

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KURU FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDEN
PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Tuba Nur KÖKTEPE

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice TOHMA

**KİMYA
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2018**

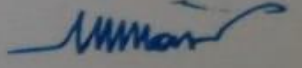
Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Dr. Öğretim Üyesi Hatice Tohma danışmanlığında, Tuba Nur Köktepe tarafından hazırlanan bu çalışma 06/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul oybirliği/oy çokluğu (3./3.) ile kabul edilmiştir.

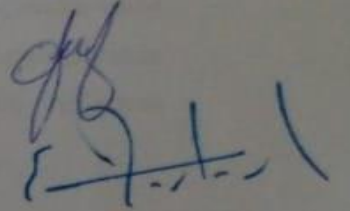
Başkan : Prof. Dr. İlhami Gülçin

İmza:



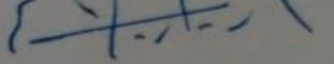
Danışman : Dr. Öğretim Üyesi Hatice Tohma

İmza:

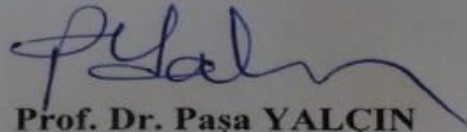


Üye : Prof. Dr. Ekrem Köksal

İmza:



Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 12. / 07. / 2018 tarih ve 2574..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 06/07/2018


Tuba Nur KÖKTEPE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KURU FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Tuba Nur KÖKTEPE

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice TOHMA

Peroksidazların çeşitli endüstriyel ve biyokimyasal alanlarda etkileri olduğundan saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları önem arz etmektedir. Bu çalışmada peroksidaz enzimi (POD) farklı tekniklerle kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinden saflaştırıldı, karakterize edildi, kinetik özellikleri belirlendi ve inhibisyon çalışması yapıldı. Fasulyedeki POD, (NH₄)₂SO₄ çöktürme, diyaliz, CM-Sephadex ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan POD enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütleini belirlemek için SDS-PAGE yapıldı ve molekül kütleisi 45 kDa bulundu. Ham ekstredeki POD enzimi üzerine yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH sırasıyla 5,0, 0,3 M, 30 °C, 5,0 olarak tespit edildi. K_m ve V_{max} değerleri Linewear-Burk grafiği çizilerek hesaplandı. Guaiakol ve H₂O₂ substratları için enzimin K_m değerleri sırasıyla 0,0154 ve 0,065 olarak belirlendi. POD enzimi üzerinde CTAB (setil trimetilamonyum bromür), EDTA(etilendiamintetra asetik asit), sitrik asit ve sodyum azidin inhibisyon etkisi incelendi ve en yüksek inhibisyon etkisi sodyum azidde (%99 inhibisyon) gözlemlendi.

2018, 56 sayfa

Anahtar kelimeler: Enzim kinetiği, inhibisyon, karakterizasyon, peroksidaz, saflaştırma

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND INHIBITION PROPERTIES OF PEROXIDASE FROM HARICOT BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS L.*)

Tuba Nur KÖKTEPE

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Dr. Faculty Member Hatice TOHMA

Since peroxidases have effects on various industrial and biochemical fields, purification and characterization studies are continuing. In this study, peroxidase enzyme (POD) was purified from bean (*Phaseolus vulgaris L.*) using different techniques, Kinetic characteristics were determined and inhibition study was performed. POD from haricot bean was purified using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, dialysis, CM-Sephadex and anion exchange chromatography. SDS-PAGE was performed to check the purity of the purified POD enzyme and to determine the molecular mass. The molecular mass was found to be 45 kDa. The optimum pH, optimum ionic strength, optimum temperature and stabil pH for POD were determined as 5.0, 0.3 M, 30 °C, 5.0 in crude extract, respectively. K_m and V_{max} values were calculated by plotting Lineweaver-Burk graph. The K_m values of the enzyme for the guaiacol and H_2O_2 substrates were determined as 0.0154 and 0.065, respectively. The inhibitory effects of CTAB (cetyl trimethylammonium bromide), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), citric acid and sodium azide on POD enzyme were examined and the highest inhibitory effect was observed for sodium azide (99% inhibition).

2018, 56 pages

Keywords: Characterization, enzyme kinetic, inhibition, peroxidase, purification.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Erzincan Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarların' da gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyelerinden çok değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hatice TOHMA'ya ve Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans öğrenimini tamamlayan çalışmalarında her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen arkadaşım Sevgi ALTIN' a şükranlarımı sunarım.

Erzincan Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında ailemden görmüş olduğum destekten dolayı kendilerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuba Nur KÖKTEPE
Mayıs, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Enzimler	2
2.1.1. Enzimlerin adlandırılması.....	4
2.1.2. Enzim kinetiği.....	5
2.1.3. Enzimlerin inhibisyonu.....	7
2.2. Peroksidaz Enzimi (POD)	10
2.2.1. Enzim kökeni	11
2.2.2. POD' un fizyolojik rolü	12
2.2.3. POD' un substrat spesifikliğı	13
2.3. Kuru Fasulye (Phaseolus vulgaris L.)	13
2.4. Tezin Amacı	14
3. MATERYAL ve METOT.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler	16
3.1.2. Yararlanılan cihaz ve aletler	16
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması	17
3.2. Metot	19
3.2.1. Fasulye bitkisinin elde edilmesi.....	19
3.2.2. Peroksidaz enziminin saflaştırılması çalışmaları	19
3.2.2.1. Enzim homojenatını hazırlanma	19
3.2.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	19
3.2.2.3. Enzimin iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması	20

3.2.2.4. Enzimin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması.....	21
3.2.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)	22
3.2.2.6. Kantitatif protein miktar tayini	22
3.2.3. POD'un karakterizasyon çalışmaları	24
3.2.3.1. Optimum pH belirlenmesi.....	24
3.2.3.2. Enzimin optimum sıcaklık değerinin araştırılması	24
3.2.3.3. Enzimin stabil olduğu pH'nın araştırılması	24
3.2.3.4. POD' un termal stabilizasyonunun belirlenmesi	25
3.2.3.5. POD' un optimum tuz konsantrasyonunun araştırılması	25
3.2.4. POD' un kinetik çalışması	25
3.2.4.1. POD' un K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	25
3.2.4.2. POD' un inhibisyon etkisinin belirlenmesi	26
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	27
4.1. POD' un Saflaştırılması Çalışmaları Sonuçları.....	27
4.1.1. Peroksidaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz saflaştırma sonuçları.....	27
4.1.2. POD'un iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları	28
4.1.3. Enzimin Sefadex jel filtrasyon kromatografisi ile ilgili çalışma sonuçları ..	28
4.1.4. Enzimin poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi ile ilgili çalışma sonuçları.....	29
4.1.5. Peroksidaz enzimi saflaştırma basamakları	30
4.2. POD'un karakterizasyonu çalışmaları sonuçları.....	31
4.2.1. POD'un optimum pH çalışması sonuçları	31
4.2.2. POD'un stabil pH çalışması sonuçları	31
4.2.3. POD'un optimum sıcaklık çalışma sonuçları	32
4.2.4. POD için termal stabilizasyon çalışma sonuçları	33
4.2.5. POD optimum tuz konsantrasyonu sonuçları	33
4.3. POD kinetik özelliklerinin sonuçları	34
4.3.1. POD K_m ve V_{max} değerlerinin sonuçları	34
4.3.2. Çeşitli kimyasalların POD aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
KAYNAKLAR	43

EKLER.....	55
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Michaelis–Menten denklemi ve grafiği	6
Şekil 2. Lineweaver-Burk grafiği.....	7
Şekil 3.Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şema halinde gösterimi	8
Şekil 4.Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şema halinde gösterimi	9
Şekil 5.Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şema halinde gösterimi	10
Şekil 6. POD' un guaiakol substratını kullanarak H ₂ O ₂ ' i giderme mekanizması	11
Şekil 7. Lowry metodu ile kantitatif protein tayininde kullanılan standart protein grafiği.....	23
Şekil 8.Artan tuz konsantrasyonunu ile süpernatant ve çökelekteki POD aktivitesinin değişimi	27
Şekil 9. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonucu her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbansları.....	28
Şekil10.Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun jel filtrasyon kolonu ile saflaştırılması sonucu her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbansları.....	29
Şekil 11. POD' un SDS-PAGE işlemi sonucu görüntüsü.....	30
Şekil 12. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun farklı pH'lardaki aktivitesi	31
Şekil 13. Fasulyeden (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) elde edilen POD'un farklı pH'lardaki zamanla stabilitesi.....	32
Şekil 14.Fasulyeden (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) elde edilen POD'un optimum çalışma sıcaklığı.....	32
Şekil 15.Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun farklı sıcaklıklarda zamanla stabilitesi	33
Şekil16. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun farklı tuz konsantrasyonlarındaki aktiviteleri.....	34
Şekil17.Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonunun sabit olup farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği	35
Şekil18.Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POD'unun guaiakol substratı konsantrasyonunun sabit olup farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği	35

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Lowry metoyla protein tayini	24
Tablo 2. Fasulyeden (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) peroksidaz enziminin saflaştırma.....	30
Tablo 3. İnhibitörlerin POD aktivitesine etkisi	36

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

<i>mL</i>	Mililitre
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

BSA	Sığır serum albümin
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
E.C.	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ES	Enzim substrat kompleksi
ESI	Enzim inhibitör substrat kompleksi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
HRP	Yaban turpu peroksidaz
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum per sülfat
pI	İzoelektrik nokta
POD	Peroksidaz
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil-etilendiamin
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Peroksidaz enzimi (POD), bitkide en fazla dayanıklılığa sahip ve yaygın olarak bulunan enzimlerden biridir (Svensson ve diğerleri, 1977). Bu enzim fenollerin ve aromatik halkaların oksidasyonu ve polimerizasyonu üzerinde rol oynar (Manu ve Rao, 2009). Bitkilerin yapraklarında, yaralanan gövdelerde, çiçeğinde ve saplarında, hücre duvarında, ribozomunda, nükleus ve hücre membranlarında bulunan POD bitkisel kaynaklıdır (Hamed ve ark., 1997).

POD, bitkide her yerde bulunsa da, piyasada bulunan POD, yaban turpu köklerinden üretilmektedir (Hiner ve ark., 1996). Bununla birlikte, benzer substrat spesifitesi ve enzimatik aktivite sağlayan farklı türlerden elde edilen POD' lar alternatif bir POD kaynağı olabilirler. Bitki POD' ların, termal kararlılık, optimum pH, substrat spesifitesi bakımından farklı olabilecek geniş bir izoenzim yelpazesine sahip olduğu bilinmektedir (Maciel ve ark., 2007). Düşük pH veya yüksek sıcaklık gibi ekstrem koşullarda kararlı olabilecek farklı türlerden POD' un saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Avokado (Rojas-Reyes ve ark., 2014), kırmızı lahana (Somturk ve ark., 2014) veya pirinç kepeği (Gautério ve ark., 2015) gibi farklı türlerden POD saflaştırılması literatürde yer almaktadır.

POD, biyosensörler, ELISA kitleri ve düşük konsantrasyonlarda kromojenik ürünler üretme kabiliyeti dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasından ötürü dikkat çekmektedir (Regalado ve ark., 2004).

Bu çalışmada, maliyeti düşük, verimi yüksek, biyokimyasal özelliklerini kaybetmeden kolaylıkla ürünlerin elde edildiği (Singh ve Singh, 2003) saflaştırma teknikleri kullanılarak fasulyeden peroksidaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Bunun yanında fasulye POD' u kinetik ve inhibisyon özellikleri de belirlendi.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Enzimler

Protein yapısında olup biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyokatalizörlere enzim denir. Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısındaki biyokatalizörlerdir (Lehninger et al., 2005; Altıkatoğlu vd, 2009; Voet ve Voet, 2010). Enzimler canlılığın oluşumu ve bu canlılığın devam etmesi için gereklidirler. Ayrıca in vivo olmayan aktivitelerinin kaybolmaması enzimlere olan ilgiyi artırmaktadır. (Karlson and Telefoncu 1998). Yalnızca canlı hücreler ile enzimler sentezlenebilmektedir. Sentezlenen enzimlerin bir kısmı hücre içerisinde kalarak işlev görürler. Bu tip enzimlere ‘intraselüler’ (hücre içi) enzimler denilir. Bazı enzimler ise hücre dışına çıkarılarak işlev görür. Bu enzimlere de ‘ekstraselüler’ (hücre dışı) enzimler denilir (Lehninger, 2005; Voet ve Voet, 2010). Enzimler solunum, büyüme, sinir iletimi, kas kasılması, fotosentez, azot bağlanması ve sindirim gibi birçok sistemin en önemli ögesidir.

Enzimler basit enzimler ve bileşik enzimler olarak ikiye ayrılır. Sadece proteinden meydana gelen enzimlere basit enzimler denilir. Basit enzimlere sindirim enzimleri (pepsin, tripsin, kimotripsin, elastaz gibi enzimler) ve üreyi parçalayan üreaz enzimi en iyi örneklerdir.

Bileşik enzimler ise iki kısımdan oluşur. İlk kısmını protein oluştururken ikinci kısmını vitaminler, mineraller veya metal iyonları oluşturabilir. Protein kısmına apoenzim, vitamin kısmına koenzim veya prostetik grup, metal iyonları ve mineral kısmına ise enzim kofaktörleri denir. Bileşik enzimlerde enzimin etki ettiği maddeyi protein kısmı belirlediği için ayrı olarak görev yapamazlar. Reaksiyonu gerçekleştiren koenzimdir. Katalitik olarak aktif enzim-kofaktör kompleksine haloenzim denilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2014).

Aktif merkeze bağlanan ve enzimin dönüşüme uğrattığı moleküle substrat molekülü denir. Aktif merkez yüzeyinin yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asitlerden oluşmuştur. Enzimler spesifiktir. Her

substrat ya da substrat grubunun spesifik enzimi mevcuttur. Substrat, enzime göre genellikle küçüktür. Reaksiyon ise aktif merkez denilen enzimin küçük bölgesinde gerçekleşir (Tüzün, 2005). Yapısı belirlenmiş bütün enzimlerin aktif merkezinin küçük bir oyuk, cep veya girinti şeklinde olduğu görülmüştür.

Enzimli reaksiyon hızlarını etkileyen etmenler vardır. Bunlar; substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, pH, zaman, sıcaklık, iyonik şiddet, varsa kofaktör konsantrasyonu, inhibitör ve aktivatör konsantrasyonlarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2014). Enzimatik reaksiyonları etkileyen faktörlerden biri sıcaklıktır. Normal şartlarda 50-60 °C de enzimlerin çoğu denatüre olur. Sıcaklık artması ile aktivite belirli yere kadar artar ve daha sonra düşer. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denilir (Daniel ve ark., 2010).

Her enzim için aktivitelerinin en yüksek olduğu pH değerleri vardır. Bu maksimum değerlerinin üzerinde ve altında aktivite düşer. Ayrıca bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri farklıdır. Enzimin pH-aktivite ilişkisine etki eden faktörler vardır. Bu faktörler şunlardır: (1) Enzimin aktif bölgesinde olan ve substratı bağlamada görevli iyonlaşabilir grupların pK'sı, (2) Enzime bağlanma olayında görevli olan substrat gruplarının pK'sı, (3) Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı (Keha ve Küfrevioğlu, 2014).

Substratın enzime bağlanmasını açıklayan 2 model vardır. Bunlar;

1-Anahtar kilit modeli

Enzim üzerinde özel bölge olan aktif bölgeye substrat bağlanır ve enzim-substrat kompleksi oluşur.

2-İndüklenmiş uyum modeli

Enzim üzerindeki aktif bölge substrat için uygun olsa bile, bağlanma esnasında, hem enzim konformasyonu hem de substratın şekli biraz değişikliğe uğraması sonucu aktif kompleks oluşur (Bakan, 2007-2008).

Enzimlerin spesifik olmaları kimyasal katalizörlerden ayrılan en önemli özelliğidir. Bu özelliği ile enzimler belirli reaksiyonları katalizlerler. Enzimlerin bu katalizleme güçleri “Turnover Sayısı” ile ifade edilmektedir. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin, ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

İn vivo ortamdaki kimyasal reaksiyonları gerçekleştiren enzimlerin aktivitelerini arttırıcı şekilde etkileyen bileşiklere aktivatör denilir. Genel olarak fazla büyük olmayan bileşikler veya küçük iyonlar aktivatör görevi görürler (Gözükara 1989).

2.1.1. Enzimlerin adlandırılması

Birçok enzim, aktivitelerini tanımlayan kelime ya da sözcük grubuna veya substratların adlarının sonuna “az” eki getirilerek adlandırılır. Enzimlere yeni sınıflandırma sistemine göre 4 haneli enzim kod (E.C.) numarası verilerek adlandırma işlemi yapılmaktadır. 4 haneli numaranın ilki enzimin hangi alt sınıfta olduğunu, ikincisi etki ettiği kimyasal yapıyı, üçüncüsü alıcıyı, dördüncüsü enzimin aldığı sıra numarası olarak belirtilmiştir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve özümşenen sistematik adlandırmada enzimler altı sınıfa ayrılır. Bu altı büyük sınıfta katalizlenen reaksiyon tipine göre sınıfları vardır. Bunlar (Turgut 2009);

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme (elektron transferi) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: C-C, C-O ve belli C-N bağlarının yıkımını katalizleyen enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri (izomerik şekil oluşumu reaksiyonları) katalizleyen enzimlerdir.

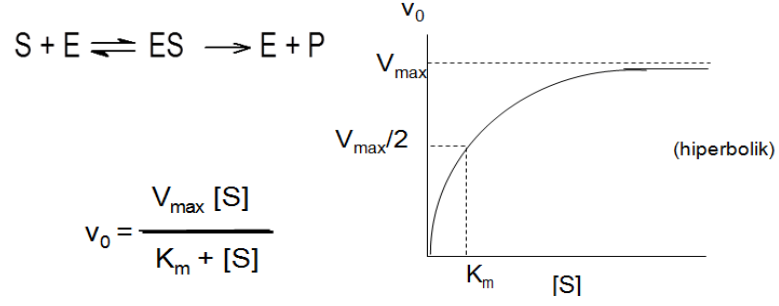
6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların hidrolizi ile birlikte yürüyen C ve O, S, N arası bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.

Enzimler kullanım alanları endüstriyel, analitik ve klinik şeklinde sınıflandırılabilir (Walsh ve Headon, 1994; İspirli, 2008; Körlü ve Altay, 2009). Saflık derecesi düşük olan kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyokatalizörler endüstriyel enzimlerdir. Genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Çevreye dost bir üretim gerçekleştirme gayesiyle, başta tekstil sektöründe, her geçen gün sayıları artmaktadır. Proteazlar, amilazlar, glukoz izomerazlar, sükröz, pektinazlar, selülaz, katalaz vb. enzimler endüstriyel enzimlere örnektir (Coşkun, 2013). Analitik enzimlerin, endüstriyel enzimlere göre saflık dereceleri yüksektir. Tanı kitlerinde ve bilimsel araştırmalarda kullanılır. Bu grupta yer alan enzimler ise hekzokinaz, alkoldehidrogenaz, glukozoksidaz vb. dir. Klinik enzimlerin de saflık dereceleri yüksektir. Farklı fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılır. Proteazlar, lipazlar, asparaginaz vb. klinik enzimlere örnektir (Coşkun, 2013).

2.1.2. Enzim kinetiği

Enzim kinetiğinde reaksiyon hızı ölçülmektedir ve farklı reaksiyon şartlarındaki tepkimelerin hızına bakılmaktadır. Bu şekilde çalışılan enzim kinetiği ile enzimin metabolizmadaki rolü, enzimin katalitik mekanizması ve enzim aktivitesinin inhibitör veya aktivatör tarafından nasıl kontrol edebileceğini gösterebilir (Lehninger 2005; Voet ve Voet 2010).

Enzim reaksiyonlarının kapsamlı kinetik çalışmalarını ilk kez 1913 senesinde Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre enzimin derişimi sabit tutulup substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi belirlenir. Michaelis-Menten bağıntısında yer alan V_{max} maksimum hızı ifade eder. K_m ise maksimum hızın yarısına (V_{max}) karşılık gelen substrat derişimidir. K_m , Michaelis-Menten sabitidir. V_{max} ve K_m enzimin aktivitesini belirleyen enzim sabitleridir (Menten ve Michaelis 1913).



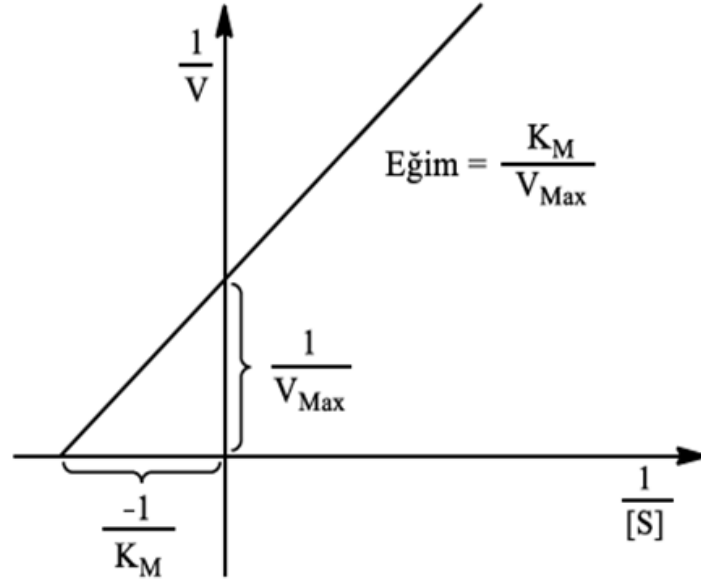
Şekil 1. Michaelis–Menten denklemi ve grafiği

Grafiğin kinetik özelliklerini ifade eden Michaelis–Menten denklemi şekil 1’ de verilmiştir. Substrat konsantrasyonu düşük olduğunda $[S] \ll K_m$ olacağından $[S]$ ihmal edilir. Bu ihmal durumunda şekil 1’ deki eğrinin başlangıç kısmı $v=[S]$ ilişkisini gösterir. $[S] \gg K_m$ olduğu yüksek substrat konsantrasyonunda Michaelis–Menten denklemindeki K_m ihmal edilir ve $v = V_{\max}$ olur. Burada bütün enzim substrat ile doymuş ve artan $[S]$ ile hız değişmeyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır. Hızın $V_{\max}/2$ olduğu durumda da değerleri Michaelis–Menten denkleminde yerleştirirsek,

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$[S] = K_m$ sonucunu elde ederiz (Kecha ve Küfrevioğlu, 2014).

Michaelis-Menten denklemi; hiperbolik eğrinin denklemi olduğundan, bu grafikten yararlanarak bir enzime ait V_{\max} ve K_m ’nin deneysel olarak incelenmesi zordur. Zorluğu ortadan kaldırmak amacıyla doğrusal olan denklemler kullanılmıştır. Bu denklemlerden Lineweaver-Burk denklemi en çok kullanılanıdır. Michaelis-Menten denkleminin tersine çevrilip çarpanlarına ayrılması ile elde edilir (Lineweaver ve Burk 1934).



Şekil 2. Lineweaver-Burk grafiği

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

2.1.3. Enzimlerin inhibisyonu

Enzimlerin in vivo ve in vitro olarak aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılmasına ya da tamamen yok edilmesine inhibisyon denilir. İnhibisyonu gerçekleştiren bileşiklere inhibitör denir. İnhibitörler çoğunlukla düşük molekül ağırlığı olan iyon ya da bileşiklerdir. Enzimatik aktivitenin inhibisyonla azalması hatta tamamen yok olması biyolojik sistemler için oldukça önemlidir ve kontrol mekanizmasını oluşturur. İnhibisyon çalışmalarıyla enzim ile gerçekleşen reaksiyonların mekanizmaları, aktif merkezde görevli fonksiyonel gruplar, aktif merkezin yapısı ve enzimin substrata özgüllüğü açıklanabilir. İlaçların ve toksik maddelerin etkisi de bu yöntemle incelenebilir (Düzcan, 2010).

Enzimatik inhibisyon iki ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

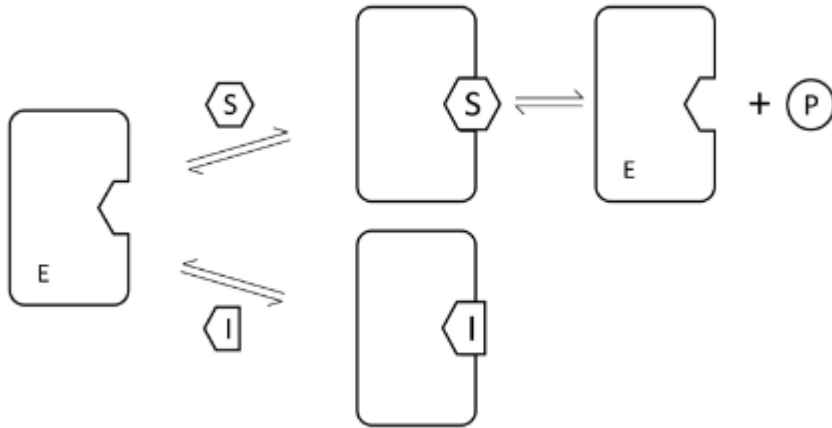
1. Dönüşümsüz inhibisyon: Bu inhibisyon türü inhibitörün enzime kovalent bağlanması sonucu meydana gelmektedir. Enzimlerin bir ya da daha fazla fonksiyonel grubunun etkilendiği inhibisyon türüdür. Dönüşümsüz inhibisyonda K_m (enzimin substrata ilgisini

belirten sabit) değişime uğramazken V_{max} azalır (Keha ve Küfrevioğlu, 2009; Segel, 1975).

2. Dönüşümlü inhibisyon: Dönüşümsüz inhibisyonun tersidir. Dönüşümlü inhibisyon enzim ile inhibitörün etkileştiği denge reaksiyonu olarak tanımlanır. Bu inhibisyon türü 3 gruba ayrılır. Bunlar;

- Yarışmalı inhibisyon
- Yarışmasız inhibisyon
- Yarı yarışmalı inhibisyon

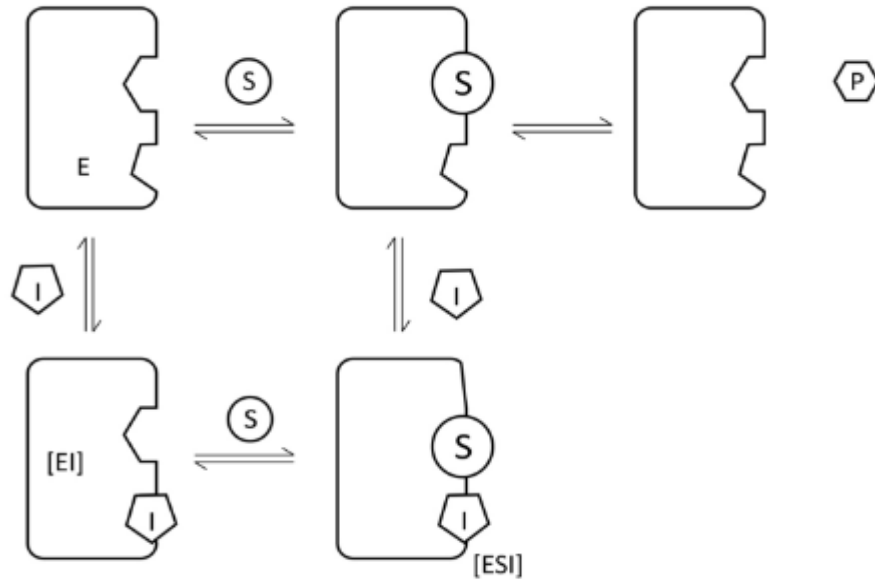
i. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon: Dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasında en basit olanıdır (Kalın, 2012). Kompetitif inhibisyonda enzimin aktif bölgesi için inhibitör ile substrat yarış halindedir. İnhibitör ile substrat yapısal olarak birbirine çok benzemektedir. Bu nedenle aktif bölgeye bağlanan inhibitör, enzim-substrat kompleksinin oluşumuna izin vermez. İnhibitör enzimin substratına olan ilgisini azalttığı için K_m değeri büyür (Segel, 1975; Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Yarışmalı inhibisyon şekil 3' de verilmiştir.



Şekil 3. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şema halinde gösterimi

(<http://publication.letstalkacademy.com/kinetic-analysis>) (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim) (17 Mayıs 2018)

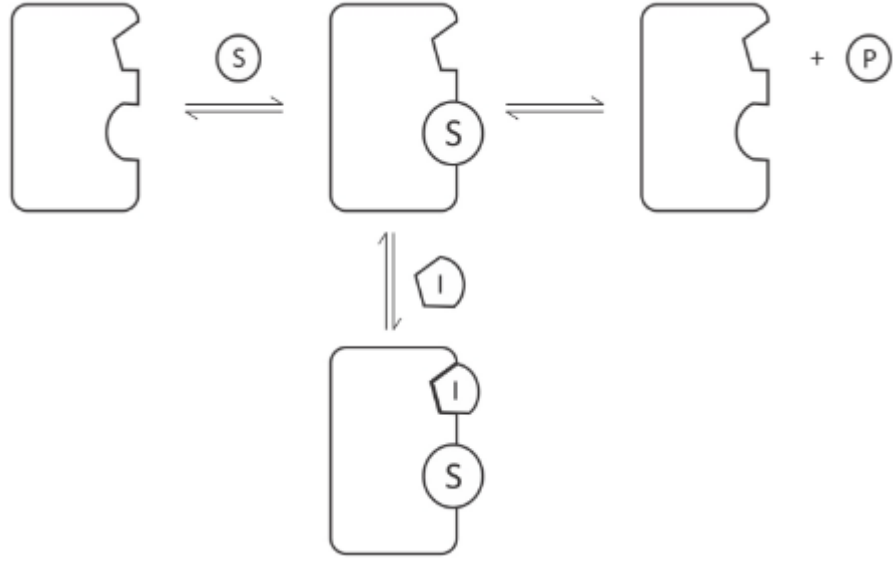
ii. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: Yarışmasız inhibisyonda inhibitör ve substrat aynı anda enzimin farklı bölgelerine bağlandığı için inhibitör ve substrat arasında yarışma gerçekleşmez. Enzim üzerinde farklı bölgelere bağlanan inhibitör ve substrattan dolayı iki tür inaktif kompleks oluşur. Bu durumda substratın konsantrasyonu arttırılarak inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalır, K_m ise sabit kalır (Somtürk, 2013). Nonkompetitif inhibisyon şekil 4’ de verilmiştir.



Şekil 4. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şema halinde gösterimi

(<http://publication.letstalkacademy.com/kinetic-analysis>) (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim) (17 Mayıs 2018)

iii. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Yarı yarışmalı inhibisyonda ise inhibitör, enzime değil, enzim-substrat kompleksine (ES) bağlanır. Bu bilgilere bakıldığında ortamda inhibitör olduğu sürece ES kompleksi uzaklaşır ve K_m ’de azalma görülür. Bu ortamda ESI kompleksi de devamlı olacağından V_{max} azalır (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Unkompetitif inhibisyon şekil 5’de verilmiştir.



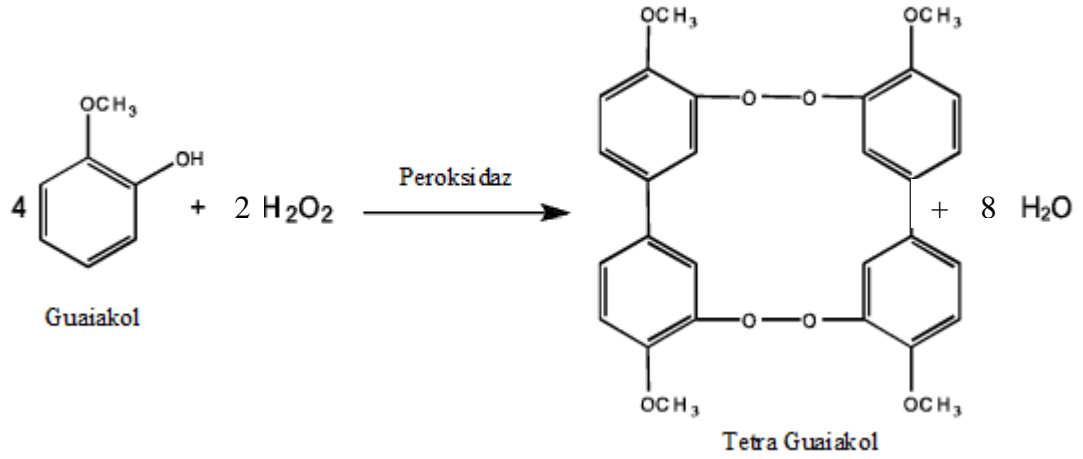
Şekil 5.Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şema halinde gösterimi

(<http://publication.letstalkacademy.com/kinetic-analysis>) (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün) (17 Mayıs 2018)

2.2. Peroksidaz Enzimi (POD)

POD (POD; EC 1.11.1.7), hidrojen atomlarını verebilen bileşikler ile bu atomları alıcı konumunda bulunan H_2O_2 bileşiği arasında gerçekleşen reaksiyonu katalizler. Oksidoredüktaz grubundadır (Fodil ve ark. 2012).

Oksitleyici özelliğe sahip olan ve bu nedenle de canlı organizmada istenmeyen H_2O_2 'in hemen etkisiz hale getirilmesi gerekir. Hücre içerisinde bu görev POD ve katalaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984). Peroksizomlarda, katalaz enzimi hücrenin diğer kısımlarında ise POD enzimi H_2O_2 'in miktarını düzenlemektedir (Scandalios ve ark. 1994). H_2O_2 'i suya indirgeyen POD enzimi substrat olarak guaiakol, katekol, kateşin ve klorogenik asit gibi fenolik bileşikleri yükseltger (Şekil 6) (Kampis ve ark. 1984; Robinson ve ark. 1987; Onsa ve ark. 2004).



Şekil 6. POD' un guaiakol substratını kullanarak H₂O₂' i giderme mekanizması

POD' lar her biri farklı biyokimyasal özelliklere sahip olan izoenzimlere sahiptirler. Bu biyokimyasal özellikler spesifik aktivite, kofaktör, substrat ilgisi, inhibitörlere hassasiyet, optimum sıcaklık, optimum pH' dır (Fric 1976). Yüksek bitkilerin çoğu POD izoenzimlerinin birkaçını içerirler. POD' un en başta protein kısmı sentezlenir. POD, apoprotein ve hem grubu ile birleşene kadar fonksiyonel olarak aktif değildir (Fric 1976; Van Huystee 1987).

2.2.1. Enzim kökeni

Amino asit sıralamasına bakılarak POD' lar üç gruba ayrılır. I. Grup askorbat POD (APX), sitokrom c POD (CcP) ve bakteriyel katalaz POD' ları ihtiva eden hücre içi POD' lardır. II. Grup mangan POD, lignin POD (LiP) gibi salgılanan “fungal enzimleri” içermektedir. Bitki POD' ları da III. grubu oluşturmaktadır (Rodriguez-Lopez ve ark., 1996).

I. grup POD' lar intraselüler enzimleridir. Bu grup mitokondride bulunur. Çözünebilir protein olan sitokrom c POD' ını, sitozolde bulunan H₂O₂' in uzaklaştırılmasından sorumlu ana enzim askorbat POD' ını, bakteriyel POD' larını kapsamaktadır (Mittler ve Zilinskas 1994; Shigeoka ve ark. 2002; Shi ve ark 2008).

Lignin POD' lar ve mangan POD' lar gibi salınan fungal POD' ları II. grupta bulunurlar. Bu tip POD'lar ligninin yıkımında yer alan monomerik glikoproteinlerdir. (Heinfling, 1998; Fodil ve ark., 2012; Janusz ve ark., 2013).

III. Grup POD'lar, klasik bitkilerden salgılanan monomerik glikoprotein yapısında bulunan POD enzimlerini içerirler. Bu grupta yer alan "horseradish POD" izoenzim C (HRP), yabancı turp (horseradish) köklerinden kolayca izole edilmesi ve kararlı olması sebebi ile birçok uygulamada kullanılır. III. grup'un temsilcisi gibi alınan HRP, POD ailesinin yapı-fonksiyon arasındaki ilişkiyle alakalı çalışmaların çoğunda yer almaktadır (Rodriguez-Lopez ve ark., 1996). Grup III POD enzimleri yaklaşık 300 amino asitten oluşmaktadır (Clemente, 2002). Hurma yaprakları (Deepa ve Arumughan, 2002), lahanalar (McLellan ve Robinson, 1987), bezelye (Halpin ve ark., 1989; Lee ve Klein, 1990), çilek (Civello ve ark., 1995), arpa (Kristensen ve ark., 1999), brokoli (Thongsook ve Barrett, 2005), pamuk (Triplett ve Mellon, 1992) gibi birçok bitki, POD içermektedir.

2.2.2. POD' un fizyolojik rolü

POD enzimleri doğada yaygın halde bulunur ve çeşitli fizyolojik fonksiyonları vardır. Bunlar; hücre duvarlarının lignifikasyonu (Quiroga ve ark., 2000), oksin oksidasyonu (Gazaryan ve Lagrimini, 1996), organogenez (Lee ve ark., 2002), fenol oksidasyonu (Lagrimini, 1991), hücre duvarı proteinlerinin çapraz bağlanması (Schnabelrauch ve ark., 1996), tuz stres toleransı (Hiraga ve ark., 2001), doku hasarı ve patojenik mikroorganizmalardan gelen enfeksiyonlardan korunma (Sakharov ve ark., 2000; Sat, 2008), böceklerle karşı savunma (García-Laraa ve ark., 2007), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa ve ark., 1991), bitkilerde hormonal faaliyet (Wakamatsu ve Takahama 1993), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri boyunca indoleasetik asit miktarında ayarlama (Agostini ve ark., 1997) gibi önemli fonksiyonlardır.

Ticari olarak POD, oksidanların üretiminde, hava kirliliği kontrolünde (Lee, 2002), organik bileşiklerin biyodönüşümlerinde, organik bileşiklerin biyotransformasyonu, fenoller ve aromatik aminler içeren endüstriyel atık sularının arıtılmasında (Rudrappa ve ark., 2007), biyo-bozulma işleminde, araştırma ve tıbbi teşhis için ikincil antikokların

üretiminde, dimerik alkaloidlerin üretiminde, birçok dondurulmuş meyve kalitesinin bozulmasının önlenmesinde (Dicko ve ark., 2006) kullanılır.

2.2.3. POD' un substrat spesifikliği

Oksitleyici enzim olan POD enzimi birçok maddenin oksidasyonunu katalize eder (Sariri ve diğerleri, 2006). POD substratları şöyle sıralanabilir: (hidrojen vericiler) o-dianisidin, vanilin, kateşin, (Lee ve ark., 2001; Leon ve ark., 2002; Clemente, 2002; Soysal ve Söylemez, 2005; Doğan ve ark., 2007), katekol (Sakharov ve Ardila, 1999; Troianı ve ark., 2003), pirogallol (Soysal ve Söylemez, 2005), guaiakol (Thongsook ve Barrett, 2005a; Ghamsari ve ark., 2007; Jouili ve ark., 2008; Rudra ve ark., 2008), 2,2-azino-bis-3 etilbenzotiazol-6-sülfonik asit (ABTS) (Rodrigo ve diğerleri, 1996; Rani ve Abraham, 2006), o-fenilendiamin (Lee ve ark., 2001; Sakharov ve ark., 2002; Leon ve ark., 2002; Doğan ve ark., 2007), tropolon ve diaminobenzidindir (Ratcliffe ve ark., 1994). Hidrokinonlar, hidrokinonid aminler, fenoller, 2-kresol, lökomalaşit yeşili, 2-toluidin, propiyonil promozin, o-tolidindir (Fortea ve ark. 2011; Fodil ve ark. 2012), askorbik asit (AA) ve NADH, indol-3-asetik asit (IAA) dir (Rogozhin ve Rogozhin, 2004).

İn vitro olarak yaygın kullanılan indirgeyici substrat guaiakolü (o-metoksifenol) oksitleyen POD' lara guaiakol POD' lar denilir. Bunlar hücre duvarı, vakuol, apoplast, sitozol ve hücre dışı ortamlarda bulunurlar, yalnız organellerde yoktur. Bitki büyümesi ve gelişimiyle de alakalı birçok yerde bulunduğu düşünölmektedir (Ghamsari ve diğerleri, 2007).

2.3. Kuru Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

Ölkemize 17. yüzyılda giren fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), ölkemizin büyük bir bölümüne iyi uyum sağlamış ve geniş bir çeşitlenme göstermiştir. Yetiştirilen taze ve kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) öлке mutfağında önemli yere sahip ve sevilerek tüketilen baklagildir. Yüksek protein (%18-31,6), B grubu vitaminleri, çinko, demir, potasyum, magnezyum ve lif kaynağının zengin olması beslenmedeki önemini arttırmaktadır (Şehirali, 1988; Pekşen ve Artık, 2005). Zengin diyet lifi içerdiğinden

dolayı son zamanlarda kalp-damar rahatsızlıkları, kolon kanseri, Tip-II diyabet, obezite ve diğer bazı hastalıkları önleyici etkisiyle beslenme uzmanları tarafından önerilmektedir (Saylam, 2017). Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) proteinlerin sindirim oranları % 71-94 arasındadır (Barampama ve Simard, 1994; Perez ve ark., 1997).

Dünyada kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ekim alanı yaklaşık 30 milyon ha' dır. Toplam üretim miktarı ise 26.833.394 milyon tondur (FAO, 2016). Ülkemizde 89.8197 hektar ekim alanı ve 235.000 ton üretimi ile nohut ve mercimekten sonra üçüncü sırada bulunmaktadır (TÜİK, 2016).

2.4. Tezin Amacı

POD enzimi, biyosensör ELISA kitleri ve pis kokularının giderilmesi gibi çeşitli uygulamalarda yaygın kullanımı nedeniyle dikkat çekmiştir (Regalado ve ark., 2004). İlgili enzimin ekstraksiyonu ve saflaştırılması, biyoişlemden biyokimyasal özelliklerini kaybetmeden ürünü elde etmek için önemli adımlardan biridir. Başarılı bir arıtma gereksinimi, minimum maliyetle maksimum verimi elde etmektir. Bu nedenle, maliyeti azaltmak ve günlük kullanım olasılığını arttırmak için hızlı ve etkili arıtma adımları ilgi çekicidir (Singh ve ark., 2003).

POD bitkide her yerde bulunsa da, ticari olarak bulunabilen POD, yaban turpu köklerinden elde edilir (Hiner ve ark., 1996). Bununla birlikte, farklı türlerden POD'lar alternatif bir POD kaynağı olarak benzer substrat spesifikliğini ve enzimatik aktiviteyi sağlayabilir. Ek olarak, bitki peroksidazlarının, termal stabilite, optimum pH, substrat spesifikliğı açısından farklılık gösterebilecek geniş bir aralıkta izoenzimlere sahip olduğu bilinmektedir (Maciel ve ark., 2007). Düşük pH veya yüksek sıcaklık gibi aşırı şartlarda kararlı olabilen yenilerini bulmak için farklı türlerden POD'un saflaştırılması ve karakterizasyonu ile önemli gelişmeler kaydedildi. POD'un buğday (Altın ve ark., 2016), avokado (Rojas-Reyes ve ark., 2014), kırmızı lahana (Somturk ve ark., 2014) veya pirinç kepeğı (Gautério ve ark., 2015) gibi farklı türlerden saflaştırılması rapor edilmiştir. Ancak, bu amaç için kuru fasulye POD araştırılmamıştır.

Mevcut alışma, ucuz bir ekstraksiyon prosedürüyle POD' un kolayca elde edilebilir kuru fasulye ile saflaştırılması ile ilgilidir. Bu çalışmada, gıda endüstrisinde ve biyokimyasal uygulamalarda yararlı olabilecek potansiyel yeni bir POD kaynağı bulmaya yönelik, kuru fasulye POD' un saflaştırılmasını, kinetik ve inhibisyon özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

Na ₂ HPO ₄	SDS	CuSO ₄ .5H ₂ O
CH ₃ COONa.3H ₂ O	CTAB	EDTA
TCA	Metanol	NaOH
Sodyum azid	Na ₂ CO ₃	Guaiakol
β-merkapt etanol	NH ₄ (SO ₄) ₂	TEMED
Tris-HCl	H ₂ O ₂	Asetik asit
Glisin	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Tris
PER	Sitrik asit	
İzopropil alkol	NaCl	
Etanol	Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi	
Akrilamid-bisakrilamid	Coommassie Brilliant Blue G250	

3.1.2. Yararlanılan cihaz ve aletler

Su banyosu	: Memmert WNE 22
UV-Spektrofotometre küveti	: 3 cm ³ ' lük kuartz küvet
pH-metre	: Hanna ph20
Isıticılı magnetik karıştırıcı	: Daihan MSH20A
Vorteks	: Daihan VM-10
Dikey elektroforez cihazı	: Bio-rad mini protean tetra cell
Peristaltik pompa	: Ismatec MCP
Hassas terazi	: Shimadzu ATX224
Kar-buz makinesi	: Mayo ZBS100
Soğutmalı santrifüj	: Selecta centrifriger
Çalkalayıcı	: WiseShake
UV-VIS Spektrofotometre	: Perkin elmer lambda 3

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması

Fosfat tamponu (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 7): 14,2 g Na₂HPO₄ tartıldı ve 80 mL saf suda çözülerek HCl ile pH 7'ye ayarlandı. Saf su ile toplam hacim 100 mL' ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

Elüsyon çözeltisi (10 mM Na₂HPO₄, pH: 6,5): 35,5 g Na₂HPO₄ tartıldı. 220 mL saf su içerisinde çözülerek pH 6' ya getirildi. Saf su son hacim 250 mL' ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

Gradient çözeltisi (1 M NaCl): 14,6 g NaCl alındı ve hacim 250 mL' ye yıkama tamponu ile tamamlanarak çözelti hazırlanmış oldu.

45 mM' lık Guaiakol çözeltisinin hazırlanması: 247 µL guaiakol alınarak saf su ile toplam hacim 50 mL' ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

22,5 mM' lık H₂O₂ çözeltisinin hazırlanması: 254 µL %30' luk H₂O₂ alındı. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanarak çözelti hazırlandı.

0,1 M' lık asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması: 100' er mL' lik üç adet beher alınarak her birine 1,36 g CH₃COONa.3H₂O konuldu ve 80 mL saf suda çözülmesi sağlandı. pH metre yardımıyla 0,1 M' lık HCl kullanılarak 3,0; 3,5 ve 4,0 olacak şekilde pH' lar ayarlanarak saf su ile toplam hacim 100 mL' e tamamlanarak çözelti hazırlandı.

0,2 M Tris-0,1 M HCl tampon çözeltilerinin hazırlanması: 100'er mL' lik üç tane behere 2,423 g Tris konularak ve 80 mL saf suda çözülmesi sağlandı. pH metre ile 0,1 M' lık HCl kullanılarak 8,0; 8,5 ve 9,0 pH' ya ayarlandı. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanarak çözelti hazırlandı.

A reaktifi; 0,5 gr CuSO₄.5H₂O 1 gr C₆H₅Na₃O₇ 100 mL destile su ile çözüldü.

B reaktifi; 20 gr Na₂CO₃ ve 4 gr NaOH 1 L destile su ile çözüldü.

C reaktifi; 50 mL B çözeltisine 1 mL A çözeltisi eklendi. A ve B reaktiflerinin hazırlanmasının ardından numune sayısı dikkate alınarak C reaktifi hazırlanarak hemen kullanıldı.

D reaktifi (Phenol –Folin –Ciocalteu reaktifi); Bu reaktif numune sayısına göre her numuneye 250 µl olacak şekilde hesaplanarak v/v oranında destile su ile hazırlandı.

Akrilamid-bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması; 100 mL su içerisinde 0,8 g bisakrilamid ve 30 g akrilamid karışımı çözülerek hazırlandı.

%10' luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS 90 mL saf suda çözüldü. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanarak çözelti hazırlandı.

1 M' lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 6,8): 12,14 g Tris 80 mL su içerisinde çözülerek hazırlandı. 1 M' lık HCl ile pH 6,8' e ayarlanarak toplam hacim 100 mL' ye tamamlandı.

1 M' lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 8,8): 12,14 g Tris 80 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı ve pH' sı 8,8 oluncaya dek 1 M HCl'den ilave edilerek hacim 100 mL' ye tamamlandı.

1,92 M'lık Glisin, 0,25 M' lık Tris, %1' lik SDS (pH 8,3) çözeltisinin hazırlanması: 14,4 g glisin, 3,03 g Tris ve 1 g SDS suda çözülüp toplam hacim 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

Ayrırma jelinin hazırlanması; 13,2 mL %30' luk akrilamid- %0,8' lik bisakrilamid, 0,4 mL %5' lik TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletilen diamin), 0,6 mL %1' lik SDS, 15 mL Tris-HCl (pH 8,8) ve 9,4 mL su ile karıştırılarak ve en son 0,8 mL %1,5' lik amonyum persülfat [(NH₄)₂S₂O₈] bu karışımın üzerine eklendi.

Yığılma jelinin hazırlanması; %5'lik TEMED'den 0,1 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 mL, 1 M' lık Tris-HCl (pH 6,8)' den 1,24 mL ve sudan 7,8 mL alınarak karıştırıldı. En son taze hazırlanmış, %1,5'lik amonyum persülfattan 0,2 mL eklendi.

Jeli sabitleme çözeltisinin hazırlanması: %10 TCA, %50 izopropil alkol ve %40 su karıştırılarak çözelti hazırlanmış oldu.

Jeli boyama çözeltisinin hazırlanması: %10 asetik asit, %50 metanol ve %40 sudan oluşan karışımda 0,1 g Coomassie Blue R250 çözüldü.

Jeli yıkama çözeltisinin hazırlanması: %10 asetik asit, %50 metanol ve %40 su karıştırılarak çözelti hazırlanmış oldu.

3.2. Metot

3.2.1. Fasulye bitkisinin elde edilmesi

Fasulye bitkisi, Erzincan' da hasat zamanının da toplandı. Kullanılmak üzere +4°C' de korundu.

3.2.2. Peroksidaz enziminin saflaştırılması çalışmaları

3.2.2.1. Enzim homojenatını hazırlanma

Sıvı azot içerisinde dondurulup öğütülen fasulyeden 10 g alındı. 50 mL 0,1 M pH'sı 7 olan Na₂HPO₄ tamponu içerisinde 15 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra süzgeç kağıdı ile süzüldü. Soğutmalı santrifüjde yarım saat 8.000 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kullanılmak üzere 4°C'de saklandı.

3.2.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Ekstraktı süzülüp 8.000 rpm'de yarım saat santrifüj yapılan homojenatın süpernatantına sırasıyla %0-10 %10-20 %20-30 %30-40 %40-50 %50-60 %60-70 %70-80 %80-90 aralıklarında amonyum sülfat eklenerek çöktürme işlemi yapıldı. Amonyum sülfat miktarını ise aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$g_{[(NH_4)_2SO_4]} = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3,54 - S_2$$

V = Süpernatant

S₁ = mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ = istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Çöktürme işlemi için ham homojenata $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ az miktarlarda eklendi. Her aralık için amonyum sülfat iyice çözdürüldü. Çözdürme işlemi yarım saat ile bir buçuk saat arasında yapıldı. Belirlenen doygunluğa getirilen süspansiyon 10.000 rpm' de 1 saat boyunca santrifüj edildi. Elde edilen çökelek tampon çözeltide çözüldü. Her santifirüj işleminin ardından çökelekte ve süpernatantta POD aktivitesine bakıldı. Tüm işlemler +4 °C' de yapıldı. En yüksek aktivite gösteren homojenat seçilip diyaliz yapıldı. Diyaliz torbası 0,1 M' lık fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde 12 saat boyunca bekletildi. Bekleme işlemi +4 °C' de magnetik karıştırıcı üzerinde yapıldı.

3.2.2.3. Enzimin iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması

Saflaştırma işlemi CM-Sefadex A50 iyon değişim kromatografisinde gerçekleştirildi. Bu yöntemde kation değiştirici olan CM-Sefadex A50 iyon değişim materyali ilk önce şişirilme işlemine tabi tutuldu. Bu gayeyle 100–120 mL yatak hacmi elde edebilmek için 4 g jel 100 mL destile suya aktararak termostatlı su banyosunda 90 °C'de 5 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 mL soğuk NaOH içinde 1 saat bekletildikten sonra 0,5 N HCl ile nötralize edildi. Jel materyalinin havası alınıp kolona pakatlendikten sonra 100 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengeleme işlemi yapıldı. Peristaltik pompa ile kolonun akış hızı 15 mL/saat olarak ayarlandı. Kolon içerisindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirildi. Enzim çözeltisi diyaliz işleminin ardından otomatik pipet ile kolona yüklendi. Yükleme işleminden sonra 100 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile yıkama yapıldı. Yıkama işleminde alttan alınan elüatlar ile üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH' ları aynı olana kadar yıkamaya devam edildi. Yıkama işleminin süresini 280 nm'deki absorbans değerleri belirledi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 mL 100 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 100 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanmış 250 mL 1 M NaCl dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyon işlemine başlandı. Enzimin sıcak nedeni ile aktivite kaybına uğramaması için hem alınan elüatlar ve hem de gradient mikserinde bulunan elüsyon tamponunun etrafı buz ile kapatılarak ortamın soğuk olması sağlandı. Kolon akış hızı 15 mL/saat'e ayarlanarak 3 mL' lik hacimler halinde tüplere alınan elüatların 280 nm' de absorbansına ve 470 nm' de guaiakol

substratı ile aktivitesine bakıldı. POD aktivitesi olan tüpler birleştirildi ve tüp numarasına karşılık-Aktivite/Absorbans grafiği çizildi. Lowry metoduna göre kantitatif protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.2.4. Enzimin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması

Kolonun Hazırlanması ve Dengelenmesi: Beherde tampon ve saf su içine alınarak, 90°C'de su banyosunda 4-5 saat veya oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek polimer materyal olan sephadex-G-25 şişirilmesi sağlandı. Şişirilme işleminin ardından su trompu kullanılarak vakumla materyal içerisindeki hava uzaklaştırıldı. Daha sonra dengeleme tamponuyla dolu kolona polimer materyali hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarıldı. Kolonun akış hızı yaklaşık 15- 20 mL/saat şeklinde ayarlanarak aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Alttan alınan tamponla üstten ilave edilen tamponun pH'sı ile 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçülerek kolon dengelendi. Ölçülen değerler aynı oluncaya kadar devam edildi.

Numune Uygulanması ve Elüsyon: Numune uygulamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel düzeyine indirildi. Numune tatbiki için %10' luk gliserinli enzim çözeltisinden 2 mL kolona tatbik edildi. Enzim çözeltisinin jel tarafından emdirildikten sonra üzerine birkaç mL elüsyon tamponu ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Üst kısmı elüsyon tamponuyla doldurulan kolondan 3' er mL' lik elüatlar tüplerde toplandı.

Değerlendirme: Toplanan elüatların tek tek veya 2-3 tüpte bir 280 nm' de köre karşı absorbansları okundu. Kör olarak elüsyon tamponu kullanıldı. Enzim saflaştırılması yapılacağı için 280 nm' de absorbans gösteren tüplerin her birinde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'deki absorbans değerleri sıfır oluna kadar elüsyon alma işlemine devam edildi. Alınan absorbans değerleri ve enzim aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiği çizildi. Kromatografi işleminin ardından enzim aktivitesi olan tüpler birleştirildi ve SDS-PAGE ile saflık kontrolü ve molekül tayini için +4 °C'de muhafaza edildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen enzim çözeltileri için Lowry metodu ile kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapıldıktan sonra spesifik aktiviteleri belirlenerek saflaştırma oranları saptandı.

3.2.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Jel filtrasyon kromatografi sonucu enzimin saflık kontrolü için SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bu işlem için elektroforez plakaları, alkol ve suyla yıkandı. Cam plakalar birbiri üzerine konularak ve kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Hazırlanan ayırma jeli enjektör ile plakalar arasına eklendi. Ayırma jelinin hava almadan plakalara eklenmesine özen gösterildi. Jel yüzeyinde pürüzsüzlüğü sağlamak için bir miktar etil alkol ilave edildi. Jelin üst yüzeyine jel katıldıktan sonra yağma jeli eklendi. Yağma jeline tarak yerleştirdikten sonra tarağın üzeri nemli süzgeç kağıdı ile kapatıldı. Bir gece bekledikten sonra taraklar çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Boşluklar işaretlenerek ve jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Yürütme tamponu elektroforez tankına konuldu. Numunelere 50 µl beta merkapt etanol bulunan karışımdan 50 µL enzim örneğinden alındı ve eppendorf tüp içerisinde karıştırıldı. Numuneler 100 °C' de 3 dk kaynatılıp soğutulduktan sonra elektroforeze enjektör yardımı ile yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı, (-) kablo (katot) ve (+) kablo (Anot) bağlandı. Sisteme 80 voltluk akım yarım saat boyunca verildi. Numunenin ayırma jeline geçmesi ile de akım 150 volta çıkarıldı. 4-5 saat oda koşullarında işleme devam edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice alındı. Sonra kullanılabilir amacıyla yürütme tamponu saklandı. Jel sabitleştirme çözeltisinde 30 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra özel kabına alınan jele üzeri örtülecek şekilde boyama çözeltisi eklendi ve 2 saat çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra 2 saat yıkama çözeltisinde bekletildi. Jeller çözeltiden protein bantları belirginleştikten sonra çıkarılarak %30' luk etil alkol içerisine konuldu. Fotoğrafları çekildi.

3.2.2.6. Kantitatif protein miktar tayini

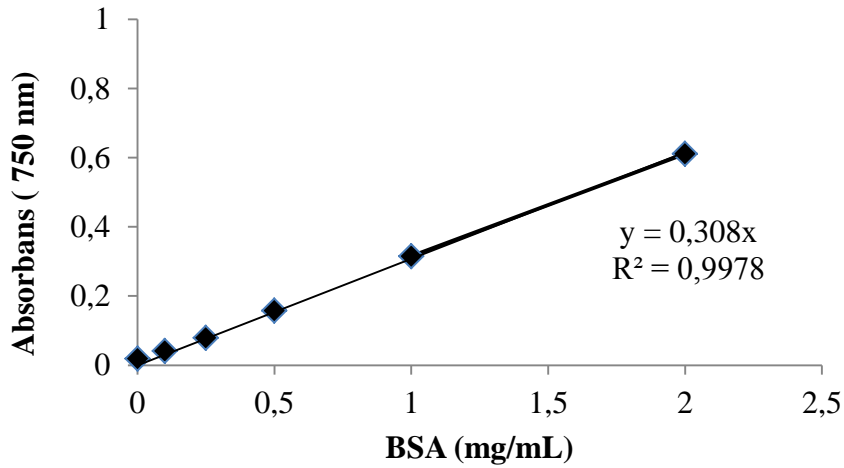
Lowry metodu kullanılarak saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim çözeltilerindeki protein miktarlarının kantitatif tayini yapıldı. Bu metotta bakır iyonu (Cu^{+2}) alkali ortamda proteinlerdeki peptit bağlarıyla birleşerek kompleks oluşturur ve Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır da proteinlerin yan zincirinde bulunan Cys, Trp ve Tyr aminoasitleriyle Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna sebep olur.

Rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Renk şiddeti 700 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (Lowry 1951).

Lowry (Folin Fenol Metodu) metodunun diğer protein tayin yöntemlerinden üstünlüğü kısa sürede uygulanabilir olması, çözelti ortamında protein-boya kompleksinin uzun süre dayanıklı olması, bozucu faktörlerin az olmasıdır. (Lowry 1951).

Protein miktarlarını belirlemek için BSA (Sığır serum albümin) ile standart grafik hazırlandı. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 7’de gösterilen standart grafikten elde edilen denklemde yerine konularak hesaplandı (r^2 : 0,9978).

$$\text{Absorbans}_{(700)} = 0,308 \times \text{Protein } (\mu\text{g})$$



Şekil 7. Lowry metodu ile kantitatif protein tayininde kullanılan standart protein grafiği

Lowry metodu ile protein miktarını tayin etmek için aşağıdaki tabloda yer alan oranlarda reaktifler ve numunenin saflaştırma basamaklarından elde edilen çözeltiler kullanılarak reaksiyon karışımı oluşturuldu. Karışımlar vorteksenerek 10 dakika inkübe edildi. Absorbanslar 700 nm’de kaydedildi. Standart protein olan BSA’dan 2 mg/mL kullanıldı.

Tablo 1. Lowry metoyla protein tayini

Lowry Metodu	Kör tüpü	Numune tüpü
Numune(μL)	-	10
Distile su(μL)	500	490
C reaktifi(μL)	2500	2500
D reaktifi (μL)	250	250

Tüpler vortekslenerek, oda ısısında 20-30 dakika inkübe edildi. 700 nm' de numune ve standartın absorbansı köre karşı okundu.

3.2.3. POD'un karakterizasyon çalışmaları

3.2.3.1. Optimum pH belirlenmesi

Optimum pH çalışması için pH 3.0' den 9.0' a kadar 1 M' lık fosfat ile yedi farklı pH ortamı hazırlanarak çalışıldı. Taze hazırlanan tamponlarla spektrofotometre ile aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite ölçümleri için numune küvetine 50 μL bitki numunesi, 950 μL tampon çözelti (farklı pH'larda), 1 mL H_2O_2 , 1 mL guaiakol konuldu. Diğer küvete ise 1 mL tampon çözelti (farklı pH'larda), 1 mL H_2O_2 , 1 mL guaiakol konuldu. Sonuçlar grafik ile verildi.

3.2.3.2. Enzimin optimum sıcaklık değerinin araştırılması

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 10–60 °C aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar su banyosunda hazırlandı. Küvete 1 mL H_2O_2 , 1 mL guaiacol ve 950 μL fosfat tamponu koyuldu. Ayarlanan sıcaklıkta 5 dk bekletildikten sonra 50 μL homojenat ilavesi ile 470 nm de tetraguaiakolün aktivitesi ölçüldü. Bu işlem her sıcaklık için tekrarlandı.

3.2.3.3. Enzimin stabil olduğu pH'nın araştırılması

Bu çalışmada iki farklı pH'da (8,0–9,0) Tris/HCl tamponu ile iki farklı pH'da (5,0–7,0) fosfat tamponu ile ve üç farklı pH'da (3,0–4,5) asetat tamponuyla çalışıldı. Belirtilen

pH'larda 500 µL tampon çözelti içerisine 250 µL enzim çözeltisi eklendi ve 4 °C'de bekletildi. Aktivite ölçümleri için numune küvetine 50 µL (250 µL enzim ve 500 µL tampon çözeltiden oluşan karışımdan alınacak) bitki numunesi, 950 µL tampon çözelti, 1 mL H₂O₂, 1 mL guaiakol konuldu. Diğer küvete ise 1 mL tampon çözelti, 1 mL H₂O₂, 1 mL guaiakol konuldu. İlk aktivite ölçümünden sonra her 48 saatte bir 240 saat boyunca aktivite ölçümü yapıldı ve enzim için stabil pH belirlendi.

3.2.3.4. POD' un termal stabilizasyonunun belirlenmesi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için 30-60 °C aralığında çalışıldı. Eppendorf tüpe 300 µl enzim konuldu ve 30 °C de olan su banyosunda 10 dk da bir eppendorf tüpte bulunan 50 µl enzimden alınıp 950 µL tampon çözelti, 1 mL H₂O₂, 1 mL guaiakol bulunan numune küvetine hızlıca ilave edildi ve aktivitesi ölçüldü.

3.2.3.5. POD' un optimum tuz konsantrasyonunun araştırılması

POD' un optimum tuz konsantrasyonu için optimum pH'da Na₂HPO₄ çözeltisi 0,025 M'den 0.5 M'e kadar yedi farklı konsantrasyonda hazırlandı. Kör küvet; 1 mL 45 mM' lık Guaiakol, 1 mL 22,5 mM' lık H₂O₂ ve 1 mL farklı konsantrasyonda hazırlanan Na₂HPO₄ çözeltisinden oluşurken numune küveti; 1mL 45 mM' lık Guaiakol, 950 µL farklı konsantrasyonda hazırlanmış Na₂HPO₄, 1 mL 22,5 mM' lık H₂O₂ ve 50 µL örnekten oluşmaktadır. Enzim aktivitesi üzerine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisi 470 nm'de ölçülerek bulundu.

3.2.4. POD' un kinetik çalışması

3.2.4.1. POD' un Km ve Vmax değerlerinin bulunması

45 mM' lık guaiakol ve 22,5 mM' lık H₂O₂ ile peroksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri için çalışmalar yapıldı. İlk önce POD ile H₂O₂ substratının konsantrasyonları sabit tutularak, guaiakol substratı 10-20-40-45-50-60 mM konsantrasyon aralığında iken aktivite ölçümleri yapıldı ve 1/V nin 1/S karşı grafikleri çizildi. Daha sonra peroksidaz enzimi ile guaiakol sabit tutularak H₂O₂ için 10-20-40-50-60 mM konsantrasyon

aralıklarında aktive ölçümleri yapıldı ve 1/Vnin 1/S grafikler çizildi. Grafiklerde ki denklemden yararlanılarak her bir substrat için Vmax ve Km değerleri belirlendi.

3.2.4.2. POD' un inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Bu çalışma için CTAB, sodyum azid, sitrik asit ve EDTA kimyasalları kullanıldı. İnhibitör eklenmeden ekstrenin aktivitesi ölçüldü. İnhibitörlerin 0-30 mM arasında çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyonlarda POD enziminin aktivitesine bakıldı. İnhibitör eklenmiş ekstrenin aktivitesi ham ekstrenin aktivitesine bölünüp yüz ile çarpıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{İnhibitör eklenmiş ekstrenin aktivitesi}}{\text{Ham ekstrenin aktivitesi}} * 100$$

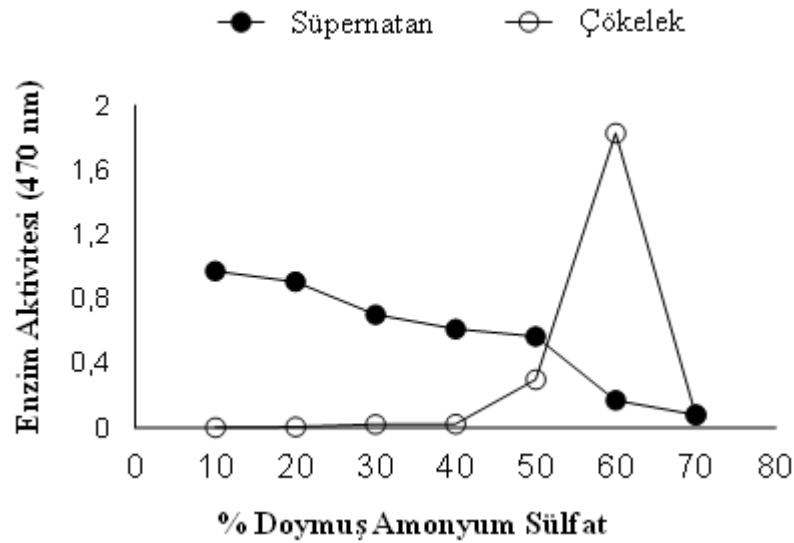
Çalışmanın sonunda maksimum inhibisyon değeri, inhibitörün en yüksek aktivite gösterdiği nokta olarak belirlendi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. POD' un Saflaştırılması Çalışmaları Sonuçları

4.1.1. Peroksidaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz saflaştırma sonuçları

Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) izole edilen POD'un sırayı takip ederek %0–10, %10–20, %20–30, %30–40, %40–50, %50–60, %60–70 aralıklarında amonyum sülfat doygunluğu belirlendi. Aralıklarda oluşan çökelek 2 mL 0,1 M'lık fosfat tamponu ile çözüldü. Çözülme işlemi enzimin homojenat tamponu olan 0,1 M'lık fosfat tamponunda gerçekleştirildi. Ayrı ayrı çökelek ve süpernatantlarda enzim aktivitesine bakılarak çökme aralığı belirlendi. POD'un büyük bir kısmının çöktüğü basamak %50–60 olarak belirlendi (şekil 8).

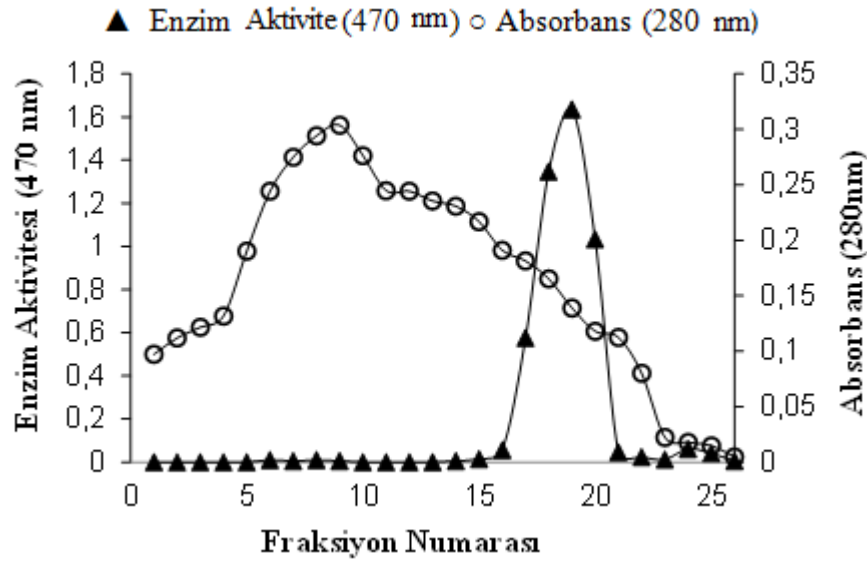


Şekil 8. Artan tuz konsantrasyonunu ile süpernatant ve çökelekteki POD aktivitesinin değişimi

Diyaliz işleminin ardından saflaştırma basamaklarının her birinde enzim çözeltisindeki protein miktarı (Lowry metoduna göre) ve enzimin aktivitesi belirlendi.

4.1.2. POD'un iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

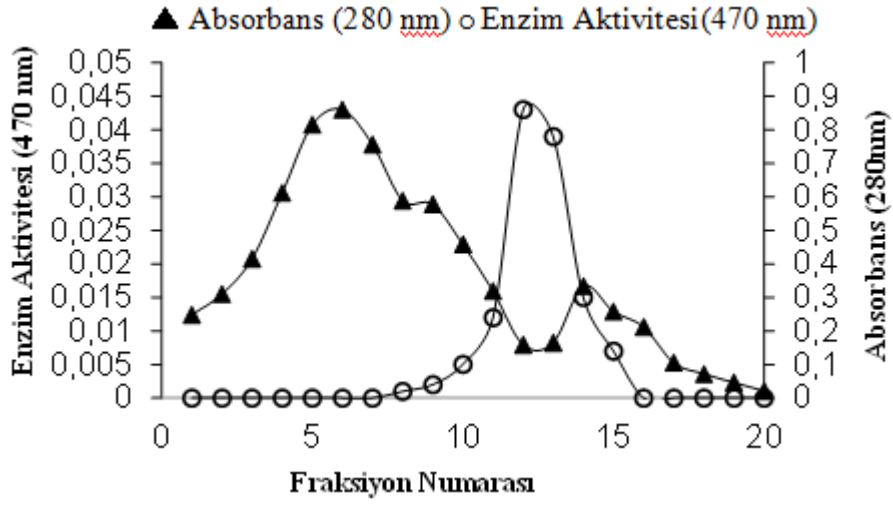
POD' un CM-Sefadeks ile saflaştırması sırasında elüatlardaki protein kontrolüne 280 nm'de bakıldı. 470 nm absorban ölçümü ile POD aktivitesine bakıldı. Elde edilen sonuçlar grafik haline getirildi (şekil 9). Aktivitenin en yüksek olduğu 18, 19 ve 20 fraksiyonlarını kapsayan tüpler birleştirildi. Birleştirilen tüplerden 1 mL protein tayini, 8 mL jel filtrasyon kromatografisi için ayrıldı.



Şekil 9. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonucu her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbanları

4.1.3. Enzimin Sefadeks jel filtrasyon kromatografisi ile ilgili çalışma sonuçları

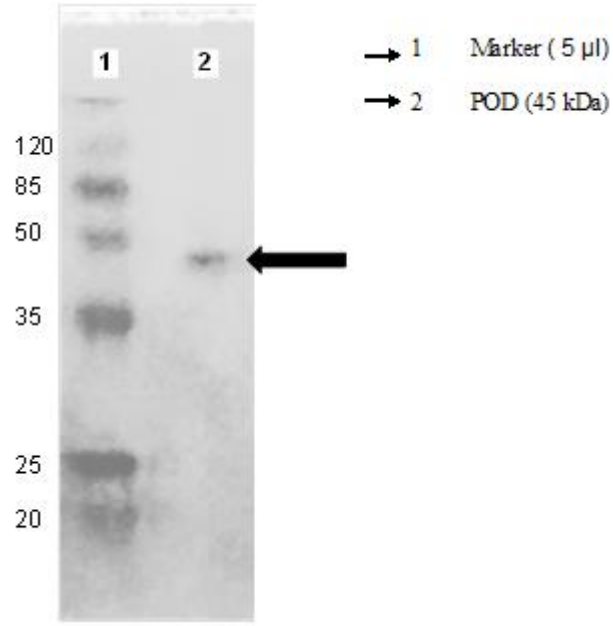
İyon değişim kromatografisinde birleştirilen eluatlar jel filtrasyon kolonuna yükleme yapıldı. Bu işlem sonucunda fraksiyonların 470 nm' de aktivite ve 280 nm' de absorban ölçümleri yapıldı (şekil 10). Ölçümlere 470 nm'de absorbanın olmadığı durumda son verildi. En yüksek aktivitenin olduğu tüp (12. tüp) SDS-PAGE işlemi için saklandı.



Şekil 10. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun jel filtrasyon kolonu ile saflaştırılması sonucu her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbanları

4.1.4. Enzimin poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi ile ilgili çalışma sonuçları

POD'un saf olup olmadığını kontrol etmek ve molekül ağırlık tespiti için yapılan SDS-PAGE çalışmasında jelde tek protein bandı gözlemlendi (şekil 11). Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) elde edilen POD'ın molkül ağırlığının yaklaşık 45 kDa olduğu bulundu.



Şekil 11. POD' un SDS-PAGE işlemi sonucu görüntüsü

4.1.5. Peroksidaz enzimi saflaştırma basamakları

Fasulyeden saflaştırılan POD'un saflaştırma katları tablo 2'de gösterilmiştir. Bu tabloya göre POD, dört tane safalaştırma basamağından sonra 0,86 kat saflaştırıldı. Bu değerin düşük olmasının sebebi; son basamağa kadar elde edilen protein miktarının çok düşük olmasıdır. Şekil 9'da görüldüğü gibi POD'un geldiği tüplerde protein miktarı çok düşüktür.

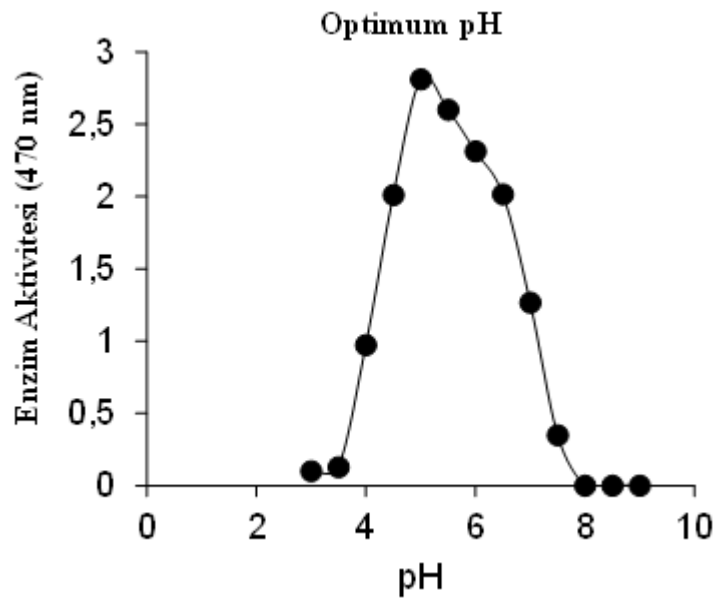
Tablo 2. Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları

Safalaştırma basamakları	Toplam enzim aktivitesi (EU/mL.min)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Safalaştırma (katları)
Homojenat	0.897	0.0305	2.64	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi ve diyaliz	0.715	0.0159	4.04	1.53
İyon değişim kromatografisi	0.318	0.0098	2.89	1.09
Sephadex-G-25	0.043	0.0017	2.26	0.86

4.2. POD'un karakterizasyonu çalışmaları sonuçları

4.2.1. POD'un optimum pH çalışması sonuçları

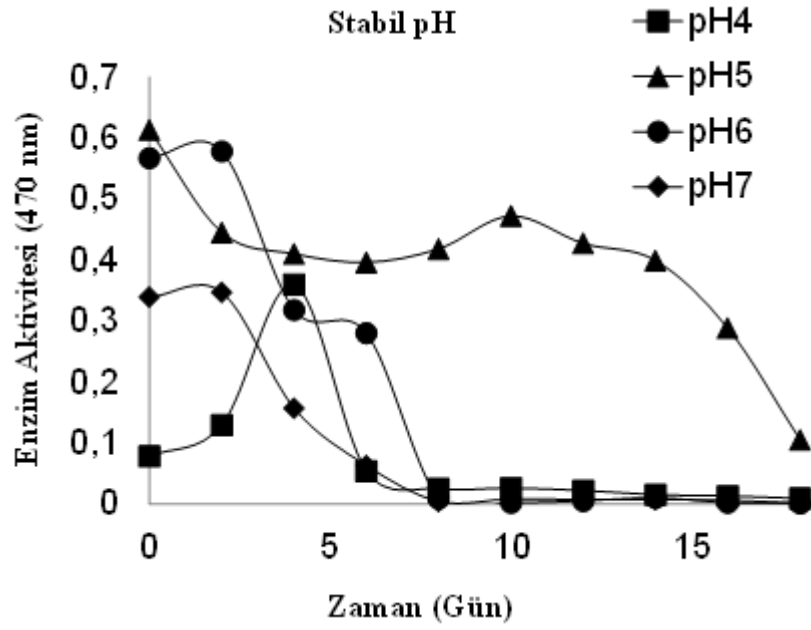
POD'un optimum pH' sını tespit etmek amacıyla on üç farklı pH da aktivite çalışıldı (şekil 12). POD'un aktivitesi pH 3,5'ta 0,127 iken pH 4'de 0,972 olarak belirlendi. Optimum pH değeri 2,809 aktivite ile 5.0 olduğu belirlendi. 8-9 pH'da aktivitenin olmadığı şekil 12'de de görülmektedir.



Şekil 12. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun farklı pH'lardaki aktivitesi

4.2.2. POD'un stabil pH çalışması sonuçları

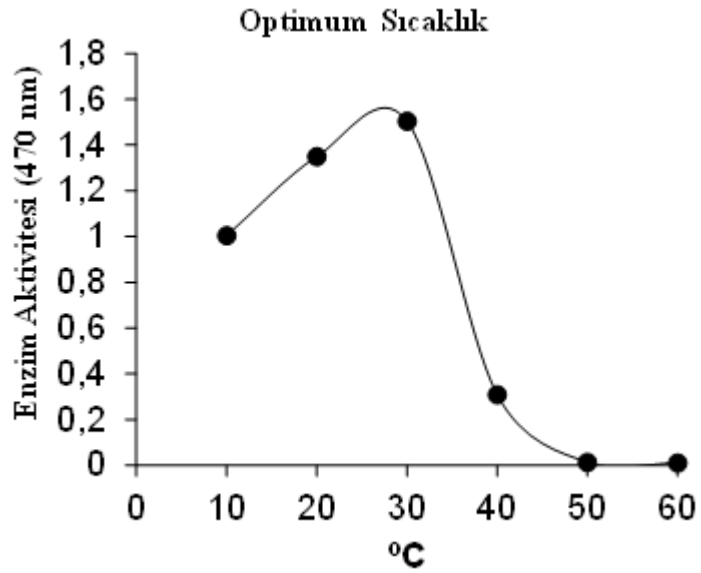
POD, pH 3'den 9'a kadar üç farklı tamponlarda on yedi gün süresince +4 °C'de bekletildi. Periyodik aralıklarla her gün aktivite ölçümleri yapıldı (şekil 13). 10. günden sonra pH 4'de aktivite yok denecek kadar az, pH 6-7'de ise aktivitenin olmadığı gözlemlendi. Grafikden de görülebileceği gibi POD aktivitesi, pH 5.0' de 10. güne kadar stabil olmakla beraber, daha sonraki günlerde kademeli olarak düştüğü gözlemlendi.



Şekil 13. Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) elde edilen POD'un farklı pH'lardaki zamanla stabilitesi

4.2.3. POD'un optimum sıcaklık çalışma sonuçları

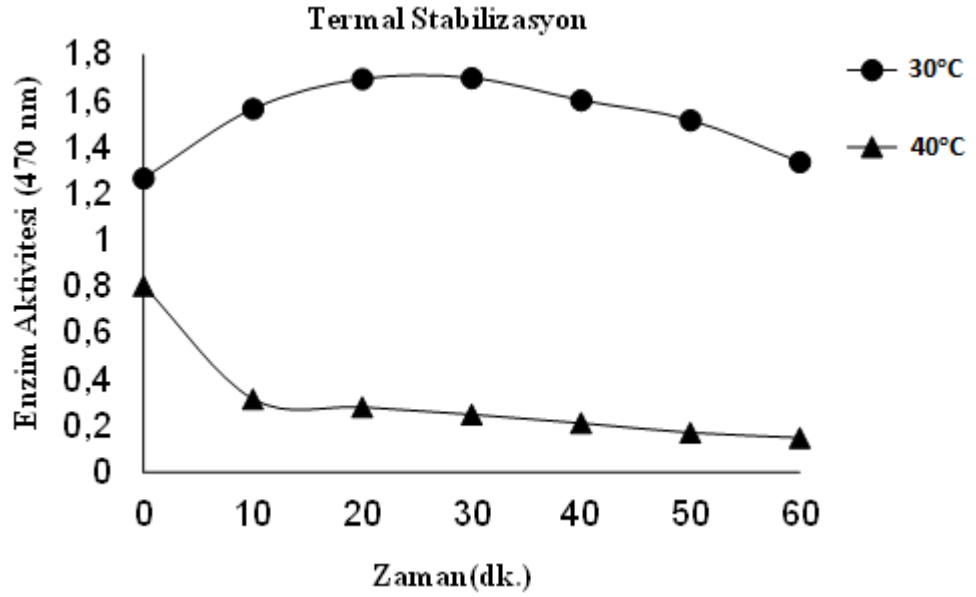
Optimum sıcaklık çalışması için 10–60 °C aralıkları kullanıldı (şekil 14). 10°C de aktivitenin 1,004 40 °C de ise 0,309 olduğu belirlendi. Optimum sıcaklık değeri 30°C'de 1,504 olarak belirlendi (şekil 14). 50 ve 60 °C' de ise aktivitenin olmadığı gözlemlendi.



Şekil 14. Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) elde edilen POD'un optimum çalışma sıcaklığı

4.2.4. POD için termal stabilizasyon çalışma sonuçları

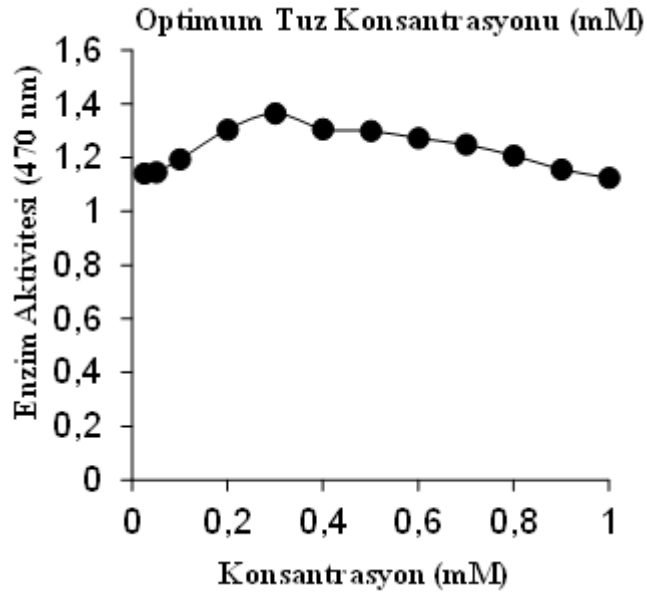
POD'un termal stabilizasyon çalışması için 30-40 °C aralığında farklı sıcaklıklarda on dakikada bir 1 saat boyunca ölçümler ile tespit edildi. Sonuçlar şekil 15' de gösterildiği gibi POD'un 30 °C'de termal stabilizasyonu olduğunu ortaya çıkardı.



Şekil 15. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun farklı sıcaklıklarda zamanla stabilitesi

4.2.5. POD optimum tuz konsantrasyonu sonuçları

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun optimum tuz konsantrasyonunu tespit etmek için 0,025 -1 mM aralıklarında farklı on iki Na₂HPO₄ konsantrasyonda çalışmalar gerçekleştirildi. Ölçümlerin sonunda uygun optimum tuz konsantrasyonu 0,3 mM olarak belirlendi (şekil 16). Grafikten de anlaşıldığı üzere tuz konsantrasyonunun etkisi pek olmamıştır.

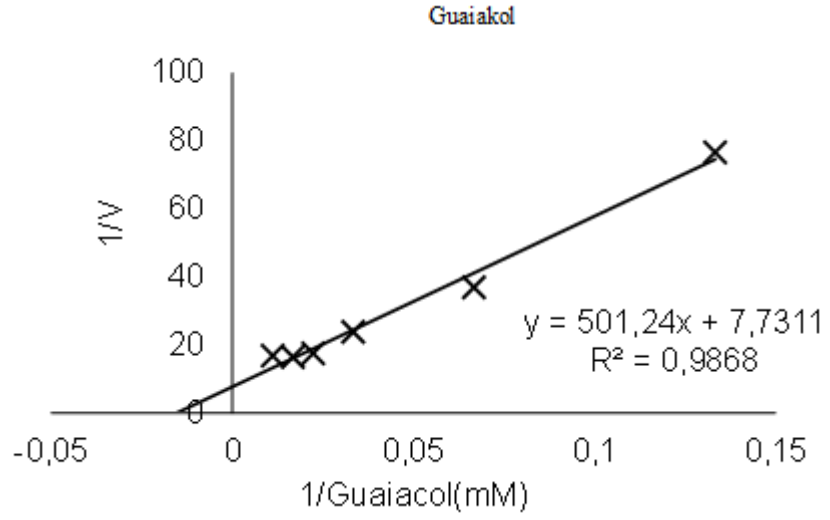


Şekil 16. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun farklı tuz konsantrasyonlarındaki aktiviteleri

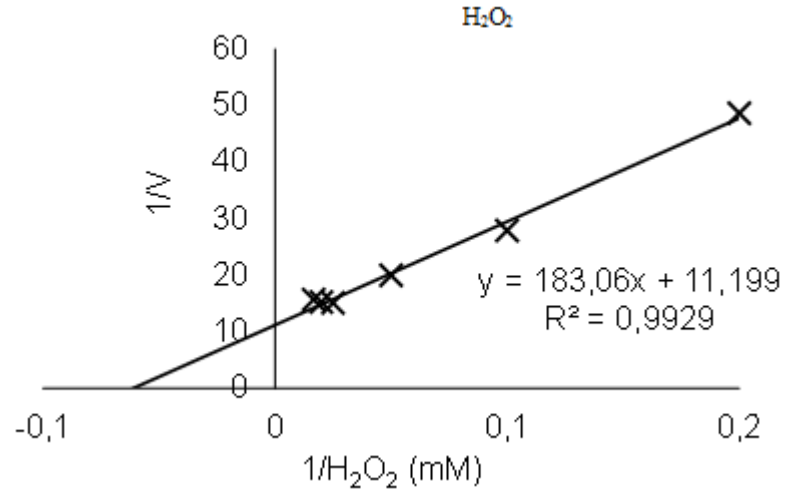
4.3. POD kinetik özelliklerinin sonuçları

4.3.1. POD K_m ve V_{max} değerlerinin sonuçları

POD'un V_{max} ve K_m değerleri için, H_2O_2 ' in konsantrasyonunun sabit tutulduğu ve farklı guaiakol konsantrasyonunun arttığı daha sonra da guaiakol konsantrasyonunun sabit olup H_2O_2 konsantrasyonunun artırılmasıyla ölçümler gerçekleştirildi. Sonuçlar şekil 17 ve 18' deki gibi grafik olarak verildi. Substratların her biri için grafiklerden bulunan denklemler aracılığı ile K_m ve V_{max} değerleri bulundu. Guaiakolün ve H_2O_2 ' in K_m değerleri sırası ile 0,0154 mM ve 0,065 mM iken V_{max} değerleri 0,064 EU/mL.dak ve 0,043 EU/mL.dak olarak belirlendi.



Şekil 17. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun H₂O₂ substratı konsantrasyonunun sabit olup farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



Şekil 18. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun guaiakol substrat konsantrasyonunun sabit olup farklı H₂O₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği

4.3.2. Çeşitli kimyasalların POD aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi

CTAB, sitrik asit, sodyum azid ve EDTA inhibitörlerinin farklı konsantrasyonları hazırlandı. İnhibisyon etkisinin 5 mM konsantrasyonda ve % 99 inhibisyon ile sodyum azid olduğu belirlendi. Farklı inhibitörlerin POD aktivitesine etkileri Tablo 3' de gösterilmektedir.

Tablo 3. İnhibitörlerin POD aktivitesine etkisi

İnhibitor	Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon
Sitrik asit	5	81
EDTA	20	90
CTAB	20	91
Sodyum azid	5	99

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonu katalize etme yeteneği nedeniyle POD, endüstride değerli bir enzimdir. Farklı özelliklere sahip POD kaynaklarının keşfi, gelecekteki uygulamalar için yeni kaynaklar sağlamak açısından önemlidir. Bu çalışmada, yeni bir POD, kuru fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) saflaştırılmış ve optimum katalitik ve kinetik aktiviteleri araştırılmıştır. Enzim özelliklerinin karşılaştırılması literatürde bildirilenlere benzerdi. Burada sağlanan bilgiler, POD'un farklı bir kaynaktan saflaştırılması ve POD'un kullanıldığı uygulamalar için yararlı olabilir.

1960'lı yıllardan bu yana POD enzimini farklı kaynaklardan saflaştırma çalışmaları yapılmıştır (Singh ve Singh, 2002). POD'ın saflaştırıldığı bitkilerden bazıları şunlardır; karalâhana (Gülçin ve Yıldırım 2005), brokoli (Tıpawan ve Barrett, 2005; Köksal ve Gülçin, 2008), bamya (Yemenicioğlu 1998), tütün (Gazaryan ve Lagrimini 1996), arpa (Kristensen ve 1999), lahanası (McLellan ve Robinson 1987), pamuk (Triplett ve Mellon 1992), bürüksel lahanası (McLellan ve Robinson 1987), portakal (Clemente 1998), çay yaprakları (Kvaratskhelia ve 1997), tatlı patates yumruları (Leon ve ark., 2002), havuç (Nair ve Showalter 1996), domates (Jen ve ark., 1980; Signoret ve Crouzet 1982), kakao çekirdeği (Sakharov ve Ardila, 1999), kavun (Rodriguez ve ark., 2000), kivi meyvesi (Fang ve ark., 2008), kırmızıbiber (Serrano Martinez ve ark. 2008), nane yaprakları (Shalini ve ark., 2008), bahar lahanası (Belcarz ve ark., 2008), yaban turpu (Veitch, 2004; Sariri ve ark., 2006), ayçiçeği kökleri (Jouili ve ark., 2008).

Bu çalışmamızın saflaştırma kısmında amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerini, enzimin saflık kontrolünde ve molekül kütlelerinin tayininde de SDS-PAGE yöntemini kullandık.

Saflaştırma işleminin ilk aşamasında, POD'un ham ekstresi % 20 ile % 70 doygunlukta amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Her bir aralıkta ekstrakte amonyum sülfat ilave edildikten sonra, numune santrifüje tabi tutuldu ve pelet, fosfat tamponu içerisinde çözüldü. POD aktiviteleri süpernatant ve çökelekte ölçüldü. İlk fraksiyonun süpernatantında önemli ölçüde daha yüksek POD aktivitesi tespit edildi. % 50 ila % 60 doygunluk aralığında çökeltme, pelet içinde POD aktivitesinde önemli bir artışa neden

olmuştur. Bu nedenle, daha fazla saflaştırma adımları için % 50-60 amonyum sülfat doyunluk aralığı seçilmiştir.

Literatürde, amonyum sülfat çökmesi, ilgi konusu proteinin kısmen saflaştırılması için hala yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Örneğin, POD'un bayır turpundan (Mohamed ve ark., 2011), lahana yapraklarından (Pandit ve ark., 2013) veya Türk kara turpundan (Şişecioğlu ve ark., 2010) saflaştırılması için amonyum sülfat doyunluğu kullanılmıştır. Amonyum sülfat yerine asetonun kullanıldığı başka çalışmalar da vardır (Duarte-Vazquez ve ark., 2007).

Numuneyi iyon değişim kromatografisine yüklemeye önce, tuzu uzaklaştırmak için numune diyaliz edilmiştir. Jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'un aktivitesi, Şişecioğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla spektrofotometrik biçimde tayin edildi. Bu çalışma, H₂O₂ tarafından guaiakol substratının yükseltgenmesi ve sonuçta oluşan renkli bileşik tetra guaiakolün 470 nm'de absorbans artışı temeline dayanmaktadır (Şişecioğlu ve ark., 2010). Bu metodun esas alınmasının sebebi guaiakol POD'un en iyi substratı olduğu için ve guaiakolün molar ekstinksiyon katsayısı bilindiği içindir ($\epsilon_{470nm}=5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçüm sonuçları 1 enzim ünitesi, 20 °C'de 1 dakikada 1 µmol guaiakol'ün yükseltgenmesini katalizleyen enzim miktarı olarak verildi.

İkinci saflaştırma aşaması, katyon değişim kromatografisidir. Analizden sonra, kromatografi, bir araya toplandı ve jel filtrasyon kromatografisine yüklemek için en yüksek POD aktivitesi gösteren 18, 19 ve 20 fraksiyonlar birleştirildi. Şekil 9'daki elüsyon profili, enzimin negatif yüklü yüzeyde tutulmasına izin veren bir net katyonik yüke sahip olduğunu gösterdi. İyon değişim kromatografisi, yüklü yüzey ile farklı POD izoformlarını incelemek için özellikle yararlıdır. Örneğin, iyon değişim kromatografisi kullanılarak, buğday kepeği (Manu ve ark., 2009), Tartary buğdayı çekimleri (Daisuke ve ark., 2013) ve *Copaifera langsdorffii* L. (Maciel ve ark., 2007) POD'ları için sadece bir tepe noktası olduğu, brokoli saplarının (Thongsook ve ark., 2005) tepe noktası ile 3 POD izoenzimi içerdiği gösterilmiştir.

Üçüncü saflaştırma aşaması jel kromatografisini içerir. Bu adımda, enzimin başarılı bir şekilde elde edildiğini gösteren tek bir tepe elde edilmiştir. Bu çalışmada sunulan aynı

teknikleri kullanarak, jel filtrasyon kromatografisi sonrası sarımsak POD ve hünnap meyvesi POD 25.256 U / mg ve 804.9 U / mg spesifik aktiviteleri bulunmuştur (Osuji ve ark., 2014). Kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD enzimi spesifik aktivitesi 2.26 EU/mg olarak bulunmuştur ve sarımsak, hünnap meyvesi POD enzim spesifik aktivitelerine göre çok düşüktür.

Jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisinden elde edilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) elüatlarının 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek kalitatif olarak protein tayini yapıldı. Yöntem, protein yapısında bulunan amino asitlerin (tirozin, triptofan ve fenilalanin) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları temeline dayanmaktadır (Segel, 1975).

SDS-PAGE metoduyla POD'un molekül ağırlığı ile 45 kDa olarak bulundu. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen POD' ın molekül kütleleri; palmiye ağacı yapraklarında 48 kDa (Deepa ve Arumughan, 2002), palmiye ağacında 51 kDa (Sakharov ve ark., 2001), karayip bitkisinde 43.11 kDa (Pandey ve ark., 2012), tatlı patates köklerinde 37 kDa (Signoret ve Crouzet, 1982), at turpunda 37 kDa (Laver ve ark., 2010), domateste 43 kDa (Jen ve ark., 1980; Signoret ve Crouzet, 1982), vanilya çekirdeğinde 46,5 kDa (Marquez ve diğerleri, 2008), kırmızı pancarda 45 kDa (Rudrappa ve ark., 2007), karalâhanada 95 kDa (Dicko ve ark., 2006), zeytinde 44kDa (Tzika ve ark., 2009), hurma yapraklarında 55 kDa (Deepa ve Arumughan, 2002), brussel filiz POD için 26-48 kDa (Forsyth ve Robinson, 1998), fıstık POD için 42 kDa (Chibbar ve Huystee, 1984), turp için 40-46 kDa (Paul ve Stigbrand, 1970), çilek POD için 56 kDa (Civello ve diğerleri, 1995), yeşil kuşkonmaz POD'u için 34 kDa (Wang ve Luh, 1983) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinden elde edilen POD' un molekül ağırlığı kırmızı pancar POD' ı ile aynıdır.

Karakterizasyon çalışmaları yapılan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) POD'unun optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık, termal stabilizasyon ve optimum iyonik şiddet değerleri bulundu.

Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) saf olarak elde edilen POD farklı pH'lardaki spektrofotometrik ölçümleri sonucunda optimum pH değeri 5.0 olarak belirlendi. Asidik şalgam POD' unun optimum pH' sı ABTS (H verici) ile 5 ile 5.5 arasında olduğu

bulunmuştur (Duarte-Vazquez ve ark.2000). Çilek POD için optimum pH değeri 6 (Civello ve diğerleri, 1995), patates filizi ve yumruları için sırasıyla 4-4.5' tir (Boucoiran ve ark., 2000). Domates suyundaki POD izoenziminin, H vericisi olarak guaiakol ile optimum 5.5 pH'ya sahip olduğu bulunmuştur (Jen ve diğerleri, 1980). Ispanak yaprağındaki POD'un optimum pH değeri 5.2 ve karnabaharındakinin 5 (Köksal ve ark. 2007), zeytin POD'unun pH değeri 7.0 (Saraiva ve arkadaşları 2007) olduğu bulunmuştur. Vanilya POD'un optimum pH'sı 3.8 olarak bulunmuştur (Marquez ve ark., 2008). Fıstık POD' nın optimum pH sı 4.0'tür (Ravindra ve Van-Huystee, 1984; Mdluli, 2005). Brokoli bitkisinin POD izoenzimleri nötr ve asidik optimum pH değerleri için sırasıyla 6.0 ve 4.0 değerleri bulunmuştur (Thongsook ve Barrett, 2005a). Bu değerler fasulye POD' ının şalgam, ıspanak yaprağı, karnabahar POD' ının optimum pH değerleri ile uyum gösterdiği görülmektedir.

POD'un stabil pH'sını belirlemek için yapılan çalışmada pH 5.0 değerinde kararlı olduğu belirlendi. Yönelik yapılan çalışmada enzimin kararlı olduğu pH değeri 5.0 olarak belirlendi. +4 °C'de onuncu günde azalan aktivitesinde artış görülmüştü. Aktivitenin artma nedeni stabil pH çalışması sırasında +4 °C'de bekletilen enzim çözeltisinde enzimin reaktif olduğu düşünülmektedir. Düşük sıcaklıklarda aktivite artışı daha önce kışlık bitkilerdeki katalaz ve peroksidaz enzimlerinde görülmüştür (Gülçin and Yıldırım 2005).

POD' un optimum sıcaklığı 30 °C bulundu. Farklı kaynaklardaki POD enzimleri, farklı optimum sıcaklık değerlerine sahiptirler ve genellikle 25-40 °C aralığında değişmektedirler. Meselâ optimum sıcaklık değeri üzüm POD için 40 °C (Sciancalepore ve ark., 1985), vanilya POD' ı için 16 °C (Marquez ve ark., 2008), çilek POD için 30 °C (Civello ve ark., 1995), ayçiçeği POD için ise 40 °C (Jouili ve ark., 2008), lahana POD için 40 °C (Belcarz ve arkadaşları 2008), zeytin POD' u 34,7 °C'dir (Saraiva ve arkadaşları 2007). Çilek POD' unun 30 °C (Civello ve ark., 1995) bulunan optimum sıcaklık değeri fasulye POD' u ile benzer sonuç göstermektedir. Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) elde edilen POD' un termal stabilizasyonu 30 °C olarak belirlendi.

Fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) elde edilen POD'un aktivitesinin en yüksek olduğu tuz konsantrasyonunun 0,3 M olduğu bulundu. Önceki çalışmalar, yüksek

konsantrasyonda NaCl'nin (2,5 M), *Jatropha curcas*'ından POD aktivitesinde % 44'lük bir artışa yol açtığını göstermiştir (Cai ve ark., 2012). Benzer şekilde *Leucaena leucocephala* yapraklarından elde edilen POD'un 3M NaCl konsantrasyonlarında optimum iyonik güce sahip olduğu bildirilmiştir (Pandey ve ark., 2011).

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H₂O₂ ve guaiakol substratları için K_m değerleri Linweaver- Burk grafiğinden bulundu (Şekil 5). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)' den saflaştırılan POD' un 25 °C ve pH 5.0' de guaiakol substratı için K_m değeri 0.0154 mM olarak bulundu. H₂O₂ substratı için K_m değeri ise 0.065 mM olarak bulundu. Farklı kaynaklardaki POD' un farklı kinetiği vardır. Havuç POD' un K_m değerleri, pirogallol için 0.34 mM, o-dianisidin için 7.7x10⁻³ mM ve guaiakol için 1.4 mM olduğu belirtilmiştir (Soysal ve Söylemez, 2005). Vanilya fasulyesi peroksidazının, guaiakol için K_m değeri 3.8 mM olduğu belirtilmiştir (Marquez ve ark., 2008). Zeytin POD' un H₂O₂ ve fenol için K_m değerleri sırasıyla 41,0 ve 0,53 mM olarak bulunmuştur (Saraiva ve ark., 2007). Lahana POD' un kinetik çalışmaları o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM) ve ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM)' e ait K_m değerleri, guaiacol (6,41 ve 13,89 mM)'den daha düşük olduğunu göstermiştir (Belcarz ve arkadaşları 2008). Marul POD' un H₂O₂ ve ABTS için K_m değerleri 1,77 mM olarak bulunmuştur (Mdluli, 2005). Hurma yaprağı yağından elde edilen POD' un guaiakol, ABTS ve pirogallol için sırasıyla K_m değerleri 3,96 - 1 - 0,84 mM olarak belirlenmiştir (Deepa ve ark., 2002). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)' den saflaştırılan POD' un guaiakol ve H₂O₂ için V_{max} değerleri sırasıyla 0,064 EU/mL.dak ve 0,043 EU/mL.dak olarak belirlendi. Üzüm POD' unun K_m ve V_{max} değerleri ABTS için sırasıyla 0,79 mM ve 1,20 mM/dk, H₂O₂ için bu değerler sırasıyla 0,4 mM ve 0,93 mM / dk olarak tespit edilmiştir (Fortea ve ark., 2009). Kırmızı tatlı biber POD için V_{max} ve K_m parametreleri hem ABTS hem de H₂O₂ için sırasıyla 0,495 ve 1,32 mM olarak bulunmuştur (Serrano Martinez ve ark., 2008). Yapılan diğer çalışmalara bakılarak fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinden elde edilen POD'ın H₂O₂ ve guaiakol substratları için K_m değerleri düşük olduğu ve V_{max} değerlerinin ise üzüm ve kırmızı tatlı bibere yakın olduğu, bu çalışmada göstermiştir.

İnhibitörler, POD' un katalizlediği reaksiyonların oranlarını farklı biçimde etkileyebilirler. Azid iyonları, florür, siyanür ve heme demirinin altıncı koordinasyon

pozisyonunda kararlı komplekslerin oluşmasıyla POD' nun katalitik aktivitesini inhibe ederek H₂O₂ ile reaksiyon önlenmektedir. Bir çok organik bileşik ara oksitler ile reaksiyonunda POD'u inhibe etmektedir (Vallee ve Ulmer, 1972). Çalışmada kullanılan sitrik asit, EDTA, CTAB ve sodyum azid inhibitörleri içerisinde POD'un aktivitesindeki % 99 gerçekleştiren 5 mM sodyum azid olarak belirlendi.

KAYNAKLAR

- Adams, J.B. (1978) “The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature-short time processing of vegetables”, *Journal Food Technology*, 13, 281–297.
- Adams, M.W., Coyne, D.P., Davis, J.H.C., Graham, P.H., Francis, C.A. (1985) “Common Bean, *Phaseolus vulgaris* L.”, Grain Legume Crops Chapter 10, R.J. Summer Field and E.H. Roberts, *Collins Professional and Technical Books*, London, 433-477.
- Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H. (1997) “Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596–598.
- Akçin, A. (1998) “Yemelik Tane Baklagiller”, *Selçuk Ü. Yayınları*, 43 (8), 41-189.
- Al-Senaidy, A., Ismael, M. (2011) “Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293-298.
- Altıkatoğlu, M., Başaran, Y., Ariöz, C., Kuzu, H. (2009) “Thermal stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran”, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, Sigma 27, 216-225.
- Altın, S., Tohma, H., Gülçin, İ., Köksal, E. (2016) “Purification, characterization and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*)”, *International Journal of Food Properties*.
- Barampama, Z., Simard, E.R. (1994) “Oligosaccharides, Antinutritional Factors and Protein Digestibility of Dry Beans as Affected by Processing”, *Journal of Food Science*, 59 (4), 833-838.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B. (1991) “The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase”, *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–250.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P. (2008) “Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis”, *Phytochemistry*, 69, 627–636.
- Boucoiran, C.F.S., Kijne, J.W., Recourt, K. (2000) “Isolation and partial characterization of thermostable isoperoxidases from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber sprouts”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 701-707.

- Cai, F., Yang, C., Duan, P., Gao, S., Xu, Y., Chen, F. (2012) "Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77,59-66.
- Chibbar, R. N., Van Huystee, R. B. (1984) "Characterization of peroxidase in plant cells", *Plant Physiology*, 75, 956-958.
- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. (1995) "Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43,2596-2601.
- Clemente, E. (2002) "Peroxidase from oranges (*Citrus sinenses L.*) Osbeck", *European Food Research and Technology*, 215,164-168.
- Clemente, E. (1998) "Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges", *Phytochemistry*, 49, 29- 36.
- Coşkun, B. (2013) "Tekstil atık sularında enzimatik renk gideriminin deneysel tasarımı ve optimizasyonu", *Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Muğla, 7.
- Daisuke, M., Kurihara, H., Takahashi, K., Suzuki, T., Morishita, T. (2013) "Effects of metal ions on the activity and stability of peroxidase in Tartary buckwheat shoots", *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*.
- Daniel, R.M., Peterson M.E., Danson M.J., et al (2010), "The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity", *Biochemical Journal*, 425 (2), 353-60.
- Deepa, S. S., Arumughan C. (2002) "Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf", *Phytochemistry*, 61,503-511.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A.G., Van, Berkel, W.J. (2006) "Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase", *Febs Journal*, 273,2293-307.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Aklan, M. (2007) "Variations of peroxidase activity among *Salvia* species", *Journal of Food Engineering*, 79,375- 382.
- Duarte-Vazquez, M.A., et al. (2007) "Broccoli processing wastes as a source of peroxidase", *J Agric Food Chem.*, 55(25),10396-404.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C. and Whitaker, J.R. (2000) "Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus L. var esculenta D.C.*) peroxidases", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48,1574-1579.

- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B.E., Regalado, C., Whitaker, J.R. (2001) "Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus* L. Var. *purpletop white globe*) roots", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4450 – 4456.
- Düzcan, B. (2010) "Karahindiba (*taraxacum officinale*) bitkisinden süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya, 8.
- Fang, L., Jiang, B., Zhang, T. (2008) "Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase", *Food Chemistry*, 109, 802–807.
- FAO, 2016.<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>,
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z., Ferradji, F., Bejar, S., Boutoumi, H. (2012) "A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. Strain AH4: Purification and biochemical characterization", *Bioresource Technology*, 11, 383-390.
- Forsyth, J.L., Robinson, D.S. (1998) "Purification of Brussels sprout isoperoxidases", *Food Chemistry*, 63, 221-234.
- Fortea, M., Miranda, S., Martinez, A., Sanchez, P., Zafrilla, M., Cacha, A., Delicado, E. (2011) "Kinetic characterization and thermal inactivation study of red alga peroxidase", *Food chemistry*, 127, 1091-1096.
- Fortea, M.I., Lopez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Carreno, B.J., Nunez-Delicado, E. (2009) "Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless)", *Food Chemistry*, 113,1008–1014.
- Fric, F., Pirson, A., Zimmerman, M.H. (1976) "Oxidative Enzymes", *Encyclopedia of Plant Physiology*, New York, 4,17.
- García-Laraa, S., Arnasonb, J.T., Díaz-Pontonesc, D., Gonzalezc, E., Bergvinsona, D.J. (2007) "Soluble peroxidase activity in maize endosperm associated with maize weevil resistance", *Crop Science*, 47,1125–1130.
- Gautério, G., et al. (2015) "Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography", *Adsorption Science & Technology*, 33(2),153-164.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M. (1996) "Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase", *Phytochemistry*, 41, 1029- 1034.
- Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo, S. (2007) "Kinetic pr operties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. Corm during rooting", *Iranian Biomedical Journal*, 11,137-146.

- Gözükara, E.M. (1989) Biyokimya, *Ofset Repromat LTD Şti.*, Ankara, 792-795.
- Gülçin, İ., Yıldırım, A. (2005) "Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* Acephala", *Asian Journal of Chemistry*, 17,2175- 2183.
- Halliwell, B. (1984) "Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance", *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N. (1989) "Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*)", *Journal Food Science*, 54,644.
- Hamed, R. R., Maharem, T. M., Fatah, M. M. A., Ataya, F. S. (1998) "Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots", *Phytochemistry*, 48, 1291.
- Hatzilazarou, S.P, Syros, T.D, Yupsanis, T.A., Bosabalidis, A. M., Economou, A. S. (2006) "Peroxidases, lignin and anatomy during in vitro and ex vitro rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots", *Journal of Plant Physiology*, 163,827-836.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998) "Transformation of Industrial Dyes by Manganese Peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction", *Appl Environ Microbiol*, 64(8), 2788–2793.
- Hiner, A.N., et al. (1996) "A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C", *Biotechnology and bioengineering*, 50(6), 655-662.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001) "A large family of class III plant peroxidases", *Plant Cell Physiology*, 42, 462- 468.
- İspirli, Y. (2008) "Taşıyıcısız İmmobilizasyon Yöntemiyle Çapraz Bağlı Glukoz Oksidaz (GOD) Enzim Agregatlarının ve Kristallerinin Sentezi ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Muğla Üniversitesi*, Muğla, 79.
- Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski, AJ. (2013) "Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation", *Enzyme Microb Technol*, 10;52(1),1-12.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H. (1980) "Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography", *Journal Food Science*, 45, 60–63.
- Jouili, H, Bouazizi, H, Rossignol, M, Borderies, G, Jamet, E., El Ferjani, E. (2008) "Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots", *Plant Physiology and Biochemistry*, 44,1-8.

- Kalın, R. (2012) “Peroksidaz enziminin afinite kromatografisi tekniği ile karaturp (*Raphanus sativus L.*) ve şalgamdan (*Brassica rapa L.*) saflaştırılması ve karakterizasyonu”, Yüksek lisans tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen bilimler Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı*.
- Kampis, A., Bartuczkovacs O., Hoschke A. and Aosvigyazo V. (1984) “Changes in peroxidasesactivity of broccoli during processing and frozen storage”, *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 17,293–295.
- Karlson, P., Telefoncu, A. (1998), *Tip ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya*, Sermet Mat., Kırıkkale, 68.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu Ö.İ. (2014) “Enzimler”, Biyokimya 10.Baskı, *Aktif yayınları*, Erzurum, 94, 102-103, 113-114.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu Ö.İ. (2009) “Enzimler”, Biyokimya 10.Baskı, *Aktif yayınları*, Erzurum, 97-125.
- Kirk, T., Farrell, R. (1987) ‘Enzymatic Combustion’, *The Microbial Degradation of Lignin Annu Rev Microbiol.*, 41, 465-505.
- Köksal, E. (2007) “Karnabahar (*Brassica oleracea L.*) Peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi”, Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*.
- Köksal, E., Gülçin, İ. (2007) “Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea L.*) buds”, *Protein and Peptide Letters*, 15,320-326.
- Körlü, A. ve Altay, P. (2009) “Enzimatik Yün Terbiyesi”, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2),81-91 .
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K. (1999) “Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens”, *Plant Physiology*, 120, 501.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N.F. (1997) “Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves”, *Plant Physiology*, 114, 1237- 1245.
- Lagrimini, L.M. (1991) “Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase”, *Plant Physiology*, 96, 577- 583.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., İrwin, D.J.G., D’Cunha, G.B. (2010) “Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471- 8476.

- Lee, D.J., Kim, S.S., Kim, S.S. (2002) “The regulation of Korean radish cationic peroxidase promoter by a low ratio of cytokinin to auxin”, *Plant Science*, 162, 345- 353.
- Lee, H.C., Klein, B.P. (1990) “Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing”, *Journal Food Biochemistry*, 14, 137–152.
- Lee, M.Y. (2002) “Effects of Na₂SO₃ on the activities of antioxidant enzymes in geranium seedlings”, *Phytochemistry*, 59, 493–9.
- Lee, S.H, Kim, E.S, Lee, M.Y. (2001) “Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium”, *Phytochemistry*, 58, 859–864.
- Lehninger, A.L. (2005) Principles of biochemistry, Worth publisher, **Acedemic Press**, New York.
- Leon, J.C, Alpeeva, I.S, Chubar, T.A, Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu. (2002) “Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers”, *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society* 56 (3), 658–666.
- Lowry, Oliver H., et al. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J biol Chem* 193,1, 265-275.
- M. Mdluli, K. (2005) “Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*)”, *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Maciel, H.P.F., et al. (2007) “Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves”, *Quimica Nova*, 30(5), 1067-1071.
- Manu, B. and U.P. Rao. (2009) “Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran”, *Food Chemistry*, 114(1), 66-71.
- Marangoni, A. G., Brown, E. D., Stanley, D. W., Yada, R. Y. (1989) “Tomato peroxidase: rapid purification and partial characterization”, *Journal of Food Science*, 54, 1269-1271.
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., Pardo, V.T. (2008) “Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean”, *Lebensmittel- Wissenschaft and-Technologie*, 41, 1372–1379.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S. (1987) “Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes”, *Food Chemistry*, 23, 305–319.

- Mdluli, K.M. (2005) "Partial purification and characterization of polyphenoloxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*)", *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Menten, L., Michaelis, M.I. (1913) "Die Kinetik der Invertinwirkung", *Biochem Z*, 49, 333–369.
- Mittler, R., Zilinskas, B.A. (1994) "Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought", *Plant Journal*, 5, 397-405.
- Mohamed, S.A., et al. (2011) "Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady", *Food Chemistry*, 128(3), 725-730.
- Nadaroğlu, H. (2009) "Purification and properties of peroxidase from prangos ferulacea (Apiaceae) and investigation by some chemicals", *Asian J Chem.*, 21(7), 5768-5776.
- Nair, A. R., Showalter, A. M. (1996) "Purification and characterization of a woundinducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots", *Biochemistry biophys. Research Communucation*, 226, 254.
- Onsa, G.H, Saari N, Selamat J. and Bakar J. (2004) "Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu", *Food Chemistry*, 85, 365–376.
- Ory, R.L., St. Angelo, A.J. (1977) *Enzyme in Food and Beverage Processing*. American Chemical Society, Washington, D.C. USA. pp. 143-171.
- Osuji, A.C., et al. (2014) "Biobleaching of industrial important dyes with peroxidase partially purified from garlic", *Scientific World Journal*, 183163.
- Pandey, V.P. and Dwivedi, U.N. (2011) "Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 168-173.
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N. (2012) "Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit", *Applied Biochemistry Biotechnology*, 167, 367- 376.
- Pandit, A.B. and Kharatmol, P.P. (2013) "Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica olearacea* var. *capitata*)", *Journal of Biochemical Technology*, 4(1), 531-540.
- Paul, K.G., Stigbrand, T. (1970) "Four isoperoxidases from horseradish root", *Acta Chemica Scandinavica*, 24, 3607-3617.
- Pekşen, E., Artık, C. (2005) "Anti besinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri", *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 110-120.

- Perez, H.M., Guerra, H.E., García, V.B. (1997) “Determination termination of Insoluble Dietary Fiber Compounds: Cellulose, Hemicellulose and Lignin in Legumes Departamento de Nutrition Bromatología”, *Facultad de Farmacia Universidad de Granada*, 18071.
- Pomar, F., Bernal, M. A., Diaz, J., Merino, F. (1997) “Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase”, *Phytochemistry*, 46, 1313– 1317.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., Milrad, D.E., Forchetti, S., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000) “A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin”, *Plant Physiology*, 122, 1119- 1127.
- Rani, N.D., Abraham, T.E. (2006) “Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time temperature indicator for food materials”, *Journal of Food Engineering*, 77, 594–600.
- Ratcliffe, B., Flurkey, W.H., Kuglin, J., Dawley, R. (1994) “Tyrosine, laccase and peroxidase in mushrooms (*agaricus*, *crimini*, *oyster* and *shiitake*)”, *Journal of Food Science*, 59, 824-827.
- Ravindra, N., Van-Huystee, R. (1984) “Characterization of peroxidase in plant cells”, *Plant Physiology*, 75, 956–958.
- Regalado, C., García-Almendárez, B.E. and Duarte-Vázquez, M.A. (2004) “Biotechnological applications of peroxidases”, *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 243-256.
- Robinson, F.E., Maxwell S.R.J. and Thorpe G.H.G. (1987) “An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence”, *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rodrigo, C., Rodrigo, M., Alvarruiz, A., Frigola, A. (1996) “Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase”, *Journal of Food Protection*, 59, 1065-1071.
- Rodriguez L, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia-Canovas,F. (2000) “Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions”, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1537–1541.
- Rodriguez-Lopez, J.N, Smith A.T., and Thorneley R.N.F. (1996) “Role of arginine 38 in horseradish peroxidase a critical residue for substrate binding and catalysis”, *Journal Of Biological Chemistry*, 271, 4023-4030.

- Rogozhin, V.V., Rogozhin, T.V. (2004) "The Role of Indole-3-Acetic Acid in Peroxidase Oxidation of Ascorbic Acid Catalyzed by Horseradish Peroxidase", *Biology Bulletin*, 31, 342–345.
- Rojas-Reyes, J.O., et al. (2014) "Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass)", *J Sci Food Agric*, 94(9), 1844-53.
- Rudra, S.G., Shivhare, U.S., Basu, S, Sarkar, B.C. (2008) "Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase in Coriander Leaves", *Food Bioprocess Technology*, 1, 187– 195.
- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M., Neelwarne, B. (2007) "Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.)", *Food Chemistry*, 105, 1312–20.
- Sakharov, I.Y, Vesga Blanco, M.K, Sakharov, I.V. (2002) "Substrate Specificity of African Oil Palm Tree Peroxidase", *Biochemistry (Moscow)*, 67, 1043-1047.
- Sakharov, I.Y., Ardila, G.B. (1999) "Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying", *Food Chemistry*, 65, 51-54.
- Sakharov, I.Y., Castillo, J.L., Areza, J.C., Galaev, I.Y. (2000) "Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaeis guineensis*", *Bioseparation*, 9, 125-132.
- Sakharov, I.Yu., Vesga B, M.K., Galaev, I.Yu., Sakharova, I.V., Pletjushkina, O.Yu. (2001) "Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties", *Plant Science*, 161, 853–860.
- Saraiva, J. A., Nunes, C. S., Coimbra, M. A. (2007) "Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase", *Food Chemistry*, 101, 1571– 1579.
- Sariri, R, Jafarian, V., Sajedi, R.H., Khajeh, K. (2006) "Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid", *Journal of Molecular Liquids*, 128, 175–177.
- Sat, I.G. (2008) "The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers", *African Journal of Biotechnology*, 7, 2248-2253.
- Saylam, A. Ç. (2017) "Kırşehir Ekolojik Koşullarına Uygun Bazı Kuru Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Çeşit/Hatların Verim Ve Verimle İlgili Özelliklerin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırşehir, 1.

- Scandalios J.G. (1994) "Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H, Mullineaux P.M. (Eds.), **Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants**", CRC Press, Boca Raton, FL, 275–316.
- Schnabelrauch, L.S., Kieliszewski, M., Upham, B.L., Alizedeh, H., Lamport, D.T.A. (1996) "Isolation of pI 4.6 extension peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site", *Plant Journal*, 9, 477- 489.
- Sciancalepore, V., Longone, V., Alviti, F.S. (1985) "Partial purification and some properties of peroxidase from malvasi grapes", *American Society for Enology and Viticulture*, 36, 105-110.
- Segel, I.H. (1975) **Enzyme Kinetics**, John Wiley and Sons, New York.
- Serrano-Martinez, A, Fortea, M.I, del Amor, F.M., Nunez-Delicado, E. (2008).
- Shalini, G.R, Shivhare, U.S, Basu, S. (2008) "Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves", *Journal of Food Engineering*, 85, 147–153.
- Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, Hiraga S, Nakayama N, Nakamura T, Yukawa K, Hachinohe M, Matsumoto H, Komatsu S. (2008) "Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding", *Phytochemistry* 69, 1295-1303.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. (2002) "Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes", *J Exp Bot*, 53, 1305–1319.
- Signoret, A., Crouzet, J. (1982) "Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography", *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Singh, N. and Singh, J. (2003) "A method for large scale purification of turnip peroxidase and its characterization", *Prep Biochem Biotechnol*, 33(2), 125-35.
- Singh, W. N., Singh, J. (2002) "Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T., Ogura, N. (1991) "Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwi fruit", *Agric. Biol. Chem.*, 55(6), 1677-1678.
- Somturk, B., Kalin, R. and Ozdemir, N. (2014) "Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography", *Appl Biochem Biotechnol*, 173(7), 1815-28.
- Somtürk, B. (2013) "Peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile bitkisel kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Kayseri, 11-12.

- Soysal, Ç., Söylemez, Z. (2005) “Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment”, *Journal of Food Engineering*, 68, 349–356.
- Sprent, J.I., Sprent, P. (1990) “Nitrogen Fixing Organisms”, *Pure and Applied Aspects*, Chapman and Hall, London, 34.
- Svensson, S., Hoyem, T., Kvale, O. (1977) “Inactivation of enzymes during thermal processing in physical, chemical and biological changes in foods caused by thermal processing”, London, *Applied Science Publishers*, 168.
- Şehirli, S. 1988 “Yemelik Tane Baklagiller”, Ders Kitabı, *Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 1089*, Ankara, 314.
- Şişecioglu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H. (2010) “Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.)”, *Journal of Medicinal Plants Research*, 1188-1189.
- Telefoncu, A. (1986) “Temel ve Uygulamalı Enzimoloji”, *Ege Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der)*, 59.
- Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K. (1992) “Purification and Characterisation Of Laccase From *Monocillium indicum* Saxenall”, *Applied Microbiol Biotechnology*, 37, 321- 323.
- Thongsook, T., Barrett, D.M. (2005a) “Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206-3214.
- Thongsook, T. and Barrett, D.M. (2005) “Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 3206-3214.
- Tıpawan, T., Barrett, M. (2005) “Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Topçular, C. (2006) “Taşıyıcılı Ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmobilize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 34.
- Triplett, B. A., Mellon, J. E. (1992) “Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*)”, *Plant Science*, 81, 147-154.
- Troiani, E.P., Troiani, C.T., Clemente, E. (2003) “Peroxidase and polyphenol oxidase in grape”, *Ciencia agrotecnologia*, 27, 635-642.

- Turgut, H.İ. (2009) “Sakarya bölgesinde yetişen deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya, 21-30.
- TÜİK, 2016. <http://www.tuik.gov.tr> ,
- Tüzün, C. 2005 **Biyokimya**, Palme yayıncılık, Ankara, 81.
- Tzika, E.D., Sotiroudis, T.G., Papadimitriou, V., Xenakis, A. (2009) “Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki)”, *European Food Research and Technology*, 228, 487- 495.
- Vallee, B., Ulmer, D. (1972) “Biological effects of mercury, cadmium and lead”, *Annual Review in Biochemistry*, 49, 91–128.
- Van Huystee, R.B. (1987) “Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies”, *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219.
- Veitch, N.C. (2004) “Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme”, *Phytochemistry*, 65, 249–259.
- Vitalı, A., Botta, B., Delle Monache, G., Zappitelli, S., et al. (1998) “Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies”, *Biochem. J.*, 331, 513-519.
- Voet, D., Voet, J.G. (2010) *Biochemistry*, Wiley; 4 edition, New York.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. (1993) “Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus”, *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Walsh, G. ve Headon, D. (1994) *Protein Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd, England, 303-304.
- Wang, Z., Luh, B.S. (1983) “Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus”, *Journal of Food Science*, 48, 1412.
- Whitaker, J.R., Ed. (1994) “Catalase and peroxidase”, *In Principles of Enzymology for the Food Sciences*, New York, 565-578.
- Wong W.S.D. (1995). *Food Enzymes Structure and Mechanism*. Chapman and Hall, 321.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. (1998) “Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158–4163.

EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Köktepe, T., Altın, S., Tohma, H., Gülçin, İ. and Köksal, E. (2017) "Purification, characterization and selected inhibition properties of peroxidase from haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.), "International Journal of Food Properties", 20 (sup2), 1944-1953.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Erzincan' da doğdu. Ortaöğretimini Erzincan merkezde tamamladı. 2010 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Bölümünde lisans eğitimine başladı. Buradaki bir yıllık eğitiminden sonra yatay geçiş ile Erzincan Üniversitesinde lisans eğitimine devam etti ve 2014 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. Yüksek lisans öğrenimine, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya alanında 2014 yılında başladı.