



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BETA-GLUKOZİDAZ VE BETA-KSİLOZİDAZ
ENZİMLERİNİN MANYETİK NANOPARTİKÜLLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE İLAÇ ÖNCÜL
MOLEKÜLLERİN BİYOTRANSFORMASYONUNDA
KULLANILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Bürde ŞİMŞEK

Biyomühendislik Anabilim Dalı Adı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BETA-GLUKOZİDAZ VE BETA-KSİLOZİDAZ
ENZİMLERİNİN MANYETİK NANOPARTİKÜLLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE İLAÇ ÖNCÜL
MOLEKÜLLERİN BİYOTRANSFORMASYONUNDA
KULLANILMASI**

Bürde ŞİMŞEK

Danışman : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Beta-glukozidaz ve Beta-ksilozidaz enzimlerinin manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonu ve ilaç öncül moleküllerin biyotransformasyonunda kullanılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03/08/2021

Bürde ŞİMŞEK

ÖZET

BETA-GLUKOZİDAZ VE BETA-KSİLOZİDAZ ENZİMLERİNİN
MANYETİK NANOPARTİKÜLLER ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE
İLAÇ ÖNCÜL MOLEKÜLLERİN BİYOTRANSFORMASYONUNDA
KULLANILMASI

ŞİMŞEK, Bürde

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

Ağustos 2021, 100 sayfa

Sikloastragenol, Astragalozit IV ve Astragalozit VII sikloartan glikozitlerinin kimyasal olarak hidrolizi ile elde edilebilmektedir. Bu hidroliz prosesi birçok yan ürün oluşumuna yol açtığı ve giderilmesi zor kimyasal atık yükü getirdiği için yeşil hidroliz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimler, tekrar kullanılabilirliği, uygun pH ve sıcaklıkta çalışmaları ve alt akım işlemlerinin kolaylığı sayesinde biyotransformasyonlar için etkili bir araçtır. Ancak enzimlerin piyasa değerlerinin yüksek olması, kullanıldıkları uygulamaları ekonomik olarak kısıtlamaktadır. Enzimlerin immobilizasyon yolu ile hidroliz performanslarını kaybetmeden tekrar kullanılabilir hale getirilmesi bir çözüm stratejisi olarak sunulabilir.

Bu tez çalışmasında, β -Glukozidaz (*Aspergillus niger*) ve β -Ksilozidaz (*Selenomonas ruminantium*) enzimlerinin Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller (MNP) üzerine kimyasal immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. MNP yüzeylerinin modifikasyon aşamalarında 3-Aptes ve gluteraldehit kullanılmıştır. Enzim immobilizasyonu sonucu β -Glukozidaz'ın geri kazanılan aktivite yüzdesi %67.0, β -Ksilozidaz'ın %38.5 olarak hesaplanmıştır, 15. kullanımda immobilize β -Glukozidaz aktivitesini ortalama %59.7, immobilize β -Ksilozidaz ortalama %21.4 korumuştur. Immobilize enzimler için en iyi depolama koşullarının, korunan ortalama %87.85 aktivite ile deiyonize suda +4°C'de olduğu belirlenmiştir,

immobilize enzimler aktivitelerini 4 haftalık depolama sonucunda serbest enzimlere göre 3 kat korumuştur.

Gerçekleştirilen HPLC analizleri sonucu, ASTVII molekülünün sadece immobilize β -Glukozidaz kullanımı ile %4.45, immobilize β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz kullanımı ile %4.32 verimle ASTIV molekülüne dönüştüğü belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzim immobilizasyonu, β -Glukozidaz, β -Ksilozidaz, manyetik nanopartikül, biyotransformasyon, Astragalozit IV, Astragalozit VII



ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF BETA-GLUCOSIDASE AND BETA-XYLOSIDASE
ENZYMES ON MAGNETIC NANOPARTICLES AND THEIR USE FOR
BIOTRANSFORMATION OF PRODRUG MOLECULES

ŞİMŞEK, Bürde

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

August 2021, 100 pages

Cycloastragenol can be obtained by chemically hydrolysis of the cycloartane glycosides of Astragaloside IV and Astragaloside VII. Green hydrolysis methods are needed because this hydrolysis process leads to the formation of many by-products and chemical waste that is difficult to remove. Enzymes are an effective tool for biotransformations due to their reusability, operation at appropriate pH and temperature, and ease of downstream processing. However, enzymes restricts their applications economically. Making enzymes reusable by immobilization without losing their hydrolysis performance can be presented as a solution strategy.

In this thesis, chemical immobilization of β -Glucosidase (*Aspergillus niger*) and β -Xylosidase (*Selenomonas ruminantium*) enzymes on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNP) was performed. 3-Aptes and glutaraldehyde were used in the modification stages of MNP surfaces. The recovered activity percentage of immobilized β -Glucosidase was calculated as 67.0%, and β -Xylosidase was calculated as 38.5%. In the 15th use, the immobilized β -Glucosidase activity preserved an average of 59.7%, and the immobilized β -Xylosidase an average of 21.4%. It was determined that the best storage conditions for immobilized enzymes were at +4°C in deionized water with a preserved average activity of

87.85%. After 4 weeks of storage, the activities of immobilized enzymes were preserved 3 times compared to free enzymes.

As a result of the HPLC analysis, it was determined that the ASTVII molecule was converted to ASTIV molecule with a yield of 4.45% only with the use of immobilized β -Glucosidase, and 4.32% with the use of immobilized β -Glucosidase and β -Xylosidase.

Keywords: Enzyme immobilization, β -Glucosidase, β -Xylosidase, magnetic nanoparticle, biotransformation, Astragaloside IV, Astragaloside VII



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında rehberliğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN'e, bu çalışma için ASTIV, ASTVII ve CA moleküllerini tedarik eden ve HPLC analizlerini gerçekleştiren Prof. Dr. Erdal BEDİR ve Araş. Gör. Melis KÜÇÜKSOLAK'a, kimyasal malzeme yardımlarından dolayı Doç. Dr. Serap EVRAN'a, kıymetli görüşlerinden yararlandığım ve yakın ilgisini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN ve sayın Dr. Melis KUBAN ALTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bana güvenerek beni cesaretlendiren, ihtiyacım olduğunda desteklerinden emin olduğum değerli aileme ve yakınlarıma, tecrübelerini paylaşarak yol gösteren değerli hocalarıma ve yüksek lisans eğitim sürecimi güzel zamanlarıma dönüştüren değerli Biyoproses Laboratuvar ekibine çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 119Z679 numaralı TÜBİTAK 1002 projesi tarafından desteklenmiştir.

03/08/2021

Bürde ŞİMŞEK



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Enzimler	5
2.1.1 Enzim Kinetiği	7
2.1.2 β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz	11
2.2 Enzimlerin İmmobilizasyonu	15
2.2.1 Çapraz Bağlanma	17
2.2.2 Adsorpsiyon	17
2.2.3 Kovalent Bağlanma	18
2.2.4 Afinite İmmobilizasyonu	18
2.2.5 Enkapsülasyon	19
2.3 İmmobilizasyon Destekleri	19
2.3.1 Manyetik Nanopartiküllere Enzim İmmobilizasyonu	21
2.4 Ninhidrin Analizi	24
2.5 Katı Faz Ekstraksiyonu	25
2.6 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	27
2.7 İstatiksel Deney Tasarımı (SDoE- Statistical Design of Experiments)	28
2.8 Biyotransformasyon	29
2.8.1 İlaç Moleküllerinin Biyotransformasyonları	30
2.8.2 Biyotransformasyonların Gerçekleşme Yolları	31
3. MATERYAL METOT	37

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Materyal.....	37
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.2 Enzimler.....	37
3.1.3 Kullanılan alet ve cihazlar	38
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	38
3.2 Metot	39
3.2.1 3-APTES ile Yüzey Aktivasyonunu Gerçekleştirme	39
3.2.2 Yüzeyde Oluşan Amino Gruplarının Tayini: Ninhidrin Analizi	39
3.2.3 Gluteraldehit ile Enzimler İçin Bağlanma Ara Kolu Oluşturma	41
3.2.4 Taşıyıcı Üzerinde Oluşturulan Gluteraldehit Ara Kollarının Analizi ...	42
3.2.5 Protein Tayini (Bradford Yöntemi)	42
3.2.6 β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz İmmobilizasyonu	43
3.2.7 Manyetik Nanopartiküllerin FTIR ve SEM Analizleri.....	46
3.2.8 İmmobilize Enzimlerin Aktivite Tayinleri	46
3.2.9 İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerini Bulma.....	48
3.2.10 İmmobilize ve Serbest Km ve Vmax Hesaplamaları.....	49
3.2.11 İmmobilize Enzimlerin Reaksiyon Koşullarındaki Stabilitelerini İnceleme.....	50
3.2.12 İmmobilize Enzimlerin Tekrarlı Kullanım Denemeleri	50
3.2.13 Ortamdaki Metanolün İmmobilize Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme.....	50
3.2.14 Farklı Depolama Koşullarının İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme	51
3.2.15 Biyotransformasyonun Gerçekleştirilmesi	51

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.16 Ekstraksiyon Çalışması	52
3.2.17 İnce Tabaka Kromatografi (İTK) Çalışması	52
3.2.18 Biyotransformasyon Örneklerinin HPLC Analizi ile Yapı Tayini.....	52
4. BULGULAR.....	56
4.1 3-Aptes ile Yüzey Aktivasyonunu Gerçekleştirme.....	56
4.2 Yüzeyde Oluşan Amino Gruplarının Tayini: Ninhidrin Analizi	57
4.3 Gluteraldehit ile Enzimler İçin Bağlanma Ara Kolu Oluşturma ve Analizi	58
4.4 Protein Tayini (Bradford Yöntemi)	58
4.5 β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz İmmobilizasyonu.....	59
4.6 Manyetik Nanopartiküllerin FTIR ve SEM Analizleri	60
4.7 İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerini Bulma	63
4.8 İmmobilize ve Serbest Km ve Vmax Hesaplamaları	64
4.9 İmmobilize Enzimlerin Reaksiyon Koşullarındaki Stabilitelerini İnceleme	66
4.10 İmmobilize Enzimlerin Tekrarlı Kullanım Denemeleri.....	67
4.11 Ortamdaki Metanolün İmmobilize Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme	68
4.12 Farklı Depolama Koşullarının İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme	69
4.13 Biyotransformasyon İşlemi Sonrası Bulgular	70
4.14 Biyotransformasyon Örneklerinin HPLC Analizi ile Yapı Tayini	75
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	79
6. ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	87
ÖZGEÇMİŞ	99



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Protein yapılarının dört seviyesi.....	5
Şekil 2.2 Uygulama alanlarına göre küresel endüstriyel enzimlerin market payları	7
Şekil 2.3 Enzimal reaksiyonlarda ürün ve substrat konsantrasyonunun zamana göre değişimi.....	8
Şekil 2.4 Michaelis-Menten Grafiği	10
Şekil 2.5 Lineweaver-Burk grafiği	11
Şekil 2.6 <i>Paenibacillus polymyxa</i> kaynaklı β -Glukozidaz enziminin yapısı.....	12
Şekil 2.7 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> kaynaklı β -Ksilozidaz enziminin yapısı	13
Şekil 2.8 pNPG ve pNPX substratlarından β -Glukozidaz ve b-Ksilozidaz enzimleri ile pNP oluşumunun şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.9 Enzim immobilizasyon teknikleri	17
Şekil 2.10 3-Aptes moleküler yapısı.....	22
Şekil 2.11 Gluteraldehit moleküler yapısı	23
Şekil 2.12 Yüzeyi silanlanmış manyetik nanopartiküllerin ninhidrin analizi reaksiyon şeması.....	25
Şekil 2.13 Katı faz ekstraksiyon prosedürünün şematik gösterimi	26
Şekil 2.14 Biyotransformasyonların gerçekleşme yolları.....	32
Şekil 2.15 CA, ATSIV ve ASTVII molekül yapısı.	34
Şekil 3.1 Ninhidrin analizi adımları.....	40
Şekil 3.2 Sağda farklı 3-Aptes konsantrasyonlarında (h/h) hazırlanan tüpler, solda ninhidrin standart grafiği	41
Şekil 3.3 Bradford standart grafiği	43
Şekil 3.4 Çalışmanın enzim immobilizasyon şeması	44
Şekil 3.5 Disk karıştırıcı	45
Şekil 3.6 pNP standart grafiği.....	47
Şekil 3.7 İmmobilize enzimlerin aktivite tayininde izlenen adımlar.....	47
Şekil 3.8 Solda aktivite tayin tüpündeki vortekslenmiş immobilize enzimler, sağda mıknatısla dipte toplanmış immobilize enzimler.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sayfa

Şekil 3.9 C18 silika kartuşları ve vakum manifoldu kullanılarak oluşturulan ekstraksiyon sistemi	52
Şekil 3.10 HPLC analizi yapılan biyotransformasyon örnekleri	53
Şekil 3.11 ASTVII kalibrasyon grafiği.	55
Şekil 3.12 ASTIV kalibrasyon grafiği.	55
Şekil 4.1 Kullanılan gluteraldehit oranları %2.5, %10, %25 (h/h) sonrası MNP, en sağda 3-Aptes kaplı MNP	58
Şekil 4.2 3-Aptes ve gluteraldehit FTIR analizi	61
Şekil 4.3 İşlem görmüş MNPlar'ın FTIR analizi.....	61
Şekil 4.4 SEM grafikleri..	62
Şekil 4.5 İşlem görmemiş, 3-Aptes, gluteraldehit muamelesi sonrası, β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz immobilize edilmiş MNP'lerin SEM analizi ile ölçülen boyutları (nm).	62
Şekil 4.6 Enzim aktivitelerinin contour yüzey grafikleri.....	63
Şekil 4.7 İmmobilize β -Glukozidaz ve serbest β -Glukozidaz enziminin Michaelis-Menten grafiği.....	64
Şekil 4.8 İmmobilize β -Ksilozidaz ve serbest β -Ksilozidaz enziminin Michaelis-Menten grafiği.....	65
Şekil 4.9 İmmobilize ve serbest β -Glukozidaz'ın Lineweaver-Burk grafiği	65
Şekil 4.10 İmmobilize ve serbest β -Ksilozidaz'ın Lineweaver-Burk grafiği	66
Şekil 4.11 β -Glukozidaz stabilite grafiği	67
Şekil 4.12 β -Ksilozidaz stabilite grafikleri	67
Şekil 4.13 β -Glukozidaz enziminin tekrarlı kullanımlarındaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri.....	68
Şekil 4.14 β -Ksilozidaz enziminin tekrarlı kullanımlarındaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri.....	68
Şekil 4.15 İmmobilize enzimlerin farklı depolama koşullarındaki 4 haftalık karşılaştırmalı aktiviteleri	69
Şekil 4.16 Serbest enzimlerin farklı depolama koşullarındaki 4 haftalık karşılaştırmalı aktiviteleri	70

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sayfa

Şekil 4.17 A,B ve C biyotransformasyon denemelerinin İTK sonuçları.....	71
Şekil 4.18 3, 6, 5, 4 günlük ve 100µL metanol eklenmiş 5 günlük biyotransformasyon denemelerinin İTK sonuçları.....	72
Şekil 4.19 1-7 ve 2-7 biyotransformasyon denemelerinin İTK sonucu.....	73
Şekil 4.20 50 °C’de 3 gün süren biyotransformasyon denemesinin İTK sonucu..	73
Şekil 4.21 İmmobilize enzimlerin yüksek aktivite verdikleri sıcaklık ve pH’ta gerçekleşen biyotransformasyonların İTK sonuçları.....	74
Şekil 4.22 İmmobilize β-G ve β-K’nın yüksek aktivite verdikleri sıcaklık ve pH’ta gerçekleşen biyotransformasyonların İTK sonuçları.....	74
Şekil 4.23 İmmobilize β-G’nin biyotransformasyonlarının İTK sonuçları	75
Şekil 4.24 Tüm örneklerin HPLC kromatogramlarının kıyaslanması	77
Şekil 4.25 Örnek 6’ya ait HPLC kromatogramı	77
Şekil 4.26 Örnek 7’ye ait HPLC kromatogramı	77
Şekil 4.27 Örnek 6 (kırmızı) ve Örnek 6 - ASTIV (mavi) örneklerinin kıyaslanması	78
Şekil 4.28 Örnek 7 (mavi) ve Örnek 7 - ASTIV (kırmızı) örneklerinin kıyaslanması	78



TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 İmmobilizasyon desteği olarak kullanılan materyaller ve kullanıldığı örnek çalışmalar.....	20
Tablo 2.2 Astragalozitlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları	36
Tablo 3.1 Standart çözeltilerin seyreltme hacimleri	43
Tablo 3.2 Optimum sıcaklık ve pH çalışması için hazırlanan Box-Behnken deneme deseni	49
Tablo 3.3 Analizi gerçekleştirilen hidroliz örneklerinin içerikleri, çözündükleri solvent ve son konsantrasyonları	54
Tablo 3.4 HPLC analizi için kullanılan mobil faz ayırım profili.....	54
Tablo 4.1 Farklı nanopartikül miktarının ninhidrin analizinde okunan absorbans ve 3-Aptes/Nanopartikül değerleri	57
Tablo 4.2 Kullanılan ticari enzimlerin protein yoğunlukları	58
Tablo 4.3 İmmobilizasyon çalışmalarındaki geri kazanım yüzdeleri.	59
Tablo 4.4 Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık, pH değerleri ve ANOVA verileri.	64
Tablo 4.5 Serbest ve immobilize enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri	66
Tablo 4.6 ASTVII için örneklerin HPLC analiz sonuçları	76
Tablo 4.7 ASTIIV için örneklerin HPLC analiz sonuçları	76



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

-NH ₂	Amino Radikali
-COOH	Karboksil Grubu
-SH	Sülfidril Grubu/Tiol
-OH	Hidroksil Grubu
Fe ₃ O ₄	Demir (II, III) Oksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NH ₃	Amonyak

Kısaltmalar

ASTIV/VII	Astragalozit 4/7
AG	Astragenol
CA	Cycloastragenol (Sikloastrogenol)
β-G	β-Glukozidaz
β-K	β-Ksilozidaz
MNP	Manyetik Nanopartikül
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
EC	Enzim Komisyonu
MW	Moleküler Ağırlık
pNPX	4-Nitrophenyl β-D-xylopyranoside
pNPG	4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside
pNP	4-Nitrofenol
3-Aptes	(3-Aminopropil) trietoksisilan
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
SDoE	İstatiksel Deney Tasarımı
h/h	Hacim/hacim oranında
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
CCD	Merkezi Komposit Tasarımı
ANOVA	Varyans Analizi



1. GİRİŞ

İlaç ham maddeleri günümüzde fermentasyon, yarı sentez, sentez gibi farklı metotlarla üretilmektedir. Bunların yanında bitkisel ve hayvansal kökenli olup ekstraksiyon ve damıtma yoluyla üretilen ilaç ham maddeleri de mevcuttur. Üretilen ham maddeler ilaç veya ilaç öncül moleküller olarak kullanılmaktadır (Rautio vd., 2008). İlaç öncül moleküllerin enzimatik ve / veya kimyasal transformasyonları sonucu farmasötik etkileri artmış, ilaç ham maddeleri olarak kullanıma uygun metabolitler oluşur (Jum' & Karaman, 2014; Padmavathy & Saravanan, 2017).

Saponinler, yüksek molekül ağırlığına sahip bir triterpenik ya da steroidal çekirdek üzerinde şeker üniteleri taşıyan ve bitkiler âleminde geniş yayılım gösteren sekonder metabolitlerdir. Saponince zengin bitkiler geleneksel tıpta yüzyıllardır bilinmekte ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kuban, 2010). Sadece fotosentetik ökaryotlar tarafından üretilen sikloartan tipi triterpenoitler (9 β ,19-siklolanostan) ilk defa *Astragalus* bitkisinde tanımlanmıştır. Bu grup bileşikler yönünden zenginlikleri ve özellikle moleküler düzeyde biyoaktivitelerinin ortaya konulması *Astragalus* türlerini ilgi odağı haline getirmiştir. Sikloartanların ve yarı-sentetik türevlerinin biyolojik aktiviteleri özellikle kolesterol düşürücü, antikanserojen ve immünomodülatör etkileri ile ön plana çıkmaktadır (Bedir vd., 2000; Mamedova ve Isaev, 2004).

Telomerler, kromozomların uçlarında bulunan tekrarlı DNA dizileridir ve her hücre bölünmesinde kısalırlar. Bölünme ile oluşan yeni hücrelerin muhtemelen hasarlı ve yanlış kopyalanmasına sebep olduğu düşünülen bu durum, aynı zamanda hücrenin bölünme kapasitesini düşürerek hücrenin fonksiyonunu kaybetmesine, yaşlanmasına ve ölmesine sebep olur (Dow ve Harley, 2016). Harley vd. (2013) yaptıkları çalışma ile gıda takviyesi olarak alınabilecek bazı besinlerin, telomerlerin yeniden inşasını sağlayan telomeraz enzimin aktivitesini arttırdığını saptamıştır. Sağlıklı hücrelerin DNA'larındaki telomerleri uzatabildiğini ve yeni oluşan hücrelerdeki telomer uzunluklarını arttırdığını, telomer kısaltmalarını tamir edebileceğini ve kısalma hızlarını azaltabileceğini belirtilmiştir. Yeni oluşacak uzun telomerli hücrelerin yaşlanmayı geciktireceği ortaya konulmuştur (Cappello, 2014).

Astragalus sikloartan glikozitin aglikonu olan Sikloastragenol'ün (Cycloastragenol=CA) telomeraz aktivatörü olduğu keşfedilmiştir (US Patent 7846904 B2 (Calvin vd., 2007)). Geron firması (2004) *Astragalus membranaceus*'ta telomeraz aktivatörü bu bileşiğin varlığını keşfetmiş ve bileşik TA Sciences tarafından lisansı alınarak 2007 yılında TA-65 ticari ismiyle yaşlanmayı geciktiren (anti-aging) bir ürün olarak gıda takviyesi piyasasına arz edilmiştir. TA-65 hali hazırda piyasadaki doğal kökenli tek telomeraz aktivatörüdür. Gerçekleştirilen randomize çift kör plasebo kontrollü klinik çalışma sonucunda ürünle ilişkili herhangi bir toksik etki göstermeden TA-65'in insanda telomerleri uzattığı ve sağlıklı yaşlanmaya katkı yaptığı saptanmıştır (Salvador vd., 2016).

TA-65'in makular dejenerasyon tedavisinde de etkili olduğu randomize plasebo kontrollü klinik bir çalışma ile ortaya konmuştur (Dow ve Harley, 2016).

Sikloastragenol (CA) ve astragenol (AG)'ün de içinde bulunduğu bileşiklerin kozmetik amaçlı kullanımıyla ilgili de patentler mevcuttur (US 20070154435 A1; WO 2005000248, US 9248088 B2 (Alto, 2007)).

Çin ve Kanada'da üretilerek ticareti yapılan ve ülkemizde de yüksek saflıkta ve rekabetçi fiyatlarla üretilen iki sikloartan molekülü, Türkiye'de ihracatı yapılan katma değeri en yüksek bitkisel kaynaklı saf maddelerdir (Telomeraz Aktivatörü Astragalozit IV ve Sikloastragenol; Ticari son ürün ismi: TA-65) olarak 5.000–16.000 USD/kg fiyat aralığında A.B.D.'ye ihraç edilmektedir (Üretici firma: Bionorm Doğal Ürünler San. Tic. Ltd. Şti.). Astragalozit VII (Astragalozit=AST), ihracatı yapılan bileşiklerle aynı kimyasal gruptan (sikloartan saponin) olup tridesmozidik yapıya sahip olduğu tespit edilen ilk triterpenik saponindir. Türkiye'de *Astragalus* türlerinden de elde edilerek üzerinde ileri araştırmalar halen devam etmektedir. Nitekim ASTVII'nin *Astragalus* köklerindeki immünostimulan etkisi en yüksek bileşiklerden biri olduğu ortaya konulmuştur (Yesilada vd., 2005).

CA, ASTIV ve ASTVII gibi sikloartan glikozitlerin kimyasal olarak hidrolizi (asidik/bazik) ile elde edilmektedir. Bu hidroliz prosesi birçok yan ürün oluşumuna yol açtığı ve giderilmesi oldukça zor kimyasal atık yükü getirdiği için yeşil hidroliz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Enzimler, enerji gereksinimlerinin ve işletme maliyetlerinin düşük olması, atık üretimlerinin az olması ve basitleştirilmiş üretim

yolları ile ilaç, enerji, yiyecek ve içecek endüstrilerinde biyotransformasyon çalışmaları için tercih edilir hale gelmişlerdir (Chapman vd., 2018; Gupta vd., 2011).

Günümüzde ilaç öncül moleküllerin biyotransformasyon yoluyla sentezlenebilmesi için mikrobiyal ve enzimatik reaksiyonlar kullanılmaktadır. CA molekülünün biyotransformasyonu için mikrobiyal transformasyon tekniğinin denendiği çalışmalarda (Kuban, 2010; Kuban vd., 2013) işlem süresi uzundur ve işlem steril ortamda sürdürülmek durumundadır. Bunların yanında mikrobiyal biyotransformasyonda oluşan metabolitler alt akım işlem basamaklarını gerekli kılmakta ve bu durum üretim maliyetini arttırmaktadır. Enzimler, tekrar kullanılabilirliği, uygun pH ve sıcaklıkta çalışmaları ve alt akım işlemlerinin kolaylığı sayesinde biyotransformasyonlar için etkili ve daha ekonomik bir yöntem sunmaktadır. Literatürde CA molekülünün üretimi için serbest enzimlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Li vd., 2019).

β -Glukozidazlar (β -D-glikozit glikohidrolazlar, EC 3.2.1.21) ve β -Ksilozidazlar (1,4- β -Ksilozidaz, EC 3.2.1.37) tarafından gerçekleştirilen biyotransformasyon uygulamaları, ginsenosidler, radix astragali saponinleri ve flavonoidleri gibi bileşiklerin hidroliz çalışmalarında gün geçtikçe odak noktası haline gelmeye başlamıştır (Li vd., 2019). β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz enzimleri, glikozit bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu iki enzimin glikozitleri hidroliz etmesi sonucu glikoz ve ksiloz uçlar ayrılır, ilaç öncül aglikon molekülleri açığa çıkar. Bu mekanizma biyotransformasyon reaksiyonlarının 1. fazına dahildir (Acar, 2013; De Alencar Figueira vd., 2011; Polizeli vd., 2005; Poutanen ve Puls, 1988).

Günümüzde biyotransformasyon reaksiyonları için tercih edilmeye başlanan bu enzimlerin piyasa değerlerinin yüksek olması, kullanıldıkları uygulamaları ekonomik olarak kısıtlar. Enzimlerin hidroliz performanslarını kaybetmeden tekrar kullanılabilir hale getirilmesi bu kısıtlamaya bir çözüm stratejisi olarak sunulabilir.

İmmobilizasyon uygulamaları, enzimlerin tekrar kullanılabilmelerini, sürecin etkili bir şekilde kontrol edilebilmesini ve enzim kayıplarını önlemeyi olanaklı kılarken aynı zamanda sistemin tasarımını ve alt akım işlemlerini kolaylaştırır.

Zaman, yer ve işçilikten tasarruf edilmesini sağlar (Chapman vd., 2018). İmmobilizasyon işlemleri için kimyasal ve fiziksel olarak çeşitli yollar izlenmektedir. Kimyasal immobilizasyon örneklerinden biri olan kovalent bağlanma ile immobilizasyon, enzimler için kararlı bir bağlanma sunar. Kovalent bağlı enzimler bağlandıktan sonra destekten ayrılmazlar, bu nedenle enzimlerde aktivite kaybının yaşanmaması için desteğe aktif kısımlarından bağlanmamış olmaları önemlidir (Sankpal ve Kulkarni, 2002).

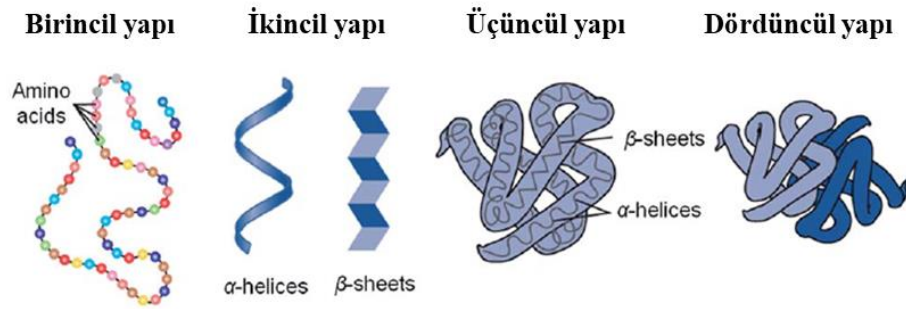
Enzimlerin manyetik nanopartiküller (MNP) üzerine kovalent olarak immobilize edilebilmeleri için nanopartikül yüzeylerinde reaktif grupların bulunması gereklidir. Gerekli reaktif grupları elde edebilmek için yüzey aktifleştirme işlemleri uygulanır ve yüzeyde amino, karboksil, hidroksil, sülfidril grupları oluşturulur. Siyanojen bromu, karbodiimit, aminoalkiledoksisilan, gluteraldehit, epiklorhidrin gibi özel reaktifler, destek üzerindeki fonksiyonel grupla bağ oluşturabilmek için kullanılan bağlanma ajanlarındandır (Vakıl Nashyan, 2012). Manyetik materyallerin immobilizasyonu teknik olarak daha hızlı ve uygulama olarak daha kolaydır. Bu materyaller, manyetik özellikleri sayesinde kullanıldıkları işlem sonunda mıknatıs ile ortamdan çekilebilirler. Sağladıkları uygulama kolaylığı, pahalı saflaştırma işlemlerinin sebep olduğu üretim maliyeti artışını önleyebilir (Acar, 2013).

Bu çalışmada β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz enzimlerinin manyetik nanopartiküller üzerine kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve immobilize edilen enzimlerin ASTIV ve ASTVII moleküllerinin CA molekülüne biyotransformasyonunda kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Enzimler

Enzimler, aminoasitlerin peptit bağları ile birbirlerine bağlanması ile oluşan biyolojik moleküllerdir. Protein yapıdaki bu moleküller katalitik aktivite için gerekli olan ve kofaktör olarak adlandırılan protein harici bileşenler de içerebilirler (Arsalan ve Younus, 2018). Yapılarındaki ana zincirde, karbon (C) atomlarına bağlı hidrojen (H) atomları, amino grubu ($-NH_2$) ve karboksil grubu ($-COOH$) bulunur. Bu yapı enzimlerin birincil yapısıdır ve ileriki kompleks yapılardan sorumlu olup enzim aktivitesini doğrudan etkilerler. Polipeptit haldeki enzimlerin sahip oldukları oksijen atomları (O), amino grupları (NH) ile hidrojen bağlarını oluşturur, oluşan hidrojen bağları kıvrımlı α -helixleri ve düz β -sheetleri meydana getirir, ana zincirin keskin dönüş yaptığı bölümler β -turnler olarak adlandırılır böylece şekillenmeye başlayan enzimlerin ikincil yapıları oluşmuş olur (Talens-Perales vd., 2015). Üçüncül yapı ise zincirdeki radikal grupların etkisiyle ortaya çıkar ve enzime 3 boyutlu yapısını kazandırır. İyonik bağlar, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri ve suyun etkisiyle bir araya toplanan hidrofobik gruplar üçüncül yapının oluşmasını sağlar (Kotzia vd., 2012). Enzimlerin üçüncül yapıları, kovalent olmayan bağlanmalar yoluyla dördüncül yapılar adı verilen daha karmaşık düzenleri oluşturur. Protein yapısının dört seviyesi Şekil 2.1'deki gibi; birincil yapı (amino asit dizisi), ikincil yapı (konformasyon), üçüncül yapı (polipeptit zincirinin genel katlanması) ve dördüncül yapı (çoklu polipeptit zincirlerinin spesifik birleşimi) olarak özetlenebilir (N. H. C. S. Silva vd., 2014).



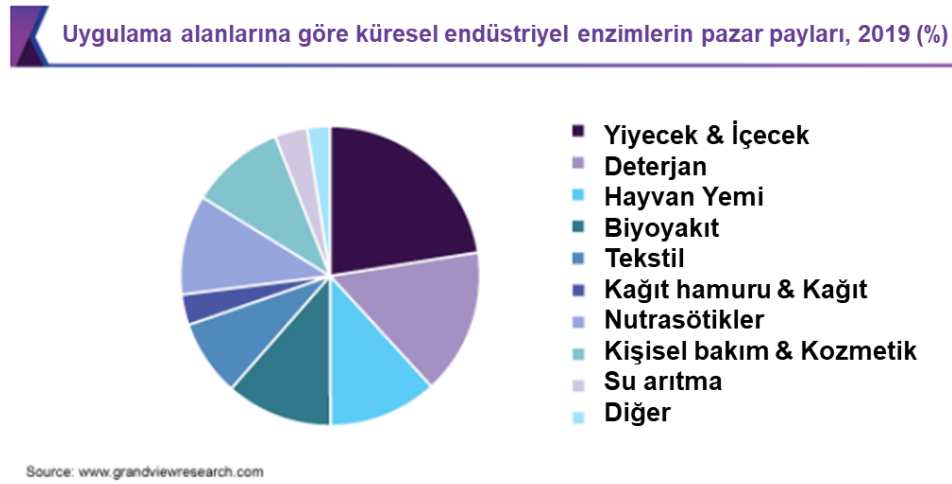
Şekil 2.1 Protein yapılarının dört seviyesi (Görsel kaynaktan uyarlanmıştır.) (N. H. C. S. Silva vd., 2014)

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar ve translokazlar olmak üzere yedi sınıfa ayrılmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzimler için yayınladığı terminoloji, 3196 farklı enzim hakkında bilgi içermektedir. Enzimlerin genel olarak adlandırılması Enzim Komisyonu'ndaki (EC) seri numaralara göre yapılır, ilk numara enzimin sınıfını ifade ederken diğer numaralar alt sınıfları gösterir (Porto de Souza Vandenberghe vd., 2020). Örneğin Beta-D-glukozit glukohidrolaz'ın EC numarası '3.2.1.21' şeklindedir.

Enzimler biyolojik katalizörlerdir ve katalizledikleri reaksiyonların meydana gelebilmesi için substratlarının yeterli aktivasyon enerjisine sahip olması gerekir. Enzimler reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek daha düşük bir enerjiyle gerçekleşmelerini sağlar. Reaksiyonların hızlarını yüzlerce kat arttırabilirler ve reaksiyonlardan etkilenmeden çıkarlar, bu sayede tekrar kullanılabilirler (Kotzia vd., 2012; N. H. C. S. Silva vd., 2014). Substratlarına özel olarak çalışırlar, sıcaklık, pH gibi çevresel şartlardan, ortamın substrat konsantrasyonundan, organik çözeltilerden, ortamda bulunan inhibitörlerden ve aktivatörlerden etkilenirler (Talens-Perales vd., 2015).

Reaksiyon koşullarının kolayca ayarlanabilmesi, substratlarına özgü olmaları, çevresel ve fizyolojik toksik etkilerinin düşük olmasına kadar uzanan çeşitli avantajları nedeniyle biyoteknolojik üretimler için kullanılan enzimler, yüksek verimli biyokatalizörlerdir. Enerji gereksinimlerinin ve işletme maliyetlerinin düşük olması, atık üretimlerinin az olması ve basitleştirilmiş üretim yolları ile ilaç, enerji, yiyecek ve içecek endüstrileri için biyotransformasyon çalışmalarında tercih edilir hale gelmişlerdir (Chapman vd., 2018; Gupta vd., 2011). Endüstriyel enzimlerden protein disülfid izomeras saç şekillendirmede (Gray, 2001), pektat liyaz pamuk temizlemede (Esteghlalian vd., 2007), lipaz yağlı lekelerin çıkarılması için çamaşır deterjanlarında (Houde vd., 2004), katalaz atık su arıtmalarında (Hos ve Frost, 1994), glukoz oksidaz yiyeceklerin raf ömrünün uzatılmasında (FIELD vd., 1986), transglutaminaz yoğurt ve krem şantide doku iyileştirmede (Ziaro ve Zaręba, 2020) kullanılır. Enzimlerin endüstriyel uygulamalar dışında organik moleküllerin eldesinde, tedavilerde, analitik ölçümlerde, gıda analizlerinde, genetik mühendislik çalışmalarında kullanımları

mevcuttur (Aehle vd., 2007). Grand Wiew Reaserch'ün endüstriyel enzimler üzerine gerçekleştirdiği pazar araştırmasına göre enzimlerin uygulamalarına göre enzim pazarındaki payları Şekil 2.2'de verilmiştir. Araştırmaya göre 2019'da 5,6 milyar ABD Doları değerinde olan küresel endüstriyel enzim pazar payının 2020'den 2027'ye kadar yıllık %6,4 büyüme oranında (CAGR) büyümesi beklenmektedir. Business Communication Company (BCC) Research 2017 yılında enzimler için gerçekleştirdiği market araştırmasında endüstriyel enzimlerin pazar payındaki artışların, aşırı atık üretimi sebebiyle para cezalarına maruz kalan tekstil, kağıt, deri ve biyodizel endüstrilerin, teknik enzim üretimine doğru kayma yaşamaları sonucu ortaya çıkabileceğini ifade edilmiştir (Chapman vd., 2018).



Şekil 2.2 Uygulama alanlarına göre küresel endüstriyel enzimlerin market payları (Görsel kaynaktan uyarlanmıştır, Kaynak: Grand Wiew Reaserch)

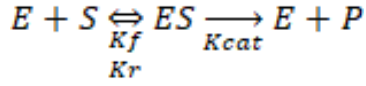
2.1.1 Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimatik reaksiyonların hızlarını ve bu hızların etkilendiği çeşitli faktörlerin incelenmesini ifade eder. Değişen koşulların enzimatik reaksiyonları ne şekilde etkilediği ve bu etkinin matematiksel olarak ifadesi enzim kinetiğinin kapsamını oluştur (Soetan vd., 2010).

Enzimatik reaksiyonlarda enzim [E] ve substratın [S] bir araya gelerek oluşturduğu yapı enzim-substrat kompleksi [ES] olarak ifade edilir. Bu kompleksin oluşumu çift taraflı bir reaksiyondur. 'k' ile ifade edilen birimler bu reaksiyonların

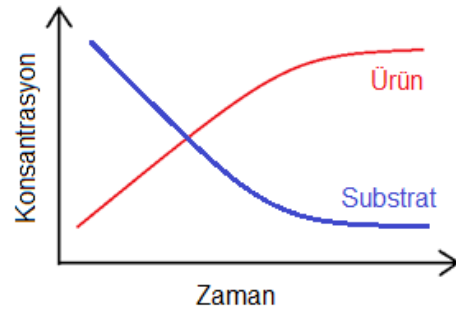
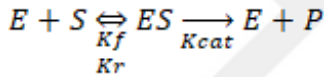
hız sabitleridir. Reaksiyon nihayetinde oluşan ürün [P] ile ifade edilir. Enzimler reaksiyonlardan etkilenmeden çıktıkları için [E] olarak kalır (Kotzia vd., 2012).

Enzimatik reaksiyon denklemi:



Birim zamanda oluşan ürün miktarı, reaksiyon hızı (v) olarak kabul edilir. Reaksiyon boyunca substratın tüketim hızı, ürünün oluşum hızına eşittir. Ürün ve substrat konsantrasyonlarında meydana gelen değişim takip edildiğinde zamanla birinin azalan diğerinin artan bir grafik çizdiği görülecektir (Şekil 2.3).

$$\text{Reaksiyon Hızı (v)} = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$



Şekil 2.3 Enzimal reaksiyonlarda ürün ve substrat konsantrasyonunun zamana göre değişimi

Reaksiyonda [ES] kompleksinin ortamdaki konsantrasyonunun sabitlendiği varsayıldığında [ES] oluşumu = [ES] yıkımına eşit olmuş olur. Bu durum 'k' hız sabitleri ile ifade edildiğinde:

$$K_f[E][S] = K_r[ES] + K_{cat}[ES]$$

$$K_f[E][S] = [ES](K_r + K_{cat})$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_r + K_{cat}}{K_f} = K_m$$

denklemleri elde edilir. Elde edilen K_m değeri Michaelis-Menten Sabitidir. Bu sabit, reaksiyon hızının yarısına denk gelen substrat konsantrasyonudur. K_m enzimler için kimlikli bir değer olup enzimlerin substratlarına bağlanma afinitelerini ifade eder. Büyük K_m değerine sahip olan enzimler küçük K_m değerine sahip olan enzimlere göre maksimum reaksiyon hızlarına daha geç ulaşırlar. Reaksiyon hızı enzim substrat kompleksinin K_{cat} hız sabiti ile hesaplanabilir.

$$V_o = \frac{d[P]}{dt} = K_{cat}[ES]$$

Reaksiyona giren enzimler etkilenmeden reaksiyondan ayrılır ve bu yüzden reaksiyon boyunca enzim miktarı korunur: *Toplam enzim* $\rightarrow E_o = E + ES$.

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$K_m = \frac{[E_o - ES][E]}{[ES]} = \frac{[E_o][S] - [ES][S]}{[ES]} = \frac{[E_o][S]}{[ES]} - \frac{[S]}{1}$$

Tüm enzimlerin substrata bağlı olduğu durumda: $E = 0, ES = E_o$ ve $V_{max} = K_{cat}[E_o]$ olur.

$V_o = \frac{V_{max}}{2}$ olduğu durumda $K_m = [S]$ olarak kabul edilir. Buradan:

$$E = E_o - ES, V_o = K_{cat}[ES], V_{max} = K_{cat}[E_o] \text{ ise}$$

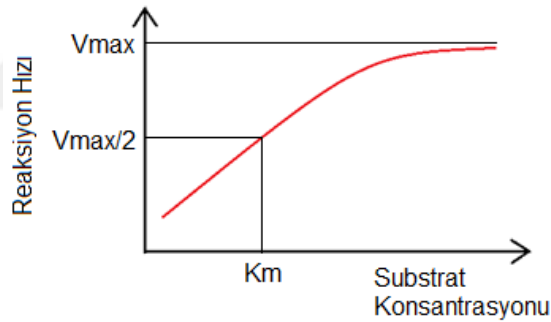
$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \text{ denklemleri elde edilir.}$$

Bu denklem **Michaelis-Menten** denklemleri olarak bilinir. Enzimatik reaksiyonların matematiksel olarak ifade edilebilmesini ve enzime ait kinetik

değerlerin hesaplanabilmesini sağlar. Bir diğer denklem ise Lineweaver-Burk Denklemdir.

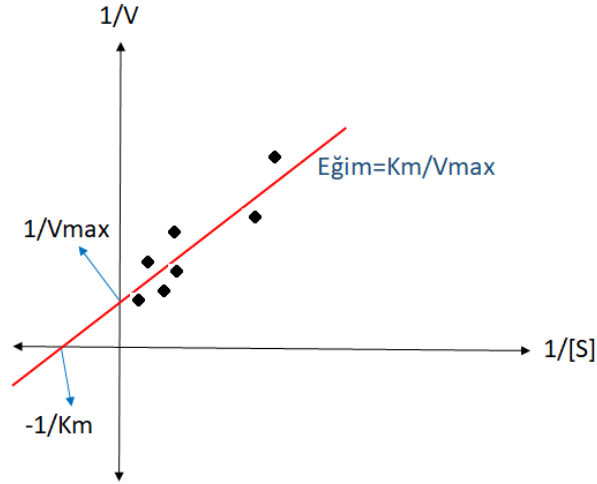
$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Michaelis-Menten grafiğini Şekil 2.4'te görüldüğü gibi elde etmek için, artan substrat konsantrasyonları kullanılarak sabit miktarda enzim ile sabit sıcaklıkta reaksiyon gerçekleştirilir. Birim zamanda substrat konsantrasyonuna karşılık oluşturulan ürün konsantrasyonu ile bir grafik elde edilir. Bu grafikte x eksenini substrat konsantrasyonunu [S] (M, mM vb.), y eksenini ürün oluşum hızını [V] (mol/dk, mM/dk vb.) gösterir. Belirli bir substrat konsantrasyonundan sonra reaksiyon hızının sabit kaldığı gözlemlenir. Bu nokta enzimin V_{max} 'ı olarak kabul edilir ve $V_{max}/2$ 'ye karşılık gelen substrat konsantrasyonu K_m değeridir (Roskoski, 2015).



Şekil 2.4 Michaelis-Menten Grafiği

1934'te Hans Lineweaver ve Dean Burk tarafından açıklanan enzim kinetik denklemini Şekil 2.5'te gösterildiği gibi **Lineweaver-Burk** grafiği olarak elde edebilmek için, reaksiyon hızının sabitleneceği yere kadar artan substrat konsantrasyonları ile seri reaksiyonlar gerçekleştirilir. Grafikte x eksenine $1/[S]$ değerleri, y eksenine $1/[V]$ değerleri yazılır. Grafikten elde edilen ' $y=mx+c$ ' eğim denkleminde $y=1/V_o$, $m= K_m/V_{max}$, $x= 1/[S]$ ve $c=1/V_{max}$ değerlerini verir (Roskoski, 2015; Uwaha, 2015).



Şekil 2.5 Lineweaver-Burk grafiği

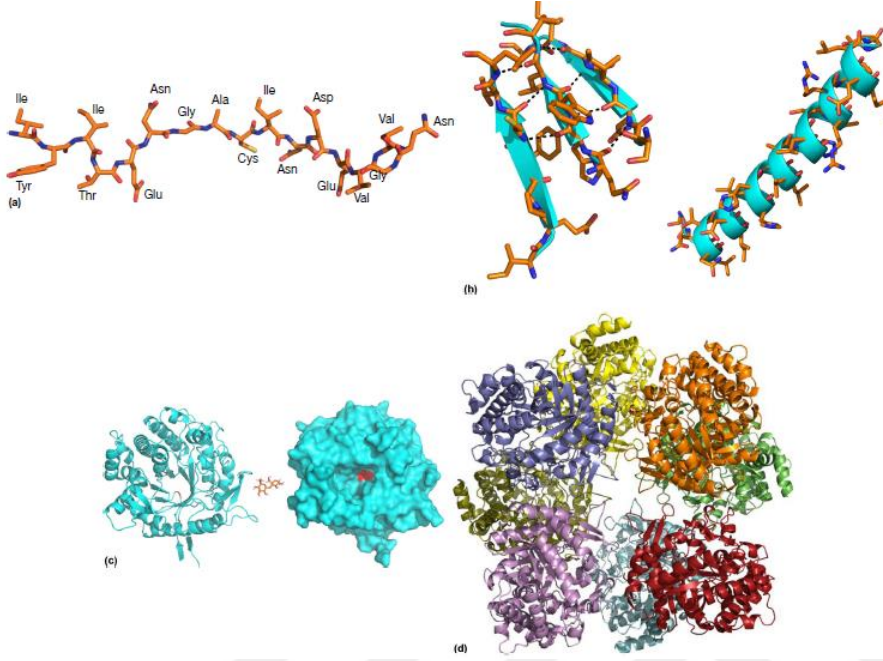
Enzimatik reaksiyonların hızları, sıcaklık ve pH'ta gerçekleşen değişikliklerden etkilenir. Enzim miktarının sabit olduğu durumda reaksiyon hızının en yüksek olduğu belirli bir pH aralığı vardır. Bu pH aralığı, protein yapıdaki enzimin sahip olduğu iyonik grupların farklı formlar arasından katalitik olarak en aktif olduğu formu sağlar. pH değişiminin enzimler üzerindeki etkisi enzim üzerinde bir denatürasyona sebep olmadığı sürece tersine çevrilebilir (Talens-Perales vd., 2015). Her enzimin optimum çalıştığı bir sıcaklık değeri vardır. Yüksek sıcaklıklara maruz kalan enzimlerde denatürasyon sonucu geri dönülmez bir aktivite kaybı yaşanabilir (Aehle vd., 2007).

Ortamdaki substrat harici bileşiklerin yoğunlukları enzimatik reaksiyonları etkiler. Bu etki reaksiyon hızını artırma veya azaltma olarak kendini gösterebilir. Azaltıcılar inhibitörler, arttırıcılar aktivatörler olarak adlandırılırlar. İnhibitörler üzerinde yapılacak çalışmalar ile enzimin substrat spesifikliğı, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı, aktif merkezde rol oynayan fonksiyonel gruplar ve enzimatik reaksiyonların kinetik mekanizmaları hakkında bilgi edinilebilir (Kotzia vd., 2012).

2.1.2 β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz

β -Glukozidaz (β -D-glukozit glikohidrolazlar, EC 3.2.1.21) (Şekil 2.6) ve β -Ksilozidaz (1,4- β -ksilozidaz, EC 3.2.1.37) (Şekil 2.7) glukozit bağlarının

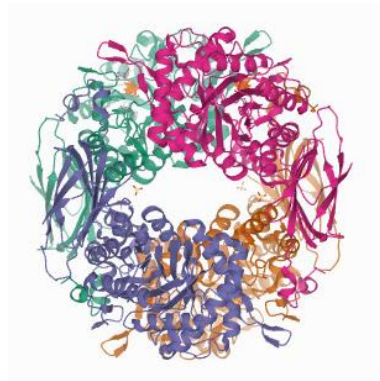
hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Hidroliz reaksiyonu sonucu moleküllerdeki monomerik şeker uçlar yapıdan ayrılır (De Alencar Figueira vd., 2011; Polizeli vd., 2005; Poutanen ve Puls, 1988).



Şekil 2.6 *Paenibacillus polymyxa* kaynaklı β -Glukozidaz enziminin a) birincil yapısı, b) ikincil yapısı, c) üçüncül yapısı, d) dördüncül yapısı (Talens-Perales vd., 2015).

β -Glukozidaz, bakteriler, funguslar, bitkiler, hayvanlar gibi tüm canlı türlerinde üretilen ve çokça karşılaşılan bir enzimdir. Reaksiyon ürünleri ile ilaç, kozmetik, gıda, deterjan gibi endüstrilerde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Çeşitli glikozitleri hidrolize edebilme özellikleri ile birçok biyoteknolojik işlemde kullanıma potansiyeli taşımaktadırlar (Ahmed vd., 2017). Literatürde β -Glukozidaz enzimi ile gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmaları endüstriyel uygulamalardaki enzimatik verimin artırılması, immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi gibi farklı amaçlarla gerçekleştirilmiştir. Romo-Sánchez vd. (2014) şarap üretiminde şaraptaki kalite göstergesi olan aromayı sağlamak için yaptıkları çalışmada, β -Glukozidaz enzimini %0.25 glutaraldehit konsantrasyonu ile aljinat-kitin, kitosan-kitin destekleri üzerine adsorpsiyon, retikülasyon ve çapraz bağlanma-adsorpsiyon olmak üzere üç farklı yöntemle immobilize etmiştir. Çalışmada şarap aroması için arzu edilen bileşiklerin salınmasında immobilize enzimler serbest enzimle aynı başarıyı göstermiştir. Park

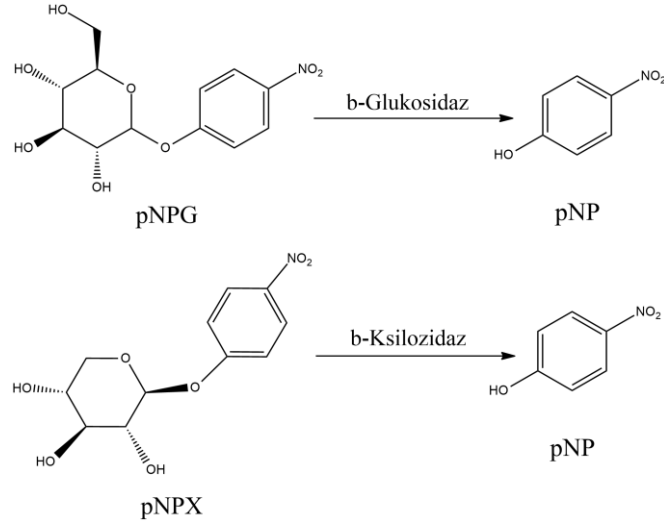
vd. (2018) yaptıkları çalışmada farklı polietilen glikol ara kol uzunlukları (MW: 200, 400, 1000) ve glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile MNP üzerine gerçekleştirdikleri β -Glukozidaz enzim immobilizasyonu sonucu farklı ara kol uzunluklarının immobilize enziminin spesifik aktivitesinde meydana getirdiği farklılıkların ihmal edilebilir olduğunu belirtmiştir. Hu vd. (2018) gerçekleştirdikleri çalışmada biçimsiz selüloz üzerine immobilize ettikleri β -glukozidazı kullanarak oluşturdukları sistem ile izoflavonun hidrolizini gerçekleştirerek aglikon molekülleri üretmişlerdir. Oluşturdukları düşük maliyetli sistemin büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar için avantajlı ve kullanışlı olduğunu ifade etmişlerdir. Selüloz kaynaklı biyoyakıt üretim prosesi için Fe_3O_4 nanopartiküller üzerine β -Glukozidaz immobilizasyonu gerçekleştiren Y. Zhou vd. (2013) yaptıkları çalışmada immobilizasyon işleminin enzimlerin reaksiyon pH'ı ve sıcaklık aralığını genişlettiğini, substratın erişilebilirliğinin, termal stabilitenin ve depolama stabilitesinin arttığını belirtmiştir. Valenzuela vd. (2014) gerçekleştirdikleri çalışmada *Trichoderma reesei*'den elde edilen β -Glukozidaz enzimini MNP üzerine immobilize ederek hidroliz reaksiyonunda selülaz enzimini desteklemek için kullanmışlardır. Oluşturulan sistem biyoetanol üretim prosesleri için maliyeti düşürecek bir yöntem olarak sunulmuştur. Acar (2013) tez çalışmasında mandalina meyvesinden saflaştırılan ve karbodiimide ile MNPlar üzerine immobilize edilen β -Glukosidaz enzimini mandalina meyve suyu ile muamele ederek meyve suyundaki aromatik kaliteye etkisi incelenmiş ve sonuç olarak oluşturduğu sistemin endüstriyel boyutta meyve sularında aroma artırıcı sistemlerin bir basamağı olarak potansiyel taşıdığını belirtmiştir.



Şekil 2.7 *Geobacillus stearothermophilus* kaynaklı β -Ksilozidaz enziminin yapısı (Czjzek vd., 2005).

β -Ksilozidaz, ksilan hidrolizinin son ürünü olan D-ksiloz oluşumuna kadar merkezi bir role sahiptir. Bu nedenle β -Ksilozidaz'ın verimli bir şekilde kullanılması birçok biyoteknolojik çalışmanın ana hedefi haline gelmiştir. β -Ksilozidaz'ı endüstriyel olarak değerlendirebilmek için birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Terrasan vd. (2017) bitki hücre duvarlarının ikinci ana bileşeni olan ksilanı tamamen parçalayabilecek yüksek aktivitede ve stabilitede biyokatalizörler elde etmek amacıyla *P. janczewskii*'den hücre dışı elde ettikleri minör β -Ksilozidaz'ı (BXYL II) ve bu fungusun ana β -Ksilozidaz'ı (BXYL I) glioksil agaroz jel üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Çalışma sonucunda aynı enzimlerin serbest hallerine göre yüksek sıcaklıkta, geniş pH aralığında ve uzun inkübasyon şartlarında stabil kalan immobilize β -Ksilozidazlar elde etmişlerdir. Fanchini Terrasan vd. (2016) çalışmasında *P. Janczewskii* kaynaklı ksilanaz, β -ksilozidaz ve α -L-arabinofuranozidazın agaroz bazlı destekler üzerine çapraz bağlama ile immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve arabinoksilanların hidrolizindeki kullanımları değerlendirmiştir. Çalışmada çoklu enzimlerin kullanımı ile farklı arabinoksilan ve ksilandan doğrudan ksiloz monosakarit oluşumunu gerçekleştirilmiş ve çoklu enzimler için eş zamanlı bir protokol oluşturulmuştur.

Kolorimetrik monosakaritler, saflaştırılmış veya ham enzim preparatlarında ekso etkili hidrolaz aktivitesinin sayısal ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır. Renge (absorbansa) dayalı aktivite ölçümlerini mümkün kılan monosakarit substratlar, monosakkarite bağlı (α - veya β -) kolorimetrik bir grup (pNP/4-nitrofenol) içerir (Şekil 2.8). Kolorimetrik monosakkarit substratlar, ekso etkili bir hidrolaz tarafından hidrolize edildiğinde, kolorimetrik gruplar ortama salınır (Uyanık, 2008). Enzim aktivitesini durdurmak için ortama alkali bir çözelti eklenir ve reaksiyon sona ermiş olur. Renk yoğunluğu, UV spektrofotometre kullanılarak ölçülür ve dalga boyu oluşan ürün konsantrasyonu hakkında bilgi edinmemizi sağlar (Acar, 2013).



Şekil 2.8 pNPG ve pNPX substratlarından β-Glukozidaz ve b-Ksilozidaz enzimleri ile pNP oluşumunun şematik gösterimi (ChemDraw®Ultra 12.0)

Bu çalışmadaki enzimlerin aktivite tayinleri için kullanılan yöntemin esası enzimlerin kolorimetrik monosakaritleri olan pNPG (4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside) ve pNPX (4-Nitrophenyl β-D-xylopyranoside) substratlarının enzimatik reaksiyon sonucu oluşturdukları p-nitrofenolün sodyum karbonatla (Na_2CO_3) 400 nm civarında spektrofotometrede ölçülebilecek sarı bir renk oluşturmasına dayanmaktadır (Li vd., 2019).

2.2 Enzimlerin İmmobilizasyonu

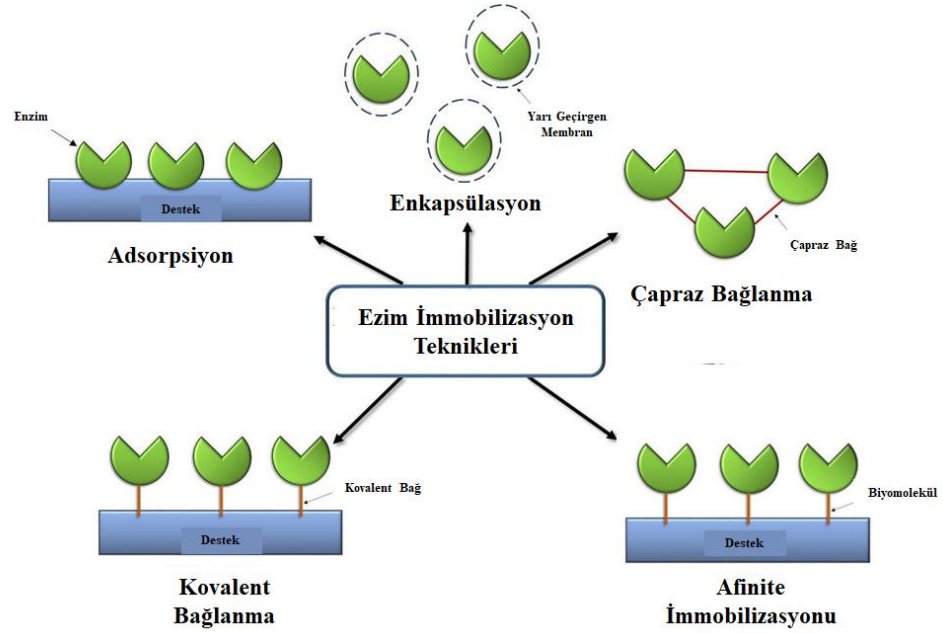
Enzimlerin immobilize edilmesi, onların belirli bir alanda sınırlandırılıp tutulması veya bir destek matrisine eklenmesi olayıdır. Enzim immobilizasyonu ile ilgili ilk bilimsel araştırma, Nelson ve Griffin (1916) tarafından mayadan ekstrakte edilen invertaz ile gerçekleştirilmiştir. Nelson ve Griffin yaptıkları çalışma sonucunda odun kömürüne adsorbe edilen enzimin doğal enzimle aynı aktiviteyi gösterdiğini açıklamıştır (Chibata ve Tosa, 1983). Bu çalışma ile enzim immobilizasyon tekniklerinin ilerlemesinin yolu açılmıştır. 1950'lerde ve 1960'larda geliştirilen immobilizasyon teknikleri günümüzde halen kullanılmaktadır (Ashkan vd., 2021).

Enzimlerin immobilizasyonu sayesinde tek bir enzim grubunun tekrar kullanımı sağlanabilir, enzim kayıpları önlenebilir, protein yapısının açılması

kısıtlanarak enzimin stabilitesi artabilir, enzimin ortamdan ayrılması ile reaksiyon hızlı bir şekilde kontrol edilebilir başlatılıp durdurulabilir, sistemin tasarımı ve alt akım işlemleri kolaylaşır, zaman, yer ve işçilikten tasarruf edilir, elde edilen ürün enzimle kontamine olmaz çünkü enzim immobilize haldedir. Kontaminasyonun engellenmesi özellikle gıda ve ilaç endüstrisi için büyük önem taşımaktadır (Chapman vd., 2018; Kotzia vd., 2012; Sankpal ve Kulkarni, 2002).

İmmobilize enzimlerin, hastalıkların tanı ve tedavileri, enzim yerine koyma tedavileri, yapay hücre ve organ çalışmaları, biyouyumlu yapay materyal kaplamaları (Soetan vd., 2010), zirai ilaçla kontamine olmuş atıkların arıtılması, ağır metallerin çevreden uzaklaştırılması (Chatterjee vd., 2019), tehlikeli kimyasal gazların veya buharların nötralize edilmesi (Liao vd., 2014), biyo-afinite kromatografisi ile proteinlerin saflaştırılması, biyomoleküllerin saflaştırılması ve ekstrakte edilmesi, biyodizel üretimi (M.M., 2011), yaşam tespiti ve gezegen keşfi (Kminek & Bada, 2006), biyosensör ve biyoreaktör gibi özgünlük ve proses boyunca devamlılık gerektiren biyoteknolojik ürünlerin üretiminde (Singh vd., 2017) kullanımları mevcuttur.

Enzim immobilizasyon işlemleri fiziksel veya kimyasal yöntemler izlenerek gerçekleştirilebilir. Kendi içinde bağlama ajanları ile birbirine bağlanabilir, destekler üzerine immobilizasyon için iyonik, kovalent, afinite bağlanmaları ve adsorpsiyon yöntemi izlenebilir, enkapsüle edilebilir. (Şekil 2.9) (Vaghari vd., 2016).



Şekil 2.9 Enzim immobilizasyon teknikleri(Görsel kaynaktan uyarlanmıştır.) (Jun vd., 2019)

2.2.1 Çapraz Bağlanma

Herhangi bir desteğin kullanılmadığı bu immobilizasyon işleminde enzim molekülleri fiziksel veya kimyasal bağlar ile birbirlerine bağlanarak 3 boyutlu daha büyük bir karmaşık yapı oluşturur. Kimyasal çapraz bağlanmada enzimler çeşitli çapraz bağlama ajanları ile kovalent bağlar oluştururlar. Fiziksel çapraz bağlanmalarda ise topaklaştırıcı (flokülasyon) ajanlar kullanılır (M.M., 2011). Çapraz bağlanma işlemlerinde, enzim molekülleri arasında oluşturulan çapraz bağ yapısının sertliği artırarak enzimler stabilize edilir ve desteğe ihtiyaç duyulmaz. Ancak bağlanma reaktifinin enzimlerin aktif bölgelerinden reaksiyona girmesi durumunda aktivite kaybı yaşanabilir veya enzim tamamen inaktive olabilir. Ayrıca kullanılan bağlanma reaktiflerinin yapılarından dolayı çapraz bağlanma her enzim için uygun bir seçenek olmayabilir (Singh vd., 2017).

2.2.2 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, enzim ve taşıyıcı arasında Van der Waals, iyonik ve hidrojen bağları gibi fiziksel etkileşimlerle gerçekleştirilen bir immobilizasyon türüdür. Bağlanma zayıftır ancak enzimlerin yapılarındaki bozulma diğer bağlanma türlerine göre daha azdır. Doğal yapıdaki bozulmanın azalması ile enzimlerin

özellikle aktif bağlanma bölgeleri korunur, aktivite kayıpları azalır (Jesionowski vd., 2014). Kontrol altına alınamamış işlemlerde proteinlerin aşırı yüklenmesi sonucu aktivite kayıpları gözlenebilmektedir. Zayıf bağlanmanın bir sonucu olarak enzimlerin destekten ayrılıp ortamı kontamine etmesi ve zamanla aktivitenin kaybolması gibi olumsuzluklarla karşılaşmaktadır. Ancak adsorpsiyon işlemlerinin dezavantajı olarak görülen bu özellikler, immobilize enzimlerin sıklıkla kullanıldıkları sensör ve analiz cihazlarına geri dönüştürülebilirlik ve dayanıklılık sağlamışlardır (Singh vd., 2017).

2.2.3 Kovalent Bağlanma

Enzimlerin, desteklere kovalent bağlanma ile bağlandığı immobilizasyon işleminde geri dönülmez güçlü bir bağ oluşturulur. Böylece bu teknik ile enzimlerin destekten sızması önlenmiş olur. Kovalent bağlanmalarda peptid ile modifiye edilmiş yüzeyler kullanılıp enzimlerin hassas hizalaması sağlanabilirse stabilite ve yüksek spesifik aktivite elde edilebilir (Singh vd., 2017). Ancak kovalent immobilizasyonlarda bağlar %100 kararlı olmadığı için, reaksiyon koşullarına dayanıklı hale getirilmemiş immobilize enzimlerde önemli ölçüde aktivite kaybı yaşanabilmektedir. Kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş enzimler, büyük ölçekli endüstriyel proseslerde, biyosensörlerde ve afinite kromatografilerinde durağan faz olarak kullanılabilirler (Trevan, 1988).

2.2.4 Afinite İmmobilizasyonu

Afinite immobilizasyonu enzimlerin desteklere özgül olması veya desteklerin afinite ligantlarıyla enzimlere özgül hale getirilmesi ile gerçekleşen biyomoleküler bir immobilizasyon metodudur. Kullanılan Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve kulombik kuvvetler gibi kovalent olmayan kuvvetler, enzimin yeniden kullanılabilirliğini artırır. Kullanılacak matriste yapılacak geliştirmeler sayesinde aktivitesi ve kararlılığı artırılmış enzim sistemleri elde edilebilir (Singh vd., 2017).

2.2.5 Enkapsülasyon

Enzimlerin, kovalent veya kovalent olmayan bağlar yardımıyla jel veya lifler gibi fiziksel bariyerler içinde tutuklanmasına enkapsülasyon denir. Bu teknik, çoklu enzim sistemlerinin hazırlanabilmesini ve sıralı enzim reaksiyonlarının gerçekleşebilmesini sağlar. Enzimlerin doğal yapıları korunur, bu sayede aktiviteleri korunmuş olur (Betancor ve Luckarift, 2008). Ancak oluşturulan sistemden enzim sızıntısını önlemek ve difüzyon sınırlamasını azaltmak için membranın kalınlığını ve geçirgenliğini kontrol etmek zahmetlidir. Bu nedenle, enkapsülasyon teknolojisi endüstriyel alanda kullanıma sahip immobilize biyokatalizörlerin hazırlanmasında daha az tercih edilmektedir (Linqiu Cao, 2005).

2.3 İmmobilizasyon Destekleri

Enzim immobilizasyon desteklerinin zamanla çeşitlenmesi, parçacık boyutu, kimyasal işlevsellik, ara kolun uzunluğu, gözeneklilik, enzimi çevreleyen mikro çevrenin hidrofilik-hidrofobik dengesi ve daha fazla özelliğin uygulamaya özgü seçilebilmesine imkan sağlamıştır. Bu seçim imkanı, immobilizasyon çalışmaları için büyük kolaylık sağlamaktadır. İmmobilizasyon uygulamalarının endüstriyel sistemlere uyarlanabilmesi için desteklerin mekanik mukavemeti, kimyasal ve fiziksel stabilitesi, maksimum enzim yükü, enzim sızıntı durumu veya nihai üretim maliyetleri de dikkat edilen özelliklerdir (Sheldon ve van Pelt, 2013; Torres-Salas vd., 2011). Demir oksitler, zeolitler, silika, alümina enzim immobilizasyonları için kullanılan inorganik desteklere örnek olarak verilirken, poliakrilamid, hidrojeller, silika sol-jeller, biyopolimerler, modifiye polisakkaritler organik polimer desteklere örnek olarak verilebilir (Torres-Salas vd., 2011). Tablo 2.1’de immobilizasyon desteği olarak kullanılan materyaller ve kullanıldığı örnek çalışmalar listelenmiştir.

Tablo 2.1 İmmobilizasyon desteği olarak kullanılan materyaller ve kullanıldığı örnek çalışmalar

Destek materyalleri		Kullanıldığı çalışmalar
Doğal polimerler	Aljinat	Ksantan-aljinat boncukları ile üreaz enziminin enkpsülasyonu (Elçin, 1995)
	Kolajen	Alkalen fosfatazın çapraz bağlama yöntemi ile kolajen yüzeyine immobilizasyonu (Hanachi vd., 2015)
	Kitosan ve Kitin	D-hidantoinazın kitin üzerine kitin bağlayıcı domain aracılığıyla (Chitin-binding domain) immobilizasyonu (Chern ve Chao, 2005)
	Karagenan	κ -Karragenan hidrojelleri üzerine kovalent bağlanma ve tutuklama yöntemi ile lipaz immobilizasyonu (Tümtürk vd., 2007)
	Jelatin	Fenilalanin amonyum liyaz kovalent bağlanma ile polyester film (asetat) üzerine, jelatine immobilizasyonu (Ateş ve Doğan, 2010)
	Selüloz	β -Galaktosidaz'ın iyonik sıvı-selüloz filme kovalent bağlanma ile immobilizasyonu (Klein vd., 2011)
	Nişasta	Nişasta jeli ile enzim immobilizasyonu (Patent) (Otto vd., 1983)
	Pektin	Glikoz oksidaz, mutarotaz, invertaz ve askorbat oksidaz'ın pektin bazlı jele immobilizasyonu (Jawaheer vd., 2002)
	Sefaroz	Laktoperoksidazın (LPO) concanavalin A-Sepharose 4B desteği üzerinde immobilizasyonu (Miroliaei vd., 2007)
Sentetik polimerler	İyon değişim reçineleri/polimerler	Kitosan ve Amberlite MB-150 boncukları üzerine α -amilaz immobilizasyonu (Kumari ve Kayastha, 2011)

Tablo 2.1 (Devam) İmmobilizasyon desteği olarak kullanılan materyaller ve kullanıldığı örnek çalışmalar

Destek materyalleri		Kullanıldığı çalışmalar
İnorganik materyaller	Demir Oksit	β -Glukozidaz'ın (Fe_3O_4) nanopartiküller üzerine immobilizasyonu (Valenzuela vd., 2014)
	Zeolit	Lizozimin ekstrüdat şeklindeki NaY zeolit üzerine immobilizasyonu (Chang ve Chu, 2007)
	Seramik	Kimyasal olarak modifiye edilmiş çift modlu seramik köpükler üzerinde lipazın immobilizasyonu (Huang ve Cheng, 2008)
	Diatomit	Sol-jel/ diatomit (celite) matrisine enkapsülasyon yoluyla ω -transaminazların immobilizasyonu (Koszelewski vd., 2010)
	Silika	Silika nanopartiküller üzerinde α -Amilaz immobilizasyonu (Soleimani vd., 2012)
	Cam	Glukoz-oksidaz ve yaban turpu peroksidaz enzimlerinin cam yüzeyler üzerinde immobilizasyonu (Costantini vd., 2013)
	Aktif Karbon	Yüzey işlevselleştirilmiş mezogözenekli aktif karbon üzerinde asidik lipazın immobilizasyonu (Ramani vd., 2012)
	Kömür	Papain'nin adsorpsiyon yöntemi ile aktif kömür üzerinde immobilizasyonu (Dutta vd., 2009)

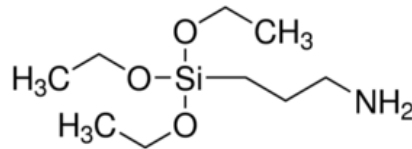
2.3.1 Manyetik Nanopartiküllere Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon desteklerinin seçimi, enzim immobilizasyonunda önemli bir rol oynar. Fe_3O_4 MNPlar mıknatıs ile ortamdan kolayca ayrılabilme özellikleri sayesinde immobilizasyon çalışmaları için araştırmacılar tarafından zamanla daha fazla tercih edilir hale gelmiştir (Zhang vd., 2016).

MNP destekler üzerine yapılan enzim immobilizasyonlarında nanopartikül yüzey alanın geniş ve tüm yüzey alanının kullanılabilir olması birim yüzey alana bağlanan enzim molekül sayısını artırmaktadır. Manyetik materyallerin immobilizasyonu teknik olarak daha hızlı ve uygulama bakımından daha kolaydır ve bu materyallerin immobilizasyon ortamında dağılıp, işlem sonunda manyetizmanın etkisi ile tekrar toplanabilme özelliği bulunmaktadır. Bu özelliğin getirdiği uygulama kolaylığı pahalı saflaştırma işlemlerinin sebep olduğu üretim maliyeti artışını önleyebilir (Acar, 2013).

Enzim yapılarındaki lizin, arginin, glutamik ve aspartik asit kalıntıları, immobilizasyonlar için yaygın olarak kullanılan fonksiyonel amino ($-NH_2$), karboksilik asit ($-COOH$), tiol ($-SH$) ve hidroksil ($-OH$) gruplarını içerir. Immobilizasyon için gerekli bu fonksiyonel gruplar nano destekler üzerine gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları ile oluşturulmaktadır (Misson vd., 2015). Yüzey modifikasyon işlemleri ile yüzeyde amino, karboksil, hidroksil, sülfidril grupları oluşturulur. Destek üzerindeki fonksiyonel grupla bağ oluşturabilmek için siyanojen bromu, karbodiimit, aminoalkiledoksisilan, glutaraldehit, epiklorhidrin gibi özel bağlama ajanları kullanılabilir. (Vakıl Naslıyan, 2012).

Silanizasyon, titanyum, hidroksiapatit ve diğer birçok metal oksit yüzeyi gibi hidroksil grupları bakımından zengin materyallerin yüzeyini modifiye etmek için kullanılan düşük maliyetli ve etkili bir kovalent kaplama yöntemidir. Silikon bazlı moleküllerin metal yüzeylere bağlanması, metal yüzeylerdeki hidroksil gruplarının silikon atomları ile kovalent olarak $-Si-O-Si-$ bağlarını oluşturması ile gerçekleşir. Silanlanmış yüzey kolayca modifiye edilebilir (Boccafocchi vd., 2018). (3-Aminopropil) trietoksisilan (APTES), silanizasyon sürecinde sıklıkla kullanılan bir aminosilandır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 3-Aptes moleküler yapısı

Silanizasyon uygulamaları, sentetik dönüşümlerde, eser metallerin miktarını zenginleştirmede, yapay membranları immobilize etmede, moleküler tanımlamada, kromatografik ayırmalarda ve biyokütle hazırlama gibi çalışmalarda silika yüzeylerini modifiye etmek için başlamış, metal oksit yüzeylerini modifikasyon amacı ile uygulandığı çalışmalarla literatürde fazlaca yer alır hale gelmiştir (Xu vd., 1997).

Gluteraldehit, biyokimya uygulamalarında, SDS-PAGE, boyama veya elektron mikroskobu öncesinde aminle reaktif homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ve sabitleyici olarak kullanılır (Şekil 2.11) Gluteraldehit gibi çapraz bağlama ajanları proteinlerde gerçekleştirecekleri kimyasal modifikasyon ile proteinleri pH inaktivasyonuna karşı proteinleri daha stabil hale getirebilir ve proteinlerin termostabilitelerini arttırabilir (C. J. S. M. Silva vd., 2004).



Şekil 2.11 Gluteraldehit moleküler yapısı

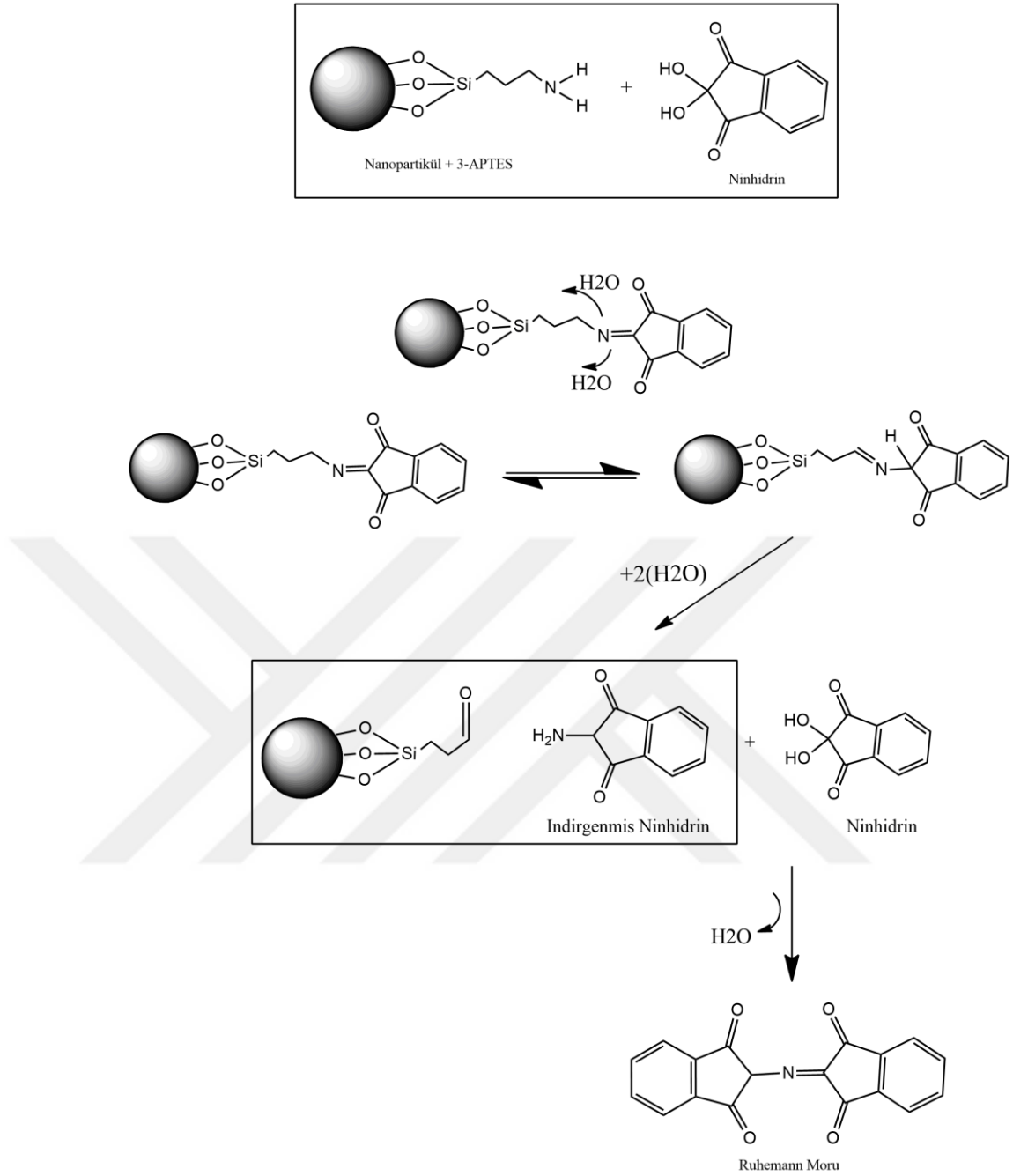
Gluteraldehit, endüstriyel, tarımsal ve tıbbi alanlarda laboratuvarlarda, günlük hayatta yüzeylerin ve ekipmanların dezenfekte edilmesi ve sterilizasyonu için kullanılır. Örneğin, petrol ve benzin boru hatlarında, atık su arıtımında, kağıt endüstrisinde ve çeşitli malzemelerin üretiminde kimyasal bir ara ürün olarak kullanılmaktadır. Boya ve çamaşır deterjanı gibi ürünlerde bulunabilmektedir (National Center for Biotechnology Information, 2021).

Silanizasyon işleminden sonra enzimlerin modifiye edilmiş yüzeye bağlanma tekniğinin seçimi yine enzimlerin karakteristik özelliklerine göre yapılmalıdır. pH değeri 8.0 üzerinde denatüre olan enzimlerin gluteraldehit ve karbodiimid gibi daha düşük pH değerlerinde, düşük pH değerlerinde denatüre olan enzimlerin de aynı şekilde yüksek pH değerlerinde bağlama işlemleri gerçekleştirilmelidir. Aktif bölgeye bağlanabilecek gruplar, bağlanma sıcaklığı, iyonik kuvvet, enzimi denatüre edebilecek veya bağlanma reaksiyonunu engelleyebilecek parametreler dikkate alınması gereken diğer faktörlerdir (L. Cao, 2011).

2.4 Ninhidrin Analizi

Ruhemann 1910 yılında ninhidrinin, amino grupları içeren amonyak (NH_3), amin (amino grubuna sahip $-\text{NH}_2$ sahip organik bileşiklerin) gibi moleküllerin sulu çözeltileri ile mor bir renk oluşturduğunu gözlemlemiştir. Literatüre daha sonra Ruhemann moru (Ruhemann's purple) olarak geçen bu renk sayesinde proteinlerin analizi için yeni bir yöntem bulunmuştur (Godsell, 1963; Ruhemann, 1910).

Ninhidrin, yüzeydeki $-\text{NH}_2$ uçlarla reaksiyona girerek indirgenir. Ardından indirgenen ninhidrin ortamdaki ninhidrinle reaksiyona girer ve Ruhemann morunu oluşturur (Şekil 2.12) (Joseph, 2004; Luo vd., 2017). Analiz, bu yönleriyle amino gruplarının tayini için niteliksel ve niceliksel bir ölçüm yöntemi olarak kullanılır. Çalışmada yapılan ninhidrin analizinde sonuçların tutarlı çıkması bu analizin yüzeydeki $-\text{NH}_2$ uçlarının tespiti için güvenilir bir yol olduğunu göstermiştir.



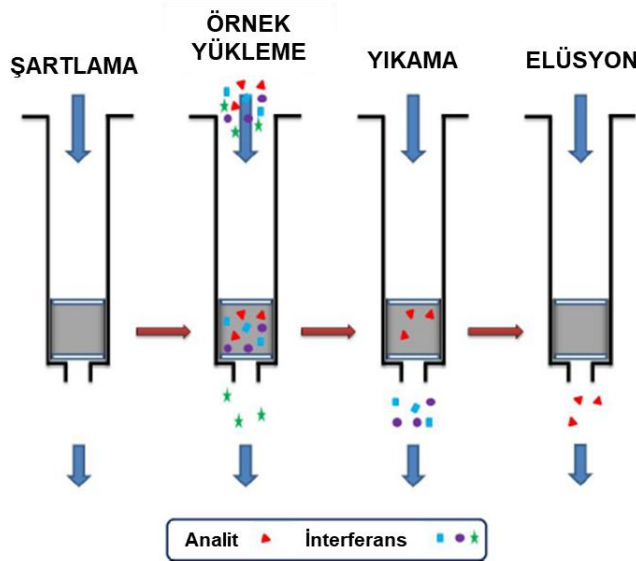
Şekil 2.12 Yüzeyi silanlanmış manyetik nanopartiküllerin ninhidrin analizi reaksiyon şeması (ChemDraw®Ultra 12.0)

2.5 Katı Faz Ekstraksiyonu

Kromatografik ayırma ve kütle spektrometresi tekniklerindeki gelişmelere rağmen, örneklerin bu analizler için hazırlanması hala sürecin en önemli kısımlarından biridir ve iyi analitik sonuçlar elde etmek için etkili numune hazırlama esastır (Núñez vd., 2012). İdeal numune hazırlama yöntemleri hızlı,

doğru, kesin olmalı ve numune bütünlüğünü korumalıdır. Numune üzerinde yapılan işlemleri azaltan, yüksek konsantrasyon ve geri kazanım sağlayan katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction-SPE) numune verimini arttırmak için kullanılan, kolay kullanımlı ve giderek gelişen, hızlı bir tekniktir. Bu teknik analitlerin katı bir sorbent üzerine adsorbsiyonu ve ardından sorbentten organik bir solvante elüsyonunu içerir (Kyle, 2017). Şekil 2.13'te katı faz ekstraksiyon prosedürünün şematik gösterimi verilmiştir. Analit ve interferans maddelerinin ayrılması üç yolla gerçekleştirilebilir: seçici ekstraksiyon, seçici yıkama veya seçici elüsyon (Rodriguez-Mozaz vd., 2007).

Ticari olarak C2, C8, C18, iyon değişimi ve bunların kombinasyonlarından oluşan karışık modlu sorbentler dahil olmak üzere birçok sorbent türü mevcuttur (Kyle, 2017). Katı faz ekstraksiyon sorbentlerinin kimyasal yapıları iyon değişimi, ters faz, HILIC (Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi) veya karışık mod olarak kategorize edilir. Ters fazlı sorbentlerde nötr interferansları ortadan kaldıracak olan apolar yıkama solüsyonları, analitleri de atık olarak yıkayacaktır. Buna karşılık karışık modlu sorbentler, ters fazlı bileşene (apolar polimer veya silikaya bağlı C18) bir anyon veya katyon parçası dahil edilerek oldukça seçici hale getirilmiştir. Bu ikili işlevsellik, sıvı fazı ekstrakte etmek için güçlü bir araçtır, apolar çözeltilerle yıkama yapılırken yüklü analitler iyon değişim parçası ile tutulabilir (Stone, 2017).



Şekil 2.13 Katı faz ekstraksiyon prosedürünün şematik gösterimi (Görsel kaynaktan uyarlanmıştır.) (Lucci vd., 2012)

2.6 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisi (İTK), karışımdaki bileşenlerin sayısını belirlemek, bir bileşiğin kimliğini ve saflığını doğrulamak, ara ürünlerin oluşumunu takip ederek reaksiyonun ilerleyişini izlemek, preparatif ayırmalar için çözücü bileşimi belirlemek ve fraksiyonları analiz etmek için kullanılır. Durağan ve hareketli fazların bulunduğu sistemlerde hareketli faz ile taşınan karışımlar durağan faz içerisinden geçirilir. Her maddenin farklı bir taşıma hızı olur ve bu sayede ayrılma gerçekleşir (Sajewicz vd., 2017). İTK’da durağan faz olarak lipofilik maddeler için: silika, alüminyum oksit, asetillenmiş selüloz, poliamidler; hidrofilik maddeler için: selüloz, selüloz iyon değiştiriciler, poliamid, ters fazlı silika kullanılır. Durağan fazlar cam, alüminyum tabakası veya sert plastikler üzerine ince bir tabaka olarak yayılmış haldedir ve görüntülemenin kolaylaşabilmesi için genellikle UV ışığında parlayan floresan bir madde içerirler (Waksmundzka-hajnos vd., 2006).

Avantajları:

- Öğrenilmesi kolay bir tekniktir.
- Hızlı bir şekilde gerçekleştirilir.
- Kullanıma hazırdır, önceden kaplanmış tabakalar ön işleme tabii tutulmadan kullanılabilir.
- Örnekler bileşenlerine ayrılmadan uygulanabilir.
- Birden fazla örnek aynı kromatogram üzerinde görüntülenebilir.
- Kromatogramlar tek kullanımlık olduğu için analiz sonrası temizleme vb. işlemlerle yenilenmesine gerek kalmaz.
- Mobil faz tüketiminin düşük olması ve dolayısıyla hemen hemen herhangi bir bertaraf sorunu olmaması nedeniyle rutin kullanım için ekonomik bir tekniktir (Jork vd., 1990).
- Farklı analitler için aynı anda birkaç tarama protokolü gerçekleştirilebilir (Poole, 2003).

Dezavantajları:

- TLC plakalarında ayırma, diğer kromatografik tekniklerle karşılaştırıldığında sınırlıdır.
- TLC'den elde edilen sonuçların tekrarı zordur.
- TLC açık bir sistem olarak çalışır; bu nedenle nem ve sıcaklık gibi bazı faktörler kromatogramın nihai sonucunu etkileyebilir.
- TLC, düşük algılama limitleri için kullanılamaz.
- Sadece nitel bir analiz tekniğidir ve nicel bir teknik değildir (Sherma, 2004).

2.7 İstatiksel Deney Tasarımı (SDoE- Statistical Design of Experiments)

Biyoteknolojik optimizasyon çalışmalarında tampon çözeltiler, konsantrasyonlar, reaksiyon koşulları ve ölçüm tekniği gibi birçok faktör dikkate alınmalıdır. Tüm faktörlerin geleneksel yaklaşımlar kullanılarak incelenmesi haftalar boyu sürebilecekken, deney tasarımı (DoE) yaklaşımları kullanılarak birkaç günde gerçekleştirilebilir. Deney tasarımı sayesinde süreç hızlanır ve test edilen değişkenlerin daha ayrıntılı bir değerlendirmesi sağlanmış olur (Onyeogaziri ve Papaneophytou, 2019). Zaman ve maliyet kaybının önüne geçilir (Carr, 2010) .

Deney tasarımı yaklaşımında öncelikle deneyi etkileyebilecek tüm kontrol edilebilir faktörleri içeren bir tarama tasarımı kullanılır. En önemli faktörler belirlenerek deneysel bir optimizasyon tasarımı ile devam etmektir. Yanıt yüzeyi metodolojisi matematiksel modeller ve eğrilerle araştırmacılara faktörler arasındaki etkileşimler hakkında fikir vermek ve tahmin etmelerini sağlamak için tasarlanmıştır (Hanrahan vd., 2005).

Yanıt yüzeyi modellemede genellikle kullanılan en yaygın iki tasarım, Merkezi kompozit tasarımlar ve Box-Behnken tasarımlarıdır. Bu tasarımlarda girdiler üç veya beş farklı seviyede yer alır ancak bu değerlerin tüm kombinasyonları tasarımda görünmez (Onyeogaziri ve Papaneophytou, 2019). Box-Behnken, yanıt yüzeyi metodolojisinde verimli bir seçenek ve merkezi

kompozit tasarımlara ideal bir alternatif olarak kabul edilir. Faktör başına üç seviyesi vardır, merkez ve uç seviyelerin kombinasyonları oluşturulur (Carr, 2010).

2.8 Biyotransformasyon

Besin, aminoasit, ksenobiyotik, toksin ve ilaç gibi moleküllerin, enzim, bakteri, fungus, bitki ve hayvan hücreleri gibi biyolojik sistemde bulunan bir ajanın etkisiyle kimyalarında meydana gelen değişimlere biyotransformasyon denir. Biyotransformasyon sonucu oluşan moleküllere metabolit adı verilir (Kebamo ve Tesema, 2015).

İlk biyotransformasyon reaksiyonu, 1842'de, bir Alman kimyagerin yutulmuş benzoik asitin glisin ile konjuge olarak üriner hippürik asit oluşturduğunu keşfetmesi olarak kabul edilmektedir. Ancak asırlardır gerçekleştirilen sirke üretimi yani asetik asit bakterilerinin alkolü oksidasyonla sirkeye dönüştürmesi de bir biyotransformasyon reaksiyonudur (C. Bachmann ve Bickel, 1985).

Biyotransformasyon reaksiyonları iki faz olarak incelenir. İlk faz, oksidasyonları, indirgenmeleri veya hidrolizleri veya herhangi birinin bir kombinasyonunu içerir. İkinci faz, konjugasyonlardan oluşan sentez reaksiyonlarını içerir (Meyer, 1996).

Faz I reaksiyonları fonksiyonel bir grubu ortaya çıkarır veya sunar (-OH, -NH₂, -SH veya -COOH). Bu nedenle Faz-I reaksiyonlarına fonksiyonalizasyon reaksiyonları da denilmektedir. Faz-I reaksiyon metabolitleri çoğunlukla Faz II reaksiyonları için substrat olarak kullanılır. Genellikle moleküllerin hidrofilik özelliklerinde küçük bir artış meydana gelir (Phang-Lyn, 2020). Esterlerin karboksilli asit ve alkollere hidrolizi, alkollerin asitlere oksidasyonu, aldehit ve ketonların alkollere redüksiyonu örnek Faz I reaksiyonlarıdır (Wermuth, 2008).

Faz II reaksiyonları, moleküle sülfat, glukuronik asit gibi küçük, polar, iyonize olabilen grupların enzimatik olarak katıldığı, bir anlamda sentez reaksiyonlarıdır. Ürünlerin orijinal substrattan önemli ölçüde daha hidrofilik olduğu varsayılmaktadır (K. Bachmann, 2009). Vücutta bu reaksiyonlar sonucunda

oluşan konjugatlar (Faz II metaboliti), çoğunlukla idrarla atılırlar. Bu konjugasyonlar, genellikle Faz I reaksiyonları sonucu moleküle kazandırılmış fonksiyonel gruplar üzerinden yürür ve sonuçta suda çözünebilen (metilasyon sonucu oluşa ürünler gibi istisnalar hariç), aktivite ve toksisitesini kaybetmiş ürünler oluşur (Wermuth, 2008). Faz II reaksiyonları, reaksiyonlar için kofaktör gerektiren transferazlarla katalize edilir. Glukonidasyon, sülfasyon, asetilleme, metilasyon, glutatyon ile konjugasyon, amino asitlerle konjugasyon, örn. taurin, glutamin, glisin örnek Faz II reaksiyonlarından (Ionescu ve Caira, 2005; Kebamo ve Tesema, 2015).

Biyotransformasyonun ilaçlar üzerindeki etkileri 19.yy'ın ortalarında fark edilmiştir. Estabrook ve arkadaşlarının kırmızı karaciğer pigmentlerinin hepatik ilaç metabolize edici oksido-redüktazların işlevini yerine getirmesinin keşfiyle hızlıca gelişmiştir (Estabrook vd., 1968). Keşfedilen pigment, 1960'larda Omura ve Sato tarafından sitokrom P450 (heme protein) olarak tanımlanmıştır (Sato, 1964). Sitokrom P450'ler (CYP'ler), biyolojik oksidasyonu ve indirgeme reaksiyonlarını katalize eden büyük bir enzim ailesidir. Geniş substrat spesifikliğine sahip sistem, yapısal olarak çeşitli birçok endojen ve ksenobiyotik bileşiğin oksidatif metabolizmasından sorumludur (K. Bachmann, 2009).

2.8.1 İlaç Moleküllerinin Biyotransformasyonları

İlaçlarda meydana gelen biyotransformasyon reaksiyonları onların; farmakolojik aktiviteleri, toksisiteleri, fizikokimyasal özellikleri, etki süreleri ve farmakokinetik özelliklerinde değişikliklere neden olabilir. İlaçların biyotransformasyonu sonucunda oluşan metabolitler asıl ilaçtan daha etkili veya etkisiz hale gelir (Shanu-Wilson vd., 2020).

İlaç molekülleri biyotransformasyonlar kullanılarak farklı amaçlar için ilaç öncül (Ön-ilâç/prodrug) formlarında üretilebilirler. Örneğin ilaç moleküllerine -OH, ester grubu, sülfat, fosfat, süksinat bağlanması ile ilaçlara lipofilik özellikler kazandırılarak ilacın hücrelere kolayca geçişi sağlanabilir. Sadece uygulamaları sırasında aktif formlarına dönüşen ilaçlar üretilerek farmasötik etkilerini kaybetmeleri önlenabilir ve üretimden satışa kadar stabiliteleri sağlanabilir (Rautio

vd., 2008). Kana karışması gereken ilaçlara çözünürlüğü arttırmak amacı ile hidrofilik özellikler kazandırılabilir. İlaç molekülleri fenolik gruplar, karboksilik asitler, tiyoller ile amid veya ester türevlerine dönüştürülerek yan etkileri azaltılabilir (Jum' ve Karaman, 2014). Topikal preperatların (krem, pomad, göz damlaları ve inhaler) difüzyon mekanizmaları sayesinde etken maddeler hedef dokulara sistemik dolaşıma geçmeden etki edebilir (Lin, 1984). Oral alınması gereken fakat belli dokulara geçemeyen yada sadece bazı dokulara etki etmesi istenen ilaç molekülleri için geliştirilmiş ön ilaç stratejileri mevcuttur (Wermuth, 2008). İlaçların vücutta daha uzun süre kalabilmesini sağlamak, metabolizma ile vücudu hızlıca terk etmesini engellemek için orijinal ilaca bileşikler eklenerek ön ilaçlar hazırlanmıştır. Oral alınan ilaçların bağırsaklardan kana geçebilmeleri için lipofilik özellikleri artırılarak bağırsaklar tarafından emilimi sağlanabilir. Tam tersi bağırsakta yapılacak bir antibiyotik tedavisi için de ilacın lipofilik özelliği azaltılarak emilimi engellenebilir (Meyer, 1996).

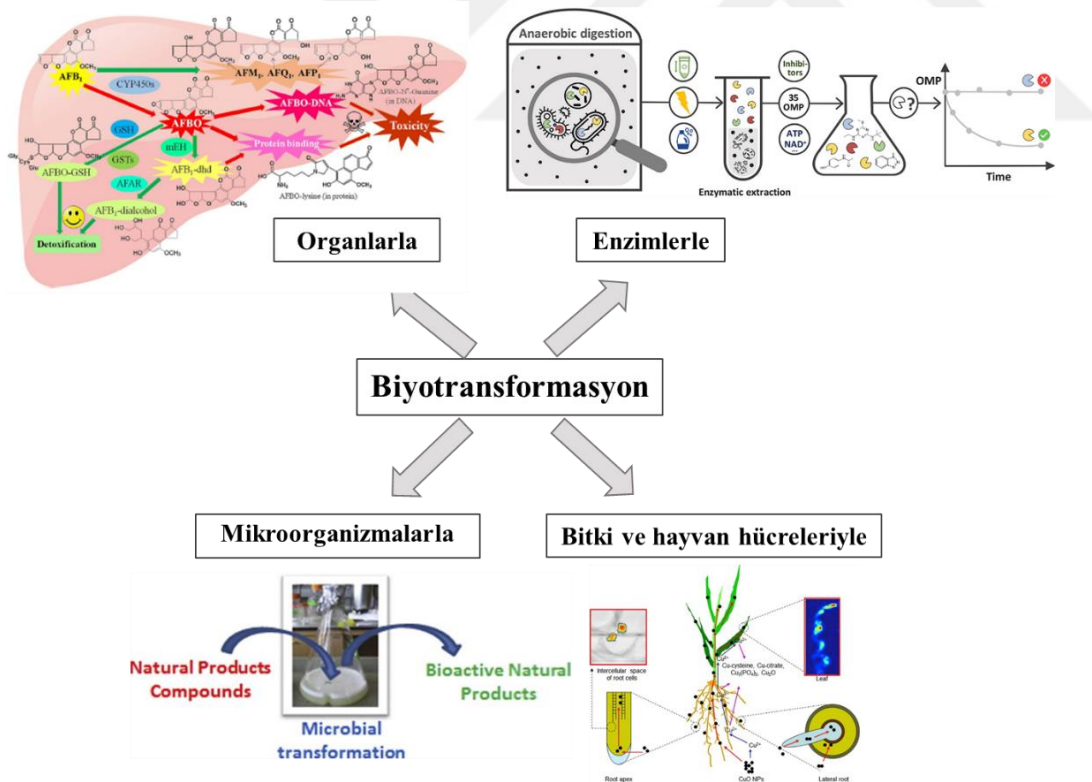
2.8.2 Biyotransformasyonların Gerçekleşme Yolları

Biyotransformasyonları gerçekleştiren enzimlerin çoğu canlı hücrelerinde bulunur. Bu hücrelerin büyük bir kısmı ise spesifik olarak belirli organlarda (karaciğer, GİS mukoza ve lümeni, böbrek, akciğer ve diğer yapılar) görev yapar. Vücuda alınan organik moleküllerin ve ilaçların farklı bileşiklere dönüşmeleri, karaciğer gibi organlar ve bağırsaktaki mikroorganizmaların salgıladıkları enzimler tarafından gerçekleştirilir (Rautio vd., 2008).

Biyotransformasyon çalışmaları için mikrobiyal, enzim, hücre ve organ düzeyinde olmak üzere farklı yollar mevcuttur (Şekil 2.14) (Hegazy vd., 2015). Mikrobiyal transformasyon reaksiyonlarının gerçekleşmesi uzun süre alır. Dolayısıyla reaksiyonun sonuna kadar steril bir ortamın sağlanması zorlaşır. Ancak mikroorganizmanın sahip olduğu farklı enzimlerin etkisiyle yeni ve farklı aktivitedeki metabolitler elde edilebilir, bu mikrobiyal transformasyonların büyük bir avantajıdır (Kuban, 2010). Bitki ve hayvan hücrelerinin kullanıldığı biyotransformasyon çalışmalarında alınan verim göreceli olarak düşüktür. Olası sekonder metabolit oluşumu gibi durumlar yüzünden alt akım işlemleri daha da zor, üretim maliyetleri fazladır (Giri vd., 2001). Enzimlerin tekrar kullanılabilmesi,

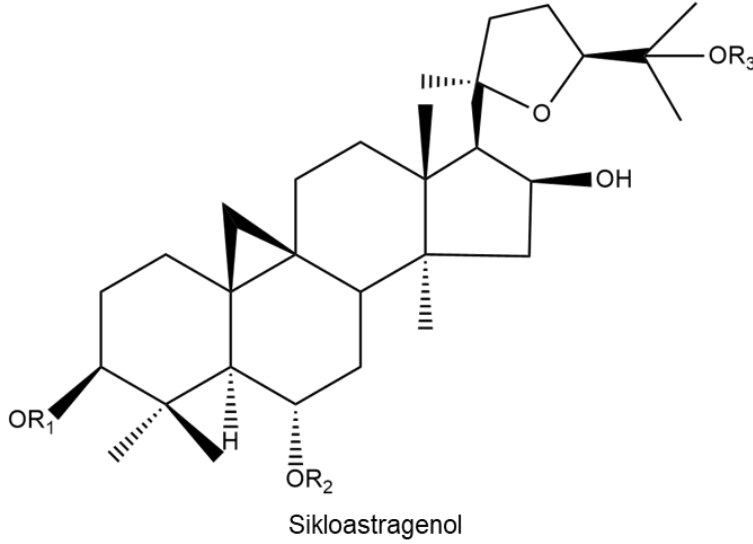
uygun pH ve sıcaklıkta çalışılabilmesi ve alt akım işlemlerinin kolaylığı onları biyotransformasyon için etkili bir alternatif haline getirmiştir. Ancak bu yöntemde maliyet diğer yöntemlere göre enzimin saflığına bağlı olarak artmaktadır (Dave, V., Khirwadkar, P., ve Dashora, 2014).

Bitkilerden elde edilen metabolitler biyotransformasyon için sınırsız bir kaynak sunarlar. Bitki metabolizması için bazen atık ve salgı ürünü olarak kabul edilen glikozitler, alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler, uçucu yağlar farklı farmakolojik etkiler ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekicidir (Dave, V., Khirwadkar, P., ve Dashora, 2014). Kimyasal olarak katalizlenmiş reaksiyonlardan biyolojik yollardan yeşil bir üretim olan biyotransformasyon son zamanlarda dikkat çeken bir biyoteknoloji alanı haline gelmiştir (Hegazy vd., 2015).



Şekil 2.14 Biyotransformasyonların gerçekleşme yolları (Görsel kaynaklardan uyarlanmıştır) (Deng vd., 2018; Gonzalez-Gil vd., 2019; Hegazy vd., 2015; Peng vd., 2015))

Molekül yapısı Şekil 2.15'te verilen CA ve CA türevi metabolitlerin (ASTIV ve ASTVII) üretimi için kullanılan biyotransformasyon işlemleri mikrobiyal ve enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. CA'nın substrat olarak kullanıldığı mikrobiyal biyotransformasyon çalışmaları olduğu gibi (Bedir vd., 2015; Ekiz vd., 2018; Kuban, 2010; Kuban vd., 2013) CA ve CA türevi astragalozitlerin üretimlerinin hedeflendiği biyotransformasyon çalışmaları da mevcuttur. Çalışmalarda kullanılan farklı teknikler ve yaklaşımlar ile çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Chen vd. (2013) yaptığı biyotransformasyon çalışmasında kalsiyum aljinat jel boncuklarına immobilize ettikleri *A. niger* M85 ile toz Radix Astragali'deki ASTIV ve toplam astragalosit içeriklerinin, ekstraksiyon örneğine göre sırasıyla 10.7 kat (2.326 mg /g) ve 8.6 kat (2.56 mg /g) arttığını belirtmiştir. Wang ve Chen (2017) yaptıkları mikrobiyal biyotransformasyon çalışmasında rekombinant *Bacillus* sp.(LG-502) ile ASTIV'ün CA'ya dönüşümünü gerçekleştirmiş, en yüksek dönüşüm 6 günlük kültür sürecinde %84-89 oranında CA dönüşümü ile sağlanmıştır. Çalışmada reaksiyon ortamındaki ASTIV'ün 0,21 mg/ml'den fazla olmasının CA oluşumunu arttırmadığı belirtilmiştir. Ye vd. (2011) yaptığı çalışmada Astragalositleri ASTIV'e dönüştürmek için *Absidia corymbifera* AS2 suşunu kullanarak ortamdaki 5 g/L astragalositten %63.7 geri kazanımla %97.2 saflığında ASTIV elde etmişlerdir. Ekiz vd. (2019) Astragalus türü kaynaklı endofitik mantarları (*Alternaria eureka*, *Neosartorya hiratsukae* ve *Camarosporium laburnicola*) kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada Astragalus sapojeninlerin (CA ve Astragenol) mikrobiyal biyotransformasyonu gerçekleştirilerek bilinen 10 bileşikle birlikte 5 yeni metabolit üretmişlerdir.



Saponin	R ₁	R ₂	R ₃
AST IV	Xyl	Glc	H
AST VII	Xyl	Glc	Glc

(Xyl: Beta-D-Ksilopiranoz (C₅H₁₀O₅), Glc: Beta-D-Glukopiranoz (C₆H₁₂O₆))

Şekil 2.15 CA, ATSIV ve ASTVII molekül yapısı (ChemDraw®Ultra 12.0) (Yang vd., 2005)

CA üretimi hedeflenerek gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyonlarda %90 üzeri dönüşüm sağlanan çalışmalar mevcuttur. Cheng vd., (2020) Cycloastragenol-6-O-β-D-glucoside (CMG) ve ASTIV' ün CA'ya biyotransformasyonu üzerinde çalışmış ve 80 mg/ml CMG substratı için *Phycoccus sp. Soil748*'den saflaştırdıkları β-Glukozidaz enzimi ile 6 saat boyunca 42°C'de devam eden reaksiyonla %99.2 CA dönüşümü sağlamışlardır. CN105734109A patent no'lu çalışma ASTIV'in β-Glukozidaz ve β-Ksilozidaz ile hidroliz, ekstraksiyon ve kristalleştirme adımlarıyla %95 ve üzeri verimle CA elde etme yöntemini içermektedir. Patent ile üretim teknolojisi basit, kolay sağlanabilir reaksiyon koşullarında, verimi yüksek, seri üretime uygun ve çevre dostu bir yöntem ortaya koyulmuştur (J. Chen vd., 2016). CN107058445A patent no'lu çalışma aynı enzimlerle hidroliz, ekstraksiyon, silika jel kolon kromatografisi ve etil alkol rekristalizasyon saflaştırma aşamalarını içeren %95 üzeri verimli bir yöntem sunmuştur (Leiyu ve Yuan, 2017).

Li vd. (2019) yaptıkları biyotransformasyon çalışmasında serbest β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz enzimlerini kullanarak ASTIV'ten CA metabolitini elde etmiştir. Çalışmada 1 U β -Glukozidaz, 0.2 U β -ksilozidaz (75°C, pH 5.5) ile 3 saat içinde 1g/L ASTIV'ten, 0.63 g/L CA elde ederek molar oranda %94.5'lik (0.63g/1g) bir dönüşüm gerçekleştirmişlerdir.

Li vd. (2019) çalışması kapsamında, ortamda %25 oranından az bulunan metanolün aktiviteyi artırıcı etki gösterdiğini belirtmiştir. Enzimlerin metanolden etkilenmemesi ASTIV'lerin biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanımı için uygun olduklarını göstermiştir. Çünkü ASTIV'lerin sudaki çözünürlüğü azdır ve enzim aktivitelerinin su-metanol gibi iki fazlı çözücülü ortamdan etkilenmemesi reaksiyon için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Çalışmada, çoğunlukla inhibisyona neden olan ortamdaki glukoz ve ksilozun, beklenen geri beslemeli inhibisyonun (feedback inhibition) aksine enzimleri β -Glukozidaz için 1 M glikoz eklemede 2.1 kat; β -Ksilozidaz için 3M ksiloz eklemede 1.3 kat uyarmıştır. Bu açıdan kullanılan enzimlerin endüstriyel uygulamalar için uygun olduğuna dikkat çekilmiştir. Bu üretim yöntemi piyasaya yaşlanma karşıtı telomeraz aktivatörü olan CA'nın üretimi için ekolojik bir seçenek olarak sunulmuştur.

CA üretimi için serbest β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz'ın kullanıldığı bir başka biyotransformasyon çalışması da Cheng vd. (2020) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz enzimleri ile 20 gram ASTIV'ten %96.5 verimle 12.02 gram CA üretilmiştir. Reaksiyonun gerçekleştiği 50°C'nin mikrobiyal kontaminasyonu önlediği ve çok yüksek sıcaklık gerektirmediği için endüstriyel üretimlerde ısıtmaya harcanacak enerji miktarını da azaltabileceği belirtilmiştir. Astragalozitlerle gerçekleştirilmiş enzimatik ve mikrobiyal biyotransformasyon çalışma örnekleri Tablo 2.2'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2 Astragalozitlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları

Kullanılan Metot	Substrat-> Ürün	Kaynak
Enzimatik Biyotransformasyon β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz	ASTIV->CA 96.5%	Cheng (2020)
Enzimatik Biyotransformasyon β -Glukozidaz	Cycloastragenol mono glucoside- (cycloastragenol-6-O-B- D-glucoside) →CA %99.2	Cheng (2020)
Enzimatik Biyotransformasyon β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz	ASTIV→CA %%94.5	Li vd. (2019)
Enzimatik Biyotransformasyon β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz	ASTIV→CA 95%	CN107058445A (2017)
Enzimatik Biyotransformasyon β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz	ASTIV->CA 95%	CN105734109A (2016)
Mikrobiyal Biyotransformasyon <i>Alternaria eureka</i> , <i>Neosartorya hiratsukae</i> <i>Camarosporium laburnicola</i>	CA ve Astragenol→bilinen 10 bileşikle birlikte 5 yeni metabolit eldesi	Ekiz vd. (2019)
Mikrobiyal Biyotransformasyon Rekombinant <i>Bacillus sp.</i> (LG-502)	ASTIV→CA %84-89	Wang ve Chen (2017)
Mikrobiyal Biyotransformasyon İmmobilize <i>A. niger M85</i>	Toz Radix Astragali→ASTIV İçerikteki ASTIV miktarının 10.7 kat artması	Chen vd. (2013)
Mikrobiyal Biyotransformasyon <i>Absidia corymbifera AS2</i>	Astragalosit→ASTIV %63.7	Ye vd. (2011)

3. MATERYAL METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- Demir (II, III) Oksit Nanopartikül (50-100 nm)
- (3-Aminopropil) trietoksisilan çözeltisi (3-Aptes) (>%98)
- Gluteraldehit Çözeltisi (%25)
- Ninhidrin (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) (katı halde)
- 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG)
- 4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside (pNPX)
- 4-Nitrofenol (pNP)
- Sodyum fosfat dibazik heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3)
- Glasial asetik asit (CH_3COOH)
- Metanol (CH_3OH)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- Etil Asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)
- Sülfirik Asit (H_2SO_4)
- Teksol (Etil Alkol + 2-Propanol)
- Deiyonize Su

Kullanılan substratlar Astragalozit IV ve Astragalozit VII glikozitleri, halen İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik Bölümünde çalışmalarına devam etmekte olan Profesör Dr. Erdal Bedir tarafından sağlanmıştır.

3.1.2 Enzimler

β -Glukozidaz (*Aspergillus niger*) (Megazyme)

β -D-Ksilozidaz (*Selenomonas ruminantium*) (Megazyme)

3.1.3 Kullanılan alet ve cihazlar

- Su banyosu (WiseBath)
- Ultrasonik banyo (LAB.ULT.4022.)
- Vorteks
- Spektrofotometre (Amersham Ultrospec 1100 Pro)
- Döner karıştırıcı
- Döner evaporatör (Heidolph)
- Vakum manifoldu (Visiprep™ SPE)
- TLC Alüminyum Levha (Silika Jel 60 F254)
- C18 Silika Bazlı SPE Kartuşları (Dionex™ SolEx™)
- Agilent - 1200 Series HPLC Sistemi – DAD (Diode-Array Detection)
- Mikropipet (2-20 µL) & (0-200 µL) & (100 µL- 1000 µL) & (500 µL- 5 mL)
- Falkon tüpler (15 ml– 50 ml)
- Kapaklı aktivite tüpleri (10 ml)

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Sodyum Asetat Tamponu (20 mM, pH 4.0): Sodyum asetatın 1.640 gram tartılarak 800 mL deiyonize su içinde çözündürüldü. (Glacial) Asetik asit ile pH ayarlaması yapıldı. Hacim 1 litreye tamamlandı.

Sodyum Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7.4): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'dan 10.107 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'dan 1.697 g tartılarak 800 mL deiyonize su içinde çözündürüldü, 1 M'lık HCl ve 1 M'lık NaOH ile pH ayarlaması yapıldı. Hacim 1 litreye tamamlandı.

P-Nitrofenol Çözeltisi (0.1 mM): pNP'den 13.9 mg tartılarak 10 ml tampon çözeltisi içinde ve 10mM'lık pNP stok çözeltisi hazırlandı. Tampon çözeltisi ile seyreltilerek konsantrasyon 0.1 mM'a getirildi ve standart grafik çözeltileri için stok olarak kullanıldı.

pNPX Çözeltisi (20 mM): pNPX substratından 27,122 mg tartıldı ve 5 ml çözgen içinde çözündürüldü, 20mM'lık pNPX çözeltisi elde edildi.

pNPG Çözeltisi (20 mM): pNPG substratından 30,125 mg tartıldı ve 5 ml çözgen içinde çözdürüldü, 20Mm'lık pNPG çözeltisi elde edildi.

Na₂CO₃ Çözeltisi (1 M): Sodyum karbonattan 53 g tartılarak deiyonize suda çözdürüldü. Hacim 500 ml'ye tamamlandı ve 1M'lık sodyum karbonat çözeltisi elde edildi.

3.2 Metot

3.2.1 3-APTES ile Yüzey Aktivasyonunu Gerçekleştirme

MNPlar'den 500 mg tartıldı. Cam şişe içerisine 0.1 M NaOH ile pH'ı 7.0'ye ayarlanan 100 mL deiyonize suda 15 dk. sonikatörde bekletildi ve MNPlar'ın su içinde dispersiyonu sağlandı. İşlem sonunda 100 ml hacme 1 ml 3-Aptes (>%98) çözeltisi eklendi. Çalkalamalı su banyosunda 3 saat boyunca 100°C'de daha sonra 24 saati tamamlayacak şekilde 40°C'de 150 rpm'de bırakıldı. Silanlama süreci tamamlandığında manyetizma yardımıyla toplanan MNPlar 100 ml deiyonize su ile 3 kere yıkandı. MNPlar kuruyana kadar 50°C'ye ayarlı etüvde tutuldu.

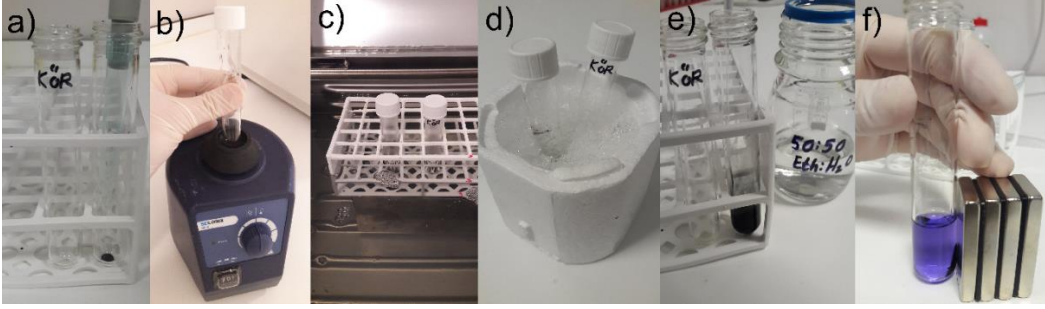
Silanlama işleminde 5 farklı 3-Aptes oranı denendi (%0.05, %0.1 ve %2, %5 ve %10). Sıvı faz olarak su ve metanol kullanıldı. MNPlar, 10 dak., 15 dak., 2 saat ve 3 saat olmak üzere 4 farklı süreyle sonikatörde tutuldu. Sıvı fazın hacmi için 120 ml'den 0.5 ml'ye; MNP için 500 mg'dan 20 mg'a farklı miktarlar denendi.

Silanlama işlemi sonrasında MNPlar'e Bölüm 3.2.2'de açıklanan ninhidrin analizi gerçekleştirildi, uygulanan silanlama işlemlerinin başarısı değerlendirildi.

3.2.2 Yüzeyde Oluşan Amino Gruplarının Tayini: Ninhidrin Analizi

Ninhidrin analizi gerçekleştirilecek MNPlar'den 20 mg tartıldı ve cam aktivite tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 µl deiyonize su ve 200 µl %2'lik ninhidrin çözeltisi eklendikten sonra girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve ağzı kapalı halde 15 dakika 100°C'de reaksiyon gerçekleştirildi. Süre dolduktan sonra tüpler buz banyosuna alınarak soğumaları için 3 dakika bekletildi. Soğuduktan sonra buz

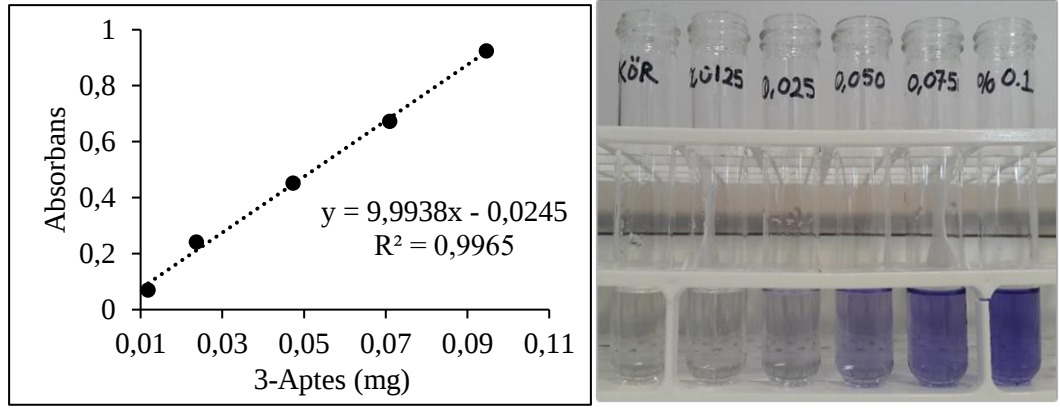
banyosundan alınana tüplere 1:1 etanol-su karışımından 3 ml eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırıldı (Şekil 3.1). Mıknatıs yardımıyla partiküllerden ayrılan sıvı fazın 570 nm’de absorbands değeri okundu. Kör için 100 µl deiyonize su üzerine 200 µl %2’lik ninhidrin çözeltisi kullanıldı.



Şekil 3.1 Ninhidrin analizi adımları (a) 20 mg nanopartikül üzerine 100 µl su ve 200 µl ninhidrin çözeltisi eklenmesi (b) Vorteks karıştırıcıda karıştırılması (c) 100°C’de 15 dak. reaksiyona tabii tutulması (d) İşlem sonunda buz banyosunda reaksiyonun durdurulması (e) Tüpe (50:50) etanol:su karışımından 3 ml eklenmesi (f) MNPLer’i mıknatıs yardımıyla toplayarak sıvı fazın spektrofotometrede absorbands değerinin okunması

Yüzeydeki -NH₂ gruplarının yoğunluğu önceden oluşturulmuş standart grafik yardımıyla hesaplandı. Grafik için %0.100, %0.075, %0.050, %0.025, %0.0125’lik (h/h) hazırlanan 3-Aptes çözeltilerinden 100 µl (kör olarak 100 µl su) alınıp üzerlerine 200 µl %2’lik ninhidrin çözeltisi eklendi ve girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra ağzı kapalı halde 15 dakika 100°C’de reaksiyon gerçekleştirildi. Süre dolduktan sonra tüpler buz banyosuna alınarak soğumaları için 3 dakika bekletildi. Soğuduktan sonra buz banyosundan alınan tüplere 1:1 etanol-su karışımından 3 ml eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve 570 nm’de absorbands değerleri okundu.

Satın alınan ticari 3-Aptes çözeltisinin yoğunluk değeri (0.946 g/ml), moleküler kütlesi (221.372 g·mol⁻¹) hesaplamalarda kullanıldı. Konsantrasyonları %0.100, %0.075, %0.050, %0.025, %0.0125 oranlarında hazırlanan örneklerdeki 3-Aptes miktarları mg cinsine çevrilerek ninhidrin standart grafiğinin x eksenini için kullanıldı. Standart çözeltilerden elde edilen absorbands değerleri ise y eksenini için kullanıldı. Oluşturulan standart grafik Şekil 3.2’de verildiği gibidir.



Şekil 3.2 Sağda farklı 3-Aptes konsantrasyonlarında (h/h) hazırlanan tüpler, solda ninhidrin standart grafiği

Analiz metriği olarak ‘ μmol 3-Aptes/g nanopartikül’ ($\mu\text{mol/g}$) kullanıldı, silanlama işlemlerinin başarısı değerlendirilirken karşılaştırmalar bu metriğe göre yapıldı.

Analiz yapılmak üzere alınan MNP miktarındaki değişimin ölçülen absorbansa etkisini ve analiz yönteminin tutarlılığını incelemek adına aynı işlemden geçmiş MNPler’den farklı miktarda (5 - 7.5 - 10 - 12.5 - 15 - 17.5 - 20 mg) alınıp ninhidrin analizine tabii tutuldu.

3.2.3 Gluteraldehit ile Enzimler İçin Bağlanma Ara Kolu Oluşturma

Bağlanma ara kolu oluşturmak üzere 400 mg silanlanmış MNP 36 ml 50 mM fosfat tamponu (7.4 pH) içine alınıp ve 2 dakika boyunca sonikatörde bekletilerek partiküllerin homojen olarak dağılması sağlandı. Süspansiyon haline gelmiş ortama 4 ml %25 (h/h) gluteraldehit çözeltisi eklenerek toplam hacim 40 ml’ye tamamlandı (ortamdaki gluteraldehit yüzdesi %2.5 (h/h)). Oda sıcaklığında (25°C) 1 saat boyunca disk karıştırıcı ile 40 rpm’de işleme tabii tutuldu. İşlem sonunda tampon çözelti ve deiyonize su ile yıkanan MNPler mıknatıs yardımıyla toplandı. Yıkamadan sonra sıvı fazından ayrılan MNPler üzerine 1 mL deiyonize su eklendi ve 4°C’de enzim immobilizasyonu için bekletildi.

Fosfat tamponu ile (50 Mm, pH 7.4) 3 farklı %2.5, %10 ve %25 (h/h) gluteraldehit oranlarında 2 mL çözeltiler hazırlandı. 20 mg silanlanmış MNP

hazırlanan çözeltilere alınarak disk karıştırıcıda 45 rpm’de 1 saat boyunca işleme tabii tutuldu.

3.2.4 Taşıyıcı Üzerinde Oluşturulan Gluteraldehit Ara Kollarının Analizi

3.2.2’de açıklanan ninhidrin analizi yüzeyde oluşturulan gluteraldehit kollarının tayini için de kullanılmıştır. Yüzeyi silanlanmış ve $\mu\text{mol/g}$ değeri bilinen MNPLer’e gluteraldehit muamelesi sonrasında yapılan ninhidrin analizi ile elde edilen değer, gluteraldehit bağlanmadan kalan $-\text{NH}_2$ ’lerin miktarını ifade eder. Bu iki değer arasındaki fark baştaki $\mu\text{mol/g}$ değerine oranlanarak gluteraldehit kaplanan uçlar yüzde olarak hesaplanmıştır.

Gluteraldehit ara kolu oluşumu (%)

$$= \left(\frac{\text{Silanlama sonrası } \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ değeri} - \text{Gluteraldehit muamelesi sonrası } \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ değeri}}{\text{Silanlama sonrası } \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ değeri}} \right) * 100$$

3.2.5 Protein Tayini (Bradford Yöntemi)

Ticari β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz enzim çözeltilerindeki protein yoğunluğunu hesaplamak için Bradford yöntemi kullanıldı.

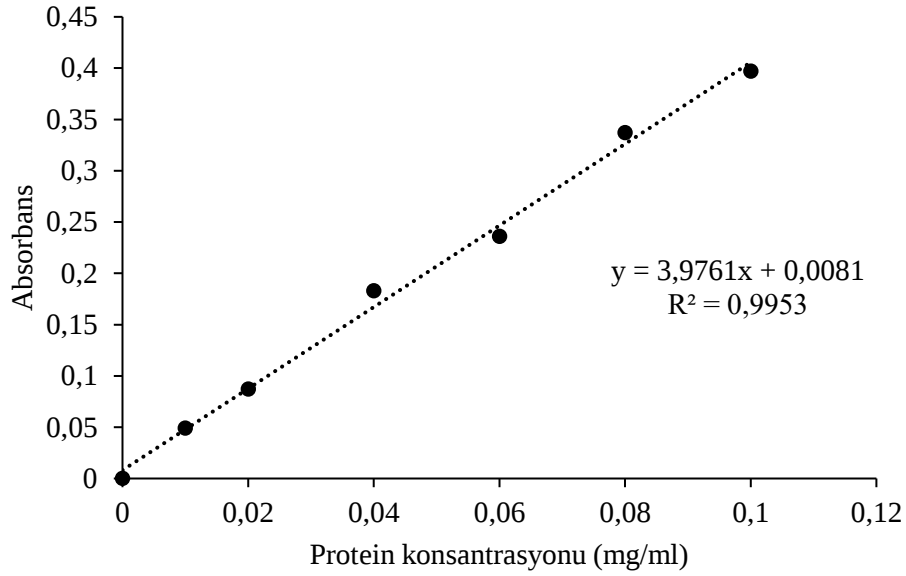
Standart grafiği oluşturma

Örnek protein olarak kullanılacak BSA’dan (Bovine Serum Albumin) 1 mg alınıp 10 ml deiyonize su içinde çözdürülerek 0,1 mg/ml stok çözeltisi elde edildi. Standartlar, deiyonize su ve stok çözeltiden Tablo 3.1’de gösterilen miktarlar kadar alınarak hazırlandı. Reaksiyonu gerçekleştirmek için aktivite tüplerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart protein çözeltilerinden 100 μl koyuldu. Tüplerin üzerlerine 1 mL Bradford çözeltisi eklenerek vorteks karıştırıcıda karıştırıldı ve 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 595nm’de absorbans değerleri okundu. Kör için 100 μl deiyonize su kullanıldı. Okunan absorbans

değerleri ile standart grafik oluşturuldu. Oluşturulan standart grafik Şekil 3.3'te verildiği gibidir.

Tablo 3.1 Standart çözeltilerin seyreltme hacimleri (mikroprotein standartları).

Protein yoğunlukları (mg/ml)	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Stok Çözeltisi (0,1mg/ml)	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl
Deiyonize su	90 µl	80 µl	60 µl	40 µl	20 µl	-



Şekil 3.3 Bradford standart grafiği

Örneklerin protein tayini

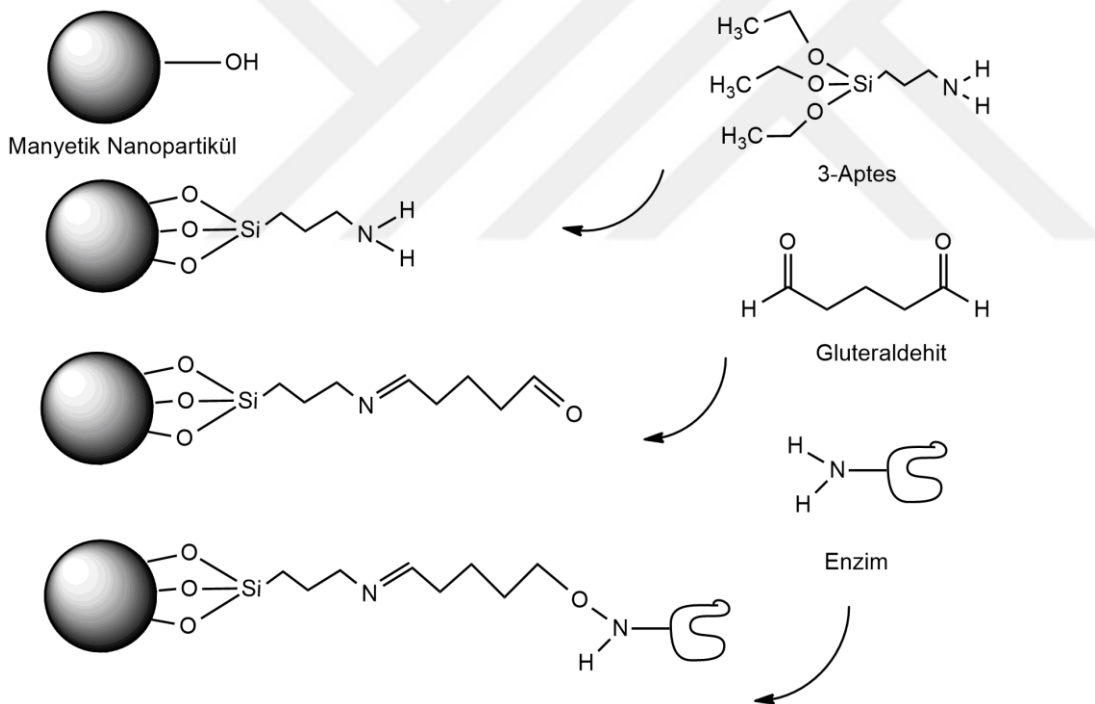
Protein tayini yapılacak örnekten 100 µl alınarak aktivite tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 1 mL Bradford çözeltisi eklenerek vorteks karıştırıcıda karıştırıldı ve 7 dak. oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 595nm'de absorbans değerleri okundu. Örneklerin protein konsantrasyonları standart grafik denklemi kullanılarak hesaplandı. Denklemden 'x' değeri olan protein yoğunluğunu bulmak için 'y' yerine ölçülen absorbans değeri kullanıldı:

$$y = 3,9761x + 0,0081$$

$$R^2 = 0,9953$$

3.2.6 β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz İmmobilizasyonu

Gluteraldehit muamelesinden sonra hazırlanan 1 mL'lik MNP süspansiyonu girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Süspansiyondan 100 µl alınarak (~25 mg MNP) 10 ml sodyum fosfat tamponu (50mM, 7.0 pH) içerisine aktarıldı. Sonikatörde 2 dakika boyunca bekletilerek MNPlar'ın ortama dispersiyonu sağlandı. Ticari β -Ksilozidaz enzim solüsyonundan 5 µl, β -Glukozidaz solüsyonundan 50 µl ortama eklendi (enzim yoğunlukları β -Glukozidaz 0.73 mg/ml; β -Ksilozidaz 5.4 mg/ml). Oda sıcaklığında (25°C) disk karıştırıcıda (Bkz. Şekil 3.5) 40 rpm'de 20 saat boyunca karışması sağlandı. İşlem sonunda MNPlar mıknatıs yardımıyla toplandı. MNPlar deiyonize su ve tampon çözelti ile yıkanıp sıvı fazdan ayrıldıktan sonra 1mL deiyonize su içine alınarak 4°C'de saklandı. MNP üzerine enzim immobilizasyon işlemlerinin adımları şematik olarak Şekil 3.4'te verildiği gibidir.



Şekil 3.4 Çalışmanın enzim immobilizasyon şeması (ChemDraw®Ultra 12.0)

İmmobilizasyon işlemi sonrası geri kazanılan toplam enzim aktivitesini belirlenmesinde Bölüm 3.2.8’de açıklanacak olan aktivite tayin yöntemi kullanıldı. 10 µl MNP süspansiyonundaki immobilize enzimlere aktivite tayini yapılarak aktiviteleri hesaplandı ve toplam süspansiyon hacmi olan 1 mL’ye oranlanarak geri kazanılan toplam aktivite miktarı bulundu. Serbest enzimlere aktivite tayini

yapılarak μL başına düşen aktivite miktarları ve bu değer ile immobilizasyon için ortama eklenen aktivite miktarları hesaplandı. Ortama eklenen aktivite miktarı ve geri kazanılan aktivite miktarı oranlanarak % geri kazanılan aktivite miktarı hesaplandı.

%Geri Kazanılan Aktivite

$$= \left(\frac{1 \text{ mL süspansiyondaki aktivite}}{\text{İmmobilizasyon için ortama eklenen ticari enzimin aktivitesi}} \right) * 100$$

$$= \left(\frac{10\mu\text{L süspansiyondaki aktivite} * 100}{\text{Serbest enzimin } \mu\text{L'deki aktivitesi} * \text{Ortama eklenen enzim hacmi}} \right) * 100$$

İmmobilizasyon işlemlerinde başlangıç olarak bu alanda yapılmış immobilizasyon çalışmaları referans alınarak pH, sıcaklık enzim ve MNP miktarları denendi, faktörlerde yapılan değişiklikler ile geri kazanılan aktivite oranları arttırılmaya çalışıldı. Değişen enzim miktarları (400-1.2 μL), MNP miktarları (200, 150, 50, 25 mg), sıcaklık (25 °C, 37°C), tampon çözeltiler (sodyum asetat, sodyum fosfat) ve pH (7.0, 7.4, 4.0) değerleri denendi. Enzimlerin aktif kısımların kovalent bağlanmaya katılmasını engellemek için tampon çözeltisine immobilizasyon ortamındaki miktarları 0.5 M olacak şekilde enzimlerin yarışmalı inhibitörleri; β -Glukozidaz için 0.5 M glukoz, β -ksilozidaz için 0.5 M ksiloz ilavesi yapıldı ve geri kazanılan aktivite miktarına etkileri incelendi.



Şekil 3.5 Disk karıştırıcı (0-90 rpm)

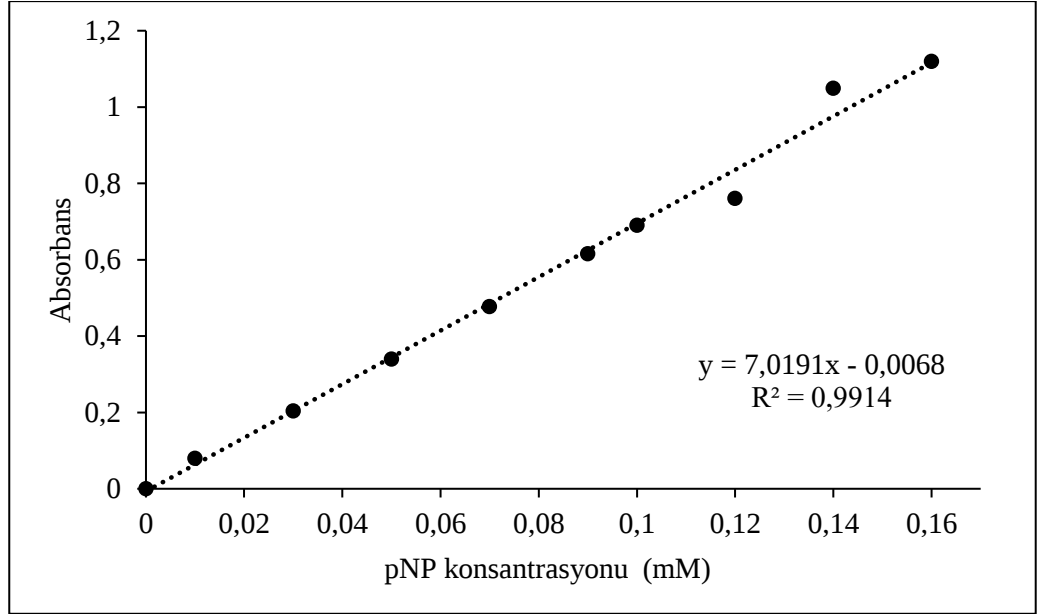
3.2.7 Manyetik Nanopartiküllerin FTIR ve SEM Analizleri

MNPlar Silanizasyon, gluteraldehit ara kolu oluşturma ve enzim immobilizasyon işlemlerinden sonra 30°C’de etüvde kurutularak ATR-FTIR spektroskopisi (Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi, Cihaz adı: Perkin Elmer Spectrum Two) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu, Cihaz adı: Thermo Scientific Apreo S) analizlerine gönderildi. FTIR ve SEM analizleri proje kapsamında EGE MATAAL’dan (E.Ü. Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi) hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi.

3.2.8 İmmobilize Enzimlerin Aktivite Tayinleri

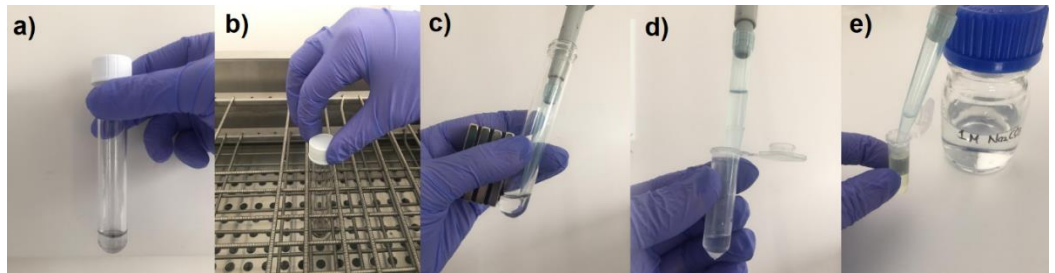
İmmobilize enzimlerin aktivite tayininde β -Glukozidaz için pNPG (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside), β -ksilozidaz için pNPX (4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside) substratları kullanıldı. Enzimler substratlarındaki şeker uçları kopararak pNP molekülünü oluşturur. Reaksiyon sonucu ortama eklenen sodyum karbonatın (Na_2CO_3) pNP molekülü ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renk aktivite tayinini mümkün kıldı.

Standart grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda 3 tekrarlı (0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.1 mM) hazırlanan pNP çözeltilerden 1’er mL aktivite tüplerine alındı, üzerlerine 1 mL 1 M’lık Na_2CO_3 çözeltisi eklendi, girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve spektrofotometrede 420 nm’deki absorpsiyon değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 pNP standart grafiği (Konsantrasyonlar sodyum fosfat tamponu (pH 6.0) ile ayarlanmıştır.)

Şekil 3.7’de adımları verilen aktivite tayininde 960 μL tampon çözelti içerisine 10 μL enzim süspansiyonu ve 30 μL substrat çözeltisi eklenip girdap karıştırıcıda karıştırılarak 50°C de 20 dakika reaksiyona tabii tutuldu. Karıştırma öncesi ve sonrası aktivite tüplerinin görüntüsü Şekil 3.8’de görüldüğü gibidir. Reaksiyon süresi sonunda mıknatıs yardımıyla MNPlar’dan ayrılan sıvı faz 2 mL’lik konik tüplere aktarıldı ve üzerine 1 mL 1 M’lık Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek oluşan rengin 420 nm’de absorbans değeri okundu. Şekil 3.6’daki standart grafikten elde edilen eğri denklemi kullanılarak ölçülen absorbans değerine karşılık gelen pNP miktarı (mM) hesaplandı.



Şekil 3.7 İmmobilize enzimlerin aktivite tayininde izlenen adımlar a) Aktivite tüpü içerisinde hazırlanmış reaksiyon ortamı b) Substrat eklendikten sonra reaksiyonun başlatılması c) Reaksiyon sonucu mıknatısla immobilize enzimlerin tutulup sıvı fazın alınması d) pNP içeren sıvı fazın 2 ml’lik konik tüplere tüpe aktarılması e) Eklenen 1 ml 1 M Na_2CO_3 ’ün pNP ile renk oluşturmaya başlaması



Şekil 3.8 Solda aktivite tayin tüpündeki vortekslenmiş immobilize enzimler, sağda mıknatısla dipte toplanmış immobilize enzimler.

1 ünite ‘U’ enzim aktivite değeri pNPX veya pNPG’den 1 dakikada 1 μ M pNP üretmek için gerekli enzim miktarı olarak kabul edildi (Wang ve Chen, 2017).

3.2.9 İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerini Bulma

Optimizasyon çalışmalarında kullanılacak deneylerin tasarım ve sonuç analizinde Design-Expert® 7.0.0 programı kullanıldı. Reaksiyon sıcaklığı ve pH değeri üzerinde yapılan optimizasyon çalışmalarında Yüzey Yanıt Metodu ve Box-Wilson tarafından geliştirilen Merkezi Komposit Tasarımı CCD (Central Composite Design) yaklaşımı izlendi. Sıcaklık ve pH olarak 2 nümerik faktör, her faktör için merkezi noktaya ek negatif ve pozitif 2 eksenel, 2 faktöryel toplamda 5 seviye seçilerek oluşturulan deneme deseni Tablo 3.2’de verildiği gibidir. Bölüm 3.2.8’de açıklanan aktivite tayini ile hesaplanan en yüksek aktivite değeri 100 kabul edildi, diğer değerler bu değere oranlanarak ‘% Aktivite’ yanıt metriği elde edildi. Tek bloktan oluşan 13 denemeli bir deneme deseni oluşturuldu. Yanıt metriği olarak 3 tekrarlı denemelerin ortalamaları kullanıldı.

Tablo 3.2 Optimum sıcaklık ve pH çalışması için hazırlanan Box-Behnken deneme deseni

Std	No	Blok 1	Faktör 1 A: Sıcaklık	Faktör 2 B: pH
1	3	Blok 1	-1.00	-1.00
2	13	Blok 1	1.00	-1.00
3	6	Blok 1	-1.00	1.00
4	10	Blok 1	1.00	1.00
5	5	Blok 1	-2.00	0.00
6	2	Blok 1	2.00	0.00
7	12	Blok 1	0.00	-2.00
8	9	Blok 1	0.00	2.00
9	4	Blok 1	0.00	0.00
10	11	Blok 1	0.00	0.00
11	7	Blok 1	0.00	0.00
12	8	Blok 1	0.00	0.00
13	1	Blok 1	0.00	0.00

Deney deseniindeki pH değerleri β -Glukozidaz için (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0), β -Ksilozidaz için (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) sıcaklık değerleri her iki enzim için de (40, 45, 50, 55, 60 °C) olarak belirlendi. Denemelerdeki pH değerlerini sağlamak için 50 mM'lık sodyum fosfat tamponu ve 20 mM'lık sodyum asetat tamponu kullanıldı.

3.2.10 İmmobilize ve Serbest Km ve Vmax Hesaplamaları

Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri oluşturularak Km ve Vmax değerleri hesaplandı. Stok substrat çözeltisinden (20 mM) farklı miktarlarda (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μ L) alınarak 10 μ L enzim süspansiyonu ve tampon çözelti ile hacim 1 mL'ye tamamlandı. Serbest enzimler β -Glukozidaz (0.72 mg/mL) ve β -Ksilozidaz (5.45 mg/mL) 1:100 oranında seyreltildi, enzimlerden sırayla 10 μ L ve 2 μ L alındı, immobilize enzimlerle aynı substrat miktarları kullanıldı. Tampon çözelti ile hacim 1 mL'ye tamamlanıp 50 °C'de pH 6.0'da 20 dak. reaksiyona tabii tutuldu. Bölüm 3.2.8'de açıklandığı gibi aktivite tayini gerçekleştirildi. Michaelis-Menten grafiğindeki x eksenini artan substrat konsantrasyonlarından (mM), y eksenini

3 tekrarlı denemelerin ürün oluşum hız ($\mu\text{M}/\text{dak.}$) değerlerinin ortalamalarından oluşturuldu.

3.2.11 İmmobilize Enzimlerin Reaksiyon Koşullarındaki Stabilitelerini İnceleme

İmmobilize enzimler $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de pH 6.0'da (30 dak., 60 dak. , 90 dak. , 120 dak. , 150 dak. ve 180 dak.) sürelerinde 4 tekrarlı olacak şekilde bekletildi. Örnekler 960 μL tampon çözelti içerisine 10 μL enzim süspansiyonu eklenerek hazırlandı. Bekleme süreleri sonunda, tüplere 30 μL substrat çözeltisi eklendi ve Bölüm 3.2.8'de açıklandığı şekilde aktivite tayini gerçekleştirildi. Analiz sonucunda tekrarlı denemelerin ortalamaları alındı, hesaplanan en yüksek aktivite değeri 100 kabul edildi, diğer değerler bu değere oranlanarak % cinsinden ifade edildi.

3.2.12 İmmobilize Enzimlerin Tekrarlı Kullanım Denemeleri

İmmobilize enzimlere bir kere 10, iki kere 15 tekrarlı kullanım denemeleri gerçekleştirildi. Tekrarlı kullanım çalışmalarında ve yıkamalar sonrasında immobilize enzimlerin hacmi 10 μL kabul edildi ve 30 μL substrat çözeltisi, 960 μL tampon çözeltisi kullanıldı, Bölüm 3.2.8'de açıklandığı şekilde aktivite tayini gerçekleştirildi. MNPlar'e her tekrardan önce deiyonize su ve tampon çözeltisi ile yıkama yapıldı. Değerlendirmelerde hesaplanan en yüksek aktivite değeri 100 kabul edildi diğer aktivite değerleri bu değere göre % olarak oranlandı ve karşılaştırıldı.

3.2.13 Ortamdaki Metanolün İmmobilize Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme

Ortamdaki metanolün immobilize enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkisini incelemek için sadece β -Glukozidaz, sadece β -Ksilozidaz, β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz'ın birlikte aktiviteleri ve ortama metanol eklenmiş haldeki aktiviteleri karşılaştırıldı. İki enzimin de bulunduğu ortam için immobilize enzim süspansiyonlarından 10'ar μL alındı, mıknatıs yardımıyla sıvı fazlarından uzaklaştırıldıktan sonra hacim olarak ikisi toplamda 10 μL kabul edildi. Ardından 30 μL pNPX çözeltisi (20Mm) ve 30 μL pNPG çözeltisi (20Mm) eklenerek fosfat

tampon çözeltisi (50Mm, pH 6.0) ile ortam hacmi 1 mL'ye tamamlandı. Metanollü denemeler için ortamlara 30 µL metanol eklenerek hacim 1 mL'ye tamamlandı. Reaksiyonlar 50 °C'de gerçekleştirildi ve Bölüm 3.2.8'de açıklandığı şekilde aktivite tayini adımları uygulandı.

3.2.14 Farklı Depolama Koşullarının İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme

Deiyonize suya ve fosfat tamponuna (50Mm, pH 6.0) alınan immobilize ve serbest enzimler 2 ay boyunca -20 °C ve +4 °C'de saklandı. İlk 4 haftanın ve 2. ayın örneklerine sırayla Bölüm 3.2.8'de açıklandığı şekilde aktivite tayinleri yapıldı. Depolama koşullarındaki farklılıkların ve depolama sürelerinin immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. İmmobilize enzimler aktivite tayinlerinden önce su ve tampon çözeltileri ile yıkandı. İmmobilize enzimler için 3, serbest enzimler için 2 tekrarlı denemeler gerçekleştirildi ve hesaplamalarda tekrarların ortalamaları kullanıldı. Hesaplanan en yüksek aktivite değeri 100 kabul edildi, diğer değerler bu değere oranlanarak % cinsinden ifade edildi.

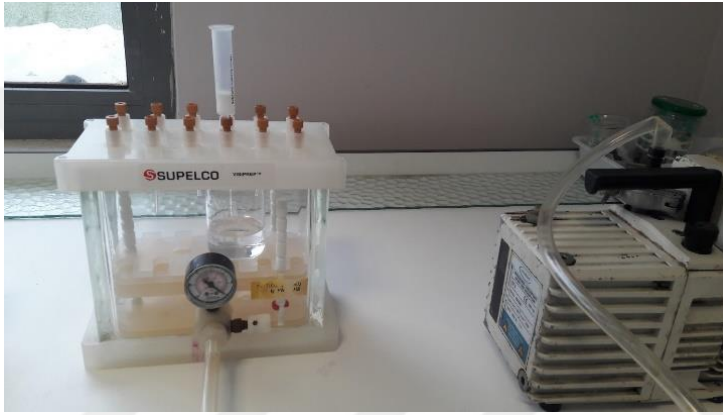
3.2.15 Biyotransformasyonun Gerçekleştirilmesi

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılacak ASTIV ve ASTVII substratları metanolde çözündürülerek 4 mg/ml'lik substrat çözeltileri elde edildi ve stok çözelti olarak kullanıldı. Reaksiyonlarda tampon çözelti olarak fosfat tamponu (6.0 pH, 50 Mm) kullanıldı. Substrat, immobilize β-Glukozidaz (β-G) ve β-ksilozidaz (β-K) enzimleri ve tampon çözeltiyle ortam hacmi 1 mL'ye tamamlandı.

Metabolit oluşum taramaları için 2, 3, 4, 5, 6, 7 günlük yapılan denemelerde, 25 °C, 37°C ve 50 °C'de reaksiyonlar gerçekleştirildi ve reaksiyonlar için disk karıştırıcı, orbital karıştırıcı ve çalkalamalı su banyosu kullanıldı. Substrat miktarları 0.1 mg, 0.2 mg ve 1 mg olarak denendi ve substratlar ortama 100 µL ve 25 µL metanolde çözündürülerek verildi. Enzimlerin tek, birlikte ve sıralı olarak kullanıldığı, ortama eklenen β-G miktarının β-K'nın 5 katı olduğu denemeler yapıldı. Biyotransformasyon çalışmaları tekrarsız denemeler halinde gerçekleştirildi.

3.2.16 Ekstraksiyon Çalışması

Şekil 3.9’da verildiği gibi C18 silika sorbent ve vakum manifoldu kullanılarak oluşturulan sistemde, sorbent materyali önce 10 ml su, ardından 10 ml metanol geçirilerek yıkandı. Sonrasında 10 ml su daha geçirilerek silika ıslak kalacak şekilde şartlandı. 1 mL reaksiyon ortamı aktarıldı. Sorbentteki tüm su vakumlandıktan sonra 10 ml metanolle silikaya tutunan moleküller toplandı. Evaporatör ile metanol uçuruldu. İşlemden sonra elde edilen kuru madde metanolde çözüldü ve örnek İTK işlemine tabii tutuldu.



Şekil 3.9 C18 silika sorbent ve vakum manifoldu kullanılarak oluşturulan ekstraksiyon sistemi

3.2.17 İnce Tabaka Kromatografi (İTK) Çalışması

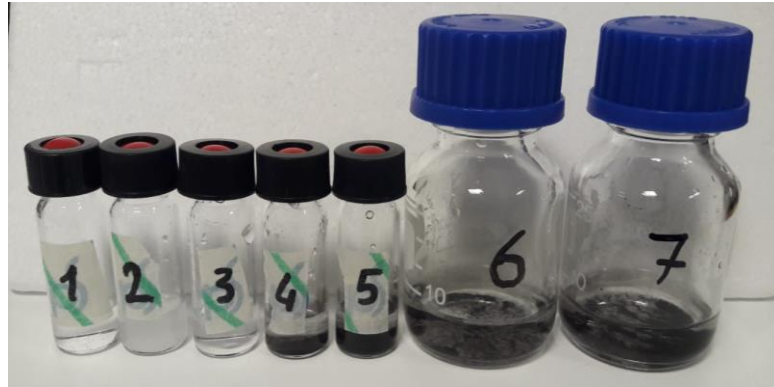
İTK çalışmalarında kontrol olarak hedef molekül CA (1mg/ml) 2 tatbik, substratlar (ASTIV, ASTVII) (4 mg/ml) 2 tatbik ve ekstrakte edilmiş reaksiyon ortamı 20 tatbik olarak uygulandı. Mobil faz olarak (etil asetat: metanol: su) çözgen sistemi (100: 17.5: 13.5), durağan faz olarak 60 F₂₅₄ silika tabakalar kullanıldı. İşlem sonucunda tabakaya sülfirik asit (metanolde %5 oranından çözdürülmüş) püskürtülerek 125°C’de yakma gerçekleştirildi.

3.2.18 Biyotransformasyon Örneklerinin HPLC Analizi ile Yapı Tayini

İTK çalışmalarının sonuçları doğrultusunda, en yüksek ASTIV dönüşümünü sağlayan biyotransformasyon koşulları (50°C, 200 rpm, 3 gün) uygulanarak elde edilen moleküllere HPLC analizi ile yapı tayini gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve biyotransformasyon örnekleri 1’den 7’ye kadar numaralandırıldı,

3 günlük reaksiyon sonucu Bölüm 3.2.16’da açıklandığı şekilde ekstrakte edilerek HPLC analizine tabii tutuldu. Analizi gerçekleştirilen örneklerinin içerikleri, HPLC analizi için kullanılan solventler ve son konsantrasyonları Tablo 3.3’te verildiği gibidir. Reaksiyon hacimleri 1 mL olan kontrol örneklerinden Örnek 1 sadece fosfat tamponu, Örnek 2 tampon ve ASTIV (0.6 mg/ml), Örnek 3 tampon ve ASTVII (0.6 mg/ml), Örnek 4 tampon ve β -Glukozidaz (20 U), Örnek 5 β -Glukozidaz (20 U) ve β -Ksilozidaz (20 U), reaksiyon hacimleri 5 ml olan biyotransformasyon örneklerinden Örnek 6 sadece immobilize β -Glukozidaz (600U, 0.6 mg/ml ASTVI), Örnek 7 eşit ünitelerde β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz (600U, 0.6 mg/ml ASTVI) içermektedir (Şekil 3.10).

HPLC analizi için Agilent - 1200 Series sistemi kullanıldı. Sistem dörtlü takım pompa, otomatik örnek enjeksiyon bölümü, kolon fırını ve sıralı diyot dedektörü (DAD) ekipmanlarından oluşmaktadır. Tüm analizler Kinetex C-18 column (150 x 4.6mm, 5 μ m particle size) kolon ile gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 35°C, mobil faz akış hızı 0.75 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 μ L, UV detektör dalga boyu 203 nm olarak ayarlandı. Ayrım için: Ultrasaf Su (A), Asetonitril (B), Metanol (C) mobil faz çözgenleri kullanıldı. Ayrım profili Tablo 3.4’te verildiği gibidir.



Şekil 3.10 HPLC analizi yapılan biyotransformasyon örnekleri

Tablo 3.3 Analizi gerçekleştirilen hidroliz örneklerinin içerikleri, çözüldükleri solvent ve son konsantrasyonları (ppm = (mg çözünen / litre çözelti).

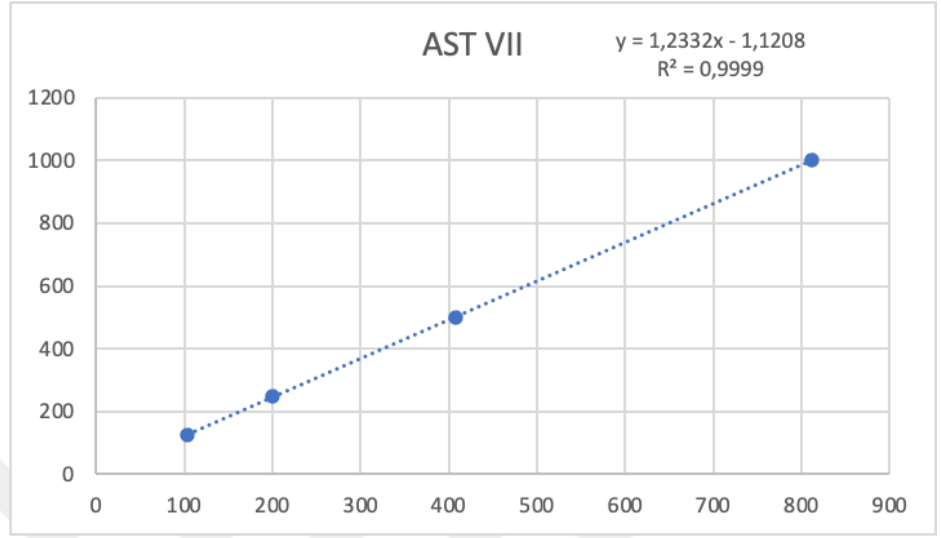
Örnek kodu	İçerik	Solvent (HPLC analizi için)	Son konsantrasyon
1	Tampon çözelti	1 mL Metanol	2900 ppm
2	Tampon + ASTIV	1 mL Metanol	1600 ppm
3	Tampon + ASTVII	1 mL Metanol	700 ppm
4	Tampon + İmmobilize β -G	1 mL Metanol	800 ppm
5	Tampon + İmmobilize β -G + β -K	1 mL Metanol	600 ppm
6	Tampon + ASTVII + İmmobilize β -G	1 mL Metanol	3100 ppm
7	Tampon + ASTVII + İmmobilize β -G + β -K	1 mL Metanol + 200 μ L Ultrasaf su	6167 ppm

Tablo 3.4 HPLC analizi için kullanılan mobil faz ayırım profili.

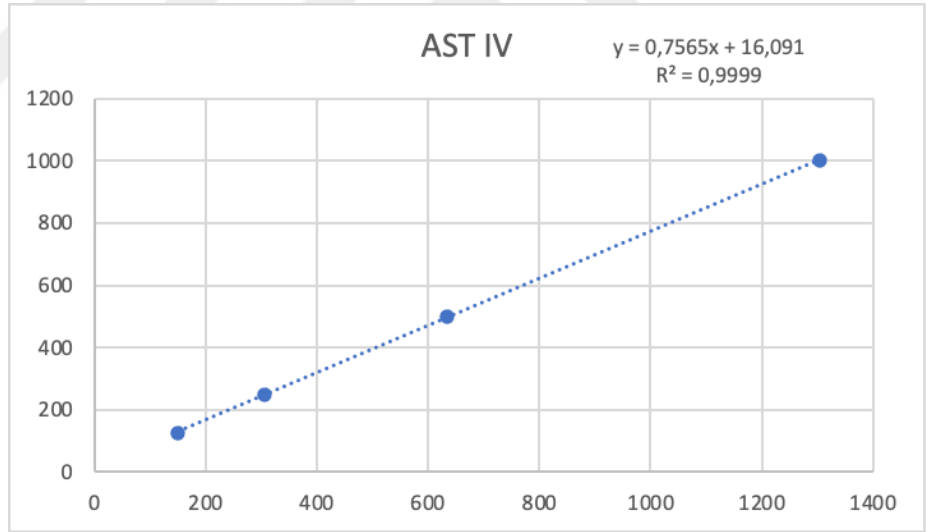
Zaman	% A	% B	% C
0.00	70	30	0
1.50	70	30	0
11.50	45	55	0
14.00	45	55	0
14.01	0	0	100
17.00	0	0	100
17.01	70	30	0
23.00	70	30	0

Deney sonuçlarının HPLC-DAD metoduyla kantitatif olarak belirlenebilmesi için ASTVII ve ASTIV referans maddelerinin kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12). Bu aşamada, referans maddelerin 1000, 500,

250 ve 125 ppm olmak üzere 4 farklı konsantrasyonu hazırlandı, 3'er tekrarlı analizi gerçekleştirildi ve kalibrasyon grafikleri çizildi.



Şekil 3.11 ASTVII kalibrasyon grafiği



Şekil 3.12 ASTIV kalibrasyon grafiği

4. BULGULAR

4.1 3-Aptes ile Yüzey Aktivasyonunu Gerçekleştirme

Bölüm 3.2.1’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen yüzey modifikasyonu yani silanlama işleminde değerlendirmeler, Bölüm 3.2.2’de açıklandığı şekilde gram MNP üzerinde oluşan μmol 3-Aptes miktarı hesaplanarak yapıldı.

MNP yüzeyinde 3-Aptes kollarının oluşturulacağı silanlama ortamı için su fazı ve metanol fazı karşılaştırıldı, %1(h/h) 3-Aptes konsantrasyonuna sahip deiyonize suyun kullanıldığı denemede MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarı $17.9 \mu\text{mol/g}$ iken %1 3-Aptes konsantrasyonundaki metanolün kullanıldığı silanlama işleminde bu değer $8.3 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı. Devam eden silanlama işlemlerinde sıvı faz olarak için deiyonize su kullanılmasına karar verildi.

Silanlama ortamın 3-Aptes konsantrasyonuna karar vermek için ön tarama olarak %1, %5 ve %10 (h/h) 3-Aptes konsantrasyonları denendi ve sırasıyla $16.3 \mu\text{mol/g}$, $11.7 \mu\text{mol/g}$, $13.1 \mu\text{mol/g}$ değerleri elde edildi. Konsantrasyonları %0.5, %1 ve %2 (h/h) olarak oluşturulan ikinci tarama denemelerinde MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarı sırasıyla 21.1 , 24.8 , $24.0 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı ve silanlama işlemlerine %1 (h/h) 3-Aptes konsantrasyonu ile devam edilmesine karar verildi.

Bölüm 3.2.1’de açıklandığı şekilde silanlama ortamına 3-Aptes eklenmeden önce MNPlar deiyonize su içerisinde 10 dakika, 15 dakika, 2 saat ve 3 saat sonikatörde süspanse edildi ardından gerçekleştirilen silanlama işlemlerinde MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarı sırasıyla 20.8 , 21.1 , 18.6 ve $18.7 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı. Sonuçta MNPlar’ın sonikatörde bekleme süresi ile MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarı arasında doğru bir orantı görülmedi. Devam eden silanizasyon işlemleri için MNPlar sonikatörde sadece 10 dakika bekletildi.

Silanlama işlemlerinde ortam hacminin büyüklüğünün MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarına etkisini incelemek için gerçekleştirilen denemede, 20 mg MNP %1 (h/h) 3-Aptes konsantrasyonuna sahip 0.5 ml ve 20 ml deiyonize suda silanlama işlemine tabii tutuldu ve sırasıyla 14.5 ve $18.7 \mu\text{mol/g}$ değerleri elde

edildi. 3-Aptes konsantrasyonu %1 (h/h) iken reaksiyon hacminin 40 katına çıkmasının MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarını 4.2 $\mu\text{mol/g}$ arttırdığı görüldü.

Çalışmanın devamında 100 mL deiyonize su içerisindeki 500 mg MNP 10 dakika sonikatörde süspanse edilip %1(h/h) 3-Aptes oranı ile çalkalamalı su banyosunda, 100 rpm'de 24 saat boyunca tutularak gerçekleştirilen silanlama işleminde MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarı 19.6 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı. Aynı koşullar kullanılarak, ilk 3 saati 100 °C'de, kalan 21 saati 40 °C'de devam eden silanizasyon işleminde MNP yüzeyinde oluşturulan 3-Aptes miktarı 37.4 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı ve bu çalışmadaki en yüksek değer elde edildi.

4.2 Yüzeyde Oluşan Amino Gruplarının Tayini: Ninhidrin Analizi

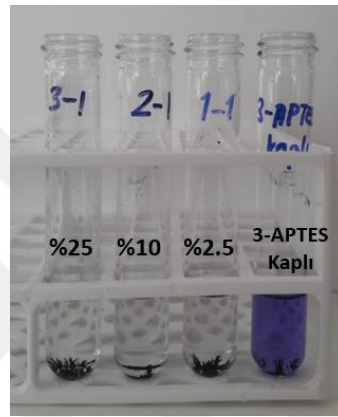
Bölüm 3.2.2'de açıklanan Ninhidrin analizinde, analiz edilen MNP miktarındaki 1 mg artışın absorbansta 0.04 kat artışa sebep olduğu belirlendi. Aynı silanlama işleminden geçmiş MNPler Tablo 4.1'de verildiği gibi farklı miktarlarda alındığında, gram MNP yüzeyinde oluşan 3-Aptes miktarının 18.2 -15.3 $\mu\text{mol/g}$ değerleri arasında kalması ile karşılaştıma metriği olarak kullanılan 3-Aptes/MNP ($\mu\text{mol/g}$) değerinin tutarlı olduğu belirlendi.

Tablo 4.1 Farklı nanopartikül miktarının ninhidrin analizinde okunan absorbands ve 3-Aptes/Nanopartikül değerleri

MNP (mg)	Absorbans	3-Aptes/MNP ($\mu\text{mol/g}$)
5.0	0.146	15.4
7.5	0.229	15.3
10.0	0.317	15.4
12.5	0.479	18.2
15.0	0.568	17.9
17.5	0.624	16.8
20.0	0.748	17.5
		Dizi Ortalaması: 16.6 Standart Sapma: 1.3

4.3 Gluteraldehit ile Enzimler İçin Bağlanma Ara Kolu Oluşturma ve Analizi

MNP yüzeyindeki 3-Aptes miktarı 21.2 $\mu\text{mol/g}$ olan MNPlar'ın, Bölüm 3.2.3'te açıklandığı şekilde 3 farklı gluteraldehit konsantrasyonu %2.5, %10 ve %25 (h/h) ile muamelesinin ardından gerçekleştirilen Ninhidrin analizi sonrası (Şekil 4.1) sırasıyla 1.3, 1.6, 1.1 $\mu\text{mol/g}$ (3-Aptes/MNP) değerleri elde edildi. Silanlanmış uçların gluteraldehit kaplanma yüzdesi Bölüm 3.2.4'te açıklandığı gibi hesaplandı ve sırasıyla %93.9, %92.4 ve %94.8 olarak bulundu.



Şekil 4.1 Kullanılan gluteraldehit oranları %2.5, %10, %25 (h/h) sonrası MNP, en sağda 3-Aptes kaplı MNP

4.4 Protein Tayini (Bradford Yöntemi)

Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen protein tayini sonucunda enzim çözeltilerinin hesaplanan protein yoğunlukları Tablo 4.2'de verildiği gibidir.

Tablo 4.2 Kullanılan ticari enzimlerin protein yoğunlukları

	Absorbans	Protein Yoğunluğu	Seyreltme	Net (mg/ml)
β -Glukozidaz	0,298	0,07	10	0,73
β -Ksilozidaz	0,439	0,11	50	5,45

4.5 β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz İmmobilizasyonu

Bölüm 3.2.6’da açıklandığı şekilde gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde farklı MNP miktarı, enzim miktarı ve reaksiyon ortam hacmi denemeleri ve Bölüm 3.2.8’de açıklandığı gibi gerçekleştirilen aktivite tayini sonuçları ile Bölüm 3.2.6’da açıklandığı şekilde hesaplanan enzimlerin aktivite geri kazanım yüzdeleri Tablo 4.3.’te verildiği gibidir.

Bölüm 3.2.6’da açıklandığı gibi ksilozsuz ortamda immobilize edilmiş β -Ksilozidaz’ın aktivite geri kazanım yüzdesi %36.0, ksilozlu ortamda immobilize edilmiş β -Ksilozidaz’ın %36.2, glukozlu ortamda immobilize edilen β -Glukozidaz’ın %46.9, glukozsuz ortamda immobilize edilen β -Glukozidaz’ın %52.3 olarak hesaplandı. Sonuçta ortama eklenen glikoz ve ksilozun immobilizasyon işlemi için olumlu bir etkisinin olmadığı anlaşıldı. İmmobilizasyon işlemlerine ortama glukoz ve ksiloz eklemesi yapılmadan devam edildi.

Tablo 4.3 İmmobilizasyon çalışmalarındaki geri kazanım yüzdeleri
*(MNP miktarı/Enzim Miktarı/Ortam Hacmi (mg/ μ l/ml)) Tablodaki % Geri kazanımlar, belirtilen koşullarda elde edilen en yüksek değerleri göstermektedir.

β -Glukozidaz		β -Ksilozidaz	
mg/ μ l/ml	Geri kazanım (%)	mg/ μ l/ml	Geri kazanım (%)
200/400/40	10	200/40/40	7.8
150/100/40	28.2	150/10/40	23.8
50/100/10	20.6	50/2.5/10	5.8
50/25/10	17.5	25/1.25/10	9.8
25/12.5/10	12.9	25/2.5/10	10.2
25/25/10	12.6	25/15/10	15.7
25/40/10	52.7	25/10/10	34.0
25/30/10	52.8	25/5/10	38.5
25/50/10	67.0		

Ortama eklenen enzim miktarının immobilizasyon işlemine etkisini incelemek için 10 ml hacimde aynı yüzey modifikasyon işlemlerinden geçmiş 25 mg MNP ile 30, 40, 50 μ L β -Glukozidaz enzim çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen denemede Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde hesaplanan aktivite geri kazanım yüzdeleri sırayla %52.8, %52.7 ve %53.4'tür.

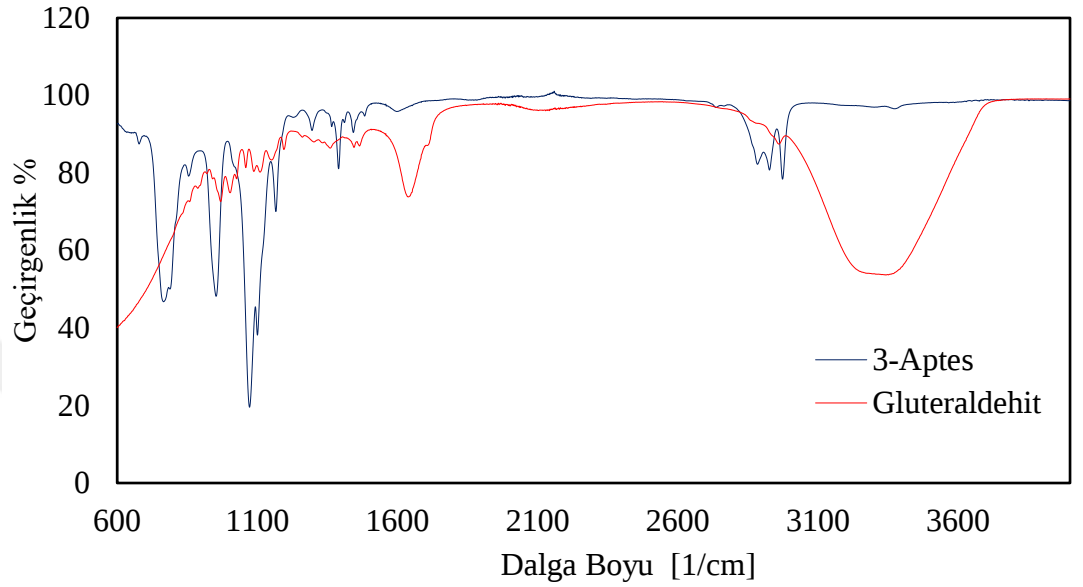
β -Glukozidaz'ın asetat tamponunda (pH 4.0) 37 °C'de gerçekleştirilen immobilizasyon işlemindeki geri kazanımı %10, fosfat tamponunda (pH 7.0) 25 °C'de gerçekleştirilen immobilizasyondaki aktivite geri kazanım yüzdesi %28 olarak, β -Glukozidaz'ın 25 °C'de, pH 7.0 ve 7.4'te gerçekleşen immobilizasyon işleminde aktivite geri kazanım yüzdeleri sırayla %12.6 ve %6.8 olarak hesaplandı. İmmobilizasyon işlemlerinin fosfat tamponunda (pH 7.0) 25 °C'de gerçekleştirilmesine karar verildi.

Enzim aktivitelerinin en yüksek geri kazanım yüzdeleri β -Glukozidaz'ın 25 mg MNP, 50 μ l enzim çözeltisi ile 10 ml ortam hacminde gerçekleştirilen immobilizasyonla %67; β -Ksilozidaz'ın 25 mg MNP, 5 μ l enzim çözeltisi ile 10 ml ortam hacminde gerçekleştirilen immobilizasyonla %38.5 olarak hesaplandı.

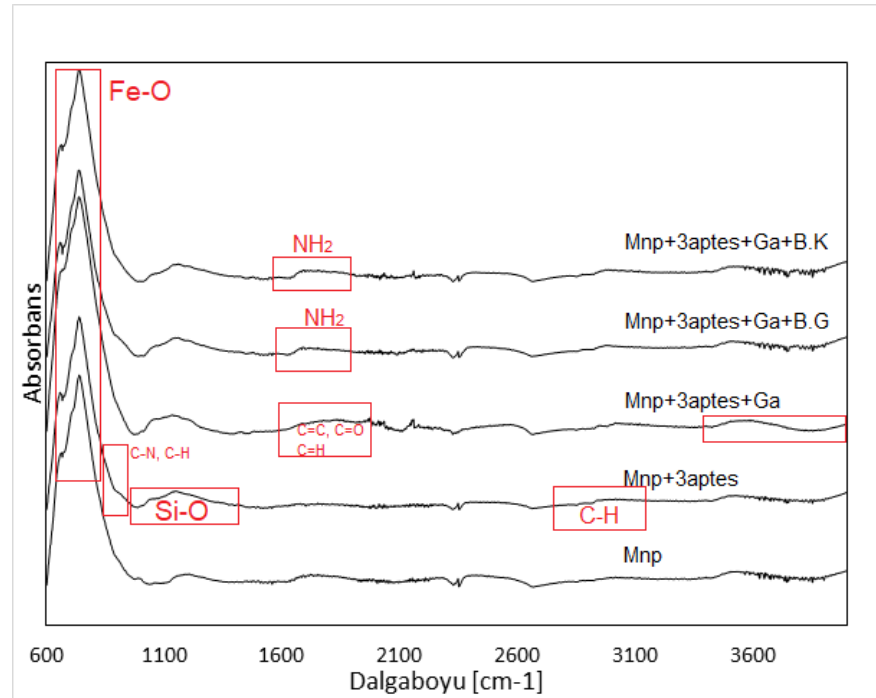
4.6 Manyetik Nanopartiküllerin FTIR ve SEM Analizleri

MNPlar'ın yüzey modifikasyonlarında kullanılan 3-Aptes ve gluteraldehit çözeltilerinin FTIR analizleri Şekil 4.2'deki gibidir. Enzim immobilizasyon adımları sonrasında alınan MNP örneklerin FTIR analizi Şekil 4.3'teki gibidir. FTIR analizi sonucunda 600 ve 800 cm^{-1} civarında gözlenen bantlar, MNPlar'ın Fe_2O_3 ve Fe_3O_4 fazlarındaki Fe-O titreşimlerinin karakteristiğidir. 3-Aptes muamelesinden sonra gözlemlenen bant değişikliği 3-Aptes'in 1073'teki Si-O karakteristik titreşiminin etkisini işaret etmektedir. 2850 ve 3000 arasındaki bantta gözlemlenen şekil değişikliğinin kaynağı yine 3-Aptes'in o bant aralığındaki tekli C-H bağlarının titreşimleridir. Aynı şekilde 3-Aptes'in 954 cm^{-1} 'deki C-N ve C-H tekli bağların titreşimleri, etkisini banttaki şekil değişikliği olarak göstermektedir. Gluteraldehitin çift bağ (C=C, C=O, C=H) bölgesinde 1642 cm^{-1} 'deki titreşiminin reaksiyondan sonra bandı esnettiği gözlemlendi. O-H ve N-H bağlarının bölgesi 3000 ve 3700 cm^{-1} arasındaki geniş titreşimin ise bandın şekil değiştirdiği ve düzleştirdiği görüldü. 600 ve 940 arasındaki alanın ise reaksiyondan sonra

gluteraldehitin o bölgedeki titreşiminden dolayı esnediği düşünüldü. Enzim immobilizasyonu sonrasında her iki enzim için de 1637-1698 cm^{-1} arasındaki banttaki değişim, proteinlerin NH_2 karakteristik titreşimlerine işaret eder. Bu da enzimlerin immobilize olduğunu göstermektedir (De Souza vd., 2017; Zlateski vd., 2014).

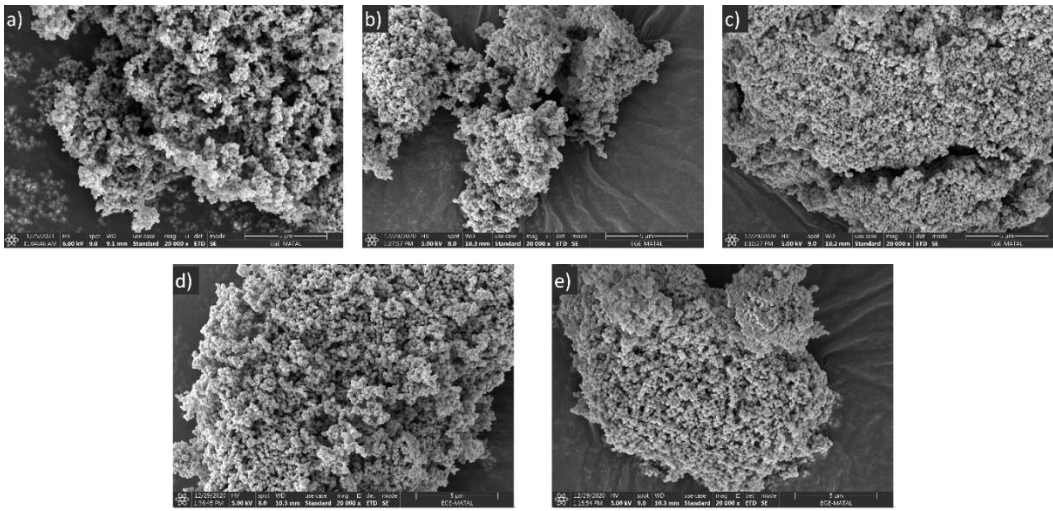


Şekil 4.2 3-Aptes ve gluteraldehit FTIR analizi

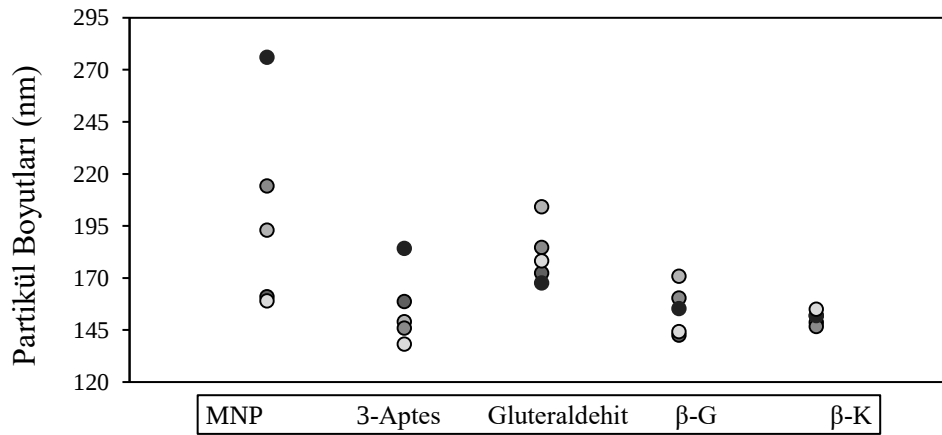


Şekil 4.3 İşlem görmüş MNPlar'ın FTIR analizi

Şekil 4.4'te verilen SEM analizleri ile, manyetik partiküllerin işlemler sonucu agregatlaşma olduğu görüldü. Başlangıçta ortalama boyutları 171.28 nm iken silanizasyon işleminden sonra hesaplanan bu değer 155.26 nm'dir. Silanlanmış manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit muamelesinden sonraki boyutları ise ortalama 181.48 nm'dir. MNPlar'ın β -Glukozidaz immobilizasyonu sonrası hesaplanan ortalama boyutları 154.68 nm, β -Ksilozidaz immobilizasyonu sonrası 150.88 nm'dir. Sonuç olarak silanizasyon, glutaraldehit ara kolu oluşturma ve enzim immobilizasyonu işlemlerinden geçen MNPlar'ın partikül çapları arasındaki farkın azaldığı, boyutları açısından daha homojen hale geldiği anlaşıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 SEM grafikleri. (a) Manyetik nanopartikül, (b) 3-Aptes kaplı manyetik nanopartikül, (c) Glutaraldehit muamelesi görmüş manyetik nanopartikül, (d) β -Glukozidaz immobilize edilmiş manyetik nanopartikül, (e) β -Ksilozidaz immobilize edilmiş manyetik nanopartikül.

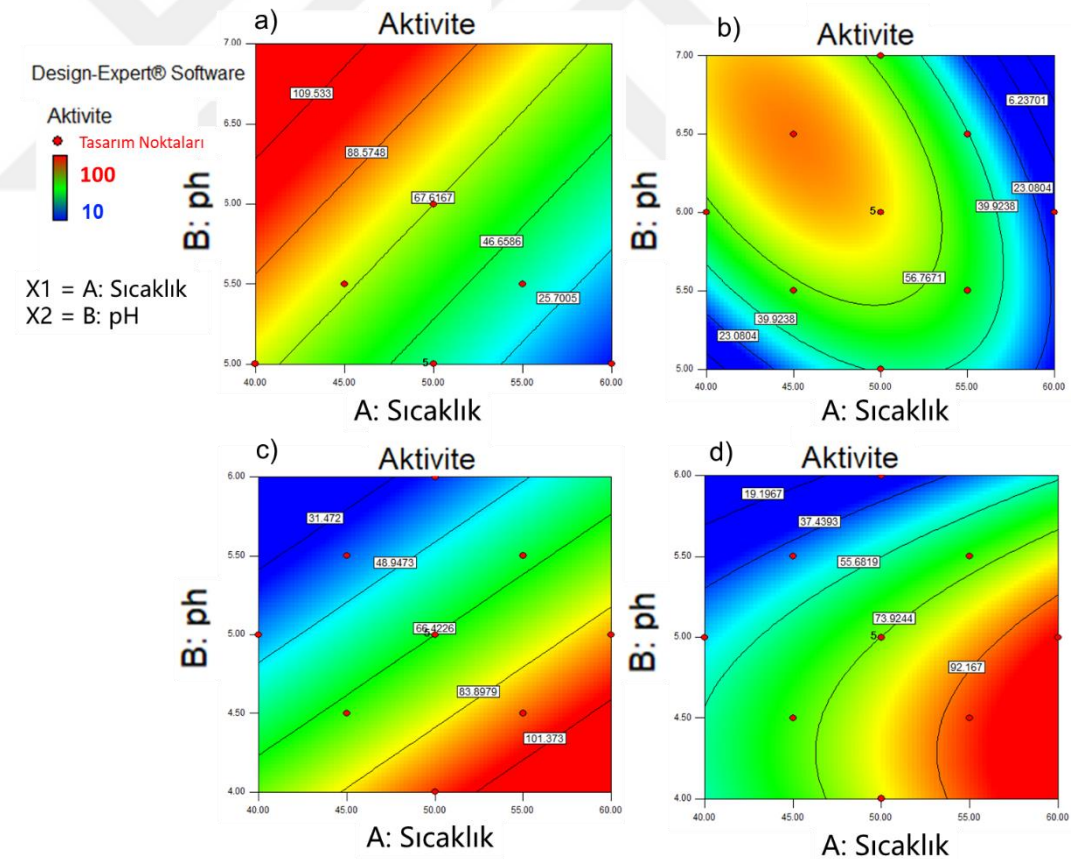


Şekil 4.5 İşlem görmemiş, 3-Aptes, glutaraldehit muamelesi sonrası, β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz immobilize edilmiş MNPlerin SEM analizi ile ölçülen boyutları (nm)

4.7 İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerini Bulma

Bölüm 3.2.9’da açıklanan optimum pH ve sıcaklığı bulma denemeleri sonucu serbest β -Ksilozidaz’ın en yüksek aktivite değerine pH 7.0 ve 40 °C’de, immobilizasyon sonrası ise en pH 6.5 ve 45 °C’de ulaştığı saptandı. Serbest β -Glukozidaz pH 4.0 ve 60 °C’de en yüksek aktivite değerini verirken immobilizasyon sonrası en yüksek aktiviteye 4.5 pH ve 60 °C’de ulaştı.

Design Expert (v7.0.0) programı ile elde edilen kontur grafikleri Şekil 4.6’da verildiği gibidir. Grafiklerdeki kırmızı alanlar %100 ve üzeri aktivite değerlerini ifade ederken mavi alanlar %10’dan düşük aktiviteleri temsil etmektedir. Grafiklerdeki ‘x’ eksenini sıcaklık, ‘y’ eksenini pH değerlerini göstermektedir. Programdan elde edilen ANOVA verileri Tablo 4.4’te verildiği gibidir.



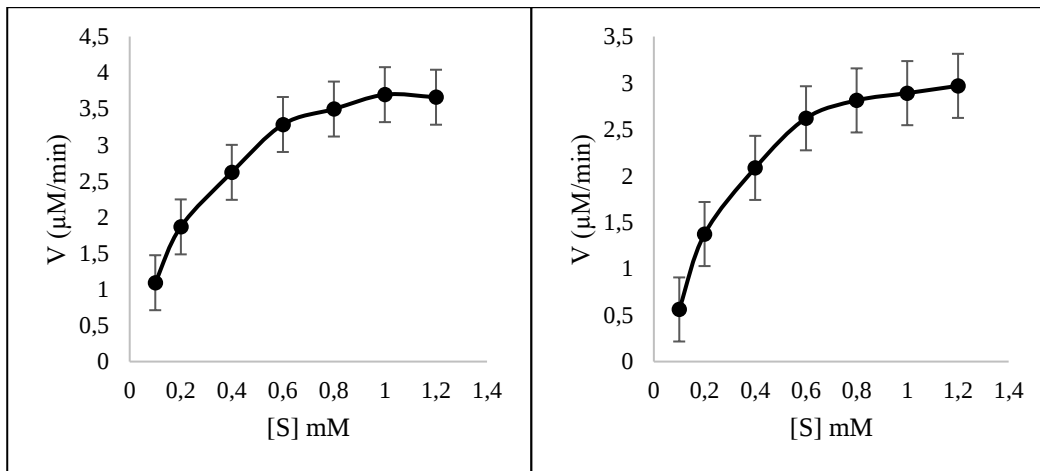
Şekil 4.6 Enzim aktivitelerinin contour yüzey grafikleri, x eksenini sıcaklık, y eksenini pH (a) Serbest β -Ksilozidaz (b) İmmobilize β -Ksilozidaz (c) Serbest β -Glukozidaz (d) İmmobilize β -Glukozidaz. (Design-Expert®)

Tablo 4.4 Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık, pH değerleri ve ANOVA verileri.

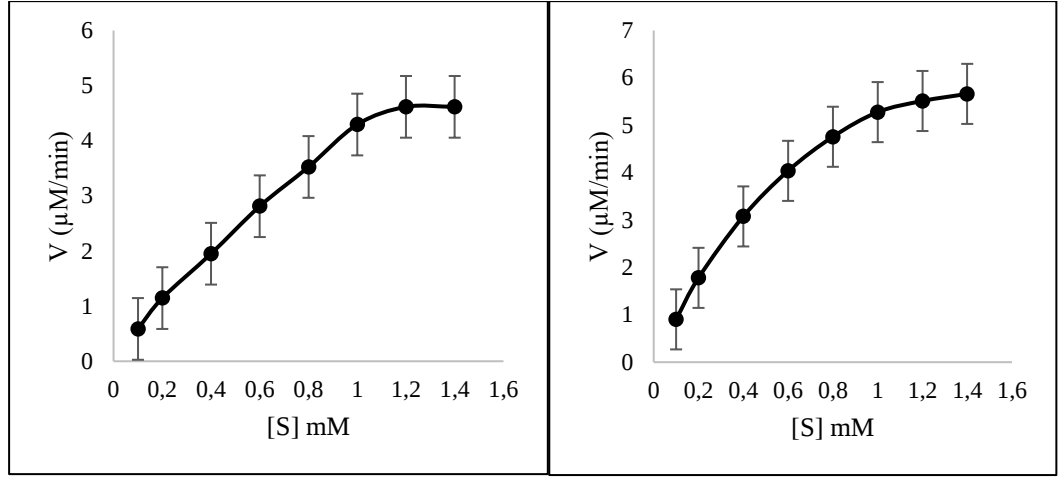
	Serbest β -Glukozidaz	İmmobilize β -Glukozidaz	Serbest β -Ksilozidaz	İmmobilize β -Ksilozidaz
pH	4.0	4.5	7.0	6.5
Sıcaklık	60 °C	60 °C	40 °C	45 °C
Model (p değeri)	0.0002	0.0001	0.0044	0.0511
Sıcaklık (p değeri)	0.0019	0.0091	0.0074	0.0345
pH (p değeri)	0.0003	< 0.0001	0.0160	0.4459

4.8 İmmobilize ve Serbest Km ve Vmax Hesaplamaları

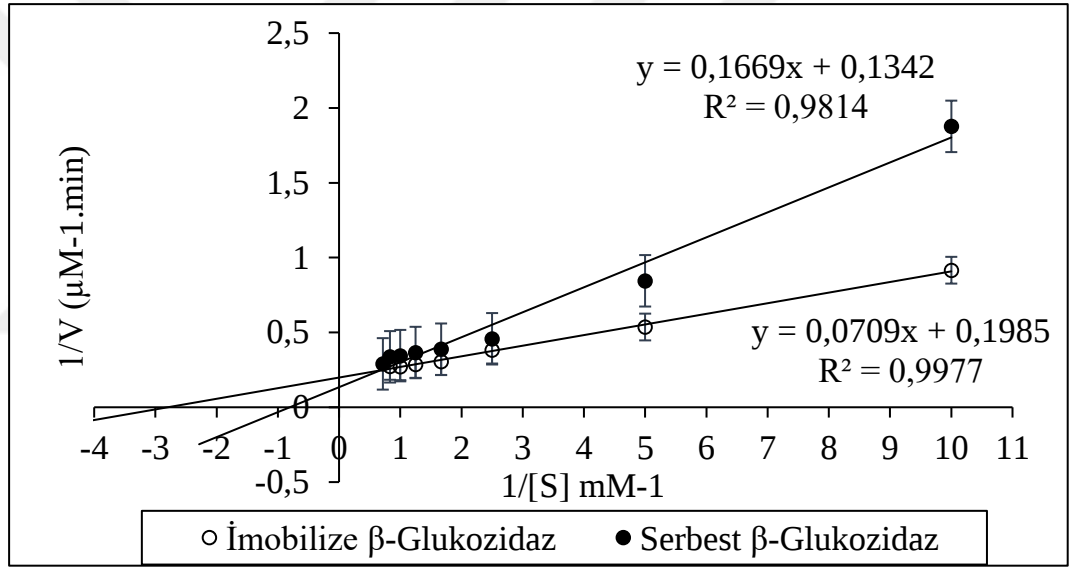
Bölüm 3.2.10’da açıklandığı şekilde, serbest ve immobilize durumdaki β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz’ın artan substrat konsantrasyonuna göre ürün oluşum hızını ifade eden ve 3.2.8’de açıklandığı şekilde hesaplanan aktivite değerleri ile oluşturulan Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de, Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da verildiği gibidir. Grafiklerden elde edilen grafik denklemi, R^2 , Km ve Vmax değerleri Tablo 4.5’te yer almaktadır.



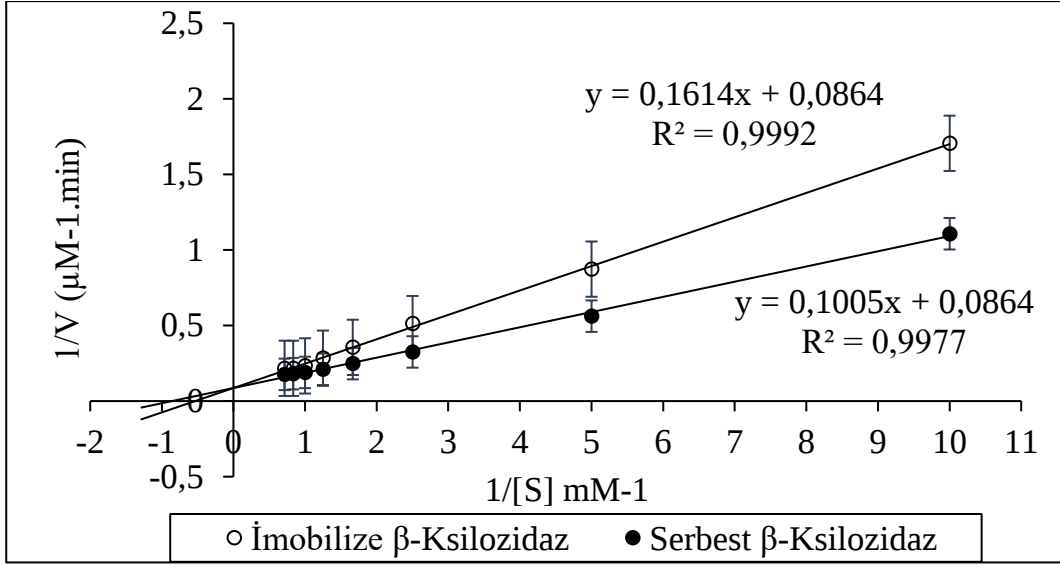
Şekil 4.7 İmmobilize β -Glukozidaz (solda) ve serbest β -Glukozidaz (sağda) enziminin Michaelis-Menten grafiği



Şekil 4.8 İmmobilize β -Ksilozidaz (solda) ve serbest β -Ksilozidaz (sağda) enziminin Michaelis-Menten grafiği



Şekil 4.9 İmmobilize ve serbest β -Glukozidaz'ın Lineweaver-Burk grafiği



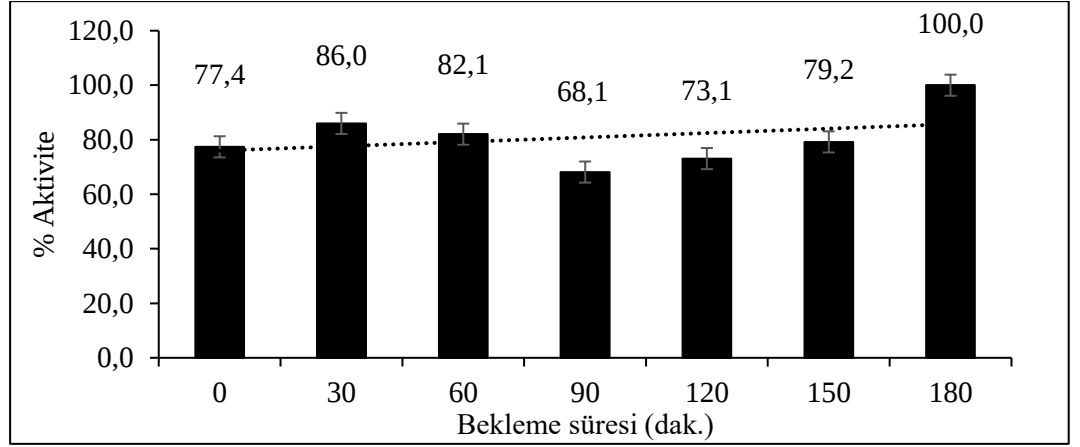
Şekil 4.10 İmmobilize ve serbest β -Ksilozidaz'ın Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.5 Serbest ve immobilize enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri

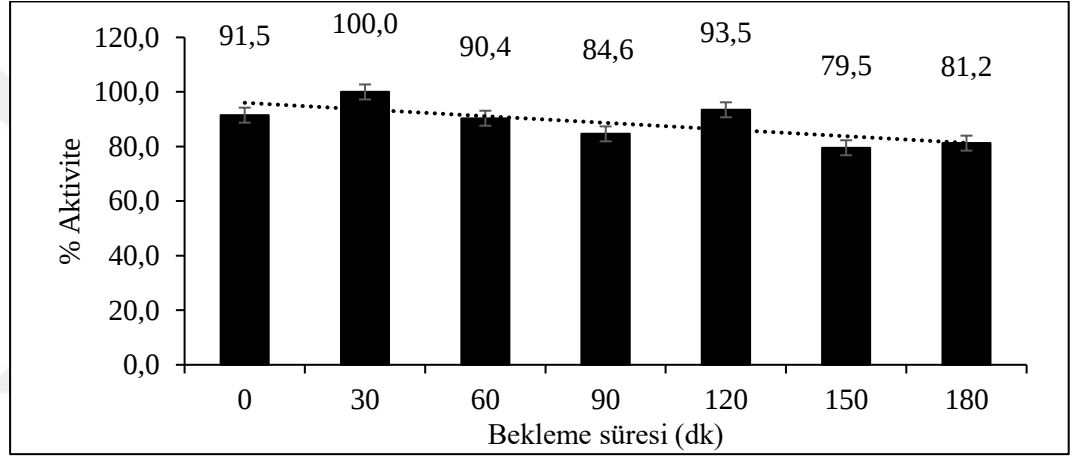
	Lineweaver-Burk Denklemleri	R^2	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{dak.}$)
Serbest β -Glukozidaz	$y = 0,1669x + 0,1342$	$R^2 = 0,9814$	1.2	7.4
İmmobilize β -Glukozidaz	$y = 0,0709x + 0,1985$	$R^2 = 0,9977$	0.3	5.0
Serbest β -Ksilozidaz	$y = 0,1005x + 0,0864$	$R^2 = 0,9977$	1.2	11.6
İmmobilize β -Ksilozidaz	$y = 0,1614x + 0,0864$	$R^2 = 0,9992$	1.9	11.6

4.9 İmmobilize Enzimlerin Reaksiyon Koşullarındaki Stabilitelerini İnceleme

İmmobilize enzimlerin 50°C fosfat tamponu (50Mm, pH 6.0) içerisinde bekletildikten sonra hesaplanan karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri β -Glukozidaz için Şekil 4.11'de, β -Ksilozidaz için Şekil 4.12'deki gibidir. Grafikte kullanılan veriler 3 tekrarlı denemelerin ortalamalarından oluşmaktadır, hata çubukları standart hatayı göstermektedir.



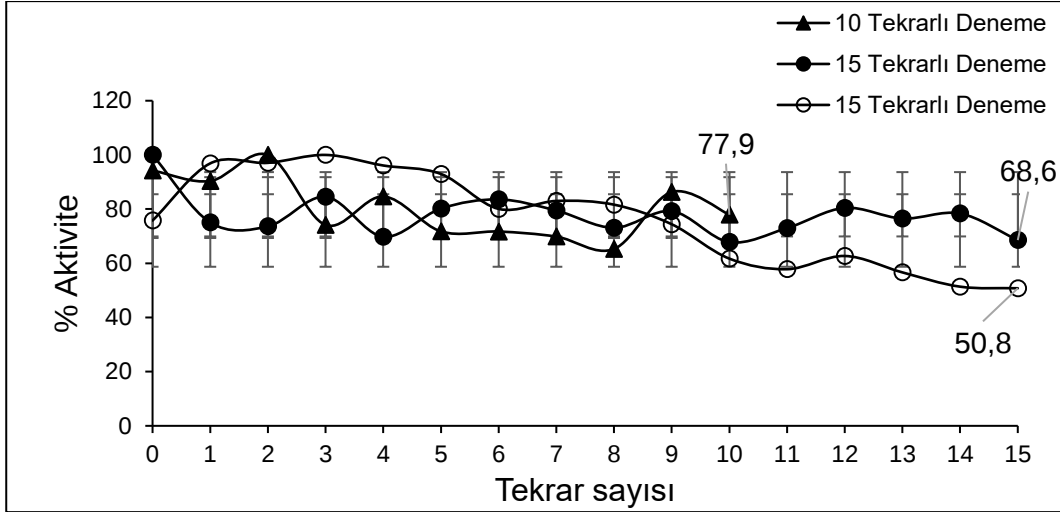
Şekil 4.11 β -Glukozidaz stabilite grafiği



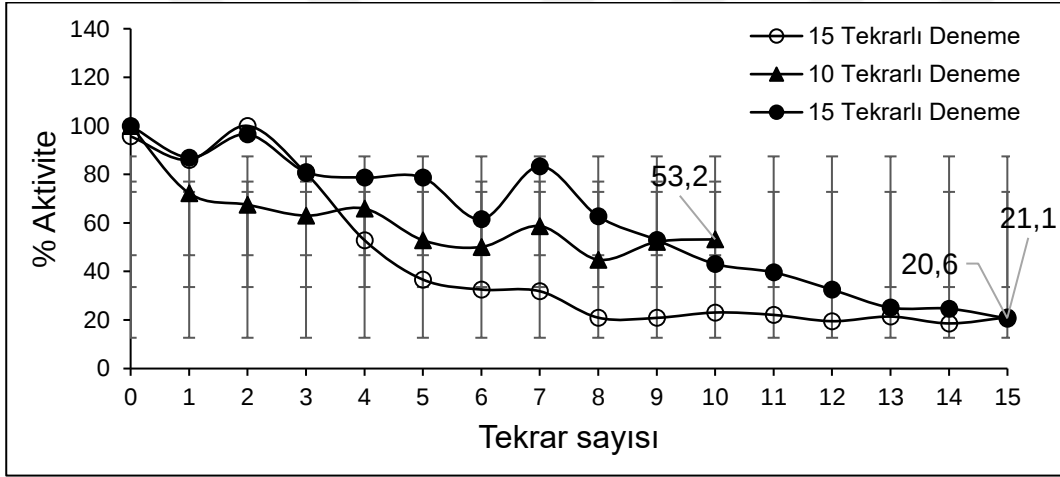
Şekil 4.12 β -Ksilozidaz stabilite grafiği

4.10 İmmobilize Enzimlerin Tekrarlı Kullanım Denemeleri

İmmobilize enzimlerin 3.2.12’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen 10 ve 15 tekrarlı denemelerindeki karşılaştırmalı aktivite değerlerinden oluşturulan grafikler β -Glukozidaz için Şekil 4.13’te, β -Ksilozidaz için Şekil 4.14’teki gibidir. Tekrarlarda hesaplanan son aktivite değerleri grafikler üzerinde etiketli haldedir, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir.



Şekil 4.13 β -Glukozidaz enziminin tekrarlı kullanımlarındaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri



Şekil 4.14 β -Ksilozidaz enziminin tekrarlı kullanımlarındaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri

4.11 Ortamdaki Metanolün İmmobilize Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme

Bölüm 3.2.13'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen denemelerden sonra 3.2.7'de açıklandığı şekilde hesaplanan metanolsüz ortamdaki immobilize β -Glukozidaz'ın aktivitesi 4.9 U, immobilize β -Ksilozidaz'ın aktivitesi 5.8 U, iki enzim birlikte toplam aktiviteleri 10.3 U'dur. Metanollü ortamda immobilize β -Glukozidaz'ın aktivitesi 6.1 U, immobilize β -Ksilozidaz'ın aktivitesi 6.1 U iki enzim birlikte toplam aktiviteleri 9.9 U'dur. Hesaplanan aktivitelerden ortamdaki metanolün β -Glukozidaz'ın aktivitesini %24,5, β -Ksilozidaz'ın aktivitesini %5,2

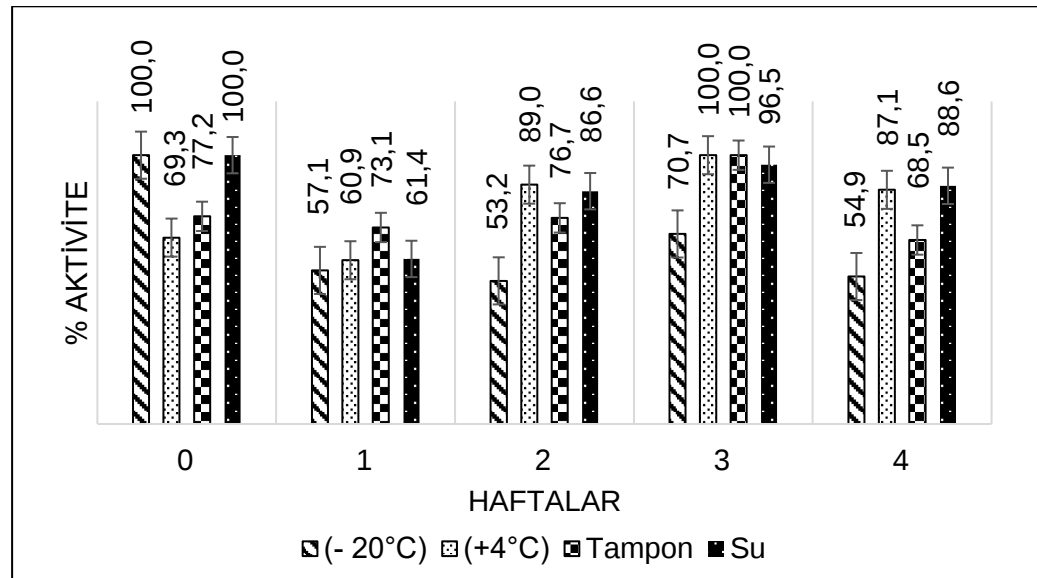
oranında arttırdığı, iki enzimin birlikte olduğu ortama eklenen metanolün aktiviteyi %3.9 oranında azalttığı hesaplandı.

4.12 Farklı Depolama Koşullarının İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitelerine Etkisini İnceleme

İmmobilize enzimlerin -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, tampon çözeltisi ve deiyonize suda depolandığında değişen karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri Şekil 4.15'te verildiği gibidir. Grafikte kullanılan veriler β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz'ın 3 tekrarlı denemelerin ortalamalarından oluşmaktadır. Standart hatalar grafik üzerinde belirtilmiş ve hesaplanan ortalama değerler grafik üzerinde etiketlenmiş haldedir.

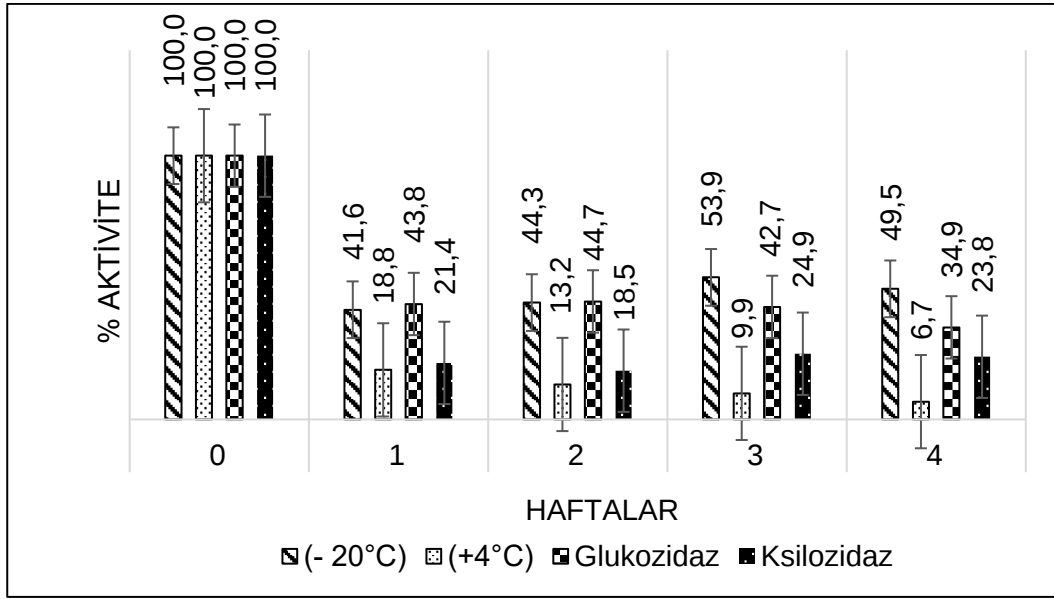
β -Glukozidaz'ın 4 hafta sonundaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri -20°C 'de %76.1, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %96.2, tampon çözeltisinde %84.3 ve deiyonize suda %95.6 iken, β -Ksilozidaz'ın 4 hafta sonundaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri -20°C 'de %36.2, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %72.2, tampon çözeltisinde %40.3 ve deiyonize suda %73.9'dur.

2 ay boyunca depolanan immobilize enzimlerin sahip oldukları aktivite yüzdeleri -20°C 'de %51, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %86.2, tampon çözeltide %86.6 ve deiyonize suda %75.4'tür.



Şekil 4.15 İmmobilize enzimlerin farklı depolama koşullarındaki 4 haftalık karşılaştırmalı aktiviteleri

Serbest enzimlerin pH 6.0 fosfat tamponu içerisinde -20°C ve +4°C’de depolandığındaki karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri Şekil 4.16’da verildiği gibidir. Grafikteki β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz verileri her iki enzimin -20°C ve +4°C’deki karşılaştırmalı aktivite yüzdelерinin ortalamalarından, -20°C ve +4°C verileri ise β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz’ın o sıcaklıktaki karşılaştırmalı aktivite yüzdelерinin ortalamalarından oluşmaktadır. Standart hatalar grafik üzerinde belirtilmiş ve hesaplanan ortalama değerler grafik üzerinde etiketlenmiş haldedir.



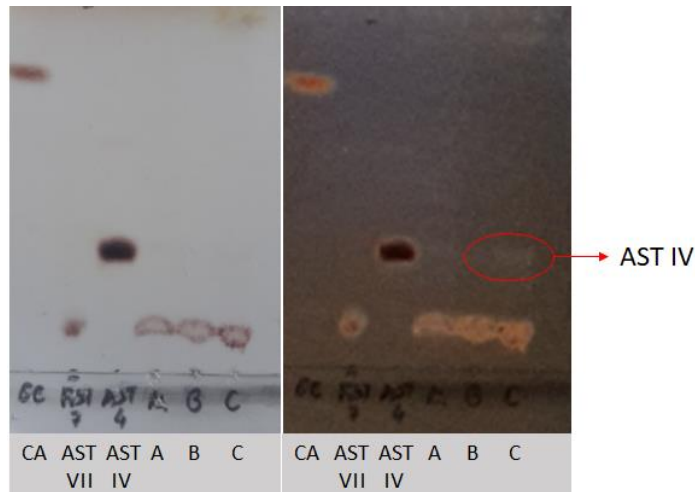
Şekil 4.16 Serbest enzimlerin farklı depolama koşullarındaki 4 haftalık karşılaştırmalı aktiviteleri

4.13 Biyotransformasyon İşlemi Sonrası Bulgular

Bölüm 3.2.15’te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen ilk tarama çalışmalarında 10 U β -G (β -Glukozidaz), 10 U β -K (β -Ksilozidaz) ve 0.1 mg/ml ASTIV, ASTVII substratı içeren (pH 6.0, 50°C, 200 rpm) çalkalamalı su banyosunda 48 saat devam eden reaksiyon sonucunda yapılan İTK çalışmasında herhangi metabolit dönüşümü belirlenemedi. Bunun üzerine substrat miktarları 10 katına çıkarıldı (1 mg/ml) 10 U β -G ve 10 U β -K 50°C’de 200 rpm’de çalkalamalı su banyosunda 7 gün boyunca reaksiyona devam etti ancak yapılan İTK çalışmaları sonucunda yine metabolit oluşumu belirlenemedi.

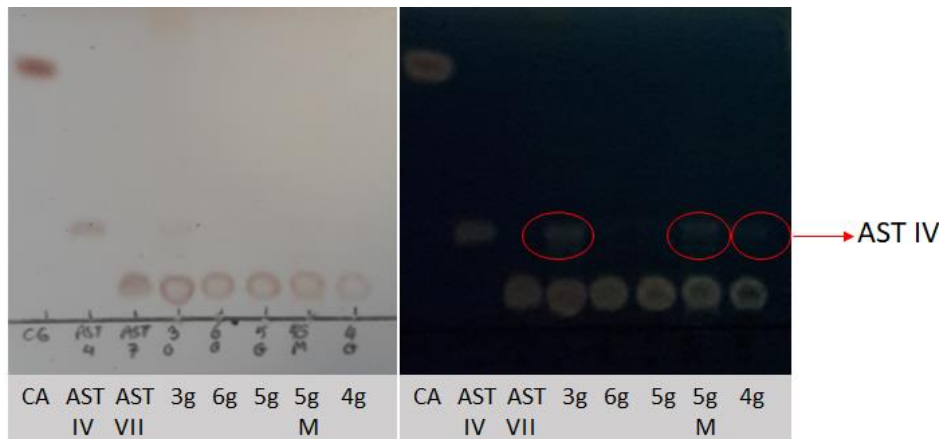
Reaksiyon süresi 7 güne çıkarılarak 50 °C’de 200rpm’de çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilen denemelerde 10 U β -G, 10 U β -K, 0.1 mg/mL ve 0.2 mg/mL konsantrasyonlarında substrat kullanıldı. Denemeler arasına 0.1 mg/ml substrat ve 10 U’luk sadece β -G veya sadece β -K içeren, ilk 4 gün 10 U β -G diğer 3 gün 10 U β -K kullanılan, ilk 4 gün 10 U β -K diğer 3 gün 10 U β -G kullanılan reaksiyonlar eklendi. Yapılan İTK analizleri sonucu sadece ilk 4 gün 10 U β -G diğer 3 gün 10 U β -K kullanılan ortamda ASTVII molekülünün ASTIV molekülüne dönüştüğü belirlendi.

Tarama çalışmaları 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 günlük olarak devam ettirilirken olumlu bulgulara ASTVII substratının kullanıldığı 7, 5 ve 2 günlük denemeler ile ulaşıldı. Yapılan İTK analizleri sonucu ASTVII’nin ASTIV metabolitine dönüştüğü anlaşıldı. Şekil 4.17’de substrat olarak 0.1 mg/mL ASTVII’nin kullanıldığı çalışmaların İTK sonucu yer almaktadır. A; 50 °C’de 200 rpm’de çalkalamalı su banyosunda 7 gün boyunca devam eden ilk 4 gün sadece 10 U β -G kalan 3 gün sadece 10 U β -K kullanılan biyotransformasyon sonucunu göstermektedir. B; her saat 10 °C artan (30°C, 40°C, 50°C, 60°C) 200 rpm’de çalkalamalı su banyosunda 10 U β -G, 10 U β -K içeren 4 saatlik biyotransformasyon sonucudur. C; 50°C’de 200 rpm’de çalkalamalı su banyosunda 2 gün devam eden 10 U β -G, 2 U β -K içeren biyotransformasyon sonucunu göstermektedir. İTK sonuçlarındaki spotlardan dönüşüm miktarının az olduğu çıkarımı yapılsa da ASTVII’nin ASTIV’e dönüştüğü görülmektedir.



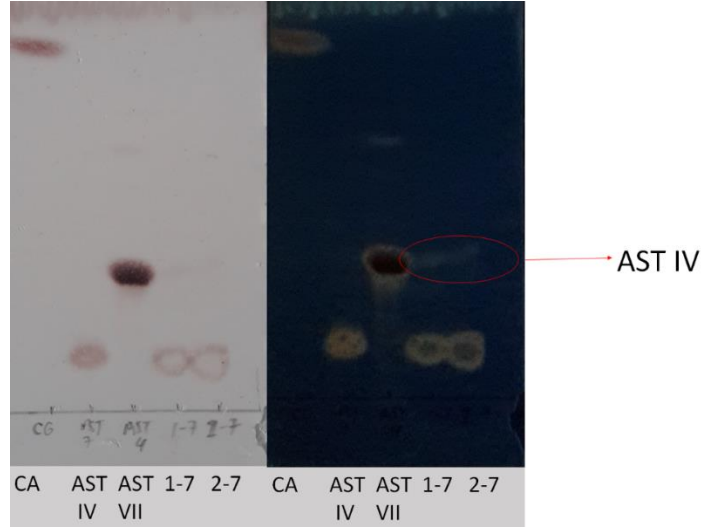
Şekil 4.17 A,B ve C biyotransformasyon denemelerinin İTK sonuçları.

Enzim miktarlarını değiştirildiği çalışmalarda substrat olarak 0.1 mg ASTVII'nin 25 µL metanol ile ortama verildiği 3 gün (20 U β-G, 20 U β-K, 50°C orbital karıştırıcı), 6 gün (10 U β-G, 2 U β-K, 25°C, disk karıştırıcı), 5 gün (10 U β-G, 10 U β-K, 37°C, orbital karıştırıcı), 4 gün (10 U β-G, 2 U β-K, 25°C, disk karıştırıcı) süren biyotransformasyon denemelerinin İTK sonuçları Şekil 4.18'de verildiği gibidir. Substrat olarak 0.1 mg ASTVII'nin 100 µL metanol ile ortama verildiği bir deneme de 5 gün boyunca devam ettirildi. Denemelerde İTK görsellerine bakılarak 3, 4 ve 5 (100 µL metanollü) günlük denemelerde ASTVII'nin ASTIV'e dönüştüğü görüldü.



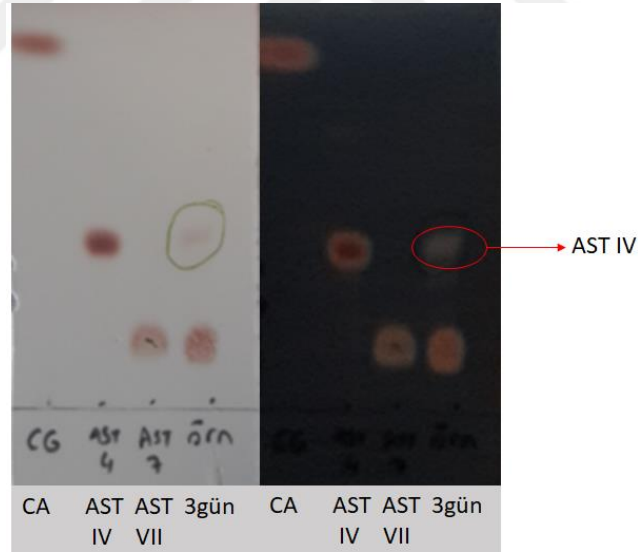
Şekil 4.18 3, 6, 5, 4 günlük ve 100µL metanol eklenmiş 5 günlük biyotransformasyon denemelerinin İTK sonuçları.

Çalışmalardan 1-7 (20U β-G, 50U β-K, 0.1mg/ml ASTVII, 50°C orbital karıştırıcı) ve 2-7 (50U β-G, 100U β-K, 0.1mg/ml ASTVII, 50°C orbital karıştırıcı) olarak kodlanan 3 günlük denemelerin İTK görüntüleri Şekil 4.19'da verildiği gibidir. Her iki denemede de ASTVII'nin ASTIV'e dönüştüğü gözlemlendi.



Şekil 4.19 1-7 ve 2-7 biyotransformasyon denemelerinin İTK sonucu.

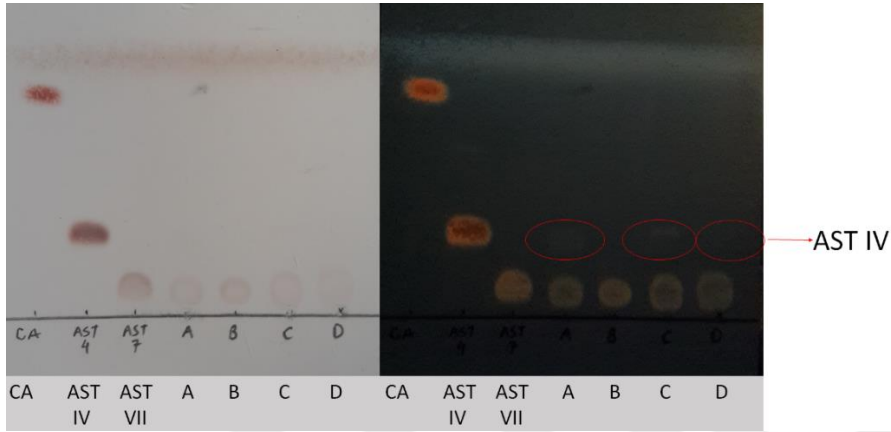
Tarama çalışmaları sonrasında 1 ml ortam hacmi ve 0.1 mg/mL ASTVII ile 50 °C’de orbital karıştırıcıda 200 rpm’de 3 gün devam ettirilen çalışmada en iyi ASTIV dönüşümün elde edildiği İTK görselleri ile görüldü (Şekil 4.20).



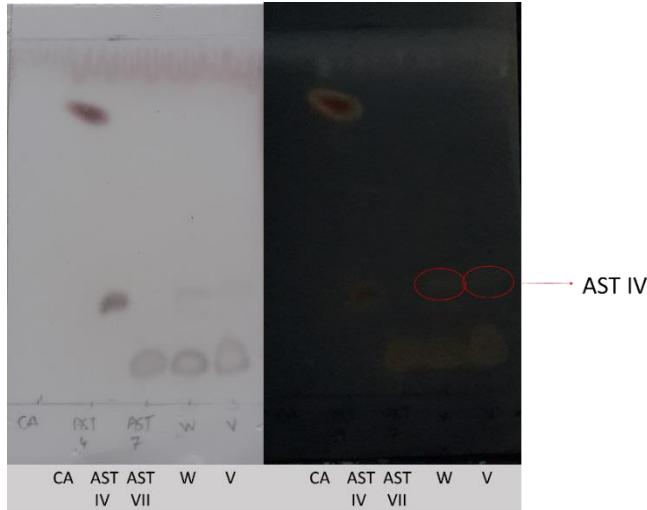
Şekil 4.20 50 °C’de 3 gün süren biyotransformasyon denemesinin İTK sonucu.

Bölüm 4.7’de immobilize enzimlerin yüksek aktiviteler gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyonların İTK sonuçları Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de verildiği gibidir. A sadece 20 U β -G’nin (58°C, 5.0 pH, 0,1 mg/mL ASTVII); B sadece 20 U β -K’nın (45°C, 6.5 pH, 0,1 mg/mL ASTVII); C 20 U β -G, 20 U β -K’nın birlikte (58°C, 5.0 pH, 0,1 mg/mL

ASTVII) ve D 20 U β -G, 20 U β -K'nın birlikte (45°C, 6.5 pH, 0,1 mg/mL ASTVII) kullanıldığı; W sadece 20 U β -G'nin (60°C, 4.5 pH, 0,1 mg/mL ASTVII) kullanıldığı; D 20 U β -G, 20 U β -K'nın birlikte (60°C, 4.5 pH, 0,1 mg/mL ASTVII) kullanıldığı 1 ml hacimle 200rpm'de çalkalamalı su banyosunda 3 gün devam eden reaksiyonların sonucunu göstermektedir. İTK sonuçlarından A, C, W ve V'de belirgin bir dönüşüm görülürken D'de çok az görülmekte ve B'de hiç dönüşüm görülmemektedir.



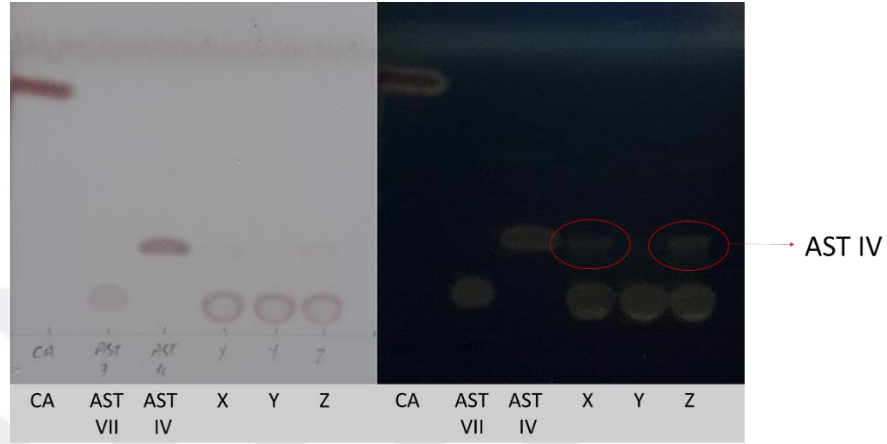
Şekil 4.21 İmmobilize enzimlerin yüksek aktivite verdikleri sıcaklık ve pH'ta gerçekleşen biyotransformasyonların İTK sonuçları



Şekil 4.22 İmmobilize β -G ve β -K'nın yüksek aktivite verdikleri sıcaklık ve pH'ta gerçekleşen biyotransformasyonların İTK sonuçları

Tarama sonuçları sonrası İTK görsellerine bakılarak ASTVII'den ASTIV'e dönüşümün en yüksek olduğu düşünülen koşullarda (0,1 mg/mL ASTVII, 6.0 pH,

50 °C, 200 rpm, 3 gün) sadece 20 U β -G'nin ve 20 U β -K'nın ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığı biyotransformasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.23'te, X sadece β -G, Y sadece β -K, Z β -G ve β -K'nın birlikte kullanıldığı denemeyi göstermektedir. X ve Z'de gözle görülebilir bir ASTIV dönüşümü varken Y'de bu durum gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.23 İmmobilize β -G'nin (6.0 pH, 50 °C) biyotransformasyonlarının İTK sonuçları

4.14 Biyotransformasyon Örneklerinin HPLC Analizi ile Yapı Tayini

Bölüm 3.2.18'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen biyotransformasyon örneklerinin HPLC analizinden elde edilen kromatogramlardaki tepe nokta alanlardan hesaplanan molekül miktarı ASTVII için Tablo 4.6, ASTIV İÇİN Tablo 4.7'de verildiği gibidir.

Örnek 6 için 3 mg ASTVII'den 0.1336 mg ASTIV'e dönüşüm gerçekleştiği hesaplandı (Verim: % 4.45).

Örnek 7 için 3 mg ASTVII'den 0.1295 mg ASTIV'e dönüşüm gerçekleştiği hesaplandı (Verim: % 4.32).

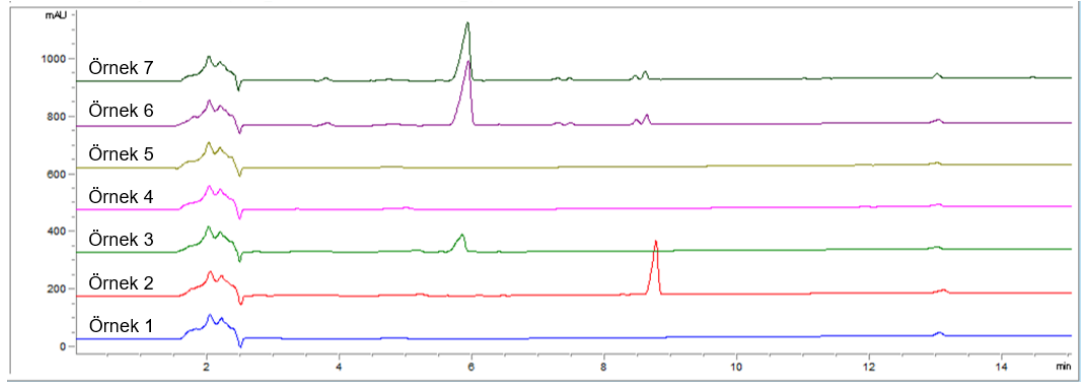
Tablo 4.6 ASTVII için örneklerin HPLC analiz sonuçları

	ASTVII					
	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan Ortalama	ppm	µg
Örnek 1	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 2	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 3	524,861	515,266	531,324	523,817	644,850324	644,9
Örnek 4	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 5	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 6	2115,49	2088,54	2093,62	2099,216667	2587,63319	2587,6
Örnek 7	1765,13	1772,05	1760,66	1765,946667	2176,64463	2612,0

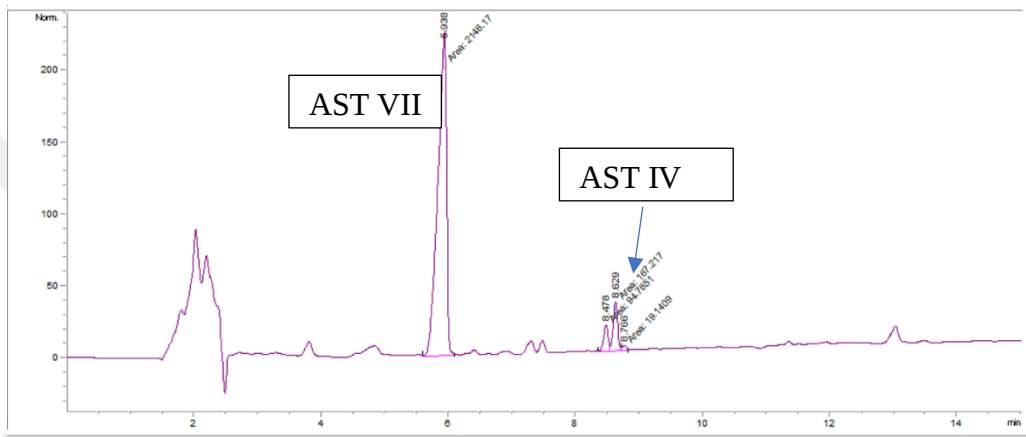
Tablo 4.7 ASTIIV için örneklerin HPLC analiz sonuçları

	ASTIV					
	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan Ortalama	ppm	µg
Örnek 1	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 2	1177,48	1174,3	1170,18	1173,986667	904,211913	904,2
Örnek 3	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 4	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 5	0	0	0	0	0	0,0
Örnek 6	156,152	155,173	154,77	155,365	133,624623	133,6
Örnek 7	121,325	121,274	121,61	121,403	107,93237	129,5

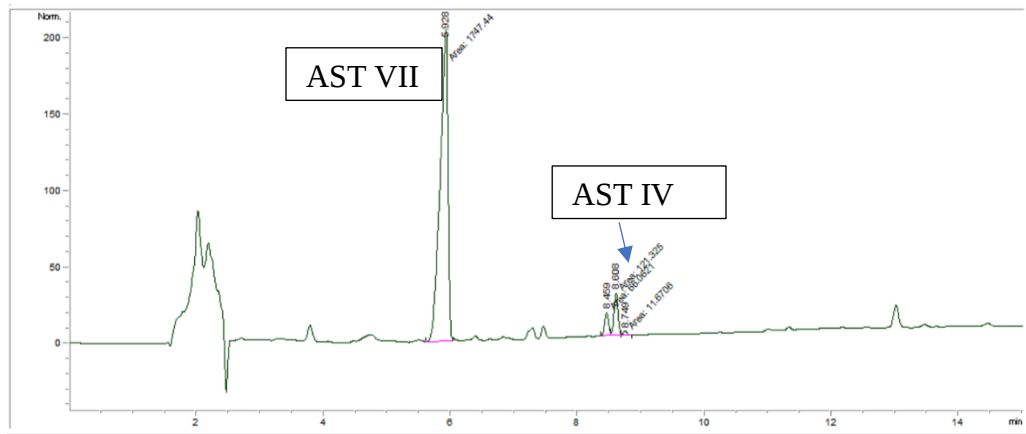
Tüm örneklerin HPLC kromatogramlarının kıyaslaması Şekil 4.24'te verildiği gibidir. Belirlenen ASTVII alıkonma süresi 5.9 dakika ve ASTIV alıkonma süresi 8.6 dakikadır. HPLC analizlerinde görülen alıkonma sürelerindeki farklılık kolonun yeterince şartlanmamasından kaynaklanmaktadır. Örnek 6'ya ait HPLC kromatogramı Şekil 4.25'te, Örnek 7'ye ait HPLC kromatogramı Şekil 4.26'da verildiği gibidir.



Şekil 4.24 Tüm örneklerin HPLC kromatogramlarının kıyaslanması



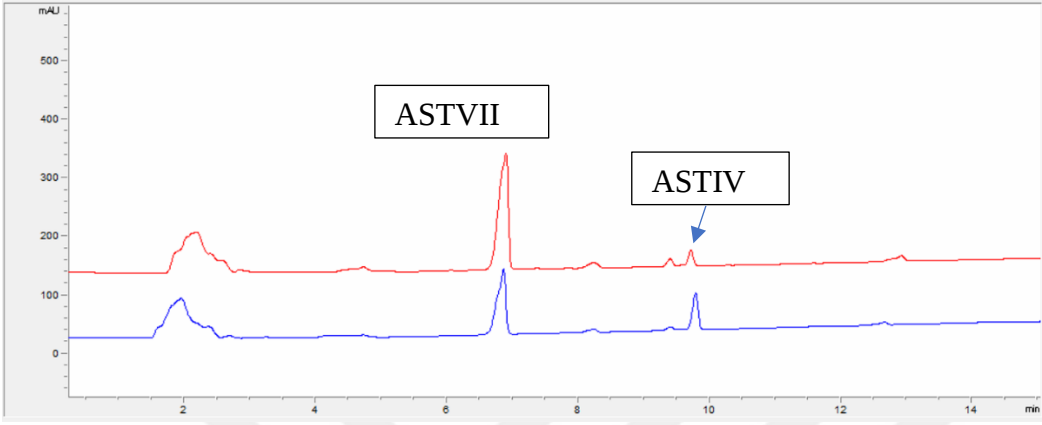
Şekil 4.25 Örnek 6'ya ait HPLC kromatogramı



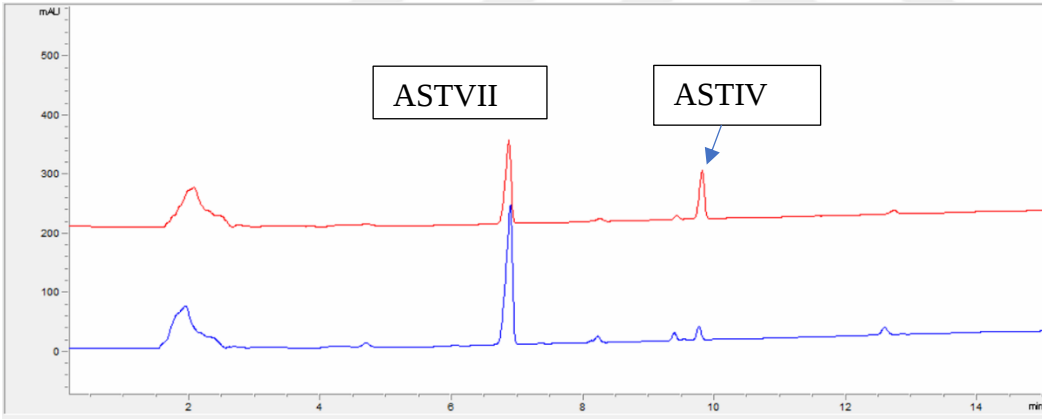
Şekil 4.26 Örnek 7'ye ait HPLC kromatogramı

Enzimatik biyotransformasyon sonucu oluşan molekülün ASTIV olduğunu doğrulamak için 250 µL Örnek 6 ve Örnek 7 üzerine 250 µL 500 ppm ASTIV eklendi. Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de sunulan kromatogramlarla oluşan molekülün

ASTIV olduğu doğrulandı. Şekil 4.27’de Örnek 6’nın analiz sonucu kırmızı hat olarak, ASTIV eklendikten sonraki hali ise mavi hat olarak görölmektedir. Şekil 4.28’de Örnek 7 mavi hat olarak verilirken ASTIV eklendikten sonraki hali kırmızı hat olarak görölmektedir.



Şekil 4.27 Örnek 6 (kırmızı) ve Örnek 6 - ASTIV (mavi) örneklerinin kıyaslanması



Şekil 4.28 Örnek 7 (mavi) ve Örnek 7 - ASTIV (kırmızı) örneklerinin kıyaslanması

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

MNP üzerine immobilize edilmiş β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz kullanılarak ASTIV ve ASTVII moleküllerinden biyotransformasyon ile CA üretilmesi için gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen bulgular literatüre yeni veri olarak sunulmuştur.

MNP üzerine immobilizasyon işleminde birinci aşamayı oluşturan silanlama yani 3-Aptes'le MNP yüzey modifikasyonu için kullanılacak ortam, bu çalışmada deiyonize su olarak belirlenmiştir. Metanolün kullanıldığı silanlama işleminde gram MNP üzerinde oluşan μmol 3-Aptes değeri $8.3 \mu\text{mol/g}$ iken deiyonize suyun kullanıldığı silanlama işleminde bu değer $17.9 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplanmıştır. Deiyonize su kullanımının metanol kullanımına göre 2.1 kat verimli olduğu, aynı zamanda yıkama sırasında daha az MNP kaybına sebep olduğu belirlenmiştir. Literatürde aseton, su, etanol, metanol, toluen gibi farklı sıvı fazların kullanıldığı bilinmektedir (Aptekin, 2009; Cho ve Rhee, 1993; Modenez vd., 2018; Thangaraj vd., 2016; Weetall, 1976).

Weetall (1976) ve Park vd. (2018) çalışmaları referans alınarak gerçekleştirilen silanlama işlemi için gram MNP üzerinde oluşan μmol 3-Aptes değeri $19.6 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplanmıştır. Lau vd. (2020) çalışmalarındaki silanlama işleminde sıcaklığı ilk 3 saat 100°C 'de sonraki 21 saat boyunca 40°C 'de tutmuşlardır. Lau vd. (2020) referans alınarak gerçekleştirilen silanizasyon işleminde gram MNP üzerinde oluşan μmol 3-Aptes değeri $19.6 \mu\text{mol/g}$ 'dan 1.9 katına çıkarak $37.4 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplanmış ve bu çalışmada elde edilen en yüksek değere ulaşılmıştır. 3-Aptes'le silanlama işlemi için Ninhidrin analizini kullanan Aptekin (2009) gerçekleştirdiği doktora tez çalışmasında, cam boncuklara uyguladığı silanlama işlemi sonrası yüzeye tutunan 3-Aptes miktarını 70 nm cam boncuklar için $33.5 \mu\text{mol}$ 3-Aptes/g destek, 100 nm cam boncuklar için $10,8 \mu\text{mol}$ 3-Aptes/g destek olarak hesaplamıştır. Destekler farklı olmasına rağmen bu çalışmada Aptekin'in (2009) gerçekleştirdiği çalışmaya benzer değerler elde edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak literatürde de desteklendiği üzere sıcaklığın ve kullanılan sıvı fazın silanizasyon işlemi için önemli parametreler olduğu anlaşılmıştır (Liu vd., 2013). Çalışmadan elde edilen veriler sonucunda 3-Aptes

konsantrasyonunun ve reaksiyon hacminin silanlama işlemi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Ninhidrin analizi için seçilen karşılaştırma metriği, gram MNP üzerinde oluşan μmol 3-Aptes değeridir. Aynı işlemden geçmiş MNPler için 15.3-18.2 $\mu\text{mol/g}$ aralığında değişen bu değer in standart sapmasının 1.3 olduğu hesaplanmıştır. Bu deneme ile Ninhidrin analizine tabii tutulan MNP miktarının ‘ μmol 3-Aptes/g destek’ metriği ile doğrusal bir ilişkisi olmadığı anlaşılmıştır.

Gluteraldehit ara kolu oluşturmak için kullanılan gluteraldehit konsantrasyonundaki artışın ara kol oluşumunu arttırmadığı anlaşılmıştır. İşlem için %2.5(h/h) gluteraldehit konsantrasyonunun yeterli olduğuna karar verilmiştir.

Enzim immobilizasyon çalışmalarında başlangıç olarak literatürde belirtilen β -Glukozidaz için 37°C ve sodyum asetat tamponu (20 mM, pH 4.0), β -Ksilozidaz için 25°C ve sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7.0) denenmiş ve faktörler sırayla değiştirilerek geri kazanım yüzdeleri arttırılmaya çalışılmıştır (Fanchini Terrasan vd., 2016; Valenzuela vd., 2014; Verma vd., 2013a). Bölüm 4.5’teki veriler değerlendirildiğinde, enzimlerin yarışmalı inhibitörleri glukoz ve ksilozun immobilizasyon ortamına eklenmesinin olumlu bir etki oluşturmadığı anlaşılmıştır. Immobilizasyon çalışmalarına yarışmalı inhibitör eklenmeden devam edilmiştir. β -Glukozidaz’ın pH 7.0 ve 7.4’te gerçekleşen immobilizasyon işleminde aktivite geri kazanım yüzdeleri sırayla %12.6 ve %6.8 olarak hesaplanmış ve pH 7.0’nin 7.4’e göre 2 kat daha verimli olduğu belirlenmiştir. β -Ksilosidaz immobilizasyon denemeleri için belirlenmiş olan başlangıç pH’ı (pH 7.0) değiştirilmemiş, referans kaynaklardaki pH değeri ile çalışmalar devam ettirilmiştir.

Aynı yüzey modifikasyon işlemlerinden geçmiş 25 mg MNP ile 30, 40, 50 μL β -Glukozidaz enzim çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon denemesinde aktivite geri kazanım yüzdelerinin Bölüm 4.5’te sırayla %52.8, %52.7 ve %53.4 olarak hesaplanması ile enzim miktarındaki artışın belirli bir değerdan sonra geri kazanım yüzdesini arttırmadığı ve partikül başına düşen enzim yükünün neredeyse sabit kaldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada enzimlerin immobilizasyonu için en önemli adımın yüzeyin modifiye edilmesi olduğu, yüzeyi

başarısız bir şekilde modifiye edilmiş MNPlar'ın, desteğe immobilize olan enzim miktarını da sınırladığı saptanmıştır.

Enzimlerin sıcaklık ve pH optimumunun belirlenmesinde, elde edilen modellerin anlamlı ve tutarlı olabilmeleri için 0.05'ten küçük olması gereken p değeri (Prob > F) Tablo 4.4'te verildiği gibi immobilize β -Glukozidaz için 0.0001, serbest β -Glukozidaz için 0.0002, serbest β -Ksilozidaz için 0.0044 ile bu şartı sağlamış ancak immobilize β -Ksilozidaz için 0.0511 ile kararsız bir model oluşturmuştur. Sıcaklık ve pH tüm enzimler için anlamlı model terimleri iken immobilize β -Ksilozidaz için yalnızca sıcaklık 0.0345 ile anlamlı bir model terimi olmuştur. pH ise 0.4459 değeri ile oluşturulan immobilize β -Ksilozidaz modeli için anlamlı bir terim olmamıştır. Anlamlı model terimlerindeki değişimler yanıt üzerinde büyük etkiye sahiptir. Buradan pH değerindeki değişimin immobilize β -Ksilozidaz'ın aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Bu istisna hariç sıcaklık ve pH faktörlerinin immobilize ve serbest enzimler üzerinde etkisi olduğu anlaşılmıştır.

İmmobilize enzimlerle gerçekleştirilen sıcaklık ve pH optimizasyon çalışmasında enzimler için seçilen sıcaklık ve pH değerlerinden β -Glukozidaz yüksek sıcaklık, düşük pH (60 °C, 4.5), β -Ksilozidaz düşük sıcaklık, yüksek pH (45 °C, 6.5) değerleri ile en yüksek aktivitelere ulaşmıştır (Bkz. Tablo 4.4). Serbest β -Glukozidaz (60°C, 4.0) ve serbest β -Ksilozidaz (40 °C, 7.0) ile karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrası enzimlerin en iyi çalışma sıcaklık ve pH değerlerinde önemli bir değişim oluşmadığı anlaşılmıştır.

İmmobilizasyon işleminden sonra β -Glukozidaz'ın K_m (1.2 mM $\rightarrow$ 0.3 mM) ve V_{max} (7.4 μ M/dak. $\rightarrow$ 5.0 μ M/dak.) değerlerinde azalma belirlenmiştir. β -Ksilozidaz'ın ise immobilize edildikten sonra K_m (1.2 mM $\rightarrow$ 1.9 mM) değeri artmış V_{max} (11.6 μ M/dak.) değeri aynı kalmıştır (Bkz. Tablo 4.5). K_m değeri, enzimin substrata bağlanma afinitesi hakkında bilgi verir. Yüksek K_m , düşük substrat afinitesine işaret eder (Kotzia vd., 2012). Enzimlerin kinetik değerlerindeki bu değişiklikler, MNP üzerine kovalent bağlanma yoluyla gerçekleşen immobilizasyon işleminin substrat afinitesinde değişime neden olduğunu göstermektedir (Verma vd., 2013b). β -Glukozidaz'ın azalan K_m değeri, immobilizasyondan sonra substrat afinitesinin arttığını, azalan V_{max} değeri

enzimin katalitik aktivitesinin immobilizasyondan sonra azaldığını göstermektedir. β -Ksilozidaz'ın artan K_m değeri substrat afinitesinin immobilizasyondan sonra azaldığını göstermektedir. Bu durumun immobilizasyondan sonra substratın β -Ksilozidaz'ın aktif enzim bölgesine erişiminin azalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Park vd., 2018). Sabit kalan V_{max} değeri ise afinitedeki bu azalmanın enzimin katalitik aktivitesini etkilemediğini göstermektedir.

Reaksiyon ortamında bulunan %2.5 (h/h) oranındaki metanolün immobilize β -Glukozidaz'ın aktivitesini %24.5 oranında, immobilize β -Ksilozidaz'ın aktivitesini %5.2 oranında arttırdığı hesaplanmıştır. Metanollü ortama birlikte koyulan β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz toplamda %3.9 oranında bir aktivite kaybı yaşamıştır. Biyotransformasyon için kullanılacak substratlar ASTIV ve ASTVII metanolde çözüleceği ve reaksiyonda her iki enzim de aynı ortamda kullanılacağı için bu sonuç önemlidir. Bu sonuç iki enzimin de biyotransformasyon için kullanılabileceğini göstermektedir. Li vd. (2019) reaksiyon ortamına eklenen metanolün β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz üzerindeki etkilerini incelemek için yaptıkları denemelerde sonuç olarak ortamda %50 oranı ve altında metanolün aktiviteyi olumsuz etkilemediği hatta bazı rekombinant enzim örneklerinde %25 oranı ve altında bulunan metanolün aktiviteyi artırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular literatürü destekler niteliktedir.

Hesaplanan aktivite kayıplarının, immobilize enzimlerin yıkama ve miknatıs ile geri toplama sırasında kaybedilen agregatlardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Park vd., 2018). İmmobilize enzimler ile yapılan deneylerde agregatlaşmış MNP'lerin, aktif enzimlerin enzim-substrat kompleksi oluşturmalarını engellemiş olabileceği ancak zamanla agregatlarda meydana gelebilecek açılma veya şekil değişimleri ile aktif enzimin tekrardan reaksiyona katılarak sonuçları etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. Buna rağmen gerçekleştirilen tekrarlı ve paralel deneme sonuçlarından elde edilen bulgular benzerlik taşımış ve değerlendirmeler yapılırken verilerin ortalamaları alınmış böylece hata payı düşürülmeye çalışılmıştır. Tekrarlı denemelerde aktivite tüplerindeki herhangi bir reaksiyon kalıntısının bir sonraki reaksiyonda hesaplanacak aktivite miktarını

etkilememesini sağlamak için her tekrardan sonra immobilize enzimlere 10 ml deiyonize su ile 3 kere yıkama yapılmıştır.

Bölüm 4.9'da bulguları verilen immobilize enzimlerin stabilite çalışmalarında β -Glukozidaz'ın (50°C, 6.0 pH) karşılaştırmalı aktivite yüzdesinin başlangıçta %77.4 iken 3 saat bekleme süresi sonunda %100'e çıktığı, β -Ksilozidaz'ın başlangıçta %91.5 iken 3 saat sonunda %81.2'ye düştüğü hesaplanmıştır. Yüksek sıcaklıkta bekleyen enzimlerin denatüre olup aktivitelerini yitirebileceği bilinmektedir. Ancak Bölüm 4.6'da gerçekleştirilen denemelerle β -Glukozidaz'ın yüksek sıcaklıkta daha yüksek aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu durumda 3 saat sonunda sahip olduğu %100 karşılaştırmalı aktivite ile biyotransformasyon çalışmaları için belirlenen 50°C, 6.0 pH reaksiyon koşullarının β -Glukozidaz üzerinde aktivite azaltıcı bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır. β -Ksilozidaz'ın karşılaştırmalı aktivitesinde ise 3 saat sonunda sadece %10'luk bir azalma olduğu hesaplanmıştır.

Bu çalışmada immobilize β -Glukozidaz'ın karşılaştırmalı aktivitesi 10. kullanımında %77.9, 15. kullanımda %68.6 ve %50.8 olarak hesaplanmıştır. β -Ksilozidaz'ın kullanıldığı çalışmada 10. tekrarda %53.2, 15. tekrarda %20.6 ve %22.1 karşılaştırmalı aktivite hesaplanmıştır. Park vd. (2018) immobilize β -Glukozidaz ile yaptığı tekrar çalışmalarında çalışmada enzimlerin 10 tekrarlı denemede aktivitelerinin ~% 38-67'sini korudukları ve aktivitedeki en hızlı düşüşlerin ilk 2-3 döngüde meydana geldiğini, Verma vd. (2013b) çalışmasında immobilize β -Glukozidaz'ın 8 tekrara kadar aktivitesini %80 koruduğunu ve 16. tekrarda halen %50 aktiviteye sahip olduğunu, De Souza vd. (2017) immobilize lipazla yaptıkları çalışmada 9. tekrarda kalan aktivitenin %93.4 olduğunu belirtmiştir. 3-APTES ve gluteraldehitin selüloz immobilizasyonu için kullanıldığı Zhang vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada 7. tekrarda %82 aktivitenin, 15. tekrarda %31 aktivitenin korunduğu belirtilmiştir. Fanchini Terrasan vd. (2016) yaptığı çalışmada immobilize β -Ksilozidaz 5. tekrarda %78.7 aktivite 10. tekrarda %47 aktivite göstermiş, Terrasan vd. (2017) yaptığı çalışmada 10. tekrarda immobilize β -Ksilozidaz aktivitesini %70 oranında hesaplamıştır. Morana vd. (2006) çalışmasında immobilize β -Ksilozidaz'ın 4 tekrarda %84 aktivite gösterdiğini belirtmiştir. Literatür karşılaştırması sonucunda bu çalışmadaki

immobilize β -Glukozidaz'ın tekrarlı kullanımı literatür değerlerini yakalamış, β -Ksilozidaz'ın kullanıldığı immobilizasyon çalışmalarında β -Glukozidaz kadar yüksek tekrarlı kullanım başarısına ulaşamamıştır. β -Ksilozidaz'ın aktivitesindeki düşüş literatür verilerine göre beklenen bir durum olsa da bu çalışmada hesaplanan karşılaştırmalı aktivite değerleri literatür verilerine yakın çıkmıştır.

Bölüm 4.12'de immobilize enzimler için en iyi depolama koşullarının deiyonize suda +4°C'de (karşılaştırmalı aktivite yüzdeleri %88.6 ve %87.1) olduğu belirlenmiştir. Serbest enzimlerin 4 hafta +4 °C'de depolanmaları sonucu karşılaştırmalı aktiviteleri %6.7'ye düşmüş en iyi depolama sıcaklığı -20 °C olarak belirlenmiştir. Serbest β -Glukozidaz'ın 4 hafta depolama süresi sonunda karşılaştırmalı aktivite yüzdesi %34.9, serbest β -Ksilozidaz'ın %23.8, immobilize β -Glukozidaz'ın %96.2, immobilize β -Ksilozidaz'ın %73.9'dur. Immobilize enzimlerin aktivitelerini 4 haftalık depolama süresi sonucunda serbest enzimlere göre 3 kata kadar koruduğu belirlenmiştir.

Biyotransformasyon çalışmalarında 3, 4, 5, 6. günler için gerçekleştirilen İTK sonuçlarında en belirgin spotların 3. günde oluştuğu görülmüştür. Tarama çalışmalarında denenen her sıcaklıkta (25°C, 37°C ve 50°C) ASTVII'nin ASTIV'e dönüşümü gerçekleşmiştir.

Ortamda enzim miktarlarının sabit tutulup (10U β -Glukozidaz ve 10U β -Ksilozidaz) substrat miktarının 10 katına çıkarılarak gerçekleştirilen denemenin İTK çalışmasında her iki koşulda da spot oluşumu görülmemiştir. Bu çalışmada substrat miktarının 0.1 mg/ml'den fazla olmasının bu çalışmada biyotransformasyon için metabolit oluşumunu arttırmadığı belirlenmiştir. Substrat miktarı 0.1 mg/ml iken ortama eklenen enzim miktarının 20U'dan fazla olmasının metabolit oluşumunu arttırmadığı belirlenmiştir.

ASTVII substratının ortama 100 μ L metanolde çözdürülerek verildiği 5 günlük denemenin Şekil 4.18'de verilen İTK sonucunda spot oluşumu gözlemlenirken, 25 μ L metanolde çözdürülerek verildiğinde İTK'da spot tespit edilememiştir. Bu durum, suda düşük çözünürlüklü substratların, ortamdaki metanolün artması ile enzimler için daha ulaşılabilir hale geldiklerini göstermektedir.

Biyotransformasyon için en iyi sonuçlar; 1 mL hacim için 20 U immobilize β -Glukozidaz, 100 μ L metanolde çözdürülerek verilen 0.1 mg/ml ASTVII, 6.0 pH sodyum fosfat tamponu ile 50 °C, 200 rpm, 3 gün boyunca devam eden reaksiyondan elde edilmiştir.

Gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmalarından izole edilen ASTIV metaboliti saf olarak elde edilse de metabolit miktarı NMR analizi için yeterli olmamıştır. Tarama çalışmalarına İTK ve HPLC analizi ile devam edilmiştir. Reaksiyon ortamlarının izolasyonu sonucu gerçekleştirilen HPLC analiz verilerine göre sadece β -Glukozidaz ile gerçekleştirilen biyotransformasyondan %4.45, β -Glukozidaz ve β -Ksilozidaz kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyondan %4.32 oranında verim alınabilmektedir. Her iki durumda da ASTVII'nin R₃ konumundaki şeker grubunun (Bkz. Şekil 2.15) kopup ASTIV'e dönüşmesi, β -Glukozidaz enziminin aktif olduğunu ve ortama eklenen β -Ksilozidaz'ın ASTIV dönüşümünü desteklemediğini göstermektedir. Çalışmada kullanılan immobilize β -Ksilozidaz, pNPX substratına karşı katalitik aktivite gösterse de ASTVII veya ASTIV substratlarına karşı analizlerde saptanabilen bir katalitik aktivite göstermemiştir. Her iki enzim de ASTIV substratına karşı analiz edilebilir bir katalitik aktivite göstermemiştir.

İmmobilize enzimlerle ASTVII ve ASTIV moleküllerinin CA molekülüne dönüşmesinin hedeflendiği bu çalışmada %4.45 verim ile ASTVII'nin ASTIV'e dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verim benzer literatür çalışmalarına göre düşüktür. Ancak immobilize enzimlerin reaksiyon sonrasında mıknatısla toplanması sonucu ortamın sadece substrat, ürün, tampon çözelti ve metanol içermesi izolasyon aşamalarını ve alt akım işlemlerini mikroorganizmalar ve serbest enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyonlara kıyasla kolaylaştırmıştır.

6. ÖNERİLER

Yüzey modifikasyonu, enzim immobilizasyonu ve biyotransformasyon gibi çoklu aşamaları içeren bu çalışmaya devam niteliğinde gerçekleştirilecek çalışmalarda, halihazırda geliştirilmiş yüzey modifikasyon ve enzim immobilizasyon metotları takip edilerek araştırma ağırlığının biyotransformasyon aşamasına verilmesi, biyotransformasyon için daha geniş ölçekli denemeler yapılması önerilebilir.

Elde edilen sonuçlar ışığında ölçek büyütme çalışmalarının başlatılması ile artan örnek hacmine bağlı olarak daha ileri analiz teknikleri ile veri toplanması mümkün olacaktır. Ölçek büyütmede kullanılan sistemde metanolün reaksiyon ortamından uzaklaşmasını önleyici geri soğutucu sistemlerin kullanılması faydalı olacaktır. Yine reaksiyon boyunca metanol konsantrasyonuna bağlı olarak metabolitlerin ortamda çözünmüş olmaları daha kontrollü şartlarda sürdürülebilecektir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde çalışmaların, ASTVII'yi ASTIV'e dönüştürebildiği HPLC analizleri ile ispatlanan β -Glukozidaz enzimi üzerine yoğunlaşması önerilmekte, böylece elde edilen %4.32 ve %4.45 biyotransformasyon veriminin arttırılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acar, M. (2013). *Mandalina (citrus reticulata) meyvesinden saflaştırılan beta-glukosidaz enziminin nanopartiküllere immobilizasyonu ve meyve suyu aroma arttırma etkisi* [Balıkesir Üniversitesi]. http://dspace.balikesir.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12462/2342/Mesut_Acar.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Aehle, W., Gmbh, W. V., & Isbn, W. (2007). Enzymes in Industry Edited by W. Aehle. *Içinde Processing*. <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527617098>
- Ahmed, A., Nasim, F. ul-H., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial β -Glucosidase Sources, Production and Applications.pdf. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 31–46. <https://doi.org/doi: 10.12691/jaem-5-1-4>
- Alto, P. (2007). (12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2007/0154435 A1. 1(19).
- Aptekin, Ö. (2009). *Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu*. Çukurova University.
- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1833–1847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030>
- Ashkan, Z., Hemmati, R., Homaei, A., Dinari, A., Jamlidoost, M., & Tashakor, A. (2021). Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168(xxxx), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.127>
- Ateş, S., & Doğan, N. S. (2010). Properties of immobilized phenylalanine ammonia lyase and investigation of its use for the prediagnosis of phenylketonuria. *Turkish Journal of Biochemistry*, 35(1), 58–62.
- Bachmann, C., & Bickel, M. H. (1985). History of drug metabolism: The first half of the 20th century. *Drug Metabolism Reviews*, 16(3), 185–253. <https://doi.org/10.3109/03602538508991435>
- Bachmann, K. (2009). Drug Metabolism. *Içinde Pharmacology* (1. baskı). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00008-7>
- Bedir, E., Calis, I., & Khan, I. A. (2000). Macrophyllosaponin E: A novel compound from the roots of Astragalus oleifolius. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(7), 1081–1083. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.1081>
- Bedir, E., Kula, C., Öner, Ö., Altaş, M., Taş, Ö., & Öngen, G. (2015). Microbial transformation of Astragalus sapogenins using Cunninghamella blakesleeana NRRL 1369 and Glomerella fusarioides ATCC 9552. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.01.013>
- Betancor, L., & Luckarift, H. R. (2008). Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 26(10), 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.06.009>
- Boccafoschi, F., Fusaro, L., & Cannas, M. (2018). Immobilization of peptides on cardiovascular stent. *Içinde Functionalised Cardiovascular Stents*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100496-8.00016-0>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Calvin, I., Harley, B., Chin, A. C., Ip, N. Y., Hk, K., & Us, P. A. (2007). *United States Patent*. 2(12).
- Cao, L. (2011). Immobilized Enzymes. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2(1969), 461–476. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00168-9>
- Cao, Linqiu. (2005). *Carrier-bound Immobilized Enzymes chapter 5.1*.
- Cappello, J. V. (2014). *Anti-Aging Formulations* (Patent Sayı USOO8906361 B2).
- Carr, B. T. (2010). Statistical design of experiments in the 21st century and implications for consumer product testing. İçinde *Consumer-Driven Innovation in Food and Personal Care Products*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845699970.4.427>
- Chang, Y. K., & Chu, L. (2007). A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. *Biochemical Engineering Journal*, 35(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.019>
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 20–29. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chatterjee, S., Pandit, S., & Fosso-Kankeu, E. (2019). Removal of Heavy Metal Pollutants from Wastewater Using Immobilized Enzyme Techniques: A Review. *Nano and Bio-Based Technologies for Wastewater Treatment*, 459–479. <https://doi.org/10.1002/9781119577119.ch13>
- Chen, C. Y., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Wang, W., Mu, F. S., Luo, M., Li, C. Y., Gu, C. B., & Zhao, C. J. (2013). Biotransformation of saponins to astragaloside IV from *Radix Astragali* by immobilized *Aspergillus niger*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.007>
- Chen, J., He, Y., Li, A., Liu, H., Ren, Pi., & Su, J. (2016). *Producing and refining method for high-purity cycloastragenol* (Patent Sayı CN105734109A).
- Cheng, L., Zhang, H., Cui, H., Wang, W., & Yuan, Q. (2020). Efficient production of the anti-aging drug Cycloastragenol: insight from two Glycosidases by enzyme mining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(23), 9991–10004. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10966-5>
- Cheng, L., Zhang, H., Liang, H., Sun, X., Shen, X., Wang, J., Wang, W., Yuan, Q., Ri, H. Il, Kim, T. M., Kang, M. S., & Linhardt, R. J. (2020). Enzymatic Bioconversion of Cycloastragenol-6-O- β -D-glucoside into Cycloastragenol by a Novel Recombinant β -Glucosidase from *Phycoccus* sp. *Soil748. Process Biochemistry*, 90(15), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.006>
- Chern, J. T., & Chao, Y. P. (2005). Chitin-binding domain based immobilization of d-hydantoinase. *Journal of Biotechnology*, 117(3), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.02.001>
- Chibata, I., & Tosa, T. (1983). Immobilized Cells : Historical Background. İçinde *IMMOBILIZED MICROBIAL CELLS: Applied Biochemistry and Bioengineering* (C. 4). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-041104-7.50007-5>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cho, S. -W, & Rhee, J. S. (1993). Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(2), 204–210. <https://doi.org/10.1002/bit.260410206>
- Costantini, F., Tiggelaar, R., Sennato, S., Mura, F., Schlautmann, S., Bordini, F., Gardeniers, H., & Manetti, C. (2013). Glucose level determination with a multi-enzymatic cascade reaction in a functionalized glass chip. *Analyst*, 138(17), 5019–5024. <https://doi.org/10.1039/c3an00806a>
- Czjzek, M., David, A. Ben, Bravman, T., Shoham, G., Henrissat, B., & Shoham, Y. (2005). Enzyme-substrate complex structures of a GH39 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Molecular Biology*, 353(4), 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.003>
- Dave, V., Khirwadkar, P., & Dashora, K. (2014). A review on biotransformation. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2(2), 1136–1140.
- De Alencar Figueira, J., Dias, F. F. G., Sato, H. H., & Fernandes, P. (2011). Screening of supports for the immobilization of β -glucosidase. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/642460>
- De Souza, M. C. M., Dos Santos, K. P., Freire, R. M., Barreto, A. C. H., Fachine, P. B. A., & Gonçalves, L. R. B. (2017). Production of flavor esters catalyzed by Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(3), 681–690. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150575>
- Deng, J., Zhao, L., Zhang, N. Y., Karrow, N. A., Krumm, C. S., Qi, D. S., & Sun, L. H. (2018). Aflatoxin B 1 metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 778(October), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.002>
- Dow, C. T., & Harley, C. B. (2016). Evaluation of an oral telomerase activator for early age-related macular degeneration - A pilot study. *Clinical Ophthalmology*, 10, 243–249. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S100042>
- Dutta, S., Bhattacharyya, A., De, P., Ray, P., & Basu, S. (2009). Removal of mercury from its aqueous solution using charcoal-immobilized papain (CIP). *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 888–896. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.085>
- Ekiz, G., Duman, S., & Bedir, E. (2018). Biotransformation of cycloanthogenol by the endophytic fungus *Alternaria eureka* 1E1BL1. *Phytochemistry*, 151, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.04.006>
- Ekiz, G., Yllmaz, S., Yusufoglu, H., Klrmlzlbayrak, P. B., & Bedir, E. (2019). Microbial Transformation of Cycloastragenol and Astragenol by Endophytic Fungi Isolated from Astragalus Species. *Journal of Natural Products*, 82(11), 2979–2985. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00336>
- Elçin, Y. M. (1995). Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres. *Biomaterials*, 16(15), 1157–1161. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93580-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93580-7)
- Estabrook, R. W., Hildebrandt, A., Remmer, H., Schenkman, J. B., Rosenthal, O., Cooper, D. Y., Orrenius, S., & Ernster, L. (1968). The Role of Cytochrome P-450 in Microsomal Mixed Function Oxidation Reactions. *Biochimie des Sauerstoffs*, 142–195. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85765-2_6

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Esteghlalian, A. R., Kazaoka, M. M., Walsh, D. F., Mccann, R. T., Solbak, A. I., Kerovuo, J., & Hazlewood, G. P. (2007). Application of a thermostable pectate lyase in the bioscouring of cotton fabrics at laboratory and pilot scales. *ACS Symposium Series*, 972, 122–136. <https://doi.org/10.1021/bk-2007-0972.ch009>
- Fanchini Terrasan, C. R., Trobo-Maseda, L., Moreno-Pérez, S., Carmona, E. C., Pessela, B. C., & Guisan, J. M. (2016). Co-immobilization and stabilization of xylanase, β -xylosidase and α -l-arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii* for arabinoxylan hydrolysis. *Process Biochemistry*, 51(5), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.014>
- FIELD, C. E., PIVARNIK, L. F., BARNETT, S. M., & RAND, A. G. (1986). Utilization of Glucose Oxidase for Extending the Shelf-Life of Fish. *Journal of Food Science*, 51(1), 66–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb10837.x>
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., & Narasu, M. L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, 19(3), 175–199. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00054-4)
- Godsell, J. (1963). Fingerprint Techniques. *Journal of the Forensic Science Society*, 3(2), 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(63\)70113-7](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(63)70113-7)
- Gonzalez-Gil, L., Krah, D., Ghattas, A. K., Carballa, M., Wick, A., Helmholz, L., Lema, J. M., & Ternes, T. A. (2019). Biotransformation of organic micropollutants by anaerobic sludge enzymes. *Water Research*, 152, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.064>
- Grand View Research, U.S California (2020). Industrial Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market> (Son Erişim Tarihi: 03.06.2021)
- Gray, J. (2001). Hair care and hair care products. *Clinics in Dermatology*, 19(2), 227–236. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(00\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(00)00133-4)
- Griffin, E. G., & Nelson, J. M. (1916). Adsorption of invertase. *J. Chem. Soc.*, 178(1911), 1109–1115.
- Gupta, M. N., Kaloti, M., Kapoor, M., & Solanki, K. (2011). Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39(2), 98–109. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>
- Hanachi, P., Jafary, F., Jafary, F., & Motamedi, S. (2015). Immobilization of the alkaline phosphatase on collagen surface via cross-linking method. *Iranian Journal of Biotechnology*, 13(3), 32–38. <https://doi.org/10.15171/ijb.1203>
- Hanrahan, G., Zhu, J., Gibani, S., & Patil, D. G. (2005). Experimental Design. İçinde *CHEMOMETRICS AND STATISTICS* (ss. 8–13). <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00079-0>
- Harley, C. B., Liu, W., Flom, P. L., & Raffaele, J. M. (2013). A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: Metabolic and cardiovascular response. *Rejuvenation Research*, 16(5), 386–395. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1430>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hegazy, M. E. F., Mohamed, T. A., ElShamy, A. I., Mohamed, A. E. H. H., Mahalel, U. A., Reda, E. H., Shaheen, A. M., Tawfik, W. A., Shahat, A. A., Shams, K. A., Abdel-Azim, N. S., & Hammouda, F. M. (2015). Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.009>
- Hos, B. B., & Frost, S. (1994). *Technical Note Catalase Activity in Wastewater*. 28(2), 497–500.
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 118(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Hu, S., Wang, D., & Hong, J. (2018). A Simple Method for Beta-glucosidase Immobilization and Its Application in Soybean Isoflavone Glycosides Hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0434-3>
- Huang, L., & Cheng, Z. M. (2008). Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*, 144(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.05.015>
- Ionescu, C., & Caira, M. R. (2005). Drug Metabolism Current Concepts. İçinde *Journal of Chemical Information and Modeling* (C. 53, Sayı 9). Springer, Dordrecht. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/1-4020-4142-X_2
- Jawaheer, S., White, S. F., Rughooputh, S. D. D. V., & Cullen, D. C. (2002). Enzyme stabilization using pectin as a novel entrapment matrix in biosensors. *Analytical Letters*, 35(13), 2077–2091. <https://doi.org/10.1081/AL-120014997>
- Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5–6), 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., & Burns, D. T. (1990). Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a. İçinde *Analytica Chimica Acta* (C. 237). [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)83962-8](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)83962-8)
- Joseph, C. G. (2004). *Design, synthesis, and characterization of peptides and peptidomimetics for mouse melanocortin receptors*. March, 186. <http://purl.fcla.edu/fcla/etd/UFE0008368>
- Jum', S., & Karaman, R. (2014). *Design & Synthesis of Novel Prodrugs View project Medicinal chemistry View project*. July. <https://doi.org/10.13140/2.1.3247.1361>
- Jun, L. Y., Yon, L. S., Mubarak, N. M., Bing, C. H., Pan, S., Danquah, M. K., Abdullah, E. C., & Khalid, M. (2019). An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102961. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102961>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kebamo, S., & Tesema, S. (2015). The Role of Biotransformation in Drug Discovery and Development. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 06(05). <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000196>
- Klein, M. P., Scheeren, C. W., Lorenzoni, A. S. G., Dupont, J., Frazzon, J., & Hertz, P. F. (2011). Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, 46(6), 1375–1379. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.021>
- Kminek, G., & Bada, J. L. (2006). The effect of ionizing radiation on the preservation of amino acids on Mars. *Earth and Planetary Science Letters*, 245(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2006.03.008>
- Koszelewski, D., Müller, N., Schrittwieser, J. H., Faber, K., & Kroutil, W. (2010). Immobilization of ω -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(1–2), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.12.001>
- Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E. G., Karamitros, C., & Labrou, N. E. (2012). Biocatalysis, Enzyme Engineering and Biotechnology. *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition*, 125–166. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch7>
- Kuban, M. (2010). *Sikloartan Grubu Saponinlerin Mikrobiyal Biyotransformasyonu*. Ege.
- Kuban, M., Öngen, G., Khan, I. A., & Bedir, E. (2013). Microbial transformation of cycloastragenol. *Phytochemistry*, 88, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.12.007>
- Kumari, A., & Kayastha, A. M. (2011). Immobilization of soybean (Glycine max) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(1–2), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.12.003>
- Kyle, P. B. (2017). Toxicology: GCMS. İçinde *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9>
- Lau, E. C. H. T., Carvalho, L. B., Pereira, A. E. S., Montanha, G. S., Corrêa, C. G., Carvalho, H. W. P., Ganin, A. Y., Fraceto, L. F., & Yiu, H. H. P. (2020). Localization of Coated Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles on Tomato Seeds and Their Effects on Growth. *ACS Applied Bio Materials*, 3(7), 4109–4117. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00216>
- Leiyu, C., & Yuan, Qi. (2017). *Method for converting astragalosides to prepare cycloastragenol by two-step enzymolysis* (Patent Sayı CN107058445A).
- Li, Q., Wu, T., Zhao, L., Pei, J., Wang, Z., & Xiao, W. (2019). Highly Efficient Biotransformation of Astragaloside IV to Cycloastragenol by Sugar-Stimulated β -Glucosidase and β -Xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*. İçinde *Journal of Microbiology and Biotechnology* (C. 29, Sayı 12, ss. 1882–1893). <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07020>
- Liao, Y., Cao, S. W., Yuan, Y., Gu, Q., Zhang, Z., & Xue, C. (2014). Efficient CO₂ capture and photoreduction by amine-functionalized TiO₂. *Chemistry - A European Journal*, 20(33), 10220–10222. <https://doi.org/10.1002/chem.201403321>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin, T. (1984). *Synthesis and In Vitro Antiviral Activity of 3'-O-Acyl Derivatives of 5'-Amino-5'-Deoxythymidine: Potential Prodrugs for Topical Application*. 2669(10), 1568–1571.
- Liu, Y., Li, Y., Li, X. M., & He, T. (2013). Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (aPtes) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*, 29(49), 15275–15282. <https://doi.org/10.1021/la403269u>
- Lucci, P., Pacetti, D., Nunez, O., & G., N. (2012). Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, October 2014. <https://doi.org/10.5772/47736>
- Luo, Y., Wen, G., Ma, L., Liang, A., & Jiang, Z. (2017). A Sensitive SERS Quantitative Analysis Method for Amino Acids Using Ruhemann's Purple as Molecular Probe in Triangle Nanosilver Sol Substrate. *Plasmonics*, 12(2), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11468-016-0264-8>
- M.M., M. (2011). The Art of Immobilization Using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology. *Biotechnology of Biopolymers*, May, 2–32. <https://doi.org/10.5772/23696>
- Mamedova, R. P., & Isaev, M. I. (2004). Triterpenoids from Astragalus plants. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(4), 303–357. <https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000048246.16075.62>
- Meyer, U. A. (1996). Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 24(5), 449–459. <https://doi.org/10.1007/BF02353473>
- Miroliaei, M., Nayeri, H., Samsam-Shariat, S. Z., & Atar, A. M. (2007). Biospecific immobilization of lactoperoxidase on Con A-Sepharose 4B. *Scientia Iranica*, 14(4), 303–307.
- Misson, M., Zhang, H., & Jin, B. (2015). Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(102). <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0891>
- Modenez, I. A., Sastre, D. E., Moares, F. C., & Marques Netto, C. G. C. (2018). Influence of dlutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase b from candida antarctica for transesterification of soy bean oil. *Molecules*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092230>
- Morana, A., Mangione, A., Maurelli, L., Fiume, I., Paris, O., Cannio, R., & Rossi, M. (2006). Immobilization and characterization of a thermostable β -xylosidase to generate a reusable biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.010>
- National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 3485, Glutaraldehyde. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutaraldehyde>, (Son Erişim Tarihi: 26.05.2021)
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C. P. B., & Lucci, P. (2012). New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1228, 298–323. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.091>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Onyeogaziri, F. C., & Papaneophytou, C. (2019). A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach. *SLAS Discovery*, 24(5), 587–596. <https://doi.org/10.1177/2472555219830084>
- Otto, L., Lier, D., & Flippo, F. A. (1983). *United States Patent* (19). 19.
- Padmavathy, J., & Saravanan, D. (2017). Natural product as a source of prodrug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 151–161. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.31020>
- Phang-Lyn S, Llerena VA. (2020). Biochemistry, Biotransformation. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544353/>. (Son Erişim Tarihi: 26.05.2021)
- Park, H. J., Driscoll, A. J., & Johnson, P. A. (2018). The development and evaluation of B-glucosidase immobilized magnetic nanoparticles as recoverable biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.017>
- Peng, C., Duan, D., Xu, C., Chen, Y., Sun, L., Zhang, H., Yuan, X., Zheng, L., Yang, Y., Yang, J., Zhen, X., Chen, Y., & Shi, J. (2015). Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environmental Pollution*, 197, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.008>
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Poole, C. F. (2003). Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 963–984. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00435-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00435-7)
- Porto de Souza Vandenberghe, L., Karp, S. G., Binder Pagnoncelli, M. G., von Linsingen Tavares, M., Libardi Junior, N., Valladares Diestra, K., Viesser, J. A., & Soccol, C. R. (2020). Classification of enzymes and catalytic properties. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, August 2018, 11–30. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819820-9.00002-8>
- Poutanen, K., & Puls, J. (1988). Applied Microbiology Biotechnology Characteristics of *Trichoderma reesei* p-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(4–5), 425–426. wos:A1988N476200021
- Ramani, K., Karthikeyan, S., Boopathy, R., Kennedy, L. J., Mandal, A. B., & Sekaran, G. (2012). Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. *Process Biochemistry*, 47(3), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.025>
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., & Savolainen, J. (2008). Prodrugs: Design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M. J., & Barceló, D. (2007). Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 1152(1–2), 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.046>
- Romo-Sánchez, S., Arévalo-Villena, M., García Romero, E., Ramirez, H. L., & Briones Pérez, A. (2014). Immobilization of β -Glucosidase and Its Application for Enhancement of Aroma Precursors in Muscat Wine. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1381–1392. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1161-1>
- Roskoski, R. (2015). Michaelis-Menten Kinetics☆. İçinde *Reference Module in Biomedical Sciences* (Sayı August 2014). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.05143-6>
- Ruhemann, S. (1910). *CCXII-Triketohydrindene Hydrate.*: C. XCVII (ss. 2025–2031).
- Sajewicz, M., Kowalska, T., & Sherma, J. (2017). Sample preparation for thin layer chromatography. *Advances in Chromatography*, 53, 301–329. <https://doi.org/10.1201/9781315370385-8>
- Salvador, L., Singaravelu, G., Harley, C. B., Flom, P., Suram, A., & Raffaele, J. M. (2016). A Natural Product Telomerase Activator Lengthens Telomeres in Humans: A Randomized, Double Blind, and Placebo Controlled Study. *Rejuvenation Research*, 19(6), 478–484. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1793>
- Sankpal, N. V., & Kulkarni, B. D. (2002). Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils. *Process Biochemistry*, 37(12), 1343–1350. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00335-1)
- Sato, R. Y. O. (1964). The Carbon of Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2370–2378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82244-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82244-3)
- Shanu-Wilson, J., Evans, L., Wrigley, S., Steele, J., Atherton, J., & Boer, J. (2020). Biotransformation: Impact and Application of Metabolism in Drug Discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(11), 2087–2107. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.0c00202>
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Sherma, J. (2004). Thin layer chromatography. *Analytical Instrumentation Handbook*, Third Edition, 995–1014. <https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.24.839>
- Silva, C. J. S. M., Sousa, F., Gübitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2004). Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 51–56.
- Silva, N. H. C. S., Vilela, C., Marrucho, I. M., Freire, C. S. R., Pascoal Neto, C., & Silvestre, A. J. D. (2014). Protein-based materials: From sources to innovative sustainable materials for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(24), 3715–3740. <https://doi.org/10.1039/c4tb00168k>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, M., Ishfaq, N., Salman, S., Bashir, M. H., & Ashfaq, B. (2017). *Enzyme Immobilization and Applications of Magnetic Nanoparticles in Smart Enzyme Immobilization*. 3(7), 387–396.
- Soetan, K. O., Aiyelaagbe, O. O., & Olaiya, C. O. (2010). A review of the biochemical, biotechnological and other applications of enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 9(4), 382–393. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i4>
- Soleimani, M., Khani, A., & Najafzadeh, K. (2012). α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.07.011>
- Stone, J. (2017). Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory. İçinde *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (Sayı Dil). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00003-1>
- Talens-Perales, D., Marín-Navarro, J., & Polaina, J. (2015). Enzymes: Functions and Characteristics. *Encyclopedia of Food and Health*, 532–538. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00256-7>
- Terrasán, C. R. F., Romero-Fernández, M., Orrego, A. H., Oliveira, S. M., Pessela, B. C., Carmona, E. C., & Guisan, J. M. (2017). Immobilization and Stabilization of Beta-Xylosidases from *Penicillium janczewskii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 349–366. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2331-1>
- Thangaraj, B., Jia, Z., Dai, L., Liu, D., & Du, W. (2016). Lipase NS81006 immobilized on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for biodiesel production. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 27(1), 13–21. <https://doi.org/10.1515/auoc-2016-0008>
- Torres-Salas, P., Del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2011). Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Advanced Materials*, 23(44), 5275–5282. <https://doi.org/10.1002/adma.201101821>
- Trevan, M. D. (1988). Enzyme immobilization by covalent bonding. *New Protein Techniques*, Humana Press, 495–510.
- Tümtürk, H., Karaca, N., Demirel, G., & Şahin, F. (2007). Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/ κ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3), 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.07.004>
- Uwaha, M. (2015). Growth Kinetics: Basics of Crystal Growth Mechanisms. *Handbook of Crystal Growth: Second Edition*, 1, 359–399. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56369-9.00008-3>
- Uyanık, A. (2008). Beta-Galaktozidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu ve Karakterizasyonu. İçinde *Master Thesis*. Ankara University Graduate School of Naturel and Applied Sciences.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., & Nasiri, S. (2016). Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnology Letters*, 38(2), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z>
- Vakıl Nashıyan, M. (2012). *Çeşitli Dokulardan Aldoz Redüktaz Enziminin İzolasyon ve İmmobilizasyonu*. Ankara University.
- Valenzuela, R., Castro, J. F., Parra, C., Baeza, J., Durán, N., & Freer, J. (2014). β -Glucosidase immobilisation on synthetic superparamagnetic magnetite nanoparticles and their application in saccharification of wheat straw and Eucalyptus globulus pulps. *Journal of Experimental Nanoscience*, 9(2), 177–185. <https://doi.org/10.1080/17458080.2011.651167>
- Verma, M. L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C. J., & Puri, M. (2013a). Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 135, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047>
- Verma, M. L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C. J., & Puri, M. (2013b). Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 135, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047>
- Waksmundzka-hajnos, M., Petruczynik, A., Hajnos, L., Tuzimski, T., Hawryl, A., & Bogucka-kocka, A. (2006). *Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography of*. 44(September), 510–517.
- Wang, L., & Chen, Y. (2017). Efficient Biotransformation of Astragaloside IV to Cycloastragenol by *Bacillus* sp. LG-502. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(4), 1488–1502. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2517-1>
- Weetall, H. H. (1976). Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. *Methods in Enzymology*, 44(Academic Press), 134–148. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(76\)44012-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)44012-0)
- Wermuth, C. G. (2008). Designing Prodrugs and Bioprecursors. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 721–746. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374194-3.00036-6>
- Xu, Z., Liu, Q., & Finch, J. A. (1997). Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: I. Direct silanation. *Applied Surface Science*, 120(3–4), 269–278. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(97\)00234-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(97)00234-1)
- Yang, Z. G., Sun, H. X., & Fang, W. H. (2005). Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 23(44), 5196–5203. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.06.016>
- Ye, L., Liu, X. H., Zhou, W., Feng, M. Q., Shi, X. L., Li, J. Y., Chen, D. F., & Zhou, P. (2011). Microbial transformation of astragalosides to astragaloside IV by *Absidia corymbifera* AS2. *Process Biochemistry*, 46(9), 1724–1730. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.014>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yesilada, E., Bedir, E., Çalış, I., Takaishi, Y., & Ohmoto, Y. (2005). Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on in vitro cytokine release. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1–2), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.036>
- Zhang, D., Hegab, H. E., Lvov, Y., Dale Snow, L., & Palmer, J. (2016). Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1682-y>
- Zhou, J., Zhang, J., David, A. E., & Yang, V. C. (2013). Magnetic tumor targeting of β -glucosidase immobilized iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 24(37). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/37/375102>
- Zhou, Y., Pan, S., Wei, X., Wang, L., & Liu, Y. (2013). Immobilization of β -glucosidase onto magnetic nanoparticles and evaluation of the enzymatic properties. *BioResources*, 8(2), 2605–2619. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.2605-2619>
- Ziarno, M., & Zaręba, D. (2020). The effect of the addition of microbial transglutaminase before the fermentation process on the quality characteristics of three types of yogurt. *Food Science and Biotechnology*, 29(1), 109–119. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00640-6>
- Zlateski, V., Fuhrer, R., Koehler, F. M., Wharry, S., Zeltner, M., Stark, W. J., Moody, T. S., & Grass, R. N. (2014). Efficient magnetic recycling of covalently attached enzymes on carbon-coated metallic nanomagnets. *Bioconjugate Chemistry*, 25(4), 677–684. <https://doi.org/10.1021/bc400476y>

ÖZGEÇMİŞ

BÜRDE ŞİMŞEK

EĞİTİM

- **(2018-) Yüksek Lisans**

EGE Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik, İzmir (TÜRKİYE)

- **(2020, Bahar Dönemi) ERASMUS Değişim Öğrencisi**

Organik Kimya Laboratuvarında Tez Çalışması

Åbo Akademi Üniversitesi, Turku (FİNLANDİYA)

- **(2012-2016) Lisans**

Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, (Mezuniyet Derecesi: 3.13/4), İstanbul (TÜRKİYE)

DENEYİMLER

- **TÜBİTAK Bursiyer |1002 Projesi (2020-2021)**

“İlaç Öncül Moleküllerin Biyotransformasyonunda Manyetik Nanopartiküle İmmobilize Beta Glukosidaz ve Beta Ksilosidaz Enzimlerinin Kullanımı”

- **Lisans Tezi | Marmara Üniversitesi (2016)**

“Modelleme Yaklaşımları Kullanılarak Genel Bir Biyokimyasal Sürecin Tekno-ekonomik Değerlendirmesi”

- **Staj | Vivosens Biyoteknoloji İstanbul (Türkiye) (2015)**

- **Staj | Ekobio Laboratuvar ve Gıda San. Tic. Ltd. Şti. İzmir (Türkiye) (2015)**

SERTİFİKALAR

- GMP: Certificate of Achievement in Good Manufacturing Practice
- GLP: Certificate of Success in Good Laboratory Practices
- ISO 9001: 2018 Quality Management Systems
- ISO / IEC 17025 Calibration Laboratory Capability

BİLGİSAYAR PROGRAMLARI

- Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint
- MATLAB
- SuperPro
- Design-Expert
- IconNMR
- ChemDraw
- Spectragryph
- Photoshop
- Sony Vegas Pro

DİLLER

- İngilizce - İyi Seviye
- Almanca – Başlangıç Seviyesi
- Korece – Başlangıç Seviyesi