**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, *APIS MELLIFERA* L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI İLE BAL OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

İSMAİL EMİR AKYILDIZ

**DOKTORA TEZİ**
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

**DANIŞMAN**
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2023

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, *APIS MELLIFERA* L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI İLE BAL OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

İSMAİL EMİR AKYILDIZ
(720417002)

**DOKTORA TEZİ**
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

**DANIŞMAN**
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2023

# TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her türlü hoşgörüsü ve yardımseverliğiyle her zaman yanımda olan, tez çalışması dışında da desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam, Prof. Dr. Ece Kök YETİMOĞLU'na,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sabrını, hoşgörüsünü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, benim için her zaman yol gösterici olan, değerli hocam, Doç. Dr. Soner ÇUBUK'a,

Doktora tezi izleme sürecinde öneri ve fikirleri ile tezime katkılarını sunan değerli tez jüri hocam, Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA'ya,

Çalışmamın analiz aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tüm Altıparmak Gıda A.Ş. Ar-Ge Merkezi çalışanlarına,

Her zaman gösterdikleri sabır ve destekleri için eşim Özge Akyıldız'a ve aileme,

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız…

**KASIM, 2023** **İsmail Emir AKYILDIZ**

# İÇİNDEKİLER

**TEŞEKKÜR** ..... **i**
**İÇİNDEKİLER** ..... **ii**
**ÖZET** ..... **viii**
**ABSTRACT** ..... **ix**
**YENİLİK BEYANI** ..... **x**
**SEMBOLLER** ..... **xi**
**KISALTMALAR** ..... **xiii**
**ŞEKİL LİSTESİ** ..... **xviii**
**SAYFA** ..... **xviii**
**TABLO LİSTESİ** ..... **xxii**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
1.1. Amaç ..... 6
1.2. Özgün Değer ..... 9
1.3. Literatür ..... 12
1.3.1. Balın bileşimi ve genel özellikleri ..... 39
1.3.2. Çam balı ..... 40
1.3.3. Nektar ..... 43
1.3.4. Bal arısı ..... 43
1.3.5. Arılarda besin sindiriminin fizyolojisi ..... 44
1.3.6. Bal ve bal arılarında α-glukosidaz (invertaz) ..... 45
1.3.6.1. Bal ve bal arılarından α-glukosidazların saflaştırılması ..... 46
1.3.6.2. İnvertazın glikoprotein olarak karakterizasyonu ve sıcaklık ile pH optimumu ..... 48
1.3.6.3. İnvertaz katalitik mekanizması ..... 49
1.3.6.4. İnvertaz aktivite testleri literatür bilgisi ..... 50
1.3.7. Bal ve bal arılarında α-amilaz (diastaz) ..... 51
1.3.7.1. Diastazın saflaştırılması ..... 53
1.3.7.2. Bal arısı diastaz karakterizasyonu - sıcaklık ve pH optimumu ..... 54
1.3.7.3. Diastaz katalitik mekanizması ..... 55
1.3.7.4. Diastaz aktivite testleri literatür bilgisi ..... 57

1.3.8. Enzim kinetiği teorisi ..... 59
1.3.9. Bal proteinlerinin izolasyonu ..... 60
1.3.10. Bal proteinlerinin karakterizasyonu ..... 61
1.3.11. Balda enzim ve şeker şurubu tağşişi ..... 63
1.3.12. Enzimlerin saflaştırılması ve aktivite tayini için kullanılan enstrümental cihaz ve teknikler ..... 65
1.3.12.1. Kromatografik ayrım ..... 65
1.3.12.2. Sıvı kromatografisi ..... 65
1.3.12.3. Ters faz kromatografisi ..... 66
1.3.12.4. Sıvı kromatografisi cihazları ..... 66
1.3.12.4.1. HPLC enstrümanları ..... 66
1.3.12.4.2. HPLC ve MPLC dedektörleri ..... 67
1.3.12.4.3. MPLC cihazı ..... 67
1.3.13. Yöntem validasyon kriterleri ..... 68
**2. MATERYAL VE YÖNTEM ..... 71**
2.1. Özet ..... 71
2.2. Materyaller ..... 75
2.2.1. Kullanılan kimyasallar ..... 75
2.2.2. Kullanılan ekipmanlar ..... 77
2.2.2.1. Laboratuvar araçları ve cam materyaller ..... 77
2.2.3. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) örnekleri ..... 79
2.2.4. Bal numuneleri ..... 79
2.2.5. Cihazlar ..... 80
2.2.6. HPLC kolonları ..... 82
2.2.7. Orta basınçlı sıvı kromatografisi sistemi (MPLC) ve ekipmanları ..... 83
2.2.7.1. MPLC protein (enzim) saflaştırma kolonları ..... 84
2.2.8. SDS-PAGE analizi reaktif ve ekipmanları ..... 86
2.2.9. HPG diseksiyonu ve ekipmanları ..... 87
2.2.9.1. Doku homojenizasyon ve enzim ekstraksiyon çalışmasına ait reaktif ve ekipmanlar ..... 90
2.2.10. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları ..... 92
2.2.10.1. Insect saline tamponu (Tris.HCl tamponu) ..... 92

2.2.10.2. MPLC enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılan tamponlar ..... 92
2.2.10.2.1. Seramik hidroksiapatit (CHT) kromatografisi ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları ..... 92
2.2.10.2.2. Anyon (AEX) ve katyon değişim kromatografisi (CEX) ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları ..... 94
2.2.10.2.3. Boyut eleme kromatografisi (SEC) ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları ..... 95
2.2.10.2.4. Lektin afinite kromatografisi ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan reaktifler ve hazırlanışları ..... 95
2.2.10.2.5. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan reaktifler ve hazırlanışları ..... 96
2.2.10.3. HPLC-PDA sistemi ile enzim aktivite ve tağşiş tespit yönteminde kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları ..... 97
2.2.10.4. SDS-PAGE running tampon çözeltisi ..... 97
2.2.10.5. Sodyum maleat tamponu hazırlanışı (100 mM, pH 5.6 + 5 mM $CaCl_2$) ..... 97
2.2.10.6. Trizma bazı çözeltisi hazırlanışı ..... 97
2.3. Yöntemler ..... 98
2.3.1. Şeker profili analizi ..... 98
2.3.2. Enzimatik aktivite testleri ..... 100
2.3.2.1. İnvertaz aktivite analizi ..... 100
2.3.2.2. Diastaz aktivite analizi ..... 103
2.3.3. Toplam protein konsantrasyon analizi ..... 105
2.3.4. Bal proteinlerinin izolasyonu ..... 107
2.3.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi (kimyasal yöntem) ..... 107
2.3.4.2. Ultrafiltrasyon yöntemleri (fiziksel yöntem) ..... 108
2.3.4.3. Diyaliz yöntemi ..... 112
2.3.5. MPLC ile invertaz ve diastaz saflaştırma yöntemleri ..... 114

2.3.5.1. İyon değişim kromatografisi (anyon (AEX) ve katyon değişim (CEX) kromatografisi) ..... 114
2.3.5.1.1. Katyon değişim kromatografisi (CEX) yöntemleri ..... 114
2.3.5.1.2. Anyon değişim kromatografisi yöntemleri ..... 115
2.3.5.2. Jel filtrasyon kromatografisi (SEC) yöntemi ..... 117
2.3.5.3. Seramik hidroksiapatit (CHT) kromatografisi yöntemi ..... 118
2.3.5.4. Afinite kromatografisi yöntemi - glikoprotein afinite kromatografisi (lektin afinite) ..... 119
2.3.5.5. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) ..... 122
2.3.6. Sodyum dodesil sulfat poli-akrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi ..... 124
2.3.7. Balların palinolojik testi ..... 125
2.3.8. Metot geliştirme & deneysel tasarım ve optimizasyon ..... 126
2.3.8.1. Ön hazırlık yöntemi (enzim ekstraksiyonu - konsantre etme ve temizleme adımları) deneysel tasarım ..... 126
2.3.8.2. Ön hazırlık konfirmasyon tasarımı ..... 128
2.3.8.3. Enzim saflaştırma yöntemi deneysel tasarımı ..... 129
2.3.9. HPLC-PDA metot optimizasyonu ..... 131
2.3.9.1. Dilute & Shoot (seyrelt-enjekte et) yöntemi ..... 132
2.3.9.2. HPLC ile enzim aktivite ve enzim tağşiş belirleme yöntemi (HPLC-PDA) ..... 132
2.3.9.3. Kalibrasyon ve numune çözeltilerinin hazırlanması ..... 133
**3. BULGULAR VE TARTIŞMA ..... 135**
3.1. Çalışma İçin Uygun Çam Balı Örneğinin Seçimi ..... 135
3.2. Düşük Protein Bağlıyıcı Filtre Seçimi ..... 135
3.3. Stirred Cell Optimizasyonları ..... 136
3.4. Ön Hazırlık Yöntemi (Enzim Ekstraksiyonu - Konsantre etme ve Temizleme Adımları) Deneysel Tasarım Sonuçları ..... 137
3.5. Ön Hazırlık Konfirmasyon Çalışması ..... 145
3.6. Enzim Saflaştırma Yöntemlerinin Geliştirilmesi ..... 148
3.6.1. Anyon değişim kromatografi uygulaması ..... 148
3.6.2. Katyon değişim kromatografi uygulaması ..... 153

3.6.3. Glikoprotein afinite kromatografi (lektin afinite) uygulaması ..... 155
3.6.3.1. Lektin afinite SPE ve QuEChERS format testleri ..... 155
3.6.3.2. Lektin afinite kolon formatı testleri ..... 158
3.6.4. Seramik hidroksiapatit (CHT) kromatografi uygulaması ..... 162
3.6.5. Hidrofobik etkileşim kromatografi (HIC) uygulaması ..... 165
3.6.6. Jel filtrasyon kromatografi (SEC) uygulaması ..... 168
3.7. Enzim Saflaştırma Final Prosesi ..... 170
3.8. Saflaştırma Performans Çalışması ..... 180
3.8.1. Diastaz saflaştırma performans verileri ..... 181
3.8.2. İnvertaz saflaştırma performans verileri ..... 183
3.9. HPG Ekstraksiyon ve Elektroforez Analizleri ..... 186
3.9.1. Doku (HPG) örneklerinin ön hazırlık optimizasyonları ..... 186
3.9.2. HPG ve bal enzimlerinin elektroforez profillerinin karşılaştırılması orijin/doğallık tespiti ..... 189
3.10. HPLC-PDA Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Çalışmaları ..... 190
3.10.1. Yöntem optimizasyonu sonuçları ..... 193
3.10.1.1. Ön hazırlık yönteminin geliştirilmesi ..... 193
3.10.1.2. Enjeksiyon hacminin etkileri ..... 194
3.10.1.3. PDA dalgaboyu optimizasyonu sonuçları ..... 194
3.10.1.4. Mobil faz modifiye edicilerin etkileri ..... 195
3.10.1.5. Gradient profillerinin etkileri ..... 196
3.10.1.6. Mobil faz akışının etkileri ..... 196
3.10.1.7. Analitik kolon seçimi - kromatografi kolonu etkileri ..... 196
3.10.1.8. Farklı kolon fırını sıcaklıklarının etkisi ..... 198
3.11. HPC-PDA Yöntem Optimizasyon Sonuçları ..... 198
3.12. HPLC Yöntemi Validasyon Sonuçları ..... 200
3.12.1. Seçicilik ..... 200
3.12.2. Sağlamlık (ruggedness) & dayanıklılık (robustness) ..... 202
3.12.3. Aralık ve doğrusallık ..... 203
3.12.4. Doğruluk (geri kazanım) ..... 204
3.12.5. Kesinlik ..... 205

3.12.5.1. Tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) ve tekrarüretilebilirlik (günler arası kesinlik) ..... 205
3.12.6. Hassasiyet sonuçları (duyarlılık - LOD & LOQ) ..... 206
3.13. HPLC-PDA Yöntemi ile Diastaz Aktivite Tayini ..... 208
3.14. HPLC Yöntemi ile İnvertaz Aktivite Tayini ..... 210
3.15. HPLC-PDA Yöntemi ile diastaz ve invertaz analizlerine ilişkin istatistiksel yaklaşımlar ..... 212
3.15.1. T testi (çift örnek T test) - F testi, doğrusal regresyon ve çift yönlü Pearson korelasyon analizleri ..... 212
3.16. HPLC-PDA Yöntemi ile Yabancı Diastaz Tağşiş Tespiti ..... 215
3.17. Piyasa Örneklerinin Analizi ve Yabancı Diastaz Tespiti ..... 216
**4. SONUÇLAR ..... 227**
4.1. Genel Sonuç ..... 227
4.2. Öneriler ..... 228
**KAYNAKLAR ..... 230**
**ÖZGEÇMİŞ ..... 259**

# ÖZET


## α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, *APİS MELLİFERA* L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI İLE BAL OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

İnvertaz ve diastaz enzim aktiviteleri balın kalite göstergelerindendir. Bu enzimlerin aktivite tayininde yanlış pozitiflikler raporlayabilen, özel substratların enzimatik hidrolizine dayanan kolorimetrik teknikler kullanılmaktadır. Çalışmamızda, öncelikle bal ve hipofaringeal bezlerden (HPG) invertaz ve diastaz enzimlerinin izolasyonu ve saflaştırılması için yeni bir metodoloji geliştirilmesi hedeflenmiştir. Devamında, saf enzimlerin, HPLC ile balda diastaz/invertaz aktivite ve yabancı enzim tayininde otantik referanslar olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, HPG ve bal proteomu sıralı ultrafiltrasyon yaklaşımı ile izole edilmiştir. Sonrasında, hedef enzimler 3 adımlı saflaştırma protokolü ile MPLC'de saflaştırılmıştır. Devamında, saf enzimler yardımıyla HPLC sisteminde aktivite ve yabancı enzim tayin yöntemi geliştirilmiştir. Diastaz ve invertaz yeni izolasyon prosedürüyle sırasıyla 24,3 ve 9 kat zenginleştirilmiştir. Saflaştırma prosesinde, invertaz ham ekstrakta oranla 19,9 kat, diastaz ise 39,2 kat daha saf elde edilmiştir. Geliştirilen HPLC yönteminin validasyonunda, doğrusal (diastaz $R^2$=0,994 ve invertaz $R^2$=0,992), tekrarlanabilir ve tekrarüretilebilir (%RSD<2) aktivite sonuçları raporlanmıştır. LOD/LOQ seviyeleri diastaz için 6,1-6,8 Schade U/g ve invertaz için 28,1-31,6 U/kg'dır. Kolorimetrik ve HPLC yöntemlerinin 15 örneği ait karşılaştırma analizinde, regresyon testi ($R^2$>0,99), F testi (F=1,04/1,02) ve t testi (t=1,04/1,02) kabul edilebilir istatistiksel sonuçlar üretmiştir. Yeni yöntemle 107 örnekteki %41 oranında yabancı diastaz pozitifliği tespit edilebilmiştir. Yeni yöntem, aktivite tabanlı yöntemlere göre hızlı, tutarlı ve maliyetsiz olup, yabancı orijinli diastaz varlığını da ballarda eş zamanlı görüntüleyebilmektedir.

# ABSTRACT

## DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD TO DETERMINE HONEY ELABORATIVE ENZYME ACTIVITIES VIA ISOLATION AND PURIFICATION OF α-GLUCOSIDASE AND α-AMYLASE FROM *APIS MELLIFERA* L. AND PINE HONEY

Invertase and diastase enzyme activities are among the quality indicators of honey. Colorimetric assays based on enzymatic hydrolysis of specific substrates are used to determine the activities of these enzymes and they may produce false positive results. Our study primarily aimed to develop a methodology for the isolation and purification of invertase and diastase in honey and hypopharyngeal glands (HPG). Subsequently, it was aimed to use these pure enzymes as authentic references in determination of diastase/invertase activities and foreign enzymes in honey using HPLC. For this, HPG and honey proteome were isolated utilizing sequential ultrafiltration. Then, the target enzymes were purified on MPLC using 3-steps novel purification protocol. HPLC-based activity and foreign enzyme determination method was developed by employing pure enzymes. Diastase and invertase were enriched 24.3 and 9 fold, respectively, utilizing the isolation procedure. As a result of the purification, invertase, and diastase were 19.9 and 39.2 fold purer in comparison to crude extract. According to validation, linear (diastase $R^2$=0.994 and invertase $R^2$=0.992), repeatable and reproducible (%RSD<2) activity results were obtained. LOD/LOQ levels were 6.1-6.8 Schade U/g for diastase and 28.1-31.6 U/kg for invertase. In comparison analyses between colorimetric and HPLC methods encompassing 15 samples, regression test ($R^2$>0.99), F-test (F=1.04/1.02) and t-test (t=1,04/1.02) results were statistically acceptable. The 41% foreign diastase positivity percentage in 107 samples could be successfully reported with the new method. The novel method is fast, cost-effective, and accurate compared to activity-based assays, and foreign diastase adulteration can also be monitored simultaneously in honey.

# YENİLİK BEYANI

## α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, *APİS MELLİFERA* L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI İLE BAL OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında çam balı ve bal arısı hipofaringeal bezlerinden (HPG) diastaz ve invertaz enzimleri, yeni geliştirilmiş ön hazırlık prosedür ile izole edilmiş ve geliştirilen protein saflaştırma metodolojisi ile saflaştırılmıştır. Devamında otantisiteleri doğrulanmış enzimler analitik referans olarak değerlendirilerek HPLC-PDA sisteminde pratik, maliyetsiz ve eş zamanlı diastaz ve invertaz aktivite tayini yapabilen yeni bir yöntem geliştirilmiş. Yeni yöntem ek olarak, bala eklenebilen yabancı orijinli enzimleri de görüntüleyerek, olası tağşişleri de raporlayabilmektedir.

Bu tez çalışmasının sunduğu en önemli yenilikler; çam balından ilk kez diastaz ve invertaz enzimlerinin yeni geliştirilmiş izolasyon ve saflaştırma prosedürü kullanılarak eldesi ve HPG enzimleri ile otantisitesinin karşılaştırması, devamında saf enzimlerin kullanımı ile aktivite tayinlerinin HPLC-PDA sisteminde direkt olarak yapılabilmesi ve final yöntemin olası enzim tağşişlerini raporlayabilmesi şeklinde sıralanabilmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler SCI kapsamındaki iki farklı dergide iki ayrı yayın olarak yayınlanmıştır;

1. 'Straightforward Monitoring of Honey with Foreign Diastase by Leveraging the Differentiation in LC-UV Proteome Profiles of Authentic and Fraudulent Samples', Microchemical Journal, 193, (2023), 109039.

2. 'Development of a novel pretreatment protocol for the efficient isolation and enrichment of honey proteome using pine honey and the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* L.', Food Measurement and Characterization, 16, 2616–2629 (2022).

# SEMBOLLER

| Semboller | | Açıklamalar |
|---|---|---|
| **Å** | **:** | Ångström |
| **ΔA** | **:** | Absorbans Ölçüm Farkı |
| **CCα** | **:** | Karar Limiti |
| **CCβ** | **:** | Dedeksiyon Limiti |
| **°C** | **:** | Celsius Ölçeği |
| **µg** | **:** | Mikrogram |
| **µs** | **:** | Mikrosiemens |
| **µL** | **:** | Mikrolitre |
| **µm** | **:** | Mikrometre |
| **mg** | **:** | Miligram |
| **mL** | **:** | Mililitre |
| **mm** | **:** | Milimetre |
| **nm** | **:** | Nanometre |
| **g** | **:** | Gram |
| **kg** | **:** | Kilogram |
| **$K_m$** | **:** | Michaelis–Menten Kinetiği Sabiti |
| **$V_{max}$** | **:** | Enzimin En Yüksek Reaksiyon Hızının (Vmax) Yarısı |
| **V** | **:** | Volt |
| **L** | **:** | Litre |
| **M** | **:** | Molarite |
| **mEq** | **:** | Milliequivalent |
| **$M_r$** | **:** | Molekül Ağırlığı |
| **$M_w$** | **:** | Molekül Ağırlığı |
| **$M_a$** | **:** | Molekül Ağırlığı |
| **mM** | **:** | Milimolar |
| **N** | **:** | Normalite |
| **$R^2$** | **:** | Korelasyon Katsayısı |
| **U** | **:** | Unit |

| | | |
|---|---|---|
| **%** | **:** | Yüzde Değer |
| **pI** | **:** | İzoelektrik nokta |
| **psi** | **:** | Bir inçkarelik alana uygulanan kuvvetin libre cinsinden değeri (Basınç birimi) |
| **pH** | **:** | Asitlik, bazlık derecesi |
| **Q** | **:** | Kuarterner amin |
| **S** | **:** | Sülfonat |
| **w/v** | **:** | Kütle/Hacim |
| **bar** | **:** | Basınç birimi |

# KISALTMALAR

| **Kısaltmalar** | | **Açıklamalar** |
|---|---|---|
| **2D** | **:** | 2 Boyutlu |
| **2D-PAGE** | **:** | 2 Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforez |
| **AB** | **:** | Avrupa Birliği |
| **ACN** | **:** | Asetonitril |
| **AEX** | **:** | Anyon Değişimi (Anion Exchange) |
| **AFGP** | **:** | 2-acetylfuran-3-glucopyranoside |
| **AGP** | **:** | Arabinogalaktan |
| ***A.mellifera* L.** | **:** | *Apis mellifera* L. (Avrupa Bal Arısı) |
| **AOAC** | **:** | Association of Official Analytical Chemists |
| **BPNPG7** | **:** | Blocked p-Nitrophenyl-α-D-Maltoheptaoside |
| **BFF** | **:** | β-Fruktofuranosidaz |
| **BME** | **:** | β-Merkaptoetanol |
| **BRS** | **:** | Esmer Pirinç Şurubu (Brown Rice Syrup) |
| **BSA** | **:** | Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümini) |
| **C18** | **:** | Octadesiltrimetoksisilane |
| **$CaCl_2$** | **:** | Kalsiyum Klorür |
| **CA** | **:** | Selüloz Asetat (Cellulose Acetate) |
| **CEX** | **:** | Katyon Değişimi (Cation Exchange) |
| **CFU** | **:** | Santrifüj Uyumlu Ultrafiltrasyon Ekipmanı (Centrifugal Ultrafiltration Unit) |
| **CHT** | **:** | Seramik Hidroksiapatit (Ceramic Hydroxyapatite) |
| **CHAPS** | **:** | 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| **CM** | **:** | Karboksimetil iyon değiştirici reçine |
| **CRM** | **:** | Sertifikalı Referans Malzeme |
| **CV** | **:** | Laboratuvarlar Arası Değişim Katsayısı |
| **Dk** | **:** | Dakika |
| **DEAE** | **:** | Dietilaminoetil Selüloz |

| | | |
|---|---|---|
| **DFA** | **:** | Difruktoz Anhidrit |
| **DN** | **:** | Diastaz Sayısı (Diastase Number) |
| **DP** | **:** | Polimerizasyon derecesi (Degree of Polymerisation) |
| **EEC** | **:** | European Economic Community |
| **EDTA** | **:** | Etilen Diamin Tetra Asetik asit |
| **ELISA** | **:** | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| **EC** | **:** | Avrupa Komisyonu (European Comission) |
| **EtOH** | **:** | Etanol |
| **EU** | **:** | Avrupa Birliği (European Union) |
| **FTIR** | **:** | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| **FT-MIR-ATR** | **:** | Fourier transform mid-infrared-attenuated total reflectance |
| **FPLC** | **:** | Hızlı Protein Sıvı Kromatografi (Fast Protein Liquid Chromatography) |
| **GC** | **:** | Gaz Kromatografi |
| **GC-MS** | **:** | Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi |
| **GK** | **:** | Geri Kazanım |
| **GST** | **:** | Glutatyon S transferaz |
| **GOX** | **:** | Glukoz Oksidaz |
| **$H_2O_2$** | **:** | Hidrojen Peroksit |
| **$H_3BO_3$** | **:** | Borik Asit |
| **$H_3PO_4$** | **:** | Ortofosforik Asit |
| **HCl** | **:** | Hidroklorik Asit |
| **HFCS** | **:** | Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu |
| **HILIC** | **:** | Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi |
| **HIC** | **:** | Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi |
| **HMF** | **:** | Hidroksimetilfurfural |
| **HPLC** | **:** | Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi |
| **HPG** | **:** | Hipofaringeal Bez |
| **HPAE-PAD** | **:** | High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometric Detection |
| **IEX** | **:** | İyon Değişim Sıvı Kromatografisi |
| **IEF** | **:** | İzoelektrik Fokuslama |

| | | |
|---|---|---|
| **IgG** | **:** | İmmünoglobülin G |
| **IgM** | **:** | İmmünoglobülin M |
| **IgE** | **:** | İmmünoglobülin E |
| **IgA** | **:** | İmmünoglobülin A |
| **IHC** | **:** | International Honey Comission (Uluslararası Bal komisyonu) |
| **IL** | **:** | İnterlökin |
| **IMAC** | **:** | İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi |
| **IUBMB** | **:** | Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği |
| **IN** | **:** | İnvertaz Sayısı |
| **IFN** | **:** | İnterferon |
| **IR** | **:** | Infra Red (Kızılötesi) |
| **IU** | **:** | International Unit |
| **KCl** | **:** | Potasyum Klorür |
| **$KH_2PO_4$** | **:** | Potasyum Dihidrojen Fosfat |
| **kDa** | **:** | Kilodalton |
| **LC** | **:** | Sıvı Kromatografi |
| **MS** | **:** | Kütle Spektrometresi |
| **MALDI** | **:** | Matrix Assisted Laser Desorption İonization |
| **MALS** | **:** | Multiangle light scattering |
| **MeOH** | **:** | Metanol |
| **$MnCl_2$** | **:** | Mangan (II) Klorür |
| **MPLC** | **:** | Orta Basınçlı Sıvı Kromatografi (Medium Pressure Liquid Chromatography) |
| **MRJP** | **:** | Majör Arı Sütü Proteinleri (Major Royal Jelly Proteins) |
| **MWCO** | **:** | Moleküler Ağırlık Dışlama Limiti (Molecular Weight Cut-off Value) |
| **NIR** | **:** | Yakın kızılötesi (Near-İnfrared) |
| **NaCl** | **:** | Sodyum Klorür |
| **NaOH** | **:** | Sodyum Hidroksit |
| **$(NH_4)_2SO_4$,** | **:** | Amonyum Sülfat |
| **$Na_2HPO_4$** | **:** | Disodyum Hidrojen Fosfat |
| **$NaH_2PO_4$** | **:** | Sodyum Dihidrojen Fosfat |

| | | |
|---|---|---|
| **NaCl** | **:** | Sodyum Klorür |
| **$NaN_3$** | **:** | Sodyum Azotür |
| **NaOH** | **:** | Sodyum Hidroksit |
| **$(NH_4)_2SO_4$** | **:** | Amonyum Sülfat |
| **NMR** | **:** | Nükleer Manyetik Rezonans |
| **PAGE** | **:** | Poliakrilamid Jel Elektroforez |
| **PDA** | **:** | Photodiode Array Detector |
| **PES** | **:** | Polietersulfon |
| **pNPG** | **:** | p -nitrophenyl-β-D-glucopyranoside |
| **PVDF** | **:** | Polivinilidin Florür |
| **PPB** | **:** | Per Part Billion (µg/Kg) |
| **PPM** | **:** | Per Part Million (mg/Kg) |
| **PTM** | **:** | Translasyon Sonrası Modifikasyonlar (Post Translational Modification) |
| **RIU** | **:** | Refraktif İndeks Ünitesi |
| **RC** | **:** | Rejenere Selüloz |
| **RP** | **:** | Ters Faz Kromatografisi |
| **RPM** | **:** | Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per minute) |
| **ODS** | **:** | Octadecyltrimethoxysilane (C18) |
| **QuEChERS** | **:** | Ekstraksiyon tekniği (hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli) |
| **QC** | **:** | Kalite Kontrol (Quality Control) |
| **RSD** | **:** | Rölatif Standart Sapma |
| **RID** | **:** | Refraktif İndeks Dedektörü |
| **RP-LC** | **:** | Ters Faz Sıvı Kromatografisi |
| **RT** | **:** | Alıkonma Süresi (Retention time) |
| **SCIRA** | **:** | Stable Carbon Isotope Ratio Analysis (Karbon İzotop Oranı Analizi |
| **SD** | **:** | Standart Sapma |
| **SDS** | **:** | Sodyum Dodesil Sülfat |
| **SEC** | **:** | Size Exclusion (Boyut Dışlama) |
| **SPE** | **:** | Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction) |

| | | |
|---|---|---|
| **SPME** | **:** | Solid Phase Micro Extraction (Katı Faz Mikro Ekstraksiyon) |
| **STAGE** | **:** | STop And Go Extraction |
| **TFA** | **:** | Trifloroasetik asit |
| **TCA** | **:** | Trikloroasetikasit |
| **TLC** | **:** | İnce Tabaka Kromatografi |
| **TNF-α** | **:** | Tümör nekroz faktörü |
| **TOF** | **:** | Time of Flight (Uçuş zamanı) |
| **UF** | **:** | Ultrafiltrasyon |
| **UV** | **:** | Ultraviyole (mor ötesi) |
| **UV-VIS** | **:** | Ultraviyole-Görünür Bölge |
| **USS** | **:** | Ultra Saf Su |
| **WRS** | **:** | Beyaz Pirinç Şurubu (White Rice Syrup) |

# ŞEKİL LİSTESİ

**SAYFA**

Şekil 1.1. *Apis mellifera* L. (Bal arısı). ..... 44
Şekil 1.2. *Apis mellifera* L. invertaz enziminin ribbon diagramı. ..... 46
Şekil 1.3. *Apis mellifera* L. diastaz enziminin ribbon diagramı. ..... 52
Şekil 2.1. MPLC ve fraksiyon toplayıcı. ..... 84
Şekil 2.2. Test edilen MPLC kolonları. ..... 85
Şekil 2.3. Arı anatomisi ..... 88
Şekil 2.4. Arı diseksiyon çalışması. ..... 89
Şekil 2.5. Disekte edilmiş HPG örnekleri. ..... 89
Şekil 2.6. HPG diseksiyon & homojenizasyon ve enzim ekstraksiyon & konsantrasyon çalışmaları özet iş akışı. ..... 92
Şekil 2.7. Stirrred Cell Ultrafiltrasyon (SCU) düzeneği. ..... 110
Şekil 2.8. Ek konsantre etme ve temizleme işlemlerinin gerçekleştirildiği centrifugal filtration unit (CFU) ekipmanı. ..... 110
Şekil 2.9. Final ön hazırlık prosedürü özet iş akışı. ..... 111
Şekil 2.10. Temizleme işlemlerinin gerçekleştirildiği diyaliz kasedi ve uygulanması. 113
Şekil 2.11. Lentil Lektin sorbent ile hazırlanan SPE kartuşu ve pozitif basınç elüsyonu ile uygulanması. ..... 121
Şekil 2.12. Lentil Lektin sorbenti doldurularak hazırlanan preparatif glikoprotein afinite kromatografi kolonu. ..... 122
Şekil 2.13. cPrime kolonun aktif ligand yapısı. ..... 123
Şekil 2.14. tert-bütil ligand yapısına sahip reçine. ..... 123
Şekil 2.15. GelDoc EZ imager, SDS-PAGE jel görüntüleme modülü, SDS-PAGE tankı ve güç ünitesi. ..... 125
Şekil 2.16. Stirred cell ön hazırlık basamağı. ..... 127
Şekil 2.17. Stirred cell sonrası CFU ve diyaliz için ön hazırlık basamakları. ..... 127
Şekil 2.18. Konfirmasyon çalışması deney modeli. ..... 129
Şekil 2.19. Ön hazırlık sonrası MPLC'de gerçekleştirilen enzim saflaştırma deneysel tasarımı. ..... 131

Şekil 2.20. Ön hazırlık sonrası MPLC'de gerçekleştirilen final enzim saflaştırma prosesi..... 131
Şekil 3.1. Toplam protein analizi görselleri. ..... 141
Şekil 3.2. Diastaz aktivite analiz görselleri. ..... 141
Şekil 3.3. İnvertaz aktivitesi görselleri. ..... 141
Şekil 3.4. Şeker analizine ait tek noktalı kalibrasyon kromatogramı. ..... 142
Şekil 3.5. Ön hazırlık optimizasyonunda CFU ultrafiltrasyon ön işleminin şeker elimine etme etkinliğine ait kromatogramlar. ..... 142
Şekil 3.6. İnvertaz aktivitesi görselleri. ..... 147
Şekil 3.7. Diastaz aktivitesi görselleri. ..... 147
Şekil 3.8. Macro-Prep® High Q kolon ile elde edilen anyon değişim kromatogramı.. 151
Şekil 3.9. Anyon değişim kromatografisinde tutunma gösteren invertaz enziminin aktivite testi sonucunda oluşan yüksek invertaz aktivitesine sahip A12 ile A15 arası fraksiyonlara ilişkin görsel. ..... 152
Şekil 3.10. Anyon değişim kromatografisinde tutunma göstermeyen diastaz enziminin aktivite testi sonucunda oluşan, yüksek diastaz aktivitesine sahip A2 ve A3 fraksiyonlarına ilişkin görsel. ..... 152
Şekil 3.11. ENrich™ Q kolon ile elde edilen anyon değişim kromatogramı. ..... 152
Şekil 3.12. Macro-Prep® High S kolon ile elde edilen anyon değişim kromatogramı. 155
Şekil 3.13. QuEChERS ve SPE formatlarında uygulanan lektin afinite ile diastaz ve invertaz saflaştırma yaklaşımı sonrasında elde edilen SDS-PAGE görseli. 157
Şekil 3.14. Lektin afinite kromatografisi, borat gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram. ..... 160
Şekil 3.15. Lektin afinite kromatografisi, pH gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram. ..... 161
Şekil 3.16. Lektin afinite kromatografisi, 0,4 M glukoz gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram. ..... 161
Şekil 3.17. Lektin afinite kromatografisi, 1 M glukoz gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram. ..... 161
Şekil 3.18. CHT reçine ile diastaz ve invertazın fraksiyonlanmasına ilişkin kromatogram. ..... 164

Şekil 3.19. CHT reçine ile elde edilen fraksiyonlardaki diastaz aktivitesi analizine ilişkin yapılan spektrofotometrik test için kullanılan örneklerdeki renk değişimi ve bununla orantılı diastaz enzim varlığı. ..... 165
Şekil 3.20. CHT reçine ile elde edilen fraksiyonlardaki invertaz aktivitesi analizine ilişkin yapılan spektrofotometrik test için kullanılan örneklerdeki renk değişimi ve bununla orantılı invertaz enzim varlığı..... 165
Şekil 3.21. Foresight™ Nuvia™ cPrime™ kolon ile diastaz ve invertazın fraksiyonlanmasına ilişkin kromatogram. ..... 168
Şekil 3.22. Macro-Prep t-Butil HIC Bulk reçinesi ile diastaz ve invertazın fraksiyonlanmasına ilişkin kromatogram. ..... 168
Şekil 3.23. SEC kolon ile diastaz ve invertaz enzimlerinin fraksiyonlanmasına ilişkin ortak kromatogram. ..... 170
Şekil 3.24. Ön hazırlık sonrası elde edilen konsantre edilmiş enzim çözeltisinin Foresight CHT kolona 0,8 mL enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram görüntüsü. ..... 174
Şekil 3.25. CHT kromatografisi sonrasında elde edilen invertaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin Enrich Q-AEX kolona 1,0 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli. ..... 175
Şekil 3.26. CHT kromatografisi sonrasında elde edilen diastaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin Enrich Q-AEX kolona 1,0 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli. ..... 175
Şekil 3.27. AEX kromatografisi sonrasında elde edilen diastaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin SEC kolona 0,25 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli..... 176
Şekil 3.28. AEX kromatografisi sonrasında elde edilen invertaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin SEC kolona 0,25 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli..... 176
Şekil 3.29. İnvertaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez görseli. ..... 177
Şekil 3.30. Diastaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez görseli. ..... 178

Şekil 3.31. Diastaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez görseli. ..... 179
Şekil 3.32. Diastaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez 2D görseli. ..... 179
Şekil 3.33. HPG ve çam balı protein ekstraktlarının SDS-PAGE gösterimi. ..... 190
Şekil 3.34. Saflaştırılmış diastaz enziminin HPLC-PDA yöntemi ile analizi sonrasındaki kromatogramı. ..... 199
Şekil 3.35. Saflaştırılmış invertaz enziminin HPLC-PDA yöntemi ile analizi sonrasındaki kromatogramı. ..... 199
Şekil 3.36. Saflaştırılmış invertaz ve diastaz enzimlerinin HPLC-PDA yöntemi ile analizi sonrasındaki ortak kromatogramı. ..... 199
Şekil 3.37. Doğal çam balının HPLC-PDA analiz yöntemi ile elde edilen enzim profili kromatogramı. ..... 200
Şekil 3.38. Saflaştırılmış invertaz, diastaz enzimlerinin ve de doğal çam balının HPLC-PDA yöntemi ile analizlerinin sonrasındaki oluşan ortak kromatogram görüntüleri. ..... 200
Şekil 3.39. HPLC-PDA diastaz kalibrasyon eğrisi. ..... 209
Şekil 3.40. HPLC-PDA invertaz kalibrasyon eğrisi. ..... 211
Şekil 3.41. Otantik ve enzim tağşişli bal örneklerinin karşılaştırmalı kromatogramları. ..... 219
Şekil 3.42. Otantik çam balı örneğinin, yabancı enzim tağşişli bal örneğinin ve de saf yabancı diastaz (fungal orijinli amilaz, 10mg/L konsantrasyonunda, insect saline tamponu ile çözülerek hazırlanmıştır) örneğinin analizinden elde edilen kromatogramlar. ..... 219

# TABLO LİSTESİ

**SAYFA**

Tablo 1.1. Diastaz aktivite yöntemleri literatür özeti. ..... 14
Tablo 1.2. İnvertaz aktivite yöntemleri literatür özeti. ..... 24
Tablo 1.3. Diastaz ve invertaz saflaştırma ve ekstraksiyon yöntemleri literatür özeti. .. 30
Tablo 1.4. Bal proteinlerinin izolasyonu. ..... 60
Tablo 1.5. Bal proteinlerinin karakterizasyonu. ..... 61
Tablo 2.1. HPLC-PDA yöntemi ile diastaz aktivite ölçümü için oluşturulan kalibrasyon seviyeleri ve aktivite değerleri. ..... 134
Tablo 2.2. HPLC-PDA yöntemi ile invertaz aktivite ölçümü için oluşturulan kalibrasyon seviyeleri ve aktivite değerleri. ..... 134
Tablo 3.1. Seçilmiş çam balı örneğine ait fizikokimyasal ve palinolojik test sonuçları. ..... 135
Tablo 3.2. Seçilmiş çam balı örneğine ait otantisite test sonuçları. ..... 135
Tablo 3.3. Şırınga filtrelerinin protein bağlama kapasiteleri. ..... 136
Tablo 3.4. Ön hazırlık optimizasyon çalışması sonuçları. ..... 138
Tablo 3.5. Konfirmasyon çalışması sonuçları. ..... 146
Tablo 3.6. Diastaz saflaştırma çalışması performans tablosu. ..... 182
Tablo 3.7. İnvertaz saflaştırma çalışması performans tablosu. ..... 184
Tablo 3.8. Seçicilik çalışması sonuçları. ..... 202
Tablo 3.9. Sağlamlık (Ruggedness) çalışması verileri. ..... 203
Tablo 3.10. Dayanıklılık (Robustness) çalışması verileri. ..... 203
Tablo 3.11. Kalibrasyon grafikleri rakamsal verileri. ..... 204
Tablo 3.12. Diastaz ve invertaz gün içi tekrarlanabilirlik (tekrarlanabilirlik, intra-day precision) verileri. ..... 206
Tablo 3.13. Diastaz ve invertaz günler arası tekrarlanabilirlik (tekrarüretilebilirlik, inter-day precision) verileri. ..... 206
Tablo 3.14. LOD ve LOQ değerleri. ..... 207
Tablo 3.15. HPLC-PDA yöntemi diastaz kalibrasyon tablosu. ..... 208

Tablo 3.16. HPLC-PDA ve spektrofotometrik / kolorimetrik aktivite tabanlı diastaz ölçüm yöntemleri ile eş zamanlı şekilde analiz edilen 15 adet numunenin analiz sonuçları. ..... 209
Tablo 3.17. HPLC-PDA yöntemi invertaz kalibrasyon tablosu. ..... 210
Tablo 3.18. HPLC-PDA ve spektrofotometrik / kolorimetrik aktivite tabanlı invertaz ölçüm yöntemleri ile eş zamanlı şekilde analiz edilen 15 adet numunenin analiz sonuçları. ..... 211
Tablo 3.19. İnvertaz verileri regresyon analiz sonuçları. ..... 213
Tablo 3.20. Diastaz verileri regresyon analiz sonuçları. ..... 213
Tablo 3.21. İnvertaz verileri T test analiz sonuçları. ..... 214
Tablo 3.22. Diastaz verileri T test analiz sonuçları. ..... 214
Tablo 3.23. Diastaz verileri F test analiz sonuçları. ..... 215
Tablo 3.24. İnvertaz verileri F test analiz sonuçları. ..... 215
Tablo 3.25. Piyasadan tedarik edilen 107 bal örneğinde yapılan kolorimetrik diastaz aktivite (spektrofotometrik tayin) ve yabancı enzim (yabancı diastaz) tespit analiz sonuçları (HPLC-PDA yeni yöntem ile tayin). ..... 220

# 1. GİRİŞ

Konsantre bir karbonhidrat çözeltisi olan bal, bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından esas ham madde olarak bitki özlerinden, nektarlarından veya bal salgılarından üretilir. Bal sadece en eski doğal tatlandırıcı değil, aynı zamanda bir gıda ve farmasötik bileşen olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Modern toplumumuzda balın süregelen popülaritesi, tadı, besleyici ve biyolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Türk Gıda Kodeksi tanımına göre bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının, salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi, Bal Tebliği, 2012/58).

Hayvansal orjine sahip gıda maddeleri zengin makro ve mikro nütrient içerikleri dolayısı ile değerli besin öğeleri olarak diyetimizde yer alması gereken kaynaklardır. Bal, sağlık faydaları ve tedavi edici özelliklerinde ötürü bizler için tüketimi önemli hayvansal gıdalardan biridir. Bal arıları, kıtlık döneminde balı petek içinde yiyecek olarak depolar [1]. Bal yüksek karbonhidrat içeriği ve çeşitliliği barındırmasının yanında aminoasitler, fenolik bileşenler, mikrobiyal peptitler, organik asitler ve proteinler içermektedir. Endüstriyel şeker üretimi başladığından itibaren, üretim proseslerindeki karbonhidrat ihtiyacı doğal bal yerini büyük ölçüde endüstriyel şekerlerden sağlanmaktadır [2]. Ancak yine de tüm dünyada bal ve arı ürünleri yaygın olarak tüketilmektedir. Bal beslenme ihtiyaçlarını karşılamanın ötesinde sağlık yararları da sağladığından ötürü fonksiyonel bir gıda olarak düşünülebilir [3]. Balın klinik önemi, yaraları, enfeksiyonları ve enflamatuar tepkileri iyileştirebilmesidir [4]. Balın asidik pH'ı da antibakteriyel aktiviteye katkıda bulunur. Balın su aktivitesi 0.6'dır ve mikroorganizma büyümesine bu açıdan da direnç gösterebilmektedir [5]. Bal, alternatif bir doğal terapi ajanı olarak çok faydalı olabilmektedir [6]. Bakterilerin artan direnç gücü endişe kaynağıdır. Bu nedenle, alternatif antibiyotiklerin uygulamaya konması gerekir. Bal, bu tür sorunları çözmek için yararlı ve doğal bir araç olabilmektedir. Balın son zamanlarda antioksidan aktivite özelliği de ilgi odağı haline gelmiştir [7].

Antioksidanların kanser, koroner hastalıklar, enflamatuar bozukluklar, nörolojik dejenerasyon ve yaşlanma gibi farklı hastalıklara karşı birçok koruyucu etkiye sahip olması, antioksidan yönünden zengin yiyecek arayışlarına yol açmış ve bal bu yönden diğer alternatif arı ürünleri ile birlikte önemli bir antioksidan kaynağı haline gelmiştir. Bileşimine göre bal, ağırlıklı olarak karbonhidratlar ve su ile birlikte majör arı sütü proteinleri, serbest amino asitler, enzimler ve mineraller içerir [1]. Balda bulunan serbest amino asitler arasında prolin baskındır [8]. ve prolin varlığı Avrupa Birliği (AB) gıda kanunlarına göre kalite göstergesi olarak kullanılmaktadır. Serbest amino asitlerin mevcudiyeti ve profili, balın coğrafi ve botanik kökeni hakkında fikir sahibi olmak için de kullanılabilmektedir [9]. Balın bileşimi, iklimsel değişikliklere ve nektar kökenine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Aynı zamanda bal arısı kökenine - *Apis Cerena* veya *Apis Melifera*'ya [10] ve işleme derecesine ve tekniğine göre de farklılık gösterebilmektedir.

Peteklerden elde edilen bal genellikle balmumu, larva, propolis, polen, yumurta ve arılar içerir. Bu kirletici maddeler, ticari olarak kabul edilebilir temiz filtrelenmiş bir bal ürünü yapmak için farklı işlem prosedürleriyle uzaklaştırılır. Ancak bu prosedürlerin, besin değerlerine negatif yansımaları olabilir. Bu nedenle balın işlenmesi sırasında, işlendikten sonra besin değerinin bozulmadan kalması için özel dikkat gösterilmelidir. Balın fizikokimyasal karakterizasyonu faydalı özelliklerini anlamak için yararlı bir araç olabilir [11]. Balın olgunluğunu belirlemek için baldaki şeker içeriği önemli bir belirteç olabilmektedir. Olgun bal, erken bir durumda hasat edilen baldan daha az disakkarit içeriğine sahiptir. Bu durumda Fruktoz / glukoz oranı balın tağşişine ilişkin bilgi sağlayabilir [12]. Balın kül içeriği, nem içeriği, asitliği, viskozitesi de kalitesini belirler. Örneğin balın ısıl işlem görmesi viskozitesini düşürür [13]. Balda bulunan protein miktarı ise, bal kuru maddesinin %0.1-0.5'inden çok daha azdır. Balda bulunan proteinlerin çoğu, bal hasadı sırasında bal arısı hipofarengeal bezinden gelir. Proteinlerin geri kalanı polen ve bitki kökenlidir. Araştırmacılar, Sodyum Dodesil Jel Elektroforez (SDS-PAGE) analizi yoluyla bazı proteinlerin tüm bal türlerinde çok yaygın olduğunu bulmuşlardır. SDS-PAGE analizindeki protein bantlarının sayısı baldan bala farklılık gösterebilmektedir. Avustralya yerel balında (Manuka balı), SDS-PAGE ile 19 protein bandı bulunmuştur [14]. Doğal balda yaklaşık 7 ila 19 protein bandı rapor edilmiştir [14]. Polen proteinlerini ve enzimleri dışarıda bıraktıktan sonra

balda bulunan baskın protein türü, majör arı sütü proteinleridir (MRJP) [15]. Balda bulunan beş majör arı sütü proteini ailesi vardır (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 ve MRJP5) ve bunların moleküler ağırlıkları 49 kDa - 87 kDa aralığındadır [16]. Balın en yaygın ve karakterize edilen proteini, arı sütü protein albüminine benzeyen MRJP1'dir (Apalbumin 1). MRJP1, farklı glikosilasyonlarından dolayı moleküler ağırlık olarak farklılıklar gösterebilir [15]. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olan Apalbumin 1, arılar ve arı ürünleri tüketen insanlar için besin ihtiyacını karşılamanın ötesinde fonksiyonel değere sahiptir. Makrofajları aktive edebilir ve TNF-α üretebilir bu sayede immunregülatör özelliğe de sahiptir [17]. Balın katalaz ve glukoz oksidaz (GOX) enzim içerikleri de söz konusudur ve GOX katalitik aktivitesi ile hidrojen peroksit ($H_2O_2$) oluşturmaktadır.

Balda $H_2O_2$ oluşumu antibakteriyel özellikler göstermektedir. Farmakolojik araştırmalarda bal proteinleri ile ilgili araştırmalar önem kazanmaktadır. Bal proteinlerinin karakterizasyonu tam olarak yapılmamıştır. Baldaki enzim ve diğer proteinlerin saflaştırılması, izolasyonu ve karakterizasyonu, biyolojik aktivitesi hakkında bilgi sahibi olmak için çok önemlidir. Karakterize edilmiş bir protein de mevcut referanslar ile daha sonra karşılaştırılabilmektedir. Protein yeni tanımlanmış bir protein ise, kendisi birçok deneysel amaç için referans olarak kullanılabilir. Bir proteinin karakterizasyonu, Amino asit kompozisyon analizi, N-terminal sıralaması, SDS-PAGE, izo elektrik fokuslama (IEF), Western blot, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), spektrofotometrik testler, Optik rotasyon, Kütle spektrometrisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), vb. çeşitli teknikler kullanılarak yapılabilir. Bazen proteinlerden peptit üretimi de yeni bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir. Çünkü bazı peptitler biyoaktiviteleri açısından proteinden daha güçlü olabilmektedir [18]. Peptitler, proteinin tamamında bulunduğunda inaktif kalır. Ancak protein, biyoaktif peptitler haline gelmek üzere sindirildiğinde veya hidrolize edildiğinde aktif hale gelebilmektedir. Peptitlerin aktiviteleri, amino asit bileşimlerine bağlıdır. Biyoaktif peptitlerin boyutu genellikle 3-20 amino asittir [19]. Biyoaktif peptitler, enzimatik hidroliz, asit hidrolizi, mikrobiyal fermantasyon, vb. birçok yolla bir proteinden üretilebilmektedir [20]. Proteazlar (proteini hidrolize eden enzimler) genellikle benzer tipte peptidler üretmek için proteini kendi spesifik amino asidinde böler. Pepsin, tripsin, kimotripsin, pankreatin, alkalin, proteinden biyoaktif peptidler

üretmek için kullanılan çok yaygın proteazlardır. Gıda proteininin hidrolizi ile üretilen biyoaktif peptitler diyet nitrojeni olarak emilebilir ve ayrıca fizyolojik aktivite gösterebilir. Çeşitli araştırmalarda peptitlerin proteinlere veya serbest amino asitlere kıyasla biyolojik olarak daha fazla kullanılabilir olduğu bulunmuştur [21]. Balın protein içeriğinin büyük bir kısmını enzimler oluşturmakta olup, balın olgunlaşmasında en önemli rolü üstlenen ve tazelik göstergesi olarakta kalite kontrol süreçlerinde işaretçi moleküller şeklinde analiz edilen moleküllerdir. Enzim içeriği, balı diğer tatlandırıcı ürünlerden ayırabilen bir özelliktir. Bal düşük ve yüksek konsantrasyonlarda farklı türden birçok enzimi içerebilmektedir. Bunlardan en önemlileri, bal arılarının hipofaringeal salgı bezi sekresyonlarından, tükrük sıvılarından ve nektar kaynağından kaynaklanan yüksek oranda diastaz (α-amilaz) ve invertaz (α-glukozidaz)'dır. Baldaki amilazın ve invertazın karakterizasyonu, balın tazeliğini belirtmek için kullanılmıştır [22]. İşlenmemiş balın ısıl işleminden sonra en çok etkilenen biyokimyasal bileşenler diastaz ve invertaz enzimleridir [23]. Balın enzim miktarı, işleme, ısıtma ve uzun süreli depolama ile azalabilmektedir.

Diastaz ve invertaz enzimleri balda beslenmeyle ilgili tazelik ve olgunlaşmış bal tespiti için en önemli kriterlerdir. Bu enzimler aynı zamanda gıda endüstrisinde, pek çok alanda, nişastanın işlenmesi ve/veya farklı kaynaklardan doğal şeker eldesi için polisakkaritlerin/oligosakkaritlerin hidroliz süreçlerinde tercih edilmekte olup, farklı orijinlerden elde edilen α-amilaz ve α-glukosidaz sıklıkla bu amaçlarla tercih edilmektedir. Diastaz, nişasta gibi yüksek derecede polimerize karbonhidratları (polisakkaritleri), kolay sindirebilmesi için hidrolize ederek kısa zincirli oligosakkaritleri oluşturuken, invertaz, sukroz ve maltoz gibi disakkaritleri hidrolize ederek fruktoz ve glukoz monosakkaritleri meydana getirebilmektedir. İnvertaz ve diastaz nektarın bala dönüşmesini sağlayan bir dizi ana reaksiyonları katalizlemektedir. Bu enzimler, bal arılarının fermantasyona dayanıklı, yüksek enerji sağlayan çok konsantre şeker solüsyonu üretmesine yardımcı olmaktadır. İnvertaz aktivitesi, diastaz ve hidroksimetil furfural (HMF) miktarı ile birlikte bal kalite kontrol parametresi olarak kullanılmaktadır. Tespit edilen enzim aktivite değerleri, balın tazelik ve olgunlaşma derecesi ile ilgili araştırmacılara bilgi vermektedir. Bal, dünyada en çok tağşiş yapılan gıdalardan biridir. Balın orijinini ve tağşiş türünü belirlemede pek çok araştırma mevcuttur. Ancak balın kalitesine ilişkin veriler sınırlıdır. Balın kalite parametrelerini

temsilen diastaz ve invertaz içerikleri bu değerlerin üretim tekniklerinden nasıl etkilendiği ve tüketilecek balın tağşiş içerip içermediği, saflık derecesi hep birlikte derinlemesine araştırılması, incelenmesi ve değerlendirilmesi gereken hususlardır. Enzimler bu açıdan hem tağşiş hemde kalite parametrelerini yansıtaiblen iyi birer işaretçi moleküllerdir. Enzimlerin hassas ve pratik yöntemler ile tespit edilebilmesi baldaki kalite derecesini ve saflık kontrolünün yapılmasında eş zamanlı bir araştırma sonucu alınmasına imkan tanımaktadır.

Ticari balın çoğunu üreten dört bal arısı türü vardır; bunlar *Apis mellifera, Dorsata, Cerana* ve *Florea*'dır. *A. mellifera*'nın doğal dağılımı, Avrupa, Afrika ve Amerika kıtalarını içerir; *A. Cerana*'nın doğal dağılımı tropikal ve doğu Asya'dadır; *A. Dorsata* ve *A.Florea*'nın doğal dağılımı Umman ve Asya'dan Endonezya'ya kadar uzanır [24]. Kuzey Amerika ve Avrupa kıtalarında ticari bal üretimi yalnızca *Apis mellifera*'dan yapılmaktadır. Balın fiyatı ve tüketicinin yüsek talebi, üreticiler tarafından daha fazla ekonomik kar elde etmek için işlenmesi ve paketlenmesi sırasında tağşiş ve taklit odaklı uygulamaları yapabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu problemle mücadele etmek için, pek çok analitik yaklaşım geliştirilmiştir. Yüksek Basınçlı Anyon değişim kromatografisi Puls Amperometrik Dedektör sistemi (HPAE-PAD) [25] ve gaz kromatografisi (GC) [26] ile oligosakkarit parmak izinin belirlenmesi balın özgünlüğünü test etmek için geliştirilen yöntemlerdendir. Balın yirmi üçten fazla farklı oligosakkarit içerdiği gösterilmiştir [27, 28]. Baldaki oligosakkaritlerin varlığı, hidrolitik enzimlerin ve nektar karbonhidratları üzerindeki transglikosilasyon aktivitelerinin bir sonucudur. Bu oligosakkaritlerin oluşumundan sorumlu olan hidrolitik enzimler, diastaz, α ve β-glukosidazlar olarak tanımlanmıştır [29]. Literatür, bal arılarından (*Apis mellifera* L.) izole edilen α-glukozidazların içeriğini ve aktivitesini inceleyen bir dizi çalışmayı içermektedir [30]. Balda ve bal arısı bağırsağında β-glukosidaz aktivitesi tespit edilmiş olmasına rağmen, bu enzim farklı bal orijinlerinden veya farklı bir bal arısı türünden izole edilmemiş ve karakterize edilmemiştir [31]. *Apis mellifera* L. tarafından üretilen ballarda, invertaz aktivitesi ölçümünün ticari önemi bulunmaktadır. Çünkü invertaz balın tazeliği ve sıcaklık ve depolama koşulları ile değişebilmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2012/58) invertaz ile ilgili bir kalite parametresi belirlememekte iken, diastaz için farklı bal türleri için diastaz sayıları belirlemiştir. Bu durum diastazın balın kalitesini ve tazelik durumunu invertaz ile birlikte belirlerlemekte olduğu ve yasal mevzuatlar ile kontol altında olduğunu göstermektedir. İlgili kontrol ve araştırma labortuvarları, enzimlerin aktivite tayinine ilişkin kontrolleri pratik, düşük maliyetli, hassas ve tekrarlanabilir şekilde yüksek doğrulukla gerçekleştirebilmelidir. Diastaz ve İnvertaz aktivite analizleri, arı ürünleri ve diğer gıda ürünlerinde, yurt içi ve yurt dışı laboratuvarlarda, Ar-Ge ve kalite kontrol amaçlı veya akademik düzeyde araştırma amaçlı, literatürde ve standart metotlarda yer almakta olan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler incelendiğinde, yurtdışında özel sentezlenmiş substratların veya hazır analiz kitlerinin kullanıldığı, enzim aktivite hesaplamasına dayalı, uzun inkübasyon süreleri dolayısı ile zaman etkin olmayan ön işlemler içeren, sarf malzeme dolayısı ile dışa bağımlı ve de maliyetli, kullanılan substratlar dolayısı ile seçiciliği kısmen düşük, tekrarlanabilirliği zayıf ve analist yorumlamasına açık yaklaşımlar ön plana çıkmaktadır. Bal ve hipofaringeal bezde (HPG), α-glukosidaz ve α-amilazın izolasyonu ve saflaştırılması hakkında ise çok az yayın olmak ile birlikte, bu araştırmaların uygulanması kolay değildir ve metodolojiler, güncel olmayan, pahalı, zaman alıcı, tekrarlanabilirliği düşük ve hassas olmayan örnek ön-işleme ve saflaştırma adımları içermektedir. Ayrıca, literatür araştırmamızda, çam balı enzimlerinin, *Apis mellifera* L. HPG enzimleriyle karşılaştırılmasının yanı sıra, çam balı matriksinde bu enzimlerin pratik ve eşzamanlı saflaştırılması ve izolasyonu için de bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 1.1. Amaç

Bu çalışmanın amacı, çam balı ve HPG'de α-glukosidaz (invertaz) ve α-amilazın (diastaz) pratik şekilde izolasyonu, yüksek etkinlikte saflaştırılması ve orijin karşılaştırması için yeni ve üstün bir metodolojinin geliştirilmesidir. İzolasyon yaklaşımlarından sonra, bu saflaştırılmış enzimlerin, baldaki diastaz ve invertaz aktivitelerinin doğrudan ultraviyole dedektör ile kombine edilmiş Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi fotodiyot array cihazı (HPLC-PDA) ile teşhisinde referans materyaller olarak kullanılması amaçlanmıştır. Enzimlerin direkt olarak (substrat aktivitesi üzerinden olmayacak şekilde) HPLC-PDA kullanılarak tespiti için *Apis mellifera* L.

orjinli enzimler ticari olarak mevcut değildir. Bu sebepten önce enzimler saflaştırılarak referans standartlar oluşturulmuş ve bu referans enzimler kullanılarak sıvı kromatografi metodu geliştirilmiş ve kalibrasyon grafikleri oluşturulabilmiştir. Araştırmamızın ikinci bölümünde, saflaştırılan enzimlerin yardımı ile optimizasyon ve kalibrasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, HPLC-PDA dedeksiyonu kullanılarak, doğrudan (seyrelt ve enjekte et) baldaki diastaz ve invertaz aktivitelerinin eşzamanlı olarak belirlenmesine dayalı yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Saflaştırılmış enzimlerin farklı oranlarda seyreltilmiş numunelerinin HPLC sistemine enjeksiyonu ile belirli aktivite aralıklarında kalibrasyon grafikleri oluşturup, hazırlanan bal çözeltilerinin sadece filtrelenerek HPLC sistemine enjekte edileceği ve mevcut enzimlerin eş zamanlı şekilde tek bir enjeksiyonda kromatografik ayrım sonrası UV sinyalinin, mevcut kalibrasyon üzerinden kantitasyonu ve bu sayede aktivite tayini yapabilecek pratik bir metot geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra geliştirilen izolasyon ve saflaştırma yöntemleri sayesinde elde edilecek referans arı orijinli enzim standartları kullanılarak ballardaki tağşişin aydınlatılabilmesi ve aktivite tayin yönteminin eş zamanlı bir tağşiş/taklit tespit metodolojisi olarak kullanımı amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılacak araştırma ve geliştirilen saflaştırma, izolasyon ve enzim miktarlandırma yöntemleri doğrultusunda beklenen başarı hedefleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Maliyetli kitler veya substratlar yerine, enzimlerin direkt olarak bal matriksinde, HPLC-PDA tabanlı yöntem kullanılarak hem daha hassas hem de seçiciliği daha yüksek, aktivite yerine her bir enzimin tek bir enjeksiyonda eş zamanlı raporlayabilen özgüllüğü yüksek bir metot geliştirilmesi.

- Maliyeti düşük, pratik, hızlı, hassas ve dışa bağımlı olmayan yöntemlerin, diastaz-invertaz enzimleri için akreditasyon düzeyinde uygulanabilir olması.

- Yurtdışı ve yurt içi akademik, Ar-Ge ve kalite kontrol amaçlı çalışan tüm laboratuvarlar için standart oluşturabilecek referans bir yöntem oluşturulması.

- Protein saflaştırmada sıklıkla tercih edilen HIC (Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi) ve IEX (İyon değişim kromatografisi) teknikerinden ziyade alternatif ve yeni bir metodolojiyi literatüreye kazandırılması. Bu kapsamda

CHT resin (Seramik hidroksi apetit kromatografisi resini) ile α-amilazın metal (Kalsiyum) afinitinesinden faydalanılması.

- Ülkemize özgün ve yoğun miktarda üretimi yapılan ve enzimleri üzerinde fazla araştırma yapılmamış olan bir bal türü olarak çam balındaki diastaz ve invertaz enzimlernin farklı orijinlerden gelen ballar ile karşılaştırılmasının yapılması.

- Çam balı ve HPG'den α-glukosidaz ve α-amilazın moleküler ağırlığı, aktiviteleri benzerlikleri açısından incelenecektir. Basra salgısı kaynaklı farklı bir profilin varlığı çam balı özelinde araştırılmış olacaktır.

- Saflaştırılmış enzimler, tazelik ve kalite belirteci olarak değerlendirilen baldaki diastaz ve invertaz miktar analizlerinde kantitatif amaçlı referans malzemeler olarak da kullanılabilmesi amaçlanmaktadır.

- Farklı orjinlerden elde edilen veya sentetik şekilde üretilen, α-amilaz ve α-glukosidaz hidrolitik enzimler olarak gıda sektöründe nişasta ve farklı polisakkaritleri işlemekte kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında, saflaştırılmış enzimler kromatografik ölçeklendirme işleminden sonra gıda endüstrisinde proses süreçleri için doğal ve ucuz birer alternatif olarak kullanılabilecektir.

- Gıda alanında protein saflaştırma çalışmaları için protein düzeyinde referans özellik taşıyabilecek bir saflaştırma prosedür gerçekleştirilecektir.

- Rutin kalite kontrol faaliyeti gerçekleştirlen laboratuvararın iş yükü ve rutin test maliyeti azalacaktır.

- İleriki süreçlerde saflaştırılmış arı orijinli enzim standartları ticari bir ürün haline dönüştürülebilecektir. Lyofilizasyon işlemi ile stabil arı ve veya bal orijinli analitik saflıkta standartlar ülkemiz tarafından üretilebilecektir.

- Saflaştırılmış enzim profili vede ön hazırlık yöntemi, şeker şurubu veya direk enzim eklentisi şeklinde tağşiş edilen ballardaki, endüstriyel enzim kalıntısı olarak tespit edilebilecek β-fruktofuranosidaz (β-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) enzimlerinden farklı bir ve doğal bir elektroforez profili oluşturacağından, tağşiş tespiti açısından da değerlendirilebilecektir. Yabancı

diastaz olarak adlandırılan ve balın diastaz değerini suni olarak yükseltmek amaçlı, dışarıdan arı HPG orijinli olmayan α-amilaz tağşişi ballarda tespit edebilen pratik bir yöntem geliştirilmiş olacaktır.

Çam balı ve *Apis mellifera* L. HPG proteinlerinden enzimlerin izolasyonu aktivite tayinlerinin yapılması, saflaştırılması, referans malzeme olarak kullanılarak hem tağşiş tespiti hemde aktivite tayininin eş zamanlı ve kromatografik olarak yapılması proje kapsamında hedeflenmektedir. Dolayısıyla, mevcut araştırma için aşağıdaki analitik hedefler oluşturulmuştur:

1. Bal ve doku bulk enzimlerinin (diastaz ve invertaz) izolasyonu ve deriştirilmesi.

2. Bal ve doku enzimlerinin saflaştırılması ve aktivite yöntemlerinin geliştirilip konfirmasyon amaçlı tayinlernin yapılması.

3. İzole edilmiş enzimlerin refernas malzemeler olarak kullanımı ve bu enzimler yardımı ile jel proteomik tabanlı ve HPLC tabanlı tağşiş tespit yönteminin geliştirilmesi.

4. İzole edilmiş enzimler kullanılarak alıkonma zamanları ve rezolüsyonu kalibre edilmiş HPLC-PDA yönteminin geliştirilmesi ile aktvite tayinlerinin hem diastaz hemde invertaz için eş zamanlı olacak şekilde gerçekleştirilmesi

## 1.2. Özgün Değer

Yüksek teknoloji ile donatılmış laboratuvarlar, kromatografi veya spektroskopi prensipleri ile çalışmakta olan gelişmiş enstrümental cihazların varlığı sayesinde pek çok analizi günümüzde, yüksek çözünürlüklü, hassas, geri kazanımı ve doğruluğu yüksek seviyelerde gerçekleştirebilmektedir. Gıda kontrol laboratuvarları başta olmak üzere, akademik düzeyde araştırma yapan üniversite laboratuvarları, gıda sektöründe üretim yapan pek çok özel sektör kuruluşu, güncel olmayan, maliyetli, doğruluk ve özgüllük seviyesi düşük yaş kimya analizlerini, enstrümental metotlara dönüştürmek ve rutin şekilde uygulamaya alabilmek amacındadır. Günümüzde sıklıkla balda, bal ihtiva eden ürünlerde ve şeker endüstrisinde, kalite ve tazelik belirteci olarak veya üretim proseslerinde kullanılacak konsantrasyonlara karar verebilmek için değerlendirilen

invertaz ve diastaz aktivite testleri, uzun ön işlemleri olan, hassasiyeti ve geri kazanımı düşük, genellikle spektrofotometrik veya titrasyona dayalı, literatür yöntemleri veya standard metotlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Mevcut tüm bu yöntemlerdeki zorluk ve kısıtlamaları çözümleyebilmek adına, öncelikle olarak çalışmamızda, çam balı ve HPG'de (Hypopharengeal gland, hipofaringeal bez) α-glukosidaz ve α-amilazın pratik ekstraksiyonu, saflaştırılması ve orijin karşılaştırması için yeni ve üstün bir ön hazırlık ve saflaştırma metodolojisi geliştirilmiştir. Saflaştırma sürecinin sonrasında, bu saflaştırılmış enzimler, baldaki diastaz ve invertaz aktivitelerinin doğrudan HPLC-PDA metodu ile teşhisinde yeni referans materyaller olarak kalibrasyon eğrilerinde kullanılmıştır. Enzimlerin direk olarak HPLC-PDA ile tespiti için *Apis mellifera* L. orjinli enzimler ticari olarak mevcut değildir. Bu sebepten önce enzimler saflaştırılarak referans standartlar oluşturulmuş ve bu referans enzimler kullanılarak metot geliştirilmiştir. Araştırmamızın ikinci bölümünde, saflaştırılan enzimlerin yardımı ile optimizasyon ve kalibrasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, HPLC-PDA dedeksiyonu kullanılarak, doğrudan (seyrelt ve enjekte et) baldaki diastaz ve invertaz aktivitelerinin eşzamanlı olarak belirlenmesine dayalı yeni bir yöntem geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış enzimlerin farklı oranlarda seyreltilmiş numunelerinin HPLC sistemine enjeksiyonu ile belirli aktivite aralıklarında kalibrasyon grafikleri oluşturup, hazırlanan bal çözeltilerinin sadece filtrelenerek HPLC sistemine enjekte edileceği ve mevcut enzimlerin eş zamanlı şekilde tek bir enjeksiyonda kromatografik ayrım sonrası UV sinyalinin, mevcut kalibrasyon üzerinden kantitasyonu ve bu sayede aktivite tayini yapabilecek pratik bir yöntem tanımlanmıştır. Enzim yapılarındaki hidrofobik fonksiyonel grupların moleküler etkileşimlerinden faydalanılarak, ters faz kromatografi prensibi ile asetonitril-tampon gradyan elüsyonu kullanarak eş zamanlı ve yüksek rezolüsyonlu şekilde dedekte edilmiştir. Bu metodoloji, α-amilaz ve α-glukosidaz özelinde ilk kez uygulanmıştır. Enstrümental cihaz olarak kullanılan HPLC-PDA (Ultrahigh pressure Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector) sistemi, "superficially porous" kolon ile yüksek basınçta, yüksek rezolüsyonu enzimler için kısa analiz sürelerinde, eş zamanlı olarak verebilmiştir. Literatüre güncel bir katkı olarak, referans enzim standartlarının eldesinde, ön hazırlık aşamalarında, (Centrifugal ultrafiltration) CFU yardımı ile ultra-diyafiltrasyon metodolojisi ve Seramik Hidroksiapatit (CHT) reçineleri kullanılarak saflaştırma metodolojisini kullanan yeni

izolasyon metodu, eski saflaştırma metotlarına göre her iki enzim için de daha kısa, daha saf ve daha tekrarlanabilir numune ön-hazırlık ve saflaştırma yaklaşımlarına sahiptir. Literatürdeki saflaştırma yöntemlerinde yer alan uzun ve geri kazanımı düşük, enzim stabilitesi açısından çok uygun olamayan diyaliz yöntemi yerine daha kısa süreli ve etkinliği yüksek ultra-diyafiltrasyon işlemi ön hazırlık süreçlerinde CFU ekipmanı kullanarak gerçekleştirilip valide edilmiştir.

Enzimlerin saflaştırılma basamaklarında, protein saflaştırma yöntemlerinde sıklıkla tercih edilen HIC (Hydrophobic Chromatography) ve IEX (Ion Exchange) teknikerinden ziyade alternatif ve yeni bir metodolojiyi literatüreye kazandırılmıştır. Bu kapsamda CHT ile α-amilazın kalsiyum afinitinesinden faydalanılmıştır. Metal afinite kromatografisi diğer kromatografik saflaştırma tekniklerine göre spesifik aktivitesi daha yüksek yani daha saf protein izolatları elde etmemizi sağlamıştır. Saflaştırılmış enzim profili, şeker şurubu veya direk enzim eklentisi şeklinde tağşiş edilen ballardaki, enzimatik reaksiyonların kalıntısı olarak tespit edilebilecek β-fruktofuranosidaz (β-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) ve Termamyl® (Heat Stable-Amylase) enzimlerinden farklı ve doğal bir elektroforez profili oluşturduğundan, tağşiş tespiti açısından da değerlendirilebilmiştir. Yöntem HPLC metodu üzerinden farklı orijindeki diastaz varlıklarını da tespit edebilen niteliktedir. Bu bağlamda tağşiş tespiti açısından oldukça zor bir matriks olan bal örnekleri için doğruluğu yüksek bir tağşiş tespit yönteminin temelleri atılmıştır. Farklı orjinlerden elde edilen veya sentetik şekilde üretilen, α-amilaz ve α-glukosidaz hidrolitik enzimler olarak gıda sektöründe nişasta ve farklı polisakkaritleri işlemekte kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında, saflaştırılmış enzimler kromatografik ölçeklendirme işleminden sonra gıda endüstrisinde proses süreçleri için doğal ve ucuz birer alternatif olarak kullanılabilecektir. Saflaştırılmış enzimler, tazelik ve kalite belirteci olarak değerlendirilen baldaki diastaz ve invertaz miktar analizlerinde kantitatif amaçlı referans malzemeler olarak da kullanılabilecektir. Bu durum aktivite tabanlı yöntemlerin kullanıldığı laboratuvarlar içinde referans malzeme ihtiyacını karşılayacaktır. Saflaştırılan enzimlerin elektroforetik protein profili görüntülenerek, çam balındaki diastaz ve invertazın moleküler ağırlıkları, enzim özellikleri, yapıları araştırılacak ve farklı orijinlerden gelen ballarla aynı olup olmadıkları da aydınlatılılacaktır. Çam balı ve HPG'den α-glukosidaz ve α-amilazın moleküler ağırlığı, aktiviteleri, benzerlikleri açısından incelenmiştir. Basra salgısı kaynaklı farklı bir

profilin varlığı çam balı özelinde araştırılmıştır. Türkiye'de ve de literatürde, bu enzim grubuna ilişkin geliştirilmiş, direk enzim tespit yöntemi henüz bulunmamak ile birlikte, yeni geliştirilecek metodoloji ve diastaz / invertaz pürifikasyon yöntemi ile birlikte referans analitik standart olarak kullanımı yurtdışı laboratuvarlar için de büyük bir yenilik teşkil edecektir. Maliyetli kitler veya substratlar yerine, enzimlerin direk olarak bal matriksinde, HPLC-PDA tabanlı yöntem kullanılarak hem daha hassas hem de seçiciliği daha yüksek aktivite yerine her bir enzimin tek bir enjeksiyonda eş zamanlı raporlayabilen özgüllüğü yüksek bir metot geliştirilmiştir ve bu yöntem maliyeti düşük, pratik, hızlı, hassas ve dışa bağımlı olmayan rutin kalite kontrol faaliyeti gerçekleştirilen laboratuvararın iş yükünü azaltacak niteliktedir. Bu yöntem, ülkemiz açısından bilimsel alanda prestij kazandıracak ve ekonomik açıdan dışa bağımlı olduğumuz analiz kitleri ve sarf malzeme ihtiyacını azaltacak etkiye sahiptir. Ayrıca referans nitelik taşıyacak bu yöntem diğer gıda ürünlerindeki enzimlerin analizinde, yurt içi ve yurt dışı laboratuvarlar için de yüksek katkı sağlayabilecek ve bu açıdan da ülkemize katma değer ve itibar kazandırabilecek formattadır.

## 1.3. Literatür

Enzimler, canlı hücrelerde birçok işlem ve reaksiyonu meydana getiren hücre içi ve hücre dışı aktivite gösteren karmaşık proteinlerdir. Balın enzim içeriği nektar kaynaklarına ve bölgelere göre değişebilir. Enzimler balda önemli bir rol oynar ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunur. Balın içersindeki enzim konsantrasyonları, işleme, ısıtma ve uzun süreli depolama gibi prosesler dolayısı ile azalabilmektedir. Bu süreç sonucunda eklenen enzim miktarı, bal arılarının yaşı, fizyolojik evresi ve beslenmesi, koloninin gücü, sıcaklık, nektar akışına bağlı olarak değişmektedir. Diastaz ve invertaz, balın olgunlaşması ve beslenme açısından uygun forma gelmesi açısından en önemli enzimlerdir. Bunun dışında, bu enzimler gıda endüstrisinde, pek çok uygulamada, nişastanın işlenmesi ve/veya doğal şeker şurubu eldesi için tercih edilmekte olup, farklı orijinlerden elde edilen veya sentetik olarak oluşturulan α-amilaz ve α-glukosidaz sıklıkla tercih edilebilmektedir. Avrupa Birliği Bal Direktifi'ne göre sağlıklı tüketime yönelik ballar için belirli kompozisyon kriterleri belirlenmelidir. Bu hedefe ulaşabilmek adına, Uluslararası Bal Komisyonu (IHC) bir dizi valide edilmiş yöntem derlemiştir. IHC 1990 yılında yeni bir evrensel bal standardı oluşturmak için

kurulmuştur. IHC'nin başlıca hedefleri; Balın ve diğer arı ürünlerinin daha iyi ve yeni analiz yöntemleri ile analiz edilmesi, bal ve diğer arı ürünlerinin kalite ve kontrolü konularında grup üyelerini bilgilendirmekti. Bu kapsamda, IHC birçok valide edilmiş yöntem derlemiştir. Balda diastaz Aktivitesinin belirlenmesi için resmi analiz yöntemleri, IHC tarafından önerildiği üzere Schade ve Phadebas® analizleridir. Literatürde diastaz aktivite tayininde doku veya balda kullanılan bu ve benzeri modifiye yöntemler, Tablo 1.1.'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.1.** Diastaz aktivite yöntemleri literatür özeti.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| High Sensitivity Method for The Measurement Of Alpha-amylase In Cereal Grains and Food (AOAC Method 2002.01 AACC Method 22-02.01 ICC Standard No. 303) PRODUCTS, [32]. | (Megazyme 2007). | Aplikasyon Dökümanı | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Gıda Ürünleri | Amylase SD Reagent-Bloklanmış özel sentez Substrat (4,6-O-ethylidene-α-4-nitrophenyl-maltoheptaoside (EtPNPG7)) ile total 20 dakika inkübasyon ve aktvite tayini, spektrofotometrede hidroliz reaksiyonu durdurulup ölçüm alınır. Yüksek konsantrasyon thermostable α-glukosidaz enzimi kullanılır. | Uzun ön-hazırlık - kit ve substrat maliyeti - Endo enzimlerin girişim ihtimali-Bal matriksine özgü bir çalışma mevcut değildir. |
| For the Measurement of Plant and Microbial Alpha-amylases (Ceralpha Method) (AOAC Method 2002.01 AACC Method 22-02.01 ICC Standard No. 303), [33]. | (Megazyme 2007). | Aplikasyon Dökümanı | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bitki ve Mikrobiyal Ajanlar | Amylase HR Reagent, "non-reducing-end blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside" (BPNPG7) özel substrat ile total 30 dakika inkübasyon süresi, spektrofotometrede hidroliz reaksiyonu durdurulup ölçüm alınır. Yüksek konsantrasyon thermostable α-glukosidaz enzimi kullanılır. | uzun ön hazırlık - kit ve substrat maliyeti - Endo enzimlerin girişim ihtimali-Bal matriksine özgü bir çalışma mevcut değildir. |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| For the Measurement of Cereal and Microbial α-amylase (ICC Standard No. 303), [34]. | (Megazyme 2007). | Aplikasyon Dökümanı | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Tahıl ve Mikrobiyal Ajanlar | Kullanılan substrat enzim karışımları (Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7, 54.5 mg) glucoamylase (100 U at pH 5.2) α-glukosidaz (100 U at pH 5.2), per vial) 15 dakika enzim ekstraksiyonu -20 dakika toplam inkübasyon, ara dilüsyonlar, hidroliz reaksiyonu durdurulup, spektrofotometrede ölçüm. | Uzun ön hazırlık - kit ve substrat maliyeti - Endo enzimlerin girişim ihtimali-Bal matriksine özgü bir çalışma mevcut değildir. |
| Diastase Activity (α-amylase) In Honey - (Phadebas metodu - Amylazyme tablet), [35]. | (Megazyme 2007). | Aplikasyon Dökümanı | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal | Özel sentez Substrat=Amylazyme HY tablet (contain dyed and crosslinked amylose (the linear fraction of starch). Phadebas tablete benzer şekilde geliştirilmiş nişasta tabanlı substratlar kullanılmaktadır. Total inkübasyon 15 dakika. Sonuçlar, Schade veya Goethe unit / gram of honey şeklinde yani Diastase Number (DN) cinsinden verilmektedir. Spektrofotometrede reaksiyon durdurulup okuma yapılır. | Uzun ön hazırlık (vorteks, filtrasyon, inkübasyon ve dilüsyon basamakları içermektedir.) - kit ve substrat maliyeti - Tağşiş kaynaklı enzimlerin girişim ihtimali -Tekrarlanabilir olmaması |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration, [36]. | Ioannis N. Pasias a, Ioannis K. Kiriakou a, Charalampos Proestos (2017) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal | Diastase activity (AOAC method 958.09, 2006) standardını uygulamaktadır | Uzun inkübasyon süresi - tağşiş içerikli enzimlerin girişim ihtimali - enzim denatürasyonu |
| Diastase activity in Honey (AOAC method 958.09, 2010), [37]. | AOAC (Association of Official Analytical Chemists) | Metot Standardı | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal | Balı tampon içerisinde çözme, pH sabitleme sonrası, NaCl ile dilüsyon ve sıcak su banyosunda nişasta ile inkübasyon - iyot çözeltisi eklenir karıştırılır ve spektrofotometrede 660 nm de okuma yapılır. | Uzun inkübasyon süresi - tağşiş içerikli enzimlerin girişim ihtimali - enzim denatürasyonu |
| Honey Diastase Activity Modified by Heating, [38]. | E. Tosi, R. Martinet, M. Ortega, H. Lucero, E. Re (2008) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal | Phadebas Yöntemi Kullanılmıştır | Uzun ön hazırlık (vorteks, filtrasyon, inkübasyon ve dilüsyon basamakları içermektedir.) - kit ve substrat maliyeti - Tağşiş kaynaklı enzimlerin girişim ihtimali -Tekrarlanabilir olmaması |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phadebas Yöntemi - Harmonized Methods of the European Commission of Honey, [39]. | (Bogdanov, Martin, & Lüllmann, 1997). | Makale | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal | Suda çözünürlüğü düşük olan blue dyed cross-linked nişasta substrat olarak kullanılmış olup, diastazın hidroliz etmesi ile oluşan suda çözünür mavi renkli fragmentler spektrofotometrede 620 nm'de okunmaktadır. | Uzun ön hazırlık (vorteks, filtrasyon, inkübasyon ve dilüsyon basamakları içermektedir.) - kit ve substrat maliyeti - Tağşiş kaynaklı enzimlerin girişim ihtimali -Tekrarlanabilir olmaması-30 dk. İnkübasyon süresi |
| Direct potentiometric determination of diastase activity in honey, [40]. | Milan Sak-Bosnar, Nikola Sakac (2012) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal | Phadebas Yöntemi kullanılarak elde edilen triiodid bileşeni spektrofotometrik ölçüm yerine potansiyometrik dedeksiyon tercih edilmiştir. | Girişime açık-uygulaması zor, phadebas yönteminden modifiye, tekrarlanabilirliği düşük yöntemdir. Phadebas tekniğinin dezavantajlarını barındırmaktadır. |
| Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L.), [41]. | Al-Sherif, A.A., Mazeed, A.M., Ewis, M.A., Nafea, E.A., Hagag, E.S.E., Kamel, A.A., (2017) | Makale | İnvertaz, glukoz oksidaz ve α-Amilaz | Diastaz ve İnvertaz Aktivite | (hipofaringeal, post-serebral, torasik and mandibular bezler) | Salgı bezleri ayrı ayrı ekstrakte edilerek, oluşturulan çözeltilerde aktivite bakılmıştır. Diastaz Aktivitesi dinitrosalisilik prosedürü ile ölçülmüştür | Ölçülen aktivite yöntemleri invertaz ve diastaz için eski ve pratik olmayan dinitrosalisilik asit yöntemleridir. Teknikler hassas olmayıp, girişime açıktır. |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzymatic Assay of α-amylase (EC 3.2.1.1) : Dinitrosalicylic acid Procedure, [42]. | Bernfeld, P. (1955) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Aktivite Tayini | Bal / Doku ekstraktları | Nişasta ile 1 saatlik amilaz hidrolizi dinitrosalisilik asit ile durdurulur ve maltoz kalibrasyonuna karşı nişastanın hidorlizi ile oluşan indirgenmiş maltoz spektrofotometrede ölçülür | Uzun inkübasyon süreleri mevcuttur. Glukoz sinyali düşük olduğundan hassas bir ölçüm yöntemi değildir. Uzun ön işlem gerelidir. Girişime açık bir yöntemdir. Eski bir yöntemdir. |
| Expression of α-amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.), [43]. | Kazuaki Ohashi, Shunji Natori ve Takeo Kubo (1999) | Makale | α-Amilaz | Hipofaringeal Dokuda Diastaz ve Glukoz-oksidaz tespiti | Hipofaringeal Doku | Diastaz aktivititesi Dinitrosalisilik Asit prosedürü ile değerlendirilmiştir Proteinler doku numunesinden ekstrakte edilip insect saline tamponu içerisinde sırası ile FPLC'de mono Q ve Mono S kartuşları ile α-amilaz ve glukoz oksidaz saflaştırılmıştır. Southern blotting, SDS-PAGE ve automated protein sequencer ile karakterizasyon ve tanımlama yapılmıştır. | İnvertaz değerlendirilmemiştir. Hassas olmayan tekrarlanabilirliği düşük dinitrosalisilik asit yöntemi kullanılmıştır. Diastaz saflaştırmada flow through mode tercih edilmiş olup, etkin bir saflaştırma değildir. balda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Characterization of Honey α-amylase, [44]. | Sibel Babacan & Arthur G. Rand (2007) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Aktivite / Karakterizasyon | Bal | Balı tampon içerisinde çözme, pH sabitleme sonrası, NaCl ile dilüsyon ve sıcak su banyosunda nişasta ile inkübasyon - iyot çözeltisi eklenir karıştırılır ve spektrofotometrede 660 nm de okuma yapılır.**White and Kushnir (1967)** / Kullanılan substrat enzim karışımları (Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7, 54.5 mg) glucoamylase (100 U at pH 5.2) α-glukosidaz (100 U at pH 5.2), per vial) 15 dakika enzim ekstraksiyonu -20 dakika toplam inkübasyon, ara dilüsyonlar, hidroliz reaksiyonu durdurulup, spektrofotometrede ölçüm.**Sigma Diagnostics (Babacan and Rand 2005).** | Uzun ön hazırlık (vorteks, filtrasyon, inkübasyon ve dilüsyon basamakları içermektedir.) - kit ve substrat maliyeti - Tağşiş kaynaklı enzimlerin girişim ihtimali -Tekrarlanabilir olmaması |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Invertase and Diastase Activity in Honeys of Czech Province, [45]. | L. Vorlova, A. Pridal (2002) | Makale | Diastaz/İnvertaz | Diastaz/İnvertaz aktivite tayini | Bal | İnvertaz için, Siegenthaier metodu kullanılmıştır. p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) susbtratı hidroliz edilip reaksiyon baz ilavesi ile durdurulur ve spektrofotometrede nitrofenol molekülü okunur. Schade method diastaz için uygulanmıştır | İnvertaz analizinde maliyetli substrat kullanımı, uzun hinkübasyon süresi mevcuttur. Diastaz yöntemi Schade metot dezavantajlarını uzun inkübasyon, olası girişim ve tekrarlanabilirlik problemleri mevcuttur. |
| Detection of Foreign Enzyme Addition into the Adulterated Honey, [46]. | Voldřich, M., Rajchl, A., Čížková, H., Cuhra, P., (2009) | Makale | α-Amilaz | Diastaz aktivite | Bal | Spektrofotometrik Schade ve phadebas yöntemi kullanılmıştır. Harmonisation methods of International Honey Commission (Bogdanov 1999). | Phadebas, Schade ve IHC invertaz ve diastaz metot dezavantajları içermektedir. Düşük geri kazanım, substrat maliyeti ve tekrarlanabilirlik problemlerini barındırmaktadır. |
| A comparison of the Schade and Phadebas methods for determining diastase activity in honey, [47]. | Blanka Zábrodská, Michaela Králová, Lenka Vorlová (2014) | Makale | α-Amilaz | Diastaz aktivite | Bal | Spektrofotometrik Schade ve phadebas yöntemi kullanılmıştır. Harmonisation methods of International Honey Commission (Bogdanov 1999). | Phadebas, Schade diastaz metot dezavantajları içermektedir. Düşük geri kazanım, substrat maliyeti ve tekrarlanabilirlik problemlerini barındırmaktadır. |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A Preliminary Cost Effective Qualitative Assay for Diastase Analysis in Honey, [48]. | Sudhanshu Saxena ve Satyendra Gautam (2017) | Makale | α-Amilaz | Diastaz aktivite | Bal | IHC Schade metodu kullanılmıştır. | Schade diastaz metot dezavantajları içermektedir. Düşük geri kazanım, substrat maliyeti ve tekrarlanabilirlik problemlerini barındırmaktadır. |
| Modified Procedure for the Determination of Diastatic Activity and α-amylase Activity, [49]. | V. M. Bendelow (1963) | Makale | α-Amilaz | Diastaz aktivite | Bal | Nişasta susbstratı amilaz ile hidroliz eidlmiş oluşan ürün dinitrosalisilik asit reaksiyona sokulup spektrofotometrede okuma yapılmıştır. | Uzun ön hazırlık içermektedir. Girişimler söz konusudur. Hassas olmayan, eski bir yöntemdir. |
| Nondestructive Determination of Diastase Activity of Honey Based on Visible and Near-Infrared Spectroscopy, [50]. | Zhenxiong Huang, Lang Liu, Guojian Li, Hong Li, Dapeng Ye, ve Xiaoli Li, (2019) | Makale | α-Amilaz | Diastaz aktivite | Bal | Vis/NIR spectroscopy imaging system ile aktivite sonrası ölçüm alınmıştır. | Komplike cihaz konfigürasyonu gerekmektedir. Uygulanabilirliği düşük ve maliyetli bir yöntemdir. Tekrarlanabilirlik verisi mevcut değildir. |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Determination of the diastase activity in honeys, [51]. | Kuc, Joanna Grochowalski, Adam Kostina, Marianna, (2017) | Makale | α-Amilaz | Diastaz aktivite | Bal | Farklı orijindeki bal numuneleri, Phadebas ve Schade metotları kullanılarak nişastanın amilaz ile hidrolizi ve iyot ile reaksiyonu sonucunda oluşan triiyodid bileşiğinin spektrofotometrede görüntülenmesi ile her iki metotta kullanılarak analiz edilmiştir. | Yöntem phadebas ve Schade metodundaki, inkübasyon süresi, tekrarlanabilirlik problemi, hassas olmama, girişim olasılığı ve dilüsyon gibi ara işlemleri gibi ortak dezavantajları barındırmaktadır. |
| The Enzymes of Honey: Examination by Ion exchange Chromatography, Gel Filtration, and Starch-Gel Electrophoresis, [52]. | Jonathan W. White Jr. & Irene Kushnir (1967) | Makale | Tüm Enzimler | Baldaki Enzimlerin Saflaştırma ve karakterizasyonu | Bal | Diyaliz ile ön hazırlık uygulaması sonrası, DEAE-cellulose, gel filtration Sephadex G-200 ve starch-gel electrophoresis uygulamaları kullanılmıştır. | FPLC saflaştırmaları rezolüsyonu düşüktür. Aktivite tayini nişasta jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım ve validasyon verileri mevcut değildir. Doku numunesi çalışılmamaıştır. Enzim saflaştırma eş zamanlı gerçekleştirilmemiştir. |

**Tablo 1.1.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Harmonised Methods of The Internatıonal Honey Commission, [53]. | International Honey Commission (2009) | Metot; Referans Standardı | Diastaz ve İnvertaz | Bal Analizleri (Diastaz ve İnvertaz aktivitesini hesaplama) | Bal | **Metot 9. Diastase activity after Schade** - **Metot 10. Diastase activity with Phadebas** - **Metot 16. Invertase activity (U. Siegenthaler**, Eine einfache und rasche Methode zur Bestimung der α-glukosidaz (Saccharase) im Honig. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 68, 251-258 (1977).) | Doku ile ilgili çalışmalar ve saflaştırma yer almamaktadır. Aktivite yöntemleri phadebas - Schade ve Siegenthaler method kapsamındadır. İnkübasyon süreleri, girişim, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım dezavantajları vardır. |
| **α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, APİS MELLİFERA L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI YAKLAŞIMLARI İLE BAL-OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN BASİT ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ** | **Akyildiz İ.E., Yetimoğlu Kök E.** | **Doktora Tezi** | **Eş zamanlı α-glukosidaz, α-amilaz** | **Enzim Saflaştırma / tanımlama ve Direk Aktivite Tayini (Diastaz ve invertaz Tayini)** | **Bal ve Hipofarenjiyal Bez** | **Stirred Cell ultrafiltration - Ultradiyafiltrasyon ön hazırlık clean-up ve deriştirme- MPLC enzim saflaştırma (IEX-CHT-SEC) - SDS-PAGE, Aktivite Konfirmasyon - HPLC-PDA enzim aktivite direk tayini** | - |

IHC diastaz analizine benzer şekilde invertaz analizi için de bir yöntem valide etmiştir ve bu yöntem dünya genelinde kabul görmüş bir yöntem olarak rutin analizlerde uygulanmaktadır. Literatürde IHC metodu haricinde de alternatif yöntemler geliştirilmiş olmak ile birlikte invertaz aktivite analizi için önerilen yöntemler Tablo 1.2.'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.2.** İnvertaz aktivite yöntemleri literatür özeti.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L.), [41]. | Al-Sherif, A.A., Mazeed, A.M., Ewis, M.A., Nafea, E.A., Hagag, E.S.E., Kamel, A.A., (2017) | Makale | İnvertaz, glukoz oksidaz ve α-amilaz | Diastaz ve İnvertaz Aktivite | (Hipofaringeal, post-serebral, torasik and mandibular bezler) | Salgı bezleri ayrı ayrı ekstrakte edilerek, oluşturulan çözeltilerde aktivite bakılmıştır. Diastaz ve İnvertaz Aktivitesi dinitrosalisilik prosedürü ile ölçülmüştür | Ölçülen aktivite yöntemleri invertaz ve diastaz için eski ve pratik olmayan dinitrosalisilik asit yöntemleridir. Teknikler hassas olmayıp, girişime açıktır. |
| Invertase : Dinitrosalicylic acid Procedure, [42]. | Bernfeld, P. (1955) | Makale | İnvertaz | İnvertaz Aktivite Tayini | Bal / Doku ekstraktları | Sakkaroz substratı ile 1 saatlik invertaz hidrolizi dinitrosalisilik asit ile durdurulur ve glukoz kalibrasyonuna karşı sakkarozun hidorlizi ile oluşan salisilik asit ile indirgenmiş glukoz spektrofotometrede ölçülür | Uzun inkübasyon süreleri mevcuttur. Glukoz sinyali düşük olduğundan hassas bir ölçüm yöntemi değildir. Uzun ön işlem gereklidir. Girişime açık bir yöntemdir. Eski bir yöntemdir. |

**Tablo 1.2.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Methods of analysis of honey, [54]. | Ana Pascual-Maté, Sandra M Osés, Miguel A Fernández-Muiño & M Teresa Sancho (2018) | Makale | Diastaz/İnvertaz | Baldaki Analiz metotları | Bal | Diastaz Analizleri (Schade method - Phadebas method - Potentiometric analysis) - İnvertaz analizleri (Polarimetric - Siegenthaler procedure - Infrared spectroscopy) | Derleme makalesidir. Phadebas, Schade ve IHC invertaz ve diastaz metot dezavantajları içermektedir. Düşük geri kazanım, substrat maliyeti ve tekrarlanabilirlik |
| Invertase and Diastase Activity in Honeys of Czech Province, [45]. | L. Vorlov, A. Pridal (2002) | Makale | Diastaz/İnvertaz | Diastaz/İnvertaz aktivite tayini | Bal | İnvertaz için, Siegenthaier metodu kullanılmıştır. p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) susbtratı hidroliz edilip reaksiyon baz ilavesi ile durdurulur ve spektrofotometrede nitrofenol molekülü okunur. Schade method diastaz için uygulanmıştır | İnvertaz analizinde maliyetli substrat kullanımı, uzun hinkübasyon süresi mevcuttur. Diastaz yöntemi Schade metot dezavantajlarını uzun inkübasyon, olası girişim ve tekrarlanabilirlik problemleri mevcuttur. |
| Invertase Activity in Bulgarian Multifloral and Honeydew Honeys, [55]. | D. Hristov Dinkov, I. Todorov Vashin (2001) | Makale | İnvertaz | İnvertaz Aktivite Tayini | Bal | Siegenthaler method, harmonised by the European Honey Commission - p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) susbtratı hidroliz edilip reaksiyon baz ilavesi ile durdurulur ve spektrofotometrede nitrofenol molekülü okunur. | İnvertaz analizinde maliyetli substrat kullanımı, uzun hinkübasyon süresi mevcuttur. |

**Tablo 1.2.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Invertase activity in honey, [56]. | Livia Persano Oddo, Maria Gioia Piazza, Patrizio Pulcini (1999) | Makale | İnvertaz | İnvertaz Aktivite Tayini | Bal | Siegenthaler method, harmonised by the European Honey Commission - p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) susbtratı hidroliz edilip reaksiyon baz ilavesi ile durdurulur ve spektrofotometrede nitrofenol molekülü okunur. | İnvertaz analizinde maliyetli substrat kullanımı, uzun inkübasyon süresi mevcuttur. |
| Harmonised Methods of the International Honey Commission, [53]. | International Honey Commission (2009) | Metot Referans Standardı | Diastaz ve İnvertaz | Bal Analizleri (Diastaz ve İnvertaz aktivitesini hesaplama) | Bal | **Metot 9. Diastase activity after Schade - Metot 10. Diastase activity with Phadebas - Metot 16. Invertase activity (U. Siegenthaler**, Eine einfache und rasche Methode zur Bestimung der α-glukosidaz (Saccharase) im Honig. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 68, 251-258 (1977).) | Doku ile ilgili çalışmalar ve saflaştırma yer almamaktadır. Aktivite yöntemleri phadebas - Schade ve Siegenthaler method kapsamında refere edilmiştir. Uzun inkübasyon süreleri, girişim ihtimali, tekrarlanabilirlik ve düşük geri kazanım bu yöntemlerdeki ortak dezavantajlardır. |

**Tablo 1.2.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Honey Invertase ELISA Test Kit (food safety rapid test kit) | Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd | Aplikasyon Dökümanı - Kit | İnvertaz | İnvertaz Aktivite Tayini | Bal | ELİSA tabanlı immunoassay yöntemi ile invertaz tayini yapılmaktadır. | Kit maliyeti söz konusudur. ELISA tabanlı referans bir yöntem mevcut değildir. Immunoassay yöntemi dolayısı ile tekrarlanabilirlik problem potansiyeli vardır. Detection Limit : Honey: 20 U/kg - Accuracy: Honey: 85±15% |
| **α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, APİS MELLİFERA L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI YAKLAŞIMLARI İLE BAL-OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN BASİT ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ** | **Akyildiz İ.E., Yetimoğlu Kök E.** | **Doktora Tezi** | **Eş zamanlı α-amilaz, α-glukosidaz** | **Enzim Saflaştırma / tanımlama ve Direk Aktivite Tayini (Diastaz ve invertaz Tayini)** | **Bal ve Hipofarenjiyal Bez** | **Stirred Cell ultrafiltration - Ultradiyafiltrasyon ön hazırlık clean-up ve deriştirme- MPLC enzim saflaştırma (IEX-CHT-SEC) - SDS-PAGE, Aktivite Konfirmasyon - HPLC-PDA enzim aktivite direk tayini** | - |

Diastaz Aktivitesi, Bal için Kodeks Standardı'nda minimum 8 Schade birimi limiti ile belirtilmiştir. Narenciye gibi düşük diastaz aktivitesine sahip ballar içinde bu limit minimum 3 Schade unit olarak belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2012/58) invertaz ile ilgili bir kalite parametresi belirlememekte iken, diastaz için farklı bal türleri için diastaz sayıları belirlemiştir. Bu durum diastazın balın kalitesini ve tazelik durumunu invertaz ile birlikte belirlerlemekte olduğu ve yasal mevzuatlar ile kontol altında olduğunu göstermektedir. Literatürü ve Avrupa Birliği Bal Kodeksini destekler şekilde, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği içerisinde de limit narenciye balları hariç diastaz için 8 DN (Diastaz Number = Schade Unit) olarak belirtilmiştir. *Apis mellifera* L. (Bal Arısı) tarafından üretilen ballarda, invertaz aktivitesi ölçümünün de ticari önemi bulunmaktadır. İnvertaz balın tazeliği ve sıcaklık ve depolama koşulları ile değişkenlik gösterebilmektedir. İnvertaz, sıcaklık değişimlerine oldukça hassas olup, balda diastazdan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Diastaz ve İnvertaz analizleri, bal ile ilgili Kodeks standardının bir parçasıdır ve son yıllarda üretici firmalar ve kalite kontrol laboratuvarları tarafından fazlası ile ilgi görmekte ve kalite prosedürlerinde oldukça kritik bir yer teşkil etmektedir. İlgili labortuvarlar, konuya ilişkin kontrolleri pratik, düşük maliyetli, hassas ve tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirebilmelidir.

Diastaz ve İnvertaz aktivite analizleri, arı ürünleri ve diğer gıda ürünlerinde, yurt içi ve yurt dışı laboratuvarlarda, Ar-Ge ve Kalite kontrol amaçlı, özel sektör ve akademik düzeyde, bilimsel literatür araştırmalarında ve akreditasyon süreçlerindeki standart metotlarda yer almakta olan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Literatür özeti olarak invertaz ve diastaz analizleri incelendiğinde, yurtdışında özel sentezlenmiş substratların ve/veya hazır analiz kitlerinin kullanıldığı, enzim aktivite hesaplamasına veya maliyetli ELISA yöntemine dayalı, inkübasyon süreleri dolayısı ile uzun ön işlemler içeren, sarf malzeme dolayısı ile dışa bağımlı ve de maliyetli, kullanılan substratlar dolayısı ile seçiciliği düşük, tekrarlanabilirliği zayıf ve analist yorumlamasına açık yaklaşımlar ön plana çıkmaktadır. Bu noktada bahsi geçen enzimlerin, direk olarak, aktivite tayini yapılabildiği kromatografik bir yöntem literatürde mevcut değildir. Çalışmada hedeflenen; enzimlerin, homojen çözelti haline getirilmiş bal çözeltilerinin, düşük protein bağlama afinitesine sahip şırınga

filtrelerinden geçirilerek HPLC-PDA'de elde edilen sinyal ile miktarlandırılmasıdır. Aynı orijinden saflaştırılmış enzimler ile oluşturulmuş kalibrasyon grafikleri kullanılarak, özgül sonuç üretebilmek, literatüre ve konu ile ilgili laboratuvarlara, diastaz ve invertaz analizinin eş zamanlı, pratik, yoruma açık olmayan, maliyetsiz ve hassas ölçüm metodu sunmak, amaçlanmaktadır. Çalışmamızın başlangıç ve temel noktası olan bal ve hipofaranjiyal bezde (HPG), α-glukosidaz ve α-amilazın izolasyonu ve saflaştırılması noktasında yapılan literatür taramasında ise az sayıda yayın mevcut olmak ile birlikte, bu araştırmaların uygulanması kolay değildir ve metodolojiler, güncel olmayan, pahalı, zaman alıcı, geri kazanımı düşük ve tekrarlanabilir olmayan örnek ön-işleme ve saflaştırma adımları içermektedir. Bahsedilen yöntemler Tablo 1.3.'de literatür özet bilgisi olarak verilmektedir.

**Tablo 1.3.** Diastaz ve invertaz saflaştırma ve ekstraksiyon yöntemleri literatür özeti.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Purification and Substrate Specificity of Honeybee, *Apis mellifera* L., α-glucosidase III, [57]. | Mamoru Nishimoto, Masaki Kubota, Masahisa Tsuji, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, (2001) | Makale | α-Glukosidaz III | *Apis mellifera* L. İnvertaz Saflaştırma ve Karakterizasyon | *Apis mellifera* L. | Salting out kromatografi ön hazırlık - Saflaştırma ara basamaklarında gün aşırı diyaliz- FPLC ile saflaştırmada DEAE Sepharose + Bio Gel P-150 + CM Toyopearl kolon kromatografileri kullanılmıştır. Toplam geri kazanım (yield) %41 tır. | Geri kazanım düşük - Uzun diyaliz ve salting out işlemleri gerektirmektedir. Balda çalışma mevcut değildir. Eş zamanlı diastaz purifikasyonu bal ve dokuda yapılmamıştır. Sadece ion exchange ve size exclusion yöntemleri kullanılmıştır. |
| Honey major protein characterization and its application to adulteration detection, [15]. | Se-Ra Won, Deug-Chan Lee, Seuk Hyun Ko, Jang-Won Kim, Hae-Ik Rhee (2008) | Makale | Toplam Protein | Bal protein Profilleme | Bal | SDS-PAGE direk uygulanmış protein profili gözlemlenmiştir. Ön hazırlık- saflaştırma ve aktvite ile ilgili bilgi verilmemiştir. | Saflaştırma ve aktivite ölçümü yapılmamış. Tüm proteinler değerlendirilmiştir. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Expression of α-amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.), [43]. | Kazuaki Ohashi, Shunji Natori ve Takeo Kubo (1999) | Makale | α-Amilaz | Hipofaringeal Dokuda Diastaz ve Glukoz-oksidaz tespiti | Hipofaringeal Doku | Diastaz aktivititesi Dinitrosalisilik Asit prosedürü ile değerlendirilmiştir. Proteinler doku numunesinden ekstrakte edilip insect saline tamponu içerisinde sırası ile FPLC'de mono Q ve Mono S kartuşları ile α-amilaz ve glukoz oksidaz saflaştırılmıştır. Southern blotting, SDS-PAGE ve automated protein sequencer ile karakterizasyon ve tanımlama yapılmıştır. | İnvertaz değerlendirilmemiştir. Hassas olmayan tekrarlanabilirliği düşük dinitrosalisilik asit yöntemi kullanılmıştır. Diastaz saflaştırmada flow through mode tercih edilmiş olup, etkin bir saflaştırma değildir. balda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. |
| Characterization of α-amylase from mandarin orange honey, [58]. | Takeshi Nagai, Reiji Inoue, Nobutaka Suzuki, Yasuhiro Tanoue & Norihisa Kai (2012) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Saflaştırma / Karakterizasyon | Bal | Phadebas Yöntemi kullanılarak elde edilen triiodid bileşeni spektrofotometrik ölçüm. **(Persano Oddo and Pulcini, 1999),** DEAE-Toyopearl 650M, CM-Toyopearl 650M, ve Toyopearl HW-55F tandem saflaştırma. | Geri Kazanım %49,3 basamaklı pürifikasyon flow through modda alıkonma olmadan saflaştırma yapılmış. Aktivite eski nişasta-iyot tablet (phadebas) dezavantajlı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Honey protein extraction and determination by mass spectrometry, [23]. | Lee Suan Chua & Jun You Lee & Giek Far Chan (2013) | Makale | Protein (Tüm Enzimler) | Bal protein Profilleme | Bal | Derleme makalesi. Bal protein ekstraksiyonu-ön hazırlık (ultrafiltrasyon, ultrasantrifujleme, Proteominer uygulaması, diyaliz, ethanol çöktürme, asit ile denatürasyon ve flokülasyon, TCA ile çöktürme teknikleri değerlendirilmiştir.) | Mevcut yöntemler derlenmiş olup, ön hazırlık prosedürleri uzun ve maliyetli ve efektif olmayan yöntemlerdir |
| Alpha-amylase From Persimmon Honey: Purification and Characterization, [59]. | Takeshi Nagai, Reiji Inoue, Nobutaka Suzuki, ve Toshio Nagashima, (2009) | Makale | α -Amilaz | Diastaz Saflaştırma | Bal | DEAE-Toyopearl 650M, CM-Toyopearl 650M, ve Toyopearl HW-55F kartuşları kullanılarak FPLC'de saflaştırma yapılmıştır. | Sadece Hurma balı çalışılmış. Flow Through modde elüsyon yapılmış, geri kazanım değeri %46,8'dir. |
| Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera* L.), [60]. | Jianke Lia, Mao Feng, Zhaohui Zhang, Yinghong Pan, (2008) | Makale | Toplam Protein | Hipofaringeal Dokuda protein profilleme | Hipofaringeal Doku | 2D protein ekstraksiyonu, 2D-PAGE MALDI-TOF ile protein profilleme | Bal ve dokuda enzimlerin aktivitesi araştırılmamıştır, saflaştırma gerçekleştirilmemiştir. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Purification and Characterization of α-amylase from Honeydew Honey, [61]. | Takeshi Nagai , Reiji Inoue , Nobutaka Suzuki & Toshio Nagashima (2008) | Makale | α -Amilaz | Diastaz saflaştırma ve karakterizasyon | Bal | CM-Toyopearl 650M (1st) - CM-Toyopearl 650M (2nd) - Toyopearl HW-55F (1st) - Toyopearl HW-55F (2nd) - kartuşları kullanılarak FPLC'de saflaştırma yapılmıştır. | Sadece salgı balı çalışılmış. Flow Through modde elüsyon yapılmış, geri kazanım değeri %41,2'dir. 4 basamaklı tandem saflaştırma yapılmıştır. Ara basamaklarda deriştirme uygulanmıştır. Süreç uzun ve kaybı yüksektir. |
| Enzymatic activity of hypopharyngeal gland extracts from workers of *Apis mellifera L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae)*, [62]. | Carminda Cruz-Landim (2005) | Makale | Total enzimler | Enzim aktivite tayini | Hipofaringeal Doku | Dokudan lysis buffer ile ekstraksiyon ve aktivite tayini | Sadece dokuda çalışılmış, saflaştırma yapılmamış total ekstraktan diastaz ve invertaz aktivitesi araştırılmamıştır |
| An Effective Method of Isolating Honey Proteins, [63]. | Aleksandra Bocian, Justyna Buczkowicz, Marcin Jaromin, Konrad Kamil Hus ve Jaroslav Legáth (2019) | Makale | Bal Proteinleri | Bal proteinlerinin ekstraksiyonu ve izolasyonu | Bal | Bal çözeltisi, konsantre fenol çözeltisi ile çöktürülür,15 dk., 30 dk. Santirfüj ve devamında 1 gün boyunca 0,1 amonyum asetat ve metanol ile çöktürme | Uzun ön işlem gerektirmekte ve kullanılan & geliştirilen yöntem pratik değildir. Fenol kimyasalı toksik etkiye sahiptir. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Purification of α-amylase from Honey, [64]. | Sibel Babacan, Arthur G. Rand (2005) | Makale | α-Amilaz | Diastaz Saflaştırma | Bal | Hollow-fiber ile ultrafiltrasyon yapılmış - Jel filtrasyon sonrası anyon ve katyon değişim kromatgorafisi uygulanmıştır. Ara basamaklarda konsantrasyon uygulanmıştır. | %3,9 geri kazanım söz konuusudur. Flow Through pikler elde edilmiştir. Ara basamaklarda Konsantrasyon uygulanmıştır. Uzun hollow fiber uygulaması mevcuttur. 3 basamaklı tandem saflaştırma IEX ve SEC uygulaması ile alınmıştır. |
| Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools, [65]. | Francesco Di Girolamo, Alfonsina D'Amato, Pier Giorgio Righetti (2012) | Makale | Toplam Protein | Toplam protein profilleme | Bal | ProteoMiner™ ile protein ekstraksiyonu kullanılmıştır. SDS-PAGE ve 2D ile protein profili çalışması yapılmıştır. Orijin tespiti gerçekleştirilmiştir. | Maliyetli ProteoMiner™ kit mevcuttur. Doku uygulaması yok. Tekrarlanabilirlik problemi ve saflaştırma amaçlı uygulama zorluğu mevcuttur. Aktivite ve saflaştırma gerçekleştirilmemiş, sadece ön hazırlık protein ekstraksiyonu kullanılmıştır. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Change in the Expression of Hypopharyngeal-Gland Proteins of the Worker Honeybees (*Apis mellifera* L.) with Age and/or Role, [66]. | Takeo Kubo, Masami Sasaki, Jun Nakamura, Hiromi Sasagawa, Kazuaki Ohashi, Hideaki Takeuchi, and Shunji Natori, (1996) | Makale | Toplam Protein | Hipofaringeal Dokuda proteinlerinin değişimini takip etmek | Hipofaringeal Doku | Protein ekstraksiyonu lysis buffer ile ultrasonik banyoda uygulanmıştır. Electrophoresis and Immunoblotting Analizleri gerçekleştirilmiştir. İnvertaz saflaştırma çalışması gerçekleştirilmiştir. Mono Q sonrası FPLC'de Superose 12 gel filtrasyon uygulanmıştır | Balda çalışma yapılmamıştır. Diastaz ile ilgili bir çalışma yoktur. İnvertaz için IHC metodu uygulanmıştır. Mono Q ve SEC ile 2 basamaklı saflaştırma kullanılmıştır. Yeterince izole protein elde edilmemiştir. |
| Localization of α-glucosidases I, II, and III in Organs of European Honeybees, *Apis mellifera* L., and the Origin of α-glucosidase in Honey, [67]. | Masaki Kubota, Masahisa Tsuj, Mamoru Nishimoto, Jintanart Wongchawalit, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Hirokazu Matsui, Rudee Surarit, (2004) | Makale | İnvertaz | Hipofaringeal Dokuda İnvertaz türleri ve lokalizasyonları | Hipofaringeal Doku | Amonyum sülfat çöktürmesi ve 3 günlük diyaliz süresi ön hazırlıkta mevcut. FPLC ile sırası ile tandem Salting-out chromatography - CM-cellulose (pH 4.7) - Bio-Gel P-150 - DEAE-Sepharose CL-6B (pH 7.8) saflaştırma yapılmış | Geri kazanım %16 - Bal ve diastaz çalışması eş zamanlı yapılmamaış. Ön hazırlık uzun GK düşük ve FPLC prosedürü uzun. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They Do Tell Us? A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys, [68]. | Rocco Rossano, Marilena Larocca, Teresa Polito, Anna Maria Perna, Maria Carmela Padula, Giuseppe Martelli, Paolo Riccio (2012) | Makale | Proteolitik Enzimler | Balda enzim profillenmesi | Bal | 2-D Gelatin Zymography tekniği ile proteinlerin profili ve birbiri ile etkilşemi çalışılmıştır. Ön hazırlıkta 1 gün süre ile diyaliz işlemi santrifüj işlemleri sonrasında geçrekleştirilmiştir. | Aktivite tayini diastaz ve invertaz için yapılmamıştır. Ön hazırlık süresi ortalam 1,5 gündür. Saflaştırma çalışılmamıştır. |
| Honey α-amylase and the effect in starch containing Foods, [69]. | Babacan, S., Pivarnik, L.F., Rand, A.G., (2006) | Makale | α -Amilaz | Diastaz Saflaştırma ve karakterizasyon | Bal | Hollow-fiber ile ultrafiltrasyon yapılmış - Jel filtrasyon sonrası anyon ve katyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Ara basamaklarda konsantrasyon uygulanmıştır. | %3,9 geri kazanım söz konusudur. Flow Through pikler elde edilmiştir. Ara basamaklarda Konsantrasyon uygulanmıştır. Uzun hollow fiber uygulaması mevcuttur. 3 basamaklı tandem saflaştırma IEX ve SEC uygulaması ile alınmıştır. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Isolation, Purification and Characterization of Glucosidases From Three Honey Bee Species (*Apis Mellifera* L., A. Cerana and A. Dorsafa) , [70]. | Julius Pontoh (2002) | Makale | İnvertaz Saflaştırma | İnvertaz Saflaştırma | Bal ve Doku | Diyaliz ve amonyum sülfat çöktürme ile ön hazırlık, FPLC İLE doku ve balda saflaştırma (Superose PG - Hydroxyapetite - Mono S - Superose tandem purifikasyonu) Native page ve Maldı-TOF konfirmasyonu kullanılmıştır. | Diastaz doku ve balda saflaştırılmamıştır. İnvertaz ve diastaz Aktivite testleri için yöntem geliştirilmemiştir. Ön hazırlık süreci uzun, diyaliz ve amonyum sülfat kromatografi uygulaması mevcuttur. Purifikasyon Rezolüsyonu düşük, Geri kazanımı değerleri belirtilmemiştir, uygulaması pratik olmayan bir yöntemdir. 4 ardışık basamak iş yükü barındırmaktadır. Saflaştırma ara basamaklarında konsantrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. |

**Tablo 1.3.** Devam.

| Referans Başlığı | Yazarlar ve Yayın Yılı | Referansın Türü | Enzim Türü | Çalışmanın Amacı | Matriks | Kullanılan Metotlar - Açıklama (Ekstraksiyon, Saflaştırma, Aktivite) | Dezavantajı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| The Enzymes of Honey: Examination by Ionexchange Chromatography, Gel Filtration, and Starch-Gel Electrophoresis, [52]. | Jonathan W. White Jr. & Irene Kushnir (1967) | Makale | Tüm Enzimler | Baldaki Enzimlerin Saflaştırma ve karakterizasyonu | Bal | Diyaliz ile ön hazırlık uygulaması sonrası, DEAE-cellulose, gel filtration Sephadex G-200 ve starch-gel electrophoresis uygulamaları kullanılmıştır. | FPLC saflaştırmaları rezolüsyonu düşüktür. Aktivite tayini nişasta jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım ve validasyon verileri mevcut değildir. Doku numunesi çalışılmamıştır. Enzim saflaştırma eş zamanlı gerçekleştirilmemiştir. |
| **α-GLUKOSİDAZ VE α-AMİLAZ ENZİMLERİNİN, APİS MELLİFERA L. VE ÇAM BALINDAN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI YAKLAŞIMLARI İLE BAL-OLGUNLAŞTIRICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ İÇİN BASİT ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ** | **Akyildiz İ.E., Yetimoğlu Kök E.** | **Doktora Tezi** | **Eş zamanlı α-amilaz, α-glukosidaz** | **Enzim Saflaştırma / tanımlama ve Direk Aktivite Tayini (Diastaz ve invertaz Tayini)** | **Bal ve Hipofarenjiyal Bez** | **Stirred Cell ultrafiltration - Ultradiyafiltrasyon ön hazırlık clean-up ve deriştirme- MPLC enzim saflaştırma (IEX-CHT-SEC) - SDS-PAGE, Aktivite Konfirmasyon - HPLC-PDA enzim aktivite direk tayini** | - |

Tüm bunlara ek olarak, literatür araştırmamızda, çam balı enzimlerinin, *Apis mellifera* L. HPG enzimleriyle karşılaştırılmasının yanı sıra, çam balı matriksinde bu enzimlerin pratik ve eşzamanlı saflaştırılması ve izolasyonu için de bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırma kapsamında sadece salgı balında diastaz pürifikasyonuna bağlı bir çalışma mevcut olup, yayında bahsedilen yöntem maliyetli, tekrarüretilebilirliği düşük ve de Ege çam balını kapsar nitelikte değildir [61]. Mevcut tüm bu yöntemlerdeki zorluk ve kısıtlamaları çözmek adına, çalışmamızda, çam balı ve HPG'de α-glukosidaz ve α-amilazın pratik izolasyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu ve orijin karşılaştırması için yeni ve üstün bir metodoloji geliştirilmiştir.

### 1.3.1. Balın bileşimi ve genel özellikleri

Bal, Codex Alimentarius Commission (2000) tarafından şu şekilde tanımlanmıştır: *A. mellifera* arılarının bitkilerin nektarından veya bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitki emen böceklerin canlı kısımlarındaki dışkılarından üretilen doğal bir tatlı maddedir. Balın içeriği üretildiği botanik floraya, iklim şartlarına, kolooninin sağlığına ve coğrafi etkenlere göre farklılık gösterebilmektedir [13]. Bal ortalama %20 nem, %76 karbonhidrat, % 0,18 kül ihtiva edebilmekte ve bunun yanında fenolik maddeler, proteinler, vitaminler, mineraller, glukoz oksidaz, peroksidaz, invertazlar, amilazlar, ve de katalaz gibi enzimler bulunmaktadır. Baskın monosakkaritler olarak glukoz ve fruktoz oranı botanik orjinine göre farklı olabilmektedir [71]. Balda eser düzeyde bulunan diğer bileşenler ise polenler, pigmentler, proteinler, aminoasitler, alifatik asit tuzları, lipitler, vitaminler, enzimler, minerallerdir. Bal yapısında %50-80'ini prolinin oluşturduğu totalde kütlece %1 oranında aminoasit bulundurur [13]. Baldaki azotun yaklaşık yarısı protein değildir ve çoğunlukla amino asitlerden oluşmaktadır. Prolin, baldaki ana serbest amino asittir ve serbest amino asit içeriğinin yaklaşık yarısını oluşturur. Prolin konsantrasyonları farklı çalışmalarda çiçek ve salgı balları için ortalama olarak 15,8- 96,3 mg/100 g ve 17,1 – 67,4 mg/100 g aralığında rapor edilmiştir [72]. Bunun yanında, balda diastaz (α-amilaz ile β-amilaz), invertaz, glukoz oksidaz bulunmaktadır. İnvertaz ve diastaz enzimleri, nektarın bala dönüşümündeki kimyasal farklılaşmalardan sorumludur. Marshall ve Williams, iki boyutlu (2-D) jel elektroforezi ile balda 19'dan fazla protein bandı tespit etmiştir [14]. White ve Kushnir, kromatografik teknikleri kullanarak, α-glukosidaz, α-

amilaz ve glukoz oksidaza karşılık gelen enzim aktivitelerine sahip bir bal numunesinde 4 ila 7 proteini tespit edebilmiştir [52]. Baldaki enzim aktiviteleri üzerindeki bir diğer inceleme, α ve β-amilaz, katalaz, glukoz oksidaz ve α ve β-glukosidazların varlığını göstermektedir [73]. 490 farklı bal örneğini içeren bir çalışmaya göre, ana mevcut karbonhidratlar fruktoz (% 25 - 45), glukoz (% 25 - 37), maltoz (% 2 - 12), sükroz (% 0,5 - 3) ve diğer oligosakkaritlerdi (% 0.1 - 8) [74]. Sporns ve arkadaşları bazı ballarındaki ortalama karbonhidrat içeriğini test etmiştir [75]. % 35,6 - 40,2 fruktoz,% 32,5 - 37,3 glukoz ve % 0,0 - 6,5 sukroz çalışmaya göre tespit edilmiştir. Balda yirmi üç oligosakkaridin O-α-D-Glukosidik ve O-β-D-glukosidik bağlantıları tanımlanmıştır [27, 28] ve bu bağların çoğunluğu O-α-glukozidik bağlantıya sahiptir. Baldaki oligosakkaritlerin çoğunluğunun varlığı, bal arısı amilaz ve glukozidazının varlığı ve bunun nektar karbonhidratlar üzerindeki etkisiyle ilişkili olduğundan, balda O-α bağlantılı oligosakkaritlerin varlığı, balda α-glukozidaz aktivitesinin varlığı ile ilişkilendirilmiştir [73]. Ek olarak, balda bir miktar β glukosidaz aktivitesi de tespit edilmiştir [76]. Bal 3,2–4,5 arasında bir pH değerine sahiptir. Bu asidik karakter, enzim aktivitesi ile oluşan yan ürünlerden glukonik asit konsantrasyonundaki artıştan ileri gelmektedir [22].

Balın fizikokimyasal değerlendirilmesi, higroskopik yapısı, viskozitesi, kristalizasyon seviyesi, iletkenliği, renk skalası gibi parametreler üzerinden yapılmaktadır. Bal kolay bir sindirimi olan, pek çok hastalık için profilaktik ve iyileştirici nitelikleri dolayısı ile fonksiyonel olarak tanımlanmaktadır [77]. Balın prebiyotik ve kuvvetli antioksidan özelliklerinin yanısıra terapötik yapısı, kalp rahatsızlıkları, sinir sistemi bozuklukları, sindirim sistemi bozuklukları, safra ve idrar yolu enfeksiyonları, gibi pek çok farklı noktada endike olup, geniş spektrumlu bir doğal ajan olarak tanınmaktadır.

### 1.3.2. Çam balı

Salgı balları genel bir tanım ile, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitki emen böceklerin canlı bitkiler üzerindeki salgılarından bal arıları tarafından hazırlanan bal türleridir [78]. Çam balı ise, belirli çam ağaçlarının özsuyu ile beslenen ve bu ağaçların üzerinde yaşayan bir böcek türü olan Marchalina hellenica'dan salgı (Basra salgısı) toplayan bal arıları tarafından üretilen bir tür salgı balıdır [79].

Marchalina hellenica'nın bulunabileceği çam türleri ağırlıklı olarak Türk Çamı (*Pinus brutia*) ve daha az oranda Halep Çamı (*Pinus halepensis*), Sarıçam (*Pinus sylvestris*) ve Fıstık Çamıdır (*Pinus pinea*) [80]. Marchalina hellenica (sin. *Monophlebus hellenicus*) (*Cocciidea: Homoptera*), sadece Türkiye ve Yunanistan'da Türkiye'nin güney Marmara, Ege ve Batı Akdeniz bölgelerinde bulunur [81]. Yaz aylarında çam ağacının özünden elde ettiği pembemsi bir salgı (bal çiği veya basra salgısı) oluşturur. Arılar bu salgıyı toplayarak çam balı haline getirirler. Çam balı Türkiye'de sadece Muğla, Marmaris, Aydın, Kuşadası ve yakın çevresi ile Çanakkale ili ve Kaz dağlarının belirli bölgelerinde üretilmektedir. Çam balı, Türkiye'de %90 oranında üretilen değerli bir salgı balıdır. Geri kalan kısmının büyük bölümü ise Yunanistan'da üretilmektedir. Yunanistan bal üretiminin %60'ı kızılçam, halep çamı ve fıstık çamında yaşayan bu böceğin salgısındandır [79]. Çam balı son yıllarda kaliteli ballar arasında yer almaya başlamıştır. Çam balı, çiçek ballarından daha koyu renkli olup, yerleşim alanlarından ve çevre kirliliğinden uzak çam ormanlarında üretilmektedir [82]. Çam balı çiçek balına göre daha fazla mineral madde, antimikrobiyal ve antioksidan özellik göstermektedir. Mineral içeriği nedeniyle büyük besin değerine sahiptir [83]. Özellikle bazı çam ballarının potasyum miktarı, potasyum kaynağı olarak gösterilebilecek seviyededir. Potasyum insan sinir sistemiyle ve kas yapısı ile doğrudan ilişkilidir. Potasyum, sinirlerin iyi çalışmasını, kasların kasılmasını ve kalp kasının iyi çalışmasını sağlar. Bu sebeple vücut için önemli minerallerdendir. Çam balı yüksek potasyum içeriğine ek olarak, yapısındaki oligosakkaritler sayesinde prebiyotik etkiye sahiptir. Çam balı çiçek balına göre daha fazla oligosakkarit içerdiği için prebiyotik etkisi daha yüksektir ve insan sindirim sistemiyle doğrudan ilişkilidir. İnsan bağırsağında sindirime yardımcı olan *bifidobacteri*a ve *lactobacilli* sayısının artmasını sağlayan prebiyotikler bal içerisinde frukto-oligosakkaritler olarak bulunurlar.

Bal fenolik asit ve flavonoidler açısından da zengin bir maddedir. Polifenollerin analizi balın bitkisel ve coğrafi orjinini tespit etmek için de önemli bir yoldur. Örneğin hesperetin narenciye balları, kaempferol biberiye balları ve quercetin ayçiçek balları için belirteçtir. Avustralya ve Avrupa okaliptüs balları arasındaki fark propolis türevli flavonoidlerin (pinobanksin, krisin ve pinosembrin) miktarlarıdır [84]. Salgı balları yüksek fenolik asit ve flavonoid içeriğiyle de dikkat çekmektedir. Farklı çiçek kaynaklarından elde edilen ballara kıyasla çam balları daha yüksek antioksidan ve

antibakteriyel özelliklere sahiptir [85]. Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilen balların fenolik asit ve flavonoid profilleri HPLC ile tespit edilmiştir. Kaffeik asit, p-komarik asit, pinosembrin ve krisin tüm numunelerde bulunmuştur. Çam ve meşe gibi salgı balları önemli miktarda protokatekuik asit içermektedir. Aksine çiçek ballarında bu bileşik bulunmamaktadır. Bu yüzden protokatekuik asit salgı balları için bir belirteç olabilir. Tüm meşe ballarında önemli miktarda ellajik asit bulunmaktadır. Meşe balı diğer salgı ballarından bu bileşik sayesinde ayrılabilir. Pamuk, yayla gibi tüm çiçek ballarında kaempferol bulunmuştur. Çoğu çiçek balı quercetin içerirken bir kısım örnekte önemli miktarda mirisetin bulunmaktadır. Çam ballarında asıl olarak protokatekuik asit, kafeik asit, şirinjik asit, p-komarik asit, ferulik asit, pinosembrin, krisin, metilşiringat bulunmaktadır [86]. Türk ballarının karakterizasyonu için organik asit profilleri de incelenmiştir. Organik asit açısından en zengin bal çam balıdır. Tartarik, malik, maleik, sitrik, süksinik ve fumarik asit önemli bileşenlerdir. Bunlardan sadece 3 tanesi (malik, sitrik ve fumarik) yayla ve pamuk balında da bulunmaktadır. Bu balların organik asit içerikleri düşüktür. Bazı görüşlere göre kestane balı da organik asit içeriği bakımından çam balına benzemektedir. Malik, askorbik, maleik, sitrik, süksinik ve fumarik asitler ayçiçeği balında bulunmaktadır. Meşe balı en yüksek sitrik asit içeriğine sahiptir. Bu sonuçlar ışığında organik asitlerin farklı botanik orjine sahip balları ayırmada iyi bir parametre olduğu anlaşılmaktadır [86]. Türk ballarının karakterizasyonu için şeker profilleri de çıkarılmıştır. Bir çalışmada sakkaroz, maltoz, glukoz, fruktoz, galaktoz ve arabinoz analizleri yapılmıştır. Çam ve meşe ballarının fruktoz ve glukoz değerleri daha düşüktür. Pamuk ve ayçiçeği balları en yüksek fruktoz glukoz değerine sahiptir. Şeker sayısı açısından da salgı balları daha zengindir. Çam ve meşe ballarının glukoz/nem oranı diğerlerine göre daha düşüktür. Kestane dışındaki çiçek ballarında glukoz değeri fazla farklılık göstermemektedir. Kestane balının glukoz değeri çam balına benzerdir. Bu bakımdan balların cins tespitinde şeker profillerinden yararlanılabilir.

Bir diğer çam balının fizikokimyasal özelliklerini aydınlatma odaklı çalışmada ise 13 Türk çam balında SPME yöntemi ve GC-MS ile uçucu bileşenler analiz edilmiştir. 42 farklı uçucu bileşen tespit edilmiştir. Bunlardan nonanal, benzen, 4-hegzen-3-ol, α-pinen ve 2-heptanonun çam balına özel bileşenler olduğu anlaşılmıştır. SPME ekstraksiyon metodunun floral kaynak belirlemek için özellikle balçiğ

elementiyle karakterize edilen çam balı gibi ballar için polen analizine alternatif olabileceği önerilmiştir [87]. Çam balının bölgesel bir ürün olması dolayısıyla literatür ve referans kaynak miktarı diğer ballara oranla çok daha azdır. Bu bal türünde invertaz ve diastazın miktarlandırılmasına yönelik çalışmalar yer almak ile birlikte, bu enzimlerin bu bal türünden izolasyonu ve saflaştırılmasına yönelik herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

### 1.3.3. Nektar

Nektar, başta çiçekler olmak üzere bitkilerin farklı kısımlarındaki salgı bezleri veya nektarlar tarafından tatlı bir karbonhidrat salgısıdır [88]. Bal arıları bu karbonhidrat karışımını toplar ve bir besin rezervi olarak peteklerinde depolar. Bu nedenle, nektarın kimyasal bileşimi, balın kimyasal bileşimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilmektedir. Karbonhidratlar, nektarın ana bileşenidir ve konsantrasyonları bitki türlerine ve çevresel koşullara bağlı olarak yüzde 5 ila 60 arasında değişir [89]. Glukoz, fruktoz ve sükroz, nektardaki ana karbonhidratlardır ve bu karbonhidratların oranı da ve bitki türlerine göre değişir [90]. Nektarda sükroz dışındaki oligosakkaritlerin varlığı da araştırmacılar tarafından ele alınmıştır [91]. Karbonhidratlara ek olarak, analiz edilen hemen hemen tüm nektarlarda amino asitler tespit edilmiştir, ancak bunlar düşük konsantrasyonda bulunmuştur [89]. Lipitler ayrıca birçok nektarda diaçilgliserolleri de içerecek şekilde bulunmuştur [90]. Zincir uzunlukları C16 ve C20 arasında olan doymuş yağ asitlerinden oluşan asetik ve β-asetopalmitik asitler ve triaçilgliseroller tespit edilmiştir. Nektarların eser miktarda alkaloid ve fenolik içerdiği de gösterilmiştir [90].

### 1.3.4. Bal arısı

Bal arıları, kolonilerde yaşayan oldukça sosyal böceklerdir. Nektarı toplar, bala dönüştürürler ve bu materyali petek hücrelerinde bir besin rezervi olarak depolarlar. Bal arılarının insanlar için önemi, bal ve balmumu, propolis ve arı sütü gibi yan ürünlerin üretimi ile sınırlı değildir. Arıların tozlaşmadaki rolü de tarımda önemli bir etkiye sahiptir [92, 93]. Daha yakın zamanlarda, seçilmiş insan ve hayvan hastalıklarının tedavisi için bal arısı zehirinin kullanımına da ilgi duyulmuştur [94]. *Apis mellifera* L. dünyada üretilen balın çoğundan sorumlu olan bal arısıdır [95]. *Apis mellifera* L., dünyanın birçok bölgesinde bal üretimi yapan baskın tür olarak tanımlanmıştır [2].

Çalışmada kullanılan bal arısı türü olan *Apis mellifera* L. görüntüsü Şekil 1.1.'de verilmektedir.



**Şekil 1.1.** *Apis mellifera* L. (Bal arısı).

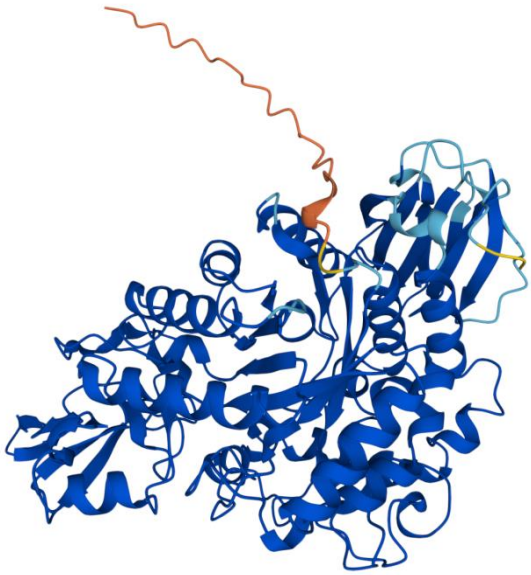
### 1.3.5. Arılarda besin sindiriminin fizyolojisi

Bal arıları temel besin kaynakları olarak nektar, polen ve su tüketirler [96]. Nektar karbonhidrat bakımından zengindir, polen ise protein açısından zengindir (kuru bazda % 8 ila 40) ve bazı lipitleri de içermektedir (kuru bazda % -5). Nektar ve polen, çok az miktarda amino asit, mineral ve vitamin içermektedir [89]. Bal arısının ağzında bu besinler baş ve göğüste bulunan bezlerden salgılanan sıvı ile karıştırılır. Hipofaringeal bezler başın yanlarında bulunur ve her bez, kısa boyunlar tarafından eksenel kanallara bağlanan çok sayıda küçük oval hücresel gövdeden oluşur [97]. Genç bal arısı işçilerinde, bu bezler kraliçe için arı sütü (arı sütü) salgılar ve yaşlı işçilerde bu bezler küçülür ve α-glukozidaz ve α-amilaz salgılar [66, 98, 99]. İşçi bal arılarının hipofarengeal bezlerinin proteaz salgılamadığı tespit edilmiştir. Bal kesesinde, büyük gıda parçacıkları (polen taneleri), proventrikülün ventriküle filtrelenmesiyle süzülür ve nektar karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve mineraller gibi çözünür maddeler kalır. Proventrikül, sindirim enzimlerinin ventrikülden bal kesesine geçmesini engeller [100]. Bal kesesinde amilaz ve glukozidaz, nektar karbonhidratlarını bala dönüştürmeye başlar. Sıvı gıdanın bal kesesinden ventriküle geçişi, gıdanın molaritesi ve hacmi, bal arısı aktivitesi ve mevsimi içeren bir dizi faktör tarafından düzenlenir [101, 102]. Bal arılarının homojenize edilmiş bağırsak örneklerinde (ventrikülüsten rektuma) çok çeşitli sindirim enzim aktiviteleri tespit edilmiştir [31].

Yazarlar, α-glukozidaz, lösin aminopeptidaz ve asit fosfataz aktivitelerinin çok yüksek olduğunu, buna karşın β-glukozidaz, β-galaktosidaz, peptidaz, alkalin fosfataz ve lipaz aktiviteleri orta düzeyde tespit edilmiştir. Yazarlar, bal arılarının ventrikülünde dört tür sindirim proteazının varlığını da bildirmiştir [103]. Moritz ve Crailsheim, ventriküldeki proteolitik aktivitenin bal arılarının yaşına ve fonksiyonel durumuna göre değiştiğini gösterdi [99]. Von der Ohe, bal arıları tarafından tüketildikten sonra bal kesesinde nektar sakkarozunun %80 oranında azaldığını bulmuştur [104]. Bal kesesindeki sükrozun azalması, bal arılarının beslenme sistemindeki α-glukozidaz varlığıyla ilişkiliydi [105, 106]. Kalan sükroz, ventrikülde hidrolize edilir ve elde edilen glukoz ve fruktoz, hemolenf içine taşınır [101, 102]. Bu sonuçlar, sükrozun hemolimfe taşınmadığını gösteren Arslan ve Woodring'in sonuçlarını da desteklemektedir [107, 108]. Bal arılarında monosakkaritlerin (glukoz ve fruktoz) mobilizasyonu çok hızlıdır. Crailsheim ve Gmeinbauer, 1.0 M glukoz çözeltisinin beslenmesinden 2 dakika sonra hemolenfte glukozun mevcut olduğunu bulmuşlardır [101, 102, 109]. β-glukosidaz aktivitesi ise bal arılarının orta bağırsağı ve rektumunda tespit edilmiştir [31]. Bal arısı bağırsağındaki β-glukosidaz varlığının nedenleri, polendeki selülozik materyallerin varlığı [110, 96] ve bazı nektarlarda β-glukopiranositlerin varlığı olabilmektedir [106].

### 1.3.6. Bal ve bal arılarında α-glukosidaz (invertaz)

α-Glukozidaz (EC 3.2.1.20; α-glukozit glukohidrolaz), α-d-glukozun birlikte salınmasıyla oligo- ve polisakkaritlerin indirgeyici olmayan ucundan α-bağlı glukoz monomerlerinin, terminalden hidrolize eder [111]. Bu enzimin yaygın isimleri glukoinvertaz, glukosidosukraz, maltaz veya maltaz-glukoamilazdır. Bal ve bal arısı α-glukosidazına genellikle invertaz adı verilir [98, 112, 113]. Bununla birlikte, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), bu terimin yalnızca β-fruktofuranosidaz (EC 3.2.1.26; b-fruktofuranoside fruktohidrolaz) için kullanılmasını önermiştir. Webb, baldaki sükroz hidrolize eden enzimin β-fruktofuranosidaz (invertaz) olmadığını gösteren ilk kişiydi [111]. Baldaki α-glukosidaz aktivitesi 1920'den beri rapor edilmektedir [114, 115]. İnvertaz enzimine ait şematik 3 boyutlu ribbon diagram-model sunumu Şekil 1.2.'de verilmiştir.



**Şekil 1.2.** *Apis mellifera* L. invertaz enziminin ribbon diagramı.

Kaynak; Uniprot, Entry name; Q17058 · MAL1_APIME, EC number; EC:3.2.1.20, Primary Accession; Q17058, Web link; https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q17058/entry.

### 1.3.6.1. Bal ve bal arılarından α-glukosidazların saflaştırılması

Baldan α-glukosidazın saflaştırılmasına yönelik belgelenmiş ilk girişim, %80 etanol çöktürülmesi kullanılarak Nelson ve Cohn tarafından gerçekleştirildi [114]. Yazarlar çökeltide α-glukozidaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Papadakis, etanol çökeltmesinin ardından alümina kullanan bir kromatografik adım ekledi ve α-glukosidaz aktivitesi içeren bir fraksiyon tespit etmiştir [116]. White ve Kushnir, baldan saf α-glukosidazlar elde etmek için anyon değişimi (DEAE-selüloz) ve jel filtrasyon kromatografisi ve nişasta jel elektroforezi kullandı [52]. Yazarlar, anyon değişim kromatografisinden α-glukosidaz aktivitesi içeren bir bağlanmamış şekilde dört ayrıştırılmış fraksiyon buldular. Low, amonyum sülfat çöktürme, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisinin bir kombinasyonu kullanılarak baldan glukosidazları saflaştırdı [76]. Bu yazarlar, bir sodyum klorür gradyanı kullanan anyon değişim kromatografisi ile α-glukosidaz aktivitesi içeren iki (bir bağlı olmayan ve bir bağlı) fraksiyon buldular. Bağlı fraksiyon jel filtrasyon kromatografisine tabi tutulduğunda, yazarlar α-glukosidaz aktivitesi içeren iki fraksiyon buldular. Bu fraksiyonlar, α-

glukosidaz-1 ve α-glukosidaz-2 olarak tanımlandı ve bu prtoeinler SDS-PAGE ile sırasıyla 73 ve 54 kDa nispi moleküler kütlelere sahipti. Huber ve arkadaşları, bal arılarından (*A. mellifera* L.) α-glukosidazları saflaştıran ilk kişilerdi [30, 117, 118]. Bu saflaştırmadaki ilk adım, çözünürlüğe dayalı iki α-glukosidaz fraksiyonu veren amonyum sülfat çöktürmesi içeriyordu. Yüksek oranda çözünür (>% 80 amonyum sülfat) α-glukosidaz süpernatandan geri kazanılırken, daha az çözünür olan ise çöktürülmüş pelletten geri kazanılmıştır. Yazarlar, yüksek çözünür ve daha az çözünür α-glukosidazları sırasıyla α-glukosidaz-1 ve α-glukozidaz-2 olarak tanımladılar. Amonyum sülfat işleminin ardından, hidroksiapatit, anyon değişimi (DEAE Sephadex), jel filtrasyonu (Sephadex (3-200 ve G-100) ve afinite kromatografisi dahil olmak üzere bir dizi saflaştırma aşaması kullanıldı. Bunların jel elektroforezi (SDS-PAGE) iki saflaştırılmış glukosidaz, sırasıyla α-glukosidaz-1 ve -2 için 93 ve 78 kDa nispi moleküler kütleler göstermiştir. Takewaki ve arkadaşları, saflaştırma protokolünü basitleştirmek için bal arılarından (*A. mellifera* L.) α-glukosidaz saflaştırmanın ilk adımında farklı bir yaklaşım kullandı [119]. Başlangıçta, tüm α-glukosidazları amonyum sülfat (%90) ile doyurarak çöktürme işlemi gerçekleştirildi; çökelti daha sonra bir Celite 545 kolonu üzerine transfer edildi. Enzimler, bir amonyum sülfat gradyanı uygulanarak Celite'den ayrıştırıldı. Bu teknik ile iki α-glukosidaz (α-glukosidaz-1 ve -2) tanımlandı. α-Glukosidaz-1'in daha fazla saflaştırılması, katyon değişimi (CM selüloz) ve jel filtrasyonu (Sephadex G-100) kromatografisi kullanılarak gerçekleştirildi; α-glukosidaz-2 için anyon değişimi (DEAE selüloz), katyon değişimi (CM selüloz) ve jel filtrasyon kromatografisi kullanıldı. Yazarlar, bu enzimlere ek olarak, anyon değişim kromatografisinden bağlı fraksiyonda bulunan üçüncü bir α-glukosidazı bildirdiler. Daha yakın zamanlarda, Kubo ve arkadaşları, anyon değişimi (Mono Q) ve jel geçirgenliği (Superose 12) kromatografisi kullanarak yetişkin bal arılarının (*A. mellifera* L.) hipofarengeal bezlerinden α-glukosidazı saflaştırdı [66]. Yazarlar, SDS-PAGE ile 70 kDa'lık nispi moleküler kütlesine dayanarak α-glukozidaz-2 olarak tanımladıkları tek bir glukozidaz buldular. Yazarlar, bu α-glukozidazın, bal arılarının daha önce tanımlanmış bir α-glukosidaz-2 izoformu olabileceğini öne sürdüler. *A. mellifera*'nın hipofaringeal bezlerinden tek bir α-glukosidaz izole edilmiş ve saflaştırılmıştır ve SDS-PAGE ile 70 kDa'lık bir MW'ye sahip olduğu bulunmuştur [66]. Takenaka ve Echigo, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel

elektroforezi) kullanılarak baldan izole edilen α-glukosidaz-1 ve -2'nin nispi moleküler kütlelerinin (Mr'ler) sırasıyla 73 ve 54 kDa olduğunu buldu [120]. SDS-PAGE ile bal arısından (*A. mellifera* L.) elde edilen α-glukosidaz-1'in Mr'lerinin 93 kDa [117] ve 94 Da [119] olduğu rapor edilmiştir. Bal arılarından (*A. mellifera* L.) α-glukosidaz-2'nin Mr değerleri 78 kDa [30] ve 76 kDa [119] olarak bulundu**.** Literatür yorumu olarak, ortalama 73 kDa'lık molekül ağırlığına sahip baldan elde edilen α-glukosidaz-1, işçi bal arılarından elde edilen α-glukozidaz-2'ninkiyle eşleşmektedir. Bal arılarından (*A. mellifera* L.) elde edilen α-glukosidaz-1 ve -2'nin izoelektrik noktaları (pI) sırası ile 7.3 [117] ve 6.5 [30] olarak bulunmuştur.

#### 1.3.6.2. İnvertazın glikoprotein olarak karakterizasyonu ve sıcaklık ile pH optimumu

Bazıları polipeptit sentezi sırasında ilave edilmesine rağmen, karbonhidratlar, translasyon sonrası modifikasyon (PTM) olarak hem N- hem de O-bağlantıları yoluyla polipeptitlere bağlanabilmektedir [121]. Çoğu protein ribozom üzerinde sentezlenirken, karbonhidrat ilavesi protein taşınması sırasında Golgi kompleksinde gerçekleşir. Amino karbonhidrat galaktozamin, glukozamin ve mannosamin, *A.mellifera*'nın balından ve bal arılarından izole edilen glukosidazlarda tanımlanmıştır [30, 117, 118, 120]. Bu nedenle bu enzimler glikoproteinler olarak sınıflandırılabilmektedir. Sindirimdeki aktif enzimlerin/proteinlerin üzerindeki karbonhidrat kısımlarının (glikanlar) varlığının, sindirim proteazlarının proteolitik aktivitesine karşı koruma sağladığı varsayılmaktadır [122].

Karbonhidratların bileşimi ve düzenlenmesi ve protein omurgası üzerindeki glikosilasyon bölgesi, glikoprotein çeşitliliğini yaratmaktadır. Bu çeşitlilik, mikroheterojenlik veya çevresel heterojenlik olarak adlandırılır [123]. Mikro-heterojenliğin bir sonucu, multiformlar veya glikoformlar olarak adlandırılan bir proteinin form çeşitliliği varlığı söz konusudur ve bundan dolayı glikoprotein saflaştırması oldukça zordur. Packer ve arkadaşları, iki boyutlu (2-D) jel elektroforezi ile glikoproteinlerin çok biçimli doğasını, moleküler ağırlık ve/veya pI'da farklılık dolayısı ile göstermiştir [124]. Huber, α-glukosidaz için polidispersif fakat tek bir bant rapor etmiştir [117]. Bal ve bal arılarından elde edilen α-glukosidazlar glikoproteinler olmalarına rağmen, jel elektroforezi ile bu enzimlerin glikoformlarının tanımlandığına

dair hiçbir rapor bulunmamaktadır. Bununla birlikte White ve Kushnir, α-glukosidaz aktivitesi içeren bal proteinlerinin jel elektroforezinden birkaç fraksiyon bildirmiş ve bunların izoenzimler olduğunu varsaymışlardır [52]. Baldan elde edilen α-glukosidazların sıcaklığı ve pH optimumunun sırasıyla 40 ila 45 °C ve 6.0 olduğu bulunmuştur [120]. Bal arılarından elde edilen α-glukosidaz-1'in pH optimumunun Huber tarafından 6.5 [117], ve Takewaki ve arkadaşları tarafından 5.0 [119] olduğu bulunmuştur. Bal arılarından elde edilen α-glukosidaz-2'nin pH optimumunun Huber ve Mathison tarafından 6.5 [30] ve Takewaki ve arkadaşları tarafından 5.0 [119] olduğu bulunmuştur. Bal arılarından α-glukosidaz-1 ve α-glukosidaz -2 için yayınlanmış optimum sıcaklık değerleri bulunmamaktadır.

#### 1.3.6.3. İnvertaz katalitik mekanizması

İnvertaz, balın olgunlaşma sürecinde sakkarozu, arı için fizyolojik olarak kullanılabilen glukoz ve fruktoza dönüştürür. İnvertaz hem sakkarozu hem de maltozu hidrolize eder [125]. Bu enzimin ayrıca transglukozidaz etkileri vardır. Aktif invertaz miktarı, yaş, fizyolojik evre, besin, arı kolonisinin durumu, sıcaklık ve bal akışının yoğunluğu veya türü gibi birçok özelliğe bağlıdır [24, 113]. Glikosidazlarla (α ve β-glukosidazlar dahil) O-glikosidik hidroliz mekanizması, bir çift yer değiştirme olarak Koshland tarafından önerilmiştir [126]. Bu teori, Kempton ve Withers tarafından doğrulanmıştır ve aynı zamanda, bu mekanizmaya karşı hiçbir çelişkili bilimsel kanıt olmamak ile birlikte uzun yıllardır biyokimyasal araştırmalar yürütülmektedir [127]. Sinnott, Koshland ve Quaroni, glikosidaz katalizi, enzime substratın bağlanmasıyla başlatıldığını öne sürmüş ve ilk aşama, bir karbonyum/oksonyum iyonu oluşturmak için bir aktif bölge (histidin) ile glikosidik oksijenin protonasyonunu ve ardından hidrolitik ürünün salınmasını ve bunu bir glikosil-enzim ara ürünü veya korumalı bir ara ürün takip etmesini içerir şeklinde hidroliz reaksiyonunu açıklamıştır [126, 128, 129]. Bu teoriye göre ikinci adım, anomerik merkezde bir su molekülünün nükleofilik saldırısını takiben hidrolitik ürünün salınmasını içermektedir. Nükleofil bir karbonhidrat ise, son ürün bir oligosakkarittir ve genel enzimatik reaksiyona transglikosilasyon denir.

Bazı Avrupa ülkelerinde invertaz aktivitesi tayini balın tazeliği, ısınma veya saklama koşulları ile ilgili bir parametre olarak kullanılmaktadır. Avrupa bal Komisyonu, balın kalitesinin bir perspektif kriteri olarak invertaz aktivite tayinini

önermektedir [39, 130]. Diastaz aktivitesi tayininden daha hassas bir parametre sunar ve belirlenmesi daha kolaydır [24, 56].

### 1.3.6.4. İnvertaz aktivite testleri literatür bilgisi

İnvertaz ölçümü, birçok ülkede tazelik göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır, çünkü bu enzim özellikle ısıya ve depolama koşullarına karşı hassastır. Uluslararası Bal Komisyonu, özellikle dikkatle işlenmiş veya taze bal için minimum invertaz aktivite değerleri önermiştir. Şimdiye kadar, sonuçlar Hadorn birimleri (invertaz sayıları) cinsinden ifade ediliyordu. Ancak son deneyler, bunları uluslararası birimlerde ifade etmenin daha iyi olacağını gösterdi. İnvertaz aktivitesi genellikle Siegenthaier yöntemi kullanılarak belirlenmektedir. Substrat olarak baldan glukoz ve para-nitrofenole invertaz tarafından ayrıştırılan p-Nitrofenil-α-D-glukopiranozid (pNPG) kullanılır. pH'ı 9.5'e (genellikle trizma bazı veya sodyum hidroksit kullanılarak) yükselterek enzimatik reaksiyon durdurulur ve aynı zamanda nitrofenol, hidroliz olmuş substrata eşdeğer olan nitrofenol anyonuna (nitrofenolat) dönüştürülür ve 400 nm'de absorbansı spektrofotometrik olarak belirlenir. Bal invertaz aktivitesi, ölçülen abosrbans değerinin 158.94 faktörü ile çarpılarak hesaplanır ve bir kilo bal için U/kg biriminde hesaplanır. Daha sonra elde edilen değer, invertaz sayısı (IN) olarak ifade edilebilir. IN, standart test koşulları altında 100 g balda invertaz tarafından 1 saatt inkübasyonda hidrolize edilebilen gram başına sakkaroz miktarını göstermektedir [39]. Hadorn ve Zürcher, bu bal enziminin analizi için polarimetrik bir yöntem önermiştir [131].

İnvertaz aktivitesi genellikle, bal invertazının substrat olarak kullanılan 4-nitrofenil-α-D-glukopiranozit ile reaksiyonundan sonra oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümüne dayanan Siegenthaler prosedürü Siegenthaler ile belirlenir [132]. Uluslararası Bal Komisyonu'nun uyumlaştırılmış yöntemleri bu yöntemi içermektedir [53]. Bunun yanında alternitf bir diğer teknik olarak, Lichtenberg-Kraag ve arkadaşları, FT-MIR-ATR ile invertazı tahmin edebilen bir yöntem önermiştir [133]. İnvertazın sonuçlarını ifade etmek için uluslararası birimleri (U/kg) önerilmiş olup geleneksel invertaz aktivite sonuçları U/kg cinsinden rapor edilmeye başlanmıştır [130]. İnvertaz aktivitesinin belirlenmesine ilişkin gerçekleştirilmiş çalışmalarda öne çıkan literatür bilgisi Tablo.2'de özetlenmiştir.

### 1.3.7. Bal ve bal arılarında α-amilaz (diastaz)

Bal, en yüksek konsantrasyonlardaki proteinler olarak diastaz ve invertaz içermektedir. Bu enzimler, balda nektar ve arılarının tükürük sıvıları ve faringeal bez salgıları kaynaklı bulunmaktadır [112, 46]. α-Amilaz baldaki en önemli enzimlerden biridir. Hipofaringeal bezdeki toplam proteinin yaklaşık %2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir [43]. Diastaz aktivitesi (α-, β-, γ-amilaz), diğer enzimlerde olduğu gibi balın ısıtılması ile azalır [45, 134, 38, 135]. Diastaz aktivitesinin azalması, uygulanan sıcaklık ve ısıtma süresi ile doğru orantılıdır. Diastaz aktivitesi ve hidroksimetilfurfural içeriği, ölçümü balın ısınmasını doğrulamak için kullanılabilen kalite kontrol parametreleridir [38, 136]. Uzun süreli veya uygun olmayan depolama veya bala yabancı şeker ilavesi sırasında da diastaz aktivitesinde bir azalma meydana gelir [44]. Bal, bir sakkaroz çözeltisi, hidrolize nişasta veya yüksek fruktoz içeriğine sahip mısır şurubu (HFCS) ilave edilerek tağşiş edilir ise, balın seyreltilmesi kaynaklı diastaz aktivitesinde bir azalma gözlenebilir.

Farklı mikroorganizmalardan elde edilebilen α-amilaz enzimlerinin bu tağşiş uygulanmış bala eklenmesi ile diastaz değerleri suni olarak yükseltilebilir [46]. Uluslararası Bal Komisyonu'nun Bal Kalitesi ve Uluslararası Düzenleyici Standartlarına göre, diastaz aktivitesi, diastaz numarası (DN) olarak ifade edilen değer 8'den küçük veya ona eşit olmamalıdır. Goethe ölçek numarasına karşılık gelen Schade ölçeğinde DN, 100g bal için 40°C'de 1 saatte hidrolize edilen 0,01 g nişasta olarak tanımlanmaktadır. Diastaz aktivitesi, işleme ve harmanlamadan sonra veya tüm perakende ballar için kalite ve tazelik parametresi olarak mutlaka tayin edilmelidir [137]. Son zamanlarda, farklı gıda ürünlerinde bal kullanımının artması nedeniyle bu enzim daha fazla ilgi görmektedir [138, 139]. Avrupa'da balın minimum α-amilaz aktivitesi değerleri için sadece yasal düzenlemeler (Direktif 2001/110/EC) değil, aynı zamanda benzer Codex Alimentarius düzenlemeleri de (CODEX STAIN 12-1981) bulunmaktadır. α-Amilaz ayrıca bira üretimi, fırıncılık, tekstil kağıdı üretimi, deterjan, şeker endüstrilerinde ve glukoz, fruktoz ve maltoz üretmek için nişasta sıvılaştırmasında sıklıkla kullanılmaktadır [140]. Bu enzim endüstriyel kullanım için faydalı olmasına rağmen balda α-amilaz hakkında çok az literatür verisi bulunmaktadır [137]. Baldaki amilazın kökeni, temel olarak arıların tükürük salgılarına atfedilmektedir. Bu sonuç,

şekerle beslenen (nektar kaynağını elemek için) arılar tarafından üretilen baldaki amilazın varlığına ve bal amilaz ile arı amilaz (hipofaringeal doku amilazı) arasındaki benzerliklere dayanmaktadır [141, 142]. Bu benzerlikler, ayrıca katalitik aktivite için klorür iyonlarına duyulan ihtiyaç, asetilleyici ajanlar tarafından inhibisyon ve nektar ve polen amilazları ile karşılaştırıldığında arı ve bal amilazlarındaki benzer pH duyarlılıkları ile desteklenmektedir [141].

Bal arısı tükürük sistemi iki salgı bezinden oluşmaktadır: kafada bulunan sefalik bez ve göğüste bulunan torasik bez. İki bez, ağız kısımlarında açılan ortak bir kanala bağlıdır [143]. Torasik ve sefalik tükürük bezleri, ortak bir embriyonik kökene ve boşaltım kanalına sahip olmalarına rağmen farklı tipte salgılar üretir ve farklı işlevlere sahiptir [144]. Simpson, sefalik bezin yağlı bir salgı üretirken, göğüs bezi tarafından üretilen salgının sulu ve sindirim enzimlerini ağırlıklı olarak içerdiğini belirtmiştir [115]. Diastaz, nişastanın maltoza dönüşümünü katalize eder. Balda pratik olarak nişasta yoktur fakat nektar kaynaklı oligosakkarit yapıları mevcuttur, Bu oligosakkaritlerin hidrolizi ve monosakkarit içeriği yüksek bal oluşumu için amilaz enzimleri bal arıları tarafından bala eklenmektedir ve bu enzimler arının fizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Diastaz enzimine ait şematik 3 boyutlu ribbon diagram-model sunumu Şekil 1.3.'de verilmiştir.



**Şekil 1.3.** *Apis mellifera* L. diastaz enziminin ribbon diagramı.

Kaynak; Uniprot, Entry name; Q9U8X5_APIME, EC number; EC:3.2.1.1, Primary Accession; Q9U8X5, Web link; https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9U8X5/entry.

### 1.3.7.1. Diastazın saflaştırılması

Literatürde balın amilazını ayırmak ve saflaştırmak için birkaç çalışma gerçekleştirilmiştir. Barhate ve arkadaşları çeşitli moleküler ağırlık dışlama limitine sahip ultrafiltrasyon (UF) membranları ile baldaki enzimlerin ayrımını incelemişler ve proseste mikrofiltrasyon ve UF membranlarının bir kombinasyonunu kullanarak saflaştırılmış bal ve enzimle zenginleştirilmiş bal üretmenin mümkün olduğunu belirlemişlerdir [145]. Schepartz ve Subers, 2 ana fraksiyon sağlayan, ancak enzimlerin kararsız yapıları nedeniyle havuzlanmış fraksiyonları karakterize edemeyen iyon değişimli selüloz kromatografisini kullanmıştır [146]. White ve Kushnir, diyaliz edilmiş bal konsantrelerinin Sephadex jel filtrasyonu ile fraksiyonlamasını gerçekleştirdi [52]. Yazarlar, α-amilaz ve α-glukosidaz bileşenleri için ayrı protein sinyalleri almayı başardılar. Sırasıyla yaklaşık 24 kDa ve 51 kDa moleküler ağırlıkları bu çalışma sonunda belirtilmiştir. Ancak yazarlar, bu hedeflenen proteinlerin kolon ile etkileşimini gözlemledikleri için bu değerlerin sadece yaklaşık değerler olduğunu da belirtmişlerdir. Bergner ve Diemair, bal proteinlerini Sephadex G-200 üzerinde 5 farklı fraksiyona ayırdı ve bunlardan birinde amilaz aktivitesini gösterdi [147]. Babacan ve Rand amilazı, içi boş fiber kartuş, Sephadex G-100 jel filtrasyonu, anyon ve katyon değişim kromatografileri ve ultrafiltrasyon yoluyla baldan saflaştırmaya çalıştı [64]. Bu enzimin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile yaklaşık 57 kDa olarak tespit edilmiştir. Bal enziminin kromatografik davranışının incelendiği bir diğer çalışmada, arı ile bal α-amilaz'ı arasında büyük benzerliğin söz konusu olduğu görülmüştür [43]. Nagai ve arkadaşları aynı metodolojiyi kullanarak narenciye, hurma ve salgı balından diastazı saflaştırmışlardır [58, 59, 61].

İzolasyon yöntemine göre bal, 4°C'de distile suya karşı çok sayıda serbest şekeri uzaklaştırmak için diyaliz membranı kullanılarak 3 gün süre ile diyaliz edildi. Diyalizat 50.000 *x g*'de 1 saat santrifüjlendi ve süpernatanlar havuzlandı ve ardından liyofilize edildi. Sonrasında, kurutulmuş numune (400 mg), 40 mL 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içinde çözülmüştür. Çözelti, daha önce aynı tamponla dengelenmiş bir EAE-Toyopearl 650M kolonuna (1.0 x 5.0 cm) enjekte edilmiştir. Enzim bu kolonda absorbe edilmediği görülmüştür. Alıkonma göstermeyen aktif fraksiyonlar bir araya toplanmış ve aynı tamponla dengelenmiş bir CM-Toyopearl 650M kolonuna (1.0 x 4.0

cm) enjekte edilmiştir. Enzimin esas olarak hidrofobik özelliklerinden dolayı kolonda da alıkonmadığı düşünülmüştür. Konsantre enzim çözeltisi, daha önce aynı tamponla dengelenmiş bir Toyopearl HW-55F kolonuna (1.5 x 75 cm) yüklenmiştir. Enzim bu rezin uygulamasından sonra başarı ile elde edilebilmiştir. Uygulanan son prosedür doğrultusunda enzim, ham özüt ile karşılaştırıldığında %49'luk bir geri kazanım oranı ile 6.5 kata kadar saflaştırılabilmiştir. Saflaştırılmış enzim, SDS-PAGE analizi sonrasında, yaklaşık 58 kDa moleküler ağırlığa sahip tek bir protein bandı olarak görülmüştür. Literatürün kapsamlı incelemesi, balın amilaz bileşenini saflaştırmak ve incelemek için yüksek verimli ve pratik bir prosedür ortaya koymamaktadır. Literatürdeki yöntemlerin geri kazanımı düşük ve uzun ön işlem vede saflaştırma basamakları içerdiği görülmüştür.

### 1.3.7.2. Bal arısı diastaz karakterizasyonu - sıcaklık ve pH optimumu

Baldaki amilaz aktivitesi uygulanan sıcaklık ve balın tazeliği ile farklı değerler gösterebilmektedir [148, 149, 150]. Daha önce, bu enzimin bal matriksi içerisinde 85°C'lik bir ısıl işlemde 11 dakika boyunca yaklaşık %77 aktivite kaybı olduğu deneysel olarak tespit edilmiştir [44]. Diğer araştırmacılar, baldaki amilazın yüksek depolama sıcaklıklarına direnci için benzer bulgular bildirmiştir. Lampitt ve arkadaşları, 60˚C, 65˚C ve 70˚C sıcaklıkları için sırasıyla 20 saat, 8 saat ve 3 saat yarı ömür değerleri bildirmiştir [148]. White ve arkadaşları, sırasıyla 40˚C, 50˚C, 60˚C ve 70˚C sıcaklıklarda 31 gün, 5,4 gün, 1 gün ve 5,3 saat yarı ömür değerleri bildirmiştir [151]. Narenciye balından elde edilen enzim, 40°C'nin altında stabil kalabilmiş ancak 50°C'nin üzerinde denature olarak aktivitesini yitirmiştir [58]. Bal amilazının doğal ortamında saf halinden daha fazla ısıya dayanıklı olduğu bulunmuştur [152, 153, 154]. Saflaştırılmış bal amilazının doğal ortamından uzaklaştırıldığında termal direncindeki azalma, enzim konsantrasyonuna da bağlı olabilmektedir.

Bal invertazının, balı tampon içinde seyreltildiğinde, seyreltilmemiş formdaki enzime kıyasla 50˚C'de ve 60˚C'de ısıl işleme karşı yaklaşık 24 kat daha az dirençli olduğu bulunmuştur [151]. Çoğu α-amilazın, moleküle güçlü bir şekilde bağlı bir $Ca^{2+}$ atomu tarafından stabilize edildiği bilinmektedir ve enzimin üçüncül yapısı için bu mineralin gerekli olduğu bulunmuştur [155]. $Ca^{2+}$'nın bazı amilazları ısı denatürasyonuna karşı stabilize ettiğine dair raporlar olmasına rağmen, bu tüm α-

amilazlar için genelleştirilememektedir [156, 157]. Babacan ve Rand, çeşitli metal iyonlarının ticari olarak temin edilebilen ballardan amilaz aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır [64]. Enzim $Cu^{+}$, $Mg^{2+}$ ve $Hg^{2+}$ tarafından inhibe edilirken $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$ ve $Zn^{2+}$ enzim aktivitesini etkilememiştir. 100 mM EDTA'nın eklenmesi, amilaz aktivitesini neredeyse tamamen ortadan kaldırmış ve bu enzimin aktivite ve stabilite için metal iyonları gerektirdiğini düşündürmüştür. Aksine, 100 mM $Ca^{2+}$' mevcudiyeti, aktiviteyi büyük ölçüde arttırmış ve bu bulgu aktivitenin ortaya çıkması ile enzimin stabilitesi için kalsiyumun gerekli olduğunu öne sürülmüştür. Babacan ve Rand, ticari olarak temin edilebilen baldan elde edilen amilazın pH 4.6-5.3'te optimal aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir [64]. Narenciye balından elde edilen α-amilaz enzimi ise pH 4.0'da stabil kalmış olup ve pH 4.0-8.0'de orijinal aktivitesinin %82'sinden fazlasını korumuştur.

### 1.3.7.3. Diastaz katalitik mekanizması

Nektarın bala dönüşümü aşamalı bir süreçtir ve nektar toplayıcı bal arılarının kovana dönüşleri sırasında süreç başlamaktadır [158]. İşçi arılar tarafından toplanan nektar, tükürük ve hipofaringeal bezlerinden salgılarla karıştırılır [56]. Kovanda nektar arıdan arıya geçtiğinde daha fazla salgı eklenir ve nektarın bala dönüşmesini sağlanır [159]. Bal yaklaşık olarak %38 fruktoz ve yaklaşık olarak %31 glukoz içermek ile birlikte farklı di- ve tri-sakkaritleri içerir [12]. Arılar, sakkarozu baldaki ana şekerler olan fruktoza ve glukoza dönüştürmek için invertaz ekler [22]. İnvertaza ek olarak, arılar ayrıca, her ikisi de bala antiseptik aktivite sağlayan, glukozu glukonik asit ve hidrojen peroksite oksitleyen glukoz oksidaz ekler [43]. Amilaz, baldaki nişastayı maltoz ve dekstrinlere ayırır [160]. Bu süreç ve dolayısıyla eklenen enzimlerin miktarı, yaş, diyet, arıların fizyolojik aşaması, koloninin gücü, sıcaklık ve nektar akışının bolluğu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Farklı araştırmacılar işçi arıların farklı yaşam evrelerinde batı bal arılarının iki bal arısı ırkı arasında invertaz, glukoz oksidaz ve amilaz salgılarını ortaya koymuş ve salgılanan enzimlerin miktarlarındaki farklılıkları bildirmiştir [161, 162, 163]. Diastazlar, α ve β-amilaz formlarını içeren bir nişasta sindirici enzim grubudur. α-amilaz enzimi nişasta zincirlerini rastgele yerlerde hidrolize ederek çeşitli dekstrinler üretir ve β-amilaz nişasta zincirinin sonundan indirgeyici şeker maltozunu böler [164]. Substrat olarak nişasta için hurma balından saflaştırılmış

amilazın kinetik parametreleri optimal koşullarda (pH 6.0 ve 40°C) test edilmiştir [59]. Bu enzim, nişastayı hidrolize ederken Michaelis-Menten tipi bir kinetik aktivite göstermiştir.

Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandığı gibi, elde eidlen $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla 2,81 mg ve 0.532 (IU/L) idi. Patates, tatlı patates, buğday ve pirinç gibi birkaç ham nişasta, çözünür nişasta, amiloz ve amilopektin gibi polisakkaritler kullanılarak, hurma balının substrat spesifikliği araştırılmıştır. Sonuç olarak, büyük miktarda α-1,4-bağlantısı içeren yüksek moleküler ağırlıklı bir substrat olan amiloz, çözünür nişastaya kıyasla bu enzim için iyi bir substrat olarak tespit edilmiştir. Hurma balından saflaştırılmış amilazın enzimatik reaksiyon ürünlerini kolayca tespit etmek ve α veya β-amilaz tipini belirlemek için (ince tabaka kromatografisi) TLC analizi yapılmıştır. Bu enzim sadece maltoz değil, diğer ara ürünler de üretmiştir. Bu sonuç aynı zamanda *B. subtilis*'ten elde edilen α-amilaz ile çarpıcı bir benzerlik taşıdığı görülmüştür. Başka bir deyişle, hurma balından saflaştırılan enzimin, bir tür α-amilaz olduğu kanıtlanmıştır. Öte yandan narenciye balından elde edilen balın ölçülen $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla 2,28 mg ve 11,3 IU/L olarak ölçülmüştür. Narenciye balından elde edilen amilazın substrat spesifikliği de hurma balı gibi, birkaç ham nişasta türü kullanılarak araştırılmıştır [58]. Sonuç olarak, amiloz ve amilopektin en iyi substratlar olarak görülmüştür. Enzim aktivitesinin kullanılan maltotrioz substratına göre maltoheptaoz substratında daha yüksel olduğu görülmüştür. Bu durum aktivitenin yüksek moleküler ağırlıklı substratlarda düşük moleküler ağırlığa göre daha yüksek olduğunu düşündürmüştür. Salgı balı amilazının substrat spesifikliği substrat olarak 7 farklı madde ile incelenmiştir [61]. Sonuç olarak, amiloz gibi α-1,4-bağını içeren yüksek moleküler ağırlıklı moleküller, enzim için iyi bir substrat olarak görülmüştür. Amilopektin ile olduğu gibi, polimerik substratın nispi hidroliz hızının, substrattaki α-1,4-bağlarının azalan yüzdesi ve artan α-1,6-bağlarının yüzdesi ile azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma içinde substrat spesifikliğini araştırmak için birçok nişasta türü kullanılmıştır. Patates ve tatlı patatesten elde edilen nişastalar uygun substratlar olarak görülürken yüksek hidrolitik aktiviteye maruz kalmışlardır. Buğday ve pirinçten elde edilen nişastaların nispi aktiviteleri ise yaklaşık %70-80 olarak analiz edilmiştir.

### 1.3.7.4. Diastaz aktivite testleri literatür bilgisi

Baldaki enzim aktivitesinin tayini uzun yıllar boyunca araştırılmıştır [141, 130, 165, 56, 166]. Diastaz aktivitesi genellikle Avrupa Bal Komisyonu'nun yöntemlerine göre iki yöntemin uygulanması ile belirlenebilir [39]. Diastaz aktivitesini belirlemek için Schade ve Phadebas'a göre spektrofotometrik yöntemler kullanılabilmektedir. Diastaz aktivitesi birimleri (Goethe birimleri), test koşulları altında 0.01 g nişastayı 40 ºC'de 1 saatte dönüştürebilen enzim miktarı olarak tanımlanır [39]. Balın diastaz aktivitesi geleneksel olarak klasik Schade prosedürü veya özel hazırlanmış bir substrat olan Phadebas tabletleri kullanılarak ölçülmektedir [167, 168, 169, 170, 56]. Bunun yanı sıra Megazyme firması tarafından geliştirilmiş benzer metodolojiye sahip kitler (Amylazyme tablet) kullanarak da amilaz aktivitesi tespit edilebilmektedir [171, 172]. Schade prosedürü, standart koşullar altında mavi renkli nişasta-triiyodür kompleksinin diastatik bozunmasına dayanmaktadır [73]. Schade, Marsh ve Eckert tarafından geliştirilmiş Schade yönteminin ilk kurulumu, iyot varlığı ile oluşan mavi rengin ve balların diastazı tarafından hidrolize edilen standart bir nişasta çözeltisinin aralıklarla ölçülmesine dayanmaktaydı [169]. Bu prosedür, uygulanan modifikasyonlar sonrasında bal analizinin standart yöntemlerine dahil edilmiştir [168, 170, 174]. "Schade yöntemi" ile ilgili sorun, substrat olarak kullanılan nişastanın nem ve mavi renk indeksi ile ilgili çok katı gereksinimleri karşılaması gerekliliğidir. Bu standardize nişastanın temini kolay değildir ve farklı üreticilerden veya orijinlerde elde edilip tedarik edilen nişasta ile farklı enzim aktiviteleri elde edilebilmektedir [175]. Bunun haricinde Schade yönteminde, sınırlı bir absorbans aralığında ölçüm söz konusu olup, doğru ölçümler elde etmek için birkaç seyreltme adımının uygulanması gerekli olabilmektedir. İkinci olarak, düşük diastaz aktivitesine sahip numunelerin tayini zordur ve ek olarak, deneyin doğruluğunu artırmak için sıklıkla tekrarlayan ölçümlere ihtiyaç duyulabilmektedir.

İyotun nişasta ile reaksiyona girme mekanizması ise henüz tam olarak açık değildir. Siegenthaler substrat olarak çözünmeyen mavi boyalı çapraz bağlı bir nişasta tipinin kullanıldığı “Phadebas yöntemi” fotometrik bir prosedürü alternatif olarak önermiştir [167]. Bu yöntem, "Schade yönteminden" çok daha basit ve hızlı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bogdanov, “Phadebas yöntemini” ilk olarak modifiye etmiş ve Persano-Oddo ile Pulcini, düşük enzim içeriğine sahip ballarda “Phadebas” ile

diastaz testi için bir formül önermiştir [176, 113]. “Phadebas prosedürü”, Schade yöntemi gibi Uluslararası Bal Komisyonu'nun standart yöntemlerine dahil edilmiştir [53]. Bu yöntemin çalışma prensibine göre, Çözünmeyen mavi boyalı çapraz bağlı bir nişasta türü (Phadebas tablet), enzim tarafından hidrolize edilir ve 620 nm'de fotometrik olarak belirlenen mavi, suda çözünür fragmentler oluşturur. Çözeltinin absorbansı, numunenin diastatik aktivitesi ile doğru orantılıdır. Diastaz aktivitesinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler de önerilmiştir. Sak-Boşnar ve Sakaç balın diastaz aktivitesi için hızlı, ucuz ve basit bir potansiyometrik analiz oluşturmuştur ve elde edilen sonuçlar klasik “Schade yöntemi” ve ticari “Phadebas yöntemi” ile korelasyon göstermiştir [177]. Analiz, bal örneğinin diastaz aktivitesi ile orantılı olan triiyodür iyonunun doğrudan potansiyometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Phadebas tabletlerine benzeyen Amylasyme (Megazyme) tabletlerinin kullanıldığı yöntemde ise, Phadebas çalışma prensibi ile aynı şekilde, substratın diastaz varlığında hidrolizinin, çözünür renk ürünlerinin çözelti ortamında oluşması ile aktivite tayini yapılmaktadır. Trizma baz solüsyonu ilavesiyle reaksiyon sonlandırıldıktan sonra numune süzülür ve 590 nm'de bir spektrofotometrede ölçülür. Ölçülen süzüntünün absorbansı, numunedeki diastaz aktivitesi ile doğru orantılıdır [35]. Bu prosedür, ticari olarak temin edilebilen bir substratın uygunluğu ve daha basit deney formatı nedeniyle bal endüstrisinde yaygın olarak benimsenmiştir. Bu ticari yöntemlerin kullanımı kolaydır, ancak analiz edilen numune başına Schade yönteminden daha yüksek maliyet oluşturmaktadır. Ayrıca, bu yöntemde de Schade prosedürüne benzer olarak diastaz aktivitesi çok yüksek ise, ek seyreltmeler ve tekrar analizleri gerekmektedir. Alternatif olarak, literatürde, baldaki amilaz aktivitesi, Sigma Diagnostics prosedürü ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [178]. Bu prosedür, amilaz için substrat görevi gören 4,6-etiliden-p-nitrofenil-α-D-maltoheptaosit içindeki α-(1-4)-glukosidik bağların aşamalı hidrolizine dayanmaktadır. Daha önce bu yöntem literatürde, saflaştırılmış amilazın stabilite özelliklerinin belirlenmesinde, enzim karakterizasyonun incelenmesinde değerlendirilmiştir [64]. Bir Sigma birimi amilaz aktivitesi, 37°C'de dakikada indirgenen bir milimol 4,6-etiliden-p-nitrofenil-α-D-maltoheptaosid olarak verilmiştir. Bu deney prosedürü sadece 20 µl numune gerektirmektedir ve hızlı bir metottur. Megazyme firması da benzer bir substrat kullanarak (Ceralpha) amilaz aktivitesinin ölçümü için yeni bir prosedür geliştirmiştir. Çalışmalar arasında, amilaz

aktivitesi ayrıca bir dinitrosalisilik asit prosedürü ile test edilmiştir [42]. Bu deneyde, substrat olarak %1 çözünür nişasta içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.1) kullanılmaktadır. 37°C'de 60 dakika inkübasyondan sonra, reaksiyonu durdurmak için eşit hacimde dinitrosalisilik asit ilave edilmiştir. Serbest formda oluşan glukoz miktarını belirlemek için çözelti kaynatılmış ve daha sonra su ile 10 kat seyreltilmiştir. Absorbans, bir spektrofotometre kullanılarak 550 nm'de ölçülmüştür. Numunenin diastaz aktivitesi, standart glukoz eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi, standart deney koşulları altında indirgeyici şeker olarak 1 μmol glukozamin-1 üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Bahsedilen tüm yöntemlerin sonuçları genellikle korelasyon içindedir, ancak aynı bal numunesi için farklı sonuçlar substratların standardize olmaması, farklı enzim (yabancı enzim) girişimlerinin söz konusu olabilmesi ve deney ölçüm aralıklarının enzim konsantrasyonuna göre doğruluktan sapma gösterebilmesi temel etkenler olarak sıralanabilmektedir. Bu kapsamda, diastaz aktivitesini ölçmek için pratik ve hızlı, yeni bir yöntem için bir talep söz konusudur.

### 1.3.8. Enzim kinetiği teorisi

Enzim kinetiği, enzimatik reaksiyon hızlarının ve bunların deneysel parametrelerdeki değişikliklere tepkilerinin incelenmesi olarak tanımlanır [121]. Dixon ve Webb'e göre, enzim kinetiğini anlamak, herhangi bir enzim çalışmasının temelini oluşturur [179]. Enzim kinetiğini incelemenin önemi, bir enzimin etki mekanizması hakkında değerli bilgilerin aydınlatılmasını, bir enzimin hücre koşulları altındaki rolüne ilişkin bilgi sağlamayı ve bir enzimin aktivitesinin nasıl kontrol edilebileceğini anlamayı içerir [180]. Enzimleri karakterize etmek için genellikle kullanılan iki kinetik sabit $V_{max}$ (maksimum hız) ve $K_m$'dir (Michaelis-Menten sabiti; 1/2 maksimum hızda substrat konsantrasyonu). Bu sabitlerin değerleri normal şartlar altında her enzim için tektir [181]. Genel olarak, Michelis-Menten kinetiğini takip eden enzimler hiperbolik bir eğri gösterir. Bununla birlikte, bazı enzimler hiperbolik olmayan davranış gösterebilmektedir. Hiperbolik olmayan kinetik davranış sergileyen enzimlerin çoğu allosterik ve polimeriktir [182].

### 1.3.9. Bal proteinlerinin izolasyonu

Bal yaklaşık ortalama olarak 181 farklı bileşen içerir [53]. Balın antibakteriyel, antiinflamatuar, antiviral, antioksidan, antidiyabetik vb. birçok işlevi bildirilmiştir. Bal proteininin bu tür faaliyetlerde önemli katkısı vardır [183]. Balda bulunan protein miktarı çok azdır. Bu nedenle, bu proteinleri balda bulunan diğer bileşenlerin havuzundan izole etmek çok zordur. Bal proteininin profilinin yanı sıra izole edilmesi ile ilgili olarakta farklı çalışmalar rapor edilmiştir. Elde edilmeye çalışılan proteinler arasında glukozidazlar, glukoz oksidaz, glukoz transferaz ve amilaz bulunur. Bal proteinleri, organik çözücü kullanılarak çöktürme (etanol, aseton, klorofom vb.), tuz ile dışlama (salting out) kozmotropik ajanlar (amonyum sülfat) kullanarak çöktürme, ultrafiltrasyon teknikleri kullanılarak izolasyon sağlama, immunoafinite odaklı yaklaşımlar ile elde etme, farklı resinlerin kullanılması tabanlı kromatografik teknikler gibi çeşitli yollarla izole edilmeye çalışılmıştır. Araştırma çalışmalarının birkaçı Tablo 1.4.'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.4.** Bal proteinlerinin izolasyonu.

| **Araştırma Materyali** | Protein | **İzolasyon ve Pürifikasyon Tekniği** | **Referanslar** |
|---|---|---|---|
| Karabuğday Balı | İnvertaz | 80 % ethanol ile çöktürme | Nelson ve Cohn, [114]. |
| Karabuğday Balı | İnvertaz | Etanol çöktürme ve diyaliz | Papadakis, [116]. |
| Çiçek balı | Glukoz oksidaz | Diyaliz, aseton çöktürme, 2. diyaliz, Sephadex jel filtrasyon | Schepartz ve Subers, [146]. |
| Bal arısı (*Apis mellifera* L.*)* | β-Glucosidaz, İnvertaz | FPLC sistemi ile (Pharmacia, İsveç) | Pontoh ve ark., [70]. |
| Çiçek Balı | Amilaz | Ultrafiltrasyon, ultrasantrifügasyon, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve PAGE | Babacan ve Rand, [64]. |
| Bal arısı (*Apis Cerana japonica*) | İnvertaz | Diyaliz, Ultrafiltrasyon, FPLC, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi, jel filtrasyon ve PAGE | Wongchawalit, J. ve ark., [184]. |

### 1.3.10. Bal proteinlerinin karakterizasyonu

Biyoaktiviteside değerlendirildiğinde en çok karakterize edilen bal proteini literatürde MRJP1 olarak karşımıza çıkmaktadır [185]. Balda bulunan MRJP'lerin izoelektrik noktası (pI) 5,2-8,0 olarak rapor edilmiştir. Konsantrasyonları enzim miktarlarına göre balda çok düşüktür ve MRJP'lerin en yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu arı ürünü arı sütüdür. Bazı bal proteinleri ayrıca sekanslanabilmiştir [186, 187]. Bal arısı *A. Cerena* ve *A. mellifera*'da bulunan bal proteini farklı yüzey yapılarına ve morfolojik karaktere sahiptir [15]. Bal proteininin (MRJP) bağışıklık düzenleyici aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur [188, 189, 187]. Avustralya yerel balında, 19 protein bandı SDS-PAGE analizi ile tespit edilmiş ve proteinlerin pl'si 4.8-7.7 aralığında olduğu raporlanmıştır [14]. Çeşitli numunelerden bal proteininin moleküler boyutu farklı çalışmalarda belirlenmiştir [14, 187, 15, 70, 188]. Bal proteininin karakterizasyonu tam olarak yapılmamış fakat bal proteininin kalitesi ve moleküler boyutları rapor edilmiştir. Bal proteini üzerinde yapılan çalışmalar Tablo 1.5.'de gösterilmektedir.

**Tablo 1.5.** Bal proteinlerinin karakterizasyonu.

| **Araştırma Materyali** | **Araştırma** | **Bulgular** | **Referanslar** |
|---|---|---|---|
| Manuka Balı | Protein elektroforezi ve gümüş boyama yöntemi | 19 protein tespit edildi- Mr: 10.5-121 kDa, pI: 4.8-7.7. | Marshal ve ark., [14]. |
| *Apis mellifera* L. *(Ventrikül ve bal kesesi)* | β -glucosidaz saflaştırılması ve karakterizasyonu | β-glukosidaz Mr:72 kDa ve tek bir alt birime sahip. SDS-PAGE.IEF. pI: 4.5-4.8. Glikolizasyon izoformları bildirilmiştir. | Pontoh ve ark., [70]. |
| Arı sütü *(A.Cerena.)* | Arı sütü proteinlerinin karakterizasyonu. | Diyaliz ön işlemi, Q-sepharose kolon ve sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi. (pI): 5.2-8.0. N terminal MRJP sekanslama yapılmıştır. | Srisuparbh ve ark., [186]. |

**Tablo 1.5.** Devam.

| Araştırma Materyali | Araştırma | Bulgular | Referanslar |
|---|---|---|---|
| Monofloral 12 farklı Bal (Brezilya) | Bradford metot toplam protein hesaplanması | 12 farklı balda 2236-199 μg/g aralığında protein içeriği rapor edilmiştir. | Azeredo ve ark., [190]. |
| Arı sütü | MRJP 3 ile *in vitro* bağışıklık tepkisinin modülasyonu | IL-4 üretiminin *in vivo* baskılanması ve T hücrelerinden IL-4, IL-2, IFN-'nin baskılanması ve bununla birlikte *in vitro* T hücresi proliferasyonunun MRJP 3 tarafından inhibisyonu rapor edilmiştir. | Okamoto ve ark., [189]. |
| Slovakya'nın farklı bölgelerinden bal örnekleri | Balın aktif arı sütü proteininin immünolojik karakterizasyonu. | 55 kDa'lık bir bal proteininin N terminal amino asit dizisi N-I-L-R-G-E olarak belirlendi. Bu protein, apalbumin-1 (ana arı sütü proteini 1) ile dizi benzerliğine sahipti. MRJP1, makrofajlardan TNF-α ve IL-6 salgılanmasını uyardı. | Simuth ve ark., [187]. |
| Kore'nin arıcılarından toplanan bal örnekleri. | Bal proteinlerinin immünolojik karakterizasyonu | DEAE iyon değişim kromatografisiyle ayrılan ve 0-0.5M NaCl doğrusal gradyan ile ayrıştırılan protein. Bal majör proteinine karşı antikor ürettiği bildirildi. *A. Cerena ve A. mellifera* balı farklı yüzey yapılarına sahiptir. | Won ve ark., [15]. |
| Doğrudan arıcı tarafından hasat edilen Kore Yerli Balı ve beş Avrupa Balı | Bal majör protein karakterizasyonu ve tağşiş tespitinde uygulanması. | Molekül ağırlığı 59 ve 56 kDa olan iki bal ana proteini MALDI-TOF tarafından analiz edildi ve iki proteinin birincil yapıyı paylaştığını bildirdi. | Won ve ark. ., [15]. |
| Hawaii kökenli 16 bal örneği. | MALDI TOF MS Kullanarak Protein Parmak İzi ve Barkodlama | MALDI TOF MS analizi ile sırasıyla 16 farklı bal numunesi için elde edilen protein tepe noktaları ve Hawaii'deki balların çiçek kökenini tespit etmek için kullanılabilecek spektral barkodların veritabanı kütüphanesini oluşturmak için kullanılan bilgiler. | Wang ve ark., [191]. |
| İşlenmemiş Revamil kaynaklı bal. | Bal proteininin antibakteriyel aktivitesi. | Glukoz oksidaz dışında bir katyonik peptit defensin-1'in inhibisyon bölgesi ile test edilen antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirdi. | Kwakaman ve ark., [192]. |
| Slovakya akasya, ıhlamur, kestane, kolza ve karahindiba monofloral balları. | Balda Arı Sütü Proteini Apalbumin 1'in ELISA ile Miktarlandırılması | Bal Apalbumin 1'in en otantik proteini, ELISA ile tanımlanmış ve nicelenmiştir. Çiçek balları apalbumin 1'i şu şekilde içermiştir: akasya, %0.011; ıhlamur, %0.010; kestane, %0.029; kolza, %0.010; ve karahindiba, %0.014. | Bíliková ve ark., [193]. |
| Beş Yeni Zelanda bal örneği, iki manuka, iki kanuka ve bir yonca balı | Arabinogalaktan proteinlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu. | Boyut dışlama kromatografisi-çok açılı lazer ışık saçılımı (SEC-MALS) ile belirlenen 110 kDa olarak bildirilen saflaştırılmış AGP'lerin ana bileşeninin moleküler ağırlığı. Bağışıklık düzenleyici aktiviteye sahip olduğu bildirildi. | Steinhorn ve ark., [188]. |

**Tablo 1.5.** Devam.

| Araştırma Materyali | Araştırma | Bulgular | Referanslar |
|---|---|---|---|
| Kestane, akasya, ayçiçeği, okaliptüs ve portakaldan elde edilen bal | Baldaki proteolitik enzimler ve aktiviteleri | Balda bulunan ve MRJP-1'i hidrolize edebilen rapor edilmiş serin proteazlar. | Rossano ve ark., [68]. |
| Kestane, akasya, ayçiçeği, okaliptüs ve portakaldan elde edilen bal | Proteomik yaklaşım ile floral orijinin tespiti | SDS PAGE'den elde edilen protein bandının ayrıştırılarak MS kullanılarak analiz edildiğini bildirdi. Sekiz protein arasından beş protein, α-glukosidaz ve defensin-1 ile birlikte bulunan ana arı sütü ailesine aittir. Bitki kaynaklı sadece bir protein tanımlandı. | Girolamo ve ark., [65]. |
| Çiçek balları | Bal proteinlerinin karakterizasyonu | Balın MRJP-1, MRJP-2, MRJP-5 ve MRJP-7 gibi başlıca arı sütü proteinleri (MRJP) ve ayrıca MS analiziyle *Apis mellifera*'dan birkaç karakterize edilmemiş protein tanımlaması bildirildi. MRJP'nin glikozilasyonu gösterildi ve MRJP1'in ana arı sütü proteini olduğu bildirildi. | Chua ve ark., [23]. |

### 1.3.11. Balda enzim ve şeker şurubu tağşişi

Avrupa Birliği Komisyonu kriterlerine göre balda hiçbir katkı maddesi kabul edilmemektedir (Codex STAN, 2001; European Commission, 2002). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebligi ise Avrupa Birliği Komisyonunun bu direktifini (2377/90 EEC) ülkemize uyarlamıştır. Bu kapsamda bala sonradan (direkt) veya arıların beslenmesi (dolaylı) yolu ile hiçbir şekilde tağşiş yapılamayacağı vurgulanmış olup, bu amaçla kullanılabilen pirinç, mısır, pancar, şeker kamışı orijinli farklı şeker şuruplarının arıcılıkta uygulanması ürünün kalitesini negatif etkilemesi dolayısı ile yasaklanmıştır. Balda direkt veya dolaylı tağşiş söz konusu olup, bal ürünleri bal arısının şeker pancarından enzimatik yolla elde edilen pancar şurupları ile beslenmesi veya direkt olarak bu şurubun bala karıştırılması suretiyle tağşiş edilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan pancar şuruplarının eldesinde endüstriyel olarak β-fructofuranosidaz (BFF)

enzimi kullanılmakta ve şeker pancarından elde edilen sakkaraozun enzimatik inversiyonu ile invert şeker şurupları (fruktoz ve glukoz karışımı) elde edilmektedir.

Pancar şurubu üretim prosesi sonunda şurup numunesi içerisinde BFF enzim kalıntısı görülebilmekte ve bu şuruplar bal ile karıştırıldığında balda BFF aktivitesi tespit edilebilmektedir. Pancar şurubu tağşişi ve yabancı invertaz olarak da adlandırılan BFF aktivitesi dışında, bal örneklerinde yüksek diastaz değerlerine de rastlanabilmektedir. Arı orijinli olmayan endüstriyel amaçla kullanılan α-amilaz (yabancı diastaz), ısıl işlem veya uzun raf ömr dolayısı ile düşük seyreden bal diastaz değerlerinin yükseltilmesi, taklit veya tağşiş edilen balın seyrelmesi dolayısı ile doğal diastaz değerlerinin düşmesi veya balda yine nişasta tabanlı bir şurup kullanımı dolayısı ile oluşacak nişasta kalıntısının giderilmesi amaçları ile ballara eklenebilmektedir. Bu amaçla kullanılan α-amilaz enzimleri genellikle ısıya dayanklı (heat stable amylase / Thermamyl) enzimler olup, balın bir kalite parametresi olan diastaz değerlerinin her daim yüksek çıkabilmesini sağlamaktadır. Geliştirilen yöntem ile her iki enzimatik kökenli tağşiş tespit edilebilmektedir.

Bu 2 tağşiş türü haricinde balda tağşiş ve tespit yöntemlerine ilişkin araştırma ve çalışmalar ise şu şekildedir; Bal tağşişi, doğrudan bala bir madde ilave edilerek veya dolaylı olarak bal arılarının bu maddelerle beslenmesi yoluyla olabilir [194, 195]. Tipik olarak bal, HFCS, sakkaroz şurubu, maltoz şurubu, kahverengi pirinç şurubu (BRS), beyaz pirinç şurubu (WRS), pancar şurubu, altın şurubu, şeker pekmezi şurubu, glukoz şurubu, akçaağaç gibi daha ucuz tatlandırıcılarla karıştırılır. Enzimatik veya asitle muamele sonrası nişastadan elde edilen şuruplar da sıklıkla kullanılabilmektedir [196, 197]. Bu düşük maliyetli şuruplar ve doğal bal arasındaki şeker bileşimindeki benzerlikler nedeniyle bu tür bir tağşişi tespit etmek oldukça zordur [198, 199]. Bu nedenle, katkısız balı tespit etmek için etkili ve uygulanabilir analitik yöntemler vazgeçilmezdir. Literatürdeki yöntemlerin çoğu balda tek tip şeker şurubu varlığını tespit edebilir, bu nedenle bal tağşişinin tam olarak tanımlanması için sırayla birkaç analitik yaklaşım uygulanmalıdır. Bal kalite kontrolü için çeşitli analitik yöntemler kullanılır ve hedeflenen yaklaşım, gaz kromatografisi (GC) [200, 201], ince tabaka kromatografisi (TLC) [202], yüksek performanslı sıvı kromatografisi [203], elemental analiz karbon izotop oranı kütle spektrometrisi [204, 205] gibi farklı kromatografi dahil

edilmiş tekniklerin uygulanmasıyla başarıldığından önerilen bal katkı maddelerinin tespiti güvenli şekilde yapılabilmektedir. Ek olarak, kızılötesi spektroskopi (IR) [206, 207], floresan spektroskopisi [208], nükleer manyetik rezonans (NMR) [209], dahil olmak üzere spektroskopik hedef tabanlı olmayan yaklaşımlar vardır. Bu yöntemlerin büyük çoğunluğu bal ticaretinde sorumlu laboratuvarlar tarafından rutin olarak uygulanmaktadır ancak bu analitik yöntemlerin de bazı sınırlamaları vardır. Tağşiş türünü belirlemek amaçlı hedefli şekilde bir veya birkaç bileşinin tespitini eş zamanlı olarak hedefleyen ve yukarıda belirtilmiş olan analitik teknikleri kullanan birkaç tağşiş tespit yöntemine bakıldığında ise literatürde, pirinç şurubu belirteçleri olarak Arsenik ile birlikte AFGP molekülünün kantifikasyonu [210, 211], oligosakkarit taraması [212], ısıl işlem ve karamelizasyon reaksiyonu nedeniyle şeker şurubu üretimi sırasında doğal olarak oluşan bir tür yan ürün olan difruktoz anhidrit (DFA) molekülünün tespiti [213], cıva kalıntısı [214], ve kamış ve mısır şurubu tanımlaması için C4-% (SCIRA) analizi [204, 215] ön plana çıkmaktadır. Tağşişi saptamak ve adlandırmak için yabancı enzim tayinleri olarak adlandırılan enzimatik tabanlı testler de vardır, bunlardan birkaçı yabancı diastaz veya ısıya dayanıklı diastaz, yabancı invertaz ve β/γ-amilazdır [46, 203]. Fakat bu yöntemlerin aktivite tabanlı olması ve kullanılan substratların yabancı enzime spesifik afiniteye sahip olmaması dolayısı ile tutarlı sonuç vermeleri sorgulanabilmektedir.

### 1.3.12. Enzimlerin saflaştırılması ve aktivite tayini için kullanılan enstrümental cihaz ve teknikler

#### 1.3.12.1. Kromatografik ayrım

Kromatografi, karışım halindeki kompleks örneklerden farklı yapıdaki kimyasal bileşenlerin kalitatif veya kantitatif olarak ayrılması, saflaştırılması veya tanımlanması için çok yaygın olarak tercih edilen geniş uygulama alanına sahip ve çok güçlü bir analitik kimya tekniğidir [216, 217].

#### 1.3.12.2. Sıvı kromatografisi

Sıvı kromatografi (Liquid Chromatography, LC), çözelti formundaki bir karışımın bileşenlerine ayrımında kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Sıvı

kromatografi, hareketli fazın sıvı bir çözücü olduğu kromatografik herhangi bir prosedürü tanımlamak için kullanılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), hareketli (sıvı) fazın mekanik biçimde durağan faz bulunduran bir kolon üzerinden pompalanacağı sıvı kromatografisi için kullanılmaktadır. HPLC aleti enjektör, pompa, kolon ve detektörden oluşmaktadır.

#### 1.3.12.3. Ters faz kromatografisi

Ters faz (Reversed Phase, RP) kromatografi tekniği dağılma kuvvetleri (Van Der Waals etkileşimleri) kullanmaktadır. Durağan faz hidrofobik yapıda olup, hareketli faz buna zıt polaritedir. Ters faz kromatografisinde kullanılan katı faz materyallerinin pek çoğu silika jelin kimyasal olarak modifiye edilmesi sureti ile oluşturulan gözenekli ekipmanlardır. Hareketli fazlar ise su ağırlıklı polaritesi yüksek ve organik solventler ile modifiye edilen karışım halindeki kompozisyonlardan oluşmaktadır.

#### 1.3.12.4. Sıvı kromatografisi cihazları

HPLC cihazları analitik kimya alanında ve de özellikle enstrümental analiz dalında düşük işletim maliyet, geniş uygulama sepktrumu, zaman etkin analiz kabiliyeti ve tekrarlanabilir sonuç raporlama özellikleri dolayısı ile fazlasıyla tercih edilmektedir. HPLC'nin bu özellikleri, protein, peptit, enzim gibi kompleks moleküllerin analizine olanak sağlamaktadır.

##### 1.3.12.4.1. HPLC enstrümanları

Uygun dedektörler ile donatılmış sıvı kromatografi sistemleri protein, enzim, sentetik ve doğal polimer gibi büyük molekül ağırlığına sahip moleküllerin yanı sıra küçük molekül ağırlığına sahip organik ve inorganik maddelerin ayrım ve dedeksiyonunda, bahsedilen yapıların UV absorpsiyon, floresans ışıma, iletkenlik, kırılma indisi, kütle, yük, polarite ve bunun gibi pek çok özelliklerinden faydalanarak etkin çözümler sunmaktadır. HPLC sistemler ile kantitatif ve kalitatif amaçlı yüksek çözünürlükte ve doğrulukta, tekrarlanabilir sonuçlar almak mümkündür.

#### 1.3.12.4.2. HPLC ve MPLC dedektörleri

Bu çalışmada geliştirilen final yöntemdeki enstrümantal dedeksiyon cihazı fotodiyot dizi dedektörü (PDA) olup sabitlenmiş dalgaboyunda UV sinyalinin şiddeti her bir enzim için ölçülerek kalitatif ve kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Baldaki hedefli enzimlerin UV ışığı absorplama kabiliyetlerinden faydalanarak tayin gerçekleştirilmiştir. Geliştirme sürecinde kullanılan MPLC sisteminde ise protein saflaştırma süreçleri hem UV dedektör hemde iletkenlik dedektöründen faydalanılarak gerçekleştirilmiştir.

MPLC sisteminde iyon baskılayacı modül olmadan sadece mobil faz değişimlerinden kaynaklı iletkenlik farklılıkları monitorize edilebilmiş olup, UV dedektörde ise 4 farklı dalgaboyu (215 nm, 255 nm, 280 nm, 495 nm) set edilerek eş zamanlı 4 farklı UV sinyali çalışma boyunca görüntülenmiştir. İletkenlik dedektörü iyon değişim kromatografisinde kullanılan tuz gradyanlarına bağlı iletkenlikteki değişimi takip edebilmek için kullanılmış olup, enzimlere bağlı UV absorpyionlarının ölçümü ile hedefli enzime bağlı fraksiyonlar, doğruluğu yüksek şekilde elde edilmiştir. Numune hazırlık süreçlerinde izole edilen ve derişik hale getirilen enzimlerin küçük moleküllerden elimine edilme verimini ölçebilmek için şeker profili analizi HPLC ile kombine edilmiş refraktif indeks dedektör (RID) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Bulk dedektör özelliğine sahip RID yüksek konsantrasyonlardaki şeker kompozisyonlarını kırılma indekslerine bağlı olarak sinyal üretebilen bir cevap üzerinden, hidrofilik etkilşim kromatografisi ayrımı sonrasında tayin edebilmektedir.

#### 1.3.12.4.3. MPLC cihazı

Orta basınçlı sıvı kromatografisi (MPLC), genellikle protein karışımlarını analiz etmek veya saflaştırmak için kullanılan bir sıvı kromatografi şeklidir. Kromatografinin diğer formlarında olduğu gibi, bir karışımın farklı bileşenleri iki malzeme için farklı afinitelere sahip olduğundan, hareketli bir sıvı (hareketli faz) ve gözenekli bir katı (sabit faz) olduğu için ayırma mümkündür. MPLC'de mobil faz, sulu bir çözelti veya "tampon"dur [218]. Tampon akış hızı, bir pompa tarafından kontrol edilir, tamponun bileşimi, iki veya daha fazla harici rezervuardan farklı oranlarda sıvılar çekilerek değiştirilebilir. Sabit faz, silindirik bir cam veya plastik kolon içine paketlenmiş,

genellikle çapraz bağlı agarozdan oluşan boncuklardan oluşan bir reçinedir. MPLC reçineleri, uygulamaya bağlı olarak çok çeşitli boncuk boyutlarında ve yüzey ligandlarında mevcuttur. Bir veya daha fazla ilgi konusu proteini içeren bir karışım, %100 tampon A içinde çözülür ve kolona enjekte edilir. İlgili proteinler reçineye bağlanırken diğer bileşenler tamponda ile atığa reçinede tutunmadan elimine edilir [219]. Tamponun toplam akış hızı sabit tutulur; bununla birlikte, tampon B'nin ("elüsyon" tamponu) oranı, programlanmış bir konsantrasyon değişikliğine ("gradyan") göre kademeli olarak %0'dan %100'e yükseltilir. Bu işlem sırasında bir noktada, bağlı proteinlerin her biri ayrıştırılır ve elüsyon sıvısında görünür. Eluent, tuz konsantrasyonunu (iletkenlik ile) ve protein konsantrasyonunu (280 nm veya farklı dalga boylarında ultraviyole ışığın absorpsiyonu ile) ölçen iki detektörden geçer. Her protein ayrıştırıldığında, yıkama sıvısında protein konsantrasyonunda bir "tepe-pik" olarak görünür ve daha sonraki işlemler için toplanabilir (Fraksiyonlama) [220]. MPLC genellikle proteinlere uygulanır; bununla birlikte, çok çeşitli reçineler ve tamponlar nedeniyle geniş uygulamalara sahiptir. HPLC'nin aksine, kullanılan tampon basıncı nispeten düşüktür, genellik ile 5 bar'dan azdır, ancak akış hızı nispeten yüksektir, tipik olarak 1-5 mL/dak civarındadır. MPLC, toplam hacmi 5 mL veya daha az olan kolonlardaki miligram karışımların analizinden, litre hacimli kolonlarda endüstriyel kilogram saflaştırılmış protein üretimine kadar kolaylıkla ölçeklendirilebilir.

### 1.3.13. Yöntem validasyon kriterleri

Validasyon süreci, bir analitik metodun yöntem geliştirme sürecinin tamamlanmasının ardından ilgili performans özelliklerinin kabül kriterlerine uygunluğunu gösterecek olan uzun soluklu bir performans değerlendirme çalışmasıdır. Hayvansal gıdalarda kalite ve tağşiş belirlenmesine yönelik olarak geliştirilen nitel veya nicel yöntemlerin tümü önceden tanımlanmış performans kriterlerini karşılamalı ve bu kapsamda yöntemi kullanacak tüm laboratuvarlar standardize edilmelidir. Analitik yöntemin performans kriterleri ve de sonuçların yorumlanmasında rehber olarak baz alınacak yönerge niteliğindeki doküman 2002/657/EC Komisyon kararında yer almaktadır. Bu kapsamda, nicel metotların doğrulanması için gerçekleştirilecek çalışmalar şu şekildedir;

**Özgüllük:** Hedeflenen analit veya analit grubunun, bulunduğu matriks içeriğindeki herhangi bir molekülden kaynaklanacak şekilde yanlış pozitiflik veya negatiflik oluşturmadan tayin edilebilme kabiliyetine yöntemin özgüllüğü denilmektedir.

**Doğrusallık:** Regrasyon katsayısı ve doğrusallık denklemlerinin rapor edildiği, tanımlanan konsantrasyon aralığında doğrusal olarak artan veya azalan sonuçların elde edilebildiğinin validasyonuna yönelik gerçekleştirilen çalışmaya doğrusallık çalışması denmektedir.

**Gerçeklik / Geri kazanım:** Sertifikalı referans malzemeler veya kör numuneye bilinen miktarda hedef analitin eklenmesi ile oluşturulan validasyon örneğinde gerçekleştirilen, yöntemin gerçek değeri ölçüm kabiliyetinin araştırıldığı validasyon parametresidir.

**Kesinlik (Tekrarlanabilirlik / Tekrarüretilebilirlik):** Referans veya laboratuvar ortamında hazırlanmış bir örneğin farklı kişiler, farklı günler, ve farklı sayılarda hazırlanması ve analiz edilmesi sureti ile gerçekleştirilen, analitik yöntemin kendi içindeki kesinliğini analiz eden validasyon parametresidir. Bu kapsamda başarı kriteri olarak hesaplanan % RSD standart sapma değeri %20 yi geçmemelidir.

**Analitik Ölçüm Limitleri (Hassasiyet):** Karar limiti (CCα) ve dedeksiyon limiti (CCβ) veya LOQ (Kantitasyon limiti) /LOD (dedeksiyon limiti) parametreleri üzerinden değerlendirilen, geliştirilmiş analitik yöntemin tespit edebildiği ve miktarlandırma yapabildiği minimum konsantrasyonaların raporlandığı validasyon çalışmasıdır.

Bu çalışmada, yöntemin geçerlilik çalışmaları için bal matriksi ile uyumlu olan ve 2002/657/EC sayılı Avrupa Komisyonu kararında yer alan başarı kriterleri ve validasyon is akışı rehber olarak seçilmiştir.

# 2. MATERYAL VE YÖNTEM

## 2.1. Özet

Çalışmanın ilk ayağında, aktivitesi yüksek fakat düşük konsantrasyonda seyreden enzimler, bal ve Hipofaringeal bez (HPG) matrikslerinden denatürasyonu engeller şekilde ekstrakte ve izole edilmiştir. Bu amaçla araştırma materyali olarak hem bal hem de HPG numuneleri toplanmış analizler öncesinde balların otantik olduğu yapılan fizikokimyasal ve de kromatografik testler ile belirlenmiştir. 2019 yılında Türkiye'nin Ege bölgesinden diğer orijinli ballara göre yüksek diastaz ve invertaz içeriklerine sahip oldularından ötürü çam balı numuneleri seçilmiş ve numuneler, α-glukosidaz ve α-amilaz konsantrasyonlarına göre incelenmiştir. Numune tedariği sonrasında, öncelikli olarak yüksek içeriğe sahip çam bal numuneleri, uygun tampon çözelti kullanarak (Insect Saline tamponu (10 mM Tris / HCl, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl ve 1 mM $CaCl_2$)) homojen birer bal çözeltisi haline getirildi ve devamında çözünürlüğü olmayan partiküllerden santrifüj yardımı ile arındırıldı. Elde edilen çözelti, Amicon stirred cell ultrafiltrasyon ekipmanına yüklenerek, azot gazı akışı altında basınç ile birlikte, enzimlerin stabil kalabileceği bir sıcaklıkta (4°C), soğutmalı inkübatör içerisinde, 10 kDa MWCO değerindeki ultrafiltrasyon membranından geçirilerek filtrelendi. Proses sonunda elde edilen konsantre protein çözeltisi, ultrasantrifüj ve düşük protein bağlayıcı PVDF şırınga filtreleri ile temizlendi. Oluşan berrak ve konsantre protein çözeltisi, organik asitler, mineraller, tuzlar, fenolik bileşenler ve bulk konsantrasyondaki şeker gibi pek çok küçük moleküllerden elimine edilebilmesi ve saf protein çözeltisi elde edebilmek için diyaliz ve centrifugal filter unit (CFU) kullanılarak ultra-dia-filtrasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Slide-A-Lyzer® diyaliz kasedi aracılığıyla saf suya karşı ultrafiltrasyondan elde edilen konsantre retentat diyaliz edilerek ve alternatif olarak ultradiyafiltrasyon yaklaşımı için CFU kullanılarak, küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerin girişimlerinden arınma etkinliği karşılaştırmalı olarak test edilmiştir.

Buraya kadar bahsedilen tüm yöntem basamaklarında toplam protein, diastaz ve invertaz aktivite ve şeker konsantrasyonları ölçülmüş geliştirilen protokolün verimi incelenerek bir sonraki metot adımı için öncesinde valide edilmiştir. Diastaz yöntemi

için Phadebas® yönteminin (Megazyme® firmasının geliştirdiği diastase (Amylasyme HY, Diastase Activity in Honey - Megazyme 2007) kısmi modifiye şekilde uygulanmış olup, invertaz analizi için IHC metodu (International Honey Commission, 2009) birebir uygulanmıştır. Bradford toplam protein deneyi, Bio-Rad firmasından tedarik edilen Bradford reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası) ile gerçekleştirilmiş olup, Şeker profili analizi, HPLC-RID sistemi kullanılarak ön hazırlıkta elde edilen protein çözeltileri şeker konsantrasyonlarını değerlendirmek için, Thermo marka propil-amino liganda sahip 150*4,6 mm'lik fiziksel ölçülerdeki HILIC kolonda asetonitril-saf su karışımından oluşan mobil faz kullanılarak, izokratik akış altında HILIC kromatografi prensibi ile analiz edilmiştir. Şeker analizleri, Waters Alliance marka HPLC sistemi, refraktif indeks dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, uygulanmış olan yöntem işletme içi (in-house) şeklinde geliştirilmiş modifiye standard DIN Norm 10758 şeker profili analiz metodudur [221].

Yüksek geri kazanımlı şekilde izole edilen protein çözeltileri BioRad marka orta basınçlı sıvı kromatografi (MPLC) cihazı ile saflaştırma öncesinde -60°C'de stabil kalması adına ekstraksiyon için kullanılan insect saline tamponu içerisinde muhafaza edilmiştir. Biyolojik pH ve elektrolit denge konsantrasyonlarına yakın tamponlar olduğundan doku diseksiyonları ve baldan enzim ekstraksiyon basamaklarında insect saline tamponları bu işlemler için tercih edilmiştir. HPG numunelerinin izolasyonunda ise ön hazırlık olarak öncelikle diseksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, HPG örneklerinin toplanması için, Avrupa bal arıları (*Apis mellifera* L.) seçilmiş ve kuru buz üzerinde soğutularak anestezi uygulanmıştır [57]. Hem post-serebral hem de torasik bezler mikroskop altında işçi bal arılarından disekte edilmiş ve elde edilen hipofaringeal (HPG) bezler insect saline tamponu içerisinde, analiz edilene kadar -60°C'de depolanmıştır. Disekte edilmiş ve depolanmış Hipofaringeal bezler, insect saline tamponu ve proteaz inhibitörleri içeren bir çözelti içerisinde Tissue Lyser cihazı ile buz üzerinde karbür boncuklar yardımı ile (bead beating) homojenize edilmiştir. Dokudan ekstraksiyon için ekstraksiyon verimi açısından RIPA® lizis tamponu ile deterjan içerikli ekstraksiyon ve 2D elektroforetik yaklaşımlarda tercih edilen üre-tiyoüre (kaotropik ajanlar) ve CHAPS (zwitter iyonik deterjan) içerikli çözeltiler (2D rehydration buffer) alternatif olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra elde edilen homojen doku ekstraktı ultrasantrifüj ile santrifüjlendi ve süpernatantlar toplandı. Elde edilen

süpernatantlar birleştirildi ve CFU ekipmanına aktarılarak, protein harici küçük molekül ağırlığına sahip metabolitlerden arındırıldı ve bu şekilde eş zamanlı olarak konsantre etme adımı da uygulandı. Bahsedilen ön-hazırlık sürecinden geçirilmiş bu sayede konsantre hale getirilmiş ve küçük molekül ve metabolitlerinden arındırılmış çam balı bulk enzimleri, MPLC ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzim fraksiyonları, moleküler ağırlık tayini ve çam balı ile HPG bezleri arasındaki enzimlerin orijinlerinin karşılaştırılması için SDS-PAGE'e transfer edilmiştir. Anyon değişim kromatografisi (AEX), katyon değişim kromatografisi (CEX), Lektin Afinite kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) ve Seramik hidroksiapatit (CHT) multi-mod kromatografisi, verimli saflaştırma yaklaşımları için sırasıyla uygulanmış ve test edilmiştir. CHT yapısındaki kalsiyum ligandları dolayısı ile metal afinite etkileşiminin α-amilaz için iyi bir alıkonma ve saflaştırma etkinliği sağladığı görülür iken invertaz için flow through mod (rezinde alıkonma olmadan elüe olma) saflaştırma uygulanmış ve bu sayede eş zamanlı etkin saflaştırma gerçekleştirilebilmiştir. MPLC'den elde edilen fraksiyonlarda gerçekleştirilen enzim aktivite testleri sonucuna göre, aktivite onaylı fraksiyonlar CHT kolonu çıkışından toplanmış ve iligli fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki saflaştırma adımına geçilmiştir. İkinci adım olarak hem invertaz hemde diastaz için safsızlıkları elimine edebilmek adına iyon değişim kolonları (anyon değişim kromatografisi) kullanılmış devamında ise son saflaştırma ve temizleme adımı olarak Jel filtrasyon yöntemi Size Exclusion (SEC) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. SEC sonrasında elde edilen aktivite onaylı saflaştırılmış enzimler, hem ön-hazırlık hemde saflaştırma yöntemlerinin bir sonucu olarak elde edilen saf enzimin görüntülenmesi, saflık kontrolü ve moleküler ağırlık tayini için SDS-PAGE analizine transfer edilmiştir. SDS-PAGE yönteminde, belirgin ve daha yüksek çözünürlüklü protein bantları elde edebilmek için 50µL kuyucuk hacmine sahip %4-20 gradyan jeli, uzun protokol uygulanarak kullanılmıştır [15].

Ön hazırlık ve MPLC saflaştırma süreçleri sonrasındaki SDS-PAGE analizi ile saflığı ve molekül ağırlığı doğrulanmış doku ve çam balı numunelerindeki enzimler, yeni geliştirilecek olan seyrelt ve enjekte et yöntemi ile analiz edilecek olan diastaz ve invertaz aktiviteleri için referans doğal arı enzimleri olarak değerlendirilmiştir. Numuneler uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek Waters Alliance HPLC-PDA sisteminde metot geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bir önceki aşamada elde

edilen saf enzim standartları kromatografik olarak eş zamanlı şekilde ve kısa sürede hassas sinyal üretebilmesi için, mobil faz kompozisyonları, enjeksiyon miktarı, kolon fırını sıcaklığı, gradyan profilleri, dalga boyu taraması sonrası maksimum UV sinyalinin elde edilmesi, akış hızları ve enzim konsantrasyonları açısından optimize edilmiştir. HPLC yöntem geliştirme ve optimizasyon çalışmaları, su-asetonitril ile ters faz (RP) koşullarında ve mobil fazlara, trifloroasetik asit (TFA), formik asit gibi farklı organik modifiye edici ajanlar eklemek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin potansiyel hidrofobik etkileşim afinite farkları nedeniyle, ilk kromatografik mod olarak ters faz kromatografisi tercih edilmiştir. Biyoanalitik kolon olarak, ilk aşamada, ortalama 450Å gözenek çapında, 2.7 µm partikül çapına sahip silis parçacıkları içeren, polifenol ligandlı RP monoklonal antikor kolonu kullanılmıştır. HPLC sistemi yüksek basınç ile kısa analiz süresi imkanı sağlarken, süperporöz partikül teknolojisi ile üretilen analitik kolon (2,7 µm), yüksek rezolüsyonlu enzim ayrımı sağlamıştır. Metot, diastaz ve invertaz aktivitesi bilinen numuneler kullanılarak doğrulanmış ve gelenekselleşmiş aktivite yöntem sonuçları ile yeni HPLC metodu arasında karşılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Saf analitik düzey enzim standartları oluşturulup bunları kullanarak HPLC yöntemi geliştirildikten sonra aktivitesi bilinen ve doğrusal aktivite değerlerine sahip numuneler seçilerek hem diastaz hemde invertaz için aktivite kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Farklı orijindeki bal çözeltileri filtrelenip cam vialler içerisinde sisteme enjekte edilip, standart aktiviteye sahip bal numunelerine karşı UV sinyali ölçülmüş ve aktivite hesaplaması gerçekleştirilmiştir.

Ek olarak, tağşişli olduğu bilinen bal numuneleri tedarik edilmiş ve metodun yabancı enzimlere karşı stabil sonuç üretebilirliği (seçiciliği) ve tağşiş tespit yöntemi olarak da değerlendirilebilmesi sorgulanmıştır. Validasyon amacı ile kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik), gerçeklik (geri kazanım) farklı orijinlerde cevap üretebilme kabiliyeti (seçicilik), sağlamlık ve stabilite testleri ve doğrusallık (lineerite) çalışmaları 2002/657/EC Komisyon Kararında yer alan performans kriterleri kapsamında ilgili rehber baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

## 2.2. Materyaller

### 2.2.1. Kullanılan kimyasallar

- Formik asit, (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Trifloroasetikasit (TFA), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Asetonitril (ACN), (LC Saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Etanol (EtOH), (LC Saflıkta), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Amonyum Sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), (Anhydrous) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Orto-fosforik asit ($H_3PO_4$), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- %37'lik Hidroklorik asit (HCl), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Titripur®, 1N Hidroklorik asit (HCl), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum hidroksit (NaOH), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Kaiser′s gliserol jelatin, (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Ziehl-Neelsen karbol-fuksin, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Borik Asit ($H_3BO_3$), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Sodyum Klorür (NaCl), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Potasyum Klorür (KCl), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Tris Bazı, (BioRad, Hercules-Kaliforniya (CA), A.B.D.)
- Amylazyme tablet, (diastaz aktivite test substratı), (Megazyme, Wicklow, İrlanda)
- Disodyum etilendiamintetraasetat dihidrat (EDTA), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)

- p-Nitrofenil-α-D-glikopiranozit (pNPG), (Calbiochem, Münih, Almanya)
- Tris hidroksimetil aminometan (Trizma bazı), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat ($KH_2PO_4$), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Asetik asit, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Metanol (MeOH), (LC Saflıkta, Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_20$), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat ($NaH_2PO_4.H_20$), (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Maleik asit, (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Kalsiyum Klorür Dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Erloz, (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- D(-)-Fruktoz, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sakkaroz, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- D(+)-Glukoz anhydrous, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- İzomaltoz, (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- D(+)-Maltoz monohidrat, (Calbiochem, Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- D(+)-Trehaloz dihidrat, (Calbiochem, Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- D(+)-Turanoz (Fluka, Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Maltotrioz, (Calbiochem, Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)

- D(+)-Melezitoz monohidrat, (Calbiochem, Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)
- Mangan (II) Klorür ($MnCl_2$), (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya)

### 2.2.2. Kullanılan ekipmanlar

#### 2.2.2.1. Laboratuvar araçları ve cam materyaller

- Otomatik pipet, (1000-5000 µL, 10–100 µL, 100-1000 µL), (Eppendorf Research® Plus Hamburg, Almanya)
- Biomax® 10 kDa PES ultrafiltrasyon disk membranı, 76 mm çapında - stirred cell uyumlu, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Amicon® stirred cell ultrafiltrasyon ekipmanı, 400 mL hacimde, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Ultracel® 10 kDa Rejenere selüloz ultrafiltrasyon disk membranı, 76 mm çapında - stirred cell uyumlu, (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes, 20 kDa MWCO, 12 mL, (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, A.B.D.)
- Amicon® Ultra-15, santrifüj uyumlu ultrafiltrasyon ekipmanı (CFU), 10 kDa MWCO, 15 mL hacimli (Merck, Darmstadt, Almanya)
- pH metre, (Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre)
- Hassas terazi, (Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre)
- Spektrofotometre kuvars küvet, 12,5 x 12,5 x 45 mm, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Ultrasonik ısıtmalı banyo (Su banyosu), (Sonorex RK 154 BH, Bandelin Electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Almanya)
- Vorteks karıştırıcı, (Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, A.B.D.)

- Ultra saf su sistemi, (Milli-Q Plus® sistem, Millipore® (Bedford, MA, A.B.D.).
- Buzdolabı, (Siemens, Münih, Almanya)
- Derin dondurucu (limit -60°C), (Jounsa Deep Freezer VXE490, Jouan, Çekya)
- Mikrosantrifüj tüpü (Eppendorf tube), (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Cam balon jöje, 5-500-1000 mL, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Cam beher 50-100-500 mL, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Mobil faz şişesi 1-4 litre, Borosilikat cam (Schott-Duran) (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Falkon vidalı kapak santrifüj tüpü 15 mL, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Falkon vidalı kapak santrifüj tüpü 50 mL, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Vial 2 mL, amber cam (La-pha-Pack, Langerwehe, Almanya)
- Vial kapağı, (La-pha-Pack, Langerwehe, Almanya)
- Manyetik balık, (Manyetik Balık - 10 x 6 mm), (İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Şırınga filtresi, (PVDF, 0,22 µm) (İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Şırınga filtresi, (CA, 0,22 µm) (İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Şırınga filtresi, (PVDF, 0,45 µm) (İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- 2,5 mL'lik steril plastik şırınga, (La-pha-Pack, Langerwehe, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj, (Hettich, Rotina 35R Type, Tuttlingen, Almanya)
- Soğutmalı ultrasantrifüj, (Sigma 1-14K, 15.000 rpm (16,602 *x g*)), (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Almanya)
- Soğutmalı inkübatör, (INCU-Line®), (VWR, Pensilvanya, A.B.D.)

- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı, (IKA, C Mag HS 7, Staufen, Almanya)
- Yatay çalkalayıcı, (IKA, KS 260 orbital shaker, Staufen, Almanya)

### 2.2.3. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) örnekleri

Bu çalışmada bal arısı türü olarak *Apis mellifera* L. kullanılmıştır. *Apis mellifera*'nın toplanması 2019 yazında Muğla lokasyonundan çeşitli kovanlardan gerçekleştirildi. Bu bal arıları, kuru buzla muamele edilerek yerinde anestezi uygulanarak öldürülmüştür. Toplanan tüm bal arıları enzim ekstraksiyonu için kullanılana kadar -60°C'de saklandı. Genel olarak, enzim ekstraksiyonu için kullanılan toplanan bal arıları, ön kanat boyutuna (*Apis mellifera* L. -9 mm) göre yetişkin işçi arılardır.

### 2.2.4. Bal numuneleri

Çalışmada yer alan bal örnekleri, yoğun hasat yapılan arılıklardan toplanmış olup, otantik nitelikteki, kestane, çam, çiçek ve de narenciye ballarıdır. Bal örneklerinin tamamı 2019 yılında toplanmış olup, narenciye ve kestane için 2'şer adet, çam için 10 adet ve çiçek için ise 16 adet örnek toplanmıştır. Yöntem geliştirme çalışması için ise ayrıca aynı yıl içerisinde çam balları toplanmış olup içlerinden otantisite, fizikokimyasal ve melissapalinolojik testler sonucunda yöntem geliştirme çalışması için en uygun numune seçilmiş ve çalışmalara başlanmıştır. Palinolojik analizlerde, BÇE/TPS-10g oranının 1.5-3.0 değerleri arasında olması balın salgı-çiçek karışık bal olduğunu, 3.0-4.5 değer aralığında olması yoğun çam balı olduğunu gösterirken, bu oran >4.5 şeklinde ifade buluyorsa da çok kaliteli çam balı olarak nitelendirilir [222]. Yoğun çam içeriği olan bal bu kriter doğrultusunda seçilmiş olup ileri testler tağşiş tespiti ve fizikokimyasal özellikleri bakımından gerçekleştirilmiştir. Fizikokimyasal testlerde numunelerin nem, hidroksimetil furfural (HMF) miktarı, asitlik, iletkenlik, fruktoz glukoz oranı ve toplam yüzdesi, toplam disakkarit ve daha yüksek polimerizasyon derecesine sahip şekerlerin varlığı, toplam diastaz ve invertaz aktivitesi ölçülmüştür. Tağşiş tespiti için ise aday numunelerde β-fruktofuranosidaz (yabancı invertaz – BFF), β/γ-amilaz, pirinç şurubu katkısı ve %C4 şeker varlığı (SCIRA) araştırılmış ve enzim

katkısı veya mısır, pirinç yada pancar orijinli şeker şuruplarının katkıları açısından güvenilir olan numuneler çalışma için seçilmiştir.

Analizler doğrultusunda yöntem geliştirme için seçilen çam balı numunesinin analiz verileri bulgular ve tartışma bölümünde verilmiştir. Örnekler, hermetikli kapak kullanılan cam kavanozlarda, düşük sıcaklıkta analiz süreçlerine kadar saklanmıştır. Diastaz ve invertaz aktiviteleri hem yeni geliştirilen HPLC-PDA yöntemi ile hemde klasik aktivite tabanlı yöntemler ile ölçülmüş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu örnekler haricinde 2021 yılında piyasadan 107 adet bal örneği toplanmış ve geliştirilen HPLC-PDA yöntemi ile yabancı diastaz tespit etkinliği değerlendirilmiştir. 107 adet numunenin diastaz aktiviteleri, yabancı enzim varlığı olabilme şüphesi ile test edilmiştir. Ortalama DN değeri olarak görülen 20 DN üzerindeki diastaz aktivitesine sahip numuneler tağşiş potansiyeli barındırdığı düşünülerek geliştirilmiş HPLC-PDA yöntemi ile yabancı enzim varlığı araştırılmış ve yöntemin aktivite haricinde yabancı diastaz tespit yöntemi olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği araştırılmıştır. Arı orijinli diastaza spesifik olmayan aktivite tabanlı yöntemler (Phadebas yöntemi) ile öncelikli olarak numuneler analiz edilmiş HPLC-PDA yöntemi hem konfirmasyon hemde yabancı enzim varlığının tespiti açısından ikincil yöntem olarak değerlendirilmiştir. HPLC-PDA yöntemini geliştirmek için referans saf enzimlerin elde edilmesi aşamasında ön hazırlık ve saflaştırma adımları için çam balı kullanılmıştır. Çam balı örneğinin tağşiş içermediği ve otantik numune olduğunu valide etmek için, prolin içeriği, invertaz aktivitesi, diastaz aktivitesi, nişasta varlığı, asitlik, iletkenlik, BFF varlığı, %C4 içeriği, şeker profili ve HMF içeriği test edilmiş olup, analiz sonuçlarına göre yüksek enzim aktivitesi içeren, taze ve doğal çam balı seçilerek enzim ekstraksiyon ve sonrasında saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.5. Cihazlar

- Thermo Scientific™ Evolution™ 350 UV-Vis Spektrofotometre (Düşük basınçlı civa buhar lambası / Xenon Flaş Lamba / Dalgaboyu Aralığı; 190–1100 nm / Dalgaboyu tekrarlanabilirliği (SD); 10 ölçüm için <0.05 nm / Spektral Bant Genişliği; 1.0, nm, (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, A.B.D.).

Diastaz ve invertaz aktivitelerinin tespitinde kullanılan substratlardan enzim aktivitesi sonucunda oluşan UV aktif hidroliz ürünlerinin absorbansının ölçülmesi ve bu ölçülen absorbanstan hesaplatılmış konsantrasyonlar doğrultusunda enzim aktivitesinin rakamsal olarak elde edilmesi amacı ile UV-Vis spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

- Waters Alliance 2695 Separation Module with Column Heater, (Waters®, Milford, MA, A.B.D.);

  - Kuarterner pompa, Solvent işletim sayısı; 1-4,

  - Kolon fırını sıcaklık aralığı; 20 - 90°C,

  - Otoörnekleyici sıcaklık aralığı; 4 - 40°C,

  - Solvent karışım modülü; premix modülü,

  - Vakum degaz modülü,

  - 50 µL loop hacmi,

  - Programlanabilir akış hızı aralığı; 0.050 to 5.000 mL/dak.,

  - Maksimum işletim basıncı; 5000 psi (345 bar),

  - Set edilen akış doğruluğu; ≤0.075% RSD,

  - Otoörnekleyici vial kapasitesi; 120 vial.

  - Waters 2996 HPLC PhotoDiode Array Detector (PDA), (Waters®, Milford, MA, A.B.D.);

    - Dalgaboyu aralığı; 190 - 800 nm,

    - Dalgaboyu doğruluğu; ±1 nm,

    - Spektral çözünürlük; 1.2 nm,

    - Baseline gürültüsü; ±1.5 x 10^-5 AU peak-to-peak, 254 nm'de.

- Waters 2414 HPLC Refractive Index Detector (RID), (Waters®, Milford, MA, A.B.D.), (Waters Alliance 2695 HPLC ve 2414 Refraktif İndeks Dedektör);

  - Sıcaklık aralığı: 15 - 32.2 °C,

  - Refraktif indeks aralığı: 1.00 - 1.75 RIU,

  - Akış hızı: 0.1 - 10 mL/dak.,

  - Flow cell (Akış hücresi): Fused quartz,

  - Flow cell hacmi 10 µL,

  - Basınç limiti: 100 psi,

  - Işık kaynağı: Light emitting diode (LED).

Windows 7 Datastation - Empower 3 Software, (Waters Alliance 2695 HPLC Yazılımı) (Waters®, Milford, MA, A.B.D.).

Saflaştırılan diastaz ve invertaz enzimlerinin referans noktalar olarak görüntülenmesinde ve baldaki invertaz ve diastaz aktivitelerinin bu referans noktalardaki pik alanları üzerinden kantitasyonunu yaparak tayin edilmesinde ayrıca yabancı enzim tağşişinin eş zamanlı görüntülenebilmesi amaçlı geliştirilen yöntemde HPLC-PDA sistemi kullanılmıştır. Enzim saflaştırma sürecinin ön hazırlık optimizasyon sürecinde kullanılan tekniklerin, karbonhidrat moleküllerini eliminasyon etkinliğinin değerlendirilmesinde ise şeker profili görüntüleme yöntemi geliştirilmiş ve uygulanmış olup, bu yöntem ise aynı HPLC sisteminin, refraktif indeks dedektör (RID) ile kombine edilmiş versiyonu kullanılarak uygulanmıştır.

### 2.2.6. HPLC kolonları

- BioResolve RP mAb Polifenil kolon, (150 mm ×4.6 mm i.d), 2.7 µm partikül çapı, 450Å por çapı, (Waters®, Milford, MA, A.B.D.).

  Enzim aktivite ve yabancı enzim tağşiş tespiti için geliştirilen yöntemde kullanılmıştır.

- Hypersil™ APS-2 Amino LC kolon, (100 mm × 4.6 mm i.d), 5 µm partikül çapı, (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, A.B.D.).

Şeker profili görüntüleme amaçlı geliştirilen yöntemde kullanılmıştır.

### 2.2.7. Orta basınçlı sıvı kromatografisi sistemi (MPLC) ve ekipmanları

- NGC Quest 10 Kromatografi Sistemi, (#7880001, NGC 10 Orta Basınçlı Sıvı Kromatografi Sistemi) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

Preparatif ölçekte protein (enzim) saflaştırma amaçlı kullanılmış olan sistemin donanım içeriği şu şekildedir;

- 10 mL/dk. Akış hızına çıkabilen ikili (binary) LC pompası (NGC F10 pump modules), Akış aralığı; 0.001–10 mL/dak.,
- 5 mm flow cell (akış hücresi),
- Maksimum işletim basıncı; 3,650 psi (252 bar),
- 4 farklı dalgaboyu set edilebilen UV dedektör,
- İletkenlik dedektörü,
- 1 NGC Numune enjeksiyon valfi, (Manuel enjeksiyon)
- 1 mL loop hacmi,
- 1 NGC solvent karıştırma modülü (263 µL iç hacminde),
- Fraksiyon toplama ünitesi (NGC BioFrac Collector).

ChromLab software, (MPLC cihaz kontrol ve dökümantasyon yazılımı), BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

Bu araştırmada kullanılmış olan tüm preparatif ölçekteki kromatografik enzim saflaştırma teknikleri, BioRad (Hercules-CA, A.B.D.) marka Orta basınçlı Sıvı Kromatografisi (MPLC) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Enzimlerin, elde edilen kromatogramlardaki sinyallerinin saptaması ve fraksiyonlarının toplanması için 4 farklı

dalgaboyu (215 nm, 255 nm, 280 nm, 495 nm) cihaza set edilerek data yorumlamaları gerçekleştirilmiştir. Tuz gradyanlarının uygulandığı yöntemlerde ise iletkenlik dedektöründen de faydalanılarak gradyanın tutarlılığı analiz boyunca görüntülenmiştir. Tüm saflaştırma işlemleri boyunca, enzimlerin stabilitesini korumak adına MPLC sistemi ve fraksiyon toplayıcı ünite, sıcaklığı 4°C'de tutulan bir buzdolabı içerisinde çalıştırılmıştır. Kullanılan konfigürasyon Şekil 2.1.'de verilmiştir.



**Şekil 2.1.** MPLC ve fraksiyon toplayıcı.

### 2.2.7.1. MPLC protein (enzim) saflaştırma kolonları

- Foresight™ CHT™ Tip I kolon (#7324735, 1 mL, Seramik Hidroksiapatit Tip I Multimod kromatografi kolonu, 40 µm partikül çapı, (BioRad, Hercules, CA, A.B.D.).

- Enrich™ Q (Yüksek çözünürlüklü anyon değişim kolonu, #7800001, 5 x 50 mm, 1 mL, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- ENrich™ SEC 650 10 x 300 mm kolon (#7801650, Yüksek çözünürlüklü jel filtrasyon kolonu, 10 x 300 mm, 24 mL, moleküler ağırlık dışlama limitler; 5 kDa –650 kDa), (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- ENrich™ S (#7800021, 5 x 50 mm, 1 mL, yüksek çözünürlüklü katyon değişim kolonu, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- Foresight™ Nuvia™ cPrime™ kolon (#7324722, 1 mL, Hidrofobik katyon değişim kolonu, multi-mod kromatografi reçinesi), (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- Macro-Prep t-Butyl HIC Bulk reçine, (Hidrofobik etkileşim kromatografi reçinesi, 50 µm partikül çapı, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- Vantage® L Laboratory Column VL, (11 mm x 250 mm, Boş biyokromatografi kolonu (Millipore, Merck, Darmstadt, Almanya).

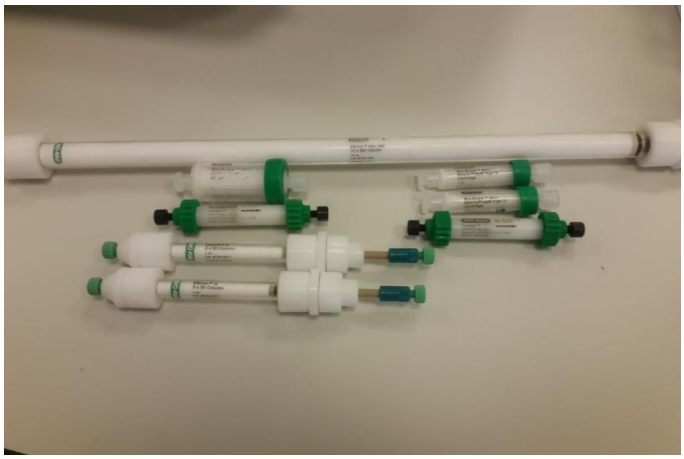
- Lentil Lectin Sepharose™ 4B, (Affinite kromatografi bulk reçinesi, 25 mL, 90 µm) (Cytiva Europe GmbH, Reugelstraat 2, 3320 Hoegaarden, Branch Belçika).

- Bio-Scale™ Mini Bio-Gel® P-6 Desalting Kartuşu, (6 kDa MWCO, 5 mL, jel filtrasyon ve desalting kolonu) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q, (Güçlü anyon değişim kolonu, 5 mL, 50 µm) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

- Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S, (Güçlü katyon değişim kolonu, 5 mL, 50 µm) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).

Şekil 2.2.'de test edilmiş olan tüm kolonlar görüntülenmiştir.



**Şekil 2.2.** Test edilen MPLC kolonları.

### 2.2.8. SDS-PAGE analizi reaktif ve ekipmanları

- Isıtıcı blok, (Digital Dry Bath) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- Mini-PROTEAN Tetra Cell, dikey SDS-PAGE elektroforez tankı, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- 4–20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, (Stain-Free Tris-Glisin SDS-PAGE Jeli (%4-20 gradyan akrilamid jel, 50 ul kuyucuklu, 10 bölmeli), (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- PowerPac™ Basic Power Supply, (SDS-PAGE güç kaynağı, 10–300 V, 4–400 mA) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- Gel Doc EZ Gel Documentation System, (Jel görüntüleme ve analiz cihazı, CCD kameralı, stain-free tray opsiyonlu) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- Image Lab™ Software, (Gel Doc EZ cihazı yazılımı) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- 10x Tris/Glycine/SDS running buffer, (#1610732, 10x konsantre Tris Glisin SDS-PAGE hareketli faz tamponu, içerik; 25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% SDS, pH 8.3) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- 4x Laemmli Sample Buffer, (#1610747, 4 kat konsantre Laemmli SDS-PAGE numune tamponu (BioRad, Hercules-CA A.B.D.).
- 2-Mercaptoethanol, (BME, #1610710, indirgeyici), (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- Protein standardı (protein ladder) (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged rekombinant, Bio-Rad® Laboratories, Inc., Hercules, CA, A.B.D.)

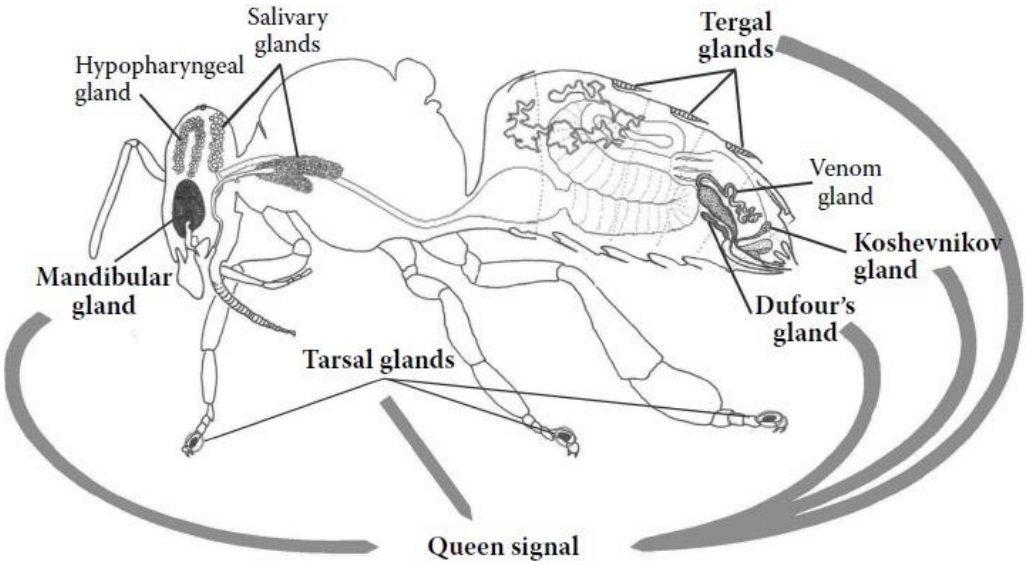
### 2.2.9. HPG diseksiyonu ve ekipmanları

- Forsep, (diseksiyon amaçlı – eğik uçlu, paslanmaz çelik) (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye).
- Forsep, (diseksiyon amaçlı – düz uçlu, paslanmaz çelik) (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye).
- Wild Heerbrugg M12 Binoküler Faz-Kontrast Mikroskop, (WILD, Heerbrugg, İsviçre).
- Polistiren - Steril Petri kabı, 60 x 15 mm, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye)
- Steril vida kapaklı numune kabı, 150 mL 57 x 73 mm, (DeltaLab, İstanbul, Türkiye).
- Dişsiz sivri penset, 11,5 santimetre (Mvm medikal, İstanbul, Türkiye).
- Lam, Rodajsız 90º, (Isolab, İnterlab, Hadımköy, Türkiye).

İşçi bal arıları (*Apis mellifera* L.), çam balı üretimi devam etmekte olan Muğla bölesindeki kovanlardan 2019 yılının Eylül-Ekim aylarında steril numune kaplarına toplanmıştır. Bal arılarına, kuru buz ile anestezi uygulanmış ve diseksiyon işlemi uygulanana kadar -60°C'de muhafaza edilmiştir. Genel olarak, bu deney için kullanılan toplanan bal arıları, ön kanat boyutuna (9 mm) göre yetişkin işçi arılardır. Her bir arının diseksiyonu binoküler mikroskop altında (100X) büyütmede, siyah tabla üzerinde yapılmıştır. Her bir donmuş haldeki bal arısı öncelikle, baş ve abdomen bölgesini torakstan ayırmak için kesildi. Petri içine alınan arının öncelikle penset yardımı ile baş bölgesi, toraks ve abdomenden ayrılmıştır. Ayrılan baş bölgesi HPG'nin kolay eldesi için petride 1-2 mL su içine alınmıştır. Donmuş haldeki numune çözülmeye başladıktan sonra (yaklaşık, 5°C sıcaklıkta), HPG kısımları, forsep yardımı ile öncelikle baş kısmının arkasında yer alan oksiput açılarak izole edildi. Ağız kısmı yukarıya bakacak şekilde yerleştirilmiş ve dikkatli bir şekilde disekte edilerek HPG'ye ulaşılmıştır.

Elde edilen HPG'ler homojenizasyon ve enzim ekstraksiyonuna kadar zarar görmemesi için pipet yardımıyla insect saline tamponu (10 mM Tris / HCl, pH 7.4, 130

mM NaCl, 5 mM KCl ve 1 mM $CaCl_2$) içerisinde ependorf tüplere aktarılarak -60°C'de dondurularak muhafaza edilmiştir. İzole edilen kısımların arı anatomisi üzerinden gösterimi Şekil 2.3.'de verilmiştir. 80 adet HPG disekte edilerek izole edilmiş ve 20'şer adet olacak şekilde 4 ayrı adet eppendorf tüp içerisine 250 ul insect saline tamponu dahil edilerek parsellenmiştir. Yaklaşık olarak, HPG'den diastaz ve invertaz enzimlerinin izolasyonu için gerçekleştirilecek olan çalışmada disekte edilmesi gereken bal arısı sayısı 80 olarak belirlenmiş ve toplanan 320 adet bal arısı disekte edilip izole edilen 320 adet HPG numunesi ekstraksiyon için depolanmıştır. Gerçekleştirilen diesksiyon ve elde edilen bezlere ait görseller Şekil 2.4. ve Şekil 2.5.'de paylaşılmaktadır. Deney için 80 adet HPG kullanılmış olup, ekstraksiyon ve homojenizasyon verimi araştırıma çalışmalarında kullanmak üzere 240 adet HPG numunesi farklı solventler ve hacimler dahil edilerek metot optimizasyonu amaçlı değerlendirilmiştir.

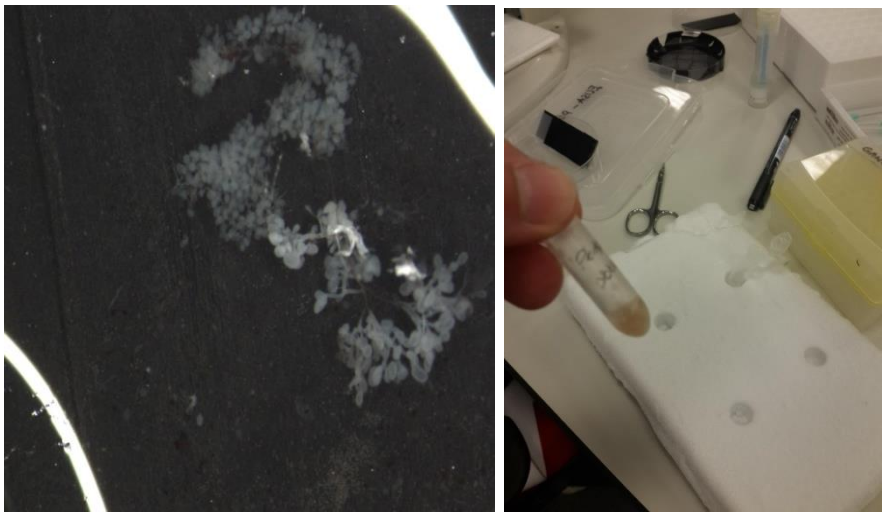



**Şekil 2.3.** Arı anatomisi

(https://www.scientificbeekeeping.co.uk/pheromonesQ.html).



**Şekil 2.4.** Arı diseksiyon çalışması.



**Şekil 2.5.** Disekte edilmiş HPG örnekleri.

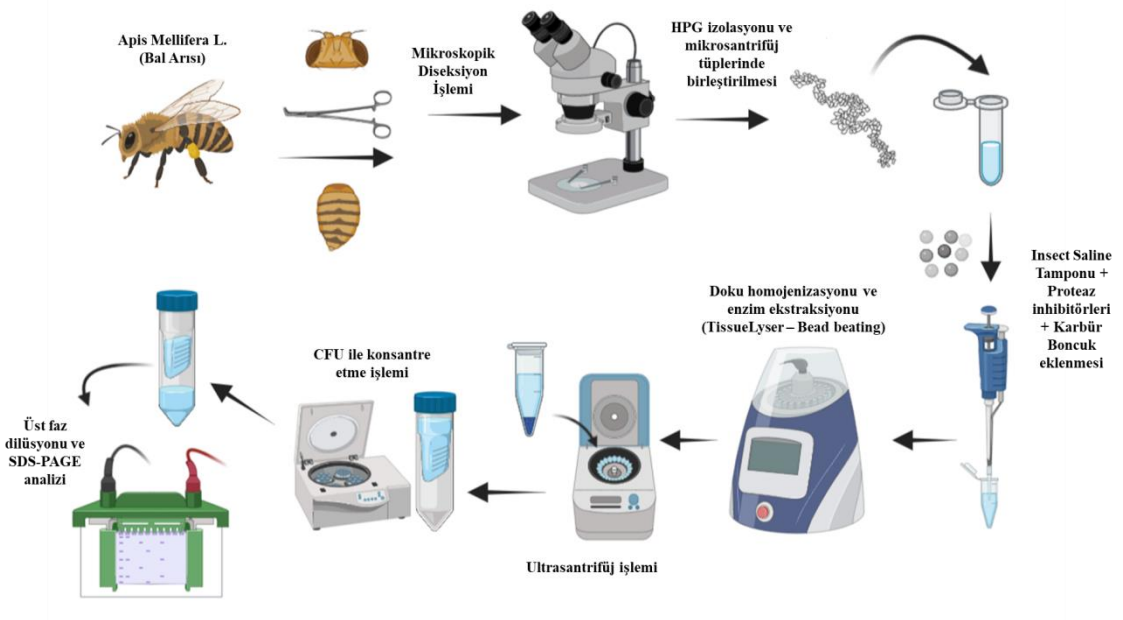
#### 2.2.9.1. Doku homojenizasyon ve enzim ekstraksiyon çalışmasına ait reaktif ve ekipmanlar

- Tissue Lyser LT, (Doku homojenizasyon ekipmanı, 100–240 V, 40–60 Hz, (Qiagen, Hilden, Almanya).
- Tungsten Carbide Beads, (Homojenizasyon için karbür boncuk, 200 adet, 3mm iç çap) (Qiagen, Hilden, Almanya).
- RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu, (100 mL) (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, A.B.D.).
- ReadyPrep™ 2-D Rehydration/Sample Buffer 1, (#1632083, 10 mL, protein solubilizasyon reaktifi, içerik; 7 M üre, 2 M tiyoüre, 1% ASB-14, 40 mM Tris, 0.001% Bromofenol mavisi) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.).
- ProteoGuard EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail, (Proteaz inhibitör kokteyli, içerik; Bestatin (Amino-peptidaz, 5 mM), Pepstatin A (Aspartik asit proteaz, 1 mM), Leupeptin Hemisulfat (Serin ve sistein proteaz, 2 mM), Aprotinin (Serin proteaz, 0,08 mM), PMSF (Serin proteaz, 100 mM)) (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japonya).

Diseksiyon sonrası elde edilmiş ve -60°C'de bekleyen, parsellenmiş olan 80 adet (4 adet 20'şer HPG içeren eppendorf tüp) HPG örneği oda sıcaklığına getirilip mikrosantrifüj tüpü içerisine 4 adet karbür boncuk ilave edilmiştir. Devamında, 10 µL proteaz inhibitör kokteyli ve 3 farklı ekstraksiyon çözeltisi 1,5 mL hacminde eklenerek homojenizasyon ve ekstraksiyon verimi değerlendirilmiştir. Lizis tamponlarının içerisine sıklıkla eklenen EDTA bu çalışmada α-amilaz'ın metalloenzim yapısında olmasından ötürü kullanılmamıştır. Enzimin stabilitesi için kalsiyum iyonlarının rolü önemlidir. EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar enzimin metalloprotein kısmına bağlanarak, apoenzim kısmından ayrılmasına ve enzimin denatürasyonuna, dolayısı ile aktivite inhibisyonuna sebep olabilmektedir. Oluşan homojenizasyon öncesindeki karışım, Tissue lyzer cihazında 42 Hz'de 2 dakika boyunca çalkalanmış ve homojenize edilmiştir. İşlem aralarında numunenin ısınması dolayısı ile oluşabilecek denatürasyon ve proteolitik aktivite kaynaklı protein kayıplarının önüne geçebilmek için

mikrosantrifüj tüpleri 30 saniye kadar buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş ve 2 dakikalık homojenizasyon süreci 3 kez tekrar edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında elde edilen süpernatanların temiz bir şekilde elde edilebilmesi, askıda kalan, girişim oluşturabilecek ve ultrafiltrasyon işleminde tıkanmaya sebebiyet verebilecek maddelerin uzaklaştırılması için 15.000 *x g* kuvvette 20 dakika kadar 4°C'de numuneler ultrasantrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlarda diastaz, invertaz enzim aktivitesi ve toplam protein içeriği analiz edilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonrasında RIPA tamponu ve 2D-rehydration tamponunun insect saline tamponundan farklı bir ekstraksiyon verimi sergilemediği görüldüğünden, final prosedür olarak insect saline tamponu eklentili prosedür uygulanacak protokol olarak kararlaştırılmıştır. Hedeflenen enzimler ekstrasellüler matriks içerisinde yer aldığında ve suda çözünürlükleri yüksek protein yapısında olduklarından, deterjan ve kaotropik ajan eklentili sert ekstraksiyon reaktiflerine gerek kalmamıştır. Sürecin devamında, 20'şer adet HPG içeren 4 ayrı ekstrakt birleştirilir ve CFU'ya aktarılır. CFU da birleştirilmiş ve toplam hacim 10 mL'ye insect saline tamponu ile tamamlanmıştır. 4°C'de 4.000 *x g*'de 40 dakika santrifüj edilen numune 500 uL hacmine kadar düşürülerek konsantre edilmiş ve 1 mL'ye insect saline tamponu ile tamamlayarak muhafaza edilmiştir. Elde edilen final numune stok enzim ekstraktı olarak değerlendirilip, SDS-PAGE analizi için konsantre kalmaktadır. Bu sebepten numune analiz öncesinde farklı seyrelte oranları uygulayarak (1/10, 1/20 vb.) seyreltilir ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirilir. Elde edilen HPG içerisindeki enzimler, baldaki saflaştırılmış olan enzimler ile karşılaştırılmak vede tağşiş tespitinin değerlendirilmesinde kullanılacak olan baldaki doğal protein referanslar olarak stok ekstrakt şeklinde etiketlenerek -60°C'de muhafaza edilmiştir. Tasarlanan yöntem akışı Şekil 2.6.'da verilmiştir.




**Şekil 2.6.** HPG diseksiyon & homojenizasyon ve enzim ekstraksiyon & konsantrasyon çalışmaları özet iş akışı.

### 2.2.10. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

#### 2.2.10.1. Insect saline tamponu (Tris.HCl tamponu)

***10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$;***

3950 mL uss üzerine 4,84 g Tris bazı + 30,38 g NaCl +1,49 g KCl + 0,44 g $CaCl_2$ eklenir. Üzerine 34 mL 1N HCl eklenir, pH 7.4 olduğu kontrol edilir ve yaklaşık 16 mL USS ile 4 litre hacime tamamlanır.

#### 2.2.10.2. MPLC enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılan tamponlar

##### 2.2.10.2.1. Seramik hidroksiapatit (CHT) kromatografisi ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları

***1M $Na_2HPO_4$ (stok çözeltisi);***

178 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$ 1 litrelik balon jöjeye tartılır ve USS ile 1 litreye tamamlanır.

***1M $NaH_2PO_4$ (stok çözeltisi);***

138 gram $NaH_2PO_4.H_2O$ 1 litrelik balon jöjeye tartılır ve USS ile 1 litreye tamamlanır.

8N NaOH (pH ayarlaması için kullanılmaktadır);

320 gram NaOH pellet toplam hacim 1 L olacak şekilde balon jöje içerisinde USS ile çözülerek hazırlanır.

***Mobil faz A, 5 mM fosfat tamponu pH 6.6;***

1,76 mL $Na_2HPO_4$ stok çözetlisi + 3,24 mL $NaH_2PO_4$ stok çözeltisi + 895 mL USS ile karışım 1 litrelik mobil faz şişesi içerisinde hazırlanır. pH 6.6'ya derişik ortofosforik asit (yaklaşık 30 µL) yardımı ile ayarlandıktan sonra, USS ile çözetli hacmi 1 Litreye getirilir.

***Mobil faz B, 400 mM fosfat tamponu pH 6.6;***

140,8 mL $Na_2HPO_4$ stok çözeltisi + 259,2 mL $NaH_2PO_4$ stok çözeltisi + 500 mL USS ilave ederek karışım hazırlanır. Yaklaşık 10,5 mL 8N NaOH eklenerek pH 6.6' ya ayarlanır ve USS ile çözelti 1 litreye tamamlanır.

***CHT kolon şartlandırma, rejenerasyon ve saklama çözeltisi;***

Foresight™ CHT™ Tip I kolon (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.), açılış olarak, 1N NaOH çözetlisi 10 dakika kadar 1mL/dak. akışta geçirilerek şartlandırılır. Daha sonra sırası ile 0,1N NaOH çözeltisi 10 dakika kadar 1mL/dak. akış ile kolondan geçirilir. 5 dakika kadar USS yine 1 mL/dak. akış ile kolondan geçirilerek NaOH uzaklaştırılır. Daha sonra sırası ile Mobil Faz A, Mobil Faz B ve tekrar Mobil Faz A 5 dakika süre ile yine 1 mL/dak. akışta geçirilerek kolon analize hazır hale getirilir. Analiz sonrası kolon USS ile yıkanıp devamında 0,1 N NaOH kolondan geçirilerek kaldırılır.

***1N NaOH çözeltisi;***

40 gram NaOH pellet toplam hacim 1 L olacak şekilde balon jöje içerisinde USS ile çözülerek hazırlanır.

***0,1N NaOH çözeltisi;***

4 gram NaOH pellet toplam hacim 1 L olacak şekilde balon jöje içerisinde USS ile çözülerek hazırlanır.

### 2.2.10.2.2. Anyon (AEX) ve katyon değişim kromatografisi (CEX) ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları

CEX Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S, (Güçlü katyon değişim kolonu, 5 mL, 50 µm) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.). ENrich™ S (#7800021, 5 x 50 mm, 1mL, yüksek çözünürlüklü katyon değişim kolonu, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) ve AEX (Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q, (Güçlü anyon değişim kolonu, 5 mL, 50 µm) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.). Enrich™ Q (Yüksek çözünürlüklü anyon değişim kolonu, #7800001, 5 x 50 mm, 1 mL, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) kolonlar için ortak mobil faz çifti kullanılmıştır. Akış hızı ve gradyan profilleri uygulanan yöntemlerde değişkenlik göstermektedir.

***Mobil faz A, 10 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl tamponu pH 7.4;***

1,21 g tris bazı ve 0,584 g NaCl tartılır ve USS 900 mL ilave edilir. pH 7.4'e ayarlanır (yaklaşık 8,4 mL1N HCl kullanarak). Çözelti 1 litreye USS ile tamamlanır.

***Mobil faz B, 1 M NaCl, 10 mM Tris.HCl tamponu pH 7.4;***

1,21 g tris bazı + 58,44 g NaCl tartılır ve USS ile 900 mL'ye tamamlanır. pH 7.4'e ayarlanır (yaklaşık 8,4 mL 1N HCl). Çözelti 1 litreye USS ile tamamlanır.

***AEX ve CEX kolonlarının şartlandırma, rejenerasyon ve saklama çözeltileri;***

5 dakika kadar USS 0,5-0,8 mL/dak. akış aralığında basınç kontrol edilerek ile kolondan geçirilerek saklama çözeltisi olan %20 EtOH uzaklaştırılır. Daha sonra sırası ile Mobil Faz A, Mobil Faz B ve tekrar Mobil Faz A 5 dakika süre ile yine aynı akış aralığında geçirilerek kolon enjeksiyona hazır hale getirilir. Analiz sonrası kolon USS ile yıkanıp devamında %20 EtOH kolondan geçirilerek kaldırılır.

***%20 EtOH çözeltisi;***

200 mL EtOH ve 800 mL USS, 1L mobil faz şişesi içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

#### 2.2.10.2.3. Boyut eleme kromatografisi (SEC) ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları

***Mobil faz (izokratik uygulama): 100 mM NaCl içeren pH 7.4 – 10 mM Tris.HCl;***

1,21 g tris bazı + 5,84 g NaCl tartılır ve USS 900 mL ilave edilir. pH 7.4'e ayarlanır (yaklaşık 8,4 mL 1N HCl). 1 litreye USS ile tamamlanır.

***SEC kolonlarının şartlandırma, rejenerasyon ve saklama çözeltileri;***

20 dakika kadar USS 0,8 mL/dak. akışta basınç kontrol edilerek kolondan geçirilerek saklama çözeltisi olan %20 EtOH uzaklaştırılır. Daha sonra Mobil Faz 30 dakika süre ile yine aynı akışta geçirilerek kolon enjeksiyona hazır hale getirilir. Analiz sonrası kolon USS ile yıkanıp devamında %20 EtOH kolondan geçirilerek kaldırılır.

#### 2.2.10.2.4. Lektin afinite kromatografisi ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan reaktifler ve hazırlanışları

***Saklama, dolum ve rejenerasyon tamponu, %20 ethanol + %0,9 NaCl+ 1mM $CaCl_2$ + 1 mM $MnCl_2$;***

200 mL etanol ve 700 mL USS 1 litrelik balon jöjeye aktarılır. Üzerine 9 gram NaCl, 0,11 gram $CaCl_2$ ve 0,12 gram $MnCl_2$ tartılarak eklenir. Tuz çözünürlükleri sağlandıktan sonra USS ile 1 litre hacime tamamlanır.

***Bağlanma tamponu ve mobil faz A (binding buffer), 20 mM Tris.HCl pH=7.4, 0,5 M NaCl;***

2,42 g tris bazı ve 29,2 g NaCl tartılır ve USS 900 mL ilave edilir. pH 7.4'e 1 N HCl ile ayarlanır. Çözelti 1 litreye USS ile tamamlanır.

***Elüsyon tamponu-1, 0,1 M borat tamponu pH=6.5;***

Borik Asit ($H_3BO_3$), 1 litrelik balon jöjeye 6,2 gram tartılır ve 800 mL USS ilave edilerek çözülür. 1N HCl ve 1N NaOH ile pH 6.5'e getirilir ve USS ile 1 litre hacime tamamlanır.

***Elüsyon tamponu-2, 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=4.5;***

2,42 g tris bazı ve 29,2 g NaCl tartılır ve USS 900 mL ilave edilir. pH 4.5'e 1N HCl kullanılarak ayarlanır. Çözelti 1 litreye USS ile tamamlanır.

***Elüsyon tamponu-3, 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=7.4, 0,4 M glukoz;***

2,42 g tris bazı, 29,2 g NaCl ve 72 gram glukoz tartılır ve USS 900 mL ilave edilir. pH 7.4'e 1 N HCl ile ayarlanır. Çözelti 1 litreye USS ile tamamlanır.

***Elüsyon tamponu-4, 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=7.4, 1 M glukoz;***

2,42 g tris bazı, 29,2 g NaCl ve 180,1 gram glukoz tartılır ve USS 900 mL ilave edilir. pH 7.4'e 1 N HCl ile ayarlanır. Çözelti 1 litreye USS ile tamamlanır.

### 2.2.10.2.5. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) ile protein saflaştırma uygulaması için kullanılan reaktifler ve hazırlanışları

***Mobil faz A, 2M amonyum sülfat + 30 mM Tris.HCl tamponu, pH 7.4;***

3,63 gram Tris bazı ve 264,2 gram $(NH_4)_2SO_4$ 1 litrelik balon jöjeye tartılır ve 800 mL USS ile çözülür pH 7.4' e 1N HCl ile ayarlanır ve hacim USS ile 1 litreye tamamlanır.

***Mobil faz B, 30 mM Tris.HCl tamponu, pH 7.4;***

3,63 gram Tris bazı 1 litrelik balon jöjeye tartılır ve 800 mL USS ile çözülür pH 7.4' e 1N HCl ile ayarlanır ve hacim USS ile 1 litreye tamamlanır.

### 2.2.10.3. HPLC-PDA sistemi ile enzim aktivite ve tağşiş tespit yönteminde kullanılan mobil faz içerikleri ve hazırlanışları

***Mobil faz A, %5 ACN + %95 USS + %0,1 TFA;***

1 litrelik mobil faz şişesi içerisine 950 mL USS ve 50 ml ACN eklenir. Karışım hazırlandıktan sonra karışımın 1 mL'lik kısmı atılır ve yerine 1 mL derişik TFA çözeltisi eklenerek karıştırılır.

***Mobil faz B, %95 ACN + %5 USS + %0,1 TFA;***

1 litrelik mobil faz şişesi içerisine 950 mL ACN ve 50 mL USS eklenir. Karışım hazırlandıktan sonra karışımın 1 mL'lik kısmı atılır ve yerine 1 mL derişik TFA çözeltisi eklenerek karıştırılır.

### 2.2.10.4. SDS-PAGE running tampon çözeltisi

10X konsantrasyonundaki (10x Tris/Glycine/SDS running buffer, (#1610732, 10x konsantre Tris Glisin SDS-PAGE hareketli faz tamponu, içerik; 25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% SDS, pH 8.3) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) stok çözelti 1 litrelik mobil faz şişesi içerisine 100 mL kadar alınır ve 900 mL USS eklenerek 1 L hacime tamamlanır. İyice karışım sağlandıktan sonra SDS-PAGE işleminde running tamponu olarak değerlendirilir.

### 2.2.10.5. Sodyum maleat tamponu hazırlanışı (100 mM, pH 5.6 + 5 mM $CaCl_2$)

11.6 g of maleik asit ve 0.735 g $CaCl_2.2H_2O$ 1 litrelik balon jöjeye tartılır. 800 mL USS eklenerek çözülür ve pH 5.6'ya 8 N NaOH ile getirilir. Çözelti hacmi 1 litreye USS ilave ederek tamamlanır ve 4°C'de muhafaza edilir.

### 2.2.10.6. Trizma bazı çözeltisi hazırlanışı

20 g of Trizma bazı 900 mL USS içerisinde çözülür. pH 8.5 değerinde olduğu kontrol edilir ve gerekir ise 1 N NaOH çözeltisi ile ayarlanır. Daha sonra çözelti 1 litre hacime tamamlanarak 4°C'de muhafaza edilir.

## 2.3. Yöntemler

### 2.3.1. Şeker profili analizi

DIN-10758 standart yöntemi modifiye edilerek numunelerin şeker içeriği ve profili analiz edilmiştir.

***Mobil faz (İzokratik uygulama), (%83'lük ACN çözeltisi);***

1 L'lik şişeye 170 mL USS ve 830 mL ACN eklenerek karıştırılır. 5 dakika ultrasonik banyoda degaz edilir.

***İğne yıkama çözeltisi;***

500 mL'lik bir şişeye 100 mL metanol ve 400 mL ultra saf su eklenir ve karıştırılır. 10 dakika ultrasonik banyoda degaz edilir.

***Numune hazırlama-1;***

0,5 g homojenize bal 15 mL'lik falkon tüpe tartılır. (± 0,001 g), 7,5 mL ultra saf su konulur, çözeltiye 2,5 mL ACN eklenir ve yatay çalkalayıcıda 30 dakika çalkalanır, şırınga ile alınan yaklaşık 2 mL çözelti, 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek cam viallere aktarılır ve enjeksiyon verilir.

***Numune hazırlama-2;***

Enzimlerin ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi amaçlı yapılan ön hazırlık sürecinin optimizasyonu ve kullanılan analitik yaklaşımların şeker eliminasyon etkinliğini değerlendirmek üzere ara basamaklarda sıvı formda örnekler toplanmış ve geliştirilen şeker profili analizi ile analiz edilmiştir. Bu noktada numune hazırlama protokolü ham bal numunelerinden farklılık göstermekte olup, sıvı formdaki numuneler asetonitril veya saf su eklemek sureti ile daha fazla seyreltilmeden direk sisteme enjekte edilmiştir.

***HPLC-RID şartları;***

Kolon; Hypersil™ APS-2 Amino LC kolon, (100 mm × 3.0 mm i.d), 5 µm partikül çapı, (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, A.B.D.).

Kolon sıcaklığı; 35°C

Enjeksiyon hacmi; 5 µL

Detektör Tipi; Refraktif indeks dedektör- 35°C

Akış; 0.5 mL, izokratik

Analiz süresi; 20 dak.

Kalibrasyon; Eksternal standart ile tek noktalı kalibrasyon

Kalibrasyon standardı (10 bileşen); Glukoz, Fruktoz, sakkaroz, turanoz, maltoz, trehaloz, izomaltoz, erloz, melezitoz, maltotrioz

***Kalibrasyon standardının hazırlanışı;***

Şeker-1 S0*;*

100 mL'lik bir behere 2,0 g fruktoz saflık değeri hesaba katılarak tartılır (±0,0002g ). 1,5 g glukoz saflık değeri hesaba katılarak tartılır ve eklenir (±0,0002 g). Yaklaşık 20 mL ultrasaf su da çözülür, 12,5 mL asetonitril eklenir. 50 mL'lik balon jojede, ultrasaf su ile 50 mL' ye tamamlanır.

Şeker-2 S0;

40 mg sakkaroz, turanoz saflık değeri hesaba katılarak tartılır (±0,05 mg). 40 mg maltoz, trehaloz ve melezitoz saflık değeri ve susuz/hidratsız hali hesaba katılarak tartılır. (±0,05 mg). 20 mg maltotrioz saflık değeri hesaba katılarak tartılır. (±0,05 mg). Hepsi birleştirilir ve yaklaşık 5 mL suda çözülür, 2,5 mL asetonitril eklenir. 10 mL'lik balon jojede, ultrasaf su ile 10 mL' ye tamamlanır.

Şeker-3 S0;

10 mg izomaltoz ve erloz saflık değeri hesaba katılarak tartılır (+0,05 mg). 750 µL ultra saf suda çözülür ve 1 mL'lik viale aktarılır. 250 µL asetonitril eklenir.

Şeker-3 K1;

450 µL Şeker-1 S0, 450 µL Şeker-2 S0 ve 100 µL Seker-3 S0, 1 mL'lik vialde karıştırılır ve vortekslenir. Kalibrasyon ve alıkonma referans noktaları olarak değerlendirilir.

### 2.3.2. Enzimatik aktivite testleri

#### 2.3.2.1. İnvertaz aktivite analizi

IHC-2009 **(Siegenthaler. 1977)** standart yöntemi uygulanarak invertaz aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Baldaki invertaz enziminin pNPG substratı ile reaksiyonundan oluşan p-nitrofenolün spektrofotometrik olarak her bal için ayrı hazırlanmış kör numunelere karşı 400 nm'de ölçülmesi çalışma prensibine dayanmaktadır.

***Fosfat tampon çözeltisinin (0.1 M, pH 6.0) hazırlanması;***

11,66 g $KH_2PO_4$ ve 2,56 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ USS'de çözülür ve 1 L'ye tamamlanır.

***Substrat çözeltisinin (0.02 M) hazırlanması;***

6,025 g pNPG ±0,001 hassas terazide tartılarak hazırlanan fosfat tamponda çözülür ve 1 L'ye tamamlanır.

***Trizma bazının (3 M) hazırlanması;***

363,42 g trizma bazı suda çözülür ve 1 L'ye tamamlanır. 1N HCl ile pH 9.5'e ayarlanır.

***Numune hazırlama;***

- 5 g bal tampon çözeltisi ile 25 mL'ye 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisinde tamamlanır.
- 5 mL substrat çözeltisi 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınır ve bal çözeltisi eklenmeden önce 5 dakika 40 $^{o}$C'de su banyosunda bekletilir.
- 0,5 mL bal çözeltisi eklenir (Başlangıç zamanı, bal çözeltisinin eklenmesi ile başlar). Karışım vortekslenir ve 40$^{o}$C su banyosuna konur.
- 20 dakika sonra 0,5 mL reaksiyon sonlandırıcı (Trizma Bazı) eklenir ve vortekslenir (Örnek çözeltisinde reaksiyon sonlandırıcı sonradan eklenir).
- Kör numune için ise 5 mL substrat çözeltisi 40$^{o}$C'de 5 dakika bekletilir. 5 dakika sonra reaksiyon sonlandırıcı eklenir, karıştırılır ve sonra 0,5 mL bal çözeltisi eklenir. Her bal numunesi için ayrı bir blank numune hazırlanır. (Blank numunede önce reaksiyon sonlandırıcı, sonra bal örneği eklenir).
- Hazırlanan numuneler sepktrofotometrede 400 nm'de okuma yapılır.

***Sonuçların hesaplanması;***

Balda invertaz aktivitesi U/kg olarak aşağıdaki formül ile hesaplanır (Eşitlik 2.1.).

1U/kg = (1μmol p-NPG/(dak. X kg bal)

U/kg'da invertaz = 6 X 0.05 X 0.05298 X 104 X ΔA= 158,94 X ΔA (2.1.)

U = 1 uluslararası birim,

6 = kullanılan örnek çözeltisinin mL faktörü,

0.05 = reaksiyon süresini 20 dakikadan 1 dakikaya çevirir (1/20 dak.),

104 = bal miktarını 1 kg'ye çevirir,

0,05298 = 7,37/139,11 µg'den µM'ye çevirme faktörü

Balda invertaz aktivitesi invertaz sayısı cinsinden ise aşağıdaki formül ile hesaplanır (Eşitlik 2.2.).

$$IN=21.64 \times \Delta A \qquad (2.2.)$$

ΔA: Örnek çözeltisi ile boş arasındaki absorbans farkıdır.

IN: İnvertaz sayısı

Modifiye edilmiş deney protokolü MPLC fraksiyonları ve HPG ekstraktları için şu şekilde uygulanmıştır;

- 2,5 mL substrat çözeltisi 15 mL'lik santrifüj tüpüne alınır ve fraksiyon veya HPG ekstrakt eklemeden önce 5 dakika 40°C su banyosunda bekletilir.
- 0,25 mL örnek çözelti eklenir. Karışım vortekslenir ve 40°C su banyosuna konur.
- 20 dakika sonra 0,25 mL reaksiyon sonlandırıcı (Trizma Bazı) eklenir ve vortekslenir (Örnek çözeltisinde reaksiyon sonlandırıcı sonradan eklenir).
- Kör numune için ise 2,5 mL substrat çözeltisi 40°C'de 5 dakika bekletilir. 5 dakika sonra reaksiyon sonlandırıcı 0,25 mL eklenir, karıştırılır ve sonra 0,25 mL bal çözeltisi eklenir. Her bal numunesi için ayrı bir blank numune hazırlanır. (Blank numunede önce reaksiyon sonlandırıcı, sonra numune eklenir).
- Hazırlanan numuneler sepktrofotometrede 400 nm'de okuma yapılır.

***Sonuçların Hesaplanması;***

Balda invertaz aktivitesi U/kg olarak aşağıdaki formül ile hesaplanır (Eşitlik 2.3.).

1U/kg = (1µmol p-NPG/(dak. X kg bal)

$$\text{U/kg'da invertaz} = 6 \text{ X } 0.05 \text{ X } 0.05298 \text{ X } 104 \text{ X } \Delta A = 158,94 \text{ X } \Delta A \qquad (2.3.)$$

U = 1 uluslararası birim,

6 = kullanılan örnek çözeltisinin mL faktörü,

0.05 = reaksiyon süresini 20 dakikadan 1 dakikaya çevirir (1/20 dak.),

104 = bal miktarını 1 kg'ye çevirir,

0,05298 = 7,37/139,11 μg'den μM'ye çevirme faktörü

### 2.3.2.2. Diastaz aktivite analizi

Diastaz aktivite analizinin gerçekleştirilmesi için 'Diastase Activity (α-amylase) In Honey Assay / T-AMZHY, (Diastaz aktivite tayin test kiti, Megazyme, Ireland)' tedarik edilmiş ve modifiye edilerek örneklere uygulanmıştır. Bu kitin çalışma prensibi Phadebas® ölçüm tekniğine dayanmaktadır. Kit içerisinde tedarik edilen Amylazyme tabletleri Phadebas tabletlerine çok benzemek ile birlikte içerisinde boyanmış yapıda, çapraz bağlı amiloz (nişasta molekülünün doğrusal fraksiyonu) bulundurmaktadır. Phadebas® tabletlerindeki substratın aksine, Amylazyme tabletleri tampon solüsyona eklendiğinde hızla hidratlanır ve boyanmış, çapraz bağlı amiloz partikülleri tampon solüsyonu absorbe eder. α-amilaz varlığında substrat hidrolize olur ve çözünür boyalı ürünler açığa çıkar. Reaksiyon sonlandırılır ve örneğin absorbansı 590 nm'de ölçülür. Örneğin absorbansı, diastaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Amylazyme'in Phadebas® tabletlere göre en büyük avantajı, Amylazyme tabletlerindeki çapraz bağlanma derecesinin, substratın hızlı hidrasyonunu ve şişmesini sağlamak için optimize edilmiş olmasıdır. Kit, tüm standart yöntemlerde olduğu gibi Schade Unit cinsinden sonuç aşağıdaki formülasyona göre verebilmektedir (Eşitlik 2.4.).

α-Amylase aktivitesi (diastaz aktivitesi - DN); (Schade unit / 1 gram bal) = 20.0 x ΔAbs (Amylazyme), (Standart ölçüm şartları altında; 10 dak., 40°C, pH 5.6 ve örnek hacmi 1.0 mL). (2.4.)

Modifiye edilmiş deney protokolü bal numuneleri için şu şekilde uygulanmıştır;

1. 1 g bal numunesi 50 mL santrifüj tüpleri içerisine tartılır ve 20 mL of 100 mM sodyum maleat tamponu (pH 5.6) eklenerek numune çözülür ve homojenize edilir. Daha sonra çözeltinin hacmi 25 mL'ye tamamlanır.

2. 1.0 mL kadar belirtilen şekilde hazırlanmış bal çözeltisinden 15 mL'lik santrifüj tüpüne transfer edilir ve numune sıcak su banyosunda 40°C'de 5 dakika kadar inkübe edilir.

3. Forsep yardımı ile tüp içerisine 1 adet Amylazyme tablet ilave edilir ve su banyosundan numuneyi çıkarmadan ve çalkalama yapmadan numune 40°C'de 10 dakika kadar inkübe edilir.

4. İnkübasyon sonrasında, tüp su banyosundan çıkartılır ve 10 mL kadar Trizma baz çözeltisi (%2 w/v) reaksiyonu sonlandırmak için tüp içerisine ilave edilir. Tüp hızlıca karıştırılır ve oda sıcaklığına ulaşması beklenir.

5. 4000 *x g* kuvvette tüp oda sıcaklığında 5 dakika kadar santrifüj edilir. Oluşan üst faz spektrofotomete küvetine transfer edilerek absorbansı 590 nm'de ölçülür.

6. Her bir numune seti için tek bir kör numune (reagent blank) gereklidir ve bu örnek, spektrofotometreyi sıfırlamak için kullanılır. Bal çözeltilerinin absorbansı daha sonra bu kör numuneye karşı ölçülür.

7. Kör numunenin hazırlığı için 1 mL örnek yerine sodyum maleat tamponu 1 mL santrifüj tüpüne transfer edilerek analiz gerçekleştirilir.

Modifiye edilmiş deney protokolü MPLC fraksiyonları ve HPG ekstraktları için şu şekilde uygulanmıştır;

1. 400 µL hacminde MPLC sisteminde elde edilen fraksiyon, ön hazırlık fraksiyonu veya HPG ekstrakt örneği 800 µL hacminde 100 mM sodyum maleat tamponu (pH 5.6) eklenerek, 15 mL'lik santrifüj tüpü içerisinde vorteks yardımı ile karıştırılır.

2. 1.0 mL kadar belirtilen şekilde hazırlanmış çözelti sıcak su banyosunda 40°C'de 5 dakika kadar inkübe edilir.

3. Forsep yardımı ile tüp içerisine 1 adet Amylazyme tablet ilave edilir ve su banyosundan numuneyi çıkarmadan ve çalkalama yapmadan numune 40°C'de 10 dakika kadar inkübe edilir.

4. İnkübasyon sonrasında, tüp su banyosundan çıkartılır ve 10 mL kadar Trizma baz çözeltisi (%2 w/v) reaksiyonu sonlandırmak için tüp içerisine ilave edilir. Tüp hızlıca karıştırılır ve oda sıcaklığına ulaşması beklenir.

5. 4000 *x g* kuvvette tüp oda sıcaklığında 5 dakika kadar santrifüj edilir. Oluşan üst faz spektrofotomete küvetine transfer edilerek absorbansı 590 nm'de ölçülür.

6. Her bir numune seti için tek bir kör numune (reagent blank) gereklidir ve bu örnek, spektrofotometreyi sıfırlamak için kullanılır. Bal çözeltilerinin absorbansı daha sonra bu kör numuneye karşı ölçülür.

7. Kör numunenin hazırlığı için 0.4 mL örnek yerine sodyum maleat tamponu 0.4 mL santrifüj tüpüne transfer edilerek analiz gerçekleştirilir.

Başlangıç numunesi olarak alınan 1 mL analiz numunesi, tampon çözelti ile 1:2 oranında karıştırılmış ve seyreltilmiş analiz edilecek hedef numuneyi içermektedir. Bu sebepten ötürü, Bulunan DN değeri, 3 ile çarpılarak fraksiyon veya HPG ekstraktının diastaz aktivitesi hesaplanmaktadır.

### 2.3.3. Toplam protein konsantrasyon analizi

Quick Start™ Bradford Protein Assay kit (Toplam protein konsantrasyonu ölçme kiti), (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.), [223].

- Sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin (BSA)) Standard Serisi: 7 adet 2 mL'lik hacimlerde BSA konsantrasyon serisi; (2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL). Tüm standartlar, %0,9 NaCl, %0.05 $NaN_3$ çözeltisi içerisinde servis edilmektedir, (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.).

- 1x Boya reaktifi: 1 Litrelik hacimde, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası, MeOH ve fosforik asit karışımı şeklinde servis edilmektedir, (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.).

Enzim saflaştırma ve bu işlemler için öncesinde gerçekleştirimiş olan numune hazırlık adımlarında elde edilmiş olan numunelerin toplam protein konsantrasyonları elde edilmiş enzim aktiviteleri ile karşılaştırılarak, saflaştırma ve zenginleştirme verimleri değerlendirilmiştir. Toplam protein konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan BioRad Protein test prosedürü (Bradford test prosedürü) çalışma prensibi şu şekildedir;

Bradford deneyi, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanmasını içeren bir protein kantitasyon yöntemidir [223]. Boya üç formda bulunabilmektedir: katyonik (kırmızı), nötr (yeşil) ve anyonik (mavi) [224]. Asidik koşullar altında, boya ağırlıklı olarak çift protonlanmış kırmızı katyonik formdadır ($A_{max}$ = 470 nm). Bununla birlikte, boya proteine bağlandığında, stabil bir protonlanmamış mavi forma dönüştürülür ($A_{max}$ = 595 nm) [225, 226]. Bir spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilen deneyde, 595 nm'de saptanan absorbans değeri bu mavi protein boyasından ileri gelmektedir.

Yöntemin numunelere uygulama prosedürü ise aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

0,02 mL miktarındaki numune veya BSA kalibrasyon standardı, 1 mL hacmindeki Bradford reaktifi ile spektrofotometre küveti içerisinde pipetaj yaparak hafifçe karıştırılmış ve 2 dakikalık inkübasyon sonrasında 595 nm'de absorbansı kaydedilmiştir. Spektrofotometredeki tüm okumalar Bradford reaktifi ile karıştırılmış 0,02 mL hacmindeki insect saline tamponundan elde edilmş olan reaktif blank numunesine karşı gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği sığır serum albümin standartları kullanılarak 7 noktalı olacak şekilde hazırlandı ve doğrusallık denkleminin eğimi belirlemek için standart bir eğri çizildi. Elde edilen bilinmeyen numune absorbansına göre protein konsantrasyonu aşağıdaki denklem ile belirlenmiştir (Eşitlik 2.5.).

µg/mL cinsinden protein konsantrasyonu = (A595 / eğim) * Seyreltme faktörü. (2.5.)

### 2.3.4. Bal proteinlerinin izolasyonu

Balda bulunan protein miktarı çok azdır. Bu nedenle, bu proteinleri balda bulunan diğer bileşenlerden ayırmak ve izole etmek çok zordur. Bu çalışmada, bal proteininin izolasyonu için doygun inorganik tuz eklentisi ile çöktürme (salting-out) öncelikli olarak değerlendirilmiştir. Organik çözücüler kullanarak (aseton, asetonitril, etanol vb.) veya Trikloroaseitk asit eklentisi gibi (TCA çöktürmesi) protein izoelektrik nokta değerlerini düşünerek gerçekleştirilen protein izolasyon teknikleri, hedeflenen enzimlerin denatürasyonuna sebebiyet verip enzim aktivitelerini ortadan kaldıracağından ötürü çalışmada değerlendirilmemiştir. Doygun Amonyum sülfat çözeltisi kullanılarak toplam bal proteinlerinin çöktürülmesi ve izolasyonu öncelikli olarak bu çalışmada test edilmiştir.

#### 2.3.4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi (kimyasal yöntem)

Bal proteinleri, amonyum sülfat çöktürme yöntemi kullanılarak konsantre edilmeye çalışılmıştır. Sıralı bir şekilde bal proteinlerinin çöktürülmesi için farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çözeltileri (%70-90 w/v) kullanılmıştır. Bu işlem için yaklaşık 50 g çam balı örneği, 100 mL amonyum sülfat doygun çözeltisi (farklı doygunluk derecelerine sahip) eklenerek homojenize edilmiştir. Çözeltilerin eklenmesinin ardından oluşan homojen bal çözeltisi 4°C'de 4 saat inkübasyona bırakılarak proteinlerinin çökme ivmesi gözlemlenmiştir. Uygulanan santrifüj işlemi sonrasında proteinler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bal, doğası gereği çok viskozdur. Bu nedenle, tuz ile çöktürme işlemi uygulayarak bal proteinlerini izole etmenin zor olduğu gözlemlenmiştir. İşlem sonunda hiçbir amonyum sülfat konsantrasyonunda görünür bir protein pelleti gözlemlenmemiştir. Aynı prosedür, enzim saflaştırma işlemleri öncesinde yüksek konsantrasyondaki amonyum sülfatı uzaklaştırmak için diyaliz veya desalting işlemleri gerektireceğinden ve baldaki düşük verimden dolayı HPG örneklerinde de test edilmemiştir. Bu nedenlerden ötürü baldan ve doku numunelerinden proteinlerin/enzimlerin izolasyonu ve konsantre edilmeleri için kimyasal ajanlar ekleme haricinde fiziksel izolasyon ve zenginleştirme odaklı alternatif tekniklere çalışmanın devamında başvurulmuştur.

### 2.3.4.2. Ultrafiltrasyon yöntemleri (fiziksel yöntem)

Çalışmada 2 farklı ultrafiltrasyon ekipmanı farklı hacimlerde ultrafiltrasyon işlemini sağlayacak şekilde kullanılmıştır. Diastaz ve İnvertaz enzimlerinin ekstrakte ve konsantre edilmesi ve ayrıca küçük moleküllerinden elimine edilmesi, tampon değişimi amaçları ile 2 farklı ultrafiltrasyon ekipmanı ardışık olarak kullanılmıştır. Bu ekipmanlardan, Amicon® stirred cell ultrafiltrasyon ekipmanı, 400 mL hacimde (Merck, Darmstadt, Almanya) hazırlanan yüksek hacimli bal çözeltilerini konsantre etme amaçlı kullanılırken, 2 farklı materyaldeki ultrafiltrasyon membranı etkinlik açısından değerlendirilmiştir. Biomax® 10 kDa PES ultrafiltrasyon disk membranı, 76 mm çapında - stirred cell uyumlu (Merck, Darmstadt, Almanya) ve Ultracel® 10 kDa Rejenere selüloz ultrafiltrasyon disk membranı, 76 mm çapında - stirred cell uyumlu (Merck, Darmstadt, Almanya) aynı çam balı örneği ile tüm ilgili ve valide deney adımı aynı kalacak şekilde karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Bal örneği için stirred cell uygulaması sonrasında konsantre şekilde elde edilmiş olan bal çözeltisi ikinci bir ön hazırlık adımı için, diyaliz ekipmanı ve CFU (Amicon® Ultra-15, Santrifüj uyumlu Ultrafiltrasyon Ekipmanı (CFU), 10 kDa MWCO, 15 mL hacimli (Merck, Darmstadt, Almanya)) ile karşılaştırmalı olarak ilave konsantre etme ve diyafiltrasyon etkinlikleri açısından test edilmiştir. Santrifüj uyumlu CFU ekipmanları hem HPG numunelerinden izole edilen enzimlerin konsantre edilmesi hemde temizlenmesi amacı ile kullanılmış olup, bal örneklerinde ise stirred cell ile konsantre edilmiş numunelerin bir adım daha konsantre edilmesi aynı zamanda yıkama işlemi yaparak (ultra-diyafiltrasyon – tampon değişimi odaklı) alt-akım işlemlerine girişim yapabilecek şeker, organik asit, mineral ve tuzlar gibi majör bileşenlerin elimine edilmesi amaçlı değerlendirilmiştir.

Ultrafiltrasyon işlemleri için gerçekleştirilen final/valide ön-hazırlık protokolü şu şekildedir;

1. Çam balı örneği 50 gram kadar temiz bir behere tartılır ve içerisine alkol ile steril edilmiş bir manyetik balık eklenir.

2. Insect saline tamponu (Tris.HCl tamponu) ile hacmi cam beherin yaklaşık 400 mL çizgisine denk gelecek şekilde çözelti hazırlanarak manyetik karıştırıcıda numune homojen hale getirilir.

3. Soğutmalı inkübatör içerisine kurulan düzenekte, manyetik karıştırıcı ve bunun üzerine gelecek şekilde stirred cell ekipmanı ve azot gazı akışının sağlanacağı bağlantılar yapılır. Ultrafiltrasyon işlemi sırasında oluşacak filtrat (atık) toplama için 500 mL hacminde bir cam beher inkübatör içerisine atık bağlantısı içerisine gelecek şekilde yerleştirilir.

4. Stirred cell ekipmanına, 10 kDa boyut dışlama limitine (MWCO) sahip PES veya rejenere selüloz (RC) membranlar monte edilerek, membranların şartlandırılması için, düzenekten 2 defa 400 mL hacminde USS geçirilir ve böylece membranlar şartlandırılır.

5. Daha sonra hazırlanmış olan homojen çam balı çözeltisi, 4000 *x g* kuvvette, enzim aktiviteleri kaybolmaması için 4°C'de 20 dakika olacak şekilde 50 mL'lik 8 adet santrifüj tüpüne bölünerek santrifüjlenir ve pelletler atılır. Üst fazlar stirred cell içerisine aktarılarak birleştirilir konsantre etme adımına başlanır.

6. Stirred cell'de konsantre etme işlemine 2 bar basınçlık azot akımı altında ve sürekli karıştırma uygulanarak başlanır. Ortalama 15 mL civarında konsantre bal çözeltisi kalana kadar işleme devam edilir. Azot basıncı, ultrafiltrasyon devam ettikçe konsantre hale gelen örneğin viskozite artacağından ötürü maksimum 5 bar basınca kadar arttırılır. Bütün işlemler enzim stabilitesini korumak için 4°C'de, inkübatör içerisinde yapılır. (Şekil 2.7.)

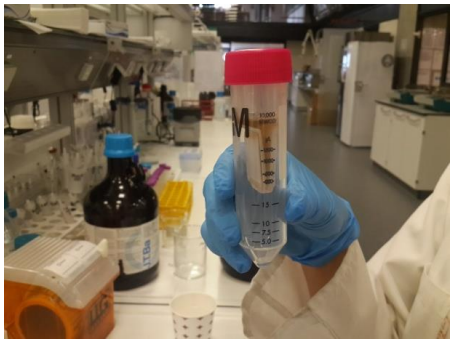
7. Stirred cell üzerinde işlem sonunda oluşan 15 mL civarındaki konsantre çözelti 2'şer mL olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine bölünerek transfer edilir, 15.000 *x g*'de 4°C'de 10 dakika kadar santrifüj edilir.

8. Ultrasantrifüj sonunda oluşan üst fazlar temiz bir 15 mL santrifüj tüpüne transfer edilirek tekrar birleştirilir. 12-15 mL civarında numune PVDF 0,45 μm'lik şırınga filtresinden geçirilirek başka bir 15 mL santrifüj tüpüne toplanır.

9. Konsantre haldeki yaklaşık 12 mL hacmindeki bal proteinlerini ve enzimlerini içeren çözelti bundan sonra ilave bir konsantre etme adımı ile birlikte çözelti içerisinde kalan küçük molekül ağırlığına sahip organik ve inorganik moleküllerden elenmek için CFU prosesine tabi tutulmuştur. (Şekil 2.8.)



**Şekil 2.7.** Stirrred Cell Ultrafiltrasyon (SCU) düzeneği.



**Şekil 2.8.** Ek konsantre etme ve temizleme işlemlerinin gerçekleştirildiği centrifugal filtration unit (CFU) ekipmanı.

***CFU protokolü;***

1. Santrifüj uyumlu ultrafiltrasyon tekniği için 10 kDa boyut eleme etkinliğine sahip membran ile donatılmış olan CFU ekipmanı kullanılmıştır. Stirred cell işlemi sonunda elde edilmiş yaklaşık 12 mL hacmindeki konsantre protein çözeltisi CFU ekipmanına aktarılır.

2. CFU ile ikinci konsantre etme ve clean-up (temizleme) işlemine, numuneye yaklaşık 40 dakika 5000 *x g*'de 4°C'de santrifüj edilirek başlanır. İşlem sonunda 500 µL civarında üst faz filtre üzerinde kalacaktır. Filtrate ise atılarak işleme devam edilecektir.

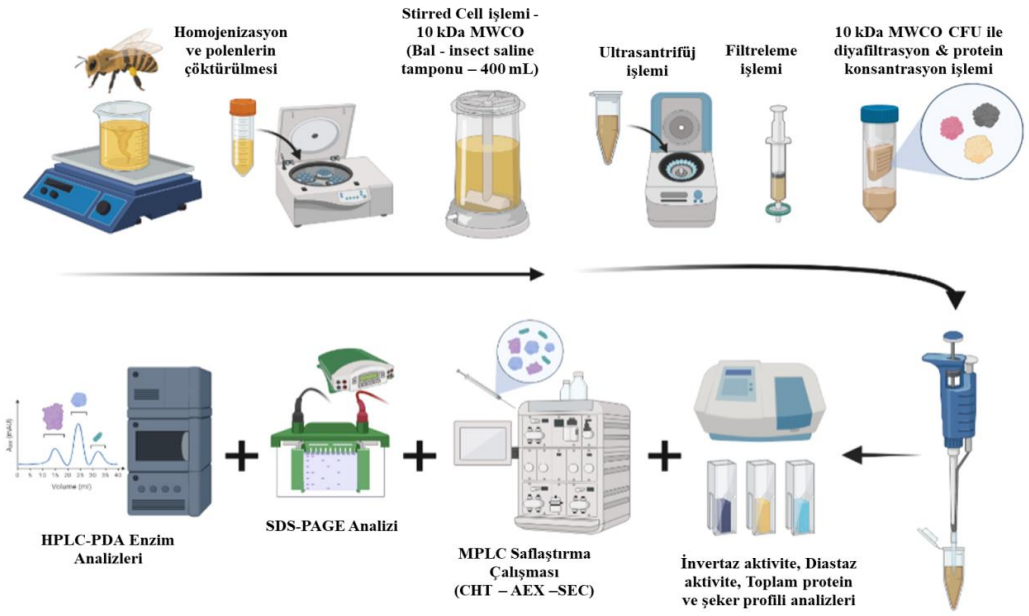
3. Birinci yıkama işlemi için 12 mL insect saline tamponu filtre üzerine eklenir ve homojenize ettikten sonra 40 dakika 5000 *x g*'de 4°C'de santirfuj edilir.

4. 1. yıkama işlemi sonunda kalan 500 µL civarı retentat birkez daha 12 mL insect saline eklenerek homojen hale getirilip yıkanır (40 dak., 5000 *x g*'de, 4°C'de).

5. 2. yıkama işlemi sonunda kalan 500 µL civarı retentat birkez daha 12 mL insect saline eklenerek homojen hale getirilip yıkanır. (40 dak., 5000 *x g*'de, 4°C'de).

6. 3. yıkama işlemi tamamlandığında filtre üzerinde kalan retentat insect saline tamponu eklenerek MPLC'ye enjeksiyona hazır homojen numune haline getirilir. Bunun için retentat içersindeki µL cinsinden ne kadar hacim olduğuna bakılarak 3,5 mL'ye çözelti tamamlanır ve homojen edilerek 1,1 mL *(500 µL invertaz deneyi + 400 µL diastaz deneyi + 20 µL Toplam protein deneyi + 100 µL SDS-PAGE ve toplam protein ölçümleri için mikrosantrifüj tüpü içine aktarılarak -60°C'de saklanmıştır)* kısmı performans testleri için ayrılır (*MPLC Saflaştırma öncesi son numune)*. Geriye kalan 2,4 mL, 3 ayrı mikrosantrifüj tüpüne parsellenir ve MPLC analizine kadar -60°C'de muhafaza edilir.

7. Hazırlanmış numuneler (3 adet) MPLC'de diastaz ve invertaz saflaştırma prosedürüne tabi tutulur. Gerçekleştirilen final protein izolasyon iş akışı Şekil 2.9.'da özetlenmiştir.




**Şekil 2.9.** Final ön hazırlık prosedürü özet iş akışı.

#### 2.3.4.2.1. HPG ekstraktlarına uygulanan CFU protokolü

1. HPG ekstraktları CFU ekipmanları kullanılarak, ilave konsantre etme ve temizleme işlemine tabi tutulur. Bunun için 10 kDa boyut eleme etkinliğine sahip membran ile donatılmış olan CFU ekipmanı kullanılmıştır. Toplanan 80 adet HPG örneğinden ekstrakte edilmiş 4 numune (4 X 20 HPG) hacimleri tek bir CFU da birleştirilirek işleme başlanır.

2. CFU'da birleştirilmiş ve toplam hacim 10 mL'ye insect saline tamponu ile tamamlanmıştır.

3. CFU ile ikincil konsantre ve temizleme işlemine, numuneye yaklaşık 45 dakika 4000 *x g*'de 4°C'de santrifüj edilirek başlanır. Santrifüj edilen numune 500 uL hacmine kadar düşürülerek konsantre edilmiştir. Filtrat ise atılarak işleme devam edilecektir.

4. Filtre üzerinde kalan retentat insect saline tamponu eklenerek 1 mL hacime tamamlanır ve mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak, SDS-PAGE, toplam protein ölçümü ve enzim aktivite analizlerine kadar -60°C'de muhafaza edilir.

### 2.3.4.3. Diyaliz yöntimi

Diyaliz denemesi için, Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes, 20 kDa MWCO, 12 mL ekipmanı, diyaliz tüplerine göre pratik kullanımı dolayısı ile tercih edilmiştir (Şekil 2.10.). Ön hazırlık optimizasyon süreci için yapılan deneyde 40 mL hacminde konsantre protein çözeltisi stirred cell ile elde edilmiş ve bu çözeltinin 32 mL'lik kısmı CFU ekipmanına geriye kalan 7,5 mL'lik kısım CFU işlemine alternatif olarak, diyaliz kasedine yüklenmiş ve küçük moleküllerin eliminasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Tüm diyaliz işlemi, stirred cell işleminin gerçekleştirildiği soğutulmuş (4°C) inkübatör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Burada kaset önce hidratize edilmesi için USS içerisine ağzı kapalı şekilde daldırılır ve 5 dakika kadar bekletilir. Daha sonra fazla ıslaklık peçete ile alınır. Pipet ile 7,5 mL hacmindeki protein çözeltisi tepeden kasete yüklenir ve üstte kalan hava, membranı 2 yandan sıkarak alınır ve diyaliz kasedinin kapağı kapatılarak diyaliz işlemine başlanır. 2 L hacime sahip cam beher içerisindeki diyaliz tamponu olarak kullanılan USS içerisine, numune diyaliz kasedi

vasıtası ile daldırılır. 2 L USS içerisine streilize edilmiş manyetik balık ilave edilerek tüm işlem manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilir. Diyaliz tamponu, başlangıç anından itibaren 2 saat sonunda, 2 mL örnek alındıktan sonra taze 2 L USS ile değiştirilmiştir. İşleme devam edilip ve 2 saat sonunda tekrar 2 mL kadar numune alınarak 2 L USS tazelenmiş ve 15 saat kadar diyaliz işlemine devam etmek üzere bırakılmıştır. Bu süre sonunda 3. Numune olarak 2 mL örnek diyaliz tamponundan alınarak işlem sonlandırılmıştır.

Diyaliz sonunda kaset içerisinden 1,5 mL örnek alınarak performans testleri (Enzim aktivite, toplam protein, şeker profili) gerçekleştirilmiştir. Kalan 6 mL numune, CFU'ya aktarıldı ve 40 dakika kadar 4°C'de 5000 *x g*'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda filtrattan 2 mL kadar analiz için ayrıldı. Yaklaşık 500 µL hacmindeki retentat insect saline tamponu ile 1,5 mL 'ye tamamlanıp homojenize ederek performans testleri için saklandı. Analiz sonuçları incelendiğinde, diyaliz işleminin yeterli temizleme işlemini uzun süren ön işlem sounda gerçekleştirdiği ayrıca bunun özellikle ısıya karşı stabilitesi düşük olan invertazda fazlası ile kayba yol açtığı gözlemlenmiştir. Ek olarak diyaliz ön işlemi prensibi dolayısı ile ek konsantre etme özelliği yoktur. İşlem sonrasında CFU ile yapılan temizlik uygulamasına göre etkin bir sonuç olması ihtimaline istinaden diyaliz sonrası CFU ile ek konsantrasyon elde edilmeye çalışılmıştır. Fakat diyaliz ile kayıp invertaz özelinde oldukça fazla olduğundan ve CFU ile temizleme aşamasında istenilen verim yeterli düzeyde alındığından ötürü ön işlem sürecinde stirred cell sonrasında CFU uygulaması uygun görülmüştür. Detaylı analiz sonuçları bulgular bölümünde tartışılmıştır. Doku örnekleri için ise sadece CFU prosedürü uygulanmıştır.



**Şekil 2.10.** Temizleme işlemlerinin gerçekleştirildiği diyaliz kasedi ve uygulanması.

### 2.3.5. MPLC ile invertaz ve diastaz saflaştırma yöntemleri

#### 2.3.5.1. İyon değişim kromatografisi (anyon (AEX) ve katyon değişim (CEX) kromatografisi)

##### 2.3.5.1.1. Katyon değişim kromatografisi (CEX) yöntemleri

Katyon değişim kromatografisi kullanarak enzim saflaştırma denemesi için 2 farklı preparatif reçine, kolon formatında, MPLC sistemine adapte edilerek test edilmek üzere tedarik edilmiştir;

- Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S, (Güçlü katyon değişim reçinesi, 5 mL iç hacminde, 50 µm partikül çapı, (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.).
- ENrich™ S (#7800021, 5 x 50 mm, 10 µm partikül çapında, 1 mL iç hacminde, yüksek çözünürlüklü katyon değişim reçinesi, (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.)

Akış hızı ENrich™ S kolon için, 0,65 mL/dak. iken, Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S kolon için ise 4,0 mL/dak. olarak planlanmıştır. Her iki kolonun rezolüsyon ve alıkoyma etkinliği aynı mobil faz bileşimleri kullanılarak test edilmesi planlanmış olup, kullanılan mobil faz içerikleri; Mobil faz A için; 10 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 ve mobil faz B için; 1 M NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 şeklindedir. Gradyan boyunca pH sabit tutulup, insect saline tamponu içerisindeki taşıdıkları yük polarizasyonu (anyon veya katyon) dolayısı ile kolonda tutunma kabiliyeti gösteren enzim ve proteinlerin artan NaCl konsantrasyonu doğrultusunda tuz gradyanı uygulayarak elüsyonu hedeflenmiştir. 10 µm partikül çapına sahip ENrich™ S adlı kolon düşük partikül çapı dolayısı ile daha yüksek rezolüsyon sağlaması hedeflenmiştir. Analiz süresi Macro-Prep® High S uygulaması için 30 dakikadır. Her iki reçine de aynı güçlü katyon değiştirici olan sulfonat fonksiyonel grubu polimer dolgu maddesine bağlı şekilde bulunmaktadır. Uygulanan gradyan programı aşağıdaki gibidir;

***Macro-Prep® High S kolon için;***

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 - 5,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

5,25 - 9,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

9,25 – 19,25 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

19,25 – 24,25 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

24,25 – 30,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

Macro-Prep® High S kolon için alıkonma hem diastaz hemde invertaz için gözlemlenmediğinden, ENrich™ S kolon için ikinci bir enjeksiyon ve gradyan denemesi gerçekleştirilmemiştir.

#### 2.3.5.1.2. Anyon değişim kromatografisi yöntemleri

Anyon değişim kromatografisi kullanarak enzim saflaştırma denemesi için 2 farklı preparatif reçine, kolon formatında, MPLC sistemine adapte edilerek test edilmiştir.

- Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q, (Güçlü anyon değişim reçinesi, 5 mL iç hacminde, 50 µm partikül çapı) (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.).
- Enrich™ Q (Yüksek çözünürlüklü anyon değişim reçinesi, #7800001, 5 x 50 mm, 10 µm partikül çapı, 1 mL iç hacminde, (BioRad, Hercules- CA, A.B.D.)

Akış hızı ENrich™ Q kolon için, 0,65 mL/dak. iken, Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q kolon için ise 4,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Her iki kolonun rezolüsyon ve alıkoyma etkinliği aynı mobil faz bileşimleri kullanılarak test edilmiş olup, kullanılan mobil faz içerikleri; Mobil faz A için; 10 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 ve mobil faz B için; 1 M NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 şeklindedir. Gradyan boyunca pH sabit tutulup, insect saline tamponu içerisindeki taşıdıkları yük polarizasyonu (anyon veya katyon) dolayısı ile kolonda tutunma kabiliyeti gösteren enzim ve proteinlerin artan NaCl konsantrasyonu doğrultusunda tuz gradyanı uygulayarak elüsyonu hedeflenmiştir. 10 µm partikül çapına sahip ENrich™ Q

adlı kolon düşük partikül çapı dolayısı ile daha yüksek rezolüsyon sağlaması hedeflenmiş olup, daha yüksek basınç oluşturması dolayısı ile daha düşük akış set edilip bu yüzden Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q kolona göre daha uzun analiz sürelerine sebebiyet vermiştir. Analiz süresi Macro-Prep® High Q uygulaması için 30 dakika iken, ENrich™ Q uygulaması için ise 40 dakikadır. Her iki reçine de aynı güçlü anyon değiştirici olan kuarterner amonyum fonksiyonel grubu polimer dolgu maddesine bağlı şekilde bulunmaktadır. Anyon değişim kolonları, CHT kromatografisi sonrasında ikinci adım saflaştırma tekniği olarak, diastaz analizinde hedefli olmayan moleküllerin alıkonarak uzaklaştırılmasında, invertaz analizinde ise enzimi alıkoyabilmek ve bu sayede girşimlerin tutunma sağlamadan elimine edilebilmesi için tercih edilmiştir.

Örnek enjeksiyonu olarak CHT kromatografi prosesi sonrası elde edilen diastaz ve invertaz aktivitesine sahip fraksiyonlar birleştirildikten sonra her iki enzim içinde ayrı ayrı 1 mL kadar numune anyon değişim kolonlarına enjekte ederek invertaz ve diastaz alıkoyma becerileri ve saflaştırma süreçlerine olan katkıları incelenmiştir. AEX işlemi sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar seçilerek yaklaşık her bir enzim için ayrı 1 mL'lik fraksiyonlar SEC uygulamasına son adım olarak transfer edilmiştir. Gradyan profili her iki kolon içinde farklı şekilde uygulanmış olup programlar aşağıdaki gibidir;

***Macro-Prep® High Q kolon için;***

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 - 5,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

5,25 - 9,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

9,25 – 19,25 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

19,25 – 24,25 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

24,25 – 30,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

***ENrich™ Q kolon için;***

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 – 6,54 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

6,54 – 11,54 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

11,54 – 26,54 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

26,54 – 31,54 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

31,54 – 40,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

**2.3.5.2. Jel filtrasyon kromatografisi (SEC) yöntemi**

Boyut eleme kromatografisi (SEC), iyon değişimi uygulaması sonrasında invertaz ve diastaz enzimlerinin saflaştırılmasında üçüncü ve son adım olarak tercih edilmiştir. Bu amaçla preparatif ölçekteki, ENrich™ SEC 650 10 x 300 mm kolon (#7801650, Yüksek çözünürlüklü jel filtrasyon kolonu, 10 x 300 mm, 24 mL iç hacimde, 10 µm partikül çapında, BioRad, Hercules- CA, A.B.D.) kolonu MPLC sistemine adapte edilerek kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Kullanılan mobil faz içeriği izokratik kullanımda; 100 mM NaCl içeren pH 7.4 – 10 mM Tris.HCl şeklindedir. Kolon ile analitler arasında herhangi bir moleküler etkileşim olmayıp ilgili analitin molekül büyüklüğüne bağlı olarak fiziksel bir ayrım bu kolonda söz konusudur. Uygulama kolonunun moleküler ağırlık dışlama limitleri 5 kDa – 650 kDa olarak belirlenmiştir. Kolonun 10 µm partikül çapına sahip düşük partikül çapı dolayısı ile daha yüksek rezolüsyon sağlaması hedeflenmiştir. Analiz süresi 60 dakikadır. Örnek enjeksiyonu olarak iyon değişim kromatografisi sonrasında elde edilen diastaz ve invertaz aktivitesine sahip fraksiyonlar birleştirildikten sonra her iki enzim içinde ayrı ayrı 250 µL kadar numune enjekte edilerek, kolonun saflaştırma süreçlerine olan katkısı incelenmiştir. SEC işlemi sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar seçilerek HPLC-PDA, SDS-PAGE, enzim aktivite ve toplam protein

analizlerine geçilmiştir. Bu saflaştırma son adımından sonra elde edilen enzimlerin saflığı ve HPLC-PDA yöntemi için referans oluşturabilme kabiliyeti analiz edilmiştir.

***İzokratik şartlarda gerçekleşen SEC-MPLC metot akış profili ise şu şekildedir;***

0,00 - 60,00 dak.; %100 A Fazı (Şartlanma - Numune yükleme – Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması – elüsyon ve rejenerasyon),

### 2.3.5.3. Seramik hidroksiapatit (CHT) kromatografisi yöntemi

CHT multimod kromatografi kullanarak enzim saflaştırma prosesi için Foresight™ CHT™ Tip I kolon (1 mL hacminde, Seramik Hidroksiapatit Tip I Multimod kromatografi kolonu, 40 µm partikül çapında, BioRad, Hercules- CA, A.B.D.) kolonu, MPLC sistemine adapte edilerek test edilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Kullanılan mobil faz içerikleri; Mobil faz A için; 5 mM Fosfat Tamponu pH 6.6 ve mobil faz B için; 400 mM Fosfat Tamponu pH 6.6 şeklindedir. Gradyan boyunca pH sabit tutulup, enzim ve proteinlerin artan fosfat iyonu konsantrasyonu doğrultusunda fosfat gradyanı uygulayarak elüsyonu hedeflenmiştir. Başlangıç analizi olan CHT kromatografisinde, B tampon mobil fazı içerisindeki yüksek fosfat tuzu konsantrasyonunun soğuk ortamda çökme riskini ortadan kaldırmak adına, MPLC sistemi oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır. CHT multimod kromatografi tekniğinde birden fazla etkileşim mekanizması protein saflaştırma için rol alabilmektedir. Reçine yapısında yer alan kalsiyum iyonları metal afinite gösteren proteinler için iyi bir ligand olabilirken, Hidroksiapatit yapısında yer alan hidroksil grupları hidrojen bağı etkileşimi dolayısı ile proteinlerin alıkonmasını sağlayabilmektedir. Bunun dışında diğer temel etkileşim türü ise reçine yapısında bulunan negatif yüklü fosfat grupları sayesinde oluşan katyon bağlama afinitesidir. Kullanılan kolon özetle, katyon değişim kromatografisi, metal afinite kromatografisi ve hidrojen bağı etkileşimi dolayısı ile geniş yelpazede bir protein saflaştırma etkinliği sağlayabilmektedir.

Bu noktada kalsiyum bağlama afinitesine sahip olan diastazın metal afinite etkileşimi ile CHT reçine tarafından alıkonması beklenir iken, invertaz enziminin tutunma olmadan kolondan elüe olması planlanmıştır. Stirred cell ve onu takip eden

CFU prosesleri sonrasında elde edilen, insect saline tamponu içerisindeki (enjeksiyon yapılan çözelti ortamı) diastaz ve invertaz açısından konsantre enzim / protein çözeltisi 0,8 mL kadar sisteme enjekte edilerek invertaz ve diastaz alıkoyma becerileri ve saflaştırma süreçlerine olan katkıları incelenmiştir. Analiz süresi bu uygulama için 35 dakikadır. CHT işlemi sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar seçilerek yaklaşık her bir enzim için ayrı 1 mL'lik fraksiyonlar iyon değişim uygulamasına transfer edilmiştir. Gradyan profili bu uygulama için aşağıdaki gibidir;

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 – 6,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

6,00 – 11,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

11,00 – 26,00 dak.; %0-70 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

26,00 – 31,00 dak.; %70-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

31,00 – 35,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

CHT kromatografisinde yapılan tek enjeksiyon ile invertaz ve diastaz konsantre enzimleri birbirinden ayrıldıktan sonra ikinci saflaştırma adımı olarak iyon değişim kromatografisi her iki enzim fraksiyonununda sisteme ayrı ayrı enjekte edilmesi ile uygulanmıştır. Girişim yapan maddeler, iyon değişim kromatografisi ile hem invertaz hemde diastaz için ayrı ayrı elimine edildikten sonra, son adım olan SEC işlemine geçilmiştir. İyon değişim kromatografisinden elde edilen 2 ayrı fraksiyon (invertaz ve diastaz için birer adet) yine ayrı ayrı SEC kolonuna enjekte edilerek son adım saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş ve saf diastaz ve invertaz enzimleri elde edilmiştir.

#### 2.3.5.4. Afinite kromatografisi yöntemi - glikoprotein afinite kromatografisi (lektin afinite)

CHT kromatografisi yerine, saflaştırma yönteminin ilk adımı olarak glikoprotein afinite tabanlı bir yöntem ile diastaz ve invertaz izolasyonu da denenmiştir. Bunun için

glikoprotein yapıdaki proteinlerin alıkonmasına imkan veren afinite reçinesi olarak lektin afinite reçinesi (Lentil Lectin Sepharose™ 4B, Affinite kromatografi bulk reçinesi, 25 mL, 90 µm partikül çapında, Cytiva Europe GmbH, Reugelstraat 2, Hoegaarden, Branch Belçika) tedarik edilmiştir. Reçine öncelikle QuEChERS (batch purification), katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve zip-tip formatlarında başlangıç olarak test edilmiştir. İleri teknik olarak tedarik edilen reçine ile birlikte boş preparatif kromatografi kolonu (Vantage® L Laboratory Column VL, (11 mm x 250 mm, Boş biyokromatografi kolonu, Millipore, Merck, Darmstadt, Almanya) tedarik edilerek, reçinenin bu boş kolona dolumu yapılmış ve lektin afinite kolonu hazırlanarak MPLC sisteminde test edilmiştir. Uygulanan yöntemde aynı gradyan profilini uygulamak üzere akış hızı olarak 3 farklı akış test edilmiştir (2 mL/dak., 2,5 mL/dak., 3mL/dak.). Analiz süresi tüm uygulamalar için 47 dakikada tamamlanmıştır. Saklama ve rejenerasyon tamponları olarak; %20 etanol + %0,9 NaCl + 1 mM $CaCl_2$ + 1 mM $MnCl_2$ karışımı hazırlanır ve boş kolon bu çözelti içerisinde bulamaç haline getirilmiş reçine ile doldurulur. Yükleme sonrası çözelti atığa gönderilir ve yeni çözelti olarak bağlanma tamponu (Binding buffer); 20 mM Tris.HCl pH=7.4, 0,5 M NaCl hazırlanarak reçineden geçirilir ve enjeksiyona hazır hale getirilir. Bu tampon içeriği tüm gradyan uygulamalarında mobil faz A olarak değerlendirilmiştir. Numune yüklenmesi sonrasında ortak gradyan profili ile 4 farklı elüsyon stratejisi test edilmiştir. Bu denemeler sırası ile tampon değişimi (borat tamponuna geçiş), pH (Tris pH 4.5 tamponu) ve ligand değişim - karbonhidrat afinitesi (0,4 M ve 1 M glukozlu tampon) ile elüsyon yaklaşımlarını içermektedir. Buna göre hazırlanmış olan elüsyon tamponları aşağıdaki gibidir;

1. 0,1 M Borat tamponu pH=6.5,
2. 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=4.5,
3. 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=7.4, 0,4 M Glukoz,
4. 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=7.4, 1 M Glukoz.

Gradyan profili, tüm mobil faz uygulamalarında sabit tutulup aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

0,00 - 8,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

8,00 – 8,20 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

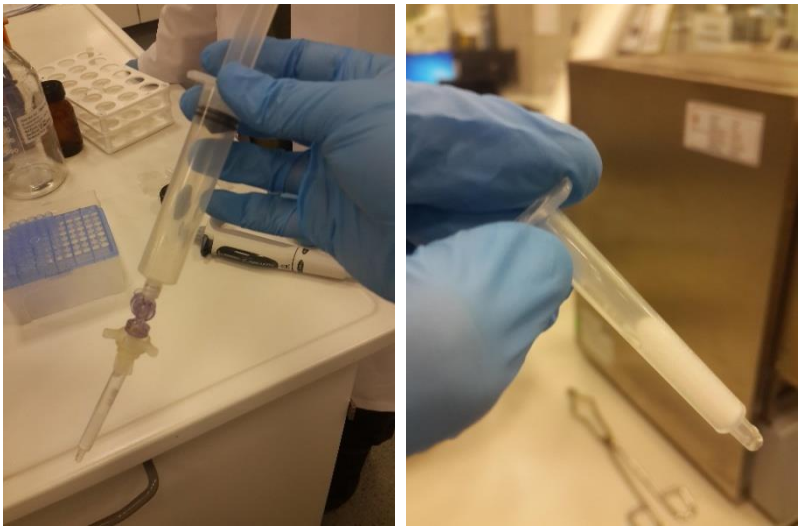
8,20 – 16,20 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

16,20 – 31,20 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

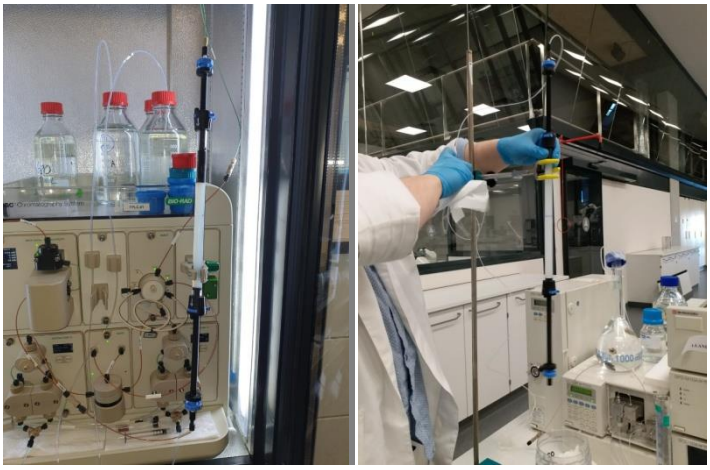
31,20 – 39,20 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

39,20 – 47,20 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

Örnek enjeksiyonu olarak, konsantre edilmiş bal numunesi her deneme için 500 µL hacminde enjekte edilmiştir. Analizler boyunca tüm kolondan elüe olan akış, fraksiyon toplayıcılarda 1 mL'lik hacimlerde toplanmış ve fraksiyonlardaki enzim varlığı aktivite testleri ile değerlendirilmiştir. SPE kartuş uygulaması Şekil 2.11.'de, preparatif glikoprotein afinite kromatografi kolonu uygulaması ise Şekil 2.12.'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.11.** Lentil Lektin sorbent ile hazırlanan SPE kartuşu ve pozitif basınç elüsyonu ile uygulanması.

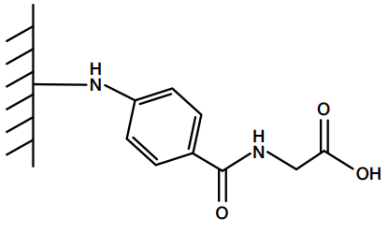


**Şekil 2.12.** Lentil Lektin sorbenti doldurularak hazırlanan preparatif glikoprotein afinite kromatografi kolonu.

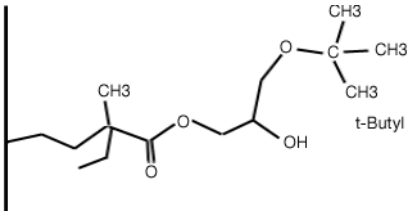
### 2.3.5.5. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC)

Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) kullanarak enzim saflaştırma denemesi için 2 farklı sorbent, kolon formatında, MPLC sistemine adapte edilerek test edilmiştir. Bunlardan biri mix-mod kromatografi kolonu olup yapısında hem katyon değişim hemde HIC yöntemi geliştirmeye uygun olan bir ligand taşıyan Foresight™ Nuvia™ cPrime™ kolonudur (1 mL, hidrofobik katyon değişim kolonu, multi-mod kromatografi reçinesi, 40 µm partikül çapı, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.), (Şekil 2.13.). Bunun yanı sıra HIC uygulaması için Bio-Scale™ Mini Bio-Gel® P-6 Desalting Kartuşu, (6 kDa MWCO, 5 mL, jel filtrasyon ve desalting kolonu, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) içerisindeki sorbent boşaltılarak yerine Macro-Prep t-Butil HIC Bulk reçinesi (Hidrofobik etkileşim kromatografi reçinesi, 50 µm partikül çapı, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.), (Şekil 2.14.) doldurulmuş ve cPrime haricinde farklı bir HIC ligand yapısına sahip kolon elde edilmiştir. HIC uygulaması için en sık kullanılan kosmotropik ajan olan amonyum sülfat yüksek konsantrasyonda mobil faz A içeriğinde ve enjeksiyon çözeltisi içeriği olarak kullanılarak salting-out etkisi ile indüklenen proteinlerin hidrofobik etkileşimleri ve bu etkileşimler üzerinden hidrofobik kolonlar ile bağlanma afinitesi hedeflenmiştir. Daha sonra azalan amonyum sülfat konsantrasyonu ile proteinlerin kolondan geri kazanımı ön görülmüş ve test edilmiştir. Mobil faz A içeriğinde yer alan yüksek konsantrasyondaki amonyum sülfat içeriği düşük sıcaklıklarda mobil faz içerisinde çözünürlüğünü kısmen kaybederek çökme riski yaratabileceğinden, HIC temelli saflaştırma işlemleri oda sıcaklığında

gerçekleştirilmiştir. cPrime kolonda benzen halkasının sağladığı hidrofobisiteden faydalanılırken, tert-bütil ligandta ise 4 karbonlu orta hidrofobisitede bir etkileşimden faydalanılmaya çalışılmıştır.




**Şekil 2.13.** cPrime kolonun aktif ligand yapısı.




**Şekil 2.14.** tert-bütil ligand yapısına sahip reçine.

Her iki kolondan %20 etanol çözeltisi ile yıkandıktan sonra USS 1 mL/dak. akış hızında 10 dakika kadar kolondan geçirilmiştir. Ardından önce Mobil Faz B (düşük tuz içeriğine sahip faz) daha sonra Mobil Faz A (yüksek tuz içeriğine sahip faz) ile kolonlar 1 mL/dak. akış hızında şartlandırılmış ve enjeksiyona hazır hale getirilmiştir. Kullanılan mobil faz içerikleri Mobil Faz A için, 2 M amonyum sülfat + 30 mM Tris.HCl tamponu, pH 7.4, Mobil Faz B için ise 30 mM Tris.HCl tamponu, pH 7.4 şeklindedir. Enjeksiyon solventi olarak Tris.HCl pH 7.4 insect saline tamponu içerikli numune hazırlık sonrası elde edilen konsantre numune enjekte edilmiş fakat olumlu sonuç alınamamıştır. Bu sebeple HIC'te moleküllerin etkileşimini arttırmak için numune çözeltisi için A fazı yani yüksek tuz içerikli tampon ile numune 1:3 oranında seyreltilmiş ve bu karışımdan 1 mL enjeksiyona vererek denemeler yapılmıştır. İzoelektrik noktası (pI) değeri 7.4 olan *Apis mellifera* L. diastaz enzimini nötral formda tutup hidrofobik etkileşimi arttırmak için hem numune çözetlisinin hemde mobil fazların pH değeri pH 7.4 olarak tercih edilmiştir. Akış hızı her iki kolon içinde 1 mL/dak. olarak set edilmiştir. İşlem sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler

toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar analiz edilmiş ve HIC ile ayrım yapabilme kabiliyeti incelenmiştir.

Analiz süresi uygulamalar için 51 dakika olup, gradyan profili her iki kolon içinde aynı şekilde aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 – 6,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

6,00 – 11,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

11,00 – 31,00 dak.; %0-100 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

31,00 – 46,00 dak.; %100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

46,00 – 51,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

### 2.3.6. Sodyum dodesil sulfat poli-akrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi

Elektroforez işlemi, Tris-glisin SDS-PAGE metodolojisi ile gerçekleştirilmiştir [227]. Protein içeren numuneler mikrosantrifüj tüpüne (52,5 µL) aktarıldı ve içerisine 17,5 µL numune tamponu ilave edildi ve vorteks yardımı ile karıştırıldı. Numune tamponu %10 konsantrasyona denk gelecek şekilde indirgeyici ajan olarak 2-Mercaptoethanol (BME, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) ve %90 oranında 4x Laemmli Sample Buffer, (4 kat konsantre Laemmli SDS-PAGE numune tamponu, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) şeklinde hazırlanmıştır. Elde edilen, poliakrilamid jeline yüklemeye hazır protein solüsyonu ısıtıcı blok (Digital Dry Bath, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) üzerinde 10 dakika süre ile 70°C'de ısıtılarak denatüre edilmiştir. Numuneler daha sonra Mini-PROTEAN Tetra Cell, dikey SDS-PAGE elektroforez tankı (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) içerisinde, 4–20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein jellerine, (Stain-Free Tris-Glisin SDS-PAGE Jeli, %4-20 gradyan akrilamid jel, 50 µL kuyucuklu, 10 bölmeli, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) 45 µL hacminde yüklenmiştir. Protein standardı (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged rekombinant, Bio-Rad® Laboratories, Inc., Hercules, CA, A.B.D.) 5 µL hacminde

numuneler ile birlikte jellere yüklenmiştir. 10X Tris/Glisin/SDS running buffer, (10 kat konsantre Tris Glisin SDS-PAGE hareketli faz tamponu, içerik; 25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% SDS, pH 8.3, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) USS ile 1X konsantrasyonuna seyreltilip elektroforez tankına doldurulmuş ve elektroforez işlemi, 200V'luk sabit bir voltajda (PowerPac™ Basic Power Supply, SDS-PAGE güç kaynağı, 10–300 V, 4-400 mA, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) 45 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. İzleme boyası (bromofenol mavisi) jelin dibine ulaştığında, elektroforez durduruldu. İşlem sonunda jellerin görüntüsü, Gel Doc EZ Gel Dökümantasyon sisteminde (Jel görüntüleme ve analiz cihazı, CCD kameralı, stain-free tray opsiyonlu, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) alındı ve jel görüntüsünün analizi Image Lab™ yazılımı, (Gel Doc EZ cihazı yazılımı, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan elektroforez ekipmanları Şekil 2.15.'de verilmektedir.



**Şekil 2.15.** GelDoc EZ imager, SDS-PAGE jel görüntüleme modülü, SDS-PAGE tankı ve güç ünitesi.

### 2.3.7. Balların palinolojik testi

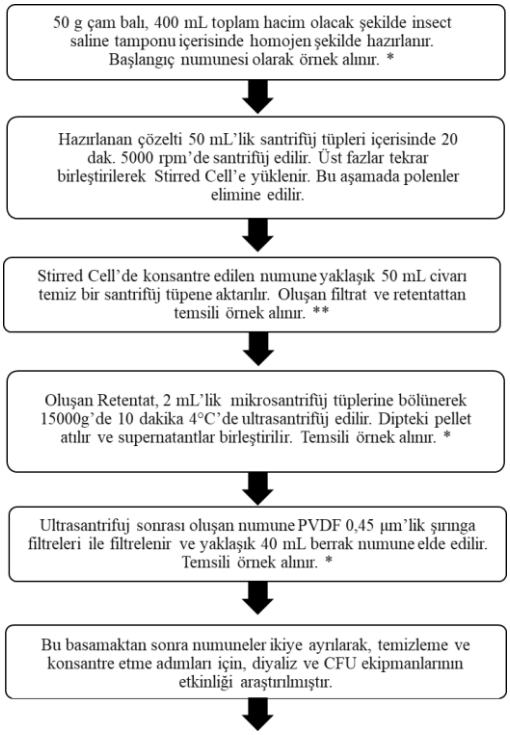
Ballara ait palinolojik testleri Altıparmak Gıda A.Ş. Apilab Araştırma & Geliştirme Laboratuvarı/Çekmeköy, Türkiye'de tamamlanmıştır. Mevcut polen içeriği tüm bal örnekleri için mikroskop altında incelenerek tanımlanmıştır. Polen sayımı neticesine bağlı olarak, balı oluşturan botanik kaynak belirlenmiş ve sınıflandırma yapılmıştır. Bu çalışma için, bal örnekleri kütlece 1:2 oranında su ile homojenize edildi. Santirfüj işlemi sonrasında oluşan üst faz atıldı ve pellet kurutma kağıdı vasıtası ile süzüldü. Kuru bal pelleti lama uygun biçimde yayıldı ve kurutuldu. Gliserin jelli boya (Kaiser′s gliserol jelatin (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya) ve Ziehl-Neelsen karbol-fuksin (Merck, Darmstadt, Almanya) çözelti karışımı) ile polenler boyandı. Bu şekilde

hazırlanan preparatlar polenlerin mikroskobik olarak tanımlanmasını ve sayımı sağladı. Analiz neticesinde botanik orijinleri polen yorumu üzerinden tanımanan bal örnekleri kestane, çam, narenciye ve çiçek (multiflora) olarak sınıflandırılmış olup yöntem geliştirme ve gerçek numune analizine alınmıştır.

### 2.3.8. Metot geliştirme & deneysel tasarım ve optimizasyon

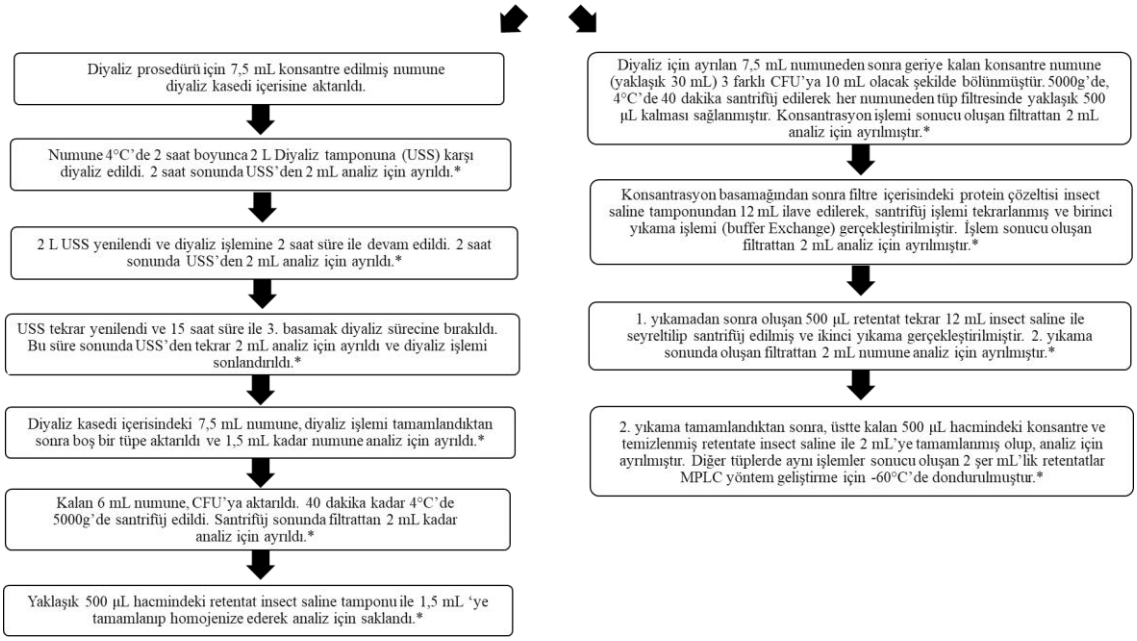
#### 2.3.8.1. Ön hazırlık yöntemi (enzim ekstraksiyonu - konsantre etme ve temizleme adımları) deneysel tasarım

Saflaştırma süreçlerindeki uygulanan analitik yöntemler kaynaklı seyrelmeler ve enzim stabilitesi kaynaklı kayıplar göz önünde bulundurulduğunda saflaştırma serisine mümkün olduğunca konsantre bir numune ile başlamak avantajlı olabilmektedir. Bu noktada ön hazırlığın, yüksek verimli enzim ekstraksiyonu sağlaması, minimum kayıp ile küçük moleküllerden elimine edilmiş, konsantre bir enzim numunesi tedarik edebilir formatta dizayn edilmesi elzemdir. Bu yaklaşım ile ön hazırlıkta stirred cell sonrasında 2 farklı ekipman verim açısından test edilip, saflaştırma öncesinde uygulanacak olan ön hazırlık optimize edilmeye çalışılmıştır. Ön hazırlık yönteminin belirlenmesinde kullanılmış olan deneysel tasarım Şekil 2.16. ve Şekil. 2.17.'deki gibi kurgulanmış ve elde edilen analitik performans değerleri neticesinde final ön hazırlık metoduna karar verilmiştir. Stirred cell ile çam balı numunesi konsantre edilmiş, elde edilen 40 mL hacmindeki numune 2 farklı ön hazırlık stratejisinde değerlendirilmiştir. 7,5 mL diyaliz işlemine tabi tutulurken, geriye kalan 32 mL 3'e bölünerek CFU ile hazırlanmıştır. Her adımdaki verimi ve enzim kaybını değerlendirmek için tüm prosedür boyunca 15 farklı noktada 2 mL ve 1,5 mL hacminde numuneler temsili olarak toplanmıştır. Toplanan 15 numune performans testlerine (diastaz aktivite, invertaz aktivite, toplam protein, şeker profili) tabi tutulmuş olup, elde edilen değerler ile toplam aktivite, toplam protein eldesi ve % geri kazanım sonuçları hesaplanmıştır. Böylece uygulanan işlemin geçerliliği değerlendirilmiştir.




* İşaretlenen basamaklarda, ait olduğu basamaktaki işlemin verimi görmek adına analiz için 2'şer mL numune ayrılmıştır, ** Bu basamakta filtrat ve retentat olmak üzere 2 numune temsili olarak 2'şer mL ayrılmıştır.

**Şekil 2.16.** Stirred cell ön hazırlık basamağı.




**Şekil 2.17.** Stirred cell sonrası CFU ve diyaliz için ön hazırlık basamakları.

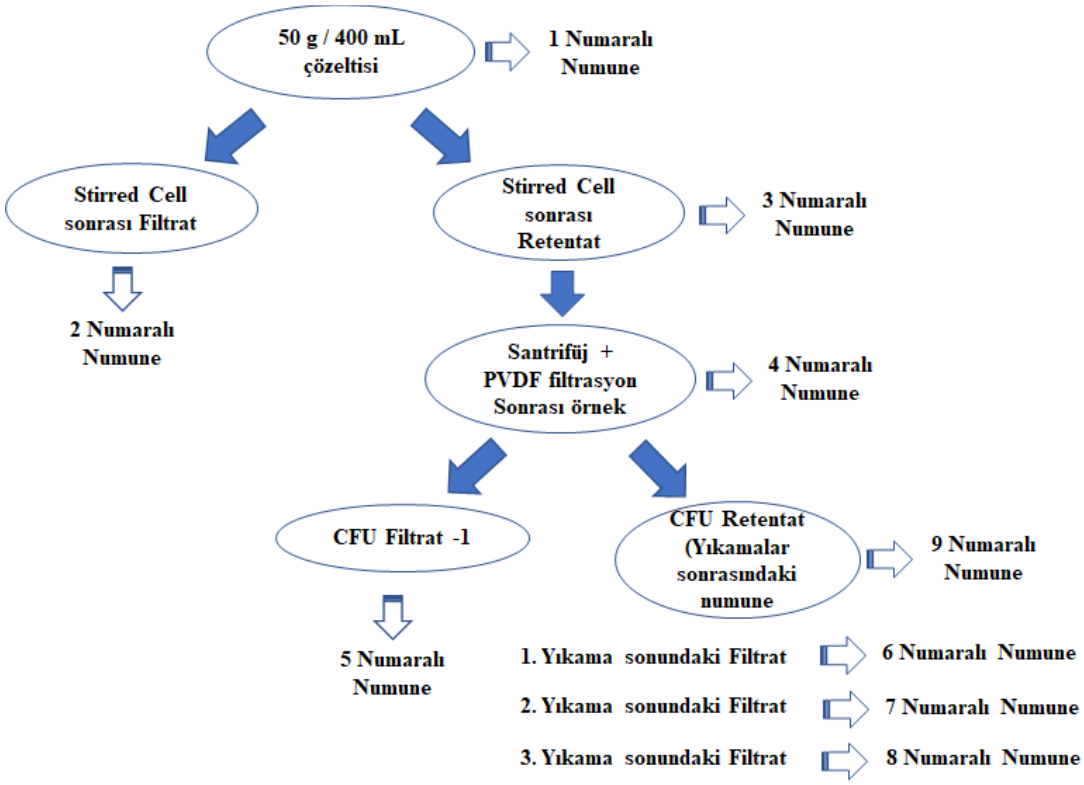
### 2.3.8.2. Ön hazırlık konfirmasyon tasarımı

Enzim saflaştırma deneyleri için ön hazırlık optimizasyon sonrası karar verilen son prosedürün konfirmasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bir önceki optimizasyon sürecindeki gibi kritik basamaklarda numuneler ayrılarak, tamamı Bradford toplam protein, şeker içeriği, diastaz ve invertaz aktivite testlerine tabi tulumuştur. Bu çalışma için planlanmış olan deney modeli Şekil 2.18'de verilmiştir. Ayrılan numuneler ile yapılan analizler sonucunda elde edilmiş değerler ise Bulgular bölümünde Tablo 3.5.'de belirtilmiştir. Çalışma gerçekleştirilirken ön hazırlık optimizasyon çalışması sonucunda karar verilen konfirmasyon prosedürü ise şöyledir;

- 50g çam balı örneği insect saline tamponunda çözülür ve 400 mL'ye tamamlanarak homojen bir çözelti elde edilir.
- Çözelti 8 adet 50 mL'lik santrifüj tüpüne bölünerek 4000 *x g*'de 20 dakika santrifüjlenir. (üst fazdan 2 mL alınır **(1)**) ve stirred cell'de yaklaşık 15 mL kalana kadar konsantre edilir (Filtrattan **(2)** ve oluşan retentattan **(3)** 2 mL kadar numune ayrılır).
- Konsantre edilmiş numune, mikrosantrifüj tüplerine aktarılır ve 15.000 *x g*'de 10 dak. 4°C'de santrifüj edilir.
- Üst fazlar birleştirilir ve PVDF şırınga filtresinden geçirilir, 2 mL kadar numune ölçümler için ayrılır **(4)**.
- Filtrelenmiş numune (Yaklaşık 12 mL) CFU ekipmanına transfer edilir ve 4°C'de, 5000 *x g* kuvvette 40 dak. Santrifüj edilir, filtrattan 2 mL numune alınır **(5)**.
- Retantat üstüne 12 mL insect saline tamponu eklenir ve 1. yıkama yapılır, 40 dak. 5000 *x g* kuvvette tekrar santrifüj işlemi uygulanır. Altta kalan filtrattan 2 mL numune alınır **(6)**.
- Retantat üstüne 12 mL insect saline tamponu eklenir ve 2. yıkama aynı şartlarda gerçekleştirilir. Daha sonra altta oluşan filtrattan tekrar ölçümler için 2 mL numune alınır **(7)**.

- Retantat üstüne tekrar 12 mL insect saline tamponu eklenir ve 3. yıkama yapılır. 40 dak. santrifüjlenir daha sonra altta oluşan filtrattan tekrar 2 mL numune alınır **(8)**. (Optimizasyon çalışmasındaki 2 tekrarlı yıkamaya 3. adım yıkama ilave edilerek yıkama sayısı arttırılmıştır.)

- Yıkama işlemleri sonunda üstte oluşan retantat (yaklaşık 250-300 uL kadar konsantre enzim & protein çözeltisi) insect saline tamponu ile 3,5 ml'ye tamamlanır ve 0,8 mL'den 3 adet ve 1,1 mL'den 1 adet olmak üzere 4 ayrı eppendorflara ayrılır. Tüm numuneler -60°C'de saklanır. 1,1 mL'lik kısım daha sonra ölçüm için çıkarılarak analizlere alınır. **(9)**.




**Şekil 2.18.** Konfirmasyon çalışması deney modeli.

### 2.3.8.3. Enzim saflaştırma yöntemi deneysel tasarımı

Ön hazırlık sürecine karar verilip final prosedür oluşturulduktan sonra bu final proses ile elde edilen 3,5 mL hacmindeki konsantre numuneden 1,1 mL performans testleri için ayrıldı kalan 2,4 mL'lik kısım ise 3'e bölünerek MPLC'de enzim saflaştırma işlemlerine başlandı. Foresight CHT kolona 3 adet 0,8 mL enjeksiyon

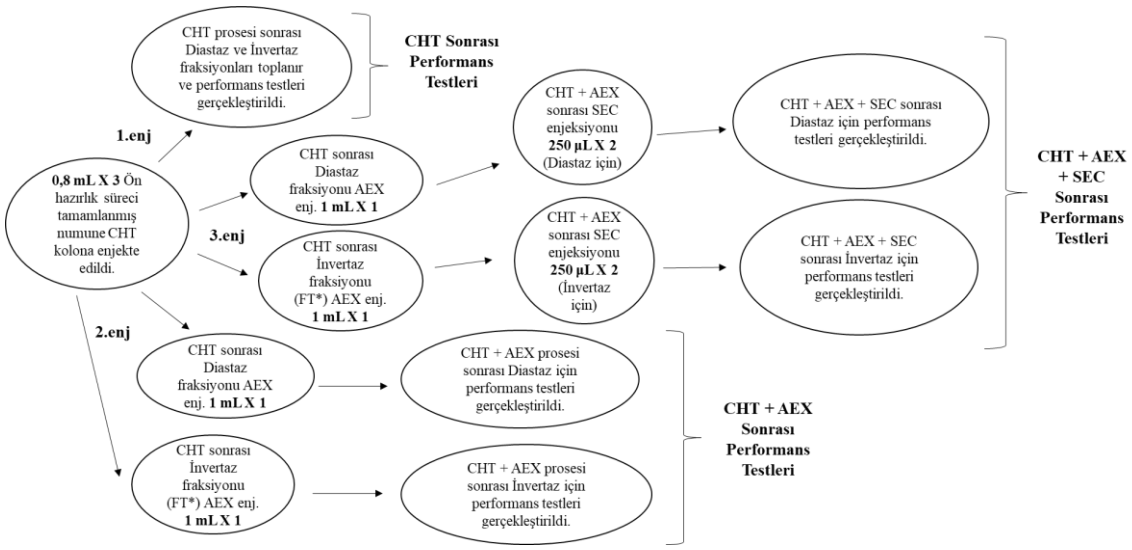
vererek prosedüre başlatılmıştır. İlk 0,8 mL'lik enjeksiyon CHT kromatografisi sonrası elde edilen invertaz ve diastaz fraksiyonları, bu adımın performans verilerini oluşturma için kullanılmıştır. İkinci 0,8 mL'lik enjeksiyon sonrası elde edilen 1'er mL'lik invertaz ve diastaz fraksiyonları ise AEX kromatografisi ile analiz edilmiş ve elde edilen fraksiyonlar AEX kromatografi basamağının performans verilerini oluşturmak için değerlendirilmiştir. 3. ve son 0,8 mL'lik kısım ise CHT kolonuna enjekte edildikten sonra elde edilen fraksiyon sırası ile önce AEX ve AEX kolondan alınan invertaz ve diastaz frakiyonlarından 0,250 mL'lik kısım ise 2 tekrar olacak şekilde SEC kolona enjekte edilmiştir. SEC adımı son saflaştırıma adımı olmak ile birlikte 2 tekrar enjeksiyon sonucu alınan diastaz ve invertaz için fraksiyonlardan biri SEC performans verilerinin ölçümü için kullanılarken diğer fraksiyon ise HPLC-PDA yönteminde referans enzim noktasını belirlemek için değerlendirilmiştir. Şekil 2.19.'da belirtilen enzim saflaştırma prosedürü doğrultusunda yapılan enjeksiyonlar ve elde edilen kromatogramlar açıklamaları ile Bulgular ve Tartışma bölümünde değerlendirilmiştir. Şekil 2.20.'de enzim saflaştırma prosedürünün saflaştırma performans tablosu doğrultusunda valide edilmiş olan saflaştırma iş akışını gösterilmektedir.

**FT;** Flow Through-Tutunma olmadan kolondan elüe olan fraksiyon,

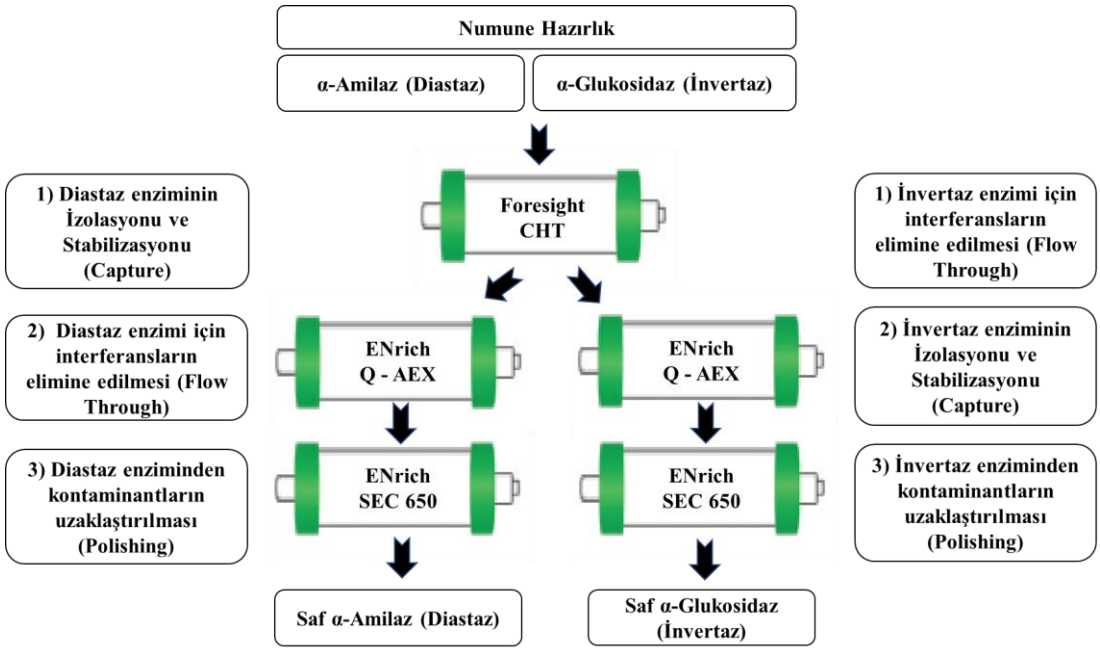
**SEC;** Boyut Eleme Kromatografisi Kolonu,

**AEX;** Anyon Değişim Kolonu,

**CHT;** Seramik Hidroksiapatit Kromatografi Kolonu.




**Şekil 2.19.** Ön hazırlık sonrası MPLC'de gerçekleştirilen enzim saflaştırma deneysel tasarımı.




**Şekil 2.20.** Ön hazırlık sonrası MPLC'de gerçekleştirilen final enzim saflaştırma prosesi.

### 2.3.9. HPLC-PDA metot optimizasyonu

Aşağıda verilen başlıklarda kromatografik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup, elde edilen deneysel çıktılar kararlaştırılmış final yöntem şartları ile birlikte Bulgular ve Tartışma bölümünde yorumlanmıştır;

- Mobil faz eklentileri (modifiye edici organik asitler) değişken tür ve konsantrasyonlarda incelenmiştir; (%0,1 Formik asit, %0,1 TFA),
- Mobil faz akış hızları (0.5, 0,7 ve 1,0 mL/dak.) gözlemlenmiştir,
- Gradyan uygulamaları test edildi,
- Kolon fırınına ait sıcaklıklar (80°C, 40°C, 30°C, 20°C) test edilmiştir,
- Enjeksiyon hacimleri, pik simetrisi ve yöntem hassasiyetini ideal hale getirmek için incelenmiştir (5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 50 µL).

#### 2.3.9.1. Dilute & Shoot (seyrelt-enjekte et) yöntemi

Seyrelt ve enjekte et yöntemi oldukça pratik olan ve analitik kimyada kabul görmüş pek çok ön hazırlık işlemini barındırmayan bir yaklaşım olup, sıvı veya sıvı çözelti formuna getirilmiş örneklerin uygun reaktif ile homojen biçimde karıştırılması ve bunu takiben filtrelenme sonrasında HPLC sistemine enjeksiyonunu içeren bir ön hazırlık uygulamasıdır [228]. Enjeksiyona verilecek nihai çözelti, esktraksiyon ve temizleme gibi adımlardan geçmediğinden matriks kaynaklı girişim ve kontaminantları içermektedir. Bu noktada temel avantaj, hazırlık rutininin çok basit, hızlı ve maliyetsiz oluşudur [229]. Dezavantaj ise enstrümental ekipmanların zaman içerisindeki kirlenme potansiyeli ve elde edilecek kromatogramın uygun rezolüsyon sağlanmadığı takdirde yorumlanmasının zorluğudur [230]. Tüm bu dezavantajları minimize edecek formatta yöntem geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

#### 2.3.9.2. HPLC ile enzim aktivite ve enzim tağşiş belirleme yöntemi (HPLC-PDA)

Çalışma kapsamında geliştirilmiş final yöntemde;

***Ön hazırlık;***

2,5 gram örneği tartılır. Üzerine 7 mL insect saline tamponu eklenir ve vorteks ile numune homojenize edilir. Hazırlanan numune 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzülerek viale alınır ve HPLC-PDA sistemine enjekte edilir.

***Kullanılan mobil fazlar;***

Mobil Faz A: %5 ACN, %95 USS, %0,1 TFA

Mobil Faz B: %5 USS %95 ACN %0,1 TFA

***HPLC-PDA şartları;***

- Kolon; BioResolve RP mAb Polifenil kolon, (150 mm ×4.6 mm i.d), 2.7 µm partikül çapı, 450Å por çapı, (Waters®, Milford, MA, A.B.D.).
- Enjeksiyon hacmi; 15 µL,
- 280 nm dalgaboyu,
- Kolon fırını sıcaklığı; 30°C,
- Oto-örnekleyici sıcaklığı; 4°C,
- 0,7 mL/dak. akış,
- 30 dak. analiz süresi,
- Gradyan profili;

| Süre, dak. | Mobil faz - A % | Mobil faz B - % |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 1,00 | 95 | 5 |
| 15,00 | 40 | 60 |
| 20,00 | 15 | 85 |
| 21,00 | 15 | 85 |
| 22,00 | 95 | 5 |
| 30,00 | 95 | 5 |

- Alıkonma Süreleri; Diastaz: 13,70 dak., İnvertaz: 14,60 dak., 14,25: Yabancı Diastaz.

**2.3.9.3. Kalibrasyon ve numune çözeltilerinin hazırlanması**

HPLC-PDA ile enzim aktivite ve enzim tağşişi belirleme yöntemi çalışma kapsamında geliştirilmiş final seyrelt & enjekte et yönteminde kullanılan ön hazırlık

prosedürü, kalibrasyon örnekleri için de herhangi bir değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Seçilen numunelerin invertaz ve diastaz aktvitileri ve bu örneklerin temsil ettikleri kalibrasyon seviyeleri Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.'de belirtilmektedir. Kalibasyon numunelerinin seçiminde otantisite, tağşiş tespiti yöntemlerinden olumlu sonuç alınması birincil şart olarak belirlenmiş olup, otantik olarak belirlenen örneklerin invertaz ve diastaz için aktivite değerleri spektrofotometrik olarak substrat hidrolizi üzerinden oluşan ürünlerin miktarını belirleme tabanlı aktivite testlerine göre belirlenmiştir. Bu değerler ile doğrulanmış şekilde artan aktivite değerlerine sahip çam, narenciye ve çiçek balı örnekleri ayrı ayrı diastaz ve invertaz kalibrasyonları için seçilmiş ve sıfır noktası dahil 7 noktalı kalibrasyon grafikleri her iki enzim için de oluşturulmuştur. Sıfır noktası için reaktif kör numunesi seçilmiş ve bu kapsamda insect saline tamponu filtrelenerek enjekte edilmiştir. Bu numune kalibrasyonun başlangıç noktası olup, kör numune olarak adlandırılmıştır.

**Tablo 2.1.** HPLC-PDA yöntemi ile diastaz aktivite ölçümü için oluşturulan kalibrasyon seviyeleri ve aktivite değerleri.

| **Kalibrasyon Seviyesi** | **Diastaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (T-AMZHY) (DN=Schade U/g)** |
|---|---|
| Seviye 6 (Çam Balı) | 25,0 |
| Seviye 5 (Çam Balı) | 20,8 |
| Seviye 4 (Çiçek Balı) | 16,7 |
| Seviye 3 (Çiçek Balı) | 13,5 |
| Seviye 2 (Çiçek Balı) | 9,9 |
| Seviye 1 (Narenciye Balı) | 5,8 |
| Kör Numune (Insect Saline Tamponu) | 0 |

**Tablo 2.2.** HPLC-PDA yöntemi ile invertaz aktivite ölçümü için oluşturulan kalibrasyon seviyeleri ve aktivite değerleri.

| **Kalibrasyon Seviyesi** | **İnvertaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Testi Sonucu (Siegenthaler, 1977), (U/kg)** |
|---|---|
| Seviye 6 (Çam Balı) | 304,2 |
| Seviye 5 (Çam Balı) | 237,9 |
| Seviye 4 (Çam Balı) | 188,4 |
| Seviye 3 (Çiçek Balı) | 129,7 |
| Seviye 2 (Çiçek Balı) | 80,0 |
| Seviye 1 (Narenciye Balı) | 26,7 |
| Kör Numune (Insect Saline Tamponu) | 0 |

# 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

## 3.1. Çalışma İçin Uygun Çam Balı Örneğinin Seçimi

Referans enzimlerin elde edilmesi ve daha sonrasında bu enzimler ile enzim aktivite ve eş zamanlı yabancı enzim tağşiş tayin metodu geliştirme çalışmaları için seçilmiş olan çam balı örneğine ait yapılan otantisite, melissopalinoloji ve fizikokimyasal analiz sonuçları Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de belirtilmiştir. Seçilen numunenin analiz sonuçları örneğin saf çam balı olduğu ve yöntem geliştirme ve optimizasyon çalışmaları için kullanılmasının uygun olduğu yönünde değerlendirilmesini sağlamıştır.

**Tablo 3.1.** Seçilmiş çam balı örneğine ait fizikokimyasal ve palinolojik test sonuçları.

| Nem (%) | HMF (mg/kg) | Asitlik (meq/kg) | İletkenlik (uS/cm) | Fruktoz + Glukoz (%) | Total Disakkarit (%) | Yüksek Şekerler (DP>3) (%) | BÇE Oranı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16,8 | 9,1 | 26,8 | 0,96 | 57,7 | 4,9 | 1,5 | 3,9 |

DP; Degree of Polymerisation (Polimerizasyon Derecesi).

**Tablo 3.2.** Seçilmiş çam balı örneğine ait otantisite test sonuçları.

| %C4 (SCIRA) | Total diastaz aktivitesi | Total invertaz aktivitesi (U/kg) | BFF aktivitesi (U/kg) | Total β/γ-amilaz aktivitesi (U/kg) | Pirinç şurubu katkısı |
|---|---|---|---|---|---|
| 1,2 | 28,5 | 117,1 | - | - | - |

## 3.2. Düşük Protein Bağlıyıcı Filtre Seçimi

Ön hazırlık boyunca farklı adımlarda oluşan partiküllerin, MPLC sistemini, preparatif saflaştırma reçinelerini, ultrafiltrasyon ve diyaliz membranlarını tıkamasını önlemek adına şırınga filtreleri ile filtrasyon uygulanmıştır. Tüm bu adımlarda kullanılacak olan şırınga filtresinin düşük protein bağlayıcı aktivitede olması, spesifik olmayan bağlanma dolayısı ile protein kaybı ve düşük enzim eldesinin sebep olmaması

gerekmektedir. Bu amaçla farklı şırınga filtresi membran materyalleri (Selüloz asetat (CA) ve PVDF) ve gözenek hacmi öncelikle test edilmiş olup daha sonrasında ön hazırlık adımlarına uygun filtre dahil edilmiştir. Bradford toplam protein analizinde kalibrasyon noktası oluşturmak için kit içerisinde tedarik edilen 2 mg/mL konsantrasyonundaki Bio-Rad standart solüsyonu filtreden geçirilerek testler gerçekleştirilmiş ve elde edilen filtratın toplam protein konsantrasyonu Bradford toplam protein analizi ile ölçülmüştür. Filtrenin geri kazanımı tayin edilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 3.3.'de verilmektedir.

**Tablo 3.3.** Şırınga filtrelerinin protein bağlama kapasiteleri.

| Numuneler | Filtrat Protein Konsantrasyonu (mg/mL) | Geri Kazanım (%) |
|---|---|---|
| İnsect Saline Tamponu (Boş numune) | 0,07 | - |
| BSA Çözeltisi (2 mg/mL) | 2,05 | 102,5 |
| Filtrat - PVDF - 0,22 µm | 2,09 | 104,5 |
| Filtrat - PVDF - 0,45 µm | 2,05 | 102,5 |
| Filtrat - CA - 0,22 µm | 1,77 | 88,5 |

Polivinilidin Florür (PVDF) şırınga filtresi materyali en düşük bağlama kapasitesine sahip ve analize uygun olan filtre türü olarak tespit edilmiştir. 0,22 µm'lik filtreler, filtrasyon esnasında yüksek basınç oluşturduklarından elenmiş ve çalışmalara PVDF materyaline sahip 0,45 µm'lik şırınga filtresi ile devam edilmiştir.

## 3.3. Stirred Cell Optimizasyonları

Stirred cell ekipmanı ve uygun ultrafiltrasyon membranı kullanarak yüksek konsantrasyonda enzim konsantrasyonu elde edebilmek için farklı gramajlarda bal tartımları alınarak 400 mL hacminde bal çözeltileri oluşturulmuş ve ultrafiltrasyon işlemine başlanmıştır. Bu amaçla 50g, 100g, 150g ve 200g çam balı örneği insect saline tamponu ile homojenize edilmiş ve santrifüj sonrası polenlerinden arındırılıp, stirred cell hücresine yüklenmiştir. Yüksek gramajlar oluşturdukları yüksek viskozite dolayısı ile filtrasyon işlemini yavaşlatmış ve tıkanmalara sebep olmuştur. İşlemin fiziksel olarak gerçekleştirilebilmesi için ideal konsantrasyon 50g/400mL olarak kararlaştırılmıştır. Öte yandan stirred cell'de gerçekleştirilen ilk ultrafiltrasyon işlemi

için ultrafiltrasyon membranları, her ikisi de 10 kDa MWCO değerine sahip olmak ile birlikte 2 farklı materyalde (PES ve RC) membran konsantre etme etkinliği açısından değerlendirilmiştir. Materyal testi için ortak numune hazırlanmış (50g/400 mL) ve santrifüj ile polenleri uzaklaştırıldıktan sonra, enzim aktiviteleri belirlenmiş ve devamında çözelti iki eş hacime bölünerek (200 mL) ultrafiltrasyon işlemine 2 farklı materyal ile başlanmıştır. İşlem sonunda invertaz ve diastaz aktiviteleri tekrar test edilmiş ve konsantre etme etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Her iki materyalde de hem invertaz hemde diastaz için yüksek ve eşlenik verim elde edilmiş olup çalışmalara PES materyali ile devam edilmiştir.

## 3.4. Ön Hazırlık Yöntemi (Enzim Ekstraksiyonu - Konsantre etme ve Temizleme Adımları) Deneysel Tasarım Sonuçları

Stirred cell ultrafiltrasyonu, CFU ve diyaliz ekipmanları ile tasarlanmış bir deney iş akışı içerisinde kullanılarak, enzim saflaştırma sürecinde kullanmak üzere konsantre ve temizlenmiş formda enzim numuneleri sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaç ile geliştirilen ön hazırlıkta kullanılan ekipmanlar ve fiziksel şartlar deneysel olarak elde edilen veriler doğrultusunda optimize edilmiştir. Bahsedilen verim çalışması sonunda elde edilen veriler Tablo 3.4.'te paylaşılmaktadır.

**Tablo 3.4.** Ön hazırlık optimizasyon çalışması sonuçları.

| Ön İşlem | Numune Numarası | Numune Açıklamaları | Toplam Şeker Miktarı % (w/v) | Toplam Protein (mg/mL) | Diastaz Total Aktivite (Schade Unit/g=DN) | İnvertaz Total Aktivite (U/Kg) | % İnvertaz Geri Kazanım | % Diastaz Geri Kazanım | % Protein Geri Kazanım (mg-protein) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Konsantrasyon + Temizleme (Stirred cell Süreci)** | **1** | **Bal Çözeltisi** (Başlangıç) (50g/400mL) | 64,1 | 0,06 | 28,5 | 117,1 | 100 | 100 | 100 |
| | **2** | Stirred cell sonrası oluşan **Filtrate** | 67,88 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| | **3** | Stirred cell sonrası oluşan **Retentat** | 62,26 | 0,56 | 237,5 | 305,4 | 260,8 | 833,1 | 909,1 |
| | **4** | **Ultrasantrifüj işlemi Sonrasındaki Supernatant** | 59,46 | 0,52 | 236,5 | 307,1 | 262,2 | 829,89 | 814,1 |
| | **5** | **Ultrasantrifüj + PVDF filtrasyon işlemi sonrasındaki numune** | 60,1 | 0,48 | 236,8 | 308,2 | 263,1 | 830,6 | 777,7 |
| **Diyaliz ile Temizleme ve Devamında CFU ile Konsantre Etme** | **6** | Diyaliz işlemi sırasında kullanılan **diyaliz tamponu (USS-1)** | 0,12 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| | **7** | Diyaliz işlemi sırasında kullanılan **diyaliz tamponu (USS-2)** | TLA | TLA | TLA | TLA | - | - | - |

**Tablo 3.4.** Devam.

| Ön İşlem | Numune Numarası | Numune Açıklamaları | Toplam Şeker Miktarı % (w/v) | Toplam Protein (mg/mL) | Diastaz Total Aktivite (Schade Unit/g=DN) | İnvertaz Total Aktivite (U/Kg) | % İnvertaz Geri Kazanım | % Diastaz Geri Kazanım | % Protein Geri Kazanım (mg-protein) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Diyaliz ile Temizleme ve Devamında CFU ile Konsantre Etme** | **8** | Diyaliz işlemi sırasında kullanılan **diyaliz tamponu (USS-3)** | TLA | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| **Diyaliz ile Temizleme ve Devamında CFU ile Konsantre Etme** | **9** | Diyaliz tamamlandıktan sonra **Diyaliz kasedi içerisindeki Numune** | 0,11 | 0,39 | 158,9 | 116 | 99 | 557,5 | 633,5 |
| | **10** | **Diyalizden çıkan numune + CFU işlemi sonrasındaki Filtrate** | 0,13 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| | **11** | **Diyaliz + CFU sonrası retentat**, 1,5 mL insect saline tamponu ile seyreltilmiş Numune | 1,58 | 1,1 | 297,4 | 307,3 | 262,4 | 1043,5 | 1779,1 |
| **CFU ile Eş Zamanlı Temizleme ve Konsantre Etme** | **12** | **Ultrasantrifüj + PVDF filtrasyon + CFU işlemi sonrası Filtrate** | 64,11 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |

**Tablo 3.4.** Devam.

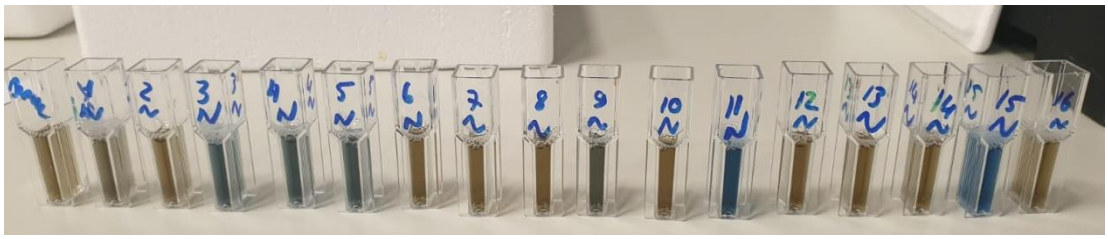
| Ön İşlem | Numune Numarası | Numune Açıklamaları | Toplam Şeker Miktarı % (w/v) | Toplam Protein (mg/mL) | Diastaz Total Aktivite (Schade Unit/g=DN) | İnvertaz Total Aktivite (U/Kg) | % İnvertaz Geri Kazanım | % Diastaz Geri Kazanım | % Protein Geri Kazanım (mg protein) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **CFU ile Eş Zamanlı Temizleme ve Konsantre Etme** | **13** | **CFU işlemi sonunda oluşan retentat,** 12 mL insect saline tamponu ile yıkama sonunda oluşan Filtrate (Yıkama 1) | 27,67 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| | **14** | **1. yıkama sonrası retentat**, 12 mL İnsect saline tamponu ile yıkama sonunda oluşan Filtrate (Yıkama 2) | 10,82 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| | **15** | **2. yıkama sonucu oluşan retentat**ın insect saline tamponu ile 2 mL'ye tamamlanması ile oluşan Numune | 9,8 | 1,12 | 450 | 641,5 | 547,7 | 1578,6 | 1808,5 |

TLA; Tespit Limiti Altında,

% Diastaz Aktivite Geri Kazanım Hesaplama Denklemi; (Başlangıç çözeltisi içerisindeki total diastaz aktivitesi (Schade U/g)) x 100) / (İlgili işlem basamağı sonunda elde edilen çözelti içerisindeki total diastaz aktivitesi (Schade U/g)),

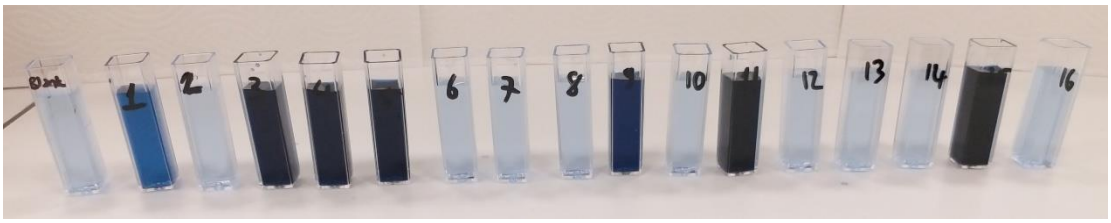
% İnvertaz Aktivite Geri Kazanım Hesaplama Denklemi; (Başlangıç çözeltisi içerisindeki total İnvertaz aktivitesi (U/Kg)) x 100) / (İlgili işlem basamağı sonunda elde edilen çözelti içerisindeki total İnvertaz aktivitesi (U/Kg)),

% Protein Geri Kazanım Hesaplama Denklemi; (Başlangıç çözeltisi içerisindeki toplam protein konsantrasyonunu (mg/mL)) x 100) / (İlgili işlem basamağı sonunda elde edilen çözelti içerisindeki toplam protein konsantrasyonu (mg/L)).



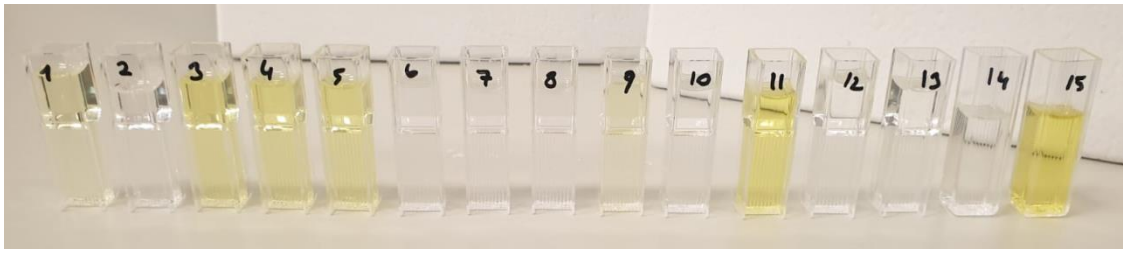
**Şekil 3.1.** Toplam protein analizi görselleri.

Koyu mavi renkler konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde protein varlığını göstermektedir. 1, 3, 4, 5, 9, 11 ve 15 numaralı numenelerde yüksek protein varlığı gözlemlenebilmektedir.



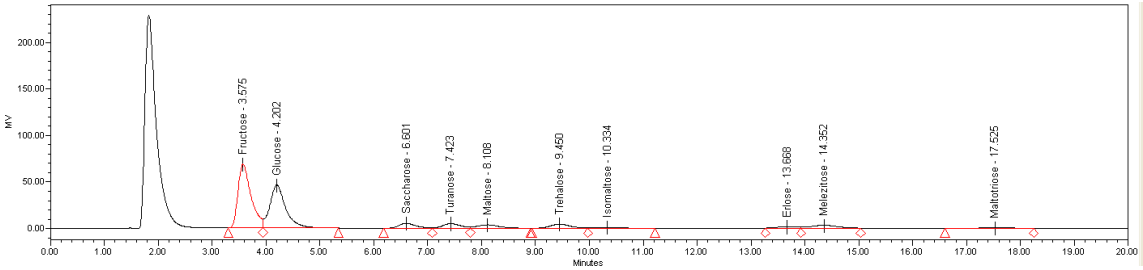
**Şekil 3.2.** Diastaz aktivite analiz görselleri.

Koyu mavi-lacivert renkler konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde diastaz enzim varlığını göstermektedir. 1, 3, 4, 5, 9, 11 ve 15 numaralı numunelerde yüksek diastaz aktivitesi gözlemlenebilmektedir.

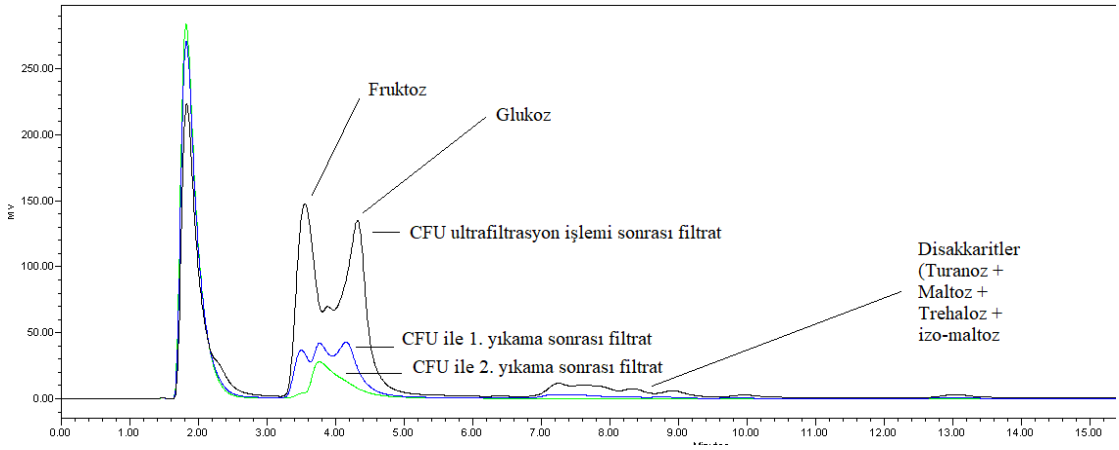


**Şekil 3.3.** İnvertaz aktivitesi görselleri.

Sarı renkler konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde yüksek invertaz enzim varlığını göstermektedir. 1, 3, 4, 5, 9, 11 ve 15 numaralı numenelerde invertaz aktivitesi gözlemlenebilmektedir.




**Şekil 3.4.** Şeker analizine ait tek noktalı kalibrasyon kromatogramı.




**Şekil 3.5.** Ön hazırlık optimizasyonunda CFU ultrafiltrasyon ön işleminin şeker elimine etme etkinliğine ait kromatogramlar.

2. yıkama sonrasında toplam şeker konsantrasyonu minimum seviyeye indirilmiştir.

Yapılan deneysel tasarım sonucunda elde edilen verilerde hem toplam enzim aktivitesi hemde toplam protein kazanımı açısından 3, 4, 5, 9, 11 ve 15 numaralı örneklerde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu örneklere ait rakamsal veriler Tablo 3.4.'te verilmek ile birlikte aktivite ve toplam protein testlerinin okumalarının yapıldığı kolorimetrik tayin yapmaya imkan sağlayan spektrofotometre küvetlerindeki görselleri de Şeki 3.1., Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'de paylaşılmıştır. Görsellerden ve elde edilen rakamsal değerlerden görüleceği üzere stirred cell sonrası oluşan örnekleri temsil eden 3, bu numuenin santrifüj ve PVDF filtrasyon işlemlerini temsil eden sırası ile 4 ve 5 numaralı örnekler yoğun diastaz ve invertaz enzim aktivitesini yüksek protein içeriği ile içermektedir. Ultrasantrifüj ve PVDF filtrasyon işlemlerinin enzim kaybına yol açmadığı valide edilmiştir. Aynı şekilde, stirred cell uygulamasının bal çözeltisini (50g/400mL) konsantre etme kabiliyeti de bu testler ile valide edilmiştir. Oluşan konsantre numune ile devamında yapılan diyaliz işlemini 9 numaralı ve bu numuneyi

CFU ile konsantre etmeyi temsil eden 11 numaralı numune de yüksek miktarda enzim aktivitesi ve protein içermek ile birlikte geri kazanım kayıpları mevcuttur. 15 numaralı CFU işlemi sonrasında elde edilen numune ise minimum geri kazanım kaybı ile en yüksek enzim aktivitesi ve protein konsantrasyonu sağlamıştır. Enzim saflaştırma süreçlerine bu prosedürü takip ederek devam etmenin daha uygun olduğu analiz verileri doğrultusunda kararlaştırılmıştır.

Diyaliz tamponu 2 litre hacimde kullanılmıştır. Buraya difüze olan karbonhidrat molekülleri toplam hacim fazla olduğundan, nihai şeker konsantrasyonu bakımından seyreltik kalmıştır. Fakat diyaliz kasedi içerisindeki izolat, toplam şeker konsantrasyonu bakımından %0,11 (w/v) değeri gibi oldukça düşük bir konsantrasyon vermektedir. CFU ile yapılan ardışık 2 yıkama sonunda ise elde edilen retentat numunesinde %9,81 (w/v) değerinde toplam şeker konsantrasyonu ölçülmüştür. Birinci ultrafiltrasyon işlemi sonucunda oluşan filtratta elde edilen %64,1, 1. ve 2. yıkama işlemleri sonunda elde edilen sırası ile %27,64 ve %10,8 toplam şeker yüzdeleri ise yıkama adımının devam ettirilmesi ve bu şekilde diyaliz ile eşdeğerde şeker eliminasyonu elde edilebileceğini göstermiştir. Bu bakımdan hem diyaliz hemde CFU ile gerçekleştirilen ultrafiltrasyon işlemi şeker gibi küçük moleküllerin eliminasyonunda etkin olarak görülebilir. Bu veriler doğrultusunda karar verilen prosedür olan CFU işleminde bir adım daha yıkama gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Yıkama adımının 3 tekrardan fazla tutmanın ise olası enzim stabilite kaybı doğurabileceği gerekçesi ile ideal sayının 3 tekrar olacağı tespit edilmiştir. Diyaliz işleminde seçilen 20 kDa küçük moleküllerin diyalizata difüze olmasını kolaylaştıran bir gözenek hacmi olmak ile birlikte CFU işleminde seçilen 10 kDa bu etkinliği azaltmakta fakat, pratik olarak uygulanabilen diya-filtrasyon işlemini bir basamak daha eklemek bu problemin önüne geçilebilmiştir. Diyaliz ve ultrafiltrasyon ile temizleme etkinliğini değerlendirmek için şeker analizi seçilmesinin nedeni çalışan matriks olan çam balında yüksek miktarda karbonhidrat mevcut olmasıdır. Farklı molekül ağırlıklarına sahip bu molekül grubunun elimine edilebilmesi nispeten daha düşük konsantrasyonlarda seyreden organik asit, amino asit, minerallar, vitaminler, fenolikler, tuzlar ve bunun gibi pek çok küçük molekülün etkin eliminasyonunun da göstergesi olacaktır şeklinde yorumlama yapılmıştır. Fruktoz ve glukoz arasında oluşan sinyal, HILIC uygulama gerçekleştirilen şeker analizinde sisteme enjekte edilen numunenin %100 su içerikli tampon ile enjekte edilmesi ve

izokratik şartlar ile enjekte edilen örneğin arasındaki organik solvent uyumsuzluğundan kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Şeker analizleri ve temizlik etkinliğine ilişkin görseller Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.'te verilmektedir.

Diyaliz işlemi esnasında invertaz enziminin geri kazanım kaybına uğradığı tespit edilmiştir. U/Kg cinsinden total invertaz aktivitesi stirred cell ve onu takip eden ultrasantrifüj, PVDF filtreleme işlemleri sonunda 308,2 U/Kg olarak %263,1 geri kazanım değeri elde edilmiş daha sonra bu numune bölünerek 7,5 mL'lik kısmı diyaliz kasedine yüklenmiştir. Bu işlem sonunda elde edilen 116,0 U/Kg aktivite, geri kazanım değeri olarak %99,2 değerine tekabül etmektedir. Bu kayıp invertaz enzimi için diyaliz işleminin verim kaybına sebep olduğunu göstermiştir. Tris.HCl tamponu (insect saline tamponu) pH 7,4'te kullanılmıştır. Bu pH değeri, invertaz enzimini teorik olarak iyonik halde tutar iken, pI değeri 7,4 olan diastaz enzimi teorik olarak nötral durumdadır. Bu durum diastazı diyaliz kasedi içerisinde tutarken, glikoprotein yapılı asidik karakterdeki invertaz enzimini iyonize ederek diyaliz tamponu içerisine çözünürlüğü arttırmak sureti ile difüze ediyor olabilir. Bunun yanı sıra 20 kDa MWCO değerine sahip diyaliz membranın, geniş por çapı dolayısı ile bu difüzyonu kolaylaştırabiliyor olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Tekniğin sürece dahil edilebilmesi için daha küçük por çapına sahip diyaliz membranlarının kullanılması gerekmektedir. Fakat işlem süresi daha da uzayacağından enzim stabilitesi açısından özellikle de invertaz açısından kayba yatkınlık artması olasıdır. İnvertaz enzimindeki bu kayıp diyaliz işleminin yaklaşık olarak 1,5 gün sürmesi ve sıcaklık stabilizasyonun diastaz enzimine oranla çok az olması kaynaklı olabilir. CFU ile gerçekleştirilen temizleme (pasif ultra-diyafiltrasyon) ve konsantre etme işlemi, protein izolatlarını deriştirme anlamında oldukça etkin sonuç vermiştir. Yıkama adımları dahil tüm CFU ile yapılan ultrafiltrasyon işlemlerinde filtratlarda protein varlığı tespit edilmemiştir. Benzer şekilde stirred cell ve PVDF filtrasyon işlemlerinde de protein kaçağı ve geri kazanım kaybı söz konusu olmamıştır. CFU işlemi tüm yıkama adımları dahil olacak şekilde 2,5 saat gibi bir sürede tamamlanabilmektedir. Protein kaybı olmaması yanı sıra diyaliz gibi ortalama 1,5 gün süren bir uygulamaya karşın zaman efektif olarak ta değerlendirilebilir.

2 farklı prosedür (CFU ve Diyaliz) sonucu oluşan numuneleri 9, 11 ve 15 numaralı örnekler temsil etmektedir. Diyaliz işlemi sonucu oluşan 9 numaralı numune

ile 15 numaralı numune 2 farklı tekniğin direk karşılaştırması olup total diastaz aktivitesi, total invertaz aktivitesi ve toplam protein eldesi bakımından büyük fark oluşturmaktadır. Diyaliz sonucu oluşan protein ve dolayısı ile aktivite kaybını geri kazanmak ve CFU'nun etkinliğin diyaliz edilen numune üzerinden de yorumlayabilmek için diyaliz işleminde sonra elde edilen numune CFU ile ultrafiltre edilmiştir. Bu işlem sonrasında oluşan 11 numaralı numune sadece CFU ile oluşturulan 15 numaralı numuneye göre düşük protein geri kazanımı ve total aktivite içermek ile birlikte diyaliz sonundaki kaybı geri kazanabilmiştir. Bu açıdan da CFU prosedürünün diyalize olan üstünlüğü gözetilebilmiştir. Çalışmamız esnasında, liyofilizasyon altyapısı olmadığından saflaştırma ara basamaklarında veya ön hazırlık süreçlerinde enzimleri konsantre etme ve stabil olarak depolama imkanı olmamıştır. Diyaliz kasetleri invertaz kaybı dolayısı ile saf dışı bırakılmış olup, CFU ve stirred cell kombinasyonu PVDF şırınga filtresi ve ultrasantrifüjden oluşan ön hazırlık gerekli enzim saflaştırma ön-numunesi için yeterli gözükmektedir. Çalışmanın ikinci adımında, bu prosedür ile tekrar bir konfirmasyon odaklı ön hazırlık çalışması yapılıp, analiz tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı valide edilmiştir. Daha sonra bu yöntemden elde edilen final numuneler kullanılarak saflaştırma prosedürlerine geçilmiştir.

## 3.5. Ön Hazırlık Konfirmasyon Çalışması

Enzim saflaştırma deneyleri için ön hazırlık optimizasyon sonrası karar verilen son prosedürün konfirmasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bir önceki optimizasyon sürecindeki gibi kiritk basamaklarda numuneler ayrılarak, tamamı Bradford toplam protein, şeker içeriği, diastaz ve invertaz aktivite testlerine tabi tulumuştur. Bu çalışma için planlanmış olan deney modeli Şekil 2.18.'de verilmiştir. Ayrılan numuneler ile yapılan analizler sonucunda elde edilmiş değerler ise Tablo 3.5.'te belirtilmiştir.

**Tablo 3.5.** Konfirmasyon çalışması sonuçları.

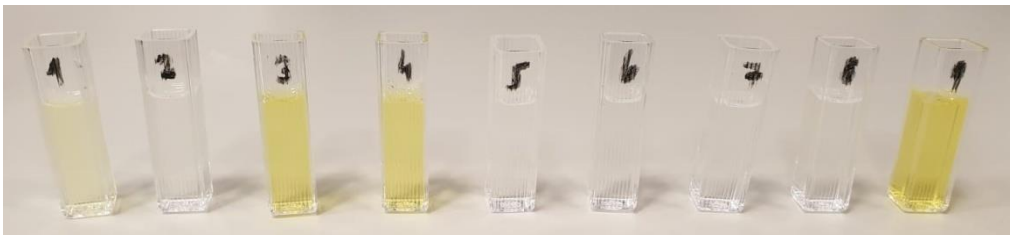
| Numune Numarası | Numune Açıklamaları | Toplam Şeker Miktarı % (w/v) | Toplam Protein (mg/mL) | Diastaz Total Aktivite (Schade Unit/g=DN) | İnvertaz Total Aktivite (U/Kg) | % Protein Geri Kazanım (mg-protein) | % Diastaz Geri Kazanım | % İnvertaz Geri Kazanım |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **50g/400mL bal çözeltisi** (santrifujlenmiş) | 64,10 | 0,06 | 28,5 | 117,1 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 2 | **Stirred cell** işlemi sonrası **filtrate** | 63,97 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| 3 | **Stirred cell** işlemi sonrası **retentate** | 62,12 | 1,11 | 451,2 | 591,3 | 1906,5 | 1583,1 | 504,6 |
| 4 | Retentat + **Ultrasantrifuj + PVDF** | 58,89 | 1,06 | 444,1 | 601,0 | 1821,2 | 1558,2 | 513,2 |
| 5 | CFU **Filtrat (ilk yükleme)** | 63,76 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| 6 | **CFU 1.yıkama filtrat** | 22,54 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| 7 | **CFU 2.yıkama filtrat** | 1,21 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| 8 | **CFU 3.yıkama filtrat** | 0,07 | TLA | TLA | TLA | - | - | - |
| **9** | CFU 3. yıkama sonrası 3,5 mL'ye tamamlanan Retentat **(final numune)** | **TLA** | **1,25** | **693,3** | **1055,0** | **2149,8 (21,4 kat)** | **2432,6 (24,3 kat)** | **900,9 (9 kat)** |

TLA; Tespit Limiti Altında,

% Diastaz Aktivite Geri Kazanım Hesaplama Denklemi; (Başlangıç çözeltisi içerisindeki total diastaz aktivitesi (Schade U/g)) x 100) / (İlgili işlem basamağı sonunda elde edilen çözelti içerisindeki total diastaz aktivitesi (Schade U/g)),

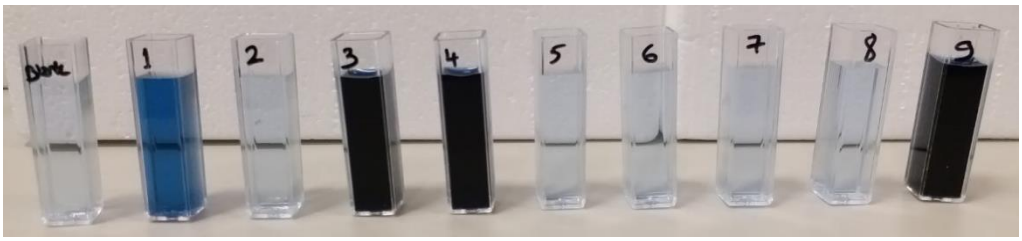
% İnvertaz Aktivite Geri Kazanım Hesaplama Denklemi; (Başlangıç çözeltisi içerisindeki total İnvertaz aktivitesi (U/Kg)) x 100) / (İlgili işlem basamağı sonunda elde edilen çözelti içerisindeki total İnvertaz aktivitesi (U/Kg)),

% Protein Geri Kazanım Hesaplama Denklemi; (Başlangıç çözeltisi içerisindeki toplam protein konsantrasyonu (mg/mL)) x 100) / (İlgili işlem basamağı sonunda elde edilen çözelti içerisindeki toplam protein konsantrasyonu (mg/L)).



**Şekil 3.6.** İnvertaz aktivitesi görselleri.

Sarı renkler konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde invertaz enzim varlığını göstermektedir. 1, 3, 4 ve 9 numaralı numenelerde yüksek invertaz aktivitesi gözlemlenebilmektedir.



**Şekil 3.7.** Diastaz aktivitesi görselleri.

Mavi-lacivert renkler konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde diastaz enzim varlığını göstermektedir. 1, 3, 4 ve 9 numaralı numenelerde yüksek diastaz aktivitesi gözlemlenebilmektedir.

Belirlenen iş akışında numune hazırlığı 4 kez yapılarak enzim saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi için numune tedariği sağlanmıştır. Verilen deney prosedürü ile yapılan 4 ayrı zamandaki numune hazırlığı ile toplamda 12 adet numune elde edilmiş ve enzim saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi için ilerleyen zamanda -60°C'de muhafaza edilmek sureti ile deney materyali olarak değerlendirilmiştir. Bir önceki ön hazırlık değerlendirme çalışmasında stirred cell ile konsantre etme işlemi sonunda retentat olarak 40 mL numune elde edilmiş bunun 7,5 mL'lik kısmı diyalize geriye kalan kısmı ise CFU işlemine tabi tutulmuştu. CFU prosedürü kullanılarak gerçekleştirilen konfirmasyon çalışmasında ise yaklaşık 15 mL numune retantat olarak membran üzerinde kalana kadar ultrafiltrasyon işlemine devam edilmiştir. Bu bakımdan bir önceki çalışmaya göre invertaz aktvitesinin, diastaz aktivitesinin ve toplam protein miktarının yüksek çıkması beklenen bir durumdur. Optimizasyon çalışmasında elde edilen diastaz toplam aktivite değeri CFU prosedürü için 450,1 Schade U/g iken konfirmasyon çalışmasında 693,3 Schade U/g olarak tespit edilmiş, invertaz aktivitesi

ise 641,5 U/Kg'dan 1055,0 U/Kg'a yükseliş göstermiştir. Toplam protein konsantrasyonu ise 1,25 mg/mL olarak bulunup bir önceki prosedürde bu değer 1,12 mg/mL olarak bulunmuştur. Bulgular konfirmasyon çalışmasında gerçekleştirilen, ultrafiltrasyon ile daha düşük hacime indirgeme seçeneğinin geri kazanımı olumlu etkilediği yönünde yorumlanabilmektedir. 400 mL hacmindeki bal çözeltisini stirred cell ultrafiltrasyonu sonunda 15 mL'ye indirgemiş ve bu sayede yaklaşık 26,5 kat derişim sağlanması hedeflenmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında konfirmasyon çalışması sonrasında diastaz, invertaz ve toplam protein için elde edilen geri kazanımlar sırası ile %2432,6, %900,9 ve %2149,8 olarak rapor edilmiştir. Buda yaklaşık olarak diastaz için 24,3 kat, invertaz için 9 kat toplam protein cinsinden ise 21,5 kat deriştirme sağlandığı anlamına gelmektedir. Diastaz ve toplam proteine oranla invertazdaki geri kazanım düşüklüğü, enzimin diastaza oranla sıcaklığa karşı daha az stabil yapıda olması, ön işlem sürelerine ve sayısına karşı daha dayanıksız olmasından ileri gelebilmektedir. İnvertaz aktivite ölçümündeki, ölçüm aralığının yüksek invertaz değerlerinde doğrusallıktan sapması ve enzim miktarı ile aktivitenin korele sonuç vermemesi de suni geri kazanım kaybı verisi yaratabilmektedir. Yıkama işlemleri sonunda ise şeker bileşenlerinin ve diğer küçük moleküllerin buna bağlı olarak etkin şekilde temizlendiği söylenebilmektedir. 3. yıkama sonunda konsantre protein çözeltisi içerisinde şeker bileşeni değeri tespit edilmemiştir. Elde edilen konsantre enzim değerlerinin MPLC ile gerçekleştirilecek saflaştırma prosedürleri için oldukça konsantre ve girişimlerden elimine edilmiş formda olduğu söylenebilmektedir.

## 3.6. Enzim Saflaştırma Yöntemlerinin Geliştirilmesi

### 3.6.1. Anyon değişim kromatografi uygulaması

İlk olarak anyon değişim kromatografisinin hedeflediğimiz invertaz ve diastaz alıkoyma etkinliği test edilmiştir. Bunun için elimizde mevcut olan 2 farklı MPLC kolonu, on-line desalting işlemi sonrasında denenmiş ve yeterli bir rezolüsyon sağlayıp sağlamadığı değerlendirilmiştir. Ön hazırlık sonucunda elde edilen 0,8 mL'lik konsantre numunelerden biri öncelikle Bio-Scale™ Mini Bio-Gel® P-6 Desalting kartuşundan (6 kDa MWCO, 5 mL, jel filtrasyon ve desalting kolonu) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) 1 mL/dak. akış hızı ile geçirilerek küçük moleküllerden arındırılmış ve elde edilen

protein fraksiyonu 1 mL kadar Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q, (Güçlü anyon değişim kolonu, 5 mL, 50 µm), (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) kolonuna MPLC sisteminde manuel olarak yüklenmiştir. Mobil faz olarak desalting kısmında Insect Saline Tamponu (Tris.HCl tamponu), (10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$), anyon değişim kromatografisinde ise Mobil faz A, 10 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 ve Mobil Faz B, 1 M NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 şeklinde gradyan uygulama ile kullanılmıştır.

Mini Macro-Prep® High Q sonrasında elde edilen fraksiyonlardan invertaz ve diastaz aktiviteleri tespit edilen fraksiyonlar Enrich™ Q (Yüksek çözünürlüklü anyon değişim kolonu, #7800001, 5 x 50 mm, 1 mL, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) kolonuna 1 mL olacak şekilde enjekte edilmiştir. Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q ile aynı mobil faz çifti kullanılmış olup gradyan uygulama ve akış hızı Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q kolondan farklı şekilde tercih edilmiştir. Akış hızı ENrich™ Q kolon için, 0,65 mL/dak. iken, Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q kolon için ise 4,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Her iki kolonun rezolüsyon ve alıkoyma etkinliği aynı mobil faz bileşimleri kullanılarak test edilmiş olup, gradyan boyunca pH sabit tutulup, insect saline tamponu içerisindeki taşıdıkları yük polarizasyonu (anyon veya katyon) dolayısı ile kolonda tutunma kabiliyeti gösteren enzim ve proteinlerin artan NaCl konsantrasyonu doğrultusunda tuz gradyanı uygulayarak elüsyonu hedeflenmiştir. 10 µm partikül çapına sahip ENrich™ Q adlı kolon düşük partikül çapı dolayısı ile daha yüksek rezolüsyon sağlaması hedeflenmiş olup, daha yüksek basınç oluşturması dolayısı ile daha düşük akış set edilip, bu yüzden Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q kolona göre daha uzun analiz sürelerine sebebiyet vermiştir. Analiz süresi Macro-Prep® High Q uygulaması için 30 dakika iken, ENrich™ Q uygulaması için ise 40 dakikadır. Her iki reçine de aynı güçlü anyon değiştirici olan kuarterner amonyum fonksiyonel grubu polimer dolgu maddesine bağlı şekilde bulunmaktadır. Uygulanan gradyan profilleri aşağıda verilmektedir;

**Macro-Prep® High Q kolon için;**

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 - 5,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

5,25 - 9,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

9,25 – 19,25 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

19,25 – 24,25 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

24,25 – 30,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

**ENrich™ Q kolon için;**

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 – 6,54 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

6,54 – 11,54 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

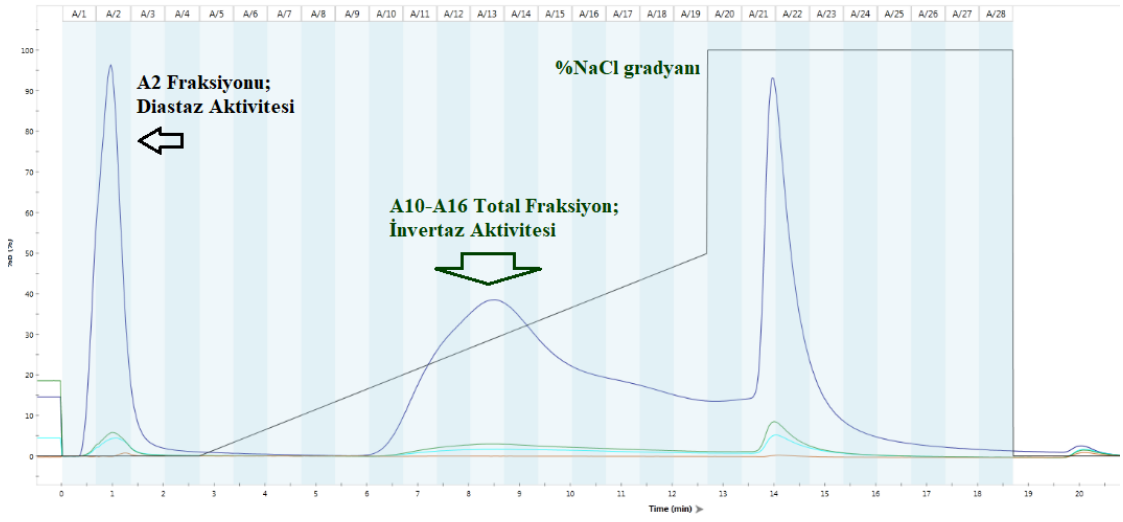
11,54 – 26,54 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

26,54 – 31,54 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

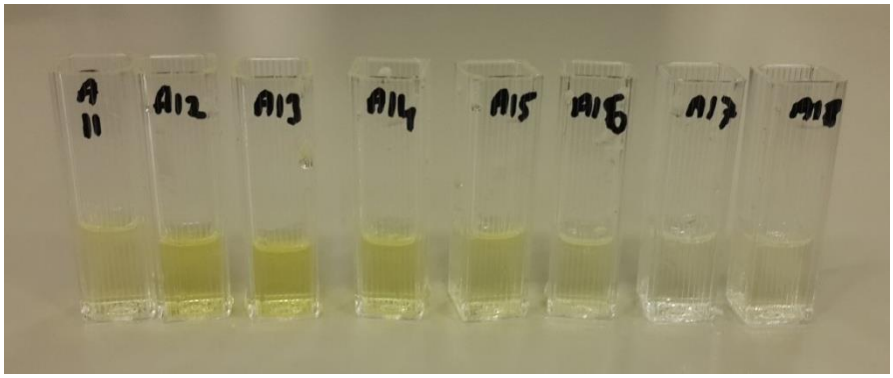
31,54 – 40,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

Anyon değişim kromatografisi ile ilk olarak Macro-Prep® High Q kolon için elde edilen kromatogram Şekil 3.8.'de verilmiştir. Flow through (A2 fraksiyonu, tutunma olmadan elüe olan kısım) fraksiyonda diastaz aktivitesi gözlemlenirken, A10-A16 arası fraksiyonlar birleştirilip enzim aktivite analizi yapıldığında invertaz aktivitesi tespit edilmiştir. Anyon değişim kromatografisinde tutunma göstermeyen diastaz enziminin aktivite teti sonucunda oluşan A2-A3 fraksiyonuna ait görsel Şekil 3.9.'da, invertaz aktivitesine sahip olan A12-A15 arası fraksiyonların görselleri ise Şekil 3.10.'da verilmiştir. Bu kısımdaki rezolüsyonun kötü olması dolayısı ile fraksiyonlar toplanmış ve bu toplu fraksiyonu temsilen 1 mL'lik kısmı daha yüksek rezolüsyon elde edebilmek adına ENrich™ Q kolona transfer edilmiştir. Buradaki amaç anyon değişim reçinelerinde alıkonma sağladığını tespit etmiş olduğumuz invertaz enzimini daha saf şekilde yüksek rezolüsyon ile girişimlerden uzak şekilde fraksiyonlayabilmekti. ENrich™ Q reçine 10 um'lik partikül çapı dolayısı ile 40 um partikül çapına sahip

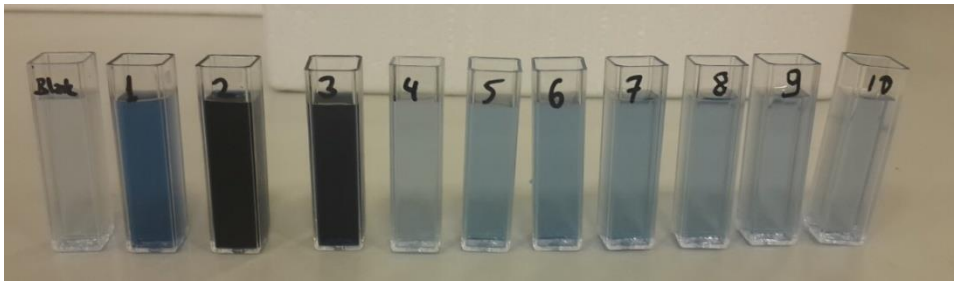
Macro-Prep® High Q kolona göre daha dar pik genişlikleri vermiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 3.11.'de verilmiştir. A9 numaralı fraksiyon tek başına invertaz aktivitesi verirken girişim oluşturan diğer moleküllerden daha rahat ayrım gösterebilmekte ve girişimden uzak fraksiyonlama imkanı oluşturabilmektedir. Enzim stabiliteleri için tüm işlemler 4°C'de gerçekleştirildi. Her iki kolona da 1 mL enjeksiyon aynı mobil fazlar kullanılarak aynı sistemde enjekte edildi. Akış hızları, reçinelerin partikül çapı ve dolayısı ile oluşturdukları basınç sebebiyle farklı şekilde kullanılmış olup, gradyan profiller ise benzer şekilde uygulanmıştır. ENrich™ Q uygulamasında %B kompozisyonuna geçiş ivmesi azaltılmış şekilde uygulama rezolüsyona katkı sağlamıştır. Bio-Scale™ Mini Bio-Gel® P-6 Desalting kartuşu kullanılmadan numunenin direk kullanılması ise profilde bir fark yaratmamıştır. Bu bakımdan saflaştırma sürecine bir adım daha ekleyerek enzim stabilitesini negatif etkileyecek saflaştırma sürecinin uzatılması akılcı değildir. Bu bakımdan bu basamak ilerleyen prosedürlerde saflaştırma süreçlerine dahil edilmemiştir. ENrich™ Q kolonun, Macro-Prep® High Q kolona göre yüksek rezolüsyon vermesi sebebi ile desalting işlemi olmadan saflaştırma sürecine dahil edilmesine karar verilmiştir.



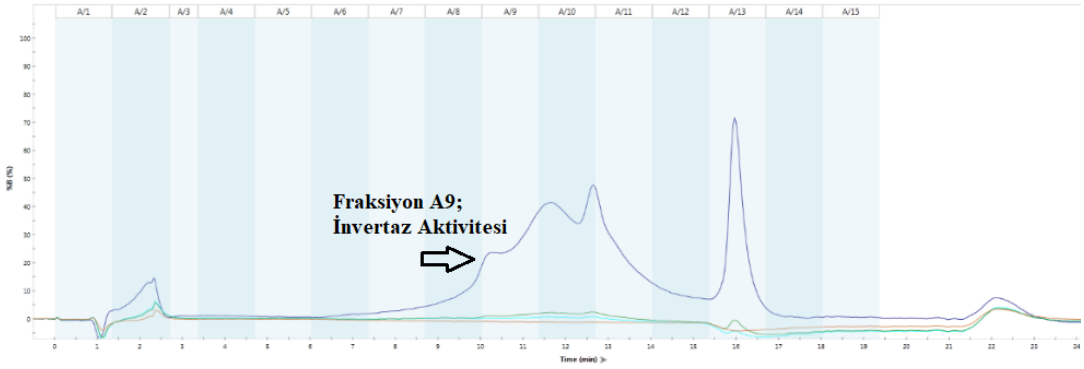

**Şekil 3.8.** Macro-Prep® High Q kolon ile elde edilen anyon değişim kromatogramı.




**Şekil 3.9.** Anyon değişim kromatografisinde tutunma gösteren invertaz enziminin aktivite testi sonucunda oluşan yüksek invertaz aktivitesine sahip A12 ile A15 arası fraksiyonlara ilişkin görsel.




**Şekil 3.10.** Anyon değişim kromatografisinde tutunma göstermeyen diastaz enziminin aktivite testi sonucunda oluşan, yüksek diastaz aktivitesine sahip A2 ve A3 fraksiyonlarına ilişkin görsel.




**Şekil 3.11.** ENrich™ Q kolon ile elde edilen anyon değişim kromatogramı.

Anyon değişim kolonları, CHT kromatografisi sonrasında ikinci adım saflaştırma tekniği olarak, diastaz saflaştırma sürecinde hedefli olmayan moleküllerin alıkonarak uzaklaştırılmasında, invertaz saflaştırma sürecinde ise bir önceki CHT prosesinde alıkonma sağlamayan invertazı alıkonma sağlayarak girişimlerin elimine

edilmesi amacı ile kullanılmıştır. Örnek enjeksiyonu olarak CHT kromatografi prosesi sonrası elde edilen diastaz ve invertaz aktivitesine sahip fraksiyonlar birleştirildikten sonra her iki enzim içinde ayrı ayrı 1 mL kadar numune anyon değişim kolonlarına enjekte ederek invertaz ve diastaz alıkoyma becerileri ve saflaştırma süreçlerine olan katkıları incelenmiştir. AEX işlemi sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar seçilerek yaklaşık her bir enzim için ayrı 1 mL'lik fraksiyonlar SEC uygulamasına son adım olarak transfer edilmiştir.

### 3.6.2. Katyon değişim kromatografi uygulaması

Diastazın alıkonması ve invertaz için geliştirilmiş bir rezolüsyon elde edebilmek adına katyon değişim kromatografisi ön hazırlıktan elde edilen 0,8 mL'lik numune katyon değişim resinlerine enjekte ederek test edilmiştir. Bunun için 2 farklı MPLC kolonu tedarik edilmiş ve yeterli bir rezolüsyon sağlayıp sağlamadıkları değerlendirilmiştir. 0,8 mL'lik konsantre enzim numunelerinden biri öncelikle Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S, (Güçlü katyon değişim kolonu, 5 mL, 50 µm) (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) kolonuna MPLC sisteminde manuel olarak yüklenmiştir. Mobil faz A, 10 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 ve Mobil Faz B, 1 M NaCl, 10 mM Tris.HCl Tamponu pH 7.4 şeklinde gradyan uygulama ile kullanılmıştır. Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S kolonda akış hızı 4,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Gradyan boyunca pH sabit tutulup, insect saline tamponu içerisindeki taşıdıkları yük polarizasyonu (anyon veya katyon) dolayısı ile kolonda tutunma kabiliyeti gösteren enzim ve proteinlerin artan NaCl konsantrasyonu doğrultusunda tuz gradyanı uygulayarak elüsyonu hedeflenmiştir. Analiz süresi Macro-Prep® High S uygulaması için 30 dakika iken, kullanılan reçinede güçlü katyon değiştirici olan sülfonat fonksiyonel grubu polimer dolgu maddesine bağlı şekilde bulunmaktadır. Uygulanan gradyan profili aşağıda verilmektedir;

<u>Macro-Prep® High S kolon için;</u>

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 - 5,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

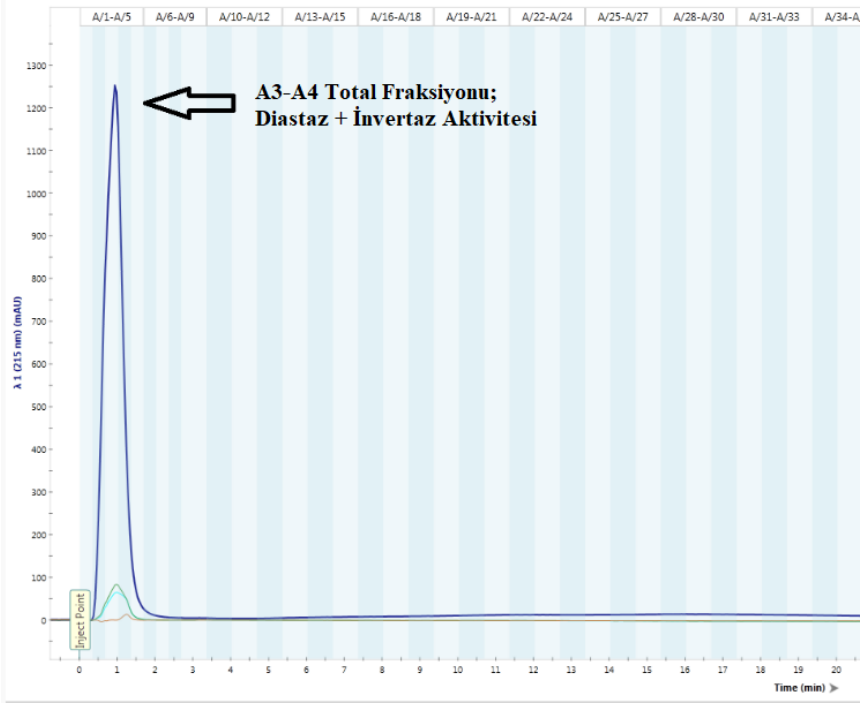
5,25 - 9,25 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

9,25 – 19,25 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

19,25 – 24,25 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

24,25 – 30,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

Katyon değişim kromatografisi ile Macro-Prep® High S kolon için elde edilen kromatogram Şekil.3.12.'de verilmiştir. Flow through (A3-A4 fraksiyonu, tutunma olmadan elüe olan kısım) fraksiyonda diastaz ve invertaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Macro-Prep® High S kolonda tutunma gözlemlenmediğinden Enrich™ S (Yüksek çözünürlüklü katyon değişim kolonu, 5 x 50 mm, 1 mL, (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) ile uygulamaya devam edilmemiştir. Diastaz ve invertaz enzimlerinin bazik proteinler olmaması, invertazın ise diastaza oranla daha asidik karakterde bir enzim olması dolayısı ile proteinlerin katyon değişim reçinelerinde alıkonabilmeleri için izo-elektrik noktalarına göre daha düşük bir pH değerine sahip mobil faz ikilisi kullanılmalıdır. Bunun ile birlikte enjeksiyon yapılacak çözelti ortamının da düşük pH'ta olması ve enzimleri katyonik formda tutulması gerekmektedir. Fizyolojik pH değerine yakın insect saline tamponu ile geliştirilen ön hazırlık metodundan elde edilen final konsantre numune bu uygulama için seyreltilmeli ve asiditesi bu şekilde arttırılmalıdır. Saflaştırma adımlarında enzimlerin olası geri kazanım kaybı dolayısı ile saf enzimlerin eldesi için mümkün olduğunca konsantre numuneler ile saflaştırma işlemine başlanması gerekmektedir. Bu bakımdan katyon değişim kromatografisi ek seyreltme ve asitlendirme gerektiğinden saflaştırma süreçlerinde tercih edilmemiş olup iyon değişim kromatografisi olarak invertazı başarılı şekilde alıkoyabilen anyon değişim kromatografisi saflaştırma adımı olarak ilerleyen süreçte değerlendirilmiştir.




**Şekil 3.12.** Macro-Prep® High S kolon ile elde edilen anyon değişim kromatogramı.

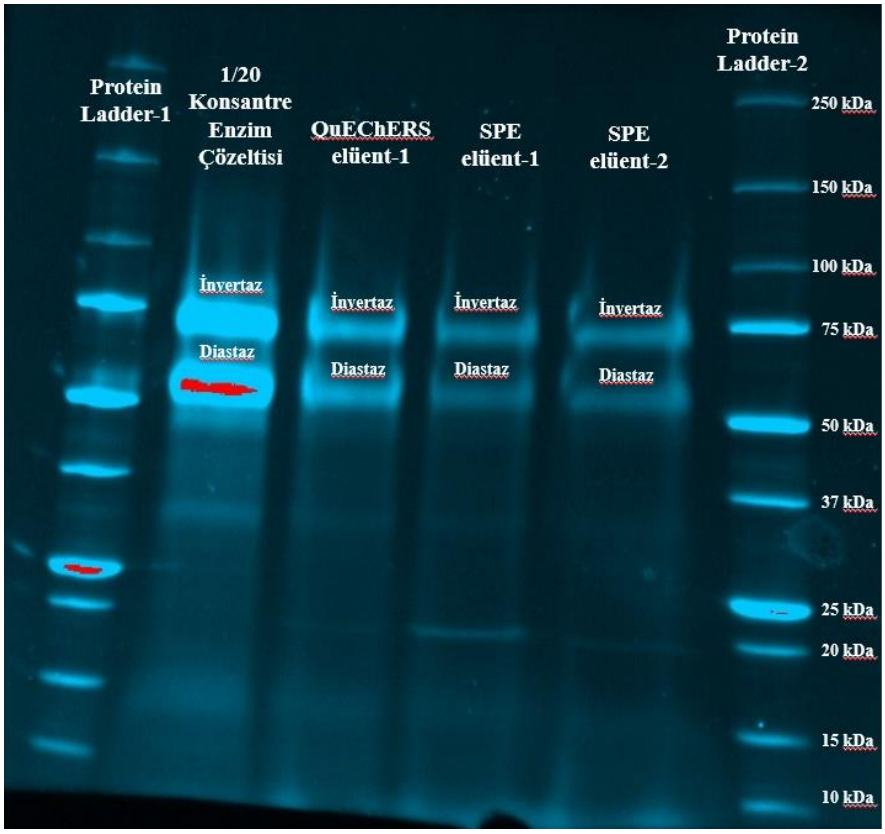
### 3.6.3. Glikoprotein afinite kromatografi (lektin afinite) uygulaması

#### 3.6.3.1. Lektin afinite SPE ve QuEChERS format testleri

CHT kromatografisi yerine, saflaştırma yönteminin ilk adımı olarak glikoprotein afinite tabanlı bir yöntem ile diastaz ve invertaz izolasyonu da denenmiştir. Bunun için glikoprotein yapıdaki proteinlerin alıkonmasına imkan veren afinite reçinesi olarak lektin afinite reçinesi (Lentil Lectin Sepharose™ 4B, Affinite kromatografi bulk reçinesi, 25 mL, 90 µm partikül çapında, Cytiva Europe GmbH, Reugelstraat 2, Hoegaarden, Branch, Belçika) tedarik edilmiştir. Reçine öncelikle QuEChERS (batch purification), katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve Zip-Tip formatlarında başlangıç olarak test edilmiştir. QuEChERS tabanlı uygulama için, 25 mL hacminde tedarik edilen Lentil Lektin afinite sorbent süspanse çözeltisinden 1 mL kısmı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 15.000 *x g* kuvvette 10 dakika santirfüj edilerek etanol içerikli saklama çözeltisi uzaklaştırıldı. Daha sonra reçineyi sartlandırmak için üzerine 1 mL kadar insect saline tamponu eklendi ve 1 dakika kadar vorteks uygulandıktan sonra 15.000 *x g* kuvvette 10 dakika santrifüj edilerek şartlama çözeltisi (üst faz) uzaklaştırıldı ve katı sorbent santrifüj tüpü içerisinde bırakıldı. Bu adım 1 kez daha tekrar edildi ve şartlandırılmış

sorbent enzim izolasyonu için hazır hale getirildi. Ön hazırlıktan elde edilen konsantre 0,8 mL hacmindeki numune SDS-PAGE analizinde enzim referansları oluşturulabilmesi için 1:20 oranında insect saline tamponu ile seyreltildi ve yüklemeye hazır hale getirildi. Aynı seyrelmiş numunenin 1 mL kadar kısmı ise şartlandırılmış Lektin afinite sorbenti üzerine eklendi ve 1 dakika kadar vortekslendi. Uygulanan santrifüj sonrasın elde edilen üst faz QuEChERS elüent-1 olarak etiketlendi ve SDS-PAGE analiz için hazırlanarak akrilamid jele yüklenmiştir. Bu noktada hedeflenen ise sorbentin özellikle invertaz enzimini etkin şekilde alıkoyması ve üst fazda invertaz tespit edilmemesidir. Bu şekilde invertaz ve diastaz ayrı şekilde izole edilip fraksiyonlanabilecek ve bu sayede saflaştırma süreçleri kolaylaştırılıp kısaltılabilecektir. Alternatif olarak aynı reçine SPE formatında da test edilmiştir. Boş, 1 mL iç hacime sahip SPE kartuşu içerisine süspanse sorbent çözetlisi QuEChERS ile eş hacimde olacak şekilde post-filter yerleştirdikten sonra 1 mL kadar eklendi ve pozitif basınç uygulayarak sorbent kartuşun tabanına sıkıştırıldı. Pre-filter sorbent üzerine ilave edilerek SPE formatında Lektin afinite kartuşu hazırlanmış oldu.

Burada QuEChERS tabanlı yöntemde etkin invertaz bağlanması sağlanmaması durumunda alternatif uygulama olarak SPE formatında ekstraksiyon ve izolasyon sağlanması hedeflenmiştir. Hazırlanan SPE içerisindeki sorbent 2 kez 1'er mL insect saline tamponu geçirmek sureti ile şartlandırıldı ve 1:20 oranında daha önce QuEChERS uygulaması için seyreltilmiş numuneden 1 mL kadar yüklendi. Pozitif basınç ile reçineden geçen çözelti toplandı ve SPE elüent-1 olarak kaydedildi. Daha sonra 1 mL kadar insect saline tamponu tekrar SPE kartuştan geçirelerek yıkama yapıldı ve bu fraksiyon SPE elüent-2 olarak kaydedildi. Bu iki numune daha sonra SDS-PAGE analizine QuEChERS elüent-1 numunesi ile eş zamanlı olarak yüklendi ve benzer şekilde elüentlerde invertaz aktivitesi gözlemlenmemesi hedeflendi.




**Şekil 3.13.** QuEChERS ve SPE formatlarında uygulanan lektin afinite ile diastaz ve invertaz saflaştırma yaklaşımı sonrasında elde edilen SDS-PAGE görseli.

Lane (L)-1; Protein Ladder-1, (L)-2; 1/20 seyreltilmiş konsantre protein çözeltisi, (L)-3; QuEChERS elüent-1 çözeltisi, (L)-4; SPE elüent-1 çözeltisi, (L)-5; SPE-elüent-2 çözeltisi, (L)-6; Protein Ladder-2.

Tüm QuEChERS ve SPE tipi Lektin afinite uygulamalarında konsantre saflaştırılmamış enzim çözeltisi ile benzer sonuç alınmıştır. Elde edilen sonuçlar SDS-PAGE görseli olarak Şekil 3.13.'de verilmiştir. Bu noktada elde edilen elüentlerin tümünün diastazın yanı sıra invertaz enzimini içerdiği gözlemlenmiş yani sorbentin invertazı etkin şekilde alıkoymadığı tespit edilmiştir. Glikoprotein yapısında olduğunu öngördüğümüz invertaz enzimini alıkoyabilmek için elverişli bağlanma koşullarının yaratılamamış olması birincil etken olarak değerlendirilmiştir. Uygulamalarda insect saline tamponu ile yıkama ve yükleme işlemlerinin yapılmış ve sorbentin aktivitesi için gerekli olan ve saklama çözeltisi içerisinde yer alan mangan elementinin elimine edilmiş olması bu negatifliğin ortaya çıkmasında etken olabilmektedir. Ayrıca sorbent miktarının azlığı da konsantre hale gelmiş olan enzimlerin bir kısmının alıkonma sağlanamadan elüe olması anlamına gelebilmektedir. Bu bakımdan daha fazla sorbent

gereksinimi söz konusu olup bu tarz bir uygulama için SPE ve batch purifikasyon (QuEChERS) yaklaşımı uygun olmayacağından mevcut Lektin sorbenti kolon formatına dönüştürülüp izolasyon çalışmasında değerlendirilmiştir.

### 3.6.3.2. Lektin afinite kolon formatı testleri

QuEChERS (Batch purification) ve SPE formatındaki denemelerde başarısız olunmasının ardından Zip-Tip (STAGE tip) formatında testlere devam edilmemiş olup, invertaz ve diastaz saflaştırılması için lentil lektin afinite reçinesi, Vantage L boş kromatografi kolonuna doldurulmuş ve saflaştırma etkinliği kolon formatında test edilmiştir. İleri teknik olarak, tedarik edilen reçine ile birlikte boş preparatif kromatografi kolonu (Vantage® L Laboratory Column VL, (11 mm x 250 mm, Boş biyokromatografi kolonu, Millipore, Merck, Darmstadt, Almanya) tedarik edilerek, reçinenin bu boş kolona dolumu yapılmış ve lektin afinite kolonu hazırlanarak MPLC sisteminde test edilmiştir. Uygulanan yöntemde aynı gradyan profilini uygulamak üzere akış hızı olarak 3 farklı akış test edilmiştir (2 mL/dak., 2,5 mL/dak., 3mL/dak.). Analiz süresi tüm uygulamalar için 47 dakikada tamamlanmıştır. Numune yüklenmesi sonrasında ortak gradyan profili ile 4 farklı elüsyon stratejisi test edilmiştir. Bu denemeler sırası ile tampon değişimi (borat tamponuna geçiş), pH düşürülmesi (Tris, pH 4.5 tamponu) ve ligand değişim stratejisi - karbonhidrat afinitesi (0,4 M ve 1 M glukozlu tampon) ile elüsyon yaklaşımlarını içermektedir. Buna göre hazırlanmış olan elüsyon tamponları aşağıdaki gibidir;

1. 0,1 M Borat tamponu pH=6.5,
2. 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=4.5,
3. 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=7.4, 0,4 M Glukoz,
4. 20 mM Tris.HCl, 0,5 M NaCl pH=7.4, 1 M Glukoz.

İlk olarak glukoz grandienti ile eüsyon test edilmiştir. Reçinenin monosakkarit bağlama afinitesi dolayısı ile yükselen glukoz konsantrasyonunda glikoproteinlerin elüsyonunun sağlanacağı düşünülmüştür. 0,4 M konsantrasyonundan 1 M glukoz konsantrasyonuna kadar değerlerde elüsyon test edilmiştir. Diğer 2 tampon pH değerini

aşağı çekmek ile birlikte tampon içerik değişimi de sağlamıştır. Teorik olarak belirtilen, düşük pH'ta saklama çözeltisi içerisinde tedarik edilen mangan iyonlarının reçineden kopması ve lentil lektinin bağlama potansiyelini kaybetmesi söz konusudur. Metal kompleksinin mangan iyonun ayrılması ile bozulması, bağlı olan glikoproteinlerin elüsyonuna sebep olacağı düşünülmüştür. Lektin bir çeşit metal bağlı glikoproteindir ve bu bakımdan diğer glikoproteinler haricinde borat anyonlarına karşı da borat iyonlarının yapay reseptör modeli oluşturmaları dolayısı ile afinitesi bulunmaktadır. Dolayısı ile artan borat tampon konsantrasyonu ile glukoz yerine borat iyonlarının afinitesinden faydalanılarak tampon değişimi ile elüsyonda alternatif olarak değerlendirilmiştir. Boratın, şeker kalıntıları üzerinde cis-dioller ile kompleksler oluşturduğu ve bu bakımdan iyi bir eluent olarak hareket edebilmesi söz konusudur. Nötral pH en iyi bağlanma kapasitesi dolayısı ile bağlanma adımında tercih edilmiştir. İnvertazın glikoprotein yapısında olması saflaştırmanın başlangıç noktasında diastaz ile invertazı birbirinden ayırabilmek için iyi bir çıkış noktası olabileceği şeklinde değerlendirilmiş ve bu sebepten glikoprotein etkileşimi ile invertazı alıkoyma ve diastazı tutunmadan kolondan alma hedeflenmiştir. Gradyan profili, tüm mobil faz uygulamalarında sabit tutulup aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

0,00 - 8,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

8,00 – 8,20 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

8,20 – 16,20 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

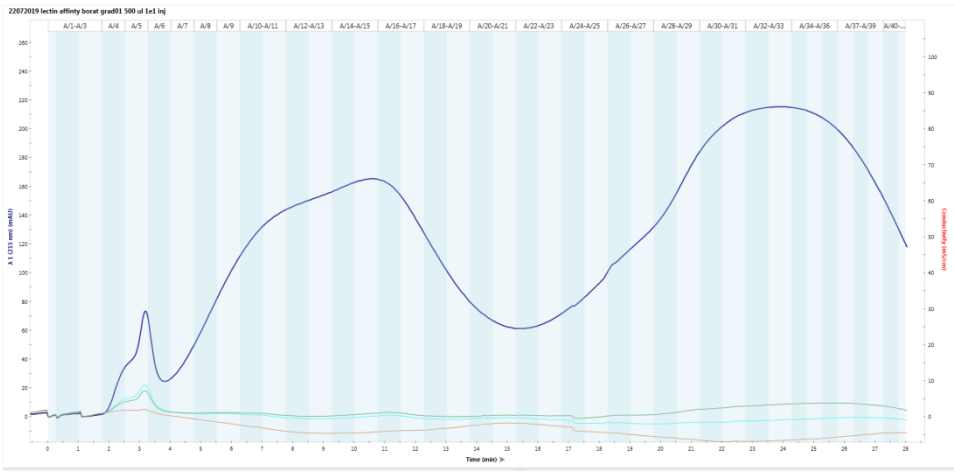
16,20 – 31,20 dak.; %0-60 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

31,20 – 39,20 dak.; %60-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

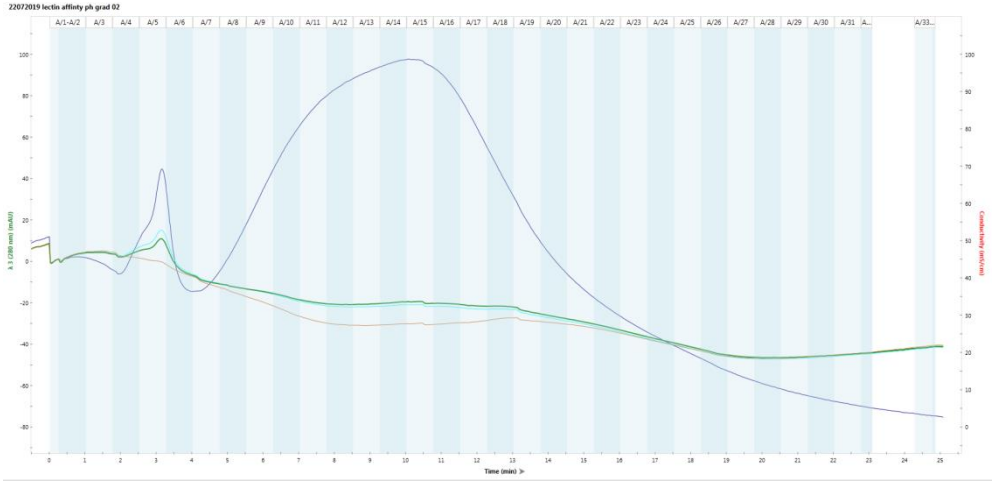
39,20 – 47,20 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

Örnek enjeksiyonu olarak, konsantre edilmiş bal numunesi her deneme için 500 µL hacminde enjekte edilmiştir. Analizler boyunca tüm kolondan elüe olan akış, fraksiyon toplayıcılarda 1 mL'lik hacimlerde toplanmış ve fraksiyonlardaki enzim varlığı aktivite testleri ile değerlendirilmiştir. Hazırlanan 4 farklı tampon çifti ile

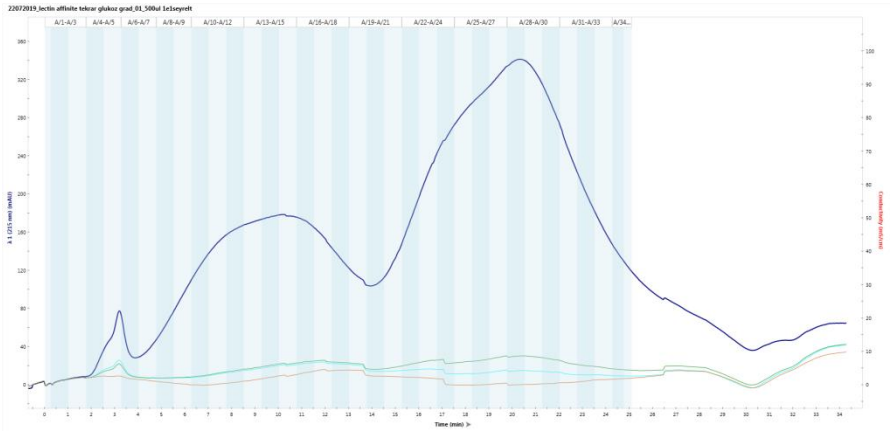
glikoprotein yapısındaki invertaz alıkonmaya çalışılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 3.14., Şekil 3.15., Şekil 3.16. ve Şekil 3.17.'de verilmiştir. Glukoz konsantrasyonu arttırmak (0,4 M'dan 1 M derişime çıkılmıştır) veya düşük pH değerine inmek ve bu uygulamalara alternatif olarak yüksek borat konsantrasyonuna çıkmak elüsyon alıkonan enzimlerin elüsyonunu sağlamamıştır. Beklenmedik şekilde invertaz ile birlikte diastazında reçinede alıkonduğu gözlemlenmiştir. MPLC analizi boyunca elde edilen fraksiyonlardan diastaz ve invertaz aktivitesi elde edilememiştir. Bu durum reçinenin hem diastazı hemde invertazı etkin şekilde alıkoymuş olduğunu fakat enzimlerin elüsyonunun test edilen tamponlar ile başarılı olmadığını ve enzimlerin reçinede kaldığını göstermektedir. Daha yüksek glukoz veya borat konsantrasyonlarının elüsyon tamponu olarak kullanılması veya alternatif monosakkaritlerin yüksek konsantrasyonlarındaki tamponların elüent olarak kullanılması veya çok daha düşük pH değerlerine inilen tampon sistemlerinin elüent olarak kullanılması gibi agresif solventlerin kullanılması gerekliliği ve bunun enzim denatürasyonuna ve aktivite kaybona sebep olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca elde edilecek elüent içerisindeki enzimlerin bir sonraki adım olarak düşünülen iyon değişim kromatografisi öncesinde bu solventlerin kullanılması durumunda desalt edilmesi gerekliliği saflaştırma süreçlerini olumsuz etkileyeceği için afinite kromatografisinin saflaştırma süreçlerine dahil edilmemesine karar verilmiştir.



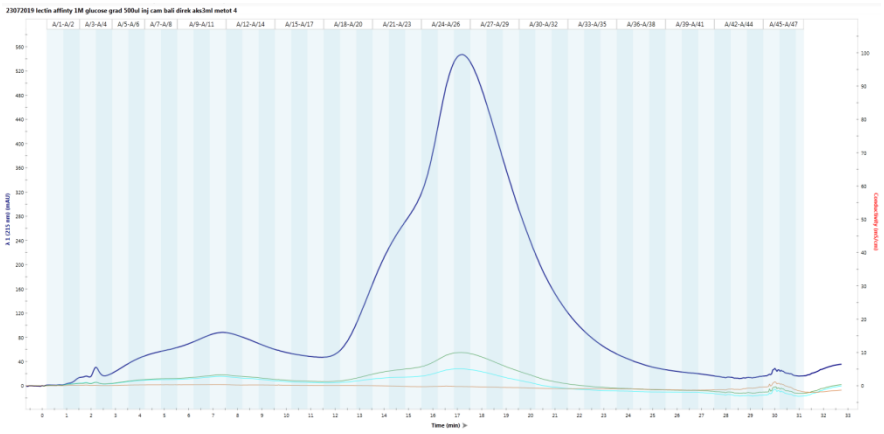
**Şekil 3.14.** Lektin afinite kromatografisi, borat gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram.



**Şekil 3.15.** Lektin afinite kromatografisi, pH gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram.



**Şekil 3.16.** Lektin afinite kromatografisi, 0,4 M glukoz gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram.



**Şekil 3.17.** Lektin afinite kromatografisi, 1 M glukoz gradyanı uygulaması sonrasında elde edilen kromatogram.

### 3.6.4. Seramik hidroksiapatit (CHT) kromatografi uygulaması

Hidroksiapatit, kemikte bulunan bir tür kalsiyum fosfat bileşiğidir. Kalsiyum fosfat, hem kalsiyum iyonlarından ($Ca^{+2}$) hem de ortofosfatlardan ($PO_4^{-3}$), metafosfatlardan veya pirofosfatlardan ($P_2O_7^{-4}$) ve bazen de hidrojen veya hidroksit iyonlarından oluşan bir mineraldir. Kalsiyum hidroksiapatit, kemik ve diş sert dokularının temel bir bileşeni olarak tıp bilimlerinin gelişiminde önemli bir role sahiptir. Hidroksiapatit uygulamaları protein kompleksinden belirli bir spesifik protein elde etmek için protein saflaştırmada bir filtre olarakta kullanılabilmektedir. CHT multimod kromatografi tekniğinde birden fazla etkileşim mekanizması protein saflaştırma için rol alabilmektedir. Reçine yapısında yer alan kalsiyum iyonları metal afinite gösteren proteinler için iyi bir ligand olabilirken, hidroksiapatit yapısında yer alan hidroksil grupları hidrojen bağı etkileşimi dolayısı ile proteinlerin alıkonmasını sağlayabilmektedir. Bunun dışında diğer temel etkileşim türü ise reçine yapısında bulunan negatif yüklü fosfat grupları sayesinde oluşan katyon bağlama afinitesidir. Kullanılan kolon özetle, katyon değişim kromatografisi, metal afinite kromatografisi ve hidrojen bağı etkileşimi dolayısı ile geniş yelpazede bir protein saflaştırma etkinliği sağlayabilmektedir. Bu noktada stabilitesi için kalsiyum mineraline ihtiyaç duyan ve bu metale bağlanma afinitesine sahip olan diastaz enziminin metal afinite etkileşimi ile CHT reçine tarafından alıkonması beklenir iken, invertaz enziminin tutunma olmadan kolondan elüe olması planlanmıştır. Bu sayede saflaştırmanın ilk adımında diastaz ve invertaz enzimleri bulk konsantrasyonlarda birbirinde ayrı şekilde fraksiyonlanabilmiştir. CHT multimod kromatografi reçinesi kullanarak enzim saflaştırma prosesi için Foresight™ CHT™ Tip I kolon (1 mL hacminde, Seramik Hidroksiapatit Tip I Multimod kromatografi kolonu, 40 μm partikül çapında, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) kolonu, MPLC sistemine adapte edilerek test edilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Kullanılan mobil faz içerikleri; Mobil faz A için; 5 mM Fosfat Tamponu pH 6.6 ve mobil faz B için; 400 mM Fosfat Tamponu pH 6.6 şeklindedir. Gradyan boyunca pH sabit tutulup, enzim ve proteinlerin artan fosfat iyonu konsantrasyonu doğrultusunda fosfat gradyanı uygulayarak elüsyonu hedeflenmiştir. Başlangıç analizi olan CHT kromatografisinde, B tampon mobil fazı içerisindeki yüksek fosfat tuzu konsantrasyonunun soğuk ortamda çökme riskini ortadan kaldırmak adına, MPLC sistemi oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır. Stirred cell ve onu takip eden

CFU prosesleri sonrasında elde edilen, insect saline tamponu içerisindeki (enjeksiyon yapılan çözelti ortamı) diastaz ve invertaz açısından konsantre enzim / protein çözeltisi 0,8 mL kadar CHT reçine bağlanmış MPLC sistemine enjekte edilerek invertaz ve diastaz alıkoyma becerileri ve saflaştırma süreçlerine olan katkıları incelenmiştir. Analiz süresi bu uygulama için 35 dakikadır. CHT işlemi sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar seçilerek yaklaşık her bir enzim için ayrı 1 mL'lik fraksiyonlar iyon değişim uygulamasına transfer edilmiştir. Gradyan profili bu uygulama için aşağıdaki gibidir;

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

5,00 – 6,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

6,00 – 11,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

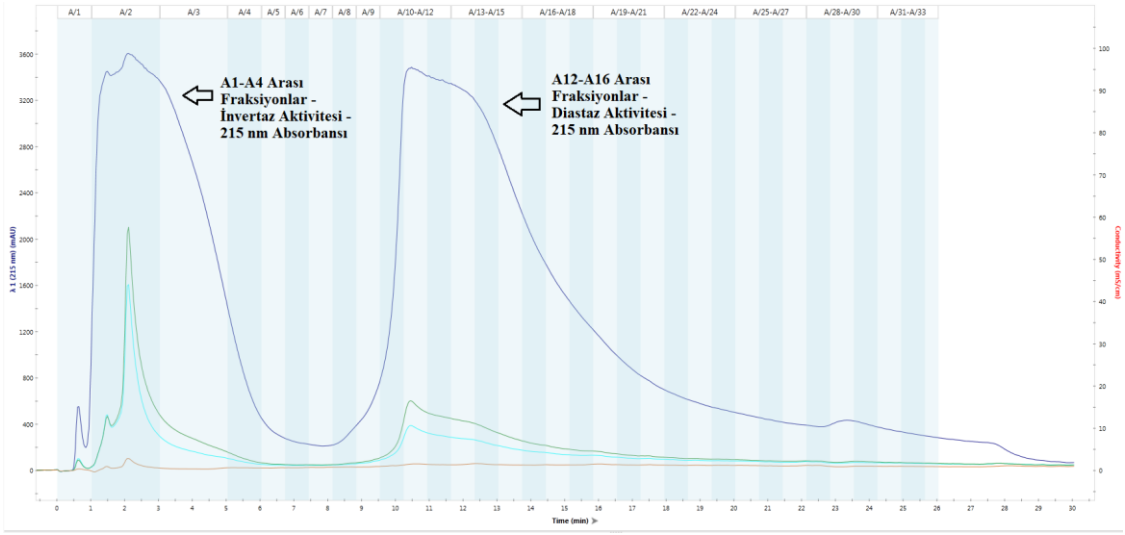
11,00 – 26,00 dak.; %0-70 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

26,00 – 31,00 dak.; %70-100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

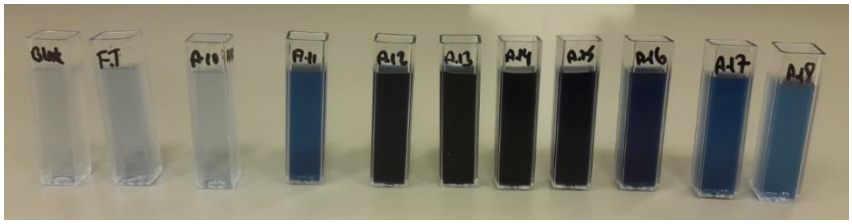
31,00 – 35,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).

Diastaz enziminin katyon ve anyon değişim kromatografilerinde tutunma sağlamamış olması hidrofobik yapısı ve net yükünün iyon değişim reçinelerinde alıkonma sağlayacak yeterlilikte olmaması dolayısı ile gözlemlenmiştir. Numune hazırlıkta enzim stabilitelerinin korunması adına tüm işlemler insect saline tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu tamponun pH değeri 7.4 olarak kullanılmıştır. Bu değer diastazın pI değeri ile çok benzer bir değerdedir ve bu durum diastazın iyonizasyonunu baskılayarak suda çözünürlüğünü azaltmakta ve hidrofobik etkileşimini indüklemektedir. Fakat diastazın stabiltesini sağlayabilmesi için metalloenzim yapısı dolayısı ile kalsiyum mineraline ihtiyaç duymaktadır. Saflaştırma reçinelerinin yapısında yer alabilecek bir bağlı kalsiyum ligandı, metal bağlanma afinitesi dolayısı ile diastazı alıkoyabilecektir. Bu düşünce ile kalsiyum hidroksiapatit materyali tedarik edilmiş ve α-amilaz tutunma ve saflaştırma etkinliği gözlemlenmiştir. İnvertaz enzimi

ise asidik karakterde ve anyonik net yüke sahip bir enzim türü olup, anyon değişim kromatografisinde alıkonma sağlayabilmiştir. Metal afinitesi olmayan ve katyon değişim kromatografisinde alıkonma sağlamadığı tespit edilen invertazın beklendiği üzere katyon dğeişim ve metal afinite primer alıkoyma mekanizmalarına sahip hidroksiapatit reçinesinde alıkonma sağlamamıştır. Bu sayede invertaz ve diastaz tek enjeksiyon ile birbirinden farklı noktalarda hidroksiapatiti reçinesinden elüe edilerek fraksiyonlanabilmiştir. CHT kromatografisinde yapılan tek enjeksiyon ile invertaz ve diastaz konsantre enzimleri birbirinden ayrıldıktan sonra ikinci saflaştırma adımı olarak iyon değişim kromatografisi her iki enzim fraksiyonununda sisteme ayrı ayrı enjekte edilmesi ile uygulanmıştır. Girişim yapan maddeler, iyon değişim kromatografisi ile hem invertaz hemde diastaz için ayrı ayrı elimine edildikten sonra, son adım olan SEC işlemine geçilmiştir. İyon değişim kromatografisinden elde edilen 2 ayrı fraksiyon (invertaz ve diastaz için birer adet) yine ayrı ayrı SEC kolonuna enjekte edilerek son adım saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş ve saf diastaz ve invertaz enzimleri elde edilebilmiştir. CHT kromatografisi sonunda elde edilen kromatogram Şekil 3.18.'de ve bu kromatogramdan toplanan fraksiyonlardaki diastaz aktivitesi testine ilişkin elde edilen spektrometre küvetlerindeki görsel Şekil 3.19.'da verilmiştir. Yanı kromatogramdan elde edilen fraksiyonlardaki invertaz aktivitesine ilişkin yapılan analiz sonucu spektrofotometre küvetlerindeki invertaz aktivite görselleri ise Şekil 3.20.'de verilmiştir.

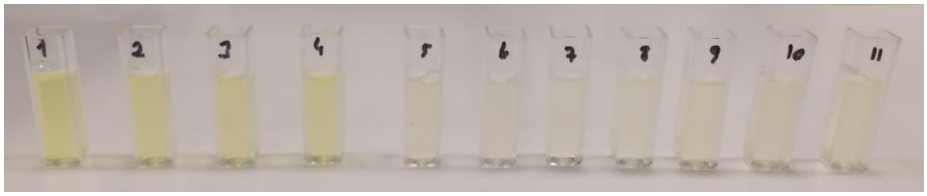



**Şekil 3.18.** CHT reçine ile diastaz ve invertazın fraksiyonlanmasına ilişkin kromatogram.




**Şekil 3.19.** CHT reçine ile elde edilen fraksiyonlardaki diastaz aktivitesi analizine ilişkin yapılan spektrofotometrik test için kullanılan örneklerdeki renk değişimi ve bununla orantılı diastaz enzim varlığı.

Koyu mavi-lacivert renkli örnekler yüksek diastaz aktivitesine sahip fraksiyonları temsil etmektedir.




**Şekil 3.20.** CHT reçine ile elde edilen fraksiyonlardaki invertaz aktivitesi analizine ilişkin yapılan spektrofotometrik test için kullanılan örneklerdeki renk değişimi ve bununla orantılı invertaz enzim varlığı.

1 ila 4 numaralı fraksiyonlara ait örneklerde invertaz aktivitesi gözlemlenmektedir.

### 3.6.5. Hidrofobik etkileşim kromatografi (HIC) uygulaması

Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) kullanarak enzim saflaştırma denemesi için 2 farklı sorbent, kolon formatında, MPLC sistemine adapte edilerek test edilmiştir. Bunlardan biri mix-mod kromatografi kolonu olup yapısında hem katyon değişim hemde HIC yöntemi geliştirmeye uygun olan bir ligand taşıyan Foresight™ Nuvia™ cPrime™ kolonudur (1 mL, hidrofobik katyon değişim kolonu, multi-mod kromatografi reçinesi, 40 µm partikül çapı, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.). Bunun yanı sıra HIC uygulaması için Bio-Scale™ Mini Bio-Gel® P-6 Desalting Kartuşu, (6 kDa MWCO, 5 mL, jel filtrasyon ve desalting kolonu, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) içerisindeki sorbent boşaltılarak yerine Macro-Prep t-Butil HIC Bulk reçinesi (Hidrofobik etkileşim kromatografi reçinesi, 50 µm partikül çapı, BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) doldurulmuş ve cPrime haricinde farklı bir HIC ligand yapısına sahip kolon elde edilmiştir. HIC uygulaması için en sık kullanılan kosmotropik ajan olan amonyum sülfat yüksek konsantrasyonda mobil faz A içeriğinde ve enjeksiyon çözeltisi

içeriği olarak kullanılarak salting-out etkisi ile indüklenen proteinlerin hidrofobik etkileşimleri ve bu etkileşimler üzerinden hidrofobik kolonlar ile bağlanma afinitesi hedeflenmiştir. Daha sonra azalan amonyum sülfat konsantrasyonu ile proteinlerin kolondan geri kazanımı ön görülmüş ve test edilmiştir. cPrime kolonda benzen halkasının sağladığı hidrofobisiteden faydalanılırken, tert-bütil reçinede ise 4 karbonlu bütil ligantın sağlayacağı orta hidrofobisitedeki bir etkileşimden faydalanılmaya çalışılmıştır. Diastazın, invertaza göre daha hidrofobik bir protein olması ve ön hazırlık sürecinde kullanılan tampon pH değerinin diastaz izo-elektrik noktası ile eş değerde olması ve bu sebep ile iyonik etkileşimlerden ziyade hidrofobik etkilşimlerin baskın olabileceği düşünülmüştür. Ek olarak daha önceki çalışmalarımızda, tuz ve pH gradyanlarının uygulandığı α-amilaz için iyon değişimi kolonlarında alıkonma sağlanamadığı gözlemlenmiştir. Bu durum α-amilaz enzimi için hidrofobik etkileşimin iyi bir alternatif oluşturabileceği yönünde bir değerlendirmeye sebep olmuştur. Elde edilecek diastaz alıkonması ile invertaz ile farklı hidrofobisitelere sahip olmaları dolayısı ile iyi bir rezolüsyon sağlanıp efektif bir fraksiyonlama sağlanabileceği ön görülmüştür. Dolayısı ile invertaz ve diastazın HIC etkileşim farkı dolayısı ile CHT ve glikoprotein lektin afinite kromatografi tekniklerine saflaştırma süreçlerinin başlangıcında iyi bir alternatif oluşturabileceği planlanmış ve test edilmiştir. Kullanılan mobil faz içerikleri mobil faz A için, 2 M amonyum sülfat + 30 mM Tris.HCl tamponu, pH 7.4, mobil faz B için ise 30 mM Tris.HCl tamponu, pH 7.4 şeklindedir. Enjeksiyon solventi olarak Tris.HCl pH 7.4 insect saline tamponu içerikli numune hazırlık sonrası elde edilen konsantre numune enjekte edilmiş fakat olumlu sonuç alınamamıştır. Bu sebeple HIC'te moleküllerin etkileşimini arttırmak için numune çözeltisi için A fazı ile yani yüksek tuz (amonyum sülfat) içerikli tampon ile numune 1:3 oranında seyreltilmiş ve bu karışımdan 1 mL enjeksiyona vererek denemeler yapılmıştır. İzoelektrik noktası (pI) değeri 7.4 olan *Apis mellifera* L. Diastaz enzimini nötral formda tutup hidrofobik etkileşimi arttırmak için hem numune çözetlisinin hemde mobil fazların pH değeri pH 7.4 olarak tercih edilmiştir. Akış hızı her iki kolon içinde 1 mL/dak. olarak set edilmiştir. İşlem sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar analiz edilmiş ve HIC ile ayrım yapabilme kabiliyeti incelenmiştir. cPrime da tutunma gösteren diastaz invertaza göre kolonu daha geç terketmektedir. Buda daha hidrofobik

yapılı olduğunu göstermektedir. Fakat glikoprotein yapısındaki hidrofilik karakterdeki invertazın da yakın bir alıkonma süresi ile kolonda tutunması, 3 farklı etkileşim mekanizması gösteren cPrime resinin, (HIC, CEX ve H bonding) invertazı alıkoyabildiği gerçeğini göstermektedir.

İyonik durumda olabilen fakat CEX'te daha önceki denemelerimizde alıkonma sağlamadığını bildiğimiz invertaz diastaza yakın bir alıkonma sağlıyor ise bu hidrofobik etkileşimden olabileceği gibi hidrojen bağı etkileşimi dolayısı ile de gerçekleşiyor olabilir. Bunu ispatlamak için cPrime da karar verilen final gradyan ve enjeksiyon şartları ile sadece HIC etkileşim sağlayacağını ön gördüğümüz tert-butil fazları kullanılarak, bir deneme gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda cPrime ile benzer bir rezolüsyon elde edildiğinden HIC etkileşim ile invertaz ve diastaz ayrımının etkin şekilde gerçekleştirilemeyeceği anlaşılmıştır. Yapılan denemeler sonunda istenilen düzeyde bir rezolüsyon diastaz ve invertaz için elde edilememiştir. Yöntemin bilinen en büyük dezavantajı, enzimler elüe olduğu ortamda yüksek miktarda amonyum sülfat içeriğinin olması ve ikinci adım olarak planlanan iyon değişim kromatografisinin uygulanmasında bu tuz içeriğinin alıkoymayı engelleme potansiyelidir. Bu durumu engellemek için desalting işlemi, ultrafiltrasyon membranları kullanarak, desalting kartuşları kullanarak veya diyaliz membranları kullanarak yapılmak durumundadır. Bu uygulamalar numuneyi seyreltebileceği gibi enzim gibi sıcaklığa karşı kırılgan yapıların stabilitesine de negatif yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca ek işlemler saflaştırma verimini düşürebileceği gibi zaman etkin yöntem geliştirmeninde önünde bir engel teşkil etmektedir. Tüm bu sebeplerden HIC uygulaması saflaştırma prosesinin birinci adımı olarak tercih edilmemiştir. Analiz süresi uygulamalar için 51 dakika olup, gradyan profili her iki kolon içinde aynı şekilde aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

0,00 - 5,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Şartlanma),

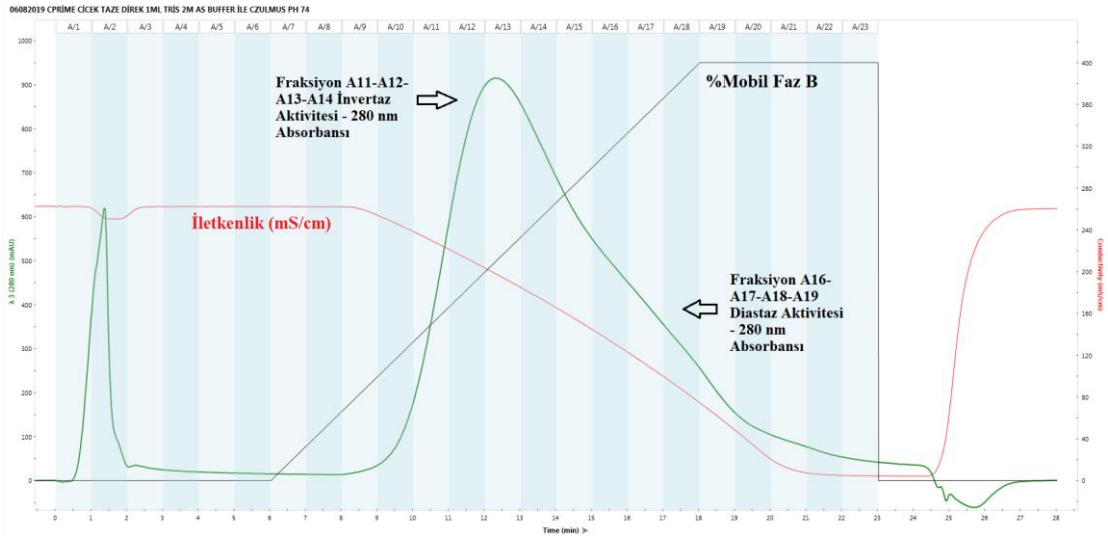
5,00 – 6,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Numune yükleme),

6,00 – 11,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Tutunma sağlamayan moleküllerin uzaklaştırılması),

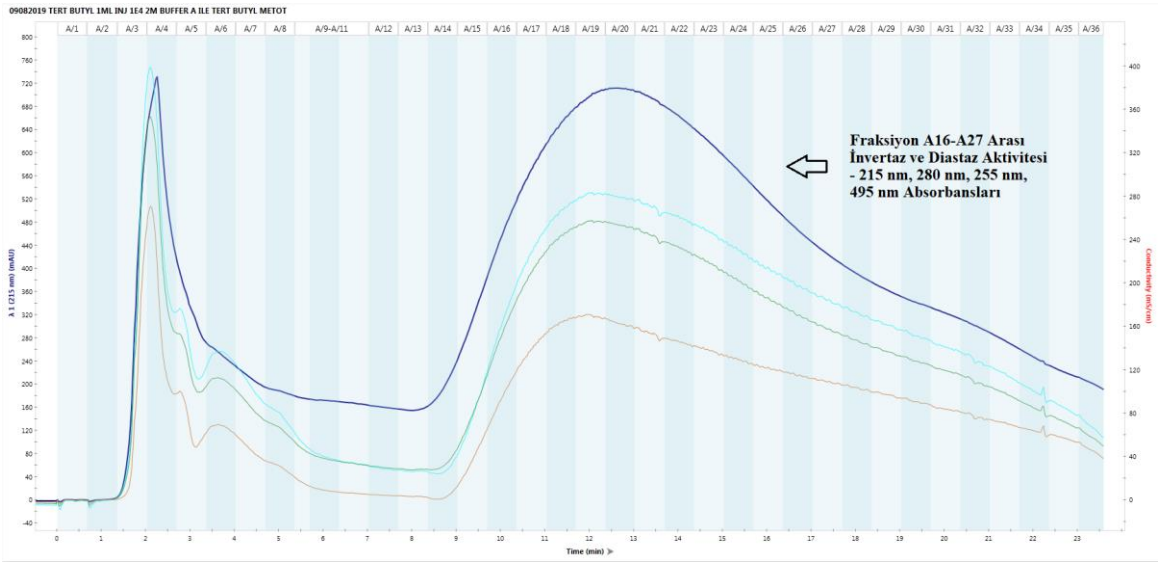
11,00 – 31,00 dak.; %0-100 B Fazı (Elüsyon 1. Basamak),

31,00 – 46,00 dak.; %100 B Fazı (Elüsyon 2. Basamak),

46,00 – 51,00 dak.; %100 A Fazı - %0 B Fazı (Rejenerasyon).




**Şekil 3.21.** Foresight™ Nuvia™ cPrime™ kolon ile diastaz ve invertazın fraksiyonlanmasına ilişkin kromatogram.




**Şekil 3.22.** Macro-Prep t-Butil HIC Bulk reçinesi ile diastaz ve invertazın fraksiyonlanmasına ilişkin kromatogram.

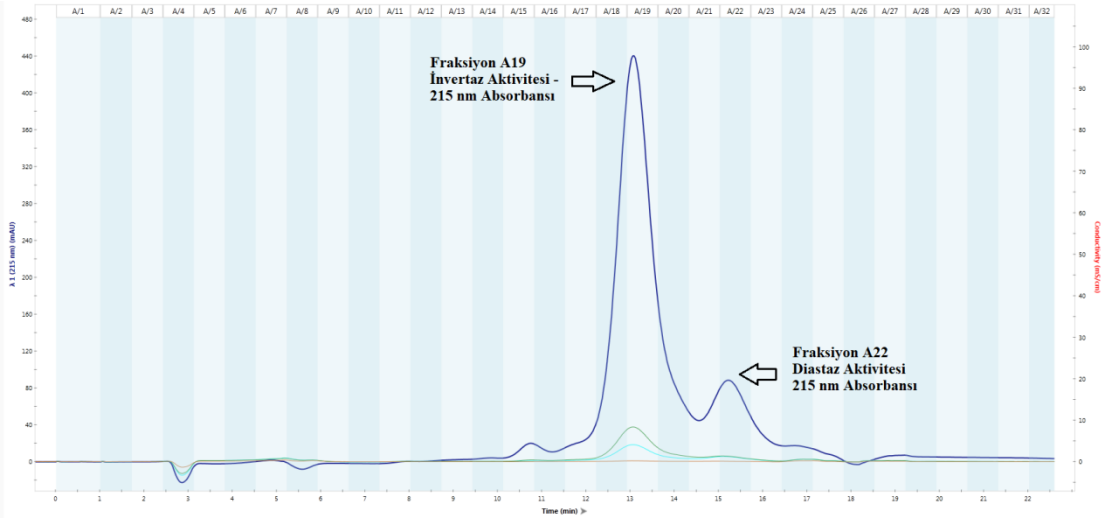
### 3.6.6. Jel filtrasyon kromatografi (SEC) uygulaması

Boyut eleme kromatografisi (SEC), iyon değişimi uygulaması sonrasında invertaz ve diastaz enzimlerinin saflaştırılmasında üçüncü ve son adım olarak tercih

edilmiştir. Bu amaçla preparatif ölçekteki, ENrich™ SEC 650 10 x 300 mm kolon (#7801650, Yüksek çözünürlüklü jel filtrasyon kolonu, 10 x 300 mm, 24 mL iç hacimde, 10 µm partikül çapında (BioRad, Hercules-CA, A.B.D.) kolonu MPLC sistemine adapte edilerek kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dak. olarak set edilmiştir. Kullanılan mobil faz içeriği izokratik kullanımda; 100 mM NaCl içeren pH 7.4 – 10 mM Tris.HCl şeklindedir. Jel filtrasyon kromatografisinde kolon ile analitler arasında herhangi bir moleküler etkileşim olmayıp ilgili analitin molekül büyüklüğüne bağlı olarak fiziksel bir ayrım bu kolonda söz konusudur. Genellikle bu yöntem saflaştırma prosesinin son basamağında hedeflenen proteinden küçük moleküllerin ve girişim yapabilecek diğer düşük konsantrasyondaki bu basamağa kadar benzer moleküler etkileşim sergilemiş fakat farklı molekül ağırlığına sahip proteinlerin eliminasyonunda değerlendirilmektedir. Uygulama kolonunun moleküler ağırlık dışlama limitleri 5 kDa – 650 kDa olarak belirlenmiştir. Kolonun 10 µm partikül çapına sahip düşük partikül çapı dolayısı ile daha yüksek rezolüsyon sağlaması hedeflenmiştir. Analiz süresi 60 dakikadır. Örnek enjeksiyonu olarak iyon değişim kromatografisi sonrasında elde edilen diastaz ve invertaz aktivitesine sahip fraksiyonlar birleştirildikten sonra her iki enzim içinde ayrı ayrı 250 µL kadar numune enjekte edilerek, kolonun saflaştırma süreçlerine olan katkısı incelenmiştir. Düşük enjeksiyon hacmi ve düşük mobil faz akışı jel filtrasyon kromatografisinde yüksek rezolüsyon sağlayabilmek için elzemdir. Bu bakımdan 250 µL enjeksiyon hacmi ve 1,0 mL/dak. akış hızı yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda iyi bir rezolüsyon elde edebilmek için metot parametresi olarak kararlaştırılmıştır.

SEC işlemi sonrasında elde edilen elüsyonlardan fraksiyon toplayıcı yardımı ile numuneler toplanmış ve enzim aktivite testleri sonrasında ilgili olan fraksiyonlar seçilerek HPLC-PDA, SDS-PAGE, enzim aktivite ve toplam protein analizlerine geçilmiştir. Bu saflaştırma son adımından sonra elde edilen enzimlerin saflığı SDS-PAGE ve HPLC-PDA yeni yöntemi ile kontrol edilip yöntemin geliştirilebilmesi için referans oluşturabilme kabiliyeti açısından analiz edilmiştir. Mobil faz içerisinde 100 mM konsantrasyonunda NaCl kullanılması proteinlerin salting-in etkisi dolayısı ile çözünürlüğünü arttırmış ve SEC reçinesinin porlarına difüzyonunu arttırmış ve bu sayede daha iyi bir ayrım elde edilmiştir. 250 µL enjeksiyon hacimi tercih edildiğinde ise daha yüksek miktarlara göre daha iyi pik ayrımı elde edilmiştir. Jel filtrasyon

kromatografi uygulaması aynı zamanda anyon değişim kromatografi elüsyonu olarak SEC reçineye enjekte ettiğimiz invertaz ve diastaz fraksiyonlarındaki tuz gradyanı dolayısı ile oluşan yüksek NaCl konsantrasyonunu da desalting özelliği sayesinde elimine etmiş olmaktadır. SEC analizi sonucunda elde edilmiş invertaz ve diastaz için kromatogram görüntüleri Şekil 3.23'de verilmiştir.




**Şekil 3.23.** SEC kolon ile diastaz ve invertaz enzimlerinin fraksiyonlanmasına ilişkin ortak kromatogram.

Anyon değişim kromatografisinden elde edilen diaztaz ve invertaz fraksiyonlarından 125'er µL alınarak 1'e 1 karışım hazırlanmış ve SEC kolona enjekte edilerek görsel elde edilmiştir.

## 3.7. Enzim Saflaştırma Final Prosesi

Performans testleri doğrultusunda valide edilen ön hazırlık ile elde edilen 3,5 mL hacmindeki konsantre numuneden 1,1 mL performans testleri için ayrılıp kalan 2,4 mL'lik kısım ise 3 eş parçaya (0,8 mL) bölünerek MPLC'de enzim saflaştırma işlemlerine başlanmıştır. Enzim saflaştırma yöntemi deneysel tasarımı başlığı altında detaylandırılmış olan ve Şekil 2.19. ile Şekil 2.20.'de özet iş akışı verilmiş olan saflaştırma prosesi ile doğal diastaz ve invertaz enzimleri ayrı ayrı referans enzimler olabilecek şekilde elde edilmiştir. Elde edilen saf ve doğal enzimlerin proses boyunca uygulanan saflaştırma performans testleri (toplam protein miktarı, total diastaz aktivitesi, total invertaz aktivitesi) ve bu test sonuçlarından elde edilen değerler doğrultusundaki yapılan hesaplamalar ile saflıkları kontrol edilerek saflaştırma prosesinin verimi denetlenmiş ve saflaştırma performans verimi her bir enzim için ayrı

ayrı hesaplanmıştır. Bu tasarım sonucunda elde edilen saflaştırılmış diastaz ve invertaz fraksiyonları ile çalışmanın devamında HPLC-PDA sistemi ile eş zamanlı doğal enzim aktivite ve yabancı diastaz tayin metodu geliştirilmiştir. Saflaştırma için kullanılacak kromatografik modların belirlenmesi için yapılan ön araştırma sonuçlarına göre, anyon değişim kromatografisi (AEX), seramik hidroksiapatit (CHT) multi-mod kromatografisi ve boyut eleme veya diğer adı ile jel filtrasyon (SEC) kromatografisinin proses içerisinde yer alması uygun görülmüş olup, glikoprotein afinite kromatografisi (Lektin afinite), hidrofobik etkileşim (HIC) kromatografisi, katyon değişim kromatografisi (CEX) elde edilen kötü rezolüsyon ve/veya enzim alıkonma etkinliği olmaması sebepleri ile bu çalışmada ki enzim saflaştırma analitik yöntemlerinde yer almamıştır. Saflaştırma prosesi için, Foresight CHT kolona 3 adet 0,8 mL enjeksiyon vererek prosedüre başlatılmıştır. İlk 0,8 mL'lik enjeksiyon CHT kromatografisi sonrası elde edilen invertaz ve diastaz fraksiyonları, bu adımın performans verilerini oluşturma için kullanılmıştır. İkinci 0,8 mL'lik enjeksiyon sonrası elde edilen 1'er mL'lik invertaz ve diastaz fraksiyonları ise AEX kromatografisi ile analiz edilmiş ve elde edilen fraksiyonlar AEX kromatografi basamağının performans verilerini oluşturmak için değerlendirilmiştir. 3. ve son 0,8 mL'lik kısım ise CHT kolonuna enjekte edildikten sonra elde edilen fraksiyon sırası ile önce AEX ve AEX kolondan alınan invertaz ve diastaz frakiyonlarından 0,250 mL'lik kısım ise 2 tekrar olacak şekilde SEC kolona enjekte edilmiştir. SEC adımı son saflaştrıma adımı olmak ile birlikte 2 tekrar enjeksiyon sonucu alınan diastaz ve invertaz için fraksiyonlardan biri SEC performans verilerinin ölçümü için kullanılırken diğer fraksiyon ise HPLC-PDA yönteminde referans enzim noktasını belirlemek için değerlendirilmiştir. Tandem saflaştırma yaklaşımında ilk olarak CHT mod tercih edilmiştir. Bu adımda reçinedeki kalsiyum metali varlığında kaynaklı, diastaz metal afinite etkileşimi üzerinden alıkonma sağlamış olup, multi-mod kromatografisinin diğer etkileşim türleri olan katyon değişim ve hidrojen bağı etkilşim varlıkları invertazı alıkoyabilmek için yeterli olmamış ve invertaz kolonda tutunmadan elüe olabilmiştir.

Bağıl konumdaki diastaz ise mobil faz B'nin gradyan akış ile sağlanan artan konsantrasyonlarında, ortamdaki artan fosfat konsantrasyonları dolayısı ile kolondan elüe edilmiştir. Reçinenin kalsiyum ligandları artan fosfat iyonları ile iyonik bağ etkileşimine girerek fosfat konsantrasyonuna göre daha düşük konsantrasyonda olan

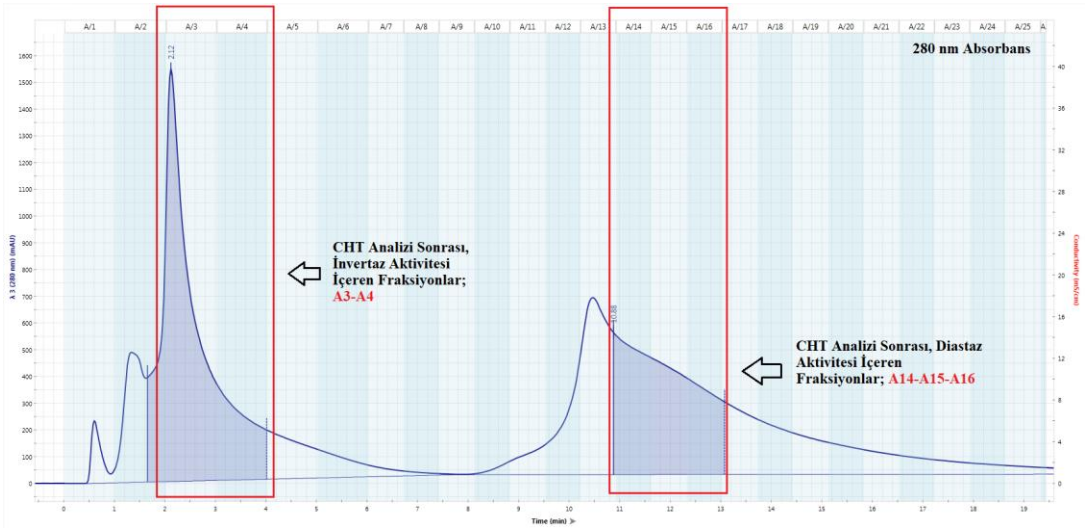
diastaz enzimi ile etkileşimini yitirmiş ve bu sayede kolondan saflaştırılmış şekilde elüe edilmiştir. Bu şekilde saflaştırmanın ilk adımında tek enjeksiyon ile konsantre ve karışım halindeki enzim çözeltisi, 2 bulk ve doğal enzim 2 ayrı fraksiyon halinde elde edilebilmiştir. CHT analizine ilişkin elde edilen kromatogram Şekil 3.24.'te verilmiştir. CHT kromatografisi protein saflaştırma süreçlerinde, ikinci veya 3. adım saflaştırma tekniği olarak kullanılabilmektedir. CHT'nin birden fazla moleküler etkileşimi içeren bir reçine olmasından kaynaklı, ilgilenin hedef protein haricindeki pek çok proteini alıkoyarak, temizleme amaçlı kullanılması yaygındır. Saflaştırmanın, genellikle afinite kromatografisi (immobilize metal (kobalt & nikel) afinite kromatografisi (IMAC) ile poli-histidin etiketli proteinlerin saflaştırılması, antikor saflaştırma (IgG, IgM, IgE, IgA) noktasında tercih edilen protein A & G kromatografisi, glutatyon S transferaz (GST) afinite kromatografisi, kalmodulin afinite kromatografisi, maltoz bağlayıcı protein afinite kromatografisi, streptavidin/avidin ligandlı reçineler ile biotin etiketli protein afinite kromatografisi, konkanavalin A lektin, lentil lektin ve boronat ligandları ile hazırlanan reçineler kullanılarak gerçekleştirilen glikoprotein afinite kromatografisi vb.) ile gerçekleştirilen birinci yakalama adımı sonrasında ve son adım olarak küçük moleküllerden elimine etme (polishing) amaçlı uygulanılan jel filtrasyon kromatografisi (SEC) adımı öncesinde, CHT kromatografisi ikincil saflaştırma adımı olarak sıklıkla kullanılabilmektedir. Bazı proseslerde CHT'nin SEC yerine 3. adım olarak kullanımı da söz konusu olabilmektedir. Biobenzer ilaç üretimde, rekombinant protein/antikor üretimi sonrası konak hücre proteinlerinin elimine edilmesi CHT kromatografisinin etkin şekilde kullanıldığı bir uygulama örneği olarak bahsedilen saflaştırma iş akışı üzerinden verilebilir.

Diastazın stabilitesinin sağlanması kalsiyum metalinin matriks içerisindeki varlığı ile doğru orantılıdır. Bu bakımdan diastazın kalsiyum bağlayıcı özelliğinden yola çıkarak, literatürde ilk kez diastaz enziminin saflaştırılmasında metal afinite kromatografisi CHT reçinesi üzerinden değerlendirilerek saflaştırma ilk adımı olarak kullanılmıştır. Tek adımda 2 ayrı hedefli enzim bu yöntem sayesinde fraksiyonlanabilmiştir. Çalışmamızın saflaştırma süreçlerinin ikinci adımında ise anyon değişim kromatografisi (AEX) CHT'den alıkonma olmadan (FT) elde edilen invertaz aktivitesine sahip fraksiyonun temizlenmesinde kullanılmış olup, benzer şekilde CHT'den alıkonma sağlanarak elde edilen diastaz fraksiyonun ise anyonik

interferanslarından temizlenmesi için kullanılmıştır. AEX uygulaması, asidik karakterdeki invertaz enziminin (pI 4,5 – 5,5), pH 7.4 değerindeki mobil fazlar içerisinde anyonik kalmasını ve bu sayede kuarterner amonyum ligandı taşıyan katyonik Enrich Q reçinesinde alıkonmasını sağlamıştır. Katyonik ve nötral küçük moleküller ile birlikte benzer özellikteki eser miktardaki proteinlerde bu adımda elimine edilerek invertaz enzimi saflaştırılmıştır. Diastaz enzimi ise pI (7,4) AEX'te kullanılan mobil fazların pH değerleri (7.4) dolayısı ile nötral durumda kalmaya yatkın olup, teorik olarak net yük taşımadığından anyon değişim reçinesinde alıkonma sağlamadan kolondan elüe olmuştur. Bu noktada diastaz enzimi de saflaştırmanın ikinci adımında (AEX) asidik karakterdeki küçük moleküllerden ve proteinlerde arındırılmış ve temizlenmiştir. AEX analizine ilişkin elde edilen kromatogram Şekil. 3.25 ve Şekil 3.26.'da verilmiştir. Diastaz enziminin CHT kromatografisinde alıkonup, yüksek fosfat içeriğine sahip artan mobil faz B konsantrasyonu ile kolondan elüe olması fraksiyon içerisinde diastaz enzimi ile birlikte yüksek fosfat iyonu yer almasına sebep olmaktadır. Bu durum iyonik şiddeti yüksek olan bu fraksiyonun anyonik reçinede diastaz enzimin alıkonmasına engel teşkil eden ikincil bir etken olarak değerlendirilebilir.

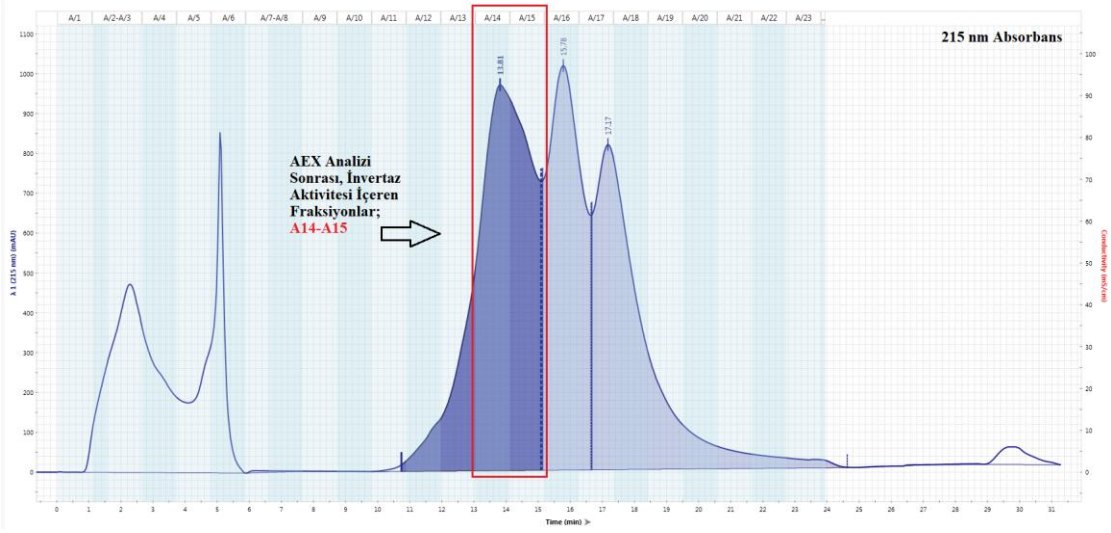
AEX uygulamasında artan NaCl konsantrasyonu ile uygulanmış olan tuz gradyanı sayesinde ortama verilmiş olan klorür iyonları reçineye bağlanarak yüksek konsantasyonlara ulaştığında proteinleri reçineden kopartarak elüe olmasını sağlamaktadır. CHT diastaz elüsyonun da yer alan yüksek fosfat konsantrasyonu, klorür benzeri bir etki ile diastazın potansiyel alıkonmasını sıfırlayarak kolondan tutunma olmadan elüsyon sağlanmasına sebep olabilmektedir. Saflaştırma iş akışında, CHT kromatografisi sonrasında uygulanan AEX ikinci adımından sonra elde edilen diastaz ve invertaz enzim fraksiyonları, üçüncü ve son adım olarak boyut eleme kromatografisi (SEC) ile girişim oluşturabilecek eser miktardaki proteinlerden ve çözelti içerisinde yer alabilecek küçük moleküllerden, boyut farklılıkları temeline göre arındırılmıştır. Boyut eleme kromatografisi tuz ve şeker gibi küçük moleküllerin elimine edilmesi, tampon değişimi ve farklı büyüklükteki proteinlerin kromatografik rezolüsyon sağlanarak fraksiyonlanması gibi amaçlar ile genellikle saflaştırma işlemlerinin son adımında değerlendirilmektedir. Bu teknik ile AEX sırasında yüksek NaCl konsantrasyonları ile elüe olan invertazın içerisinde bulunduğu yüksek iyonik şiddete sahip fraksiyonun tuz içeriği giderilmiştir. Aynı zamanda diastaz ve invertaz enzimi, SEC tekniğinin tampon

değişim etkinliği dolayısı ile eş tampon içeriğine sahip izolatlar olarak elde edilebilmiştir. Bunun yanı sıra, bu adıma kadar hedefli enzimler ile birlikte hareket eden protein varlıkları da bu teknik ile elimine edilebilmiş ve saf enzimler elde edilmiştir. Bu teknikte izokratik akışta insect saline tamponu pH 7.4 değerinde kullanılmış olup, analizlerin çıkış noktası olan ön hazırlıktaki bal örneklerinin homojenize edildiği çözelti ile aynı elektrolitik denge ve pH içeriği sağlanmış şekilde süreç sonlandırılabilmiştir. SEC analizine ilişkin elde edilen kromatogram Şekil. 3.27. ve Şekil 3.28.'de verilmiştir. Kromatografik enzim saflaştırma adımlarının tümünde denatüre edici hiçbir kimyasal ve uygulama kullanılmamış olup enzimler 3 boyutlu ve katlı yapılarını dolayısı ile aktivitelerini HPLC-PDA sistemine enjeksiyon verilene kadar korumuştur. Bu sayede ön hazırlık sürecinden saflaştırma sürecinin ara ve son basamaklarının tümünde enzimlerin stabilitesi kontrol edilebilmiş, proses performansı ölçümlenebilmiştir.



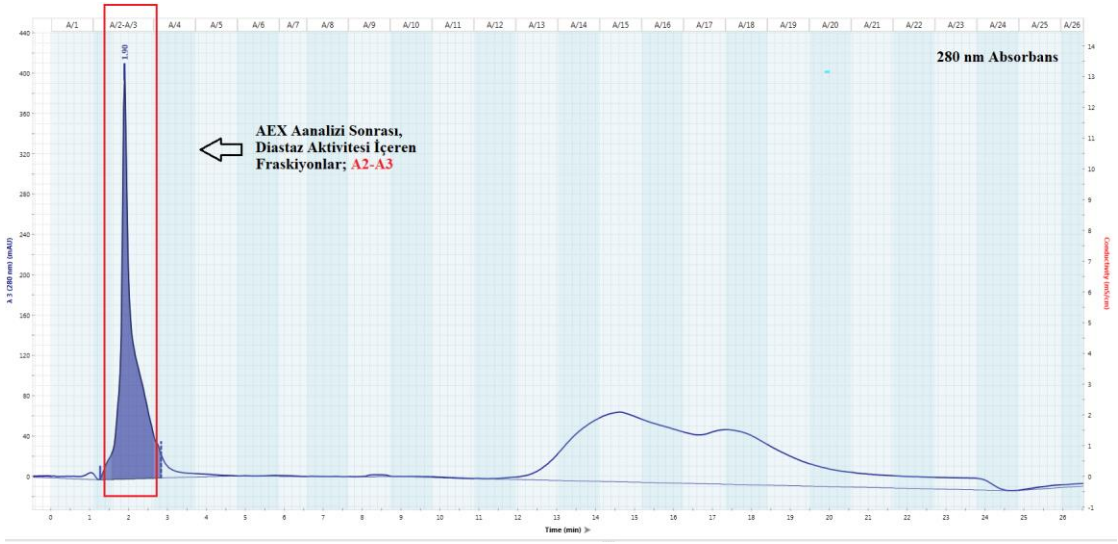

**Şekil 3.24.** Ön hazırlık sonrası elde edilen konsantre edilmiş enzim çözeltisinin Foresight CHT kolona 0,8 mL enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram görüntüsü.

A3 ve A4 kodlu fraksiyonlar invertaz aktivitesine sahip olup birleştirilerek Enrich Q-AEX kolona saflaştırma 2. adımı olarak enjekte edilmiştir. A14, A15 ve A16 kodlu fraksiyonlar diastaz aktivitesine sahip olup birleştirilerek daha sonra Enrich Q-AEX kolona saflaştırma 2. adımı olarak enjekte edilmiştir.



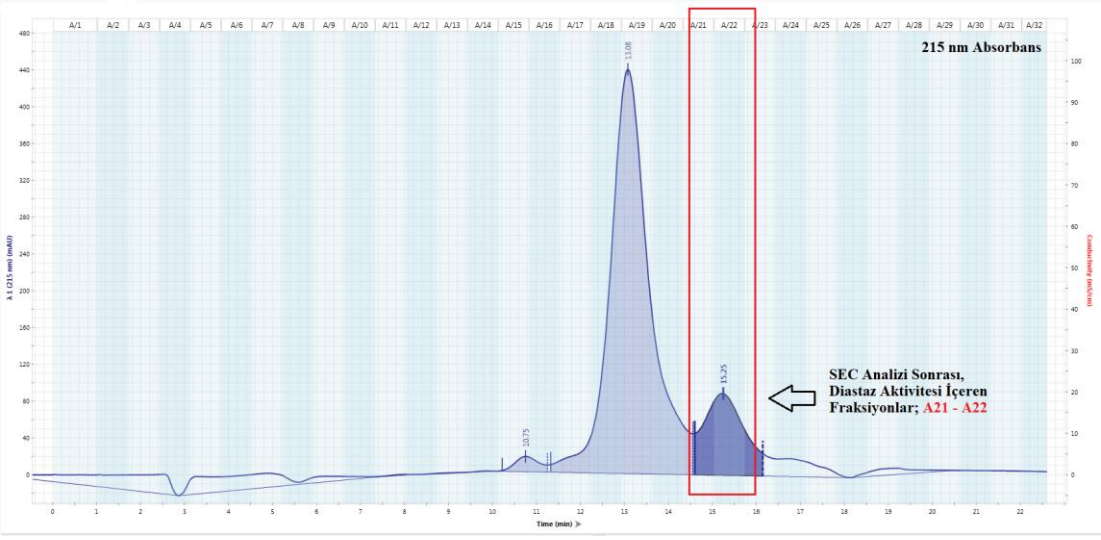

**Şekil 3.25.** CHT kromatografisi sonrasında elde edilen invertaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin Enrich Q-AEX kolona 1,0 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli.

Analiz sonunda A14 ve A15 kodlu fraksiyonlar invertaz aktivitesine sahip olup bu fraksiyonlar birleştirilerek SEC kolona saflaştırma 3. adımı olarak enjekte edilmiştir.



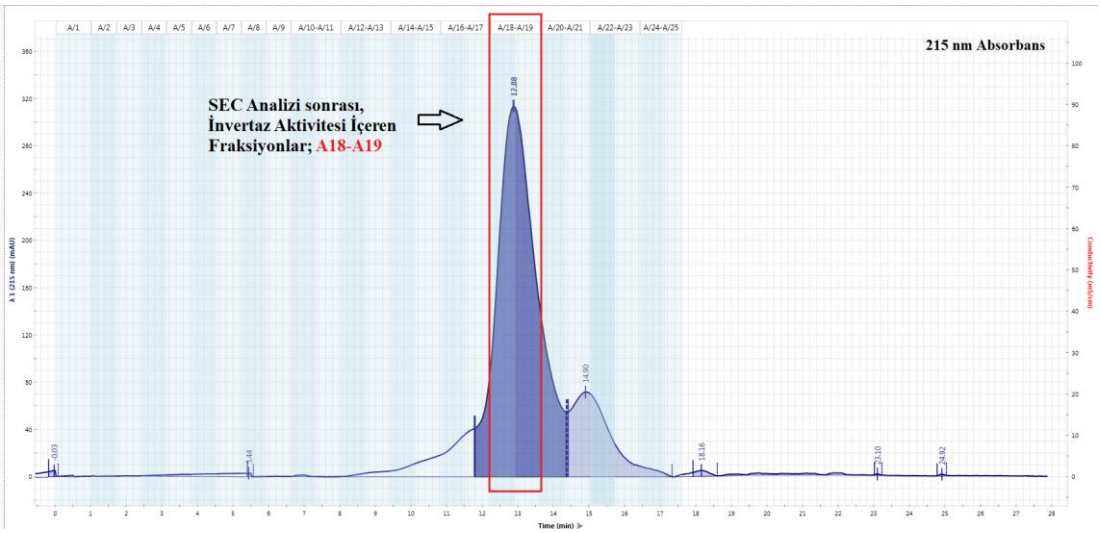

**Şekil 3.26.** CHT kromatografisi sonrasında elde edilen diastaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin Enrich Q-AEX kolona 1,0 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli.

Analiz sonunda A2 ve A3 kodlu fraksiyonlar diastaz aktivitesine sahip olup bu fraksiyonlar birleştirilerek SEC kolona saflaştırma 3. adımı olarak enjekte edilmiştir.




**Şekil 3.27.** AEX kromatografisi sonrasında elde edilen diastaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin SEC kolona 0,25 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli.

Analiz sonunda A21 ve A2 kodlu fraksiyonlar diastaz aktivitesine sahip olup bu fraksiyonlar birleştirilerek HPLC-PDA analizinde referans standartlar olarak değerlendirilmiştir.

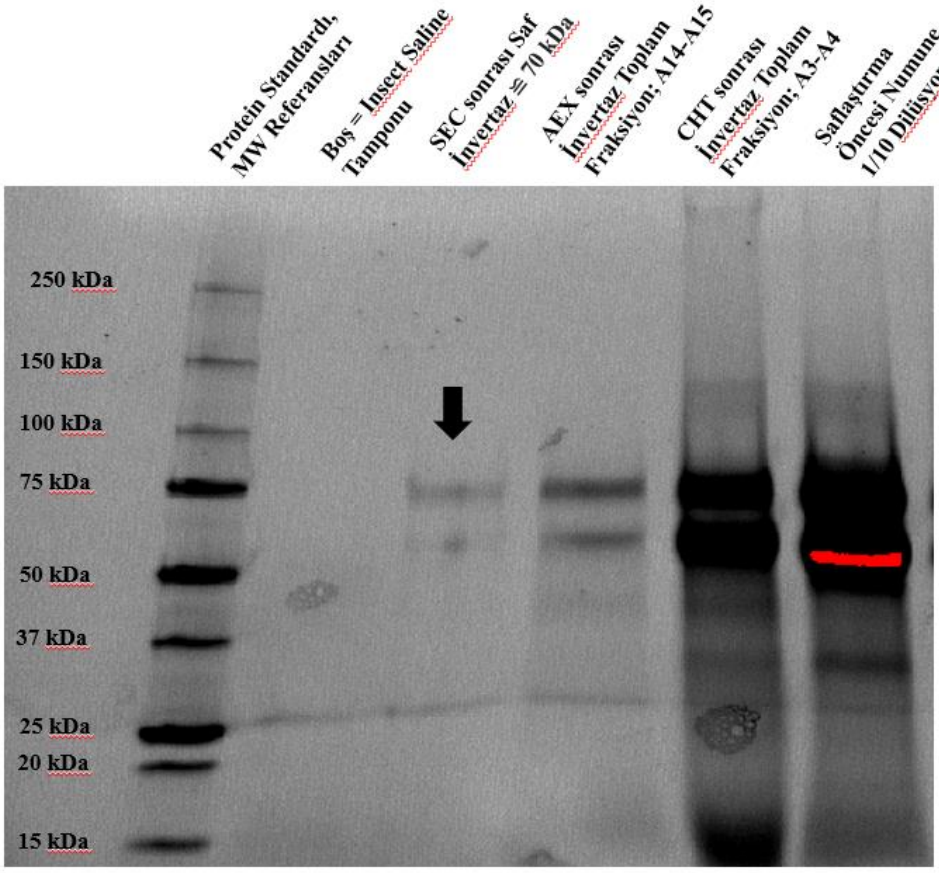



**Şekil 3.28.** AEX kromatografisi sonrasında elde edilen invertaz aktif fraksiyonların birleşiminden elde edilen numunenin SEC kolona 0,25 mL enjeksiyonunda elde edilen kromatogram görseli.

Analiz sonunda A18 ve A19 kodlu fraksiyonlar invertaz aktivitesine sahip olup bu fraksiyonlar birleştirilerek HPLC-PDA analizinde referans standartlar olarak değerlendirilmiştir.

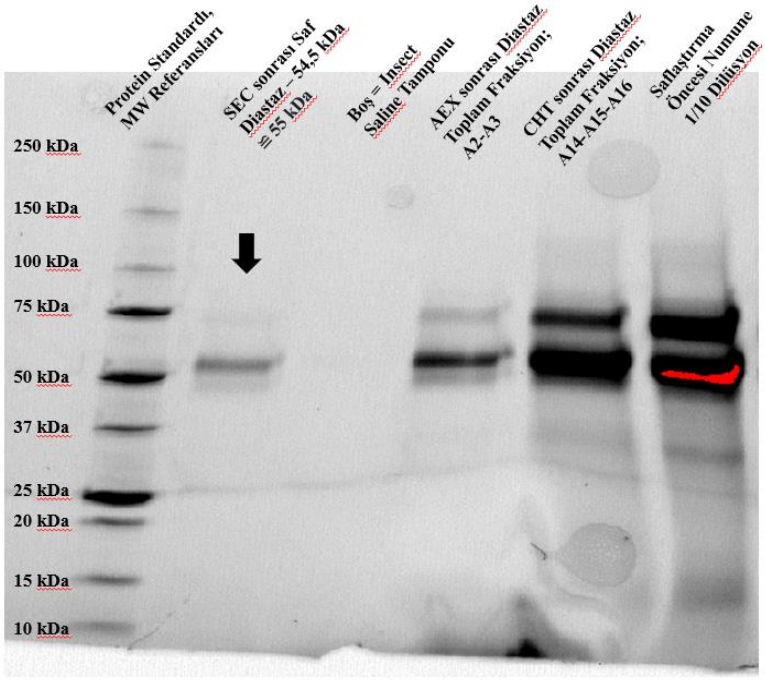
Gerçekleştirilen SDS-PAGE elektroforez analizlerinde ise elde edilen fraksiyonlardaki protein/enzim varlıklarını elektroforetik olarak görüntülemek,

saflaştırma verimini anlamak ve elde edilen enzimlerin molekül ağırlıklarını yaklaşık olarak tespit etmek hedeflenmiştir. CHT, AEX ve SEC analizlerinden elde edilen protein fraksiyonlarının yanı sıra MPLC ile gerçekleştirilen saflaştırma öncesindeki başlangıç numunesi de 1:10 oranında insect saline tamponu ile seyreltilerek diğer numuneler ile eş zamanlı analiz edilmiştir. Bu sayede saflaştırma verimi performans verileri doğrultusunda sadece rakamsal olarak değil molekül ağırlıklarının görüntülendiği protein elektroforezi ile de valide edilmiştir. Şekil 3.29. ve Şekil 3.30.'da ayrı ayrı diastaz ve invertazın saflaştırma performansı elektroforez protein bantları şeklinde paylaşılmış olup, Şekil 3.31. ve Şekil 3.32.'de ise her iki enziminde eş zamanlı saflaştırma süreci elektroforetik olarak görüntülenmiş ve bu analiz sonucunda elde edilmiş molekül ağırlık analiz çıktıları paylaşılmıştır. Analiz sonuçlarına göre literatürü destekler şekilde saflaştırılmış doğal bal diastaz enzimi yaklaşık olarak 54,5 kDa ağırlığında tespit edilirken aynı analizde saflaştırılmış doğal bal invertaz enzimi ise yaklaşık olarak 70 kDa molekül ağırlığında sonuç vermiştir.



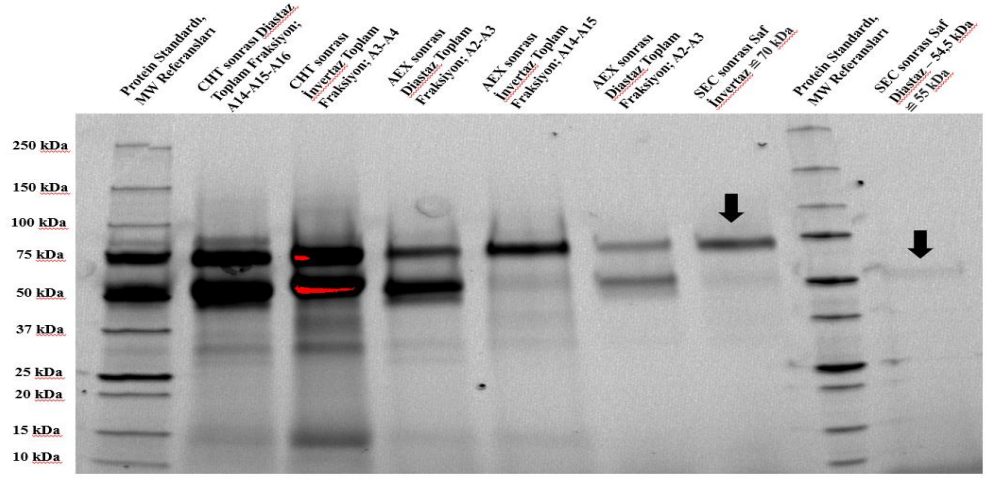

**Şekil 3.29.** İnvertaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez görseli.

Soldan sağa doğru sıralı şekilde Lane 1; Protein Standart karışımı, Lane 2; Kontrol amaçlı boş numune (SDS-PAGE numune tamponu + insect saline tamponu), Lane 3; SEC sonrası elde edilen final numune (Saflaştırılmış invertaz yaklaşık 70 kDa), Lane 4; AEX sonrası elde edilen invertaz aktivitesine sahip fraksiyonların toplamı, Lane 5; CHT sonrası elde edilen invertaz aktivitesine sahip fraksiyonların toplamı, Lane 6; MPLC ile saflaştırma işlemlerine tabi tutulan başlangıç numunesi, ön hazırlık sonrası elde edilen konsantre, doğal bal enzimleri karışımı.



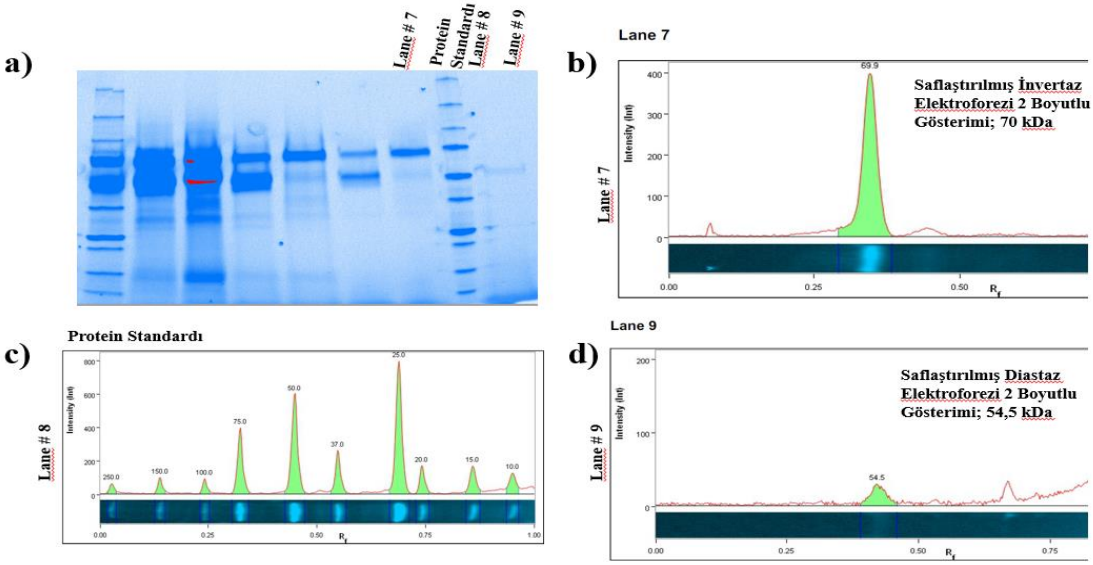

**Şekil 3.30.** Diastaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez görseli.

Soldan sağa doğru sıralı şekilde Lane 1; Protein Standart karışımı, Lane 2; SEC sonrası elde edilen final numune (Saflaştırılmış diastaz yaklaşık 55 kDa), Lane 3; Kontrol amaçlı boş numune (SDS-PAGE numune tamponu + insect saline tamponu), Lane 4; AEX sonrası elde edilen diastaz aktivitesine sahip fraksiyonların toplamı, Lane 5; CHT sonrası elde edilen diastaz aktivitesine sahip fraksiyonların toplamı, Lane 6; MPLC ile saflaştırma işlemlerine tabi tutulan başlangıç numunesi, ön hazırlık sonrası elde edilen konsantre, doğal bal enzimleri karışımı.




**Şekil 3.31.** Diastaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez görseli.

Soldan sağa doğru sıralı şekilde Lane 1; Protein Standart karışımı, Lane 2; SEC sonrası elde edilen final numune (Saflaştırılmış diastaz yaklaşık 55 kDa), Lane 3; Kontrol amaçlı boş numune (SDS-PAGE numune tamponu + insect saline tamponu), Lane 4; AEX sonrası elde edilen diastaz aktivitesine sahip fraksiyonların toplamı, Lane 5; CHT sonrası elde edilen diastaz aktivitesine sahip fraksiyonların toplamı, Lane 6; MPLC ile saflaştırma işlemlerine tabi tutulan başlangıç numunesi, ön hazırlık sonrası elde edilen konsantre, doğal bal enzimleri karışımı.




**Şekil 3.32.** Diastaz saflaştırma işlemleri sırasında elde edilen fraksiyonların protein elektroforez 2D görseli.

a) Fraksiyonların toplu jel elektroforez gösterimi, b) Lane #7 Saflaştırılmış doğal bal invertaz enzimi, c) Lane #8 Referans Protein Ladder: Bio-Rad Precision Plus Protein Mix-Unstained (2-D Gösterim), d) Saflaştırılmış doğal bal diastaz enzimi.

## 3.8. Saflaştırma Performans Çalışması

Performans verilerinin değerlendirilmesi noktasında, saflaştırma adımlarının öncesinde ve sonrasında elde edilen fraksiyonların total diastaz aktivitesi, total invertaz aktivitesi ve total protein içeriği ölçümlenmiştir. Bu ölçümler ile elde edilen değerler üzerinde yüzde geri kazanım, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı hesaplanmış ve saflaştırma performs tablosu oluşturulmuştur. Spesifik aktivite değeri, ilgili fraksiyonun toplam diastaz veya invertaz aktivite değerinin çözeltideki toplam protein değerine bölümü ile elde edilmiş olup U/mg protein cinsinden invertaz için Schade U/mg protein cinsinden ise diastaz için sonuç verilmiştir (Eşitlik 3.1.).

Enzim spesifik aktivitesi = Total Enzim Aktivitesi / Toplam protein Miktarı (3.1.)

Saflaştırma katsayısı ise her iki enzim içinde ayrı ayrı olacak şekilde, ilgili adımdaki spesifik aktivitenin, ilk olarak elde edilen saflaştırma öncesi hesaplatılmış spesifik aktivite değerine bölünmesi ile hesaplatılmıştır (Eşitlik 3.2.).

Saflaştırma Katsayısı = Saflaştırma Sonrası Fraksiyondaki Spesifik Enzim Aktivitesi / Referans Numune Spesifik Enzim Aktivitesi. (3.2.)

Saflaştırma adımlarının sayısı ve süresi arttıkça sıcaklık etkisi, saflaştırma adımlarında kullanılan resinlerin protein bağlama kapasitelerindeki (dynamic binding capacity) kısıtlar ve/veya kullanılan mobil fazların denatüre edici etkileri ilgilenilen proteinde degredasyon, agregasyon ve/veya denatürasyon gibi aktivite kayıplarına sebep olabilmektedir. Bu bakımdan saflaştırma işlemlerinde geri kazanım kaybı gözlemlenmesi olası bir durumdur. Geri kazanım değerlerinin geliştirdiğimiz prosedür boyunca nasıl değiştiğini analiz edebilmek için enzim saflaştırma çalışması öncesi optimize edilmiş ön hazırlıktan elde edilen konsantre enzimlerin bulunduğu çözeltideki toplam diastaz ve toplam invertaz aktivite değerleri ve buna karşılık gelen geri kazanım değerleri %100 geri kazanım olarak değerlendirilip, bu numune başlangıç ve referans noktası olarak kabul edilmiştir. Sonrasında, saflaştırma adımlarının ayrı ayrı ve nihai şartlarda ne kadar kayıp oluşturduğunu yorumlayabilmek için tüm saflaştırma sürecinin geri kazanım hesaplatması ilgili adımdaki toplan enzim aktivitesinin (diastaz veya

invertaz) 100 ile çarpımının, referans numunedeki total enzim aktivitesi değerine (diastaz veya invertaz) bölünmesi ile elde edilmiştir (Eşitlik 3.3.).

% Geri Kazanım = Saflaştırma Sonrası Fraksiyondaki Total Enzim Aktivitesi * 100 / Referans Numune Total Enzim Aktivitesi. (3.3.)

### 3.8.1. Diastaz saflaştırma performans verileri

Gerçekleştirilmiş çalışma sonunda elde edilen veriler ile hazırlanan saflaştırma performans tablosu diastaz enzimi için Tablo 3.6.'da verilmektedir.

**Tablo 3.6.** Diastaz saflaştırma çalışması performans tablosu.

| Numune Açıklamaları | Toplam Fraksiyon Hacmi (mL) | Toplam Protein (mg/mL) | Çözelti İçerisindeki Toplam Protein (mg) | Total Diastaz Aktivitesi (Absorbans) | Diastaz Total Aktivite (Schade Unit/g Bal=DN) | % Diastaz Geri Kazanım | Saflaştırma Katsayısı | Spesifik Aktivite (Schade U/mg protein) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Saflaştırma öncesi numune** | 3,50 | 1,25 | 4,38 | 4,08 | 693,30 | 100 | 1 | 158,47 |
| **CHT Toplam Fraksiyon (Diastaz) A14-15-16** | 3,00 | 0,09 | 0,26 | 1,45 | 246,15 | 35,50 | 6,06 | 960,43 |
| **AEX Toplam Fraksiyon (Diastaz) A2-A3** | 2,00 | 0,06 | 0,13 | 1,08 | 183,50 | 26,47 | 9,14 | 1448,09 |
| **SEC Toplam Fraksiyon (Diastaz) A21-22** | 1,00 | 0,01 | 0,01 | 0,41 | 69,98 | **10,09** | **39,18** | **6209,05** |

Saflaştırma prosesi sonunda diastaz ilk numuneye oranla 39,18 kat daha saf şekilde elde edilmiştir. Bu değer literatürdeki bazı veriler ile karşılaştırıldığında yüksek bir saflaştırma verimini işaret etmektedir [64, 231]. yaptıkları çalışmada elde ettikleri saf diastaz için 531.3 saflaştırma katsayısı, %3,9 geri kazanım ve 4,41 U/protein absorbansı (280 nm) değerlerini hesaplamıştır. Bir başka diastaz saflaştırma çalışmasında ise Ohashi ve arkadaşları bu enzim için %27 geri kazanım, 480 U/mg protein spesifik aktivite ve 42 saflaştırma katsayısı elde etmişlerdir [43]. Nagai ve arkadaşları ise yılındaki çalışmalarında, hurma balından diastazı saflaştırmış ve bu çalışma sonunda 5,4 saflaştırma katsayısını, %46,8 geri kazanım ve 78.3 IU/L.mg spesifik aktivite değerlerini elde etmiştir [59].

Aynı grup, salgı balından diastazı 3,4 saflaştırma katsayısı, %41,2 geri kazanım ve 20,3 IU/L.mg spesifik aktivite değerleri ile saflaştırmıştır [61]. Nagai ve arkadaşları ek olarak narenciye balında da benzer protokolü uygulayarak %49 geri kazanım, 6,5 saflaştırma katsayısı ve 67,9 IU/L.mg spesifik aktivite değerleri elde etmiştir [58]. Saflaştırma performansı açısından değerlendirilmesi gereken bir diğer önemli unsur ise spesifik aktivite değeridir. Çalışma sonunda diastaz enzimi için 6209,05 Schade U/mg protein spesifik aktivite ölçümlenmiştir. Bu değer saflaştırma katsayısı ile birlikte değerlendirildiğinde yüksek saflıkta diastaz elde edildiğini göstermektedir. Diastaz için saflaştırma uygulamasının sonunda %10,09 geri kazanım değeri elde edilmiştir. Bu rakam her ne kadar düşük görünse de elde edilen enzim miktarı ileriki adımlar için yeterli saflık ve konsantrasyonda olduğundan ileri bir optimizasyon prosedür için düşünülmemiştir. Çalışmada elde edilen fraksiyonların yanlızca bir kısmı, bir sonraki adımda kullanılan resinlerin yükleme kapasitesi düşünülerek kolona yüklenmiştir. Buda diastaz enziminin sadece bir kısmının saflaştırma sürecine devam etmesi anlamına gelmektedir. Bu durum her saflaştırma adımında bir miktar diastaz kaybının doğal olacağını ve geri kazanımın düşüceğini göstermektedir.

Çalışmadaki enzim kayıplarının numunenin her adımda bölünmesi kaynaklı olduğu ve denatürasyon, agregasyon veya degredasyon kaynaklı olmadığı söylenebilir. Laboratuvar ölçekli bir araştırma çalışması olduğundan bu kısımlardaki kayıp göz ardı edilerek elde edilen diastaz miktarından ziyade enzimin saflığı üzerine odaklanılmıştır. Tandem şekilde gerçekleştirilen saflaştırma basamaklarında konsantre etme işlemi uygulanmamıştır. Bu bakımdan işlemler sırasında kaybedilen diastaz enzimi deriştirilerek geri kazanım daha yüksek değerlere taşınamamıştır. Verilmiş olan prosedür uygulanırken konsantre etme teknikleri uygulanarak ve önerilmiş fonksiyonel gruplara sahip resinlerin yüksek yükleme kapasitesine sahip versiyonları tercih edilerek ölçek büyütme yapılabilir ve bu sayede endüstriyel amaçlı kullanılabilecek yüksek saflıkta ve gramajda doğal diastaz enzimi elde edilebilir.

### 3.8.2. İnvertaz saflaştırma performans verileri

Gerçekleştirilmiş çalışma sonunda elde edilen veriler ile hazırlanan saflaştırma performans tablosu invertaz enzimi için Tablo 3.7.'de verilmektedir.

**Tablo 3.7.** İnvertaz saflaştırma çalışması performans tablosu.

| Numune Açıklamaları | Toplam Fraksiyon Hacmi (mL) | Toplam Protein (mg/mL) | Çözelti İçerisindeki Toplam Protein (mg) | Total İnvertaz Aktivitesi (Absrobans) | İnvertaz Total Aktivite (U/Kg Bal) | % İnvertaz Geri Kazanım | Saflaştırma Katsayısı | Spesifik Aktivite (U/mg protein) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Saflaştırma öncesi numune** | 3,50 | 1,25 | 4,38 | 4,02 | 1055,00 | 100,00 | 1,00 | 241,14 |
| **CHT Toplam Fraksiyon (İnvertaz) A3-A4** | 2,00 | 0,23 | 0,46 | 1,765 | 462,94 | 43,88 | 4,21 | 1015,07 |
| **AEX Toplam Fraksiyon (İnvertaz) A14-A15** | 2,00 | 0,08 | 0,16 | 1,1087 | 290,80 | 27,56 | 7,61 | 1836,23 |
| **SEC Toplam Fraksiyon (İnvertaz) A18-19** | 1,00 | 0,02 | 0,02 | 0,3891 | 102,06 | **9,67** | **19,86** | **4788,20** |

Saflaştırma prosesi sonunda invertaz ilk numuneye oranla 19,86 kat daha saf şekilde elde edilebilmiştir. 4788,20 U/mg protein spesifik aktivite ve %9,67 geri kazanım değerleri saflaştırma işlemleri sonunda hesaplanmıştır. Elde edilen değerler literatürdeki sınırlı sayıdaki çalışma ile karşılaştırıldığında yüksek saflıkta doğal invertaz ilk kez çam balından izole edilebildiği söylenebilmektedir. Nishimoto ve arkadaşları yaptıkları çalışmada elde ettikleri saf α-glukosidaz III için saflaştırma katsayısı rapor etmemiş olup, %41 geri kazanım ve 11,3 U/mg protein spesifik aktivite değerlerini hesaplamıştır [57]. Bu çalışmada, yazarlar α-glukosidaz III izo-enziminin balda bulunan glukosidaz isoformu olduğunu ve bal invertazı olarak adlandırılabileceğini vurgulamışlardır. Çalışmamızda elde edilen 4788,20 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip invertaz belirtilen referans çalışmaya göre yaklaşık 424 kat daha saf şekilde elde edilmiştir.

Kubota ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada ise α-glukosidaz I, II, ve III izo-enzimleri *Apis mellifera* L. bal arısının organlarından izole edilerek saflaştırılmış ve karakterize edilmiş vede bal invertazının orijini belirlenmeye çalışılmıştır [67]. α-glukosidaz III benzer şekilde bal invertazı olarak belirlenmiş ve baldan yapılan 4 adımlı saflaştırma çalışmasında %16 geri kazanım, 9,3 U/mg protein spesifik aktivite elde edilmiştir. Bu çalışmada da saflaştırma katsayısı hesaplanmamıştır. Bu çalışmaya oranla bakıldığında ise bal doğal invertazı çalışmamızda, spesifik aktivite üzerinden 514,8 kat daha saf şekilde elde edilmiştir. Baldan doğal invertazın izolasyonunu hedefleyen farklı bir çalışmaya rastlanmazken, invertazın saflaştırılmasını hedefleyen fakat bu prosesi, araştırma materyali olarak *Apis mellifera* L. bal arısından diseksiyon sonrası elde edilen fraksiyonlarında uygulayan bir diğer çalışma alternatif olarak incelenmiştir [70]. Çalışmada, α-glukosidaz 1 ve 2 olarak isimlendirilen 2 izoform tanımlanmıştır. α-glukosidaz-1 enzimi için ventrikül fraksiyonundan yapılan saflaştırma sonunda 40,9 U/mg protein spesifik aktivite hesaplanırken α-glukosidaz-1 enzimi için bu değer 89,6 U/mg protein olarak rapor edilmiştir. Saflaştırma katsayıları ise α-glukosidaz-1 ve α-glukosidaz-2 için sırası ile 6,2 ve 13,6 olarak belirtilmiştir. Bu çalışma için geri kazanım değerleri bildirilmemiştir. Aynı araştırmada bal kesesinden de aynı enzimlerden sadece α-glukosidaz-2 saflaştırılmıştır. α-Glukosidaz-2 için saflaştırma katsayısı 446 olarak bildirilerken, spesifik aktvite 76,4 U/mg protein olarak hesaplanmıştır ve geri kazanım yüzdesi bildirilmemiştir. Çalışmamızda invertaz için elde edilen geri kazanım değerindeki görece düşüklük ise, diastaz saflaştırmadaki etkenlerin eş zamanlı, ortak saflaştırma prosedürü uygulanması dolayısı ile, invertaz içinde geçerli olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat laboratuvar ölçekli saf invertaz elde etme hedefi dolayısı ile elde edilmiş olan saflık katsayısı ve spesifik aktivite elde edilen invertaz miktarına oranla çok daha büyük önem arz etmektedir. Bu bakımdan invertaz saflaştırma prosedürünün optimizasyonuna gerek duyulmamış olup, endüstriyel ölçekli doğal invertaz eldesi için diastaz bölümünde verilen öneriler burada da geçerlidir denebilmektedir.

## 3.9. HPG Ekstraksiyon ve Elektroforez Analizleri

İzole edilmiş HPG örneklerinden tanımlama yapabilecek konsantrasyonda enzimleri elde edebilmek için, ekstraksiyon teknikleri, ekstraksiyon çözeltisi içerikleri ve ekstrakte edilecek HPG adeti optimize edilmiştir. Öncelikle, çam balı üretimi yapılan Muğla bölgesinden 2019 yılı Eylül ve Ekim aylarında toplanan işçi bal arıları binoküler mikroskop altında disekte edilmiştir. Diseksiyon sonunda elde edilen HPG'ler homojenizasyon ve enzim ekstraksiyonuna kadar enzimlerin stabilitelerini sağlamak için fizyolojik pH ve elektrolit konsantrasyon sağlaması bakımından insect saline tamponu (10 mM Tris / HCl, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl ve 1 mM $CaCl_2$) içerisinde -60°C'de muhafaza edilmiştir [43]. Çalışma için 320 adet *Apis mellifera* L. disekte edilerek 320 adet HPG örneği toplanmıştır.

Bu örneklerin bir kısmı homojenizasyon ve ekstraksiyon verimini değerlendirmek için bir kısmı ise karar verilen prosedürün uygulanması için ayrılmıştır. HPG ekstraksiyonu ve HPG örneklerinden protein/enzim izolasyonu çalışmalarında literatürde farklı sayıda HPG örneği kullanıldığı görülmüştür [43]. Glukoz oksidaz ve diastaz ekspresyon seviyelerinin işçi bal arılarının yaşı ile nasıl değiştiğini öğrenmek için yaptığı araştırmada 500 adet arıdan HPG dokusu ekstrakte etmiştir. Al-Sherif ve arkadaşları yılında yaptıkları çalışmada 70 adet HPG disekte ederek, *Apis mellifera* L.'nin 2 alt türündeki HPG örneklerinin bal olgunlaştırıcı enzim aktivitelerini araştırmıştır [163]. Bir diğer grup 50 adet HPG dokusunu insect saline tamponu içerisinde ekstrakte ederek protein ekspresyonlarını incelemiştir [66]. 2002 yılında Pontoh ve Low**,** β-glukosidaz saflaştırması için 25 adet HPG örneği kullanmıştır [70]. Görüldüğü üzere çok değişken sayıda doku numunesi çalışılmış olup, bu veriler doğrultusunda diastaz ve invertazın HPG'den ekstraksiyonu için 80 adet doku numunesinin literatür ortalamasının üzerinde ve yeterli miktarda enzim tedarik edebilecek sayı olduğu öngörülmüştür. Bu sayı teorik olarak belirledikten sonra deneysel çalışmalar ile yeterli enzim aktivitesinin elde edildiği doğrulanmıştır.

### 3.9.1. Doku (HPG) örneklerinin ön hazırlık optimizasyonları

80 adet HPG disekte edilerek izole edilmiş ve 20'şer adet olacak şekilde 4 ayrı adet eppendorf tüp içerisine 250 ul insect saline tamponu dahil edilerek parsellenmiştir.

Deney için 80 adet HPG kullanılmış olup, ekstraksiyon ve homojenizasyon verimi araştırma çalışmalarında kullanmak üzere 240 adet HPG numunesi farklı solventler ve hacimler dahil edilerek metot optimizasyonu amaçlı değerlendirilmiştir. Diseksiyon sonrası elde edilmiş ve -60°C'de bekleyen, parsellenmiş olan 80 adet (4 adet 20'şer HPG içeren eppendorf tüp) HPG örneği oda sıcaklığına getirilip mikrosantrifüj tüpü içerisine 4 adet karbür boncuk ilave edilmiştir. Farklı materyallerdeki öğütücü boncukların (silika, metal) protein kaybına yol açtığı tespit edilmiş olup, tungsten-karbür boncuklar spesifik olmayan alıkonma probleminin gözlemlenmediği materyal olup yöntemde tercih edilmiştir. Devamında, 10 µL proteaz inhibitör kokteyli ve 3 farklı ekstraksiyon çözeltisi 1,5 mL hacminde eklenerek homojenizasyon ve ekstraksiyon verimi değerlendirilmiştir. Proteaz inhibtörleri olarak kokteyl karışım kullanılmış olup, bu amaçla aspartik asit proteaz olarak pepstatin A, serin ve sistein proteazları olarak leupeptin hemisulfat, PMSF ve aprotinin ve aminopeptidaz olarak bestatin içeren karışım tercih edilmiş ve etkin sonuç alınabilmiştir.

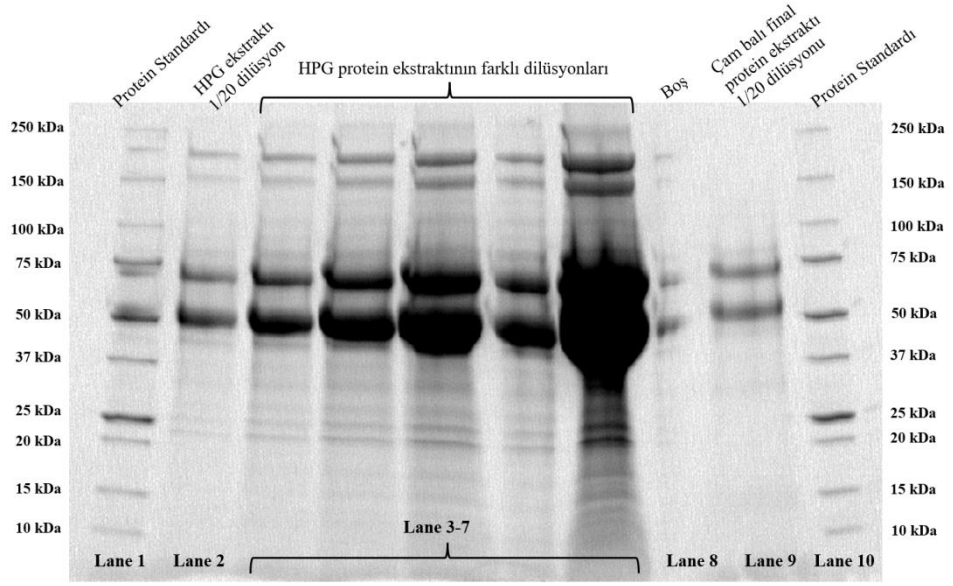
Lizis tamponlarının içerisine sıklıkla eklenen EDTA bu çalışmada α-amilaz'ın metalloenzim yapısında olmasından ötürü kullanılmamıştır. Enzimin stabilitesi için kalsiyum iyonlarının rolü önemlidir. EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar enzimin metalloprotein kısmına bağlanarak, apoenzim kısmından ayrılmasına ve enzimin denatürasyonuna, dolayısı ile aktivite inhibisyonuna sebep olabilmektedir. Oluşan homojenizasyon öncesindeki karışım, Tissue lyzer cihazında 42 Hz'de 2 dakika boyunca çalkalanmış ve homojenize edilmiştir. İşlem aralarında numunenin ısınması dolayısı ile oluşabilecek denatürasyon ve proteolitik aktivite kaynaklı protein kayıplarının önüne geçebilmek için mikrosantrifüj tüpleri 30 saniye kadar buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş ve 2 dakikalık homojenizasyon süreci 3 kez tekrar edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında elde edilen süpernatanların temiz bir şekilde elde edilebilmesi, askıda kalan, girişim oluşturabilecek ve ultrafiltrasyon işleminde tıkanmaya sebebiyet verebilecek maddelerin uzaklaştırılması için 15.000 *x g* kuvvette 20 dakika kadar 4°C'de numuneler ultrasantrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlarda toplam protein içeriği ve elektroforetik bant kalınlıkları analiz edilmiştir. Yapılan değerlendirme sonrasında RIPA tamponu ve 2D-rehydration tamponunun insect saline tamponundan farklı bir ekstraksiyon verimi sergilemediği görüldüğünden, final prosedür olarak insect saline tamponu eklentili prosedür uygulanacak protokol olarak

kararlaştırılmıştır. Hedeflenen enzimler ekstrasellüler matriks içerisinde yer aldığında ve suda çözünürlükleri yüksek protein yapısında olduklarından, deterjan ve kaotropik ajan eklentili sert ekstraksiyon reaktiflerine gerek kalmamaktadır. RIPA tamponu içeriğinde anyonik deterjanlar olarak sodyum dodesil sülfat ve deoksikolat içerirken Nonidet-P-40 ise iyonik olmayan deterjan olarak içeriğide yer almaktadır. Bu deterjan karışımının varlığında protein veya enzimlerin denatüre olması ve çözünürlüklerinin artmasının yanında fonksiyonel özellik kazandıkları katlı (3 boyutlu) yapılarının bozulması söz konusudur. Benzer şekilde çözünürlük ve ekstraskyon verimi açısından değerlendirilmiş olan bir diğer reaktif ReadyPrep™ 2-D Rehydration/Sample Buffer 1'de içeriğinde, 7 M üre ve 2 M tiyoüre güçlü kaotrop ajanların yanı sıra, 1% ASB-14 zwitter iyonik deterjanı içermektedir. Tris tuzu ile tamponlanmış bu karışımda ayrıca takip boyası olarak bromofenol mavisi içermektedir. Kaotrop ajanlar, bu konsantrasyonlarda güçlü denatürant olarak aktivite göstermektedir. Bu bakımdan enzimlerin aktivitelerini ekstraksiyon sonrasında takip edebilmek söz konusu değildir. Yani RIPA reaktifi ve 2-D Rehydration/Sample Buffer-1 ile ekstraktların enzim elde etme verimi aktivite üzerinden değerlendirilememektedir. Bu yüzden insect saline tamponu ve bu ajanlar kullanılarak yapılan ekstraksiyon çalışmalarının verimleri SDS-PAGE analizindeki bant kalınlıkları ve toplam protein konsantrasyonları üzerinden değerlendirilmiş ve yeterli bant yoğunluğunu ve protein konsantrasyonu sağlamış olan, 3 boyutlu enzim yapısının korunmasını sağlayan insect saline tamponu ile gerçekleştirilmiş ekstraksiyon çalışmada tercih edilmiştir.

Sürecin devamında, 20'şer adet HPG içeren 4 ayrı ekstrakt birleştirilir ve CFU'ya aktarılır. CFU da birleştirilmiş ve toplam hacim 10 mL'ye insect saline tamponu ile tamamlanmıştır. 4°C'de 4000 *x g*'de 40 dakika santrifüj edilen numune 500 uL hacmine kadar düşürülerek konsantre edilmiş ve 1 mL'ye insect saline tamponu ile tamamlayarak muhafaza edilmiştir. Elde edilen final numune stok enzim ekstraktı olarak değerlendirilip, SDS-PAGE analizi için konsantre kalmaktadır. Bu sebepten numune analiz öncesinde insect saline tamponu ile farklı seyreltme oranları uygulanarak (1/5, 1/10, 1/20 vb.) seyreltilmiş ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirilirmiştir. Elde edilen HPG içerisindeki enzimler, çam balından saflaştırılmış olan enzimler ile karşılaştırılmak ve baldaki doğal protein referansları olarak nitelendirilmek üzere stok ekstrakt şeklinde etiketlenerek -60°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.9.2. HPG ve bal enzimlerinin elektroforez profillerinin karşılaştırılması orijin/doğallık tespiti

Konsantre çam balı örneğinin ve HPG ekstraktının 1:20 oranındaki dilüsyonları protein profilleri açısından benzer bantlar vermiştir. Karşılaştırma sonucu Şekil 3.33.'de SDS-PAGE elektroforez görüntüsü olarak verilmiştir. Ön hazırlık sonucunda çam balından elde edilmiş konsantre enzim/protein profili bal arısı HPG örneklerinden ekstrakte edilen protein içerikleri ile benzer şekilde yaklaşık olarak 70 kDa ve 55 kDa değerlerinde elektroforez görüntüsü sağlamıştır. Hem aktiviteleri ve hemde molekül ağırlıkları ile invertaz ve diastaz olduğu doğrulanmış olan çam balı enzimlerinin HPG ekstraktlarındaki distaz ve invertaz ile benzer aktivite ve elektroforetik geçiş göstermesi başarı ile tamamlanmış olan enzim saflaştırma süreçlerinin otantik ve arı orijinli enzimler ile yapıldığını valide etmektedir. Bunun yanı sıra HPG protein ekstraktında 150 kDa, 230 kDa, 20-25 kDa aralıklarında belirgin protein bantları gözlemlenmiştir. HPG bezlerden birçok protein ve peptit hücre dışına ifade edilebilmektedir. Yapısal pek çok peptit ve protein ve bunların fragmentleri, öncü ve sinyal protein ve peptitlerde doku protein ekstraktlarında bulunabilmektedir. Yapılan tissue lyzer ile ekstraksiyon işlemi lizozim ve deterjan içermediğinden bir lizis prosesi olarak nitlendirilmemektedir. Doku hücresinin sitozolik ve yapısal (iskelet – membran proteinleri) protein tabanlı bileşenlerinin bu çözelti içerisinde yer almayacağı fakat asit-fosfataz, glukoz oksidaz, katalaz enzimleri gibi, majör arı sütü proteinleri (MRJP 1-9) ve henüz tanımlanmamış pek çok protein ve peptitler, öncüleri ve bunların oligomerik varyantları, hücre dışı matriste yer alabilmektedir. Bu sebepten ötürü aktivite ve elektroforetik molekül ağırlığı tespiti sonrasında varlığı doğrulanmış diastaz ve invertaz haricindeki bu protein bantlarının tanımlanması ayrı bir araştırma konusu olarak değerlendirilmelidir. Bu proteinler konsantre edilmiş çam balında net bantlar olarak tespit edilmediğinden ve saflaştırma süreçlerinin odağında olmadığından bu çalışmada göz arı edilebilmiştir.




**Şekil 3.33.** HPG ve çam balı protein ekstraktlarının SDS-PAGE gösterimi.

Lane 1 ve Lane 10; protein standartları, Lane 2; 1/20 seyreltilmiş nihai HPG ekstraktı, Lane 3-7; nihai HPG protein ekstraktının değişen dilüsyonları, Lane 8; boş, Lane 9; Hazırlanan çam balı protein ekstraktının 1/20 seyreltilmesi. Yaklaşık 55 kDa ve 70 kDa'daki belirgin bantlar, sırasıyla aktivitesi doğrulanmış arı orijinli diastaz ve invertaz enzimlerini göstermektedir.

## 3.10. HPLC-PDA Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Çalışmaları

Kromatografik enzim tespit yönteminin geliştirilmesi noktasında metot optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin HPLC sisteminde görüntülenmesi için ters-faz kromatografisi uygulaması sıklıkla tercih edilmektedir. Alternatif ayrım teknikleri de (afinite, boyut eleme, iyon değişimi vb.) protein analizlerinde tercih edilebilmektedir. Proteinler sahip oldukları izoelektrik nokta değerlerine göre ve bulundukları ortamın pH'ına bağlı olarak farklı net yükler taşıyabilmektedir. Bu iyonik yapıları dolayısı ile anyon veya katyon değişim kromatografik resinleri ile hazırlanmış HPLC kolonlarında iyi bir rezolüsyon ile ayrım gösterebilirler. Uygulanan gradyan türüne göre artan tuz konsantrasyonu veya değişen mobil faz pH değeri ile alıkondukları kolondan elüe edilebilirler. İzoelektrik nokta farklarına göre ayrımı esas alan ve değişen (artan veya azalan) pH değerleri ile rezolüsyon sağlanan iyon değişim uygulamalarına 'chromatofocusing' ismi de verilmektedir. Artan tuz (NaCl) konsantrasyonu ile elüsyon sağlandığından ise proteinin

taşıdığı artı veya eksi yükün bolluğu esas alınmakta ve bu temel üzerinden proteinler birbirinden ayrılmaktadır.

Kuvvetli anyon veya katyon değişim reçineleri veya zayıf anyon veya katyon değişim reçineleri aplikasyon türüne göre karboksimetil, sulfonat, kuarterner amin veya dietilaminoetil gibi ligandlar ile hazırlanabilmektedir. Bahsedilen bu teknik, anyonik ve katyonik (asidik veya bazik) proteinlerin ayrımında etkin olmak ile birlikte her iki türün eş zamanlı kantitatif olarak analiz edilmek istendiğinden uygun cevap üretememektedir. Aynı zamanda nötral protein yapılarının analizine uygun bir yöntem değildir. Aynı şekide hidrofobik protienlerin analizi içinde ilk tercih olmamaktadır. İyonik etkileşim (elektrostatik) tabanlı alıkoyma ve rezolüsyon sağlayan bu teknik protein saflaştırma süreçlerinde flaş kromatografi olarak preparatif amaçlı veya tek tür proteinin (biobenzer ilaç üretiminde, antikor karakterizasyonunda vb.) yük varyantlarının kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılabilmektedir. Protein HPLC analizleri için başvurulan bir diğer analitik ayrım tekniği ise jel filtrasyon veya diğer adı ile boyut eleme kromatografisidir. Bu teknikte ise proteinler veya enzimler içerisinde bulundukları çözelti içerisindeki diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden molekül ağırlığı ve şekline göre ayrılabilmektedir. Kolon materyali ile herhangi bir moleküler etkileşimin olmadığı farzedilerek moleküler düzeyde hacime bağlı bir elek görevi gören bu metodoloji, birbirine yakın molekül ağırlığına sahip proteinlerin ayrımında yetersiz kalabilmektedir. Silika veya polimer dolgu materyalleri ile hazırlanan bu kolonlarda, diol ligandı bağlı silika tabanlı kolonlar veya özel por çaplarına sahip sentezlenmiş polimerik malzemeler bu analizlerde tercih edilebilmektedir. Çok kompleks matrislerde birden fazla pek çok molekül bulunduğundan bu tür numunelerinde analizinde ilk başvuralacak teknik olmaktan ziyade 2. veya 3. adım doğrulama ve temizleme adımı olarak karakterizasyon testlerinde tercih edilebilmektedir. Bir diğer sıklıkla başvurulan analiz ve ayrım tekniği ise yine HPLC ile kombine edilebilen afinite kromatografisidir. Oldukça spesifik yanıt üretebilen ve rezolüsyonu çok yüksek olan bu teknik, ilgili proteine özgü bir ligand ile hazırlanmış bir kolon olduğunda istenilen cevabı verebilmektedir. Prensipte, analiz için hedeflenmiş protein molekülü kolondaki ligand anitkor tabanlı bir molekül ise bir antijen görevi görmektedir ve moleküler etkileşimler doğrultusunda antijen antikor tarafından alıkonulup bir immun komplkes oluşmaktadır. Bu kompleksten antijen daha sonra gradyan uygulama ile ayrılarak hedeflenen protein

izole edilebilmektedir. Afinite kromatografisinin bu türüne immunoafinite kromatografisi denmektedir. Afinite kromatografisinin gıda analizlerinde, biyokimya uygulamalarında, moleküler biyoloji testlerinde ve daha pek çok alanda özellikle protein analizlerinde ve üretimlerinde oldukça önemli bir rolü vardır.

Antikor karakterizasyonu ve titre miktarlarının ölçümlerinde sıklıkla kullanılan protein A veya protein G kromatografisi veya afinite etiketleri bağlı (histidin etiketli, glutatyon S transferaz etiketli, biotin bağlanmış vb.) proteinlerin analizinde kullanılan özel kolonlar (immobilize metal afinite kolonları, streptavidin bağlı kolonlar, lektin afinite kolonları vb.) bunlara örnek olarak verilebilmektedir. Çalıştığımız enzimlere spesifik afinite ligandı bağlı bir reçine literatürde ve piyasada mevcut olmadığından araştırmamızda afinite kromatografisine başvurulmamıştır. Bir diğer tercih edilen kromatografik ayrım tekniği ise hidrofobik etkileşim kromatografisi olup (HIC) bahsedilen diğer tekniklere göre daha az tercih edilen ve daha sık olarak protein saflaştırma için kullanılan bir yöntemdir. Protein karakterizasyonunda, hidrofobik değişikliğe yol açan translasyon sonrası modifikasyonların çözümlenmesinde (glikozilasyon, deamidasyon, PEG eklentisi modifikasyonları gibi) iyi bir cevap üretebilen bu teknik ağırlıklı olarak az sayıda protein bileşenin varlığında daha iyi yanıt üretebilmektedir. Kompleks karışımlarda verdiği rezolüsyon yetersiz kalabilmektedir. Protein analizlerinde en sık tercih edilen teknik ise ters faz kromatografisi prensibi ile çalışan ayrım tekniğidir. Ters faz kromatografisi ile gerçekleştirilen HPLC protein analizlerinde ağırlıklı olarak su ve asetonitril gradyanı tercih edilmektedir. Bu gradyanlara organik modifiye edici ajan olarak formik asit, trifloroasetik asit ve difloroasetik asit eklentileri rezolüsyonu ve tanımlamayı arttırabilmek amaçlı iyon çifti ajanları olarak farklı konsantrasyonlarda eklenebilmektedir. Kullanılan kolonlarda ise pek çok opsiyon söz konusu olmak ile birlikte kullanılan dolgu maddesi polimerik veya silika veya organosilika hibrid partiküller şeklinde hazırlanıp bu dolgu maddelerine farklı hidrofobisitede ligandlar bağlanabilmektedir. Kullanılan dolgu maddelerinin por çapları protein analizleri için ortalama 300 Å ölçüsünde olup, 450 Å'a kadar yükelebilen değerler farklı büyüklükteki proteinlerin analizine imkan verebilmektedir.

Kullanılan bağlı ligandlara bakıldığında ise, C18, C8, C4 gibi alifatik hidrokarbon zincirleri veya aromatik halkaların (polifenol) tercih edildiği

görülebilmektedir. Çalışmamızda da ters faz kromatografisi oldukça kompleks bir matriks olan balda, enzimlerin hedefli şekilde kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilmesi için tercih edilmiştir. Bu kapsamda farklı kolonlar ve aşağıdaki analiz şartları yöntem geliştirme ve optimizasyon amaçlı test edilmiştir.

### 3.10.1. Yöntem optimizasyonu sonuçları

#### 3.10.1.1. Ön hazırlık yönteminin geliştirilmesi

Kromatografik şartların optimize edilmesi ve saf enzimler ile ideal ayrımın ve hassasiyetin sağlanması sonrasında, gerçek numune ile optimizasyon ve ek geliştirme süreçleri tamamlanmıştır. Çalışma kapsamında amaçlanan seyrelt ve enjekte et metodolojisi hızlı, pratik ve minimum maliyet sağlayan bir ön hazırlık yaklaşımı olduğundan öncelikli olarak değerlendirilmiş ve yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında bu teknikten verim alınmıştır. Geliştirilen seyrelt ve enjekte et ön hazırlığı ile eş zamanlı olarak hem yabancı enzim tespiti yapılabilmiş hemde diastaz ve invertaz aktviteleri için rakamsal veriler tek bir HPLC enjeksiyonu ile elde edilebilmiştir. Farklı gramajlardaki tartımlar ve eklenecek tampon çözelti türü ve miktarı hem yöntemin ideal enzim dedeksiyon hassasiyeti için hemde balın viskozitesinin değiştirilerek homojen ve enjekte edilebilir bir çözelti elde edebilmek için değerlendirilmiştir. Kullanılacak homojenizasyon ve ekstraksiyon tampon miktarı oluşturalacak bal çözeltisinin filtrasyon sırasında basınç yaratmayacak hacimde olmalıdır. Ek olarak, eklenecek miktar bal örneğini fazla seyreltmeden yöntemin dedeksiyon seviyesini yükseltmeyecek şekilde optimize edilmelidir. Bu kapsamnda, eklenen reaktif hacimleri, 9 mL, 8 mL, 7 mL, 6 mL olarak test edilmiştir. Yapılan kromatografik değerlendirmeler sonucu en ideal enzim sinyalinin 2,5 gram bal üzerine eklenen 7 mL homojenizasyon ve ekstraksiyon tamponu sonrasında yapılan homojenize bal çözeltisi ile elde edildiği görülmüştür. Insect saline tampon çözeltisi içerdiği tuz çeşitliliği ile sağladığı fizyolojik uyumlu *in-vitro* şartlar (KCl, NaCl, $CaCl_2$), konsantrasyonları ve de pH değeri (7,4) dolayısı ile enzimleri stabil tutabilecek ve referans enzimlerin oluşturulması işlemlerinde (stirred cell konsantrasyon, CFU temizleme ve konsantrasyon, SEC ile tampon değişimi ve saflaştırma son adımı) ilk adımdan son adıma kadar kullanımı valide edilmiş olan bir tampon türü olduğundan balın homojenize edilmesi ve enzim ekstraksiyonu için tercih edilmiştir. PBS (phosphate buffer saline) ile yapılan denemlerde de benzer sonuçlar elde

edilmiş olup, çalışmalara insect saline tamponu ile devam edilmiştir. Çalışma kapsamında geliştirilmiş final yöntemde ön hazırlık şu şekilde kararlaştırılmıştır;

2,5 gr bal 15 mL'lik falkon tüpe tartılır. Üzerine 7 mL insect saline tamponu eklenir ve vorteks ile numune homojenize edilir. Hazırlanan numune 0,45 µm'lik PVDF şırınga filtresinden süzülerek viale alınır ve HPLC-PDA sistemine 15 µL enjekte edilir.

### 3.10.1.2. Enjeksiyon hacminin etkileri

Değişken enjeksiyon miktarları iyi bir hassasiyette ideal pik simetrilerini yakalamak adıan test edildi. Optimizasyon çalışmaları sonucunda 15 uL hacmin en verimli kromatogramı sağladığı tespit edildi. Yüksek enjeksiyon hacimlerinin bant genişlemesi ve asimetriye neden olduğu buna ek olarak doğrusal sinyal artışı yaratmadığı gözlemlendi. Seyrelt ve enjekte et prensibi ile hazırlanan örneklerin yüksek miktarda sisteme enjekte edilmesi, kirlenme potansiyelini de arttıracağından daha yüksek hacimlerin kullanılmamasına da karar verilmiştir.

### 3.10.1.3. PDA dalgaboyu optimizasyonu sonuçları

Saflaştırılan diastaz ve invertaz enzimlerinin referans noktalar olarak görüntülenmesinde ve baldaki invertaz ve diastaz aktivitelerinin bu referans noktalardaki pik alanları üzerinden kantitasyonunu yaparak tayin edilmesinde ayrıca yabancı enzim tağşişinin eş zamanlı görüntülenebilmesi amaçlı geliştirilen yöntemde Waters® Alliance 2695 Separation Module ve Waters® 2996 HPLC PhotoDiode Array Detector (PDA), (Waters®, Milford, MA, A.B.D.) HPLC sistemi kullanılmıştır. 280 nm dalgaboyu, PDA dedektör ile yapılan dalgaboyu taramasında enzim elüsyon bölgesinde diastaz ve invertaz için en yüksek sinyali üreten dalgaboyu olduğundan ve protein analizlerinde sıklıkla tercih edilen bir dalgaboyu değeri olduğundan geliştirdiğimiz enzim HPLC yönteminde kullanılmıştır. Karar verilen 280 nm daha sonra sabitlenmiş dalgaboyu değeri olarak PDA dedektöründe kullanılmış ve PDA'nın tarama opsiyonu bu noktadan sonra pasif tutulmuştur.

### 3.10.1.4. Mobil faz modifiye edicilerin etkileri

Mobil faz modifiye edici organik asitler değişken molaritelerde kullanılarak sonuca olan etkileri gözlemlenmiştir: (%0,1 Formik asit (FA), %0,1 trifloroasetik asit (TFA)). Yapılan denemeler sonucunda elde edilen datalardaki pik şekillleri, pik alanları, tekrarlanabilir seviyesi, alıkonma zamanlarındaki sapmalar gözlemlenmiş olup, optimizasyon yapılmıştır. TFA ve FA protein analizlerinde iyon çifti ajanı olarak mobil fazlara ilave edilmektedir. Ters faz kromatografisi uygulamalarında silika tabanlı kolonlar tercih edildiğinde, silikanın iyonizasyonunun baskılaması ve ilgili analitin silika ile silanol kalıntıları üzerinden ikincil bir etkileşime girmesini engellemek için düşük pH değerlerinde mobil faz çiftleri gradyan veya izokratik uygulamalarda tercih edilir. Aynı zamanda asidik pH değeri silikanın çözülmesini ve dolayısı ile kolon ömrünü de uzatmaktadır. Bunun için uçucu veya uçucu olmayan pek çok asit eklentisi mobil fazlarda ters faz kromatografisi için kullanılmaktadır. Aplikasyon türüne göre çeşitlilik gösteren bu asit türleri, protein analizleri için daha dar bir çeşitlilik ile değerlendirilmektedir. TFA ve FA bahsedilen etkileri haricinde protein analizlerinde iyon çifti kromatografisi ile proteinlerin alıkonmasını ve rezolüsyonunu arttıran bir etkiye de sahiptir. Yaptığımzı denemelerde FA ve TFA %0,1 konsantrasyonlarında değerlendirilmiş, asit miktarının azaltılmasının rezolüsyon kaybı ve alıkonma sürelerinde gerileme gibi etkileri görülmüştür. Bunun yanı sıra konsantrasyonun arttırılmasının pozitif bir etki yaratmadığı aksine kolon ömrü açısından olumsuz olacağı değerlendirilmiştir. %0,1 FA içeriğinin hem ACN hemde su içerikli mobil fazlara eklentisnin aynı orandaki TFA eklentisine göre kromatografik rezolüsyon kaybına sebep olduğu TFA'nın kütle spektrometresi (MS) analizlerinde iyon baskılama etkisi dolayısı ile FA'nın yanlızca MS uygulamalarında düşünülebileceği yorumlanmıştır. Bunun yanı sıra zayıf mobil faz olarak kullanılan su, güçlü mobil faz içeriği olarak MeOH ve ACN ile gradyan testlerinde değerlendirilmiştir. ACN kullanımının enzimlerin pik etkinliğini iyileştirdiği ve bant genişliğini düşürdüğü, HPLC işletim basıncını azlttığı ve de analiz süresini minimize ettiği görülmüştür. Bunun ile birlikte ile birlikte, proteinlerin kolonda yüksek alıkonma afinitesi göstermiştir. MeOH gibi elüsyon gücü ACN gibi hidrofobisitesi daha yüksek olan solventlere göre daha düşük olması dolayısı ile yüksek alıkonma etkinliği gösteren enzimlerin kolondan elüe edilebilmesi için yeterli etkinlikte değildir. Bu bakımdan gradyan uygulamanın su ve ACN içerikli mobil fazlar ile

yapılmasının daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Tüm bu sebeplerden geliştirilen yöntemde kullanımına karar verilen mobil faz çifti şu şekildedir;

Mobil Faz A, %5 ACN + %95 USS + %0,1 TFA

Mobil Faz B, %95 ACN + %5 USS + %0,1 TFA

### 3.10.1.5. Gradient profillerinin etkileri

Konveks, doğrusal, ve de konkav gradyan akış profilleri, su ve ACN içerikli zayıf ve güçlü mobil fazlar ile iyon çifti ajanı olarak TFA eklentisi sonrasında değerlendirildi. İdeal rezolüsyon ve pik şekli, kısa sürede ve yüksek etkinlikte ve de kabul edilebilir bir basınçta elde edilmeye çalışıldı. 30 dakikalık analiz süresine sahip gradyan tüm enzimlerin başarılı bir biçimde tayin edilmesine olanak sağladı. Uygulanan gradyan sonunda, alıkonma süreleri hedefli enzimler olan diastaz ve invertaz için sırası ile 13,7 dak ve 14,6 dak olarak tespit edilmiştir.

### 3.10.1.6. Mobil faz akışının etkileri

Mobil faz akış miktarları da çalışma kapsamında test edilmiştir. Karar verilen ideal gradyan profili sabit kalmak sureti ile değişken akış hızları analiz süresini kısaltabilmek ve yöntem hassasiyetini iyileştirmek için değerlendirilmiştir (0.5, 0,7 ve 1,0 mL/dak.). Yüksek LC akış hızları, enzimler ile kolon sabit faz materyali arasındaki etkileşimi negatif yönde etkileyebilmektedir. Bu durum, hedeflenen enzimlerin RT değerlerinin düşmesine ve teorik plaka sayılarının artmasına olanak sağlayabilmektedir. Öte yandan yüksek akışlar, yüksek HPLC işletim basıncına neden olur ve bu durum analitik kolonun ömrünün azalamasına ve yüksek sarfiyata yol açabilmektedir. Tüm bu değerlendirmeler kapsamında, total analiz süresini yükseltmeyen, ideal pik şekli ve teorik plaka sayısını yakalayan, makul bir sistem basıncı sağlayan, yüksek hassasiyeti mümkün kılan 0.7 mL/dak. akış hızının set edilmesine karar verilmiştir.

### 3.10.1.7. Analitik kolon seçimi - kromatografi kolonu etkileri

Çalışmada, BioResolve RP mAb Polifenil kolon, (150 mm ×4.6 mm i.d), 2.7 µm partikül çapı, 450Å por çapı, (Waters®, Milford, MA, A.B.D.) HPLC kolonu olarak tercih edilmiştir. HPLC akışlarına olanak sağlayan 4,6 mm iç çap değeri karar verilen

0,7 mL/dak. akış değeri için kabul edilebilir bir işletim basıncı sağlamıştır. Aynı zamanda bu iç çap değeri daha fazla dolgu maddesi dolumuna ve dolayısı ile buna bağlı yüksek ligand yoğunluğuna imkan verdiğinden geniş bir konsantrasyon aralığında alıkonma sağlayan ve kolaylıkla doygunluğa ulaşmayan bir analiz olanağı sağlamıştır. Bir diğer fiziksel parametre olan 150 mm kolon uzunluğu ise istenilen enzim rezolüsyonunun elde edilmesinde yeterli bir değerdir. 250 mm uzunluğundaki kolonlar hem analiz süresini uzatacağından, hem maliyetli oluşlarından hemde yüksek basınç oluşturabilme potansiyellerinden ötürü bu çalışmada elimine edilmiştir. 2,7 µm partikül çapı ise core shell teknoloji olarak adlandırılan düşük basınçta UPLC pik şekillerini dar bant genişlikleri ve yüksek etkinlik ile sağlayan bir özelliktir. Bütünüyle poröz yapıda olmayan bu partikül yapısı ortasında gözenekli olmayan bir çekirdek ve bunun etrafındaki silika dolgu maddesi ile oluşturulan ve Eddy difüzyonlarını azaltarak ilgili moleküller için düşük toplam plaka yüksekliği (HETP) sağlayan bir partikül türüdür.

Çalışmada yüksek etkinliği dolayısı ile bu partikül versiyonu 2,7 µm çap ile kullanılmıştır. 450Å por çapı ise genellikle kullanılan 300Å por çapından özellikle daha yüksek bir ölçekte tercih edilmiş olup, küçük moleküllerin alıkonma etkinliğini azaltan ve enzim yorumlama da girişim oluşturmasını engellemek için değerlendirilmiştir. Antikor analizleri veya benzer protein büyüklüğüne sahip moleküller için uygun olan bu por çapı 55 kDa ve 70 kDa büyüklüğündeki proteinler için yeterli alıkonmayı sağlarken, pek çok çeşitlilikte ve yüksek konsantrasyonda bal matrisinde yer alan küçük moleküllerin analiz sırasında eş zamanlı olarak elimine edilmesini sağlamıştır. Bu por çapı ile hedeflenen enzimler küçük molekül kontaminasyonu olmadan analiz sırasında ek bir ön hazırlığa gerek duyulmadan başarı ile analiz edilebilmiştir. Kolonun seçicilik unsuru için ise en önemli kriter dolgu maddesine tutturulmuş olan ve ters faz kromatografi şartını sağlayan, kolona karakteristik özelliğini kazandıran ligand yapısıdır. Polifenil ligand yapısı aromatik fenil yapıları dolayısı ile hem hidrofobik etkileşim sağlamış aynı zamanda bu polimerik halkalar içerdikleri pi bağları dolayısı ile aromatik aminoasit içeren sekanslara sahip proteinler için ikincil bir etkileşim (pi-pi etkileşimi) imkanı sağlamıştır. İlaveten, polifenil halka yapılarının düzlemsel şekilleri sterik etkileşim açısından da farklılık yaratarak proteinlerin şekilsel farklılıkları üzerinden de ek bir ayrım kabiliyeti sağlamıştır. Bahsedilen kolon, tipik bir C18 liganda

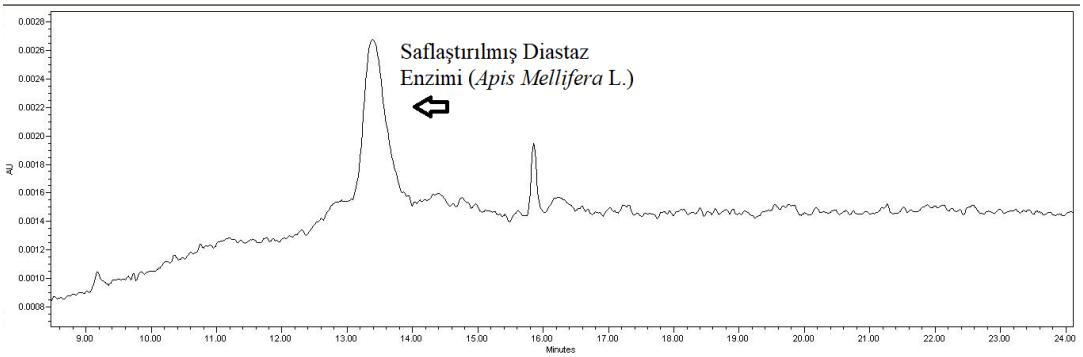
göre ek etkileşim mekanizmaları barındırması dolayısı ile seçicilik açısından protein analizlerinde değerlendirilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

#### 3.10.1.8. Farklı kolon fırını sıcaklıklarının etkisi

Yöntemde kullanılacak olan kolon fırını sıcaklık derecesi, analizin rezolüsyonuna, total işletim basıncına ve analiz süresine doğrudan etki edebilmektedir. 20°C, 30°C, 40°C, ve 80°C deneysel kolon fırını sıcaklık parametreleri olarak değerlendirilmiştir. Kısa süreli analiz, simetrik pik şekli, düşük basınç sağlayan 30°C kromatografik yöntemin final kolon sıcaklığı olarak kullanılmıştır. Düşük sıcaklıkların yüksek basınca, daha yüksek sıcaklıkların ise, agregasyon kaynaklı protein kaybına neden olduğu deney süresince gözlemlenmiştir. Tüm analizler boyunca enzim stabilizasyonu sağlamak için HPLC sisteminin otoörnekleyici sıcaklığı ise 4°C olarak sabitlenmiştir.

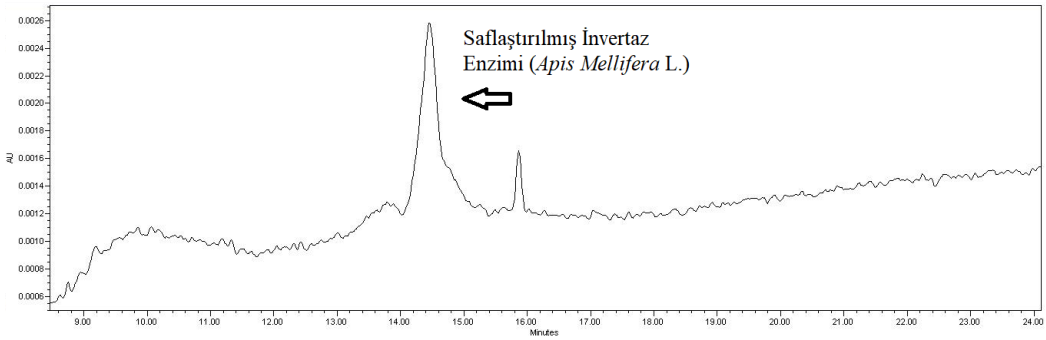
## 3.11. HPC-PDA Yöntem Optimizasyon Sonuçları

Yapılan tüm yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda oluşturulmuş HPLC-PDA enzim analiz yöntemi ile elde edilen doğal saflaştırılmış arı orijinli diastaz enziminin (diastaz referans standardı) kromatogramı Şekil 3.34.'te verilmiştir. Aynı yöntem ile elde edilmiş olan saflaştırılmış doğal arı orijinli invertaz enziminin (invertaz referans standardı) kromatogramı ise Şekil 3.35.'te verilmektedir. Şekil 3.36.'da ise her iki enzimin ortak kromatogram profili paylaşılmıştır. Aktivite hesaplamalarında da kullanılacak olan nihai yönteme ilişkin doğal bal örneği ile örnek analize ilişkin kromatogram ise Şekil 3.37.'de verilmiştir. Şekil 3.38.'de ise saflaştırılmış diastaz, invertaz ve doğal bal örneğinin kromatogramları eş zamanlı olarak verilmiş olup, referans enzimlerin doğal bal örneğine ait kromatogramlarda denk geldiği ve referans oluşturduğu noktalar belirtilmeye çalışılmıştır.



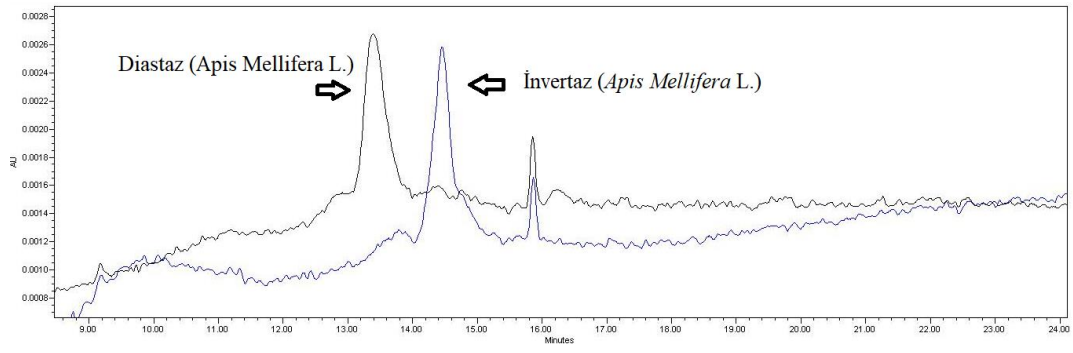

**Şekil 3.34.** Saflaştırılmış diastaz enziminin HPLC-PDA yöntemi ile analizi sonrasındaki kromatogramı.

13,7. dakikada *Apis mellifera* L. orijinli saflaştırılmış diastaz enzimi tek görüntülenebilir molekül olarak, SDS-PAGE saflık analizini doğrular şekilde HPLC-PDA sisteminde görüntülenebilmektedir.



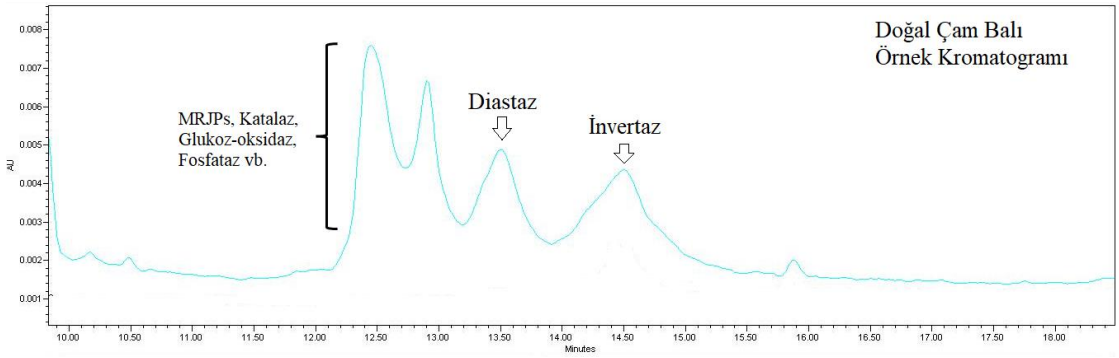

**Şekil 3.35.** Saflaştırılmış invertaz enziminin HPLC-PDA yöntemi ile analizi sonrasındaki kromatogramı.

14,6. dakikada *Apis mellifera* L. orijinli saflaştırılmış invertaz enzimi tek görüntülenebilir molekül olarak, SDS-PAGE saflık analizini doğrular şekilde HPLC-PDA sisteminde görüntülenebilmektedir.

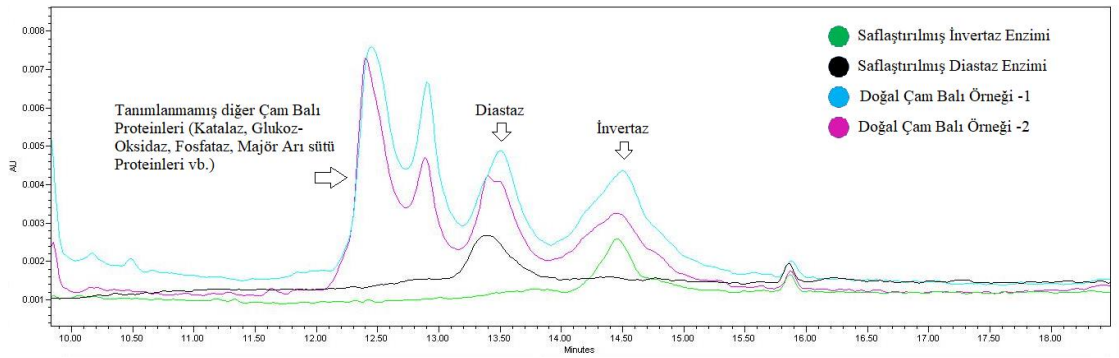



**Şekil 3.36.** Saflaştırılmış invertaz ve diastaz enzimlerinin HPLC-PDA yöntemi ile analizi sonrasındaki ortak kromatogramı.

14,6. dakikada *Apis mellifera* L. orijinli saflaştırılmış invertaz enzimi, 13,7. dakikada *Apis mellifera* L. orijinli saflaştırılmış diastaz.




**Şekil 3.37.** Doğal çam balının HPLC-PDA analiz yöntemi ile elde edilen enzim profili kromatogramı.




**Şekil 3.38.** Saflaştırılmış invertaz, diastaz enzimlerinin ve de doğal çam balının HPLC-PDA yöntemi ile analizlerinin sonrasındaki oluşan ortak kromatogram görüntüleri.

## 3.12. HPLC Yöntemi Validasyon Sonuçları

### 3.12.1. Seçicilik

HPLC-PDA yönteminin spesifikliğinin test edilmesi için diastaz ve invertaz aktivitesi içeren bal numuneleri seçilip aktivite değerleri kaydedilmiştir. Devamında enzimlerin denatüre olup aktivitelerini kaybetmesi ve aktivite ölçüm testlerinde sinyal oluşturmamaları için 100°C'de 2,5 saat süre ile bal numunemeleri su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda enzim yapıları aktivite gösterdikleri 3 boyutlu yapılarını kaybedip denatüre ve/veya degredasyona uğramış bir form oluşturduklarından, doğal diastaz ve invertaz pikleri yerinde HPLC-PDA yönteminde sinyal üretmemiştir. Enzim aktivitelerini ısıl işlem sonrası tamamen kaybeden numunelerin diastaz ve invertaz aktvitite ölçümleri substrat hidrolizi prensibi ile çalışan aktivite tabanlı spektrofotometrik yöntemler ile de test edilmiş olup, bu deneylerde de

bir aktivte görülmemiştir. Bu bakımdan, seçicilik validasyonu için hazırlanan denatüre bal örneklerinin bu kullanım amacına uygun olduğu doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra ısıtma işleminin, teorik olarak Maillard ve karamelizasyon reaksiyonlarını oluşturacağı ve bunun da glikasyon modifikasyonu üzerinden enzimler ve diğer bal proteinleri üzerinde hidroliz/fragmentasyon etkisi yaratacağı ayrıca erken ve ileri evre glikasyon ürünlerinin farklı yapılarda ve artan konsantrasyonlarda açığa çıkacağı öngörülmüştür. Dolayısı ile hem küçük moleküllerin hemde protein fragmanlarının potansiyel oluşumunun, hedeflenmiş doğal diastaz ve invertaz sinyallerine girişim yapıp yapmadığının gözlemlenebilmesi planlanmıştır. Kullanılan seyrelt ve enjekte et ön hazırlıklı HPLC-PDA yöntemi 300Å por çapına sahip bir analitik kolon kullanmaktadır. Bu çap boyutu küçük moleküller için sabit faz materyaline bağlı ligand yapısı uygun olsa bile yeterli alıkonma için uygun hacmi sağlamamaktadır. Dolayısı ile küçük moleküller fazla tutunma gösteremeden erken bir elüsyon zamanında kolonu terk etmektedir. Peptit ve proteinlerin alıkonması ve daha ileri bir alıkonma süresinde sinyal üretmeleri büyük molekül ağırlıklarına sahip olmaları dolayısı ile söz konusudur. Bu bakımdan yöntemin seçiciliğine küçük molekül konsantrasyonunun ve değişkenliğinin etkisi yoktur denebilmektedir.

Farklı botanik orijinlerdeki bal örnekleri kullanılarak matriks etkisinin yönteme ne derecede tesir ettiği de çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Kestane, çiçek, narenciye ve de çam balı örneklerinin geliştirilmiş yöntem ile analizi sonucunda hedefli enzimler haricindeki matriks kaynaklı moleküllerin spektroskopik ve kromatografik olarak herhangi bir girişime neden olup olmadığı analiz edilmiştir. Bu çalışma için 1'er adet çam, çiçek, kestane ve narenciye balı ısıtılarak enzim varlıkları sonlandırılmış ve 3 tekrarlı okuma her biri için yapılarak HPLC-PDA yönteminde enzim aktivitesi araştırılmıştır. Analiz sonuçları, invertaz ve diastaz için ortak olarak Tablo 3.8.'de özetlenmiştir. Elde edilen veriler, aktivite sonlandırıldığında kromatografik olarak girişim yapacak bir molekülün tüm botanik orijinler için mevcut olmadığını ve yöntemin seçici olduğu ve hedef enzimlere karşı spesifik yanıt ürettiği söylenebilmektedir.

**Tablo 3.8.** Seçicilik çalışması sonuçları.

| HPLC-PDA Yöntemi (%RSD) - Seçicilik | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Diastaz aktivite değeri (Schade U/g) | | | | | İnvertaz aktivite değeri (U/kg) | | | |
| | Numune cinsi | | | | | Numune cinsi | | | |
| | Narenciye | Çiçek | Kestane | Çam | | Narenciye | Çiçek | Kestane | Çam |
| Denatürasyon Öncesi | 5,4 | 14,3 | 16,7 | 28,5 | | 32,5 | 166,4 | 60,6 | 117,1 |
| 1. okuma | TLA | TLA | TLA | TLA | 1. okuma | TLA | TLA | TLA | TLA |
| 2. okuma | TLA | TLA | TLA | TLA | 2. okuma | TLA | TLA | TLA | TLA |
| 3. okuma | TLA | TLA | TLA | TLA | 3. okuma | TLA | TLA | TLA | TLA |

TLA; Tespit limiti altında.

### 3.12.2. Sağlamlık (ruggedness) & dayanıklılık (robustness)

Validasyon için seçilen bal numunesi iki analist tarafından, iki farklı HPLC ve farklı lot numaralarına sahip 2 kolon ile analiz edildi ve elde edilen değerler geri kazanım (%) cinsinden değerlendirildi. Çalışmada enzim saflaştırma süreçleri öncesinde gerçekleştirilen ön hazırlık optimizasyonu çalışmalarında kullanılan çam balı örneği kullanılmıştır. Örnek 28,5 Schade U/g ve 117,1 U/kg düzeylerinde sırası ile diastaz ve invertaz aktivitesi içeren çam balı numunesidir. Robustness adı altında yapılan dayanıklılık çalışması birinci ayağında, yöntemin belirtilen değişikliklerden etkilenmediği, geri kazanım seviyelerindeki düşük sapmalar dolayısı ile görülebilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.10.'da invertaz ve diastaz için ortak olarak verilmiştir. Sağlamlık çalışmasının ikinci ayağında ise ruggedness çalışması uygulanmıştır. Ruggedness analizlerinde ise kolon fırını sıcaklıkları ± 10°C (20°C ve 40°C) ve akış hızı ±%10 (0.630 ve 0.770 mL/dak.) olarak değiştirilmiş ve yöntemin bu değişikliklere olan duyarlılığı elde edilen %RSD değerleri üzerinde yorumlanmıştır. Seyrelt ve enjekte et prosedüründen geçirilen validasyon için seçilmiş çam balı örneği bahsedilen değişken şartlar altında analiz edildiğinde %RSD değerlerinin orijinal metot ile benzer seviyelerde olduğu ve yöntemin stabil kalabildiği gözlemlenmiştir. Çalışmaya ilişkin sonuçlar Tablo 3.9.'da paylaşılmaktadır.

**Tablo 3.9.** Sağlamlık **(Ruggedness)** çalışması verileri.

| HPLC-PDA Yöntemi (%RSD) - Ruggedness | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kolon Fırın Sıcaklığı (°C) Etkisi (Schade U/g Diastaz, U/kg İnvertaz) | | | | | | | Akış Hızı (mL/dk) Etkisi (Schade U/g Diastaz, U/kg İnvertaz) | | | | | |
| Analit | 30 Nominal | 20 | 40 | *Ort.* | *SD* | *% RSD* | 0,7 Nominal | 0,63 | 0,77 | *Ort.* | *SD* | *% RSD* |
| Diastaz | 28,5 | 28,4 | 28,5 | 28,5 | 0,06 | 0,2 | 28,5 | 28,4 | 29,1 | 28,7 | 0,3 | 1,3 |
| İnvertaz | 117,1 | 115,8 | 116,7 | 116,5 | 0,6 | 0,5 | 117,1 | 117,5 | 116,4 | 117,0 | 0,5 | 0,4 |

SD; Standart sapma (Standard Deviation), %RSD; Bağıl standart sapma (Relative Standard Deviation).

**Tablo 3.10.** Dayanıklılık **(Robustness)** çalışması verileri.

| HPLC-PDA Yöntemi (% Geri Kazanım) - Dayanıklılık | | |
|---|---|---|
| Analitler | Kolon-1 / Cihaz-1 / Analist-1 | Kolon-2 / Cihaz-2 / Analist-2 |
| Diastaz | % 99,6 | % 99,2 |
| İnvertaz | % 99,5 | % 99,8 |

### 3.12.3. Aralık ve doğrusallık

Validasyon çalışmaları kapsamında lineerite çalışmaları doğrusal artış gösteren değerlerde diastaz ve invertaz aktivitelerine sahip örnekler kullanılarak minimum ve maksimum görüntülenebilir değerleri kapsayacak şekilde çalışılmıştır. Kalibrasyon grafikleri her iki nezim içinde minimum ve maksimum noktaları ve de sıfır (orijin) noktasını içerecek şekilde 7 noktalı olarak oluşturulmuştur. Doğrusallık grafiğindeki konsantrasyon seviyeleri sırası ile invertaz aktivite ölçümü için kör numune-26,7 U/kg, 80 U/kg, 129,7 U/kg, 188,4 U/kg, 237,9 U/kg, 304,2 U/kg ve diastaz aktivite ölçümü için ise kör numune, 5,8 Schade U/g, 9,9 Schade U/g, 13,5 Schade U/g, 16,7 Schade U/g, 20,8 Schade U/g, 25,0 Schade U/g şeklindedir. Doğrusallık grafikleri balın sahip olduğu matriks etkisini içerecek biçimde, matriks eşleşmiş (matrix-matched) formatta oluşturulmuştur. Belirlenen her bir kalibrasyon seviyesi her iki enzim içinde 3 tekrarlı okuma şeklinde analiz edilmiş ve kalibrasyon grafiği ve bu grafiğe ait denklem hesaplanmıştır. Çalışma sonunda her iki enzim içinde regresyon katsayısı $R^2$=0.990

değeri üzerinde elde edilebilmiştir. Sinyal olarak, pik tepe alanının, her analit için belirlenen konsantrasyonlara (diastaz için Schade U/g ve invertaz için U/kg cinsinden) karşı oranı cinsinden çizildi ve kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Yöntem belirlenen konsantrasyon aralığında iki enzim için de lineer denilebilmektedir. İnvertaz ve diastaz için analizler sonunda elde edilen regresyon katsayıları ve denklemler Tablo 3.11.'de özetlenmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri ise, 'HPLC-PDA Yöntemi ile Diastaz Aktivite Tayini' ve 'HPLC-PDA Yöntemi ile İnvertaz Aktivite Tayini' başlıkları altında sırası ile Şekil 3.39. ve Şekil 3.40.'da verilmektedir.

**Tablo 3.11.** Kalibrasyon grafikleri rakamsal verileri.

| HPLC-PDA Doğrusallık Çalışması | | |
|---|---|---|
| Analitler | $R^2$ | Denklem |
| Diastaz | 0,994 | y=3,9929 x - 2,8714 |
| İnvertaz | 0,992 | y=51,55 x - 68,071 |

### 3.12.4. Doğruluk (geri kazanım)

Validasyon kapsamında, doğruluk çalışması için %RSD, ve % geri kazanım değerleri hedef enzimler için hesaplanmıştır. Geri kazanım (doğruluk) validasyon çalışması için hem diastaz hemde invertaz değerlerinin eş zamanlı belirtildiği bir referans malzeme (BIPEA) tedarik edilmiş ve yeterlilik testine tabi olan bu örnek ile gerçeklik çalışması yapılmıştır. Laboratuvarlar arası karşılaştırmaya tabi olan bu örnek yeni HPLC-PDA yöntemi ile analiz edilmiş ve sonuçların tutarlılığı, BIPEA raporundaki atanmış değerler ($X_{pt}$) olan diastaz ve invertaz değerleri ve teste dahil olan laboratuvarların raporlamış olduğu sonuçlara göre hesaplanan z skoruna göre değerlendirilmiştir.

Çalışılan BIPEA numunesindeki diastaz $X_{pt\ ve}$ invertaz $X_{pt}$ değerleri sırası ile 12 Schade U/g ve 60 U/kg şeklindedir. Kolorimetrik, aktivite tabanlı testler ile ölçümlenen invertaz [132] ve diastaz (T-AMZHY) test sonuçları da bu atanmış değerlere uygun şekilde sırası ile 60 U/kg ve 12 Schade U/g analiz sonuçlarını vermiştir. Bu sonuçlar için hesaplanan z skorları diastaz ve invertaz için sırası ile 0,4 ve 1,2 şeklinde tespit edilmiştir. Değeri bilinen ve farklı laboratuvarlarca z skoruna uygun şekilde enzimleri

raporlanmış bu numune yeni geliştirilmiş HPLC-PDA yöntemi ile 7 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiş ve %RSD değerleri ile birlikte %geri kazanım değerleri hem diastaz hemde invertaz için hesaplanmıştır. İnvertaz için 0,2 %RSD, %102 geri kazanım oranı ile elde edilmiştir. Diastaz enzimi de benzer başarı ile görüntülenerek %2 RSD, %98,3 geri kazanım değeri ölçümlenmiştir.

### 3.12.5. Kesinlik

#### 3.12.5.1. Tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) ve tekrarüretilebilirlik (günler arası kesinlik)

Bu çalışmada, kesinlik değerleri gün içi tekrarlanabilirlik ve günler arası tekrarlanabilirlik (tekrarüretilebilirlik) olarak raporlanmıştır. Hedef enzimler için kalibrasyon aralığında tespit edilen minimum, maksimum ve de orta seviye konsantrasyonlarda (3 farklı seviyede) 7 tekrarlı deneyler tamamlanmıştır. Diastaz için 5,8 Schade U/g / 16,7 Schade U/g / 25 Schade U/g konsantrasyonları, invertaz için ise 26,7 U/kg / 188,4 U/kg / 304,2 U/kg konsantrasyonları $n$=7 tekrar mertebesinde cihazda geliştirilen yöntem uygulanarak okunmuştur. Bu numuneler öncelikle gün içi kesinliği ortaya koymak için 7 tekrar çalışılmış daha sonra 7 ardışık gün analiz edilmiş ve böylece günler arası tekrarlanabilirlik raporu oluşturulmuştur. Kesinlik parametresinin başarısı, %RSD değerlerinin hesaplanması sureti ile değerlendirilmiştir. Elde edilen düşük RSD seviyeleri yöntemin kesinlik düzeyinin yüksek ve oldukça tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bağıl standart sapmanın değerleri (%RSD), diastaz için gün içi tekrarlanabilirlikte 3 konsantrasyon için ortalama %1,15, günler arası tekrarlanabilirlikte ise ortalama %1,49 olarak tespit edilmiş olup, invertaz enzimi için tekrarlanabilirlik %RSD ortalaması 3 konsantrasyon özelinde %0,34, tekrarüretilebilirlik ortalaması ise %1,48 olarak hesaplanmıştır. Analiz çıktıları Tablo 3.12. ve Tablo 3.13.'de verilmektedir. Kesinlik çalışmlarının tutarlı olması ve tamamen yöntem tekrarlanabiliriğini yansıtabilmesi adına validasyon çalışması öncesinde sistem tekrarlanabilirliği çalışması da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda ise %RSD değerleri invertaz ve diastaz saf enzimleri için %2,0 nin altında görüntülenebilmiştir ve sistem uygunluğu valide edilmiştir.

**Tablo 3.12.** Diastaz ve invertaz gün içi tekrarlanabilirlik (tekrarlanabilirlik, intra-day precision) verileri.

| Analitler | Kons. | *n*=1 | *n*=2 | *n*=3 | *n*=4 | *n*=5 | *n*=6 | *n*=7 | Ort. | SD | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Diastaz | 5,8 Schade U/g | 5,6 | 5,7 | 5,6 | 5,8 | 5,8 | 5,6 | 5,8 | 5,7 | 0,10 | 1,75 |
| | 16,7 Schade U/g | 16,5 | 16,8 | 16,5 | 16,7 | 16,7 | 16,5 | 16,3 | 16,6 | 0,17 | 1,03 |
| | 25,0 Schade U/g | 25,2 | 25,3 | 25,4 | 25,4 | 25 | 25,1 | 25 | 25,2 | 0,17 | 0,69 |
| İnvertaz | 26,7 U/kg | 26,3 | 26,3 | 26,5 | 26,6 | 26,7 | 26,7 | 26,5 | 26,5 | 0,17 | 0,63 |
| | 188,4 U/kg | 187,5 | 188,2 | 188,3 | 188,2 | 188,4 | 187,4 | 188,3 | 188,0 | 0,41 | 0,22 |
| | 304,2 U/kg | 303,8 | 304,2 | 304,1 | 303,7 | 304,2 | 304,3 | 302,8 | 303,9 | 0,52 | 0,17 |

SD; Standard deviation, %RSD; Relative Standard Deviation, Ort; Ortalama.

**Tablo 3.13.** Diastaz ve invertaz günler arası tekrarlanabilirlik (tekrarüretilebilirlik, inter-day precision) verileri.

| | Konsantrasyon =1, 5,8 Schade U/g, *n*=7 gün | | | Konsantrasyon = 2, 16,7 Schade U/g, *n*=7 gün | | | Konsantrasyon = 3, 25,0 Schade U/g, *n*=7 gün | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Diastaz | Ort. | SD | %RSD | Ort. | SD | %RSD | Ort. | SD | %RSD |
| | 5,79 | 0,11 | 1,85 | 16,91 | 0,29 | 1,72 | 24,93 | 0,23 | 0,92 |
| | Konsantrasyon = 1, 26,7 U/kg, *n*=7 gün | | | Konsantrasyon = 2, 188,4 U/kg, *n*=7 gün | | | Konsantrasyon = 3, 304,2 U/kg, *n*=7 gün | | |
| İnvertaz | Ort. | SD | %RSD | Ort. | SD | %RSD | Ort. | SD | %RSD |
| | 27,09 | 0,53 | 1,95 | 186,26 | 3,69 | 1,98 | 304,01 | 1,57 | 0,52 |

SD; Standard deviation, %RSD; Relative Standard Deviation, Ort; Ortalama.

### 3.12.6. Hassasiyet sonuçları (duyarlılık - LOD & LOQ)

Yöntemin hassasiyet limitleri (duyarlılığı), hedef enzimlerin, LOQ ve LOD ölçümlerinin S/N değerinin ölçümlenmesi esası ile belirlenmiştir. Bu kapsamda, azalan enzim aktivitelerindeki bal örnekleri sisteme geliştirilmiş yöntem ile enjekte edilerek S/N olarak tespit edilebilen en düşük sinyal öncelikle görüntülenmiştir. Bu deneysel olarak tespit edilmiş konsantrasyon seviyesinde 14 tekrarlı ölçüm alınarak standart sapma hesaplanmış ve elde edilen standart sapmanın sırası ile 3 ve 10 katı alınarak LOD ve LOQ seviyeleri raporlanmıştır. LOQ seviyesi yöntem için diastaz ve invertaz için doğrusallık çalışmalarının başlangıç seviyesi olarak belirlenmiştir. Bu seviyede diastaz

ve invertaz için 14 tekrarlı okuma gerçekleştirilerek SD değerleri hesaplanmış ve aşağıdaki formüllere göre LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir (Eşitlik 3.4. ve Eşitlik 3.5.).

$$LOD = C_{ortalama} + 3xSD \quad (3.4.)$$

$$LOQ = C_{ortalama} + 10xSD \quad (3.5.)$$

($C_{ortalama}$; LOD/LOQ çalışmasının gerçekleştirildiği konsantrasyon seviyesinin 14 okuma sonunda elde edilen ortalama değeridir. SD; 14 veri sonucunda hesaplanan bu konsantrasyon seviyesindeki standart sapmadır.)

Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik dataları 14 adet veri olarak (7'şer adet tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik) değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.14.'te verilmiştir. Elde edilen LOQ değerleri, diastaz için 6,8 Schade U/g ve invertaz için 31,6 U/kg'dır. LOD değerleri ise sırası ile diastaz ve invertaz için 6,1 Schade U/g ve 28,1 U/kg olarak belirlenmiştir.

**Tablo 3.14.** LOD ve LOQ değerleri.

| | LOD / LOQ çalışması | |
|---|---|---|
| | Diastaz (Schade U/g) | İnvertaz (U/kg) |
| HPLC-PDA 1.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -1) | 5,6 | 26,3 |
| HPLC-PDA 2.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -2) | 5,7 | 26,3 |
| HPLC-PDA 3.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -3) | 5,6 | 26,5 |
| HPLC-PDA 4.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -4) | 5,8 | 26,6 |
| HPLC-PDA 5.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -5) | 5,8 | 26,7 |
| HPLC-PDA 6.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -6) | 5,6 | 26,7 |
| HPLC-PDA 7.okuma (Tekrarlanabilirlik verisi -7) | 5,8 | 26,5 |
| HPLC-PDA 8.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -1) | 5,7 | 26,9 |
| HPLC-PDA 9.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -2) | 5,8 | 28,2 |
| HPLC-PDA 10.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -3) | 5,6 | 27,1 |
| HPLC-PDA 11.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -4) | 5,8 | 26,7 |
| HPLC-PDA 12.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -5) | 5,9 | 26,8 |
| HPLC-PDA 13.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -6) | 5,9 | 27,2 |
| HPLC-PDA 14.okuma (Tekrarüretilebilirlik verisi -7) | 5,8 | 26,7 |
| $C_{Ortalama}$ | 5,7 | 26,8 |
| *SD* | 0,1 | 0,5 |
| *3*SD* | 0,3 | 1,4 |
| *10*SD* | 1,1 | 4,8 |
| *LOD ($C_{ort.}$ + 3SD)* | 6,1 | 28,1 |
| *LOQ ($C_{ort}$ + 3SD)* | 6,8 | 31,6 |

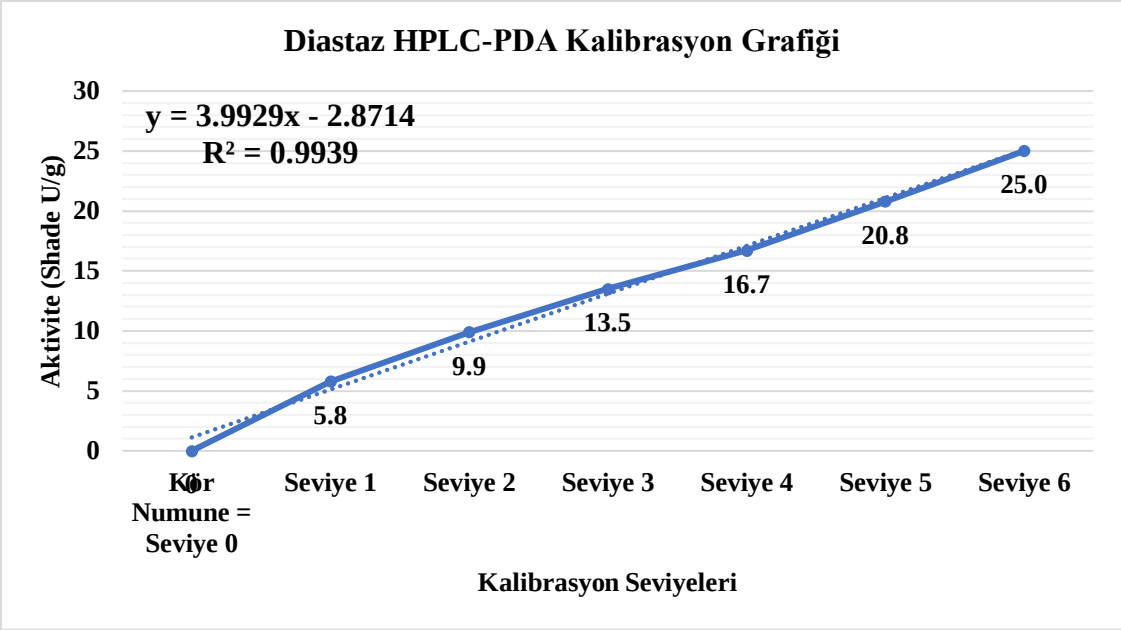
SD; Standard deviation, LOD; Limit of Detection, LOQ; Limit of Quantitation

## 3.13. HPLC-PDA Yöntemi ile Diastaz Aktivite Tayini

Çalışma kapsamında diastaz aktivitesinin, geliştirilmiş olan HPLC-PDA yöntemi ile tayin edilmesi için 15 adet farklı ve doğrusal diastaz aktivite değerlerine sahip bal numunesi seçilmiştir. Seçilen 15 adet numunenin çok düşük bir değerden yüksek bir diastaz değerine yükselen şekilde değişken fakat doğrusal bir konsantrasyon aralığında olmasına ve şeker şurubu veya yabancı enzim aktivitesi içermeyecek şekilde otantik numuneler olarak seçilmesine özen gösterilmiştir. 15 numune haricinde otantisite ve diastaz konsantrasyonunun doğrusal olması noktasında benzer özelliklere sahip numuneler kalibrasyon amaçlı seçilmiştir. Kör numune sıfır noktası olarak kabul edilmek (insect saline tamponu) üzere 6 adet doğrusal diastaz aktivitesine (enzim konsantrasyonuna) sahip bal numunesi yöntemin kalibrasyonu için seçilmiştir ve bu şekilde 7 noktalı kalibrasyon eğrisi HPLC-PDA diastaz aktivite tayini için oluşturulmuştur. Gerçekleştirilmiş kalibrasyon çalışması sonunda numune analizi için $R^2$=0,993 korelasyon katsayısına sahip bir kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. HPLC-PDA ve spektofotometrik aktivite tabanlı yöntem ile analiz edilen 15 adet numunenin analiz sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 3.15.'te verilmektedir. Kalibrasyon için değerlendirilen numunelerin temsil ettiği kalibrasyon seviyeleri ve buna karşılık gelen spektorofotometrik/kolorimetrik diastaz aktivite sonuçları Tablo 3.16.'da ve de bu sonuçlar ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 3.39.'da paylaşılmıştır.

**Tablo 3.15.** HPLC-PDA yöntemi diastaz kalibrasyon tablosu.

| **Kalibrasyon Seviyesi** | **Diastaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (T-AMZHY) (DN=Schade U/g)** |
|---|---|
| Seviye 6 | 25,0 |
| Seviye 5 | 20,8 |
| Seviye 4 | 16,7 |
| Seviye 3 | 13,5 |
| Seviye 2 | 9,9 |
| Seviye 1 | 5,8 |
| Kör Numune | 0 |




**Şekil 3.39.** HPLC-PDA diastaz kalibrasyon eğrisi.

**Tablo 3.16.** HPLC-PDA ve spektrofotometrik / kolorimetrik aktivite tabanlı diastaz ölçüm yöntemleri ile eş zamanlı şekilde analiz edilen 15 adet numunenin analiz sonuçları.

| Numune Kodu | Diastaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (T-AMZHY) (*DN, Schade U/g) | HPLC-PDA yöntem Sonucu (Schade U/g) |
|---|---|---|
| **DN-1 | 29,4 | 28,7 |
| DN-2 | 27,8 | 28,1 |
| DN-3 | 26,3 | 25,7 |
| DN-4 | 4,0 | 4,7 |
| DN-5 | 5,4 | 5,9 |
| DN-6 | 6,5 | 6,2 |
| DN-7 | 9,1 | 8,7 |
| DN-8 | 11,4 | 12,1 |
| DN-9 | 13,5 | 12,2 |
| DN-10 | 14,3 | 14,7 |
| DN-11 | 16,7 | 15,9 |
| DN-12 | 18,5 | 17,9 |
| DN-13 | 19,2 | 18,8 |
| DN-14 | 21,7 | 22,5 |
| DN-15 | 22,7 | 22,3 |

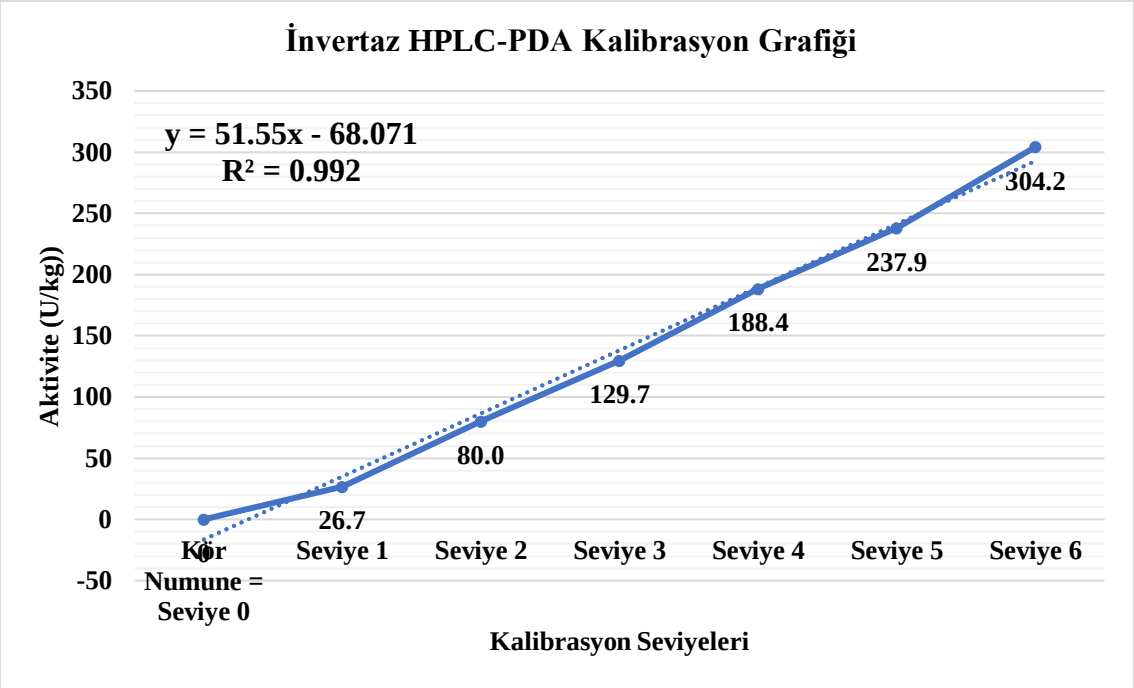
*DN; Diastaz sayısı, **DN; Diastaz numunesi.

## 3.14. HPLC Yöntemi ile İnvertaz Aktivite Tayini

Çalışma kapsamında invertaz aktivitesinin, geliştirilmiş olan HPLC-PDA yöntemi ile tayin edilmesi için 15 adet farklı ve doğrusal diastaz aktivite değerlerine sahip bal numunesi seçilmiştir. Seçilen 15 adet numunenin çok düşük bir değerden yüksek bir invertaz değerine yükselen şekilde değişken fakat doğrusal bir konsantrasyon aralığında olmasına ve şeker şurubu veya yabancı enzim aktivitesi içermeyecek şekilde otantik numuneler olarak seçilmesine özen gösterilmiştir. 15 numune haricinde otantisite ve invertaz konsantrasyonunun doğrusal olması noktasında benzer özelliklere sahip numuneler kalibrasyon amaçlı seçilmiştir. Kör numune sıfır noktası olarak kabul edilmek (insect saline tamponu) üzere 6 adet doğrusal invertaz aktivitesine (enzim konsantrasyonuna) sahip bal numunesi yöntemin kalibrasyonu için seçilmiştir ve bu şekilde 7 noktalı kalibrasyon eğrisi HPLC-PDA ivertaz aktivite tayini için oluşturulmuştur. Gerçekleştirilmiş kalibrasyon çalışması sonunda numune analizi için $R^2$=0,992 korelasyon katsayısına sahip bir kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. HPLC-PDA ve spektofotometrik aktivite tabanlı yöntem ile analiz edilen 15 adet numunenin analiz sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 3.17.'de verilmektedir. Kalibrasyon için değerlendirilen numunelerin temsil ettiği kalibrasyon seviyeleri ve buna karşılık gelen spektorofotometrik/kolorimetrik invertaz aktivite sonuçları Tablo 3.18.'de ve de bu sonuçlar ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 40.'da paylaşılmıştır.

**Tablo 3.17.** HPLC-PDA yöntemi invertaz kalibrasyon tablosu.

| **Kalibrasyon Seviyesi** | **İnvertaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Testi Sonucu (Siegenthaler, 1977), (U/kg)** |
|---|---|
| Seviye 6 | 304,2 |
| Seviye 5 | 237,9 |
| Seviye 4 | 188,4 |
| Seviye 3 | 129,7 |
| Seviye 2 | 80,0 |
| Seviye 1 | 26,7 |
| Kör Numune | 0 |




**Şekil 3.40.** HPLC-PDA invertaz kalibrasyon eğrisi.

**Tablo 3.18.** HPLC-PDA ve spektrofotometrik / kolorimetrik aktivite tabanlı invertaz ölçüm yöntemleri ile eş zamanlı şekilde analiz edilen 15 adet numunenin analiz sonuçları.

| Numune Kodu | İnvertaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (Siegenthaler, 1977) (U/kg) | HPLC-PDA Yöntem Sonucu (U/kg) |
|---|---|---|
| *İN-1 | 336,4 | 329,2 |
| İN-2 | 297,1 | 287,8 |
| İN-3 | 276,0 | 272,4 |
| İN-4 | 255,2 | 262,5 |
| İN-5 | 245,5 | 244,8 |
| İN-6 | 222,9 | 224,2 |
| İN-7 | 212,8 | 210,6 |
| İN-8 | 203,9 | 211,9 |
| İN-9 | 166,4 | 157,8 |
| İN-10 | 146,2 | 138,9 |
| İN-11 | 125,4 | 122,7 |
| İN-12 | 60,6 | 58,8 |
| İN-13 | 43,8 | 42,6 |
| İN-14 | 32,0 | 30,7 |
| İN-15 | 11,1 | 14,3 |

*İN; İnvertaz Numunesi.

## 3.15. HPLC-PDA Yöntemi ile diastaz ve invertaz analizlerine ilişkin istatistiksel yaklaşımlar

### 3.15.1. T testi (çift örnek T test) - F testi, doğrusal regresyon ve çift yönlü Pearson korelasyon analizleri

Çalışma kapsamında çift örnek T testi, F testi, çift yönlü Pearson korelasyon ve doğrusal regresyon analizleri diastaz ve invertaz ölçümlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Spektrofotometrik okuma ile substrat hidroliz aktivitesi üzerinden elde edilen kolorimetrik sonuçlar ve bu değerlere karşılık gelen HPLC-PDA yöntemi ile elde edilen analiz verilerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı T testi, F testi ile ve 2 veri seti arasındaki korelasyonu rakamsal olarak değerlendirebilmek için ise regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Güven aralığı %95, $\alpha$=0,05 değerlerine göre kurulan hipotezlerde, H0; iki analiz verisine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olmadığı, H1 hipotezi ise 2 data seti ortalaması arasında anlamlı bir fark olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. T testi ve F testi sonucunda elde edilen *p* değerlerinin $\alpha$=0,05 değerinden küçük veya eşit olması durumunda H0 hipotezi reddedilir ve 2 veri seti arasında anlamlı fark olduğu şeklinde yorumlama yapılır. Sonuç anlamlı çıkmadığında yani H0 hipotezi kabul edildiği durumlarda işlem burada sonlandırılır. Ancak sonucun anlamlı bulunması durumunda farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek üzere tamamlayıcı (post-hoc) hesaplamalara geçmek gereklidir.

Buna ek olarak regresyon analizleri tanımlanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. T test sonucunda elde edilen pearson korelasyn katsayısının 0,990 değerinden büyük olması durumunda sonuçlar arasında güçlü korelasyon ilişkisi olduğu çalışma özelinde kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra regresyon analizinden elde edilen $R^2$ değerlerinin de aynı şekilde 0,990'dan yüksek olması çalışmalar kapsamında beklenmektedir. Tablo 3.19.'da diastaz analizleri için Tablo 3.20.'de ise invertaz analizleri için elde edilen regresyon analiz sonuçları verilmektedir. T test sonuçları ise Tablo 3.21.'de diastaz ve Tablo 3.22.'de invertaz için verilmiştir. Pearson korelasyon katsayısı invertaz deneyleri için 0,9987, diastaz deneyleri için ise 0,9969 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler 2 analiz içinde analiz sonuçlarının oldukça benzer olduğunu ve yüksek bir pozitif

korelasyon içerisinde olduklarını göstermektedir. Öte yandan regresyon analizlerinde de elde edilen $R^2$ değerlerine bakıldığında diastaz için 0,994 ve invertaz için 0,997 değerleri hesaplanmıştır. Bu rakamlarda 2 veri seti arasındaki güçlü korelasyonu her iki analiz için de vurgulamaktadır. T testi sonucunda elde edilen *p* olasılık değerlerine bakıldığında ise her iki yöntem için olasılık faktörü olarak belirlenen 0,05 değerinden büyük değerler elde edildiği (diastaz için tek yönlü *p*;0,21, çift yönlü *p*;0,42 ve invertaz için tek yönlü *p*;0,11, çift yönlü *p*;0,22) görülmüştür. Bu değerler, H0 hipotezini doğrulamakta olup, spektrofotometrik / kolorimetrik aktivite ölçüm sonuçları ile HPLC-PDA ölçüm yöntemi arasında anlamlı bir farklılık olmadığını vurgulamaktadır. Benzer şekilde iki ölçüm setinin varyanslarını karşılaştıran F testinde ise H0 hipotezini doğrulayan *p* değerleri (>α=0,05) elde edilmiştir. Tablo 3.24. ve Tablo 3.25.'te sırası ile diastaz ve invertaz için F testi sonuçları belirtilmiştir.

**Tablo 3.19.** İnvertaz verileri regresyon analiz sonuçları.

| **Regresyon İstatistikleri** | |
|---|---|
| **Çoklu R** | 0,9987 |
| ***R Kare*** | ***0,9975*** |
| **Ayarlı R Kare** | 0,9973 |
| **Standart Hata** | 5,3596 |
| **Gözlem** | 15 |

**Tablo 3.20.** Diastaz verileri regresyon analiz sonuçları.

| **Regresyon İstatistikleri** | |
|---|---|
| **Çoklu R** | 0,9970 |
| ***R Kare*** | ***0,9940*** |
| **Ayarlı R Kare** | 0,9935 |
| **Standart Hata** | 0,6607 |
| **Gözlem** | 15 |

**Tablo 3.21.** İnvertaz verileri T test analiz sonuçları.

| | **İnvertaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (U/kg)** | **HPLC-PDA yöntem Sonucu (U/kg)** |
|---|---|---|
| **Ortalama** | 175,69 | 173,9 |
| **Varyans** | 10577,83 | 10397,4 |
| **Gözlem** | 15 | 15 |
| ***Pearson Korelasyonu*** | ***0,9987*** | |
| **Öngörülen Ortalama Farkı** | 0 | |
| **df** | 14 | |
| **t Stat** | 1,29 | |
| **P(T<=t) tek-uçlu** | ***0,11*** | |
| **t Kritik tek-uçlu** | 1,76 | |
| **P(T<=t) iki-uçlu** | ***0,22*** | |
| **t Kritik iki-uçlu** | 2,14 | |

**Tablo 3.22.** Diastaz verileri T test analiz sonuçları.

| | **Diastaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (*DN, Schade U/g)** | **HPLC-PDA yöntem Sonucu (Schade U/g)** |
|---|---|---|
| **Ortalama** | 16,43 | 16,3 |
| **Varyans** | 67,21 | 64,6 |
| **Gözlem** | 15 | 15 |
| ***Pearson Korelasyonu*** | ***0,9970*** | |
| **Öngörülen Ortalama Farkı** | 0 | |
| **df** | 14 | |
| **t Stat** | 0,83 | |
| ***P(T<=t) tek-uçlu*** | ***0,21*** | |
| **t Kritik tek-uçlu** | 1,76 | |
| ***P(T<=t) iki-uçlu*** | ***0,42*** | |
| **t Kritik iki-uçlu** | 2,14 | |

**Tablo 3.23.** Diastaz verileri F test analiz sonuçları.

| | Diastaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (*DN, Schade U/g) | HPLC-PDA yöntem Sonucu (Schade U/g) |
|---|---|---|
| Ortalama | 16,43 | 16,29 |
| Varyans | 67,21 | 64,59 |
| Gözlem | 15 | 15 |
| df | 14 | 14 |
| F | 1,04 | |
| ***P(F<=f) tek-uçlu*** | ***0,47*** | |
| F Kritik iki-uçlu | 2,48 | |

**Tablo 3.24.** İnvertaz verileri F test analiz sonuçları.

| | İnvertaz Spektrofotometrik / Kolorimetrik Aktivite Test Sonucu (U/kg) | HPLC-PDA yöntem Sonucu (U/kg) |
|---|---|---|
| Ortalama | 175,69 | 173,95 |
| Varyans | 10577,83 | 10397,36 |
| Gözlem | 15 | 15 |
| df | 14 | 14 |
| F | 1,02 | |
| ***P(F<=f) tek-uçlu*** | ***0,49*** | |
| F Kritik iki-uçlu | 2,48 | |

## 3.16. HPLC-PDA Yöntemi ile Yabancı Diastaz Tağşiş Tespiti

Yabancı enzim tağşişinin, balın önemli bir tazelik ve kalite parametresi olan ve bal ticaretinde önemli bir değerlendirme unsuru olan diastaz değerini yükseltmek amaçlı eklendiğini bilmekteyiz. Taze olmayan balın diastaz değerini suni olarak yükseltmek haricinde, balın farklı şeker şurupları ile tağşiş edilmesi ve dolayısı ile kalite parametrelerindeki seyrelme odaklı düşüşte enzim eklentisi ile tolere edilmeye çalışılabilmektedir. Bunun yanı sıra balın tüketime hazır hale getirilmesi esnasında pastörizasyon amaçlı yüksek sıcaklıklara çıkılması da kalite parametrelerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. HMF değerinin yükselmesinin yanı sıra sıcaklığa karşı dayanksız olan diastaz ve invertaz enzimlerinin denatüre olması ve aktivitesini kaybetmesi de buna örnek verilebilecek durumlar olarak belirtilebilmektedir. Yüksek sıcaklık uygulaması sonucunda düşebilecek diastaz değerleri doğrultusunda bu etkiyi maskelemek amaçlı yabancı diastaz bala eklenerek de enzim tağşişi yapılabilmektedir. Bu sebep ile enzimlerin varlığı ve HMF değeri balın tazelik ve proses detaylarını ön görebilmek için oldukça önemli parametrelerdir. Son olarak tağşiş yerine taklit amaçlı

da yabancı diastaz kullanılabilmektedir. Bu noktada bal olmadan şeker şurupları ile hazırlanan bal benzeri formülasyonunda diastaz aktivitesi oluşturabilmek için de yabancı enzim kullanımına başvurulabilmektedir. Bu potansiyel tağşiş varlığını görüntüleyebilmek ve kapsamlı değerlendirebilmek için 107 adet bal örneği piyasadan toplanmış ve diastaz aktivitesinin yanısıra geliştirilen alternatif HPLC-PDA aktivite ve yabancı diastaz tespit yöntemi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizler ve değerlendirmeler sonucunda, yaklaşık 30 DN (Diastaz sayısı; Schade U/kg) aktivitesi üzerindeki sonuçlarda yabancı diastaz sinyali tespit edilmiştir.

Balın orijinine göre farklı aktiviteler gösterebilen doğal diastaz varlığı ballarda ortalama olarak minimum 8 DN ile 30 DN arasında aktivite ile raporlanmaktadır. Bu bakımdan bu ortalama üzerinde değerler şüphe ile yaklaşılması gereken ve farklı orijine sahip bir enzim ile tağşiş uygulanmış numuneler olarak değerlendirilebilmektedir. Yeni geliştirilen yöntem bu hipotezi doğrular şekilde 30 ve üzerinde aktivitelerin yabancı diastaz ile elde edildiğini vurgulayabilmektedir. Unutulmaması gereken bir diğer husus, iyi kontrol edilmiş bir enzim tağşişi diastaz değerini ortalama 8 ila 30 DN arasında tutabilecek şekilde yapılabilir ve toplam aktivite sonucu veren analitik yaklaşımlar bu varlığı gözden kaçırabilir. Bu açıdan toplam aktivite sonucu, tağşiş değerlendirmesi noktasında arı orijinli diastaza spesifik sonuç üretemediğinden, yanlış uygunluk beyanının raporlanmasına neden olabilir. Yüksek diastaz aktivitesine sahip örneklerde yüksek korelasyon ile yabancı diastaz varlığı tespit edilmiştir.

## 3.17. Piyasa Örneklerinin Analizi ve Yabancı Diastaz Tespiti

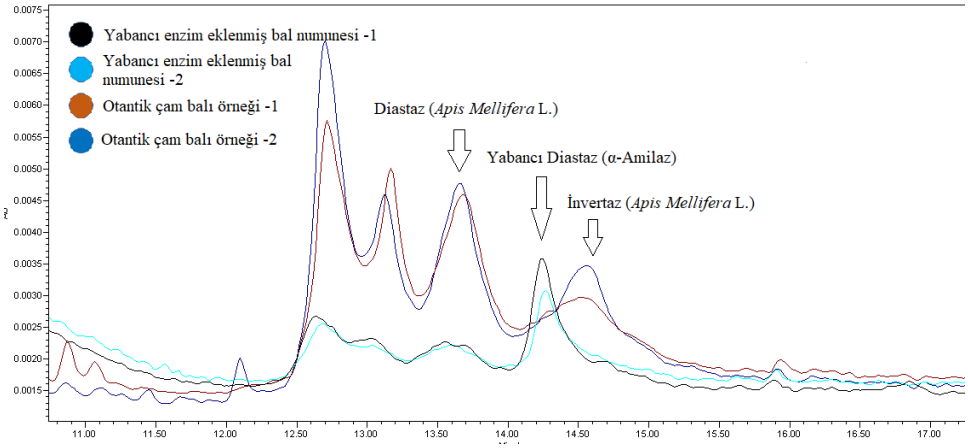
Geliştirilen HPLC-PDA enzim tespit yöntemi diastaz ve invertaz aktivitelerini tespit edebilmenin yanında doğal ve yabancı diastaz ayrımını dolayısı ile aktivitesini gösterebilmektedir. Şekil 3.41. ve Şekil 3.42.'de yapılan analiz sonuçlarında elde edilen görsellere yer verilmiştir. Şekil 3.41.'de yabancı diastaz varlığı tespit numunelerden temsili olarak seçilen 27 kodlu numune (DN:70; yabancı enzim eklenmiş bal numunesi-1 (siyah renklendirilmiş kromatogram) ve 21 kodlu numune (DN:33,3; yabancı enzim eklenmiş bal numunesi-1 (turkuaz renklendirilmiş kromatogram) ile birlikte doğal olduğu tespit edilmiş tağşişsiz 2 adet temsili bal örneği örnek kromatogramı yer almaktadır. Şekil 3.42.'de ise ballarda enzim tağşişinde kullanıldığı ön görülen ve

piyasadan kolaylıkla temin edilebilen fungal orijine sahip ısıya dayanıklı α-amilaz analiz sonucu, doğal ve tağşişli bal görselleri ile birlikte verilmektedir. Her iki görselde de saflaştırılmış diastaz ve invertaz enzimlerinin ortasına denk gelen bir alıkonma zamanına sahip (yaklaşık olarak 14,2 dakika) bir protein geçişi gözlemlenmektedir. Bu geçiş saf fungal amilaz da ve suni yükseklikteki diastaz aktivitesine sahip ballarda ortak olarak gözlemlenirken, otantik olarak değerlendirilebilecek ballarda bu bölgede belirgin bir sinyale rastlanmamıştır. Bu durum kalitatif olarak yabancı diastaz varlığının tespitini doğrulamaktadır. Piyasa numunelerinde yapılan analiz sonuçları Tablo 3.25.'de paylaşılmaktadır. Toplam diastaz ve yabancı diastaz görüntlemesi dışında %C4 varlığı mısır şurubu katkısının, AFGP ve sorbik asit sırası ile beyaz ve esmer pirinç şuruplarının katkısını ve BFF analizi ise pancar şurubu katkısını anlamak için analiz edilmiştir. Bu analiz sonuçları ile birlikte enzimin, şeker şurubu ile tağşiş edilmiş balın seyrelme etkisi ile düşen diastaz değerini geri kazanmak amaçlı da kullanılıp kullanılmayacağı aydınlatılmaya çalışılmıştır.

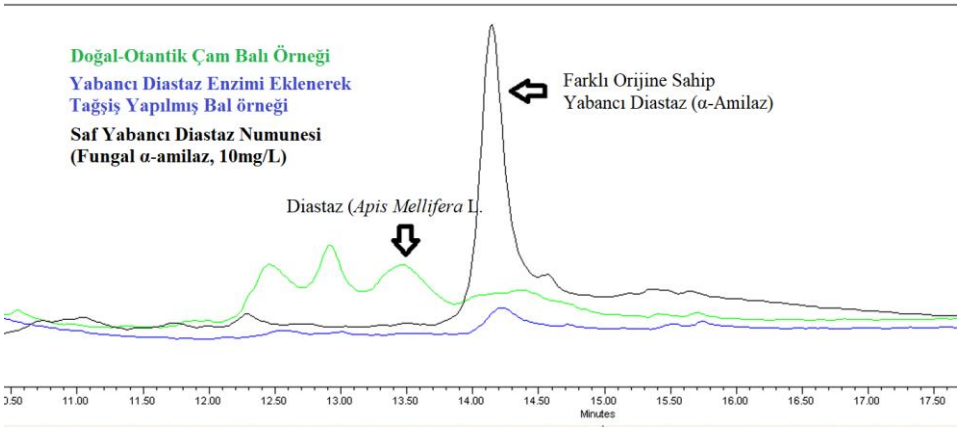
Sonuçlardan görüleceği üzere, yabancı diastaz açısından pozitif olarak tespit edilen toplam 44 numuneden, 21 numunede yanlızca enzim eklentisi görülürken geriye kalan 23 numunede ise 1 veya 1'den fazla orijindeki şeker şurupları ile eş zamanlı olarak yabancı enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Bu durum enzimin hem ısıl işlem sonrası düşen diastaz değerlerini yükseltmek hemde şuruplar ile seyrelmiş olan örneklerdeki düşük diastazı yükseltmek için kullanılabildiğini göstermektedir. Yabancı diastaz katkısı olan örneklerde ortak olarak tespit edilen bir diğer durum ise, doğal bal proteinlerinin çok düşük sinyallerde elde edilmesidir. Isıl işlem uygulanması veya taze olmayan ürün kaynaklı bal enzimlerinin ve diğer bal proteinlerinin denatürasyonu, degredasyonu beklenen bir durumdur. Şeker şurupları katkısı dolayısı ile bal proteinlerinin ve enzimlerinin seyrelmesi de bir diğer potansiyel tağşiş göstergesidir. Geliştirilen HPLC-PDA yönteminde bal proteinleri kromatografik olarak profillenmekte ve UV sinyalleri üzerinden aktiviteleri ve bollukları tespit edilmektedir. Analiz sonuçlarına göre yabancı diastaz tespit edilen tüm örneklerde ortak olarak düşük doğal diastaz ve diğer bal proteinlerinin varlığı gözlemlenmiştir. Bu durum enzim tağşişinin geliştirilen yeni yöntem ile tespiti açısından ikincil bir konfirmasyon noktası olarak addedilebilmektedir. Bahsedilen konfirmasyon yorumlaması Şekil 3.41.'deki örnek analiz kromatogramlarındaki yabancı diastaz tespit edilmiş olan turkuaz ve siyah

renklendirilmiş kromatogramlardan anlaşılabilmektedir. Bu örneklerde 45,5 ve 50 Schade U/g diastaz aktivitesi tespit edilmiş olmasına karşın, doğal diastaz piklerindeki ve diğer bal proteinlerindeki elde edilmiş olan düşük pik alanları ve bunun yanı sıra yabancı enzim alıkonma zamanındaki pozitif pik alanları, enzim tağşişinin güvenli şekilde gösterebilmektedir. Geliştirilen yöntem ile yapılan 107 adet bal örneği analizinde 44 numunede, baldaki ortalama diastaz aktivite değerlerinin çok üzerindeki yüksekliklerde diastaz aktiviteleri tespit edilmiştir (14,8 Schade U/g ortalama değer 107 adet numune spektrofotometrik diastaz aktivite analizi sonucunda elde edilmiştir, diastaz sayısı 8 altında olan sonuçlar balın otantik olmadığı gerekçesi ile ortalamaya dahil edilmemiştir. Ayrıca yabancı diastaz testinden pozitif sonuç olan örnekler de (44 adet) ortalama hesaplamasına dahil edilmemiştir). Gerçekçi olamayacak yükseklikteki bu diastaz değerlerinin suni bir yüksekliği temsil ettiği, geliştirilen yöntem doğrultusunda tespit edilen yabancı diastaz sinyalleri ile doğrulanabilmiştir. Yöntem ile yabancı diastaz için kalitatif sonuç verilebilmektedir.

Enzim tağşişinin hangi orijinden (organizmadan) elde edilmiş diastaz enzimi ile yapıldığı tam olarak bilenemediğinden ve aynı enzim orijininin farklı prosesleri ile ortaya çıkabilecek farklı aktivitedeki enzim ürünlerinin kullanılabilme potansiyeli dolayısı ile doğal arı orijinli diastaz varlığı haricindeki bu diastaz enzimleri için kantitatif sonuç verilememektedir. Bir diğer deyiş ile kantitatif şekilde doğruluğu yüksek aktivite sonucu verebilmek için, tağşiş odaklı kullanımda olan tüm diastaz enzim türleri için farklı kalibrasyon eğrilerinin çizimi gerekmektedir. Sadece arı orijinli diastaz ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri bu doğal enzimin kantitatif sonucunu verebilmekte iken farklı bir organizmadan elde edilmiş diastazın bal içindeki varlığı kromatografik ve kalitatif olarak tayin edilebilmektedir. Bu durum yüksek diastaz değerlerinin doğal veya suni şekilde oluştuğunu gösterebilmekte ve önemli bir tazelik ve de kalite parametresi olan diastaz aktvitesinin otantisite testlerinin özgünlüğüne uygun şekilde yapılabilmesinin önünü açmaktadır.




**Şekil 3.41.** Otantik ve enzim tağşişli bal örneklerinin karşılaştırmalı kromatogramları.




**Şekil 3.42.** Otantik çam balı örneğinin, yabancı enzim tağşişli bal örneğinin ve de saf yabancı diastaz (fungal orijinli amilaz, 10mg/L konsantrasyonunda, insect saline tamponu ile çözülerek hazırlanmıştır) örneğinin analizinden elde edilen kromatogramlar.

**Tablo 3.25.** Piyasadan tedarik edilen 107 bal örneğinde yapılan kolorimetrik diastaz aktivite (spektrofotometrik tayin) ve yabancı enzim (yabancı diastaz) tespit analiz sonuçları (HPLC-PDA yeni yöntem ile tayin).

| Numune Kodu | Diastaz Aktivitesi (Schade U/kg)- (T-AMZHY) (Aktivite Tabanlı Ölçüm Sonucu) | Yabancı Diaztaz Varlığı Değerlendirme (+/-)- (HPLC-PDA Yöntemi) | * β-FF Varlığı (U/kg) (Pancar şurubu katkısı) | ** %C4 Şeker (Mısır ve Şeker Kamışı orijinli şurup varlığı) | *** Pirinç Şurubu Varlığı (+/-) | ***Yorum*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | - | 3 | 5,5 | - | |
| 2 | 9,8 | - | 6,9 | 3,1 | - | |
| 3 | 9,8 | - | 3,9 | TLA | - | |
| 4 | 9,4 | - | 5 | TLA | - | |
| 5 | 3 | - | 2,2 | 4,4 | - | |
| 6 | 8,1 | - | 1,8 | 1,9 | - | |
| ***7*** | ***50*** | **+** | ***6,9*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 8 | 7,5 | - | 9,2 | TLA | - | |
| ***9*** | ***TLÜ*** | **+** | ***109,9*** | ***1,3*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 10 | 11,4 | - | 7,9 | TLA | - | |
| ***11*** | ***50*** | **+** | ***1,3*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 12 | 16,1 | - | 197,6 | TLA | - | |
| 13 | 14,3 | - | 9,2 | TLA | + | |
| 14 | 13,9 | - | 3,9 | TLA | - | |
| ***15*** | ***45,5*** | **+** | ***15,7*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 16 | 17,9 | - | 108,6 | TLA | + | |
| 17 | 8,1 | - | 3,9 | TLA | - | |
| ***18*** | ***43,5*** | **+** | ***5,2*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| ***19*** | ***TLÜ*** | **+** | ***2,6*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |

**Tablo 3.25.** Devam.

| Numune Kodu | Diastaz Aktivitesi (Schade U/kg)- (T-AMZHY) (Aktivite Tabanlı Ölçüm Sonucu) | Yabancı Diaztaz Varlığı Değerlendirme (+/-)- (HPLC-PDA Yöntemi) | * β-FF Varlığı (U/kg) (Pancar şurubu katkısı) | ** %C4 Şeker (Mısır ve Şeker Kamışı orijinli şurup varlığı) | *** Pirinç Şurubu Varlığı (+/-) | ***Yorum*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***20*** | ***43,5*** | **+** | ***136,1*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| ***21*** | ***33,3*** | **+** | ***3,8*** | ***0,6*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 22 | 20 | - | 117,8 | TLA | - | |
| ***23*** | ***70*** | **+** | ***3,7*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| ***24*** | ***50*** | **+** | ***1,6*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim ve pirinç şurubu tağşişi vardır*** |
| ***25*** | ***33,3*** | **+** | ***48,4*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim, pirinç ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 26 | 7,5 | - | 4,1 | TLA | - | |
| ***27*** | ***70*** | **+** | ***1,6*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 28 | 27,8 | - | 2 | 5,6 | - | |
| ***29*** | ***70*** | **+** | ***1,6*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| ***30*** | ***TLÜ*** | **+** | ***3*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| ***31*** | ***35,7*** | **+** | ***159,6*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 32 | 15,2 | - | 87,7 | TLA | - | |
| 33 | 14,7 | - | 226,4 | TLA | - | |
| 34 | 20 | - | 123 | TLA | - | |
| 35 | 1 | - | 1,3 | 81,6 | + | |
| 36 | 5,4 | - | 10,5 | TLA | - | |
| 37 | 5 | - | 3,7 | 2,6 | - | |
| ***38*** | ***70*** | **+** | ***17*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 39 | 11,9 | - | 3,1 | TLA | - | |
| ***40*** | ***70*** | **+** | ***26,2*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |

**Tablo 3.25.** Devam.

| Numune Kodu | Diastaz Aktivitesi (Schade U/kg)- (T-AMZHY) (Aktivite Tabanlı Ölçüm Sonucu) | Yabancı Diaztaz Varlığı Değerlendirme (+/-)- (HPLC-PDA Yöntemi) | * β-FF Varlığı (U/kg) (Pancar şurubu katkısı) | ** %C4 Şeker (Mısır ve Şeker Kamışı orijinli şurup varlığı) | *** Pirinç Şurubu Varlığı (+/-) | ***Yorum*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 41 | 1 | - | 1,4 | 73,3 | + | |
| 42 | 1 | - | 2,9 | 82,3 | + | |
| 43 | 12,8 | - | 209,4 | TLA | + | |
| 44 | 11,4 | - | 3 | TLA | - | |
| ***45*** | ***70*** | **+** | ***223,8*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| ***46*** | ***33,3*** | **+** | ***155,7*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 47 | 19,2 | - | 30,1 | TLA | - | |
| ***48*** | ***70*** | **+** | ***62,8*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim pirinç ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 49 | 1 | - | 1,7 | 73,3 | + | |
| ***50*** | ***TLÜ*** | **+** | ***5,2*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 51 | 5,4 | - | 3,1 | 2,5 | - | |
| ***52*** | ***70*** | **+** | ***4,1*** | ***12*** | **-** | ***Enzim ve mısır şurubu tağşişi vardır*** |
| ***53*** | ***50*** | **+** | ***5,5*** | ***1,4*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| ***54*** | ***70*** | **+** | ***0,7*** | ***9,6*** | **-** | ***Enzim ve mısır şurubu tağşişi vardır*** |
| ***55*** | ***35,7*** | **+** | ***17,5*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 56 | 13,5 | - | 5,9 | TLA | - | |
| ***57*** | ***45,5*** | **+** | ***0,4*** | ***8,8*** | **+** | ***Enzim pirinç ve mısır şurubu tağşişi vardır*** |
| ***58*** | ***31,3*** | **+** | ***3,9*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim ve pirinç şurubu tağşişi vardır*** |
| 59 | 10,9 | - | 2,9 | TLA | - | |
| 60 | 12,5 | - | 8 | TLA | - | |
| 61 | 5,4 | - | 2,6 | 1,9 | - | |
| ***62*** | ***45,5*** | **+** | ***6,5*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |

**Tablo 3.25.** Devam.

| Numune Kodu | Diastaz Aktivitesi (Schade U/kg)- (T-AMZHY) (Aktivite Tabanlı Ölçüm Sonucu) | Yabancı Diaztaz Varlığı Değerlendirme (+/-)- (HPLC-PDA Yöntemi) | * β-FF Varlığı (U/kg) (Pancar şurubu katkısı) | ** %C4 Şeker (Mısır ve Şeker Kamışı orijinli şurup varlığı) | *** Pirinç Şurubu Varlığı (+/-) | ***Yorum*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 63 | 10,4 | - | 1 | 0,6 | - | |
| 64 | 20,8 | - | 6,7 | TLA | - | |
| ***65*** | ***50*** | **+** | ***206,8*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim, pirinç ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| ***66*** | ***47,6*** | **+** | ***34,7*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| ***67*** | ***50*** | **+** | ***9,4*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim ve pirinç şurubu tağşişi vardır*** |
| ***68*** | ***50*** | **+** | ***185,8*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim pirinç ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 69 | 10,4 | - | 5 | TLA | - | |
| ***70*** | ***50*** | **+** | ***175,2*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 71 | 13,2 | - | 4,8 | TLA | - | |
| ***72*** | ***50*** | **+** | ***1,4*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 73 | 13,5 | - | 8,1 | TLA | + | |
| 74 | 10,9 | - | 6,7 | TLA | - | |
| ***75*** | ***50*** | **+** | ***29,8*** | ***TLA*** | **-** | ***Enzim ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 76 | 7,5 | - | 3,9 | 1,9 | - | |
| 77 | 7,1 | - | 13,3 | 1,3 | - | |
| 78 | 7,1 | - | 12,2 | 0,6 | - | |
| 79 | 5,9 | - | 1,7 | 4,8 | - | |
| 80 | 10,9 | - | 103 | TLA | + | |
| ***81*** | ***70*** | **+** | ***9,7*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 82 | 10,9 | - | 5,6 | TLA | + | |
| 83 | 5,4 | - | 6,4 | 2,5 | - | |

**Tablo 3.25.** Devam.

| Numune Kodu | Diastaz Aktivitesi (Schade U/kg)- (T-AMZHY) (Aktivite Tabanlı Ölçüm Sonucu) | Yabancı Diaztaz Varlığı Değerlendirme (+/-)- (HPLC-PDA Yöntemi) | * β-FF Varlığı (U/kg) (Pancar şurubu katkısı) | ** %C4 Şeker (Mısır ve Şeker Kamışı orijinli şurup varlığı) | *** Pirinç Şurubu Varlığı (+/-) | ***Yorum*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***84*** | ***33,3*** | **+** | ***4,6*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim ve pirinç şurubu tağşişi vardır*** |
| 85 | 4,5 | - | 11 | 1,3 | - | |
| 86 | 1 | - | 1,4 | 15 | - | |
| ***87*** | ***50*** | **+** | ***16,4*** | ***1,4*** | **+** | ***Enzim ve pirinç şurubu tağşişi vardır*** |
| ***88*** | ***33,3*** | **+** | ***27*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim, pirinç ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| ***89*** | ***TLÜ*** | **+** | ***20,4*** | ***TLA*** | **+** | ***Enzim, pirinç ve pancar şurubu tağşişi vardır*** |
| 90 | 26,3 | - | 15,4 | TLA | - | |
| 91 | 9,8 | - | 9,8 | TLA | - | |
| 92 | 10,9 | - | 3,9 | TLA | - | |
| 93 | 20,8 | - | 1,6 | TLA | - | |
| ***94*** | ***TLÜ*** | **+** | ***0,8*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 95 | 11,9 | - | 4,2 | TLA | - | |
| 96 | 14,3 | - | 5,2 | 0,7 | - | |
| 97 | 9,1 | - | 213,2 | 0 | - | |
| 98 | 25 | - | -1 | 4,4 | - | |
| ***99*** | ***TLÜ*** | **+** | ***3,9*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 100 | 18,5 | - | 164,4 | TLA | - | |
| 101 | 11,4 | - | 2,1 | TLA | - | |
| 102 | 7,5 | - | 1,4 | 7,4 | - | |
| 103 | 12,5 | - | 47,5 | TLA | - | |

**Tablo 3.25.** Devam.

| Numune Kodu | Diastaz Aktivitesi (Schade U/kg)- (T-AMZHY) (Aktivite Tabanlı Ölçüm Sonucu) | Yabancı Diaztaz Varlığı Değerlendirme (+/-)- (HPLC-PDA Yöntemi) | * β-FF Varlığı (U/kg) (Pancar şurubu katkısı) | ** %C4 Şeker (Mısır ve Şeker Kamışı orijinli şurup varlığı) | *** Pirinç Şurubu Varlığı (+/-) | ***Yorum*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***104*** | ***31,3*** | **+** | ***1,3*** | ***TLA*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| ***105*** | ***33,3*** | **+** | ***7,7*** | ***6,7*** | **-** | ***Sadece enzim tağşişi mevcuttur*** |
| 106 | 45,5 | - | 26,2 | TLA | + | |
| 107 | 5,9 | - | TLA | TLA | - | |

TLÜ; Tespit Üst-Limiti Üzerinde yüksek diastaz aktivitesi mevcuttur, TLA; Tespit Limiti Altında, (+/-); Kalitatif olarak yabancı enzim varlığı tespit edilme sonucu, 44 numunede (koyu renk ile işaretlenmiş satırlar) yabancı diastaz varlığı tespit edilmiştir, * BFF analizlerinde 20 U/kg LOQ değeri olarak belirlenmiş olup, bu değer üzerindeki sonuçlar pancar şurubu ile tağşiş edilmiş bal numunesini göstermektedir., ** %7 üzerindeki C4 sonuçları numunede mısır veya şeker kamışı orjinli şeker şurubu olduğunu göstermektedir., *** Sorbik asit esmer pirinç şurubu varlığını ve AFGP beyaz pirinç şurubu varlığını gösteren işaretçi bileşenler olup her ikisinin de varlığı pirinç şurubu eklentisini analiz edilmiştir.

# 4. SONUÇLAR

## 4.1. Genel Sonuç

Geliştirilen yöntem hidrolitik aktiviteye sahip α-amilaz ve α-glukosidaz enzimleri için kantitiatif ve kalitatif analiz imkanı sağlamaktadır ve benzer matriksler ile protein veya enzim çalışmalarına ışık tutcak cinstedir. Çalışmanın hedefleri içerisinde yer alan α-amilaz ve α-glukosidaz enzimlerinin çam balı ve HPG'den izole edilmesi ve saflaştırılan enzimlerin referans standartlar olarak kullanılması, HPLC sistemleri ile direk tespit yöntemi, analitik kimya alanındaki bir yenilik olmak ile birlikte ticari açıdan da pek çok laboratuvara pratik, maliyetsiz, hassas ve tutarlı sonuç üretebilme imkanı sağlamaktadır. Protein ve enzim saflaştırma uygulamalarını, ağırlıklı olarak ilaç endüstrisinde alt akım işlemlerinde biyobenzer ilaç üretiminde, immunoloji tabanlı araştırma çalışmalarında veya protein tanımlaması için proteomiks odaklı çalışmalarda sıklıkla görebilmekteyiz. Gıdalar içerisinde yer alan enzim, peptit ve proteinlerin yapı, orijin, aktivite tayini gibi amaçlar için kullanılan proteomik ve pürifikasyon temelli teknikler, arı ürünlerinde, ulusal düzeyde fazla kullanılmamıştır. Çalışma kapsamında ülkemiz için özgün olan ve ağrılıklı olarak Ege bölgesinde üretilen çam balında protein saflaştırma ve tanımlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *Apis mellifera* L. ve çam balı orijinli enzimler ticari olarak mevcut değildir. Bu yüzden pratik, eş zamanlı ve kısa süreli diastaz ve invertaz görüntüleme yöntemi için bahsi geçen enzimler HPG ve bal matrikslerinden izole edilmiş ve yüksek geri kazanımlı şekilde saflaştırılmıştır. Bu sayede farklı orijinlerde ticari olarak mevcut diastaz ve invertaz hidrolitik enzimlerine doğal alternatifler kazandırılmıştır. Saflaştırılan enzimler ilgili laboratuvarlar tarafından, kalite kontrol süreçlerinde referans standartlar olarak kullanılabileceği gibi, bu enzimleri üretim basamaklarında kullanan firma ve kuruluşlar için çalışma ölçeklendirilip yüksek hacim ve konsantrasyonda enzim üretimi sağlanabilecektir. Türkiye'de ve de literatürde, bu enzim grubuna ilişkin geliştirilmiş, direk enzim tespit yöntemi henüz bulunmamak ile birlikte, geliştirilen metodoloji ve diastaz / invertaz pürifikasyon yöntemi ile birlikte referans analitik standart olarak kullanımı yurtdışı laboratuvarlar için de büyük bir yenilik teşkil etmektedir. Maliyetli kitler veya substratlar yerine, enzimlerin direk olarak bal matriksinde, HPLC-PDA tabanlı yöntem kullanılarak hem daha hassas hem de seçiciliği daha yüksek aktivite yerine her bir

enzimin tek bir enjeksiyonda eş zamanlı raporlayabilen özgüllüğü yüksek bir metot geliştirilmiştir. Bu yöntem maliyeti düşük, pratik, hızlı, hassas ve dışa bağımlı olmayan rutin kalite kontrol faaliyeti gerçekleştiren laboratuvarların iş yükünü azaltacak niteliktedir. Yöntem, ülkemiz açısından bilimsel alanda prestij kazandıracak ve ekonomik açıdan dışa bağımlı olduğumuz analiz kitleri ve sarf malzeme ihtiyacını azaltacak etkiye sahiptir. Ayrıca referans nitelik taşıyacak bu yöntem diğer gıda ürünlerindeki enzimlerin analizinde, yurt içi ve yurt dışı laboratuvarlar için de yüksek katkı sağlayabilecek ve bu açıdan da ülkemize katma değer ve itibar kazandırabilecek formattadır. Saflaştırılmış enzim profili, doğal bal enzim profili ile eşleştirilmiş ve şeker şurubu veya direk enzim eklentisi şeklinde tağşiş edilen ballardaki enzimlerden farklı ve doğal bir spektrum profili oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu bakımdan yöntem eş zamanlı olarak enzim tağşişlerini de tespit edebilmektedir. Farklı orjinlerden elde edilen veya sentetik şekilde üretilen, α-amilaz ve α-glukosidaz hidrolitik enzimler olarak gıda sektöründe nişasta ve farklı polisakkaritleri işlemekte kullanılmaktadır. Bu bağlamda tağşiş tespiti açısından oldukça zor bir matriks olan bal örnekleri için doğruluğu yüksek bir tağşiş tespit yönteminin temelleri de atılmıştır.

## 4.2. Öneriler

Tağşiş tespiti noktasında sadece arı ürünlerinde değil pek çok gıda ürününde bütünsel bir analitik yaklaşım uygulanması gerekmektedir. Gıdalar mikro ve makronütrientleri geniş bir dinamik konsantrasyon aralığında barındırması bakımından zengin ve oldukça kompleks matrikslerdir. Bu sebepten, moleküler düzeyde yapılacak araştırmalar sadece küçük molekül ağırlığına sahip organik ve inorganik bileşenleri değil, oligosakkarit, polisakkarit veya peptit, protein gibi görece büyük biyopolimerleri de içermelidir. Bu bakımdan gerçekleştirmiş olduğumuz çalışma da enzimler model proteinler olarak tanımlanabilir ve geliştirilen saflaştırma ve tanımlama metodolojileri taslak olarak değerlendirilip amaca uygun şekilde modifiye edilerek protein/peptit tabanlı çalışmalar biyoaktivite tanımlanması ve/veya tağşiş işaretçilerinin belirlenmesi amacı ile tüm gıda ürünlerinde gerçekleştirilebilir. Arı ürünlerindeki potansiyel tağşiş türlerinin tespiti ile ilgili çalışma sayısı ve çeşitliliği arttıkça arıcılık kültür seviyesi, tüketici bilinci ile doğru orantılı şekilde artacaktır. Arı ürünlerinin ticari aktivitesi noktasında tağşiş tespitinin pratik şekilde yapılabilmesi ve bu geliştirilen tekniklerin

konu ile ilgili tüm laboratuvarlarda uygulanabilir şekilde yaygınlaştırılması, ülke ekonomisine ve itibarına olumsuz etkileri olan bu tarz uygulamaların önüne geçebilmek için elzemdir. Bal ve diğer arı ürünleri ile ilgili akademi ve özel sektörde yapılacak ileri analitik araştırmalar, sağlık faydaları pek çok çalışma ile ispatlanmış olan kıymetli arı ürünlerinin güvenli ve tüketici sağlığını ön planda tutan şekilde tüketimini sağlayacaktır. Yanlızca tağşiş tespiti odaklı olmayan, bal ve diğer arı ürünlerinde biyoaktif bileşenlerin keşfedilmesi ve bu bileşenlerin *in-vivo* / *in-vitro* testleri ile ileri ölçekte araştırmaların da çalışma kapsamlarına dahil edilmesi ülkemiz açısından ciddi kazanımlara yol açabilecek yaklaşımlar olacaktır.

# KAYNAKLAR

**[1]** Seeley, T.D., Morse, R.A., (1976), The nest of the honey bee (Apis mellifera L.). Insectes Sociaux, 23, 495–512. https://doi.org/10.1007/BF02223477.

**[2]** Crane, E., (1999), 'The World History of Beekeeping and Honey Hunting'. Routledge inc., New York, NY. https://doi.org/10.4324/9780203819937.

**[3]** Dezmirean, G.I., Mărghitaş, L.A., & Dezmirean, D.S.,(2011), Honey like component of functional food. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 44(2),406-411.

**[4]** Zumla, A., Lulat, A., (1989), Honey - A Remedy Rediscovered. Journal of the Royal Society of Medicine, 82(7):384-385. https://doi.org/10.1177/014107688908200704.

**[5]** Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.N., (1999), Microbiology. 4th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 685. https://www.mheducation.com/unitas/highered/sample-chapters/9781260211887.pdf.

**[6]** Molassiotis, A., Fernández-Ortega, P., Pud, D., Ozden, G., Scott, J.A., Panteli, V., Margulies, A., Browall, M., Magri, M., Selvekerova, S., Madsen, E., Milovics, L., Bruyns, I., Gudmundsdottir, G., Hummerston, S., Ahmad, A.M., Platin, N., Kearney, N., Patiraki, E., (2005), Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. Annals of Oncology, 16(4):655-63. https://doi.org/10.1093/annonc/mdi110.

**[7]** Jaganathan, S.K., Mandal, M. (2009), Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 830616. https://doi.org/10.1155/2009/830616.

**[8]** Alzahrani, H.A., Boukraa, L., Bellik, Y., Abdellah, F., Bakhotmah, B.A., Kolayli, S., Sahin, H., (2012), Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of

honey from different botanical and geographical origins. Global Journal of Health Science, 10;4(6):191-6. https://doi.org/10.5539/gjhs.v4n6p191.

**[9]** Rebane, R., Herodes, K., (2008), Evaluation of the Botanical Origin of Estonian Uni- and Polyfloral Honeys by Amino Acid Content, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 22, 10716–10720. https://doi.org/10.1021/jf8018968.

**[10]** Lee, D.C., Lee, S.Y., Cha, S.H., Choi, Y.-S., & Rhee, H.I., (1998), Discrimination of native bee-honey and foreign bee-honey by SDS-PAGE. Korean Journal of Food Science and Technology, 30(1), 1-5. https://www.semanticscholar.org/paper/Discrimination-of-native-bee-honey-and-foreign-by-Lee-Lee/d4ea8658eb1d33cd17d62da919b6f4e39186750a.

**[11]** Adebiyi, F.M., Akpan I., Obiajunwa E.I., & Olaniyi H.B., (2004), Chemical/Physical Characterization of Nigerian Honey. Pakistan Journal of Nutrition, 3: 278-281. https://doi.org/10.3923/pjn.2004.278.281.

**[12]** Doner, L.W., (1977), The sugars of honey – a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 28, 443–456. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508.

**[13]** Anklam, E., (1998), A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey. Food Chemistry, 63, 549-562. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0.

**[14]** Marshall, T. & Williams K.M., (1987), Electrophoresis of honey: characterization of trace proteins from a complex biological matrix by silver staining. Analytical Biochemistry, 167, 301–303. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90168-0.

**[15]** Won, S.R., Lee, D.C., Ko, S. H., Kim, J.W., & Rhee, H.I., (2008), Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. Food Research International, 41(10), 952-956. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.014.

**[16]** Schmitzova´, J., Klaudiny, J., Albert, Sˇ., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Ju´dova´, J., Simuth, J., (1998), A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera L. Cellular and Molecular Life Sciences, 54, 1020–1030. https://doi.org/10.1007/s000180050229.

**[17]** Majtán, J., Kovácová, E., Bíliková, K., Simúth, J., (2006), The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNF-alpha release. International Immunopharmacology, 6(2):269-78. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.08.014.

**[18]** Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2006), Bioactive Peptides: Production and Functionality. International Dairy Journal, 16, 945-960. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012.

**[19]** Kitts, D.D., Weiler, K., (2003), Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Current Pharmaceutical Design; 9(16):1309-23. https://doi.org/10.2174/1381612033454883.

**[20]** Gilani, G.S., Xiao, C., & Lee, N., (2008), Need for Accurate and Standardized Determination of Amino Acids and Bioactive Peptides for Evaluating Protein Quality and Potential Health Effects of Foods and Dietary Supplements. Journal of AOAC International, 91, 894-900. https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.894.

**[21]** Agyei, D., & Danquah, M.K., (2012), Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. Trends in Food Science and Technology, 23(2), 62–69. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.010.

**[22]** White, J.W., (1975), Composition of honey. Honey: A Comprehensive Survey (ed. by E. Crane), pp. 180–194. Heinemann, U.K. ISBN: 9780434902705, 0434902705, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082198/.

**[23]** Chua, L.S., Lee, J.Y., Chan, G.F., (2013), Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 3063–3074. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6630-2.

**[24]** Crane, E., (1990), Bees and Beekeeping – Science, Practice and World Resources. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York. Bath Press Ltd. Avon, p 614. https://doi.org/10.5860/choice.28-2129.

**[25]** Swallow, K.W., Low, N.H., (1990), Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38, 1828–1832. https://doi.org/10.1021/jf00099a009.

**[26]** Low, N.H., & South, W., (1995), Determination of honey authenticity by capillary gas chromatography. Journal of AOAC International, 77:1210-1218. https://doi.org/10.1093/jaoac/78.5.1210.

**[27]** Siddiqui, L.R., & Furgaia B., (1967), Isolation and characterization of Oligosaccharides from honey, Part 1, Disaccharides. Journal of Apicultural Research. 6:IB-145. https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100174.

**[28]** Siddiqui, L.R., & Furgaia B., (1968), Isolation and characterization of oligosaccharides from honey, Part II, Trisaccharides. Journal of Apicultural Research. 751-59. https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100174.

**[29]** Takenaka, T., Ito, H., Yatsunami, K., & Echigo, T., (1990a), Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during the lifespan of honey bee workers (Apis mellifera L.). Agricultural and Biological Chemistry, 54, 2133–2134. https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870255.

**[30]** Huber, R.E, Mathison, R.D., (1976), Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees. Canadian Journal of Biochemistry, 54:153–64. https://doi.org/10.1139/o76-023.

**[31]** Gilliam, M., Lorenz, B.J., & Richardson, G.V., (1988), Digestive enzymes and mimorganisms in honey bees, Apis mellifera: influence of streptomycin, age, season and pollen, Microbios,55:95-1-14.
https://www.semanticscholar.org/paper/Digestive-enzymes-and-micro-organisms-in-honey-Apis-Gilliam-Lorenz/d8e34912613fe80160f63ace2fb32fbde140647f.

**[32]** Megazyme, (2007),High Sensitivity Method for The Measurement of α-Amylase In Cereal Grains and Food (AOAC Method 2002.01 AACC Method 22-02.01 ICC Standard No. 303) Products. Assay procedure. Megazyme International Ireland Ltd.

**[33]** Megazyme, (2007), For the Measurement of Plant and Microbıal α-Amylases (Ceralpha Method), (AOAC Method 2002.01 AACC Method 22-02.01 ICC Standard No. 303), Assay procedure. Megazyme International Ireland Ltd.

**[34]** Megazyme, (2007), For the Measurement of Cereal and Microbial α-Amylase (ICC Standard No. 303), Assay procedure, Megazyme International Ireland Ltd.

**[35]** Megazyme, (2007), Diastase activity (α-amylase) in honey. Assay procedure. Megazyme International Ireland Ltd.

**[36]** Pasias, I.N., Kiriakou, I.K., Proestos, C., (2017), HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. Food Chemistry, 15;229:425-431. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.084.

**[37]** AOAC 958.09-1977, (2010), Diastatic activity of honey.

**[38]** Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., Re, E., (2008), Honey diastase activity modified by heating. Food Chemistry, 106: 883-887. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.025.

**[39]** Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C., Borneck, R., Flamini, Ch., Morlot, M., Heretier, J., Vorwohl, G. Russmann, H., Persano-Oddo, L., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., Marioleas, P., Tsigouri, K., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., (1997), Harmonised methods of the European honey commission, Apidologie(extra issue).1-59, https://www.researchgate.net/profile/StefanBogdanov/publication/292092907_Harmonised_methods_of_the_European_Honey_Commission/links/5762b07208ae0eda64310e21/Harmonised-methods-of-the-European-Honey-Commission.pdf.

**[40]** Sak-Bosnar, M., Sakac, N., (2012), Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. Food Chemistry, 135(2): 827-831. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.006.

**[41]** Al-Sherif, A.A., Mazeed, A.M., Ewis, M.A., Nafea, E.A., Hagag, E.S.E., Kamel, A.A., (2017), Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two

subspecies of honeybee (Apis mellifera L). Physiological Entomology, 42(4): 397–403. https://doi.org/10.1111/phen.12213.

**[42]** Bernfeld, P., (1955), Amylases, α and β. Methods in Enzymology, 1, 149–158. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5.

**[43]** Ohashi, K., Natori, S., & Kubo, T., (1999), Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (Apis mellifera L.). European Journal of Biochemistry, 265, 127–133. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00696.x.

**[44]** Babacan, S., Rand, A.G., (2007), Characterization of honey amylase. Journal of Food Science 72: C50-55. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00215.x.

**[45]** Přidal, A., Vorlová, L., (2002), Honey and its physical parameters. Czech Journal of Animal Science, 47: 439-444. ISSN/ISBN: 1212-1819, Accession: 003796567.

**[46]** Voldřich, M., Rajchl, A., Čížková, H., Cuhra, P., (2009), Detection of foreign enzyme addition into the adulterated honey. Czech Journal of Food Sciences,, 27: 280-282. https://doi.org/10.17221/1066-CJFS.

**[47]** Zábrodská, B., Vorlová, L., (2014), Adulteration of honey and available methods for detection—A review. Acta Veterinaria Brno, 83:85–102. https://doi.org/10.2754/AVB201483S10S85.

**[48]** Saxena, S., Gautam,S., (2017), A Preliminary Cost Effective Qualitative Assay for Diastase Analysis in Honey. Insights in Enzyme Research, 1:1. https://doi.org/10.21767/2573-4466.100007.

**[49]** Bendelow, V.M., (1963), Modified Procedure for the Determination of Diastatic Activity and α-Amylase Activity, Journal of Institute of Brewing, Issue 6, 69:467-472. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1963.tb01954.x.

**[50]** Huang, Z., Liu, L., Li, G., Li, H., Ye, D., Li, X., (2019), Nondestructive Determination of Diastase Activity of Honey Based on Visible and Near-Infrared Spectroscopy. Molecules., 24(7):1244. https://doi.org/10.3390/molecules24071244.

**[51]** Joanna, K., Adam, G., Marianna, K., (2017), Determination of the diastase activity in honeys, Technical Transactions, 114, vol. 8, 29-35. https://repozytorium.biblos.pk.edu.pl/redo/resources/28435/file/suwFiles/KucJ_DeterminationDiastase.pdf.

**[52]** White, J.W., Kushnir, I., (1967), The enzymes of honey: examination by ion-exchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis. Journal of Apicultural Research, 6:69–89. https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100163.

**[53]** Bogdanov, S., (2009), Harmonized methods of the International Honey Commission. https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf.

**[54]** Ana Pascual-Maté, A., Pascual-Maté, Sandra M Osés, S., Osés, M., Miguel, A., Fernández-Muiño, M.A., Fernández-Muiño, A., & M. Teresa Sancho, M., Teresa Sancho, T., (2018), Methods of analysis of honey. Journal of apicultural research, 57, 38-74. https://doi.org/10.1080/00218839.2017.14111178.

**[55]** Hristov, D.D., Todorov, I.V., (2001), Invertase Activity In Bulgarian Multifloral and Honeydew Honeys, Apiacta, 36(2), 57-61. https://www.researchgate.net/publication/258325277_Invertase_activity_in_Bulgarian_multifloral_and_honeydew_honeys.

**[56]** Oddo, L.P., Piazza, M.G., & Pulcini, P., (1999), Invertase activity in honey. Apidoiogie, 3057-65. https://doi.org/10.1051/APIDO:19990107.

**[57]** Nishimoto, M., Kubota, M., Tsuji, M., Mori, H., Kimura, A., Matsui, H., Chiba, S., (2001), Purification and substrate specificity of honeybee, Apis mellifera L., α-glucosidase III. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65(7):1610-6. https://doi.org/10.1271/bbb.65.1610.

**[58]** Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., & Nagashima, T., Tanoue, Y., & Kai, N., (2012), Characterization of α-amylase from mandarin orange honey, Journal of Apicultural Research, 51:1, 3-9. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.02.

**[59]** Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., & Nagashima, T., (2009), α-Amylase from Persimmon Honey: Purification and Characterization, International Journal of Food Properties, 12:3, 512-521. https://doi.org/10.1080/10942910701867764.

**[60]** Li, J., Feng, M., Zhang, Z., Pan, Y., (2008), Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (Apis mellifera). Apidologie, 39(2), pp.199-214. https://doi.org/10.1051/apido:2007059.

**[61]** Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., & Nagashima, T., (2008), Purification and Characterization of α-Amylase from Honeydew Honey, International Journal of Food Properties, 11:1, 137-145. https://doi.org/10.1080/10942910701272338.

**[62]** Cruz-Landim, C.D., Dallacqua, R.P., (2005), Morphology and protein patterns of honey bee drone accessory glands. Genetics and Molecular Research, 4(3):473-81. ISSN/ISBN: 1676-5680, PMID: 16342031, Accession: 004452917, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16342031/.

**[63]** Bocian, A., Buczkowicz, J., Jaromin, M., Hus, K.K., Legáth, J., (2019), An Effective Method of Isolating Honey Proteins. Molecules, 24(13):2399. https://doi.org/10.3390/molecules24132399.

**[64]** Babacan, S., & Rand, A.G., (2005), Purification of amylase from honey. Journal of Food Science, 70(6), c413-c418. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11439.x.

**[65]** Di Girolamo, F., D'Amato, A., Righetti, P.G., (2012), Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. Journal of Proteomics, 75(12):3688-93. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.029.

**[66]** Kubo, T., Sasaki, M., Nakamura, J., Sasagawa, H., Ohashi, K., Takeuchi, H., & Natori, S., (1996), Change in the Expression of Hypopharyngeal-Gland Proteins of the

Worker Honeybees (Apis melliferaL.) with Age and/or Role. The Journal of Biochemistry, 119:2, 291-295. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021237.

**[67]** Kubota, M., Tsuji, M., Nishimoto, M., Wongchawalit, J., Okuyama, M., Mori, H., Matsui, H., Surarit, R., Svasti, J., Kimura, A., (2004), Localization of α-Glucosidases I, II, and III in Organs of European Honeybees, Apis mellifera L., and the Origin of α-Glucosidase in Honey. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68, 2346–2352. https://doi.org/10.1271/bbb.68.2346.

**[68]** Rossano, R., Larocca, M., Polito, T., Perna, A.M., Padula, M.C., Martelli, G., (2012), What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They Do Tell Us? A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys. PLoS ONE 7(11): e49164. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049164.

**[69]** Babacan, S., Pivarnik, L.F., Rand, A.G.., (2006), Honey Amylase Activity and Food Starch Degradation, Journal of Food Science, Volume 67, Issue 5, Pages 1625-1630. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08695.x.

**[70]** Pontoh, J., Low, N.H., (2002), Purification and characterization of β-glucosidase from honey bees (Apis mellifera), Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32,; 6, 679-690, https://doi.org/10.1016/s0965-1748(01)00147-3.

**[71]** White, J.W.Jr., (1978), Honey. Advances in Food Research 24:288. https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3.

**[72]** Sorkun, K., Doğan, C., (2002), The importance of the total number of pollen types in 10g of honey in distinguishing between natural honey and artificial honey produced in Turkey. Mellifera 2-3: 34-38.

**[73]** Doner, L. W., (1991), The enzymes of honey. In: "Food Enzymology, Volume 2". P.F.Fox (ed). Elsevier, London, UK. pp 143-16 1.

**[74]** White, J.W., (1992), Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. Bee World Journal: 792–4. https://doi.org/10.1080/0005772X.1994.11099213.

**[75]** Sporns, P., (1992), Honey analysis, In: Hui YH, editor. Encyclopedia of food science and technology. Vol.2, p;1417–22. ISBN:978-0-471-19285-5. Https://www.wiley.com/enus/Wiley+Encyclopedia+of+Food+Science+and+Technology%2C+4+Volume+Set%2C+2nd+Edition-p-9780471192855.

**[76]** Low, N.H., Vong, KV., & Spom, P., (1986), A new enzyme, β-glucosidase. in honey. Journal of Apicultural Research, 25: 178-181. https://doi.org/10.1080/00218839.1986.11100713.

**[77]** Özmen, A. ve Alkın, B., (2006), Balın Antimikrobiyel Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Uludağ Arıcılık Dergisi. 4: 155-160. https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/143535.

**[78]** Sanz, M.L., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., & Martınez-Castro, I., (2005), A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey.Food Chemistry, 91(2),313-317.Https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.013.

**[79]** Bacandritsos, N., Saitanis, C., Papanastasiou, I., (2004), Morphology and life cycle of Marchalina hellenica (Gennadius) (Hemiptera: Margarodidae) on pine (Parnis Mt.) and fir (Helmos Mt.) forests of Greece. Annals Societe Entomologique France, 40: 169-176. https://doi.org/10.1080/00379271.2004.10697413.

**[80]** Ünal, S., Ayan, S., Karadeniz, M., Yer, E.N., (2017), Some forest trees for honeydew honey production in Turkey // Sibirskij Lesnoj Zurnal, Siberian Journal of Forest Science., N. 4: 101–110. https://doi.org/10.15372/SJFS20170409.

**[81]** Gürkan, B., Bogelmez, A., (1989), Bioecology and population dynamics of the pine scale Marchalina hellenica (Gennadius). PhD thesis, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 87 pp.

**[82]** Bayraktar, D., Altuğ-Onoğur, T., (2011), Investigation of the aroma impact volatiles in Turkish pine honey samples produced in Marmaris, Datça and Fethiye regions by SPME/GC/MS technique. International Journal of Food Science & Technology, 46, 1060-1065. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02588.x.

**[83]** Tananaki, C., Thrasyvoulou, A., Giraudel, J., Montury M., (2007), Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps, Food Chemistry, 101 (4), pp. 1687-1693. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.042.

**[84]** Pyrzynska, K., Biesaga, M., (2009), Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 28, Issue 7, Pages 893-902. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015.

**[85]** Lachman J., Orsák M., Hejtmánková A., Kovářová E., (2010), Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. LWT - Food Science and Technology, 43(1):52–58. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.008.

**[86]** Haroun, M.I., Poyrazoglu, S.E., Konar, N., & Artik, N., (2012), Phenolic Acids and Flavonoids Profiles of Some Turkish Honeydew and Floral Honeys. Journal of Food Technology, 10: 39-45. https://doi.org/10.3923/jftech.2012.39.45.

**[87]** Silici, S., (2011), "Determination of volatile compounds of pine honeys," *Turkish Journal of Biology*: Vol. 35: No. 5, Article 14. https://doi.org/10.3906/biy-1009-112.

**[88]** Gruszka, I., (1998), "Beekeeping in Western Canada". Alberta Agriculture, Food and Rural Development, PubLishing Branch, Edmonton, AB. https://ia802705.us.archive.org/21/items/beekeepinginwest00grus/beekeepinginwest00grus.pdf.

**[89]** Shuel, R.W., (1992), The production of nectar and pollen. In: 'The Hive and the Honey Bee", J.M. Graham (ed). Dadant & Sons, Hamilton, IL. pp 40 1-436. https://pages.charlotte.edu/wpcontent/uploads/sites/28/2012/02/Schneider-Chap.-4-Hive-and-Honey-Bee-2015.pdf.

**[90]** Baker, H.G., & Baker, I., (1983), A brieE historical review of the chernistry of floral nectar. In: 'The Biology of Nectaries", B. Benciey and T. E h s (eds), Columbia University Press. New York, NY. pp 126- 152. ISBN: 9780231044462, https://cup.columbia.edu/book/the-biology-of-nectaries/9780231044462.

**[91]** Butler, G.D., Loper, G.M., McGregor, S.E., Webster, J.L., & Margoüs, H., (1972), Amounts and Kinds of Sugars in the Nectars of Cotton (Gossypium spp.) and the Time of Their Secretion, Agronomy Journal, 64364-368. https://doi.org/10.2134/AGRONJ1972.00021962006400030033X.

**[92]** Morse, R.A., & Calderone, N.W., (2000), The value of honey bees as pollinators of US crops m 20. Bee Culture, 1-15. https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/pollinators/documents/ValueofHoneyBeesasPollinators-2000Report.pdf.

**[93]** Scott-Dupree, C., Winston, M., Hergert, G., Say, S.C., Nelson, D., Gates, J., Temeer, B., & Otis, C., (1995), A Guide to Managing Bees for Crop Pollination Canadian Assoc. of Professional. Apiculturists, Guelph, ON. https://capabees.com/shared/2012/10/CAPAcroppollination.pdf.

**[94]** Klinghardt, D., (1999), Neural therapy with bee-venom. in: Proceedings', Congress. Internat, Fed of Beekeeping' Ass. Vancouver, BC. pp 75-77. https://wellspringofhealth.com/wp-content/uploads/2015/08/Bee-Venom-Therapy-for-Chronic-Pain-1990-Klinghardt.pdf.

**[95]** Crane, E., (1992), The worId's beekeeping - past and present. In: 'The Hive and the Honey Bee, Revised Edition" AM. Graham (ed). Dadant & Sons, Hamilton, IL. p;1-22.Https://books.google.com.tr/books/about/The_Hive_and_the_Honey_Bee.html?id=jcM9AAAAIAAJ&redir_esc=y.

**[96]** Herbert, E.W., (1992), Honey bee nutrition. In: 'The Hive and the Honey Bee", J.M.Graham (ed). Dadant & Sons, Hamilton, IL. pp 197-233. https://books.google.com.tr/books/about/The_Hive_and_the_Honey_Bee.html?id=jcM9AAAAIAAJ&redir_esc=y.

**[97]** Snodgrass, R.E., & Erickson, E.H., (1992), The anatomy of the honey bee. In: 'The Hive and the Honey Bee", LM.Graham. (ed). Dadant & Sons, Hamilton, IL.103-169. https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT31027153/pdf.

**[98]** Simpson, J., Riedel, I.B., & Wilding, N., (1968), Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. Journal of Apicultural Research, 7, 29–36. https://doi.org/10.1080/00218839.1968.11100184.

**[99]** Moritz, B., & Crailsheim, K., (1987), Physiology of protein digestion in the midgut of the honey bee (Apismellifera L.). Journal of Insect Physiology, 33:923-931. https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90004-7.

**[100]** Peng, Y., & Marston, J.M., (1986), Filtering mechanism of the honey bee proventriculus. Physiological Entomology, 11:433-439. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1986.tb00434.x.

**[101]** Crailsheim, K., (1988a), Regdation of food passage in the intestine of the honeybee (Apis meitifera L.). Journal of Insect Physiology, 34:85-90. https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90158-8.

**[102]** Crailsheim, K., (1988b), Intestinal transport of sugars in the honeybee (Apis mellifera L), Journal of Insect Physiology, 34839-845. https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90117-5.

**[103]** Giebel, W., Zwilling, R., & Pfleiderer, G., (1971), The evolution of endopeptidases—XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (Apis Mellifica L.): Purification and characterization of endopeptidases in the midgut of adult workers and comparative studies on the endopeptidase-pattern of different castes and on different ontogenetic stages. Comparative Biochemistry and Physiology, 38B- 197-2 10. https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90297-5.

**[104]** Von der Ohe, W., (1994), Unifloral Honeys: Chemical Conversion and Pollen Reduction. Grana, 33, 292-294. http://dx.doi.org/10.1080/00173139409429013.

**[105]** Southwick, E.X., (1992), Physiology and social physiology of the honey bee-In: 'The Hive and the Honey Bee'', LM.Graham (ed). Dadant & Sons, Hamilton, IL. Pp 171-196. https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT31027153/pdf.

**[106]** Terra, W.R., & Ferreira, C., (1994), Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function, Comparative Biochemistry and Physiology, 109 B:1-62. https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4.

**[107]** Arslan, A., Standifer, L.N., & Don, H., (1986), Carbohydrates in honey bee hemolymph, Comparative Biochemistry and Physiology, 848:363-367. https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90090-8.

**[108]** Woodring, J., M. Bolden, M., Das, S., & Gade, G., (1993), Study on blood sugar homeostasis in the honeybee (Apis mellifera L.). Journal of Insect Physiology, 39:89-97. https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90022-J.

**[109]** Gmeinbauer, R., Crailsheim, K., (1993), Glucose utilization during flight of honeybee (Apis mellifera) workers, drones and queens. Journal of Insect Physiology, 39:959-967. https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90005-C.

**[110]** Crailsheim, R.L., Schneider, H.W., Hrassnigg, N., Buhhann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., & Schofhann. D.L., (1992), Pollen consumption and utilization in worker honeybees (Apis mellifera carnica): Dependence on individual age and function.Journal of Insect Physiology, 38:409-419. https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V.

**[111]** Webb, E.X., (1992), "Enzyme Nomenclature. Recommendation of the Nomenclature Committee of the international Union of Biochemistry and Molecular Biology". Academic Press. Inc., San Diego, CA. https://www.sciencedirect.com/book/9780122271649/enzyme-nomenclature.

**[112]** Huidobro, J. F., Santana, F. J., Sanchez, M. P., Sancho, M. T., Muniategui, S., & Simal- Lozano, J., (1995), Diastase, invertase and α-glucosidase activities in fresh honey from north–west Spain. Journal of Apicultural Research, 34, 39–44. https://doi.org/10.1080/00218839.1995.11100884.

**[113]** Persano, Oddo, L., & Pulcini, P., (1999), A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content. Apidologie, 30, 347-348. https://doi.org/10.1051/apido:19990411.

**[114]** Nelson, L.M., & Cohn D.J., (1924), Invertase in honey. Journal of Biological Chemistry, 6 1: 193-224.

**[115]** Simpson, J., (1960), The functions of the salivary glands of Apis mellifera. Journal of Insect Physiology, 4, 07–121. https://doi.org/10.1016/0022-1910(60)90073-1

**[116]** Papadakis, P.E., (1929), Further Findings on Invertase From Honey. Journal of Biological Chemistry. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)77086-5.

**[117]** Huber, R.E., (1975), The purification and study of a honey bee abdominal sucrase exhibiting unusual solubility and kinetic properties. Archives of Biochemistry and Biophysics. 168: 198-209. https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90242-8.

**[118]** Huber, R.E., & Thompson D.J., (1973), Studies on a honey bee sucrase exhibithg unusual kinetics and ttansglucolytk activity. Biochemistry, 12:4011-4020. https://doi.org/10.1021/bi00744a035.

**[119]** Takewaki, S., Chiba, S., Khura, A., Matsui, H., & Koike, Y., (1980), Purification and Properties of α-Glucosidases of the Honey Bee Apis mellifera L., Agricultural and Biological Chemistry. 44.731-740. https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864027.

**[120]** Takenaka, T., & Echigo, T., (1978), Properties and transglucosydation action of α-glucosidase of honey (Part 2). Buii Fac. Agric. Tamagawa Univ. 18:22-3 l.

**[121]** Lehninger, A.L., Nelson, D.L., & Col, M.M., (1993), "PrincipIes of Biochemistry, Second Edition". Worth publishers, New York,NY. https://doi.org/10.1016/0307-4412(93)90079-F.

**[122]** Montreuil, J. (1986), Glycoproteins: structure and biosynthesis. In: "Molecular and Cellular Basis of Digestion", P. Desnuelle, H. Sjostrom and Noren (eds). Eisevier. Amsterdam, NetheriandS. pp 3-23.

**[123]** Vliegenthart, J.F.G., & Montreuil, J., (1995), Primary structure of glycoprotein glycans. In: "Glycoproteins", Montreuil, J., and Vliegenthart, J.F.G. (eds). Elsevier, New York, NY. pp 13-28. https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60585-2.

**[124]** Packer, N.H., Bail, M.S., & Devine, P.L., (1999), Glycoprotein detection of 2-D separated proteins. In: "Methods in Molecular Biology, Volume 112: Proteome AnaLysis Protocols", 112:341-352. https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:341.

**[125]** Belitz, H.D., & Grosch, W., (1992), Handbuch Der Lebensmittelchemie. 4. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag. ISBN 10: 3642461905ISBN 13: 9783642461903, https://www.springer.com/series/526.

**[126]** Koshland, D.E., (1953), Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. Biological Reviews, 281416-436. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x.

**[127]** Kempton, J.B., & Withers, S.G., (1992), Mechanism of Agrobacteriurn β-glucosidase: kinetics studies. Biochemistry. 3 1:996 1-9969. https://doi.org/10.1021/bi00156a015.

**[128]** Sinnott, M.L., (1990), Catalytic Mechanisms of Enzymic Glycosyl Transfer. Chemical Reviews. 90:1171-1202. https://doi.org/10.1002/chin.199108388.

**[129]** Quaroni, A., Gerchhon, E., & Semenza, G., (1974), Affinity labeling of the active sites in the sucrase-isomaltase complex from small intestine. Journal of Biological Chemistry. 249:6424-6433. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42174-1.

**[130]** Bogdanov, S., Lullmann, C., Mossel, B. L., D'Arcy, B. R., Russmann, H., Vorwohl, G., Oddo, L., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lheretier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., Vit, P., Martin, P., and von der Ohe, W., (1999), Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Honey Commission. Bee World 90 108-125. https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099428.

**[131]** Hadorn, H., & Zürcher, K., (1966), Eine verbesserte polarimetrische Methode zur Saccharase Zahl Bestimmung im Honig. Dt. Lebensm. Rdsch. 62, 195-201. https://hal.science/hal-00890338/document.

**[132]** Siegenthaler, U., (1977), Eine Einfache Und Rasche Methode Zur Bestimmung Der α-Glucosidase (Saccharase) Im Honig. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 68, 251-258. https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90149-Y.

**[133]** Lichtenberg-Kraag, B., (2012), Saccharose degradation over time in stored honey: Influence of time, temperature, enzyme activity and botanical origin. Journal of Food and Nutrition Research, 51, 217–224. https://www.researchgate.net/publication/259638815_Saccharose_degradation_over_time_in_stored_honey_Influence_of_time_temperature_enzyme_activity_and_botanical_origin.

**[134]** Tosi, E.A., Re, E., Lucero, H., Bulacio, L., (2004), Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. LWT-Food Science & Technology 37: 669-678. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.005.

**[135]** Samborska, K., & Czelejewska, M., (2014), The influence of thermal treatment and spray drying on the physicochemical properties of Polish honeys. Journal of Food Processing and Preservation, 38(1), 413-419. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00789.x.

**[136]** Thrasyvoulou, A.T., (1986), The use of HMF and diastase as criteria of quality of Greek honey. Journal of Apicultural Research, 25, 186–195. https://doi.org/10.1080/00218839.1986.11100715.

**[137]** Oddo, L.P., Baldi, E., Accorti, M., (1990), Diastatic activity in some unifloral honeys. Apidologie 21:17–24. https://doi.org/10.1051/apido:19900103.

**[138]** Shimanuki, H.A., (1992), Beekeeping. In:Hui YH, editor. Encyclopedia of food science and technology. New York: John Wiley & Sons Inc. p 180–4. ISBN: 978-0-471-19285-5.

**[139]** Ropa, D.J., (1999), The functional role of honey in baked goods.Cereal Foods World, 44:140– 2.

**[140]** Crueger, W., Crueger, A., In T.D., Brock (Ed.), (1990), Biotechnology: a textbook of industrial microbiology (pp. 191–199). ISBN: 9780878931316, 0878931317, https://searchworks.stanford.edu/view/1089599.

**[141]** Rinaudo, M.T., Ponzetto, C., Vidano, C., Marletto, F., (1973), The origin of honey amylase. Comparative Biochemistry and Physiology, 46B:253–6. https://doi.org/10.1016/0305-0491(73)90315-5.

**[142]** Stadelmeier, M., Bergner, K.G., (1986), Proteine des bienenhonigs VII. Eigenschaften und herkunft der honig amylase. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 182:196–9. https://doi.org/10.1007/BF01042127.

**[143]** Katzav-Gozansky, T., Soroker, V., Ionescu, A., (2001), Task-related chemical analysis of labial gland volatile secretion in worker honeybees (Apis mellifera ligustica). Journal of Chemical Ecology, 27, 919–926. https://doi.org/10.1023/A:1010330902388.

**[144]** Poiani, S.B., & Cruz-Landim, C., (2010), Changes in the size of cephalic salivary glands of Apis mellifera and Scaptotrigona postica (Hymenoptera: Apidae) queens and workers in different life phases. Zoologia, 27, 961–964. https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000600018.

**[145]** Barhate, R., Subramanian, R., Nandini, K., & Hebbar, H.U., (2003), Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. Journal of Food Engineering, 60(1), 49-54. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00017-7.

**[146]** Schepartz, A.I., Subers, M.H., (1966), Observations on honey diastase. Journal of Apicultural Research, 5:45–8 https://doi.org/10.1080/00218839.1966.11100131.

**[147]** Bergner, K.G., Diemair, S., (1975), Proteine des bienenhonigs. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 157:7–13. https://doi.org/10.1007/BF02427787.

**[148]** Lampitt, L.H., Hughes, E.B., Rooke, H.S., (1930), The diastatic activity of honey. The Analyst 55:666–72. https://doi.org/10.1039/AN9305500666.

**[149]** White, J.W. Jr, Riethof, M.L., Kushnir, I., (1961), Composition of honey: the effect of storage on carbohydrates, acidity and diastase content. Journal of Food Science, 26:63–71. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1961.tb00042.x.

**[150]** Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F., Lozano, J.S., (1992), Aging of honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40:134–8. https://doi.org/10.1021/jf00013a026.

**[151]** White, J.W., Jr., Kushnir, I., & Subers, M.H., (1964), Effect of storage and processing temperatures on honey quality. Food Technology, 18(4), 153-156. https://www.iasj.net/iasj/download/b52db327044ada1d.

**[152]** DeCordt, S., Hendrickx, M., Maesmans, G.,Tobback, P., (1994), The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of α-amylase. Biotechnology & Bioengineering, 43:107–14. https://doi.org/10.1002/bit.260430202.

**[153]** Lecker, D.N., Khan, A., (1996), Theoretical and experimental studies of the effects of heat, EDTA, and enzyme concentration on the inactivation rate of α-amylase from Bacillus sp. Biotechnology, 12:713–7. https://doi.org/10.1021/bp960053d.

**[154]** Weemaes, C., DeCordt, S., Goossens,K . ,Ludikhuyze, L., Hendrickx, M., Heremans, K., Tobback, P., (1996), High pressure, thermal, and combined pressure-temperature stabilities of α-amylases from Bacillus species. Biotechnology & Bioengineering, 50:49–56. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<49::AID-BIT6>3.0.CO;2-1.

**[155]** Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N., Fischer, E.H., (1959), Metal content of α-amylases of various origins. Journal of Biological Chemistry, 234:2901–5. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69691-7.

**[156]** Bealin-Kelly, F., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M., (1991), Studies on the thermostability of the α-amylase of Bacillus caldovelox. Applied microbiology and biotechnology, 36(3), 332-336. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00017-7.

**[157]** Ivanova, V.N., Dobreva, E.P., Emanuılova, E.I., (1993), Purification and characterization of a thermostable α-amylase from Bacillus licheniformis. Journal of Biotechnology 28: 277-289. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118639.

**[158]** Nicolson, S.W., & Human, H., (2008), Bees get a head start on honey production. Biological Letters, 4, 299–301. https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0034.

**[159]** Maurizio, A., (1975), How bees make honey. Honey: A Comprehensive Survey (ed. by E. Crane), pp. 77–105. Heinemann, U.K. https://doi.org/10.1080/0005772X.2020.1865626.

**[160]** Balasubramanyam, M.V., & Ramesha, I., (2012), Amylase and starch content in ripening of honey of indigenous hive bee Apis cerana indica. Journal of Chemical, Biological and Physical Science, 2, 237–241.

**[161]** Brouwers, E.V.M., (1982), Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee. Journal of Apicultural Research, 21, 193–198. https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100541.

**[162]** Fluri, P., Lüscher, M.M., Wille, H. & Gerig, L., (1982), Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. Journal of Insect Physiology, 28, 61–68. https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3.

**[163]** Al-Sherif, A.A., Mazeed, A.M., & Hagag, E.S.E., (2012), Activity of hypopharyngeal gland in secreting honey-elaborating enzymes in Carniolan and Egyptian honeybees. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology, 5(2), 167-173. https://doi.org/10.21608/EAJBSA.2012.14827.

**[164]** Crane, E., (1975), Honey: A comprehensive survey. International Bee Research Association, London: Heinemann. Ch. 5, p 157–94. ISBN: 9780434902705, 0434902705, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082198/.

**[165]** Krauze, A.,Zalewski, R., (1991), Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. Zeitschrift für

Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 192:19-23. https://doi.org/10.1007/BF01201436.

**[166]** Sanchez, J., Wilkîns, M.R., Appei, R.D., Williams, K.L., & Hochstrasser, D.F., (1997), Identifying proteins for proteome studies: a two-dimensional gel electrophoresis approach In:"Protein Function A Practical Approach, Second Edition", T.E. Creighton (ed). RL Press, Oxford, UK, pp 1-27. ISBN;019963615X, 9780199636150,https://books.google.com.tr/books/about/Protein_Function.html?id=hjO5Uoc7GaYC&redir_esc=y.

**[167]** Bogdanov, S., & Lischer, P., (1993), International Honey Commission Interlaboratory trials: diastase activity, Phadebas and Schade methods, Invertase activity after Siegenthaler and Humidity by refractometry. Report for the participants. https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf.

**[168]** Hadorn, H., & Zurcher, K., (1972), Eine einfache kinetische Methode zur Bestimmung der Diastasezahl in Honig. Deutsche Lebensmittel Rundschau, 68, 209–216. https://hal.science/hal-00890338/document.

**[169]** Schade, J., Marsh, G., & Eckert, J., (1958), Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. Journal of Food Science, 23(5), 446-463. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1958.tb17592.x.

**[170]** White, J.W., & Pairent, F.W., (1959), Report on the analysis of honey. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 42, 341–348. https://doi.org/10.1093/jaoac/42.2.341.

**[171]** McCleary, B.V., & Sturgeon, R., (2002), Measurement of α-amylase in cereal, food and fermentation products. Cereal Foods World, 47(7), 299-310. https://prod-media.megazyme.com/media/pdf/dd/eb/41/measurement-of-alpha-amylase-in-cereal-food-and-fermentation-products.pdf.

**[172]** American Association of Cereal Chemists, Approved Methods, (2004), Measurement of α-amylase in cereal grains and flours - Amylazyme method, Method

22-05. https://prod-media.megazyme.com/media/pdf/dd/eb/41/measurement-of-alpha-amylase-in-cereal-food and-fermentation-products.pdf.

**[173]** Teitelbaum, R. C., Ruby, S. L., & Marks, T. J., (1978), On the structure of starch–iodine. Journal of American Chemical Society, 100, 3215–3217. https://doi.org/10.1021/ja00478a045.

**[174]** Codex, S., (2001), STAN 12-1981. Norma del Codex para la miel. Codex Aliemntarius. FAO/OMS.

**[175]** Kerkvliet, J.D., & Putten, A.P.J., (1973), The diastase number of honey: A comparative study. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 153, 8793. https://doi.org/10.1007/bf01137309.

**[176]** Bogdanov, S., (1984), Honigdiastase, Gegenuberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden. Mitteilungen Gebiete Lebensmittelsicherheit, Hygiene, 75, 214–220.

**[177]** Sakač, N., Sak-Bosnar, M., A rapid method for the determination of honey diastase activity, Talanta, Volume 93, 2012, Pages 135-138. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.063.

**[178]** Sigma Diagnostics, (1999), Diagnostic kits and reagents. Procedure, #577, Sigma Chemical Company.

**[179]** Dixon, M., & Webb., E.C., (1979), "Enzymes, Third Edition", Academic Press, New York, NY. https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1016/0014-5793%2881%2980688-6.

**[180]** Price, N.C., & Stevens., L., (1989), "Fundamentals of Enzymology, Second Edition". Oxford University Press, New York, NY. ISBN 10: 0198552971 / ISBN 13: 9780198552970,https://www.abebooks.com/servlet/BookDetailsPL?bi=30760407845&searchurl=sortby%3D17%26tn%3Dfundamentals%2Bof%2Benzymology&cm_sp=snippet-_-srp1-_-title2.

**[181]** Copeland, R.A., (1996), "Enzymes: A practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis". VCH Fubüshers Inc, New York. NY. https://doi.org/10.1021/jm020467f.

**[182]** Schulz, A.R., (1994), "Enzyme Kinetics: From Diastase to Multienzyme System". Cambridge University Press, New York, NY. https://archive.org/details/enzymekineticsfr0000schu/page/n7/mode/2up.

**[183]** Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., (2008), Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. Journal of Food Science, 73: 117-24. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x.

**[184]** Wongchawalit, J., Yamamoto, T., Nakai, H., Kim, Y.M., Sato, N., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Saji, O., Chanchao, C., Wongsiri, S., Surarit, R., Svasti, J., Chiba, S., Kimura, A., (2006), Purification and characterization of α-glucosidase I from Japanese honeybee (Apis cerana japonica) and molecular cloning of its cDNA. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70(12):2889-98. https://doi.org/10.1271/bbb.60302.

**[185]** Šimúth, J., (2001), Some properties of the main protein of honeybee (Apis mellifera) royal jelly. Apidologie, 32(1), 69-80. https://doi.org/10.1051/apido:2001112.

**[186]** Srisuparbh, D., Klinbunga, S., Wongsiri, S., & Sittipraneed, S., (2003), Isolation & characterization of major royal jelly cDNAs & proteins of the honey bee (Apis cerana). BMB Reports, 36(6), 572-579. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2003.36.6.572.

**[187]** Šimúth, J., Bíliková, K., Kováčová, E., Kuzmová, Z., & Schroder, W., (2004), Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-α release is a regular component of honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(8), 2154-2158. https://doi.org/10.1021/jf034777y.

**[188]** Steinhorn, G., Sims, I.M., Carnachan, S.M., Alistair, J.C., Schlothauer, R., (2011), Isolation and characterization of arabinogalactan-proteins from New Zealand

kanuka honey. Food Chemistry, 128, 949–956. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.124.

**[189]** Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata,T., (2003), Major Royal Jelly Proteins Modulates İmmune Responses in vitro and in vivo. Life Sciences, 73(16):2029–2045. https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00562-9.

**[190]** Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., De Souza, S.R., & Dutra, V.M.L., (2003), Protein contents and physicochemical properties in honey samples of Apis mellifera of different floral origins, Food Chemistry. 80, 249. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00261-3.

**[191]** Wang, J., Kliks, M.M., Qu, W., Jun, S., Shi, G., Li, Q.X., (2009), Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(21):10081-8. https://doi.org/10.1021/jf902286p.

**[192]** Kwakman, P.H,, Van den Akker, J.P., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade,J.M., de Boer, L., Boszhard, L., Paulus, F., Middelhoek, P., te Velde, A.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Schultz, M.J., Zaat, S.A., (2008), Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clinical Infectious Diseases, 46(11):1677-82. https://doi.org/10.1186/cc11849.

**[193]** Bíliková, K., Simúth, J., (2010), New Criterion for Evaluation of Honey: Quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in Honey by ELISA , Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 15, 8776–8781. https://doi.org/10.1021/jf101583s.

**[194]** Cordella, C., Faucon, J.P., Cabrol-Bass, D. (2003), Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 71, 279–290. https://doi.org/10.1023/A:1022251208688.

**[195]** Rios-Corripio, M.A., Rojas-López, M., & Delgado-Macuil, R., (2012), Analysis of adulteration in honeywith standard sugar solutions and syrups using

attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopyand multivariate methods Análisis de la adulteración en miel de abeja con azúcares estándar y jarabes utilizandoespectroscopia de transformada de Fourier con reflectancia atenuada total y métodos multivariados, CyTA - Journal of Food. https://doi.org/10.1080/19476337.2011.596576.

**[196]** Amiry, S., Esmaiili, M., & Alizadeh, M., (2017), Classification of adulterated honeys by multivariate analysis. Food Chemistry, 224, 390-397. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.025.

**[197]** Geana, E.I., & Ciucure, C.T, (2020), Establishing authenticity of honey via comprehensive Romanian honey analysis. Food Chemistry, 306, 125595. https://doi.org 10.1016/j.foodchem.2019.125595.

**[198]** Cordella, C., Militão, J.S.L.T., Clèment, M.C., Drajnudel, P., Cabrol-Bass, D., (2005), Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of saccharide syrup or bee-feeding; preliminary study using high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAC) and chemometrics, Analytica Chimica Acta, 531,239-248. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.018.

**[199]** Cotte, J.F., Casabianca, S., Chardon, J., Lheritier, & M.F., Grenier., (2003), Application ofcarbohydrate analysis to verify honey authenticity. Journal of Chromatography A. 1021:145–155.https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.005.

**[200]** Ruiz-Matute, A.I., Soria, A.C., Martinez-Castro, I., & Sanz, M.L.A., (2007), New methodology based on GC–MS to detect honey adulteration with commercialsyrups. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 7264–7269. https://doi.org/10.1021/jf070559j.

**[201]** Ruiz-Matute, A.I., Weiss, M., Sammataro, D., Finley, J., & Sanz, M.L, (2010), Carbohydrate composition of high fructose corn syrups (HFCS) used for beefeeding effect on honey composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 7317–7322. https://doi.org/10.1021/jf100758x.

**[202]** Puscas, A., Hosu, A., Cimpoiu, C., (2013), Application of a newly developed and validated high-performance thinlayer chromatographic method to control honey adulteration. Journal of Chromatography A.1272:132-5. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.064.

**[203]** Wang, S., Guo, Q., Wang, L., Lin, L., Shi, H., Cao, H., & Cao, B., (2015), Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography. Food Chemistry, 172, 669-674. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.044.

**[204]** Cabanero, A. I., Recio, J. L., & Ruperez, M., (2006), Liquid chromatography coupled toisotope ratio mass spectrometry: A new perspective on honey adulterationdetection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 9719–9727. https://doi.org/10.1021/jf062067x.

**[205]** Padovan, G.J., Rodrigues, L.P., Leme, I.A., Jong David, D., & Marchini, J.S., (2007), Presence of C4 sugars in honey samples detected by the carbon isotope ratiomeasured by IRMS. Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 2(3), 134–141. https://www.researchgate.net/publication/228638619_Presence_of_C4_Sugars_in_Honey_Samples_Detected_by_The_Carbon_Isotope_Ratio_Measured_by_IRMS.

**[206]** Ferreiro-Gonzalez, M., Espada-Bellido, E., Guillen-Cueto, L., Palma, M., Barroso, C.G., & Barbero, G.F., (2018), Rapid quantification of honey adulteration by visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics. Talanta, 188, 288-292. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.095.

**[207]** Latorre, C.H., Peña Crecente, R.M., García, S., Martín, J., García, B., (2013), A fast chemometric procedure based on NIR data for authentication of honey with protected geographical indication. Food Chemistry, 141 (4), pp. 3559-3565. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.022.

**[208]** Dramićanin, T., Lenhardt Acković, L., Zeković, I., & Dramićanin, M.D., (2018), Detection of adulterated honey by fluorescence excitation-emission matrices. Journal of Spectroscopy, 2018. https://doi.org/10.1155/2018/8395212.

**[209]** Bertelli, D., Lolli, M., Papotti, G., Bortolotti, L., Serra, G., & Plessi, M., (2010), Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(15), 8495-8501. https://doi.org/10.1021/jf101460t.

**[210]** Jackson B.P., Taylor, V.F., Karagas, M.R., Punshon, T., Cottingham, K.L., (2012), Arsenic, organic foods, and brown rice syrup. Environmental Health Perspectives, 120 (5), pp. 623-626. https://doi.org/10.1289/ehp.1104619.

**[211]** Xue, X., Q. Wang, Y., Li, L., Wu, L., Chen, J., Zhao, I., (2013), 2-Acetylfuran-3-glucopyranoside as a novel marker for the detection of honey adulterated with rice syrup. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (31). https://doi.org/10.1021/jf401912u.

**[212]** Arias, V., Castells, R., Malacalza, N., Lupano, C., & Castells, C., (2003), Determination of oligosaccharide patterns in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Chromatographia, 58(11), 797-801. https://doi.org/10.1365/s10337-003-0115-6.

**[213]** Montilla, A., Ruiz-Matute, A.I., Sanz, M.L., Martínez-Castro, I., & Del Castillo, M., (2006), Difructose anhydrides as quality markers of honey and coffee. Food Research International, 39(7), 801-806. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.002.

**[214]** Toth, T., Kopernika, M., Sabor., Kopernika, T., (2016), The Evaluation of Mercury in Honey Bees and Their Products from Eastern Slovakia. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 49, 257–260.

**[215]** Şimşek, A., Bilsel, M., Gören, A.C., C-13/C-12 pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS, Food Chemistry, cilt.130, ss.1115-1121, 2012. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.017.

**[216]** Skoog, D.A., Holler, F.J., & Nieman, T.A., (1998), Principles of Instrumental Analysis. Saunders College Publishing, Philadelphia. ISBN 10: 0030012295,

https://books.google.com.tr/books/about/Principles_of_Instrumental_Analysis.html?id=_7MPAQAAMAAJ&redir_esc=y.

**[217]** *Kazakevich*, Y.V. & Lobrutto, R. (*2007*) HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Hoboken. https://doi.org/10.1002/0470087951.

**[218]** Horacio G., Pontis, (2017), Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms, Academic Press, 45-63. Paperback ISBN: 9780128033968, https://shop.elsevier.com/books/methods-for-analysis-of-carbohydrate-metabolism-in-photosynthetic-organisms/pontis/978-0-12-803396-8.

**[219]** Rutkowski, M.J., Scherer, P.E., (2014), Chapter Thirteen - Isolation and Quantitation of Adiponectin Higher Order Complexes, Editor(s): Ormond A. Macdougald, Methods in Enzymology, Academic Press, Volume 537, Pages 243-259. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00013-6.

**[220]** Sheehan, D., O'Sullivan, S., (2004), Fast Protein Liquid Chromatography. In: Cutler, P. (eds) Protein Purification Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 244. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_25.

**[221]** Siegenthaler, U., (1975), Bestimmung der Amylase in Bienenhonig mit einem handelsublichen, farbmarkierten Substrat. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 66, 393-399. http://www.terezinka.cz/vcely/Med/IHCmethods_e.pdf.

**[222]** Sorkun, K., (2008), Türkiye'nin Nektarlı Bitkileri, Polenleri ve Balları. Palme Yayıncılık,462.341s.https://kutuphane.tarimorman.gov.tr/vufind/Record/16797/Description.

**[223]** Bradford M.M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248–54. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

**[224]** Compton, S.J., & Jones, C.G., (1985), Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Analytical Biochemistry, 151(2), 369–374. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3.

**[225]** Reisner, A.H., Nemes, P., Bucholtz, C., (1975), The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 64(2):509-16. https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90461-3.

**[226]** *Sedmak,* J.J., & *Grossberg,* S.E., (*1977*), A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. Analytical Biochemistry, 79, 544-552. https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90428-6.

**[227]** Laemmli, U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680–5. https://doi.org/10.1038/227680a0.

**[228]** Esposito, S., Bracacel, E., Nibbio, M., Speziale, R., Orsatti, L., Veneziano, M., Monteagudo, E., Bonelli, F., (2016), Use of 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in preclinical research: Application to a DMPK study ofperhexiline in mouse plasma, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 118 (pp. 70–80). https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.004.

**[229]** B. Greer, O., Chevallier, B., Quinn, L.M., Botana, C.T., Elliott, (2021), Redefining dilute and shoot: the evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 141. https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116284.

**[230]** K. Deventer, O.J., Pozo, A.G., Verstraete, P., Van Eenoo, (2014), Dilute-and shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 55, pp. 1-13. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.012.

**[231]** Babacan, S., & Rand, A. G., (2006), Purification of Amylase from Honey, Journal of Food Science, Volume 70, Issue 6, Pages c413-c418. https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2005.TB11439.X.

# ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** İsmail Emir Akyıldız

**Lisans:** Balıkesir Üniversitesi, Kimya Bölümü.

**Yüksek Lisans:** Marmara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı.

**Yayınlar Listesi:**

1. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, Dilek Uzunöner, Emel Damarlı, Ece Kök Yetimoğlu, ‘‘Straightforward Monitoring of Honey with Foreign Diastase by Leveraging the Differentiation in LC-UV Proteome Profiles of Authentic and Fraudulent Samples’’, Microchemical Journal, 193, (2023), 109039.
2. Duygu Nur Çobanoğlu, **İsmail Emir Akyıldız**, İlginç Kızılpınar Temizer, Emel Damarlı, Şenol Çelik, ‘‘Phenolic Compounds, Organic Acids, Elements, and Carbohydrate Profiles of Pine and Blossom Honey’’, European Food Research and Technology, 166, 1-13 (2023).
3. Etil Güzelmeriç, Hande Sipahi, Yağmur Özhan, Muhammed Hamitoğlu, Sinem Helvacıoğlu, **İsmail Emir Akyıldız**, Gamze Düz, Beril Kadıoğlu Yaman, Merve Hazar, Sevtap Aydın Dilsiz, Ahmet Aydın, Erdem Yeşilada, ‘‘Comprehensive estrogenic/anti-estrogenic, anticancer, mutagenic/anti-mutagenic, and genotoxic/anti-genotoxic activity studies on chemically characterized black poplar and Eurasian aspen propolis types’’, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 226, 115241 (2023).
4. **İsmail Emir Akyıldız,** Sezer Acar, Ece Kök Yetimoğlu, Sinem Raday, Özge Erdem, Emel Damarlı, ‘‘Single Pot In-Situ Aqueous Derivatization and Subsequent Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Honey by Means of Mass Spectrometry’’, Food Chemistry, 405, Part A, 134826 (2022).
5. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Tuğçe Daştan, Sezer Acar, Dilek Uzunöner, Gamze Düz, Emel Damarlı, ‘‘Elucidating the False Positive Tendency at AOAC 998.12 C-4 Sugar Test for Pine Honey Samples: Modified

Sample Preparation Method for Accurate $\delta^{13}C$ Measurement of Honey Proteome‘‘, Journal of Food Composition and Analysis, 114, 104787 (2022).

6. Ebru Pelvan, Müge Serhatlı, Öznur Karaoğlu, Bülent Karadeniz, Ceyda Pembeci Kodolbaş, Neşe Aslı Öncü, Gamze Çakırca, Emel Damarlı, Günay Başdoğan, Gizem Mergen Duymaz, **İsmail Emir Akyıldız**, Gamze Düz, Sezer Acar, Yağmur Özhan, Hande Sipahi, Mohammad Charehsaz, Ahmet Aydın, Erdem Yesilada, Cesarettin Alaşalvar, ‘‘Development of propolis and essential oils containing oral/throat spray formulation against SARS-CoV-2 infection‘‘, Journal of Functional Foods, 97, 105225 (2022).
7. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, Sinem Raday, Özge Erdem, Sezer Acar, Özlem Yılmaz, Dilek Uzunöner, Gamze Düz, Emel Damarlı, ‘‘Development of a novel pretreatment protocol for the efficient isolation and enrichment of honey proteome using pine honey and the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* L.’’, Food Measurement and Characterization, 16, 2616–2629 (2022).
8. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, Sinem Raday, Sezer Acar, Özge Erdem, ‘‘Validation of two UHPLC-MSMS methods for a fast and reliable determination of quinolone residues in honey’’, Food Additives & Contaminants Part A, 5, 807-819 (2021).
9. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Özge Erdem, Sezer Acar, İlknur Coşkun, Emel Damarlı, ‘‘Analytical Investigation of Active Compound Contents of Panax ginseng C.A. Meyer and Ginkgo Biloba L. Supplements Fortified with Apitherapy Products’’, International Journal of Secondary Metabolite, 8 (2), 70 - 93 (2021).
10. **İsmail Emir Akyıldız**, Dilek Uzunöner, Sinem Raday, Sezer Acar, Özge Erdem, Emel Damarlı E, ‘‘Identification of the Rice Syrup Adulterated Honey by Introducing a Candidate Marker Compound for Brown Rice Syrups’’, LWT Food Science & Technology, 154, 112618 (2021).
11. Özün Görel, Şule Dinç, **İsmail Emir Akyıldız**, Güzin Alpdogan, ‘‘Multivariate Optimization of a new LC-MS/MS Method for the Determination of 156 Pesticide Residues in Milk and Dairy Products‘‘, Journal of the Science of Food and Agriculture, 100 (13), 4808-4817 (2020).

**Uluslararası Bildiriler Listesi:**

1. **İsmail Emir Akyıldız,** Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Sezer Acar, Emel Damarlı, "Targeted Microproteomic Workflow for Label-Free Quantification of Honey Defensine-1." International Proteomics Congress // 5th Turkish National Proteomics Congress, 2023, Anakara, Türkiye.
2. **İsmail Emir Akyıldız,** Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Sezer Acar, Emel Damarlı, "Quantification of HR-MS Annotated MRJP Proteotypes Utilizing Native-SEC-UV Methodology." International Proteomics Congress // 5th Turkish National Proteomics Congress, 2023, Anakara, Türkiye.
3. Dilek Uzunöner, **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, "Versatile Probing of Multi-Class Antibiotic Residues in Honey by Utilizing a Novel Methodology: UHPLC-ESI-MS/MS Analysis Integrated with Ion-Paired Equilibrated Online-SPE Pretreatment", 2nd International Food Chemistry Congress, 2023, Antalya, Türkiye.
4. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Straightforward Monitoring of Honey with Foreign Diastase by Leveraging the Differentiation in LC-UV Proteome Profiles of Authentic and Fraudulent Samples'', 2nd International Food Chemistry Congress, 2023, Antalya, Türkiye.
5. Sinem Raday, **İsmail Emir Akyıldız**, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Label Free Quantıtatıon of Defensıne-1 in Honey From Different Botanical Origins: Versatile Microproteomic Workflow for Absolute Quantification of Antimicrobial Peptide'', 2nd International Food Chemistry Congress, 2023, Antalya, Türkiye.
6. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Elucidating the False Positive Tendency at AOAC 998.12 C-4 Sugar Test for Pine Honey Samples: Modified Sample Preparation Method for Accurate δ13C Measurement of Honey Proteome'', 2nd International Food Chemistry Congress, 2023, Antalya, Türkiye.
7. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, Dilek Uzunöner, Emel Damarlı, ''An Overview of Bioanalytical Assays and

Techniques Used at Antibody-Drug Conjugate (ADC) Characterization''. 8th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, 2022, Istanbul, Türkiye.

8. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Quantitation of the Myo-Inositol and D-Pinitol levels as promising bioactive constituents of Pine honey and elucidation of the pathway by analyzing phloem of Pinus brutia and the secretion of insect Marchalina hellenica'', Apimondia 47th - International Bee Keeping Congress, 2022, İstanbul, Türkiye.
9. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Quantitation of the Myo-Inositol and D-Pinitol levels as promising bioactive constituents of Pine honey and elucidation of the pathway by analyzing sap of Pinus brutia and the secretion of aphid Marchalina hellenica'', The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (SNFF), 2022, İstanbul, Türkiye.
10. İlknur Coşkun**, İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı ''Changes in Biochemical Properties of Royal Jelly by Different Storage Conditions and Different Packaging Materails'', The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (SNFF), 2022, İstanbul, Türkiye.
11. **İsmail Emir Akyıldız**, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Identification of the Rice Syrup Adulterated Honey by Introducing a Candidate Marker Compound for Brown Rice Syrups'', 1st Food Chemistry Congress, 2022, Antalya, Türkiye.
12. **İsmail Emir Akyıldız**, Dilek Uzunöner, Sezer Acar, Özge Erdem, Sinem Raday, Emel Damarlı, ''Elucidating the False Positive Tendency at AOAC 998.12 C-4 Sugar Test for Pine Honey Samples: Modified Sample Preparation Method for Accurate $\delta^{13}C$ Measurement of Honey Proteome'', Apimondia 47th-International Bee Keeping Congress, 2022, İstanbul, Türkiye.
13. **İsmail Emir Akyıldız**, Sezer Acar, Özge Erdem, Dilek Uzunöner, Sinem Raday, Emel Damarlı, ''Chromatographic determination of foreign diastase

adulterated honey by harnessing the enzyme-origin differences'', Apimondia 47th- International Bee Keeping Congress, 2022, İstanbul, Türkiye.

14. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Preventing False Positivity in C4 Test For Pine Honey by Developing a Modified Sample Preparation Method'', 7. International Muğla Beekeeping and pine honey congress, 2022, Muğla, Türkiye.
15. Dilek Uzunöner, **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, , Emel Damarlı, ''Simultaneous Analysis of Antibiotic Residues in Bee-Pollen by the Novel Cost and Time Effective Multiclass UHPLC-ESI-MS/MS Method'', Apimondia 47th- International Bee Keeping Congress, 2022, İstanbul, Türkiye.
16. Sinem Raday, **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Development of an effective pretreatment method for the isolation and enrichment of honey enzymes using pine honey and the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* L.'', Apimondia 47th International Bee Keeping Congress, 2022, İstanbul, Türkiye.
17. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, Ece Kök Yetimoğlu, ''Analysis of Isobaric Advanced Glycation End Products Instead of Furosine as an Early Stage Maillard Reaction Product for Quality Assessment of Food Samples'', 3rd International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, İstanbul, Türkiye.
18. **İsmail Emir Akyıldız**, Dilek Uzunöner, Sezer Acar, Özge Erdem, Sinem Raday, Emel Damarlı, ''Reliable and straightforward identification of foreign diastase adultered honey by enzyme-origin discrimination'', EurasianBioChem, 2021, Ankara, Türkiye.
19. Sezer Acar, **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, Dilek Uzunöner, Özge Erdem, Sinem Raday, Emel Damarlı, ''One pot in-situ aqueous derivatization and subsequent determination of aminoglycosides in honey by means of mass spectrometry'', EurasianBioChem, 2021, Ankara, Türkiye.
20. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sezer Acar, ''Targeted Lipidomic Investigation of Royal Jelly Samples as a Rich Source of Sterols and Fatty

Acids'', 3rd International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, İstanbul, Türkiye.

21. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, "Enlightening the %C4 Result Falsification at Aegean Pine Honey Samples- Alternate Sample Preparation and Evaluation For C13/C12 Isotope Ratio Calculation in Place of Standard AOAC Method", EurasianBioChem, 2020, Ankara, Türkiye.
22. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, Ece Kök Yetimoğlu, ''Development of an effective pretreatment method for the isolation and enrichment of predominant honey enzymes'', II. International Enzyme & Bioprocess Days, Gebze Technical University, 2020, İstanbul, Türkiye.
23. **İsmail Emir Akyıldız**, Sezer Acar, Sinem Raday, ''Assessment of Adulteration Identification Based on Elucidation and Comparison of Honey and *Apis mellifera* L. Hypopharyngeal Gland Protein Profiles'', International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BioTechBioChem), 2020, İstanbul, Türkiye.
24. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, Ece Kök Yetimoğlu, ''Benefits and drawbacks of foreign enzyme detection assays at honey samples: Chromatographic determination of β/γ-Amylase and β-fructofuranosidase activities'', II. International Enzyme & Bioprocess Days, Gebze Technical University, 2020, İstanbul, Türkiye.
25. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Monitoring the Pesticide Residues at Commercially Available Propolis Extracts: Depreciation of Potential Superfood Due to Misapplication of Agrochemicals and Systemic Acaricides'', EurasianBioChem, 2020, Ankara, Türkiye.
26. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, Dilek Uzunöner, Emel Damarlı, ''Unravelling the Sugar Syrup Adulteration via HILIC-UPLC/MS Method- Enhanced Confidence at Honey Authenticity Monitoring Using Novel Marker'', Euroanalysis, 2019, İstanbul, Türkiye.
27. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sezer Acar, İlknur Coşkun, Emel Damarlı, ''Investigation of the Active Compound Contents of Ginseng (Ginsenosides)

and Gingko Biloba (Terpene Lactones) Containing Supplementary Food Products'', Phytovision III, 2019, İstanbul, Türkiye.

28. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, Ece Kök Yetimoğlu, ''Breakthrough Determination and Quantification of Wax-Moth and Bee Repellents Using GC-MS'', Euroanalysis XX Conference, 2019, İstanbul, Türkiye.
29. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Determination of Furosine Concentrations at Royal Jelly Samples Using Ion Exchange Separation Coupled with UV Detection'', Euroanalysis XX Conference, 2019, İstanbul, Türkiye.
30. Emel Damarlı, **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Gamze Düz, Gizem Mergen Duymaz, ''Determination of the Effect of Different Extraction Solvents and Methods on Phenolic Profile, Total Phenolic Content and Antimicrobial Activity of Propolis'', Apimondia, 2019, Montreal, Kanada.
31. Soner Çubuk, **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, ''Comprehensive Screening of Bee Products Flavonoid Contents with Time Effective and Sensitive HPLC-UV Methodology'', 4th Icntc Conference, 2018, St. Petersburg, Rusya.
32. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''Investigation of Flavonoid Profiles of Pine Sap, Honeydew and Pine Honey Samples'', 6th International Mugla Beekeeping & Pine Honey Congress, 2018, Muğla, Türkiye.
33. Gamze Düz, **İsmail Emir Akyıldız**, Gizem Mergen Duymaz, Sinem Raday, Sezer Acar, Emel Damarlı, ''The Characterization and Bioactive Composition of Propolis'', Propolis in Human and Bee Health Conference, 2018, Sofya, Bulgaristan.
34. Ece Kök Yetimoğlu, **İsmail Emir Akyıldız**, Soner Çubuk, ''Development of UPLC-ESI-MS/MS Analytical Method for Quinolone Antibiotics Analysis in Honey'', 3rd Icntc Conference, 2017, Helsinki, Finlandiya.
35. **İsmail Emir Akyıldız**, Elif Yorulmaz Önder, Özge Erdem, Sezer Acar, ''Development of Cost and Time Effective, High-Sensitive Multiclass Method for Quinolone, Macrolid and Tetracycline Antibiotic Residues in Honey by

UPLC-ESI-MS/MS'', Apimondia 45th International Bee Keeping Congress, 2017, İstanbul, Türkiye.

36. Ece Kök Yetimoğlu, **İsmail Emir Akyıldız**, Soner Çubuk, ''A Novel Approach for Quantitative Analysis of Unconjugated Bisphenol A Levels in Maternal and Umbilical Cord Blood'', 4th International Conference on New Trends in Chemistry, 2017, St. Petersburg, Rusya.
37. **İsmail Emir Akyıldız**, Sinem Raday, Sezer Acar, Özge Erdem, Elif Yorulmaz Önder, Emel Damarlı, ''Development and Validation of Cost Effective, High-Sensitive Multiclass Method for Nitrofurans, Nitroimidazoles and Amphenicols Antibiotic Residues in Honey by UPLC-ESI-MS/MS'', Apimondia 45th International Bee Keeping Congress, 2017, İstanbul, Türkiye.
38. **İsmail Emir Akyıldız**, Murat Çelik, Hasan Özgen, Gökhan Günay, ''Immunosuppressants and 25-hydroxy vitamin D3/D2 analysis with Zivak Automated Clinical Analyzer LC/ MSMS'', American Association for Clinical Chemistry, 2014, Chicago, A.B.D.

**Ulusal Bildiriler Listesi:**

1. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök, Yetimoğlu, Sezer Acar, Özge Erdem, ''Reliable Quantitation of Beta-Lactam Antibiotic Residues in Honey Through Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry Using Breakthrough Sample Preparation'', 32. Online National Chemistry Congress 2020)
2. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök, Yetimoğlu, Sezer Acar, Özge Erdem, ''Investigation of Catalase and Glucose-Oxidase Enzyme Activities of Royal Jelly Samples Using Practical UV-Vis Spectrophotometry Methodologies'', 32. Ulusal Kimya Kongresi, 2020, İstanbul, Türkiye.
3. Ece Kök, Yetimoğlu, **İsmail Emir Akyıldız**, Sezer Acar, Özge Erdem, ''Isolation and Purification of Alpha-Glucosidase Enzyme from Honey and *Apis Mellifera* Hypopharyngeal Glands'', 32. Ulusal Kimya Kongresi, 2020, İstanbul, Türkiye.

4. Soner Çubuk, **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök, Yetimoğlu, ‘‘Quantitation of Major Sterol Components at Marine Sponge Fractions by GC-FID Detection’’, 30. Ulusal Kimya Kongresi, 2018, Kıbrıs, Türkiye.
5. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök, Yetimoğlu, Sezer Acar, Özge Erdem, Emel Damarlı, ‘‘Development of UPLC-ESI-MS/MS Analytical Method for Quinolone Antibiotics Analysis in Honey’’, XV. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 2017, Yalova, Türkiye.
6. **İsmail Emir Akyıldız**, Hasan Şanlıer, Elif Asil, Figen Okyar, Hamdi Yıldız, ‘‘Determination of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs at animal origin foods which can be detected as residue’’, Farabi III. Ar&Ge ve İnovasyon Konferansı, 2015, Zonguldak, Türkiye.

**Tezden Türetilen Yayınlar:**

1. **İsmail Emir Akyıldız**, Özge Erdem, Sinem Raday, Sezer Acar, Dilek Uzunöner, Emel Damarlı, Ece Kök Yetimoğlu, ‘‘Straightforward Monitoring of Honey with Foreign Diastase by Leveraging the Differentiation in LC-UV Proteome Profiles of Authentic and Fraudulent Samples’’, Microchemical Journal, 193, (2023), 109039.
2. **İsmail Emir Akyıldız**, Ece Kök Yetimoğlu, Sinem Raday, Özge Erdem, Sezer Acar, Özlem Yılmaz, Dilek Uzunöner, Gamze Düz, Emel Damarlı, ‘‘Development of a novel pretreatment protocol for the efficient isolation and enrichment of honey proteome using pine honey and the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* L.’’, Food Measurement and Characterization, 16, 2616–2629 (2022).