

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN FARKLI TAŞIYICILAR
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE FARKLI ÇAY
ÖRNEKLERİ ÜZERİNE AROMA ARTIRICI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Akile ÇELİK

**Danışman
Doç. Dr. Ayşe DİNÇER**



MANİSA-2015

Akile

ÇELİK

**β-GLUKOZİD AZ ENZİMİNİN FARKLI TAŞIYICILAR ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU 2015
VE FARKLI ÇAY ÖRNEKLERİ ÜZERİNE AROMA ARTIRICI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

TEZ ONAYI

Akile Çelik tarafından hazırlanan " **β -Glukozidaz enziminin farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu ve farklı çay örnekleri üzerine aroma artırıcı özelliklerinin incelenmesi**" adlı tez çalışması 02/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Ayşe DİNÇER
Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ayşe DİNÇER
Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Tülin AYDEMİR
Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Figen Zihnioğlu
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Akile ÇELİK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. β -Glukozidaz	4
2.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	6
2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	7
2.3.1. Tutuklama Yöntemleri	9
2.3.1.1. Jelde Tutuklama	9
2.3.1.2. Mikro Kapsülleme	9
2.3.1.3. Lipozom tekniği	9
2.3.2. Bağlama Yöntemleri.....	10
2.3.2.1. Çapraz Bağlama	10
2.3.2.2. Enzim Kopolimerizasyonu	11
2.3.2.3. Taşıyıcıya Bağlama	11
2.3.2.3.1. Fiziksel Adsorpsiyon	11
2.3.2.3.2. İyonik Bağlama	12
2.3.2.3.3. Şelat Bağlama	12
2.3.2.3.4. Biyospesifik Bağlama	13
2.3.2.3.5. Kovalent Bağlama	13
2.4. İmmobilizasyonda Taşıyıcı Seçimi	14
2.4.1. Kitin	15
2.4.2. Kitosan	16
2.4.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp	17
2.5. Uçucu Yağların Tanımı Ve Özellikleri	19
2.5.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri.....	20
2.5.2. Bazı Uçucu Yağlara Örnekler	20
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. p-Nitrofenol Standart Eğrisinin Oluşturulması	24
3.2.2. β -Glukozidaz Aktivite Tayini	25
3.2.3. Protein Tayini.....	26
3.2.4. İmmobilizasyon Verimi Ve Yükleme Etkinliği Hesaplanması.....	26
3.2.5. Kompozit Taşıyıcıların Hazırlanması	27
3.2.5.1. Fe_3O_4 (Manyetit) Hazırlanması	27
3.2.5.2. Kitosan- Fe_3O_4 Kompozit Taşıyıcıların Hazırlanması	27
3.2.5.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpün (MWCNTs) Aktivasyonu.....	28
3.2.5.4. Kitosan-Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs) Taşıyıcıların Hazırlanması.....	28

3.2.6. Kitosan-Fe ₃ O ₄ Kompozit Taşıyıcıların Epiklorohidrin (ECH) İle Aktivasyonu.....	29
3.2.6.1. Epiklorohidrin İle Aktivasyon Süresinin Etkisi	29
3.2.6.2. Epiklorohidrin Konsantrasyonunun Etkisi	30
3.2.7. Kitosan-MWCNTs Kompozit Taşıyıcıların Glutaraldehit (GLA) İle Aktivasyonu	30
3.2.7.1. Glutaraldehit İle Aktivasyon Süresinin Etkisi	31
3.2.7.2. Glutaraldehit Konsantrasyonunun Etkisi.....	31
3.2.8. İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	31
3.2.9. β-Glukozidaz Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	31
3.2.10. Fiziksel Ve Kimyasal Karakterizasyon.....	32
3.2.10.1. Serbest Ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	32
3.2.10.2. Serbest Ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi...	32
3.2.11. Kararlılık Testleri.....	32
3.2.11.1. Termal Kararlılık.....	33
3.2.11.2. pH Kararlılığı	33
3.2.11.3. Operasyonel Kararlılık.....	33
3.2.11.4. Depolama Kararlılığı.....	33
3.2.12. Kinetik Parametreler.....	34
3.2.13. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	34
3.2.14. İmmobilize β-Glukozidaz Enziminin p-NPG Hidrolizinde Kullanımı	34
3.3. Aroma Deneyleri	35
3.3.1. Çay İnfüzyonunun Hazırlanması.....	35
3.3.2. Çay İnfüzyonunun İmmobilize Enzim İle Muamelesi	35
3.3.3. Aroma Bileşenlerinin Analizi	35
3.3.3.1. Aroma Bileşenlerinin Ekstraksiyonu	35
3.3.3.2. Gaz Kromatografisi (GC) Analizi.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Fiziksel Karakterizasyon	37
4.1.1. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	37
4.1.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)	40
4.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	42
4.2. Aktivite Ve Protein Standart Grafikleri.....	46
4.2.1. p-Nitrofenol (p-NP) Standart Eğrisinin Oluşturulması	46
4.2.2. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması.....	47
4.3. Kitosan-Fe ₃ O ₄ Kompozit Taşıyıcılarının Epiklorohidrin (ECH) İle Aktivasyonu.....	47
4.3.1. ECH İle Aktivasyon Süresinin β-Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	47
4.3.2. ECH Konsantrasyonunun β-Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	48
4.4. Kitosan-MWCNTs Kompozit Taşıyıcılarının Glutaraldehit (GLA) İle Aktivasyonu.....	50
4.4.1. GLA İle Aktivasyon Süresinin β-Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	50

4.4.2. GLA Konsantrasyonunun β -Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	51
4.5. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	52
4.5.1. İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	52
4.5.2. β -Glukozidaz Konsantrasyonunun Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	53
4.6. Optimize Edilen Koşullarda İmmobilizasyon Verimi (%) Ve Yükleme Etkinliğinin (%) Hesaplanması.....	54
4.7. Serbest Ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	56
4.8. Serbest Ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Optimum pH' larının Belirlenmesi.....	57
4.9. Kararlılık Testleri	59
4.9.1. Serbest Ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Termal Kararlılığı	59
4.9.2. Serbest Ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin pH Kararlılığı.....	60
4.9.3. Operasyonel Kararlılık	61
4.9.4. Depolama Kararlılığı.....	63
4.10. Serbest Ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	65
4.11. Tekrar Kullanılabilirlik	66
4.12. İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin p-NPG Hidrolizinde Kullanımı .	67
4.13. Gaz Kromatografisi (GC) Analizi.....	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	Absorbans
BSA	Sığır Serum Albümin
CS	Kitosan
ECH	Epiklorohidrin
FID	Alev İyonlaşma Dedektörü
FTIR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
GLA	Glutaraldehit
K_D	Bozunma Katsayısı
K_m	Michealis-Menten Sabiti
MWCNTs	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
p-NP	p-Nitrofenol
p-NPG	p-Nitrofenil-β-D-Glukopiranozid
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
TPP	Tripolifosfat
t_{1/2}	Yarılanma Ömrü
V_{max}	Maksimum Reaksiyon Hızı

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. β -Glukozidaz enziminin yapısı	4
Şekil 2.2 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	8
Şekil 2.3. Enzimin bir kapsül içine tutuklanması.....	9
Şekil 2.4. Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül	10
Şekil 2.5. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu	11
Şekil 2.6. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	12
Şekil 2.7. Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu.....	13
Şekil 2.8. Kitinin molekül yapısı	16
Şekil 2.9. Kitosanın molekül yapısı	16
Şekil 2.10. Çok duvarlı karbon nanotüp	17
Şekil 2.11. Bazı uçucu yağların molekül yapıları	22
Şekil 3.1. MWCNTs' ün H_2SO_4 ve HNO_3 ile aktivasyonu.....	28
Şekil 3.2. Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar	29
Şekil 3.3. Kitosan-MWCNTs taşıyıcının glutaraldehit ile aktivasyonu.....	30
Şekil 3.4. Ekstrakte edilen çay örneği.....	36
Şekil 4.1. Fe_3O_4 , kitosan- Fe_3O_4 kompozit ve kitosanın IR spektrumları.....	38
Şekil 4.2 Kitosan, kitosan-MWCNTs kompozit ve MWCNTs' ün IR spektrumları	38
Şekil 4.3. a) Kitosan b) ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı c) Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı TGA sonuçları.....	40
Şekil 4.4 a) Kitosan b) GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı c) Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı TGA sonuçları	41
Şekil 4.5. a) Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme	42
Şekil 4.6. a) ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme.....	43
Şekil 4.7 a) β -Glukozidaz ile immobilize edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) β -Glukozidaz ile immobilize edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme	43
Şekil 4.8. a) Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme.....	44
Şekil 4.9. a) GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme.....	44
Şekil 4.10. a) β -Glukozidaz ile immobilize edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) β -Glukozidaz ile immobilize edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme.....	45
Şekil 4.11. Kitosan- Fe_3O_4 ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar.....	45
Şekil 4.12. p-Nitrofenol standart eğrisi	46
Şekil 4.13. Protein standart eğrisi	47
Şekil 4.14. Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcıların ECH ile aktivasyon süresinin belirlenmesi	48
Şekil 4.15. ECH konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	49
Şekil 4.16. Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıların GLA ile aktivasyon süresinin belirlenmesi	50

Şekil 4.17. GLA konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	51
Şekil 4.18. İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	53
Şekil 4.19. Enzim immobilizasyonu için optimum β -glukozidaz konsantrasyonunun belirlenmesi	54
Şekil 4.20. Serbest ve immobilize β -glukozidazın optimum sıcaklıklarının belirlenmesi	56
Şekil 4.21. Serbest ve immobilize β -glukozidazın optimum pH' larının belirlenmesi	58
Şekil 4.22. Serbest ve immobilize β -glukozidazın sıcaklık stabilitesi	59
Şekil 4.23. Serbest ve immobilize β -glukozidazın pH stabilitesi	60
Şekil 4.24. İmmobilize β -glukozidaz enziminin operasyonel kararlılığı	62
Şekil 4.25. Serbest ve immobilize β -glukozidazın +4 °C' de depolama kararlılığı	63
Şekil 4.26. Serbest ve immobilize β -glukozidazın oda sıcaklığında depolama kararlılığı	64
Şekil 4.27. β -Glukozidaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	65
Şekil 4.28. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği.....	66
Şekil 4.29. p-NPG' nin kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit taşıyıcılara immobilize edilen β -glukozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarı	68
Şekil 4.30. p-NPG' nin kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılara immobilize edilen β -glukozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarı.....	68
Şekil 4.31. İnfüze edilen çay ve ekstrakte edilen çay örnekleri	69

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri	7
Tablo 2.2. Destek materyalin içerdiği bazı fonksiyonel gruplara göre aktifleştirilebileceği reaktifler, aktifleşme ile oluşan reaktif gruplar, enzimin desteğe kovalent bağlanabileceği gruplar ve bağlanma tipi	14
Tablo 2.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	15
Tablo 2.4. Karbon nanotüplerin kimyasal uygulama alanları	18
Tablo 3.1. p-Nitrofenol eğrisi	24
Tablo 3.2. Aktivite tayini	25
Tablo 4.1. Yaş taşıyıcıların boyutları.....	46
Tablo 4.2. Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit taşıyıcısında kullanılan iki farklı aktivite edici ajanın immobilizasyon verimi üzerine etkisi	49
Tablo 4.3. Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcısında kullanılan iki farklı aktivite edici ajanın immobilizasyon verimi üzerine etkisi.....	52
Tablo 4.4. Kitosan-Fe ₃ O ₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar üzerine optimize edilen koşullarda immobilize edilen β-glukozidaz enziminin % verimi ve % yükleme etkinliği	55
Tablo 4.5. İmmobilize β-glukozidaz enziminin farklı zamanlardaki K _D değerleri	62
Tablo 4.6. Serbest ve immobilize β-glukozidaz enziminin K _M ve V _{max} değerleri	65
Tablo 4.7. Çay örneklerindeki aromatik bileşenlere β-glukozidaz enziminin etkisi	71

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşturulması süresince, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, ilgisiyle ve samimi desteğiyle beni hep yüreklendiren değerli hocam Doç. Dr. Ayşe DİNÇER' e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya 2013-113 kodlu proje kapsamında destek veren Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana destek olan Prof. Dr. Tülin AYDEMİR' e, Arş. Gör. Mustafa CİTTAN ve Arş. Gör. Pelin SÖZEN AKTAŞ'a ve aynı zamanda laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarıma manevi desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Beni yetiştiren, amaçlarımın doğrultusunda ilerlemem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve maddi manevi destekleri ile her zaman yanımda olan annem Hayriye ÇELİK' e ve babam Hasan ÇELİK' e; kardeşim Mustafa ÇELİK' e ve tüm aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Akile ÇELİK

Manisa,2015

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

β -Glukozidaz Enziminin Farklı Taşıyıcılar Üzerine İmmobilizasyonu Ve Farklı Çay Örnekleri Üzerine Aroma Artırıcı Özelliklerinin İncelenmesi

Akile ÇELİK

**Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

Sistemik adı β -D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β -glukozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki β -glukozid bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir. β -Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak bulundukları bildirilmektedir. β -glukozidaz uygun *in vitro* koşulların sağlandığı durumlarda gıda detoksifikasyonu, biyokütle dönüşümü, şarap ve içeceklerde lezzet geliştirmek için kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak gıda, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip çeşitli glikozitlerin sentezinde kullanılabilmektedir. Pek çok β -glukozidazın antioksidan olma, kan glukoz düzeyini düşürme, zırları donma-çözölme hasarlarından koruma, tirozinazı inhibe etme gibi çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. β -glukozidazlar ile ilgili birçok farklı kaynaklardan yola çıkılarak yapılan saflaştırma çalışması olmasına rağmen, bu enzimle sınırlı sayıda immobilizasyon çalışması bulunmaktadır. Enzim immobilizasyonu, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketinin önemli ölçüde kısıtlandığı bir prosestir. Kitosan, enzim immobilizasyonu için ucuz, toksik ve zararlı olmayan bir destektir. Kitosan, mükemmel hidrofilikliğe, yüksek gözeneklilik ve geniş yüzey alanı gibi birçok avantaja sahiptir. Hidroksil ve amino grupları üzerinden enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Kitosan boncuklarının yoğunlukları suya çok yakındır ve dokusu çok yumuşaktır. Kitosanın mekanik kararlılığını artırmak üzere bu çalışmada kitosan, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs) ve Fe₃O₄ gibi materyaller ile karıştırıldı. Hazırlanan kompozit taşıyıcıların karakterizasyonu Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve termal gravimetrik analiz (TGA) ile yapıldı.

β -Glukozidaz enzimi hazırlanan kitosan kompozit taşıyıcılar üzerine kovalent olarak immobilize edildi. İlk kısmında immobilizasyon koşulları optimize edildi. Bunun için optimum çapraz bağlama süresinin ve optimum çapraz bağlayıcı

konsantrasyonunun belirlenmesi ile enzim immobilizasyon süresinin ve enzim konsantrasyonunun etkisi incelendi. Bununla birlikte hem serbest enzim hem de immobilize β -glukozidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi ve sıcaklığın etkisi incelendi. Serbest ve immobilize enzimin termal, pH, ve depolama stabiliteleri karşılaştırılarak, immobilize β -glukozidaz enziminin tekrar kullanılabilirliği ve operasyonel kararlılığı incelendi. Immobilize β -glukozidaz enziminin siyah, yeşil, mate, adaçayı ve melisa çay örneklerinde aroma artıcı etkisi de araştırıldı. Bu çalışmada gaz kromatografisinde yapılan analizler ile linalool, nerol, geraniol, terpineol, benzil alkol ve 2-fenil etanol aromatik öncüllerinin miktarındaki artış izlendi.

Anahtar kelimeler: β -glukozidaz, aroma arttırıcı etkisi, Fe_3O_4 , kitosan, immobilizasyon, MWCNTs

2015, 78 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Immobilization of β -Glucosidase on Different Carriers And Investigation of Aroma-increasing Effect on Different Tea Samples

Akile ÇELİK

**Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe DİNÇER

Systematic name β -D-glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21) are the β -glucosidase enzyme can hydrolyze β -glucoside bonds in oligosaccharides of glucose or other compounds. β -glucosidases are mostly found in microorganisms, animals and plants. Under appropriate in vitro conditions, β -glucosidase is used for food detoxification, biomass conversion and to enhance the flavor of wine and beverages. In addition, it is used for synthesing of various commercial importance glycosides which can be used in food, cosmetics, pharmaceutical and detergent industry. Many β -glucosidases have a variety of important biological activity such as antioxidant, lowering blood glucose levels, membrane protection from freeze-thaw damage, and inhibiting the activity of tyrosinase. Although there are many studies about purification of β - glucosidase from different sources, only a few immobilization studies with this enzyme was reported. Enzyme immobilization, while continuing the catalytic activity of the enzyme, is a process wherein substantially restricted movement. Chitosan is cheap, non-toxic and non-hazardous support for enzyme immobilization. Chitosan has excellent hydrophilicity and has many advantages such as high porosity and large surface area. Enzyme immobilization can be occurred via hydroxyl and amino groups. Chitosan beads' density is very close to the water and its texture is very soft. In this study, in order to increase the chitosan beads' mechanical strength, chitosan is mixed with carbon nanotube (Multiwalled carbon nanotube, MWCNTs) and Fe_3O_4 . Characterization of composite carriers were done by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and the thermal gravimetric analysis (TGA).

In this thesis study, β -glucosidase was immobilized on chitosan composite beads covalently. In the first part of the study, immobilization conditions were optimized. To optimize the immobilization conditions, optimum cross-linking time and cross-linker concentration, effect of β -glucosidase immobilization time and enzyme concentration was examined. In addition, effect of pH and temperature on the activity of free and immobilized β -glucosidase was examined. Also, thermal and storage stability of free and immobilized enzyme was compared. The operational stability and reusability of immobilized β -glucosidase was examined. Aroma-increasing effect of immobilized β -glucosidase on black, green, sage, balm and yerba mate tea samples was investigated. In this study, the increasing ratio of linalool, nerol, geraniol, terpineol, benzyl alcohol and 2-phenylethanol aromatic precursors were monitored by GC analysis.

Key Words: : β -glucosidase, chitosan, Fe_3O_4 , MWCNTs, immobilization, aroma-increasing effect

2015, 78 pages

1. GİRİŞ

β -glukozidazlar(EC 3.2.1.21, β -D-glukopiranozid glukohidrolaz), glukoz ve aglikon grupları örneğin kısa zincirli oligosakkaritler ve disakkaritlerin yanı sıra norizoprenoidler, uçucu fenoller, alifatik alkoller, terpineoller arasındaki β -glukozidik bağlantılarını hidrolize eden enzimlerdir. β -glukozidaz ile ilgili reaksiyonların farmasötik, kozmetik ve deterjan endüstrileri gibi birçok alanda uygulaması vardır. Bu enzim, aynı zamanda, tat endüstrisinde glükozidik bağlı aromaların serbest bırakılması için de kullanılabilir [1].

Bitkisel kökenli besinlerde bulunan ana renklendirici maddeler olan antosiyaninleri hidrolize etme kabiliyetine sahiptir. β -Glukozidaz meyve sularına ve içeceklerin stabilizasyonunda, aromatik bileşiklerin üretiminde ve gıda ve yem ürünlerinin organoleptik özelliklerinin iyileştirilmesin kullanılır. Ayrıca, biyokütle degradasyonu ve selülozik tarımsal artıklarından yakıt etanol üretiminde kullanılır. β -Glukozidaz tüm yaşam alanlarında ortaya çıkar ve besin alımı için selüloz ve diğer karbohidratların degradasyonu ve gelişim düzenlemesi ya da patojen saldırısına karşı kimyasal savunma gibi işlemlerde temel biyolojik roller oynar. β -Glukozidaz bazlı teknoloji maliyeti enzimin yeniden kullanılabilirliğini ve stabilitesini artırarak azaltılabilir [2,3].

Enzimlerin optimum şartlar altında aktivitelerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları, bunlardan pek çok alanda yararlanabilme imkânı vermektedir. Bunlar arasında tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarımı örnek verilebilir. Enzimlerin endüstriyel alanda kullanımı sırasında bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Endüstriyel uygulamaların büyük bir bölümü sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden, kullanılan enzimleri geri kazanmak mümkün değildir. Bu amaçla immobilizasyon kullanılan en önemli yöntemlerden biridir.

İmmobilize enzimlerin endüstriyel alanda kullanımlarının birçok avantajı bulunmaktadır. Enzimin katalitik aktivitelerinin önemli ölçüde kararlı hale gelmesi, tekrar kullanılabilirliği, ürünlerin saf olarak kolaylıkla elde edilebilmesi, çevresel etkilere karşı yüksek stabilitesi, üretimin sürekliliği ve maliyetin azalması enzim immobilizasyonunun avantajları arasında yer almaktadır [4].

Enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan özellikler; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli (poröz) yapı, mekanik stabilite ve uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, makroorganizmalara karşı direnç, ucuzluk, zehirsizlik, rejenere olabilme gibi özelliklerdir. Ayrıca, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalıdır [5].

Kitosan; enzimler için ucuz, toksik ve zararlı olmayan destektir. Kitosan, mükemmel hidrofilisite, yüksek gözeneklilik ve geniş adhezyon alanı gibi birçok avantajlara sahiptir; bütün bunlar enzimlerde düşük sterik engelleme ve bu nedenle düşük kütle transferi direncine yol açar. Kitosanın enzimler ile kolayca bağlantı yapabileceği hidroksil (-OH) ve amino (-NH₂) grupları vardır [6]. Yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar, katyonik polimer olma avantajı ve nanoboyutta kitosan parçacıklarının hazırlanabilmesi özellikle; biyomedikal, kozmetik, gıda, farmasötik sektöründe oldukça ilgi uyandırmıştır [7].

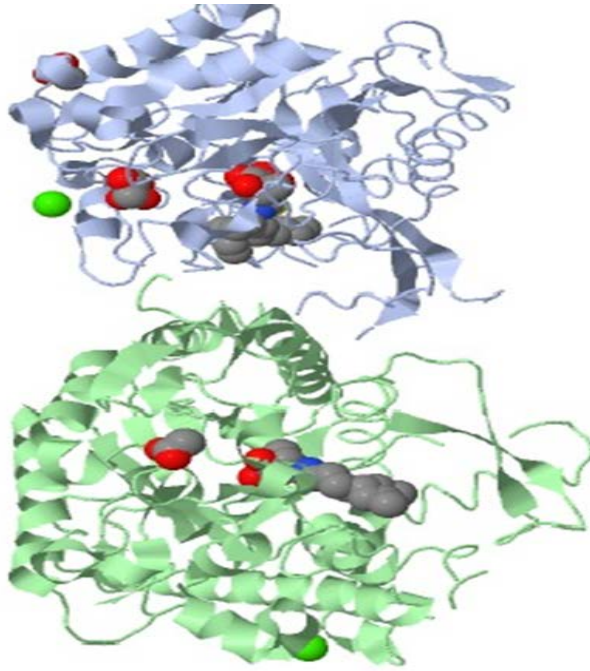
Bu çalışmada, manyetik özellik gösteren Fe₃O₄ parçacıkları ve çok duvarlı karbon nanotüp doğal bir polimer olan kitosana karıştırılarak kompozit taşıyıcılar elde edildi. Kitosan, enzim immobilizasyonu için ucuz, toksik ve zararlı olmayan bir destektir. Kitosan, mükemmel hidrofilikliğe, yüksek gözeneklilik ve geniş yüzey alanı gibi birçok avantaja sahiptir. Hidroksil ve amino grupları üzerinden enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Bu avantajları sebebiyle destek olarak seçildi fakat mekanik gücü zayıf olduğu için Fe₃O₄ ve MWCNTs ile karıştırılarak dayanıklılığı artırıldı. Bu kompozit taşıyıcıların fiziksel karakterizasyonu Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR), termogravimetrik analiz (TGA) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri ile araştırıldı. Hazırlanan kitosan-Fe₃O₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar β -glukozidaz enzimi immobilizasyonu için destek materyal olarak kullanıldı. Daha sonra enzim immobilizasyonu koşulları optimize edildi. Bu amaçla; aktive edici ajanların optimum konsantrasyonu ve süresi, optimum enzim konsantrasyonu ve inkübasyon süresi incelendi. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonundan sonra serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Optimum sıcaklık, optimum pH değerleri ve kinetik

parametreler belirlendi. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin termal, pH, operasyonel ve depo kararlılıkları incelendi. Endüstride kullanım için önemli bir diğer parametre olan tekrar kullanılabilirlik denemesi çalışıldı. Bununla birlikte immobilize enzimin çay örneklerindeki aroma arttırıcı etkisi incelendi. Bunun için immobilize enzim optimum koşullarda çay örnekleriyle inkübe edildi ve gaz kromatografisinde aroma öncül miktarlarındaki yüzdesel artış incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. β -Glukozidaz

Sistemik adı β -D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β -glukozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki β -glukozid bağlarını hidroliz edebilen enzimlerdir. β -Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak bulundukları ve biyolojik yollarda önemli görevlerinin olduğu bildirilmektedir (Şekil 2.1) [8].



Şekil 2.1. β -Glukozidazın yapısı [9]

β -Glukozidazlar tarafından katalizlenen β -glikozidik bağlarının hidrolizi sonucu disakkarit, oligosakkarit ya da konjuge olmuş glukozidler oluşur. Bu yüzden doğada farklı rollere sahip β -glukozidazlar bulunur. Enzimatik sistemdeki mevcudiyetleri bitkinin biyokütlesinin yıkımını ve insanlarda Gaucher's hastalığı gibi moleküler patolojilerin açığa çıkmasını sağlar. β -glukozidazların başka bir önemli özelliği de şekerlerin ve şeker türevlerinin spesifik enzimatik sentezi için önemli olan

transglikozidasyon (glikozidik birimlerin transferi gibi) aktivitesine sahip olmasıdır [10].

In vitro koşulların sağlandığı durumlarda gıda detoksifikasyonunda, biyokütle dönüşümü, şarap ve içeceklerde lezzet geliştirmek için kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak gıda, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip çeşitli glikozitlerin sentezinde kullanılabilmektedir. Zira pek çok β -glukozidazın antioksidan olma, kan glukoz düzeyini düşürme, zarları donma-çözülme hasarlarından koruma, tirozinazı inhibe etme gibi çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Pek çok mikrobiyal β -glukozidaz glukoz tarafından inhibe edilirken bitki kökenliler yüksek glukoz derişimlerine karşı toleranslı oldukları rapor edilmiştir [8].

β -glukozidazlar karbohidratlar üzerine etki eden enzimlerdir ve genel asit baz mekanizması ile oksijen nükleofilleri arasındaki glikozil transferini katalizlerler. Bu da anomerik yapının sabit tutulması ve bir kovalent glikozil-enzim ara ürününün oluşumu ile olur. Fizyolojik şartlar altında böyle bir transfer reaksiyonu genellikle β -glikozidik bağın disakkarit, oligosakkarit ya da konjuge olmuş glukozidlerin hidroliziyle sonuçlanır [10].

β -glukozidazlar tüm canlı organizmalarda birçok biyolojik işlevde rol oynamaktadırlar. Bu sebeple β -glukozidaz enzimleri protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık çalışılmaktadır. β -glukozidazlar (özellikle Familya 1 enzimleri) bitkilerde biyolojik bazı süreçlere katılırlar. Bu süreç; herbivor, insektalar ve bitki zararlılarına karşı savunma, besin kalitesinin artışı, yenilenebilir yakıt üretimi, lignin biyosentezi ve kağıt kalitesinin artışı, sekonder bitki metabolizması ve antikanserijen etkidir.

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birkaç yüz β -glukozidik ürün teşhis edilmiştir. Bu moleküllerin aglikon parçalarının besin kalitesi ve üretimi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak aglikonların ortaya çıkmaları için β -glukozidaz enzimleri tarafından β -glukozidik substratların hidrolize uğraması gerekmektedir. Bu tür biyokimyasal bilgiler, meyve suyu ve meşrubat üretiminde kullanılmaktadır. Üretim sırasında ve ya sonrasında β -glukozidaz enzimi eklendiğinde ürünlerin tat, lezzet,

aroma ve diğ er kalite faktörlerinde artış gözlenmektedir. Aynı Şekilde bu bilgilerin, istenilen özellikte transgenik bitki oluşturulmasında genetik mühendisliği açısından da temel oluŐturacaĐı düşünülmektedir [11].

2.2. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler kimya, biyoteknoloji ve birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. Kullanılan enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız olması, enzimlerin daha ekonomik ve kullanıŐlı hale getirilmesi için yapılan çalıŐmalara hız kazandırmıŐtır [12]. Farklı kaynaklardan izole edilen enzimlerin, aktivitelerini kaybetmeden reaksiyon ortamından geri kazanılmaları olanaksızdır. Bu durum enzimlerin çok spesifik ve pahalı katalizör olmalarına neden olur ve maliyeti yükseltir. Serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanmazlar. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, katalizat rlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltelerde gerçekleştiğinden katalizatör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması olanak dıŐıdır. Söz konusu sebeplerden dolayı immobilizasyon tekniklerinin geliŐtirilmesi ve uygulanması enzimleri endüstride daha çekici ve kullanılabilir duruma getirebilir [12, 13].

Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir. Bir katıya tutundurularak, üzerinden geçen substratların ürünlere dönüŐmesini sağlayan enzimlere immobilize enzimler denir. Enzim immobilizasyonu, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketinin önemli ölçüde kısıtlandığı bir prosestir [14]. İmmobilize olmuş enzimlerde, enzimin hareketleri sınırlandırılmıŐ ve belli bir desteğe veya polimerik matriks’de alıkonularak tekrar tekrar katalitik aktivite göstermesi amaçlanmıŐtır. İmmobilizasyon uygulamaları sadece enzimlere değil ayrıca hücresel organellere, mikrobiyal hücelere, bitki hücrelerine ve hayvan hücrelerine v.b. uygulanabilir. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması 1969 yılında Chibata tarafından gerçekleŐtirilmiŐtir ve yine ilk olarak hücre immobilizasyonu Chibata ve çalışma arkadaşlarınca 1973 yılında yüksek seviyede aspartaz aktivitesine sahip E. Coli’ yi poliakrilamit jelinde hapsetmiŐlerdir [15].

İmmobilizasyon iŐlemiyle bir katıya tutundurulmuŐ enzimin, çözelti içerisindeki bir enzime göre birçok avantajı bulunmaktadır (Tablo 2.1) [12, 13, 14] :

Tablo 2.1. İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri

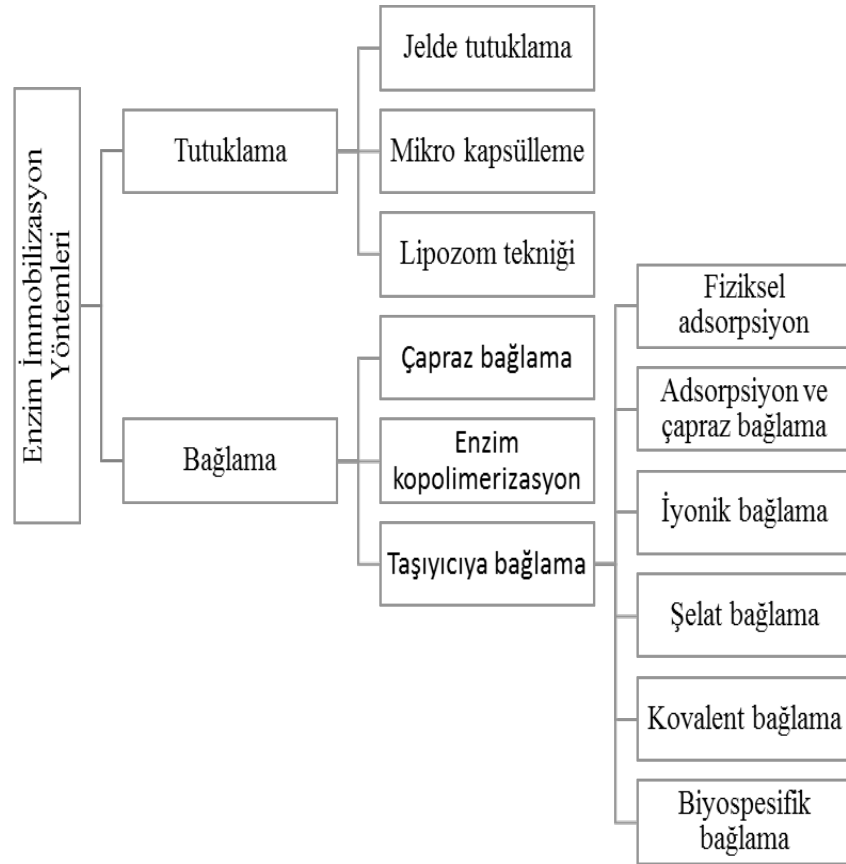
- Enzim birçok kere kullanılabilmekte ve bu da maliyeti düşürmektedir.
- Enzimin ortamdan uzaklaştırılması sonucu reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilmektedir.
- Oluşan ürünlerde enzim kalıntıları bulunmamaktadır (Özellikle gıda ve ilaç sektörleri için enzimin kirletici içermemesi çok önemlidir.).
- Enzimin kararlılığı artmaktadır.
- Enzimin ortamdan ayrılması kolaylaşmaktadır.
- Sürekli sistemde çalışlabilmektedir.
- Ürünün kolayca ayrılması sağlanmaktadır.
- Atık sıvı miktarı azalmaktadır.
- Bazı durumlarda enzimin aktivitesi artmaktadır.
- Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır.
- Enzimin kendi kendisini parçalaması (otoliz) olasılığı azalır.

2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelerle immobilizasyon işlemi sırasında oluşabilecek sorunlara çabuk ve etkili çözümler getirilebilmektedir, ancak her enzim için ayrı ayrı kabul edilen genel bir metot bulunmamaktadır [14].

Her enzim için ideal taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçiminde bilimsel standartların oluştuğunu söylemek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilirken hem immobilize enzimin karakteristikleri ve kullanılacağı alan hem de seçilen yöntem ile taşıyıcı kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliklerinin

uyumuna dikkat edilmelidir. Diğer bir deyişle, enzim mümkün olan en düşük hasarla bağlanmalıdır. Enzimin esansiyel bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyondan kaçınılması istenmektedir. Alternatif olarak, bağlanma sırasında aktif bölge enzim aktivitesini kaybetmeksizin uzaklaştırılabilecek uzun koruyucu gruplar ile korunabilir. Bazı durumlarda koruyuculuk fonksiyonu bir substrat veya enzimin bir yarışmalı inhibitörü tarafından yerine getirilebilir [12, 16]. İmmobilizasyon yöntemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2):



Şekil 2.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması [13]

2.3.1. Tutuklama Yöntemleri

2.3.1.1. Jelde Tutuklama

Jel tutuklama metodunda tutuklama; monomer (akrilamid), oligomerik ve polimerik (kolojen, jelatin, kalsiyum aljinat) maddelerden elde edilen, suda çözünmeyen polimer jellerde gerçekleşir. İlk uygulamaları poliakrilamid jel içerisine tripsin, papain, β -amilaz ve D-fruktoz bifosfat aldolaz enzimleri ile Bernfeld ve Wan tarafından 1963 de yapılmıştır [12, 14].

2.3.1.2. Mikro Kapsülleme

Hapsetme yöntemi ile immobilizasyon, enzimin polimerik bir matriks ya da yarı geçirgen bir membran içerisinde tutuklanmasına dayanır (Şekil 2.3).Mikrokapsül içerisine hapsetmede, enzim molekülleri 10-100 μm çapında olabilen yarı geçirgen membranlar içerisine hapsedilir. Bu metodun avantajları substratla enzime geniş yüzey alanı sağlaması ve sadece tekil enzimler değil, değişik tipte enzimlerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır [14, 17].

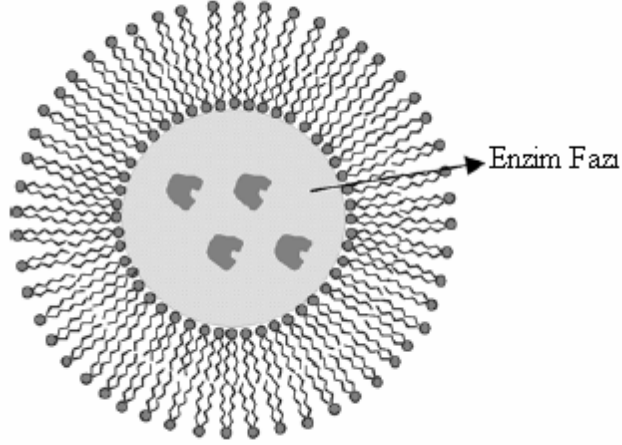


Şekil 2.3. Enzimin bir kapsül içine tutuklanması [17]

2.3.1.3. Lipozom Tekniği

Bu yöntem, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır (Şekil 2.4). Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir. Oldukça büyük bir kontakt

yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır [18].



Şekil 2.4. Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül [18]

2.3.2. Bağlama Tekniği

2.3.2.1. Çapraz Bağlama

Enzimlerin serbest amin ve karboksil gruplarıyla çok fonksiyonlu maddelerin kovalent bağlarla üç boyutlu çapraz bağlanarak enzim kümeleri oluşturmalarıdır. Bu yöntemde enzimleri birbirine bağlamak amacıyla glutaraldehit, diazobenzidin gibi maddeler kullanılır. Bu maddeler, enzim moleküllerini birbirine bağlayarak, çapraz bağlı ve suda çözünmeyen enzim kompleksleri oluştururlar (Şekil 2.5). Bir enzimin kendisi üzerine çapraz bağlanması pahalı ve de yetersiz bir yöntemdir, çünkü bu durumda proteinin bir kısmı taşıyıcı gibi davranmakta ve bu da enzimatik aktivitenin düşmesiyle sonuçlanmaktadır. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon metotlarından biriyle kullanılması daha iyidir [12, 14, 18].



Şekil 2.5. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu [17]

2.3.2.2. Enzim Kopolimerizasyonu

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Yöntem polimer matrikse tutuklanmaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmesi gibi üstünlüğü vardır [18].

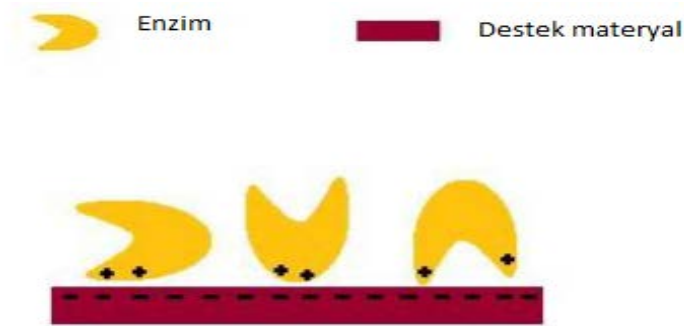
2.3.2.3. Taşıyıcıya Bağlama

Taşıyıcı bağlama metodu en eski immobilizasyon yöntemidir, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması şeklinde gerçekleşir. Bu yöntemde bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır. Fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır.

2.3.2.3.1. Fiziksel Adsorpsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemdir. Yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır (Şekil 2.6). Bu yöntemde hidrofobik bağlanma gerçekleşebilmekte, ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler de etkili olmaktadır. Enzimler bu yöntemle immobilize edildiklerinde, aktifliklerini büyük ölçüde korumaktadırlar. Bu yöntemin avantajı destek materyalinin pH, sıcaklık gibi etkiler sonunda tekrar kullanılabilmesidir. Fakat, adsorplayıcı tarafından zayıf etkileşim kuvvetleri ile tutulan enzimin kullanılması sırasında adsorplayıcıdan uzaklaşması, yöntemin bir dezavantajı

olabilir. Fiziksel adsorpsiyon işleminde genellikle adsorbant olarak alumina, aktif karbon, kil, kolojen, cam ve hidroksilapatit kullanılmaktadır [12, 14, 17].



Şekil 2.6. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu [17]

2.3.2.3.2. İyonik Bağlama

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları içeren bir taşıyıcıya iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. İyonik bağlama metodunda kullanılan taşıyıcılar; organik (seluloz, dekstran) ve inorganik (silika) destek maddeler ile iyon değiştirici kalıntılarından türeyen iyon değiştiricilerdir. İyonik bağlama ve fiziksel adsorpsiyon arasındaki temel fark enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın, iyonik bağlamada çok daha kuvvetli olmasıdır. Bu şekilde enzimin katıya bağlanması fiziksel adsorpsiyondan daha güçlü bir bağlanmadır. İyonik bağlama çok ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin yapısında değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile destek arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur [12, 14].

2.3.2.3.3. Şelat Bağlama

Bu yöntemde, bazı geçiş metallerinin (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır [18].

2.3.2.3.4. Biyospesifik Bağlama

Bu yöntemde, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak enzimler immobilize edilmektedirler. Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır [18].

2.3.2.3.5. Kovalent Bağlama

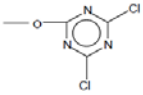
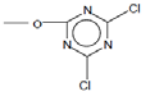
İmmobilizasyon teknikleri arasında en fazla çalışılan tekniktir. Bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzimin nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir (Şekil 2.7). Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH_2), karboksil grubu (CO_2H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur. Kovalent bağlanma yönteminde kullanılacak çok sayıda taşıyıcı vardır, hangi taşıyıcının kullanılacağı taşıyıcının avantaj ve dezavantajları dikkate alınarak seçilmektedir. Kovalent bağlama enzimin aktif merkezini ve konformasyonel yapısını değiştirebilir. Bunun sonucu olarak substrat değişebilir ve/veya aktivitenin büyük bir kısmı kaybedilebilir. Fakat enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvveti oldukça güçlüdür. Substratın varlığında veya iyonik şiddeti yüksek çözeltide bile enzim ayrılmaz [14, 16].



Şekil 2.7. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu [17]

Destek materyalin içerdiği bazı fonksiyonel gruplara göre, aktifleştirmede kullanılacak bazı reaktifler, aktifleşme sonucunda oluşan reaktif gruplar, enzimin desteğe hangi grup üzerinden kovalent bağlanabileceği ve bağlanma türü Tablo 2.2.'de gösterilmiştir [17].

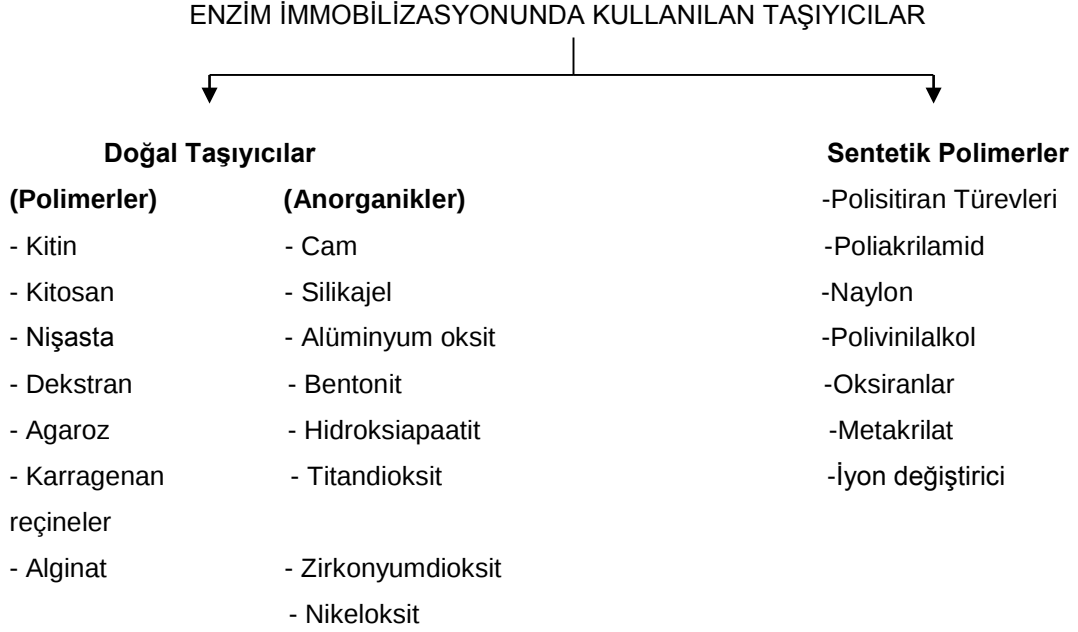
Tablo 2.2. Destek materyalin içerdığı bazı fonksiyonel gruplara göre aktifleştirilebileceği reaktifler, aktifleşme ile oluşan reaktif gruplar, enzimin desteğe kovalent bağlanabileceği gruplar ve bağlanma tipi

Destek materyaldeki grup	Aktifleştirici	Aktifleşmiş yapı	Destek materyalde oluşan reaktif grup	Enzimin reaktif grubu	Bağlanma tipi
-NH ₂	HOC(CH ₂) ₃ CHO (Glutaraldehit)	-N=CH(CH ₂) ₃ CHO	-CHO	-NH ₂	Schiff bazı
-COOH (-CH ₂ OH) (-OH)	R-N=C=N-R', H ⁺ (Karbodiimit)	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{---COO---C---} \\ \\ \text{NH}^+ \\ \\ \text{R}' \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{---COO---C---} \\ \\ \text{NH}^+ \\ \\ \text{R}' \end{array}$	-NH ₂	Peptit bağı
-OH	 (Siyanürik klorür)			-NH ₂	Alkilasyon
-CH ₂ -CH=CH ₂	-	-	-CH ₂ -CH=CH ₂	-NH ₂ , -OH, -SH	Alkilasyon

2.4. İmmobilizasyonda taşıyıcı seçimi

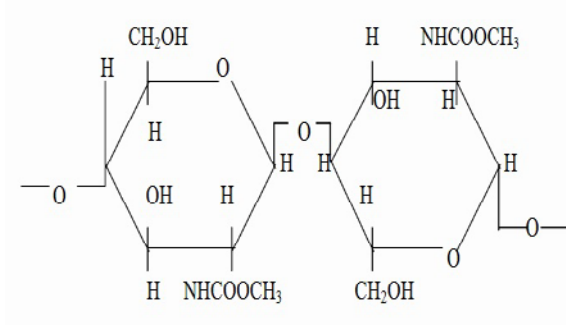
İmmobilizasyon işleminde farklı özelliklere sahip taşıyıcılar kullanılmaktadır. İmmobilizasyonda taşıyıcı seçimi çok önemlidir, çünkü bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır. Taşıyıcının seçilmesi immobilize enzimin performansı açısından büyük önem taşımaktadır. Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelere rağmen her enzim için ayrı ayrı kabul edilen genel bir immobilizasyon metodu bulunmadığı gibi enzimler için evrensel olarak belirlenmiş taşıyıcılar da bulunmamaktadır (Tablo 2.3). Taşıyıcı seçiminde en önemli kriter enzimin cinsidir. Bunun dışında; hidrofilik karakter; suda çözünmeme; gözenekli (poröz) yapı; mekanik stabilite ve uygun parçacık formu; kimyasal veya termal kararlılık; kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda tepkime verebilen gruplar taşımali; mikroorganizmalara karşı dirençlilik; ucuzluk; zehirsizlik; rejenere olabilmelidir [14, 15].

Tablo 2.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar [19]



2.4.1. Kitin

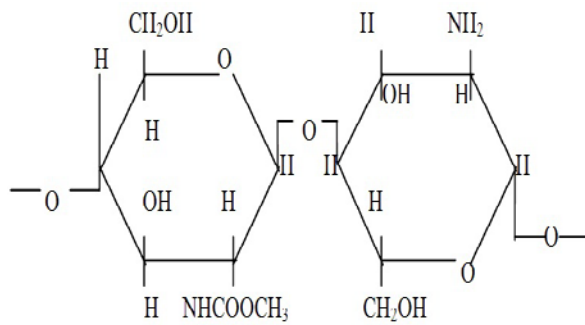
Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunmaktadır. Bir biyopolimer olan kitin, esas olarak poli- $[\beta-(1,4)\text{-}2\text{-asetamid-}2\text{-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$ yapısında olup çok düşük oranda 2-amino-2 deoksi- β -glukopiranoz monomerlerini de içermektedir (Şekil 2.8). Kabuklu su ürünleri artıklarının başta kitin olmak üzere çeşitli ürünlerin eldesi şeklinde değerlendirilmesiyle hem ekonomik açıdan kazanç hem de çevre açısından oldukça büyük yarar sağlanmış olmaktadır [20].



Şekil 2.8. Kitinin moleküler yapısı

2.4.2. Kitosan

Kitosan, kitinden türetilen modifiye bir polisakkarittir, kitinin deasetilasyonu ile üretilmektedir. Kitosanın kimyasal yapısı, poli- $[\beta\text{-(1,4)-2-amino-2-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$ şeklindedir (Şekil 2.9). Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCooCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır.



Şekil 2.9. Kitosanın moleküler yapısı

Kitosanın kullanımını belirleyen özellikleri başta deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı olmak üzere pH, viskozite ve renk şeklinde sıralanmaktadır. Kitosan

günümüzde tıptan gıdaya, ziraatten kozmetiğe, eczacılıktan atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilir. Ayrıca; biyoteknolojide enzim immobilizasyonunun yanında, hücre immobilizasyonunda, protein ayırmada, hücre geri kazanımında ve kromatografik uygulamalarda da kullanılmaktadır [14, 20].

2.4.3 Çok Duvarlı Karbon Nanotüp

Karbon nanotüpler, nanometre ölçeğinde çapa sahip, karbondan yapılan tüp şeklindeki malzemelerdir. Karbon nanotüpler farklı boyda, kalınlıkta, çok katmanlı ve spiral tipte pek çok farklı yapıya sahiptirler. Çok duvarlı karbon nanotüpler, ikiden fazla grafen çepere sahip nanotüplerdir. Çok duvarlı karbon nanotüplerin iç çapları 0,4 - 5 nm, dış çapları ise yaklaşık 15 nm' dir (Şekil 2.10). Grafit tabakasındaki karbon atomları arası kimyasal bağ doğada bilinen en güçlü bağlardan olduğundan, karbon nanotüplerin çok iyi mekanik özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bu durumda bileşik malzemelerin güçlendirilmesinde karbon nanotüpler önemli bir potansiyele sahiptir. Çok duvarlı karbon nanotüplerde (MWCNT) katmanları farklı kristal yapısında olduğundan davranışları komplektir. Grafitin simetrik ve kendine has elektronik yapısı olduğu için, nanotüpün yapısı elektrik özelliklerini etkiler. Bağ yapısı polar olmadığı için, nanotüpler suda çözünmezler ve kimyasal müdahaleler olmadığı sürece bir çözücüde çözünmezler [21, 22].



Şekil 2.10. Çok duvarlı karbon nanotüp [21]

MWCNT' un özel ve sağlam yapısal özellikleri ve morfolojisi katalitik destekler olarak kullanılmak üzere oldukça uygundur. Enzim immobilizasyonunda destek olarak karbon nanotüpleri kullanmak mümkündür [23]. Karbon nanotüpler elektronik malzeme olarak manyetik ve optik nano aygıt yapımında, işlemci, süper iletkenler, ekran, diyot ve elektronik anahtar yapımında, atomik kuvvet mikroskopunda uç malzeme olarak kullanım alanları bulunmaktadır. Çok duvarlı karbon nanotüpler, biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Karbon nanotüplü elektrotlar, karbon nanotüp duvarlarında ve içinde enzimler ve diğer redoks proteinleri tespit etmek için kullanılırlar. Deneyler, küçük proteinlerin basit bir yöntemle karbon nanotüplerin içine yakalanabileceğini göstermiştir. Nanotüplerin kullanıldığı diğer alanlar: tekstil, askeriye, köprülerin çelik halatları ve spor malzemeleri vb. (Tablo 2.4) [21, 22].

Tablo 2.4. Karbon nanotüplerin kimyasal uygulama alanları [22]

Uygulama	Kimyasal modifikasyonun işlevi
Nanoelektronikler	Elektronik bant yapısının lokal modifikasyonu
(Biyo-) kimyasal sensörler	Analit moleküllerinin seçimli tespiti
Katalizör destek malzemeleri	Moleküllerin veya metal nanotaneçiklerin tutturulması
Kompozit malzemeler	Matrisle bağlanma
Alan emisyonu	Tüp uçlarındaki iş fonksiyonunun düşürülmesi
Nanofiltrasyon	Moleküllerin veya iyonların sterik engellerle seçimli geçişi
Yapay kaslar	Çapraz bağlanma ile nanotüp filmlerin kararlılıklarını artırmak
Denetimli ilaç salımı	Hedef moleküllerin tespiti
Farmakoloji	Hücre zarındaki iyon kanallarının bloke edilmesi
Hücre büyümesi	Hücre yüzeyleri ile özel etkileşimler

2.5. Uçucu Yağların Tanımı Ve Özellikleri

Uçucu yağlar bitkilerin yaprak, kabuk, tohum veya kök kısımlarında bulunan ve bu kısımlardan çeşitli yöntemler ile elde edilen; uçucu olan; oda sıcaklığında sıvı ya da yarı katı halde bulunan, hatta bazen reçinemsi olabilen; genelde renksiz veya açık sarı olan fakat bazen karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye ve papatya yağı gibi yeşilden maviye kadar farklı renklerde olabilen; su ile karışmayan ve güzel kokulara sahip uçucu madde karışımlarıdır. Açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden uçucu yağ ve eterik yağ; güzel kokuları olduklarından dolayı da esans gibi isimlerle bilinmektedirler [24].

Fiziksel özellikleri yönünden birbirlerine genellikle benzerler ve genel olarak kırılma indisleri yüksektir. Optikçe aktiftirler ve yağların polarize ışığı spesifik olarak çevirmeleri yağı tanıtmaya yarayan önemli özelliklerden birisidir, kırılma indisinde polarize ışığı çevirmede meydana gelen değişimler, yağın saflığının bozulduğunu gösterir. Uçucu yağlar su ile karışmayan maddeler oldukları halde, kokularının suya geçmesine yetecek oranda suda çözünürler. Petrol eteri, benzen, eter, etanol, hegzan gibi organik çözücülerde çözünürler. Bugüne kadar araştırılan 300 bitki familyasından % 30' dan fazlasının uçucu yağ içerdikleri anlaşılmıştır. Aromatik bitkilerde uçucu yağ oranı % 0,01 ile % 20 arasında değişkenlik göstermektedir [25].

Uçucu yağlar bitkilerin salgı tüyleri, salgı hücreleri, salgı kanalları ve salgı cepheleri gibi kısımlarında meydana gelmektedirler. Bitkilerdeki bu uçucu yağların hangi amaçla oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca uçucu yağ içeren bitkiler genellikle Akdeniz iklimi gibi sıcak iklime sahip bölgelerde yetiştiğinden ötürü, uçucu yağın bitkinin üzerindeki havayı bağlaması ile bitkinin su kaybını önlemesinden ötürü de oluşmuş olabileceği düşünülmektedir [24].

Uçucu yağların bileşiminde bulunan maddelerin tanınması için, bu maddelerin birbirinden ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli destilasyon ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Kromatografik yöntemler arasında en iyi sonuç GC ve GC/MS ile alınmaktadır. Gaz kromatografisinin kolon kısmında ayırım gerçekleştirildikten sonra bileşenler FID dedektöre gönderilmektedir. Elde edilen kromatogramın integrasyonu ile bileşenlerin konsantrasyonu tespit edilebilmektedir.

Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi (GC/MS) ile ise bileşenlerin kimlik tespiti kesin olarak yapılabilmektedir [26].

2.5.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimi

Uçucu yağ, katı ya da sıvı birçok farklı kimyasal bileşiğin birbirinde çözünerek homojen bir çözelti oluşturduğu kompleks bir karışımdır. Kimyasal ve fiziksel özellikler açısından sabit yağlardan oldukça farklıdır. Uçucu yağlar genellikle terpenler ile bunların oksijenli türevleri olan terpenoitlerin karışımından meydana gelmektedir. Uçucu yağların koku ve tadını veren en önemli bileşikler oksijenli türevlerdir. Bu bileşiklerin az da olsa suda çözünürlükleri vardır fakat daha çok alkolde çözünürler. Birçok yağ terpen yapısındaki bileşikleri içermektedir. Fakat tarçın ve karanfil yağı gibi bazı uçucu yağlar terpenlerle karışmış olarak bulunan aromatik türevler de içermektedir. Aslında aromatik halka içeren timol, karvakrol gibi birkaç bileşik yapısal olarak terpenoitlerdir. Bu bileşikler dışında portakal yağı gibi uçucu yağların yapılarında dekanal gibi aldehit bileşikler de bulunmaktadır.

Terpenler izopren birimleri olarak bilinen bir veya birden fazla C_5 birimlerinden oluşmaktadırlar. İzoprenin sistematik adı 2-metil-1,3-bütadiendir. Birçok terpen halka şeklinde bağlanmış izopren birimlerine sahiptir. Bunlar hemiterpenler (C_5H_8), monoterpenler ($C_{10}H_{16}$), seskiterpenler ($C_{15}H_{24}$), diterpenler ($C_{20}H_{32}$), sesterpenler ($C_{25}H_{40}$), triterpenler ($C_{30}H_{48}$), tetraterpenler ($C_{40}H_{64}$) ve politerpenler $[(C_5H_8)_n]$ olarak sınıflandırılmaktadırlar [24].

Küçük molekülü terpenler su buharı destilasyonu ile, büyük molekülü olanlar ekstraksiyon ile, daha büyük molekülü olan terpenler ise kolon ve ince tabaka kromatografisi gibi yöntemlerle ayrılabilirler [27].

2.5.2. Bazı Uçucu Yağlara Örnekler

Geraniol bir monoterpenoid ve bir alkoldür. Gül yağının esasını teşkil eder. Birçok muhtelif esas yağlarda bulunur (Sardunya çiçeğinin yağında). Yağımsı, uçuk sarı renkte bir sıvıdır. Suda çözünmez. Organik çözücülerde çözünür. Tatlı gül kokusu vardır. Tat verici olarak ve parfümeride kullanılır (Şekil 2.11).

Nerol, limon ve şerbetçiotu gibi birçok temel yağlarda bulunan bir monoterpendir. Neroli yağından izole edilmiştir, bu yüzden adı neroldur. Bu renksiz sıvı parfümeride kullanılır. Nerol kolayca diterpen oluşturmak için su kaybeder. Geraniol ile izomerdir (Şekil 2.11) [28].

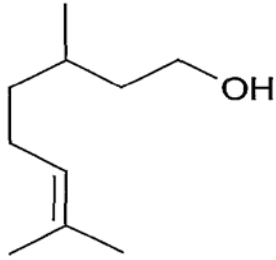
Linalool için zambak kokusu demek tam doğru olmasa da, birçok bitkide farklı enantiomerler halinde bulunan, zambak kokusunu andıran, çiçeksi doğal bir güzel koku molekülüdür. Rasemik karışım hali de enantiomerleri gibi zambak kokusunu andıran, taze, çiçeksi bir kokuya sahip olan renksiz bir sıvıdır. Enantiomerleri arasında çok az da olsa bir koku farkı vardır. Ester halleri ile birlikte, linalool, en sık kullanılan ve oldukça büyük miktarlarda üretilen güzel koku moleküllerinden biridir. Linalool, sahip olduğu çiçeksi kokusu sayesinde, parfümeride, çiçek kokusu karışımlarında (zambak, lavanta, neftyağı) sıklıkla kullanılır. Yüksek uçuculuğu sayesinde, doğal bir koku havası verir. Bazı ortamda kararlı olmasından dolayı, sabun ve deterjanlarda da kullanılır (Şekil 2.11) [29].

Terpineol; cajuput yağı, çam yağı ve petitgrain yağı gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiş olan doğal olarak oluşan bir monoterpen alkoldür. Dört izomeri, alfa, beta, gama-terpinol ve terpinen-4-ol bulunmaktadır. Sadece beta- ve gama-terpinol çift bağın konumu bakımından farklılık göstermektedir. Terpineol, genellikle izomerlerin bir karışımıdır ve ana kurucu madde alfa-terpineol' dur. Terpineol leylak benzer hoş bir kokuya sahiptir ve parfüm, kozmetik, ve gıda sanayinde kullanılmaktadır. α -terpineol Lapsang Souchong çayda en bol bulunan iki aroma bileşenlerinin biridir (Şekil 2.11) [28].

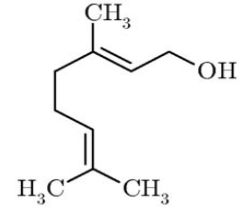
Benzil alkol, $C_6H_5CH_2OH$ formülü ile aromatik bir alkoldür. Hafif ve hoş aromatik kokusu olan benzil alkol renksiz bir sıvıdır. Benzil alkol çoğunlukla meyve ve çaylarda bulunan doğal olarak üretilen uçucu yağdır. Ayrıca yasemin, sümbül ve ylang ylang da dahil olmak üzere temel yağ çeşitleri bulunmaktadır ve kunduz yağı içinde bulunan bileşiklerden de biridir. Bu bileşik kunduz bitkisinden elde edilir. Farmasötik endüstrisinde düşük konsantrasyonlarda benzil alkol, damar içi ilaçları korumak için kullanılır. Cilde uygulandığında uyuşturucu etkisi olduğu için, bölgesel ağrı kesici olarak kullanılır. Mürekkep, boya, epoksi reçine ve lakların üretiminde bir çözücü olarak kullanılır. Kozmetik sektöründe koruyucu, çözücü (solvent), akışkanlık

artırıcı, koku maskeleyici olarak kullanılır. Gıda endüstrisinde kullanılan tatlandırıcı esterleri için öncü madde olarak kullanılır. Fotoğraf sektöründe de yine kullanımı mevcuttur. Nanoteknoloji de nanotellerin dielektroforetik yeniden yapılandırılması için dielektrik çözücü olarak kullanılır (Şekil 2.11) [28, 30].

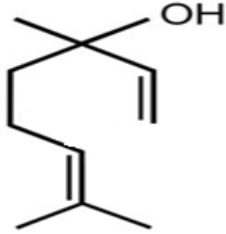
Fenetil alkol ya da 2-fenil etanol doğal bir organik bileşiktir. Doğal yağlarda, gül, karanfil, sümbül de bulunur. Sıvıdır. Çiçek kokuludur. Alkol ve eterle karışır. Tat verici ve parfümeride kullanılır. Göz ilaçlarında da bakterilere karşı kullanılmıştır. Sabunda koruyucu madde olarak da kullanılır (Şekil 2.11).



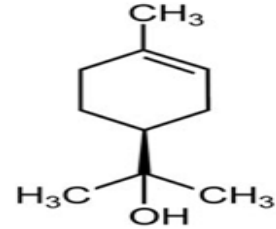
Nerol



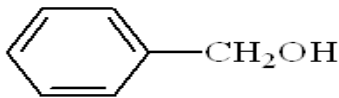
Geraniol



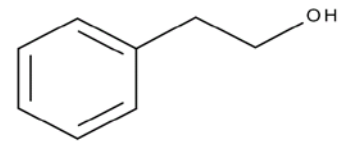
Linalool



Terpeneol



Benzil Alkol



2-Fenil Etanol

Şekil 2.11. Bazı uçucu yağların moleküler yapıları [31, 32]

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasallar β -glukozidaz (β -glucosidase from almonds, 5,3 U/mg ve ≥ 6 U/mg), 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozid (pNPG), p-nitrofenol (p-NP), epiklorohidrin (ECH), PEG, sodyum karbanot (Na_2CO_3), sitrik asit, sodyum sitrat dihidrat, hidroklorik asit (HCl), sığır serum albumin (BSA), glutaraldehit (GLA), o-fosforik asit (o- H_3PO_4), $\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, kitosan (CT), Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWNCTs) (çapı 110-170 nm, uzunluğu 5-9 mikron, 90+%), nitrik Asit (HNO_3), sülfirik Asit (H_2SO_4), coomassie brilliant blue G-250, etanol (% 99), sodyum fosfat pentabazik (TPP), Tris (hidroksimetil) aminometan (Sigma-Aldrich, ABD); sodyum asetat (CH_3COONa), asetik asit (CH_3COOH), dihidrojenfosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojenfosfat (K_2HPO_4), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya), diklorometan (CH_2Cl_2), kaprik asit ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$), sodyum sülfat (Na_2SO_4), amonyak (NH_3).

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer spectrum BX), UV-vis spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU), pH metre (Inolab WTW series), inkübatör (GFL), Magnetic Susceptibility Balance (Sherwood Scientific), Gaz kromatografisi (Agilent 7890A GC system) kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) analizleri hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1. p-Nitrofenol Standart Eğrisinin Oluşturulması

p-Nitrofenol (p-NP) standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,01-0,1 mM aralığında bir seri p-nitrofenol standart çözeltisi pH 5,0 sitrat tamponu içerisinde hazırlanmış olan 0,1 M stok p-nitrofenol çözeltisinden yola çıkılarak hazırlandı. Üzerine 2 ml 1 M Na₂CO₃ çözeltisi eklendi ve 400 nm’de alınan absorbans değerleri ile p-nitrofenol konsantrasyonları arasında standart grafiği çizildi. β-glukozidaz aktivitesinin tayininde enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan p-nitrofenol miktarı, çizilen standart grafiği kullanılarak bulundu (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. p-Nitrofenol standart eğrisi

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Distile Su (mL)	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mM p-NP çözeltisi (µL)	-	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Tampon (µL)	-	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900
1 M Na ₂ CO ₃ çözeltisinden 2 ml eklendi.											
400 nm’ de ölçüm alındı.											

3.2.2. β -Glukozidaz Aktivite Tayini

Bu çalışmada serbest ve immobilize enzim aktivite tayini Su ve ark. kullandıkları yöntem uygulanarak tayin edildi [33]. β -Glukozidaz aktivitesi enzimin yapay substratı olan p-nitrofenil- β -D-glukopiranozid (p-NPG) kullanılarak ölçüldü (Tablo 3.2). Enzimatik reaksiyon 1 M Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek durduruldu. Aktivite tayini, reaksiyon sonrasında enzimatik hidroliz sonrasında açığa çıkan p-NP' un 400 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Bir ünite enzim aktivitesi; 37 °C' de dakikada açığa çıkan μmol p-NP (μmol p-nitrofenol/dk.) olarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.2. Aktivite tayini

	Kör	Örnek
Saf Su	50 μl	—
5 mM p-NPG	950 μl	950 μl
Serbest enzim /	—	50 μl /
İmmobilize β -glukozidaz		50 mg boncuk
İnkübasyon (37° C de 1 dk.)		
1 M Na_2CO_3	2000 μl	2000 μl
400 nm' de ölçüm alınır.		

400 nm’ de ölçüm alındıktan sonra, çizilen p-NP standart grafiğinden absorbans değerlerine karşı gelen konsantrasyon değerleri bulundu ve aktivite hesaplamalarında kullanıldı.

3.2.3. Protein Tayini

Protein miktarlarının tayini Bradford [34] yöntemi ile gerçekleştirildi. Bradford tarafından geliştirilen bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır. Bradford reaktifinin hazırlanması için ilk olarak 40 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml %95’ lik etanolde çözöldü. Çözeltiye 55 ml % 88’ lik fosforik asit eklendi ve hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Standart protein eğrisinin oluşturulması için önce sığır serum albüminin (BSA) distile su ile 1 mg/ml’ lik çözeltisi hazırlandı. Bu stoktan seyrelmeler yapılarak 0,02-0,15 mg/ml konsantrasyon aralığında bir seri standart çözelti hazırlandı. Hazırlanan protein standart çözeltiilerinden 0,1 ml alındı ve üzerlerine 2 ml Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika beklendi ve 595 nm’de absorbans ölçümleri alındı. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyona karşılık grafiğe geçirildi ve standart protein eğrisi oluşturuldu.

3.2.4. İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliğinin Hesaplanması

İmmobilizasyon verim aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\text{İmmobilizasyon verimi: } \frac{a_{\text{imm}}}{a_{\text{serbest}}} \times 100 \text{ (3.1.)}$$

a_{imm} : İmmobilize enzimin spesifik aktivitesi

a_{serbest} : Serbest enzimin spesifik aktivitesi

Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarı, total protein miktarından bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak % yükleme etkinliği hesaplandı.

$$\% \text{ Yükleme etkinliği} = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100 \quad (3.2.)$$

C_i : Serbest enzimin protein miktarı

V_i : Ortama konan enzim çözeltisinin hacmi

C_f : Filtratta bulunan protein miktarı

V_f : Filtrat hacmi

3.2.5. Kompozit Taşıyıcılarının Hazırlanması

3.2.5.1. Fe_3O_4 (Manyetit) Hazırlanması

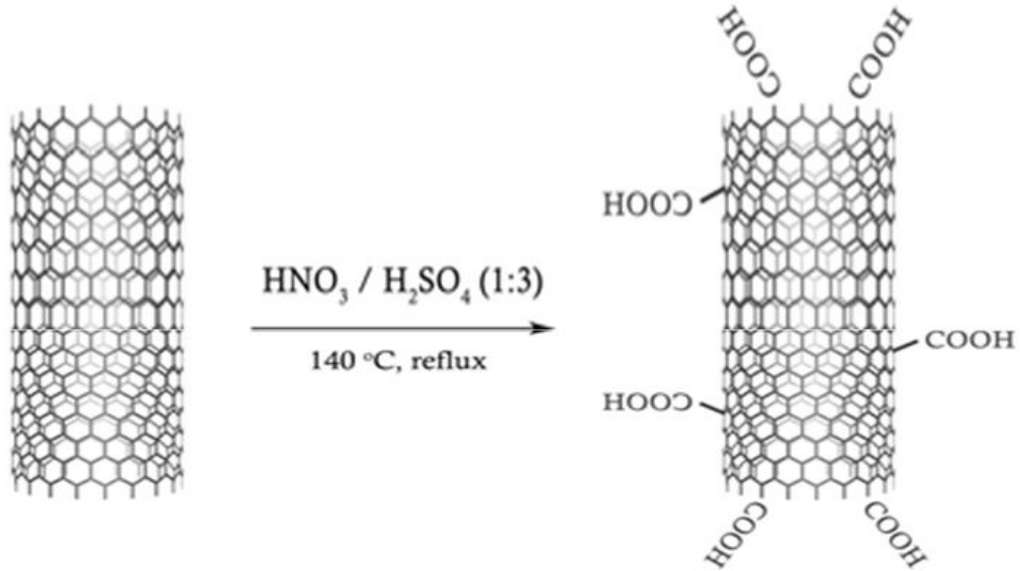
Fe_3O_4 partikülleri Z. Yuanbi ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre sentezlendi [35]. $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}:\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2:3 (mol:mol) oranında tartıldı ve ayrıca 1 g PEG 4000 eklenerek 100 ml deiyonize suda karıştırıldı. Daha sonra ortamın pH'ı 11,0 olacak şekilde sulu amonyak (0,3 mol/L) ile ayarlandı. Fe_3O_4 oluşumundan dolayı çözeltinin renginin siyah olduğu gözlemlendi. Ortamın pH' ı nötr olana kadar saf su ile yıkama yapıldı. Fe_3O_4 partikülleri süzgeç kağıdıyla süzülerek kurutuldu. Elde edilen Fe_3O_4 partiküllerinin manyetik duyarlılığı Magnetic Susceptibility (Sherwood Scientific) cihazıyla ölçüldü.

3.2.5.2. Kitosan- Fe_3O_4 Kompozit Taşıyıcılarının Hazırlanması

2,5 g kitosan %2' lik 100 ml asetik asit çözeltisi içinde çözöldü. Üzerine 1 g Fe_3O_4 partikülleri eklendi. Hazırlanan Fe_3O_4 kitosan süspansiyonu soğuk TPP (pH 8,2) çözeltisi içine ucu kesilmiş iğne yardımı ile damlatıldı, sertleşmesi için soğukta 4 saat karıştırılarak bekletildi. Sertleşen boncuklar süzülerek bol su ile yıkandı ve daha sonra kullanılmak üzere +4 °C' de depolandı.

3.2.5.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpün (MWCNTs) Aktivasyonu

Çok duvarlı karbon nanotüp, 3:1 (v/v) konsantre H_2SO_4 - HNO_3 asit karışımı kullanılarak kimyasal olarak aktive edildi (Şekil 3.1). Aktivasyon işlemi 3,5 saat $55^\circ C$ ' de manyetik karıştırma altında reflüks ile yapıldı. Aktifleştirme ile MWCNT' ün $-COOH$ grupları aktifleştirilerek, karboksil grubu fonksiyonlandırılmış MWCNTs elde edildi (MWCNTs- $COOH$) [36]. Elde edilen MWCNT-asit süspansiyonu santrifüjlenerek, MWCNTs katı olarak ayrıldı. Ayrılan katı nötral olana kadar ultra saf su ile yıkandı ve etüvde kurutuldu.

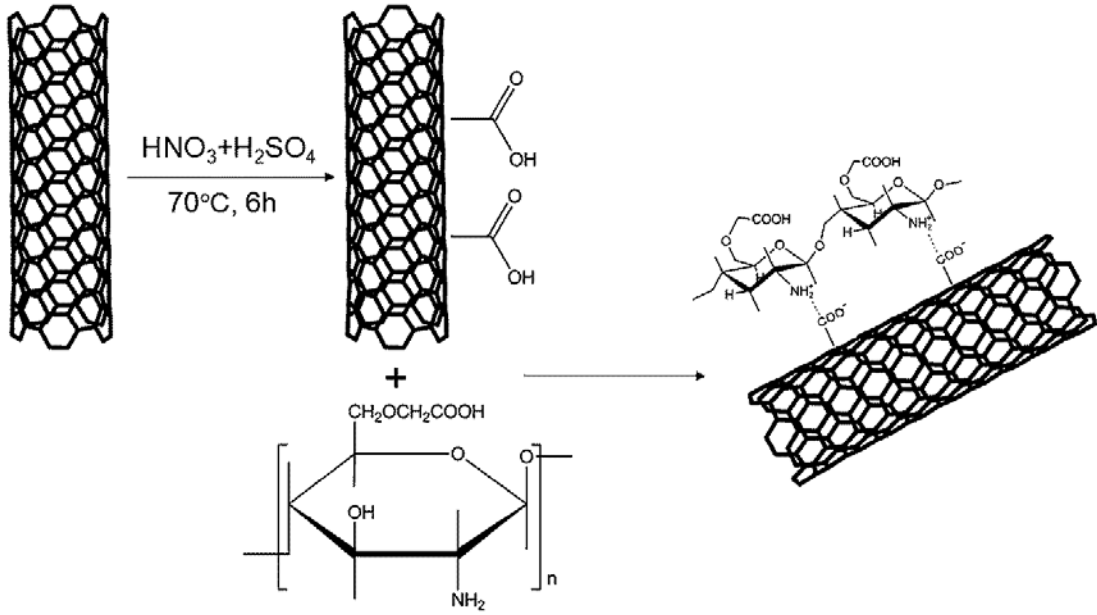


Şekil 3.1. MWCNTs' ün H_2SO_4 ve HNO_3 ile aktivasyonu [37]

3.2.5.4. Kitosan-Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs) Taşıyıcıların Hazırlanması

Kitosan-MWCNTs kompozit boncukları hazırlamak için öncelikle 2,5 g kitosan %2' lik 100 ml asetik asit çözeltisi içinde çözüldü. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiye aktive edilmiş MWCNT den 500 mg eklendi (Şekil 3.2). Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra süspansiyon, TPP (pH:8,2) çözeltisine bir şırınga

yardımı ile damla damla ilave edildi ve oluşan boncukların sertleşmesi için 4 saat bekletildi. Sertleşen boncuklar distile su ile iyice yıkanarak +4 °C’ de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar [38]

3.2.6. Kitosan-Fe₃O₄ Kompozit Taşıyıcıların Epiklorohidrin (ECH) ile Aktivasyonu

Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcıların aktivasyonu ECH ile yapıldı. Bu amaçla ilk olarak optimum çapraz bağlama süresi belirlendi ve sonrasında optimum ECH konsantrasyonu bulundu.

3.2.6.1. Epiklorohidrin ile Aktivasyon Süresinin Etkisi

Optimum çapraz bağlama süresinin belirlenmesi için kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcılar (50 mg) 30-60-120-180-240 dakika sürelerinde 50 mM ECH çözeltisiyle 50 °C’ de aktive edildi. Aktivasyon işleminden sonra 1 mg/ml (0,18 mg protein) konsantrasyonunda hazırlanan 2 ml β-glukozidaz enzim çözeltisi taşıyıcılar üzerine eklenerek, 2 saat inkübe edildi. 400 nm’ de alınan absorbans ölçümleri sonrasında

hesaplanan spesifik aktivite değerleri süreye karşılık grafiğe geçirilerek optimum inkübasyon süresi belirlendi.

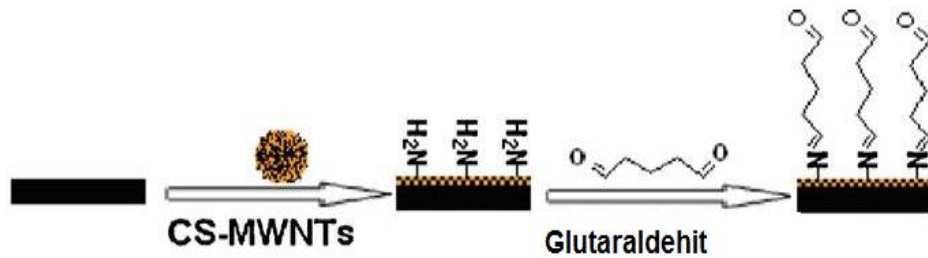
3.2.6.2. Epiklorohidrin Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum ECH konsantrasyonunu belirlemek için kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcılar (50 mg) ECH' in 25-100 mM arasında değişen konsantrasyonlarında aktive edildi. Aktivasyon işleminden sonra 1 mg/ml (0,22 mg protein) konsantrasyonunda hazırlanan 2 ml β-glukozidaz enzim çözeltisi taşıyıcılar üzerine eklenerek, 2 saat inkübe edildi. 400 nm' deki absorbans ölçümlerinin sonucunda immobilize enzim aktiviteleri ölçülerek ECH konsantrasyonuna karşılık spesifik aktivite grafiği çizildi. Çizilen grafikten optimum ECH konsantrasyonu belirlendi.

Aktivasyon çalışmaları karşılaştırma amacı ile optimize edilen koşullar altında GLA aktive edici ajan ile de yapıldı ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak verildi.

3.2.7. Kitosan – MWCNTs Kompozit Taşıyıcıların Glutaraldehit (GLA) ile Aktivasyonu

Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıların aktivasyonu GLA ile yapıldı. Bu amaçla ilk olarak optimum çapraz bağlama süresi belirlendi ve sonrasında optimum GLA konsantrasyonu bulundu. (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Kitosan-MWCNTs taşıyıcının glutaraldehit ile aktivasyonu [36]

3.2.7.1. Glutaraldehit ile Aktivasyon Süresinin Etkisi

Optimum çapraz bağlama süresinin belirlenmesi için kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar (100 mg) 60-120-180-240-300 dakika sürelerinde %1(v/v)'lik GLA çözeltisiyle 37 °C' de aktive edildi. Aktivasyon işleminden sonra 1 mg/ml (0,32 mg protein) konsantrasyonunda hazırlanan 2 ml β -glukozidaz enzim çözeltisi taşıyıcılar üzerine eklenerek, 2 saat inkübe edildi. 400 nm' de alınan absorbans ölçümleri sonrasında hesaplanan spesifik aktivite değerleri süreye karşılık grafiğe geçirilerek optimum inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.7.2. Glutaraldehit Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum GLA konsantrasyonunu belirlemek için kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar (100 mg) GLA' ın % 0,5-3 (v/v) arasında değişen konsantrasyonlarında aktive edildi. Aktivasyon işleminden sonra 1 mg/ml (0,32 mg protein) konsantrasyonunda hazırlanan 2 ml β -glukozidaz enzim çözeltisi taşıyıcılar üzerine eklenerek, 2 saat inkübe edildi. 400 nm' deki absorbans ölçümlerinin sonucunda immobilize enzim aktiviteleri ölçülerek GLA konsantrasyonuna karşılık spesifik aktivite grafiği çizildi. Çizilen grafikten optimum GLA konsantrasyonu belirlendi.

Aktivasyon çalışmaları karşılaştırma amacı ile optimize edilen koşullar altında GLA aktive edici ajan ile de yapıldı ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak verildi

3.2.8. İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Aktive edilen kitosan-Fe₃O₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar üzerine enzimin optimum bağlanma süresinin belirlenmek amacıyla, 60-240 dakika arasında değişen sürelerde 1 mg/ml konsantrasyonunda 2 ml enzim çözeltisi eklendi. Belirtilen sürelerin sonunda immobilize enzim aktiviteleri ölçülerek süreye karşılık spesifik aktivite grafiği çizildi. Çizilen grafikten optimum immobilizasyon süresi belirlendi.

3.2.9. β -Glukozidaz Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum enzim konsantrasyonunu belirlemek için β -glukozidazın 1-2,5 mg/ml arsında değişen konsantrasyonlarda 2 ml enzim çözeltisi kullanıldı. Optimize edilen immobilizasyon sürelerinin sonunda 400 nm’ de aktivite ölçümleri ve protein tayinleri yapıldı ve konsantrasyona karşılık spesifik aktivite grafiği çizilerek optimum konsantrasyon belirlendi.

3.2.10. Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

3.2.10.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimler protein yapısında olduğu için yüksek sıcaklarda denature olmaktadır. Bu sebeple sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi önemlidir.

Serbest ve immobilize β -glukozidaz aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacıyla 25–55 °C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Sıcaklığa karşılık % aktivite grafiği çizilerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.2.10.2. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Optimum pH tespiti için pH 4,0’ de 50 mM asetat, 4,0–6,0 aralığında 50 mM sitrat, 6,0–8,0 aralığında 50 mM fosfat tamponu kullanıldı. Optimum koşullarda yapılan aktivite ölçümleri sonucu pH değerlerine karşılık % aktivite grafiği çizilerek optimum pH değerleri bulundu.

3.2.11. Kararlılık Testleri

Enzim immobilizasyonunun en büyük amaçlarından biri enzimin kararlılığının gerek medikal gerekse endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirlik etkinliğinin artırılmasıdır [16]. Bu kısımda termal kararlılık, pH kararlılığı, operasyonel kararlılık ve depo kararlılığı parametreleri incelendi.

3.2.11.1. Termal Kararlılık

Enzimler protein yapısında oldukları ve ısıya karşı kararlı olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybı hızlanır [16].

İmmobilize boncukların ve serbest enzimin termal kararlılığı, immobilize ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda (4–25-35-45-55 °C) 1 saat inkübe edildikten sonra optimum koşullarda kalan aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlendi.

3.2.11.2. pH Kararlılığı

İmmobilize boncukların serbest enzimin pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla immobilize boncuklar ve serbest enzim pH aralığı 4,0-8,0 arasında değişen tamponlarda 1 saat bekletildikten sonra optimum koşullarda kalan aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.11.3. Operasyonel kararlılık

Enzimlerin operasyonel kararlılığı, immobilize sistemlerin uygulamalarında önemli bir parametredir. Operasyon zamanı ile enzim aktivitesindeki azalma arasındaki ilişki belirlenerek biyokatalizörün yarı ömrü ($t_{1/2}$) hesaplanır [16].

Kitosan-Fe₃O₄ (200 mg) ve kitosan–MWCNTs (100 mg) kompozit taşıyıcılara immobilize enzimin üzerine 50 mM pH 5,0 sitrat tamponunda hazırlanmış olan 5 mM p-NPG çözeltisi eklendi ve 0-240 dk. aralığında 37 °C’ de inkübe edildi. Belirli sürelerde ortamdan örnek alınarak açığa çıkan p-NP miktarları hesaplandı.

3.2.11.4. Depo Kararlılığı

İmmobilize enzim için depolama stabilitesi, enzim özelliklerini değerlendirmek için önemli indeksler bildirir ve serbest enzimden daha avantajlıdır [33].

Depo kararlılığını belirlemek için immobilize enzimler +4 ve 25 °C' de depolandı ve 50 gün boyunca belirli zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.12. Kinetik Parametreler

Serbest enzim ve kitosan–MWCNTs, kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize enzimin Michealis-Menten (K_m) sabitini ve maksimum reaksiyon hızını (V_{max}) hesaplamak için p-NPG' un farklı konsantrasyonlarında aktive ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk (1/V-1/S) grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.13. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

Enzim immobilizasyonunun amaçları arasında enzimlerin birçok kere kullanılmasını sağlayarak maliyeti düşürmek ve enzimlerin kesikli veya sürekli reaktörlerde kullanımlarını sağlamak sayılmaktadır. Bu nedenle immobilize edilen bir enzimin tekrar kullanılabilirlik özelliği çok önemlidir [14].

İmmobilize β -glukozidaz'ın tekrar kullanılabilirlik denemeleri 37 °C' de optimum koşullarda gerçekleştirildi. Karışım 1 dk. inkübatörde bekletildikten sonra immobilize enzim ortamdan ayrıldı ve absorbans ölçümü yapıldı. İmmobilize enzim içeren boncuklar 50 mM pH 5,0 sitrat tamponuyla yıkandı ve aktivite ölçüm prosedürü tekrarlandı.

3.2.14. İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin p-NPG Hidrolizinde Kullanımı

İmmobilize β -glukozidaz enziminin enzimatik substrat hidroliz çalışmalarını gerçekleştirmek için substrat olarak p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (p-NPG) kullanıldı. Hidroliz çalışmaları kesikli karıştırılmalı sistemde gerçekleştirildi.

Kitosan-Fe₃O₄ (200 mg) ve kitosan–MWCNTs (100 mg) kompozit taşıyıcılara immobilize enzimin üzerine 50 mM pH 5,0 sitrat tamponunda hazırlanmış olan 5 mM

p-NPG çözeltisi eklendi ve 37 °C’ de inkübe edildi. Belirli sürelerde ortamdan örnek alınarak hidroliz edilen p-NPG miktarları hesaplandı.

3.3. Aroma Deneyleri

3.3.1. Çay İnfüzyonunun Hazırlanması

20 g çay örneği, 85 °C 200 ml distile su içinde 30 dk. boyunca demlendi. Daha sonra çay infüzyonu gaz kromatografisi analizi için süzüldü.

3.3.2. Çay İnfüzyonunun İmmobilize Enzim ile Muamelesi

200 ml demlenmiş çay örneğine 2 g immobilize β -glukozidaz eklendi ve 2 saat 37 °C’ de inkübe edildi. Sonra gaz kromatografisi analizi için süzüldü.

3.3.3. Aroma Bileşenlerinin Analizi

3.3.3.1. Aroma Bileşenlerinin Ekstraksiyonu

İmmobilize enzim ile muamele edilmiş ve edilmemiş 200 ml çay örneğine 30 ml diklorometan ve iç standart olarak 50 ppm 2 ml kaprik asit eklenerek ekstraksiyon yapıldı (Şekil 3.5). Ekstraksiyon sonrasında elde edilen ekstrat Na_2SO_4 eklenerek bir gece boyunca kurutuldu. Daha sonra 100 μl ’ye azot gazı geçirilerek deriştirildi ve analiz için gaz kromatografisine verildi.



Şekil 3.4. Ekstrakte edilen çay örneği

3.3.3.2. Gaz Kromatografisi (GC) Analizi

- ✓ Enjektör : Splitless
- ✓ Dedektör : Alev iyonlaşma dedektörü (FID)
- ✓ Kolon : OPTIMA-WAXplus kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)
- ✓ Enjeksiyon sıcaklığı : 280 °C
- ✓ Dedektör sıcaklığı : 300 °C
- ✓ Taşıyıcı sıcaklığı : Helyum (16,371 psi basınçta ve 3 mL/dakika akış hızında)
- ✓ Enjeksiyon miktarı : 1 μ L
- ✓ Sıcaklık programı : 50 °C' de 5 dakika beklemeden sonra, dakikada 5 °C artarak 200 °C' ye çıkmış ve orada da 3 dk. beklemiştir.

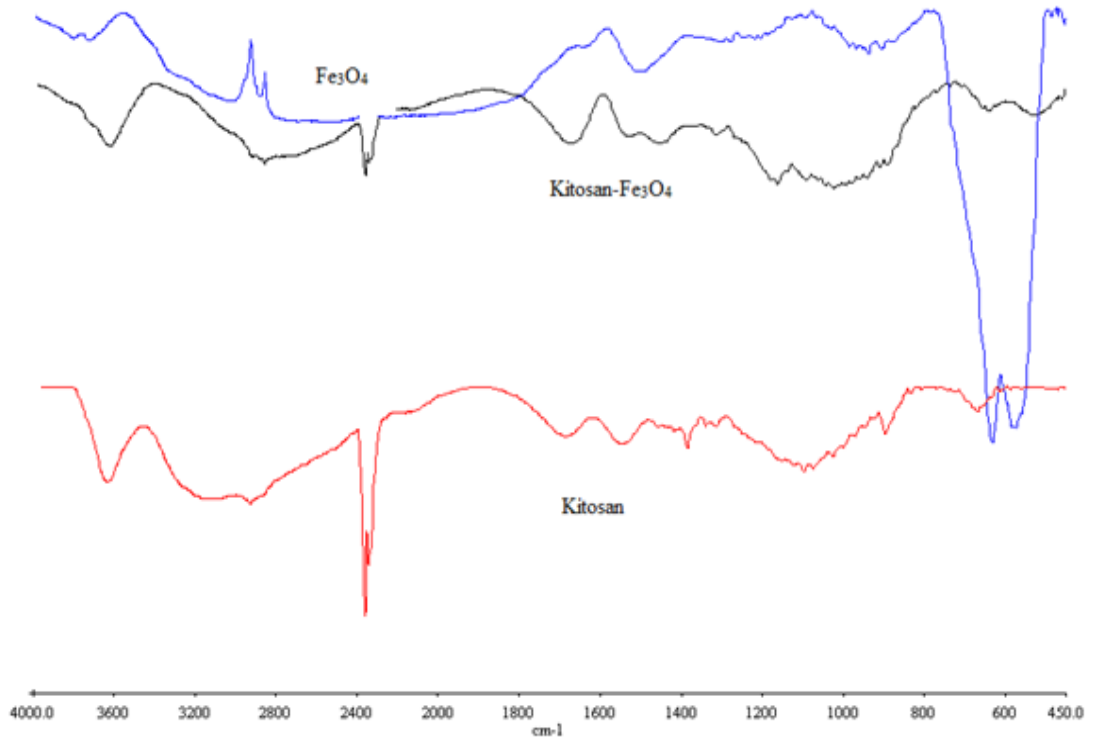
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Fiziksel Karakterizasyon

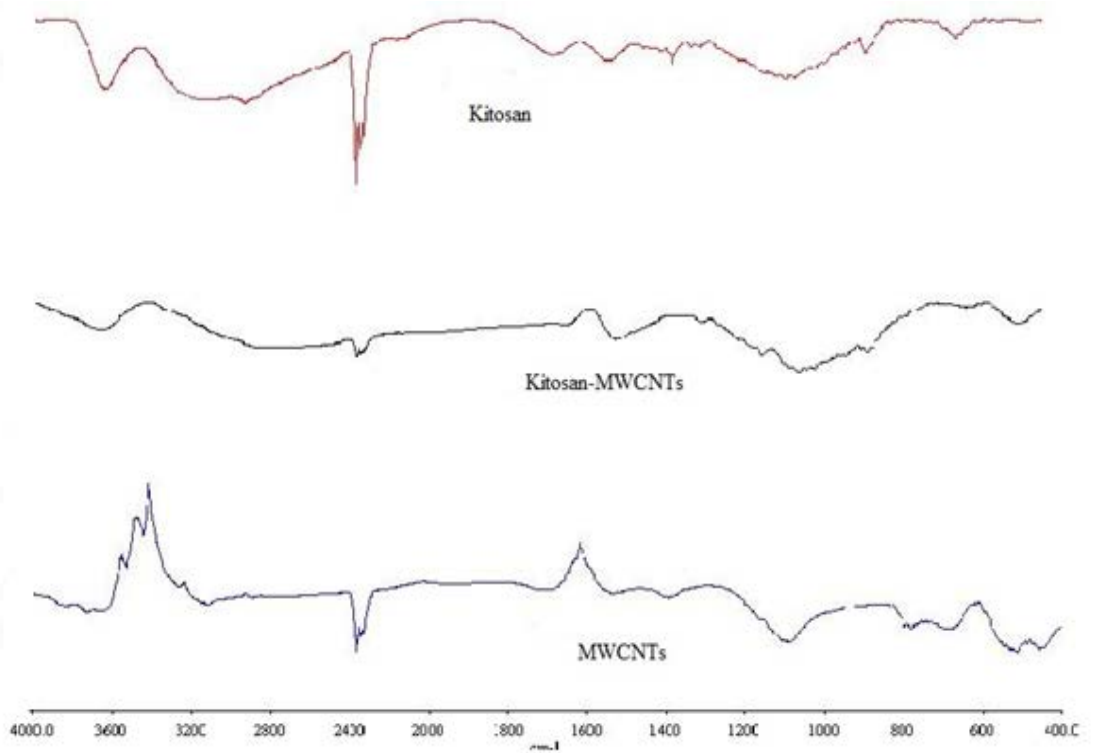
Bu çalışmada hazırlanan kitosan-Fe₃O₄, kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılarının karakterizasyon çalışmaları FTIR, TGA ve SEM analizleri ile yapıldı.

4.1.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Moleküllerin soğurduğu ya da yaydığı elektromanyetik ışınımaları inceleyen moleküler spektroskopidir. İnfrared spektroskopisi de moleküler spektroskopinin bir dalıdır. Bir molekülün infrared spektrumunun elde edilebilmesi için molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki geçiş olasılığının var olması, diğer bir deyişle sıfırdan farklı olması gerekir. Bu koşulun sağlanması için molekülün değişen bir dipol momenti olması şarttır. İnfrared spektrumlar, uzak infrared (20-400 cm⁻¹), orta infrared (400-4000 cm⁻¹) ve yakın infrared (4000-12500 cm⁻¹) olmak üzere üç temel bölgede incelenir. İnfrared uygulamalarının büyük çoğunluğu orta infrared bölgede yapılır. İnfrared spektroskopisinde, deneysel çalışma sırasında en önemli nokta spektrumun yorumlanmasıdır. Spektrumun yorumlanması kabaca ortaya çıkan bandların moleküldeki hangi atom gruplarından kaynaklandığının belirlenmesidir. Çünkü, molekülün içerdiği bazı gruplar molekülün geri kalan kısmı ne olursa olsun yaklaşık aynı frekanslarda soğurma bandı verir. Bu frekanslar ise, grup frekansları olarak adlandırılırlar [39].



Şekil 4.1. Fe_3O_4 , kitosan- Fe_3O_4 kompozit ve kitosanın IR spektrumları



Şekil 4.2. Kitosan, kitosan-MWCNTs kompozit ve MWCNTs' un IR spektrumları

Kitosan partikülle ait FTIR spektrumları Şekil 4.1.' de görülmektedir. Kitosan ve kitosan ile hazırlanan kompozit taşıyıcıların spektrumlarında gözlenen 3650 cm^{-1} ' deki pik, hidroksil ve molekül içi hidrojen bağlarına karşılık gelmektedir. Aynı zamanda birincil aminler de $3700\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ' de pik vermektedir. Bu yüzden, 3650 cm^{-1} ' deki geniş pik NH_2 , O-H gerilimi ve hidrojen bağlarının birleşmiş piki olduğu söylenebilir. Kitosan partikül için 2395 cm^{-1} ' de C-H, 1650 cm^{-1} ' de CONH_2 , 1150 cm^{-1} ' de C-O-köprüsü ve $960\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ civarında ise C-O-C simetrik gerilimlerine ait pikler yer almaktadır. Kitosanın IR spektrumundaki 1450 cm^{-1} ' deki NH_2 grubu, kitosan partikül spektrumunda 1580 cm^{-1} ' de NH_3^+ amin grubu bozulma titreşimine dönüşmektedir.

Fe_3O_4 parçacıklarının Şekil 4.1.' de verilen FT-IR spektrumunda, 570 cm^{-1} ' de Fe-O bağına ait gerilme titreşimi ve 3400 cm^{-1} civarındaki pikte OH grup pikinden kaynaklanabilir.

Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcısının Şekil 4.1.' de gösterilen FT-IR spektrumunda, 521 cm^{-1} ' de ortaya çıkan Fe-O gerilme titreşimi, manyetik bileşenin yapıdaki varlığını göstermiştir. Ayrıca 3620 cm^{-1} ' de O-H, 2857 cm^{-1} ' de, 1665 cm^{-1} C-O, 1454 cm^{-1} ' de NH_2 piki, C-H ve 1157 cm^{-1} ' de C-O-C gerilme titreşim bandları, kitosanın yapısında manyetik nanoparçacıkların bulunduğunu gösterdi.

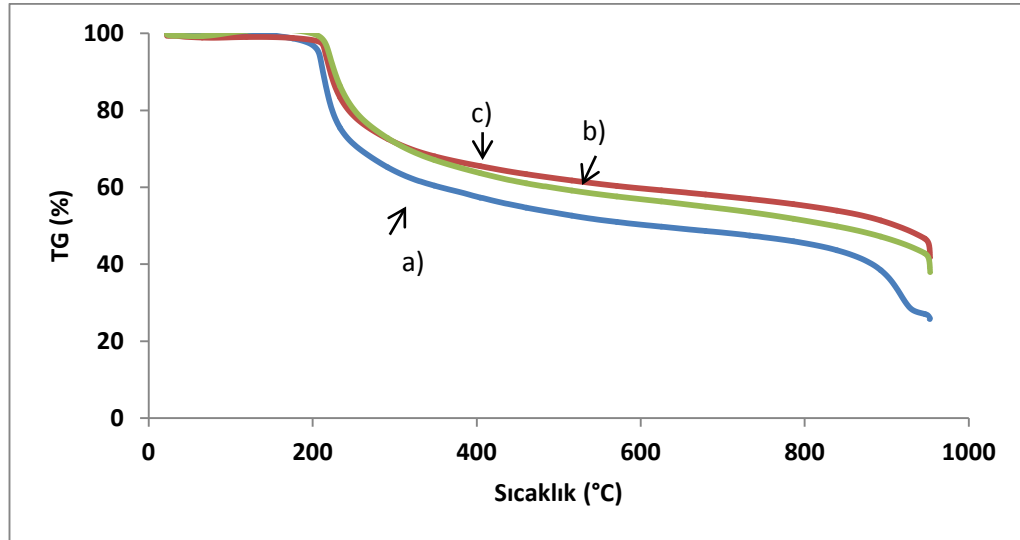
MWCNTs parçacıklarının Şekil 4.2.'de gösterilen IR spektrumlarında, 3210 cm^{-1} ' de OH, 2358 cm^{-1} ' de C=O, 1393 cm^{-1} ' de O-H ve C-OH, 1150 cm^{-1} ' de C-O ve 514 cm^{-1} ' de ise COOH bantları gözlemlendi.

Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcısının Şekil 4.2.'de IR spektrumları gösterilmiştir. Spektrumda MWCNTs 'e ait 504 cm^{-1} ' de COOH ve 1061 cm^{-1} ' de C-O bantları bulunmaktadır. Ayrıca 3648 cm^{-1} ' de OH, 2362 cm^{-1} ' de C-H ve 1522 cm^{-1} ' de ise CONH_2 bantları bulunur. Bu sonuçlar kitosanın yapısında MWCNTs' un bulunduğunu gösterdi.

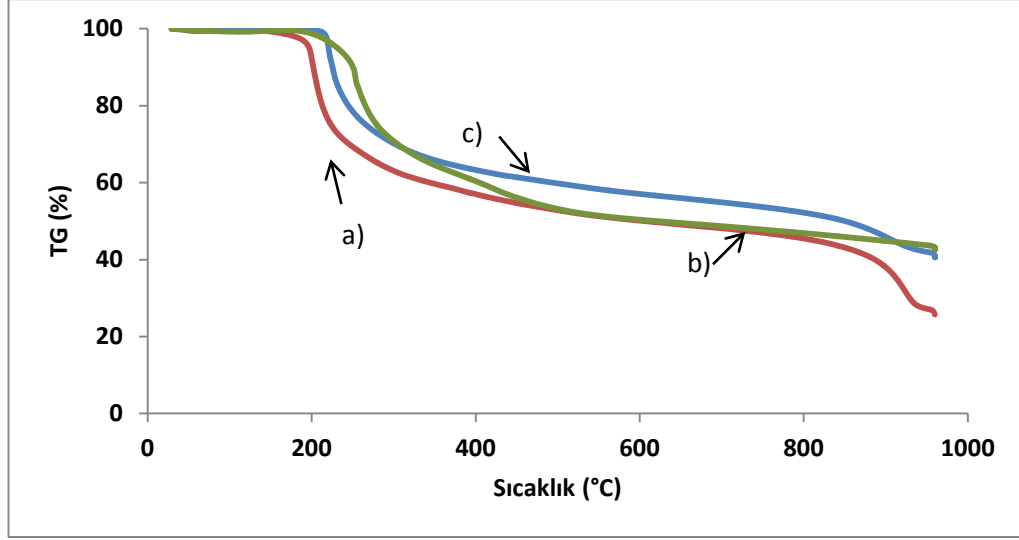
4.1.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz metoduyla, kontrol edilen bir atmosferde, sıcaklığın programlı olarak artırılması ya da azaltılmasıyla maddenin kütlesinde meydana gelen kayıp (değişiklik) sıcaklığın ya da zamanın fonksiyonu olarak incelenir ve sıcaklığa karşı maddenin kütlesinde meydana gelen azalmayı gösteren termogramlardan, maddenin yapısal özellikleri ve içerdiği su miktarı konusunda bilgi edinilebilir [17].

Bu deneyde numuneler 25 °C ile başlayarak 950 °C' ye 10 °C/dk. hızla ısıtılarak analiz edildi. Kompozit boncukların, termal bozundurulması sonucu TGA eğrileri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4. verilmektedir.



Şekil 4.3. a) Kitosan b) ECH ile aktive edilen kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı c) Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı TGA sonuçları



Şekil 4.4. a) Kitosan b) GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı c) Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı TGA sonuçları

Kitosan, kitosan- Fe_3O_4 ve ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcıların TGA spektrumları Şekil 4.3.' de verildi. Taşıyıcıların TGA spektrumları incelendiğinde 200 °C' in altında gözlenen kütle kayıplarının taşıyıcıların yapısında bulunan suyun uzaklaşmasından ileri geldiği söylenebilir. Sudan kaynaklanan kütle kaybı kitosan için % 3,8, kitosan- Fe_3O_4 için % 1,66 ve ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcıların için % 5' dir. Kitosanın TGA spektrumunda 200-400 °C' de hızlı degradasyon gerçekleştiği görülmektedir. Kitosanın bu aralıktaki kütle kaybı % 42,44' dür ve 842 °C' den sonra kitosan tamamen degradasyona uğramıştır. Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcısının 212 °C' den sonra termal bozunma aşamaları başlamıştır ve 961 °C' de tamamen degrade olmuştur. ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcıların ise 219 °C' den sonra termal bozunması başlamıştır ve 945 °C' de degradasyon tamamlanmıştır. Son sıcaklıklarda kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcısı ve ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcısının kütle kayıpları sırasıyla % 57,33 ve % 61,97' dir.

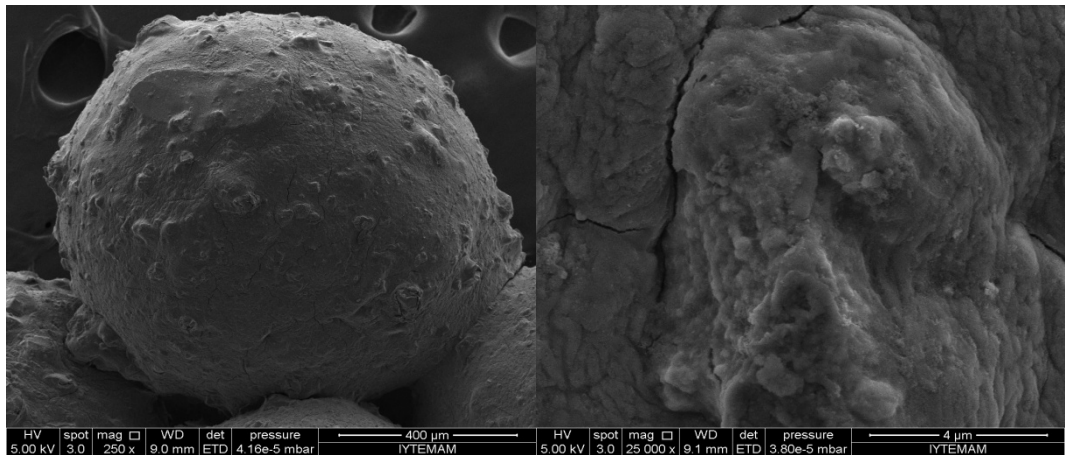
Kitosan, kitosan-MWCNTs ve GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıların TGA spektrumları şekil 4.4.' de verildi. Sudan kaynaklanan kütle kaybı kitosan- MWCNTs için % 2,77 ve GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıların ise % 2,08' dir. Kitosan-MWCNTs kompozit

taşıyıcıların TGA spektrumlarında 200-350 °C’ de arasında hızlı bir degradasyon olduğu gözlenmektedir. 960 °C’ den sonra tamamen degradasyon gerçekleşmiş ve kütle kaybı % 57,2’dir. GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılarda ise 240-380 °C arasında hızlı bir degradasyon vardır ve 935 °C’ den sonra tamamen degrade olmaktadır. Bu sıcaklıktaki kütle kaybı da % 58,92’ dir. Aktive edilen taşıyıcılarda kütle kaybının daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ise aktive edici ajanlardan gelen organik yapıların bulunması ve bu yapıların daha çabuk degradasyona uğramalarıdır.

4.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilmektedir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir [39].

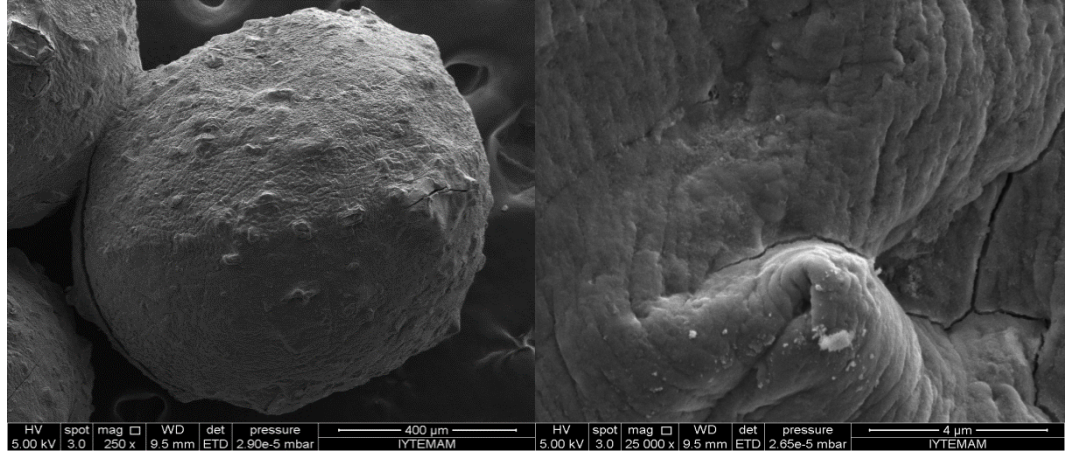
SEM çalışmaları kitosan-Fe₃O₄ (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7.) ve kitosan-MWCNTs (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10) kompozit boncukların genel morfolojisi ile ilgili bilgi vermektedir.



a)

b)

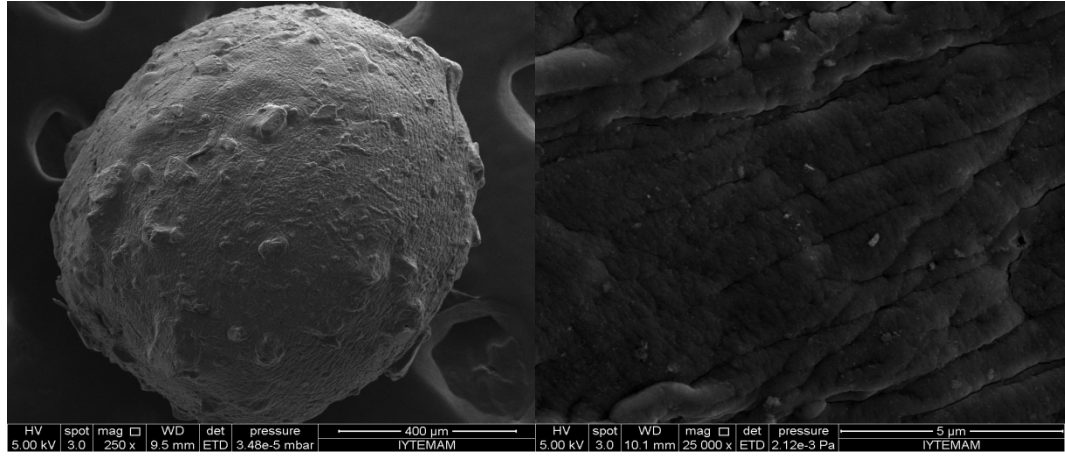
Şekil 4.5. a) Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme



a)

b)

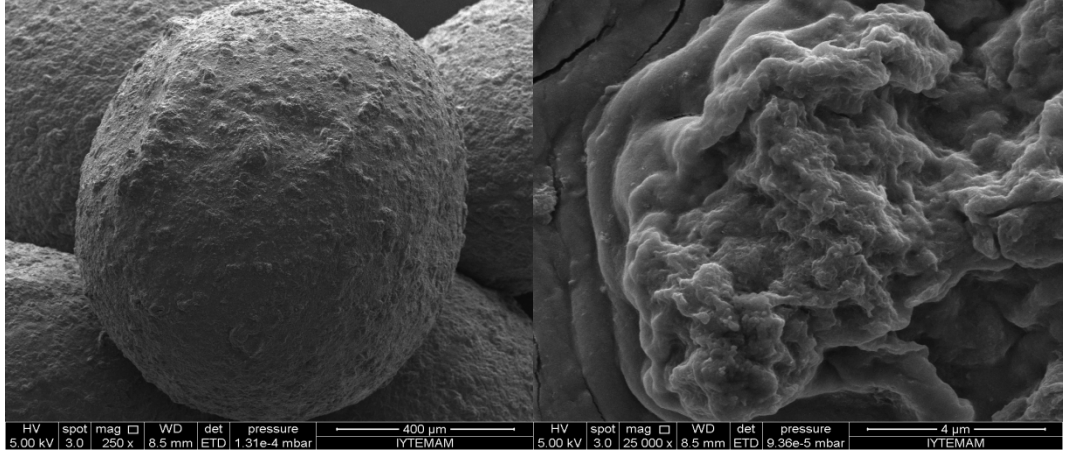
Şekil 4.6. a) ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) ECH ile aktive edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme



a)

b)

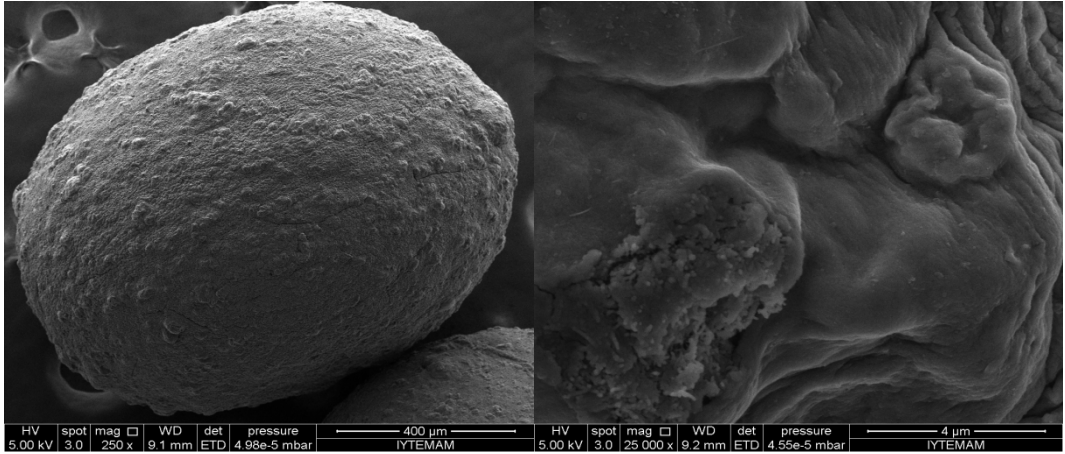
Şekil 4.7. a) β -glukozidaz ile immobilize edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 250x büyütme b) β -glukozidaz ile immobilize edilen kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı 25.000x büyütme



a)

b)

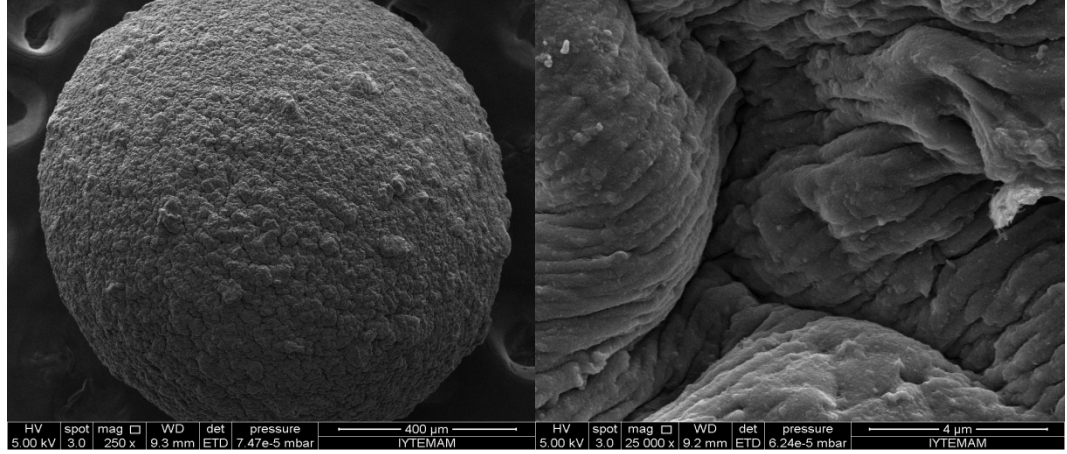
Şekil 4.8. a) Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 250x büyüme b) Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 25.000x büyüme



a)

b)

Şekil 4.9. a) GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 250x büyüme b) GLA ile aktive edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 25.000x büyüme

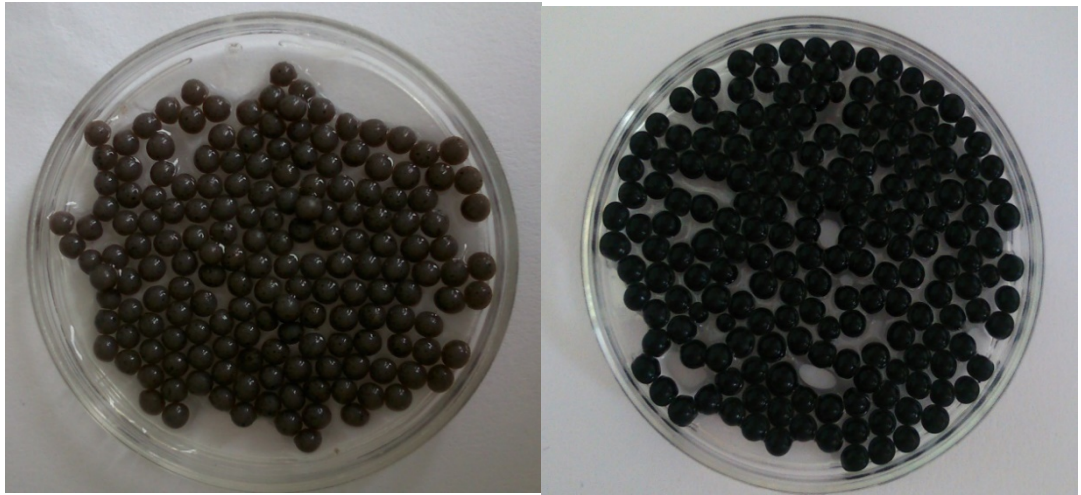


a)

b)

Şekil 4.10. a) β -glukozidaz ile immobilize edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 250x büyüme b) β -glukozidaz ile immobilize edilen kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı 25.000x büyüme

SEM çalışmalarında elde edilen veriler sonucunda çapraz bağlı taşıyıcıların daha sıkı oldukları ve katmanlarının belirgenleştiği görüldü.



Şekil 4.11. Kitosan-Fe₃O₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar

Yapılan boyut deneyi sonucunda Tablo 4.1.'de de görüldüğü gibi aktivasyon sonucunda taşıyıcılarda sıkılaşma gözlemlendi.

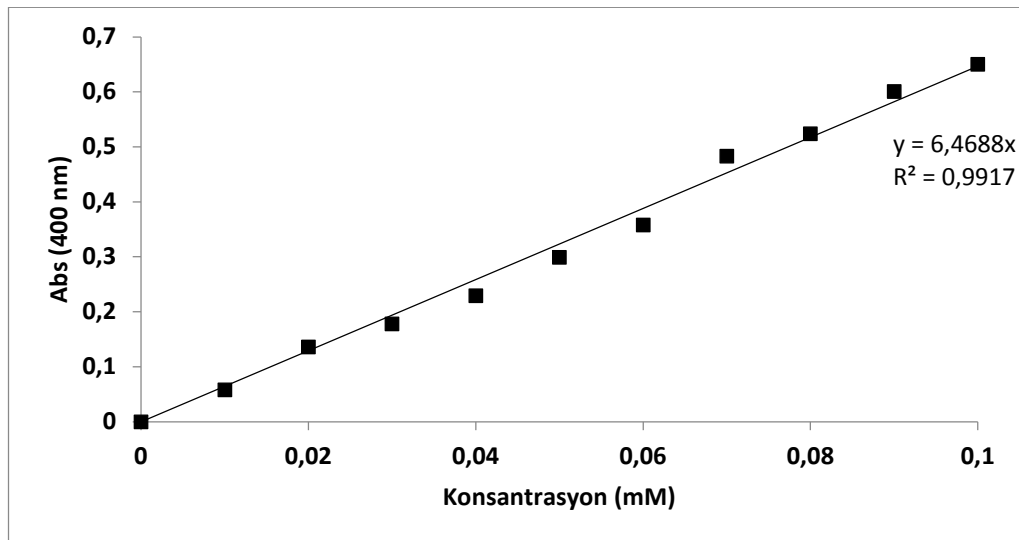
Tablo 4.1. Yaş taşıyıcıların boyutları

Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit taşıyıcı	ECH ile Çapraz bağlanmış kitosan- Fe ₃ O ₄ kompozit taşıyıcı	Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı	GLA ile Çapraz bağlanmış kitosan- MWCNTs kompozit taşıyıcı
1,1 mm	0,48 mm	1,4 mm	0,66 mm

4.2. Aktivite ve Protein Standart Grafikleri

4.2.1. p-Nitrofenol (p-NP) Standart Eğrisinin Oluşturulması

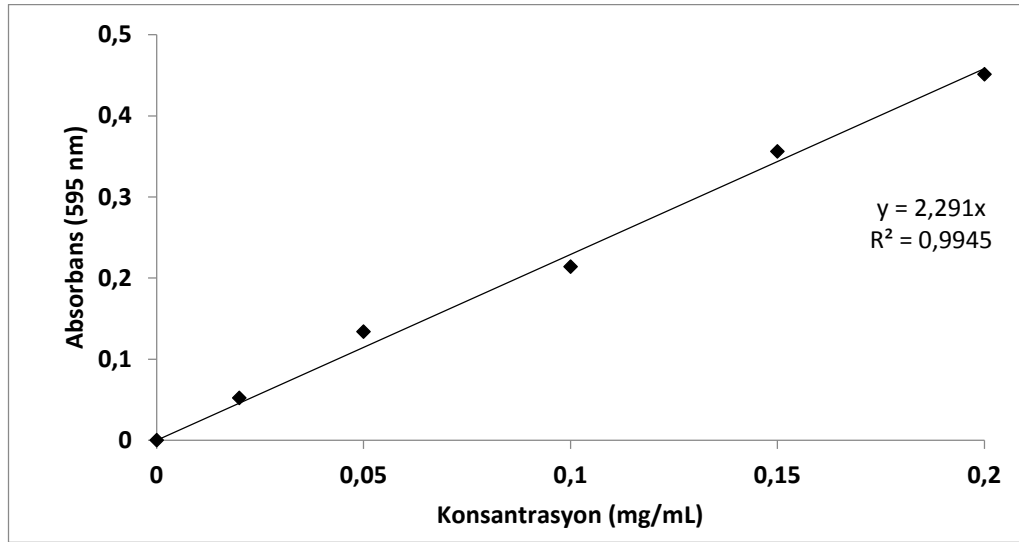
p-Nitrofenol standart eğrisinin (Şekil 4.12) oluşturulmasında ilk olarak 0,01-0,1 mM aralığında bir seri p-nitrofenol standart çözeltisi 50 mM pH 5,0 sitrat tamponu içerisinde hazırlanmış olan 0,1 M stok p-nitrofenol çözeltisinden yola çıkılarak hazırlandı. Bu çalışmada serbest ve immobilize enzim aktivite tayini Su ve arkadaşlarının metodu uygulanarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yöntem; enzimatik hidroliz sonrasında açığa çıkan p-nitrofenolun (p-NP) 400 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır [33].



Şekil 4.12. p-Nitrofenol standart eğrisi

4.2.2. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması

Standart protein eğrisinin çizimi için 0,02-0,15 mg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albümin (BSA) çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinden ayrı ayrı 0,1 mL alınarak üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletilip 595 nm’ de absorbanları ölçüldü. Bu değerler, derişime karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturuldu, elde edilen grafik örneklerin protein miktarlarının belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 4.13).



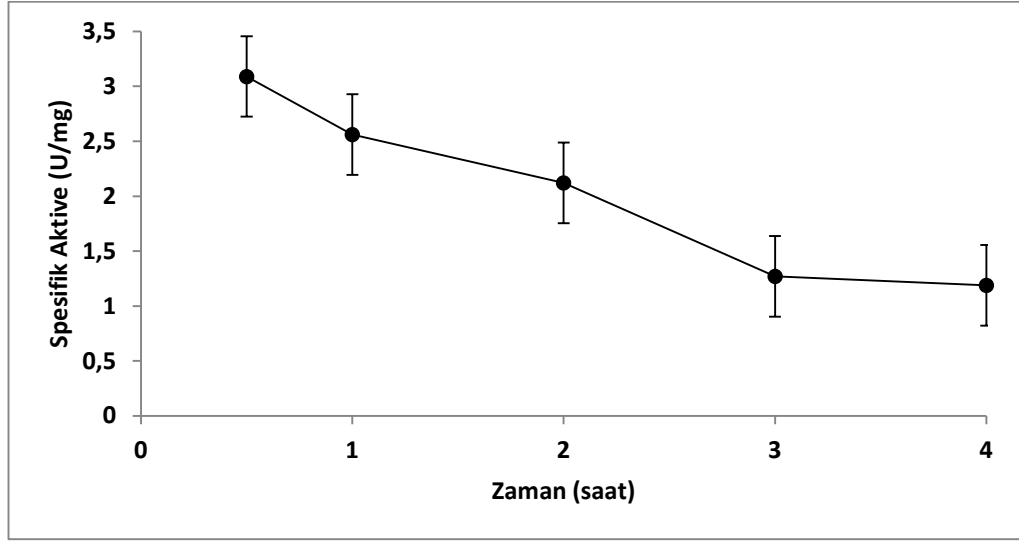
Şekil 4.13. Protein standart grafiği

4.3. Kitosan-Fe₃O₄ Kompozit Taşıyıcıların Epiklorohidrin (ECH) ile Aktivasyonu

4.3.1. ECH ile Aktivasyon Süresinin β -Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

ECH ile aktivasyon süresinin immobilizasyon üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla, taşıcının sabit miktarı üzerine 50 mM ECH çözeltisi eklendi. 30-240 dk. aralığında değişen sürelerde ECH ile aktive edilen boncuklar üzerine 1 mg/ml (0,18 mg protein) olacak şekilde β -glukozidaz enzimi immobilize edildi. Yapılan aktivite

ölçümleri sonucunda spesifik aktivite değerleri hesaplandı ve çizilen grafikten (Şekil 4.14) optimum aktivasyon süresi 30 dakika olarak belirlendi.

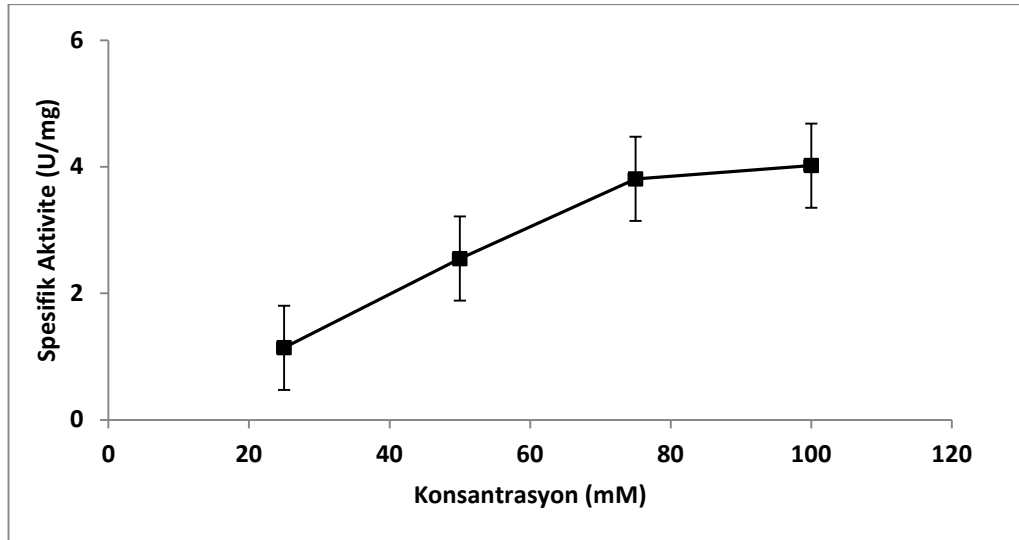


Şekil 4.14. Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcıların ECH ile aktivasyon süresinin belirlenmesi

(50 mg taşıyıcı, 50 mM ECH, aktivasyon sıcaklığı 50 °C, enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C)

4.3.2 ECH Konsantrasyonunun β -Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcıların 25-100 mM arasında değişen konsantrasyonlarda ECH ile aktive edildi. Daha sonra aktive edilen boncuklar üzerine 1 mg/ml (0,22 mg protein) β -glukozidaz enzimi immobilize edildi. Enzim immobilizasyonundan sonra hesaplanan spesifik aktivitelere göre optimum ECH konsantrasyonu belirlendi (Şekil 4.15). Deney sonucunda en iyi aktivite 75 mM ECH ile aktive edilmiş taşıyıcı üzerine immobilize edilen enzimde gözlemlendi.



Şekil 4.15. ECH konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

(50 mg taşıyıcı, aktivasyon sıcaklığı 50 °C, aktivasyon süresi 30 dk., enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C)

ECH ile aktivasyon sonucunda immobilizasyon verimini GLA ile aktivasyon sonucundaki immobilizasyon verimiyle karşılaştırmak amacıyla 50 mg kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcılar %1(v/v)' lik GLA çözeltisi 30 dk. 37 °C' de inkübe edildi ve hesaplamalar yapıldı. Deney sonucundaki veriler Tablo 4.2.' de verildi. Verilerin karşılaştırması sonucu ECH ile yapılan aktivasyonda immobilize verimin daha iyi olduğu görüldü ve çalışmaya ECH aktive edici ajanıyla devam edildi.

Tablo 4.2. Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcısında kullanılan iki farklı aktive edici ajanın immobilizasyon verimi üzerine etkisi

	Başlangıç Protein (mg)	Bağlanan Protein (mg)	Serbest Enzimin Spesifik ,Aktivitesi (U/mg)	İmmobilize Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)
*ECH	0,21±0,02	0,03±0,007	3,51±0,02	2,12 ±0,05	% 60,4
**GLA	0,26±0,04	0,01±0,003	1,5±0,01	0,64 ±0,06	% 22,07

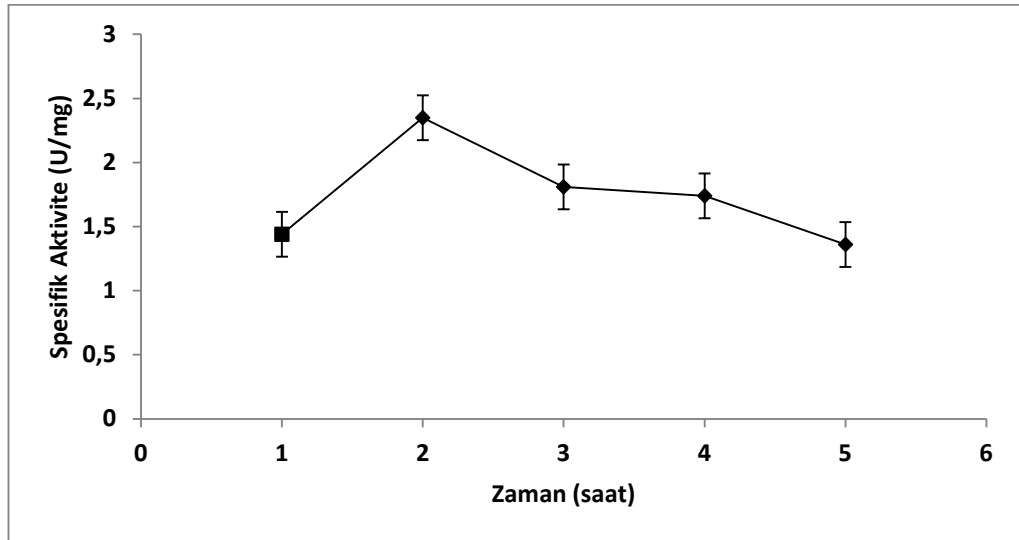
*50 mg taşıyıcı, 75 mM ECH, aktivasyon sıcaklığı 50 °C, aktivasyon süresi 30 dk., enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C

**50 mg taşıyıcı, %1 (v/v) GLA, sıcaklığı 37 °C, aktivasyon süresi 30 dk., enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C

4.4. Kitosan-MWCNTs Kompozit Taşıyıcıların Glutaraldehit (GLA) ile Aktivasyonu

4.4.1. GLA ile Aktivasyon Süresinin β -Glukozidaz Enzim Immobilizasyonu Üzerine Etkisi

GLA ile aktivasyon süresinin immobilizasyon üzerine etkisi incelenmesi amacıyla, taşıyıcının sabit miktarı üzerine %1 (v/v)' lik GLA çözeltisi eklendi. 60-300 dk. arasında değişen sürelerde GLA ile aktive edilen boncuklar üzerine 1 mg/ml (0,32 mg protein) olacak şekilde β -glukozidaz enzimi immobilize edildi. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda GLA ile optimum aktivasyon süresi, 2 saat olarak belirlendi (Şekil 4.16).

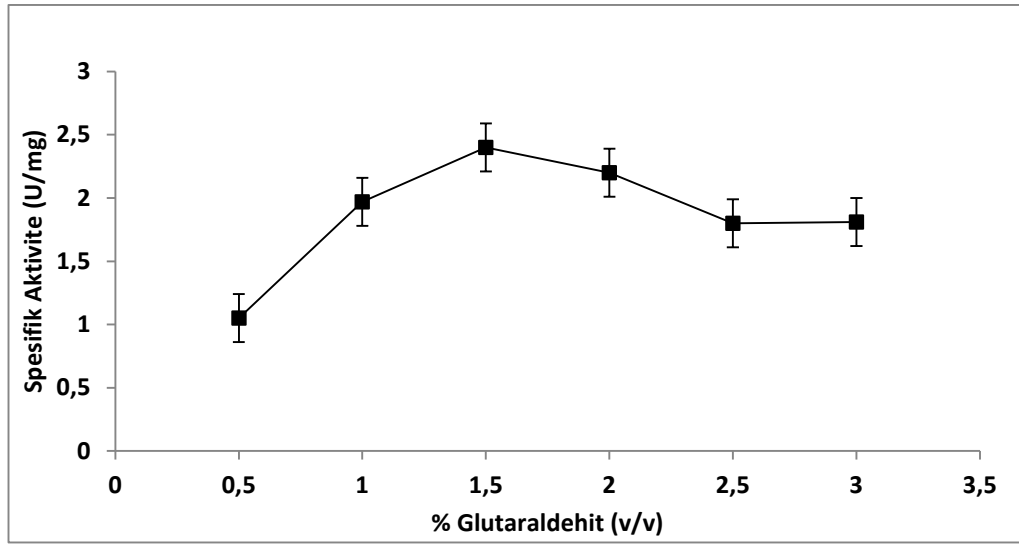


Şekil 4.16. Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıların GLA ile aktivasyon süresinin belirlenmesi

(100 mg taşıyıcı, %1 (v/v) GLA, sıcaklığı 37 °C, enzim bağlama immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C)

4.4.2. GLA Konsantrasyonunun β -Glukozidaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

Kitosan-MWCNTs boncuklar % 0,5-3 (v/v) arasında değişen oranlarda GLA ile aktive edildi. Daha sonra aktive edilen boncuklar 1 mg/ml (0,32 mg protein) β -glukozidaz enzimi immobilize edildi. Yapılan aktivite ölçümleri sonrasında hesaplanan spesifik aktivitelere göre optimum GLA konsantrasyonu %1,5 (v/v) olarak belirlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. GLA konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

(100 mg taşıyıcı, sıcaklık 37 °C, aktivasyon süresi 2 saat, enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C)

Taşıyıcılar düşük konsantrasyonda glutaraldehit ile aktive edildiğinde düşük mekanik dayanıklılık gösterirler. Bununla birlikte yüksek glutaraldehit konsantrasyonu enzimin denatüre olmasına neden olabilir. Glutaraldehit konsantrasyonu %8' i aştığında mikroküreler üzerindeki aldehit grubu bireysel enzimlerle geniş bir etkileşim gösterdiği ve bunda enzim yapısını değiştirebildiği ve enzim aktivitesinde bir düşüşe neden olduğu gözlenmektedir [6].

GLA ile aktivasyon sonucunda immobilizasyon verimini ECH ile aktivasyon sonucundaki immobilizasyon verimiyle karşılaştırmak amacıyla 100 mg kitosan-

MWCNTs kompozit taşıyıcılar 75 mM ECH çözeltisi ile 30 dk. 50 °C’ de inkübe edildi ve hesaplamalar yapıldı. Deney sonucundaki veriler Tablo 4.3.’ de verildi. Verilerin karşılaştırması sonucu kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcıların aksine kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıların GLA ile yapılan aktivasyonunda immobilize verimin daha iyi olduğu görüldü ve çalışmaya GLA aktive edici ajanıyla devam edildi.

Tablo 4.3. Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcısında kullanılan iki farklı aktive edici ajanın immobilizasyon verimi üzerine etkisi

	Başlangıç Protein (mg)	Bağlanan Protein (mg)	Serbest Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	İmmobilize Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)
*ECH	0,40±0,02	0,12±0,03	3,6±0,02	1,26 ±0,05	% 34,5
**GLA	0,41±0,06	0,18±0,05	2,5±0,02	2,08 ±0,02	% 81,5

*100 mg taşıyıcı, 75 mM ECH, aktivasyon sıcaklığı 50 °C, aktivasyon süresi 30 dk., 1,5 mg/ ml enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C

**100 mg taşıyıcı, %1 (v/v) GLA, sıcaklığı 37 °C, aktivasyon süresi 30 dk., enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C

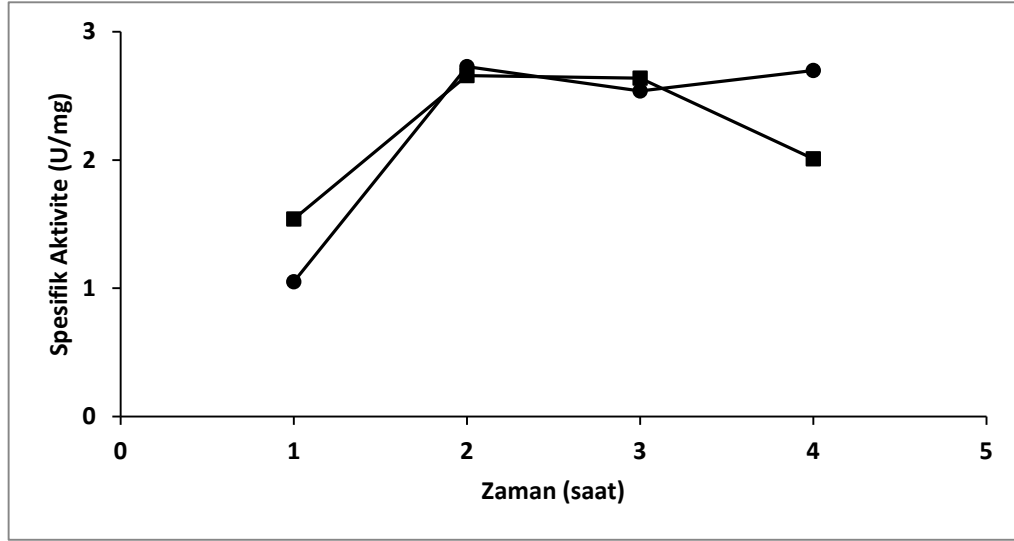
4.5. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Aktivasyon süresinin ve aktive edici ajanların konsantrasyonunun optimizasyonundan sonra β-glukozidaz enziminin kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilizasyon koşulları optimize edildi. Bu amaçla immobilizasyon üzerine sürenin ve enzim konsantrasyonunun etkisi incelendi.

4.5.1. İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Aktive edilen kompozit boncuklar üzerine 1 mg/ml β-glukozidaz enzimi 1-4 saat süreyle immobilize edildi. İmmobilize β-glukozidaz enziminin aktive tayini

yapıldı. Spesifik aktiviteye karşı çizilen zaman grafiğinden (Şekil 4.18) optimum immobilizasyon süresi her iki taşıyıcı için 2 saat olarak bulundu.

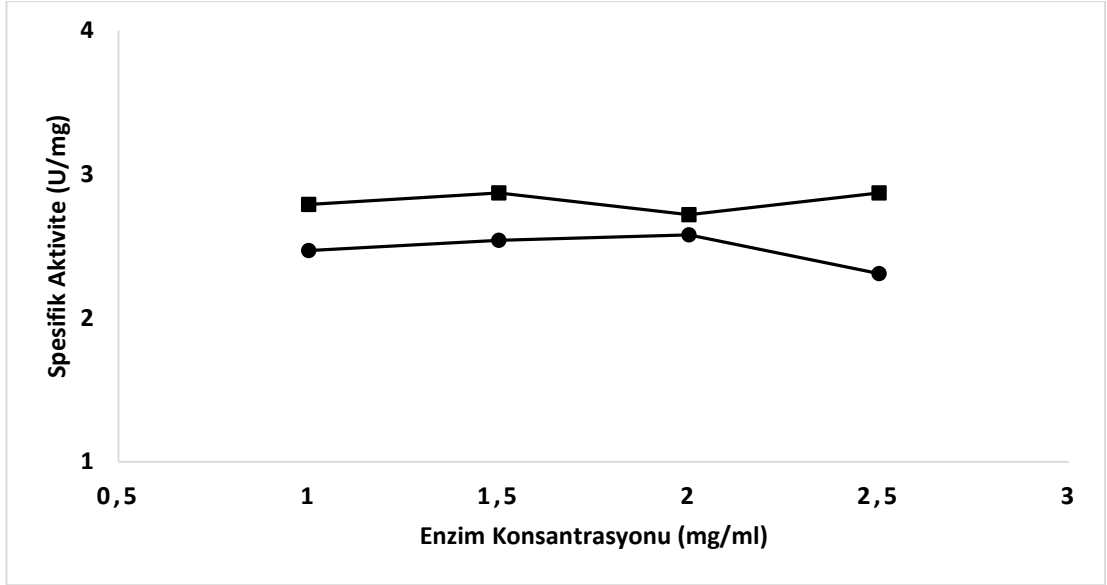


Şekil 4.18. İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

(Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

4.5.2. β -Glukozidaz Konsantrasyonunun Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

β -Glukozidaz konsantrasyonunun enzim immobilizasyonu üzerine etkisini incelemek için belirlenen optimum sürede immobilize edildi ve kitosan-Fe₃O₄ (50 mg), kitosan-MWCNTs kompozit boncukları (100 mg) 1-2,5 mg/ml (0,3-0,5 mg protein) arasında değişen β -glukozidaz ile optimum immobilizasyon süresi kadar muamele edildi. Spesifik aktivite hesaplarından sonra kitosan-Fe₃O₄ için 1,5 mg/ml (0,44 mg protein), kitosan-MWCNTs için 1 mg/ml (0,3 mg protein), konsantrasyonlarında optimum sonucu verdi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Enzim immobilizasyonu için optimum β -glukozidaz konsantrasyonunun belirlenmesi

(Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

4.6. Optimize Edilen Koşullarda İmmobilizasyon Verimi (%) Ve Yükleme Etkinliğinin (%) Hesaplanması

Optimize edilen koşullarda kitosan- Fe_3O_4 ve kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enziminin aktivitesi ölçüldü. Bununla birlikte serbest enzim, filtrat ve yıkama sularında protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Bu verilerden yararlanarak immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği hesaplandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kitosan-Fe₃O₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar üzerine optimize edilen koşullarda immobilize edilen β -glukozidaz enziminin % immobilizasyon verimi ve % yükleme etkinliği

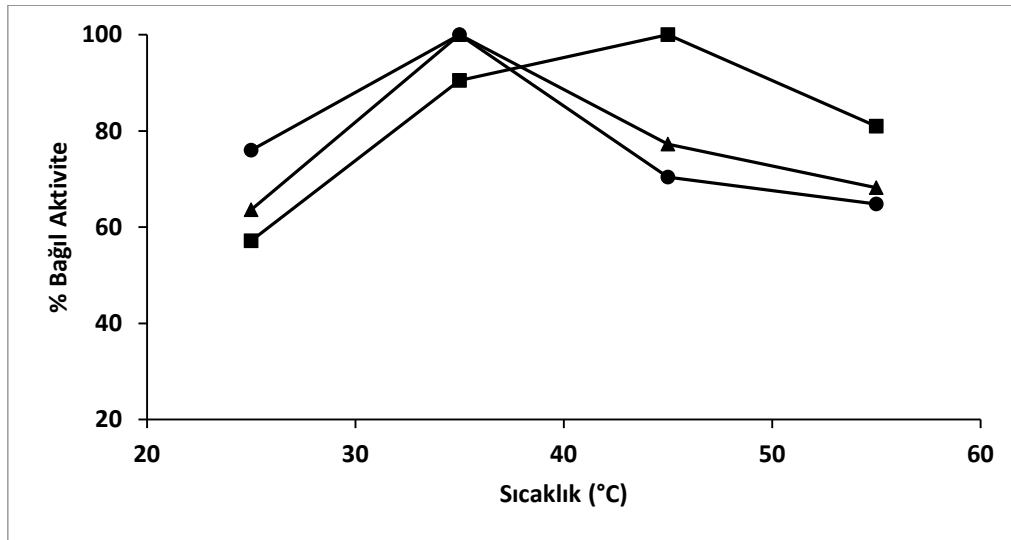
	Serbest Enzim					İmmobilize Enzim		
	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Bağlı Protein (mg)	Yükleme Etkinliği (%)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)
Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit taşıyıcı	0,06±0,005	0,44±0,02	2,27±0,04	0,14±0,01	% 23,1	0,01±0,002	1,97±0,02	% 86,8
Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı	0,04±0,005	0,30±0,03	2,72±0,01	0,08±0,01	% 27	0,02±0,004	2,59±0,07	% 95

50 mg kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı, 75 mM ECH, aktivasyon sıcaklığı 50 °C, aktivasyon süresi 30 dk., 1,5 mg/ml enzim, enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C

100 mg kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı, %1,5 (v/v) GLA, aktivasyon sıcaklığı 37 °C, aktivasyon süresi 2 saat, 1 mg/ml enzim, enzim immobilizasyon süresi ve sıcaklığı 2 saat, 37 °C

4.7. Serbest ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize β -glukozidaz optimum sıcaklığını belirlemede farklı sıcaklık değerlerinde (25-55 °C) aktivite ölçümleri yapıldı. Hesaplanan aktivite ölçümlerine göre optimum sıcaklık değerleri serbest enzim ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen β -glukozidaz için 35 °C ve kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen β -glukozidaz için 45 °C olarak bulundu (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Serbest ve immobilize β -glukozidazın optimum sıcaklıklarının belirlenmesi

(Serbest β -glukozidaz enzimi (▲), Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

Yapılan çalışmada kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığında bir değişiklik olmadığı görüldü. Genellikle β -glukozidaz enzimi immobilize edildiğinde optimum sıcaklığında bir değişiklik olmamaktadır [33]. Busto ve arkadaşları β -glukozidaz enzimini aljinat üzerine immobilize ettikleri çalışmada

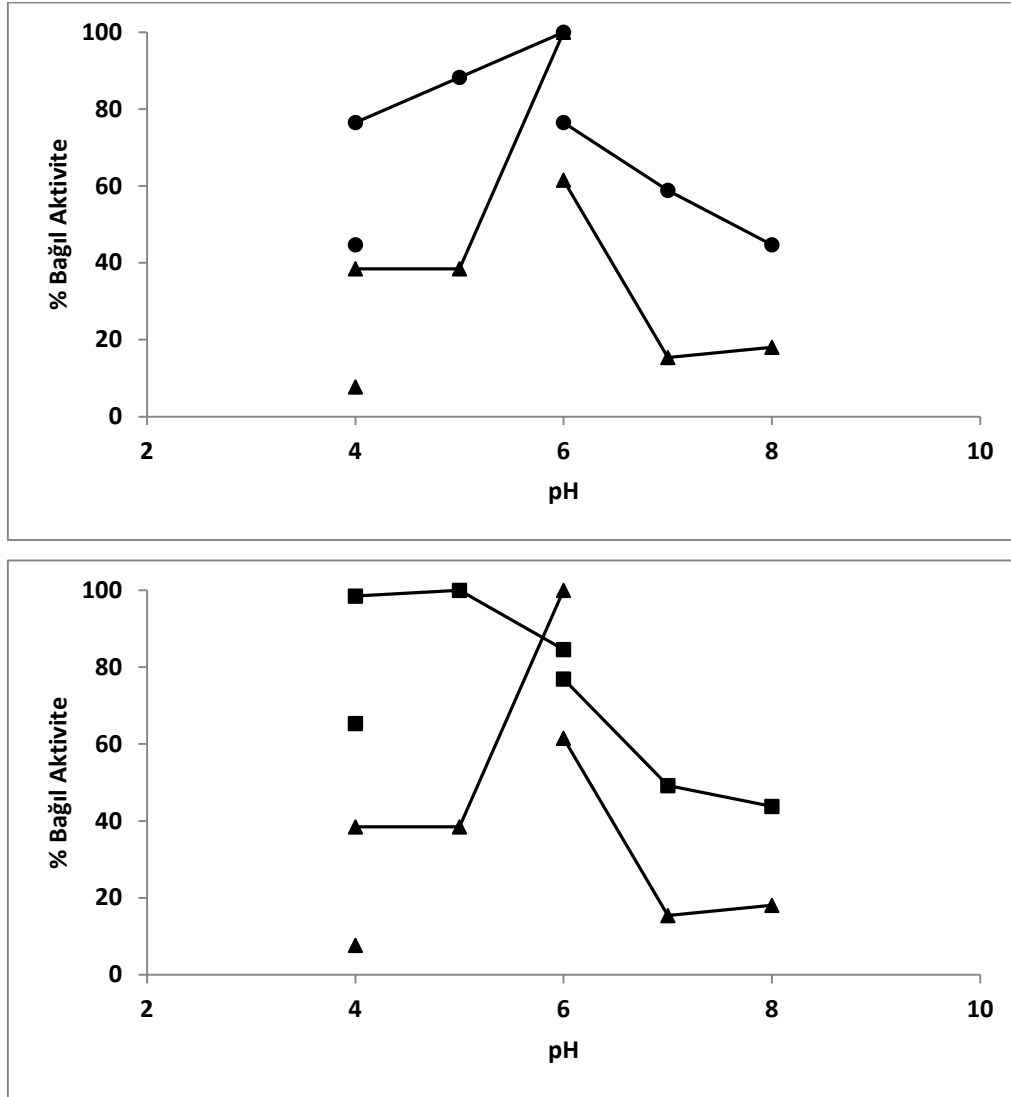
optimum sıcaklığının serbest β -glukozidaz enzimin sıcaklığı ile aynı, daha yüksek ya da daha düşük olabileceğini rapor etmişlerdir [40].

Bununla birlikte kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığı serbest enzime göre farklılık gösterdi. Fan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre serbest enzimin optimum sıcaklığını 65 °C ve immobilize enzimin ise 55 °C olarak rapor etmişlerdir. Meydana gelen değişimin sebebi ise β -glukozidaz ve glutaraldehit ile aktive edilme sonucu molekülün yapısında meydana gelen bir değişiklik sonucu olabilir [41].

İmmobilize enzimlerin optimum sıcaklıklarında gözlenen benzer bir kayma, farklı çalışmalarda da rapor edilmiştir; fakat kayma derecesi taşıyıcı ile enzim etkileşiminin türüne göre değişir. Enzim ve taşıyıcı arasındaki moleküller arası kovalent bağların oluşumu enzim molekül yapısına sertlik kazandırmaktır; böylece yüksek sıcaklıklarda enzim daha az denatüre olmaktadır [42, 43].

4.8. Serbest ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Optimum pH' larının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize β -glukozidaz enziminin optimum pH' nı belirlemek için farklı pH aralıklarında hazırlanan tamponlar kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Bu sonuçlara göre serbest enzim ve kitosan-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen enzim için pH 6,0'da ve kitosan-MWCNTs üzerine immobilize edilen enzim için pH 5,0' de en yüksek aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Serbest ve immobilize β -glukozidaz optimum pH' larının belirlenmesi

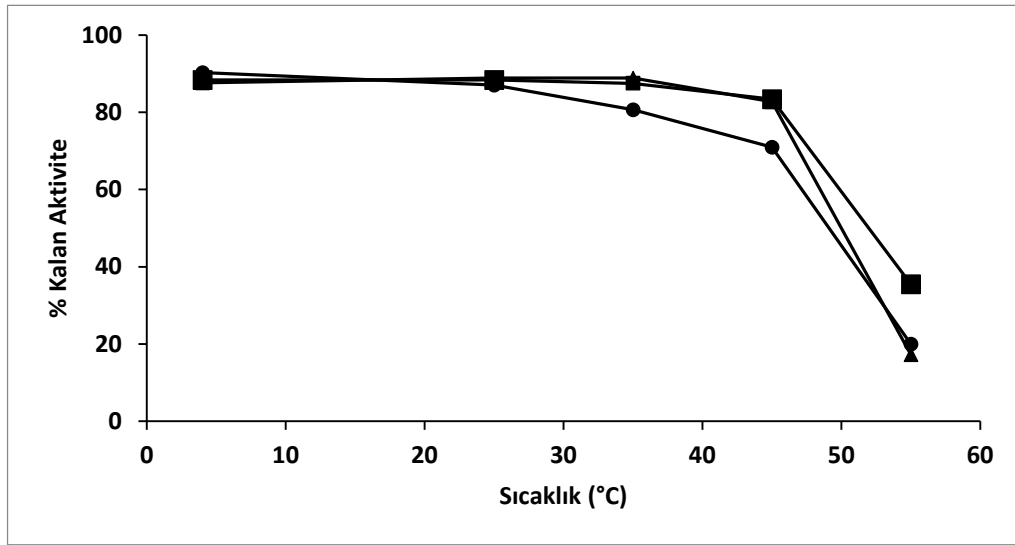
(Serbest β -glukozidaz enzimi (▲), Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■), pH 4,0' de 50 mM asetat, 4,0–6,0 aralığında 50 mM sitrat, 6,0–8,0 aralığında 50 mM fosfat tamponu)

İmmobilize enzimler değişen reaksiyon koşullarına daha az duyarlıdır. Enzim kovalent bir desteğe bağlandığında ya da gözenekli bir matrikse hapsedildiğinde taşıyıcının yapısına bağlı olarak optimum pH' da kaymalar görülebilir. Genel olarak, immobilize enzimlerdeki pH profilindeki fark, uygulanan immobilizasyon yöntemine ve kullanılan taşıyıcıya bağlı olarak değişebilir [2, 44].

4.9. Kararlılık Testleri

4.9.1. Serbest ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Termal Kararlılığı

İmmobilize ve serbest enzim 4-55 °C aralığında değişen sıcaklıklarda 1 saat bekletildi ve daha sonra aktivite ölçümleri alınarak stabilitesi araştırıldı (Şekil 4.22). Bu sonuçlar enzimin tipik olarak düşük sıcaklıklarda çalışabileceğini gösterir ve bu da içecek sanayisinde kullanım için uygun olduğunu gösterir. Aksi halde yüksek sıcaklıklarda içecek kalitesi bozulur [45].



Şekil 4.22. Serbest ve immobilize β -glukozidazın sıcaklık stabilitesi

(Serbest β -glukozidaz enzimi (▲), Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

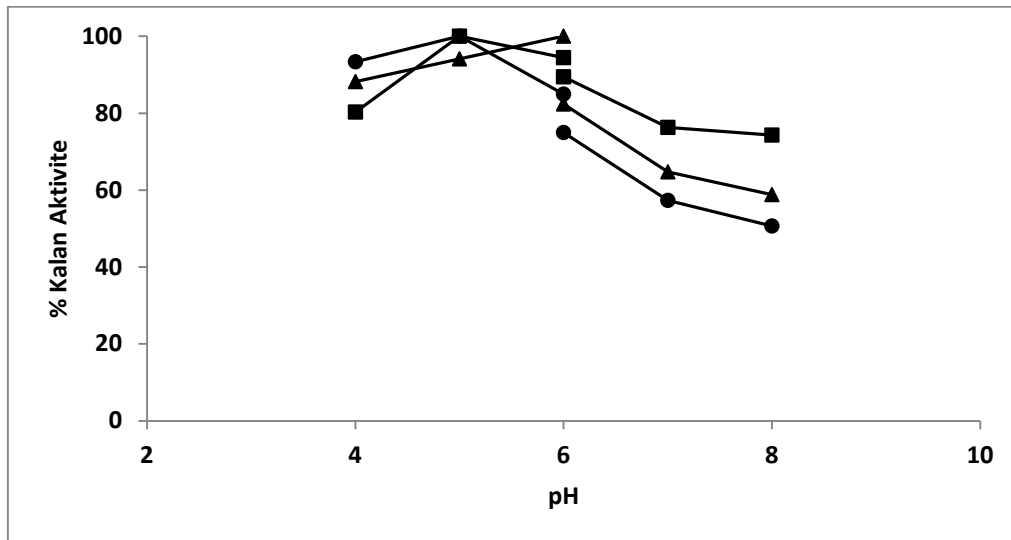
Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada β -glukozidaz enzimi kitosan üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon, enzimin sertliğini arttırdığı için immobilize β -glukozidazın ısı direncinin arttığını rapor etmişlerdir. Böylece, serbest enzime göre, immobilize enzim az aktivite kaybı ile çevre koşullarına dayanabilir [46, 47].

Sol-gel ve lentikats üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enzimi ile yapılan çalışma sonucu lentikats taşıyıcısı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enziminin diğer immobilize

enzime göre sıcaklık stabilitesinin daha iyi olduğu rapor edilmiştir. İmmobilizasyon desteği immobilizasyon sonucu olarak enzimin yapısal esneklik kazanmasına neden olarak koruyucu bir etki gösterir. İmmobilizasyon aşaması enzimin sertliğini artırarak termal bir denatürasyona karşı stabiliteyi iyileştirmektedir [48].

4.9.2. Serbest ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin pH Kararlılığı

İmmobilize ve serbest enzim pH' ı 4,0-8,0 arasında değişen farklı tamponlarda 1 saat bekletildi ve daha sonra aktivite ölçümleri alınarak pH stabiliteleri araştırıldı (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Serbest ve immobilize β -glukozidazın pH stabilitesi

(Serbest β -glukozidaz enzimi (▲), Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

Ahmed ve arkadaşlarının β -glukozidaz enziminin farklı taşıyıcılarla immobilizasyonu sonucu elde ettikleri verilerde immobilize enzimin pH 4,0–6,0 aralığında yüksek bir stabilite gösterirken, daha asidik veya alkalik koşullarda stabilitesi azaldığını rapor etmişleridir [2].

Fan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada β -glukozidaz enzimi kitosan üzerine immobilize edilmiştir ve optimum pH denemesi 3-7,5 aralığında araştırılmıştır. Bu deneyde

immobilize enzimin pH 4,0-8,0 arasında serbest enzime göre daha stabil ve yüksek aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [41].

4.9.3. Operasyonel Kararlılık

Operasyonel kararlılık enzimin iş yapma süresince aktivitesindeki değişmeyi gösteren bir parametredir ve operasyon süresiyle operasyon sıcaklığına bağımlı olarak değişir. Ayrıca bir enzimin katalitik potansiyeli operasyonel kararlılığı ile orantılıdır. Operasyonel kararlılığın ölçüsü enzimin reaktördeki yarı ömrüdür ve $t_{1/2}$ ile ifade edilir. Daha doğru bir tanımlama ile enzimin aktivitesinin yarısının yitirilmesi için geçen zamandır ve şu eşitlik ile hesaplanır.

$$t_{1/2} = 0,693 / k_D \quad (4.1.)$$

$$k_D = 2,303 / t \cdot \log(A_0 / A) \quad (4.2.)$$

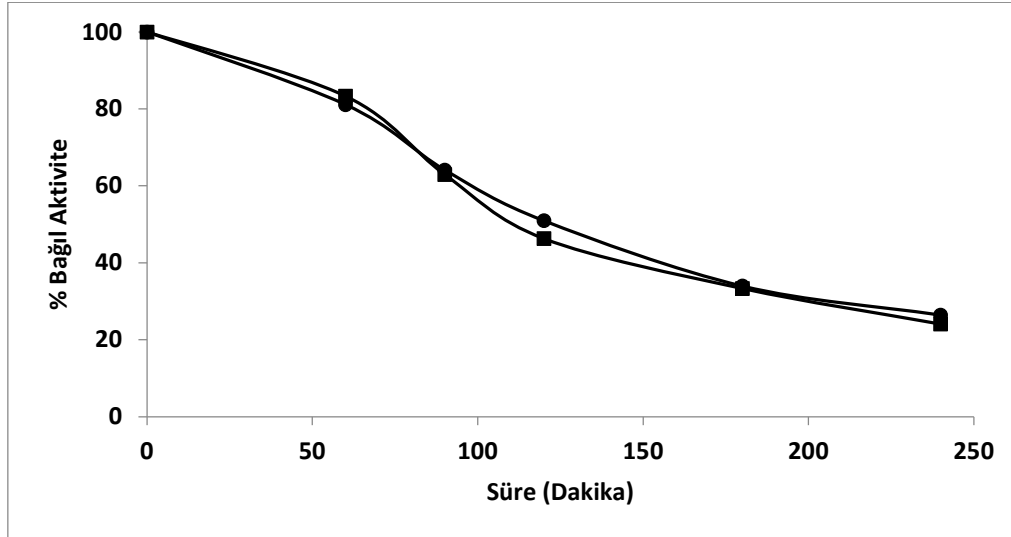
t operasyon süresini, k_D bozunma katsayısını, A_0 ve A ise sırasıyla başlangıç ve t anındaki enzimatik aktiviteyi göstermektedir [49].

Bozunma katsayıları (k_D) yukarıdaki gibi formül kullanılarak hesaplandı ve Tablo 4.5.' de hesaplanan k_D değerleri verildi.

Tablo 4.5. İmmobilize β -glukozidaz enziminin farklı zamanlardaki k_D değerleri

k_D		
Süre (dakika)	Kitosan-Fe ₃ O ₄ Kompozit Taşıyıcı	Kitosan-MWCNTs Kompozit Taşıyıcı
60	$3,48 \times 10^{-3}$	$4,23 \times 10^{-3}$
90	$4,93 \times 10^{-3}$	$5,93 \times 10^{-3}$
120	$5,62 \times 10^{-3}$	$7,01 \times 10^{-3}$
180	6×10^{-3}	$6,50 \times 10^{-3}$
240	$5,54 \times 10^{-3}$	$6,23 \times 10^{-3}$

Yapılan hesaplamalar sonucu k_D değerinin ortalaması kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için $5,11 \times 10^{-3}$, kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı için $5,98 \times 10^{-3}$ olarak hesaplandı. Bu değerler dikkate alınarak enzimin yarı ömrü ($t_{1/2}$) yukarıdaki formülden sırasıyla 135 dakika ve 115 dakika olarak hesaplandı (Şekil 4.24).



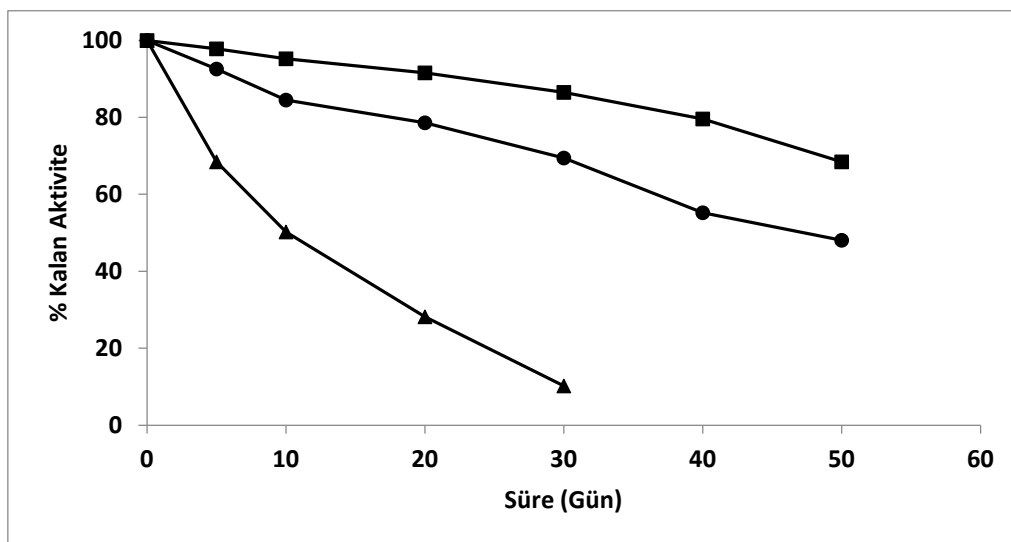
Şekil 4.24. İmmobilize β -glukozidaz enziminin operasyonel kararlılığı (Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (■))

Bu deney sonucunda kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların üzerine immobilize edilen β-glukozidaz enziminin yarı ömrünün ve operasyonel kararlılığının kitosan-MWCNTs kompozit boncukları üzerine immobilize edilen β-glukozidaz enzimine göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Immobilize enzimin sınırlı yarı ömrü olası pratik uygulamalar için bir dezavantajdır [50].

4.9.4. Depolama Kararlılığı

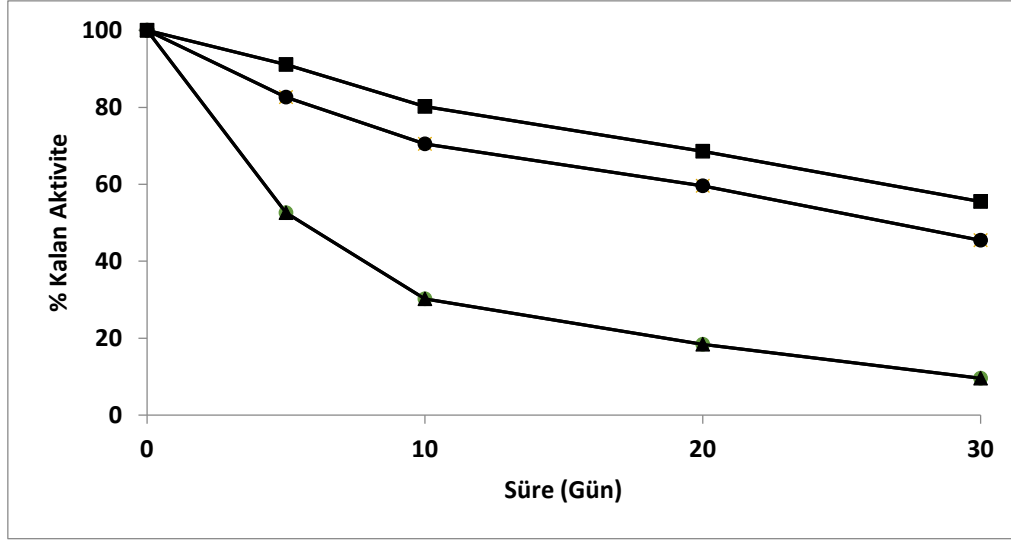
Serbest ve immobilize β-glukozidaz, 4 °C ve 25 °C’ de 50 gün boyunca uygun koşullarda depolandı ve belirli aralıklarla aktiviteleri ölçüldü. Immobilize enzimlerde kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcının kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcıya göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür. +4 °C de serbest enzim %10,23, kitosan-Fe₃O₄ % 48,1 ve kitosan-MWCNTs % 68,4 (Şekil 4.25); 25 °C de ise serbest enzim % 9,6, kitosan-Fe₃O₄ % 45,4 ve kitosan-MWCNTs % 55,5 oranında aktivitesini korumuştur (Şekil 4.26).

Sonuçlar, immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir ve benzer sonuçlar literatürde de bulunmaktadır [46].



Şekil 4.25. Serbest ve immobilize β-glukozidazın +4 °C’ de depolama kararlılığı

(Serbest β -glukozidaz enzimi ($\blacktriangle$), Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) ($\bullet$), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) ($\blacksquare$))



Şekil 4.26. Serbest ve immobilize β -glukozidazın oda sıcaklığında depolama kararlılığı

(Serbest β -glukozidaz enzimi ($\blacktriangle$), Kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) ($\bullet$), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) ($\blacksquare$))

β -Glukozidaz enzimi aljinat üzerine immobilize edilmiştir. Depolama 4 °C’ de uygulanmış ve bu çalışmada serbest ve immobilize enzimin sırasıyla 20 ve 42 gün boyunca aktivitelerini korudukları rapor edilmiştir. Aktivitenin belirtilen sürede korunmuş olması, β -glukozidazın biyomakromoleküllere immobilizasyonu sırasında yapısal denatürasyonun engellenmesinden kaynaklanır [33].

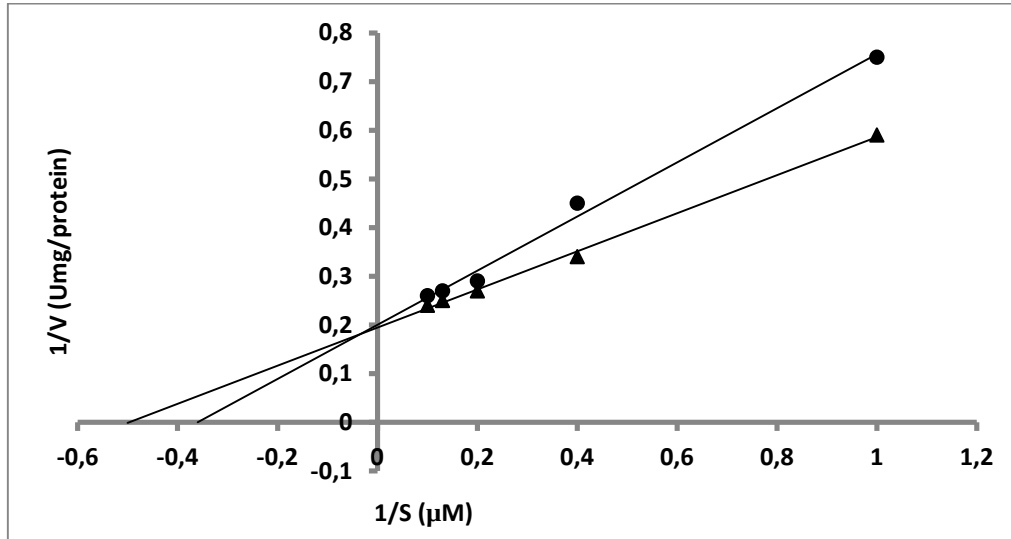
Başka bir çalışmada β -glukozidaz enzimi nano-gözenekli silika köpükler üzerine immobilize edilmiştir. Bu çalışmada sırasıyla serbest ve immobilize enzimin 4 °C’ de 10 ve 60 gün aktivitelerini korudukları rapor edilmiştir. Bununla birlikte taşıyıcıların glutaraldehit ile enzime bağlanması diğer benzer immobilize enzimlerle karşılaştırıldığında önemli bir depolama stabilitesi ile sonuçlanır [51].

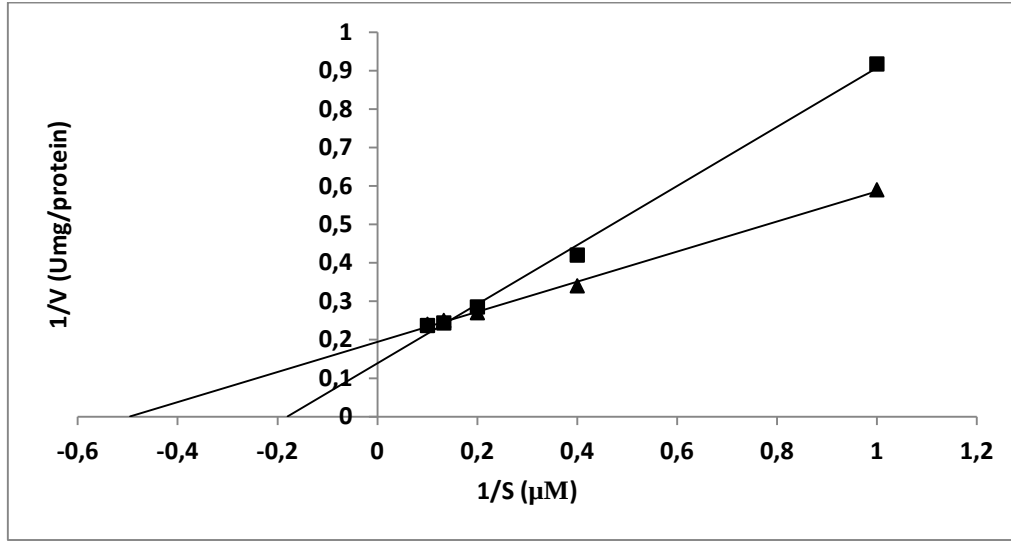
4.10. Serbest ve İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Doygunluk substrat (p-NPG) konsantrasyonunu ve K_m ile V_{max} değerlerini belirleyebilmek için 1-10 mM konsantrasyon aralığı kullanılarak serbest ve immobilize β -glukozidaz enziminin aktivite değeri ölçüldü. Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 4.27) K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Serbest ve immobilize β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri

	K_m (μM)	V_{max} (U.mg pro. ⁻¹)
Serbest Enzim	2,04	5,12
Kitosan-Fe ₃ O ₄ Kompozit Taşıyıcı	2,70	5,26
Kitosan-MWCNTs Kompozit Taşıyıcı	5,55	7,14





Şekil 4.27. β -glukozidaz için Lineweaver-Burk grafiği

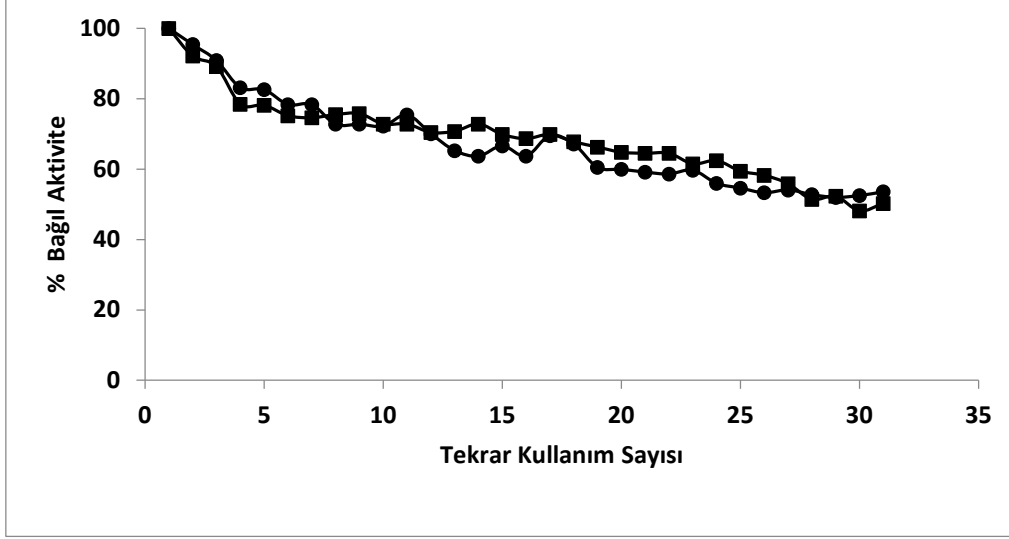
(Serbest β -glukozidaz enzimi (▲), Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

Başka bir çalışmada β -glukozidaz enzimi manyetik nano parçacıklar üzerine immobilize edilmiştir. Çalışma sonucunda sırasıyla serbest ve immobilize enzim K_m değerleri 3,5 ve 4,3 mM ve V_{max} değerleri 0,72 ve 0,89 U/mg olarak rapor edilmiştir. Enzimin taşıyıcılara kovalent bağlanması sonucunda substratın immobilize enzimin aktif bölgesine sınırlı difüzyonundan dolayı, substratlarına karşı affinitelerinde bir değişime neden olur [43, 52].

İmmobilize enzimlerdeki kinetik değişiklikleri; enzim konformasyonundaki değişiklikler, sterik engeller, mikroçevre, şişme ve difüzyon etkileri gibi faktörler kontrol eder. Substratın çözeltilerden mikroçevreye göçü immobilize enzimin K_m değerindeki artışın temel bir faktörü olabilir [53].

4.11. Tekrar Kullanılabilirlik

İmmobilize β -glukozidazın tekrar kullanılabilirliği endüstriyel uygulamalar için kilit öneme sahiptir [46]. Artmış stabilite immobilize enzimi serbest enzimden daha avantajlı yapabilir [33].



Şekil 4.28. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği

(Kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (50 mg) (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz (100 mg) (■))

Yaptığımız çalışmalar sonucu tekrar kullanılabilirliğin her iki taşıyıcı için birbirine yakın olduğunu görüldü. 50 kez kullanım sonrasında her iki taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidazın aktivesinin % 50' sini koruduğu görüldü. Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk üzerine immobilize edilen β -glukozidazın 10 kez tekrar kullanımı sonrasında % 72,22 ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidazın ise % 72,83 oranında aktivitesini koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.28).

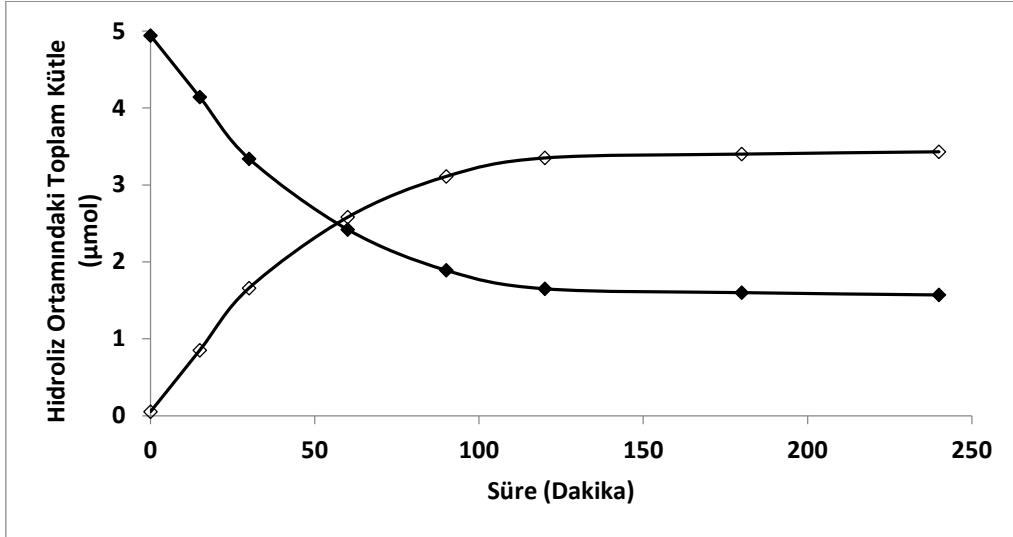
Yeniden kullanıldığında immobilize enzimin aktivite kaybı, enzim ve taşıyıcı arasındaki bağların zayıflamasından kaynaklanabilir. Ayrıca, immobilize enzimin aktif bölgesi substratla sık sık bir araya gelmesi nedeniyle bozulabilir ve bu nedenle katalitik etki azalabilir [46].

Zhou ve arkadaşlarının yaptığı deneyde β -glukozidaz enzimi magnetit Fe₃O₄ nanopartiküller üzerine immobilize edilmiştir ve 10 tekrar kullanımı sonucunda aktivitenin %

86' sını koruduğu rapor edilmiştir. İmmobilize enzimin aktivite kaybı muhtemelen yapısal değişiklikler ve taşıyıcıdaki sızıntı nedeniyle olabilir [54].

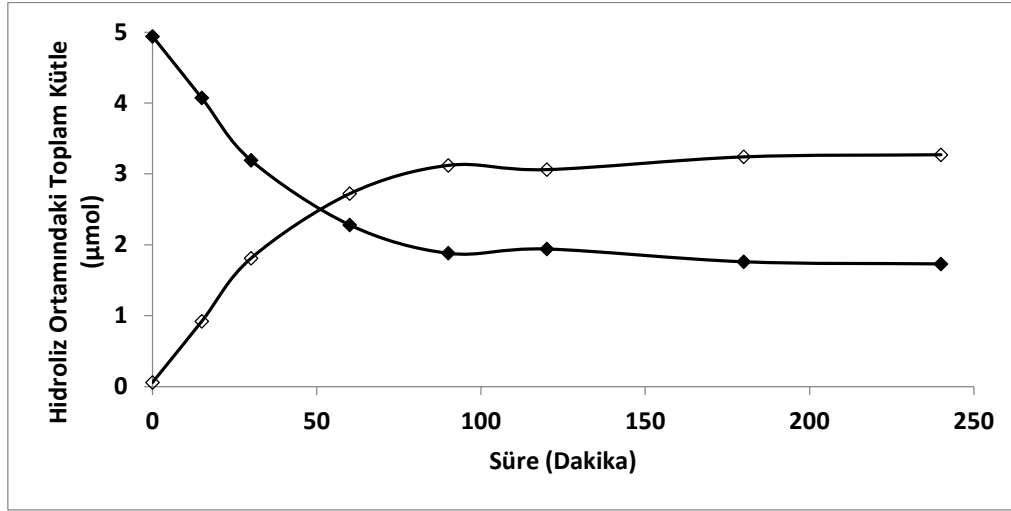
4.12. İmmobilize β -Glukozidaz Enziminin p-NPG Hidrolizinde Kullanımı

Hidroliz denemeleri 37 °C' de p-NPG için yapıldı. Her iki taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enzimi için aynı işlemler uygulandı. Başlangıç anında ve belirli zaman aralıklarında p-NPG' nin hidrolizi sonucunda açığa çıkan p-NP miktarı ölçüldü (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).



Şekil 4.29. p-NPG' nin kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcılara immobilize edilen β -glukozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları

Hidroliz Edilen Substrat Miktarı (♦), Açığa Çıkan Ürün Miktarı (◇)



Şekil 4.30. p-NPG' nin kitosan- MWCNTs kompozit taşıyıcılara immobilize edilen β -glukozidaz enzimi ile hidrolizinde tüketilen substrat ve oluşan ürün miktarları

Hidroliz Edilen Substrat Miktarı (♦), Açığa çıkan Ürün Miktarı (◇)

Hidroliz sonrası elde edilen dönüşüm değerleri her iki kompozit taşıyıcı için birbirine yakındır. Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuklara immobilize edilen enzim hidrolizinde 60 dk. sonra substratın yarısı hidroliz edilmiştir. Kitosan- MWCNTs kompozit boncuklara immobilize edilen enzim hidrolizinde ise 55 dk. sonra substratın yarısının hidroliz olduğu gözlenmiştir.

4.13. Gaz Kromatografisi (GC) Analizi

Çay örnekleri (siyah çay, yeşil çay, mate çayı, adaçayı ve melisa çayı) iç standart (50 mM kaprik asit) yöntemi ile diklorometan kullanarak ekstrakte edildi (Şekil 4.31). Aroma bileşenleri, aroma bileşenleri referans maddeleri ve pik karşılaştırma yöntemi kullanılarak, alıkonulma zamanları ve literatür verileri de dikkate alınarak belirlendi. Yapılan çalışmaların verileri Tablo 4.7.' de verildi.



Şekil 4.31. İnfüze edilen ve ekstrakte edilen çay örnekleri

Deney sonuçlarına göre incelenen altı aroma bileşenleri açısından toplam aromatik içeriğin adaçayında yüksek olduğu gözlemlendi. İmmobilize β -glukozidaz ile muamele sonrasında karbohidrat artıklarına bağlı olan aroma bileşenlerinin hidrolizi sonucu yüksek oranlarda aromatik bileşiklerde artma görüldü ve literatür verileri ile de paralel olduğu belirlendi.

Bu sonuçlar, β -glukozidaz enziminin seçilen çay örneklerinde bulunan öncül glikozidik aroma bileşenlerini farklı derecelerde hidrolize ettiğini gösterdi. Bunun nedeni de çayların işleme tekniklerinin farklı olmasıdır ve β -glukozidaz enzimi farklı glikozidik aroma öncüllerine farklı substrat özgüllüğü gösterebilir.

Yeşil çay, adaçayı, melisa çayı yaprakları işlem sırasında endojen enzimleri inaktive etmek amacıyla önce yüksek sıcaklıklarda soldurulur. Bunun bir sonucu olarak, glikozidik aroma bileşenleri endojen enzim hidrolizinden korunmuş olur. Bunun tersi olarak, siyah çay ve mate çayında endojen enzimleri inaktive etmeye gerek yoktur çünkü endojen enzimlerin etkisini göstermesi için uygun koşullar oluşturulur (fermantasyon). Bu nedenle, işlem sırasında çok miktarda glikosidik aroma öncülleri serbest bırakılmak üzere hidrolize uğrar [33].

Yeşil çay, adaçayı ve melisa çayı yüksek sıcaklıklarda ani olarak kurutulduğu için aromatik öncüllerdeki artış daha fazladır. Yeşil çaydaki aromatik öncüllerinin yüzde olarak sıralaması yapılırsa; benzil alkol(%160) > geraniol(%68,72) > nerol(%67,68) > linalool(%17,93) > 2-fenil etanol(%4,15) > terpineol, adaçayı için; linalool(%119) > 2-fenil etanol(%94,12) > nerol(%91,66) > terpineol(%87,76) > geraniol(%50,78) > benzil alkol(%38,35), melisa çayının aromatik öncüllerinin sıralaması ise; nerol(%583,6) > benzil alkol(%346,3) > 2-fenil etanol(%312,4) > linalool(%117,6) > geraniol(%50,12) olarak bulundu.

Siyah ve mate çayında fermentasyon işlemi uygulandığı için aromatik öncüllerindeki artış diğer çaylara göre daha azdır. Siyah çaydaki aromatik öncüllerinin artışın sıralaması şöyledir; 2-fenil etanol(%41,68) > benzil alkol(%20,52) > geraniol(%18,57) > linalool(%10) > terpineol=nerol. Mate çayında da sıralama şu şekildedir; geraniol(%136,36) > 2-fenil etanol(%61,90) > nerol(%60) > benzil alkol(%52,38) > terpineol(%40) > linalool(%11,53). Tüm bu veriler Tablo 4.7.' da da görülmektedir.

Tablo 4.7. Çay örneklerindeki aromatik bileşenlerine β -glukozidaz enziminin etkisi

	Siyah çay			Yeşil çay			Mate çayı			Adaçayı			Melisa çayı		
	F ^a	E ^b	Y ^c (%)	F	E	Y(%)	F	E	Y(%)	F	E	Y(%)	F	E	Y(%)
LİNALOOL	0,030	0,033	10	0,009	0,011	17,93	0,026	0,029	11,53	0,119	0,261	119	0,034	0,074	117,6
TERPİNEOL	—	0,025	—	—	0,022	—	0,110	0,154	40	0,209	0,392	87,76	—	—	—
NEROL	—	0,021	—	0,006	0,011	67,68	0,015	0,024	60	0,060	0,115	91,66	0,177	1,210	583,6
GERANİOL	0,533	0,632	18,57	0,108	0,182	68,72	0,011	0,026	136,36	1,280	1,930	50,78	0,413	0,620	50,12
BENZİL ALKOL	0,453	0,546	20,52	0,030	0,078	160	0,021	0,032	52,38	0,857	1,190	38,85	0,401	1,790	346,3
2-FENİL ETANOL	0,379	0,537	41,68	0,196	0,204	4,15	0,042	0,068	61,90	0,800	1,550	94,12	0,257	1,060	312,4

F^a : İmmobilize β -glukozidaz ile muamele edilmemiş örnek

E^b : İmmobilize β -glukozidaz ile muamele edilmiş örnek

Y^c : Artış yüzdesi ; $Y(\%) = (F \text{ uçucu madde miktarı} - E \text{ uçucu madde miktarı}) / F \text{ uçucu madde miktarı} \times 100$

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ilk olarak kitosan-Fe₃O₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcıları hazırlandı. Taşıyıcıların karakterizasyonu TGA, SEM ve FTIR analizi ile yapıldı. Daha sonra β -glukozidaz enziminin kitosan-Fe₃O₄ ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcılar üzerine immobilizasyon koşullarının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmada aktive edici ajan olarak kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için 75 mM ECH kullanıldı ve 30 dk. sürede aktive edildi; kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı ise 2 saat %1,5 (v/v) GLA aktive edildi. Immobilizasyon için uygun enzim konsantrasyonu kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için 1,5 mg/ml, kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı için 1 mg/ml belirlendi. β -Glukozidaz enzimi kompozit taşıyıcıların üzerine optimum immobilizasyon süresi 2 saat bulundu. Immobilizasyon koşullarının optimizasyonundan sonra serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Optimum pH, serbest enzim ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için pH 6.0, kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı için 1 birim kayma gözlenerek pH 5.0 bulundu. Optimum sıcaklık da serbest enzim ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için 35 °C, kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı için de 45 °C olarak bulundu. Serbest enzimin K_M değeri her iki kompozit taşıyıcıdan daha düşük bulundu, V_{max} değeri serbest enzim ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için 5 U/mg protein, kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı için de 7,14 U/mg protein bulundu. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin termal, pH ve depo kararlılıkları incelendi ve immobilize enzimlerin stabilitelerinin serbest enzime kıyasla daha iyi olduğu görüldü. Operasyonel kararlılık testleri sonucu yarılanma ömrü kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı için 135,61 dakika ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı için 115,88 dakika olarak tespit edildi. Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk üzerine immobilize edilen β -glukozidazın 10 kez tekrar kullanımı sonrasında %72,22 ve kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen β -glukozidazın ise %72,83 oranında aktivitesini koruduğu gözlemlendi.

Çalışmanın diğer aşamasında immobilize β -glukozidazın çeşitli çay örneklerinde aroma artırıcı etkisi incelendi. Siyah çay, yeşil çay, adaçayı, melisa çayı ve mate çay örneklerinde nerol, linalool, geraniol, terpineol, benzilalkol ve 2-fenil etanol aroma öncüllerinin enzimle muamele öncesi ve sonrasında miktarları

kıyaslandı. Çalışma sonucunda aroma öncüllerinin miktarlarında yüzdesel olarak artış gözlemlendi.

Bu tez çalışmasında kullanılan taşıyıcılar üzerine immobilize edilen β -glukozidaz enziminin serbest enzime göre stabilitelerinin daha iyi olması ve örnek uygulamasında aroma öncüllerinde belirgin yüzdesel artışların gözlenmesi, endüstriyel alanda da uygulanabilirliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1 Ren, J., Yang, Z., Tai, Y., Dong, M., He, M., Fan, G. Characteristics of β -glucosidase from oranges during maturation and its relationship with changes in bound volatile compounds. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.6956
- 2 Ahmed, S. A., El-Shayeb, N. M., Hashem, A. M., Saleh, S. A., Abdel-Fattah, A. F. Biochemical studies on immobilized fungal β -glucosidase. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2013, 30(4), 747-758.
- 3 Ramachandran, P., Tiwaria, K. M., Singha, K. R., Hawb, J., Jevaa, M., Leea, J. Cloning and characterization of a putative β -glucosidase (NfBGL595) from *Neosartorya fischeri*. Process Biochemistry. 2012, 47, 99-105.
- 4 Nasliyan, V. M. Çeşitli Dokulardan Aldoz Redüktaz Enziminin İzolasyon Ve İmmobilizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2012, 82 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 5 Örnek Acar, D. Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2009, 52 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 6 Chang, M., Juang R. Use of chitosan–clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. Biochemical Engineering Journal. 2007, 35, 93-98.
- 7 Bingöl, S. İ. Kitosan Partikül İle Atık Sulardan Sülfat Giderilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2013, 62 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 8 Ergöçen, G. β -Glukozidaz Enziminin Kayısı (*Prunus Armeniaca*) Çekirdeklerinden Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana, 2013, 45 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 9 <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Beta-glucosidase>
- 10 Demirkan, G. *Climacocystis borealis*'den β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, 2009, 58 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 11 Kara, H. β -Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle *Olea europea* Meyvesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu İle Bazı Pestisit Ve Ağır Metaller Karşı Afinitesinin Araştırılması. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 2010, 134 s. (Doktora Tezi).
- 12 Tutar, H. *Candida Rugosa* lipaz Enziminin Sporopollenin Üzerine Adsorpsiyonu Ve Karakterizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, 2009, 83 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 13 Arslan, F. Ksantin Tayini İçin Polipirol Filme Ksantin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2004, 89 s. (Doktora Tezi)
- 14 Kasavi, C. Kovalent Bağlanma Ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları İle Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 2006, 92 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- 15 Bozkurt H., Aslım, B. İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı, Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2004, 2(7), 01-14.
- 16 Coşkun, G. Glutatyon–S–Transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu Ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, 2007, 118 s. (Doktora Tezi).
- 17 Kalkan, N. A. Kitosan Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Lakkaz İmmobilizasyonunda Ve Reaktif Boyarmadde Adsorpsiyonunda Kullanılması. Gazi

Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2010, 204 s. (Yüksek Lisans Tezi).

18 Alagöz, D. β -Galaktozidaz Ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu Ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi Ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana, 2007, 72 s. (Yüksek Lisans Tezi).

19 Güler, S. Kitosan Türevlerinde İmmobilize Edilen Lakkaz Enziminin Aktiviteleri, Stabiliteleri Ve Reaksiyon Kinetiklerinin İncelenmesi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Manisa, 2012, 77 s. (Yüksek Lisans Tezi).

20 Demir, A., Seventekin, N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2009, 3(2), 92-103.

21 Özgür, I. Nanotüp Ve Nanotel Yapılarının XRD İle Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2008, 73 s. (Yüksek Lisans Tezi).

22 Erbaş, Z. Bazı Metal İyonlarının Patent Blue V İle Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Üzerinde Zenginleştirilmesi Ve Alevli AAS İle Tayini. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Nevşehir, 2015, 51 s. (Yüksek Lisans Tezi).

23 Go'mez, J. M., Romero, M.D., Ferná'ndez, T.M. Immobilization of β -Glucosidase on carbon nanotubes. Catalysis Letters. 2005, 101, 3-4.

24 Boyanay, Ö. K. Turunçgil Yapraklarından Çeşitli Ayırma Yöntemleri İle Uçucu Yağ Eldesi Ve Bileşiminin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 2013, 115 s. (Yüksek Lisans Tezi).

25 İskefiyeli, Z. Ormangülü (Rhododendron) Uçucu Yağ Ve Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimleri Ve Biyolojik Aktiviteleri. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, 2010, 108 s. (Yüksek Lisans Tezi).

26 Memikoğlu İnce, B. Salvia cedronella Bitkisinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Karakterizasyonu Ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Muğla, 2009, 75 s. (Yüksek Lisans Tezi).

27 Diri, M. Coridothymus capitatus (L.) Reichb. Uçucu Yagının Analizi, Su Ve Etanol Ekstraktlarının Antioksidant Aktivitelerinin Belirlenmesi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Muğla, 2006, 101 s. (Yüksek Lisans Tezi).

28 <http://en.wikipedia.org/wiki>

29 <http://www.kimyasanal.com/konugoster.php?yazi=v3anlcztzo>

30 <http://kimyaca.com/benzil-alkolun-kullanim-alanlari/>

31 <http://www.epharmacognosy.com/2012/05/alcohol-volatile-oils.html>

32 <http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Blattgewuerze/german/chemie>

33 Su, E., Xiaa, T., Gaoa, L., Daia, Q., Zhanga, Z. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. Food and Bioproducts Processing. 2010, 88, 83-89.

34 Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry. 1976, 72, 248-254.

35 Yuanbi, Z., Zumin, Q., Jiaying, H. Prerparation and analysis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2008, 16(3), 451-455.

36 Wang, Q., Zhanga B., Lina, X., Wenga, W. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-mutiwalled carbon nanotubes

nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sensors and Actuators B*. 2011, 156, 599-605.

37 Tarawneh, A. M., Ahmad, H. S. Characterization and morphology of modified multi-walled carbon nanotubes filled thermoplastic natural rubber (TPNR) composite. <http://dx.doi.org/10.5772/50726>

38 Liu, Y., Liu, Y., Wang, G., Di, D. Liquid–liquid/solid three-phase high-speed counter-current chromatography based on O-carboxymethyl chitosan-functionalized multi-walled carbon nanotubes as solvent additive. *RSC Advances*. 2014, 4(50), 26231-26239.

39 Eker, E. Lantanborat Bileşiminin Katı Hal Yöntemi İle Sentezi ve Karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2006, 76 s. (Yüksek Lisans Tezi).

40 Busto, M. D., Ortega, N., Perez-Mateos, M. Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal β -D-glucosidase. *Process Biochemistry*. 1997, 32(5), 441-449.

41 Fan, G., Xu, Y., Zhang, X., Lei, S., Yang, S., Pan, S. Characteristics of immobilised β -glucosidase and its effect on bound volatile compounds in orange juice. *International Journal of Food Science and Technology*. 2011, 46, 2312–2320.

42 Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Kumar, L., Gupta, V. K. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. *Process Biochemistry*. 2012, 47(9), 1402-1410.

43 Bayramoğlu, G., Akbulut, A., Arica, M. Y. Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, 244, 528-536.

44 Martino, A., Pifferi, P. G., Spagna, G. Immobilization of β -Glucosidase from a Commercial Preparation. Part 2. Optimization of the Immobilization Process on Chitosan. *Process Biochemistry*. 1996, 31(3), 287-293.

45 Martino, A., Durante, M., Pifferi, P. G., Spagna, G., Bianchi, G. Immobilization of β -Glucosidase from a Commercial Preparation. Part 1. A Comparative Study of Natural Supports. *Process Biochemistry*. 1996, 31(3), 281-285.

46 Zhou, Y., Wang, L., Wu, T., Tang, X., Pan, S. Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013, 16(6).

47 Chang, J., Park, I. H., Lee, Y. S., Chung, S. Y., Fang, S. J., Chandra, M. S., Choi Y. L. Immobilization of β -glucosidase from *exiguobacterium* sp. DAU5 on chitosan bead for improved enzymatic properties. *Journal of Life Science*. 2010, 20(11), 1589-1594.

48 Figueira, J. A., Gonc, F. F., Dias, A., Sato, H. H., Fernandes, P. Screening of Supports for the Immobilization of β -Glucosidase. *SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research*. 2011, 2011.

49 Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 s.

50 Reshmi, R., Sugunan, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013, 85, 111-118.

51 Verma, L. M., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C. J., Puri, M. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2013, 135, 2-6.

- 52 Başak, E., Aydemir, T., Dinçer, A., Becerik, S. Comparative study of catalase immobilization on chitosan, magnetic chitosan and chitosan-clay composite beads. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2013, 41, 408-413.
- 53 Zhou, Y., Pan, S., Wei, X., Wang, L., Liu, Y. Immobilization of β -glucosidase onto magnetic nanoparticles and evaluation of the enzymatic properties. *BioResources*. 2013, 8(2), 2605-2619.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Akile ÇELİK

Doğum Yeri ve Yılı : Söke, 1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : akile-celik@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi, 2007

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2012

Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü/ Biyokimya, 2015