



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FINDIKTAN (*Corylus maxima* Miller) GLUKOZ-6-FOSFAT
DEHİDROGENAZIN SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Bertan Boran BAYRAK

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Ocak, 2008

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FINDIKTAN (*Corylus maxima* Miller) GLUKOZ-6-FOSFAT
DEHİDROGENAZIN SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Bertan Boran BAYRAK

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Ocak, 2008


İSTANBUL

Bu çalışma 24/01/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı


Prof. Dr. Ayşe YUSUFOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Organik Kimya Anabilim Dalı


Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı


Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı


Prof. Dr. Hacı ORAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Organik Kimya Anabilim Dalı

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin T-981/06102006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans öğrenimim sırasında ve bu tezin konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem ÖZSOY SAÇAN'a; Arş. Gör. Sevim TUNALI'ya, Arş. Gör. M. Mutluhan DÖĞER'e, Arş. Gör. İ. Burcu TÜRKYILMAZ'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma, çalışmalarım esnasında bana gösterdikleri ilgi, anlayış ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca bana her zaman sonsuz destek olan aileme çok teşekkür ederim.

Fındıkların teşhisini yapan Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı emekli Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Kerim ALPINAR'a teşekkür ederim.

T-981/06102006 sayılı proje kapsamında, çalışmama maddi destek sağlayan İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne de teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2008

Bertan Boran BAYRAK

İÇİNDEKİLER

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖNSÖZ | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| ŞEKİL LİSTESİ | vii |
| TABLO LİSTESİ | viii |
| SEMBOL LİSTESİ | ix |
| ÖZET | x |
| SUMMARY | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL KISIMLAR | 2 |
| 2.1. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ | 3 |
| 2.1.1. Pentoz Fosfat Yolu | 3 |
| 2.1.1.1. <i>Pentoz Fosfat Yolunun Oksidatif Reaksiyonları</i> | <i>4</i> |
| 2.1.1.2. <i>Pentoz Fosfat Yolunun Nonoksidatif Reaksiyonları.....</i> | <i>5</i> |
| 2.1.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Yapısal Özellikleri | 7 |
| 2.1.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Spesifik Özellikleri | 9 |
| 2.1.3.1. <i>Anomerik Karbon Atomu Spesifitesi</i> | <i>9</i> |
| 2.1.3.2. <i>Substrat Spesifitesi</i> | <i>9</i> |
| 2.1.3.3. <i>Hidrojen Atomunun Taşınmasındaki Stereospesifitesi.....</i> | <i>10</i> |
| 2.1.3.4. <i>Koenzim Spesifitesi</i> | <i>10</i> |
| 2.2. FINDIK | 11 |
| 2.2.1. Fındık Bitkisinin Özellikleri..... | 11 |
| 2.2.1.1. <i>Fındık Ağacı.....</i> | <i>11</i> |
| 2.2.1.2. <i>Kök.....</i> | <i>12</i> |
| 2.2.1.3. <i>Yaprak.....</i> | <i>12</i> |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.1.4. Tomurcuklar..... | 12 |
| 2.2.1.5. Çiçekler..... | 12 |
| 2.2.1.6. Yumurtalık..... | 13 |
| 2.2.1.7. Züraf..... | 13 |
| 2.2.1.8. Çotanak..... | 13 |
| 2.2.2. Fındığın Bitkiler Alemindeki Yeri..... | 14 |
| 2.2.3. Türkiye’de Yetişen <i>Corylus</i> Türleri..... | 14 |
| 2.2.3.1. <i>Corylus avellana</i> L. (Adi Fındık)..... | 14 |
| 2.2.3.2. <i>Corylus maxima</i> Miller (Lâmbert Fındığı, Dev Fındık, Uzun Fındık)..... | 15 |
| 2.2.3.3. <i>Corylus colurna</i> L. (Türk Fındığı)..... | 15 |
| 2.2.4. Çeşit Grupları ve Özellikleri..... | 15 |
| 2.2.4.1. Yuvarlak Fındıklar (Tombul Fındıklar)..... | 15 |
| 2.2.4.2. Sivri Fındıklar..... | 16 |
| 2.2.4.3. Badem Fındıklar (Uzun Fındıklar)..... | 17 |
| 2.2.5. Kalite Açısından Türk Fındıkları..... | 17 |
| 2.2.5.1. Giresun Kalite..... | 17 |
| 2.2.5.2. Levant Kalite..... | 17 |
| 2.2.6. Dünya Fındık Üretiminde Türkiye..... | 18 |
| 2.2.6.1. Türkiye’de Fındık Üretim Alanları..... | 18 |
| 2.2.6.2. Türkiye’nin Fındık Üretimi ve İhracatı..... | 19 |
| 2.2.7. Kullanım Alanları..... | 19 |
| 2.2.8. Fındığın Besin Değeri..... | 20 |
| 2.3. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ .. | 21 |
| 2.3.1. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Varyantları..... | 22 |
| 2.3.1.1. <i>G6PDB</i> ⁺ | 22 |
| 2.3.1.2 <i>G6PDA</i> ⁺ | 22 |
| 2.3.1.3 <i>G6PDA</i> ⁻ | 22 |
| 2.3.1.4. <i>G6PD-Mediterranean</i> | 23 |
| 2.3.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliğinin Klinik Belirtileri..... | 23 |
| 2.3.2.1. Akut Hemolitik Anemi (AHA)..... | 23 |
| 2.3.2.2. Yenidoğan Sarılığı..... | 25 |
| 2.3.2.3. Kronik Non-Sferotik Hemolitik Anemi (KNSHA)..... | 25 |
| 2.4. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU. 26 | |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3. MALZEME VE YÖNTEM | 29 |
| 3.1. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ALETLER... | 29 |
| 3.2. FINDIKTAN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ HAM EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI | 32 |
| 3.3. FINDIK HAM EKSTRESİNDE GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZI ÇÖKTÜREN UYGUN AMONYUM SÜLFAT KONSANTRASYONUNUN SAPTANMASI..... | 32 |
| 3.4. FINDIK HAM EKSTRESİNDE GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN % 80 AMONYUM SÜLFAT KONSANTRASYONUNDA ÇÖKTÜRÜLMESİ | 33 |
| 3.5. HİDROKSİLAPATİT KOLON KROMATOĞRAFİSİ | 34 |
| 3.5.1. Hidroksilapatitin Hazırlanması | 34 |
| 3.5.2. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi..... | 34 |
| 3.6. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ | 35 |
| 3.6.1. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini | 35 |
| 3.6.1.1. Deneyin Yapılışı..... | 35 |
| 3.6.1.2 Sığır Serum Albumin Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi..... | 36 |
| 3.6.2. E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayini..... | 36 |
| 3.7. ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ | 38 |
| 3.7.1. Kullanılan Çözeltiler | 39 |
| 3.7.1.1. Deneyin Yapılışı..... | 39 |
| 3.8. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (PAGE)..... | 41 |
| 3.8.1. Kullanılan Çözeltiler | 41 |
| 3.8.1.1. Deneyin Yapılışı..... | 42 |
| 3.9. SODYUM DODESİL SÜLFAT-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE) | 43 |
| 3.9.1. Kullanılan Çözeltiler | 43 |
| 3.9.2. Jellerin Hazırlanması..... | 44 |
| 3.9.3. SDS-PAGE Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü..... | 44 |
| 3.10. FINDIKTAN ELDE EDİLEN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ | 46 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.10.1. Enzim Aktivitesinin Değişik Substrat Analoglarına Olan İlgisinin Belirlenmesi | 46 |
| 3.10.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazın NADP ⁺ ne NAD ⁺ 'yi Koenzim Olarak Kullanımı | 46 |
| 3.10.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisinin İncelenmesi | 46 |
| 3.10.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi | 47 |
| 3.10.5. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivitesine Göre Depo Kararlılığı | 48 |
| 3.10.6. Çeşitli Bileşiklerin Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Etkileri..... | 48 |
| 3.10.6.1. Anorganik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri..... | 48 |
| 3.10.6.2. Organik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri | 48 |
| 3.10.7. Enzim Aktivitesi Üzerine NADPH+H ⁺ 'ın İnhibitör Konsantrasyonunun Etkisi..... | 49 |
| 4. BULGULAR | 50 |
| 4.1. FINDIKTAN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN SAFLAŞTIRILMASI..... | 50 |
| 4.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması | 50 |
| 4.1.2. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi..... | 50 |
| 4.1.3. PAGE ve SDS-PAGE Elektrofrezisi | 53 |
| 4.1.3.1. PAGE | 53 |
| 4.1.3.2. SDS-PAGE | 54 |
| 4.2. ENZİM AKTİVİTESİNİN ÇEŞİTLİ SUBSTRAT ANALOGLARINA OLAN İLGİSİ..... | 54 |
| 4.3. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN NADP⁺ VE NAD⁺'Yİ KOENZİM OLARAK KULLANIMI | 55 |
| 4.4. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE pH'IN ETKİSİ | 58 |
| 4.5. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ..... | 59 |
| 4.6. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİNE GÖRE DEPO KARARLILIĞI | 60 |
| 4.7. ÇEŞİTLİ BİLEŞİKLERİN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ | 61 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7.1. Anorganik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri..... | 61 |
| 4.7.2. Organik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri..... | 63 |
| 4.8. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE NADPH+H ⁺ 'IN İNHİBİTÖR KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ..... | 64 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 66 |
| KAYNAKLAR | 72 |
| ÖZGEÇMİŞ | 89 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1.1.1 | : Pentoz fosfat yolunun reaksiyonları | 3 |
| Şekil 2.1.1.2.1 | : Nükleotid ve nükleik asid sentezi için gerekli olan pentozların sağlanması | 5 |
| Şekil 2.1.1.2.2 | : ATP ile beraber NADPH+H ⁺ 'a riboz-5-P'tan daha fazla gereksinim duyulduğu durum | 6 |
| Şekil 2.1.2.1 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin tetramer, dimer ve monomer yapılarına dönüşmesinde etkili olan koşullar | 8 |
| Şekil 2.1.2.2 | : İnsan G6PD'nin dimer yapısı | 9 |
| Şekil 2.2.4.1.1 | : Tombul fındıklar | 16 |
| Şekil 2.2.4.2.1 | : Sivri fındıklar | 16 |
| Şekil 2.2.4.3.1 | : Uzun fındıklar | 17 |
| Şekil 3.8.1.1.1 | : Dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerinin NBT yardımıyla jel üzerinde boyanma mekanizması | 43 |
| Şekil 4.1.2.1 | : Fındık ham ekstresinin % 80 amonyum sülfat kesitinin hidroksilapatit kolon kromatografisi elüsyon grafiği | 51 |
| Şekil 4.1.3.1.1 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması sırasında standart proteinlerin, ham ekstrenin, hidroksilapatit eluatının protein bantlarının ve bu eluata ait aktivite bandının PAGE elektroforezinde gösterilmesi | 53 |
| Şekil 4.1.3.2.1 | : SDS-PAGE sonucunda molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin yardımıyla eluatın molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan ln M _w -R _f grafiği | 54 |
| Şekil 4.3.1 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin NADP ⁺ ve NAD ⁺ 'yi koenzim olarak kullanması | 55 |
| Şekil 4.3.2 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 6 mM G6P derişiminde, 0,5-3 mM NADP ⁺ 'ye karşı çizilen Michaelis-Menten grafiği | 56 |
| Şekil 4.3.3 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 6 mM G6P derişiminde, 0,5-3 mM NADP ⁺ 'ye karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği | 56 |
| Şekil 4.3.4 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 2 mM NADP ⁺ derişiminde 6 mM G6P'a karşı çizilen Michaelis-Menten grafiği | 57 |
| Şekil 4.3.5 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 2 mM NADP ⁺ derişiminde, 6 mM G6P'a karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği | 57 |
| Şekil 4.4.1 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi | 58 |
| Şekil 4.5.1 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi | 59 |
| Şekil 4.5.2 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın aktivitesinin logaritması (log A) ile 1/T (K ⁻¹) arasındaki ilişki | 59 |
| Şekil 4.6.1 | : -20°C'de derin dondurucuda saklanan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın depo kararlılığı | 60 |
| Şekil 4.6.2 | : +4°C'de buzdolabında saklanan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın depo kararlılığı | 60 |
| Şekil 4.6.3 | : Oda sıcaklığında saklanan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın depo kararlılığı | 61 |
| Şekil 4.8.1 | : β-NADPH+H ⁺ konsantrasyonu ile glukoz-6-fosfat dehidrogenazın % inhibisyonu arasındaki ilişki | 65 |

TABLO LİSTESİ

| | | |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.2.6.1 | : Dünya kabuklu fındık üretimi ve ticareti | 18 |
| Tablo 2.2.6.2.1 | : Fındık üretimi ve ihracatı | 19 |
| Tablo 2.3.2.1.1 | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği olan hastalarda hemolize neden olabilen ilaçlar | 24 |
| Tablo 2.3.2.3.1 | : Kronik-nonsferotik hemolitik anemi olgusu olmayan, ancak glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği görülen hastalarda güvenle kullanılabilen bazı ilaçlar..... | 26 |
| Tablo 3.6.2.1 | : E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Warburg yöntemi ile protein miktar tayininde kullanılan faktör tablosu..... | 37 |
| Tablo 4.1.2.1 | : Fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılma evreleri | 52 |
| Tablo 4.3.1 | : G6P ve NADP ⁺ için hesaplanan V _{max} ve K _m değerleri | 58 |
| Tablo 4.7.1.1 | : 1 ⁺ Değerlikli bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri | 61 |
| Tablo 4.7.1.2 | : 2 ⁺ Değerlikli bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri..... | 62 |
| Tablo 4.7.1.3 | : 3 ⁺ Değerlikli bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri..... | 63 |
| Tablo 4.7.2.1 | : Organik bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri..... | 64 |
| Tablo 4.8.1 | : β-NADPH+H ⁺ 'ın glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi..... | 65 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| AHA | : Akut hemolitik anemi |
| ADP | : Adenozin difosfat |
| ATP | : Adenozin trifosfat |
| β-ME | : β -Merkapto etanol |
| β-NAD⁺ | : Nikotinamid adenin dinükleotid |
| β-NADH+H⁺ | : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid |
| β-NADP⁺ | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| β-NADPH+H⁺ | : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| d-ANADP | : Deamino nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| DNA | : Deoksiribonükleik asid |
| EDTA | : Etilendiamin tetraasetik asid |
| FMS | : Fenazin metosülfat |
| G6PD | : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz |
| G6P | : D-glukoz-6-fosfat |
| GSH | : İndirgenmiş glutatyon |
| GSSG | : Yükseltgenmiş glutatyon |
| KNSHA | : Kronik non-sferotik hemolitik anemi |
| NBT | : Nitroblue tetrazolyum |
| NBT.H₂ | : Formazan |
| OPPP | : Oksidatif pentoz fosfat yolu |
| PAGE | : Poliakrilamid jel elektroforezi |
| PPE | : Fosfopentoz epimeraz |
| PPI | : Fosfopentoz izomeraz |
| RNA | : Ribonükleik asid |
| SDS-PAGE | : Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi |
| Span 20 | : Sorbitan monolaurat |
| ρ-KMB | : ρ -kloromerküri benzoik asid |
| TEMED | : N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin |
| Tris | : Tris(hidroksimetil)aminometan |
| Triton X-100 | : 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-poli-etilen glikol |
| Tween 20 | : Polioksietilen monolaurat |
| TA | : Transaldolaz |
| TK | : Transketolaz |
| 6PGA | : 6-Fosfoglukonik asid |
| 6PGD | : 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz |
| 6PGLH | : 6-Fosfoglukono- δ -lakton hidrolaz |

ÖZET

FINDIKTAN (*Corylus maxima* Miller) GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Çalışmamızda, Türkiye’de Giresun ili ve civarında oldukça bol miktarda yetiştirilen findıktan (*Corylus maxima* Miller) glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD, E.C. 1.1.1.49) enzimi ilk kez saflaştırıldı ve bazı özellikleri incelendi.

G6PD findıktan homojenizasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidroksilapatit kolon kromatografisi yöntemleriyle 36,2 kat saflaştırıldı. Saflaştırma prosesi süresince sıcaklık +4°C’de tutuldu. Protein miktar tayini Bradford ve Warburg yöntemlerine göre; enzim aktivitesi ise 37°C’de Beutler ve Betke yöntemlerine göre, 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede tayin edildi.

G6PD enziminin PAGE sonucunda 271 kDa mol ağırlığına karşılık gelen tek aktivite bandı gösterdiği saptandı. SDS-PAGE sonucunda ise bu enzimin oktamer yapıda ve alt birim molekül ağırlığının 33,820 kDa olduğu bulundu.

G6PD koenzim olarak sadece NADP⁺’yi kullandı. Optimum temperaturünün 37-40°C arasında olduğu, optimum pH’sının ise 8.0 olduğu saptandı. Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisi 5.01 kcal.mol⁻¹ olarak bulundu.

Enzimin D-glukoz-6-fosfat ve NADP⁺ substratlarına karşı Km değerleri sırasıyla 1.9449 mM ve 0.4192 mM; Vmax değerleri ise sırasıyla 0.0514 U/mL ve 0.0428 U/mL bulundu.

G6PD enzim aktivitesi üzerine çeşitli anorganik, organik bileşiklerin ve bazı deterjanların etkileri incelendi. Ayrıca, enzimin depolanma kararlılığı da araştırıldı.

SUMMARY

PURIFICATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM HAZELNUT (*Corylus maxima* Miller) and INVESTIGATION OF SOME PROPERTIES

In our study, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, E.C. 1.1.1.49) was purified for the first time from hazelnut (*Corylus maxima* Miller) being abundant in Giresun (Turkey) and surroundings and some properties of the enzyme were investigated.

G6PD was purified 36.2-fold from hazelnut by homogenization, ammonium sulfate precipitation, hydroxylapatite column chromatography. Temperature of +4°C was maintained during the purification process. The protein content was determined by Bradford's and Warburg's methods and the enzyme activity was measured spectrophotometrically at 37°C according to Beutler's and Betke's methods at 340 nm.

The PAGE of the purified enzyme showed one activity band corresponding to 271 kDa molecular weight. SDS-PAGE showed that the enzyme was an octamer composed of 33.820 kDa subunits.

It was found that the purified glucose-6-phosphate dehydrogenase utilised only NADP⁺ as a coenzyme. The optimum temperature was found to be between 37-40°C, and the optimum pH at pH=8.0. The activation energy of the reaction catalyzed by the enzyme was calculated as 5.01 kcal.mol⁻¹.

The affinity of the enzyme against the D-glucose-6-phosphate and NADP⁺ was investigated Km values were for D-glucose-6-phosphate and NADP⁺ 1.9449 mM and 0.4192 mM, respectively. Vmax values were for D-glucose-6-phosphate and NADP⁺ 0.0514 U/mL and 0.0428 U/mL, respectively.

The effects of several inorganic, organic compounds, and some detergents on the enzyme activity was determined. Storage stability of the enzyme was also investigated.

1. GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşumuna fırsat vermeden % 100'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Katalitik aktiviteye sahip ribonükleik asid moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapısındadırlar.

Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücrelerin belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntıları ile incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Enzimler ve bunların fonksiyonları ile ilgili çalışmalar çok eski tarihlere kadar dayanır. Enzim bilimi sadece tıp alanında değil, biyoloji, kimya, fizik dallarında da önemini ve gereğini duyuran bir bilim dalıdır.

İnsanlar tarafından tüketilen besin kaynaklarından biri olan fındık, protein, yağ, B grubu vitaminleri, E vitamini ve Na, K, Ca, Se gibi mineraller açısından önemli bir kaynaktır. Türkiye, ortalama fındık üretimi 50.000 ton olan ve dünyada en çok fındık üreten bir ülkedir.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz pentoz fosfat metabolik yolunda indirgeyici güç elde etmek için kullanılan tepkime ve metabolik yolların başında ilk sırada yer alır. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz birçok bitkisel, hayvansal kaynaktan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasına rağmen, bugüne kadar fındıktan (*Corylus maxima* Miller) saflaştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda glukoz-6-fosfat dehidrogenaz fındıktan ilk defa saflaştırılarak fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Enzim kavramı ilk kez F. W. Kuhle tarafından 1878'de kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu kavram giderek yayılmaya başlamış ve sonunda tüm bilim dünyası tarafından kabul edilmiştir. Enzim kavramı asıl olarak “mayanın içerisinde” (Enzym=In yeast) anlamına gelmektedir. Önceleri bu kavram, maya hücreleri içerisinde bulunan ve alkolik fermentasyonu oluşturan “zymas” enzimi için kullanılmıştır [1].

Enzimlerin katalitik rolü ise önce 1885 yılında J. J. Berzelius tarafından gösterildiği halde, ilk enzimin varlığı ancak 1926 yılında üreaz enziminin J. B. Somner tarafından fasulye tanelerinden izole edilmesi ile gösterilmiştir. 1930'da pepsin ve tripsin enzimleri kristalize olarak Northrop ve diğ. tarafından izole edilmiştir [2].

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş kısmını oluştururlar [1].

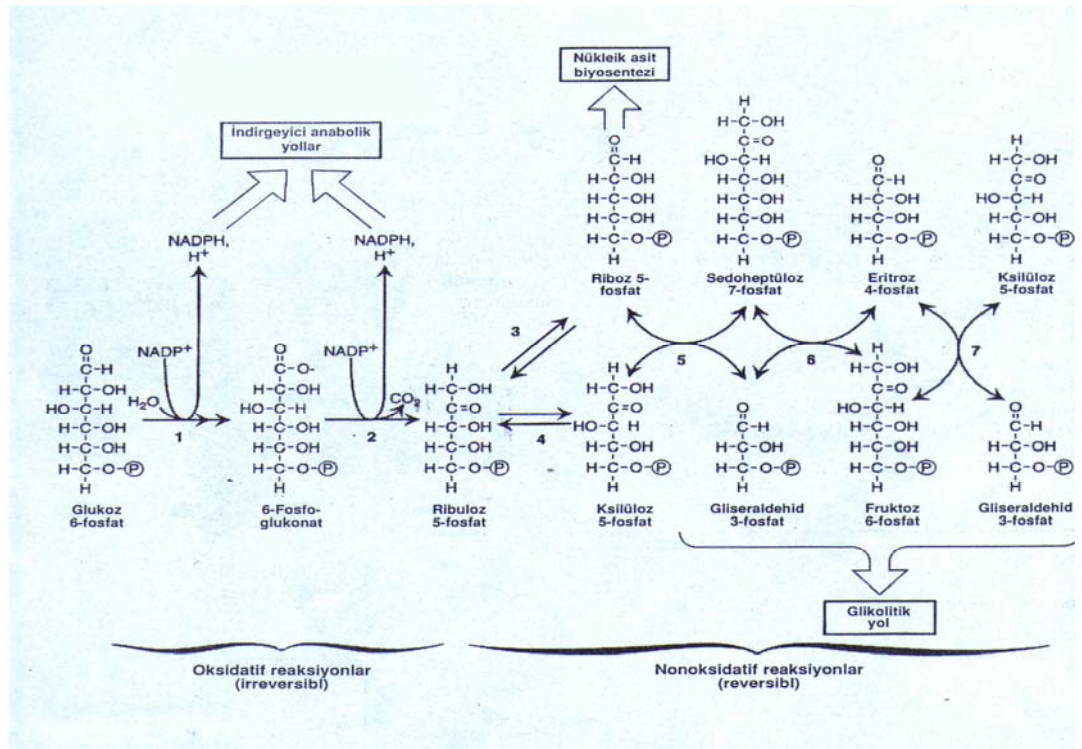
Enzimler, biyolojik katalizör olmaları nedeniyle dünyamızdaki yaşamı olası kılan etmenlerin başında gelir [3]. Bütün canlılar varlıklarını sürdürebilmek için hücre ve dokularında çeşitli biyokimyasal tepkimeleri ve mekanizmaları kullanmaktadırlar. Yaşam sürekliliğinin sağlanması için enerjiye gereksinim vardır. Bu enerji de karbohidrat, yağ, protein gibi maddelerin yıkılması ile elde edilir. Organizmada karbohidrattan (glukoz) enerji elde etmek için kullanılan ana metabolik yol glikolizdir [4]. Glikoliz tüm hücrelerde meydana gelir. Glukozdan enerji elde etmek için kullanılan diğer bir yol da pentoz fosfat yoludur. Bu yol glikolize göre daha az yaygındır. Pentoz fosfat yolu yağ asidi, steroid hormonları, DNA ve RNA sentezinin yoğun olarak meydana geldiği karaciğer, adipoz doku, süt bezleri, böbrekler, adrenal korteks ve eritrositlerde büyük öneme sahiptir. Pentoz fosfat yolunda yer alan ve üzerinde çok çalışılan enzimlerden birisi de hücrenin biyosentez ve detoksifikasyon gibi çok önemli görevlerini yerine getirebilmek için gereksinim duyduğu indirgen gücün, NADPH+H⁺ üretimini sağlayan glukoz-6-fosfat dehidrogenazdır.

2.1. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (EC 1.1.1.49, D-Glukoz-6-fosfat: NADP⁺ 1-oksiredüktaz, G6PD), Amerikan Kimya Derneği'nin Kimyasal Abstrakt Servisi (CAS) tarafından verilen CAS-kayıt numarası 9001-40-5 olan oksiredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. Bu enzimin, NADP⁺-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, Zwischenferment, D-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (NADP⁺), NADP⁺-bağımlı glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukoz dehidrogenaz, Entner-Doudoroff enzim ve glukoz-6-fosfat 1-dehidrogenaz gibi isimleri de bulunmaktadır [5].

2.1.1. Pentoz Fosfat Yolu (PPP, Heksoz Monofosfat Yolu, Fosfoglukonat Yolu)

Pentoz fosfat yolu hücrenin sitosolünde gerçekleşip, iki irreversible oksidatif reaksiyondan oluşur ve bunu bir seri reversibil şeker fosfat dönüşümleri izler (Şekil 2.1.1.1.). Döngüde direkt olarak hiç ATP üretilmez ve tüketilmez [6]. G6PD enzimi, pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı basamağını katalizleyen, düzenleyici ve anahtar bir enzimdir [7-9].



Şekil 2.1.1.1. Pentoz fosfat yolunun reaksiyonları [6]. Numaralandırılmış enzimler: (1) G6PD ve 6PGLH, (2) 6PGD, (3)PPI, (4) PPE, (5) ve (7) TK, (6) TA

2.1.1.1. Pentoz Fosfat Yolunun Oksidatif Reaksiyonları

PPP'nin oksidatif bölümü okside olan her G6P molekülü için ribuloz-5-fosfat, CO₂ ve iki molekül NADPH+H⁺'in oluştuğu 3 reaksiyondan meydana gelir. NADP⁺'nin NADPH+H'a indirgenmesi ve glukoz-6-fosfat'ın 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüşmesiyle sonuçlanan ilk reaksiyonun ürünü, glukozun 1.C'undaki karboksil grubu ile 5.C atomundaki hidroksil grubu arasında oluşan bir molekül içi estere sahip olan 6-fosfoglukono-1,5-lakton'dur. Reaksiyonu katalizleyen G6PD enzimi, NADP⁺'ye karşı oldukça spesifik olup, NAD⁺ için K_m değeri NADP⁺ için olandan yaklaşık 1000 kat fazladır. Bundan sonraki basamak, 6-fosfoglukono-1,5-lakton'un laktonaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonat'a hidrolizidir. Oluşan bu altı karbonlu şeker, koenzimi yine NADP⁺ olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi katalizörlüğünde oksidatif dekarboksilasyon sonucunda ribuloz-5-fosfata çevrilir. Riboz-5-fosfat sentezindeki son basamak ise ribuloz-5-fosfatın izomerleşme reaksiyonudur [10].

Pentoz fosfat yolunun bu ilk iki adımında oluşan indirgenmiş NADPH+H⁺'lar;

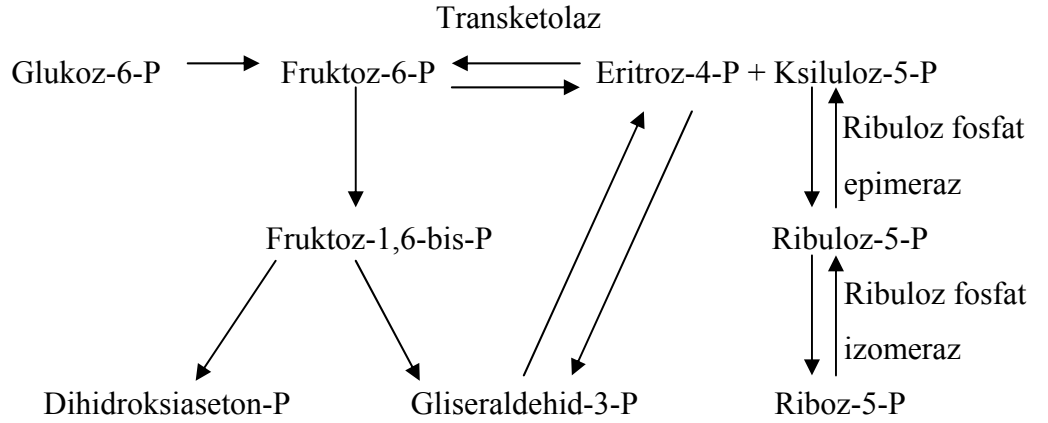
- Yağ asitlerinin biyosentezi ve zincir uzatma reaksiyonlarında,
- Steroidlerin biyosentezinde,
- Bazı aromatik aminoasitlerin biyosentezinde,
- Okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesinde,
- DNA sentezi sırasında ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüştürülmesinde,
- Nörotransmitter sisteminde,
- Peroksitlerin, ilaçların ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda,
- Methemoglobin hemoglobine dönüşümünde,
- Glukuronik asid yolunda,
- L-askorbik asid sentezinde,
- Hücre zarının bütünlüğünün korunmasında kullanılmaktadır [11-13].

2.1.1.2. Pentoz Fosfat Yolunun Nonoksidatif Reaksiyonları

PPP'nin non-oksidatif reaksiyonlarını üç-, dört-, beş- ve yedi-karbonlu şekerlerin birbirine dönüşümü izler. Bu reaksiyonlar, yolun oksidatif bölümünde oluşan ribüloz-5-P'nin ya nükleotid sentezi için gerekli olan riboz-5-P'ye ya da fruktoz-6-P ve gliseraldehid-3-P gibi glikoliz ara ürünlerine dönüşmesini sağlar. Bu nedenle, PPP izole, tekrarlayıcı bir siklus değil, glikolizle entegre bir sıklustur.

Pentoz fosfat yoluna giren bir glukoz molekülü başına iki $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ve bir riboz-5-fosfat oluşmaktadır. Bu metabolik yolda, okside olan glukoz-6-fosfat, hücredeki $\text{NADPH}+\text{H}^+$, ATP ve riboz-5-fosfat ihtiyacına göre farklı yoldan metabolizmaya katılır.

- A.** Hücrede, riboz-5-fosfata olan ihtiyaç, $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'tan daha fazla ise, glukoz-6-fosfatın çoğu, glikoliz yolu ile fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfat'a dönüştürülür. Transketolaz ve transaldolaz enzimlerinin dönüşümlü olarak katalizlediği bir seri tepkime ile bir molekül gliseraldehid-3-fosfat ve iki molekül fruktoz-6-fosfat, üç molekül riboz-5-fosfata çevrilir.



Şekil 2.1.1.2.1. Nükleotid ve nükleik asid sentezi için gerekli pentozların sağlanması.

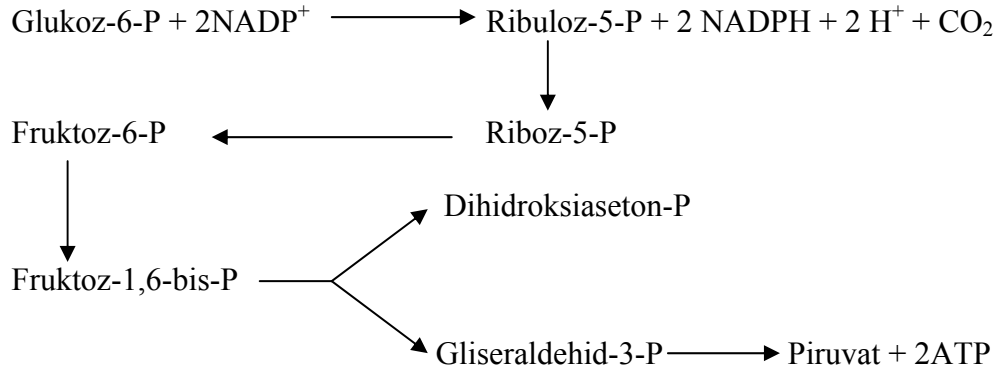
- B.** $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ve riboz-5-fosfat gereksinimi eşit ise, pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları meydana gelir. Bu reaksiyonların stokiyometrisi şöyledir:



C. $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'a riboz-5-fosfattan daha fazla ihtiyaç olduğu durumda; glukoz-6-fosfat tamamen CO_2 'ye okside olur ve bu da üç adımda gerçekleştirilir. Birinci reaksiyonda, $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ve bir riboz-5-fosfat oksidatif olarak sentezlenir. Daha sonra riboz-5-fosfat, transketolaz ve transaldolaz enzimlerinin katalitik etkisiyle fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata dönüştürülür. Son adımda ise, glukoneogenez reaksiyonlarıyla gliseraldehid-3-fosfat ve fruktoz-6-fosfattan glukoz-6-fosfat yeniden sentezlenir.



D. ATP ile beraber $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'a riboz-5-fosfattan daha fazla gereksinim duyulduğunda, glukoz-6-fosfat piruvata dönüşür. Riboz-5-fosfattan meydana gelen fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla piruvata kadar yükseltgenir. Bunun sonucunda da $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ve ATP birlikte sentezlenmiş olur [14, 15].



Şekil 2.1.1.2.2. ATP ile beraber $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'a riboz-5-fosfattan daha fazla gereksinim duyulduğu durum.

G6PD enzimi, bitkilerde sitosol ve plastidlerde bulunur [16]. Fotosentetik ve heterotrofik bitkilerde, hücre sitosolü ve plastidlerindeki Oksidatif Pentoz Fosfat Yolu'nun (OPPP) farklılıklar gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiş [16], sitosoldeki yolda bazı enzimlerin aktivitelerinin tespit edilemediği gösterilmiştir [17, 18]. 1970'li yıllarda G6PD enziminin alglerin ve yüksek yapılı bitkilerin kloroplastlarında bulunduğu kanıtlanmıştır [19]. Buna karşın, bütün bitki dokularında

bu enzimin plastidlerde de bulunduğu gösterilmiş [20], fotosentez yapılmayan bitki dokularındaki azot metabolizmasında ve yağ asidi sentezinde önemli rolü olduğu belirtilmiştir [21, 22]. Bu nedenle bitkilerde bu enzim ile yapılan çalışmalar daha çok yapraklar üzerinde yapılmıştır. Enzim aktivitesinin düzenlenmesinin temelinde fotosentez metabolizmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür [19, 23-26]. Çünkü, OPPP'da üretilen metabolitler diğer metabolik yollar için yakıt teşkil etmektedir. Örneğin, eritroz-4-P molekülü bitkilerde fotosentez yapan dokularda Kelvin Döngüsü ve Shikimate Yolu ile elde edilirken, bitkilerin kök, yumru gibi işık almayan dokularında OPPP ile sentezlenmektedir [27].

2.1.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Yapısal zellikleri

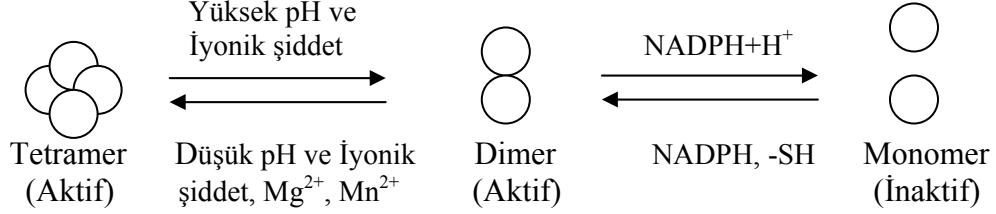
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi, mayalarda [28], tek hücrelilerde [29], bitkilerde [30] ve hayvansal dokularda [31] bulunur.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz monomeri yaklaşık 515 aminoasidden oluşur, mikrobiyal türlerde molekül ağırlığı 50-60 kDa, memelilerde ise 58-67 kDa arasında değişiklik göstermektedir [32].

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, birbiriyle tamamıyla aynı olan birden fazla alt birimin (monomerin) bir araya gelmesiyle oluşan kompleks bir moleküldür. Bu enzimin, aktivite gösterebilmesi için en az dimer yapıda olması gereklidir. Monomerleri tek başına aktivite göstermeyen bu enzim, söz konusu monomerlerin fazla sayıda birleşmesi sonucunda aktif formlarını oluşturur [33]. G6PD enziminin alt birimleri protein derişimine, iyonik kuvvete ve ortamın pH'sına bağlı olarak değişik yapılarda bulunur [34].

Enzim genellikle aktif olarak dimer yapı gösterir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, enzim, NADP^+ , $\text{NADPH}+\text{H}^+$ konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Yüksek iyonik kuvvet ve yüksek pH değerleri enzimin dimer forma dönüşmesine neden olurken; tersine, düşük pH, düşük iyonik kuvvet ve ortamda Mg^{2+} , Mn^{2+} gibi iki değerlikli katyonların bulunması durumunda tetramer yapıya dönüşümün gerçekleştiğini belirtmişlerdir [32]. Buna ek olarak, G6PD enziminin pH=6'nın altında

tetramer formu baskın halde iken, pH:8'in üzerinde dimer yapının baskın olduğu belirtilmiştir [7]. Glukoz-6-fosfat ve NADPH+H⁺, G6PD enzimini inaktif haldeki monomer yapıya dönüştürürken, sülfhidril grubu ve NADP⁺'nin varlığı enzimi aktif dimer yapıya dönüştürmektedir (Şekil 2.1.1.1).



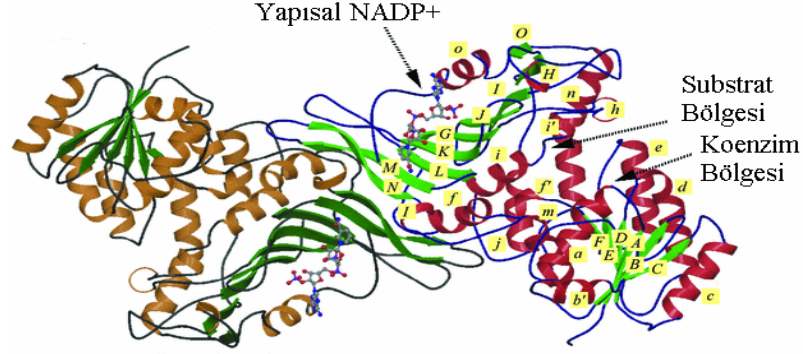
Şekil 2.1.2.1. G6PD enziminin tetramer, dimer ve monomer yapılarına dönüşmesinde etkili olan koşullar

G6PD'nin biyokimyasal olarak aydınlatılan yapısında G6P'nin enzime bağlanma bölgesinde, enzimin reaksiyonu katalizlemesinde ve nükleotidin (NADP⁺'nin) bağlanmasında 9 adet aminoasit kalıntısının bulunduğu belirtilmiştir [35-37].

1994 yılında *L. mesenteroides*'ten elde edilen G6PD enziminin dimer yapıda olduğu ve her bir alt biriminde 1 tane aktif bölge içerdiği belirtilmiştir [38]. 1999-2000 yıllarında ise insandan saflaştırılan bu enzimin tetramer yapıda olduğu gösterilmiştir [7].

Bakteriden ve insandan elde edilen G6PD enziminin dimer haldeki yapısında bulunan 57 aminoasit kalıntısının 31 tanesi hidrofobik karakterdedir. İnsan G6PD'nin her alt biriminde "Yapısal NADP⁺" adı verilen ve enzimin kararlılığı için gerekli olan NADP⁺ molekülü bulunmaktadır (Şekil 1.2.1.2). Bundan başka, bir de enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan "Koenzim NADP⁺" molekülü vardır. Bu NADP⁺ molekülünün, enzimdeki dinükleotid bağlanma bölgesinde bulunan 41. aminoasit olan Glisin (Glisin41) ve Aspartik asit42 ile etkileşime girdiği tahmin edilmektedir. "Yapısal NADP⁺" deki adenin molekülünün Tirozin503 ve Arginin487 arasında; nikotinamid molekülünün ise Triptofan509 ile Tirozin401 arasında enzime bağlandığı düşünülmektedir. Bu "Yapısal NADP⁺" molekülündeki 2'-fosfat grubu Arginin487, Arginin357, Lizin238 ve Lizin366 ile hidrojen bağı oluştururken, bisfosfat grubu Arginin370 ile etkileşim halindedir. Nikotinamid molekülündeki amid grubu ise

Arginin393 ve Aspartik asit421 ile etkileşim içindedir. Bütün bu etkileşimler göz önünde bulundurulduğunda, “Yapısal NADP⁺” nin ortamdan ayrılması durumunda enzimdeki alt birimlerin hepsinde yapısal bütünlüğün bozulabileceği düşünülmektedir [39].



Şekil 2.1.2.2. İnsan G6PD'nin dimer yapısı (Kırmızı ve yeşil renklerle belirtilen kısım alt birimlerden birini gösterirken kahverengi renkli kısım da diğer alt birimi göstermektedir) [40].

2.1.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Spesifik Özellikleri

2.1.3.1. Anomerik Karbon Atomu Spesifitesi

G6PD enziminin, substratı olan G6P'ı, açık-zincir (Fischer formülü) halinde mi yoksa piranoz halkası (Haworth formülü) şeklinde mi kullandığı eşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, bütün G6PD enzimlerinin substratını β -D-glukopiranoz-6-fosfat şeklinde kullandığı bulunmuştur. G6PD enziminin anomerik C atomu spesifitesi Salas ve diğ. (1965) tarafından fizyolojik açıdan incelenmiş, bunun sonucunda glukoz-6-fosfatı kullanan çeşitli enzimlerin anomerik özgülüğünün birbirinden farklı olduğu belirtilmiştir [41].

2.1.3.2. Substrat Spesifitesi

G6PD enziminin doğal substratı D-glukoz-6-fosfattır. Ancak enzim 2-deoksiglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-floroglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-kloroglukoz-6-fosfat, mannoz-6-fosfat, 3-deoksiglukoz-6-fosfat gibi substrat analoglarını da belirli oranlarda kullanabilmektedir. Bu enzimle ilgili olarak yapılan bütün çalışmalarda, D-glukoz-6-fosfat için en yüksek Vmax ve en düşük Km değeri bulunmuştur [32].

Substratın yapısında bulunan anomerik C atomundaki değişiklerin enzimde aktivite kaybına neden olduğu Levy (1979) tarafından belirtilmiştir. Substratın 2. C atomunda bulunan –OH grubundaki değişiklik enzim tarafından farklı derecelerde tolere edilebilmektedir. Örneğin; bu –OH grubu yerine -NH₂, -F veya –Cl grubunun geçmesi, farklı kaynaklardan elde edilen bazı G6PD enzimleri tarafından kullanılabilir. Bundan başka, 2-deoksiglukoz-6-fosfat, biręok G6PD enzimi için zayıf bir substrattır. Substrat analogu olan glukozamin-6-fosfat ise bazı G6PD enzimleri için substrat değil, inhibitördür. –OH grubu yerine –OCH₃ grubunun geçmesi sonucunda, bu molekül, enzim tarafından kullanılamamakta ve substratın stereokimyasal özelliği değiştiğinden enzimde aktivite kaybına neden olmaktadır. Galaktoz-6-fosfat, G6PD enzimi için zayıf bir substrattır. 4. C atomundaki –OH grubunun yerine –F grubu geçmesi neticesinde enzimin bu molekülü az da olsa kullandığı belirtilmiştir. Bu nedenle, 4. C atomunda bulunan –OH grubundaki değişikliğin önemli olmadığı belirtilmiştir. Glukoz-6-fosfat'ın ana yapısındaki bazı değişiklikler enzim tarafından tolere edilmesine rağmen bütün bu değişiklikler enzimde aktivite kaybına neden olmakta ve/veya substratın enzime bağlanmasını etkilemektedir. Bütün bu bilgiler ışığında, G6PD enzimlerinin büyük bir çoğunluğunun fazla miktarda substrat-seğici olduğu sonucuna varılabilir [32].

2.1.3.3. Hidrojen Atomunun Taşınmasındaki Stereospesifitesi

G6PD enziminin katalizlediği reaksiyonda, anomerik C atomundaki hidrojenin doğrudan koenzim olan NAD(P)⁺ molekülündeki nikotinamid kalıntısına β-pozisyonundan taşındığı belirtilmiştir. Bu olay ilk defa Stern ve Vennesland tarafından NADP⁺-spesifik olan *S. carlbergensis*'te gösterilmiştir [42].

2.1.3.4. Koenzim Spesifitesi

Daha önceleri *S. carlbergensis* ve çeşitli memeli dokularından elde edilen G6PD enzimleriyle yapılan ęalıřmalarda, bu enzimlerin hepsinin NADP⁺ için spesifik olduğu bildirilmekte idi. Ancak, laktasyondaki sıçan meme bezlerinden ve bazı memeli dokularından Levy (1961) tarafından saflaştırılan G6PD enzimlerinin, yüksek konsantrasyonlarda koenzim olarak NAD⁺'yi kullanabildiği gösterilmiştir [43]. Bu ęalıřmalar sonucunda G6PD enzimleri 5 ana sınıfta toplanmaktadır. Bunlar;

1. NADP⁺-Spesifik G6PD Enzimleri: Bu enzimler NAD⁺ ile reaksiyon vermezler [29, 42, 44-49].
2. NADP⁺-Tercih Eden G6PD Enzimleri: Bu enzimler yüksek konsantrasyonda NAD⁺'yi kullanabilirler, ancak fizyolojik koşullar altında NADP⁺'yi tercih ederler [50, 51].
3. Hem NADP⁺'yi Hem de NAD⁺'yi Kullananlar: Bu enzimler, fizyolojik koşullar altında koenzim olarak her iki molekülü de kullanırlar [9, 52, 53].
4. NAD⁺-Tercih Eden G6PD Enzimleri: Bu enzimler, hem NAD⁺'yi hem de NADP⁺'yi koenzim olarak kullanabilirler, fakat fizyolojik şartlarda sadece NAD⁺ ile reaksiyon verirler [54, 55].
5. NAD⁺-Spesifik G6PD Enzimleri: Bu enzimler sadece NAD⁺ ile reaksiyona girerler [56].

G6PD enzimlerinin çoğunluğu bu grupların ilk üçüne dahildir, sadece az bir kısmının diğer iki gruba ait olduğu belirtilmektedir [32].

2.2. FINDIK

Fındık, huşgiller (Betulaceae) familyasından *Corylus* cinsini oluşturan çalı ve ağaçların ortak adıdır [57].

2.2.1. Fındık Bitkisinin Özellikleri

Karadeniz Bölgesi'nin iklim özellikleri fındık için en ideal ortamı oluşturmaktadır. Fındığın anayurdu, Karadeniz'in Türkiye kıyılarıdır. Eski belgeler fındığın Doğu Karadeniz kıyılarının özel bitkisi olduğunu, buradan önce Eski Yunan'a ve Roma'ya, oradan da Dünya'ya yayıldığını göstermektedir [58, 59].

2.2.1.1. Fındık ağacı

Fındık ağacı 36°-41° kuzey enlemlerinde ve nemli iklim koşullarında, deniz kıyısından en çok 30 km içeride ve 750-1000 m'yi geçmeyen yüksekliklerde yetişir ve iyi ürün

verir. Fındık ağacının gelişmesi kolay ve uyumludur. Boyu 5-6 m'yi geçmeyen bu bodur ağacın kabuğu parlak kurşuni ve kahverengiye yakın renktedir [60].

2.2.1.2. Kök

“Saçak kök” şeklinde olan fındık kökleri fazla derine gitmez. Genellikle taç izdüşümüne kadar gelişme göstermektedir. Kök gelişmesi meyilli arazilerdeki ocakların üst kısımlarında az, yan ve alt kısımlarında ise daha fazladır.

2.2.1.3. Yaprak

Şubat ayında gelişmeye başlayan ve kısa bir sap ile yıllık sürgünler üzerinde almaşıklı olarak dizili bulunan yapraklar, yuvarlak veya hafif uzunca ve genellikle kalp şeklinde olup 10-12 cm uzunlukta ve 8-10 cm genişliktedir. Yaprakların kenarları yer yer derin dişli, alt yüzleri hafif tüylü ve mat, üst yüzleri ise açıktan koyu yeşile kadar değişebilen renge sahiptir. Yaprak damarları üst yüzde içeriye doğru girintili alt yüzde ise çıkıntılıdır.

2.2.1.4. Tomurcuklar

Yıllık sürgünler üzerindeki yaprak koltuklarında haziran ayından itibaren gelişmeye başlayan tomurcuklar, yumurta biçiminde ve yeşil renktedir. Yaprakları oluşturan tomurcuklar küçük ve sivri, yaprak ve çiçeklerin bir arada bulunduğu tomurcuklar ise daha küt ve iridir. Tomurcuklar üst üste binmiş pulcuklardan meydana gelmiştir.

2.2.1.5. Çiçekler

Fındık tek evcikli bir bitki olup, erkek ve dişi çiçekleri aynı bitki üzerinde fakat ayrı ayrı yerlerde bulunmaktadır.

Püs, kedicik ve şeton adı da verilen erkek çiçekler, haziran ayı içerisinde yıllık sürgünler üzerindeki yaprakların koltuklarında tek tek veya gruplar halinde gelişmeye başlarlar. Olgunlaşmış olan bir püs 5.5 milyon dolayında çiçek tozu yayabilmektedir. Olgunlaşan püsler kasım ayından itibaren çiçek tozu yaymaya başlarlar ve çeşitlere göre değişmekle beraber çiçek yaymaları şubat sonu ve mart ayı ortalarına kadar devam etmektedir.

Karanfil adı verilen dişi çiçek kümeleri bir tepe tomurcuğu veya yan tomurcuk olarak Haziran ayında gelişmeye başlar. Dış görünüşleri yumurta biçiminde olan tomurcuklar birbiri üzerine binmiş pulcuklardan meydana gelmiştir. Bir dişi çiçek kümesi 4-24 pistil ihtiva etmektedir. Bir çift pistil bir çiçeğe karşılıktır. Dişi çiçek kümeleri gelişmelerini Kasım ayından itibaren tamamlamakta ve karanfil adı verilen pistilleri görülmeye başlamaktadır. Başlangıçta açık renkli olan pistiller daha sonra koyu kırmızı renk almaktadırlar. İşte bu kırmızı uç safhasından sonra çiçek tozu kabul edebilir olgunluğa ulaşmış olur. En ideal çiçek tozu kabul etme süresi 15 gün olup 30 güne kadar çiçek tozu kabul edebilmektedirler. Çeşitlere göre değişmekle birlikte karanfiller, Kasım ayından itibaren açılmaya başlamakta Şubat sonu ve Mart ayı ortalarına kadar devam etmektedir. Fındık, kış aylarında çiçeklenen ve döllenerek tek bitkidir.

2.2.1.6. Yumurtalık

Yumurtalık iki bölme içersinde asılı bir yumurta bulunur. Genel olarak bunlardan bir tanesi gelişirken diğeri körelir. İki yumurta döllenip gelişirse ikiz fındık meydana gelir.

2.2.1.7. Züraf

Fındığın sert kabuklu meyvesini dıştan saran kısımdır. Bazı çeşitlerde züraf, meyve boyunu kısmen aşmakta, bazı çeşitlerde ise meyve boyunun birkaç katı büyüklükte olabilmektedir. Gelişmiş olan züraf yeşil renkli olup hasat zamanında tabandan itibaren sarımtırak kırmızı renk alır.

2.2.1.8. Çotanak

Fındığa sargı görevi yapan züraf, aynı zamanda meyvenin beslenmesine de yardım eder. Bir karanfildeki dölenen çiçek sayısı kadar çotanaklarda meyve oluşmakta ve çeşitlere göre sayısı değişmektedir. Züraf bir tane ise tekleme, iki tane ise çiftleme, üç ve daha fazla ise çotanak adını alır.

2.2.2. Fındığın Bitkiler Alemi'ndeki Yeri

Bitkiler Alemi yedi büyük bölüme ayrılır. İlk altı bölüm çekirdeksiz bitkiler bölümünü, yedinci bölüm ise çiçekli bitkiler (tohumlu bitkiler) bölümünü oluşturur [61].

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| Bölüm | : <i>Spermatophyta</i> (Tohumlu bitkiler) |
| Alt bölüm | : <i>Angiospermae</i> (Kapalı tohumlu bitkiler) |
| Sınıf | : <i>Dicotyledoneae</i> (Çift çenekli bitkiler) |
| Takım | : <i>Fagales</i> (Kayıngiller) |
| Familiya | : <i>Betulaceae</i> (<i>Corylaceae</i>) |
| Alt familya | : <i>Coryleae</i> |
| Cins | : <i>Corylus</i> |

2.2.3. Türkiye'de Yetişen *Corylus* Türleri

2.2.3.1. *Corylus avellana* L. (*Adi fındık*)

Kışın yaprağını döken, 1-7 m boyunda bir çalıdır. Züruflarının boyu meyvenin boyundan daha kısa veya biraz daha uzundur. Zürufları mızrak veya üçgen şeklinde parçalı olup, parçacıkların uçları dişlidir. Meyvenin şekli genellikle yuvarlağımsı oval olup, uzunlukları 12-18 mm civarındadır. Yaprakları kalp biçimine yakın, yuvarlak-oval veya geniş-oval şekillidir. Yapraklarının üst yüzleri tüysüz, alt yüzlerinde ise damarların üzerleri tüylüdür, kenarları da çift dişlidir.

Bu tür, ülkemizde Doğu Karadeniz, Batı Karadeniz, Marmara ve Trakya Bölgeleri'nin daha ziyade dağlık kısımlarında yaygındır. Ayrıca, Doğu Anadolu'da Van, Bitlis ve Siirt civarında da bulunur.

Günümüzde Dünya'da yetiştirilen fındık çeşitlerinin büyük bir çoğunluğu ya *C. avellana*'dan direkt olarak ya da bu tür ile diğer türlerin melezleşmeleri sonucunda meydana gelmiştir [60].

2.2.3.2. *Corylus maxima* Miller (*Lâmbert Fındığı, Dev Fındığı, Uzun Fındık*)

Kültür ve yabani formları mevcuttur. Balkan Yarımadası'nın kuzeyinde, Anadolu'nun kuzey doğusunda ve İtalya'da yabani formlarına rastlanılmaktadır. Güney Asya'da da yaygındır. Kan fındığı adıyla da yetiştirilmektedir. Meyvesi lezzetlidir. Bu türün kırmızı meyveli ve yapraklı olan formları da vardır. Çalı ve bazen de 8-9 m kadar boylanabilen bir ağaçtır. Yaprakları oval, hafif parçalı ve çift dişlidir. Zürufu boru şeklindedir. Dip kısmı geniş ve daha sonra giderek daralmakta, dış kısmı ise ince tüylerle kaplı bulunmaktadır. Meyvesi uzunca 2-2.5 cm ve iricedir. Tohumu ince, kırmızı veya beyaz bir zarla kaplıdır [61].

2.2.3.3. *Corylus colurna* L. (*Türk Fındığı*)

Anavatanı Karadeniz sahilleri, Trakya ve Makedonya olarak bilinmektedir. Bu fındık türü 1582 yılında İstanbul'dan Avusturya'ya götürüldüğü için Türk fındığı adını almıştır. *Corylus colurna* türü, 22 m kadar boynalabilen tipik ağaçlar meydana getirebilmektedir. Yaprakları yuvarlaktan ovale kadar değişiklik göstermektedir. Yaprak kenarları parçalı, tek ve çift dişlidir. Zürufu meyveden çok uzundur. Üst kısmı çoğunlukla tüylerle kaplıdır. Meyvesi yuvarlak ve oval şekilli olup, 1.8 cm uzunluktadır. Kalın kabuklu olup kırılması oldukça zordur. Daha çok süs ağacı olarak yetiştirilir. Kerestesi mobilya sanayiinde fazla tutulmaktadır [61].

2.2.4. Çeşit Grupları ve Özellikleri

Türkiye'de yetiştirilen fındık çeşitleri meyve şekli ve özelliklerine göre üç grupta toplanır [60].

2.2.4.1. Yuvarlak Fındıklar (*Tombul Fındıklar*)

Ülkemizde yetiştirilen en önemli fındık çeşididir. Daha ziyade Giresun İli'nde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Uzunluk, genişlik ve kalınlıkları hemen hemen aynı olan küresel biçimli fındıklardır. Meyve kalitesinin çok iyi olması, uluslar arası pazarlarda kolayca tutunmasını sağlamış ve Türk Fındığı dünya ülkelerince aranır duruma gelmiştir. Bu fındık çeşidi, iyi ve bakımlı bahçe koşullarında her yıl düzenli ve oldukça yüksek verim vermektedir.

Genellikle orta irilikte olup, yüksek kaliteli çeşitlerdir. İç verimleri (randıman), protein ve yağ oranları yüksektir. Depolama ve taşımada önemli olan iç meyve zarı (testa) açık kahverengi, parlak, pürüzsüz, ince, ete yapışık ve üzeri hafif damarlıdır. Zarı kolay soyulabilen ve beyazlatılabilen bu çeşitlerin tamamı yuvarlak fındık grubundandır. Yuvarlak şekilleri nedeniyle kırmaya elverişlidirler. 1 kilogramında 670-730 tane bulunan bu fındık çeşidinin zürüfları, genellikle meyve boyunun 2.5 katı büyüklükte olup, çoğunlukla 3'lü ve 4'lü çotanak oluşturmaktadır.



Şekil 2.2.4.1.1. Yuvarlak (Tombul) fındıklar [60]

Bu gruba giren Giresun Tombul Fındığı, dünyanın tartışmasız en üstün nitelikli çeşididir. Ayrıca, Palaz, Foşa, Çakıldak (Delisava), Kalınkara, Kargalak, Uzunmusa, Mincane, Cavcava ve Kan fındığı bu gruptandır.

2.2.4.2. Sivri Fındıklar

Hemen hemen fındık üretilen tüm yörelerde bu fındık çeşidine rastlanılmaktadır. Uzunlukları, genişlik ve kalınlıklarından biraz daha fazla olan çeşitlerdir.

İç meyve üzerinde bulunan zar ince, ete yapışık, açık parlak kahverengi ve üzeri damarlıdır. Bu tür fındıkların kırma işlemi sırasında çoğu zaman sivri uçları koptuğundan daha fazla zayıt verirler. Bu nedenle daha çok kabuklu olarak pazarlanırlar. 580-650 tanesi 1 kg gelen bu çeşitte, züruf uzunluğu meyve boyunun 1.5-2 katı olmakta ve çoğunlukla 3'lü çotanak oluşturmaktadır. Sivri, İncekara, Acı, Kuş fındığı gibi çeşitleri vardır.



Şekil 2.2.4.2.1 Sivri fındıklar [60]

2.2.4.3. *Badem Fındıklar (Uzun Fındıklar)*

Uzunlukları, kalınlık ve genişliklerinden oldukça fazla olan çeşitlerdir. Genellikle iri ve gösterişlidirler. Kırmaya ve işlemeye elverişli değildirler. Kabuklu olarak, daha çok kurutulmadan, çerez olarak tüketilirler. Zürufları meyve boyunun 1.5 katı büyüklükte, uçları az parçalı ve boru şeklindedir. Çotanaklarındaki meyve sayısı genellikle 3'lüdür. Yuvarlak Badem, Yassı Badem ve Değirmendere fındığı olarak üç çeşidi vardır.



Şekil 2.2.4.3.1. Uzun fındıklar [60]

2.2.5. Kalite Açısından Türk Fındıkları

Türk fındığı kalite açısından ikiye ayrılır [62].

2.2.5.1. *Giresun Kalite*

Giresun İli'nin tamamında yetiştirilen tombul fındıklar ile az çok Giresun kalitesi özelliği taşıyan Trabzon İli'nin Beşikdüzü, Vakfıkebir, Çarşıbaşı ve Akçaabat ilçelerinde yetiştirilen tombul fındıklardır. Dünyanın en üstün özellikli fındıklarıdır. Dünyadaki fındık çeşitleri içinde en yüksek oranda zar atan fındıktır.

2.2.5.2. *Levant Kalite*

Giresun kalite fındığın üretim bölgesi dışında kalan bölgelerde üretilen tüm fındıklara verilen ortak isimdir. Yetiştirildiği yere göre Levant Akçakoca, Levant Ordu, Levant Trabzon ve Levant Samsun olarak isimlendirilen bu fındıklar, Giresun kalite fındıklardan daha az yağ oranı içermesine rağmen diğer ülkelerde yetiştirilen fındıklardan genellikle daha yüksek yağ oranına sahip olup, tat bakımından da üstün niteliktedirler.

2.2.6. Dünya Fındık Üretiminde Türkiye

Fındık bademden sonra Dünya’da en yaygın yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyvedir.

Dünya fındık üretimi 1960’lı yıllarda yaklaşık 250.000 ton civarında iken aradan geçen süre içinde 570.000 ton/yıl (%230) artarak 820.000 ton civarına yükselmiştir. 2000’li yıllarda Dünya’da üretimin % 65’ini Türkiye, %17’sini İtalya, %4’ünü ABD ve %3’ünü İspanya yapmaktadır. Fındık üretimine ve yetiştirilmesine en uygun koşullara sahip ülkelerin başında Türkiye gelmektedir [63]. Türkiye ekonomisi açısından fındık önemli bir üründür [64].

Tablo 2.2.6.1. Dünya kabuklu fındık üretimi ve ticareti

| Yıllar | Ortalama Dünya Üretimi | % Artış | Ortalama Türkiye Üretimi | % Artış | Ortalama Dünya İhracatı | % Artış | Türkiye İhracatı | Türkiye Pazarı % |
|---------|------------------------|---------|--------------------------|---------|-------------------------|---------|------------------|------------------|
| 1961-70 | 247.600 | - | 138.000 | - | 151.558 | - | 112.658 | 74,33 |
| 1971-80 | 413.150 | 66,86 | 259.000 | 87,68 | 282.952 | 86,70 | 227.260 | 80,32 |
| 1981-90 | 528.700 | 27,97 | 342.650 | 32,30 | 359.260 | 26,97 | 270.886 | 75,40 |
| 1991-00 | 692.000 | 30,89 | 492.800 | 43,82 | 464.840 | 29,39 | 391.016 | 84,12 |
| 2000-02 | 940.000 | 35,84 | 730.000 | 48,13 | 540.000 | 16,17 | 512.000 | 94,81 |

2.2.6.1. Türkiye’de Fındık Üretim Alanları

Türkiye fındık üretim alanlarına göre 3 bölgeye ayrılmaktadır [63].

- A. 1. Standart Bölge: Fındık üretimi açısından en önemli bölge olarak kabul edilir. Buna göre Artvin, Giresun, Ordu, Rize ve Trabzon illeri bulunmaktadır.
- B. 2. Standart Bölge: Fındığın ticari mal niteliğinde olduğu bu bölge ise Bolu, Düzce, Kastamonu, Kocaeli, Sakarya, Samsun, Sinop ve Zonguldak illeri bulunmaktadır.
- C. 3. Standart Bölge: Çanakkale’den Diyarbakır’a kadar geniş bir alanı kapsamakta olup, bu bölgede üretim çerezlik olarak yapılmakta ve üretimin ekonomik bir değeri olmadığı varsayılmaktadır.

2.2.6.2. Türkiye'nin Fındık Üretimi ve İhracatı

Ülkemizde ilk kez Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen fındık, 1964'den bu yana maliyetlerin üzerinde fiyatla alım garantisi verilmesi, fındığın diğer ürünlere göre daha az emekle yetiştirilen bir ürün olması ve bölgeden yapılan göçler vb. etkenlerle doğal ekim alanlarının da dışına taşarak önce Batı Karadeniz daha sonra ise diğer illere yayılmıştır.

1998 yılından bu yana 540.000 hektar olarak hesaplanan ve sabit kaldığı varsayılan fındık dikim alanlarının, sanılan aksine, özellikle Batı Karadeniz Bölgesi'nde artmakta olduğu gözlenmiştir. 1995-2002 döneminde 2. Standart Bölgede dikim alanları % 50 oranında artarken, fındığın doğal ekolojisi sayılan 1. Standart Bölgede üretim alanları % 5 oranında azalmıştır [63].

Tablo 2.2.6.2.1. Fındık üretimi ve ihracatı

| Yıllar | Ekim Alanı (Hektar)* | REKOLTE (Ton)* | İHRACAT (Ton)** |
|------------|----------------------|----------------|-----------------|
| 1998/99 | 540.000 | 580.000 | 347.416 |
| 1999/00 | 540.000 | 530.000 | 398.840 |
| 2000/01 | 544.000 | 470.000 | 408.506 |
| 2001/02 | 548.000 | 625.000 | 511.786 |
| 2002/03 | 548.000 | 610.000 | 511.836 |
| 2002/03*** | 548.000 | 610.000 | 354.013 |
| 2003/04*** | 548.000 | 500.000 | 259.134 |

(* Fiskobirlik, ** İhracatçı Birlikleri, ***Eylül-Şubat dönemi)

2.2.7. Kullanım Alanları

Türkiye ve Dünya'da çerez olarak da tüketilen fındığın % 90'a yakın kısmı kavrulmuş, beyazlatılmış, kıyılmış, dilimlenmiş un ve püre halinde çikolata, bisküvi, şekerleme sanayiinde; tatlı, pasta ve dondurma yapımı ile yemek ve salatalarda yardımcı madde olarak kullanılmaktadır [60].

Yaklaşık beşbin yıldır bilinen fındık, meyvesinden odununa kadar birçok yerde insanlığa büyük yararlar sağlamaktadır. Fındık kabuğu ülkemizde özellikle fındık üretilen bölgelerde çok değerli ve yüksek kalorili bir yakıt maddesi olarak

kullanılmaktadır. Fındık kabuğu potansiyel olarak Türkiye için önemli bir enerji kaynağıdır [65]. Fındık kabuğundan solar hidrojen üretimi yapılmıştır [66].

Ayrıca fındık odunundan sepet, baston, sandalye, çit ve el aletleri yapımında faydalanılır. Bazı türleri park ve bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilir. Fındık yaprağı ile meyve zürüfları da gübre olarak kullanılmaktadır. Üretim fazlası fındıklardan fındık yağı elde edilmektedir. Fındık ham yağı rafine edilerek yemeklik yağ olarak, yağ çıkarılması sırasında arta kalan küspe, yüksek oranda protein içermesi nedeni ile yem sanayiinde kullanılmaktadır. İspanya ve Portekiz gibi ülkelerde fındık unu, gıda değerini arttırıcı olarak ekmeğe katılır. Kalitesi yüksek olan fındıklardan çıkarılan yağ, yemeklik yağ olarak kullanıldığı gibi pastacılık, eczacılık ve parfümeri endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca fındık kabukları Cr (III), Cr (VI), Cd (II), Zn (II) [67, 68] ve Ni (II) [69] iyonlarının ortamdan uzaklaştırılmasında kullanılır [70].

2.2.8. Fındığın Besin Değeri

Ülkemiz fındığın anavatanı olması nedeni ile oldukça zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Enerji değerinin çok yüksek olması nedeni ile besin maddesi olarak fazla miktarda tüketilmektedir. 100 g fındık yandığı zaman 600-650 kcal'lik bir enerji sağlar [71]. Karbohidrat oranı % 10-12 [72, 73] iken, protein oranı % 10-24'tür. Fındık % 50-73 oranında yağ içerir. Bu yağda doymamış yağ asitleri olan linoleik, linolenik ve oleik, palmitik ve stearik asid bulunur. Fındıkta ayrıca B₁, B₂, B₃ ve B₆ vitaminleri, α - tokoferol, askorbik asid bulunur. Fe, Cu, Mg, Mn, Ca, K ve Na iyonlarının da iyi bir kaynağıdır [74, 75]. Bununla birlikte, en önemli antioksidanlardan biri olarak görev yapan selenyum da fındıkta bulunmaktadır. Serbest radikal oluşumunu önleyici etkisinden dolayı selenyumun hücre membralarını koruduğu, kansere yakalanma riskini azaltarak kalp ve damar hastalıklarını önlediği belirtilmiştir [76].

Organik asidlerden de az miktarda fındıkta bulunmaktadır. En fazla bulunan organik asid malik asiddir [73]. Ayrıca, esansiyel amino asidlerden arginin, lösin, ve esansiyel olmayan amino asidlerden glutamik asid ve aspartik asid de fındıkta bulunmaktadır [64]. Tombul fındıkta total diyet lif içeriği % 13'tür. Bunun % 2'si çözünebilir lifdir [76]. Çözünebilir lifin total ve LDL-kolesterolü düşürdüğü literatürde belirtilmiştir

[77]. Fındıkta bulunan kuersetinin diyabette oluşan oksidatif hasarı azalttığı öne sürülmüştür [78, 79].

Sağlıklı kişilerin, 1 ay süresince diyetlerine 1 g/kg/gün oranında fındık ilavesinden sonra plazma lipid peroksidasyon düzeylerinde anlamlı bir düşüş görüldüğü Durak ve diğ. tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir [77]. Hiperkolesterolemik kişilerde fındık ile zenginleştirilmiş diyetin plazma kolestrol ve lipoproteinleri azalttığı öne sürülmüştür [80].

Tavşanlarda, diyete fındık yağı ilave edilmesi sonucunda, plazma lipid peroksit düzeylerinin düzeldiği, apo B-100 içeren lipoproteinlerin azaldığı ve aortik aterosklerotik lezyonların da düzeldiği Hatipoğlu ve diğ. tarafından gösterilmiştir [81, 82].

Hiperlipidemik ve diyabetik hayvan modellerinde fındığın trombojenik aktivite ve lipid profili düzeyleri Yarat ve diğ. [83] tarafından incelenmiş ve fındığın tromboplastik aktivite ve lipid düzeylerini düşürdüğü öne sürülmüştür [84].

2.3. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

G6PD enzimin eksikliği, 1950’li yılların başlarında bazı Amerikan askerlerinin antimalaryal bir ilaç olan Primakin’i kullanmaları sonucunda ortaya çıkan akut hemolitik anemi hastalığının semptomlarının araştırılmasıyla keşfedilmiştir [85, 86]. Bu keşiften sonraki on yıl içerisinde, G6PD eksikliği daha çok klinik açıdan incelenmiş, bunu takip eden yıllarda enzimin çeşitli varyantları araştırılmaya başlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu enzim eksikliğine neden olan çeşitli mutasyonlar DNA düzeyinde incelenmeye devam etmektedir [87].

G6PD eksikliğine bazı insanlarda bakla (*Vicia faba*) yedikleri zaman allerjik bir reaksiyon olarak ortaya çıktığı için “Favizm” de denilmektedir [88].

G6PD eksikliği, yeryüzünde en sık rastlanan ve X-kromozomuna bağlı genetik bir enzim bozukluğu olup, günümüzde 400 milyondan fazla insanı etkilemekte ve yaşam kalitelerini düşürmektedir [39, 89, 90].

2.3.1. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Varyantları

Mutant genler, normal enzim yerine varyant enzim sentezlemektedirler. Buna göre dünya nüfusunun % 7.5'i mutant geni taşımakta ve % 2.9'unda da klinik olarak alyuvar G6PD enzim eksikliği görülmektedir. Erkekler sadece 1 tane X kromozomu taşımaktadırlar. Bu nedenle G6PD eksikliği açısından ya sağlıklı (normal) ya da hasta olacaklardır. Fakat kadınlar iki adet X kromozomuna sahip olduklarından normal, heterozigot (taşıyıcı) veya homozigot (hasta) olabilirler. Taşıyıcı olan bireyler de G6PD normal ya da çok az da olsa aktivite gösterebilmektedir [90].

Dünya'da 400'den fazla varyant saptanmış ve bu varyantların moleküler özellikleri incelenmiştir [91]. Bunlar;

2.3.1.1. *G6PDB*⁺

Normal enzim aktivitesi gösteren enzimdir.

2.3.1.2. *G6PDA*⁺

Amerikan zencilerinin yaklaşık % 20'sinde görülen ve normal enzim aktivitesi gösteren bu varyantın oluşumuna aspartik asid-asparagin aminoasidlerinin yer değiştirmesinin neden olduğu 1967 yılında saptanmıştır [92]. 1987 yılında ise bu yer değiştirmeye sebep olarak 376. nükleotidde Adenin (A)-Guanin (G) substitusyonu gösterilmiştir. Bundan dolayı da *G6PDA*⁺ varyantı normal enzime göre elektroforetik ortamda daha hızlı göç etmektedir [93].

2.3.1.3. *G6PDA*⁻

Normal enzimin yaklaşık % 5-15'i kadar aktiviteye sahip olan bu varyant, elektroforetik olarak hızlı göç eder. Varyant oluşumunun sebebi, protein yapısı aydınlatılana kadar bulunamamış, fakat 1988 yılında bu varyantın *G6PDA*⁺'da olduğu gibi bir tane değil,

iki farklı noktadaki nükleotidde yer değiştirmeden kaynaklandığı saptanmıştır. Yani, G6PDA⁻ varyantının tüm örneklerinde, G6PDA⁺ oluşumuna neden olan 376. nükleotiddeki A-G dönüşümü vardır [93]. Buna ek olarak 202. nükleotidde, G-A yer değiştirmesinin sonucunda valin amino asidi yerine metiyonin amino asidi geçtiği anlaşılmıştır. Daha sonraki yıllarda, 680. nükleotidde G-T ve 968. nükleotidde de T-C dönüşümlerinin bu varyant oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir [94].

2.3.1.4. G6PD-Mediterranean (G6PD-Med)

G6PD varyantları arasında % 10'dan daha az aktiviteyle en şiddetli polimorfik tip olan G6PD-Med, çok sayıda etnik grubu kapsayan, geniş bir coğrafik alanda bulunur. Bu varyanttaki mutasyon, normal enzimin yapısındaki 188. amino asid olan fenilalanin yerine serin amino asidinin geçmesi sonucu meydana gelmiştir [91]. G6PD-Med, elektroforezde normal olarak göç eder ve her iki substratına karşı düşük Km değerine sahiptir [94].

2.3.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliğinin Klinik Belirtileri

G6PD eksikliğine sahip olan insanların hemen hemen tamamında klinik anlamda belirti görülmez. Bu bireyler ancak, oksidatif strese maruz kaldıklarında veya bazı ilaçları kullandıklarında enzim eksikliğine bağlı olarak semptomlar ortaya çıkar. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliğinin, bu enzimin varyantlarını taşıyan bireylerin yaşam süreleri üzerine etkisi yoktur [95]. G6PD enzimin moleküler özelliklerinden ve çeşitli çevresel faktörlerden kaynaklanan bazı klinik semptomlar bulunmaktadır [96].

2.3.2.1. Akut Hemolitik Anemi (AHA)

G6PD eksikliğine sahip insanlarda AHA'nın gelişmesine neden olan üç risk faktörü bulunmaktadır [90]. Bunlar;

- Favizm: İlk çağlardan beri bazı insanların bakla (*Vicia faba*) yemelerinin ardından hasta oldukları bilinmektedir. Özellikle taze bakla başta olmak üzere, kurutulmuş veya dondurulmuş bakla yiyen insanlarda renk solukluğu, şiddetli halsizlik, bel veya karın ağrısı, koyu renkli idrar ve hemoglobinüri şeklinde

kendini gösteren AHA olgusuna “favizm” denir [88]. Favizm’de hemolitik atağın görülme süresi Luzzatto’ya (2006) göre 48-72 saatlerde iken, Mehta ve diğ. (2000) göre 24-48 saattir. Favizm geçirmiş kişilerin hepsi G6PD eksikliğine sahip iken, G6PD eksikliği olanların tümü bakla yediği zaman akut hemolitik krize yakalanmamaktadır [97]. Favizm, özellikle 2-6 yaş arası çocuklarda çok sık görülür. Bakla yiyen hamile kadınlarda, anneden fetüse de geçebilmektedir [97].

- İlaç Alımına Bağlı AHA: G6PD eksikliği primakin isimli bir ilacın hemolitik etki göstermesi ve bunun nedenlerinin araştırılması sonucunda keşfedilmiştir [83]. G6PD eksikliği görülen bireylerde, ortak özellikleri oksidan ajan olan primakin ve diğer bazı ilaçların alımına bağlı olarak hemoliz meydana gelir ve belirtileri favizmdekine benzerdir. Bu ilaçlar Tablo 2.3.2.1.1’de verilmiştir [39].
- Enfeksiyon ile Gelişen AHA: Enfeksiyon, G6PD eksikliğine sahip bireylerde hemolize neden olan en yaygın olaydır. Çeşitli bakteriyel, viral ve parazit kaynaklı enfeksiyonların akut hemolitik krize neden olduğu bildirilmiştir [95].

Tablo 2.3.2.1.1. G6PD eksikliği olan hastalarda hemolize neden olabilen ilaçlar

| Kaçınılması Gereken İlaçlar | | G6PD Varyantları |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anti Diyabetik Ajanlar | Glibenklamid | G6PD-Med / G6PDA ⁻ |
| Antimalaryal İlaçlar | Pentakin Pamakin Primakin Quinakrin | Tümü Tümü Tümü G6PD-Med / G6PDA ⁻ |
| Kemoterapötik Ajanlar | Kloramfenikol Siprofloksasin Doksorubisin Nalidiksik asid Nitrofurantoin Stibofen | G6PD-Med / G6PDA ⁻ G6PD-Med / G6PDA ⁻ G6PD-Med / G6PDA ⁻ G6PD-Med / G6PDA ⁻ Tümü Tümü |
| Gut Tedavisi | Rekombinant Ürat Oksidaz | Tümü |
| Sülfonamidler | Sülfasalazin (5-Amino salisilik asid) Sülfapiridin Sülfadimidin | Tümü Tümü Tümü |
| Sülfonlar | Dapson (Diyafenilsulfon) | Tümü |

2.3.2.2. *Yenidoğan Sarılığı*

G6PD eksikliği, eritrositlerde en sık görülen ve yenidoğanlarda sarılığa neden olan enzimopatidir. Enzim eksikliği olmayan yenidoğanlara oranla G6PD eksikliğine sahip yenidoğanlarda sarılığın gelişmesi çok risklidir. Yenidoğan sarılığı, özellikle G6PD-Med varyantında G6PDA⁻ varyantına göre daha şiddetli geçer [39, 90, 95]. G6PD eksikliğine bağlı yenidoğan sarılığı acil olarak önlenmezse, bebekte zeka geriliğine (kernikterus) ve spastik serebral felce bağlı ölümlere neden olabilir. Bu ciddi sağlık sorunları, erken dönemde fototerapi ile önlenmektedir [97].

2.3.2.3. *Kronik Non-Sferotik Hemolitik Anemi (KNSHA)*

G6PD aktivitesi çok az olan, bir başka deyişle enzimin şiddetli eksikliğine neden olan az sayıdaki mutasyonlar sonucu görülür. Kronik hemoliz, genelde hafif veya orta şiddette ortaya çıkmaktadır. Ancak seyrek rastlanan bazı G6PD varyantlarında, sürekli kan transfüzyonu gerektirecek kadar şiddetli olabilen hemolitik krizler görülmektedir. KNSHA'ya neden olan G6PD varyantlarındaki mutasyonların büyük bir kısmı, enzimin substrat bağlama bölgesinde kümelenmiştir. Bu mutasyonlara sahip eritrositlerde küresel yapı bozulmakta, anemi ve bilirubin değerlerinde artma gibi durumlar görülmektedir [97]. KNSHA olgusu olmayan, ancak G6PD eksikliği görülen hastalarda bazı ilaçların kullanılabildiği Beutler tarafından belirtilmiştir [98]. Bu ilaçlar Tablo 2.3.2.3.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.3.2.3.1. Kronik non-sferotik hemolitik anemi olgusu olmayan, fakat G6PD eksikliği görülen hastalarda güvenle kullanılabilen bazı ilaçlar

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Asetaminofen (Parasetamol, Tilenol, Tralgon, Hidroksi asetanilid) | Menadion sodyum bisulfit (Hikinone) |
| Asetofenetidin (Fenasetin) | ρ -Aminobenzoik asid |
| Asetilsalisilik asid (Aspirin) | ρ -Aminosalisilik asid |
| Aminopirin (Piramidon, Aminopirin) | Probenesid (Benemid) |
| Antazolin (Antistin) | Prokainamid hidroklorür (Pronestil) |
| Antipirin | Pirimetamin (Daraprim) |
| Askorbik asid (Vitamin C) | Streptomisin |
| Benzheksol (Artane) | Sülfasitin |
| Difenildramin (Benadril) | Sülfadiazin |
| Fenilbutazon | Sülfaguanidin |
| Fenitoin | Sülfamerazin |
| Izoniazid | Sülfametoksazol (Gantanol) |
| Kloramfenikol | Sülfametoksipiridazin (Kinex) |
| Klorguanidin (Proguanil, Paludrin) | Sülfisoksazol (Gantrisin) |
| Klorokin | Tiaprofenik asid |
| Kolşisin | Trimetoprim |
| Kinin | Tripeleennamine (Piribenzamin) |
| L-Dopa | Vitamin K |

2.4. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU

Pentoz fosfat yolunun ilk ve düzenleyici enzimi olan G6PD 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından at eritrositlerinde keşfedilmiş olup, bu enzime o zamanlarda “Zwischenferment” adı verilmiştir [99]. Bu enzim saf olarak ilk kez 1936 yılında Brewers’ mayasından Noltmann, Gubler ve Kuby tarafından kristal yapıda elde edilmiş [28, 100], daha sonra diğer memeli eritrositlerinde keşfedilmiştir [27]. G6PD enzimi insan eritrositlerinden 1961’de Marks ve diğ.; 1962’de Kirkmann ve Hendrickson; 1963’te Chung ve Langdon; 1965’te Luzzatto ve Allen tarafından saflaştırılmıştır [101]. G6PD enzimi, insan eritrositlerinden 1966 yılında Yoshida tarafından homojen halde ve en yüksek saflık derecesine sahip olarak (258.000 kat) saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 750 U/mg protein olarak bulunmuştur. Yoshida’ya göre enzim en aktif durumda heksamer yapıya sahiptir [34]. Daha sonraki yıllarda, çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan bu enzimin izolasyonu ve kinetik parametreleri üzerine

çalışmalar yapılmış, enzime ait moleküler, katalitik ve düzenleyici özelliklerine ait bilgiler elde edilmiştir.

Genellikle sitoplazmik bir enzim olan G6PD enziminin saflaştırılmasında başlangıçta iyon değişim kromatografisi ve jel eleme kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda afinite ligandları (2',5'-ADP-Sepharose ya da NADP⁺-Sepharose) kullanılmaya başlanmıştır [102].

G6PD enzimi protozoa [44], bakteri [47], mantar [103], sinek [104], sıçan [105], balık [106] ve memelilerin hemen hemen bütün dokuları olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur. Bunlara ek olarak tavşan karaciğer mikrozomunda ve kemik iliğinde de bu enzimin olduğu tespit edilmiştir [107].

G6PD enzimi çeşitli insan dokularından elde edilmiştir. İnsan eritrositlerinden [34, 101, 105, 108-113], insan beyni, trombositleri, böbrek ve karaciğerinden [49, 111] ve insan plasentasından [15, 112] saflaştırılmış ve bu enzimin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

G6PD enzimi hayvan dokularından koyun eritrositleri ve göz lensinden [10], Van Gölü balığından (*Chalcalburnus Tarischii* Palas, 1811) [106], sığır eritrositlerinden, adrenal korteksinden, lensinden [51, 113, 112], tavşan beyin korteksinden, ince bağırsağından, eritrositleri ve retikülositlerinden [103, 115], kaz eritrositlerinden [116], laktasyondaki sıçan meme bezlerinden [49, 111, 117], sıçan karaciğeri, böbreği, yumurtalıkları ve beyninden [118-124], fare böbreklerinden [125-126], tavuk karaciğerinden [127], domuz beyni, ince bağırsağı ve karaciğerinden [45, 129, 130], köpek karaciğerinden [131], farklı metodlarla saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir.

Bitkilerden ise bezelye yapraklarından [19], patatesten [20, 27], arpa ve arpa köklerinden [21, 133, 134], soya fasulyesi yumrularından [22], ıspanaktan [24, 25], mısır yapraklarından [26], fındık (*Corylus avellana* L.) kotiledonlarından [30], maydanoz (*Petroselinum hortense*) yapraklarından [136], şeftaliden [137], tütün yapraklarından [138, 139], arpa yapraklarından [140], soya fasulyesi yapraklarından

[141], buğday germinden [142] farklı metodlarla saflaştırılarak çeşitli kinetik özellikleri incelenmiştir.

G6PD enzimi mikroorganizmalardan da *Saccaromyces carlsbergensis*'den [28, 100], *Aspergillus aculeatus*'tan [29], *Trypanosoma brucei*'den [44], *Aspergillus niger* ve *Aspergillus nidulans*'tan [47], *Acetobacter hansenii*'den (*Acetobacter xylinum*) [48, 54], *Pseudomonas multivorans*'tan [55], *Candida utilis*'ten [102], *Hansenula mrakii*'den [143], *Neurospora crassa*'dan [144], *Pseudomonas fluorescens*'ten [145], *Pseudomonas aeruginosa*'dan [146], *Pseudomonas W6*'dan [53, 147], *Escherichia coli*'den [148-150], *Drosophila melanogaster*'den [151], *Macracanthorynchus hirudinaceus* (*Acanthocephala*)'dan [152], *Cryptococcus neoformans*'tan [153], *Saccharomyces cerevisiae*'den [154-155], *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'tan [156], *Methanoculleus thermophilicus*'tan [157], *Bacillus stearothermophilus*'dan [158], *Plasmodium berghei*'den [159, 160], *Plasmodium falciparum*'dan [161], *Corynebacterium glutamicum*'dan [162], *Eimeira stiedai*'den [163], *Mycobacterium smegmatis*'ten [157, 164], *Arthrobacter globiformis*'ten [165], *Leuconostoc mesenteroides*'ten [166, 167] ve *Penicillium duponti* ve *Penicillium notatum*'dan [168] çeşitli metodlarla saflaştırılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan fındıklar (*Corylus maxima* Miller), Ağustos 2005 tarihinde Giresun İli Tirebolu İlçesi'nden sağlandı. Fındıkların teşhisi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı emekli Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Kerim ALPINAR tarafından yapıldı.

3.1. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ALETLER

Fındıktan (*Corylus maxima* Miller) glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada, 0.48 M mannitol (Merck 5982) içeren 25 mM sodyum fosfat tamponu (pH = 7.0) ile hazırlanan ham ekstreler kullanıldı. Sodyum fosfat tamponunun hazırlanmasında $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106345) ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106573)'dan yararlanıldı. Fındıklardan hazırlanan ham ekstrenin amonyum sülfat kesiti için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck 101216) kullanıldı. Diyaliz işleminde ise Sigma marka {D-9527 genişliği 43 mm (1.7 μ), çapı 27 mm (1.1 μ)} diyaliz kesesi kullanıldı.

Ham ekstre ve amonyum sülfat kesitinin hazırlanmasında Waring blender, Chiltern Hotplate HS 31 manyetik karıştırıcı ve SIGMA 3K 30 soğutuculu santrifüj kullanıldı.

Kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak kullanılan hidroksilapatitin hazırlanmasında $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106345), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106573), CaCl_2 (Merck 053101) ve NaOH (Merck 6462)'den, kolonda kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanmasında ise $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106345) ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106573)'dan yararlanıldı.

Protein miktar tayinlerinde, enzim aktivitesinin ölçümlerinde ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında Shimadzu-PharmaSpec UV 1700 spektrofotometresi ve buna bağlı Nüve BM 320 su banyosu, tampon çözeltilerin pH'larının ölçülmesinde ise Beckman pH metresi kullanıldı. Poliakrilamid jel elektroforezinde Thermo EC120-2 Mini Vertical Gel System elektroforez sistemi ve Micro-Bio-Tec Brand güç kaynağından yararlanıldı.

Fındıktan elde edilen ham ekstrede, % 80'lik amonyum sülfat fraksiyonunda, hidroksilapatit kromatografilerinden elde edilen fraksiyonlarda yapılan enzim aktiviteleri tayinlerinde substrat olarak D-glukoz-6-fosfat (G6P) (Sigma G-7879), tampon olarak Tris(hidroksimetil)aminometan (Merck 108387), β -NADP⁺ (Fluka 93205) ve MgCl₂.6H₂O (Atabay Kimya)'dan yararlanıldı.

Protein miktar tayininde; standart olarak sığır serum albumini (Merck 112018), Bradford metoduna göre protein miktar tayininde kullanılan Bradford ayırıcının hazırlanmasında ise Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka 27815) kullanıldı.

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'nde ise, N,N'-metilendiakrilamid (Merck 805968), akrilamid (Merck 800830), β -dimetilaminopropiyonitril (Sigma D-7924), potasyum ferrisiyanür (Riedel de Haën 12643) ve amonyum persülfat (Merck 101200); elektroforez tamponunun hazırlanmasında Tris(hidroksimetil)aminometan (Merck 108387) ve glisin (Merck 500190); jellerin boyanmasında Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka 27815); dekolorasyon işlemlerinde metanol (Merck 106008) ve asetik asid (Merck 100056) ve molekül ağırlığı tayini için standart olarak Sigma (MW-ND-500) marker kiti kullanıldı.

Aktivite bantlarını boyamak için 0,1 M Tris-HCl pH=8.0 tamponu, nitrobluetetrazolyum (NBT) (Sigma N-6876), fenazinmetosülfat (FMS) (Fluka 68600), β -NADP⁺ (Fluka 93205) ve G6P (Sigma G-7879)'tan yararlanıldı.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) jellerin hazırlanmasında N,N'-metilen diakrilamid (Merck 805968), akrilamid (Merck 800830), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Fluka 71725), N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) (Fluka 87687), amonyum persülfat (Merck 101200), Tris(hidroksimetil)aminometan (Merck 108387), HCl (Merck 100314); numune tamponunda Tris(hidroksimetil)aminometan (Merck 108387), HCl (Merck 100314), SDS (Fluka 71725), β -merkapt etanol (Merck 805740), brom timol mavisi (Merck 103026), gliserin (Merck 4091); yürütme tamponunun hazırlanmasında Tris(hidroksimetil)aminometan (Merck 108387), glisin (Merck 500190) ve SDS (Fluka 71725); renklendirme çözeltisinin hazırlanmasında Coomassie Brilliant Blue R-250

(Fluka 27816), metanol (Merck 106008) ve asetik asid (Merck 100056), renksizleştirme çözeltisinin hazırlanmasında ise asetik asid (Merck 100056) ve metanol (Merck 106008)'den yararlanıldı. Molekül ağırlığı tayininde standart olarak Sigma marker kiti (MW-SDS-70L) kullanıldı.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine farklı substratların etkisini incelemek amacıyla D-glukoz (Merck 8346), D-fruktoz (Merck 5321), D-mannoz (Fluka 63580) ve D-galaktoz (Merck 4060) kullanıldı.

İnhibitör ve aktivatör denemelerinde anorganik bileşikler olarak 1^+ değerlikli iyonlardan; KCl (Merck 4935), KF (Merck 5030), KNO₃ (Merck 5061), NaCl (Merck 106404), NaF (Merck 6441), NaNO₃ (Merck 6535), Na(CH₃COO) (Merck 6265), NaHCO₃ (Merck 106323), LiCl (Fluka 62478), NH₄Cl (Merck 1142); 2^+ değerlikli iyonlardan K₂CO₃ (Merck 159236), K₂SO₄ (Merck 5150), Na₂CO₃ (Merck 106398), Na₂SO₄ (Merck 822286), CaCl₂ (Merck 2386), CaCO₃ (Merck 2064), Ca₃(PO₄)₂ (Fluka 50553), BaCl₂.2H₂O (Merck 1717), BaCO₃ (Merck 1710), Ba(NO₃)₂ (Merck 1727), CuCl₂ (Merck 2731), CuSO₄.5H₂O (Pancreac 131270), FeCl₂.4H₂O (Merck 3860), FeSO₄.2H₂O (Merck 2967), Hg(NO₃)₂ (Ferak Berlin 010415), Mg(NO₃)₂.6H₂O (Merck 5854), MgSO₄.7H₂O (Fluka 63140), MnCl₂.6H₂O (Riedel de Haën 13216), ZnCl₂.4H₂O (Pancreac 141779), ZnSO₄.7H₂O (Merck 8881); 3^+ değerlikli iyonlardan ise AlCl₃.6H₂O (Merck 1064), CrCl₃.6H₂O (Merck 2487), FeCl₃.6H₂O (Merck 3948) kullanıldı.

Organik bileşiklerden ise glutatyon (GSH) (Fluka 49750), glutatyon (okside form, GSSG) (Sigma G-4376), 2-iyodoasetamid (Merck 804744), 1,4-ditiyoeritrol (Fluka 43796), piridoksal 5'-fosfat (Fluka 82870), asetil salisilik asid (Merck 100085), etilendiamin tetraasetik asid (EDTA) (Merck 8421), p-kloromerküribenzoik asid (p-KMB) (Fluka 25010), Triton X-100 (Fluka 93420), Tween 20 (Sigma P-1379), oksalik asid (Merck 492), fumarik asid (Merck 269), süksinik asid (Merck 681), sitrik asid (Merck 7254), malik asid (Merck 382) kullanıldı. İnhibitör ve aktivatör denemelerinde kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıktadır.

3.2. FINDIKTAN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZ HAM EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI

Fındıktan ham ekstre hazırlamak üzere toz haline getirilmiş ve sıvı azot ile dondurulmuş 100 g fındık üzerine, 0.48 M mannitol içeren 150 mL 0.025 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) ilave edildi ve +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldı. Daha sonra ağzı kapatılarak bir gece +4°C'deki soğuk dolapta bekletildi. Ertesi gün homojenizat iki kat tülbenkten süzüldü ve 0°C'de 20000 rpm (37565 rcf)'de, 20 dakika santrifüj edildi. Üstte toplanan yağlı tabaka alındıktan sonra 0°C'de 20000 rpm (37565 rcf)'de, 20 dakika daha santrifüj edildi. Süpernatant alındı. Bu işlemlerin sonucunda **findık ham ekstresi** elde edildi. Ham ekstrede glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

3.3. FINDIK HAM EKSTRESİNDE GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZI ÇÖKTÜREN UYGUN AMONYUM SÜLFAT KONSANTRASYONUNUN SAPTANMASI

Fındıktaki glukoz-6-fosfat dehidrogenazı çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 10 adet 25 mL'lik behere, 5'er mL fındık ham ekstresi konuldu. Birinci behere ortamdaki konsantrasyonu % 10 olacak şekilde toz amonyum sülfattan yavaş yavaş ilave edilerek +4°C'de manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Her beherde konsantrasyon % 10 artırılarak, % 90'a kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek +4°C'de karıştırıldı. Ham ekstreler içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 30 dakika daha karıştırıldı ve ağızları kapatılarak +4°C'deki soğuk dolapta bir gece bekletildi. Ertesi gün, her beherdeki ham ekstre 0°C'de 20000 rpm (37565 rcf)'de, 20'şer dakika santrifüj edildi. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi için süpernatantlarda ve ham ekstrenin hazırlanmasında kullanılan tamponun mümkün olan en küçük hacminde yeniden çözüldürülmüş çökeltilerde protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlardan fındık tohumu için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonun % 80 olduğu saptandı.

3.4. FINDIK HAM EKSTRESİNDE GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZI % 80 AMONYUM SÜLFAT KONSANTRASYONUNDA ÇÖKTÜRÜLMESİ

Fındıktaki glukoz-6-fosfat dehidrogenazı çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu % 80 olarak belirlendiğinden, ham ekstreye ortamdaki konsantrasyonu % 80 olacak şekilde, toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek +4°C'deki soğuk dolapta karıştırıldı. Ham ekstre içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 30 dakika daha karıştırıldı ve ağzı kapatılarak +4°C'deki soğuk dolapta bir gece bekletildi. Ertesi gün 0°C'de 20000 rpm (37565 ref)'de, 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Çökelti, 0.48 M mannitol içeren 0.025 M sodyum fosfat tamponunun (pH=7.0) mümkün olan en küçük hacminde çözüldü ve hacmi ölçüldü. Bu çözeltide de glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra, amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla diyaliz kesesine (Sigma D-9527 {genişliği 43 mm (1.7 μ), çapı 27 mm (1.1 μ)} konuldu. +4°C'deki soğuk dolapta, 0.001 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) ile çözelti sık sık değiştirilerek ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çözeltide sülfat iyonu kalmayınca kadar diyaliz işlemine devam edildi. Diyaliz işlemi tamamlanmış olan çözelti, diyaliz kesesinde çökmesi muhtemel kısımları uzaklaştırmak amacıyla, 0°C'de 20000 rpm (37565 ref)'de, 20 dakika, santrifüj edildi. Üstteki berrak çözelti alındı ve % **80 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı. % 80 amonyum sülfat kesitinin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra bu kesit uygun hacimlere bölünerek derin dondurucuda saklandı.

3.5. HİDROKSİLAPATİT KOLON KROMATOĞRAFİSİ

3.5.1. Hidroksilapatitin Hazırlanması

Bu yöntemin uygulanması sırasında kolon dolgu maddesi olarak kullanılan hidroksilapatit Tiselius, Hjérten ve Levin'e [169, 170] göre hazırlandı. 2 L 0.5 M Na_2HPO_4 ve 2 L 0.5 M CaCl_2 , 5 litrelik paslanmaz çelik tencere içine damla damla akmaları sağlanarak karıştırıldı. Çözeltilerin akış hızı 12 mL/dakika olarak ayarlandı. Karıştırma işlemi zikzak şeklinde cam karıştırıcı ile sağlandı (80 devir / dakika). Meydana gelen inaktif kalsiyum fosfat (brushite) çökünce, sıvı kısım su trombu yardımıyla alındı ve çökelti 3 kere 3-4 L bidistile su ile her defasında 5 dakika karıştırıldıktan sonra 5 dakika çökmesi beklenerek yıkandı. En son konulan su alınmadı. Ertesi gün üstteki kısım su trombu ile alındıktan sonra yeni su ilave edildi.

Yıkanmış çökeltinin üzerine 3 L bidistile su ve 100 mL % 40 NaOH ilave edildi, 45 dakikalık süre sonunda kaynamaya başlamasını sağlamak üzere ısıtıldı ve 1 saat süre ile kaynatıldı. Cam karıştırıcı ile karıştırma işlemine bu safhalarda da devam edildi. Çökeltinin çökmesi için 5 dakika beklendikten sonra bulanık sıvı kısım su trombu ile alındı. 7 kere 3-4 L bidistile su yardımıyla, her defasında 5 dakika karıştırıldıktan sonra 5 dakika çökmesi beklenerek yıkandı.

Çökelti, 3 L 0.01 M sodyum fosfat tamponuyla (pH=6.8) karıştırılarak 15 dakika daha kaynatıldı. Sıvı kısım, oluşan çökeltinin çökmesi için 1 dakika beklendikten sonara su trombu ile alındı. Bu işlem 2 kere tekrarlandı. Aynı şekilde çökelti 2 kere 0.001 M sodyum fosfat tamponu (pH=6.8) ile yıkandı. Üçüncü kez tampon ilave edildikten sonra soğuması beklendi. Elde edilen hidroksilapatit son olarak geniş ağızlı şişelere dolduruldu.

3.5.2. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi

Laboratuvarımızda yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan hidroksilapatit, alt ucu ince cam pamuğu ile kapatılmış, 1.4 cm çapında, alt kısmı musluklu bir cam kolona, kolon yüksekliği 12 cm olacak şekilde dolduruldu. Kolon, hidroksilapatit hacminin yaklaşık üç katı kadar 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) geçirilerek dengelendi. Yaklaşık

olarak 200 mg protein içeren % 80 amonyum sülfat kesiti, hidroksilapatitin yüzeyini bozmayacak şekilde dikkatlice kolona uygulandı. Kolondan 200 mM sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) geçirilerek elüsyon işlemi gerçekleştirildi. 4-5 mL hacimler halinde toplanan (60 mL/saat) eluatların absorbans değerleri, elüe edilen tampona karşı spektrofotometrede, 280 nm dalga boyunda okundu. Ayrıca, elüatlardaki glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi de tayin edildi. Protein absorbansları ve enzimin aktivite değerleri kullanılarak elüsyon grafiği çizildi. Enzimatik aktivite gösteren tüplerdeki çözeltiler birleştirilerek, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra uygun hacimlere bölünerek, daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.6. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve % 80 amonyum sülfat kesitinin elde edilmesi evrelerinde, protein miktarı Bradford [171] yöntemine göre tayin edildi. Hidroksilapatit kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise E_{280} / E_{260} Warburg [99] yöntemi kullanıldı.

3.6.1. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Bradford ayıracı : 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL % 96'lık etanolde çözüldükten sonra üzerine 55 mL % 85'lik H_3PO_4 ilave edildi ve son hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.6.1.1. Deneyin Yapılışı

100 µL protein tayini yapılacak örnek üzerine 5 mL Bradford ayıracı ilave edildi. Kör deney olarak 100 µL bidistile su kullanıldı. Tüpler vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm'de kör deneye karşı absorbans değeri okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı % mg olarak saptandı.

3.6.1.2. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Sığır serum albuminin bidistile sudaki % 100 mg'lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler ile % 20 mg, % 40 mg, % 60 mg, % 80 mg ve % 100 mg'lık konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Bradford [169] deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak serum albumini regresyon denklemi elde edildi ve standart grafiği çizilerek protein miktarları hesaplandı

3.6.2. E₂₈₀ / E₂₆₀ Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Kolondan elde edilen elüatların 280 nm ve 260 nm'deki absorbansları [99] elüedildikleri tamponlara karşı spektrofotometrede okundu. E₂₈₀ / E₂₆₀ oranı hesaplandı ve bu değere uyan faktör Tablo 3.6.2.1.' den bulundu. Çözeltinin içerdiği protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{protein mg/ mL} = \text{Faktör} \times E_{280} \quad (3.1)$$

$$\text{Protein Konsantrasyonu (mg/mL)} = 1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260} \quad (3.2)$$

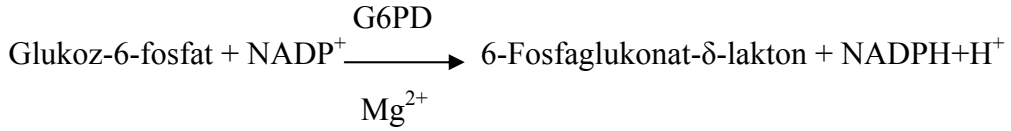
Tablo 3.6.2.1. E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg yöntemi ile protein miktar tayininde kullanılan faktör tablosu

| E ₂₈₀ /E ₂₆₀ | % Nukleik asid | Faktör* |
|------------------------------------|----------------|---------|
| 1.75 | 0.00 | 1.116 |
| 1.63 | 0.25 | 1.081 |
| 1.52 | 0.50 | 1.054 |
| 1.40 | 0.75 | 1.023 |
| 1.36 | 1.00 | 0.994 |
| 1.30 | 1.25 | 0.970 |
| 1.25 | 1.50 | 0.944 |
| 1.16 | 2.00 | 0.899 |
| 1.09 | 2.50 | 0.852 |
| 1.03 | 3.00 | 0.814 |
| 0.979 | 3.50 | 0.776 |
| 0.939 | 4.00 | 0.743 |
| 0.874 | 5.00 | 0.682 |
| 0.846 | 5.50 | 0.656 |
| 0.822 | 6.00 | 0.632 |
| 0.804 | 6.50 | 0.607 |
| 0.784 | 7.00 | 0.585 |
| 0.767 | 7.50 | 0.565 |
| 0.753 | 8.00 | 0.545 |
| 0.730 | 9.00 | 0.508 |
| 0.705 | 10.00 | 0.478 |
| 0.671 | 12.00 | 0.422 |
| 0.644 | 14.00 | 0.377 |
| 0.615 | 17.00 | 0.322 |
| 0.595 | 20.00 | 0.278 |

* 1 cm'lik ışık yolu

3.7. ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Fındıktan G6PD enziminin saflaştırılması sırasında ham ekstre, % 80 amonyum sülfat kesiti ve hidroksilapatit kolon kromatografisi eluatlarındaki G6PD aktivitesi Beutler [172] ve Betke [173] metoduna göre yapıldı. Bu metotta, enzim aktivitesi 37°C’de nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADP⁺) indirgenmesi sonucu oluşan NADPH+H⁺’ın 340 nm’de absorbans vermesi esasına dayanır. NADPH+H⁺’ın absorbans vermesi, spektrofotometrede absorbans artışı görülür. 1 mM NADP⁺ indirgendiğinde (1 mL hacim ve 1 cm ışık yolunda) 340 nm’de spektrofotometrede 6.22 optik dansite verir. Absorbansı ölçülen NADPH+H⁺, G6PD enziminin organizmada fizyolojik olarak katalizlediği aşağıdaki reaksiyonla meydana gelmektedir.



G6PD enziminin katalizlediği bu reaksiyona göre, 1 mol glukoz-6-fosfat reaksiyona girdiğinde 1 mol NADPH+H⁺ oluşur [172].

1 Enzim Ünitesi: Bir dakikada 37°C’de ve pH=8.0’de 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlandı.

Spesifik Aktivite: Enzim ünitesinin mg protein miktarına bölünmesiyle elde edildi.

3.7.1. Kullanılan Çözeltiler

- A.** 5 mM EDTA içeren 1 M Tris-HCl tamponu (pH=8.0): 6.057 g Tris ve 0.0931 g EDTA 40 mL bidistile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8.0'e ayarlandı. Toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.
- B.** 0.1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ çözeltisi: 1.0166 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 40 mL bidistile suda çözüldü ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.
- C.** 2 mM β -NADP⁺-disodyum tuzu çözeltisi: 32 mg β -NADP⁺-disodyum tuzu 10 mL bidistile suda çözüldü. Çözelti deney günü taze olarak hazırlandı.
- D.** 6 mM glukoz-6-fosfat monosodyum tuzu çözeltisi: 34 mg glukoz-6-fosfat monosodyum tuzu 10 mL bidistile suda çözüldü. Çözelti deney günü taze olarak hazırlandı.
- E.** Stabilizasyon çözeltisi: 0.25 mL β -merkпто etanol üzerine 5 mL 0.27 M EDTA ilave edildi. 0.1 N NaOH ile pH=7.0'ye ayarlandı ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

3.7.1.1. Deneyin Yapılışı:

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin tayin işlemlerinde aşağıdaki prosedür uygulandı.

| Reaktifler | Kör | Deney | |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 M Tris-HCl pH=8.0 | 250 μ L | 250 μ L | |
| 0.1 M $MgCl_2$ | 250 μ L | 250 μ L | |
| 2 mM NADP ⁺ | 250 μ L | 250 μ L | |
| Bidistile su | 1450 μ L | 1450 μ L | |
| Stabilizasyon çözeltisi | 50 μ L | — | |
| Enzim çözeltisi | — | 50 μ L | ilave edildi. |

Tüpler iyice karıştırılıp 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Kör ve deney tüplerine 250 µL 6 mM G6P çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm dalga boyunda, 37°C’de 5 dakika süre boyunca dakikada bir absorbans değerleri ölçüldü. 5 dakika sonunda absorbans değerleri arasındaki farktan mL başına enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$A = \frac{\Delta OD}{\epsilon_{340}} \times \frac{V_C}{V_E} \quad (3.3)$$

A = mL başına enzim ünitesi (EU) sayısı.

ΔOD = 340 nm’de optik dansitenin dakika başına değişimi.

V_C = Küvet hacmi.

V_E = Küvetteki enzim çözeltisinin hacmi.

ϵ_{340} = 1 mM NADP⁺’nin indirgendiği farz edildiğinde kullanılan molar ekstinksiyon katsayısı (6.22 M⁻¹.cm⁻¹).

Tüm denemeler 37°C’de gerçekleştirildi.

3.8. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (PAGE)

Fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin elde edilmesi evrelerinde ham ekstre, hidroksilapatit kolonu çıkışlı glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflığının kontrolü Ornstein ve Davis'in PAGE yöntemi kullanılarak yapıldı [174, 175].

3.8.1. Kullanılan Çözeltiler

A. Tampon Çözelti:

Tris–glisin tamponu (pH=8.5): 3 g Tris, 14.4 g glisin 100 mL'lik balon jøjeye bidistile su yardımı ile aktarıldı ve kaynar su banyosunda çözüldü. Soğutulduktan sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözelti kullanılmadan önce 10 kez seyreltildi.

B. Stok Jel Çözeltileri:

1. Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi: 100 mL'sinde 30 g akrilamid, 0.8 g N, N'-metilen bis akrilamid içeren çözelti.
2. β -Dimetilaminopropionitril çözeltisi: 2.5 kez seyreltilmiş stok Tris-glisin tampon çözeltisinin 100 mL'sinde 1.6 g β -dimetilaminopropiyonitril içeren çözelti.
3. Potasyum ferrisiyanür çözeltisi (% 0.03): 0.03 g potasyum ferrisiyanürün 100 mL bidistile sudaki çözeltisi.
4. Amonyum persülfat çözeltisi (% 0.7): 0.7 g amonyum persülfatın 100 mL distile sudaki günlük çözeltisi.

C. Boya çözeltisi: % 0.25 Coomassie Brilliant Blue G-250' nin metanol:su: asetik asid (45.4:45.4:9.2) karışımındaki çözeltisi.

D. Dekoloran çözeltisi: 10 kısım metanol, 7 kısım derişik asetik asid ve 83 kısım bidistile su.

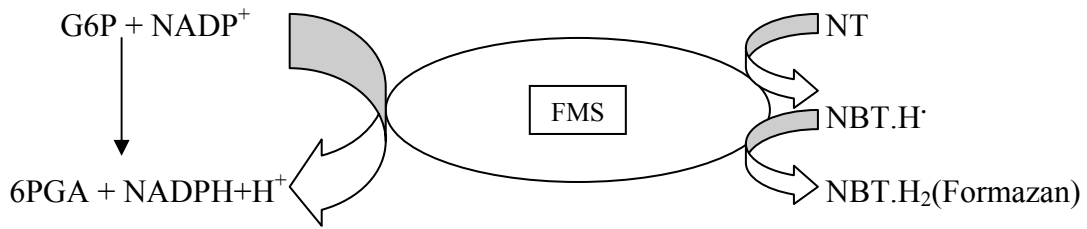
E. Saklama çözeltisi: 5 kısım metanol, 10 kısım derişik asetik asid ve 85 kısım bidistile su.

3.8.1.1. Deneyin Yapılışı

Poliakrilamid jellerdeki protein bantlarını tesbit etmek için jeller Coomassie Brilliant Blue G-250 ile 10 dakika boyandı. Boyadan çıkarılan jeller dekoloran çözeltisi içeren ağzı kapalı kaplarda günde 2-3 defa dekoloran çözeltisi değiştirildi. Bu işlemden sonra jel, saklama çözeltisi içeren ağzı kapalı kaplara konuldu. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın molekül ağırlığı standart molekül ağırlığı kitleri ile çizilen grafikten hesaplandı.

Buzdolabında bekletilen stok çözeltiler deney günü oda ısısına getirildikten sonra kullanıldı. 1, 2, 3 ve 4 numaralı stok çözeltilerden 5'er mL alınarak iyice karıştırıldı. Hazırlanan jel, ince uçlu bir enjektör yardımı ile 0.7 cm çapındaki cam tüplere, üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde, hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek dolduruldu. Yaklaşık 30 dakika jelin polimerleşmesi beklendi. Yükleme jeli polimerleştikten sonra jel kasetlerinin üst kısmında kalan boşluk kısma hidroksilapatit kolonundan elde edilen eluat ve molekül ağırlıkları belli olan standart protein çözeltileri Hamilton enjektörü ile dikkatli bir şekilde jele enjekte edildi. 200 µg protein/jel olacak şekilde tatbik edilen çözeltinin yoğun olması için gliserin ilave edildi. +4°C'deki soğuk dolaba yerleştirilen elektroforez tankına soğuk Tris-glisin tamponu konuldu. Jel kasetlerinin üst kısmında kalan boşluğa da tampon ilave edildikten sonra jeller elektroforez tankına yerleştirildi. 40 mA/jel olacak şekilde akım geçirildi. 2 saat sonra elektroforez işlemine son verildi. Jeller, tabakalardan uzun uçlu enjektör yardımıyla çıkarıldı. Poliakrilamid jellerdeki protein bantlarını tesbit etmek için jeller Coomassie Brilliant Blue G-250 ile 10 dakika boyandı. Boyadan çıkarılan jeller dekoloran çözeltisi içeren ağzı kapalı kaplarda günde 2-3 defa dekoloran çözeltisi değiştirildi. Bu işlemden sonra jel, saklama çözeltisi içeren ağzı kapalı kaplara konuldu. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın molekül ağırlığı standart molekül ağırlığı kitleri ile çizilen grafikten hesaplandı.

Jelde aktivite boyanması Vuopio ve diğ. yönteminin değiştirilmesiyle yapıldı [174]. Jeller 0.5 mM NADP^+ , 2mM G6P, 0.4 mg/mL nitrobluetetrazolyum (NBT) ve 0.6 mg/mL fenazin metosülfat (FMS) içeren 0.1 M Tris-HCl pH=8.0 tamponunda 37°C'de 60 dakika karanlıkta tutuldu [176]. Reaksiyon jellerin bidestile su ile yıkanmasıyla durduruldu. Burada aktivite boyamasının temelini $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'tan alınan elektronların FMS aracılığıyla NBT'ye aktarılması oluşturmaktadır. Bunu sonucunda ise çözünmez özellikte koyu renkli formazan oluşur [177]. Aktivite boyama mekanizması Şekil 3.8.1.1.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.8.1.1.1. Dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerinin NBT yardımıyla jel üzerinde boyanma mekanizması.

3.9. SODYUM DODESİL SÜLFAT-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS - PAGE) [178]

3.9.1. Kullanılan Çözeltiler

- A. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8.8: 12.114 g (0.1 M) Tris 80 mL bidistile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=8.8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- B. 1 M Tris-HCl tamponu pH=6.8: 12.114 g (0.1 M) Tris 80 mL bidistile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6.8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- C. Numune Tamponu: 0.65 mL 1M Tris-HCl (pH=6.8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL %87 gliserin, 1 mL %0.1'lik brom timol mavisi karıştırılarak son hacim bidistile su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptolanol ilave edildi.

- D. Yürütme Tamponu:** 1.5 g Tris ve 7.2 g glisin 50 mL bidistile suda çözüldü, 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- E. Renklendirme Çözeltisi:** 0.66 g Coomassie Brilliant Blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asid ile 120 mL bidistile su ilavesiyle hazırlandı.
- F. Renksizleştirme Çözeltisi:** 7.5 kısım asetik asid, 5 kısım metanol ve 87.5 kısım bidistile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.9.2. Jellerin Hazırlanması

Ayırma Jeli: 15 mL 1 M Tris-HCl (pH=8.8), 13.2 mL %30 akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid, 0.61 mL %10'luk SDS, 0.4 mL %5'lik N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) ve 9.4 mL bidistile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0.8 mL %1.5'lik taze hazırlanmış amonyum persülfat çözeltisi ilave edildi.

Yığıma Jeli: 1 M Tris-HCl (pH=6.8)'den 1.24 mL, %30 akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %10'luk SDS'den 0.1 mL, %5'lik TEMED'den 0.1 mL ve bidistile sudan 7.36 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak taze hazırlanmış %1.5'lik amonyum persülfat çözeltisinden 0.2 mL ilave edildi.

3.9.3. SDS - PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Fındık glukoz-6-fosfat dehidrogenazının hidroksilapatit kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi, Laemmli tarafından belirtilen [178] yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Elektroforez cam plakaları önce su ile yıkandı, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra 8x8 cm plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbirinin üzerine konuldu ve plakaların kenarları kısıkaç ile sabitlendi. Buzdolabında bekletilen stok çözeltiler deney günü oda ısısına getirildikten sonra kullanıldı. Ayırma jeli, ince uçlu bir enjektör yardımı ile üstten 0.5 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-butanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-butanol döküldü. Daha sonra polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yağma jeli ilave edildi ve bu jelin içerisine numunenin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için tarak şeklindeki kaset yerleştirildi. Yağma jeli polimerleştikten sonra bu kaset çıkarıldı. İçerisinde 200 µg protein olacak şekilde hazırlanan üreaz (545 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (36 kDa) ve ovalbumin (45 kDa) standart protein çözeltileri ve hidroksiapatit kolon kromatografisi sonunda elde edilen enzim çözeltisi toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulup, Hamilton enjektörüyle plakalar arasındaki kuyucuklara dikkatlice yüklendikten sonra tabaka elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına soğuk yürütme tamponu konuldu. 40 mA akım geçirildi. Brom timol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Elektroforez plakaları arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı, yağma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli, renklendirme çözeltisine konuldu ve 1.5-2 saat yavaş bir şekilde çalkalandı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. 30 dakikalık aralarla çözelti değiştirildi. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra %7'lik asetik asidde saklandı.

Fındık glukoz-6-fosfat dehidrogenazının molekül ağırlığı standart proteinlerin molekül ağırlıkları yardımıyla grafikten hesaplandı. Bantların orijine göre R_f değerleri bulundu. Hesaplanan R_f değerleri apsise, protein bantlarına karşılık gelen molekül ağırlıklarının logaritması da ordinata yazılarak molekül ağırlığı grafiği elde edildi. Aynı şekilde glukoz-6-fosfat dehidrogenazın R_f değeri hesaplanarak, grafikten molekül ağırlığı tayin edildi.

3.10. FINDIKTAN ELDE EDİLEN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Fındıktan elde edilen glukoz-6-fosfat dehidrogenazın kinetik özelliklerini incelemek amacıyla hidroksilapatit kolunundan elde edilen fraksiyonlar kullanıldı.

3.10.1. Enzim Aktivitesinin Değişik Substrat Analoglarına Olan İlgisinin Belirlenmesi

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin değişik substrat analoglarına olan ilgisinin belirlenmesi amacıyla D-glukoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-fruktoz'un 6 mM konsantrasyonundaki çözeltileri hazırlanarak enzim aktivitesi Beutler [172] ve Betke [173] yöntemine göre tayin edildi.

3.10.2 Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz'ın NADP⁺ ve NAD⁺'yi Koenzim Olarak Kullanımı

Çalışmamızda G6PD enziminin hangi koenzime spesifitesinin fazla olduğunu tayin etmek için sabit 6 mM G6P derişimine karşı 0.01-3 mM NAD⁺ ve 0.5-3 mM NADP⁺; sabit 2 mM NADP⁺ derişimine karşı 2-8 mM G6P derişimleri derişimleri kullanıldı. Enzim aktivitesi literatürde belirtildiği şekilde tayin edildi [172, 173]. Denemeler 4'er kez tekrarlandı. En küçük kareler yöntemine göre Lineweaver-Burk doğru denkleminde ve grafikten her bir substrat için ayrı ayrı Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

3.10.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

Fındıktan elde edilen glukoz-6-fosfat dehidrogenazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla enzimin pH=2-10 aralığında gösterdiği aktivite ölçüldü. pH=2-6 aralığında sitrik asid-NaOH tamponu, pH=7-9 aralığında Tris-HCl tamponu, pH=9-10 aralığında borik asid-NaOH tamponu kullanıldı. Aktivite tayini, toplam hacim 2.5 mL olacak şekilde 250 µL 1 M Tris-HCl pH=8.0 tamponu, 250 µL 0.1 M MgCl₂, 250 µL 2 mM β-NADP⁺, 1450 µL bidestile su ve 50 µL enzim çözeltisi ilavesiyle oluşturuldu. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra su banyosunda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Kör ve

deney tüplerine 250 µL 6 mM G6P çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm dalga boyunda, 37°C'de 5 dakika süre boyunca dakikada bir absorbans değerleri ölçüldü [172, 173]. 5 dakika sonunda absorbans değerleri arasındaki farktan enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$A = \frac{\Delta OD}{\epsilon_{340}} \times \frac{V_C}{V_E} \quad (3.3)$$

Tüm denemeler 37°C'de gerçekleştirildi. Denemeler 5 kez yapılarak ortalamaları alındı. Değişik pH değerlerinde elde edilen glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ordinata, pH değerleri apsise konarak optimum pH eğrisi çizildi.

3.10.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

G6PD aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 10°C–70°C arasında, sıcaklık her defasında 10°C arttırılarak denemeler gerçekleştirildi. Buna göre, enzim çözeltisi hariç diğer bütün reaktifler istenilen sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda enzim çözeltisi ilavesiyle reaksiyon başlatıldı ve absorbans değerindeki artış 5 dakika süreyle dakikada bir kaydedildi. Denemeler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alındı. Sıcaklık değerleri apsise, elde edilen enzim aktivite değerleri ordinatta olmak üzere optimum sıcaklık eğrisi çizildi. 37°C'de yapılan denemelerin aktiviteleri 100 kabul edilerek (kontrol) her bir sıcaklık için % aktivite değerleri hesaplandı.

G6PD enziminin 10-40°C arasındaki aktivite değerlerinin logaritması ile sıcaklık 1/T (K⁻¹) arasında çizilen grafikten enzimin aktivasyon enerjisi hesaplandı.

3.10.5. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivitesine Göre Depo Kararlılığı

-20°C'de derin dondurucuda, +4°C'de buzdolabında ve oda sıcaklığında 21 gün saklanan saklanan enzim çözeltilerinde iki günde bir enzim aktivitesi tayin edildi.

3.10.6. Çeşitli Bileşiklerin Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

3.10.6.1. Anorganik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Çalışmamızda 1⁺, 2⁺ ve 3⁺ değerlikli anorganik bileşiklerin G6PD aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla 1⁺ değerlikli KCl, KF, KNO₃, NaCl, NaF, NaNO₃, Na(CH₃COO), NaHCO₃, LiCl, NH₄Cl; 2⁺ değerlikli K₂CO₃, K₂SO₄, Na₂CO₃, Na₂SO₄, CaCl₂, CaCO₃, Ca₂(PO₄)₃, BaCl₂.2H₂O, BaCO₃, Ba(NO₃)₂, CuCl₂, CuSO₄.5H₂O, FeCl₂.4H₂O, FeSO₄, Hg(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂.6H₂O, MgSO₄.7H₂O, MnCl₂, ZnCl₂, ZnSO₄.7H₂O; 3⁺ değerlikli AlCl₃, CrCl₃.6H₂O, FeCl₃.6H₂O'un 1 mM konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı. Anorganik bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi 3.7.1'e göre tayin edildi.

3.10.6.2. Organik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Organik bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla p-kloromerküri benzoat, 1,4-ditiyoeritrol, GSH, GSSG, 2-iyodoaset amid, asetil salisilik asid, malik asid, oksalik asid, süksinik asid, fumarik asid, sitrik asid ve piridoksal 5'-fosfat'ın 1µM, 10 µM ve 20 µM'lık çözeltileri hazırlandı. EDTA'nın 1 mM'lık; Triton X-100 ve Tween 20'nin ise % 0.01 (v/v) konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlandı. Organik bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi 3.7.1'e göre tayin edildi.

3.10.7. Enzim Aktivitesi Üzerine NADPH+H⁺'ın İnhibitör Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inhibitör konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi amacıyla β -NADPH+H⁺'ın 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M'lık konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlandı.

Aktivite tayini, toplam hacim 2.5 mL olacak şekilde 250 μ L 1 M Tris-HCl pH=8.0 tamponu, 250 μ L 0.1 M MgCl₂, 250 μ L 2 mM β -NADP⁺, 1450 μ L bidestile su, 40 μ L enzim çözeltisi ve 10 μ L β -NADPH+H⁺ ilavesiyle oluşturuldu. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra su banyosunda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Kör ve deney tüplerine 250 μ L 6 mM G6P çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm dalga boyunda, 37°C'de 5 dakika süre boyunca dakikada bir absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans farkından enzim aktivitesi (3.3)'e göre hesaplandı. 37°C'de ortamda inhibitör olmadan yapılan denemelerin aktiviteleri 100 kabul edilerek (kontrol) her konsantrasyon için % inhibisyon değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. FINDIKTAN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZIN SAFLAŞTIRILMASI

4.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

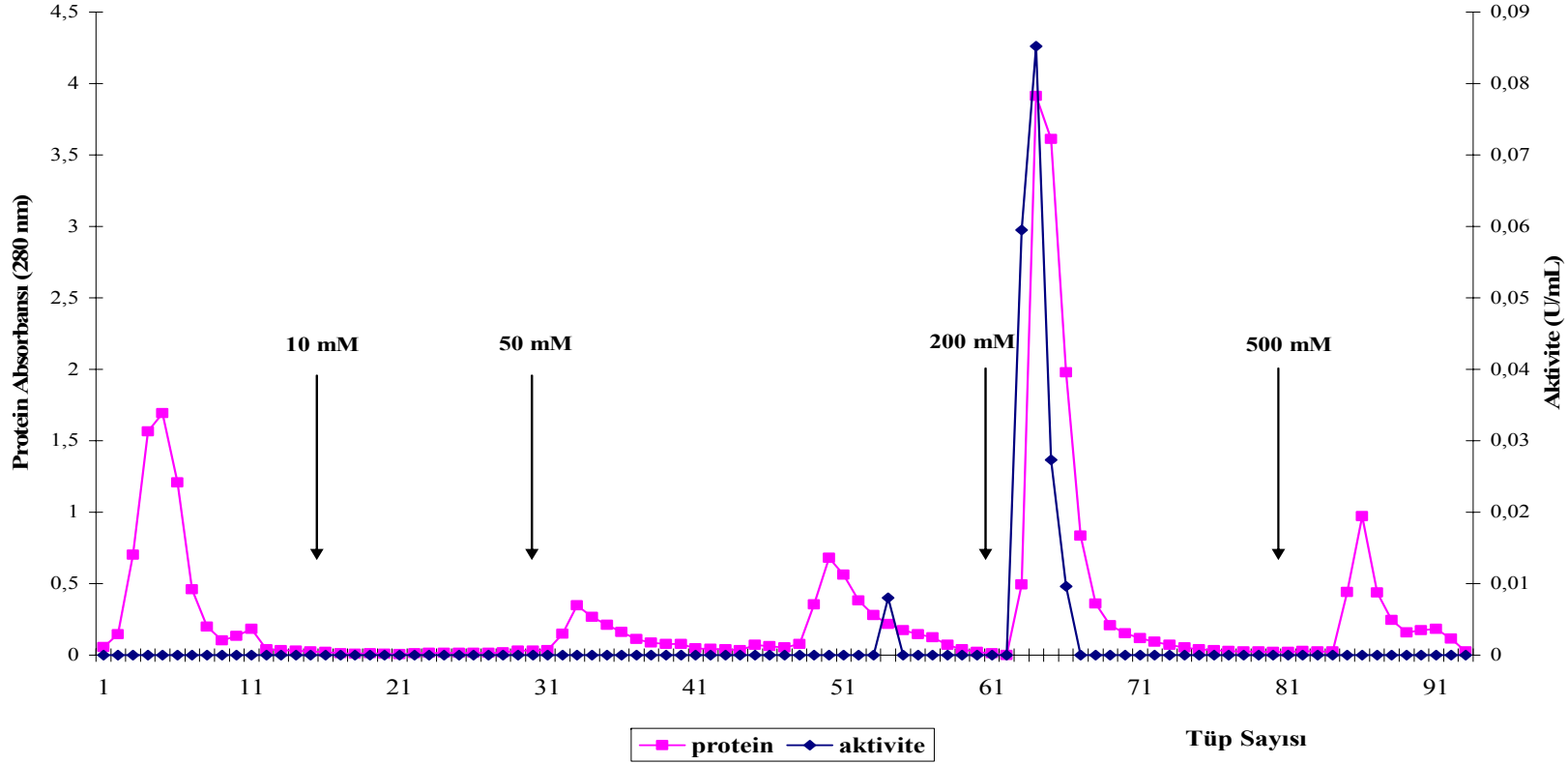
Fındıktan hazırlanan ham ekstrede, G6PD enzimini çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu % 80 olarak bulundu.

4.1.2. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi

Fındıktan elde edilen ham ekstrenin % 80 amonyum sülfat kesiti, daha önceden 1 mM fosfat tamponuyla (pH=7.0) dengelenmiş hidroksilapatit kolonuna uygulandıktan sonra, 10 mM, 50 mM, 100 mM ve 200 mM'a kadar farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponları (pH=7.0) ile elüe edildi. Elüsyon işlemi sonucunda G6PD aktivitesi sadece 200 mM fosfat tamponu ile elde edilen elüatlarda bulundu (Şekil 4.1.2.1). G6PD aktivitesinin en yüksek olduğu tüplerdeki elüatlar bir araya toplanarak protein miktarı ve G6PD aktivitesi tayin edildi; bu çözelti daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

Çalışmamızda fındık ham ekstresi hazırlanmasında, amonyum sülfat kesitinin elde edilmesinde ve hidroksilapatit kolon kromatografisi evrelerinde G6PD aktivitesi [172, 173] tayin edildi. Fındıktan G6PD enzimi hidroksilapatit kolon kromatografisi sonucu 36,2 kez saflaştırıldı (Tablo 4.1.2.1).

Fındıktan G6PD'ın saflaştırılma evreleri ve bu evrelere ait sonuçlar Tablo 4.1.2.1'de gösterildi.



Şekil 4.1.2.1 Fındık ham ekstresinin % 80 amonyum sülfat fraksiyonunun hidroksilapatit kolon kromatografisi elüsyon grafiği.

Kolon boyutu: 1.4x 12 cm;

Kolona uygulanan protein : 200 mg/mL

Akış hızı : 60 ml /saat

Elüsyon tamponları: pH'sı 7.0 olan 10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM ve 500 mM sodyum fosfat tamponu.

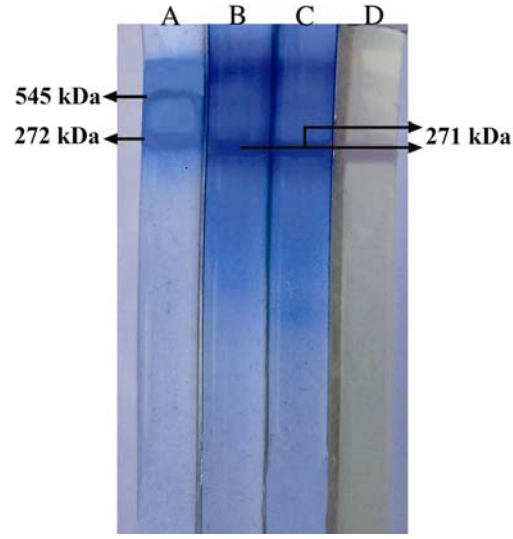
Tablo 4.1.2.1. Fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılma evreleri.

| Saflaştırma Adımları | Toplam Hacim (mL) | Toplam Protein (mg) | Protein (mg/mL) | Aktivite (U/mL) | Toplam Aktivite (U) | Spesifik Aktivite (U/mg protein) | Saflaştırma Oranı | % Verim |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------------------------|-------------------|---------|
| Ham Ekstre | 49 | 955,5 | 19,5 | 0,285 | 13,965 | 0,0146 | 1 | 100 |
| %80(NH ₄) ₂ SO ₄ kesiti | 16 | 94,208 | 5,888 | 0,434 | 6,944 | 0,0737 | 5 | 49,7 |
| Hidroksilapatit Eluatı | 13 | 2,925 | 0,225 | 0,119 | 1,547 | 0,5289 | 36,2 | 11 |

4.1.3. PAGE ve SDS-PAGE Elektroforezi

4.1.3.1. PAGE

Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın fındıktan saflaştırılması sırasında elde edilen ham ekstre ve hidroksilapatit kolon çıkışlı elüatın saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlığını tayin etmek amacı ile yapılan PAGE sonuçları Şekil 4.1.3.1.1’de görülmektedir. Şekil 4.1.3.1.1’de görüldüğü gibi, hidroksilapatit elüatında tek bir aktivite (Şekil 4.1.3.1.2) bandı saptandı.

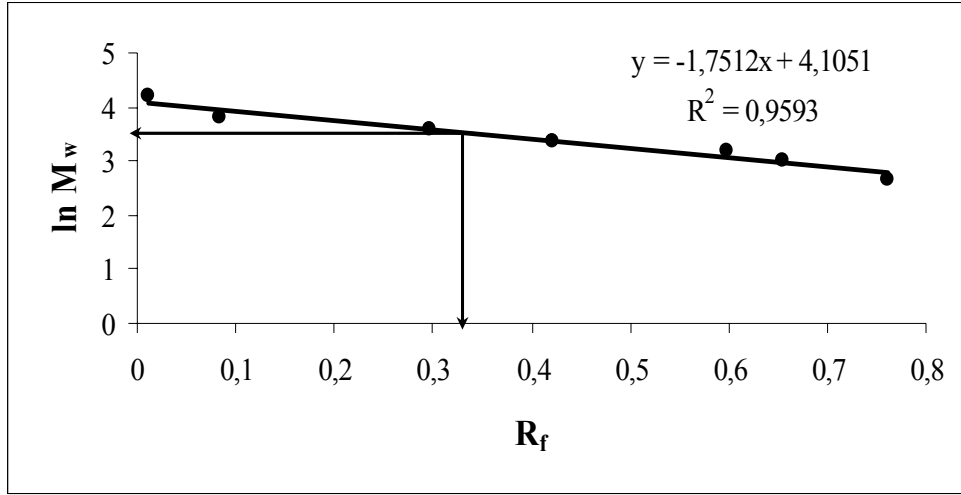


Şekil 4.1.3.1.1. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması sırasında standart proteinlerin, ham ekstre, hidroksilapatit eluatının protein bantlarının ve bu eluata ait aktivite bandının PAGE’de gösterilmesi.

- A. Üreaz (Hekzamer, $M_r = 545$ kDa; trimer 272 kDa)
- B. Ham ekstre
- C. Hidroksilapatit kolon eluatı
- D. Hidroksilapatit kolon eluatının aktivite bandı

4.1.3.2. SDS-PAGE

SDS-PAGE uygulanarak molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart proteinler ile çizilen eğriden, saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın molekül ağırlığının 33.820 kDa olduğu saptandı. Buna göre saflaştırılan enzimin oktamer yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.1.3.2.1).



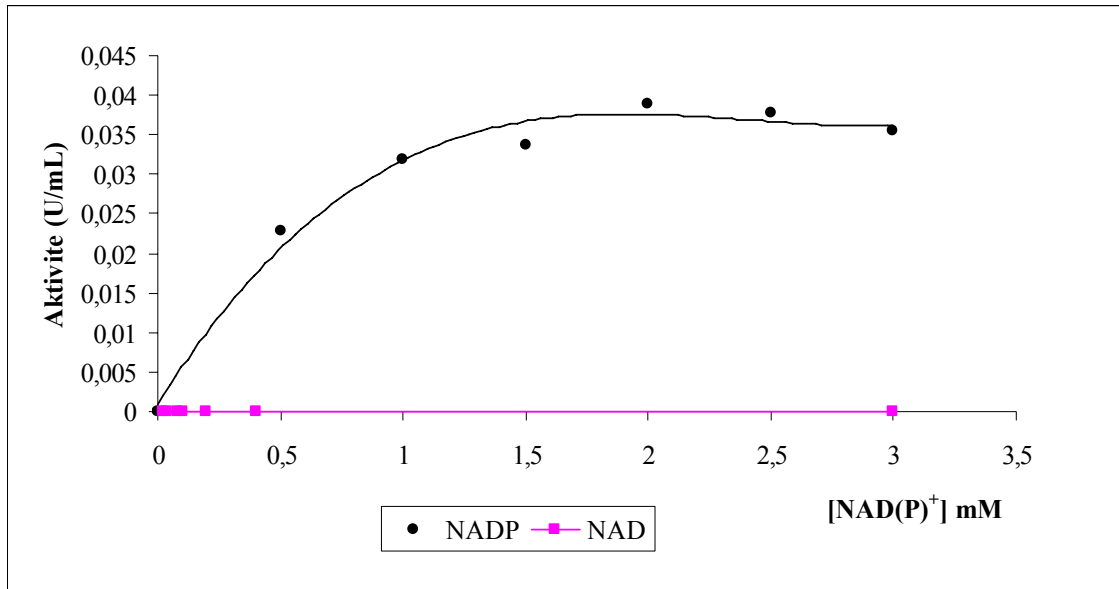
Şekil 4.1.3.2.1. SDS-PAGE sonucunda molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin yardımıyla eluatın molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan $\ln M_w$ - R_f grafiği.

4.2. ENZİM AKTİVİTESİNİN ÇEŞİTLİ SUBSTRAT ANALOGLARINA OLAN İLGİSİ

G6PD aktivitesinin değişik substrat analoglarına olan ilgisinin belirlenmesi amacıyla D-glukoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-fruktoz'un 6 mM konsantrasyonundaki çözeltileriyle yapılan deneylerde enzimin bu substratlara karşı hiç ilgi göstermediği görüldü.

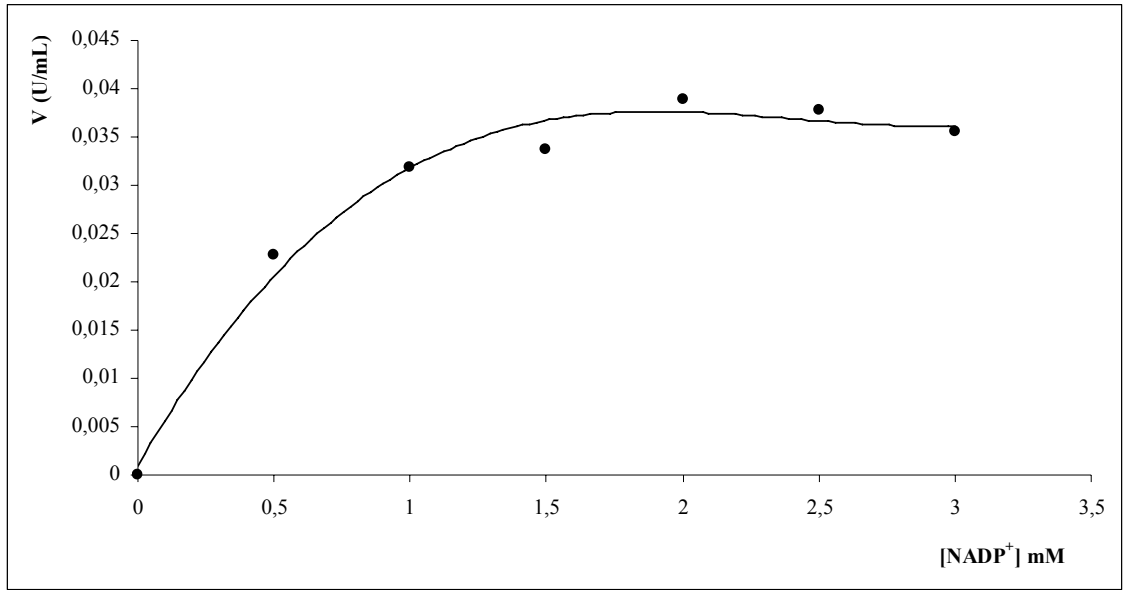
4.3. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ'IN NADP⁺ VE NAD⁺'Yİ KOENZİM OLARAK KULLANIMI

G6PD'nin hangi koenzimi daha fazla kullandığını tayin etmek için yapılan deneylerde G6PD enziminin doğal koenzimi olan NADP⁺ kullandığı Şekil 4.3.1.'de verildi. Diğer nükleotid olan NAD⁺'nin ise enzim tarafından hiç kullanılmadığı Şekil 4.3.1.'de gösterildi. NADP⁺ ile hiperbolik Michaelis-Menten modeli görülürken, enzim aktivitesinde NAD⁺ ile hiçbir farklılık görülmedi. NAD⁺'nin konsantrasyonunun artırılması ile de hiçbir farklılık görülmedi.

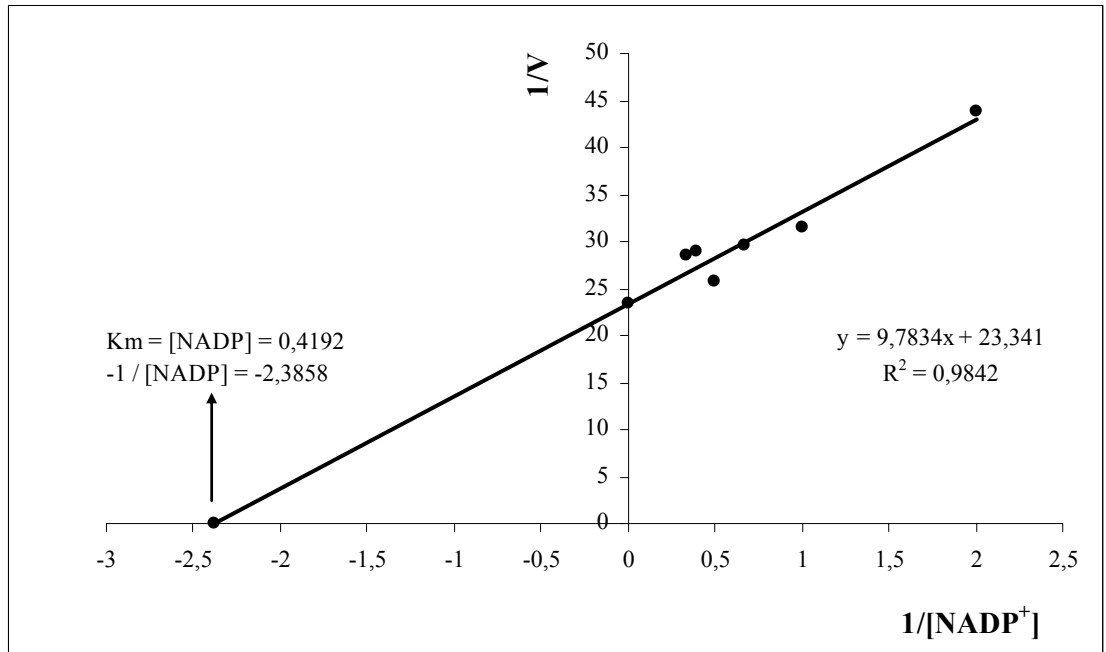


Şekil 4.3.1. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın NADP⁺ ve NAD⁺'yi koenzim olarak kullanması.

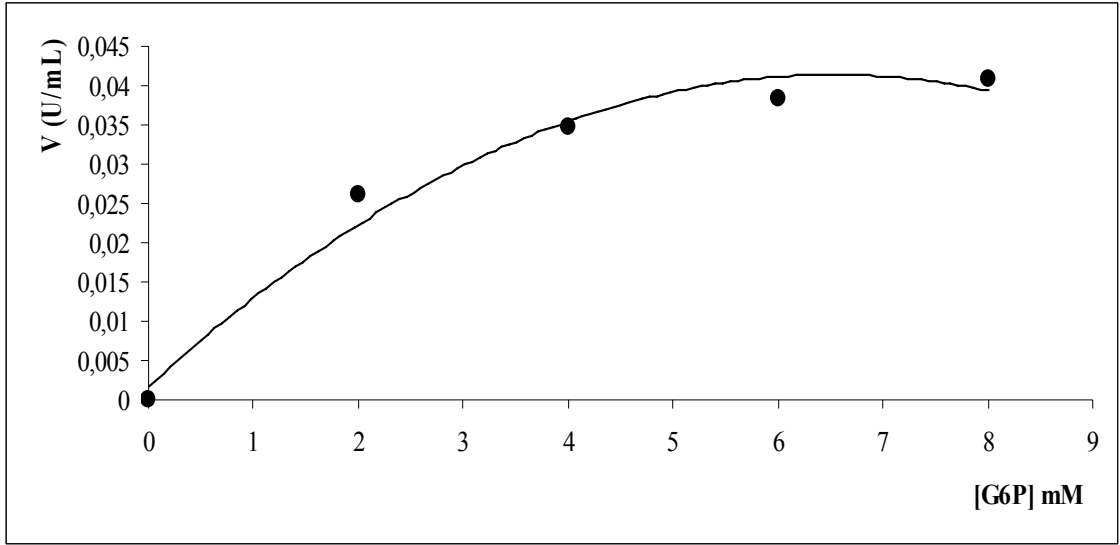
Çalışmamızda enzimin hangi substratı daha fazla kullandığını saptamak için yapılan deneylerde G6PD'nin NADP⁺'ye karşı ilgisinin, G6P'a olan ilgisinden daha fazla olduğu bulundu. G6P ve NADP⁺ için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.3.2, Şekil 4.3.3, Şekil 4.3.4 ve Şekil 4.3.5). Bu grafiklerden hesaplanan Km ve Vmax değerleri Tablo 4.3.1'de verildi.



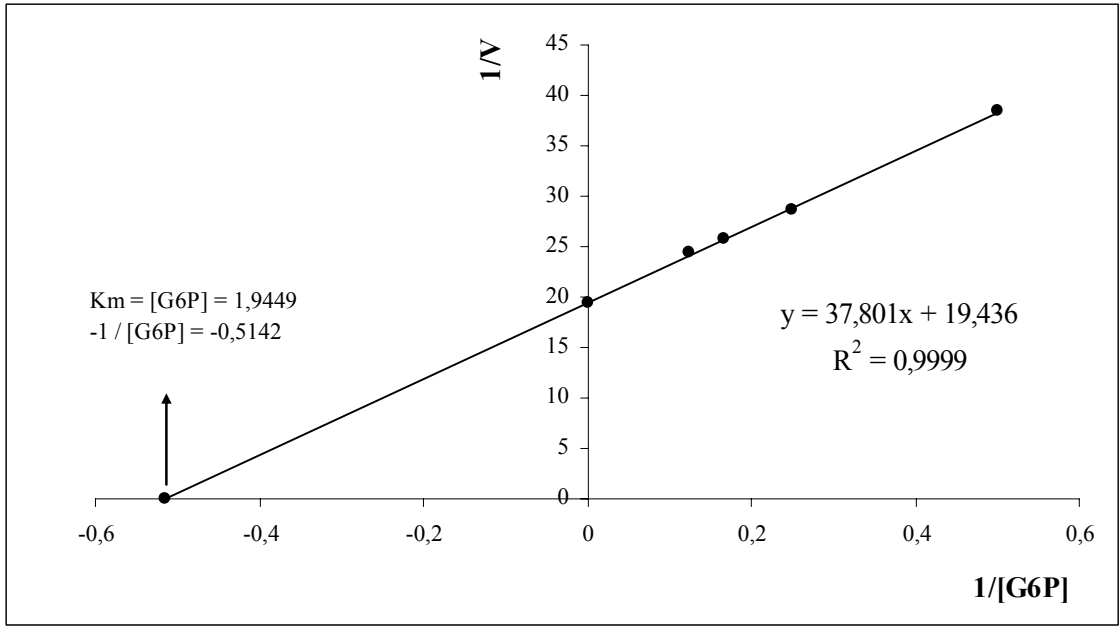
Şekil 4.3.2. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 6 mM G6P derişiminde, 0,5-3 mM NADP⁺'ye karşı çizilen Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.3.3. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 6 mM G6P derişiminde, 0,5-3 mM NADP⁺'ye karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.3.4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 2 mM NADP⁺ derişiminde, 2-8 mM G6P'a karşı çizilen Michaelis-Menten grafiği.



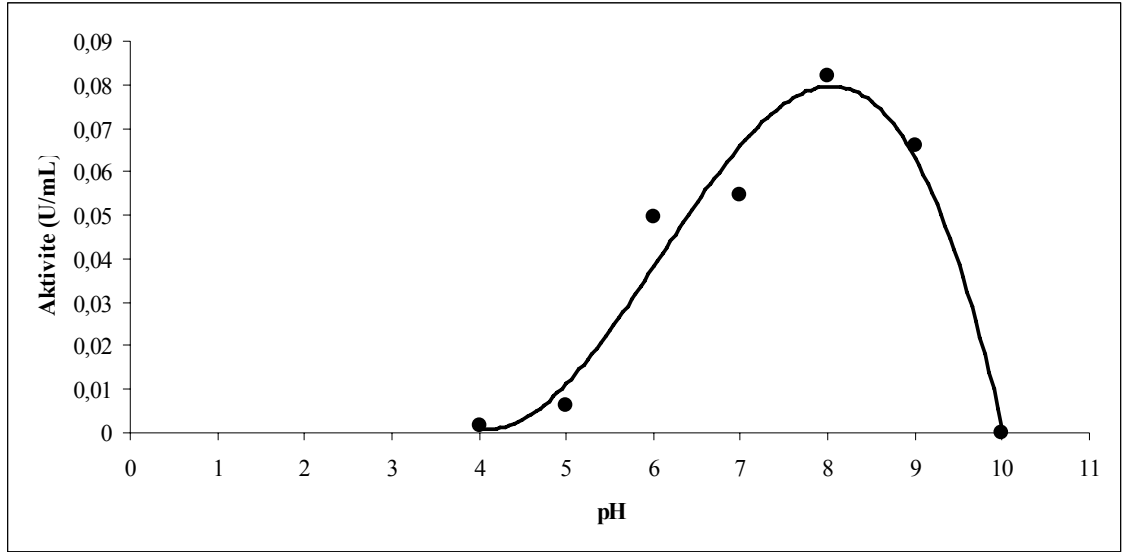
Şekil 4.3.5. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın sabit 2 mM NADP⁺ derişiminde, 2-8 mM G6P'a karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 4.3.1. G6P ve NADP⁺ için hesaplanan Vmax ve Km değerleri.

| Substrat | Km (mM) | Vmax (U/mL) | Vmax/Km |
|-------------------|---------|-------------|---------|
| Glukoz-6-fosfat | 1.9449 | 0.0514 | 0.0264 |
| NADP ⁺ | 0.4192 | 0.0428 | 0.1021 |

4.4. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE pH'NIN ETKİSİ

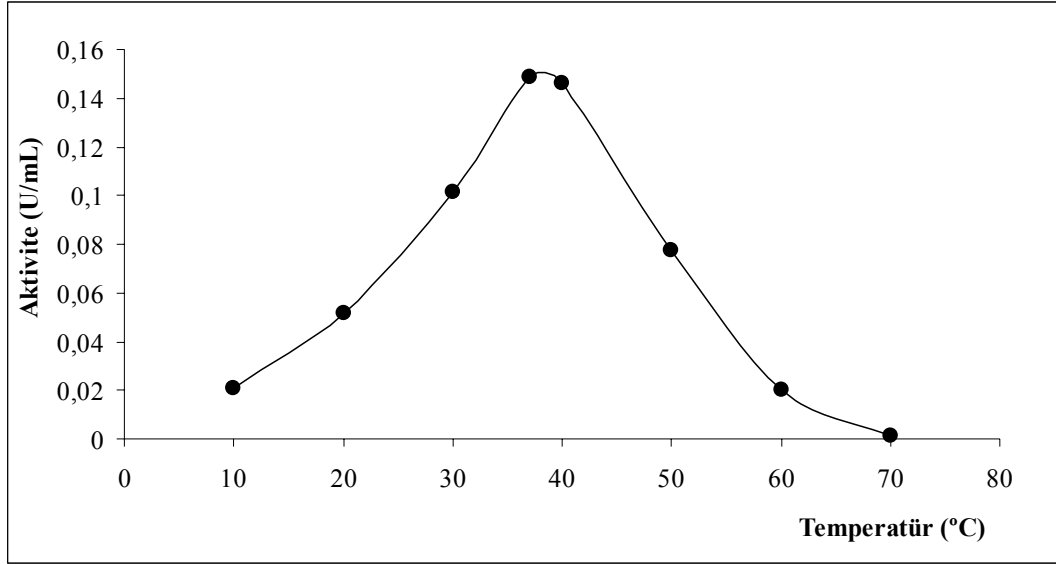
G6PD aktivitesinin, farklı pH'larda (pH=4-10) 6 mM G6P substratı kullanılarak incelenmesi sonucunda, fındık G6PD'nin en yüksek aktiviteyi pH=8.0'da gösterdiği, bu değerden sonra ise aktivitenin azaldığı görüldü (Şekil 4.4.1) [172, 173].



Şekil 4.4.1. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

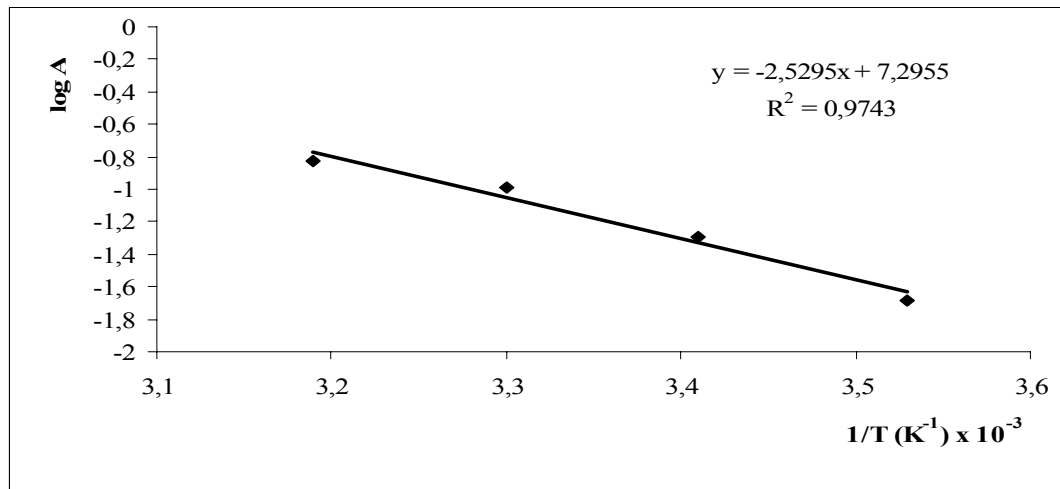
4.5. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ

G6PD aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 10°C-70°C arasında, sıcaklık her defasında 10°C artırılarak incelendi. Buna göre, en yüksek aktivitenin 37-40°C arasında olduğu bulundu. Sıcaklığın daha da artmasıyla aktivitenin azaldığı saptandı (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.1. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

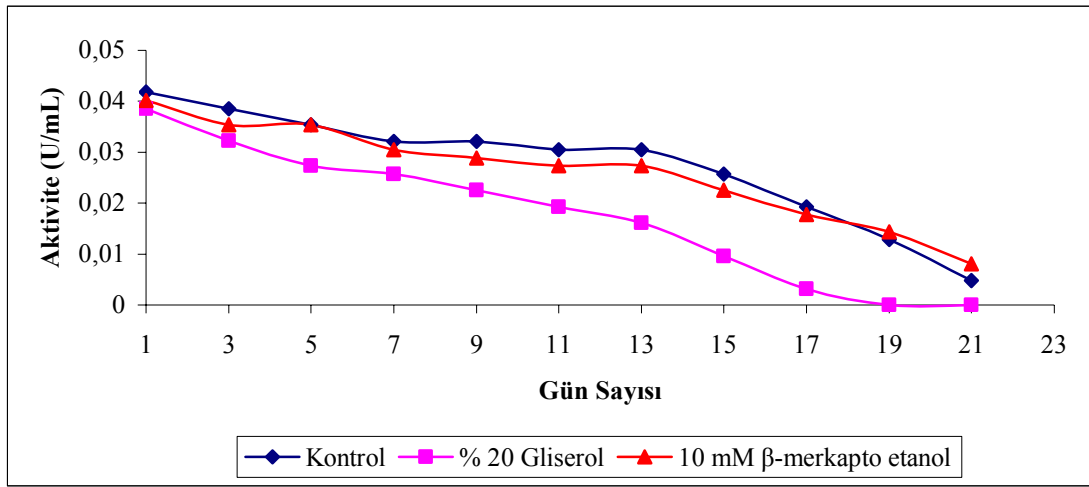
G6PD enziminin aktivasyon enerjisini hesaplamak amacıyla 10-40°C arasında ölçülen aktivite değerlerinin logaritmasına ($\log A$) karşı sıcaklık ($1/T$) değerleri arasında çizilen grafik Şekil 4.5.2'de verildi. Elde edilen doğru denklemi ile G6PD enziminin aktivasyon enerjisi $5,01 \text{ kcal.mol}^{-1}$ bulundu.



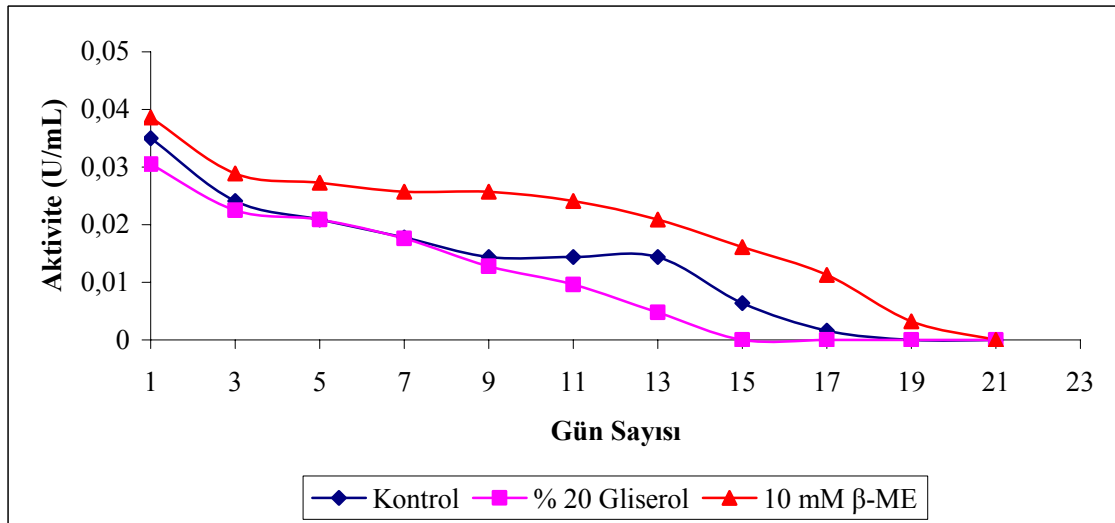
Şekil 4.5.2. Fındık glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin logaritması ($\log A$) ile $1/T \text{ (K}^{-1})$ arasındaki ilişki.

4.6. GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİNE GÖRE DEPO KARARLILIĞI

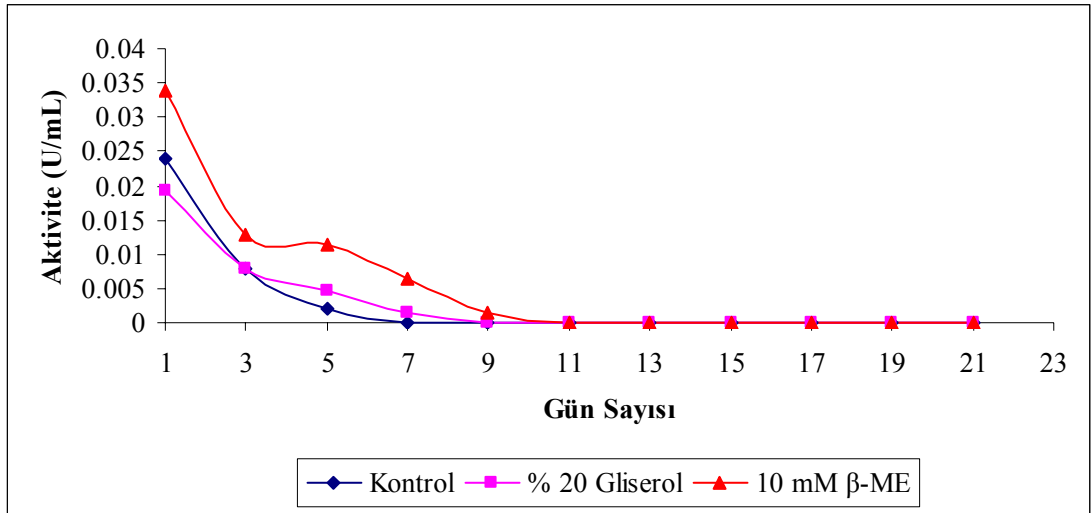
-20°C’de derin dondurucuda, +4°C’de buzdolabında ve oda sıcaklığında 21 gün süreyle saklanan enzim çözeltilerinin iki günde bir enzim aktivitesinin tayin edilmesi sonucunda, 10 mM β -merkaptto etanol içeren enzim çözeltilerinin, her üç sıcaklık değerinde de % 20 gliserol içeren enzim çözeltilerine göre daha koruyucu etkiye sahip olduğu Şekil 4.6.1., Şekil 4.6.2., ve Şekil 4.6.3.’de görülmektedir.



Şekil 4.6.1. -20°C’de derin dondurucuda saklanan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın depo kararlılığı.



Şekil 4.6.2. +4 °C’de buzdolabında saklanan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın depo kararlılığı.



Şekil 4.6.3. Oda sıcaklığında saklanan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın depo kararlılığı.

4.7. ÇEŞİTLİ BİLEŞİKLERİN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

4.7.1. Anorganik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Anorganik bileşiklerin G6PD aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde, enzimin 1^+ değerlikli anorganik bileşiklerden en fazla KF tarafından % 56.66 oranında inhibe edildiği görüldü (Tablo 4.7.1.1.).

Tablo 4.7.1.1. 1^+ Değerlikli bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri.

| Madde | Konsantrasyon (mM) | % Aktivite | % İnhibisyon |
|-------------------------|--------------------|------------|--------------|
| Kontrol | - | 100 | 0 |
| KCl | 1 | 74.34 | 25.66 |
| KF | 1 | 43.34 | 56.66 |
| KNO ₃ | 1 | 55.46 | 44.54 |
| NaCl | 1 | 70.57 | 29.43 |
| NaF | 1 | 59.64 | 40.36 |
| NaNO ₃ | 1 | 65.55 | 34.45 |
| Na(CH ₃ COO) | 1 | 63.51 | 36.49 |
| NaHCO ₃ | 1 | 75.76 | 24.24 |
| LiCl | 1 | 79.09 | 20.91 |
| NH ₄ Cl | 1 | 77.04 | 22.96 |

2⁺ değerlikli anorganik tuzlardan K₂CO₃'ün, % 63.04 inhibisyon ile enzim aktivitesi üzerine etki ettiği görüldü. K₂CO₃'ün konsantrasyonu artırıldığında ise inhibisyon etkisinin azaldığı görüldü. Konsantrasyon ile inhibisyon arasındaki bu ters orantı, FeCl₂ ile yapılan inhibisyon deneylerinde de elde edildi. 1 mM FeCl₂, enzimi % 5.43 oranında inhibe ederken, konsantrasyonunun 10 mM'a çıkarılması sonucunda G6PD'ı inhibe değil, aksine % 0.43 oranında aktive ettiği görüldü.

Öte yandan, Hg(NO₃)₂ ve Mg(NO₃)₂'ün inhibisyon etkisinin konsantrasyon ile arttığı saptandı (Tablo 4.7.1.2.).

Ca²⁺ ve Ba²⁺ tuzlarının ise enzim aktivitesi üzerine aktivasyon etkisi gösterdiği bulundu.

Tablo 4.7.1.2. 2⁺ Değerlikli bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.

| Madde | Konsantrasyon (mM) | % Aktivite | % İnhibisyon |
|-------------------------------------------------|--------------------|------------|--------------|
| Kontrol | | 100 | 0 |
| K ₂ CO ₃ | 1 | 36.96 | 63.04 |
| K ₂ CO ₃ | 10 | 90.92 | 9.08 |
| K ₂ SO ₄ | 1 | 50.39 | 49.61 |
| Na ₂ CO ₃ | 1 | 72.29 | 27.71 |
| Na ₂ SO ₄ | 1 | 74.80 | 25.20 |
| CaCl ₂ | 1 | 110.30 | 10.30* |
| CaCO ₃ | 1 | 111.30 | 11.30* |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 1 | 128.50 | 28.50* |
| BaCl ₂ | 1 | 118.60 | 18.60* |
| BaCO ₃ | 1 | 113.10 | 13.10* |
| Ba(NO ₃) ₂ | 1 | 102.10 | 2.10* |
| MgSO ₄ | 1 | 92.09 | 7.91 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 1 | 73.96 | 26.04 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 10 | 71.60 | 28.40 |
| CuCl ₂ | 1 | 61.90 | 38.10 |
| CuSO ₄ | 1 | 91.47 | 8.53 |
| FeCl ₂ | 1 | 94.57 | 5.43 |
| FeCl ₂ | 10 | 100.42 | 0.42* |
| FeSO ₄ | 1 | 86.62 | 13.38 |
| ZnCl ₂ | 1 | 94.57 | 5.43 |
| ZnSO ₄ | 1 | 79.09 | 20.91 |
| MnCl ₂ | 1 | 107.14 | 7.14* |
| Hg(NO ₃) ₂ | 1 | 37.29 | 62.71 |
| Hg(NO ₃) ₂ | 10 | 15.76 | 84.24 |

*G6PD enzimini aktive eden bileşikler

3⁺ değerli anorganik tuzlardan FeCl₃ ise enzimi, % 27.86 ile en fazla inhibe eden kimyasal madde olarak bulundu (Tablo 4.7.1.3.).

Tablo 4.7.1.3. 3⁺ Değerlikli bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.

| Madde | Konsantrasyon (mM) | % Aktivite | % İnhibisyon |
|-------------------|--------------------|------------|--------------|
| Kontrol | | 100 | 0 |
| AlCl ₃ | 1 | 96.33 | 3.67 |
| CrCl ₃ | 1 | 92.86 | 7.14 |
| FeCl ₃ | 1 | 90.50 | 9.50 |
| FeCl ₃ | 10 | 72.14 | 27.86 |

4.7.2. Organik Bileşiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

G6PD aktivitesi üzerine organik bileşiklerin etkisini saptamak amacıyla yapılan deneylerde, enzimin en fazla sitrik asid tarafından % 54.4 oranında inhibe edildiği, en fazla piridoksal 5'-fosfat tarafından ise % 15.39 aktive edildiği belirlendi (Tablo 4.7.2.1.).

Deterjanlardan Triton X-100'ün G6PD'ı zayıf bir şekilde aktive ettiği görülürken, Tween 20'nin % 8.33 oranında aktive ettiği bulundu (Tablo 4.7.2.1.).

Tablo 4.7.2.1. Organik bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri.

| Madde | Konsantrasyon (mM) | % Aktivite | % İnhibisyon |
|------------------------|--------------------|------------|--------------|
| Kontrol | | 100 | 0 |
| ρ-Kloromerküri benzoat | 1 µM | 76.41 | 23.59 |
| | 10 µM | 76.48 | 23.52 |
| | 20 µM | 66.19 | 33.81 |
| 2-İyodoaset amid | 1 µM | 77.95 | 22.06 |
| | 10 µM | 69.63 | 30.37 |
| | 20 µM | 66.19 | 33.81 |
| Asetil salisilik asit | 1 µM | 79.43 | 21.57 |
| | 10 µM | 64.06 | 35.94 |
| | 20 µM | 63.24 | 36.76 |
| Malik asit | 1 µM | 77.96 | 22.04 |
| | 10 µM | 66.58 | 33.42 |
| | 20 µM | 51.48 | 49.52 |
| Oksalik asit | 1 µM | 76.49 | 23.51 |
| | 10 µM | 75.07 | 24.93 |
| | 20 µM | 66.19 | 33.81 |
| Sitrik asit | 1 µM | 88.25 | 11.75 |
| | 10 µM | 86.50 | 13.50 |
| | 20 µM | 45.60 | 54.40 |
| GSH | 10 µM | 98.78 | 1.22 |
| GSSG | 10 µM | 87.05 | 12.95 |
| Fumarik asit | 10 µM | 98.72 | 1.28 |
| Süksinik asit | 10 µM | 96.31 | 3.69 |
| Piridoksal 5'-fosfat | 10 µM | 115.39 | 15.39* |
| 1,4-Ditiyoeritrol | 10 µM | 106.19 | 6.19* |
| EDTA | 1 | 73.94 | 26.06 |
| Triton X-100 | % 0.01 | 99.69 | 0.31 |
| Tween 20 | % 0.01 | 108.33 | 8.33* |

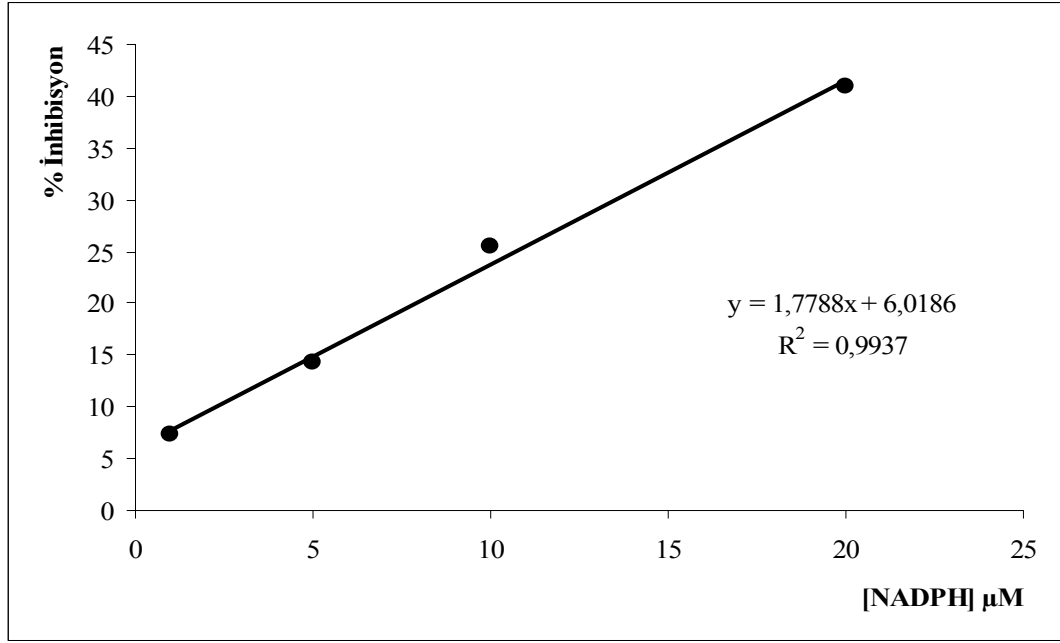
*G6PD enzimini aktive eden bileşikler

4.8. ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE NADPH+H⁺'İN İNHİBİTÖR KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ

Enzim aktivitesi üzerine inhibitör konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan deneylerde, β-NADPH+H⁺'in 1µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM'lık konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği Tablo 4.8.1.' de verildi. Konsantrasyonun artırılmasıyla % inhibisyon arasında doğru orantı olduğu görülmektedir (Şekil 4.8.1.).

Tablo 4.8.1. β -NADPH+H⁺'in glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.

| Madde | Konsantrasyon (μ M) | % Aktivite | % İnhibisyon |
|-------------------------------|--------------------------|------------|--------------|
| Kontrol | | 100 | 0 |
| β -NADPH+H ⁺ | 1 | 92.70 | 7.30 |
| | 5 | 85.62 | 14.38 |
| | 10 | 74.45 | 25.55 |
| | 20 | 59.12 | 40.88 |

Şekil 4.8.1. β -NADPH+H⁺ konsantrasyonu ile glukoz-6-fosfat dehidrogenazın % inhibisyonu arasındaki ilişki.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizleyen bir enzimdir. Hemen hemen tüm memeli dokularında [15], bitkilerde [20] ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır [28, 29]. Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olması ve katalizlediği reaksiyonda NADP^+ 'ın indirgenmesi ile oluşan $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'ların vücutta indirgenme reaksiyonlarında ve çeşitli detoksifikasyon reaksiyonlarında kullanılması nedeni ile, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz organizma için önemli bir enzimdir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın fındıktan saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ilk kez tarafımızdan saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda Van Gölü balığının karaciğerinden G6PD enzimi afinite kromatografisi ile 899 kat saflaştırılmıştır [106]. İnsan eritrositlerinden, koyun eritrositleri ve göz lensinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan bu enzim sırası ile 9.150, 488,74 ve 10.400 kat saflaştırılmıştır [10, 109]. Bitkilerde yapılan saflaştırma çalışmalarında, G6PD, maydanoz yapraklarından 58 kat [136], su yosunundan (*Chlorella vulgaris* C-27) 11,3 kat [179], bezelye yapraklarından 6470 kat [19], arpa köklerinden 147,6 kat [135], arpa yapraklarından 65,56 kat [140], mısır yapraklarından 78,5 kat [26] saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak yapılan saflaştırma proseslerinde saflaştırma katsayıları yüksektir. Çalışmamızda fındık G6PD 36,2 kat saflaştırılmıştır. Bu değer, diğer bitkilerle ilgili çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

Enzimlerin canlıya ve dokuya bağlı olarak molekül ağırlıkları farklılıklar göstermektedir. G6PD'nin molekül ağırlığını saptamak için araştırmacılarla çeşitli farklı türlerde elektroforez yöntemleri uygulanmıştır [101, 120, 122, 154, 158, 185, 186]. G6PD'nin saflaştırılma evrelerinde ham ekstre ve hidroksilapatit kolonu çıkışlı enzim örneklerinde yapılan PAGE sonucunda hidroksilapatit eluatında tek bir aktivite bandı

görüldü. Standart proteinlerin molekül ağırlıklarıyla karşılaştırılan hidroksilapatit eluatının molekül ağırlığı 271 kDa olarak tayin edildi.

SDS-PAGE elektroforezi sonucunda enzimin molekül ağırlığının standart olarak kullanılan proteinlerin molekül ağırlıklarıyla mukayese edilmesi sonucunda alt birimlerin 33,820 kDa olduğu ve bu enzimin oktamer yapıda olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.1.3.2.1.).

G6PD'nin saflaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalarda, G6PD enziminin molekül ağırlığının bezelye yapraklarında 240 kDa [19], soya fasulyesinde 110 kDa [23], ıspanak yapraklarında 105 kDa [25], mısır yapraklarında 209 kDa [26], maydanoz yapraklarında 79,3 kDa [136], arpa yapraklarında 112 kDa [140] ve su yosununda 450 kDa [179]; insan ve domuz beyininde 220 kDa [49]; *Acetobacter hansenii*'de [48] ve *Azotobacter vinelandii*'de 220 kDa [52], *Pseudomonas multivorans*'da 240 kDa [55] olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda fındıktan saflaştırdığımız G6PD'nin 218 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu bulundu. Bu değer, diğer bitkilerden saflaştırılan G6PD'nin molekül ağırlıklarıyla uygunluk göstermektedir.

Enzimler, birden fazla substrata karşı ilgi gösterirler. G6PD'nin substrat analoglarına olan ilgisini belirlemek amacıyla D-glukoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-fruktoz ile yapılan deneylerde enzimin bu substratlara karşı hiçbir ilgi göstermediği saptandı. Ayrıca enzimin substratı olan G6P ve NADP⁺ için Km ve Vmax değerleri hesaplandığında enzimin NADP⁺'ye ilgisinin daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. G6PD enzimi koenzim olarak NADP⁺'nin yanısıra bazı canlılarda NAD⁺ ve d-ANADP⁺'yi de kullanmaktadır. Çalışmamızda enzim doğal koenzimi olan NADP⁺'yi kullandığı ve bunun Km değerinin 0,4192 mM olduğu bulunmuştur. NAD⁺'yi fındık G6PD enzimi hiç kullanmamaktadır (Şekil 4.3.1.). Bu nedenle fındık G6PD'yi NADP⁺ spesifik bir enzimidir. *Aspergillus aculeatus*'tan [29], mayadan [42], *Aspergillus nidulans*'tan [47], *Bacillus stearothermophilus*'tan [158] ve sıçan ince bağırsağından [180] saflaştırılan G6PD'lerin, NAD⁺'yi koenzim olarak kullanmadığı, NADP⁺'yi kullandığı bildirilmiştir.

G6PD'nin optimum pH aralığının 5,2-10,00 arasında değiştiği çeşitli araştırma gruplarınca bildirilmiştir [181-183]. Çalışmamızda fındık G6PD'nin optimum pH'nın 8,0 olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda enzim aktivite tayini de pH=8,0'da yapılmıştır. Koyun eritrositleri ve lenslerinden elde edilen G6PD'nin optimum pH'sı da 8,0 bulunmuştur [10]. Soya fasulyesinden elde edilen G6PD'nin optimum pH=8,1-8,5 değerindedir [23]. Maydanoz G6PD'nin optimum pH'sı da 8,0 bulunmuştur. Bu çalışmalar bizim çalışmamızla uygunluk göstermektedir [136].

G6PD'nin optimum sıcaklığının çeşitli çalışmalarda 30-60°C arasında olduğu görülmektedir [31, 117, 136, 152]. Çalışmamızda fındık G6PD'nin optimum sıcaklığı 37°C'dir. Bu da enzim aktivite tayininde çalışılan sıcaklık ile aynı değerdedir. Çalışmamızda 40°C'den daha yüksek sıcaklıklarda enzimin kararlılığını kaybettiği görülmektedir. Çalışmamızda bulduğumuz optimum pH ve sıcaklık değerleri enzim aktivitesinin, çalışmamızda uygun reaksiyon şartlarında yapıldığını göstermektedir.

Özer ve diğ. insan plasentasından saflaştırdıkları G6PD'nin aktivasyon enerjisini 8.160 kcal.mol⁻¹ [15], köpek karaciğerinden saflaştırdıkları G6PD enziminin aktivasyon enerjisini de 8.96 kcal.mol⁻¹ [133] saptamışlardır. Çalışmamızda hesaplanan aktivasyon enerjisi değeri 5.01 kcal.mol⁻¹'dür. Bu değer Özer ve diğ. değerinden daha düşük bir değerdir.

Çalışmamızda G6PD depo kararlılığına +4°C, -20°C ve 20°C'lerde bakıldığında, enzimin ortama hiçbir madde katılmadan kısa sürede 20°C'de aktivitesini kaybettiği görülmektedir. Ortama % 20 gliserol katıldığında, gliserolün enzimin aktivitesini, kontrol grubuna nazaran oda sıcaklığında daha fazla koruduğunu göstermektedir. Aynı şekilde Levy ve diğ. gliserolün aktiviteyi korumada etkili olduğunu göstermiştir [116]. Gliserolün enzimin alt birimleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri stabilize ettiği gösterilmiştir [184]. G6PD'nin depo kararlılığını en fazla etkileyen madde β-merkaptto etanol'dür. β-merkaptto etanol katılması ile enzim aktivitesinin daha uzun sürede aktivitesini kaybettiği görülmektedir.

Literatürde çalışmaların birçoğunda tampon olarak Tris-HCl tamponu kullanılmış ve tampon derişimleri 5-100 mM arasında tutulmuştur [34, 158, 167, 185-187].

Çalışmamızda kullanılan fosfat tamponu pH=7'de 200 mM olarak tutulmuştur. İyonik kuvvetin yükselmesi tetramer veya heksamer yapıdaki enzimi alt birimlerine dönüştürmektedir. Bu nedenle saflaştırma basamakları süresince kullanılan tamponun pH=7'de tutulmuştur. Bu pH'lardan daha yüksek ve daha düşük pH'larda enzimin yapısında ve aktivitesinde değişiklik olmaktadır [33, 188-190]. Ayrıca seyrelme ile enzimin inaktivasyonu artmaktadır. Enzim derişik iken hem kararlı hem de aktif bir yapıya sahiptir [189].

NADPH+H⁺, G6PD'ın inhibitörüdür [15, 32, 131, 188, 192]. Çalışmamızda NADPH+H⁺'in konsantrasyon artışı ile % inhibisyon değerinin arttığı bulunmuştur. Bu da literatür ile uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda Hg(NO₃)₂'in enzimi en yüksek oranda inhibe ettiği ve konsantrasyon artışına bağlı olarak enzimin inhibisyon değerinin de arttığı görülmektedir. Hg²⁺ iyonları enzimin spesifik inhibitörlerindedir [141, 142]. Çalışmamızda da Hg²⁺ iyonları tarafından enzim inhibisyonu enzimin –SH gruplarına Hg²⁺ bağlanması ve dönüşümsüz olarak enzimi inhibe etmesi nedeniyle olduğu ileri sürülebilir.

Literatürde G6PD'ın bazı deterjanlar (Triton X-100, Tween 80, Span 20) tarafından aktive edildiği belirtilmektedir [142]. Çalışmamızda da Tween 20'nin enzimi aktive ettiği görülmektedir.

TCA siklusunun ara maddeleri olan malik asid, sitrik asid, süksinik asid, fumarik asid gibi maddeler pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan G6PD enzimini inhibe eden maddelerdir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon değeri artmaktadır. EDTA'nın da G6PD enzimi üzerine inhibe edici etkisi bulunmaktadır.

Aktivite tayininde reaksiyon ortamında MgCl₂ bulunur. Mg²⁺ iyonlarının G6PD enziminin aktivatörü olduğu literatürde bildirilmektedir. Çalışmamızda Mg(NO₃)₂ bileşiği az da olsa enzimi inhibe etmektedir. Bu inhibisyonun NO₃⁻ iyonlarından dolayı olduğu söylenebilir. Çalışmamızda MnCl₂, CaCl₂, CaCO₃, Ca₃(PO₄)₂, BaCl₂, BaCO₃, Ba(NO₃)₂ gibi bileşikler enzimi aktive etmektedirler. Bu iyonların ortamda bulunması ile enzimin aktivasyonuna devam edebileceği görülmektedir.

Sonuç olarak fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi ilk kez saflaştırılmış ve bazı özellikleri incelenmiştir. Buna göre;

- Fındıktan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi 36,2 kat saflaştırıldı.
- Fındıktan saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın, molekül ağırlığı PAGE yöntemi ile yaklaşık olarak 271 kDa olarak tayin edildi. SDS-PAGE elektroforezi sonucunda enzimin alt birim molekül ağırlığının 33,820 kDa ve bu değere göre enzimin oktamer yapıda olduğu bulundu.
- Fındık glukoz-6-fosfat dehidrogenazının koenzim olarak yalnızca NADP^+ 'yi kullandığı saptandı.
- Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sının 8; optimum sıcaklık değerinin de 37-40°C arasında olduğu saptandı.
- Enzimin D-glukoz-6-fosfat substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 1.9449 mM ve 0.0514 U/ml olduğu bulundu. Buna karşın glukoz-6-fosfat dehidrogenazın NADP^+ 'ye karşı K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0.4192 mM ve 0.0428 U/mL olarak belirlendi.
- Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin en iyi depolanma kararlılığının -20°C'de olduğu ve depolanma kararlılığını en fazla etkileyen maddenin β -merkaptan etanol olduğu bulundu.
- Fındıktan saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenazın optimum koşullarda aktivasyon enerjisinin 5,01 kcal.mol⁻¹ olduğu belirlendi.
- Fındık glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine çeşitli anorganik bileşiklerin etkisi incelendiğinde; 1⁺ değerlikli bileşiklerden KF'nin % 56.66, NaF'nin ise % 40.36 oranında enzimi inhibe ettiği görüldü. 2⁺ değerlikli bileşiklerden Hg(NO₃)₂'ın % 84.24, K₂CO₃'ün ise % 63.04 oranında inhibisyona neden olduğu bulundu. Buna karşılık, çalışılan diğer 2⁺ değerlikli bileşiklerden Ca₃(PO₄)₂'in enzimi % 28.50, BaCl₂'ün ise % 18.60 oranında aktive ettiği saptandı. 3⁺ değerlikli bileşiklerden FeCl₃'ün % 27.86 oranında enzimi inhibe ettiği bulundu.
- Enzim üzerine bazı organik bileşiklerin etkisi incelendiğinde; sitrik asidin % 54.40, malik asidin % 49.52 oranında enzimi inhibe ettiği görüldü. Asetil salisilik asidin % 36.76, p-kloromerküri benzoik asidin ve 2-iyodoaset amidin ise enzim aktivitesi üzerine % 33.81 oranında inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Buna karşılık en fazla aktivatör etkisi gösteren organik maddenin

% 15.39 ile piridoksal 5'-fosfat olduğu bulunurken, 1,4-ditiyoeritrolün de enzimi % 6.79 oranında aktive ettiği saptandı.

- Deterjanlardan Tween 20, enzimi % 8.33 oranında aktive ederken, Triton X-100'ün % 0.31 ile zayıf inhibitör etkisine sahip olduğu bulundu.
- β -NADPH+H⁺'in konsantrasyonunun artırılmasıyla % inhibisyon etkisinin de doğru orantılı olarak arttığı saptandı.

Sonuç olarak, ülkemizde Karadeniz Bölgesi'nde bol miktarda yetiştirilen ve yurt dışına ihraç edilen fındıktan ilk defa glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. LEHNINGER, A. L., 1982, *Principles of Biochemistry*, 2nd Ed., Worth Publishers, Inc., S:198-239, New York, USA.
2. ARAS, K., ERŞAN, G., 1988, *Teorik ve Klinik Enzimoloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
3. TEMİZKAN, G., ARDA, N., 2004, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 975-420-347-4.
4. EMEKLİ, N., 1994, *Basic and Applied Biochemistry*, Marmara Üniversitesi Yayınları, No: 556, S: 155, İstanbul.
5. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> [Ziyaret Tarihi:17 Kasım 2007].
6. CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A., 1994, *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, 2nd Ed., S: 111-112.
7. AU, S. W., GOVER, S., LAM, V. M., ADAMS, M. J., 2000, Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency, *Structure*, 8, 293-303.
8. ESPOSITO, S., 2006, Glucose-6P dehydrogenase in *Chorella sorokiniana* (211/8K): An enzyme with unusual characteristics, *Planta*, 223, 796-804.
9. OPHEIM, D., BERNLOHR, R. W., 1973, Purification and regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*, *Journal of Bacteriology*, 116 (3), 1150-1159.
10. BEYDEMİR, Ş., 2002, *Koyun eritrositleri ve göz lensinden glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon kinetiklerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
11. COLLEEN, S., MARKS, A. D., LIEBERMAN, M., 2007, *Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası-Klinik Yaklaşım*, Güneş Kitabevi, İstanbul, ISBN: 978-975-227-138-3.
12. GIUSEPPE, M., URSINI, M. V., 1996, A new lease of life for an old enzyme, *Bioessays*, 18, 631-637.
13. SCOTT, M. D., ZUO, L., LUBIN, B. H., CHIU, D. T., 1991, NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes, *Blood*, 77 (9), 2059-2069.
14. KEHA, E. E., KÜFREYOĞLU, Ö. İ., 2000, *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, s:344-345, İstanbul, ISBN: 975-6755-20-02.

15. AKSOY, YASEMİN., 1992, *Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin insan plasentasından saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
16. KRUGER, N. J., von SCHAEWEN, A., 2003, The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation, *Current Opinion in Plant Biology*, 6,236-246.
17. SCHNARRENBERGER, C., FLECHNER, A., MARTIN, W., 1995, Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves, *Plant Physiology*, 108, 609-614.
18. DEBNAM, P. M., EMES, M. J., 1999, Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues, *Journal of Experimental Botany*, 50,1653-1661.
19. FICKENSER, K., SCHIEBE, R., 1986, Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247, 393-402.
20. WENDT; U. K., WENDEROTH, I., TEGELER, A., von SCHAEWEN, A., 2000, Molecular characterisation of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.), *The Plant Journal*, 23, 723-733.
21. ESPOSITO, S., MASSARO, G., VONA, V., Di MARTINO, R. V., CARFAGNA, S., 2003, Glutamate synthesis in barley roots: The role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Planta*, 216, 639-647.
22. HUTCHINGS, D., RAWSTHORNE, S., EMES, M. J., 2005, Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.), *Journal of Experimental Botany*, 56, 577-585.
23. HONG, Z. Q., COPELAND, L., 1991, Isoenzymes of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the plant fraction of soybean nodules, *Plant Physiology*, 96, 862-867.
24. LENDZIAN, K. J., 1980, Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP⁺ and dithiothreitol at variable NADPH/NADP⁺ ratios in an illuminated reconstituted spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system, *Planta*, 148, 1-6.
25. SCHNARRENBERGER, C., OESER, A., TOLBERT, N. E., 1973, Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 154, 438-448.

26. VALENTI, V., STANGHELLINI, M. A., PUPILLO, P., 1984, Glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes of maize leaves, *Plant Physiology*, 75, 521-526.
27. HAUSCHILD, R., von SCHAEWEN A., 2003, Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato, *Plant Physiology*, 133, 47-62.
28. NOLTMANN, E. A., GUBLER, C. J., KUBY, S. A., 1961, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (*Zwischenferment*) I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, 236 (5), 1125-1230.
29. IBRAHEEM, O., ADEWALE, I. O., AFOLAYAN, A., 2005, Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (5), 584-590.
30. GOSSLING, P. G., ROSS, J. O., 1979, Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase from hazel cotyledons, *Phytochemistry*, 18, 1441-1445.
31. ULUSU, N. N., TANDOĞAN, B., 2006, Purification and kinetic properties of sheep kidney cortex glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Comperative Biochemistry and Physiology*, 143B, 249-255.
32. LEVY, H. R., 1979, Glucose-6-phosphate dehydrogenases, *Advances in Enzymology*, 48, 97-192.
33. WRIGLEY, N. G., HEATHER, J. V., BONSIGNORE, A., DE FLORA; A., 1972, Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: Electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers, *Journal of Molecular Biology*, 68 (3), 483-499.
34. YOSHIDA, A., 1966, Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human erythrocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, 241 (21), 4966-4976.
35. CAMARDELLA, L., CARUSCO, C., RUTIGLIANO, B., ROMANO, M., DI PRISCO, F., 1988, Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Identification of a reactive lysyl residue labelled with pyridoxal 5'-phosphate, *European Journal of Biochemistry*, 171, 485-489.
36. LEE, W. T., LEVY, H. R., 1992, Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase participates in substrate binding through charge-charge interaction, *Protein Science*, 1, 329-334.
37. JEFFERY, J., PERSSON, B., WOOD, I., BERGMAN, T., JEFFERY, R., JORNVAL, H., 1993, Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Structure-function relationships and the *Pichia jadinii* enzyme structure *European Journal of Biochemistry*, 212, 41-49.

38. ROWLAND, P., BASAK, A. K., GOVER, S., LEVY, H. R., ADAMS, M. J., 1994, The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2Å resolution, *Structure*, 2 (11), 1073-1087.
39. MASON, P. J., BAUTISTA, J. M., GILSANZ, F., 2007, G6PD deficiency: The genotype-phenotype association, *Blood Reviews*, 21, 267-283.
40. KOTAKA, M., GOVER, S., VANDEPUTTE-RUTTEN, L., AU, S. W., LAM, V. M., ADAMS, M. J., 2005, Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61, 495-504.
41. SALAS, M., VIÑUELA, E., SOLS, A., 1965, Spontaneous and enzymatically catalyzed anomerization of glucose 6-phosphate and anomeric specificity of related enzymes, *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 561-568.
42. STERN, B. K., VENNESLAND, B., 1960, The enzymatic transfer of hydrogen. IX. The reactions catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 235 (1), 205-208.
43. LEVY, H. R., 1961, The pyridine nucleotide specificity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 6, 49-53.
44. HEISE, N., OPPERDOES, F. R., 1999, Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanoma brucei*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 99, 21-32.
45. TAPPIA, P. S., JONES, C. J. P., CONNOCK, M. J., 1998, Purification of guinea pig small intestinal peroxisomes and the subcellular localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179, 13-20.
46. ASKAR, M. A., SUMATHY, K., BAQUER, N. Z., 1996, Regulation and properties of purified glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat brain, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 33, 512-518.
47. WENNEKES, L. M. J., GOOSEN, T., VAN DEN BROEK, P. J. M., VAN DEN BROEK, H. W. J., 1993, Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*, *Journal of General Microbiology*, 139, 2793-2800.
48. LEVY, H. R., COOK, C., 1991, Purification and properties of NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter Hansenii* (*Acetobacter xylinum*), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 291 (1), 161-167.

49. CHO, S. W., JOSHI, J. G., 1990, Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain, *Neuroscience*, 38 (3),819-828.
50. LEVY, H. R., 1963, The interaction of mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase with pyridine nucleotides and 3 β -Hydroxyandrost-5-en-17-one, *The Journal of Biological Chemistry* , 238 (2), 775-784.
51. ULUSU, N. N., KUŞ, M. S., ACAN, N. L., TEZCAN, E. F., 1999, A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31, 787-796.
52. ANDERSON, B. M., ANDERSON, C. D., 1995, Purification and characterization of *Acetobacter vinelandii* glucose-6-phosphate dehydrogenase: Dual coenzyme specificity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321 (1), 94-100.
53. REUTER, R., NAUMANN, M., METZ, P., KOPPERSCHLÄGER, G., 1990, Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas W6*, *Biomedica Biochimica Acta*, 49 (7), 539-546.
54. RAGUNATHAN, S., LEVY, H. R., 1994, Purification and characterization of the NAD-preferring glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310 (2), 360-366.
55. WYK, J. C. V., LESSIE, T. G., 1974, Purification and characterization of the *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate dehydrogenase active with nicotinamide adenine dinucleotide, *Journal of Bacteriology*, 120 (3), 1033-1042.
56. BENZIMAN, M., MAZOVER, A., 1973, Nicotinamide adenine dinucleotide- and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glucose 6-phosphate dehydrogenases of *Acetobacter xylinum* and their role in the regulation of the pentose cycle, *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (5), 1603-1608.
57. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Fındık> [Ziyaret Tarihi: 10 Kasım 2007].
58. PEKER, K. C., 1950, Fındık Bilgisi, *Tübitak*, Kayıt No: 16900, İstanbul.
59. AYFER, M., 1973, Değişik nem ve sıcaklıklarda saklanan fındıklarda kalite kayıpları ve kalite ile yağ asidlerinin değişimleri arasındaki ilişkiler, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, No: 524, Ankara.
60. http://www.ftg.org.tr/devam_tur/cesit [Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2007].
61. <http://www.findik.com/yetistircilik> [Ziyaret Tarihi: 09 Kasım 2007].
62. <http://www.kib.org.tr/index> [Ziyaret Tarihi: 10 Kasım 2007].

63. www.arip.org.tr/documents_raporlar_makaleler/findik_raporu_mart_2004.doc [Ziyaret Tarihi: 22 Kasım 2007].
64. KÖKSAL, A. İ., ARTİK, N., ŞİMŞEK, A., GÜNEŞ, N., 2006, Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey, *Food Chemistry*, 99, 509-515.
65. ASIK, M., DEYMER, J., GULENSOY, H., 1977, Utilization of hazelnut shells, *Clinica Chimica Turcica*, 1977, 5, 27-41.
66. MIDILI, A., RZATEV, P., OLGUN, H., AYHAN, T., 2000, Solar hydrogen production from hazelnut shells, *International Journal of Hydrogen Energy*, 25, 723-732.
67. CIMINO, G., PASSERINI, A., TOSCANO, G., 2000, Removal of toxic cations and Cr (VI) from aqueous solution by hazelnut shell, *Water Research*, 34, 2955-2962.
68. EKİNCİ, Z., KOBYA, M., DEMİRCİOĞLU, N., BAYRAMOĞLU, M., ÇAKICI, A., 1997, The preparation of activated carbon from hazelnut shell for the removal chromium (III) from wastewater, *Chimica Acta Turcica* (Turkish), 25, 165-169.
69. KOBYA, M., DEMİRBAŞ, E., ÖNCEL, M. S., ŞENCAN, S., 2002, Adsorption kinetic models applied to nickel ions on hazelnut shell activated carbons, *Adsorption Science Technology*, 20, 179-188.
70. KOBYA, M., 2004, Removal of Cr (VI) from aqueous solution by adsorption onto hazelnut shell activated carbon: Kinetic and equilibrium studies, *Biosource Technology*, 91, 317-321.
71. ALPHAN, E., PALA, M., AÇKURT, F., YILMAZ, T., 1997, Nutritional composition of hazelnuts and its effects on glucose and lipid metabolism, *Acta Horticulturae*, 415, 305-310.
72. BONVEHI, J. S., COOL, F. V., 1993, Oil content, stability and fatty acid composition of the main varieties of Catalonian hazelnut (*Corylus avellana* L.), *Food Chemistry*, 48, 231-241.
73. BOTTA, R., GIANOTTI, C., RICHARDSON, D., SUNAWAGUL, A., SANZ, C. L., 1994, Hazelnut variety organic acids sugars and total lipid fatty acids, *Acta Horticulturae*, 351, 693-699.
74. AÇKURT, F., ÖZDEMİR, M., BİRİNGEN, G., LÖKER, M., 1999, Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey, *Food Chemistry*, 65, 309-313.

75. ÖZDEMİR, N., AÇKURT, F., KAPLAN, M., YILDIZ, M., LÖKER, M., GÜRCAN, T., BİRİNGEN, G., OKAY, A., SEYHAN, F. G., 2001, Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: Fatty acid composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability, *Food Chemistry*, 73, 411-415.
76. ALASALVAR, C., SHAHIDI, F., LIVANAPATHIRANA, C. M., OHSHIMA, T., 2003, Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). I. Compositional characteristics, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51 (13), 3790-3796.
77. DURAK, İ., KÖKSAL, İ., KAÇMAZ, M., BÜYÜKKOÇAK, S., ÇİMEN, B. M. Y., ÖZTÜRK, H. S., 1999, Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels, *Clinica Chimica Acta*, 284, 113-115.
78. COŞKUN, O., KANTER, M., KORKMAZ, A., OTER, S., 2005, Quercetin, a flavanoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas, *Pharmacology Research*, s: 117, Abst: 51.2.
79. ANJAEYALU, M., CHOPRA, K., 2004, Quercetin, an anti-oxidant bioflavanoid, attenuates diabetic nephropathy in rats, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, s: 224, Abst: 31.4.
80. MERCANLIGİL, S. M., ARSLAN, P., ALASALVAR, C., OKUT, E., AKGÜL, E., PINAR, A., GEYİK, P. Ö., TOKGÖZOĞLU, L., SHAHIDI, F., 2007, Effects of hazelnut-enriched diet on plasma cholesterol and lipoprotein profiles in hypercholesterolemic adult men, *European Journal of Clinical Nutrition*, 61 (2), 212-220.
81. BALKAN, J., HATIPOĞLU, A., AYKAÇ-TOKER, G., UYSAL, M., 2003, Influence on hazelnut oil, administration on peroxidation status of erythrocytes and apolipoprotein B-100 containing lipoproteins in rabbit fed on a high cholesterol, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 3905-3909.
82. HATIPOĞLU, A., KANBAĞLI, B., BALKAN, J., KÜÇÜK, M., ÇEVİKBAŞ, M., AYKAÇ-TOKER, G., BERKKAN, H., UYSAL, M., 2004, Hazelnut oil administration reduces aortic cholesterol accumulation and lipid peroxides in the plasma, liver and aorta of rabbits fed a high-cholesterol diet, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 68 (10), 2050-2057.
83. YARAT, A., SERDAROĞLU, E., EMEKLİ, E., GÜLAL, E., AKYÜZ, S., EREN, N., 2003, *Corylus avellana*'nın tükürük ve kan glutasyon ve lipid peroksidasyonu ve serum lipidleri üzerine etkisi, *Serbest Radikaller ve Antioksidan Araştırma Derneği, III. Ulusal Kongresi, 26-30 Mart 2003 Afyon*, s. 56.

84. KAŞIKÇI, E., 2006, *Hiperlipidemik ve diyabetik hayvan modellerinde "Corylus avellana"nın ve doymamış yağ asidi içeriğinin trombojenik aktivite ve lipid profili üzerine etkisinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
85. CARSON, P. E., FLANAGAN, C. L., ICKES, C. E., ALVING, A. S., 1956, Enzymatic deficiency in primaquin-sensitive erythrocyte, *Science*, 124, 484-485.
86. BEUTLER, E., 1956, The hemolytic effect of primaquin and related compounds: A review, *The Journal of Hematology*, 14(2), 103-139.
87. BEUTLER, E., 1993, Study of G6PD: History and molecular biology, *American Journal of Hematology*, 42, 53-58.
88. <http://www.favism.org> [Ziyaret Tarihi: 30 Kasım 2007].
89. THEODORSSON, E., BIRGENS, H., HAGVE, T. A., 2007, Haemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Scandinavian perspective, *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 67, 3-10.
90. LUZZATTO, L., 2006, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: From genotype to phenotype, *Haematologica*, 91 (10), 1303-1306.
91. BEUTLER, E., 1989, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: New perspectives, *Blood*, 73 (6), 1397-1401.
92. BEUTLER, E., 1991, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *The New England Journal of Medicine*, 324 (3), 169-174.
93. HIRONO, A., BEUTLER, E., 1988, Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-), *Proceedings National Academy of Science*, 85 (11), 3951-3954.
94. BEUTLER, E., 1990, The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Seminars in Hematology*, 27 (2), 137-164.
95. MEHTA, A., MASON, M. J., VULLIAMY, T. J., 2000, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Baillière's Clinical Haematology*, 13 (1), 21-38.
96. BONILLA, J. F., SANCHEZ, M. C., CHUAINÉ, L., 2007, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Response of the human erythrocyte and another cells to the decrease in their activity, *Colombia Medica*, 38 (1), 76-83.
97. <http://www.sci.ege.edu.tr/bakla.htm> [Ziyaret Tarihi: 01 Aralık 2007].
98. BEUTLER, E., 2008, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: A historical perspective, *Blood*, 111 (1), 16-24.

99. WARBURG, O., CHRISTIAN, W., 1931, Aktivierung von kohlehydrat in roten blut zellen, *Biochemische Zeitschrift.*, 238, 131.
100. YUE, R. H., NOLTMANN, E. A., KUBY, S. A., 1969, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (*Zwischenferment*) III. Studies on the subunit structure and on the molecular association phenomenon induced by triphosphopyridine nucleotide, *The Journal of Biological Chemistry* , 244 (5), 1353-1364.
101. De FLORA, A., LORENZONI, I., MANGIAROTTI, M. A., DINA, D., BONSIGNORE, A., 1968, Electrophoretic behavior of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase during purification, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 501-507.
102. CHILLA, R., DOERING, K. M., DOMAGK, G. F., RIPPA, M., 1973, A simplified procedure for the isolation of a highly active crystalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159, 235-239.
103. REILLY, K. E., ALLRED, J. B., 1995, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Saccaromyces cerevisiae* is a glycoprotein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216(3), 993-998.
104. CHI-YU, L., LANGLEY, C. H., BURKHART, J., 1978, Purification and molecular weight determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme from mouse and *Drosophila*, *Analytical Biochemistry*, 86, 697-706.
105. ÖZMEN, İ., KÜFREVIÖĞLU, Ö. İ., GÜL, M., 2005, Effects of some antibiotics on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes in vitro and effect of isepamicin sulfate on activities of antioxidant enzymes in rat erythrocytes, *Drug and Chemical Toxicology*, 28, 443-445.
106. ÇİFTÇİ, M., TÜRKÖĞLU, V., ÇOBAN, T. A., 2007, Effects of some drugs on hepatic glucose-6-phosphate dehydrognase activity in Lake Van fish (*Chalcalburnus tarischii* Palas, 1811), *Journal of Hazardous Materials*, 143, 415-418.
107. NINFALI, P., PALMA, F., 1990, Comparative study of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rabbit tissues, *The Journal of Experimental Zoology*, 254, 6-12.
108. PITTALIS, S., di MONTEMUROS, F. M., TAVAZZI, D., FIORELLI, G., 1992, Rapid isolation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes by combined affinity and anion-exchange chromatography for biochemical characterization of variants, *Journal of Chromatography*, 573, 29-34.

109. ERAT, M., 2004, Purification of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step, *Protein Expression and Purification*, 34, 257-260.
110. BÜYÜKOKUROĞLU, M. E., ALTİKAT, S., ÇİFTÇİ, M., BANOĞLU, Z. N., GÖÇER, F., 2001, Klorpromazin ve Haloperidol'ün insan eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine in vitro etkileri, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11 (2), 101-105.
111. ÇİFTÇİ, M., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., GÜNDOĞDU, M., ÖZMEN, İ., 2000, Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes, *Pharmacology Research*, 41 (1), 109-113.
112. KAHLER, S. G., KIRKMAN, H. N., 1983, Intracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase does not monomerize in human erythrocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, 258 (2), 717-718.
113. YOSHIDA, A., 1970, Enzyme purification by selective elution with substrate analog from ion-exchange columns: Application to glucose-6-phosphate dehydrogenase, pseudocholineesterase, lactate dehydrogenase, and alanine dehydrogenase, *Analytical Biochemistry*, 37, 357-367.
114. SHREVE, D. S., LEVY, H. R., 1977, On the molecular weight of human glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78 (4), 1369-1375.
115. OERTEL, G. W., BENES, P., 1972, The effects of steroids on glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3, 493-496.
116. ÇİFTÇİ, M., BEYDEMİR, Ş., YILMAZ, H., ALTİKAT, S., 2003, Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties, *Protein Expression and Purification*, 29, 304-310.
117. CRISS, W. E., MCKERNS, K. W., 1968, Purification and partial characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex, *Biochemistry*, 7 (1), 125-134.
118. CAPELLACI, S., ALUIGI, G., TABELLINI, L., NINFALI, P., 2001, One step purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from brain areas by immunoaffinity chromatography, *Biotechnology Letters*, 23, 353-357.
119. BEYDEMİR, Ş., YILMAZ, H., ÇİFTÇİ, M., BAKAN, E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., 2003, Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from goose erythrocytes and kinetic properties, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 1179-1185.

120. LEVY, H. R., RAINERI, R. R., NEVALDINE, B. H., 1966, On the structure and catalytic function of mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 241 (10), 2181-2187.
121. DELGADO, C., TEJEDOR, M. C., LUQUE, J., 1990, Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphofructokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography*, 498, 159-168.
122. DAO, M. L., WATSON, J. J., DELANEY, R., JOHNSON, B. C., 1979, Purification of a new high activity form of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and the effect of enzyme inactivation on its immunochemical reactivity, *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (19), 9441-9447.
123. GRUNWALD, M., HILL, Z. H., 1976, Characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver mitochondria, *Biochemical Journal*, 159, 683-687.
124. JEFFERY, J., BARROS-SÖDERLING, J., MURRAY, L., WOOD, I., HANSEN, R., SZEPESI, B., JÖRNVALL, H., 1989, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Characteristics revealed by the liver enzyme structure, *Journal of Biochemistry*, 186, 551-556.
125. CORPAS, F. J., GARCÍA-SALGUERO, L., PERAGÓN, J., LUPIÁÑEZ, J. A., 1995, Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex, *Life Science*, 56 (3), 179-189.
126. NINFALI, P., GUIDI, L., ALUIGI, G., BIAGIOTTI, E., DEL GRANDE, P., 1999, High glucose-6-phosphate dehydrogenase activity contributes to the structural plasticity of periglomerular cells in the olfactory bulb of adult rats, *Brain Research*, 819, 150-154.
127. PARSHAD, R. K., GURAYA, S. S., 1991, Comparison of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in healthy and atretic follicles in rat ovary, *Indian Journal of Experimental Biology*, 29, 276-277.
128. BELGE, E., YÜREGİR, G. T., TUNCER, İ., 2000, The effect of Halothane on the enzymatic activity of mouse liver and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Turkish Journal of Medical Science*, 30, 219-222.
129. VELASCO, P., BARCIA, R., IBARGUREN, I., SIEIRO, A. M., RAMOS-MARTINEZ, J. I., 1994, Purification, characterization and kinetic mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse liver, *International Journal of Biochemistry*, 26 (2), 195-200.
130. ERAT, M., 2005, Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from chicken liver and investigation of some kinetic properties, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, 53-69.

131. NINFALI, P., MALATESTA, M., BIAGIOTTI, E., ALUIGI, G., GAZZANELLI, G., 2001, Glucose-6-phosphate dehydrogenase in small intestine of rabbit: Biochemical properties and subcellular localization, *Acta Histochemistry*, 103, 287-303.
132. KANJI, M. I., TOEWS, M. L., CARPER, W. R., 1976, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 251 (8), 2255-2257.
133. ÖZER, N., BİLGİ, C., ÖĞÜŞ, İ. H., 2002, Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: Purification and kinetic properties, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34, 253-262.
134. ESPOSITO, S., GUARRIERO, G., VONA, V., Di MARTINO RIGANO, V., CARFAGNA, S., RIGANO, C., 2005, Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: The dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms, *Journal of Experimental Botany*, 409, 55-64.
135. ESPOSITO, S., CARFAGNA, S., MASSARO, G., VONA, V., Di MARTINO RIGANO, V., 2001, Glucose-6-phosphate dehydrogenase in barley roots: Kinetic properties and localisation the isoforms, *Planta*, 212, 627-634.
136. ÇOBAN, T. A. K., ÇİFTÇİ, M., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., 2002, Purification and investigation of some kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32 (2), 173-187.
137. WEI-FU, K., JIAN-YE, C., ZHI-XIA, H., PENG-FEI, W., JI-CHENG, Z., QUI-HONG, P., WEI-DONG, H., 2007, Activity and subcellular localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in peach fruits, *Journal of Plant Physiology*, 164, 934-944.
138. KNIGHT, J. S., EMES, M. J., DEBNAM, P. M., 2001, Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*, *Planta*, 212, 499-507.
139. ŠINDELÁŘ, L., ŠINDELÁŘOVÁ, M., BURKETOVÁ, L., 1999, Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (3), 195-201.
140. SEMENIHINA, A., POPOVA, T., SCHNARRENBERGER, C., PINHEIRO DE CARVALHO, M. A. A., 2001, Purification and some catalytic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms from barley leaves, *Photosynthetica*, 39 (2), 299-304.

141. ROBINSON, M. J., 2000, Dark and daylight activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the leaves of nitrogen-limited spinach and soybean plants, *International Journal of Plant Science*, 161 (4), 651-657.
142. MIRFAKHRAI, M., AULEB, L., 1989, Partial purification and kinetic characterization of wheat germ glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Journal of Plant Physiology*, 135, 191-196.
143. MIKI, T., TSUJIMOTO, Y., MIYABE, S., SUGIYAMA, K., IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A., 1996, Oxidative stress response in yeast: Purification and some properties of oxidative stress-inducible glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Hansenula mrakii*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60 (6), 966-970.
144. SCOTT, W. A., TATUM, E. L., 1971, Purification and partial characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*, *The Journal of Biological Chemistry*, 246 (20), 6347-6352.
145. BÉRIAULT, R., CHÉNIER, D., SINGH, R., MIDDAGH, J., MAILLOUX, R., APPANNA, V., 2005, Detection and purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis*, 26, 2892-2897.
146. LESSIE, T., NEIDHART, F. C., 1967, Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Journal of Bacteriology*, 93 (4), 1337-1345.
147. MIETHE, D., BABEL, W., 1988, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas W6*, *Methods in Enzymology*, 346-350.
148. XU, Y., VITOLO, M., DE ALBUQUERQUE, C. N., PESSOA Jr., A., 2003, Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Baker's yeast in aqueous two-phase systems with free triazine dyes as affinity ligands, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 108 (1-3), 853-865.
149. SANWAL, B. D., 1970, Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors. III. Control of glucose 6-phosphate dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 245 (7), 1626-1631.
150. BOWMAN, J. E., BRUBAKER, R. R., FRISCHER, H., CARSON, P. E., 1967, Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase, *Journal of Bacteriology*, 94 (3), 544-551.
151. GANGULY, R., GANGULY, N., MANNING, J. E., 1985, Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*, *Gene*, 35, 91-101.

152. STEIN, T. A., 1971, Partial purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Acanthocephala), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 39 B, 541-549.
153. NIEHAUS, W. G., MALLET, T. C., 1994, Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans*: identification as "Nothing Dehydrogenase", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313 (2), 304-309.
154. FARMER, E. E., EASTERBY, J. S., 1984, The purification of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by dye-ligand chromatography, *Analytical Biochemistry*, 141, 79-82.
155. BAKIR, S., ATALAY, A., 1990, N-Nitrozodietilamin'in glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve piruvat kinaz enzimleriyle *in vitro* etkileşimleri, *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 12 (1), 53-64.
156. SHAH, H. N., ANDREWS, D. M. A., 1994, Malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, key markers for studying the genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *FEMS Microbiology Letters*, 122, 69-74.
157. KLEIN, A. R., BERK, H., PURWANTINI, E., DANIELS, L., THAUER, R. K., 1996, *Si-face* stereospecificity at C5 of coenzyme F₄₂₀ for F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F₄₂₀-dependent alcohol dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus*, *European Journal of Biochemistry*, 239, 93-97.
158. OKUNO, H., NAGATA, K., NAKAJIMA, H., 1985, Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*, *Journal of Applied Biochemistry*, 7, 192-201.
159. BUCKWITZ, D., JACOBASCH, G., KUCKELKORN, U., PLONKA, A., GERTH, C., 1990, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium berghei*: Kinetic and electrophoretic characterization, *Experimental Parasitology*, 70, 264-275.
160. BUCKWITZ, D., JACOBASCH, G., KUCKELKORN, U., MEGOW, D., 1990, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium berghei*: Kinetic and electrophoretic characterization, *Biomedica and Biochimica Acta*, 49 (2/3), 295-300.
161. KURDI-HAIDAR, B., LUZZATTO, L., 1990, Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*, *Molecular Biochemistry and Parasitology*, 41, 83-92.

162. MORITZ, B., STRIEGEL, K., de GRAAF, A. A., SAHM, H., 2000, Kinetic properties of the glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*, *European Journal of Biochemistry*, 267, 3442-3452.
163. FRANDBSEN, J. C., 1976, Partial purification and some properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865) Kisskalt & Hartmann, 1907 (Protozoa: Coccidia), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 54 B, 537-541.
164. PURWANTINI, E., DANIELS, L., 1996, Purification of a novel coenzyme F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*, *Journal of Bacteriology*, 178 (10), 2861-2866.
165. SOKOLOV, A. P., TROTSENKO, Y. A., 1990, Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis*, *Methods in Enzymology*, 188, 339-342.
166. LEVY, H. R., CHRISTOFF, M., INGULLI, J., HO, E. M. N., 1983, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*: Revised kinetic mechanism and kinetics of ATP inhibition, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 222 (2), 473-478.
167. OLIVE, C., GEROCH, M. E., LEVY, H. R., 1971, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*, *The Journal of Biological Chemistry*, 246 (7), 2047-2057.
168. MALCOLM, A. A., SHEPHERD, M. G., 1972, Purification and properties of *Penicillium* glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry Journal*, 128, 817-831.
169. TISELIUS, A., HJÉRTEN, S., LEVIN, O., 1956, Protein chromatography on calcium phosphate columns, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 65 (1), 132-155.
170. LEVIN, O., 1962, Column chromatography of proteins: Calcium phosphate, *Methods in Enzymology*, 5, 27-32.
171. BRADFORD, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
172. BEUTLER, E., 1984, *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 3rd ed. Orlando, Grune and Stratton, 68-73.

173. BETKE, K., BREWER, G. J., KIRKMAN, H. N., 1967, Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO scientific group, *World Health Organization Technical Report Series*, No: 366.
174. ORNSTEIN, L., 1964, Disc electrophoresis-I: Background and theory, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 321-349.
175. DAVIES, B. J., 1964, Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 321, 404-427.
176. VUOPIO, P., HÄRKÖNEN, M., JOHNSON, R., NUUTINEN, M., 1973, Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Finland, *Annals of Clinical Research*, 5, 168-173.
177. De JONG, J. S. S. G., FREDERICKS, W., Van NOORDEN, C. J., 2001, Oxygen insensitivity of the histochemical assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for the detection of (pre)neoplasm in rat liver, *Journal of Histochemistry*, 49, 565-571.
178. LAEMMLI, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
179. HONJOH, K. I. M., KUROIWA, A., HAGISAKO, E., SUGA, T., SHIMIZU, K., DUBEY, H., MIYAMOTO, R. S., HATANO, T., IIO, M. S., 2003, Purification and characterization of two isoforms of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) from *Chlorella vulgaris* C-27, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67 (9), 1888-1896.
180. DANIŞAN, A., 2004, *Sıçan ince bağırsağından glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
181. HIZI, A., YAGIL, G., 1974, On the mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation in mouse liver. II. Purification and properties of the mouse-liver enzyme, *European Journal of Biochemistry*, 45, 201-209.
182. KUŞ, M. S., 1979, *Normal, senil katarakt ve diyabetik kataraktlı insan lensi G6PD'lerinin kısmen saflaştırılması ve özelliklerinin karşılaştırılması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
183. SOLDIN, S. J., BALINSKY, D., 1968, The kinetic properties of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, 7, 1077-1081.
184. NEVALDINE, B. H., HYDE, C. M., LEVY, H. R., 1974, Mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase. Molecular weight studies, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 165, 398-406.

185. KUBY, S. A., WU, J. T., ROY, R. N., 1974, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from Brewer's yeast (*Zwischenferment*). Further observation on the ligand-induced macromolecular association phenomenon: Kinetic properties two-chain protein species; and studies on the enzyme-substrate interactions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 165, 153-178.
186. LEE, C. Y., YUAN, J. H., MOSER, D., KRAMER, J. M., 1979, Purification and characterization of mouse glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 24, 67-73.
187. MATSUDA, T., YUGARI, Y., 1967, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver. I. Crystallization and properties, *Journal of Biochemistry*, 61, 535-540.
188. YOSHIDA, A., 1973, Hemolytic anemia and G6PD deficiency, *Science*, 179, 532-537.
189. BONSIGNORE, A., CANCEDDA, R., NICOLINI, A., DAMIANI, G., De FLORA, A., 1971, Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. VI. Interconversion of multiple molecular forms, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 147, 493-501.
190. HOLTEN, D., 1972, Relationships among the multiple molecular forms of rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 268, 4-12.
191. KIRKMAN, H. N., HENDRICKSON, E. M., 1962, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes II. Subactive states of the enzyme from normal persons, *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 2371-2376.
192. ROSEMEYER, M. A., 1987, The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase, *Cell Biochemistry and Function*, 5, 79-95.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Bertan Boran BAYRAK
Doğum Tarihi : 05.06.1980
Doğum Yeri : Nevşehir

Öğrenim Durumu

İlk Okul : Köyceğiz Merkez Atatürk İlk Okulu 1986-1991 Muğla
Orta Okul : Bahçelievler Orta Okulu 1991-1993 Ankara / M. Emin Günel Orta Okulu 1993-1994 Nevşehir
Lise : Nevşehir Lisesi 1994-1997 Nevşehir
Yüksek Öğrenim : İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü 1999-2004
Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı 2004-2008
Yüksek Lisans Tezi Konusu: Fındıktan (*Corylus maxima* Miller) Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenazın Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi
Bildiği Yabancı Dil : İngilizce
Medeni Hali : Bekar