

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



**ZEYTİN β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE NANO PARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERHAD ONAT

BALIKESİR, MAYIS - 2016

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



**ZEYTİN β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE NANOPARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LISANS TEZİ

SERHAD ONAT

Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr . Elif SAVAŞ (Tez Danışmanı)

Yrd. Doç. Dr . Aylin ER

Doç. Dr. Ece TAMER

BALIKESİR, MAYIS - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Serhad ONAT tarafından hazırlanan “ZEYTİN β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE NANO PARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02.05.2016 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

Üye
Yrd. Doç.Dr. Aylin ER

Üye
Doç.Dr. Canan Ece TAMER


.....

.....

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez alışması TÜBİTAK tarafından 1100778 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tez alışması Balıkesir Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 2016/0001 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ZEYTİN β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
NANOPARÇACIKLARA İMMOBİLİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SERHAD ONAT
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: YRD.DOÇ.DR.ELİF SAVAŞ)
(EŞ DANIŞMAN: PROF.DR.FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, MAYIS - 2016**

Bu çalışmada, zeytin (*Olea europaea L.*) meyvesinden elde edilen β -glukozidaz enzimi iki aşamalı olarak saflaştırılmış ve nanoparçacıklara immobilize edilmiştir. Saflaştırma işleminde önce amonyum sülfat çöktürmesi devamında ise hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda zeytin β -glukozidaz enzimi % 9,90 verimle 163,62 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan zeytin β -glukozidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezlerinde molekül ağırlığı 40 kDa olarak tek bant şeklinde görüntülenmiştir.

Saflaştırılan zeytin β -glukozidaz enzimi karbodiimide ile aktifleştirilmiş süperparamanyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarına immobilize edilmiştir. Serbest enzimin optimum pH değeri 5,5 olarak belirlenirken, immobilize enzimin optimum pH değeri de 5,5 olarak bulunmuştur. Serbest enzimin optimum sıcaklığı 50 °C iken immobilizasyon işleminden sonra 5°C artarak 55°C'ye yükselmiştir. Serbest enzimin oleuropein substratına karşı optimum pH'sı 35°C olarak belirlenmiştir. Zeytin β -glukozidaz enziminin saf ve immobilize formlarının pNPG ve oleuropein substratlarına karşı K_M ve V_{max} değerleri Linewear-Burk grafiği ile belirlenmiştir. pNPG substratında saf enzim için 0,37 mM ve 370 EU/ml olarak immobilize enzim için 1,34 mM ve 384,61 EU/ml olarak belirlenmiştir. Oleuropein substratına karşı ise saf enzim için 1,7 mM ve 1000 EU/ml olarak immobilize enzim için 6 mM ve 2000 EU/ml olarak belirlenmiştir.

Zeytin β -glukozidaz enziminin aktivitesine karşı inhibitör etkisi gösteren bazı kimyasallar, ağır metaller ve pestisitlerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin, β -glukozidaz, nano parçacık.

ABSTRACT

THE PURIFICATION OF B-GLUCOSIDASE FROM OLIVE AND IMMOBILIZED ON THE NANOPARTICLES

MSC THESIS

SERHAD ONAT

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

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

(CO-SUPERVISOR: PROF.DR.FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, MAY 2016

B-glucosidase enzyme is known to be localized to vacuoles in plant cells, as in many plants, the olive plant (*Olea europaea L.*) is the basis of the defense mechanism. In this study, β -glucosidase purified using hydrophobic interaction chromatography from olive with the specially designed Sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine. In purification process firstly the ammonium sulfate precipitation, secondly hydrophobic interactions chromatography methods were used. In our study, olive β -glucosidase enzyme, purified 163,62 fold with 9,90 % yields. The purified olive β -glucosidase enzyme, was observed SDS-polyacrylamide gel electrophoresis a single band with 40 kDa.

The purified olive β -glucosidase enzyme was immobilized on the superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles with carbodiimide. The optimum temperature for β -glucosidase was determined 35 °C using pNPG. The optimum temperature for β -glucosidase (50 °C) was increased by 5 °C after immobilisation, while the optimum pH and immobilisation pH for β -glucosidase was by 5,5. The K_M and V_{max} values were determined of free and immobilized enzyme by the method of Lineweaver-Burk plots, using pNPG and oleuropein as substrates. The K_M and V_{max} values of free and immobilized β -glucosidase were determined 0,37 mM (370 EU/ml) and 1,34 mM (334,61 EU/ml) by the method of Lineweaver-Burk plots for pNPG substrate. The K_M and V_{max} values of free and immobilized β -glucosidase were determined 1,7 mM (1000 EU/ml) and 6 mM (2000 EU/ml) by the method of Lineweaver-Burk plots for oleuropein substrate.

Some chemicals showing an inhibitory effect against the activity of β - glucosidase olive was calculated IC₅₀ values of the heavy metals and pesticides.

KEYWORDS: Olive, β -glucosidase, nano particles.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin Meyvesi.....	2
1.2 β -glukozidaz Enzimi	4
1.2.1 β -glukozidaz Enziminin Adlandırılması.....	4
1.2.2 β -glukozidaz Enziminin Özellikleri	5
1.2.3 β -glukozidaz Enziminin Katalizleme Mekanizması.....	6
1.2.4 β -glukozidaz Enziminin Substratları	8
1.2.5 Beta-Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması	9
1.3 Beta-Glukozidaz Enziminin Önemi	10
1.3.1 Bitkilerde Savunma	10
1.3.2 β -glukozidazların Farmakolojik Kullanım Alanları	11
1.3.3 β -glukozidazların Bitkiler Abiyotik Stres Etkisi	11
1.3.4 β -glukozidazların Bitkilerde Meyve Olgunlaşması ve Tat Oluşumu Üzerine Etkisi	12
1.3.5 β -glukozidazların Biyokütle Değişimi Üzerine Etkisi	12
1.4 Oleuropein.....	13
1.5 Enzim İmmobilizasyonu	13
1.5.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	15
1.5.1.1 Taşıyıcı Bağlama Metodu.....	15
1.5.1.2 Çapraz Bağlama Metodu	16
1.5.1.3 Tutuklama Metodu.....	16
1.6 β -glukozidaz Enzimi Üzerine Etkisi Olan Pestisitler.....	19
1.7 β -glukozidaz Enzimi Üzerine Etkisi Olan Ağır Metaller.....	20
2. MATERYAL VE METOT	22
2.1 Materyaller	22
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	22
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	24
2.1.3.1 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler	24
2.1.3.2 SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	26
2.1.3.3 Enzimin İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler	28
2.2 Metot	28
2.2.1 Aseton Tozunun Hazırlanması	28
2.2.2 Enzim Ham Ekstraktının Hazırlanması	29
2.2.3 Enzim Aktivite Tayini	29
2.2.4 Protein Tayini	30
2.2.4.1 Lowry Yöntemiyle Protein Tayini.....	30
2.2.4.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	31

2.2.5	Enzimin Saflaştırılması	33
2.2.5.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	33
2.2.5.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzim Saflaştırılması	34
2.2.5.3	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	35
2.2.6	β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36
2.2.6.1	Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	36
2.2.6.2	Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	36
2.2.6.3	Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi	37
2.2.6.4	Enzimin Farklı Substratlara Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi	37
2.2.6.5	Saflaştırılan Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	37
2.2.6.6	İnhibitörlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	38
2.2.6.7	Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Belirlenmesi	38
2.2.6.8	Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisitlerin Etkisinin Belirlenmesi	38
2.2.7	Glukozidaz Enziminin İmmobilizasyonu	39
2.2.7.1	Enzimin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu.....	39
2.2.7.2	Enzimin Nanopartiküllere Bağlanmasının FT-IR Analizi ile Belirlenmesi	40
2.2.7.3	İmmobilize Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi	40
2.2.8	İmmobilize β -glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	41
2.2.8.1	İmmobilize Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	41
2.2.8.2	İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	41
2.2.8.3	İmmobilize Enzimin pNPG ve Oleuropein Substratlarına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	42
3.	BULGULAR.....	43
3.1	Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Standart Eğri.....	43
3.2	β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması	44
3.2.1	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması...44	
3.2.2	Zeytin β -Glukozidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	47
3.3	Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri	47
3.3.1	Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması.....	47
3.3.2	Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması	48
3.3.3	Zeytin β -Glukozidaz Enziminin Termal Kararlılığı	50
3.3.4	Enzimin Farklı Substratlara Karşı Spesifikliğı	50
3.3.5	Farklı Substratların K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	51
3.3.5.1	Enzimin pNPG Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri	51
3.3.5.2	Enzimin Oleuropein Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri ..54	
3.3.6	β -glukozidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	56
3.3.6.1	Glukozun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	56
3.3.6.2	Sitrik Asitin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi ..58	
3.3.6.3	Laktik Asitin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	60

3.3.6.4	Sodyum Klorürün Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	62
3.3.6.5	Sodyum Hidroksitin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	64
3.3.7	Zeytin β -Glukozidaz Enzimi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisi ..	67
3.3.8	β -glukozidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Pestisitlerin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	69
3.3.8.1	Deltametrin pestisitinin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	69
3.3.8.2	Chlorpyrifos Pestisitinin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	71
3.3.8.3	Alphacypermethrin Pestisitinin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi ..	73
3.4	β -Glukozidaz Enziminin İmmobilizasyonu	75
3.4.1	Enzim İmmobilizasyonunun FT-IR Analizi	75
3.4.2	İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	77
3.4.2.1	İmmobilize Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması	77
3.4.2.2	İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması... ..	78
3.4.2.3	İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin pNPG Substratına Karşı KM ve Vmax Değeri.....	79
3.4.2.4	İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Oleuropein Substratına Karşı K _M ve Vmax Değeri	82
3.4.2.5	İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Tekrar Kullanım Grafiği....	84
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
5.	KAYNAKLAR	91

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Zeytin meyvesi [15].	3
Şekil 1.2: β -glukozidaz enzimlerinin genel üç boyutlu yapısı.	4
Şekil 1.3: Mısır β -glukozidaz Glu1 izoenzimi monomerinin 3 boyutlu yapısı.	5
Şekil 1.4 : Enzimin katalizleme mekanizması [30].	7
Şekil 1.5: β -glukozidazların substrat ile etkileşimi [34].	8
Şekil 1.6: β -glukozidazların bazı yapay substratları [30].	9
Şekil 1.7: Oleuropeinin kimyasal yapısı [71].	13
Şekil 1.8: İmmobilizasyonda kullanılan farklı destek materyali türleri.	14
Şekil 1.9: Taşıyıcı bağlanma metodları [78].	16
Şekil 1.10:Çapraz bağlanmış enzim kümesi oluşumunun şematik gösterimiPEG: Polietilen glikol [78].	16
Şekil 1.11:Fraklı tutuklanma metodları [78].	17
Şekil 1.12:Enzim immobilizasyon yöntemleri.	18
Şekil 1.13:Deltamethrin yapısı [82].	19
Şekil 1.14:Chlorpyrifos'un yapısı [84].	20
Şekil 1.15:Alpha-cypermethrin yapısı [85].	20
Şekil 1.16:Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayılımları [87,88].	21
Şekil 2.1: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.	31
Şekil 2.2: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.	32
Şekil 2.3: Hidrofobik etkileşim kromotografisinde kullanılan hidrofobik jel.	34
Şekil 3.1: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 μ L hacimli pNPG standart grafiği.	43
Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 μ L hacimli pNPG standart grafiği.	44
Şekil 3.3: Hidrofobik etkileşim kolonundan zeytin β -glukozidaz. enziminin elüsyon grafiği	45
Şekil 3.4: Hidrofobik etkileşim kromotografi ile saflaştırılan zeytin β -glukozidaz enzimi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi	47
Şekil 3.5: Zeytin β -glukozidaz enziminin optimum pH grafiği.	48
Şekil 3.6: Zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG substratına karşı optimum sıcaklık grafiği.	49
Şekil 3.7: Zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratına karşı optimum sıcaklık grafiği.	49
Şekil 3.8: Zeytin β -glukozidaz enziminin termal kararlılık grafiği.	50
Şekil 3.9: Zeytin β -glukozidazının farklı substratlara karşı olan aktiviteleri.	51
Şekil 3.10: pNPG Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.	52
Şekil 3.11: Oleuropein substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.	54
Şekil 3.12: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda glukoz % aktivite grafiği.	58
Şekil 3.13: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda sitrik asitin % aktivite grafiği.	60

Şekil 3.14: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda laktik asitin % aktivite grafiği.	62
Şekil 3.15: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda sodyum klorürün % aktivite grafiği.	64
Şekil 3.16: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda sodyum hidroksidin % aktivite grafiği.	66
Şekil 3.17: Zeytin β -glukozidaz enzimi üzerine bazı ağır metallerin etkileri. .	67
Şekil 3.18: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,25 mM pNPG substratı konsantrasyonunda deltamethrin pestisitinin % aktivite grafiği.	69
Şekil 3.19: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,25 mM pNPG substratı konsantrasyonunda chlorpyrifes pestisitinin % aktivite grafiği.	71
Şekil 3.20: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,25 mM pNPG substratı konsantrasyonunda alphacypermethrin pestisitinin % aktivite grafiği.	73
Şekil 3.21: İmmobilizyon destek materyali, saf enzim ve enzim bağlı nanopartikülün FT-IR spektrumları.	76
Şekil 3.22: İmmobilize enziminin optimum pH grafiği.	77
Şekil 3.23: İmmobilize ve serbest enzimin optimum pH grafiği.	78
Şekil 3.24: İmmobilize enzimin optimum sıcaklık grafiği.	78
Şekil 3.25: İmmobilize ve serbest enzimin optimum sıcaklık grafiği.	79
Şekil 3.26: İmmobilize β -Glukosidaz Enziminin pNPG Substratına Karşı K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.	80
Şekil 3.27: İmmobilize β -Glukosidaz Enziminin Oleuropein Substratına Karşı K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.	82
Şekil 3.28: İmmobilize β -Glukosidaz Enziminin Tekrar Kullanım Grafiği.	84

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Ham zeytin bileşimi [16].	3
Tablo2.1: Kullanılan Alet ve Cihazlar.	23
Tablo 2.2: SDS yönteminde kullanılan çözelti miktarları.	27
Tablo 2.3: Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının enzim aktivitesi bulunurken kullanılan reaksiyon hacimleri.	33
Tablo 3.1: Saflaştırma tablosu.	46
Tablo 3.2: Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı ilgisinin belirlenmesinde kullanılan substrat çeşitleri, enzim aktivite ve relative aktivite değerleri.	51
Tablo 3.3: Zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.	53
Tablo 3.4: Zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.	55
Tablo 3.5: Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı K_M , V_{max} ve V_{max} / K_M değerleri.	56
Tablo 3.6: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren glukozun IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	57
Tablo 3.7: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren sitrik asitin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	59
Tablo 3.8: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren laktik asitin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	61
Tablo 3.9: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren sodyum klorürün IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	63
Tablo 3.10: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren sodyum hidroksitin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	65
Tablo 3.11: β -glukozidaz enzimi üzerine ağır metallerin etkisinin belirlenmesinde kullanılan metal çeşitleri ve bu metallerin enzim aktivitesi üzerindeki sonuçları.	68
Tablo 3.12: Zeytin beta glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren delthamethrin pestisitinin IC_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	70

Tablo 3.13: Zeytin beta glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren chlorpyrifos pestisitinin IC ₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.	72
Tablo 3.14: Zeytin beta glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren alphacypermethrin pestisitinin IC ₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	74
Tablo 3.15: İmmobilize zeytin β-glukozidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, KM ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri.	81
Tablo 3.16: İmmobilize zeytin β-glukozidaz enziminin oleuropein substratı kullanılarak, KM ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri.	83
Tablo 3.17: İmmobilize Zeytin β-glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı KM, Vmax ve Vmax / KM değerleri.	84

SEMBOL LİSTESİ

pNPG :	4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid
pNP :	4-Nitrofenol
Na-Ac :	Sodyum Asetat
EU :	Enzim Ünitesi
SDS :	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE :	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED :	N,N,N', N' , -tetrametiletildiamin
APS :	Amonyum Persülfat
BSA :	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
[S] :	Substrat Konsantrasyonu
Tris :	Trihidroksi metil aminometan
FT-IR :	Fourier Transform İnfrared
K_M :	Michaelis-Menten Sabiti
V_{max} :	Maksimum Hız
mM :	Milimolar
μL :	Mikrolitre
DMSO:	Dimetil sülfoksit

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından bugüne, her türlü konuda değerli görüşlerine başvurduğum, karşılaştığım her türlü zorlukta akademik ve manevi desteklerini benden ve benim gibi bu yolda ilerlemeye çalışan öğrencilerden esirgemeyen kıymetli hocalarım Sayın Yrd.Doç.Dr. Elif SAVAŞ'a ve Sayın Prof.Dr. Feray KÖÇKAR'a teşekkürü bir borç bilirim ve bizlere verdikleri emekleri zayi etmemeyi kendime bir ders bilirim.

Bilimin ve deneyimlerin paylaştıkça piştiğini ve çoğaldığını öğreten pek kıymetli hocalarım Prof.Dr. Selma SİNAN, Yrd.Doç.Dr. Hatice YILDIRIM, Yrd.Doç.Dr. Sümeyye AYDOĞAN, Yrd.Doç.Dr.Meltem ALPER ve Dr. Esra TOKAY'a yaptıkları tüm yardımlardan dolayı şükranlarımı sunarım.

Yaptığım tüm çalışmalarda katkısı ve emeği olan tüm öğrenci arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hem beni büyüten aileme, hemde benim büyüteceğim aileye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Serhad ONAT

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji önderliğinde çok hızlı bir şekilde gelişen gen ve protein mühendisliği; son yıllarda sağlıktan gıdaya kadar birçok alanda yeni veriler ortaya koymuş ve birçok çalışmaya ışık tutmuştur. Canlı sistemlerde bulunan protein, enzim, hormon gibi biyomoleküllerin insanlığın yararına farklı alanlarda kullanılması ve ticari ürünlerin üretilmesine olan ilgi arttıkça biyoteknoloji alanı önemini her geçen gün daha da arttırmaktadır [1,2].

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizatörler olarak tanımlanmaktadır. [3]. İlk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmaca mide suyunun eti çözebildiği gösterilerek enzimin hücre dışında da bir aktivitesi olduğu fark edilmiştir .Bu sayede enzimlerden doğal ortamlarının dışında pek çok alanda yararlanabilme imkânı ortaya çıkmıştır [4].

Son yıllarda başta gıda endüstrisi olmak üzere eczacılık ve kimya sanayinde kullanılan enzim sayısı oldukça fazladır [5]. Bu enzimlerden biri de β -glukozidazlardır. β -glukozidazlar mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi oldukça yaygın bir canlı grubunda bulunmaktadır. β -glukozidaz enzimlerinin karbonhidratlardaki glikozidik bağları hidroliz ederek bitkilerde savunma, hücre duvarı metabolizması, abiyotik stres dayanıklılığı, biyokütle yıkımı ve lignifikasyon gibi bir çok biyolojik işlevde görev aldıkları belirlenmiştir [6-7]. Enzimler doğal formlarında kullanılmalarının yanı sıra immobilize formlarda da oldukça etkili bir şekilde kullanılabilirler [8]. Ekonomik etkiler her alanda enzim kullanımını negatif yönde etkilemektedir. Ancak enzimlerin yeniden kullanılabilmesine imkan vermesi nedeniyle immobilizasyon uygulamaları bu yönde maliyeti azaltıcı etkileriyle büyük ölçüde pozitif bir ivme sağlamaktadır [9].

Bu doğrultuda yapmış olduğumuz çalışmada zeytin β -glukozidaz enziminin saflaştırılması ve süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilizasyonu amaçlanmıştır. Bu çalışma için aşağıdaki uygulamalar gerçekleştirilmiştir:

- ❖ Zeytin meyvesinden aseton tozu hazırlanması

- ❖ Aseton tozundan ham ekstrakt hazırlanması
- ❖ Ham ekstrakta amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak kısmi saflaştırma yapılması
- ❖ Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile zeytin meyvesi β -glukozidaz enziminin saflaştırılması
- ❖ SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflığının kontrolü
- ❖ Enzimin optimum pH, sıcaklık değerlerinin ve termal kararlılığının belirlenmesi
- ❖ Enzimin farklı substratlara (pNPG, oleuropein) karşı kinetik özelliklerinin (K_M ve V_{max}) araştırılması
- ❖ Enzimin literatürde geçen inhibitör maddelere karşı aktivitesinin incelenmesi
- ❖ Zeytincilikte kullanılan bazı pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi
- ❖ Enzimin süperparamanyetik nanopartiküllere karbodiimide ile kovalent olarak immobilizasyonu
- ❖ FT-IR analizi ile bağlanmanın kontrolü
- ❖ İmmobilize enzimin optimum pH, sıcaklık değerlerinin belirlenmesi
- ❖ İmmobilize enzimin farklı substratlara (pNPG, oleuropein) karşı kinetik özelliklerinin (K_M ve V_{max}) araştırılması

1.1 Zeytin Meyvesi

Eski çağlardan beri önemini ve değerini koruyan zeytin meyvesi *Oleacea* familyasının bir üyesidir. *Olea* cinsi ve *Olea europaea* türü olan zeytin zor yetiştirme alanlarında yetişebilen, kuraklığa dirençli olan, meyvesi yenen ve yağı çıkarılan Akdeniz –Marmara iklimine uygun bir ağaç türüdür [10,11].

Türkiye’de bilinen 88 çeşit zeytin içerisinde 17’sinin ticari değere sahip olduğu bilinmektedir [12]. İçeriğinde barındırdıkları fenolik maddeler nedeniyle zeytin hasattan sonra acı bir lezzete sahiptir. Bu sebepten dolayı hemen tüketilemez. Acılığın giderilmesi için belirli aşamalardan geçmektedir. Bu sayede tüketilebilir hale gelmektedir [13]. Sofralık zeytin standartlarında; ‘‘Kültüre alınmış zeytin ağacı (*Olea europaea sativa*, Hoffg, Link) meyvelerinin tekniğine

uygun olarak acılığı giderilip, laktik asit fermantasyonuna tabi tutularak veya tutulmayarak gerektiğinde laktik asit ve / veya diğer katkı maddeleri ilave edilen, pastörizasyon veya sterilizasyon işlemine tabi tutularak veya tutulmadan elde edilen mamüldür.” şeklinde ifade edilmektedir [14].



Şekil 1.1: Zeytin meyvesi [15].

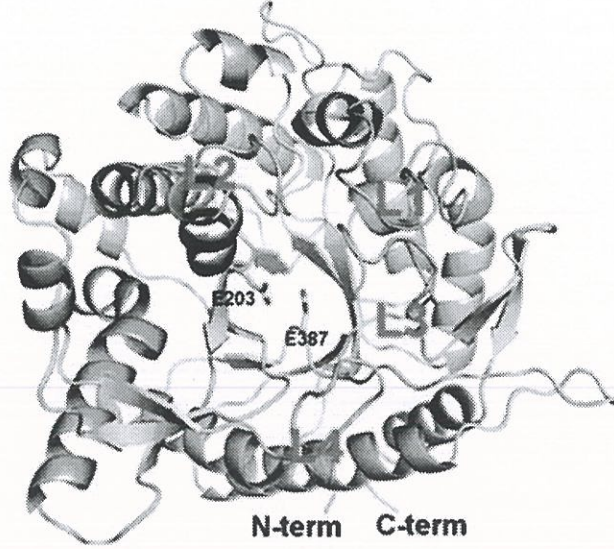
Zeytin sağlıklı beslenme açısından bileşiminde bulunan maddelerden dolayı oldukça önemli bir değere sahiptir. Özellikle zeytinyağının kalp krizi, yüksek tansiyon, damar sertliği ve kolesterol üzerine olumlu etkileri mevcuttur. Bazı kanser türlerine karşı koruyucu etkisi de bulunmaktadır [16,17].

Tablo 1.1: Ham zeytin bileşimi [16].

Bileşim	%
Nem	60-65
Yağ	10-25
İndirgen şeker	3-6
İndirgen olmayan şeker	<0.3
Mannitol	0.5-1.0
Lif	1-4
Ham protein	1-2
Kül	<1.0
Organik asit ve tuzları	1-2
Fenolik maddeler	2-3
Pektik maddeler	<0.6
Diğer bileşenler	3-7

1.2 β -glukozidaz Enzimi

β -glukozidazlar tüm canlı gruplarında evrensel bir dağılım gösterirler. Selülozik biyokütle yıkımı, lignin biyosentezi, glukolize flavonoidlerin serbest bırakılması, abiyotik stres dayanıklılığı gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynarlar [18].



Şekil 1.2: β -glukozidaz enzimlerinin genel üç boyutlu yapısı.

1.2.1 β -glukozidaz Enziminin Adlandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan isimlendirme sistemine göre β -glukozidazlar Hidrolazların bulunduğu 3. sınıfta yer almaktadırlar. Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler EC.3.2. alt sınıfında yer alan glikozid hidrolazlardandır [19]. Glikozid hidrolazlar, amino asit dizisinde belirlenen benzerliklerine dayanılarak, 82 enzim ailesi olarak sınıflandırılmıştır [19].

EC.3. Hidrolazlar

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

EC.3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [20]

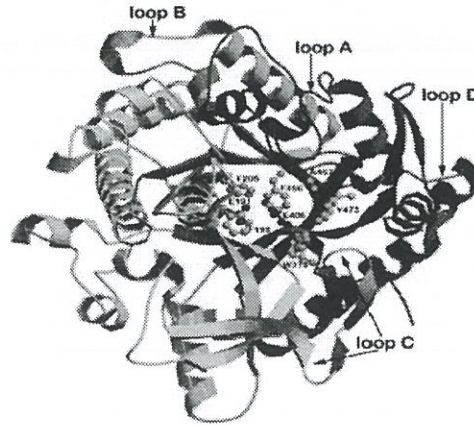
EC.3.2.1.21 β -glukozidazlar (1,4- β -glukozidaz) [21]

β -glukozidazların sistematik adları β -D-glukozid glukohidrolaz, EC3.2.1.21' dir. β -glukozidazlar iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikon ve bir aril veya alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki β -glikozidik bağı hidroliz eden enzimlerdir [21,22].

1.2.2 β -glukozidaz Enziminin Özellikleri

Aile1 β -Glukozidaz enzimlerinin monomerlerinin literatürde incelenmesi sonucu SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında görüntülediği belirlenmiştir. Monomerlerin polipeptid uzunluklarının enzimin elde edildiği organizmanın kaynağına göre 447 (*Bacillus polymyxa*) - 527 (Beyaz hardal mirosinazı) aminoasit aralığında değiştiği gözlenmiştir. Öbakteriler ve arkebakterilerdeki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha kısa, ökaryotlardaki enzimlerin polipeptid zincirlerinin ise daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Dikotil bitkilerden ve hayvanlardan saflaştırılan tüm β -Glukozidazlarda hesaplanan monomerlerin molekül büyüklüklerinin, cDNA veya genomik DNA'dan hesaplanan molekül büyüklüklerine göre ortalama 3-5 kDa daha uzun olduğu belirlenmiştir [23].

β -glukozidaz monomerlerinin her birinin temel yapısında yüksek korunumlu peptid motifleri mevcut bulunmaktadır. Bunlar TFNEP, SAYQI, DNFEW, YRFSI, LGLNYY ve YITENG'dir. Bunlardan YITENG ve TFNEP enzimin aktif bölgesinin bir parçasını oluştururlar ve iki katalitik glutamat içerirler [24]. Şekil 1.3'de aktif merkezdeki motifler görülmektedir.



Şekil 1.3: Mısır β -glukozidaz Glu1 izoenzimi monomerinin 3 boyutlu yapısı.

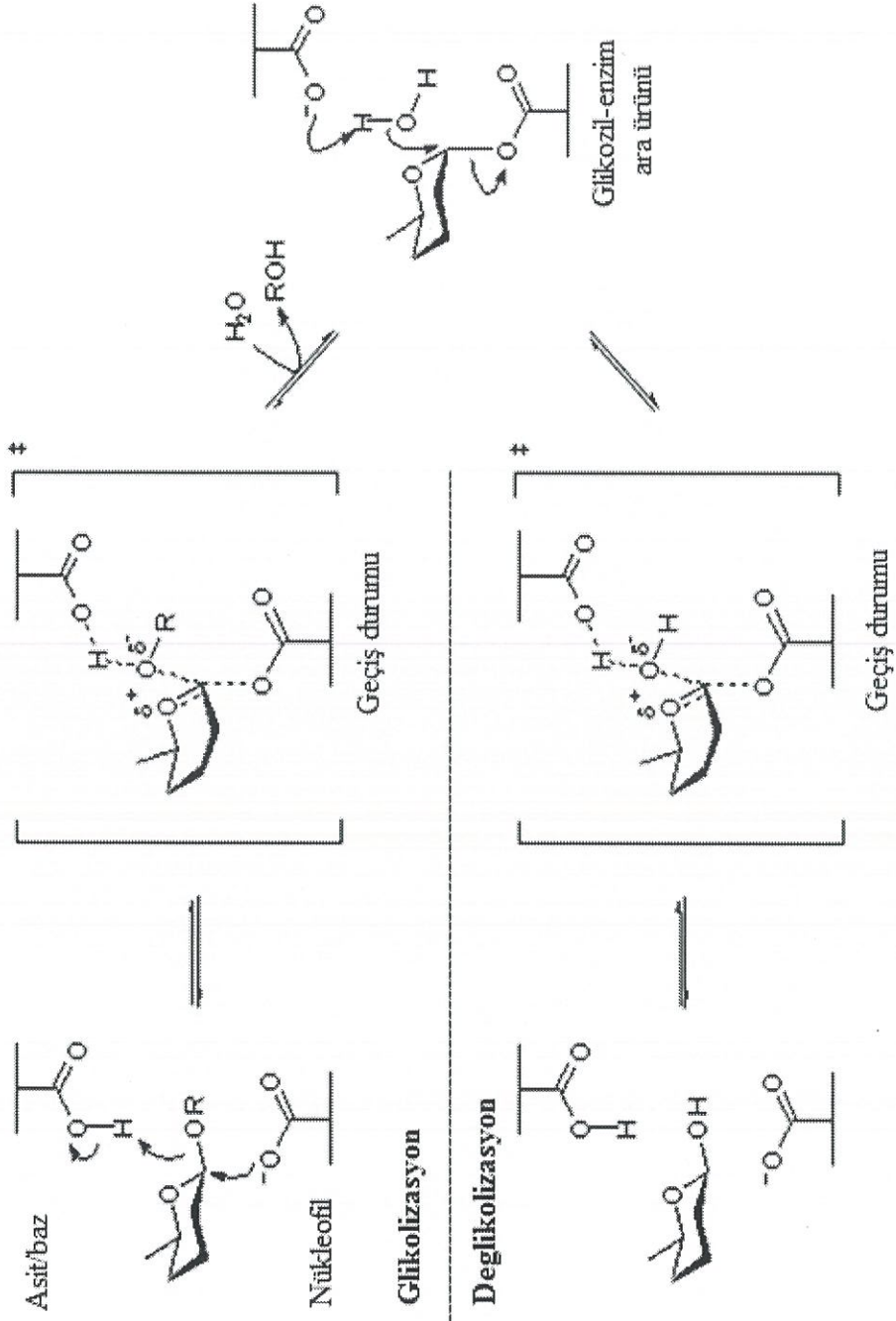
1.2.3 β -glukozidaz Enziminin Katalizleme Mekanizması

Çoğu organik tepkime, redoks tepkimelerinden yani elektron veren tanecik yükseltgenirken, elektron alan tanecik indirgenmesi sonucu oluşur. Bazı enzimlerin aktif merkezleri elektron alan ve elektron veren olarak katalitik süreçlere katılan aminoasit işlevsel grupları içerir. İçerdikleri bu gruplardan birisi E (Glu) glutamik asit kalıntısıdır [25]. β -glukozidazların aktif merkezlerinde de E406 ve E191 konumunda işlevsel iki glutamik asit kalıntısının mevcut olduğu belirtilmektedir [26].

Tüm Aile 1 β -glukozidazlar etki ettikleri maddenin glikozid bağımlı hidroliz ederken glikonun anomerik konfigürasyonunu korurlar. Diğer bir deyişle ürün olarak açığa çıkan β -D-glukoz ile substrattaki β -D-glukozid birbirinin aynıdır. Enzim tarafından substratın hidrolizi iki basamakta gerçekleşir; birinci basamak enzim glikolizasyonu (glikozlanması), ikinci basamak ise deglikozilasyondur (glikoz kopması).

Glikozilasyon basamağında YI/VTENG motifindeki nükleofilik glutamat rezidüsü substratın anomerik karbonuna (C-1) atak yapar. Aglikon bir glutamik asit kalıntısı ile kararlı tutulurken, aynı anda Şekil 1.4'de görüldüğü gibi T(F/L/M)NEP motifindeki asit katalizleyici glutamik asit rezidüsü de glikozidik oksijenin protonlanmasını sağlar ve kovalent bağ yapımına katılarak geçiş formunu oluştururlar. Bu sırada glikozil-enzim ara ürünü meydana gelir ve aglikon serbest kalır [27,28].

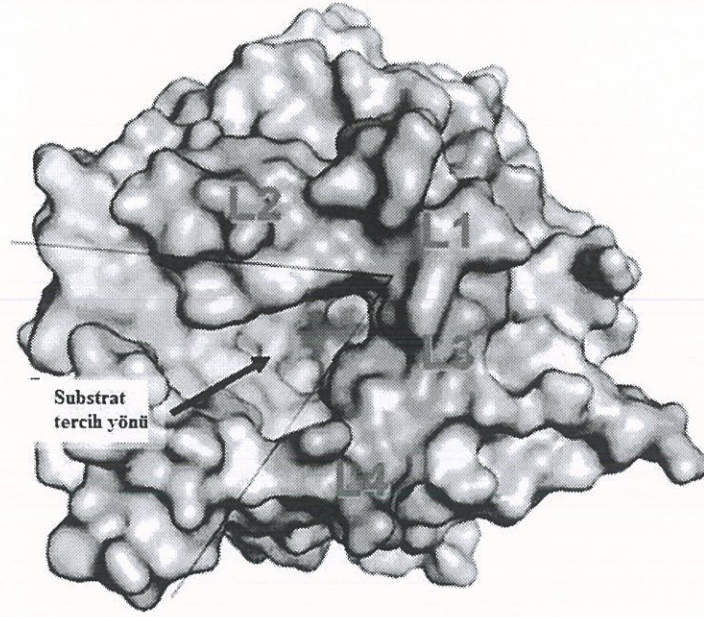
Deglikozilasyon basamağında, aktif merkezdeki anyon ve baz katalizleyici durumunda olan ikinci katalitik glutamat rezidüsü H_2O 'dan bir proton koparır ve bu sayede H_2O 'nun nükleofilik gücünü artırır. Devamında oluşan OH^- glikon ve enzim arasındaki kovalent bağa nükleofilik atak yapar ve glikonu uzaklaştırır. Sonuç olarak nükleofilik glutamat eski haline geri döner [29].



Şekil 1.4 : Enzimin katalizleme mekanizması [30].

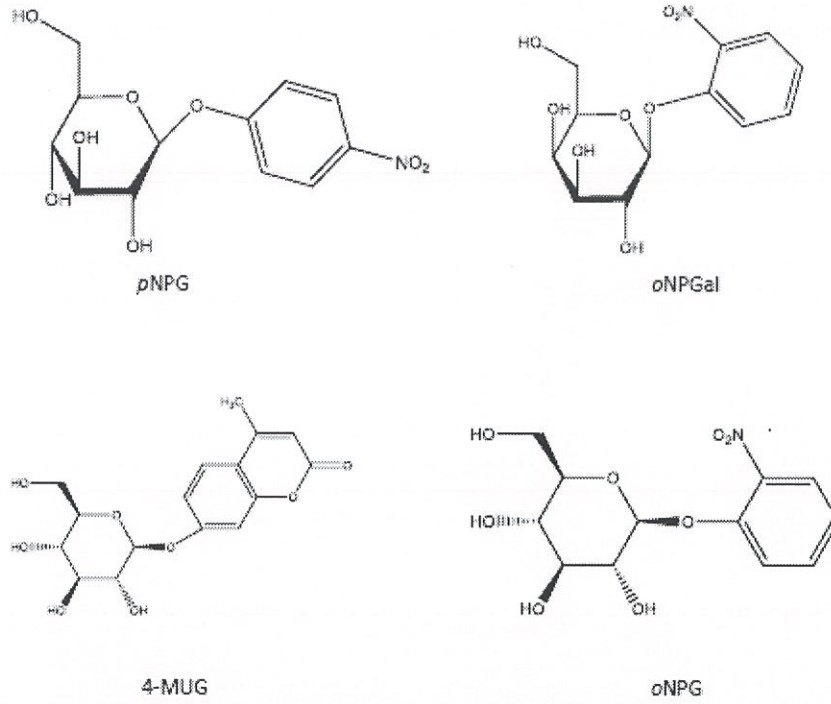
1.2.4 β -glukozidaz Enziminin Substratları

β -glukozidazların substrat çeşitliliğinin temel nedeni yapılarında bulunan sabit monosakkarite bağlı kimyasal grupların çeşitliliğidir. 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 prunasin, durrin ve DIMBOAGlc'da olduğu gibi bir aril grup olabilir [31,32,33].



Şekil 1.5: β -glukozidazların substrat ile etkileşimi [34].

β -glukozidaz enziminin çalışmalarımızda da kullandığımız doğal substratı olan oleuropein zeytin meyvesinde bulunan bir fenolik bileşiktir ve acılığın temel nedeni olan substrattır [35]. Doğal substratlara ilave olarak yapay substratları da mevcuttur. Mısır β -glukozidaz izoenzimi 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 görülmüştür. Literatür incelendiğinde β -glukozidaz enzimleriyle ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan substratın pNPG olduğu görülmektedir [36,37].



Şekil 1.6: β -glukozidazların bazı yapay substratları [30].

1.2.5 Beta-Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

β -glukozidaz enzimlerinin bitki, hayvan, mantar ve bakteri dokularında buldukları çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir. Literatürde inceleme yapıldığında β -glukozidaz enziminin pek çok canlıdan saflaştırıldığı görülmektedir. β -glukozidaz enzimi sıçan böbreği [38], papaya [39], koyun karaciğeri [40], üzüm [41], midye [42], pirinç [43], çavdar [44], kiraz [45], toprak [46], vanilya [47], aleo vera [48], mantar [49], erik [50], mısır [51], mandalina [52] gibi pek çok canlıdan saflaştırılmıştır.

Yapılan saflaştırma işlemlerinin çoğunda öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi yapıldığı ardından farklı kromatografi teknikleri kullanılarak çoklu saflaştırma basamakları izlenmiştir. Bir midye türü olan *Mytilus galloprovincialis*'tan yapılan saflaştırma işleminde önce homojenizat santrifüje edilmiş ve ardından elde edilen ham ekstreden %40-60 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülmesi yapılmıştır. Saflaştırma işleminin devamında numune diyaliz edilmiş ve hidroksiapatit kolona uygulanmıştır. Bu işlemler

sonrasında midye β -glukozidazı 13 kez saflaştırılarak elde edilmiştir [42]. Çavdardan yapılan bir çalışmada ise ilk işlem olarak izoelektrik çöktürme uygulanmış daha sonrasında anyon değişimi kromatografisi ve jel filtrasyonu yöntemleri kullanarak saflaştırılmıştır [44]. Kiraz meyvesinden yapılan saflaştırmada ise amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değiştirici ve moleküler eleme kromatografi yöntemleriyle β -glukozidaz saflaştırılmıştır [45].

1.3 Beta-Glukozidaz Enziminin Önemi

β -glukozidazlar tüm canlı organizmalarda birçok önemli görev ve işlevlere sahiptir. Bu nedenle özellikle biyoteknolojide, protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılıkta oldukça önem verilen bir enzim grubudur. Bitkilerde savunma, farmakolojik kullanım alanları, abiyotik stress dayanıklılığı, biyokütle yıkımı, meyve olgunlaşması ve tat bileşiklerinin oluşması gibi birçok biyolojik süreçlere katılırlar.

1.3.1 Bitkilerde Savunma

Bitkilerde zararlılara karşı savunma mekanizmalarından biri de ikincil bileşiklerdir. Bu bileşikler çoğunlukla glukozile edilerek etkisiz hale getirilerek depo edilirler. Herbivor veya patojenlerin saldırısı sonucu meydana gelen doku bozulması nedeniyle normalde ayrı bir bölmede tutulan β -glukozidazla temas geçerler. Hidroliz sonucu serbest kalan aglikon kısım zehirli bir bileşiktir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan siyanojenik glukozitlerden zehirli HCN oluşturulması buna örnektir [53,54].

Zeytin bitkisinin en önemli fenolik bileşiği olan oleuropein, aynı aileden kurtbağrı bitkisinde de mevcut bulunur ve bir savunma mekanizması olarak, yüksek özgülükteki β -glukozidazlar tarafından aktif bir protein denature edici bileşiğe dönüşümü başlatılır [55]. Bu durumu benzer şekilde zeytin ağacının hem yaprağında hemde meyvesinde bulunan oleuropein, β -glukozidazlar ile yıkıldığında oluşan hidrolitik bileşikler böcek istilasına karşı koruma ve direnç sağlar [56]. β -glukozidaz enziminin araştırılması alanında gerçekleştirilecek çalışmalar

sayesinde bitki zararlılarına karşı daha ekonomik ve daha ekolojik bir savunma mekanizması oluşturulması düşünülmektedir.

1.3.2 β -glukozidazların Farmakolojik Kullanım Alanları

Antikorla Yönlendirilmiş Enzim (Öncül İlaç Tedavisi), görece non-toksik bir öncül ilacın seçici olarak tümör hücrelerindeki bir enzim tarafından etkin toksik şekline dönüştürülmesi temeline dayanır. Bundan dolayı aktive edici enzim monoklonal bir antikorla tümör hücresine yönlendirilir [57]. β -glukozidazlar glukozile edilerek etkisizleştirilmiş öncül ilacın tümör hücresinde aktifleştirilmesi için kullanım potansiyeline sahiptir [58].

Sağlık açısından oldukça yararlı olan flavonoidler önemli bitki kimyasallarıdır. Örneğin, soya izoflavonları DNA'da oksidatif strese karşı direnç artırma [59], postmenopozal dönemde meme kanseri riskini azaltma [60], diyabetik kobaylarda serum insülin düzeyini yükseltme , kanserli yumurtalık hücre hattında apoptozisi uyarma [61] gibi çeşitli pozitif etkiler gösterir. Soyada izoflavonların çoğu glukozidik şekilde bulunur, ince bağırsakta β glukozidazın dâhil olduğu bir biyotransformasyon işlemiyle daha hızlı emilen ve biyoaktif serbest aglikon elde edilir [62].

1.3.3 β -glukozidazların Bitkiler Abiyotik Stres Etkisi

Bitkilerde aşırı sıcak, soğuk ve aşırı tuzluluk gibi abiyotik stress koşullarında bu strese cevap olarak absisik asit miktarını artırmanın bir yolu, absisik asit-glukoz konjugatının β -glukozidaz enzimleriyle hidrolizlenmesidir [63,64]. Bunun yanısıra havasızlık, susuzluk, yaşlanma gibi fotosentezi engelleyen stres durumlarında hücre duvarı polisakkaritlerinin katabolizmasını sağlayan β -glukozidazların aktivitesinde belirli bir artış olmaktadır. Bu durumun sonucu olarak bitkilerin enerji gereksinimlerini gidermede alternatif şeker kaynağı olarak bu polisakkaritleri kullanmalarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir [65,66].

1.3.4 β -glukozidazların Bitkilerde Meyve Olgunlaşması ve Tat Oluşumu Üzerine Etkisi

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkisi olan birkaç yüz β -glukozidik ürün belirlenmiştir. β -glukozidazların olgunlaşma aşamasında hücre duvarındaki etkinliklerinin artışı ve kompleks glikanları yıkabilmesi gibi faktörler β -glukozidazların meyve yumuşamasında rolünün olabileceğini göstermektedir [67]. Çay, üzüm, portakal, şeftali, çilek, elma, mango gibi pek çok bitkide, glikozitlenmiş halde bulunan maskelenmiş tat bileşikleri β -glukozidazlar tarafından hidrolizlenip serbest tat oluşturucu aglikon bileşiklerini oluşturulur [68]. Bu enzimlerin, katalitik özelliklerinin geliştirilerek içeceklerin tatlarının artırılması alanlarında kullanım potansiyelleri mevcuttur [69].

1.3.5 β -glukozidazların Biyokütle Değişimi Üzerine Etkisi

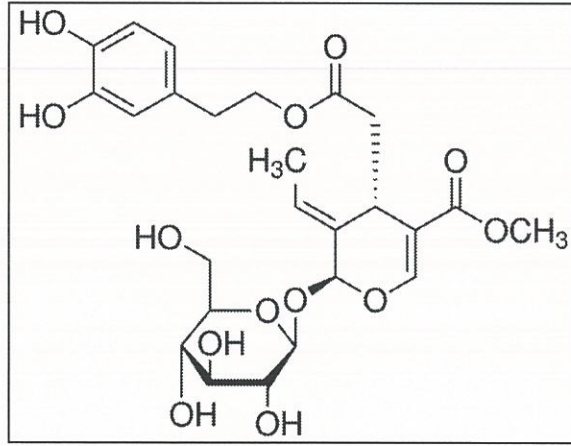
Polisakkaritler içerisinde özellikle selüloz biyosferde oldukça bol bulunan bir bileşik olup geri dönüşümü mümkün olan kimyasal maddelerin ve yakıtların önemli kaynaklarıdır. Tüm çöp toplama alanlarının yaklaşık %40'ı gazete ve diğer kağıt ürünlerinden oluşmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda ve inorganik asit kullanımı sonucu selülozun hidrolizi gerçekleşmiş olur ancak bu yöntem ekonomik bir yol değildir. Selulitik organizmalarca salgılanan bir selulaz enzim kompleksi selulozu glikoza hidroliz edebilir. Bu sistem endüstriyel çevreler açısından uygun bir uygulama modeli oluşturmaktadır. Bu model enzim kompleksi üç enzimden oluşmaktadır: bir endoglukonaz, bir ekzoglukonaz ve bir β -glukozidaz. Endoglukonazlar selülozun iç β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizle keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglukonazlar da oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. En son işlem olarak β -glukozidazlar sellobiyoz birimlerini glukoz birimlerine hidroliz ederler [70].

Günümüzde enzim katalizli proseslere olan ilgi oldukça fazladır ve günden güne de hızla artmaktadır. Hız, ekonomi, verim gibi önemli noktalarda oldukça olumlu sonuçlar verdiği için dolaylı kimyasal reaksiyona kıyasla daha fazla tercih edilmektedir.

1.4 Oleuropein

Oleuropein Zeytinde yaygın olarak bulunan bir fenolik bileşiktir. Konsantrasyonuna kuru madde bazında bakıldığında ham meyvede 140 mg/g, yaprakta ise 60-90 mg/g değerlerine ulaşabilir. Oleuropein, sekoiridoid ailesinden bir bileşik olarak tanımlanmıştır [35].

Ağaçları böcek istilasına karşı korur. Meyveye acı bir tat veren oleuropein, meyvenin olgunlaşma periyodunda enzimatik veya kimyasal olarak daha küçük ve tat veren fenolik bileşiklere hidrolizlenir. Bu sayede mevcut olan acılık ortadan kalkmış olur. Zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukozidaz enziminin oleuropeine karşı özgülüğü, çok yaygın kullanılan yapay substrat pNPG ile kıyaslandığında 200 kat olarak ölçülmüştür [68].



Şekil 1.7: Oleuropeinin kimyasal yapısı [71].

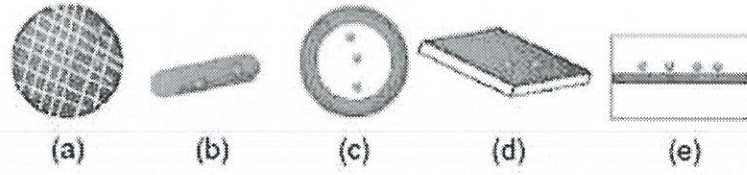
1.5 Enzim İmmobilizasyonu

İlk olarak 1971 yılında ABD'de düzenlenen Enzim Mühendisliği Konferansında tanımlanan immobilizasyon terimi biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan etmenlerin yeniden kullanılabilir hale getirilmesi veya sürekli sistemlerde daha kolay kullanılabilirliğinin sağlanmasını tanımlamaktadır. Diğer bir ifadeyle immobilizasyon; enzimlerin, katalitik aktivitelerinin sabit kalması

koşuluyla, tekrar ve sürekli kullanımına izin verecek şekilde, tanımlanmış belirli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi ve hapsedilmesidir [5].

Enzim immobilizasyonunun temel amacı; enzimin geçişini engelleyecek, ancak substrat, ürün ve kofaktörlerin geçmesine izin verecek bir yarı geçirgen destek materyaline enzimin hapsedilmesidir. İmmobilize enzimde en önemli gereksinimlerden biri de kullanılacak olan matriksin enzime uygun bir şekilde belirlenmesidir. Bu sayede matriksin enzimin yapısını bozması engellenmiş olur [72].

Enzim immobilizasyonunda kullanılan farklı tekniklerden dolayı birbirinden farklı bir çok destek materyali kullanılmaktadır. Bu materyaller; boncuklar, lifler, membranlar, filmler ve kapsüller şeklinde olabilmektedirler [73].



Şekil 1.8: İmmobilizasyonda kullanılan farklı destek materyali türleri.
a) boncuk (küre), b) lif, c) kapsül, d) film, e) membran [73].

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler şunlardır:

- ✓ Yüksek kararlılık
- ✓ Tekrar kullanılabilirlik
- ✓ Sürekli üretime olanak vermesi
- ✓ Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi
- ✓ Yüksek saflık
- ✓ Yüksek ürün yüzdesi
- ✓ Ekonomik olması

İmmobilize enzimlerin doğal formlara göre çok daha üstün özellikleri mevcuttur. İmmobilize olmuş bir enzimin normal enzime göre avantajları oldukça fazladır. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir.

- ✓ Biyolojik dayanıklılığını yükseltmek
- ✓ Yüksek hücre konsantrasyonunda çalışma imkânı sağlamak
- ✓ Kütle transferini geliştirmek
- ✓ Ürün verimini yükseltmek
- ✓ Ürün dayanımını geliştirmek
- ✓ Ürünün ortamdan ayrılmasını kolaylaştırmak ve hızlandırmak
- ✓ Reaksiyon seçiciliğini arttırmak

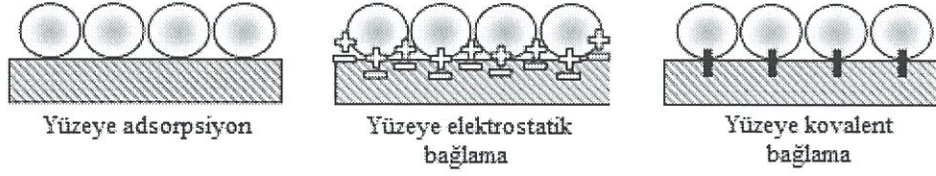
1.5.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında kullanılan matriks ve enzime uygun olacak şekilde değişik yöntemler kullanılabilir. Bu çalışmayı hazırlarken önemli olan aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemi seçmektir.

İmmobilizasyon sırasında veya immobilizasyon işlemi bittikten sonra enzimin aktif merkezinin zarar görmeyeceği şekilde bir yöntem seçilmelidir. Bu yüzden çalışılan enzimin yapısı ve özellikleri çok iyi bilinmelidir [74,75].

1.5.1.1 Taşıyıcı Bağlama Metodu

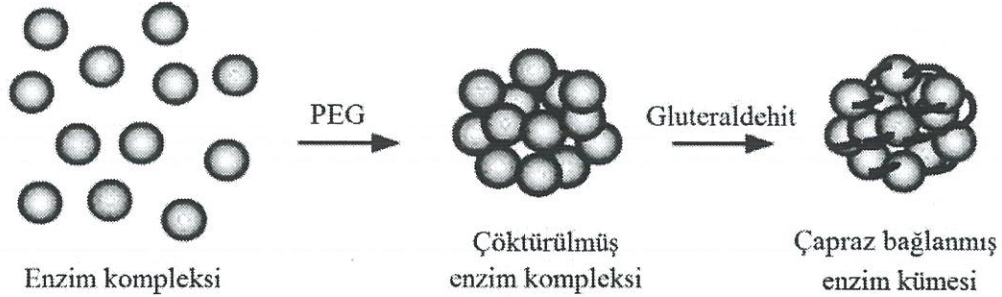
Bu metodta enzim molekülleri kovalent veya kovalent olmayan bağlarla kimyasal olarak bir matriks materyeline bağlanmaktadır. Taşıyıcı bağlama metodunda matriks olarak birçok farklı materyal (poliakrilamid, selüloz, manyetik parçacıklar, glioksil, agaroz vs.) kullanılabilir. Kovalent bağlanmada dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için temel göreve sahip olan amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bağlanma sırasında dış etkenlerden korunmalıdır. Taşıyıcı olarak kullanılacak olan materyellerin; yüksek yüzey alanı sağlaması, çalışılacak besiyeri bileşimine uygunluk, yüksek protein bağlama kapasitesi, yüksek mekanik ve kimyasal dayanıklılık ve kullanım sonrası geri kazanılabilir olması şeklinde özellikleri temin etmesi oldukça önemlidir [76,77].



Şekil 1.9: Taşıyıcı bağlanma metodları [78].

1.5.1.2 Çapraz Bağlama Metodu

Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlanma yöntemlerinin bir kombinasyonu sonucu meydana gelmektedir. Enzimlerin çapraz bağlanmasında tutuklanmış enzim glutaraldehit, hegzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, disüksinil süberat gibi bifonksiyonel reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır. Elde edilen kompleks suda çözünmez. Bu sistemde taşıyıcı materyal kullanılması ve immobilize hale getirilen enzimin konsantrasyonunun gerçeğe çok yakın olması çok ciddi avantajlar sağlamaktadır [79,80].



Şekil 1.10: Çapraz bağlanmış enzim kümesi oluşumunun şematik gösterimi, PEG: Polietilen glikol [78].

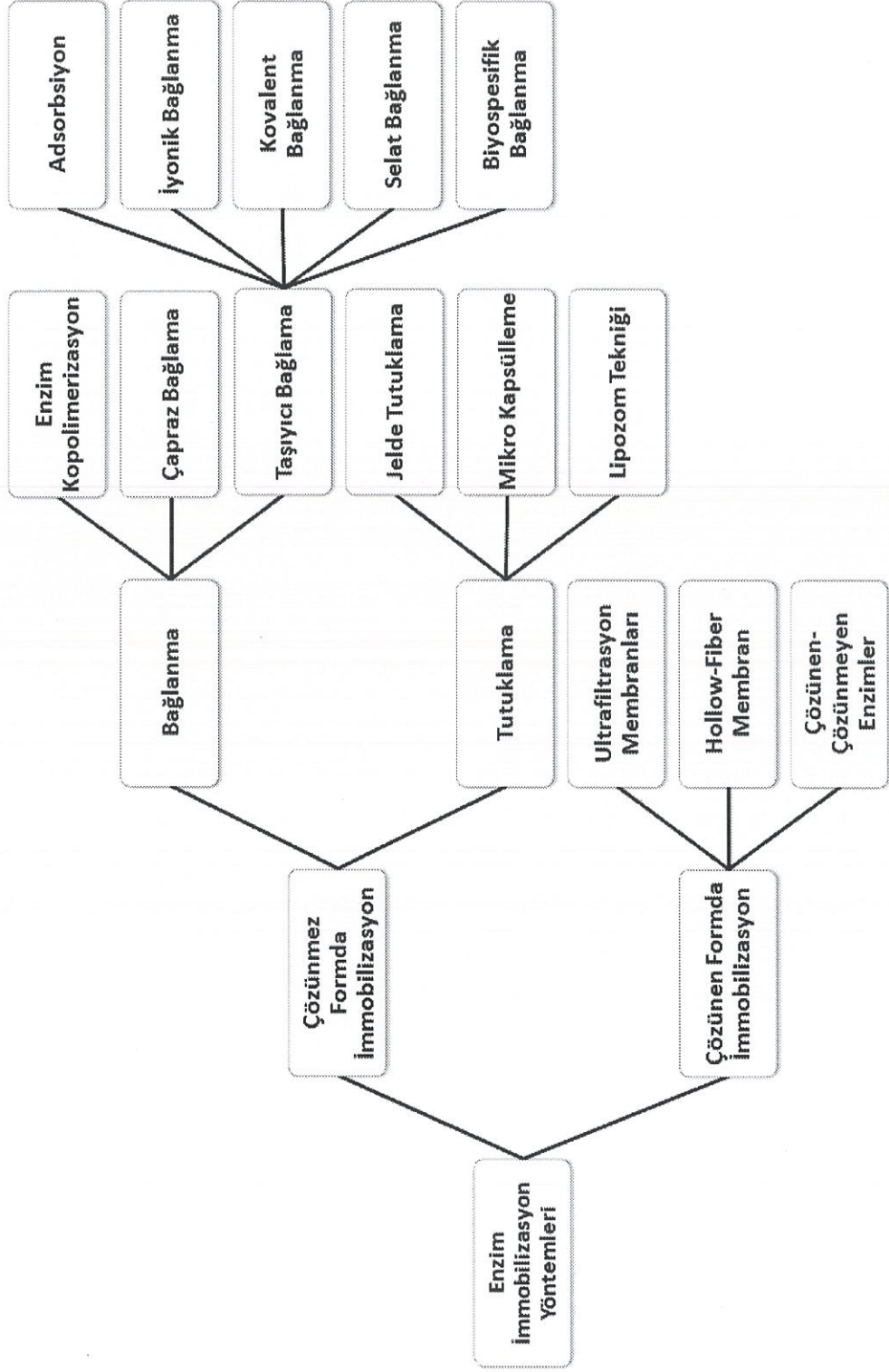
1.5.1.3 Tutuklama Metodu

Bu yöntemin temeli polimerik jellerle elde edilen immobilize destek materyalinde mevcut bulunan boşluklara biyokatalizörlerin yerleştirilmesidir. Elde edilen immobilize kompleksin yüzeyi substrat ve son ürün geçişine izin verecek açıklıklara sahiptir. Aynı zamanda madde alışverişine imkan sağlayarak biyokatalizörün çalışmasına izin vermektedir. Bu metodun en önemli avantajı tek bir biyokatalizör yerine farklı biyokatalizörlerin yada hücrelerin aynı yolla

immobilize edilebilmesidir. Poliakrilamid jel, aljinat ve K-karagenan gibi materyaller tutuklama metodu kullanımına örnek olarak gösterilebilir [77,80].



Şekil 1.11: Farklı tutuklanma metodları [78].



Şekil 1. 12 : Enzim immobilizasyon yöntemleri.

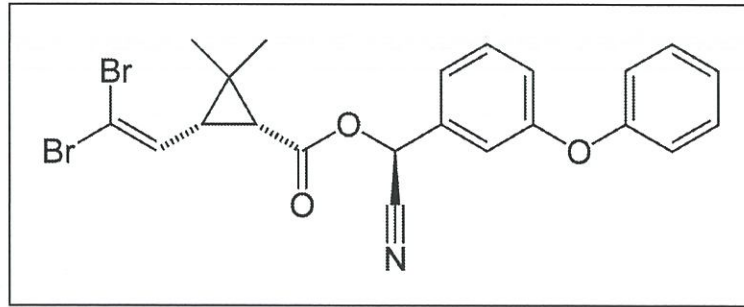
1.6 β -glukozidaz Enzimi Üzerine Etkisi Olan Pestisitler

Pestisit terimi; böcek öldürücü, yabancı ot öldürücü, küf öldürücü, kemirgen öldürücü vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır. İçerdikleri etken maddelere göre doğal, inorganik ve sentetik olarak sınıflandırılmaktadırlar. Pestisitler çok eski tarihlerden beri kullanılmaktadırlar. M.Ö. 1500'lere ait bulunan bilgilerde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşiğin patenti alınmıştır ancak bunlardan 600 kadarının ticari olarak kullanımı uygun olmuştur [81].

Pestisitlerin yoğun ve bilinçsiz kullanımının sonucunda gıdalarda, toprakta, suda ve havada birçok pestisit ya kendisi ya da dönüşüm ürünleri aşırı miktarda kalabilmektedir. Bu biriken maddelerin insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkiler saptanmıştır [81].

Çalışmamızda zeytin tarımında oldukça sık kullanılan üç farklı pestisit β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

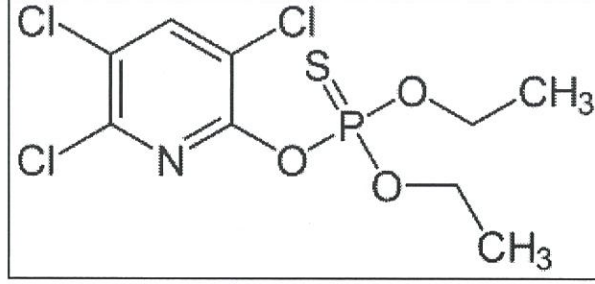
Deltamethrin zeytin sineğine karşı kullanılan ticari bir pestisit türüdür. Çok hızlı etki gösterir. Balıklara ve arılara karşı zehirlidir. Türk Gıda Kodeksinde kullanımına izin verilen kabul edilebilir en yüksek kalıntı değeri 0,5 mg/kg 'dır [82,83].



Şekil 1.13: Deltamethrin yapısı [82].

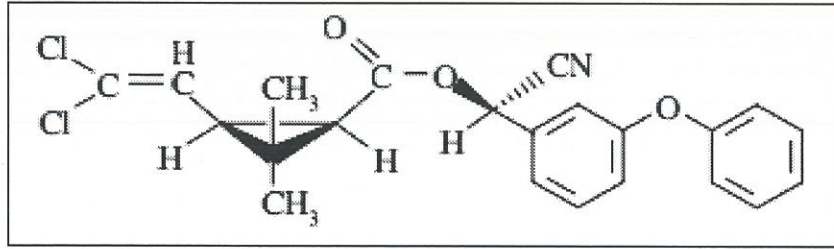
Chlorpyrifos pestisiti hafif mercaptan kokulu ve renksizdir. Arılarda ve balıkta zehirlidir. Kontak mide ve solunum sisteminde etkilidir. Türk Gıda

Kodeksinde kullanımına izin verilen kabul edilebilir en yüksek kalıntı değeri 0,5 mg/kg'dır [83,84].



Şekil 1.14: Chlorpyrifos'un yapısı [84].

Alpha-cypermethrin sentetik piretroid pestisidler grubunda bulunan bir pestisit ve 1983 yılından beri zararlılara karşı kullanılmaktadır. Türk Gıda Kodeksinde kullanımına izin verilen kabul edilebilir en yüksek kalıntı değeri 0,5 mg/kg'dır [85].



Şekil 1.15: Alpha-cypermethrin yapısı [85].

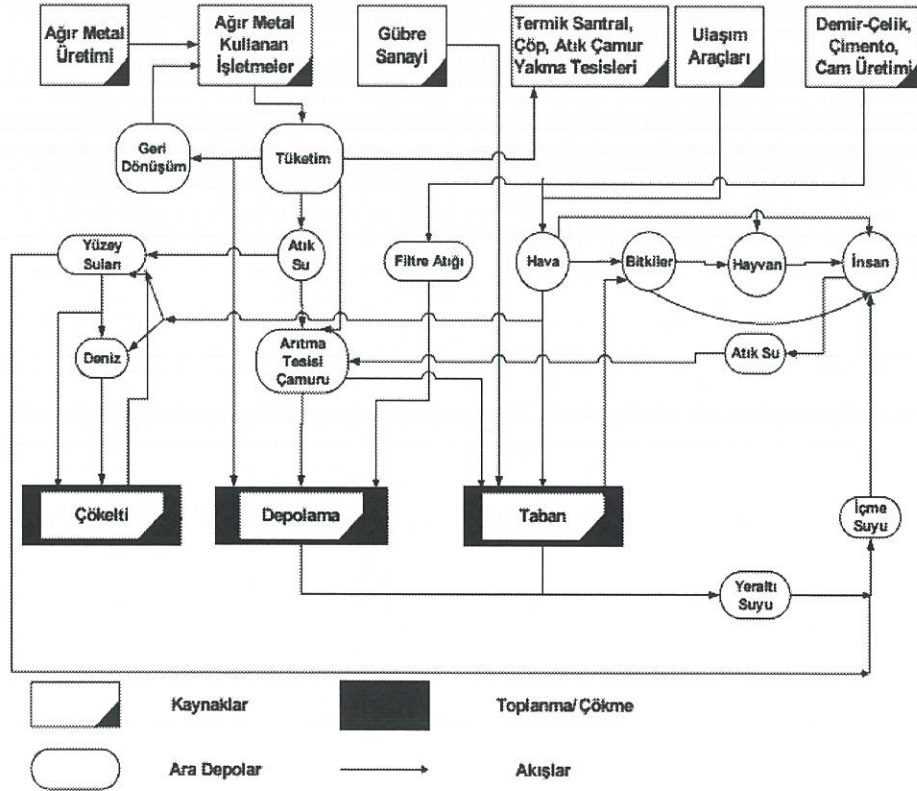
1.7 β -glukozidaz Enzimi Üzerine Etkisi Olan Ağır Metaller

Ağır metaller zehirli ve çevre kirliliğine neden olan tüm metallerdir. Ağır metaller fiziksel özellik bakımından yoğunluğu 5 g/cm³ ' ten daha yüksek olan metallerdir. Bu grupta bakır, civa, çinko, demir, kurşun, kadmiyum, krom, kobalt, magnezyum, mangan, nikel olmak üzere 60' tan fazla metal mevcuttur [86].

Ağır metaller biyolojik süreçlere katılma oranlarına göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan gruplara göre sınıflandırılırlar. Organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gerekli olan ağır metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin; bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin bir çok oksidasyon ve redüksiyon süreçlerinde görev alır [87,88].

Yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonlar da dahi sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu duruma örnek olarak kükürtlü enzimlere bağlanan cıva örnek verilebilir [88].

Yapmış olduğumuz çalışmada zeytin β -glukozidaz enzimi aktivitesi üzerine çinko, nikel, kobalt, krom, mangan ve magnezyum ağır metallerinin etkileri araştırılmıştır.



Şekil 1.16: Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayılımları [87,88].

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalar sırasında kullanılan *p*NPG, *oleuropein*, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, Standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletildiamin (TEMED), Trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), Amonyum sülfat ve Karbodiimide (Cyanamide) Sigma Chemical'den; Amonyum persülfat, Sodyum hidroksit, Dimetil Sülfoksit, Fosforik asit, Asetik asit, Etil alkol, Hidroklorik asit, Glisin, Sodyum dihidrojen fosfat, β -Merkaptoetanol, Sodyum dodesil sülfat, Akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, Bromofenol mavisi, Gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, Sodyum bikarbonat, Sodyum fosfat, Potasyum fosfat, Magnezyum klorür, Merk'den temin edildi.

Süperparamanyetik Fe₃O₄ nanopartiküller Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR ve Arş. Gör. Dr. Öznur KARAAĞAÇ tarafından sentezlenmiştir. Yapılan immobilizasyon çalışmalarının tamamında bu nanopartiküller kullanılmıştır.

Enzim kaynağı olarak kullanılan zeytin meyvesi Balıkesir-Edremit bölgesinde yetişen yeşil zeytinler elde edilmiştir.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Tablo2.1: Kullanılan Alet ve Cihazlar.

Cihaz Adı	Firma
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
Multi Santrifüj	Thermo IEC
pH metre	Hanna HI 2210
UV-Spektrofotometre	Thermo Type 1510
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Peristaltik Pompa	Atta SJ-1211H
Gradient Mikser	Atta C-10 Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Doğrayıcı	Miccra
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Elektroforez Sistemi	Mini Protean Tetra Cell Bio-Rad
Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Sonikatör	Selecte
Evaporatör	Buchi Rotavapor R-200
Thermo-Block	Biosan TS-100
İnkübatör	GFL, Almanya
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.3.1 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

- ❖ **Zeytin Ekstraksiyon Tamponu:** 100 mM borat tamponu pH 9,5 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.25 % (w/v) dithiothreitol (DTT). Tampon çözeltiyi hazırlamak için 6.18 g borik asit tartılarak 850 mL distile suda çözüldü ve 1M NaOH ile pH 9' a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan borik asit tamponundan 90 mL alınarak içinde 0.25g DTT, 0.1461g EDTA çözüldü ve 100mM'lık PMSF stok çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Son hacim borat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.
- ❖ **Enzim aktivitesinin ölçüldüğü ve substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon:** 50 mM pH 5.5 olan sodyum asetat tamponu; 6.804g Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü ve glacial asetik asit ile pH 5.5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.
- ❖ **Substrat çözeltisi:** 5 mM p-NPG çözeltisi; 0,0075 g pNPG 5 mL, 50 mM pH 5.5 sodyum asetat tamponu içinde vortekste karıştırılarak çözüldü.
- ❖ **Reaksiyon durdurma tamponu:** 0.5 M Na_2CO_3 ; 26.498g Na_2CO_3 son hacim 500 mL olacak şekilde distile suda çözümlenerek hazırlandı.
- ❖ **PMSF Stok Çözeltisi:** 10 mL isopropanol içerisinde 174.19 g fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) vorteks yardımıyla çözüldü.
- ❖ **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan pelletin alındığı tampon çözeltisi:** 1M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8). Bunun için 8,899g (0.05 mol) Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 950 mL distile suda çözümlenerek, 1N HCl ile pH'ı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- ❖ **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8). Bunun için 8,899 g (0.05 mol) Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

- ❖ **Hidrofobik jele bağlanmış β -glukozidaz enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** 1M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8) ve 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu. Bunun için 8,899 g (0.05 mol) Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 8,899 g (0.05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- ❖ **Kantitatif protein tayinlerinde kullanılan çözeltiler:** Lowry ve Bradford yöntemleri için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.
 - ✓ **Çözelti A:** 0,1 M NaOH içeren %2'lik (w/v) Na_2CO_3 çözeltisi; 1 g (0,025 mol) NaOH ve 5 g Na_2CO_3 200 mL distile suda çözündü ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
 - ✓ **Çözelti B:** %1'lik (w/v) NaK tartarat; 1 g NaK 90 mL distile suda çözündü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
 - ✓ **Çözelti C:** %0.5'lik (w/v) CuSO_4 ; 0,5 g CuSO_4 90 mL distile suda çözündü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
 - ✓ **Çözelti D:** 48 mL Çözelti A, 1 mL Çözelti B ve 1 mL Çözelti C alınarak hazırlandı.
 - ✓ **Çözelti E:** Folin fenol ve distile su (1:1 v/v); 2,5 mL folin fenol 2,5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

- ✓ **Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, ışık almaması için 100 mL'lik alüminyum kaplı bir behere alındı. Üstüne 50 mL etanol ilave edilerek 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. İşlem sonlandığında çözelti daha büyük bir behere alınarak üstüne 100 mL %85'lik fosforik asit eklendi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Çözelti ardarda iki kez karanlık ortamda filtre kağıdından geçirilerek filtre edildi ve alüminyum kaplı bir şişeye aktarılarak stoklandı.
- ✓ **Sığır Serum Albumini (BSA):** 5 mg BSA 5 mL distile suda çözünerek taze olarak hazırlandı.

2.1.3.2 SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- ✓ **SDS'li alt ayırma tamponu:** % 0,4'lük (w/v) SDS içeren, 1,5 M Tris-Base tamponu (pH 8,8); 19,8 g (0,15 mol) Tris ve 0,4 g SDS 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- ✓ **SDS'li üst yığma tamponu:** % 0,4'lük (w/v) SDS içeren, 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8); 6,6 g (0,05 mol) Tris ve 0,4 g SDS 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- ✓ **SDS-PAGE'de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 2.2'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 2.2: SDS yönteminde kullanılan çözelti miktarları.

SDS-PAGE	%10 Ayırma Jeli	%3 Yığıma Jeli
Ayırma Tamponu	2,5 mL	-
Yığıma Tamponu	-	1,25 mL
Akrilamid-Bisakrilamid(37,5:1)	2,5 mL	0,625 mL
ddH ₂ O	5 mL	3,07 mL
%10 APS	100 µL	50 µL
Temed	10 µL	5 µL
SDS'li Tank (Yürütme) Tamponu	3 g Tris-HCl, 14,4 g Glisin ve 1 g SDS eklenir ve pH'ı 8,3'e getirildikten sonra son hacim 1 L'ye tamamlanır.	
Yükleme Tamponu (SDS ve β-merkaptolanol içerir.)	2,5 mL 0,5 M Tris-HCl, (pH'ı 6,8) tamponu, 4 mL %10'luk SDS, 2 mL Gliserol, 1 mL β-merkaptolanol, 0,01 g Bromfenol mavisi ve 0,5 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.	

2.1.3.3 Enzimin İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- ❖ **İmmobilizasyona hazırlık ve immobilizasyonda kullanılan tampon:** 0,1 M NaCl içeren, 0,003 M NaH₂PO₄ tamponu (pH 6,0); 2,92 g (0,05 mol) NaCl ve 0,179 g (0,0015 mol) NaH₂PO₄ 450 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 6,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- ❖ **İmmobilizasyondan sonra yıkamada ve depolamada kullanılan tampon:** 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,5); 6,804 g (0,05 mol) Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü. Glacial asetik asit ile pH'ı 5,5'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ❖ Nanopartikülleri aktifleştirmek için kullanılan karbodiimide çözeltisi: 0,025 g karbodiimide 1 mL 0,1 M NaCl içeren, 0,003 M NaH₂PO₄ tamponu (pH 6,0) içinde çözüldü.

2.2 Metot

2.2.1 Aseton Tozunun Hazırlanması

Enzim ekstraktının hazırlanmasından önce birincil basamak olarak aseton tozu hazırlandı. Aseton tozu hazırlamak için toplanan zeytin meyveleri iyice yıkandıktan sonra meyvelerin çekirdekleri çıkarıldı. 100 g çekirdeği çıkarılmış zeytin meyvesi bir kaba konuldu. Daha önceden -20° C'de bekletilen soğutulmuş asetonun 750 ml ilave edilerek 2 dk boyunca homojenizatörde parçalandı. Elde edilen kıyılmış küçük parçalar Whatman No 1 filtre kağıdı yardımıyla filtre edildi. Filtre üzerindeki kalıntı -20 °C'de soğutulmuş aseton ile 5-6 kez yıkandı. Filtre üzerindeki son kalıntı kurutma kağıtlarına konarak oda sıcaklığında, çeker ocakta 6-8 saat bekletildi. Bu şekilde asetonun ortamdan uzaklaşması ve preparatın iyice

kuruması sağlandı. Bu işlemler sonucunda aseton tozu hazırlanmış oldu. Aseton tozu kullanılana kadar -20 °C'de saklandı. Deneyleerde kullanılacak olan enzim ekstraktı bu aseton tozundan elde edildi.

2.2.2 Enzim Ham Ekstraktının Hazırlanması

Ham ekstrakt hazırlamak için bir behere 2 g aseton tozu koyulup üzerine, önceden yaklaşık +4°C'ye kadar soğutulmuş olan 100 mL zeytin ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Beher içeriği buz içinde, 2 dk homojenizatörde homojenize edildi. Elde edilen homojenat 15300 rpm, 30dk, +4 °C'de teflon tüplerde santrifüj edildi ve süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.2.3 Enzim Aktivite Tayini

Zeytin β -Glukozidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü sağlamak için 70 μ L, 5 mM pNPG substrat çözeltisi ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi ilave edilerek 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 70 μ L 50 mM pH 5.5 Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi ilave edildi. Etüvde 37°C'de, 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyon 70 μ L 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu.

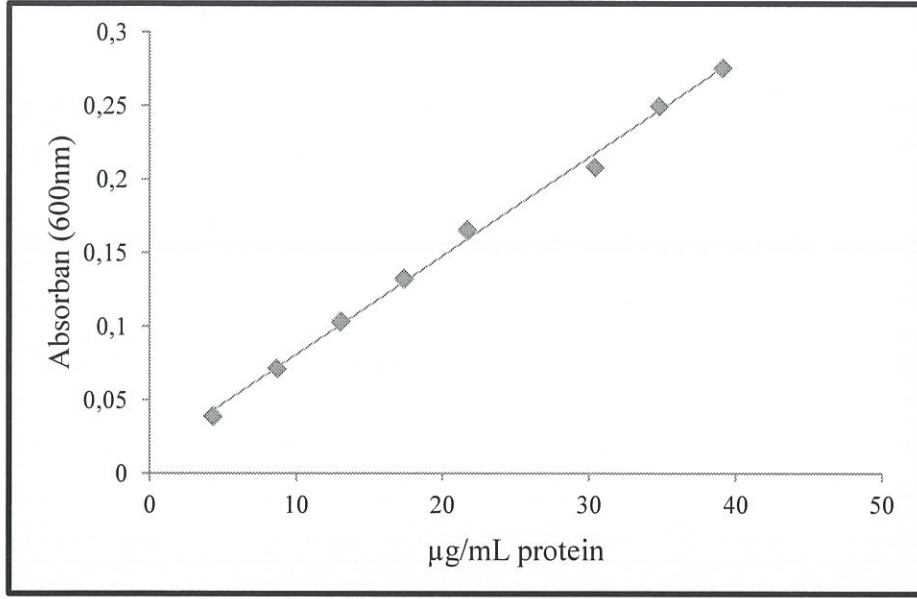
β -glukozidaz enzim aktivitesi, enzim ünite hesaplamasında okunan absorbansa karşılık gelen pNitrofenol ürün konsantrasyonunun μ M cinsinden değeridir. Ürün miktarının belirlenmesinde önceden hazırlanan standart grafik kullanılmıştır. Standart grafik hazırlanırken son hacim 210 μ L ve 280 μ L olacak şekilde iki ayrı pNitrofenol konsantrasyonu hazırlandı. Kör olarak kullanılan miktarda saf su kullanıldı. Hazırlanan numunelerin 405 nm'de absorbansları okundu. Elde edilen değerler ile pNitrofenol standart eğrisi oluşturuldu. Bir Enzim Ünitesi (EU) dakikada oluşan pNitrofenolün μ mol'ü olarak belirlendi.

2.2.4 Protein Tayini

2.2.4.1 Lowry Yöntemiyle Protein Tayini

Saflaştırma basamaklarındaki protein miktar ölçümleri Lowry Metoduna göre belirlendi. Bu yöntem Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptit bağları ile Cu^{+2} arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli kompleks meydana getirir ve 600 nm dalga boyunda absorbans verir.[1] Ayrıca Lowry yöntemi, tirozin ve triptofan içeriği fazla olan proteinlerle daha fazla hassasiyet gösterdiği için bu amino asitler açısından zengin olan proteinlerde oldukça iyi sonuçlar vermektedir.

Protein tayini yapmak amacıyla bu basamaklar izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ L alındı ve her tüpün son hacmi 100 μ L olacak şekilde üzerlerine saf su ilave edildi. Ardından her tüpe 2 ml Çözelti D eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dk sonunda tüplere 0,2 mL Çözelti E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er μ L koyularak 600 nm'de absorbansları köre karşı okundu. Kör olarak BSA içermeyen 1. Tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 2.1).



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

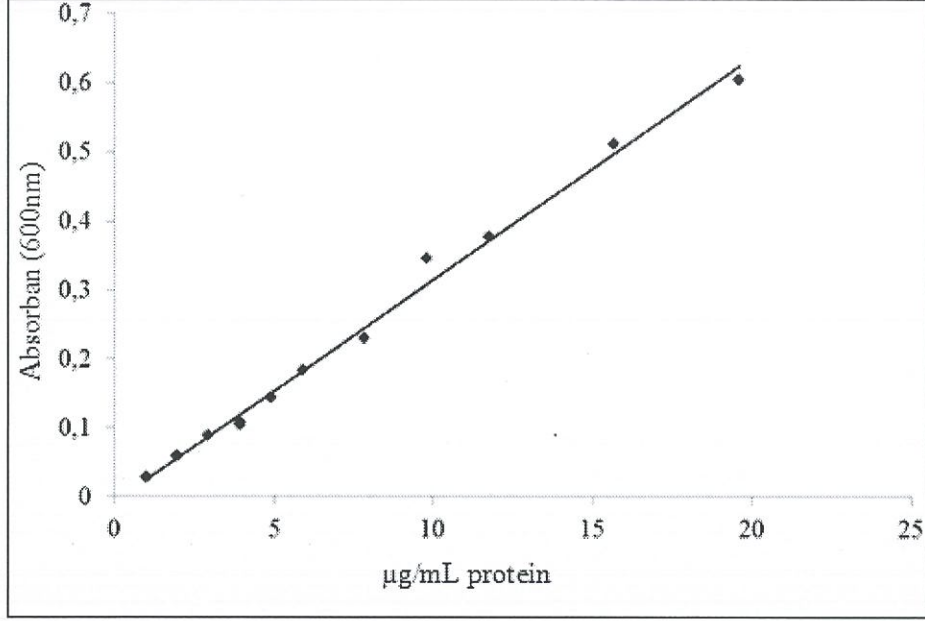
Saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 100'er µL tüplere alındı ve Lowry yöntemiyle standart grafik oluşturmak için uygulanan basamaklar aynı şekilde uygulandı. Daha sonra numunelerin içindeki protein miktarı, standart grafikten elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak hesaplandı.

2.2.4.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Enzim immobilizasyon basamaklarında elde edilen yıkama çözeltilerindeki protein miktarlarını belirlemek için bu yöntem kullanıldı. Kullanılan yöntemin temel esası fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesidir [2].

Protein tayini yapmak amacıyla şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı ve her tüpün son hacmi 100 µL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. Her bir tüpe 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi eklendi. Tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübe edildi. 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorban değerleri okundu. Kör olarak BSA

İçermeyen 1. Tüp kullanıldı. Okunan absorban değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 2.2).



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

Protein miktarı belirlenecek numunelerden 100'er μL tüplere alınarak Bradford yöntemiyle standart grafik oluşturmak için uygulanan basamaklar aynı şekilde uygulandı. Numunelerin içindeki protein miktarları standart grafikten elde edilen doğru denklemini kullanılarak hesaplandı.

2.2.5 Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi çözeltinin tuz konsantrasyonunu artırarak proteinin çözünürlüğünü değiştirmesi ve bunun sonucunda proteinin denature olmadan çökmesine dayanan bir yöntemdir. Öncelikle, %50 doygunlukta gerekli olan amonyum sülfat miktarı aşağıda verilen formülle tespit edildi:

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

V : Serum hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi için gerekli miktar belirlendikten sonra çöktürme işlemine geçildi. 0°C'de 30-40 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılarak ilave edilen amonyum sülfatın çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet 5mL, 50mM pH 6.8 sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

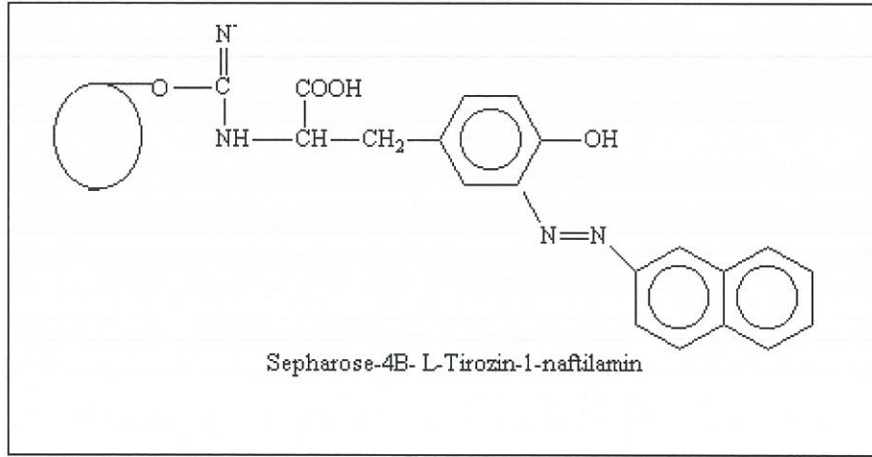
Tablo 2.3: Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının enzim aktivitesi bulunurken kullanılan reaksiyon hacimleri.

KÖR	AKTİVİTESİ BAKILAN NUMUNE
70 µl Aktivite tamponu	70 µl Aktivite tamponunda çözünmüş substrat
70 µl 0-50 aralığındaki numune	70 µl 0-50 aralığındaki numune

Enzim çözeltisi renkli olduğu için enzim aktivitesi belirlenmesi aşamasında kör olarak enzim çözeltisi de ortama eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübe sonunda reaksiyonlar 70 µL 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu ve 405 nm'de absorbans değerleri okundu. Numunenin kantitatif protein miktarı Bölüm 2.2.4.1'de verilen Lowry metoduna göre hesaplandı.

2.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzim Saflaştırılması

Zeytin β-glukozidaz enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından diğer bir saflaştırma basamağı olan hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Bunun için laboratuvarında sentezlenen ve Şekil 2.3'de verilen hidrofobik jel sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır[3].



Şekil 2.3: Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel.

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu öncelikle 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ile dengelenerek saflaştırma işlemine hazır hale getirildi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine gelene kadar indirildi ve yüklemeye hazır hale getirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çökeleği en küçük hacimde 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu çözüldü. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ve 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponları ile yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz

konsantrasyonuna doğru düzenli bir şekilde oluşan tuz gradienti uygulandı. Tuz gradienti ile kolondan elüe edilen elüatlar dikkatli bir şekilde 2 mL halinde tüplere alındı. Elüsyon tamponu uygulamasına 280 nm'deki absorpsiyon sıfır oluncaya kadar devam edildi. 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de protein tayini yapıldı. Devamında 405 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarları belirlenerek gerekli grafikler çizildi.

2.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Beta-glukozidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra proteinleri molekül ağırlıklarına (büyüklüklerine) göre ayırtmada kullanılan sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) kullanıldı. İki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemli [4] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen yüksek aktiviteli elüatlar birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında SDS ve β-merkaptöetanol içeren numune yükleme tamponuyla karıştırıldı. Molekül ağırlık standartları; (β-galaktozidaz (116,0kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), yumurta albumini (45,0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), REase Bsp98I (*E.coli*) (25,0 kDa), β-laktoglobulin (18,4 kDa) ve Lizozim (14,4 kDa) içeren standart protein çözeltisinden (marker) 5 µL alındı. Marker ve numuneler 95 °C'de 5 dakika bekletildi. Isıl işlem uygulamasından sonra numuneler ve marker soğutularak kuyucuklara tatbik edildi. Güç kaynağına bağlı elektrofrez 80 volt'a ayarlandı. Yükleme tamponu içindeki boya ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt'a yükseltildi. Jeldeki proteinler, jelin altına 1 cm kalana kadar yürütülmeye devam edildi. Bantlar istenilen seviyeye ulaştığında akım kesilerek yürütme durduruldu. Elektrofrez tankından çıkarılan jel dahil oldukları sistemden dikkatlice çıkarıldı. Yığıma jeli kısmı dikkatlice kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeline renklendirme çözeltisi tatbik edildi ve 30 dakika çalkalayıcı içerisinde bırakılarak homojen bir boyama sağlandı. Daha sonra jel

renklendirme çözeltilisinden çıkartılarak renk açma çözeltisi içerisine konuldu. Belirli aralıklarla renk açma çözeltisi yenilendi. Bu sayede daha belirgin bir görüntü elde edilmeye çalışıldı. İstenilen belirginliğe ulaşan jel renk açma çözeltilisinden çıkarıldı. Jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntüsü elde edildi.

2.2.6 β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.6.1 Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Optimum pH belirlemek amacıyla hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan zeytin β -glukozidaz enziminin aktivite gösterebileceği farklı pH (2-10) değerlerine sahip 50 mM Na-Ac tamponu hazırlandı. Hazırlanan Na-Ac tamponlarının her birinde son konsantrasyonu 5 mM olarak şekilde *p*NPG substratı çözüldü. Farklı pH değerlerindeki enzim aktivitesi belirlenirken; 70 μ L, farklı pH'a sahip 5 mM *p*NPG substrat çözeltisi üzerine 70 μ L enzim çözeltisi eklenerek 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 70 μ L 50 mM (pH 5,5) Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37 °C'de, 30 dakika inkübe edildi ve 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70 μ L 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. Enzim Ünitesi (EU) okunan absorbans değerlerinden *p*NPG standart grafik kullanılarak hesaplandı.

2.2.6.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığını saptamak amacıyla, 25-65 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık 5 °C artırılarak aktivite tayini yapıldı. Enzimin farklı sıcaklıklarda aktivitesini belirlemek için Bölüm 2.2.3'te aktivite tayininde belirtilen yöntem kullanıldı. Farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonlar durdurulmalarının ardından 405 nm'de absorbansları alındı ve *p*NPG standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesabı yapıldı.

2.2.6.3 Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimin termal kararlılığının belirlemek amacıyla enzimin optimum sıcaklığına göre değerlendirildiğinde denatüre olacağı 70 °C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon süreleri 3 dakika aralıklı olarak 30 dakika boyunca periyodik olarak alındı. Isı ile muamele edilmemiş stok enzim çözeltisinden alınan ve aktivitesine bakılan örnek başlangıç enzim aktivitesi olarak kabul edildi. Belirlenen sürelerde inkübasyondan alınan enzim çözeltilerinin pNPG substratı kullanılarak aktivitelerine bakıldı. İşlemler sonunda 405 nm’de absorbanları okundu. Elde edilen değerler pNPG standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

2.2.6.4 Enzimin Farklı Substratlara Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi

Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı gösterdiği aktivitesini belirlemek amacıyla çeşitli substratlar kullanıldı. Bu amaçla konsantrasyonları 5 mM olan para-Nitrofenol β -D-glukopiranozid ve 5 mM oleuropein substratları kullanıldı. Bu substratların aktivite tayinleri Bölüm 2.2.3’te belirtildiği şekilde yapıldı.

2.2.6.5 Saflaştırılan Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG ve oleuropein substratlarına olan ilgisi K_m ve V_{max} değerleri bulunarak tespit edildi. Bu çalışma için pNPG ve oleuropein substratlarının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerleri grafiğin denkleminde elde edilen verilerden yararlanılarak hesaplandı. Bunun için grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri ve denklemin eğimi olan K_M/V_{max} değerinden V_{max} yerine yazılarak K_M değeri hesaplandı.

2.2.6.6 İnhibitörlerin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan glukoz, sodyum hidroksit, sitrik asit, laktik asit ve sodyum klorür maddelerinin IC₅₀ değerlerini bulmak için, *p*NPG substratının reaksiyon hacminde 1,66 mM konsantrasyonu çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi hesaplanarak bulunan değer %100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. Bu grafiklerden yararlanarak aktivite grafikleri çizildi ve enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı.

2.2.6.7 Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Belirlenmesi

Zeytin β -glukozidaz aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin etkisini belirlemek amacıyla Zn, Cr, Mn, Mg, Co ve Ni iyonlarını içeren 5 mM stok çözeltiler hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. Metal iyonu içeren enzim çözeltilerinin aktiviteleri, içermeyen çözelti aktivitesi ile kıyaslanarak, % kalan aktivite olarak hesaplandı.

2.2.6.8 Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisitlerin Etkisinin Belirlenmesi

Zeytin β -glukozidaz aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisini belirlemek amacıyla farklı stok konsantrasyonlarında Deltamethrin, Chlorpyrifos ve Alphacypermethrin çözeltileri hazırlandı. IC₅₀ değerlerini bulmak için, *p*NPG substratının reaksiyon hacminde 1,25 mM konsantrasyonu çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi hesaplanarak bulunan değer %100 aktivite olarak alındı. Farklı pestisit konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. Bu grafiklerden yararlanarak aktivite grafikleri

çizildi ve enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri hesaplandı.

2.2.7 Glukozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

2.2.7.1 Enzimin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu

Saflaştırdığımız enzimin immobilizasyonunu gerçekleştirmek için önceden tedarik ettiğimiz süperparamanyetik Fe_3O_4 nanopartiküller kullanıldı. Manyetik olarak seçilen immobilizasyon materyalinin amacı; immobilizasyon işleminden sonra enzim-nanoparçacık kompleksinin ortamdaki rahatça uzaklaştırılabilmesidir. β -glukozidaz enziminin immobilizasyonu gerekli olan tüm işlem basamakları şu şekildedir:

Öncelikle biri numune diğeri kör olarak kullanılmak üzereki adet 0,1 g Fe_3O_4 nanopartikülü tartılarak cam tüplere alındı. Üzerlerine 2 mL 0,1 M NaCl, 0,003 M NaH_2PO_4 tamponu (pH 6,0) eklendi. Karışım 30 dakika +4 °C' de sonikatörde bekletildi. Daha sonra herbirine 0,5 mL karbodiimide çözeltisi eklendi. Karışım 15 dk. daha sonikatörde bekletildi. Bu işlemler sonlandığında nanopartiküller karbodiimide ile aktifleştirilmiş oldu ve β -glukozidaz enzimine bağlamaya hazır hale getirildi[5-6].

Protein miktarı önceden hesaplanmış stok enzim çözeltisinden, numune olarak kullanılacak tüpe 2 mL enzim ilave edildi. Kör olarak kullanacağımız tüpe ise 2 mL 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponundan eklendi. Her iki tüpte bulunan karışımlar 30 dakika boyunca sonikatörde bekletildi. Daha sonra cam tüplerin dış yüzeyine mıknatıs konularak nanopartiküllerin tüp içerisinde bir kenar bölgeye toplanması sağlandı. Daha sonra protein tayini yapmak amacıyla geride kalan tüm karışım pipet yardımıyla alındı.

Tüplerin dış yüzeyine yaklaştırılan mıknatıslar ortamdaki uzaklaştırıldı ve tüpün içerisine 2 mL 0,1 M NaCl, 0,003 M NaH_2PO_4 (pH 6,0) tamponu eklenerek iki kez yıkandı. Her defasında yıkama suları ayrı bir tüpe konuldu. En son aşamada

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

2.2.7.2 Enzimin Nanopartiküllere Bağlanmasının FT-IR Analizi ile Belirlenmesi

Enzim saflaştırma basamağından sonra yapılan immobilizasyon işleminin doğruluğunu kanıtlamak amacı ile Fe₃O₄ nanopartiküllerin, β-glukozidaz enziminin ve β-glukozidaz ile immobilize edilen nanopartiküllerin IR spektrumları alındı. KBr pelet hazırlama tekniği kullanılarak numunelerin IR spektrumu alındı. Bu amaçla immobilize nanopartiküllerin ve enzimin tamponu uzaklaştırılarak kurutuldu. Fe₃O₄ nanopartikülleri kendinden kuru olarak temin edildiği için herhangi bir işleme tabi tutulmadan doğrudan analizde kullanıldı.

Hazırlanan numunelerin her birinden 0,5-1 mg madde alındı ve tamamen kurutulmuş KBr ile karıştırıldı. KBr ve numune karışımı bir agat havan yardımıyla dövülerek toz haline getirildi. Elde edilen karışım paslanmaz çelikten yapılmış bir cihaz içine konularak hidrolitik preste 4500 kg/cm²'lik bir basınçta 1-2 dakika bekletildi. Bu işlem sonucunda KBr pelleti elde edilmiş oldu. İçinde numune olmayan boş KBr pelleti kör olarak okutularak hazırlanan numunelerin IR spektrumları alındı.

2.2.7.3 İmmobilize Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi

İmmobilize β-glukozidaz enziminin aktivitesi belirlenirken serbest enzim için kullanılan yöntem referans olarak alındı. Bu doğrultuda 0,1 g enzim bağlı ve kör olarak hazırlanan nanopartikülleri içeren numunelerin bulunduğu tüplere, konsantrasyonu 2,5 mM olan 1 mL pNPG substratından konuldu. Tüpler çalkalamalı etüvde 37 °C'de 210 rmp'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda numune ve kör olan tüplerden 140'ar µL alınarak 96'lık plakaya (well-plate) konuldu. Üzerlerine 70 µL 0,5 M Na₂CO₃ konularak reaksiyonlar durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de absorbans değeri okundu. İmmobilize

enzimin aktivitesini hesaplamak için son hacmi 210 µL olan pNPG standart grafik denklemini kullanıldı.

2.2.8 İmmobilize β-glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.8.1 İmmobilize Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

İmmobilize enzimin optimum pH'ını belirlemek amacıyla öncelikle immobilize olmuş enzim stoğu hazırlandı. Bu çalışma için 0,1 g Fe₃O₄ nanopartiküle immobilize olmuş enzim son hacim 10 mL olacak şekilde homojen hale getirildi ve 1'er mL olacak şekilde tüplere bölündü. Enzim aktivitesi ölçümü sırasında kör hazırlanmasında da aynı basamaklar izlendi.

Farklı pH'larda (2-10) 50 Mm Na-Ac tamponu hazırlandı. Hazırlanan tamponların her birinin son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde pNPG substratında çözüldü. Hazırlanan tüplere 1'er mL konuldu. Aynı işlem kör olarak hazırlanmış tüpler için de uygulandı. Bölüm 2.2.6.1'deki yöntemle her tüpün 405'nm de absorbansları alınarak aktivitelere bakıldı. Elde edilen sonuçlar pNPG standart eğri kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesabı yapıldı.

2.2.8.2 İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

İmmobilize enzimin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla öncelikle immobilize olmuş enzim stoğu hazırlandı. Bu çalışma için 0,1 g Fe₃O₄ nanopartiküle immobilize olmuş enzim son hacim 10 mL olacak şekilde homojen hale getirildi ve 1'er mL olacak şekilde tüplere bölündü. Enzim aktivitesi ölçümü sırasında kör hazırlanmasında da aynı basamaklar izlendi.

Enzim aktivitesi incelenirken 25-65 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık 5 °C arttırılarak aktivite tayini yapıldı. Bölüm 2.2.6.2'deki yöntemle farklı sıcaklıklarda her tüpün 405'nm de absorbansları alınarak aktivitelere araştırıldı. Elde edilen sonuçlar pNPG standart eğri kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesabı yapıldı.

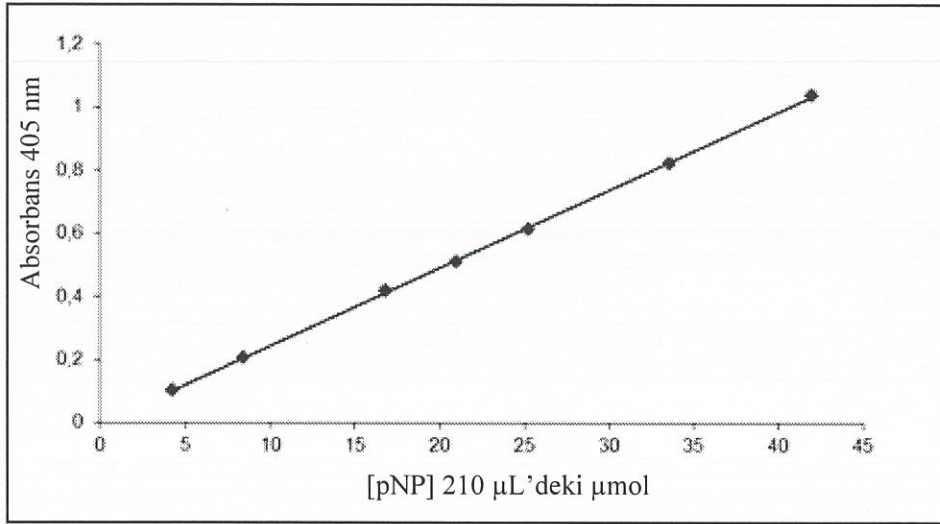
2.2.8.3 İmmobilize Enzimin pNPG ve Oleuropein Substratlarına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

İmmobilize edilen zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG ve oleuropein substratlarına olan ilgisi K_M ve V_{max} değerleri bulunarak tespit edildi. Bu çalışma için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan pNPG ve oleuropein substratlarının enzim aktivitesi ölçüldü. Elde edilen sonuçlardan $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. İmmobilize enzimin K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Bu hesaplama 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.

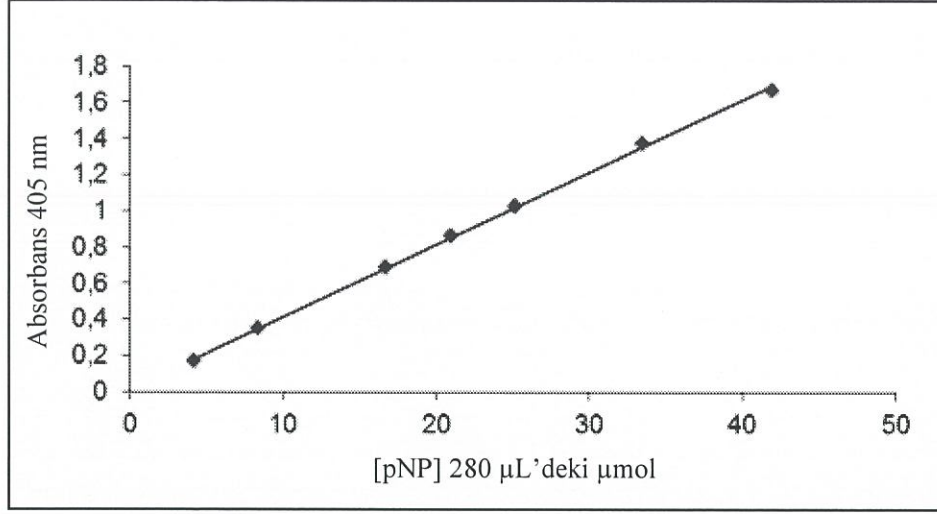
3. BULGULAR

3.1 Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Standart Eğri

Enzimin aktivite tayini, β -glukozidaz enzim hidrolizi ile glikopiranozide bağı olan *p*Nitrofenolün serbest kalması esasına dayanılarak yapıldı. Bu doğrultuda 210 μ L ve 280 μ L'lik son reaksiyon hacimlerinde *p*NPG standart grafikleri oluşturuldu. Bu grafikleri oluştururken *p*Nitrofenol standart olarak kullanıldı. Standart çözeltideki μ mol *p*Nitrofenole karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.3'de anlatılan yöntemle bulunarak Şekil 3.1 ve 3.2'deki standart grafikler oluşturuldu.



Şekil 3.1: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 μ L hacimli *p*NPG standart grafiği.



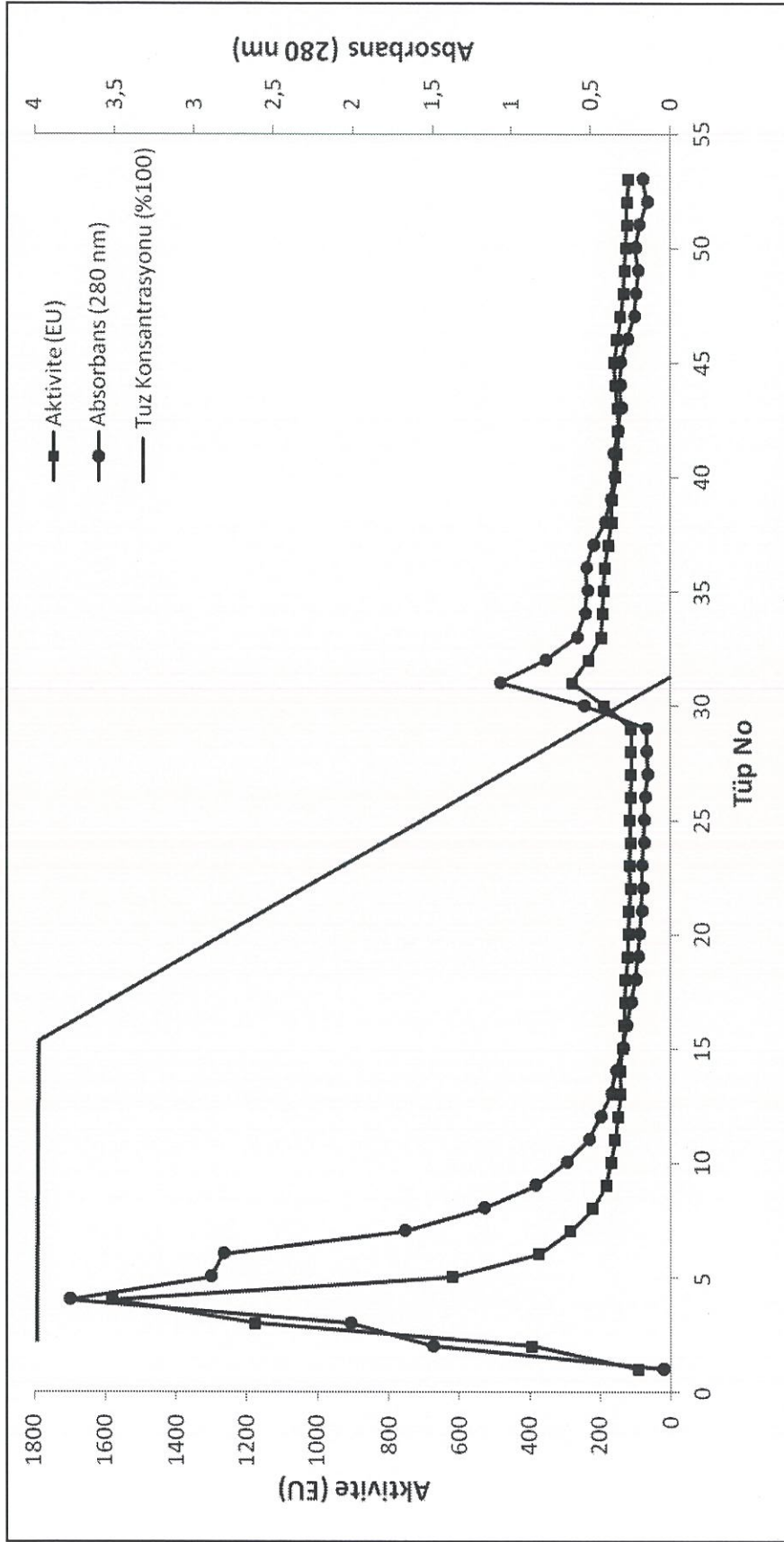
Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 µL hacimli pNPG standart grafiği.

3.2 β-Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

3.2.1 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi işlemi Bölüm 2.2.5.1' de belirtilen yöntemle göre uygulandıktan sonra elde edilen numune laboratuvarında sentezlenen hidrofobik yapıdaki sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jelini içeren kolona tatbik edildi. Kolondaki jel yüksekliği 3 cm ve çap 1 cm olacak şekilde düzenlendi. Kolondan alınan tüm numunelere 50 mM sodyum fosfat pH 6,8 tamponu kör kullanılarak, 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Kolona tatbik edilen numunelere ve yüksek aktivite gösteren elüat için Lowry metoduyla protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilerek Tablo 3.1'deki saflaştırma tablosu oluşturuldu.

Tablo 3.1'deki gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çözülen çökeleğin toplam aktivitesi 11123,31 EU/mL ve toplam protein miktarı 23,19 mg/mL olarak belirlenmiş ve % 97,30 verimle 12,47 kat saflaştırılmış olduğu hesaplanmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda 31. tüpteki saf enzimin % 9,90 verimle 163,62 kat saflaştırılmış olduğu belirlenmiştir.



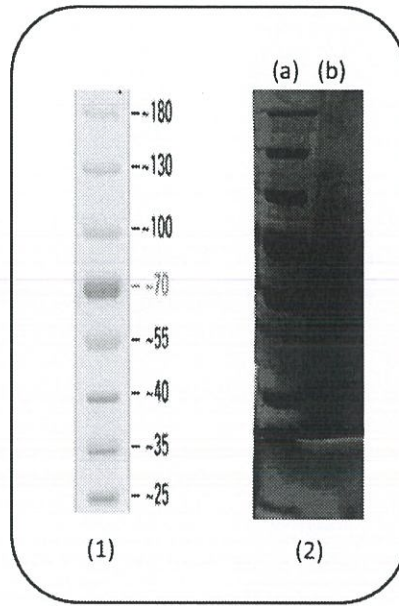
Şekil 3.3: Hidrofobik etkileşim kolonundan zeytin β -glukozidazının elüsyon grafiği

Tablo 3.1: Saflaştırma tablosu.

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham ekstrakt	40	285,772	11430,88	6,606	297,27	38.4528	100	
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	10	1112,331	11123,31	2,319	23,19	479,6597	97,30	12,47
Hidro fobik Etkileşim Kromatografisi	2	566,260	1132,52	0,091	0,18	6291,7777	9,90	163,62

3.2.2 Zeytin β -Glukozidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan zeytin β -glukozidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 2.2.5.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine, saflaştırılan enzim numuneleri uygulandı. Protein bantlarını içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı. Zeytin β -glukozidaz enziminin Şekil 3.4’deki 2.(b) olan görüntüde yaklaşık 40 kDa bölgesinde tek bant verdiği görülmektedir.



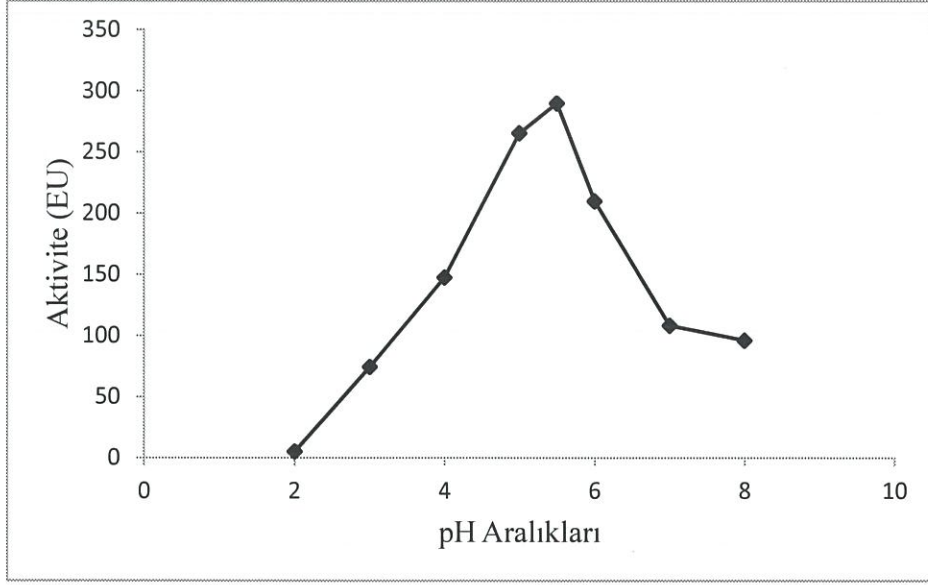
Şekil 3.4: Hidrofobik etkileşim kromatografi ile saflaştırılan zeytin β -glukozidaz enzimi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi 1: Protein Marker ,2.(a): protein marker bantları,2.(b): numune bandı.

3.3 Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

3.3.1 Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması

Bölüm 2.2.6.1’de ifade edildiği şekilde, bir seri farklı pH değerlerine sahip *p*NPG substratlarının enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH değerine karşı aktivite grafiği çizildi. Elde edilen grafikten zeytin β -

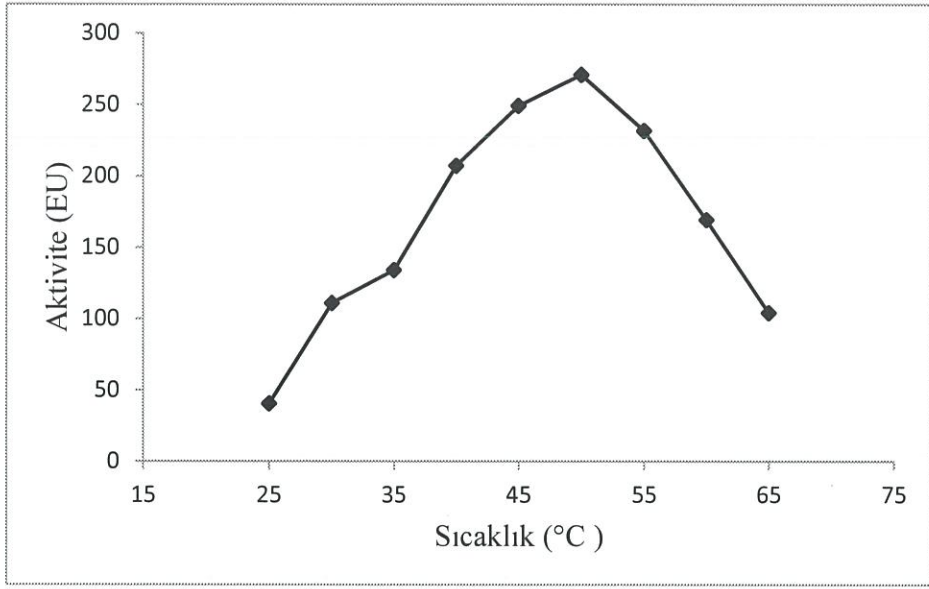
glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri 5,5 olarak bulunmuştur.



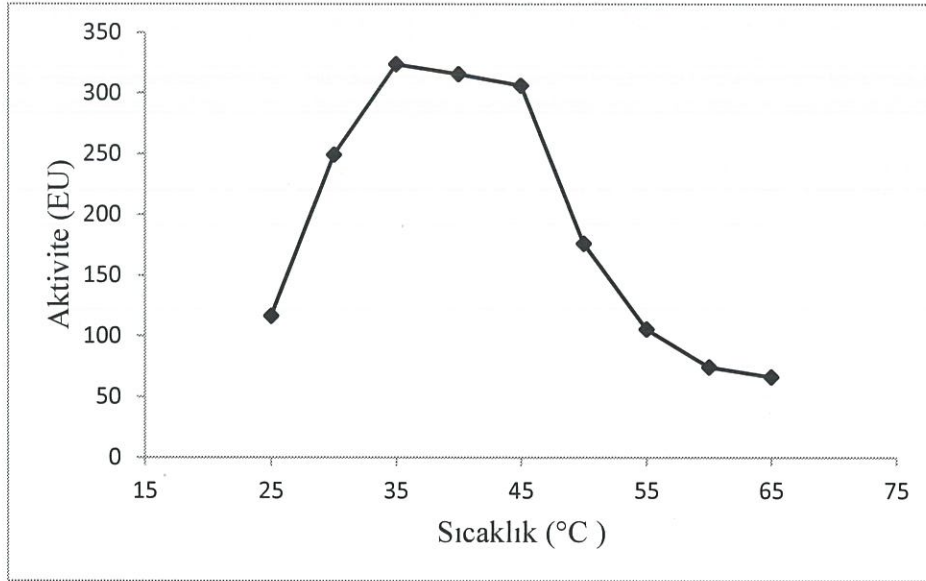
Şekil 3.5: Zeytin β -glukozidaz enziminin optimum pH grafiği.

3.3.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması

Bölüm 2.2.6.2’de ifade edildiği şekilde saf enzim, farklı sıcaklarda ve farklı substratlara karşı inkübe edildi ve aktivite ölçümleri yapıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklık değerine karşı aktivite grafikleri çizildi. Elde edilen grafiklerden zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG substratına karşı en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak belirlenirken, oleuropein substratına karşı en yüksek aktivitesinin gözlemlendiği sıcaklık ise 35°C olarak bulunmuştur.



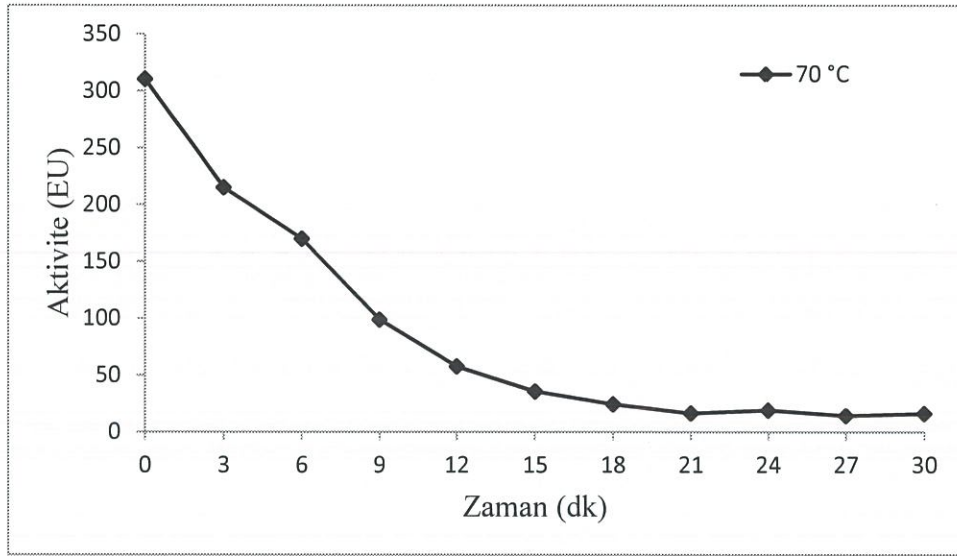
Şekil 3.6: Zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG substratına karşı optimum sıcaklık grafiği.



Şekil 3.7: Zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratına karşı optimum sıcaklık grafiği.

3.3.3 Zeytin β -Glukozidaz Enziminin Termal Kararlılığı

β -glukozidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek amacı ile enzim çözeltisine Bölüm 2.2.6.3'de belirtilen şekilde işlemler uygulanmış sonuç olarak ısıya belli bir süre muamele edilen stok enzim çözeltisinden alınıp, aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen değerlerden 70°C' deki ısı işlem uygulamasının zamana karşı aktivite grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafikten termal inkübasyonun 6 dk sonunda enzimin aktivitesini % 54, 30 dk sonunda ise % 4,8 koruduğu belirlenmiştir.



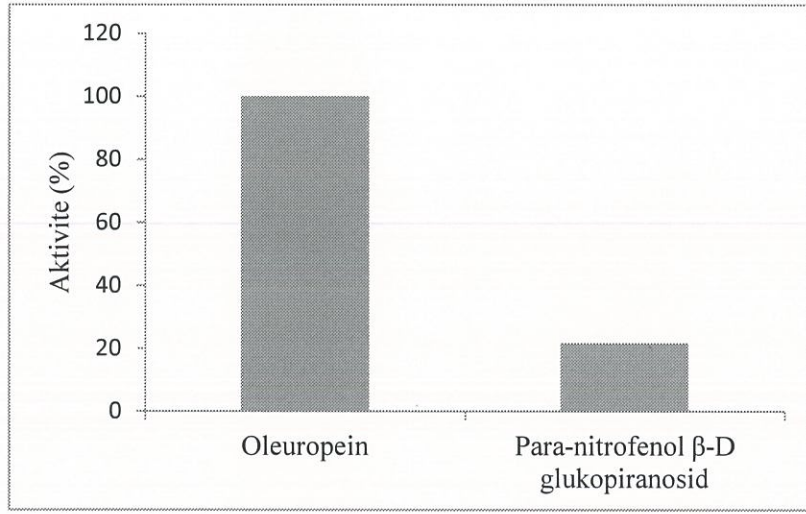
Şekil 3.8: Zeytin β -glukozidaz enziminin termal kararlılık grafiği.

3.3.4 Enzimin Farklı Substratlara Karşı Spesifikliğı

Zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.6.4'de belirtilen yöntemle aktivite tayini yapıldı. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği oleuropein substratına göre relative aktivite belirlendi.

Tablo 3.2: Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı ilgisinin belirlenmesinde kullanılan substrat çeşitleri, enzim aktivite ve relative aktivite değerleri.

Substrat	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyucuk Substrat Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
Oleuropein	70	70	2,5	0,84	1140,65	100,00
pNPG	70	70		0,18	248,78	21,81



Şekil 3.9: Zeytin β -glukozidazının farklı substratlara karşı olan aktiviteleri.

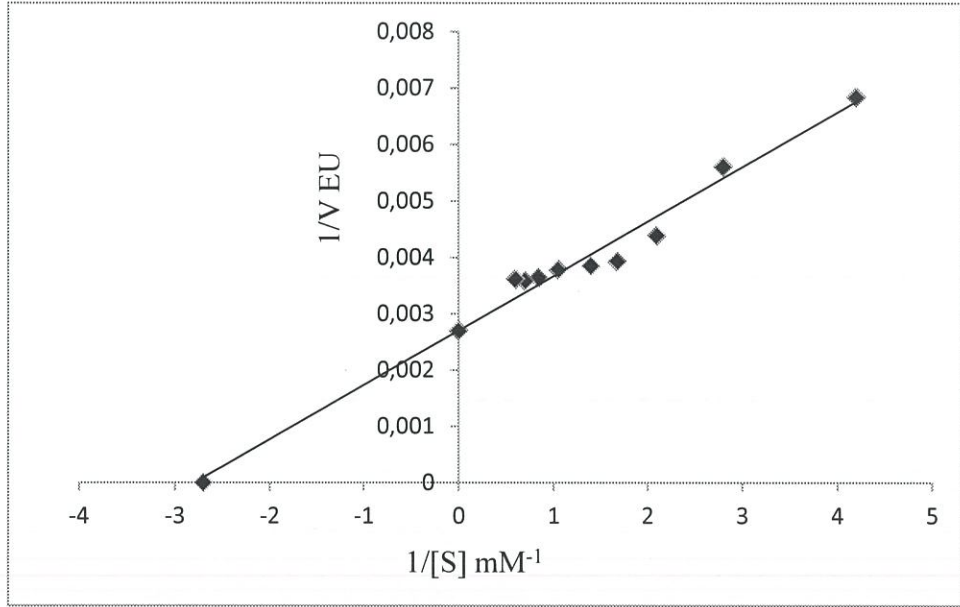
3.3.5 Farklı Substratların K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

3.3.5.1 Enzimin pNPG Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri

β -glukozidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla pNPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı.

405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı V (EU/mL) olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.10'de gösterilen

Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak zeytin β -glukozidaz enzimine ilişkin pNPG substratı için K_M değeri 0,37 mM ve V_{max} değeri 370,37 EU olarak hesaplandı.



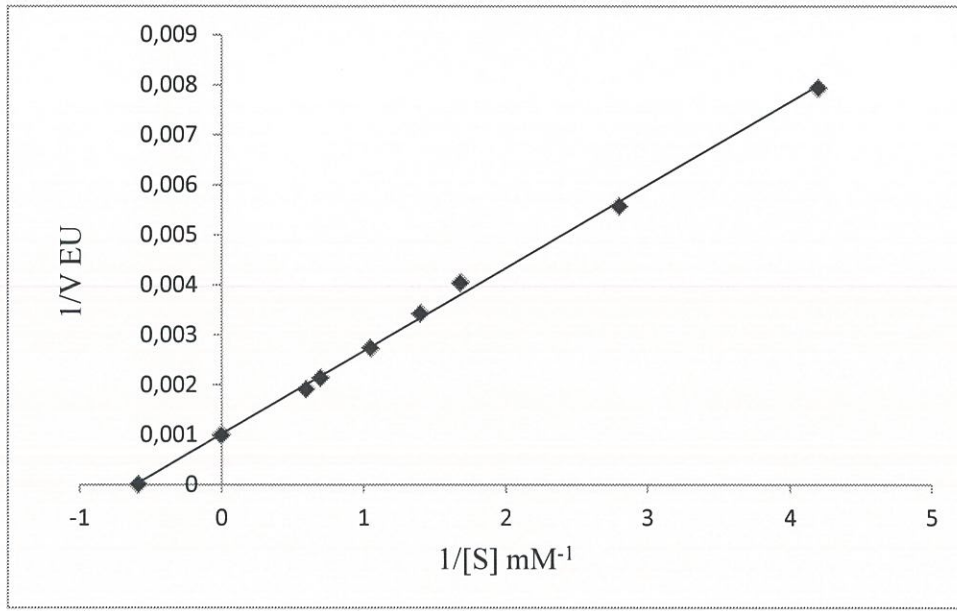
Şekil 3.10: pNPG Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.3: Zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, KM ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Kuyucuk Toplam Hacmi (μ l)	Kuyucuk Substrat Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
5	70	135	210	0,12	0,124	90,39	11,06	8,40
10		130		0,24	0,191	146,20	6,84	4,20
15		125		0,36	0,229	178,28	5,61	2,80
20		120		0,48	0,288	227,90	4,39	2,10
25		115		0,60	0,321	254,64	3,93	1,68
30		110		0,71	0,327	259,90	3,85	1,40
40		100		0,95	0,332	264,16	3,79	1,05
50		90		1,19	0,345	274,77	3,64	0,84
60		80		1,43	0,349	278,78	3,59	0,70
70		70		1,67	0,347	276,69	3,61	0,60
100	40	2,38	0,396	317,96	3,15	0,42		

3.3.5.2 Enzimin Oleuropein Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri

β -glukozidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla oleuropein substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı V (EU/mL) olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.10'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak zeytin meyvesi β -glukozidaz enzimine ilişkin oleuropein substratı için K_M değeri 1,7 mM ve V_{max} değeri 1000 EU olarak hesaplandı.



Şekil 3.11: Oleuropein substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.4: Zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Kuyucuk Toplam Hacmi (μ l)	Kuyucuk Substrat Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
5	70	135	210	0,12	0,095	65,91	15,17	8,40
10		130		0,24	0,167	126,07	7,93	4,20
15		125		0,36	0,231	179,53	5,57	2,80
20		120		0,48	0,248	193,73	5,16	2,10
25		115		0,60	0,312	247,20	4,05	1,68
30		110		0,71	0,365	291,48	3,43	1,40
40		100		0,95	0,454	365,83	2,73	1,05
50		90		1,19	0,54	437,68	2,28	0,84
60		80		1,43	0,575	466,92	2,14	0,70
70		70		1,67	0,641	522,06	1,92	0,60
100	40	2,38	0,805	659,06	1,52	0,42		

Tablo 3.5: Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı K_m , V_{max} ve V_{max} / K_m değerleri.

Substrat	V_{max} (EU)	K_m (mM)	V_{max}/K_m
pNPG	370,37	0,37	1001
Oleuropein	1000	1,7	588,23

3.3.6 β -glukozidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

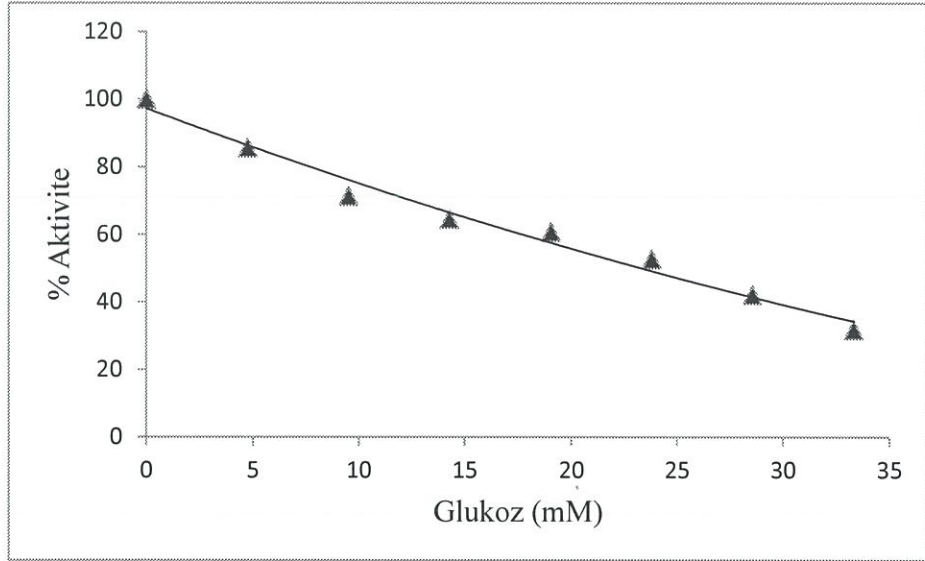
β -glukozidaz enziminin üzerine inhibitör etkisi olabilecek maddelerin etkilerinin araştırılması için IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Bu nedenle glukoz, sitrik asit, laktik asit, sodyum hidroksit ve sodyum klorürün enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

3.3.6.1 Glukozun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Glukozun zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, pNPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.66 mM kullanıldı. Glukoz bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC_{50} değeri belirlenirken % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan Glukozun 4,76-33,33 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki verileri Tablo 3.6'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren glukozun IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0	Glukoz	70	70	70	0,00	0,316	250,96	100
10				60	4,76	0,273	214,97	85,66
20				50	9,52	0,23	179,11	71,37
30				40	14,29	0,209	161,92	64,52
40				30	19,05	0,198	152,31	60,69
50				20	23,81	0,174	132,40	52,76
60				10	28,57	0,142	105,67	42,10
70				0	33,33	0,111	79,91	31,84



Şekil 3.12: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda glukoz % aktivite grafiği.

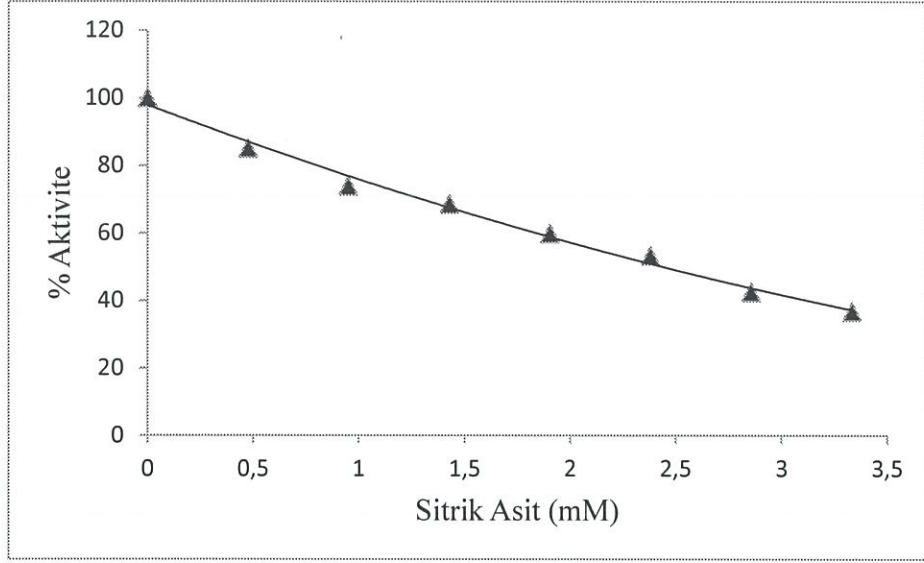
Glukozun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.12'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun IC_{50} değeri 23,33 mM olarak hesaplanmıştır.

3.3.6.2 Sitrik Asitin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Sitrik asitin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.66 mM kullanıldı. Sitrik asit bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC_{50} değeri belirlenirken % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan sitrik asitin 0,48 - 3,33 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki verileri Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren sitrik asitin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0				70	0,00	0,258	202,09	100
10				60	0,48	0,222	172,01	85,12
20				50	0,95	0,195	149,46	73,96
30	Sitrik asit	70	70	40	1,43	0,182	138,60	68,58
40				1,90	0,161	121,05	59,90	
50				2,38	0,145	107,69	53,29	
60				2,86	0,119	85,96	42,54	
70				3,33	0,105	74,27	36,75	



Şekil 3.13: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda sitrik asitin % aktivite grafiği.

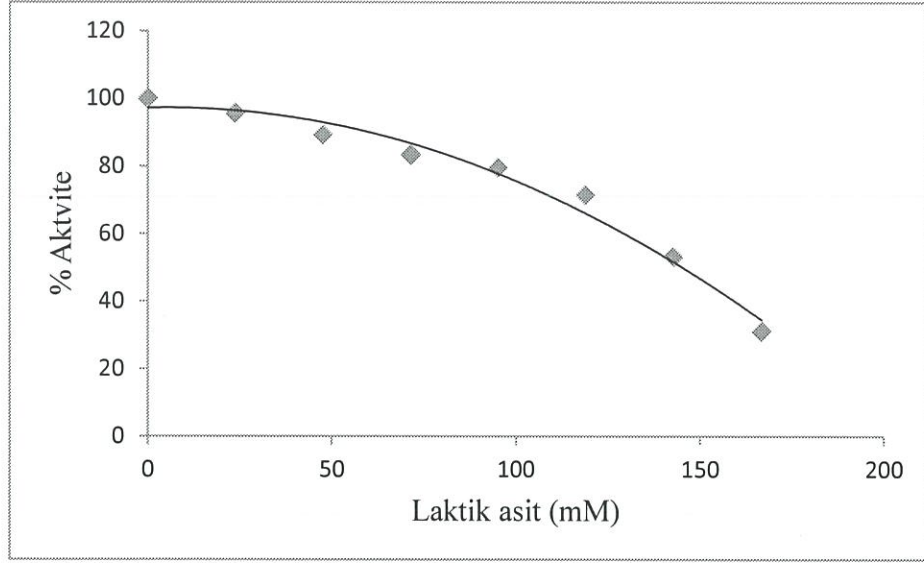
Sitrik asitin *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.13'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine sitrik asitin IC_{50} değeri 12,275 mM olarak hesaplanmıştır.

3.3.6.3 Laktik Asitin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Laktik asitin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.66 mM kullanıldı. Laktik asit bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC_{50} değeri belirlenirken % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan laktik asitin 23,81 – 166,67 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki verileri Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.8: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren laktik asitin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0	Laktik Asit	70	70	70	0,00	0,202	155,30	100
10				23,81	0,194	148,62	95,70	
20				47,62	0,182	138,60	89,24	
30				71,43	0,171	129,41	83,32	
40				95,24	0,164	123,56	79,56	
50				119,05	0,149	111,03	71,49	
60				142,86	0,115	82,62	53,20	
70				166,67	0,074	48,37	31,15	



Şekil 3.14: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda laktik asitin % aktivite grafiği.

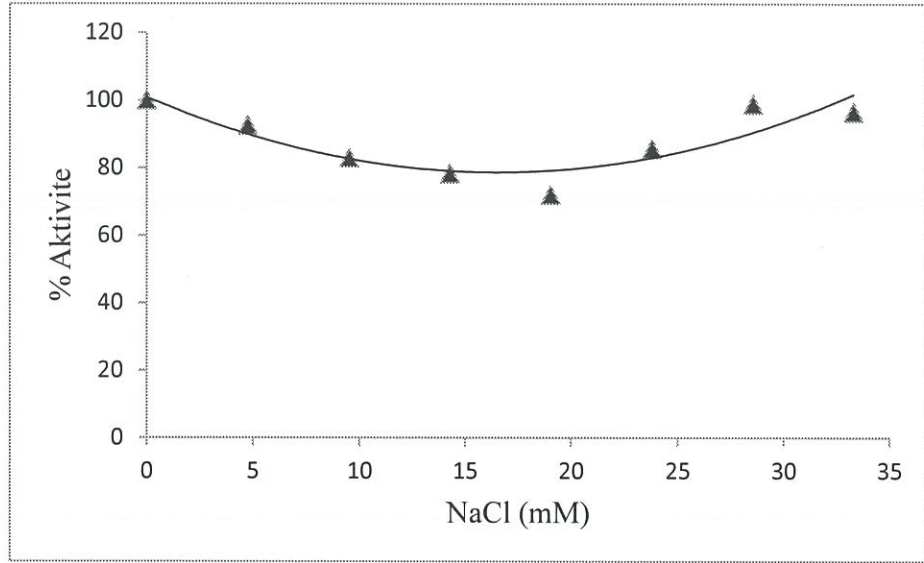
Laktik asitin *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.14'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine laktik asitin IC_{50} değeri 145,7 mM olarak hesaplanmıştır.

3.3.6.4 Sodyum Klorürün Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Sodyum klorürün zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.66 mM kullanıldı. Sodyum klorür bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC_{50} değeri belirlenirken % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan sodyum klorürün 4,76 – 33,33 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki verileri Tablo 3.9'de gösterilmiştir.

Tablo 3.9: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren sodyum klorürün IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0	NaCl	70	70	70	0,00	0,191	146,12	100
10				60	4,76	0,178	135,25	92,57
20				50	9,52	0,161	121,05	82,85
30				40	14,29	0,153	114,37	78,27
40				30	19,05	0,142	105,18	71,98
50				20	23,81	0,166	125,23	85,71
60				10	28,57	0,189	144,44	98,86
70				0	33,33	0,185	141,10	96,57



Şekil 3.15: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda sodyum klorürün % aktivite grafiği.

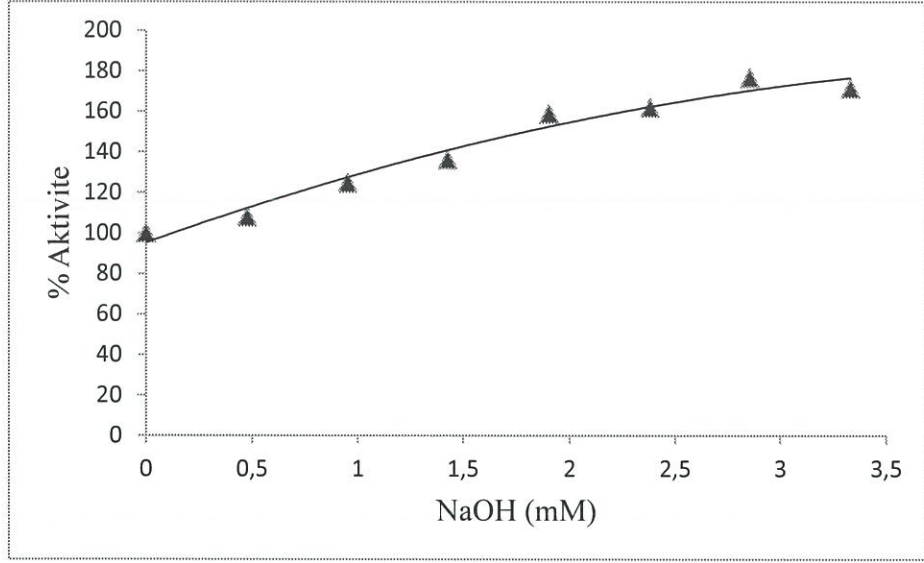
Sodyum klorürün *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.15'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine sodyum klorürün IC_{50} değeri 24,1 mM olarak hesaplanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda değişen inhibitör molaritesine bağlı olarak düzenli sonuç verileri belirlenememiştir. Düşük inhibitör konsantrasyonunda inhibe etkisi gözlemlenirken, yüksek konsantrasyonlarda ise aktive edici bir özellik gözlenmiştir.

3.3.6.5 Sodyum Hidroksitin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Sodyum hidroksitin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.66 mM kullanıldı. Sodyum hidroksit bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC_{50} değeri belirlenirken % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan sodyum hidroksitin 0,48 – 3,33 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki verileri Tablo 3.10'de gösterilmiştir.

Tablo 3.10: β -glukozidaz üzerinde inhibisyon etki gösteren sodyum hidroksit IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0				70	0,00	0,109	77,94	100
10				60	0,48	0,117	84,29	108,15
20				50	0,95	0,132	97,33	124,87
30				40	1,43	0,143	106,27	136,33
40		70	70	30	1,90	0,164	123,89	158,95
50	NaOH			20	2,38	0,167	126,23	161,95
60				10	2,86	0,181	137,76	176,74
70				0	3,33	0,176	133,67	171,49

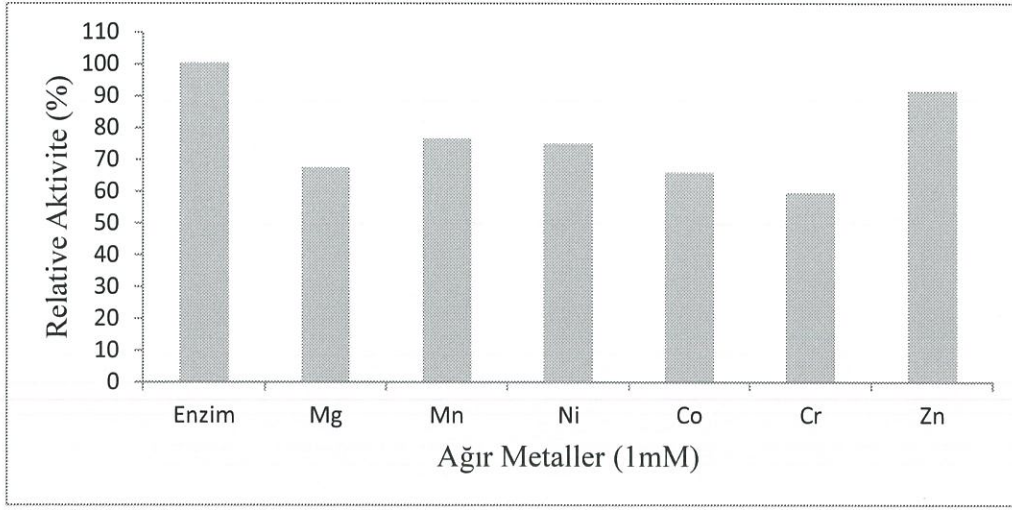


Şekil 3.16: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,66 mM pNPG substratı konsantrasyonunda sodyum hidroksidin % aktivite grafiği.

Sodyum hidroksitin *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.16'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine sodyum hidroksitin IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Elde edilen değerler sonucu oluşturulan grafiğtende anlaşıldığı üzere sodyum hidroksitin küçük molaritelerde dahi β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine aktivator etkisi bulunmaktadır.

3.3.7 Zeytin β -Glukozidaz Enzimi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisi

Zeytin β -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine Ni⁺¹, Zn⁺¹, Cr⁺¹, Mn⁺², Mg⁺² ve Co⁺¹ ağır metal iyonlarının etkisini Bölüm 2.2.6.7’de anlatılan yöntemle belirlenmiştir. Reaksiyon ortamında 1,75 mM *p*NPG ve 1 mM ağır metal bulunan numunelerin aktivite tayinleri yapılmış ve ağır metal içermeyen, enzim çözeltisi ile kıyaslanarak % kalan aktiviteyi belirlenmiştir(Şekil 3.17).



Şekil 3.17: Zeytin β -glukozidaz enzimi üzerine bazı ağır metallerin etkileri.

Elde edilen sonuçlarla hazırlanan grafikte kullanılan ağır metaller içerisinde enzimi en çok inhibe eden Cr ve Mg iyonları olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışılan diğer ağır metallerin de belirli oranlarda inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir.

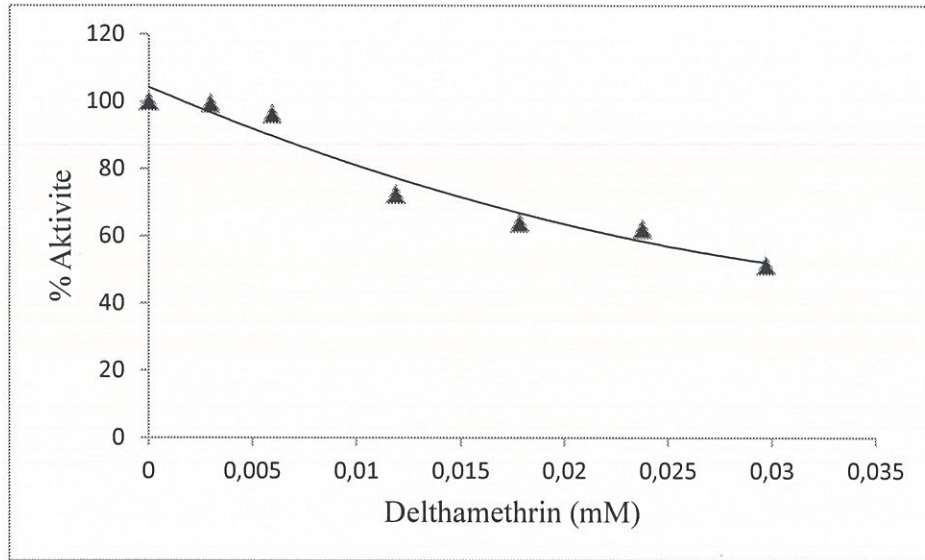
Tablo 3.11: β -glukozidaz enzimi üzerine ağır metallerin etkisinin belirlenmesinde kullanılan metal çeşitleri ve bu metallerin enzim aktivitesi üzerindeki sonuçları.

Ağır Metaller	Ağır Metal Çözeltisinin Hacmi (mM)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Kuyucuk Ağır Metal Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
Enzim	-	70	70	70	-	0,203	156,1403509	100
Mg ⁺²	42	70	70	28	1	0,142	105,1796157	67,36222579
Mn ⁺²	42	70	70	28	1	0,159	119,3817878	76,45799893
Ni ⁺¹	42	70	70	28	1	0,156	116,8755221	74,85286249
Co ⁺¹	42	70	70	28	1	0,139	102,67335	65,75708935
Cr ⁺¹	42	70	70	28	1	0,127	92,64828739	59,33654361
Zn ⁺¹	42	70	70	28	1	0,187	142,7736007	91,43927234

3.3.8 β -glukozidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Pestisitlerin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

3.3.8.1 Deltamethrin pestisitinin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Deltamethrin pestisitinin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.25mM olarak kullanılmıştır. Deltamethrin bulunmayan reaksiyon ortamındaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilmiştir ve DMSO içinde çözünen deltamethrin 0.0029 - 0.0297 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarında tespit edilen % Aktivite değerleri Tablo 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.18: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,25 mM pNPG substratı konsantrasyonunda deltamethrin pestisitinin % aktivite grafiği.

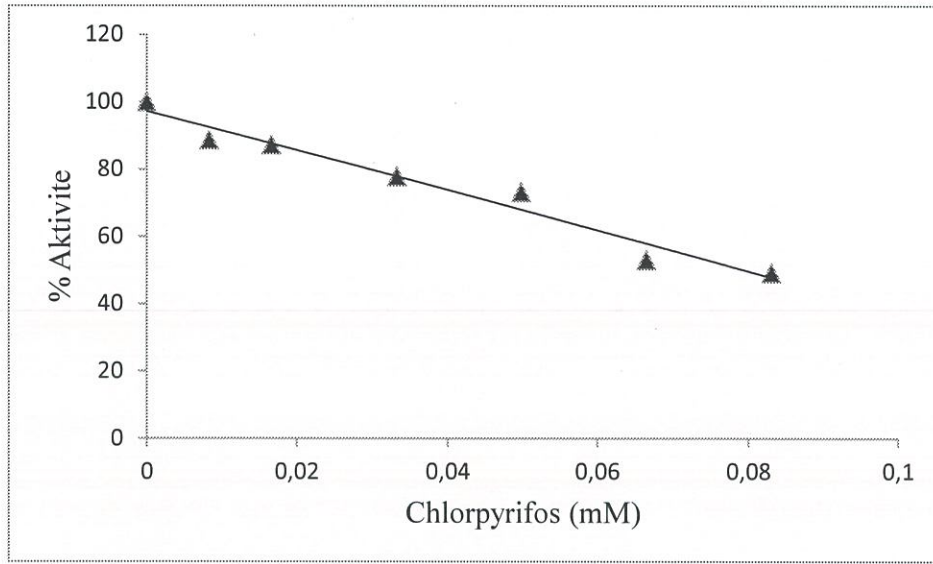
Tablo 3.12’deki verilerle oluşturulan p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.18’deki gibidir. Grafikten elde ettiğimiz denklemden yararlanarak zeytin beta-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine deltamethrin pestisitinin IC₅₀ değeri 0.0323 mM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.12: Zeytin β -glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren deltamethrin pestisitinin IC50 değerinin bulunmasında kullanılan çözeltili miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0				70	0	0,2415	328,46	100
1				69	0,0029	0,2401	326,56	99,42
2				68	0,0059	0,2322	315,85	96,16
4	Deltamethrin	35	35	66	0,0118	0,1747	237,94	72,44
6				64	0,0178	0,1541	210,03	63,94
8				62	0,0237	0,1498	204,20	62,17
10				60	0,0297	0,1235	168,56	51,32

3.3.8.2 Chlorpyrifos Pestisitinin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Chlorpyrifos pestisitinin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.25mM olarak kullanılmıştır. Chlorpyrifos bulunmayan reaksiyon ortamındaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilmiştir ve DMSO içinde çözünen chlorpyrifos 0.0083 – 0,0837 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarında tespit edilen % Aktivite değerleri Tablo 3.13’de verilmiştir.



Şekil 3.19: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,25 mM pNPG substratı konsantrasyonunda chlorpyrifos pestisitinin % aktivite grafiği.

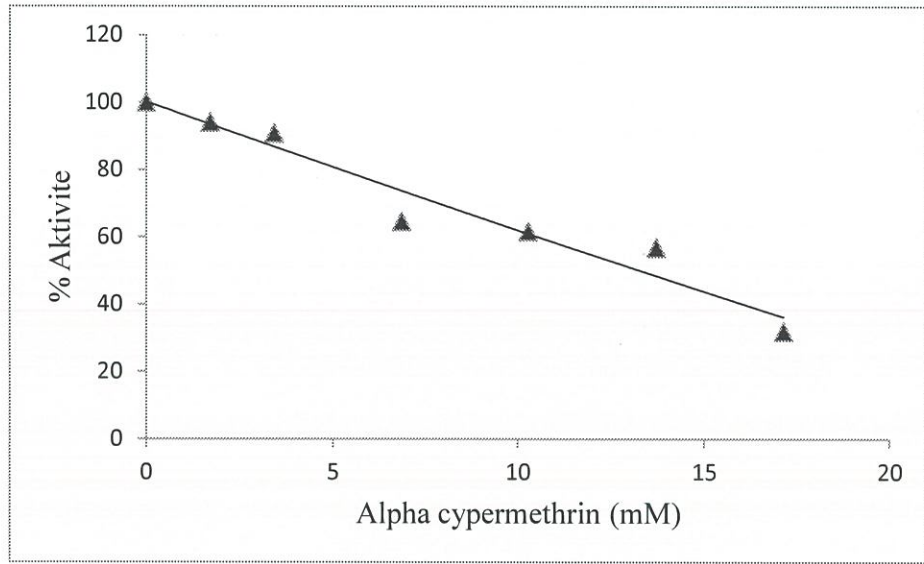
Tablo 3.13’deki verilerle oluşturulan p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.19’deki gibidir. Grafikten elde ettiğimiz denklemden yararlanarak zeytin beta-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine chlorpyrifos pestisitinin IC₅₀ değeri 1,25 mM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.13: Zeytin β -glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren chlorpyrifos pestisitinin IC_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0				70	0	0,1149	156,91	100
1				69	0,0083	0,1017	139,02	88,60
2				68	0,0166	0,1001	136,86	87,22
4	Chlorpyrifos	35	35	66	0,0332	0,0892	122,09	77,81
6				64	0,0498	0,0838	114,77	73,14
8				62	0,0664	0,0605	83,20	53,02
10				60	0,0837	0,0561	77,24	49,22

3.3.8.3 Alphacypermethrin Pestisitinin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Alphacypermethrin pestisitinin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.25mM olarak kullanılmıştır. Alphacypermethrin bulunmayan reaksiyon ortamındaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilmiştir ve DMSO içinde çözünen alphacypermethrin 1,17 – 17,14 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarında tespit edilen % Aktivite değerleri Tablo 3.14’de verilmiştir.



Şekil 3.20: β -glukozidaz enzimi üzerine 1,25 mM pNPG substratı konsantrasyonunda alphacypermethrin pestisitinin % aktivite grafiği.

Tablo 3.14’deki verilerle oluşturulan p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite grafiği Şekil 3.20’deki gibidir. Grafikten elde ettiğimiz denklemden yararlanarak zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine alphacypermethrin pestisitinin IC₅₀ değeri 13,29 mM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.14: Zeytin β -glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren alphacypermethrin pestisitinin IC_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

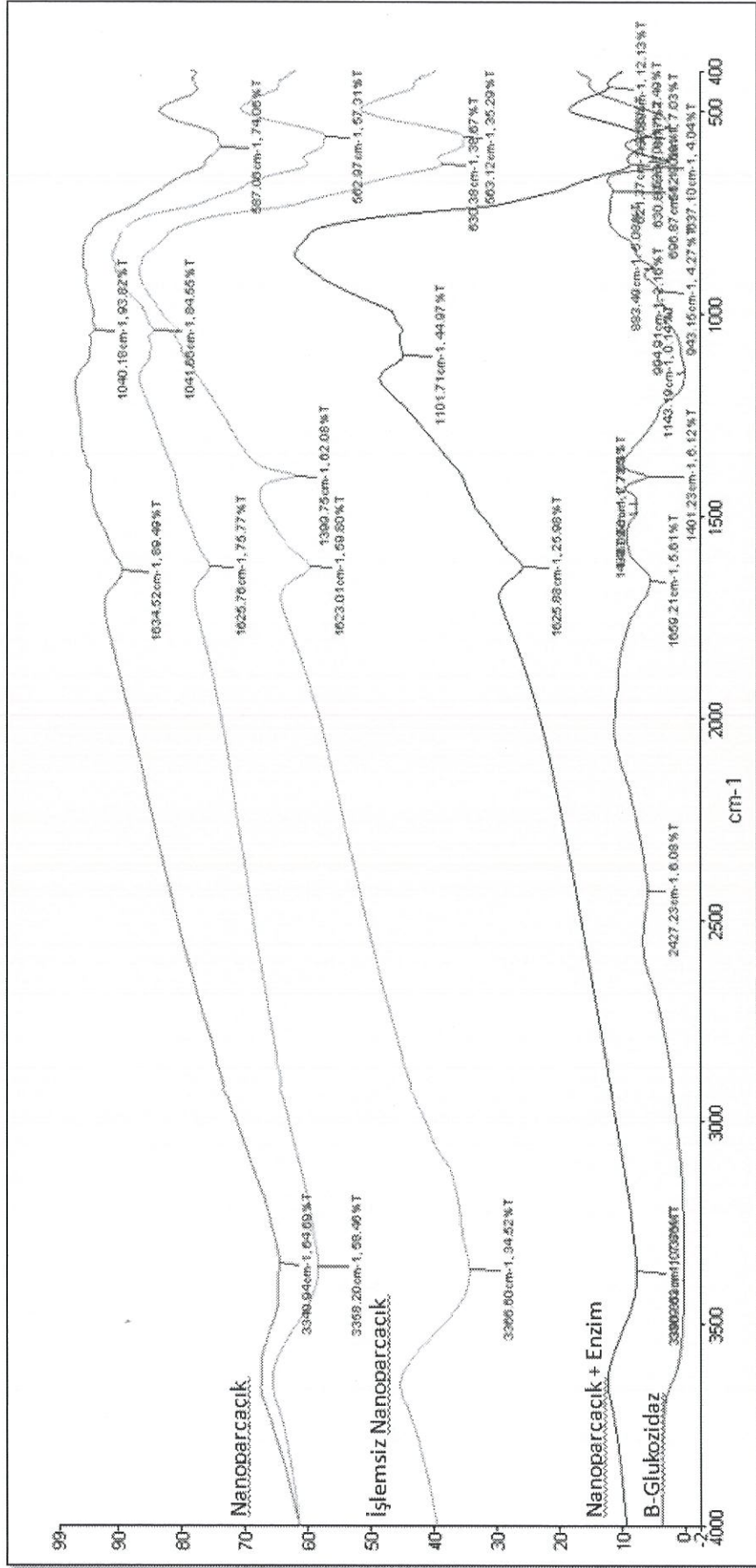
İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μl)	50 mM Na-Ac Tamponu (μl)	Kuyucuk İnhibitör Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	% Aktivite
0				70	0,00	0,198	269,78	100
1				69	1,71	0,186	253,79	94,07
2				68	3,43	0,179	244,99	90,81
4	Alpha cypermethrin	35	35	66	6,86	0,127	174,39	64,64
6				10,29	0,121	166,40	61,68	
8				13,71	0,112	153,39	56,86	
10				17,14	0,062	86,31	31,99	

3.4 β -Glukozidaz Enziminin İmmobilizasyonu

3.4.1 Enzim İmmobilizasyonunun FT-IR Analizi

FT-IR analizi sonucu elde edilen grafikte saf β -glukozidaz enzimi, Fe_3O_4 nanopartikülü, işlem görmüş Fe_3O_4 nanopartikülü ve nanopartikülüne immobilize edilmiş β -glukozidaz enzimine ait FT-IR verileri görülmektedir.

Enzime ait 1400 cm^{-1} piki carbodiimide aktivasyonu yapılmış (enzimsiz) nanoparçacıkta ve enzim bağlı nanaoparçacıkta kaybolmuş, $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 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 naoparçacık ve enzim kullanılmadan yapılan işlemlerin sonucunda elde edilen nanoparçacığın IR spektrumlarındaki benzerlikten yola çıkılarak IR spektrumlarına göre carbodiimide aktivasyonu ile nanoparçacık-carbodiimide bağlanmasının gerçekleştiği sonucunu varılabilir. Enzime bağlı nanopartikül grafiğinde saf enzimde görülen karakteristik piklerin mevcut olması enzimin nanopartiküle bağlandığını gösterebilmektedir.



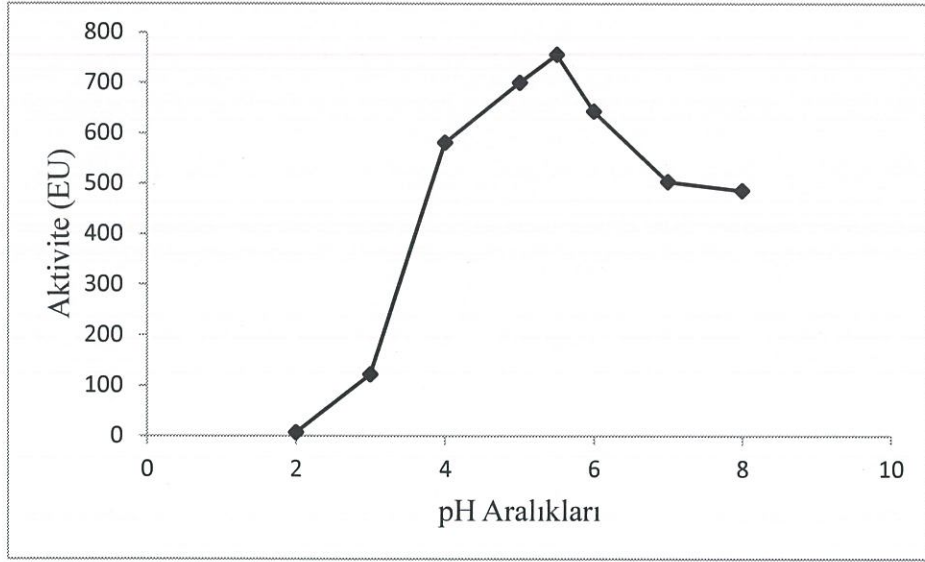
Şekil 3.21: İmmobilizasyon destek materyali, saf enzim ve enzim bağlı nanopartikülün FT-IR spektrumları.

3.4.2 İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Zeytin β -glukozidaz enziminin süperparamanyetik Fe₃O₄ nanopartiküllere immobilizasyonunun, enzim üzerine etkileri araştırılmıştır.

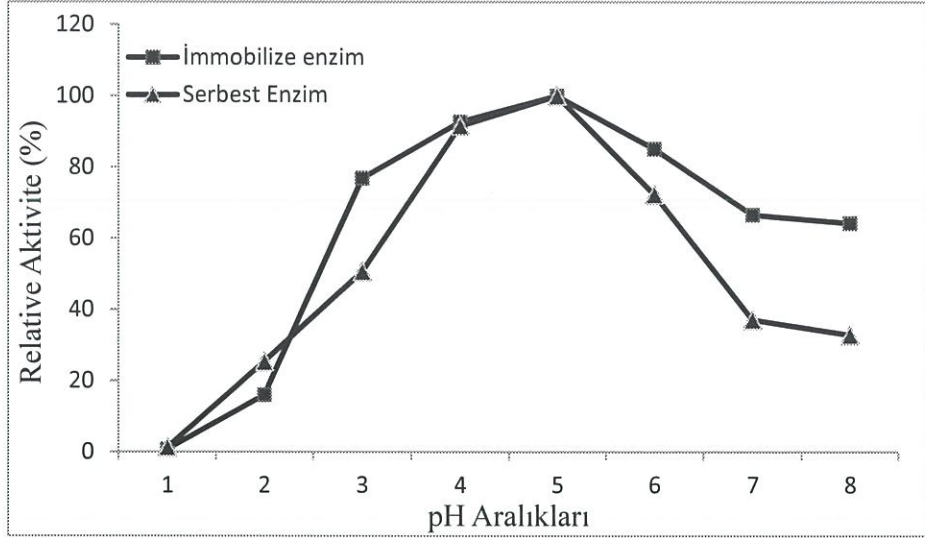
3.4.2.1 İmmobilize Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması

Bölüm 2.2.8.1' de belirtildiği şekilde, bir seri farklı pH değerlerine sahip pNPG substratlarının enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH değerine karşı aktivite grafiği oluşturuldu. Elde edilen grafikten nanopartiküllere immobilize zeytin β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri 5,5 bulunmuştur.



Şekil 3.22: İmmobilize enziminin optimum pH grafiği.

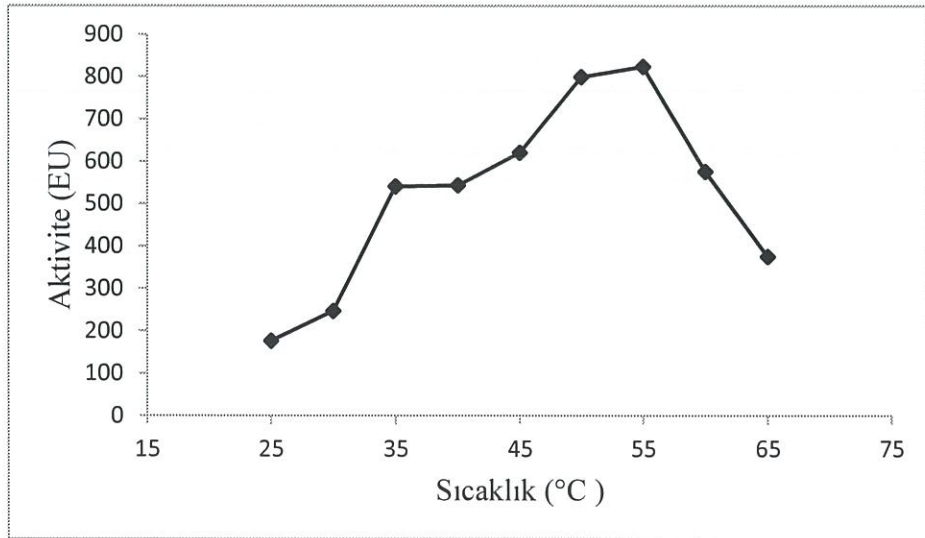
Şekil 3.23'de immobilize enzim ile serbest enzimin aynı pH larda aktiviteleri karşılaştırdık. Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite gösterdikleri değerler %100 olarak kabul edildi. İmmobilize enzimin pH değerinin serbest enzimin pH değeriyle aynı olduğu belirlendi. Ancak immobilize olan enzimin daha geniş bir pH aralığında daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir.



Şekil 3.23: İmmobilize ve serbest enzimin optimum pH grafiği.

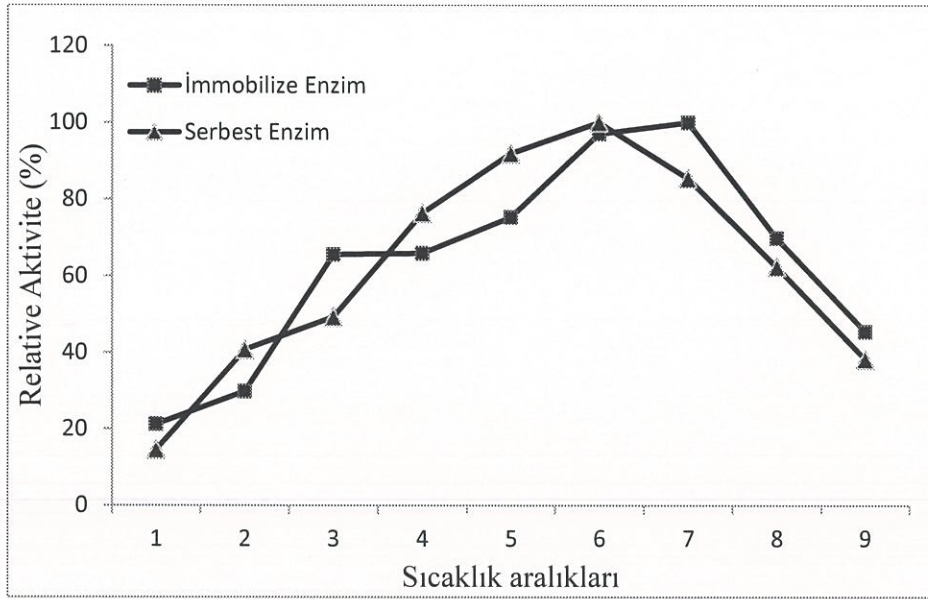
3.4.2.2 İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Bulunması

Bölüm 2.2.8.2’de belirtilen yöntemle immobilize enzim, farklı sıcaklıklarda inkübe edildi ve aktivitesi hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklık değerine karşı aktivite grafiği çizildi. Elde edilen grafikten immobilize zeytin β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 55 °C bulunmuştur.



Şekil 3.24: İmmobilize enzimin optimum sıcaklık grafiği.

Şekil 3.25’de immobilize enzim ile serbest enzimin aynı sıcaklıklardaki aktivitelerini karşılaştırdık.Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite gösterdikleri değerler %100 olarak kabul edildi.İmmobilize enzimin sıcaklık değerinin serbest enzime göre 5°C daha yüksek olduğunu belirlendi.



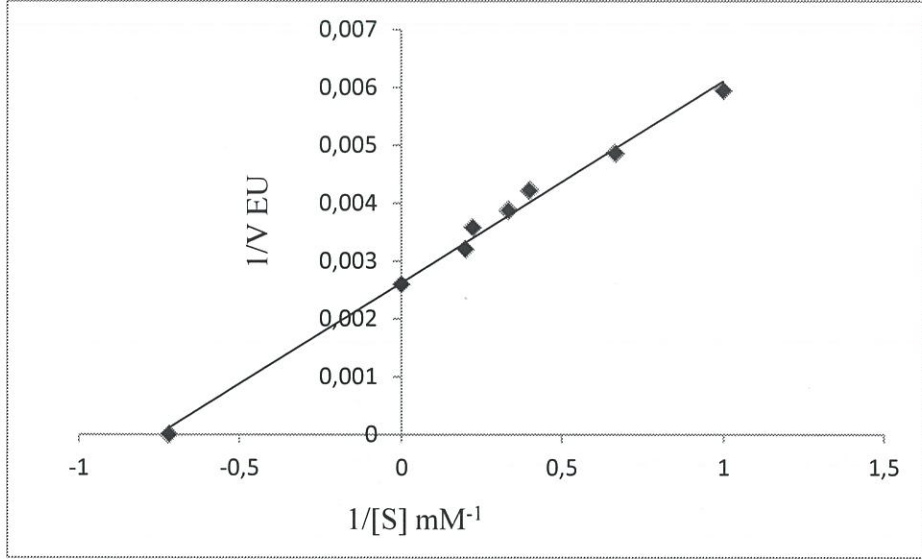
Şekil 3.25: İmmobilize ve serbest enzimin optimum sıcaklık grafiği.

İmmobilize enzim sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmış ve daha geniş bir sıcaklık bandına ulaşmıştır.

3.4.2.3 İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin *p*NPG Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değeri

İmmobilize zeytin β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla *p*NPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm’de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı V (EU/mL) olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.26’da gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Elde edilen grafik denkleminde yola

çıkarak immobilize zeytin β -glukozidaz enzimine ilişkin K_M değeri 1.34 mM ve V_{max} değeri 384,61 EU olarak hesaplandı.



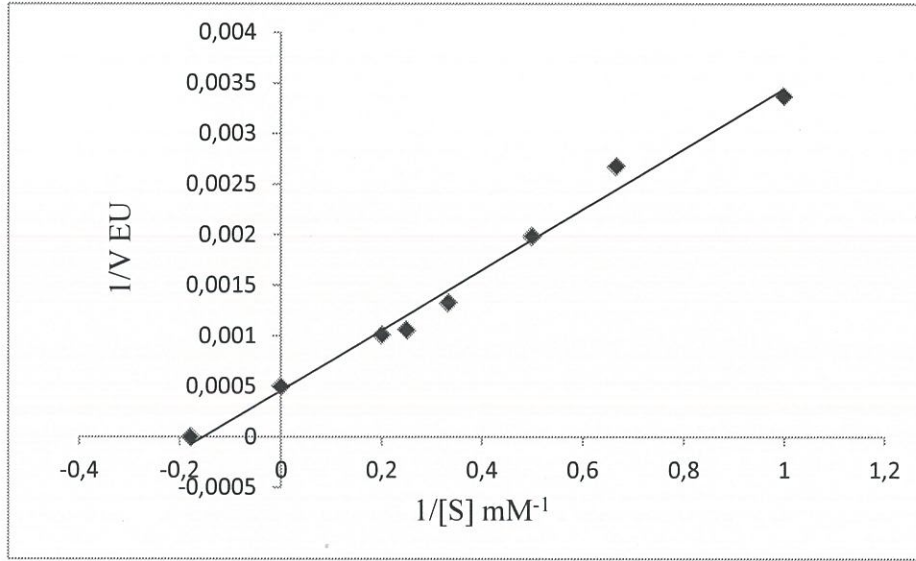
Şekil 3.26: İmmobilize β -Glukosidaz Enziminin pNPG Substratına Karşı K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.15: İmmobilize zeytin β -glukozidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, KM ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri.

Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Enzim İle İmmobilize Nanopartikül Miktarı(mg)	50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Tüpteki Toplam Hacmi (μ l)	Tüpteki Substrat Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	1/V x 10 ⁻³	1/[S]
100	0,01	900	1000	0,5	0,067	92,01	10,87	2,00
200		800		1	0,123	168,02	5,95	1,00
300		700		1,5	0,15	205,56	4,86	0,67
500		500		2,5	0,174	236,99	4,22	0,40
600		400		3	0,189	257,72	3,88	0,33
800		200		4	0,198	270,19	3,70	0,25
900		100		4,5	0,204	278,86	3,59	0,22
1000		0		5	0,229	311,79	3,21	0,20

3.4.2.4 İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Oleuropein Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değeri

İmmobilize zeytin β -glukozidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla oleuropein substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı V (EU/mL) olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.27'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Elde edilen grafik denkleminde yola çıkarak immobilize zeytin β -glukozidaz enzimine ilişkin K_M değeri 6 mM ve V_{max} değeri 2000 EU olarak hesaplandı.



Şekil 3.27: İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Oleuropein Substratına Karşı K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.16: İmmobilize zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratı kullanılarak, KM ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri.

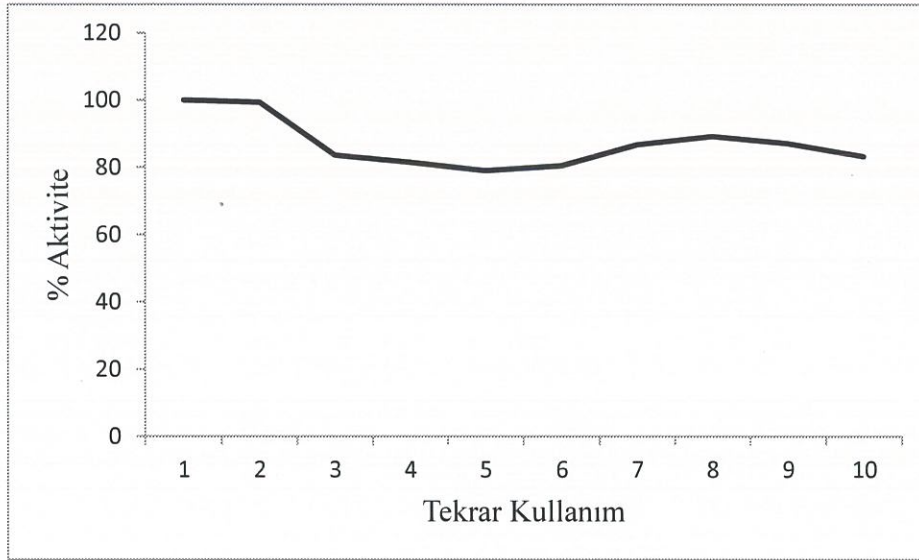
Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Enzim İle İmmobilize Nanopartikül Miktarı(mg)	50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Tüpteki Toplam Hacmi (μ l)	Tüpteki Substrat Kons. (mM)	Abs. 405 nm	Aktivite (EU/mL)	1/V x 10 ⁻³	1/[S]
100	0,01	900	1000	0,5	0,121	165,18	6,05	2,00
200		800		1	0,218	296,61	3,37	1,00
300		700		1,5	0,275	373,85	2,67	0,67
400		600		2	0,371	503,93	1,98	0,50
500		500		2,5	0,492	667,89	1,50	0,40
600		400		3	0,556	754,61	1,33	0,33
800		200		4	0,695	942,95	1,06	0,25
1000		0		5	0,731	991,73	1,01	0,20

Tablo 3.17: İmmobilize Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı K_M , V_{max} ve V_{max} / K_M değerleri.

Substrat	V_{max} (EU)	K_m (mM)	V_{max}/K_m
pNPG	384,61	1,34	287,02
Oleuropein	2000	6	333,3

3.4.2.5 İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin pNPG Substratına Karşı Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize zeytin β -glukosidaz enziminin tekrar kullanılabilirlik potansiyelinin belirlenmesi amacıyla pNPG substratı kullanılarak aynı immobilize enzim kompleksinden 10 kez art arda aktivite bakıldı. Bölüm 2.2.7.3' te belirtilen yöntemle enzim aktivitesi belirlendi.



Şekil 3.28: İmmobilize β -Glukosidaz Enziminin Tekrar Kullanım Grafiği

Elde edilen grafikten immobilize zeytin β -glukozidaz enziminin en yüksek %20 aktivite kaybı gösterdiği belirlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, β -glukozidaz enzimini zeytin meyvesinden saflaştırılarak, süperparamanyetik özelliğe sahip Fe_3O_4 nanopartiküllerine immobilize edilmiştir. β -glukozidaz enzimlerini saflaştırma işlemine ilk basamak olarak amonyum sülfat çöktürmesiyle başlanmış ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi uygulanarak saflaştırma katsayısının artması sağlanmıştır. Uygulanmış olan saflaştırma disiplinlerinden sonra elde edilen saf enzimin kinetik özellikleri incelenmiştir. İmmobilizasyon işleminde ilk çalışmalar nanopartikülleri aktiveleştirme işlemiyle başlamıştır. Karbodiimide ile aktiveleştirilen Fe_3O_4 nanopartiküller üzerine β -glukozidaz enziminin kovalent bağlanması sağlanmış ve immobilize enzimin bazı kinetik özellikleri belirlenmiştir.

Zeytin meyvesinden β -glukozidaz enzimi saflaştırılması için ham ekstrakt hazırlama işlemi iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk basamak olarak zeytin meyvesinden aseton tozu hazırlanmıştır. Bu sayede zeytin meyvesinde oldukça yüksek miktarlarda bulunan yağ ve fenolik bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Literatürde farklı araştırmacılar tarafından kiraz meyvesinden [45] ve çay yapraklarından [68] yapılan saflaştırmalarda da aseton tozu hazırlandığı görülmektedir. Temel saflaştırma işleminin ikinci basamağında ise aseton tozundan ham ekstrakt hazırlanarak amonyum sülfat çöktürmesi tekniğine kaynak hazırlanmıştır.

Zeytin meyvesinden toplam β -glukozidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme işleminde tuz konsantrasyon aralığı %50 olarak belirlenmiş [30] ve amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürmesi işleminin midye [42], pirinç [43], kiraz [45] ve erik [50] gibi materyallerden enzim saflaştırırken kullanıldığını belirledik. Çalışmalar sonunda zeytin meyvesinden β -glukozidaz enzimi % 97,30 verimle 12,47 kat saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonundaki bu değerlerin, kirazdan saflaştırılan β -glukozidaz enzimi için %98 verimle 1.9 kat [45], çaydan yapılan saflaştırmada %50.6 verimle 7.6 kat [68] olduğu görülmektedir. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürme basamağı sonunda elde

edilen saflaştırma katsayısının belirtilen diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi kullanılarak iki aşamalı saflaştırma işlemi yapılmıştır. Az sayıda saflaştırma basamağı uygulanarak enzimin aktivitesini kaybetmemesi sağlanmıştır. Saflaştırma işlemine devam etmek için çözelti içinde mevcut bulunan tuzun uzaklaştırılması gerekmemektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi işleminde, laboratuvarımızda sentezlenmiş olan sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılmıştır [89]. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda yüksek aktivite gösteren numune tüpleri birleştirilmiş ve bu sayede saf enzim çalışmalarında kullanılmak üzere gerekli miktarda saf enzim elde edilmiştir.

Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda söz konusu enzim % 9,90 verimle 163,62 kat saflaştırılmıştır. Kara ve diğ. [40] tarafından yapılan aynı yapıya sahip hidrofobik jelle zeytin β -glukozidaz enziminin iki aşamalı saflaştırmasında % 53,92 verimle 154,93 kat saflaştırdıkları bildirilmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada zeytin β -glukozidaz enziminin koyun ciğeri [40], midye [42], kirazdan [45], vanilyadan [47], aleo vera [48] dan yapılan saflaştırma çalışmalarına göre daha yüksek verimde saflaştırıldığı görülmektedir.

Saflaştırma kat sayısının yüksek olmasının en önemli sebeplerinden biri de saflaştırmanın iki basamaklı bir sistemle yapılarak enzim kaybının en aza indirilmiş olmasıdır.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda zeytin β -glukozidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmıştır. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi uygulama sonucunda SDS PAGE'de yaklaşık 42 kDa hizasında tek bant verdiği gözlemlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada zeytin β -glukozidaz enziminin yaklaşık 42 kDa hizasında tek bant göstermesi, literatürdeki sonuçlarla farklılık göstermektedir. Bu değişkenliğe sebep olan etkenin saflaştırılması yapılan zeytin çeşitlerinin farklı olmasıdır diye düşünülmektedir.

Saflaştırdığımız zeytin β -glukozidaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Zeytin β -glukozidaz enzimi için optimum pH 5,5

ve optimum sıcaklık 50 °C olarak tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık çalışmasında β -glukozidaz enziminin doğal substratı olan oleuropein de çalışmalara katılmıştır. Zeytin β -glukozidaz enziminin doğal substratı olan oleuropeinin optimum sıcaklık değeri 35 °C olarak belirlenmiştir. Oleuropeinin daha düşük sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda tespit ettiğimiz optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinin literatürde yapılan diğer bitki β -glukosidaz enzimlerinin optimum değerleriyle benzerlik göstermiştir.

Zeytin β -glukozidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek amacıyla 70 °C 'de belirli zaman aralıklarıyla aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışma sonucunda termal inkübasyonun 6 dk sonunda enzimin aktivitesini % 54, 30 dk sonunda ise % 4,8 koruduğu tespit edilmiştir.

Zeytin β -glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı aktivitesi belirlendi. Bu çalışma için *p*NPG ve oleuropein olmak üzere iki farklı substrat kullanıldı. Substrat konsantrasyonunun 2.5 mM olarak hazırlandığı çalışmada saflaştırılan enzimin *p*NPG substratına karşı oleuropein substratında 5 kat fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmanın devamında zeytin β -glukozidaz enziminin substratlarına karşı olan ilgisinin belirlenmesi amacıyla K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Saf enzim kullanılarak yapılan çalışmalarda kinetik değerler *p*NPG substratı için K_M değeri 0,37 mM ve V_{max} değeri 370,37 EU olarak belirlenmiş, katalitik etkinliğin ölçüsü olan V_{max} / K_M oranı 1001 olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratı için K_M değeri 1,7 mM ve V_{max} değeri 1000 EU olarak belirlenmiş ve V_{max} / K_M değeri 588,23 olarak hesaplanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz sonuçların diğer çalışmalarla [30] uyumlu olduğu görülmektedir. Doğal oleuropein substratının da saflaştırılan enzime karşı ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Gıda sanayiinde zeytin acılık giderme çalışmalarında ve zeytin β -glukozidaz enzimi üzerine genel olarak inhibitor etkisi gösteren glukoz, laktik asit, sodyum klorür, sodyum hidroksit ve sitrik asidin IC_{50} değerleri hesaplandı. Glukozun *p*NPG substratı varlığındaki zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği IC_{50} değerini 23,33 mM olduğu tespit edilmiştir. Aynı prosedür ile yapılan diğer çalışmalarda sitrik asidin IC_{50} değeri 12,27, laktik asidin

IC₅₀ değeri ise 145,7 mM olarak belirlenmiştir. Laktik asidin zeytin β-glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Sodyum klorürle yapılan çalışmalarda ise inhibitör molaritesine göre düzenli sonuçlar vermediği saptanmıştır. Sodyum klorürün düşük inhibitor konsantrasyonlarında inhibe etkisi gözlemlenirken, yüksek konsantrasyonlarda ise aktive edici özelliği belirlenmiştir. Yaptığımız diğer çalışmada ise sodyum hidroksitin zeytin β-glukozidaz enzimi üzerine aktive edici özelliği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan dolayı IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Zeytin meyvesinden saflaştırılan β-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine Ni⁺¹, Zn⁺¹, Cr⁺¹, Mn⁺², Mg⁺² ve Co⁺¹ ağır metal iyonlarının etkisi araştırılmıştır. Çalışılan ağır metallerin tamamının enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. 1,75 mM *p*NPG substratı ve 1 mM ağır metal bulunan reaksiyon ortamındaki relative aktivite; Zn⁺¹ için % 91, Ni⁺¹ için % 74, Cr⁺¹ için 59, Mn⁺² için % 76, Mg⁺² için % 67, ve Co⁺¹ için % 65 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda zeytin tarımında oldukça sık kullanılan deltamethrin, chlorpyrifos ve alphacypermethrin pestisitlerinin zeytin meyvesinden saflaştırılan β-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalar sonucunda deltamethrinin *p*NPG substratı varlığında zeytin β-glukozidaz enzimini inhibe ettiği belirlenmiş ve IC₅₀ değerinin 0,0323 mM olduğu belirlenmiştir. Çalışılan diğer bir pestisit olan alphacypermethrinin IC₅₀ değeri 13,29 mM olarak belirlenmiş ve chlorpyrifosun IC₅₀ değeri ise 1,25 mM olarak belirlenmiştir.

İki aşamalı olarak yaptığımız saflaştırma işlemlerinden sonra elde ettiğimiz zeytin β-glukozidaz karbodiimide aracılığıyla süperparamanyetik Fe₃O₄ nanopartiküllere kovalent olarak bağlanmıştır. Literatürde β-glukozidaz enzimi için birçok immobilizasyon tekniği ve immobilizasyon materyali mevcuttur. Deneysel zeminde yaptığımız immobilizasyon çalışmasını FT-IR spektrumu ile destekleyerek immobilizasyon yönteminin gerçekleştiği gösterilmiştir. Elde edilen nanoparçacık-enzim kompleksinin saf enzime göre daha yüksek aktivite göstermesi ve kararlılığın artması beklenmiştir. İmmobilize enzim üzerine yaptığımız çalışmalarda bunu desteklemektedir.

İmmobilize zeytin β -glukozidaz enziminin biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla immobilize enzimin optimum pH'ı belirlendi. Elde edilen optimum pH değeri 5,5 olarak hesaplandı. Serbest zeytin β -glukosidaz enziminin optimum pH değeri 5,5 olarak hesaplanmıştı. Bu doğrultuda immobilizasyonun optimum pH üzerine bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Ancak immobilize enzimin daha geniş bir pH aralığında aktivite gösterdiği analiz edilmiştir.

Çalışmamızda immobilize zeytin β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklığı 55 °C olarak belirlendi. Serbest zeytin β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklığı 50 °C olarak belirlendiği için immobilizasyonun optimum sıcaklık değerini 5°C arttırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonucun sebebi olarak enzimin immobilizasyon işleminden sonra meydana gelen bağ yapılarıyla daha kararlı hale geldiği gösterilebilir. Literatürde yapılan araştırmalarda immobilizasyon işlemlerinin optimum sıcaklığı belirli oranlarda arttırdığı görülmüştür [90].

İmmobilize β -glukozidaz enziminin *p*NPG ve oleuropein substratlarına karşı ilgisini belirlemek amacıyla K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. *p*NPG substratına karşı immobilize enzimin K_M değeri 1,34 mM, V_{max} ise 384,61 EU olarak tesbit edilmiştir. Serbest zeytin β -glukozidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri sırası ile 0,37 mM, 370,37 EU olarak belirlenmişti. Oleuropein substratına karşı immobilize β -glukozidaz enziminin K_M değeri 6 mM, V_{max} ise 2000 EU olarak tesbit edilmiştir. Serbest zeytin β -glukozidaz enziminin oleuropein substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri sırası ile 1,7 mM, 1000 EU olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre immobilizasyon işlemi V_{max} değerini arttırarak enzimin kataliz hızını maximum seviyelere yükseltmiştir.

İmmobilize zeytin β -glukosidaz enziminin tekrar kullanılabilirlik sayısının belirlenmesi amacıyla *p*NPG substratı kullanılarak aynı immobilize enzim kompleksinden 10 kez art arda aktivite bakıldı. Yapılan deneysel çalışmanın sonucunda 10 kez kullanım sonunda enzimin aktivitesini %20 oranında kaybettiği belirlenmiştir. İmmobilize enzimin tekrar kullanım sonucunda bile aktivitesini oldukça yüksek oranda koruduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız deneysel çalışmalar neticesinde saflaştırılmış olan zeytin β -glukozidaz enzimi süperparamanyetik nanoparçacıklara immobilize edilerek daha kararlı bir hale gelmiştir ve enzimin tekrar kullanılabilirlik özelliğinin

pekiştirilmesi sağlanmıştır. Bu sayede nanoparçacık-enzim kompleksinin gıda sanayinde acılık giderme ve tatlandırma çalışmalarında kullanılmasını sağlamıştır. Elde edilen kompleks sayesinde tekrar kullanıma hazır hale gelen enzim, zeytincilikte üretim aşamalarında oldukça rahat ve güvenli bir şekilde kullanılabilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Eren Kıran, O., Comlekcioglu, U., Dostbil, N., “Bazı Mikrobiyal Enzimlerin Endustrideki Kullanım Alanları”, *KSU Fen ve Muhendislik Dergisi* 9:1, (2006).
- [2] Ertunga, N.S. “Termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun fruktoz-1,6-bifosfat Aldolaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu” Doktora Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, (2006).
- [3] Smith, A.D, (Ed) et al. “Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology” Oxford University Press, (1997).
- [4] Telefoncu, A. “Enzimoloji”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-305, (1997).
- [5] 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).
- [6] Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Robinson, R.C., Yuvaniyama, J., Oonant, W., Bevan, D.R., Esen, A., Chen, C.-J., Opassiri, R., Svasti, J., and Cairns, J.R.K., “Structural Insights into Rice Bglu1 [Beta]-Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation” , *Journal of Molecular Biology*, 377(4), 1200-1215, (2008).
- [7] Wallecha, A. and Mishra, S., "Purification and Characterization of Two [Beta]-Glucosidases from a Thermo-Tolerant Yeast *Pichia Etchellsii*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1649(1), 74-84, (2003).

- [8] Taqieddin, E. and Amiji, M. "Enzyme immobilization in novel alginatechitosan core-shell microcapsules" , *Biomaterials* 25: 1937-1945, (2004).
- [9] Ovsejevi, K., Grazu, V., Cuadra, K., Batista-Viera, F. , "Enzyme reduction on solid phase as a tool fort he reversible immobilizastion of yeast β -galactosidase onto a thiol-reactive support" , *Enxyme and Microbial Technology* 35: 203-209, (2004).
- [10] Aktan, N. ve Kalkan, H. Sofralık Zeytin Teknolojisi, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, (2000).
- [11] "Kew World Checklist of Selected Plant Families, *Olea europaea*", Kew Royal Botanic Gardens, Retrieved December 5, (2014).
- [12] Fernandez, G.A., Diez, M.J.F. and Adams, M.R. Table Olives Production and Processing, *Chapman & Hall*, London, (1997).
- [13] Borcaklı, M., Özay, G. ve Alperden, İ., "Çeşitli Proseslerin Siyah Zeytin Fermantasyonuna Etkileri" , *Kükem Dergisi*, 17, 1, 39-50, (1994).
- [14] Sofralık Zeytin, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, TS-774, (1997).
- [15] http://www.netkayit.com/firma_info.php?iid=1224, (2 Ocak 2016).
- [16] Darcey, L., Klaahsen "Extra Virgın Olive Oil And Vascular Health" , (2008).
- [17] Harwood, J.L., Yaqoop, P. "Nutritional and health aspects of olive oil." *Eur.J.Lipid Sci.Technol.* 104 ,685 – 697, (2002).
- [18] Ketudat Cairns, J. ve Esen, A., "B-Glucosidases", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 3389-3405, (2010).
- [19] Henrissat, B., "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", *Biochem. J.*, 280, 309-316, (1991).

- [20] Henrissat, B. and Davies, G. J., "Structural and sequencebased classification of glycoside hydrolases", *Curr Opin Struct Biol*, 7, 637-644, (1997).
- [21] 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).
- [22] Henrissat, B. and Bairoch, A., "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases", *Biochem J*, 316, 695-696, (1996).
- [23] Esen, A., " β -Glucosidase", (eds: J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen and D. W. S. Wong), *Handbook of Food Enzymology*, New York: Marcel Dekker, 791-803, (2002).
- [24] Sanz-Aparicio, J., Hormoso, J. A., martinez-Ripoll, M. and Lequerica, J., "Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymixia*: insights in to the catalytic activity in family1 glycosyl hydrolases.", *J. Mol. Biol.*, 275, 491-502, (1998).
- [25] A. L., Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., Second Edition, *Lehninger*, New York, 198-239, (1993).
- [26] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. "The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-dimboa, -dimboaglc, and -dhurrin complexes." *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:13555-13560, (2000).
- [27] Henrissat, B. and Davies, G. J. "Glycoside hydrolases and glycosyl-transferases. Families, modules, and implications for genomics", *Plant Physiol*, 124, 1515-1519, (2000).
- [28] Handbook 30 Wang ,Q.D., Ttrimbur, R, (1997).
- [29] Davies, G. and Henrissat, B., "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases", *Structure*, 3, 853-859, (1995).
- [30] Kara, H., " β -Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile *Olea europea* Meyvesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ile Bazı

- Pestisit ve Ağır Metaller Karşı Afinitesinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2010).
- [31] Conn, E., A. Esen (Ed.), ‘‘β-Glycosidases in plants, substrate specificity In β-Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology’’, American Chemical Society, Washington, DC, ACS Symposium Series 533, pp, 15–26, (1993).
- [32] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A, ‘‘The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β-glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β-glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes’’ , Proc Natl Acad Sci USA, 97:13555-13560, (2000).
- [33] Verdoucq, L., Morinier, 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*, (2004).
- [34] 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).
- [35] Kiai, H. ve Hafidi, A. "Chemical Composition Changes in Four Green Olive Cultivars During Spontaneous Fermentation", *Lwt-Food Science and Technology*, 57: 663-670, (2014).
- [36] Cicek, M., and Esen, A. ‘‘Structure and expression of dhurrinase from sorghum’’ , *Plant Physiol*, 116, 1469-1478, (1998).
- [37] Aksoy, V.A., ‘‘β-glikozidaz enziminin bornova misketi üzümünden izolasyonu saflaştırılması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi’’, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2010).

- [38] Patel, V., Tapel, A.L. B-Glucosidase and β -xylosidase of fat kidney. *Biochemistry Biophysics Acta*, 191:653-662, (1969).
- [39] Schreier, H.J., Schreier, P., "Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit", *Phytochemistry*, 25: 2271-2274, (1997).
- [40] Chinchetru, M.A., Cabezas, J.A., Calvo, P., "Purification and characterization of a broad specificity β -glucosidase from sheep liver" , *International Journal of Biochemistry*, 21:469-476, (1989).
- [41] Lecas, M., Gunata, Z.Y., Sopsis, J.C., Bayonove, C.L., "Purification and partial characteriation of β -glucosidase from grape" , *Phytochemistry*, 30: 451-454, (1991).
- [42] Özsoy, N., "Midye manto dokusu β -glukozidazi" , Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (1995).
- [43] Akiyama, T., Hanae, K., and Natao, S., "Acell Wall-Bound β - Glucosidase From Germinated Rice: Purification And Properties", *Phytochemistry*, 48: 49-54, (1997).
- [44] Masayuki, S., Atsushi, I., Hajime, I., "Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings", *Plant Science*, 155: 67-74, (2000).
- [45] Gerardi, C., Federica, B., Angelo, S., Giuseppe. Z. "Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit", *Plant Science*, 160:795-805, (2001).
- [46] Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., Ostle, N., " β - Glucosidase activity in pasture soils", *Applied Soil Ecology*, 20: 157-162, (2002).
- [47] Odoux, E., Chauwin, A., Brillouet, J.M., "Purification

- and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -Dglucosidase”, *J Agric Food Chemistry*, 51: 3168-3173, (2003).
- [48] Yilmaz, T. “Aloe vera yaprak pulpası β -glukozidaz’ın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi”, İstanbul, 48s, (2005).
- [49] Demirkan, G., ‘*Climacocystis borealis*'den β -glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu’, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü., Trabzon, (2009).
- [50] Chen, L., Li, N., Zong, MH., ‘A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus Domestica* seeds: Purification and characterization”, *Process Biochemistry*, 47: 127-132, (2012).
- [51] Compos, N., Bako, L., Brzobohaty, B., Feldwisch, J., Zettl, R., Oland, W., Palme, K. ‘Identification and characterization of a novel phytohormone conjugate specific β -glucosidase activity from maize’, *American Chemical Society*, 533: 205-213, (1993).
- [52] Acar, M., “Mandalina(*Citrus Reticulata*) Meyvesinden Saflaştırılan Beta-Glukozidaz Enziminin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu Ve Meyve Suyu Aroma Arttırma Etkisi ” ,Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [53] Himeno, N. Saburi, W. Wakuta, S. Takeda, R. Matsuura, H. Nabeta, K. Sansenya, S. Cairns, J.R.K. Mori, H. Imai, R. ve Matsui, H., "Identification of Rice Beta-Glucosidase with High Hydrolytic Activity Towards Salicylic Acid Beta-D-Glucoside", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 77: 934-939, (2013).

- [54] Morant, A.V. Jorgensen, K. Jorgensen, C. Paquette, S.M. Sanchez-Perez, R. Moller, B.L. ve Bak, S. "Beta-Glucosidases as Detonators of Plant Chemical Defense", *Phytochemistry*, 69: 1795-1813, (2008).
- [55] Konno, K. Hirayama, C. Yasui, H. ve Nakamura, M. "Enzymatic Activation of Oleuropein: A Protein Crosslinker Used as a Chemical Defense in the Privet Tree", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9159-9164, (1999).
- [56] Spadafora, A. Mazzuca, S. Chiappetta, F.F. Parise, A. Perri, E. ve Innocenti, A.M. "Oleuropein-Specific-B-Glucosidase Activity Marks the Early 60 Response of Olive Fruits (*Olea Europaea*) to Mimed Insect Attack", *Agricultural Sciences in China*, 7: 703-712, (2008).
- [57] Niculescu-Duvaz, I. ve Springer, C.J. "Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (Adept): A Review", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 26: 151-172, (1997).
- [58] Syrigos, K.N. Rowlinson-Busza, G. ve Epenetos, A. "In Vitro Cytotoxicity Following Specific Activation of Amygdalin by Beta-Glucosidase Conjugated to a Bladder Cancer-Associated Monoclonal Antibody", *International Journal of Cancer*, 78: 712-719, (1998).
- [59] Spadafranca, A. Erba, D. Foti, P. ve Testolin, G. "The Consumption of Soy Products Positively Affects DNA Resistance to Oxidative Stress in Healthy Subjects", *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18: E45-E46, (2008).
- [60] Ma, D.-F. Qin, L.-Q. Wang, P.-Y. ve Katoh, R.. "Soy Isoflavone Intake Increases Bone Mineral Density in the Spine of Menopausal Women: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials", *Clinical Nutrition*, 27: 57-64, (2008).
- [61] Ouyang, G. Yao, L. Ruan, K. Song, G. Mao, Y. ve Bao, S. "Genistein Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Human Ovarian Cancer

Cells via Activation of DNA Damage Checkpoint Pathways", *Cell Biology International*, 33: 1237-1244, (2009).

- [62] Mccue, P. ve Shetty, K. "Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 361-367, (2004).
- [63] Lee, K.H. Piao, H.L. Kim, H.-Y. Choi, S.M. Jiang, F. Hartung, W. Hwang, I. Kwak, J.M. Lee, I.-J. ve Hwang, I. "Activation of Glucosidase Via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid", *Cell*, 126: 1109-1120, (2006).
- [64] Thorlby, G. Fourrier, N. ve Warren, G. "The Sensitive To Freezing2 Gene, Required for Freezing Tolerance in Arabidopsis Thaliana, Encodes a Beta-Glucosidase", *Plant Cell*, 16: 2192-2203, (2004).
- [65] Patro, L. Mohapatra, P.K. Biswal, U.C. ve Biswal, B. "Dehydration Induced Loss of Photosynthesis in Arabidopsis Leaves During Senescence is Accompanied by the Reversible Enhancement in the Activity of Cell Wall Beta-Glucosidase", *Journal Of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 137: 49-54, (2014).
- [66] Fujiki, Y. Yoshikawa, Y. Sato, T. Inada, N. Ito, M. Nishida, I. ve Watanabe, A. "Dark-Inducible Genes from Arabidopsis Thaliana are Associated with Leaf Senescence and Repressed by Sugars", *Physiologia Plantarum*, 111: 345-352, (2001).
- [67] Gerardi, C. Blando, F. Santino, A. ve Zacheo, G. "Purification and Characterisation of a Beta-Glucosidase Abundantly Expressed in Ripe Sweet Cherry (*Prunus Avium L.*) Fruit", *Plant Science*, 160: 795-805, (2001).
- [68] Rawat, R. Gulati, A. ve Joshi, R. "Partial Purification and Characterization of Beta-Glucosidase from Tea Shoot", *Journal of Food Biochemistry*, 35: 953-975, (2011).

- [69] Gueguen, Y. Chemardin, P. Janbon, G. Arnaud, A. ve Galzy, P. "A Very Efficient Beta-Glucosidase Catalyst for the Hydrolysis of Flavor Precursors of Wines and Fruit Juices", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2336-2340, (1996).
- [70] Beguin, P. "Molecular biology of cellulose degradation." *Annu. Rev. Microbiol* 44: 219–248, (1990).
- [71] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/12247>, (9 Kasım 2015).
- [72] Bhat, M.K, "Cellulases and related enzymes in biotechnology" , *Biotechnology Advances* 18, 5: 355-383, (2000).
- [73] Twyman, R.M., "Immobilized Enzymes", *Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition*, 523-529, (2005).
- [74] Cao, L., "Immobilised enzymes: science or art", *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217-226, (2005).
- [75] Chase, H. A. and Yang, Y., "Immobilization of α -amilase on poly (vinylalcohol)-coated perfluoro polymer supports for use in enzyme reactors", *Biotechnology and Biochemistry*, 28, 145-154, (1998).
- [76] M. Alvarez-Ícaza and U.Bilitewski, "Mass production of biosensors", *Analytical Chemistry*, 65:11 525-533, (1993).
- [77] A.Telefoncu, Biyoreseptörlerin İmmobilizasyonu, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*, 1999, 42-65, (1998).
- [78] "İmmobilizasyon Ve İmmobilizasyon Yöntemleri" , *Gıda Biyoteknolojisi Uygulama Dersi No: 6* , (2011).

- [79] S. K. Sharma, N. Sehgal and A. Kumar, ‘‘Biomolecules for development of biosensors and their applications’’ , *Current Apply. Phys.* 307-316, (2003).
- [80] A.Telefoncu, ‘‘Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Fiziksel Yöntemler’’ , *Doğa III*, 6-11, (1979).
- [81] Dr. Ülkü Y., ‘‘Pestisitlerin İnsan Ve Çevre Üzerine Etkileri’’ Ankara Nükleer Araştırma Ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, (2001).
- [82] "Deltamethrin Odorless Synthetic Pyrethroid Insecticides". Pest Products.com. Retrieved , (2008).
- [83] Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği, (24 Aralık2015).
- [84] https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorpyrifos#cite_ref-agrochemicals_1-0, (15 Şubat 2015).
- [85] Safety of Pyrethroids for Public Health Use, World Health Organization (WHO / CDS / WHOPES / GCDPP / 2005.10) (WHO/PCS / RA / 2005.1), (2005).
- [86] B. Bigersson, O. Sterner, E. Zimerson, *Chemie und Gesundheit* ‘‘Eine verständliche Einführung in die Toxikologie’’, VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-26455-8, (1988).
- [87] Alexander R., ‘‘Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen’’ , Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, (2002).
- [88] John H. Duffus, Howard G.J. Worth, ‘‘Fundamental toxicology for chemists’’, Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry Information Services, (1998).
- [89] Sinan, S., Köçkar, F. and Arslan, O., ‘‘Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglykosid derived antibiotics’’, *Biochimie*, 88, 565-574, (2006).

- [90] Singh, R. K., Zhang, Y. W., Nguyen, N. P., Jeya, M. and Lee, J. K., “Covalent immobilization of β -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 89, 337-344, (2011).

