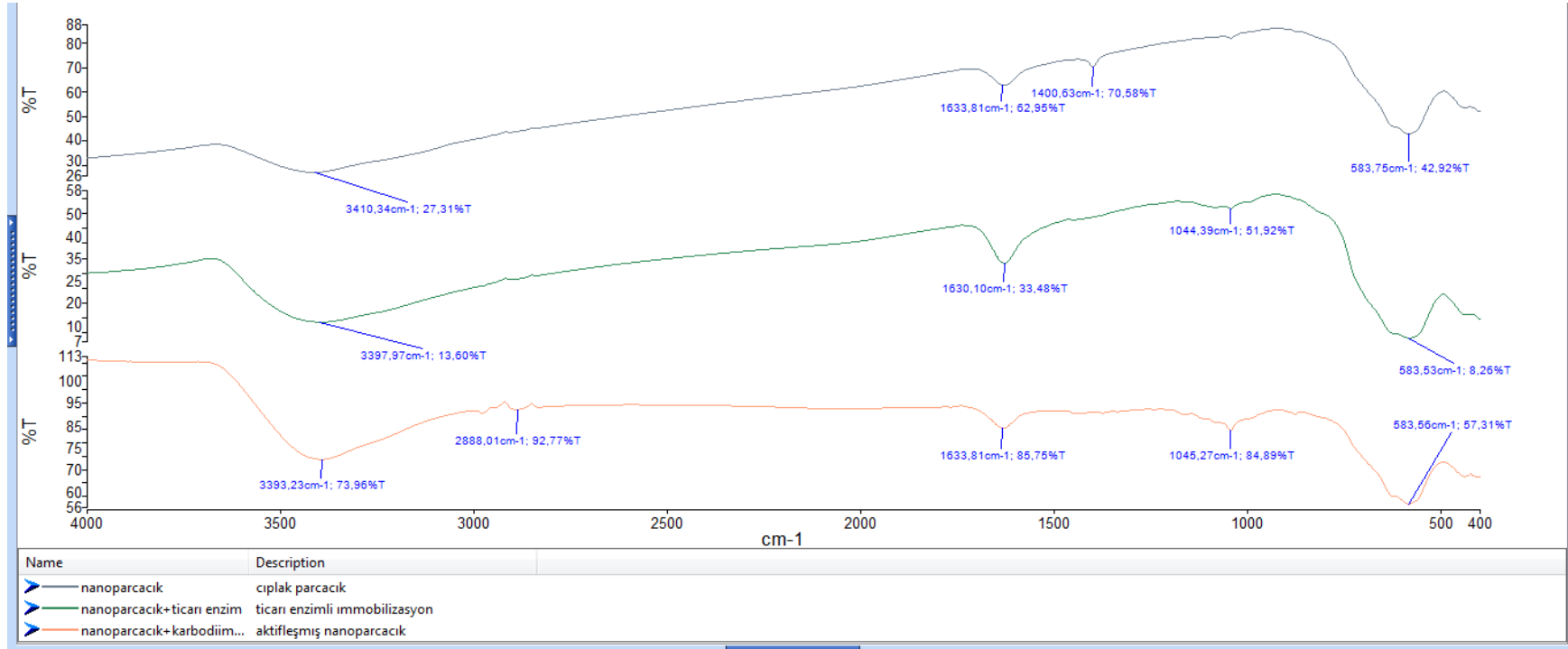
Zeytinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılarak elde edilen  $\beta$ -glikozidaz enzimi (E) ve süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilizasyonu ile elde edilen immobilize enzim (İE) ile gerçekleştirilen çalışmalarda karşılaştırma yapmak amacıyla liyofilize enzim ile benzer denemeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



### 3.3.1 FTIR Analizi

Zeytinden Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile saflaştırılarak Manyetik nanoparçacıklara immobilize edilen zeytin  $\beta$ -glikozidazının (İE) ile karşılaştırma yapmak üzere ticari preparat olarak kullanılmakta olan  $\beta$ -glikozidaz enziminin immobilizasyonu ile elde edilen İmmobilize Ticari Enzimin (İTE) FTIR analizleri ile manyetizma karakterizasyonu belirlenmiştir. FTIR analiz sonucu Şekil 3.15’de görülmektedir.

Yapılan FT-IR analizinde O-H bağı piki olduğunu düşündüğümüz piki çıplak nanoparçacık  $3410\text{ cm}^{-1}$ ’de, karbodiimid ile aktifleştirilmiş nanoparçacık  $3393\text{ cm}^{-1}$ ’de, ticari enzim immobilize edilmiş nanoparçacık ise  $3397\text{ cm}^{-1}$ ’de vermiştir. C=O bağı piki olduğunu düşündüğümüz piki çıplak nanoparçacık  $1633\text{ cm}^{-1}$ ’de, karbodiimid ile aktifleştirilmiş nanoparçacık  $1633\text{ cm}^{-1}$ ’de, ticari enzim immobilize edilmiş nanoparçacık ise  $1630\text{ cm}^{-1}$ ’de vermiştir. C-O bağı piki olduğunu düşündüğümüz piki, karbodiimid ile aktifleştirilmiş nanoparçacık  $1045\text{ cm}^{-1}$ ’de, ticari enzim immobilize edilmiş nanoparçacık ise  $1044\text{ cm}^{-1}$ ’de vermiştir. Çıplak nanoparçacık C-O piki olduğunu düşündüğümüz piki vermemiştir.



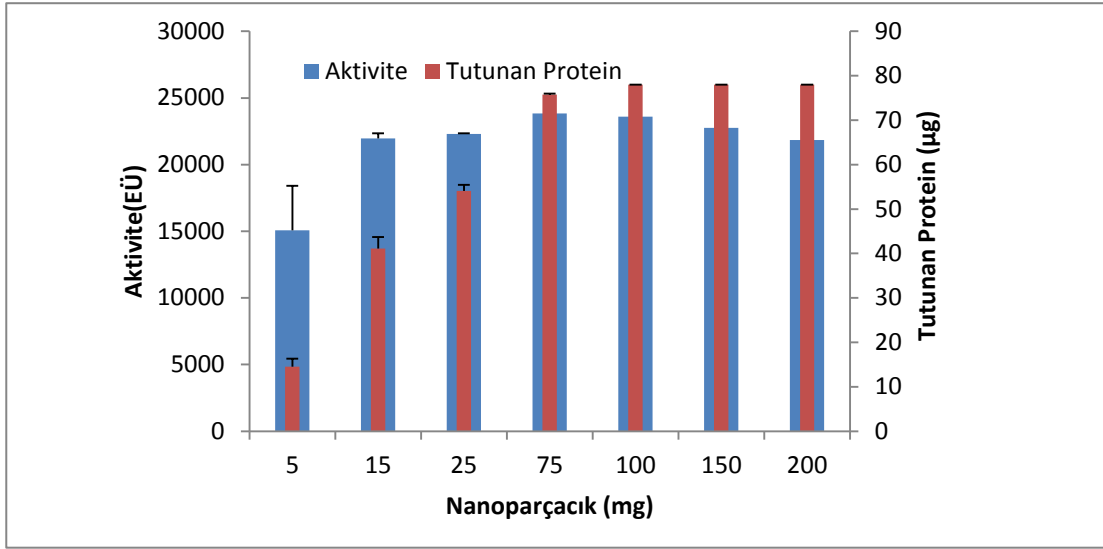
Şekil 3.15 : Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklara İmmobilize edilmiş ticari enzim FT-IR spektrumu.

### 3.3.2 Ticari Enzimin Nanoparçacıklara bağlanma kapasitesinin Belirlenmesi

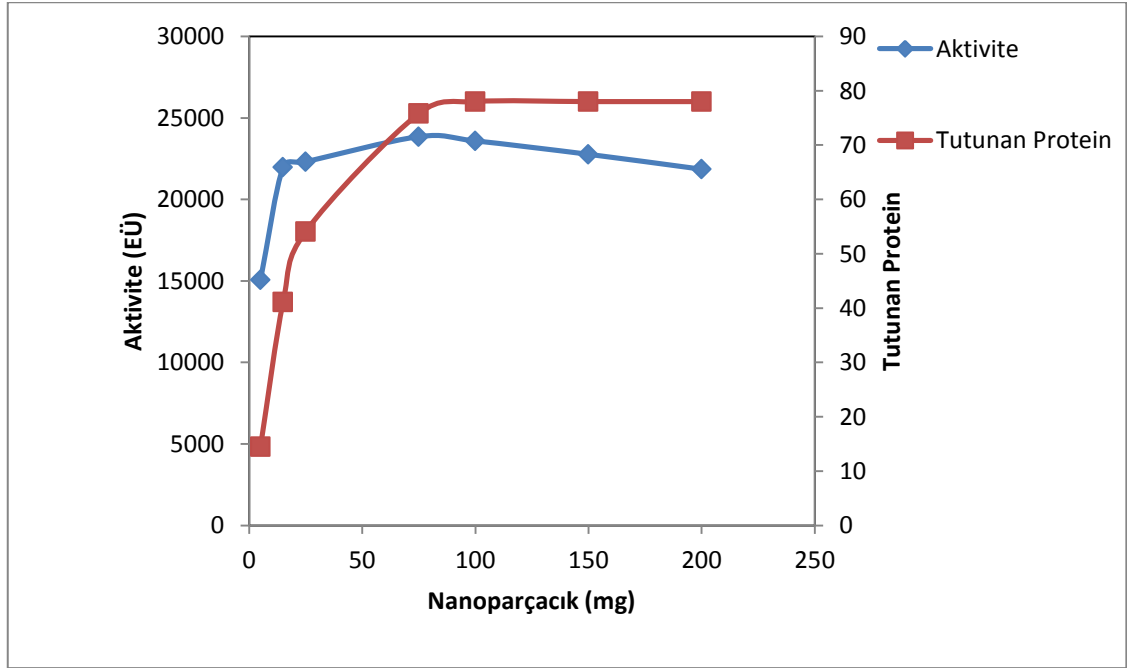
Ticari enzimin nanoparçacıklara bağlanma kapasitesini belirlemek amacıyla Bölüm 2.3.1'de belirtilen yöntem ile Tablo 3.12'da belirtilen nanoparçacık miktarlarına 78 µg enzim yüklendi. Bölüm 2.3.3'deki yöntem ile aktivite tayini yapıldı. 210 µl *p*NPG standart eğri grafiği kullanılarak enzim ünitesi hesaplandı. Üstten alınan yıkama sıvılarında tutunmayan protein miktarları Bölüm 2.2.2'de belirtilen Bradford yöntemi ile belirlendi ve böylece tutunan enzim miktarı tayin edildi. Denemeler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapmaları hesaplanarak nanoparçacık miktarına karşılık tutunan protein miktarı ( $\beta$  glu/Fe<sup>+3</sup>) (µg/mg) ve aktivite (EU/mg) değişim grafiği çizildi. Tablo 3.12'da görüldüğü üzere 100 mg nanoparçacığa 78 µg enzim bağlanma oranı %100 olarak belirlenirken en yüksek aktivite değeri 78 µg protein değerine karşılık 75 mg süperparamanyetik nanoparçacık ile elde edildi (Şekil 3.16). Reaksiyon ortamında enzim tutunmayan nanoparçacık miktarı arttıkça aktivitenin düştüğü belirlendi (Şekil 3.17

**Tablo 3.7 :** Ticari Enzimin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan protein ve nanoparçacık miktarları

<b>Nanopartikül mg</b>	<b>Yüklenen protein miktarı (µg)</b>	<b>Tutunmayan protein miktarı (µg)</b>	<b>Tutunan protein (µg)</b>	<b>Enzim bağlanma oranı (%)</b>	<b>Aktivite (EÜ)</b>
5	78	63,5	14,5	18,5	15063,89
15	78	36,9	41,1	52,6	21974,79
25	78	23,9	54,1	69,35	22307,69
75	78	2,2	75,8	97,1	23849,79
100	78	0	78	100	23590,38
150	78	0	78	100	22766,03
200	78	0	78	100	21851,5



**Şekil 3.16** : Ticari enzimin süperparamanyetik nanopartiküllere tutunma kapasitesinin belirlenmesi



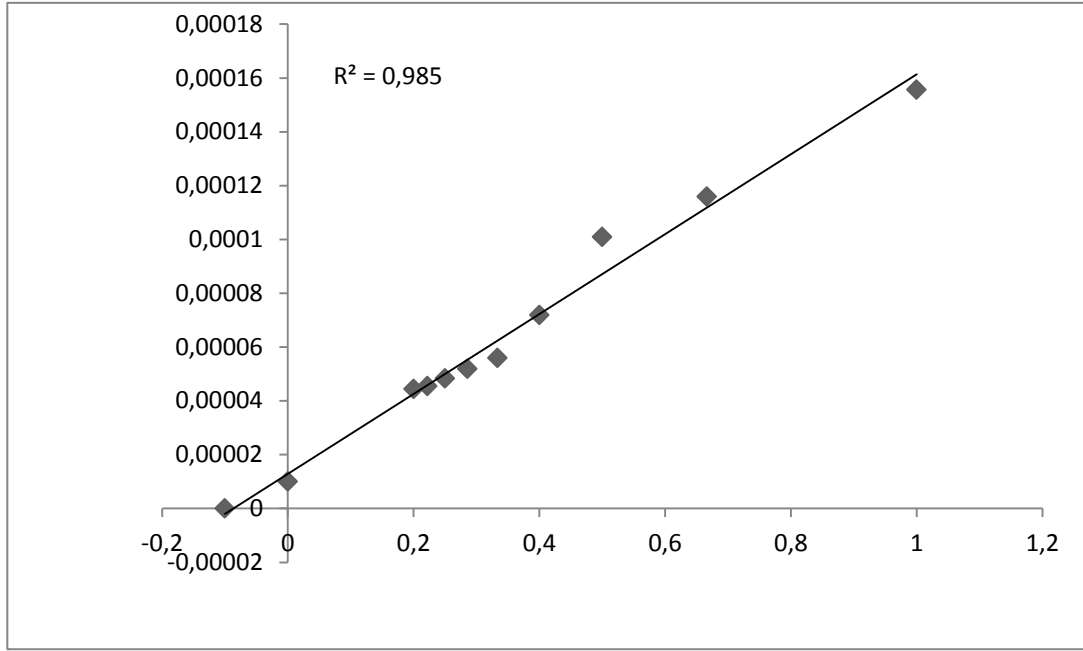
**Şekil 3.17** : Farklı miktarlarda süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiş ticari enzim aktivite ve yüzeye tutunan protein ( $T.E/Fe$ ,  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) miktarlarındaki değişim grafiği.

### 3.3.3 Ticari Enzim pNPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

İmmobilize ticari enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerinin belirlenmesi için Bölüm 2.3.1’de belirtilen yöntem ile 0,2 g nanoparçacığa enzim immobilize edildi. 0,2 g nanoparçacık 50 mL sodyum asetat tamponunda homojen olarak karıştırıldı. Her tüpe 5 mL örnekten alındı ve nanoparçacıklar 10 eşit hacme bölündü. 10 tüpte bulunan enzim ihtiva eden nanoparçacıklarda Bölüm 2.3.3’de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı. Hepsinin aynı aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. İmmobilize ticari enzimim  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerini belirlemek amacı ile eşit miktarlarda aktivite gösteren tüplerde Tablo 3.9’de belirtilen farklı substrat konsantrasyonunda Bölüm 2.3.3’de belirtilen yöntem ile aktivite tayini yapıldı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.18). İmmobilize ticari enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak sırasıyla 10 mM ve 10.000 EU/mL olarak bulundu (Tablo 3.10)

**Tablo 3.8** : İmmobilize ticari enzimin pNPG substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

<b>50 mM Sodyum asetat Tamponu (<math>\mu</math>l)</b>	<b>pNPG Çözeltisi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>İmmobilize Ticari Enzim Miktarı (g)</b>	<b>Tüpteki Toplam Hacim (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Tüpteki Substrat Derişimi (mM)</b>	<b>A 405</b>	<b>Aktivite EÜ/mL</b>	<b><math>1/V</math> (<math>\times 10^4</math>)</b>	<b><math>1/[S]</math></b>
800	200	0,020	1000	1	1,001	6426,28	0,155	1
700	300	0,020	1000	1,5	1,345	8631,41	0,115	0,66
600	400	0,020	1000	2	1,545	9913,46	0,100	0,5
500	500	0,020	1000	2,5	2,17	13919,8	0,071	0,4
400	600	0,020	1000	3	2,79	17900,6	0,055	0,33
300	700	0,020	1000	3,5	3,0	19298,0	0,051	0,28
200	800	0,020	1000	4	3,22	20695,5	0,048	0,25
100	900	0,020	1000	4,5	3,43	22003,2	0,045	0,22
0	1000	0,020	1000	5	3,51	22535,2	0,044	0,2



**Şekil 3.18** : İmmobilize ticari enzimin *p*NPG substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Tablo 3.9** : İmmobilize ticari enziminin *p*NPG substratlara karşı  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max} / K_M$  değerleri

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (EU/mg)	$V_{max}/K_M$
<i>p</i> NPG	10	100000	10000



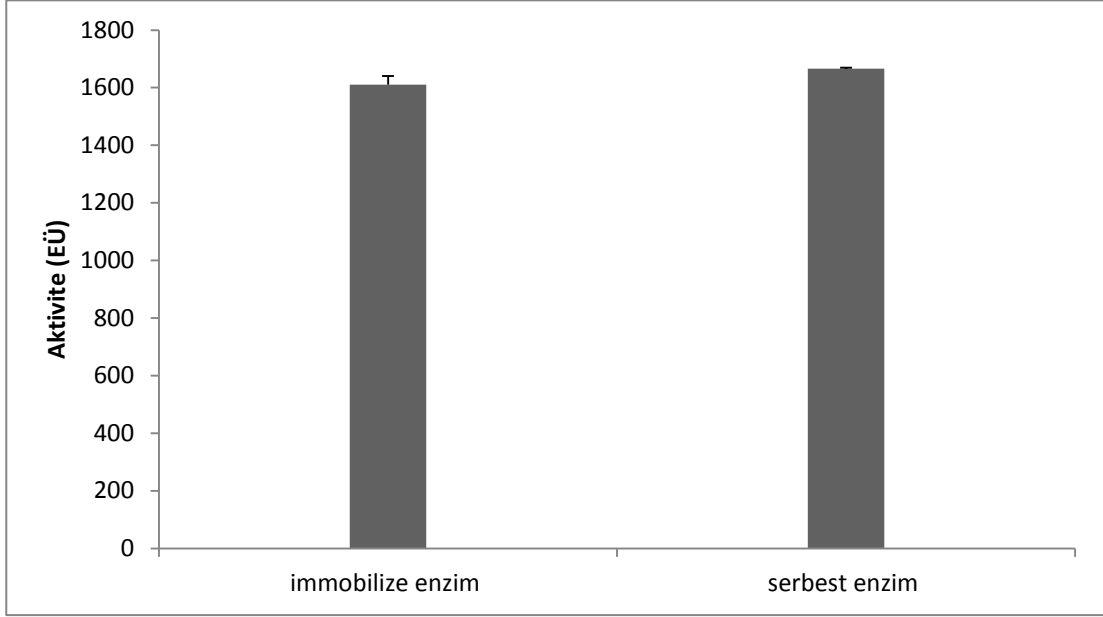
### 3.4 Serbest ve İmmobilize Enzim Farkının Belirlenmesi

#### 3.4.1 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Saflaştırılan Serbest Zeytin $\beta$ - Glukozidazı ve İmmobilize Zeytin $\beta$ - Glukozidazı Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırmış zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin Bölüm 3.2.1 de belirtilen yöntem ile enzim süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edildi. Aynı miktar serbest enzim ve aynı koşullarda aktivite tayini yapıldı (Tablo 3.11). Deney 3 tekrarlı çalışılarak standart sapmaları hesaplanarak immobilize ve serbest enzim aktivite karşılaştırma grafiği çizildi. Buna göre serbest enzim immobilize edildikten sonra aktivitesinde çok fazla değişiklik olmadığı belirlendi (Şekil 3.19).

**Tablo 3.10 :** Serbest enzim ve immobilize  $\beta$ -glukozidaz enzimin protein miktarları ve aktiviteleri.

	Sodyum asetat tamponu	<i>p</i> NPG (5mM)	Protein miktarı ( $\mu$ g)	A405	EÜ/mL
Serbest enzim	0,5 mL	0,5 mL	2,29	0,255	1644,87
İmmobilize enzim	0,5 mL	0,5 mL	2,29	0,259	1669,87



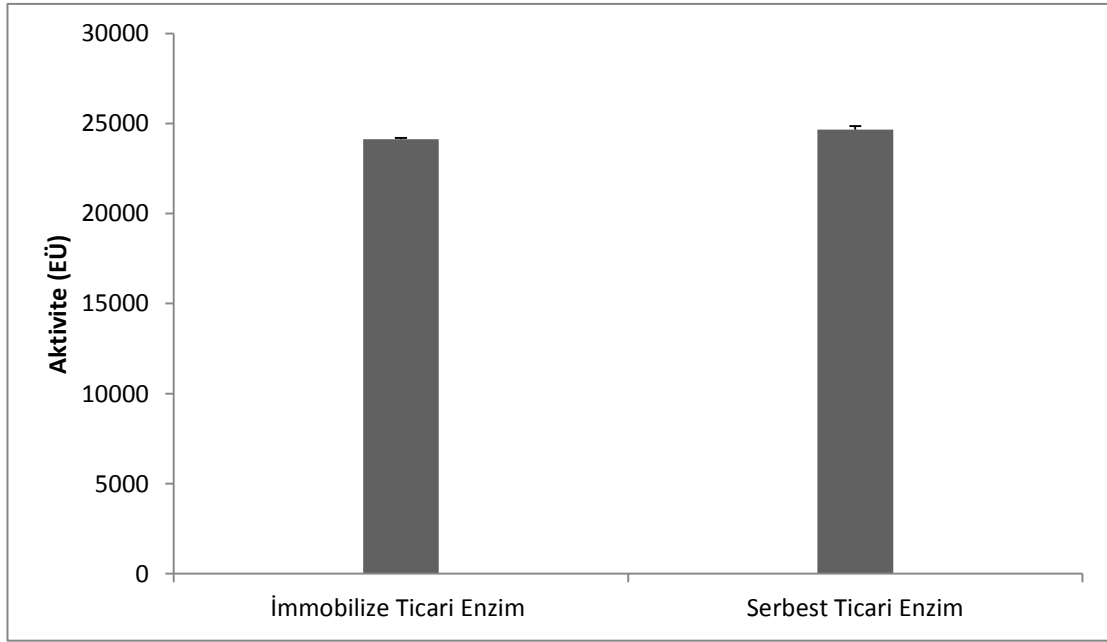
**Şekil 3.19** : Serbest ve immobilize zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitelerinin karşılaştırılması.

### **3.4.2 Serbest Ticari Enzim ve İmmobilize Ticari Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması**

Ticari enzim Bölüm 3.2.1 de belirtilen yöntem ile enzim süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edildi. Aynı miktar serbest enzim ile immobilize enzimin aynı koşullarda aktivite tayini yapıldı (Tablo 3.12). Deney 3 tekrarlı çalışılarak standart sapmaları hesaplanarak immobilize ve serbest enzim aktivite karşılaştırma grafiği çizildi. Buna göre serbest enzim immobilize edildikten sonra aktivitesinde çok fazla değişiklik olmadığı belirlendi (Şekil 3.20).

**Tablo 3.11** : Serbest enzim ve immobilize ticari enzimin protein miktarları ve aktiviteleri

	<b>Sodyum asetat tamponu</b>	<b>pNPG (5mM)</b>	<b>Protein miktarı (µg)</b>	<b>A405</b>	<b>EÜ/mL</b>
<b>Sebest Ticari enzim</b>	0,5 mL	0,5 mL	78	3,837	24605,8
<b>İmmobilize Ticari enzim</b>	0,5 mL	0,5 mL	78	3,753	24067,3



**Şekil 3.20** : Serbest ve immobilize ticari enziminin aktivitelerinin karşılaştırılması.

### 3.4.3 Serbest $\beta$ -Glukozidaz , İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz ve İmmobilize Ticari Enzim $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Karşılaştırılması

Serbest ve immobilize  $\beta$ -Glukozidaz enzimi ile yapılan  $K_M$  ve  $V_{max}$  çalışmalarında İmmobilize enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin serbest enzime ait aynı değerlerden yüksek olduğu, belirlendi. İmmobilize enzimin serbest enzime göre  $p$ NPG substratına karşı ilgisinin az olmasına rağmen kinetik hızının daha fazla olduğu bulundu. Ticari enzimin immobilizasyonu ile elde edilen Ticari İmmobilize Enzime (TİE) ait  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin immobilize  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinden çok fazla olduğu bulundu (Tablo 3.13).

**Tablo 3.12 :** Serbest  $\beta$ -glukozidaz, immobilize  $\beta$ -glukozidaz ve immobilize ticari enziminin  $p$ NPG substratlara karşı  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max} / K_M$  değerleri.

	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (EU/mg)	$V_{max}/K_M$
<b>Serbest <math>\beta</math>-glukozidaz</b>	0,8	192,3	240
<b>İmmobilize <math>\beta</math>-glukozidaz</b>	1,3	333,3	256
<b>İmmobilize Ticari Enzim</b>	10	10000	1000

#### 3.4.4 Serbest $\beta$ -Glukozidaz Enzimi ve İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enzimi Optimum pH Değerlerinin Karşılaştırılması

Serbest  $\beta$ -glukozidaz, immobilize  $\beta$ -glukozidaz ve immobilize ticari enzim ile yapılan optimum pH çalışmalarında tüm numunelerin optimum pH değerleri 5,5 olarak belirlendi (Tablo 3.14).

**Tablo 3.13:** Serbest ve immobilize zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değerlerinin Karşılaştırılması.

	Optimum pH
Serbest $\beta$ -Glukozidaz	5,5
İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz	5,5

#### 3.4.5 Serbest $\beta$ -Glukozidaz Enzimi ve İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enzimi Optimum Sıcaklık Değerlerinin Karşılaştırılması

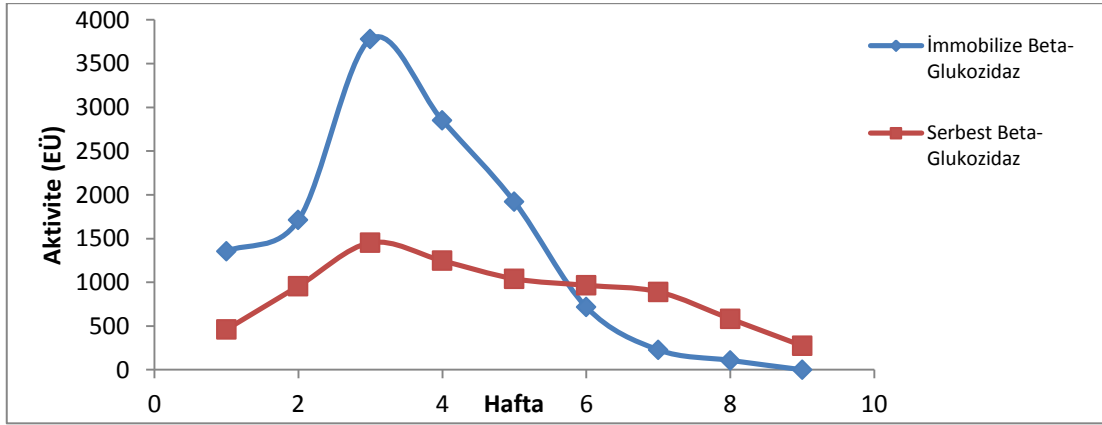
Serbest  $\beta$ -glukozidaz, immobilize  $\beta$ -glukozidaz ve immobilize ticari enzim ile yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında serbest enzimde optimum sıcaklık 55 °C olarak belirlenirken immobilize enzim örneklerinde bu değer 37 °C olarak belirlendi (Tablo 3.15).

**Tablo 3.14:** Serbest ve immobilize zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklıklarının karşılaştırılması.

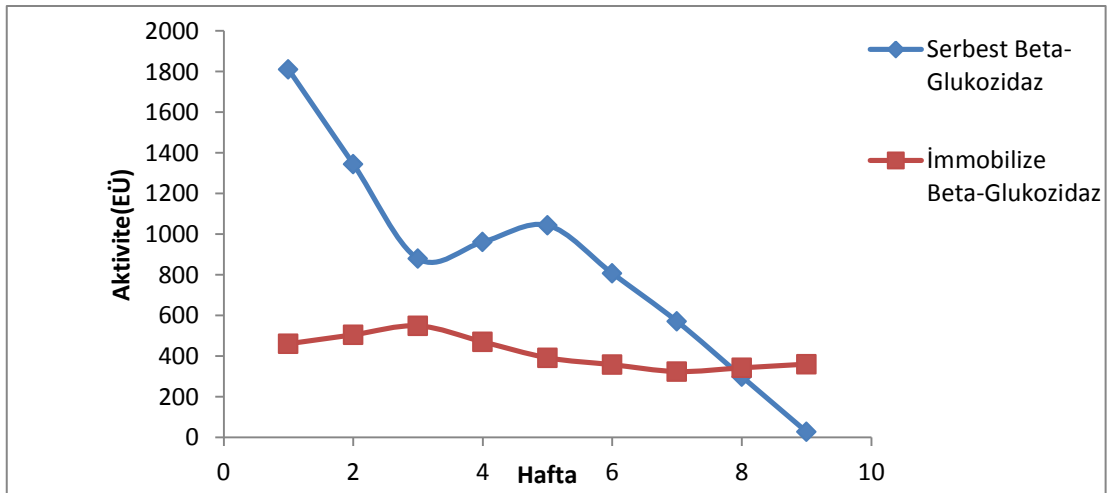
	Optimum Sıcaklık
Serbest $\beta$ -Glukozidaz	55 °C
İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz	37 °C

### 3.4.6 Serbest $\beta$ -Glukozidaz Enzimi ve İmmobilize $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Bekleme Koşullarının Belirlenmesi

Bölüm 2.2.1.5’de belirtilen yöntemle saflaştırılan Zeytin  $\beta$ -glukozidazı Bölüm 2.3.1’de belirtilen yöntem ile demir oksit superparamantetik nanoparçacıklara immobilize edildi. İmmobilize edilen enzim ve serbest durumdaki enzim +4’de (Şekil 3.21) ve +25 ‘de (Şekil 3.22) 9 hafta bekletildi ve her hafta aktivite tayini yapıldı.



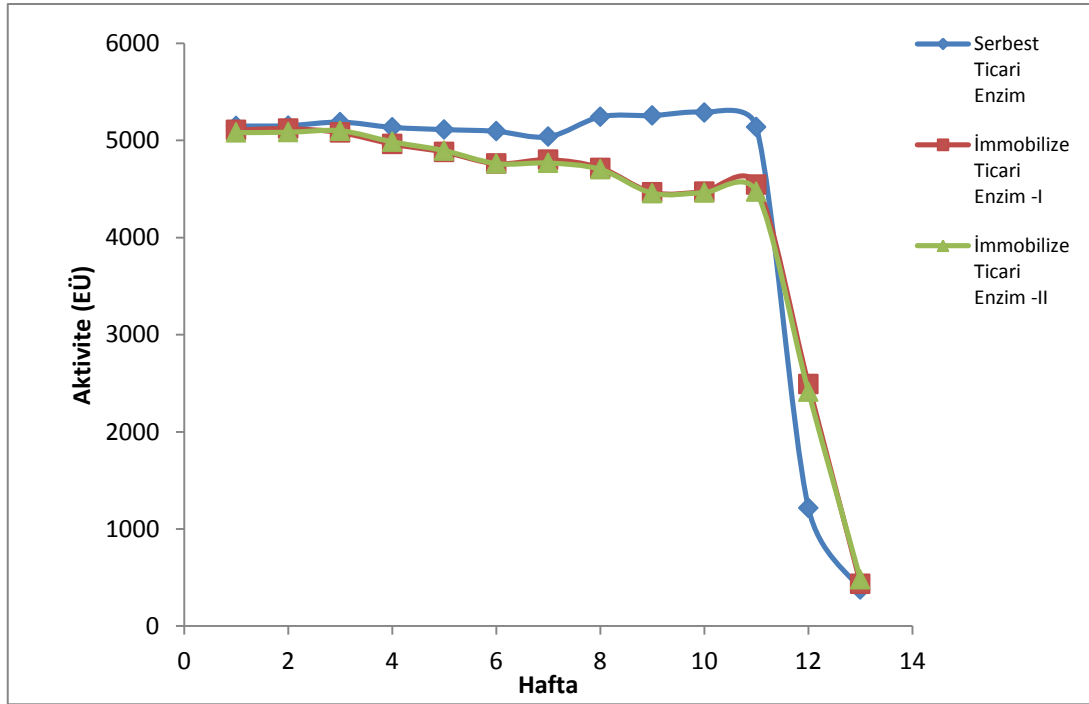
Şekil 3.21 : Serbest ve immobilize Zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin +4 °C’de depolma kararlılığının belirlenmesi.



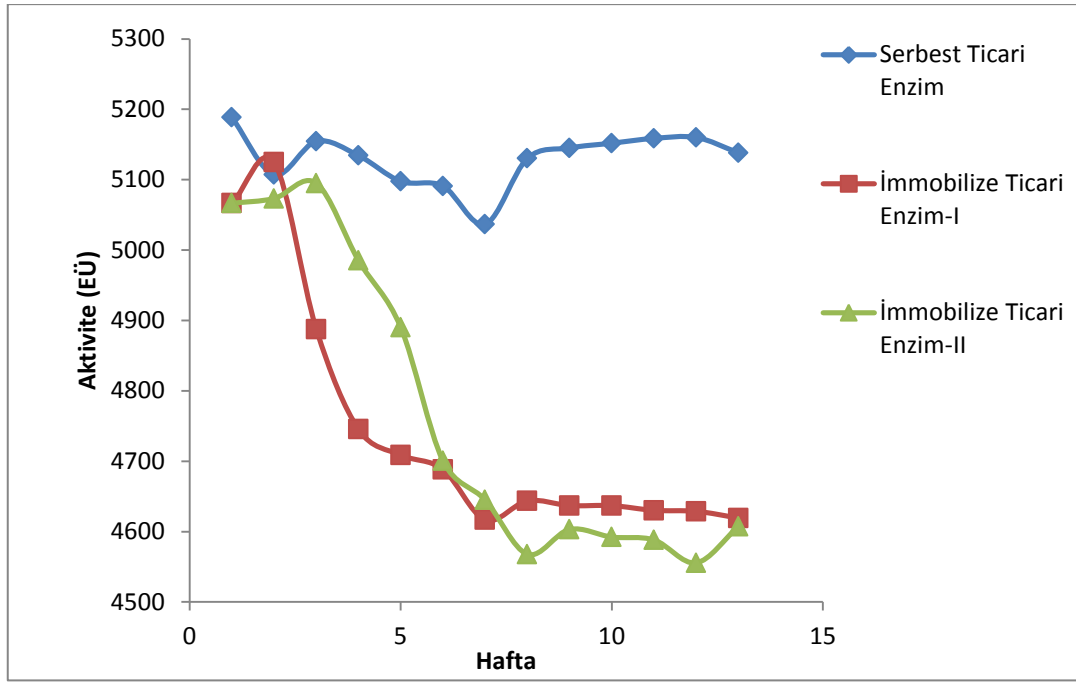
Şekil 3.22 : Serbest ve immobilize Zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin +25 °C’de depolma kararlılığının belirlenmesi.

### 3.4.7 Serbest Ticari ve İmmobilize Ticari Enziminin Bekleme Koşullarının Belirlenmesi

Ticari enzim Bölüm 2.3.1’de belirtilen yöntem ile demir oksit superparamantetik nanoparçacıklara immobilize edildi. İmmobilize edilen enzim ve serbest durumdaki enzim+4 (Şekil 3.23)‘ ve +25 ‘de (Şekil 3.24) de 13 hafta bekletildi ve her hafta aktivite tayini yapıldı.



Şekil 3.23 : Serbest ve immobilize ticari enzimin bekleme +4 °C’de depolama kararlılığının belirlenmesi.



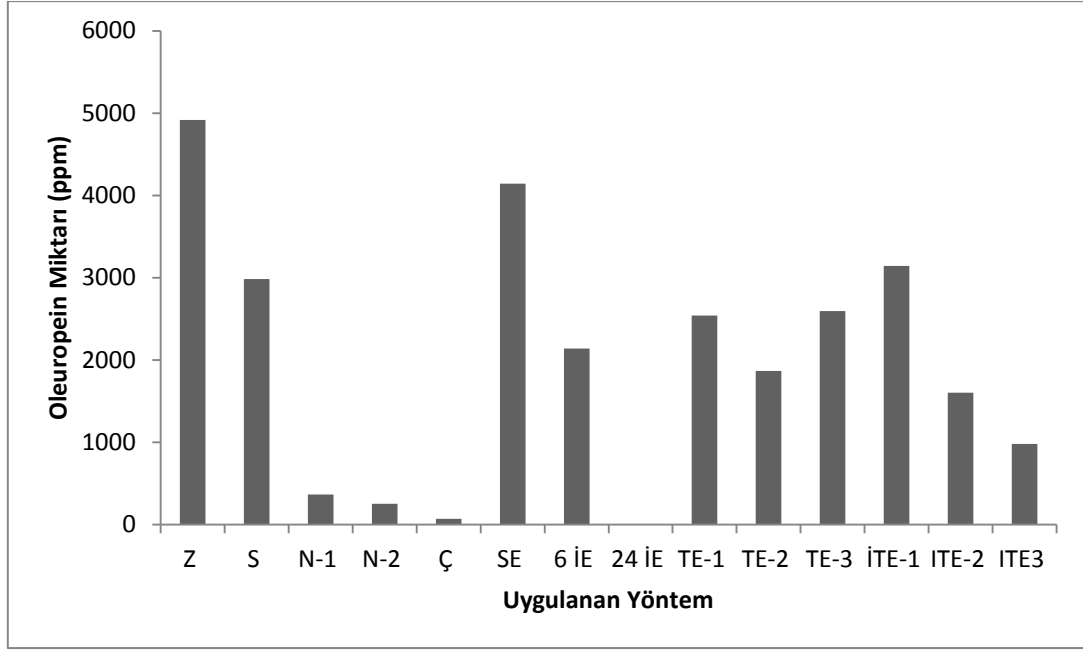
**Şekil 3.24** : Serbest ve immobilize ticari enzimin bekleme +25 °C’de depolama kararlılığının belirlenmesi.

### 3.5 Zeytin Tatlandırma Deneyleri

#### 3.5.1 Zeytin tatlandırmada en uygun yöntemin belirlenmesi

Bölüm 2.4’de belirtilen yöntemlerle zeytin meyvesi 24 saat tatlandırılmaya bırakıldı ve HPLC ile oleuropein analizi yapılarak oleuropein miktarları belirlendi. Oleuropein miktarlarındaki azalmaya bağlı olarak zeytin tatlandırma amacıyla eşit sürede uygulamalarının ardından en uygun zeytin tatlandırma yöntemi belirlendi. Buna göre aynı sürelerle gerçekleştirilen yöntemler arasında oleuropein miktarlarında en anlamlı düşüşler immobilize  $\beta$ -glikozidaz ve immobilize ticari  $\beta$ -glikozidaz uygulamaları olarak belirlendi (Şekil 3.25).





**Şekil 3.25** : Farklı acılık giderme işlemlerinin sofralık zeytin üretiminde oleuropein düzeylerine etkisi.

Z : İşlenmemiş zeytin

S : su ile tatlandırma yapılmış zeytin

N-1 : NaOH ile tatlandırma yapılmış zeytin

N-2 : NaOH ile tatlandırma yapılmış zeytin

Ç : Çizme yöntemi ile tatlandırma yapılmış zeytin

S E : Serbest  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile tatlandırılmış zeytin

6 İE : İmmobilize  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile 6 saat tatlandırılmış zeytin

24 İE : İmmobilize  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile 24 saat tatlandırılmış zeytin

TE- 1 : Serbest ticari enzim ile tatlandırılmış zeytin

TE- 2 : Serbest ticari enzim ile tatlandırılmış zeytin

TE- 3 : Serbest ticari enzim ile tatlandırılmış zeytin

İTE-1 : İmmobilize ticari enzim ile tatlandırılmış zeytin

İTE-2 : İmmobilize ticari enzim ile tatlandırılmış zeytin

### İTE-3: İmmobilize ticari enzim ile tatlandırılmış zeytin

Uygulamalararası farklılıkları ortaya koymak amacıyla yapılan denemeler sonrasında oleuropein miktarlarındaki düşüş etkisi açısından İmmobilize zeytin  $\beta$ -glikozidazı ve immobilize ticari enzim uygulamalarının diğer yöntemlere göre daha etkili oldukları belirlendi (Şekil 3.26) ve (Tablo 3.16).

Etki değeri aşağıda ki şekilde hesaplandı :

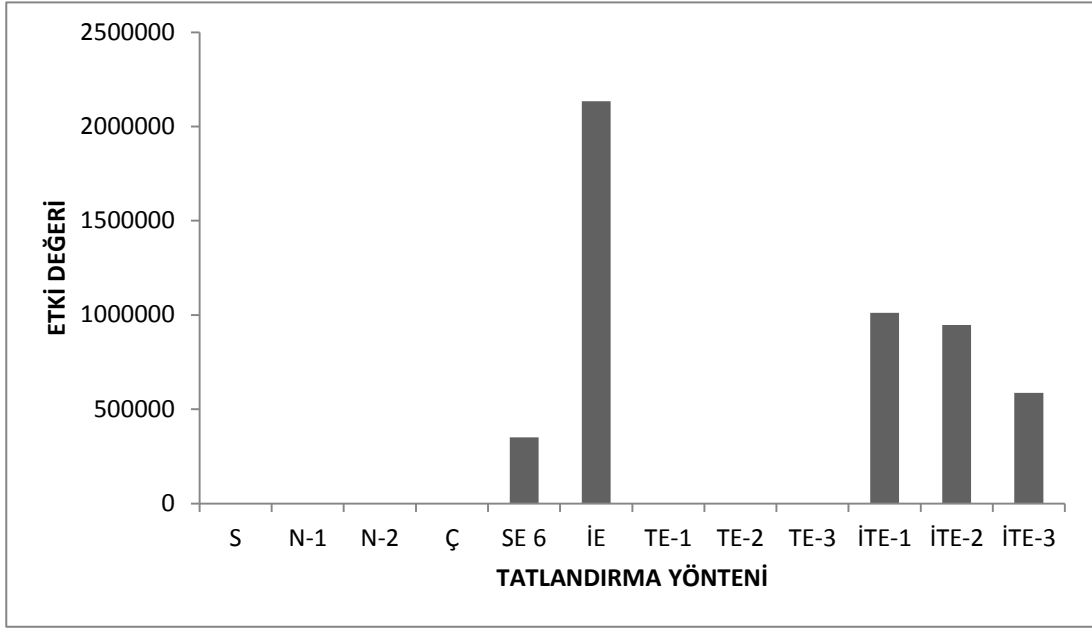
$$\frac{\text{İşlem sonrası zeytindeki oleuropein miktarı}}{\text{İşlem görmemiş zeytindeki oleuropein miktarı}} \times 100 = \% \text{ oleuropein düzeyindeki azalma}$$

İşlem süreleri sabit tutulduğunda, örneklere ait oleuropein düzeylerindeki azalma etkisi en fazla olan örnek %100 kabul edilerek bu azalma etkileri bağıl olarak değerlendirildi.

**Tablo 3.15** : Zeytin tatlandırma için kullanılan farklı yöntemlerle oleuropein hidrolizinin karşılaştırılması

	<b>Uygulama saati</b>	<b>Zeytinden Hidroliz edilen oleuropein</b>	<b>Zeytinde kalan oleuropein</b>	<b>Zeytinde % Oleuropein hidrolizi</b>
<b>Su ile tatlandırma</b>	24	1934	2982	39
<b>NaOH ile tatlandırma-1</b>	24	4551	365	92
<b>NaOH ile Ttatlandırma-2</b>	24	4663	253	94
<b>Çizme yöntemi ile tatlandırma</b>	24	4846	70	98
<b>Serbest B-glukozidaz ile tatlandırma</b>	24	773	4143	15
<b>İmmobilize beta gukozidaz ile tatlandırma</b>	6	2775	2142	56
<b>İmmobilize B-Glukozidaz ile tatlandırma</b>	24	4917	0	100
<b>Serbest Ticari Enzim ile tatlandırma -1</b>	24	2378	2539	48
<b>Serbetst Ticari Enzim ile tatlandırma -2</b>	24	3050	1866	62
<b>Serbest Ticari Enzim ile tatlandırma -3</b>	24	2323	2594	47

<b>İmmobilize Ticari Enzim ile tatlandırma -1</b>	24	1772	3145	36
<b>İmmobilize Ticari Enzim ile tatlandırma -2</b>	24	3313	1604	67
<b>İmmobilize Ticari Enzim ile tatlandırma -3</b>	24	3933	983	80



**Şekil 3.26** : Zeytinde farklı tatlandırma uygulamalarının kullanılması ile oleuropein düzeylerindeki azalma etkisi.

Z : İşlenmemiş zeytin

S : su ile tatlandırma yapılmış zeytin

N-1 : NaOH ile tatlandırma yapılmış zeytin

N-2 : NaOH ile tatlandırma yapılmış zeytin

Ç : Çizme yöntemi ile tatlandırma yapılmış zeytin

S E : Serbest  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile tatlandırılmış zeytin

6 İE : İmmobilize  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile 6 saat tatlandırılmış zeytin

24 İE : İmmobilize  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile 24 saat tatlandırılmış zeytin

TE- 1 : Serbets ticari enzim ile tatlandırılmışzeytin

TE- 2 : Serbets ticari enzim ile tatlandırılmışzeytin

TE- 3 : Serbets ticari enzim ile tatlandırılmışzeytin

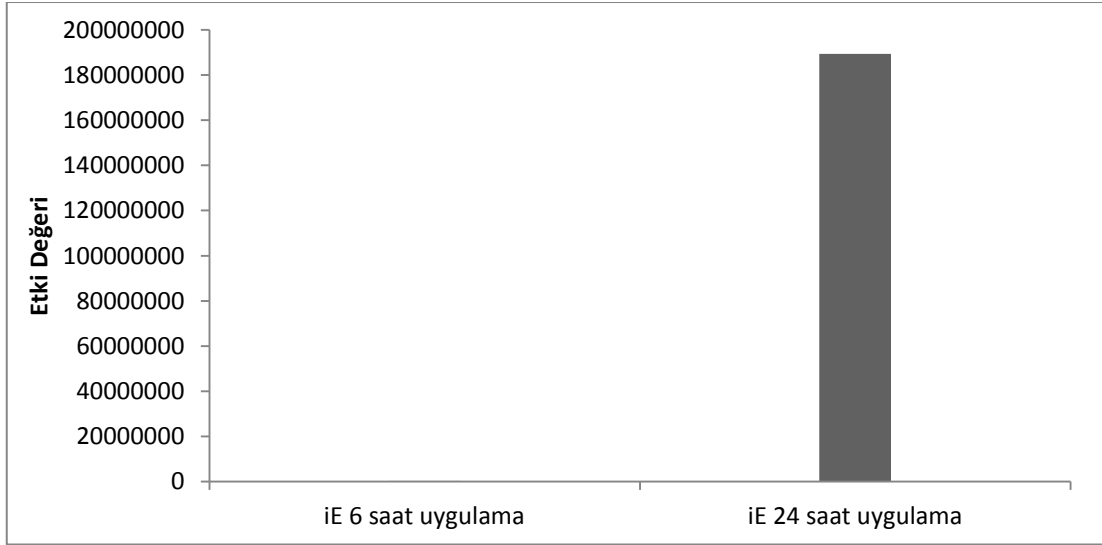
İTE-1 : İmmobilize ticari enzim ile tatlandırılmışzeytin

İTE-2 : İmmobilize ticari enzim ile tatlandırılmışzeytin

İTE-3: İmmobilize ticari enzim ile tatlandırılmışzeytin

### 3.5.2 Optimum uygulama saatinin belirlenmesi

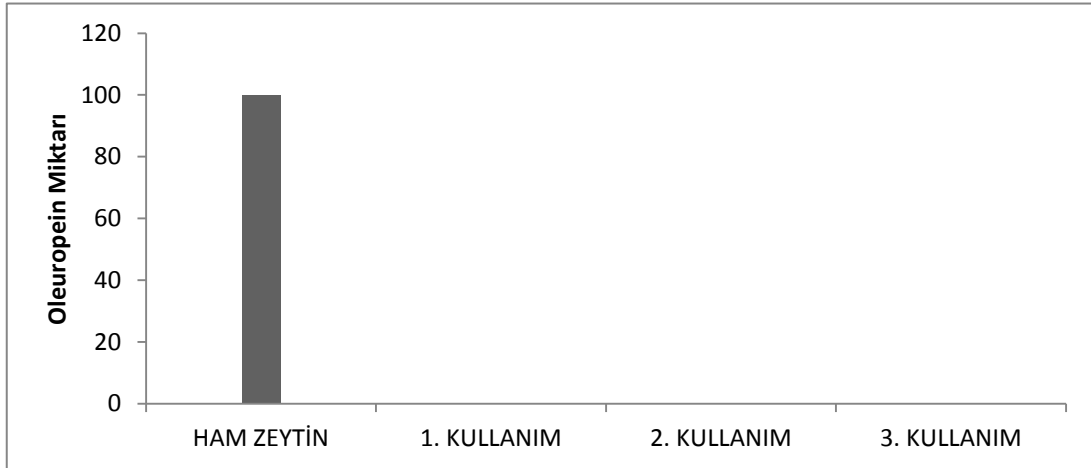
Sofralık zeytin üretiminde oleuropein miktarlarındaki düşüş etkisinin HPLC analizleri ile belirlendiği denemelerde İmmobilize zeytin  $\beta$ -glikozidazının uygun konsantrasyonlarda süre optimizasyonunu belirlemek üzere 6 ve 24 saatlik deneme uygulamaları gerçekleştirilmiştir. 6 saatlik uygulama sonucunda oleuropein düşüşleri anlamlı bulunmazken 24 saatlik deneme süresinin NaOH uygulama sonuçlarına göre daha anlamlı sonuç verdiği belirlendi (Şekil 3.27).



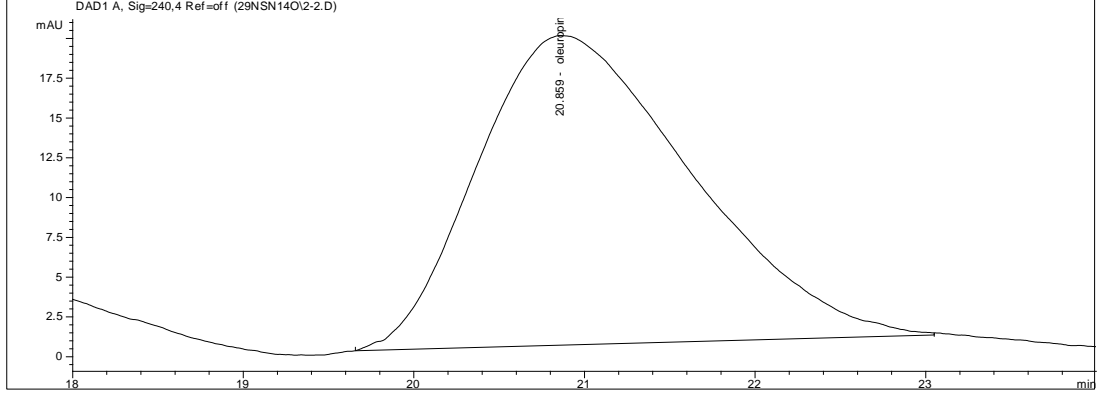
Şekil 3.27 : İmmobilize zeytin  $\beta$ -glikozidaz enziminin (İE) farklı sürelerde oleuropein düzeylerine olan etkisi.

### 3.5.3 İmmobilize $\beta$ -glukozidaz enziminin kullanım sayısının belirlenmesi

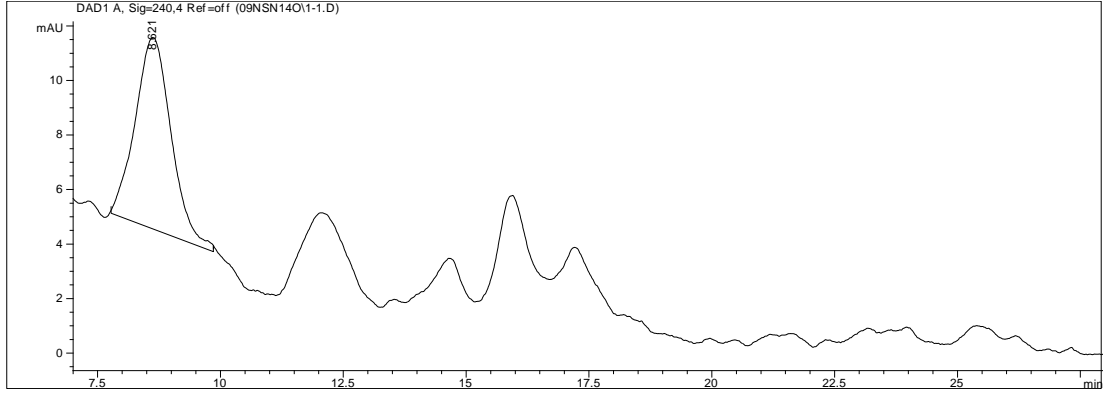
Enzim katalizli reaksiyonlarda en önemli enzimin tekrar kullanılabilirliği endüstriyel olarak büyük önem taşımaktadır. Tekrar kullanılabilirliği sağlamada zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  yüklü süperparamanyetik nanoparçacıklara karbodimid aktivasyonu ile gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmasında oleuropein düzeylerindeki azalma etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.26). Denemelerde 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilerek bu üç tekrarın ortalaması alınmıştır ve karşılaştırma numunesi olarak ham zeytin örnekleri analiz edilmiştir. Araştırmada esas alınan ölçüt oleuropein miktarları HPLC ile belirlenmiş (Şekil 3.29-Şekil 3.55 ) ve sonuçlar mg/kg olarak verilmiştir. İlk denemelerde aynı immobilize enzim ile gerçekleştirilen 1., 2. ve 3. tatlandırma deneyleri sonucunda oleuropein miktarı 0 olarak değerlerde belirlenmiştir (Şekil 3.28). Daha kapsamlı olarak yapılan çalışmada 0,1 gr tam doyumluğa erişmiş anoparçacıklar 15g, 30g, ve 60g zeytine 2 tekrarlı olarak 24 saat uygulanarak immobilize enzimin tekrar kullanılabilir özelliği araştırıldı. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarına 4. denemeye kadar oleuropein miktarlarının 15g, 30g, 60g, zeytinde oleuropeinin tespit edilemeyecek kadar düşük miktarları elde edilmiştir (Tablo 3.17).



Şekil 3.28 : İmmobilize zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin zeytin tatlandırmada birden fazla kullanılması sonucu oleuropein hidrolizini belirlenmesi.

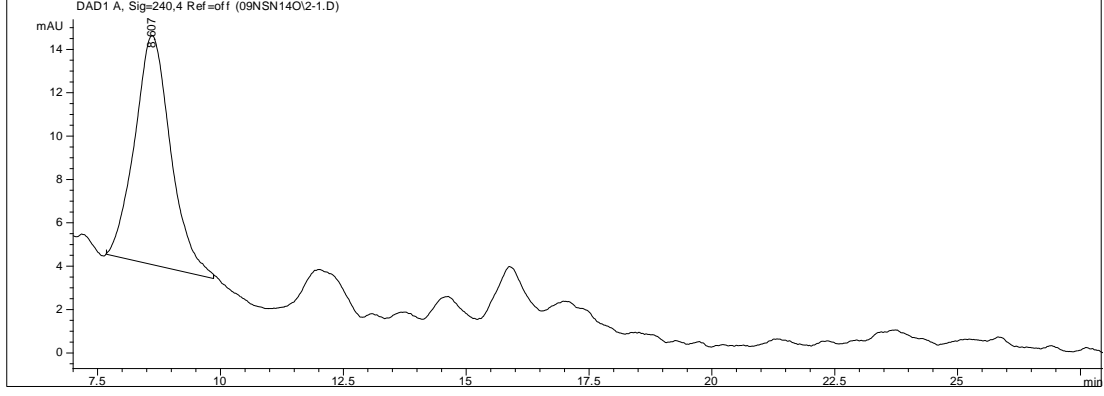


**Şekil 3.29 :** Tablo 3.17’de belirtilen Ham zeytin örneğinin uygulamalar öncesi metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.

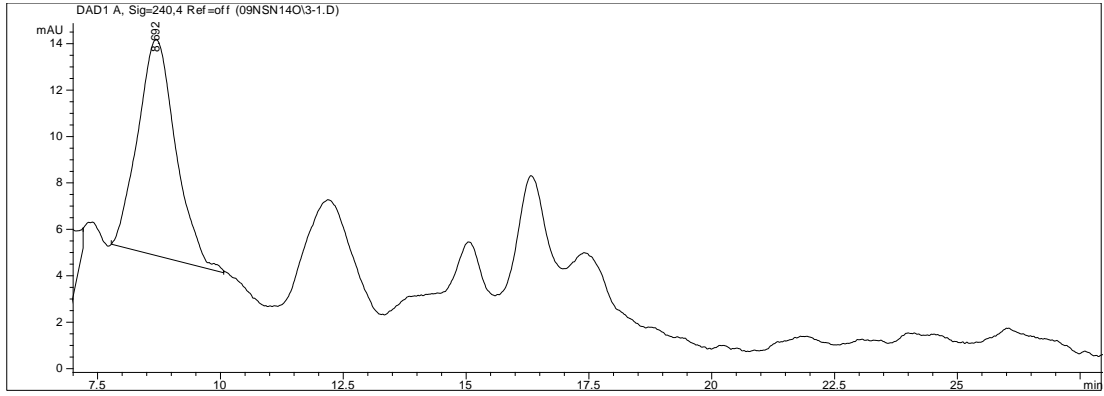


**Şekil 3.30 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 1 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.

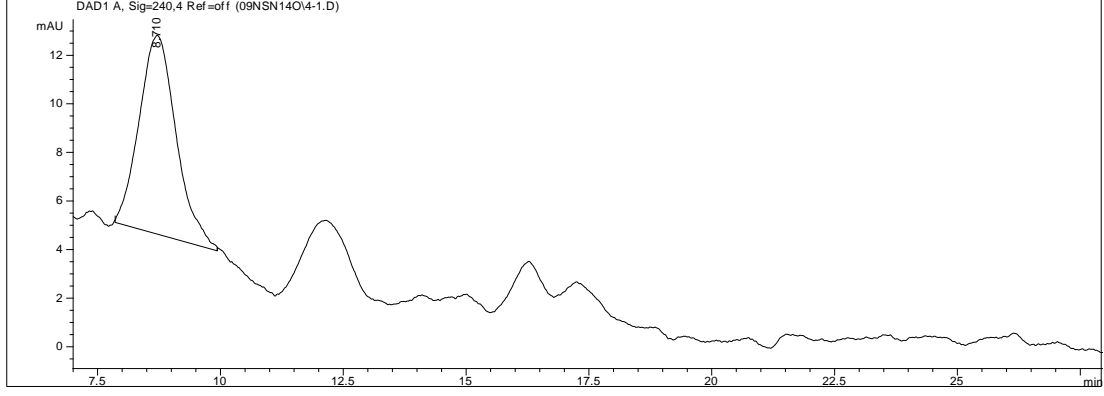




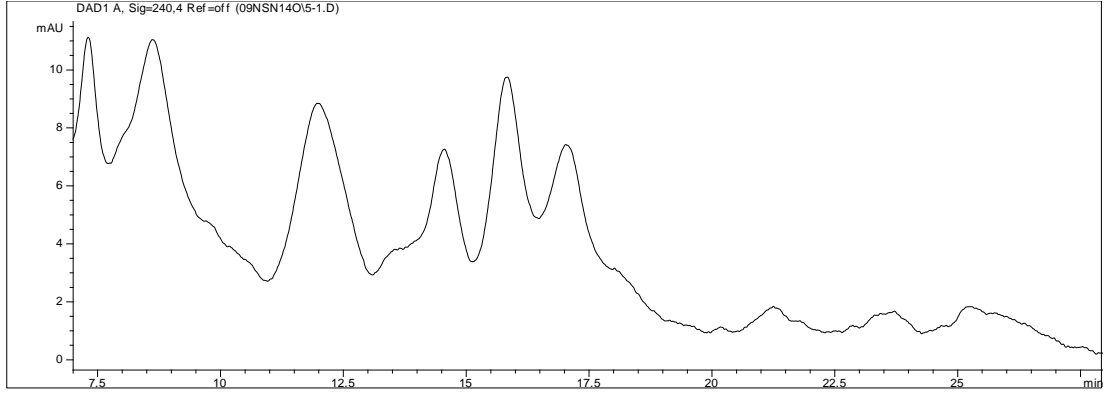
**Şekil 3.31 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 2 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



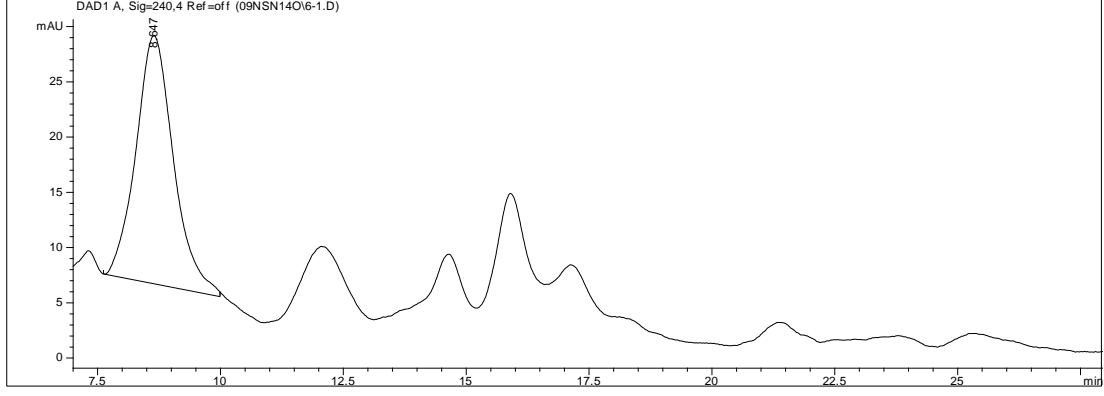
**Şekil 3.32 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 3 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



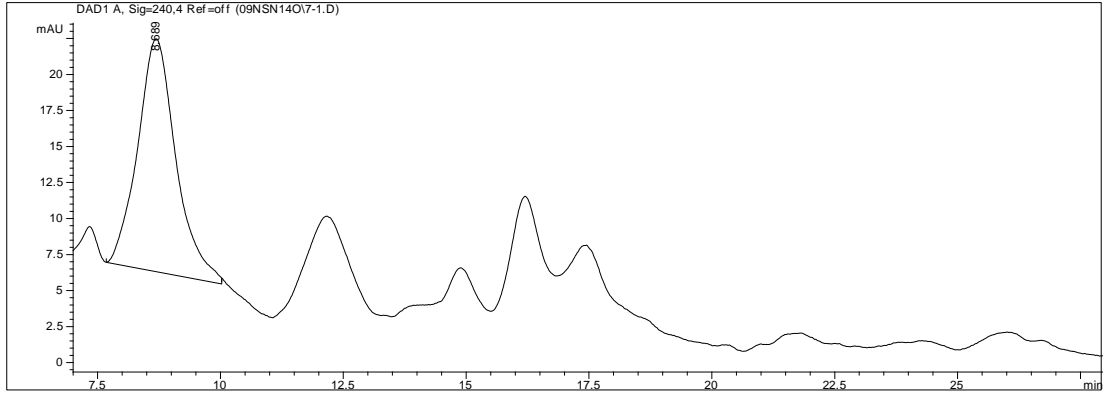
**Şekil 3.33 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 4 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



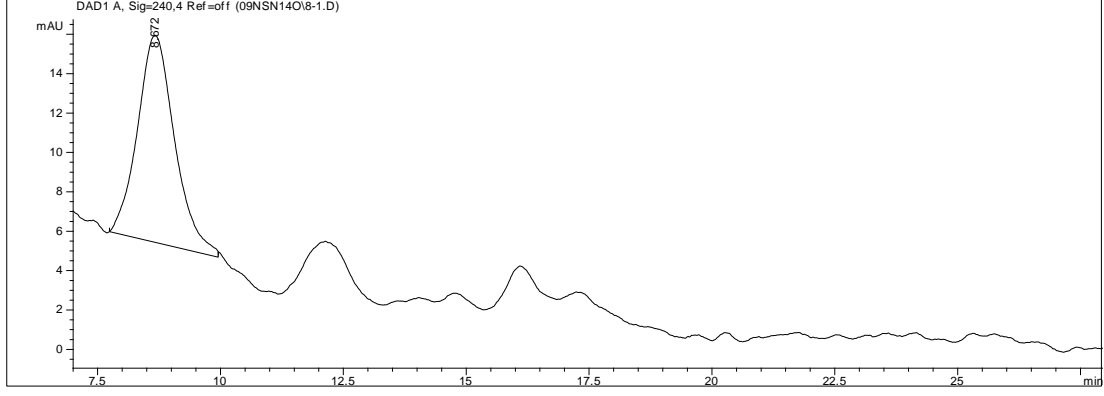
**Şekil 3.34 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 5 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



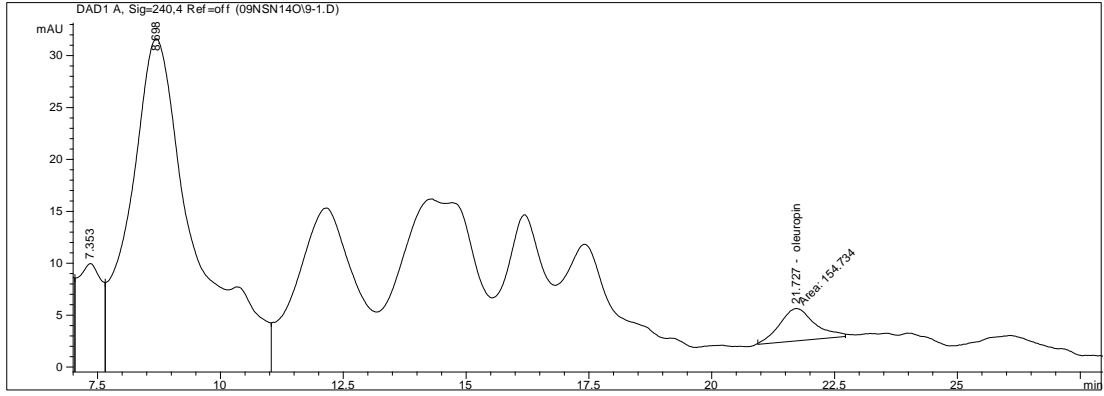
**Şekil 3.35 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 6 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



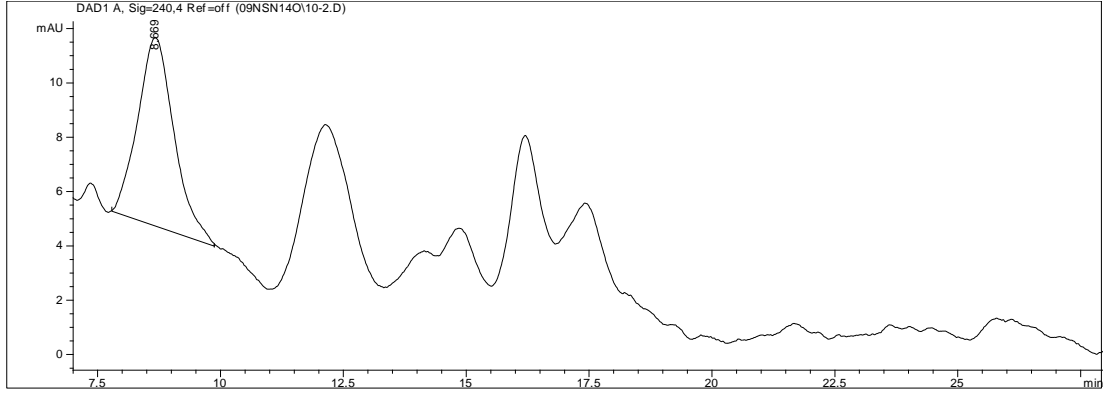
**Şekil 3.36 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 7 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



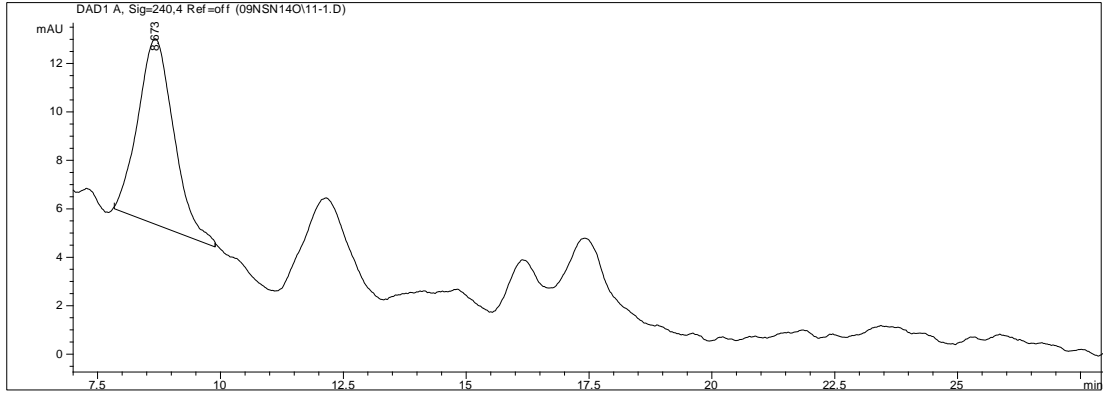
**Şekil 3.37 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 8 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



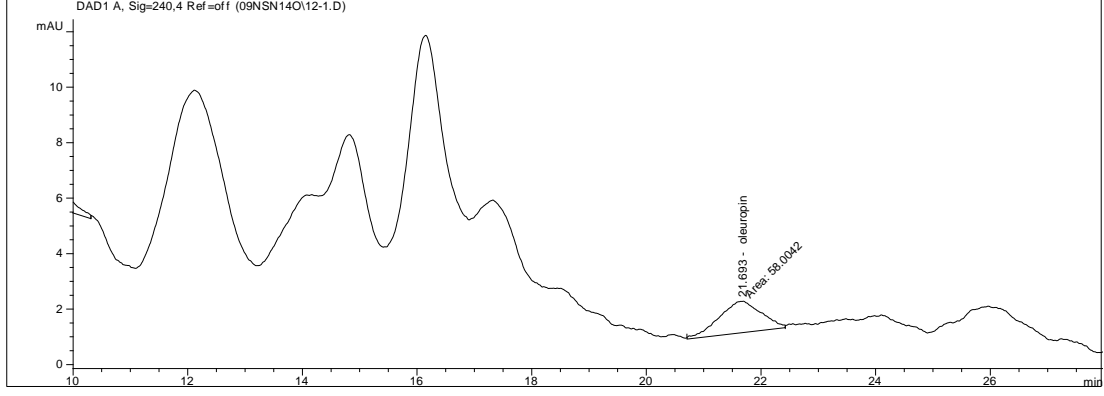
**Şekil 3.38 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 9 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



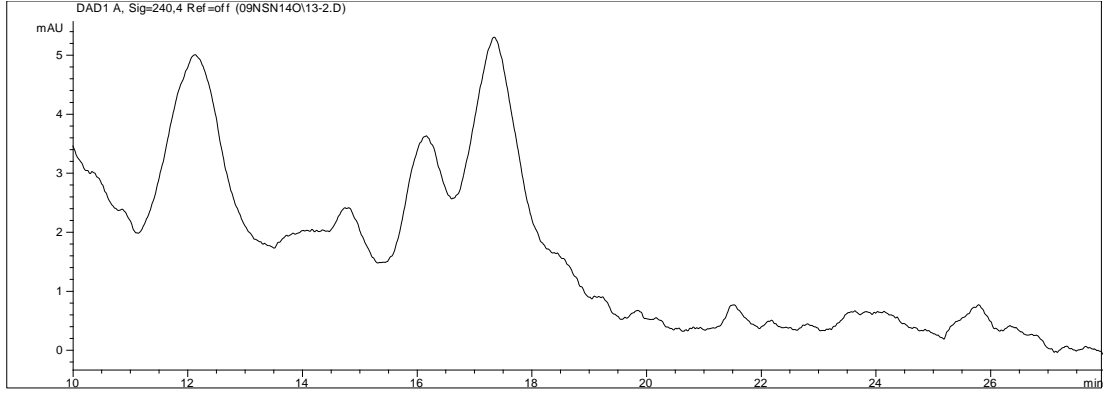
**Şekil 3.39 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 10 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



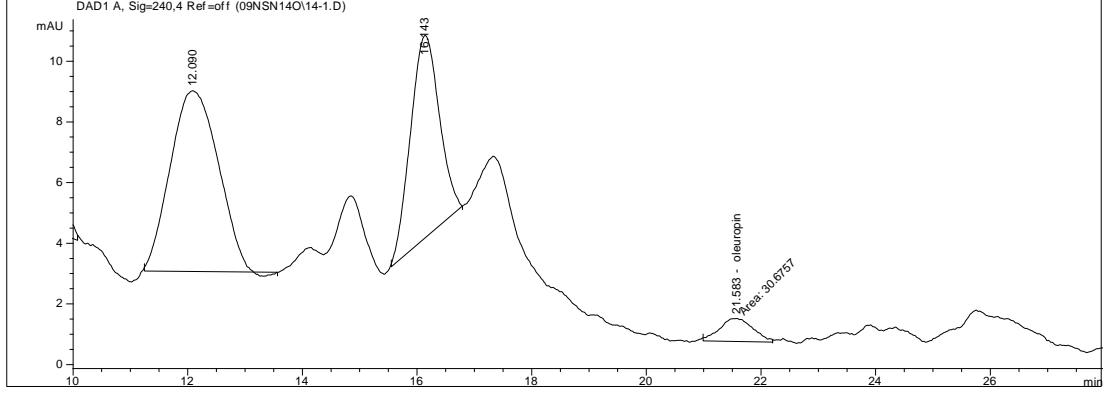
**Şekil 3.40 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 11 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



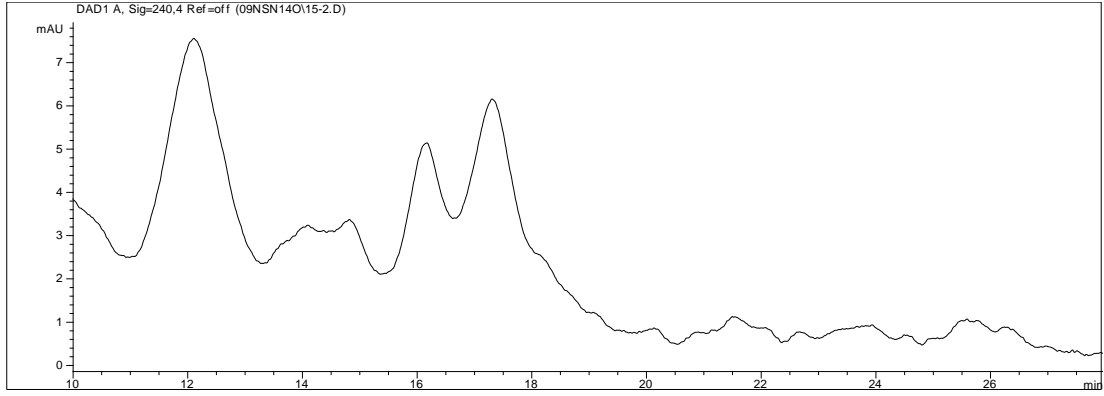
**Şekil 3.41 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 12 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



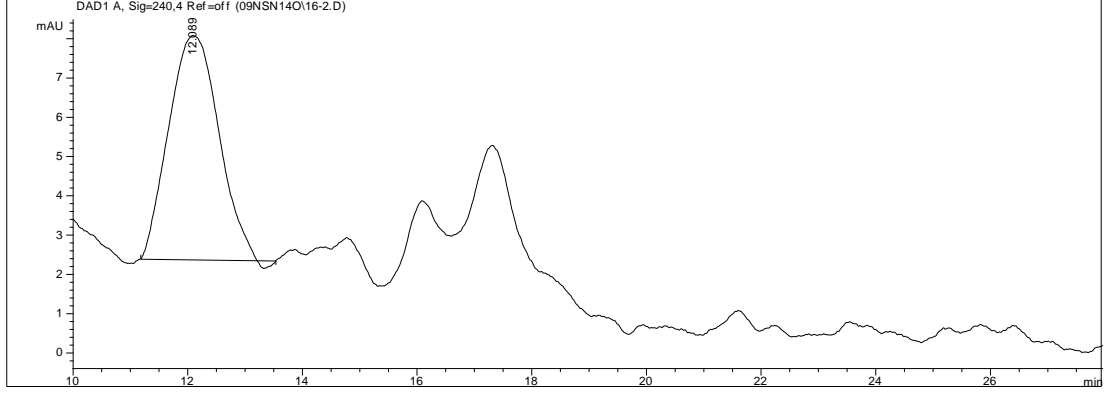
**Şekil 3.42 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 13 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



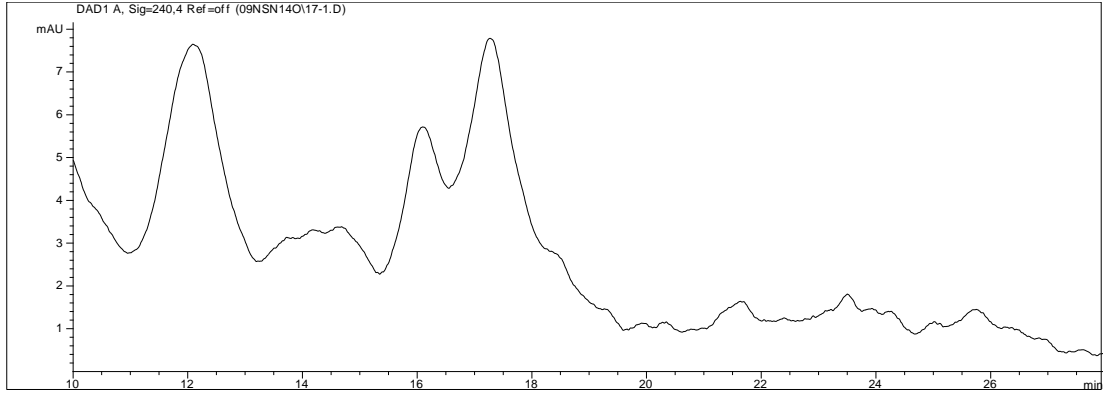
**Şekil 3.43 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 14 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



**Şekil 3.44 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 15 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.

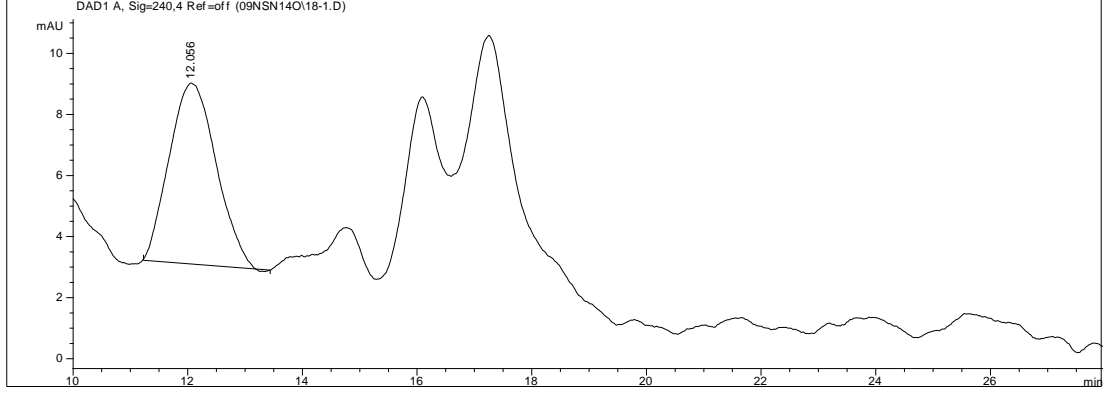


**Şekil 3.45 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 16 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.

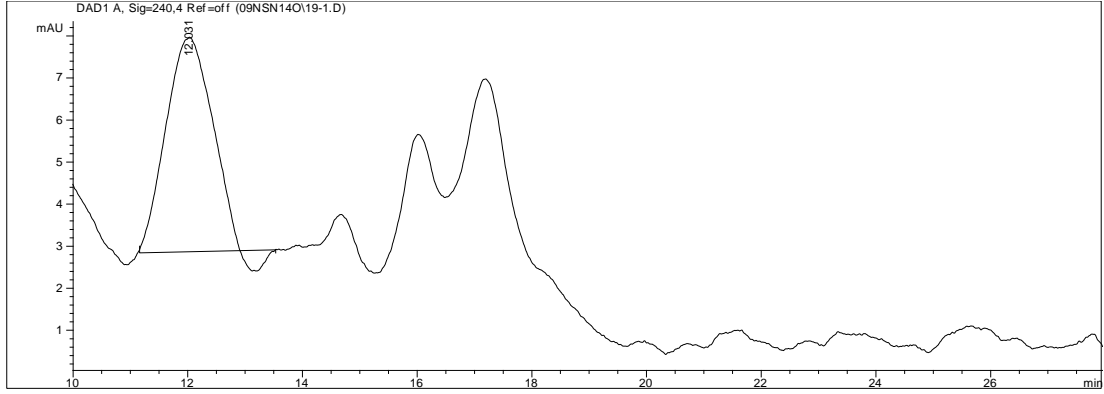


**Şekil 3.46 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 17 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogram

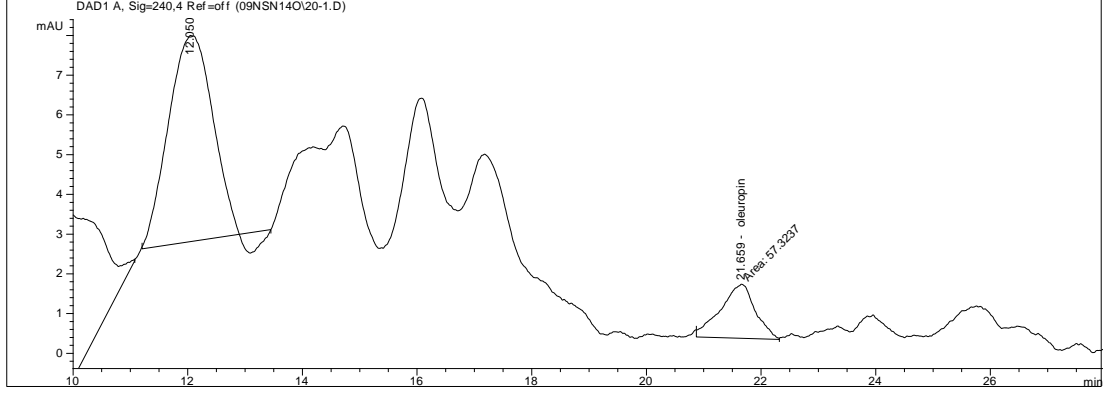




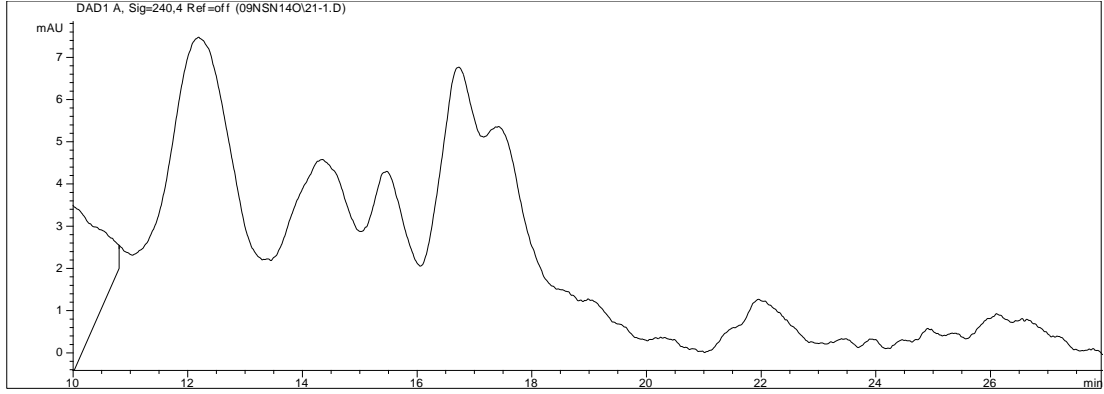
**Şekil 3.47 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 14 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



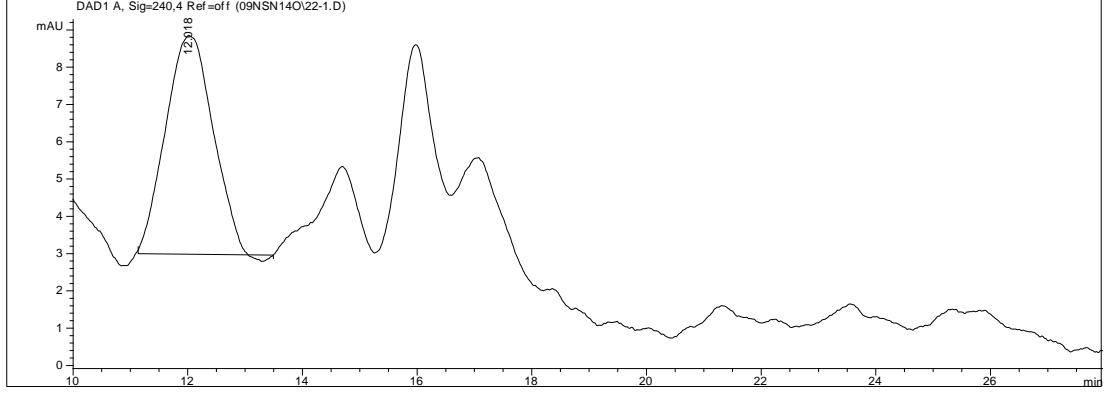
**Şekil 3.48 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 14 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



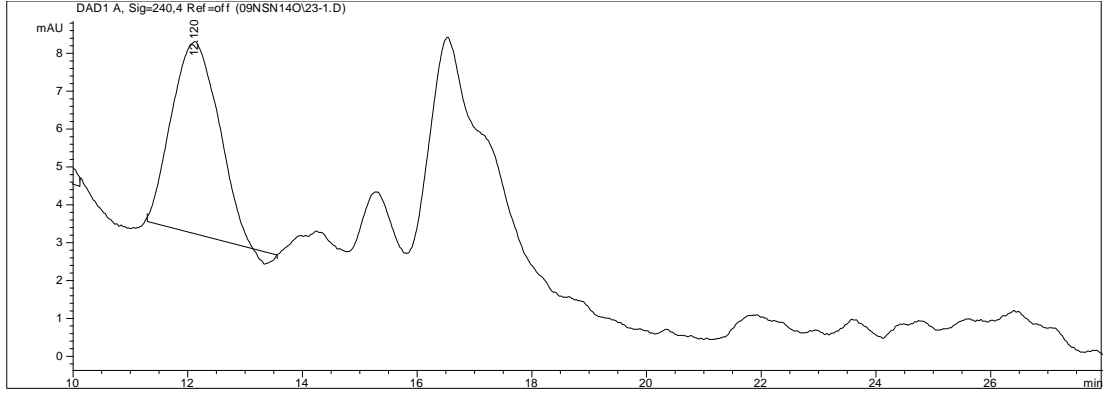
**Şekil 3.49 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 20 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



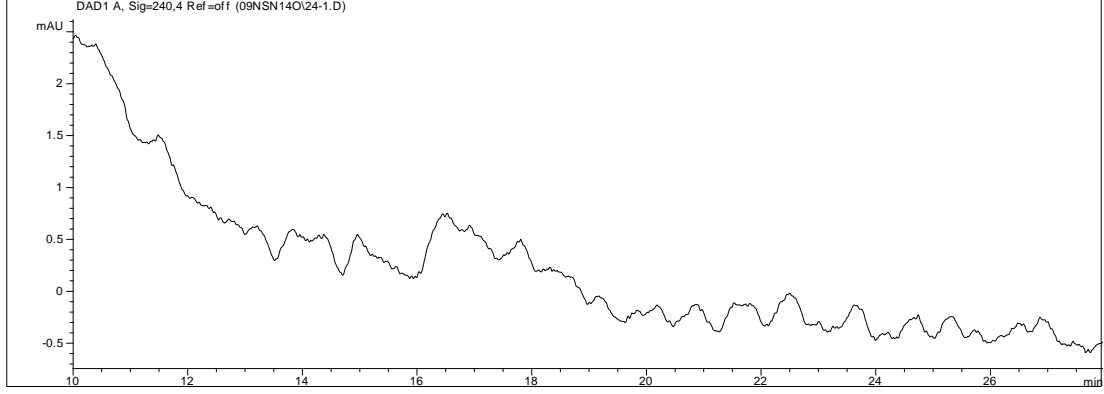
**Şekil 3.50 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 21 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



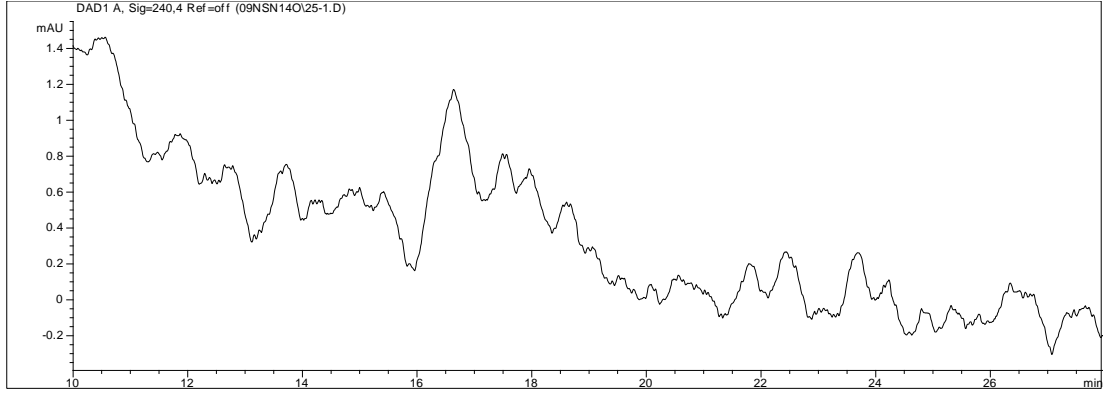
**Şekil 3.51 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 22 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



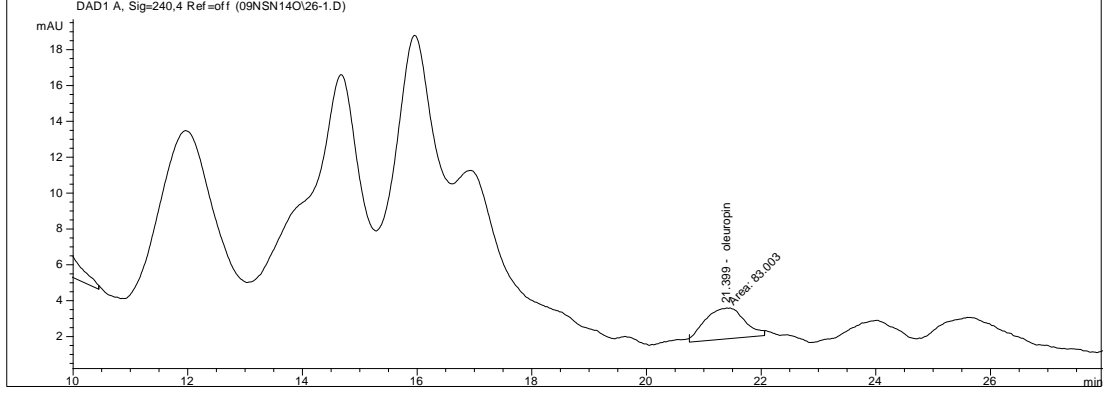
**Şekil 3.52 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 23 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



**Şekil 3.53 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 24 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



**Şekil 3.54 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 25 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.



**Şekil 3.55 :** İmmobilize  $\beta$ -Gluozidaz enzim ile tatlandırılmış Tablo 3.17’de belirtilen 26 numaralı zeytin örneğinin metanol ekstraktının 240 nm DAD dedektörü kullanılarak elde edilen oleuropein kromatogramı.

**Tablo 3.16 :** İmmobilize  $\beta$ -glukozidaz enziminin zeytin tatlandırma işleminde tekrar kullanılması sonucu oleuropein hidrolizi miktarları.

Örnek No		Uygulama Saati	Zeytinden Hidroliz Edilen Oleuropein (ppm)	Zeytinde Kalan Oleuropein (ppm)	Zeytininde % oleuropein Hidrolizi
	Ham Zeytin	-	-	1227	-
1	15 g zeytine 1. Uygulama	24	1227	0	100
2	15 g zeytine 1. Uygulama (2)	24	1227	0	100
3	30 g zeytine 1. Uygulama	24	1227	0	100
4	30 g zeytine 1. Uygulama (2)	24	1227	0	100
5	60 g zeytine 1. Uygulama	24	1227	0	100
6	60 g zeytine 1. Uygulama (2)	24	1227	0	100
7	15 g zeytine 2. Uygulama	24	1227	0	100
8	15 g zeytine 2. Uygulama (2)	24	1227	0	100
9	30 g zeytine 2. Uygulama	24	1123	104	91
10	30 g zeytine 2. Uygulama (2)	24	1227	0	100
11	60 g zeytine 2. Uygulama	24	1227	0	100
12	60 g zeytine 2. Uygulama (2)	24	1186	41	96
13	15 g zeytine 3. Uygulama	24	1227	0	100

14	15 g zeytine 3. Uygulama (2)	24	1205	22	98
15	30 g zeytine 3. Uygulama	24	1227	0	100
16	30 g zeytine 3. Uygulama (2)	24	1227	0	100
17	60 g zeytine 3. Uygulama	24	1227	0	100
18	60 g zeytine 3. Uygulama (2)	24	1227	0	100
19	15 g zeytine 4. Uygulama	24	1185	0	100
20	15 g zeytine 4. Uygulama (2)	24	1227	42	96
21	30 g zeytine 4. Uygulama	24	1227	0	100
22	30 g zeytine 4. Uygulama (2)	24	1227	0	100
23	60 g zeytine 4. Uygulama	24	1227	0	100
24	60 g zeytine 4. Uygulama (2)	24	1227	0	100
25	NaOH %1	24	1163	0	100
26	NaOH %1 (2)	24	1227	64	94

### 3.5.4 Tatlandırma işlemleri sonrası zeytin meyvesinin salamuraya alınması

İmmobilize enzim oleuropein hidrolizi yapılan zeytinler % 5 tuz içeren şalamura suyuna alındı ve bekletildi (Şekil 3.56)



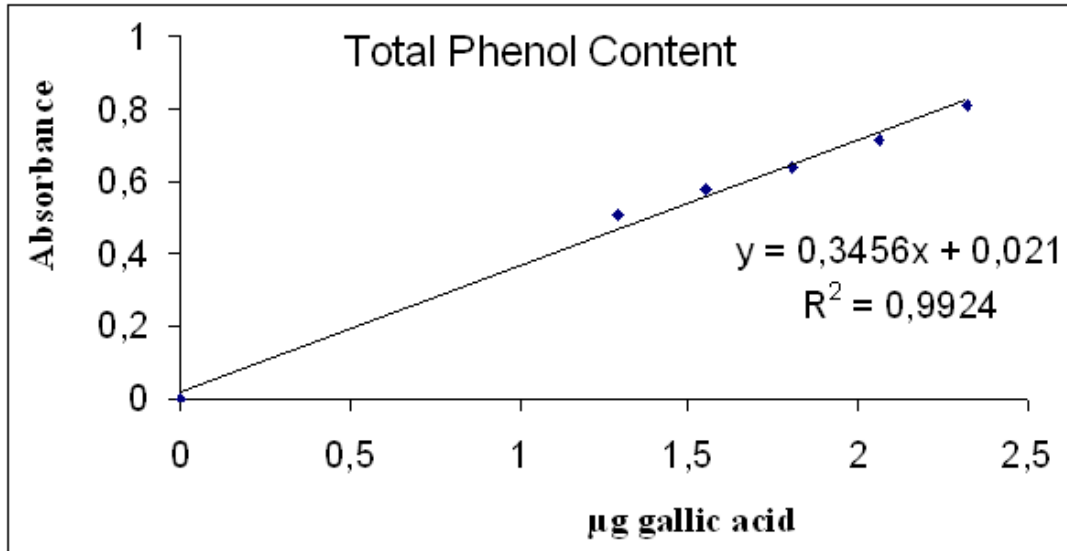
Şekil 3.56 : Tatlandırma sonrası zeytin meyvesi salamurası.

## 3.6 Zeytin Meyvesinde Antioksidan Aktivite Belirlenmesi

### 3.6.1 Total Fenol İçeriğinin Belirlenmesi

Su ekstraktının total fenol içeriğini Bölüm 2.6.2.1’de belirtilen yöntem ile belirlendi. Sonuçlar gallik asit standartı kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.57). Su ekstraktında total fenol içeriği 9,67  $\mu\text{g/ml}$ , etanol ekstraktının total fenol içeriği 1,64  $\mu\text{g/ml}$ , metanol ekstraktının total fenol içeriği 3,84  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi (Tablo 3.18).





**Şekil 3.57** : Total fenol içeriğinin belirlenmesinde kullanılan gallik asit standart grafiği.

**Tablo 3.17** : Denemelerde kullanılan Edremit çeşidi yeşil zeytin örneklerinin su, etanol ve metanol ekstraktlarına ait total fenol miktarları.

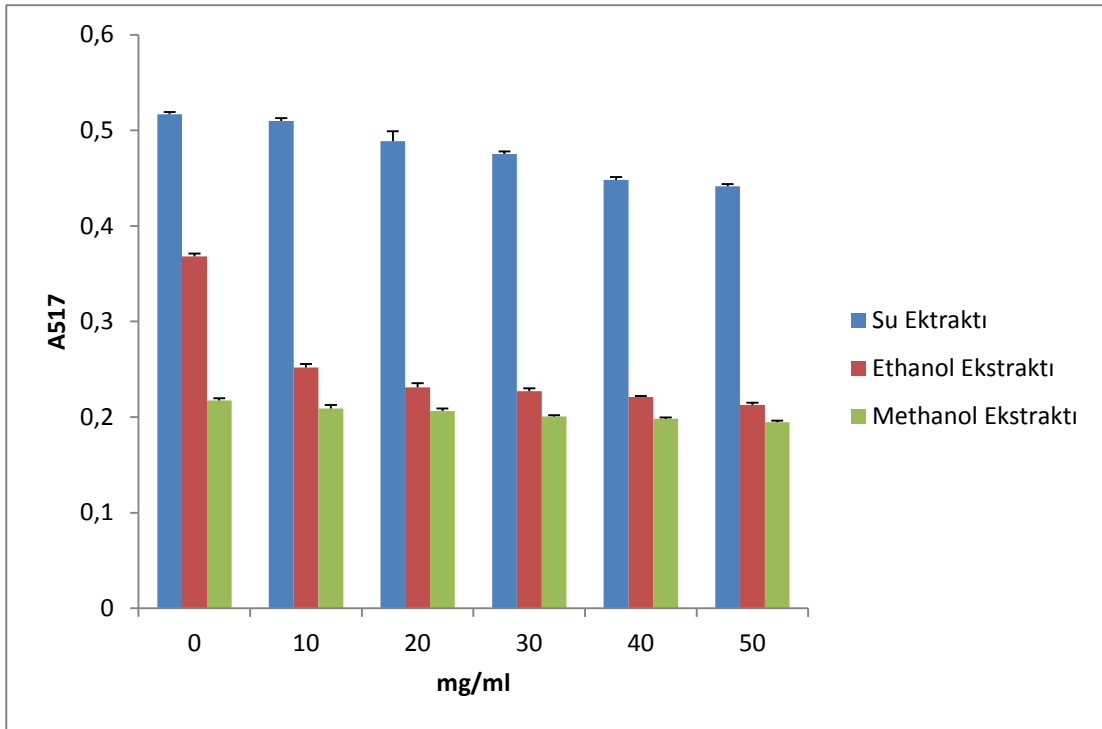
	<b>Total Fenol İçeriği</b> (µg/ml)
<b>Su Ekstraktı</b>	9,67
<b>Etanol Ekstraktı</b>	1,64
<b>Metanol Ekstraktı</b>	3,84

### 3.6.2 DPPH Giderme Aktivitesi Belirlenmesi

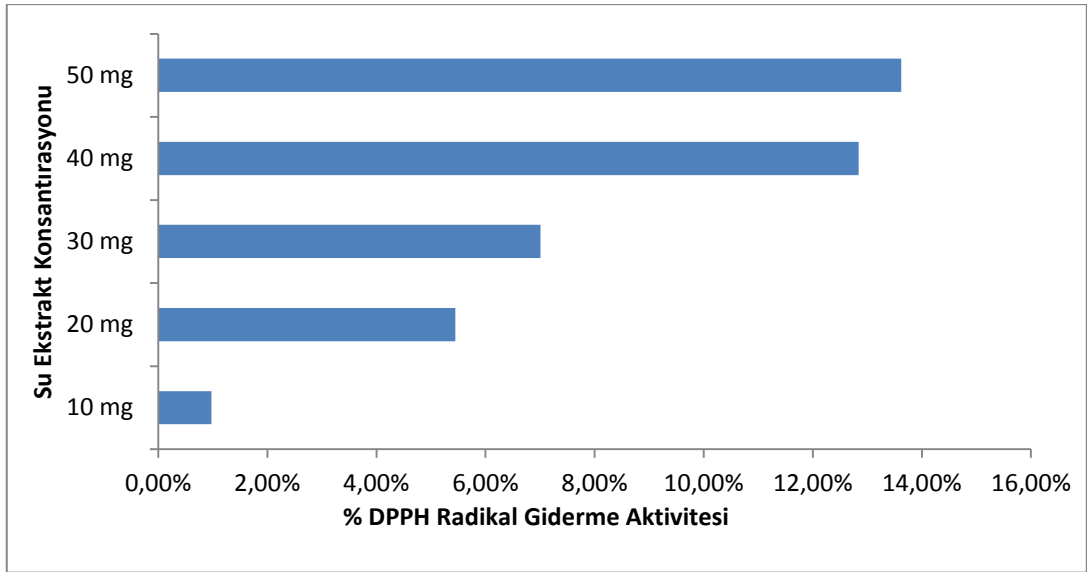
Bölüm 2.6.1’de belirtilen yöntemler ile su, etanol, metanol ekstraktları hazırlandı ve bu ekstraktların Bölüm 2.6.2.2’de belirtilen yöntem ile DPPH giderme aktivitesi belirlendi. Sonuç olarak su ekstraktında en yüksek aktivite gözlemlendi ve etanol ve metanol ekstraktlarının değerlerinin çok yakın olmakla birlikte etanolün daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 3.58).

Aşğıdaki formül kullanılarak su, etanol ve metanol ekstarktları için % DPPH Radikal Giderme Aktivitesi belirlendi (Şekil 3.59) (Şekil 3.60) (Şekil 3.61).

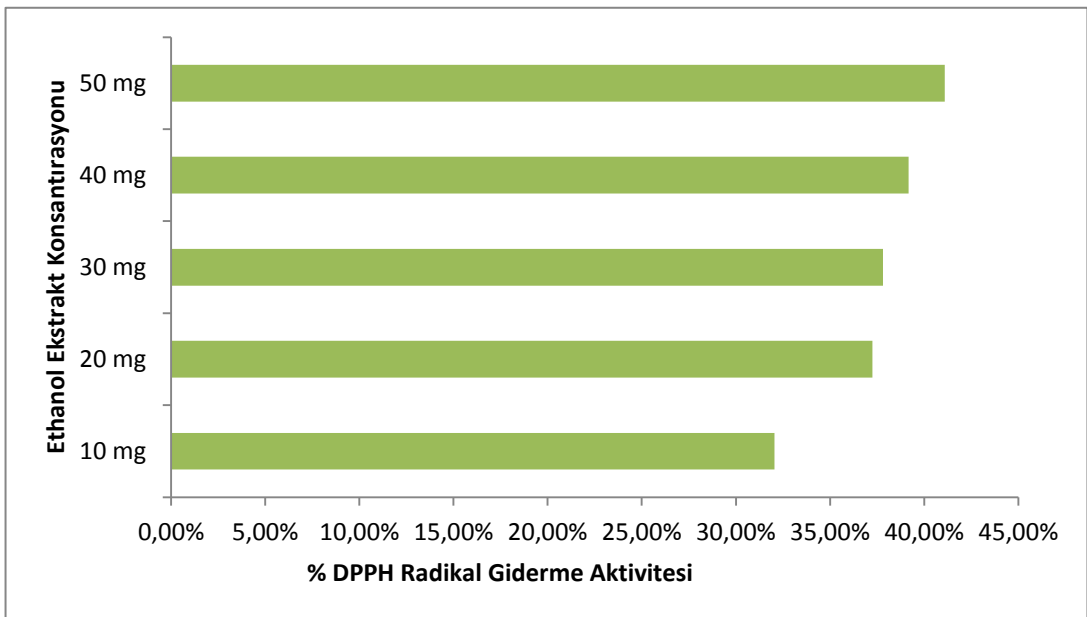
$$\% \text{ DPPH Radikal Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrol absorbanısı} - \text{Örnek absorbanısı}}{\text{Kontrol Absorbanısı}} \times 100$$



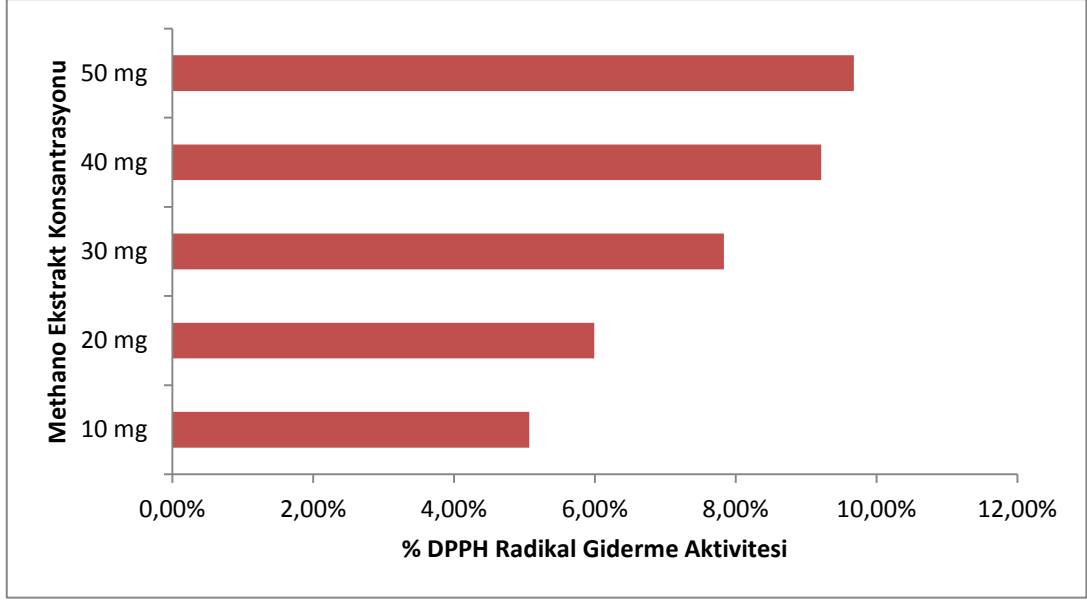
Şekil 3.58 : Su, etanol ve metanol ekstraktlarında DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi



**Şekil 3.59 :** Su ekstraktlarında % DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi



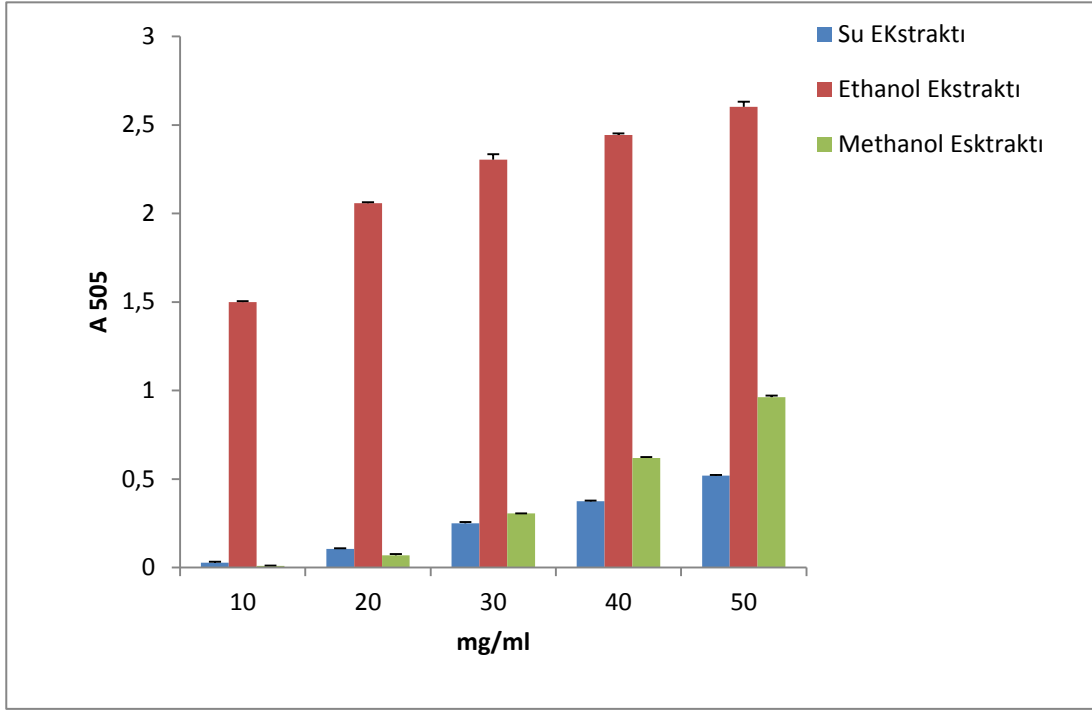
**Şekil 3.60 :** Etanol ekstraktlarında % DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi



**Şekil 3.61 :** Metanol ekstraktlarında % DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi

### 3.6.3 DMPD Radikal Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi

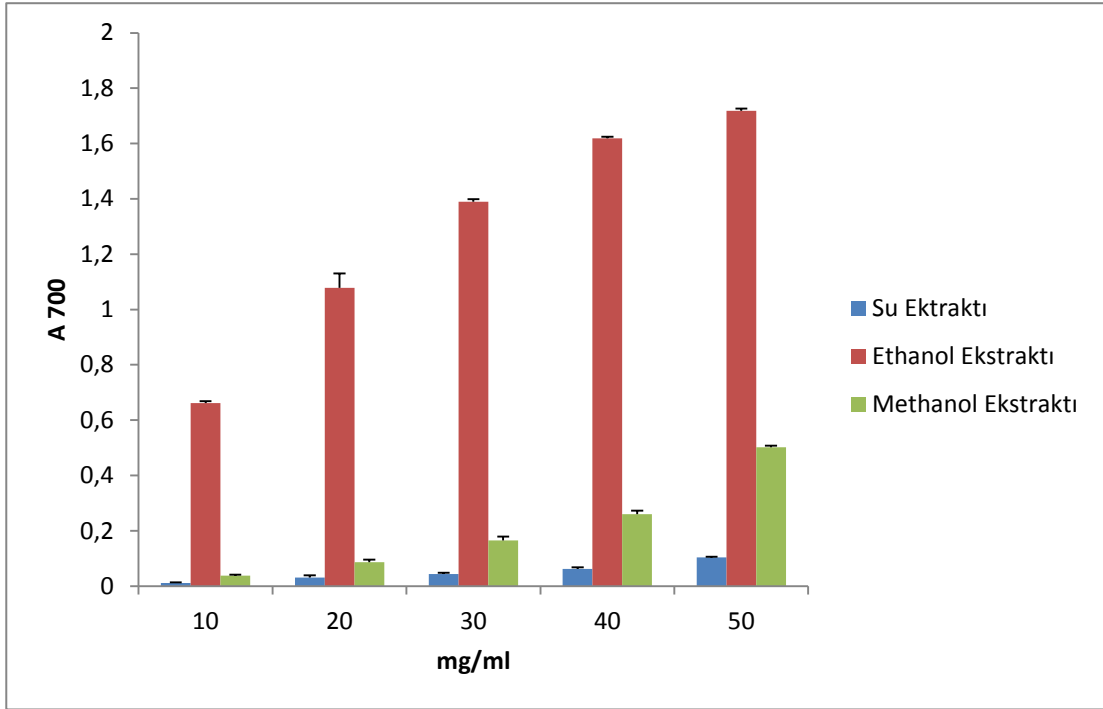
Bölüm 2.6.1’de belirtilen yöntemler ile su, etanol, metanol ekstraktları hazırlandı ve bu ekstraktların Bölüm 2.6.2.3’de belirtilen yöntem ile DMPD radikal giderme aktivitesi belirlendi. Sonuç olarak etanol ekstraktlarında en yüksek aktivite gözlemlendi ve metanol ve su ekstraktlarının DMPD Giderme Aktivitesi daha düşük olarak belirlendi (Şekil 3.62).



**Şekil 3.62** : Su, etanol ve metanol ekstraktlarında DMPD radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi

### 3.6.4 Toplam İndirgeme Gücü Belirlenmesi

Bölüm 2.6.1’de belirtilen yöntemler ile su, etanol, metanol ekstraktları hazırlandı ve bu ekstraktların Bölüm 2.6.2.4’de belirtilen yöntem ile Toplam indirgeme gücü belirlendi. Toplam indirgeme gücü açısından en yüksek aktivite değerleri etanol ekstraktında belirlenirken, metanol ve su ekstraktlarında aktivitenin daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 3.63)



Şekil 3.63 : Su, etanol, metanol ekstraktlarından toplam indirgeme gücünün belirlenmesi

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Zeytin meyvesinde bulunan oleuropein zeytin ağacının daha dayanıklı olmasını ve sıklıkla kanser olmayan bitki özelliğini kazanmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda oleuropein, bir fenolik bileşen olarak zeytin meyvesine acılık vererek diğer meyvelerin aksine taze olarak tüketilmesini önlemektedir. Zeytin meyvesinin sofralık zeytin olarak tüketilebilmesi için oleuropeinin hidroliz edilmesini esas alan işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Tatlandırma işlemi olarak adlandırılan bu işlem basamağı sofralık zeytin üretiminde en önemli işlem basamağı olarak kabul edilmektedir. Bu işlem, Akdeniz beslenme kültürü içinde yer alan pek çok geleneksel yöntem içinde halen evsel üretimde yer almakta iken gıda sanayiinde en çok NaOH ve küf kaynaklı enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. NaOH ile yapılan tatlandırma yöntemlerinde zeytinde bulunan ve insan sağlığına yararlı fenolik bileşiklerin yıkama, değişime uğradığı ve yararlı bileşenlerin azaldığı bilinmektedir. Sağlıklı beslenmenin temel kurallarından birisi olan doğal beslenme, üretimde yer alan unsurların ve elde edilen ürünlerin doğal ya da doğala özdeş olmaları anlamına gelmektedir. Sofralık zeytin üretiminde de zeytinin temel bir bileşeni olan  $\beta$ -glikozidaz enzimi meyvenin doğasından gelmekte ve tatlandırma amacıyla kullanıldığında tamamıyla doğal etki göstermektedir. Olgunlaşma sürecinde oleuropeini hidroliz ederek aromayı geliştirir. Ancak zeytin meyvesi dışında olgunlaştırılan Hurma zeytin dışında tam anlamıyla oleuropeini parçalanmış ve acılığı giderilmiş değildir. Gıda sanayiinde enzimatik oleuropein hidrolizi çok yaygınlaşmamakla birlikte üretimde kullanılan ticari  $\beta$ -glikozidaz enziminin fungal kökenli olduğu bilinmektedir. Çoğunlukla gıda sanayiinde farklı alanlarda da aroma zenginleştirmek amaçlı kullanılan bu enzim preparatları liyofilize formda ve tek kullanımlık olarak üretilmektedir.

Araştırmamızda planlandığı üzere immobilize edilecek manyetik nanoparçacıkların sentezi yapılmış ve zeytinden  $\beta$ -Glukosidaz enzimi saflaştırılması amacıyla hidrofobik etkileşim kromatografi jel sentezi gerçekleştirilmiş ve saflaştırma üzerine optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Enzim saflaştırma çalışmalarında öncelikle zeytin örneklerinin aseton tozu hazırlanarak,  $\beta$ -glikosidaz aktiviteleri ölçülmüş; saflaştırma prosedürü optimize edilmiştir. Bununla ilgili olarak enzim saflaştırılmasında kullanılacak Hidrofobik Jelin sentezi gerçekleştirilmiş ve bu jel kullanılarak HEK (Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi) yöntemiyle saf enzim elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılarak iki aşamalı saflaştırma işlemi yapılmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi için ortamdaki tuzun uzaklaştırılması gerekmemekte ve enzim aktivitesinin korunması açısından diyaliz gibi ayrı bir basamak kullanılmamaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saf enzim olarak çalışmalarda kullanılmıştır.

Kara ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada zeytin  $\beta$ -glikozidazı saflaştırma derecesi 154.9 ve verim % 53.9 olarak belirtilmiştir. Daha düşük verimle 20,91kat saflaştırdığımız enzime ait spesifik aktivite değerleri Kara ve ark. (2011)'e göre oldukça yüksek bulunmuştur [76]. Yüksek spesifik aktiviteye rağmen daha yüksek saflaştırma derecesi ve verimini elde etmek üzere taze zeytinlerden saflaştırma denemelerine devam edilmiştir. Romero-Segura ve ark. (2009), amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel filtrasyon kromatografisi ile tuz uzaklaştırdıktan sonra elde ettikleri saf zeytin  $\beta$ -glukosidazı için daha sonra anyon değiştirici matriksle iyon değişim kromatografisi yaptıktan sonra hidrofobik etkileşim kromatografisinin yapmışlardır [77]. Bu basamakların sonunda araştırmacıların zeytin  $\beta$ -glukosidazını % 8.3 verimle 8.1 kat saflaştırdıkları görülmektedir.

Edremit çeşidi yeşil zeytine ait aseton tozundan elde edilen ham ekstraktta yüksek spesifik aktivite elde edildikten sonra iki basamakta saflaştırılan zeytin  $\beta$ -glikosidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla, enzim SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanmıştır. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi yaklaşık 55 kDa hizasında bant tespit edilmiştir. Bitki  $\beta$ -glukosidazları için SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenen altbirimlerinin 55-65 kDa arasında olduğu belirtilmektedir.

Literatür çalışmalarında  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*-NPG substratına ilgisinin en yüksek olduğu belirtilmiştir [78,79]. Araştırmamıza yön veren bu bulgular ışığında çalışmalarımızın hızla devam edebilmesi amacıyla *p*-NPG substrat olarak



kullanılmıştır. Kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında saflaştırılmış serbest enzimle *p*-NPG substratı için  $K_m$  değeri 0.8 mM,  $V_{max}$  ise 192.3 EU mM; immobilize enzimde ise  $K_m$  değeri 1.3 mM,  $V_{max}$  ise 333.33 EU olarak bulunmuş, katalitik etkinliğin ölçüsü olan  $V_{max}/K_M$  oranı serbest enzim için 240 ve immobilize enzim için 256 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar enzimin substrata olan ilgisinin oldukça yüksek olduğunu, özellikle immobilizasyonun bu ilgiyi daha yükselttiğini ortaya koymaktadır. Serbest enzimin optimum sıcaklık değeri 55 °C iken immobilize optimum sıcaklık değeri 37 °C olarak belirlenmiştir. Bunun sebebinin nanoparçacıkların ısıyı tutarak enzimin ortamının sıcaklığını daha yüksek algılamasını sağladığı düşünülmektedir. Immobilize enzimlerde daha yüksek sıcaklıklarda enzimin denatüre olarak aktivite kaybetmesi nanoparçacıkların ısıyı tuttuğunu desteklemiştir. Optimum pH çalışmalarında ise serbest ve immobilize enzimin de pH 5,5'de en yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Sentezlenen süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklarına zeytin  $\beta$ -glukozidaz enziminin immobilizasyonu sonrasında immobilize enzimin aktivitesi, kararlılığının belirlenmesi ve immobilize enzimin sofralık zeytin üretiminde oleuropein hidrolizinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

İmmobilizasyonda kullanılacak manyetik nanoparçacıklar ortak çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş, manyetik ve yapısal özellikleri araştırılmıştır. Bu kapsamda demir oksit nanoparçacıklar açık hava ortamında sentezlenmiştir.  $Fe^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  iyonlarından 2/3 oranında kullanılarak  $NH_4OH$  varlığında yüksek karıştırma hızında demir oksit nanoparçacıklar elde edilmiştir. Optimum doyum manyetizasyonuna sahip demir oksit nanoparçacıkların elde edilmesi için  $Fe^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  iyon konsantrasyonları optimize edilmiştir [82].

Optimize edilen nanoparçacıkların yapısal karakterizasyonuna FT-IR ile devam edilmiştir. Çıplak nanoparçacık, aktifleştirilmiş nanoparçacık ve enzim immobilize edilmiş nanoparçacıklarda FT-IR analizi yapılmıştır. Elde edilen spektrumda pik şiddetlerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir.  $3571\text{ cm}^{-1}$ 'de ortaya çıkan pik nanoparçacıkların yüzeyindeki O-H esneme titreşimlerini,  $1631\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise adsorblanan suya ait bükülme titreşimlerini ifade edebilir [75]. Bununla birlikte çıplak nanoparçacığın verdiği  $3410\text{ cm}^{-1}$ 'deki O-H piki olduğu düşünülen pik

nanoparçacık aktifleştikten sonra 3393  $\text{cm}^{-1}$ 'ye  $\beta$ -glukozidazın bağlanması ile de 3390  $\text{cm}^{-1}$ 'ye, ticari enzimin bağlanmasıyla 3397  $\text{cm}^{-1}$ 'ye kaydığı görülmektedir. Aynı şekilde çıplak nanoparçacığın verdiği 1633  $\text{cm}^{-1}$ 'deki C=O piki olduğu düşünülen pik nanoparçacık aktifleştikten sonrada aynı yerde pik vermesi fakat  $\beta$ -glukozidazın bağlanması ile 1627  $\text{cm}^{-1}$ 'ye, ticari enzimin bağlanmasıyla 1630  $\text{cm}^{-1}$ 'ye kaydığı görülmektedir. Ayrıca Nanoparçacığın aktifleştikten sonra 1045  $\text{cm}^{-1}$ 'de, enzim bağlandıktan sonra ise 1043  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik verdiği C-O bağı olduğu düşünülen yerde nanoparçacık pik vermemiştir. Burada yeni bağların oluştuğu enzimin karbodiimit aracılığı ile beklide bir kısmının direk olarak bağlandığı düşünülebilir. Bunula birlikte Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkların FT-IR spektrumunun immobilizasyondan sonra ayrıntılı olarak incelenmesi ile enzime ait 1400  $\text{cm}^{-1}$  piki karbodiimid aktivasyonu yapılmış (enzimsiz) nanoparçacıkta ve enzim bağlı nanoparçacıkta kaybolmuş, 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  arasında geniş bir yeni pik ortaya çıkmıştır. Enzim bağlı nanoparçacıkta, enzime ve nanoparçacığa ait pikler birebir gözlenmemekle birlikte nanoparçacıktaki yukarıda belirtilen pikin kaybolup yeni pikin oluşması yeni bir bağ oluşuma işaret edebilir.

Enzim bağlı nanoparçacık ve enzim kullanılmadan yapılan işlemlerin sonucunda elde edilen nanoparçacığın IR spektrumlarındaki benzerlikten yola çıkılarak IR spektrumlarına göre karbodiimid aktivasyonu ile nanoparçacık-karbodiimid bağlanmasının gerçekleştiği sonucunu varılabilir. Enzimin bağlanması ile ilgili bir sonuç buradaki IR spektrumlarından kesin olarak ortaya çıkmamakla birlikte, enzim bağlı nanoparçacığın aktivite ölçümleri ayrıca bradford yöntemi ile yüklenen protein ve yıkamadaki proteinin takibi ile ortaya çıkan bulgular enzimin bağlandığını kesin göstermektedir.

Sofralık zeytin üretiminde geleneksel, ticari ve enzimatik yöntemlerin karşılaştırıldığı araştırmamızda, geleneksel yöntemlerin oleuropein hidrolizinde oldukça uzun sürede beklenen etkiyi yarattığı belirlenmiştir. Bu amaçla ticari olarak en çok uygulanan İspanyol ve Kaliforniya Yöntemleri'nde acılık giderme amacıyla NaOH uygulaması 22-24 saat süre sonunda oleuropeinde %65-80 oranında başarıya ulaşmaktadır. Bu yöntem hızlı sonuç vermekle birlikte zeytinin temel antioksidant maddelerine zarar vermektedir [14]. Uygulamalar arası süre ve konsantrasyon farklılıkları göz önüne alınmadığında; uygulamaların oleuropein düzeyindeki düşme etkisi NaOH'in %0,5 ve %1 konsantrasyonlarında kullanımı en etkili yöntem gibi

görülmektedir. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile zeytin meyvesinden saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin 6 saatlik uygulama sonrası oleuropein miktarlarındaki azalma NaOH uygulamasına göre daha düşük etki değeri göstermiştir. Bu durum kullanılan enzim konsantrasyonunun NaOH konsantrasyonundan daha düşük olması ve NaOH uygulamasının sanayide uygulanan şekli ile NaOH meyve etinin 2/3'üne etki edinceye kadar (24 saat) süreyle uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Ancak, belirlenen bağlanma kapasitesinde 24 saat süreyle meyveye uygulanmış immobilize enzimin (İE) bu süre sonunda 30,60 g zeytin deneylerinde zeytinlerdeki oleuropeinin %90-99 oranında hidrolize ederek bazı denemelerde 0 oleuropein ile acılığın tamamıyla ortadan kalkmasına sebep olmuşlardır. Son olarak yapılan optimizasyonlarda 0,1 grnanoparçacığa bağlanmış 91,6  $\mu$ genzim ile 60 g'na kar zeytine 24 saat uygulamada, enzimin 4 kez kullanımı sonucu oleuropeinin nerdeyse tamamen hidroliz edildiği belirlenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda immobilize enzmin oleuropein hidrolizinden 4 kezden daha fazla kullanılabilir özelliği olduğu düşünülmektedir ve bu doğrultuda çalışmalarımız devam etmektedir.

Enzimin tekrar kullanılabilirliğine olanak veren en önemli konu immobilizasyonda kullanılan demir oksit nanoparçacıklarıdır. Bu parçacıkların güçlü süperparamanyetik özellikleri immobilize enzimin reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılarak tekrar kullanımına imkan vermektedir. Ayrıca süperparamanyetik nanoparçacıkların süperparamanyetik özelliği hiçbir şekilde insan sağlığına zarar vermemesini sağlamaktadır. Bu özelliği ile tatlandırmada nanoparçacığın ortamda kalması söz konusu olsa dahi bu süper paramanyetik özellikleri nanoparçacık vücutta bulunan demir iyonundan bir farklılık göstermemektedir [82].

İmmobilize zeytin  $\beta$ -glukozidazının oleuropein hidrolizinde kullanılabilirliğinin araştırıldığı çalışmamızda, denemeler çoğunlukla yeşil zeytin örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Enzim kaynağı olarak siyah olgunluktaki zeytinlerin tercih edilmesinin sebebi bu dönemdeki zeytinlerde bulunan  $\beta$ -glikozidaz aktivitesinin daha yüksek bulunmasıdır. Buna karşın yeşil olgunluktaki zeytinlerde oleuropein oranlarının daha yüksek olması acılık giderme denemelerinde yeşil olgunlukta zeytin kullanımının temelini oluşturmaktadır. Bundan sonraki araştırma çalışmalarımıza bu araştırmada elde edilen bulgular ışığında  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilen  $\beta$ -glikozidaz enziminin siyah olgunluktaki zeytinlerden sofralık zeytin üretiminde ortaya çıkan problemlerden renk

kayıplarını ortadan kaldırmak amacıyla Ferroglukonat kullanımına alternatif etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yön verilecektir.

Ham zeytinde Total Fenol İçeriği, DPPH Radikal Giderme Aktivitesi, DMPD (N, N-dimethyl-p-phenylenediamine ) denemeleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda su ekstraktlarının artan konsantrasyonlarında DPPH radikal giderme aktivitesinin arttığı belirlendi. Ancak etanol ve metanol ekstraktlarının benzer çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında etanol ekstraktlarının %40 ve Metanol ekstraktlarında aynı değer %8 olarak daha düşük bulundu. Zeytin meyvesinin sahip olduğu fenolik bileşenlerden en fazla miktarda bulunan oleuropein, tirosol, hidroksitirosol, kafeik asit gibi temel fenolikler polar bileşikler oldukları için su ekstraktlarında daha çok antioksidan etkisi belirlenmiştir. Flavanoid grubu fenoliklerin farklı olgunlaşma süreçlerinde farklı konsantrasyonlarda zeytinde bulunması etanol fazında bulunan yüksek antioksidant etkinin sebebinin oluşturmaktadır. DMPD ve toplam indirgeme gücünün belirlenmesinde etanol ekstraktında aktivitenin arttığı su ve metanol ekstraktında ise etanole göre çok düşük bir artış görüldüğü tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İmmobilizasyonda kullanılacak nanoparçacıkların sentezi orijinal olarak yapılıp, yapısal ve manyetik karakterizasyonu detaylandırılmıştır. Saflaştırılan zeytin  $\beta$ -glikozidazının sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan nanoparçacıklara immobilizasyonu karbodi amid reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu, zeytin  $\beta$ -glikozidaz immobilizasyon stratejisi, hem kullanılan manyetik nanoparçacıkların, hemde yöntem olarak literatürde bulunmayan orijinal bir yöntemdir. Nanoparçacık olarak manyetik nano parçacıkların seçilmesinin nedeni, bu nanoparçacıkların kullanıldığı ortamdan basit bir manyetizasyon ile kolayca uzaklaştırılabilmesidir. Manyetik nanoparçacıklar bu amaçla hem tıp hemde biyoteknolojik olarak son yıllarda oldukça büyük önem arz etmektedir.

Süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilerek stabilitesi artırılmış bulunan zeytin  $\beta$ -glikozidaz enzimi sofralık zeytin üretiminde acılık giderme amacıyla kullanılabilir ve hatta güçlü manyetizma etkisi ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılarak bir sonraki üretimde de güvenle kullanılabilir.

Sanayide düşük maliyet kısa sürede istenilen tatlandırma işlemini immobilize enzim sunmaktadır. İmmobilize enzim 24 saat uygulama ile 6 kez kullanılabilir özelliğine sahip olmaktadır. Bu da her zaman hem sağlıklı hem düşük maliyetli tatlandırma hizmeti sunmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Sanchez, J., "Lipid Photosynthesis in Olive Fruit", *Prog.Lipid.Res.*, 33, 97-104, (1994).
- [2] Susamcı, E., "Farklı Gaz Bileşimi ve Sıcaklık Koşullarının Erkence Hurma Zeytini'nin Depo Ömrü Üzerine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, İzmir, (2011).
- [3] [www.olivetolive.tr](http://www.olivetolive.tr) (2014)
- [4] Therios, I.N., *Olives*, CABI, Wallingford: Cambridge, MA, (2009).
- [5] Suakar, Ö., "Bazı Zeytin Çeşitlerinde Sad Geninin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi ve Polimorfizm Analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [6] Varol, N., Erten, L. ve Turanlı, T., *Zeytin*, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü, 52, 330, Ankara, (2009).
- [7] Preedy, V. and Watson, R., *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, London, UK: Academic Press, 1520, (2010).
- [8] Vergara, P.D., "Dünya Zeytin Ansiklopedisi", Madrid (İspanya). Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (1997).
- [9] Salas, J. J., Sanchez, J., Ramli, U. S., Manaf, A.M., Williams, M., and Harwood, J. L.S., "Biochemistry of Lipid Metabolism in Olive and Other Oil Fruits", *Progress in lipid research*, 39, 151-180, (2000).
- [10] Suakar, Ö., "Zeytin cDNA Kütüphanelerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Önemli Genlerin Tespiti", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2012).

- [11] Pirgün, Y., “Hatay’da Yetiştirilen Gemlik ve Halhalı Zeytinlerinin Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2007).
- [12] Boskou, G., Salta, F. N., Chrysostomou S., Mylona, A., Chiou, A. and Andrikopoulos, N.K., “Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek Market”, *Food Chemistry*, 94, 558-564, (2006).
- [13] Kaya, Ü., “İzmit’te Yetiştirilen Gemlik Zeytininin ve Yağının Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2009).
- [14] Bianchi, G., “Lipids and Phenols in Table Olives”, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105, 229-242, (2003).
- [15] Garrido Fernandez, A., Garcia, P., Lopez, A. and Arroyo Lopez F. N., Processing technology in olive oil and table olive. TDC Olive Encyclopaedia. European Community Priority 5 on Food Quality and Safety, (2004).
- [16] Göğüs, F., Özkaya, M. T. ve Ötles, S., *Zeytinyağı*, Ankara: Eflatun Yayın Evi, 274, (2009).
- [17] Danieller, D. and Robards, K., “Phenolic compounds in olives”, *Analyst*, 123, 31- 44, (1998).
- [18] Tokuşoğlu, Ö., Alpas, H. and Bozoğlu, F., “High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 250-258, (2010).
- [19] Tetik, H.D., Sofralık Zeytin İşleme Teknikleri, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 53, İzmir, 136s, ( 2005).
- [20] Tuna, S., “Sofralık Zeytin Fermantasyonunda Alkali ve Enzimatik Yöntemlerin Fizikokimyasal Özellikler Üzerine Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bursa, (2006).

- [21] Piga, A., Gambella, F., Vacca, V. and Agabbio, M., "Response of Tree Sardinian Olive Cultivars to Grek-Style Processing", *Ital. J. Food Sci.*, 13, 29-40, (2001).
- [22] Tuna, S. and Akpınar-Bayızıt, A., "The Use of  $\beta$ -Glucosidase Enzyme in Black Table Olives Fermentation", *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 37 (2), 182-189, (2009).
- [23] Savaş, E. and Uylaşer, V., "Quality Improvement of Green Table Olive cv. 'Domat' (*Olea europaea* L.) Grown in Turkey Using Different De-Bittering Methods", *Not Bot Horti Agrobo*, 41(1), 269-275, (2013).
- [24] Mazzei ve ark. 2006; Tuna ve Akpınar-Bayızıt, (2009).
- [25] Withers, S. G., Warren, R. A. J. and Street, I. P., "Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue of a retaining glucosidase", *J. Am. Chem. Soc.*, 112, (1990).
- [26] Wang, Q. D., Trimbur, R., Graham, R., Warren, R. A. J., Withers, S. G., "Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium facealis*  $\beta$ -glucosidase by kinetic analysis of mutants", *Biochemistry*, 34, 14554-14562, (1995).
- [27] Davies, G. and Henrissat, B., "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases", *Structure*, 3, 853-859, (1995).
- [28] Yenil, N., Kuzu, S., Ay, K., and Ay, E., "Monosakkarit Birimlerinin O-Glikozidik Bağlanması; O-Disakkarit Oluşumları", *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1), 59-74, (2009).
- [29] Henrissat, B. "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochem. J.*, 280, 309-316, (1991).
- [30] Henrissat, B., "Glycosidase families." *Biochem. Soc. Trans.*, 26, 153-156, (1998).
- [31] Henrissat, B. and Davies, G. J. "Structural and sequence based classification of glycosyl hydrolases", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637-644, (1997).



- [32] Lee, Y. C. and Lang, D., "Automatic analysis of sugar components of glycoproteins." *J. Biol Chem.*, 243, 677-700, (1968).
- [33] Henrissat, B. and Davies, G. J., "Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics", *Plant Physiol*, 124, 1515-1519, (2000).
- [34] 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).
- [35] Xu, Z., Escamilla-Trevino, L. L., Zeng, L., et al., "Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1", *Plant Molecular Biology*, 55, 343-367, (2004).
- [36] Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Palmieri, S. and Henrissat, B., "The Crystal Structures of *Sinapis alba* Myrosinase and of a Covalent Glycosylenzyme Intermediate Provide Insights into the Substrate Recognition and Active-Site Machinery of an S-Glycosidase", *Structure*, 663-675, (1997).
- [37] Wiesmann. C., Beste, G., Hengstenberg, W., Schulz, G. "The three-dimensional structure of 6-phospho- $\beta$ -galaktosidaz from *Lactococcus lactis*." *Structure* 3.(1995) 961-968
- [38] Barrett, T., Suresh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J., Hughes, M.A. "The crystal structure of a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase from white sweet clover, a family 1 glycosyl hydrolase." *Structure* 3. (1995) 951-960
- [39] Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J. A., Martinez-Ripoll, M., et al., "Crystal Structure of B-Glucosidase a from *Bacillus polymyxa*: Insights into the Catalytic Activity in Family 1 Glycosyl Hydrolases", *Journal of Molecular Biology*, 275, 491-502, (1998).
- [40] Verdoucq, L., Morinie`re, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. and Czjzek, M., "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).
- [41] Nam, K. H., Sung, M. W., and Hwang, K. Y., “Structural Insights into the Substrate Recognition Properties of Beta-Glucosidase”, *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), 1131-5, (2010).
- [42] Clarke, A. J., Bray, M. R., and Strating, H., “Glucosidases, Glucanases, and Xylanases, in  $\beta$ -Glucosidases”, *American Chemical Society*, 27-41, (1993).
- [43] Withers, S. G., Warren, R. A. J. and Street, I. P.,” Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate rezidu of a reatining glucosidase”, *J. Am. Chem. Soc*, 112, (1990).
- [44] Çiçek, M., “Mechanism of Substrate Specificity and Catalysis in Retaining  $\beta$ -glucosidases From Maize and Sorghum”, Ph.D. Thesis, *Virginia Polytechnic Institute and State University*, Blacksburg, Virginia, (1999).
- [45] Kara, H., “ $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile *Olea europea* Meyvesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ile Bazı Pestisit ve Ağır Metallerle Karşı Afinitesinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2010).
- [46] Ergöçen, G., “ $\beta$ -glukozidaz Enziminin Kayısı (*Prunus armeniaca*) Çekirdeklerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana, (2013).
- [47] Demirkan, G., “*Climacocystis borealis*'den  $\beta$ -glukozidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, (2009).
- [48] Odoux, E., Chauwin, A., Brillouet, J. M., “Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)  $\beta$ -Dglucosidase”, *J. Agric Food Chemistry*, 51, 3168-3173, (2003).
- [49] Turan, A., “*Armillaria mellea* Mantarından Beta-glukozidaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz*

*Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, (2011).

- [50] 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).
- [51] Gümüşkesen, A. S. and Yemişcioğlu, F., “The regional characterization of olive varieties and olive oils in Turkey” (Final report) <http://www.egelihracatcilar.com/Images/Menu1Page//> Turkiyedeki Zeytin Çesitlerinin ve Zeytinyağlarının Bölgesel Karakterizasyonu. Erişim tarihi: 15 Ağustos 2008).
- [52] Dembitsky, V. M., “Astonishing diversity of natural surfactants: 1.Glycosides of fatty acids and alcohols”, *Lipids*, 39, 933-953, (2004).
- [53] Niemeyer, H.M., “Hydroxamic Acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones) Defense Chemicals in the Gramineace”, *Phytochemistry*, 27, 3349-3358, (1988).
- [54] Poulton, J. E., “Cyanogenesis in plants”, *Plant Physiol*, 94, 401-405, (1990).
- [55] Yılmaz, S., “Alternatif Besin Yan Ürünlerinden Bakteriyel Selüloz Üretimi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, İstanbul, (2007).
- [56] Akmaz, S., “Selülozun Enzimli Hidroliz Yoluyla Glukoza Dönüştürülmesi ve Tepkime Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, (2001).
- [57] Sönmez Deniz, G., “Zeytin Beta Glukozidaz ve Metalotionein Genlerinin Moleküler, Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [58] Hösel, W. and Todenhagen, R., “Characterization of a B-Glucosidase from Glycine Max Which Hydrolyses Coniferin and Syringin”, *Phytochemistry*, 19(7), 1349-1353, (1980).

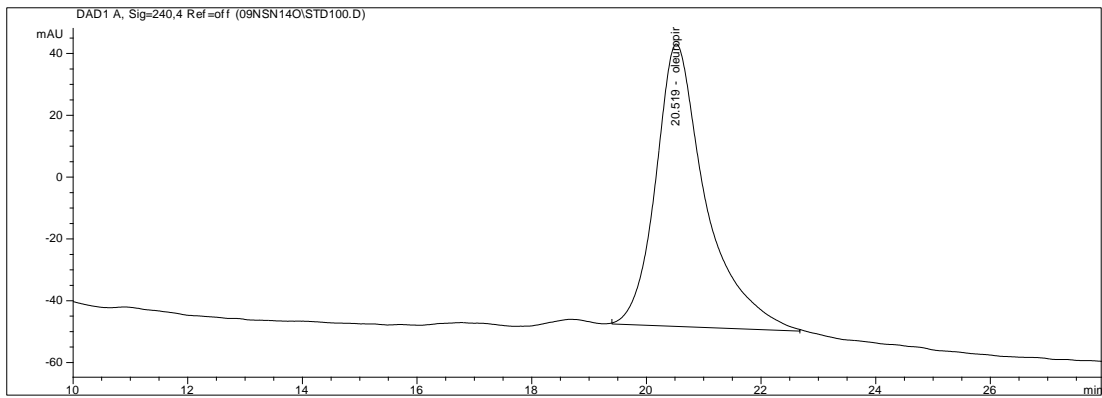
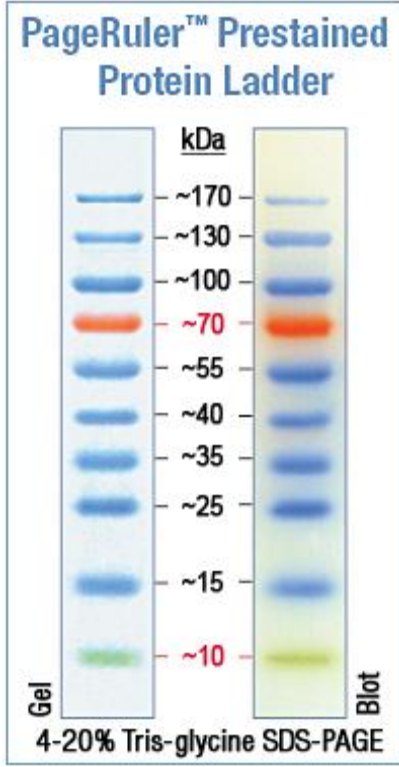
- [59] Surholt, E. and Hösel, W., “Identification of Coniferin-Specific-Glucosidases in Cicer Arietinum L. Seedlings”, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 101(3), 207-214, (1981).
- [60] Grohmann, K., Manthey, J. A., Cameron, R. G. and Buslig, B. S., “Purification of Citrus Peel Juice and Molasses”, *J Agric Food Chem*, 47(12), 4859-67, (1999).
- [61] Günata, Z., Dugelay, I., Sapis J. C, Baumes, R., Bayonove, C., “Role of the enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in vinemaking”, In: Schreier, P., Winterhalter, P. Progress in flavour precursor Studies. Allured Publ. (1993).
- [62] Odoux, E., Chauwin, A. and Brillouet, J. M., “Purification and Characterization of Vanilla Bean (*Vanilla Planifolia* Andrews) Beta-D-Glucosidase”, *J Agric Food Chem*, 51(10), 3168-73, (2003).
- [63] Wang D, Yoshimura T, Kubota K, Kobayashi A. “Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. I. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds.” *J Agric Food Chem* 48, (2000) 5411–5418
- [64] 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).
- [65] <http://www.biol.vt.edu/faculty/esen/glycosidase/ab/index2.html>
- [66] Alptekin, Ö., “Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu”, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Adana, (2009).
- [67] Öztürk, T. K., “Lipaz Enziminin Polivinil Alkol (PVA) Üzerine İmmobilizasyonu ve Bazı Organik Çözgenlerde Kullanım Olanaklarının Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, (2009).

- [68] Şılbr, M. S., “*Zymomonas mobilis* ile Levan Üretimi ve Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, (2013).
- [69] Dinçkaya, E., *Enzim sensörleri, Biyosensörler* (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Ün. Yayınları, 81-142, (1999).
- [70] Parlak, M., “Modifiye Dekstransükraz Kullanarak Prebiyotik Sentezi”, Doktora Tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Gebze, (2013).
- [71] Talbert, J. N., Gaddard, J. M., “İnfluence of nanoparticle diameter on conjugated enzyme activity” *FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING*, 91, 693-699, (2013)
- [72] Kaya, M. O., “Yeni Bir Metodla Hyalüronidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklerin Bu Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [73] Chen, D. H., Liao, M. H., “Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 283–291,(2002).
- [74] Gülçin, İ., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M., O., “Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.)” *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205–215, (2004).
- [75] Kockar, F., Beyaz, S., Sinan, S., Kockar, H., Demir, D., Eryılmaz, S., Tanrisever, T., Arslan, O.” *Paraoxonase 1-Bounded Magnetic Nanoparticles: Preparation and Characterizations*”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10, 7554-7559, ( 2010).
- [76] Kara, H. “The Putrification and Characterization of  $\beta$ -Glukosidase Enzyme From *Olea europea* with hydrophobic interaction chromatography and the investigation of affinities of some pesticides and heavy metals to the enzyme”.

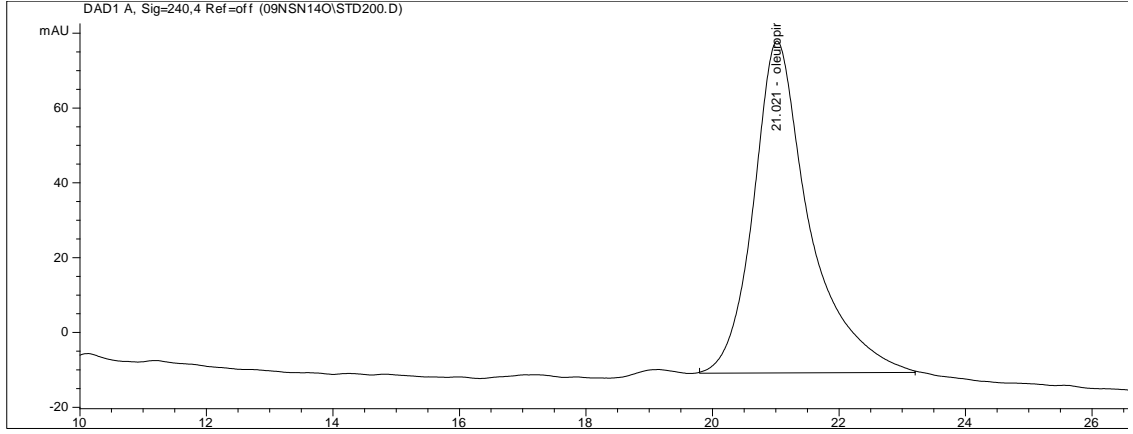
Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology, Balikesir, Turkey, 117p. (2010) .

- [77] Romero-Segura, C., Sanz C, Perez AG “Purification and characterization of an olive fruit  $\beta$ -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil of phenolics” *J. Agric. Chem* 57 7983-7988 (2009).
- [78] Cameron, R.G., Manthey, J. A., Baker, R.A., Grohmann, K.”Purification and Characterization of a  $\beta$  -Glucosidase from Citrus sinensisvar. Valencia Fruit Tissue, *J. Agric. Food Chem.*, 49,4457–4462. (2001).
- [79] Khalafalla, S. E., Reimers, G. W. *IEEE Transactions on Magnetics*, Vol. MAG-16, No.2, 178-179, (1980).
- [80] Altınyay Ç, Güvenç A, Altun ML, Antioxidant Activities of Oleuropein and the Aqueous Extracts of *Olea Europea L.* Varieties Growing in Turkey .*Turk J. Pharm. Sci.* 8 (1), 23-30, 2011
- [81] Salioglu E.C., Akaydin G., Can E.Ç., Akaydin S.Y. Evaluation of Antioxidant Activity of Various Herbal Folk Evaluation Medicine. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 35, 59-67,( 2010 )
- [82] Ozel, F., Koçkar, H., Beyaz, S.,Karaağaç, O.,Tanrıseven, T, “ Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: effect of iron oleate precursors obtained with asiply way”, *Jornal of the materials secience-materials in electronics*, 24, 3073-3080, (2013)

# EKLER



HPLC analizi için kullanılan 100 ppm'lik sıtandardart



HPLC analizi için kullanılan 200 ppm'lik sıtandard