



**AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE
TATLI TURP (*Raphanus Sativus*), JAPON TURP'U
(*R.sativus* L. var. *longipinnatus*) ve KARNABAHAH'DAN
(*Brassica oleracea*) PEROKSİDAZ (POD) ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Nastaran SADEGHİAN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE TATLI TURP
(*Raphanus Sativus*), JAPON TURP'U (*R. sativus* L. var. *longipinnatus*)
ve KARNABAĞAR'DAN (*Brassica oleracea*) PEROKSİDAZ (POD)
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

Nastaran SADEGHİAN

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE TATLI TURP (*Raphanus Sativus*), JAPON TURP'U (*R. sativus* L. var. *longipinnatus*) ve KARNABAHARDAN (*Brassica oleracea*) PEROKSİDAZ (POD) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Nastaran SADEGHİAN tarafından hazırlanan bu çalışma 21.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/oyçokluğu (S./T.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 05.10.2017 tarih ve 4/2017 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE TATLI TURP (*Raphanus Sativus*), JAPON TURP'U (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve KARNABAHARDAN (*Brassica oleracea*) PEROKSİDAZ (POD) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

Nastaran SADEGHİAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada; Tatlı Turp (*Raphanus Sativus*), Japon Turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve Karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden peroksidaz (POD) enzimi Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta sırasıyla %19,65 verimle 25,75 kat, %9,6 verimle 34,74 kat ve %9,75 verimle 21,23 kat saflaştırıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 470 nm'de ölçüldü. Enzimlerin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini belirlemek için SDS-poliakrilamid jellelektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Molekül kütleleri tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD için yaklaşık 62,25 kDa, japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD için yaklaşık 62,21 kDa ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD için yaklaşık 57,3 kDa olarak bulundu. Enzimler üzerinde yapılan kinetik çalışmalar neticesinde optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla tatlı turp (*Raphanus Sativus*) için 6,5, 1,0 M, 35°C, 6,5, japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) için 6,5, 0,1 M, 35°C, 5,5 ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için 6,00, 1 M, 30°C, 5,5 olarak tespit edildi. Guaiakol substratı için saf enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı ve tatlı turp (*Raphanus Sativus*) için K_m 0,41 mM, V_{max} 1,43 EÜ/mL, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) için K_m 0,56 mM, V_{max} 1,50 EÜ/mL ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için K_m 0,64 mM, V_{max} 1,95 EÜ/mL olarak belirlendi. Ayrıca saf peroksidaz enzimleri üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda ayrı ayrı incelendi. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü her üç bitki peroksidazı içinde yarışmalı inhibisyon göstermekte olup, tatlı turp (*Raphanus Sativus*) ve japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için sırasıyla IC_{50} değeri 0,165, 0,283 ve 0,163 mM olarak, K_i değerleri ise sırasıyla 0,1406±0,037, 0,1288±0,028 ve 0,4233±0,022 mM olarak tespit edildi.

2016, 99 sayfa

Anahtar Kelimeler: Afinite, saflaştırma, karakterizasyon, peroksidaz

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM SWEET RADISH (*Raphanus Sativus*), JAPANESE RADISH (*R.sativus L. var. longipinnatus*) and CAULIFLOWER (*Brassica oleracea*) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

Nastaran SADEGHIAN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this study, Peroxidase (POD) enzymes of sweet radish (*Raphanus Sativus*), japanese radish (*R.sativus L. var. longipinnatus*) and cauliflower (*Brassica oleracea*) plants were purified in a single step by using Sepharose-4B-Ltyrosine- 4-aminobenzohydrazide affinity chromatography as 19.65% yield, 25.75-fold, 9.6% yield, 34.74-fold and 9,75% yield, 21.23-fold, respectively. Enzyme activity was calculated spectrophotometrically procedure at 470 nm. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was done to check the molecular weights of enzymes and purity to determine and the recognized of single band. Molecular masses of enzymes for POD on sweet radish (*Raphanus Sativus*), japanese radish (*R.sativus L. var. longipinnatus*) and cauliflower (*Brassica oleracea*) were found to be approximately 62.25 kDa, 62.21kDa and 57.3 kDa, respectively. As a result of the kinetic tests on the POD enzymes; optimum pH, optimum ionic strength, the optimum temperature and stable pH were recorded as 6.5, 1 M, 35°C, 6.5 for sweet radish (*Raphanus Sativus*), 6.5, 0,1 M, 35°C, 5.5 for japanese radish (*R.sativus L. var. longipinnatus*) and 6, 0,1 M, 30°C, 5.5 for cauliflower (*Brassica oleracea*). K_m and V_{max} values were measured for the pure enzyme with using guaiacol as substrate and for sweet radish (*Raphanus Sativus*) K_m and V_{max} values were obtained to be as 0.41 mM and 1.43 EU/mL, japanese radish (*R.sativus L. var. longipinnatus*) 0.56 mM and 1.45 EU/mL and for cauliflower (*Brassica oleracea*) they were determined to be as 0,64 mM and 1,95 EU/mL. 4-aminobenzohydrazide has shown competitive inhibition on peroxidase enzymes of sweet radish (*Raphanus Sativus*), japanese radish (*R.sativus L. var. longipinnatus*) and cauliflower (*Brassica oleracea*), IC_{50} values were measured as 0.165 mM, 0.283 mM and 0.163 mM, K_i values were determined as 0.1406±0.037 mM, 0.1288±0.028 and 0.4233±0.022 mM, respectively.

2016, 99 pages

Keywords: Affinity, characterization, purification, peroxidase

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarımda her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakóltemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Abdulhalik KARABULUT'e ve Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOğLU'na ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis şAKIROğLU'na, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Melda şİşECİOğLU'na,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışma arkadaşlarım Sayın Arř. Gör. Ramazan KALIN, Sayın Arř. Gör. Dr. Zeynep KÖKSAL ve Sayın Doktora Öđr. Yeliz DEMİR başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışan bütün arkadaşlarıma,

Ayrıca çalışmalarımın tamamlanmasındaki bu önemli süreçte, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, eşim Parham TASLİMİ'e ve değerli aileme eğitimimi tamamlamamı sağladıkları için şükranlarımı sunarım.

Nastaran SADEGHIAN

Aralık, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	7
1.1.1. Serbest radikaller ve etkileri.....	7
1.1.2. Antioksidanlar	8
1.1.3. Antioksidan enzimler	9
1.2. Peroksidazlar (POD, E.C.1.11.1.7)	10
1.3. Afinite Kromatografisi	14
1.3.1. Matriks.....	16
1.3.2. Ligand.....	16
1.3.3. Uzantı kolu	17
1.3.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılacak kimyasal maddeler	27
3.1.2. Yararlanılacak alet ve cihazlar	27
3.1.3. Kullanılacak çözeltiler ve hazırlanması	28
3.1.3.a. Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.....	28
3.1.3.b. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler	29
3.1.3.c. Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	30
3.1.3.d. Aktivite ölçümünde kullanılacak çözeltiler.....	30
3.1.3.e. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılacak çözeltiler.....	30
3.1.3.f. Elektroforez için kullanılacak çözeltiler	31

3.1.3.g. Gümüş boyamada kullanılacak çözeltiler.....	32
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Protein tayini	33
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	33
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	33
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	34
3.3. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>), Japon Turpu (<i>R.sativus</i> L. var. <i>longipinnatus</i>) ve Karnabahar'dan (<i>Brassica oleracea</i>) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	36
3.3.1. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	36
3.3.1.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması:	36
3.3.1.b. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi:	37
3.3.1.c. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	38
3.3.1.d. Homojenat hazırlanması.....	38
3.3.1.e. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	39
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi	39
3.4.1. Ayırma jeli şöyle hazırlanacak	40
3.4.2. Yığıma jeli şöyle hazırlanacak	40
3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması	41
3.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	41
3.5.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	41
3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	42
3.6. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>), Japon Turpu (<i>R.sativus</i> L. var. <i>longipinnatus</i>) ve Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) Bitkilerinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları.....	42
3.6.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları.....	42
3.6.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları.....	42
3.6.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları	43
3.6.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları	43
3.6.5. Guaiakol için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	43
3.6.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik	45
4.2. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>), Japon Turp (<i>R.sativus</i> L. var. <i>longipinnatus</i>) ve Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) Bitkilerinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları	46
4.2.1. POD enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırma sonuçları	46
4.2.2. POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları	49
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	50
4.3. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>), Japon Turp (<i>R.sativus</i> L. var. <i>longipinnatus</i>) ve Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) Bitkilerinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar	53
4.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları	53
4.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları	57
4.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları	60
4.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları	64
4.3.5. Guaiakol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	68
4.3.6. Kullanılan inhibitörün K_i ve IC_{50} değerlerinin bulunması yönelik yapılan çalışma sonuçları	71
4.4. Amino benzohidrazitin Kolon Kapasite Grafikleri	82
4.4.1. Sıcaklık üzerine kolonun kapasite belirlenmesi	82
4.4.2. pH üzerine kolon kapasitenin belirlenmesi	82
4.4.3. İyonik şiddeti üzerine kolon kapasitenin belirlenmesi	83
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	84
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CAT	Katalaz
E:C	Enzim kod numarası
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-RD	Glutasyon redüktaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	Peroksidaz
SDS	Sodyum dodesilsülfat
SOD	Süperoksit dismutaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasında anahtar-kilit modeli	3
Şekil 1.2. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş-uyum modeli.....	3
Şekil 1.3. Peroksidaz enzimin reaksiyon mekanizması	12
Şekil 1.4. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.....	13
Şekil 1.5. Afinite kromatografisinin genel prensibi (1)'de ligand matrikse kovalent bağlanması, (2)'de numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir.	15
Şekil 1.6. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü	17
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.....	34
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumin).....	45
Şekil 4.2. 4-aminobenzohidrazit kolonundan tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını gösteren grafik	46
Şekil 4.3. 4-aminobenzohidrazit kolonundan japon turp (<i>R. sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını gösteren grafik.....	47
Şekil 4.4. 4-aminobenzohidrazit kolonundan karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını gösteren grafik	47
Şekil 4.5. 4-aminobenzohidrazit kolonundan tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik	48
Şekil 4.6. 4-aminobenzohidrazit kolonundan japon turp (<i>R. sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	48

Şekil 4.7. 4-aminobenzohidrazit kolunundan Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	49
Şekil 4.8. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>)POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	51
Şekil 4.9. 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen Rf-logM _K grafiği.....	51
Şekil 4.10. 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>), japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>)POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	52
Şekil 4.11. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>), japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen Rf-logM _K grafiği	52
Şekil 4.12. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enzimi için yapılan optimum pHçalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği.....	54
Şekil 4.13. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enzimi için yapılan optimum pHçalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/mL)- pH grafiği	55
Şekil 4.14. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/mL)-pH grafiği	56
Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki KH ₂ PO ₄ (pH:6,5) tampon çözeltileri kullanılarak tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-[KH ₂ PO ₄] (mM) grafiği.....	58
Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki KH ₂ PO ₄ (pH:6,5) tampon çözeltileri kullanılarak Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-[KH ₂ PO ₄](mM) grafiği	59
Şekil 4.17. Değişik konsantrasyonlardaki KH ₂ PO ₄ (pH:6,5) tampon çözeltileri kullanılarak Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-[KH ₂ PO ₄] (mM) grafiği.....	60
Şekil 4.18. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (0°C) grafiği	61
Şekil 4.19. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) saflaştırılan POD enziminin optimumsıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği ..	63

Şekil 4.20. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği	64
Şekil 4.21. Değişik pH'lardaki KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	65
Şekil 4.22. Değişik pH'lardaki KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	66
Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	67
Şekil 4.24. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin guaiakol için K _m ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	69
Şekil 4.25. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin guaiakol için K _m ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	70
Şekil 4.26. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin guaiakol için K _m ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	71
Şekil 4.27. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[4-amino benzohidrazid] grafiği.....	73
Şekil 4.28. Japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazitinhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[4-aminobenzohidrazit] grafiği.....	74
Şekil 4.29. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[4-amino benzohidrazid] grafiği.....	76
Şekil 4.30. Tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik	78
Şekil 4.31. Japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik	78
Şekil 4.32. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik	81
Şekil 4.33. Sıcaklık üzerine kolonun kapasite belirlenmesi	82
Şekil 4.34. pH üzerine kolon kapasitenin belirlenmesi	82
Şekil 4.35. İyonik şiddeti üzerine kolon kapasitenin belirlenmesi	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar	16
Çizelge 3.1. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki kuvvet içeriği	35
Çizelge 4.1. Tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	50
Çizelge 4.2. Japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	50
Çizelge 4.3. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	50
Çizelge 4.4. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>), Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) ve Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) PODenzimleri için SDS-PAGE ile molekül kütlesi sonuçları	53
Çizelge 4.5. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 MKH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	54
Çizelge 4.6. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 MKH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	55
Çizelge 4.7. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	56
Çizelge 4.8. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonikşiddeti için KH ₂ PO ₄ (pH:6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	57
Çizelge 4.9. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddetiiçin KH ₂ PO ₄ (pH:6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	58
Çizelge 4.10. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddetiiçin KH ₂ PO ₄ (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	59

Çizelge 4.11. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları	61
Çizelge 4.12. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları	62
Çizelge 4.13. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları	63
Çizelge 4.14. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	65
Çizelge 4.15. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	66
Çizelge 4.16. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	67
Çizelge 4.17. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enzimi için K _m ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi	68
Çizelge 4.18. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enzimi için K _m ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi	69
Çizelge 4.19. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enzimi için K _m ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi	70
Çizelge 4.20. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge	72
Çizelge 4.21. Tatlı Turp (<i>Raphanus Sativus</i>) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	72
Çizelge 4.22. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan	

çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge	73
Çizelge 4.23. Japon Turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	74
Çizelge 4.24. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge	75
Çizelge 4.25. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	75
Çizelge 4.26. Tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü	77
Çizelge 4.27. Japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	79
Çizelge 4.28. Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü	80
Çizelge 4.29. Tatlı Tturp (<i>Raphanus Sativus</i>), japon turp (<i>R.sativus L. var. longipinnatus</i>) ve karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>) POD enzimlerinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları	81

1. GİRİŞ

Enzimler; canlı metabolizmadaki reaksiyonları katalizleyen, %100 ürün verimini sağlayan ve hiçbir yan ürün oluşumuna olanak vermeyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Berg *et al.* 2013). Enzimlerin katalitik gücü diğer katalizörlere göre daha fazladır. Kimyasal reaksiyonların hızını, kendiliğinden oluşan tepkimelere göre 108-1020 kat yükseltirler. Enzim ile katalizlenen bir reaksiyonda, enzim ile substrat bir araya gelir ve enzim substrat kompleksini oluşturur. Tepkimenin sonucunda oluşan ürün enzimden ayrılır. Enzimler normalde küresel proteinler şeklindedirler (62 aa-2500aa). Enzimlerin çoğu etki gösterdikleri substratlardan çok daha büyüktür ve enzimin yapısında bulunan küçük 3-4 amino asit kalıntısı katalizleme reaksiyonuyla doğrudan ilişkilidir. Bu küçük kısmı içeren amino asit kalıntılarının olduğu yer, substrata bağlanır ve reaksiyon aktif bölge olarak adlandırılan kısımda gerçekleşir (Lehninger *et al.* 2005; Altıkatoğlu *et al.* 2009). Enzimler biyolojik olarak iki gruba ayrılır:

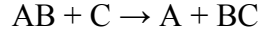
- ✓ Hücre içi (İntraselüler): Hücrenin içinde aktivite gösteren enzimlerdir.
- ✓ Hücre dışı (Ekstraselüler): Hücrede enzim üretildikten sonra hücre dışına salgılanarak aktivite gösterirler (Voet 2010).

Enzimler kataliz ettikleri tepkimelerin türüne göre altı büyük gruba ayrılırlar (Turgut 2009).

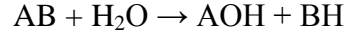
1. Oksidoredüktazlar: Substratların redüksiyonunu veya oksidasyonunu katalizler. (Oksidaz, Dehidrogenaz)



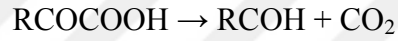
2. Transferazlar: Bir kimyasal grubun (amin, metil, fosfat vs) bir molekülden başkasına aktarımını gerçekleştirir. (Polimeraz)



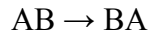
3. Hidrolazlar: Hidroliz ile substrattan iki ürünün çıkmasını sağlarlar. (Amilaz, lipaz, proteaz)



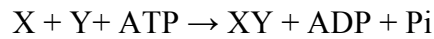
4. Liyazlar: İki molekülün yeni bir molekül oluşturma tepkimesini veya tersini katalize ederler. (Dekarboksilazlar)



5. İzomerazlar: Bir bileşikte atomların en baştan düzenlenmesini katalize ederler. (Glikoz izomeraz)



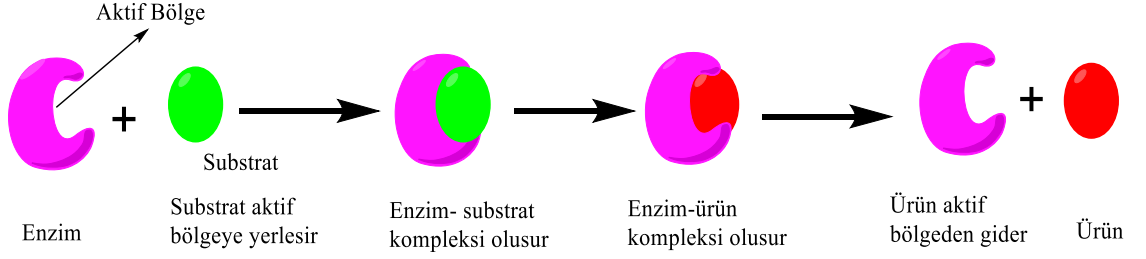
6. Ligazlar: Bu enzimler ATP kullanılarak iki molekülün birleştirilmesini sağlarlar.



Organizmalarda gerekli moleküllerin yıkım ve yapımı, kas kasılması, sindirimi, hücre solunumu gibi önemli işlemlerde hücre içi tepkimeler tarafından meydana gelmekte ve enzimlerin katalitik etkisiyle oluşmaktadır (Keha and Küfrevioğlu 2005).

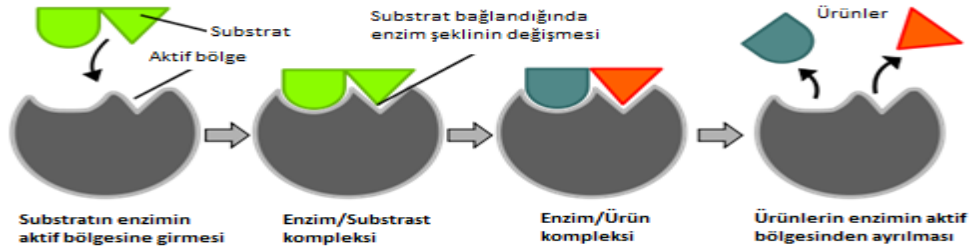
Substrat ile Enzimin bağlanmasıyla ilgili iki model vardır;

1. Emil Fischer tarafından tanımlanan anahtar-kilit modelidir. Bu model substratın enzimin aktif kısmına anahtar kilit şeklinde bağlanmasını açıklamaktadır.



Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasında anahtar-kilit modeli

2. Daniel Koshland'ın ileri sürdüğü indüklenmiş-uyum modelidir. Substrat olduğu zaman, enzim substratı kendine çeker. Enzim, bağlandığı substratı parçalayarak ürüne dönüştürür ve reaksiyon bittiği zaman, enzim hiç değişmeden ayrılır (Nelson and Cox 2005; Megep 2006).



Şekil 1.2. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş-uyum modeli

Substrat-enzim kompleksi oluşumunu engelleyen ve enzim aktivitesini azaltan bileşiklere “enzim inhibitörleri”, bu olaya da “enzim inhibisyonu” denir. Enzim aktivitesine; enzim derişimi, substrat derişimi, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, aktivatörler ve inhibitörler etki eder. Enzimler protein yapısında oldukları için çevresindeki sıcaklık değişikliğinden etkilenirler. Enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir (30-40°C). Sıcaklık değişikliği ise enzimin çalışma hızını negatif etkiler (Keha and Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2013).

Biyoteknoloji çalışmalarında enzimlerin yüksek sıcaklıklarda inaktif olmaları büyük bir sorun oluşturmaktadır. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için

çalışma koşulları altında aktivitelerini korumaları gerekmektedir. Enzimler immobilizasyon teknikleri, protein mühendisliği, stabilize edici katkı maddeleri kullanılarak uygulama koşulları altında daha dayanıklı bir yapıya getirilebilmektedir (Altıkatoğlu *et al.* 2009).

Enzimler destek rolü oynayan materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen şekle getirilmelerine immobilizasyon denir. Ayrıca enzimler, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer şeklinde katılmasıyla ve suda çözünmeyen mikro kapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Telefoncu 1997).

İmmobilize enzimin serbest enzime rağmen üstünlükleri;

- ✓ Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- ✓ Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- ✓ Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- ✓ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- ✓ Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- ✓ Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- ✓ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ✓ Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- ✓ Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır (Telefoncu 1997).

Enzimatik reaksiyonların hızlarını etkileyen faktörler; Sıcaklık, pH, Zaman, Substrat konsantrasyonu, Enzim konsantrasyonu ve inhibitör olarak altı gruba ayrılır.

Sıcaklık: İn vitro koşullarda enzim reaksiyonları çoğu zaman 37-40°C arasında yapılır. Enzimatik tepkimeler üzerinde sıcaklığın hızı doğrudan arttığında artar.

pH: Enzimler katalitik etki yaparken çevrenin hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişebilmektedir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya optimum pH'ı adı verilir (Altunkaya ve Gökmen 2011).

Zaman: Enzim tarafından gerçekleşen bir reaksiyon koşulunda reaksiyonun hızı giderek düşmektedir.

Substrat konsantrasyonu: Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belli bir seviyeye kadar substrat konsantrasyonu ile artmaktadır. Enzimin ulaştığı maksimum hıza V_{max} denir.

Enzim konsantrasyonu: Ortamdaki enzim molekülü ne kadar fazlaysa tepkime o kadar hızlı yürümektedir.

İnhibitör: İnhibitörler enzimatik reaksiyonların hızını azaltan maddelerdir (Lehninger *et al.* 2005; Daniel *et al.* 2010).

İki tip inhibisyon mevcuttur, birincisi dönüşümlü inhibisyon, ikincisi dönüşümsüz inhibisyonudur. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör aktif merkeze kovalent olarak bağlanarak enzimi inaktif hale getirir. Dönüşümlü inhibisyonda ise inhibitör enzimle veya enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanır. Üç çeşit dönüşümlü inhibisyon tipi vardır (Lehninger *et al.* 2005).

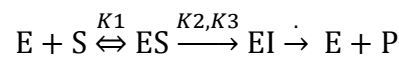
Bunlar;

- ✓ Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- ✓ Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- ✓ Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)

Bir canlıdaki parçalanma ve yapım (sentez) tepkimelerin tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ile gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla enzimler canlılığın devamı için gerekli biyolojik materyallerdir. Enzimler temizlik madde üretimi, gıda, ilaç, kimya endüstrisinde, boya, dericilik gibi çeşitli alanlarda, biyoteknoloji ve biyoloji gibi bilim dallarında, tarım, tıp, veterinerlik ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (Wolfgang 2004).

Enzim moleküllerinde, bir substratın bağlanabileceği aktif bölge bulunmaktadır. Fazla oranda substrat derişiminde aktif bölgelerin tümü substrat tarafından doldurulurlar. Michealis-Menten kinetiği, tersinir substrat-enzim yapısının dağılması ve oluşmasını basamaklarını kapsayan basit reaksiyon şemaları ile tespit edilmektedir. Michaelis-Menten grafiği üç kısımdan oluşur. İlk bölgede substrat konsantrasyonu az miktarda olduğu için ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusal şeklindedir. İkinci bölgede ise oldukça çok miktarda substrat konsantrasyonlarında ihmal yapılmaz, o yüzden reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede ise $[S] \ll K_m$ 'dir. Dolayısıyla $V=V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla yürür.

Enzim kinetiği reaksiyonu şu şekilde belirlenir; (Menten and Michaelis 1913).



Michaelis-Menten formülü şu şekilde gösterilir; (Menten and Michaelis 1913).

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

Yukarıdaki Michaelis-Menten fomülünü tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla gerçekleşen *Lineweaver-Burk* denklemi, en çok kullanılan denklemlerdendir (Lineweaver and Burk 1934).

Lineweaver-Burk denklemi;

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

1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

1.1.1. Serbest radikaller ve etkileri

Bu bileşikler; yapılarında tek sayıda elektron içeren, açık elektron kabuğu konfigürasyonuna sahip olan molekül veya atomdur. Bunlara "Reaktif Oksijen Türleri (ROS)", "serbest radikal", veya "oksidan moleküller" denir, diğer bir tanımlama ile yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşiklerdir. Canlı organizmalarda çeşitli sebeplerle pek çok şekilde ROS oluşabilmektedir.

Serbest radikaller; enerji kaynağı için ATP'nin sentezlenmesiyle oluşmaktadırlar. Yağlar, proteinler ve karbohidratların oksijeni ile reaksiyona girerek bu biyomoleküllerinin yapısını bozarlar (Çakatay ve Kayalı 2006; Gülçin 2012; Gülçin and Beydemir 2013).

Genelde ROS'lar bazı enzim sistemleri (katalaz ve süperoksit dismutaz) ve suda çözünebilen bazı protein yapısında olmayan moleküller (tokoferol ve ürik asit) tarafından durdurulur (Lichtenthaler *et al.* 2003).

Serbest radikaller genel metabolik reaksiyonlar sırasında oluşmasının yanı sıra, başka etkenler sonucunda da meydana gelebilir. Bu oluşan etkenler arasında çoğu kimya sanayinin gelişmesi ile farklı yerlerde kullanılan pestisitler, herbisit, petrokimya ürünleri ve çözücüler sayılabilir. Bu ürünler bağışıklık sistemine ve somatik hücrelere saldıran serbest radikallerin oluşumunu artırarak sağlık sorunlarına sebep olur (Temur 2006).

1.1.2. Antioksidanlar

Antioksidan bileşikler, serbest radikallerin bitkilere zarar veren moleküllere karşı koruyucu ve bunun yanı sıra lipit peroksidasyonunun hızını azaltıcı veya tamamen engelleyici seviyede etki etmektedir (Gülçin *et al.* 2005; Gülçin 2008).

Sanayide doğal olan antioksidanlar sentetik yapılan antioksidanlara tercih edilir. Bitkilerde mevcut olan fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğe sahip olması; serbest radikallerin kaldırılması, metal iyonlarla bazı bileşikleri oluşturulmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Gülçin *et al.* 2005, 2006). Onun için uzun süreliğine gıdaların tat ve koku gibi özelliklerini artırmak nedeniyle katkı maddesi olarak gıdalara doğal aromatik bitkilerin ve baharat katılması önem kazanmaktadır (Elmastaş *et al.* 2005).

Endüstriyel çalışmalarda gıda maddelerinin depolanma ve stabilite özelliklerini artırmak için çoğunlukla BHT, BHA ve PG (Öztaşkın *et al.* 2015) gibi sentetik yapılmış antioksidanlar kullanılmaktadır. Ayrıca, antioksidan için kullanılan molekülerin muhtemel toksisiteleri sebebiyle, son zamanlarda ilgili doğal antioksidan bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır (Bera *et al.* 2006).

Antioksidanlar ekzojen ve endojen olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlar, hasarlı atomları kaldırıcı fosfolipaz ve proteaz gibi enzimler, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, ferritin ve transferrin gibi bazı metal bağlayıcı proteinler, ürik asit gibi küçük moleküller ve glutatyon gibi bileşiklerdir. Ekzojen antioksidanlar ise sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu endojen antioksidanların hepsi zararlı olan reaktif türleri gidererek ROS'nin zararlı tesirlerinden metabolizmayı korumaktadırlar (Annakkaya 2012).

1.1.3. Antioksidan enzimler

Antioksidan enzimler, canlılarda hücrelere zarar veren reaktif ürünleri (serbest radikaller) etkin bir forma dönüştürerek çok az toksisiteli veya toksik özelliği olmayan ürünler oluştururlar. Böylece organizma aktif oksijen ve serbest radikal türlerinden etkilenmiş olur. Ayrıca reaktif bileşiklerin (reaktif oksijen türleri vb.) olduğu durumlarda, sağlıklı bir hayat için antioksidan enzimleri önemli kılınlar (Sroka and Cisowski 2003; Xu *et al.* 2014).

Antioksidan enzimler; katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi dört grupta olan enzimler serbest radikalleri kaldırarak savunma sisteminde primer olarak görev yaparlar (Jariteh *et al.* 2015; Kiani-Pouya 2015). İndirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinde rol oynayan enzimlere oksidoredüktazlar denir ve katalaz enzimi, oksidoredüktazların (dehidrojenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, hidroperoksidazlar) bir grubu olan hidroperoksidazlar serisinde yer alır (Nicholls *et al.* 2000).

Katalaz enzimi, toksik olan hidrojen peroksiti canlı hücrelerden kaldırmada önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, canlı hücrelerde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksiti önce moleküler oksijene ve suya ayırmaktadır. Katalaz enzimin diğer bir görevi ise; formik asit, fenol, alkol ve formaldehid gibi moleküller üzerinde peroksidatik aktivite göstermesidir (Shahidi 1996).

Glutatyon (GSH, γ -glutamil sisteinil glisin), glisin ve sistein ile glutamik asit amino asitlerinden oluşan sülfhidril gruplu tripeptid yapısında olup hücre sitoplazmasında olan temel antioksidan moleküldür. Canlı hücrelerinde yükseltgenmiş (GSSG) ve indirgenmiş (GSH) olarak bulunmaktadır. Glutatyon reaksiyonları en önemli antioksidan sistemlerin savunma mekanizmalarından birisidir. Ayrıca Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi, hücredeki H_2O_2 molekülü detoksifikasyonundan sorumlu önemli rolü bulunan bir enzimdir (Batçioğlu *et al.* 2002). Glutatyon peroksidaz enzimi, hücrede glutatyonun indirgeyici gücünü kullanarak hidrojen peroksitin ve doymamış yağ asitlerinden ortaya

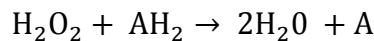
çıkan organik hidroperoksitlerin deaktivasyonunda görev alır. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), selenyum bağı olmayan ve selenyum bağı olarak iki şekilde bulunmaktadır (Cnubben *et al.* 2001).

Süperoksit dismutaz enziminin ilk yaptığı iş, canlı hücrelerde ve dokularda oluşan ROS'ların zararlı tesirlerini ortadan kaldırmaktır. Süperoksit dismutaz enzimi, önemli bir süperoksit kaldırıcısıdır. Bu enzim daha çok ekstrasellüler matrikste hücre yüzeylerinde bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz enzimi, ortamdaki oksidatif strese karşı canlı hücreleri zararlı bileşiklerden korumada en etkili enzimdir. Bu enzimin aktivitesi, vücutta Haber-Weiss tepkime substratlarının (H_2O_2 ve O_2) konsantrasyonlarını belirlemektedir (Sheng *et al.* 2004).

Glutasyon redüktaz (GSSG-Red) enzimi, hücrelerde glutasyon peroksidaz aracılığıyla hidroperoksitlerin sonunda gerçekleşen okside glutasyonun (GSSG) yine indirgenmiş glutatona (GSH) çevrilmesini gerçekleştirir. Bu reaksiyonda, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) rol oynamaktadır (Aksoy *et al.* 2016).

1.2. Peroksidazlar (POD, E.C.1.11.1.7)

Oksidoredüktaz sınıfına ait olan peroksidaz enzimi; yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen bir enzim grubudur. Bu enzim Uluslar Arası Biyoteknoloji Derneği (International Union of Biotechnology-IUB) tarafından da EC 1.11.1 formunda kodlanmıştır. Peroksidazlar, oksijenli solunum oluşturan canlı organizmaların hücrelerinde bulunan H_2O_2 moleküler oksijen ve suya çevirerek hücreyi bu molekülün oksidatif etkisinden korurlar (Şişecioğlu *et al.* 2010).



Bitki peroksidazlar üst familya olarak üç gruba ayrılmaktadır:

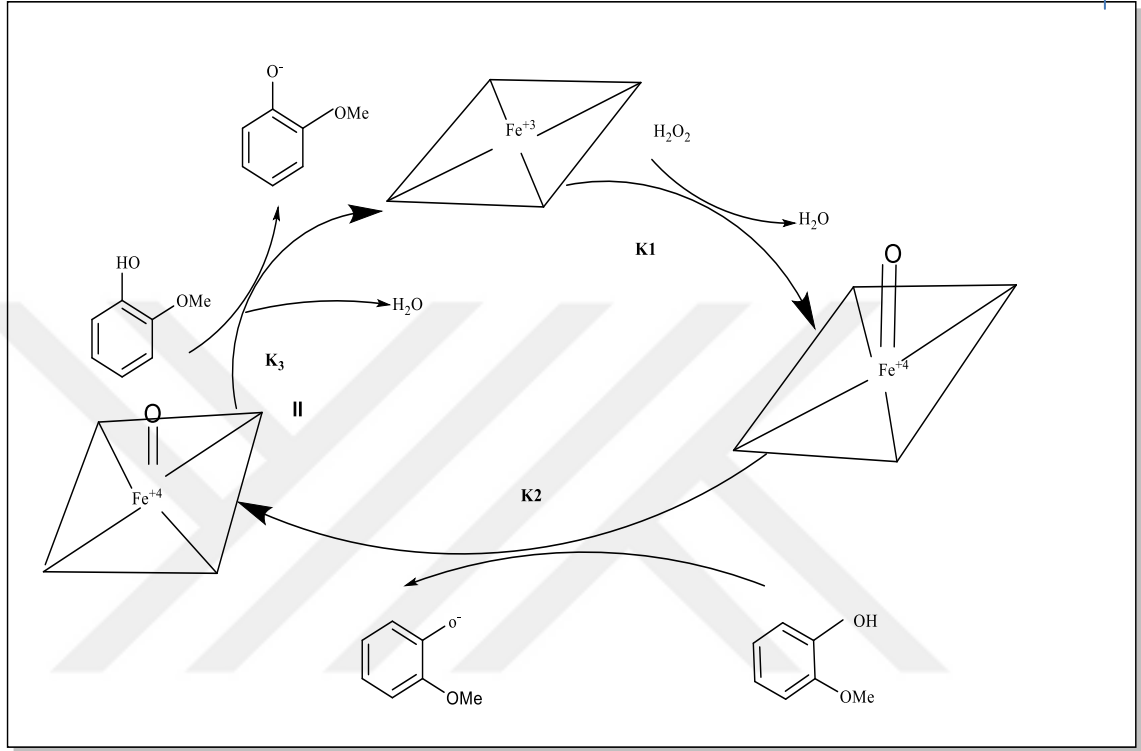
1. grup peroksidazlar daha yüksek bitki peroksidazlarıdır.
2. grup peroksidazlar prokaryot kaynağının intrasellüler peroksidazlarıdır,
3. grup ise mantarimsı peroksidazlardan oluşan enzimlerdir (Soda *et al.* 1991).

Peroksidazlar, H_2O_2 molekülü kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu katalizlerken, hidrokinonlar, fenoller, hidrokinonid aminler gibi fenolik ve fenolik olmayan çok miktarda molekülün dehidrogenasyonunu da katalizlerler. Ayrıca bu bileşikler arasında 2-toluidin, 2-kresol, pirogallol, guaiakol, 4,4'-diamino difenilen amin, lökomalaşit yeşili, propiyonil promozin, o-tolidin, benzidin, di-o-anisidin ve bazı azo-boya çeşitleri bilinmektedir (Fortea *et al.* 2011; Fodil *et al.* 2012).

Bu enzim hücre duvarı bileşenleri formlarına kovalent ya da iyonik olarak bağlanıp bitki hücreleri içinde bulunurlar. Amino asitlerin yapılarına ve dizilişlerine göre bitki, hayvan, bakteri ve mantar peroksidazları olmak üzere birkaç gruba ayrılmaktadır. Bu enzim çeşitlerinin farkları aminoasit dizilişlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca POD'un; optimum pH, spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler ve inhibitör tepkimeleri gibi biyokimyasal özellikleri açısından farklılık gösteren birçok izoenzimleri bilinmektedir. Bu enzimler bitkilerin gelişimini de kontrol ederler (Fric 1976; Şişecioğlu *et al.* 2010). Bitkisel peroksidazlar, monomerik glikoprotein yapısındadırlar. Bu grubun japonya turpu, tatlı turp, brokoli, hurma yaprakları, arpa, lahana, bezelye, karnabahar, pamuk, çilek gibi pek çok bitki peroksidazını içeren geniş bir bitki sınıfını kapsamaktadır (Deepa and Arumughan 2002; Thongsook and Barrett 2005; Nadaroğlu 2009).

Birinci sınıfa ait olan intrasellüler peroksidazlardır. Mitokondriyal elektron transport metabolizmasında bulunan ve toksik peroksidazlara karşı koruma sistemini sağlayan, çözünebilir bir protein olan maya sitokrom c peroksidazını; gelişmiş bitkilerdeki sitozolde ve kloroplasttaki hidrojen peroksidin kaldırılmasında rol oynayan anahtar enzim olan askorbat peroksidazları, hem peroksidaz hem de katalaz aktivitesi içeren bakteriyel peroksidazları içermektedir. İkinci sınıfta ise, mangan-peroksidazlar ve lignin peroksidazlar gibi salınan fungal peroksidazları içermektedir. Bu enzimler ligninin katabolizmasında rol alan monomerik glikoproteinlerdir. Mangan peroksidaz enzimi

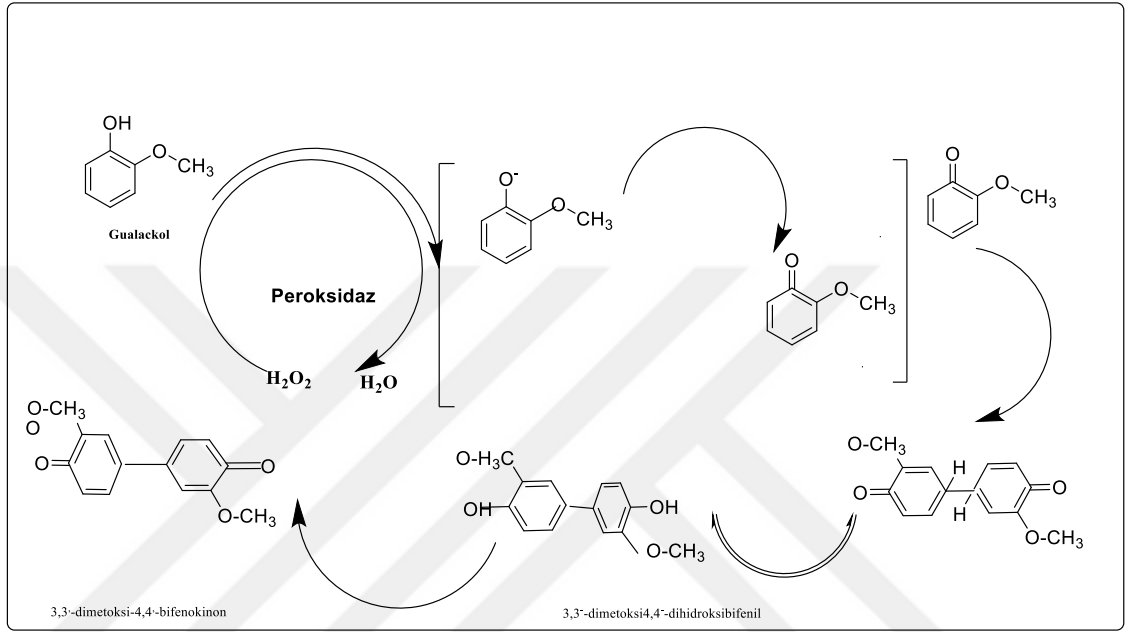
Mn^{2+} indirgeyici substrat olarak görev yapmaktadır (Mittler and Zilinskas 1994; Shigeoka *et al.* 2002; Shi *et al.* 2008; Al-Senaïdy and İsmael 2011; Fodil *et al.* 2012).



Şekil 1.3. Peroksidaz enzimin reaksiyon mekanizması (Turgut 2009)

Peroksidaz enzimi, farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bu enzimin; bilgisayar çipleri, yapıştırıcı, tıpta kullanılan teşhis kitlerinin üretimi, otomobil parçalarının üretimi yada endüstriyel atık suların temizlenmesi gibi farklı yerlerde yararlı olduğu tespit edilmiştir. Kağıt, petrol, tekstil ve hatta kömür gibi sanayide kullanılan zararlı kimyasalların doğaya aktarılmadan önce, su çözücüsünde çözünebilen ve daha az molekül kütleli moleküllere çevrilmesinde, alfa toksin B1 maddesinin zararının kaldırılmasında, atık ve içme sularında olan aromatik amin gruplarını ve kimyasallarının giderilmesinde peroksidaz çeşitleri sıkça kullanılmaktadırlar (Hsu *et al.* 2012). Peroksidaz enzimi lakkaz enzimiyle, sanayide ağartma işlemlerinde kullanılan H₂O₂ ve boyama işleminde kullanılan çok molekül kütleli boyaların parçalanmasıyla kaldırılmasında kullanılmaktadır (Topçular 2006). Günümüzde sanayide POD enzimi, deterjan formülasyonunun katkı bileşiği olarak da kullanıldığı belirlenmiştir. Peroksidazlar aynı

zamanda organik bileşiklerin stereo spesifik biyotransformasyonunu geliştirmek, farklı polimerleri sentezlemek için biyo tedavide sıkça kullanılmaktadır (Humaira and Qayyum 2010).



Şekil 1.4. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması

POD enzimleri farklı substratları kullanarak canlı hücrelerin hayatını korumak için önemli rol oynamaktadırlar, örnek olarak biyoloji savunma sistemlerinde ve tıpta görev yaparlar. Bu enzimler kendine ait substratlardan yararlanarak organik hidroperoksitlerin azalmasını kataliz ederler. Sanayide bu enzimlerin, ilaçların sentezinde ve polimer bileşiklerin biyosentezinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Kalın *et al.* 2014).

Bitki POD enzimleri çok farklı bitkilerden saflaştırılmıştır. Örnek olarak *Beta vulgaris*, *Sources viz., Leucaena leucocephala, Vigna mungo, Viscum angulatum, Solanum melongena fruit juice, Roystonea regia, Tamarix hispida, and Jatropha curcas* suşları verilebilir. Ayrıca POD'lar bu bitkilerde bulunan zararlı maddeleri zararsız hale dönüştürülmesini sağlamaktadırlar. Yüksek bitkilerde genelde çeşitli POD enzimlerin

izoformları (asidik, bazik ve nötral POD'lar) mevcuttur (Balasubramanian and Boopathy 2013).

POD enzimleri hem grubu içeren metal proteinlerdir. Bu enzimler bazı metal iyonları ile aktif veya inhibe olurlar; bu yüzden çalışmalarda metal iyonların enzimler üzerine etkileri incelenmiştir. Örneğin, *Ricinus communis* buğday türünde olan peroksidaz enzimi Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları ile aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Sodyum azid ve β -merkaptotanol gibi maddeler POD enzim üzerine inhibe etki gösterdiği, çilek ve kavundan saflaştırılmış POD enzimin üzerine deterjan maddelerin inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir (Pandey *et al.* 2012).

POD geniş bir alanda birçok bitkide bulunmakta ve ticari olarak en önemli kaynağının at turpu köklerinde olduğu bilinmektedir. Ayrıca yeni analitik yöntemler ile tespit edilen çeşitli POD enzim türlerinin potansiyel olarak endüstriyel proseslerin oluşmasında rol oynamaktadır (Gülçin and Yıldırım 2005).

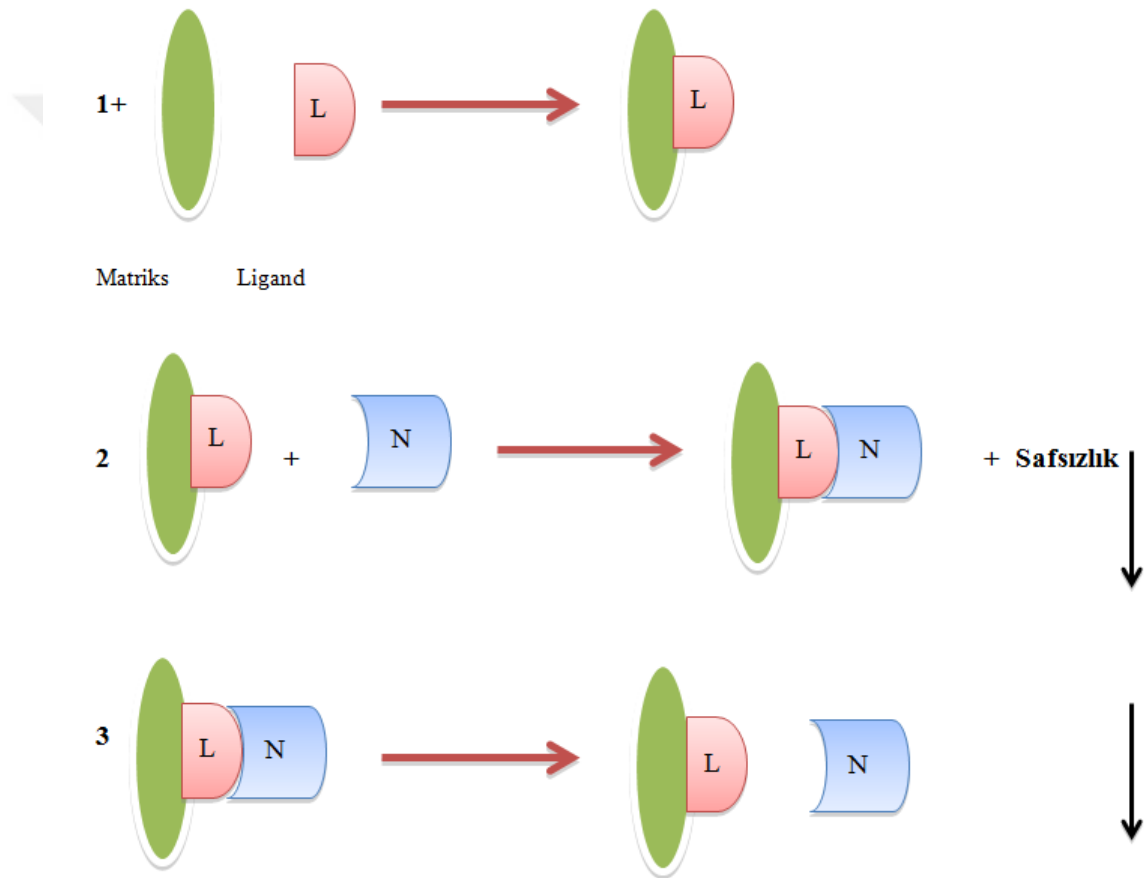
1.3. Afinite Kromatografisi

Kromatografi, bir karışımda mevcut olan maddelerin, biri hareketli diğeri sabit faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde saflaştırılması ve ayrılması yöntemidir. İlk kez botanikçi olan Mikhail Tsvett (1903) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Tsvett bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli moleküllerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bantlar bulunduğundan, bu ayırma yöntemine kromatografi ismini vermiştir (Wilchek and Chaiken 2000).

Biyomoleküllerin iyonik kuvvet, pH, tuz, sıcaklık, çözücü veya polimerler ile çöktürülerek ayrılmasına dayanan önceki metotlar zamanla yerini biyolojik özelliklere dayalı ayırma metotlarına vermiştir. Dolayısıyla afinite kromatografisi, proteinlerin kimyasal veya fiziksel özelliklerinin yerine biyolojik kullanılmalarına göre ayrılmalarını gerçekleştiren bir yöntemdir (Wilchek and Chaiken 2000; Zou *et al.* 2001). Bu metotta immuno afinite, biyoafinite, lektin afinitesi, DNA afinitesi, boronat afinitesi,

biyomimetik afinite ve metal iyonu afinitesi gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bu metotlar enzim, protein, karbonhidrat, vitamin gibi moleküllerin ayrılmasında, antikor ve antijen saflaştırmalarında kullanılmaktadır. Bu metodun en iyi avantajı, uygun koşullarda hedef proteinin tek basamakta saflaştırılabilmesidir (Hage 2006).

Afinite koromatografisinin genel prensibi Şekil 1.5’de özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Afinite kromatografisinin genel prensibi (1)'de ligand matrikse kovalent bağlanması, (2)'de numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir.

Bu yöntemde, önemli olan biyomolekülün, çözünme özelliği olmayan bir destek materyal (matriks) üzerine immobilize olması ve belirlenen molekülün tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından dönüşümlü olarak adsorbe edilmesine dayalı olmasıdır (Kumpalume and Ghose 2003).

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar (Axen and Ernback 1971)

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Antikor	Virüs, Antijen, hücre
Enzim	Kofaktör, substrat, inhibitör,
Lektin	Glikoprotein, polisakkarit, hücre, hücreyüzey reseptörü
Hücre	Lektin, hücre yüzeyi spesifik proteini,
Nükleik asit	Histon, komplementer baz dizisi, Nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Vitamin, Hormon	Reseptör taşıyıcı protein

1.3.1. Matriks

Afinite kromatografisinde matriks olarak; Sepharose, Sephadex ve Bio-gel gibi çeşitli jeller kullanılmaktadır. Bu yöntemde en fazla kullanılan Sepharose, inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jelidir. Agaroz jeli, biyolojik aktif olan moleküllerin immobilizasyonu çalışmalarında düzgün bir matriks için gerekli olan tüm özelliklere sahiptir. Sepharose kullanarak hazırlanan adsorbanlar: deterjanlar, düşük ve yüksek pH, disosiye yapan bileşikler gibi olumsuz koşullara dirençlidir. Organik çözücülerin ve guanidin hidroklorür, gibi parçalayıcı bileşiklerin gerektiği koşullarda, kovalent halde çapraz şeklinde bağlanmış jel olan Sepharose-CL en uygun ortamdır. Örnek olarak; Blue Sepharose-CL-6B adsorbanları ve protein A-Sepharose-CL-4B Sepharose-CL kullanarak hazırlanmaktadır (Axen and Ernback 1971).

1.3.2. Ligand

Afinite kromatografisi yönteminde ligand seçimi iki faktör tarafından etkilenmektedir. Birincisi, ligand protein saflaştırılması için tersinir ve spesifik bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama afinitesini bozmadan matriks bileşiğine tutunmasını sağlayan ve kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Bu yöntemde ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözeltide 10^{-4} - 10^{-8} M arasında olması uygundur. 10^{-4} M'dan daha fazla ayrışma sabitlerini içeren etkileşmeler (mesela

zayıf bir inhibitör ve bir enzim arasındaki ilişki gibi), afinite kromatografisi için ideal değildir. Ayrıca 10^{-8} M'dan daha az ayrışma sabitlerini içeren bileşiklerden (mesela bir reseptör ve hormon arasındaki ilişki gibi) oluşan afinite kromatografisinde ise, bağlı olan maddenin inaktive olmadan elüsyonu zor olacaktır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

1.3.3. Uzantı kolu

Canlı organizmalarda enzimin aktif bölgesi normalde molekülün en iç kısmına yerleşmiştir. Küçük ligandlar (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matriks bölgesine bağlandıktan sonra hazırlanan adsorbanlar, ligand ile matrikse bağlanan moleküler arasında sterik engeller için düşük ayırma kapasitesi göstermektedirler. Ayrıca adsorbanlar bu koşullarda uzantı kolunun etkili bağlanması için ligand ile matriks arasına girerler.

Aktif bölge



Uzantı kolu

Şekil 1.6. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü

Uzantı kolunun uzunluğunun ideal olması dikkate alınmaktadır. Fazla kısa olursa, uzantı kol etkisiz olur ve ligand numunedeki molekülü bağlamak için uygun olmaz. Tersine çok uzun olursa, spesifik olmayan bağlanmalar çok olur ve ayırmanın seçicilik yeteneği azalır (Ocarra *et al.* 1974).

1.3.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi

Ligand ile matriksin kovalent bağlanma işlemi; normal bağlanma olayını en aza indirmek için, molekölün en az etkili olan kısmına yapılmalıdır. Örnek olarak amino grupları iğer bir enzim inhibitörü, matriks kısmına amino atomları aracılığıyla bağlanabilir; dolayısıyla inhibitörün enzimle spesifik bağlanma afinitesi korunmuş olmaktadır. Aynı zamanda amino grupları da bağlanma tepkimesine girerlerse, bu koşulda gerekli olmayan diğer bir grupla bağlamak zaruri olacaktır (Keha 1981).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Erdem *et al.* (2015), Afinite kromatografisi kullanılarak beyaz lahanaya bitkisinden tek basamakta peroksidaz enzimini 24,7 kat %4,3 verimle ve 964,5 EU/mg spesifik aktiviteyle saflaştırmışlar. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak enzimin molekül kütlesini 73,2 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığı ise sırayla 6,5, 30°C bulunmuştur. Guaiacol substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri sırayla 3,19 mM ve 0,2 EU/mL hesaplanmıştır. 4-Amino benzohidrazit maddesinin inhibitör olarak enzim üzerine etkisi incelenmiş ve IC_{50} ile K_i değerleri sırayla 0.517, 0.994±0.453 mM olarak tespit edilmiştir.

Asgher *et al.* (2016), mutasyon oluşturulmuş özel olan *Trametes versicolor* IBL-04 mantar suşundan mangan peroksidaz enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapmışlardır. Bu çalışmada enzim iyon değişim ve jel filtrasyon kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırmışlardır. Daha sonra SDS-PAGE tekniği ile enzimin molekül kütlesini 43 kDa olarak belirlemişlerdir. İlgili enzimin optimum pH değeri 5,0 ve optimum sıcaklığı ise 40°C olarak bulunmuştur.

Rudrappa *et al.* (2007), genetik olarak transforme olmuş kırmızı pancar'dan amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi tekniği kullanarak POD enzimini saflaştırmışlar ilgili enzimin en yüksek aktivitesini pH'a 5,0'da göstermiştir. POD enzimi 20 dakikada ve 70°C sıcaklıkta %70 aktivitesini kaybetmemiştir. Ayrıca bu çalışmada saflaştırılmış olan enzim üzerine çeşitli substratların etkisi incelenmiş ve en yüksek aktiviteden düşük aktiviteye sırayla ortodiazidin> 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6 sülfonik asit> guaiacol bulunmuştur. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE kullanılarak 45 kDa bulunmuştur.

Kalın *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada şalgam ve karaturptan peroksidaz enzimini afinite kromatografisi yöntemini kullanarak tek basamakta saflaştırmışlar. Yeni sentezlenen 4-amino benzohidrazit kolonunda uzantı kolu olarak kullanılan *L*-tirozin

amino asiti CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye bağlanmıştır. Bu çalışmada karaturp ve şalgam bitkileri için enzimin saflaştırma kat sayıları sırayla 40,3 (%10,6 verim) kat ve 269,3 (%9 verim) kat bulunmuştur. TBR-POD ve şalgam-POD enzimlerin molekül kütleleri SDS-PAGE sonucunda 67,3 kDa ve 65,8 kDa olarak hesaplanmıştır. Guaiakol substratı kullanarak karaturp ve şalgam için K_m ve V_{max} değerleri sırayla 24,88 mM ve 3,23 EU/mL; 4,09 mM ve 0,797 EU/mL olarak bulunmuştur. H_2O_2 substratı kullanılarak karaturp ve şalgam için K_m ve V_{max} değerleri sırayla 3,247 mM ve 0,799 EU/mL; 12,49 mM ve 4,055 EU/mL hesaplanmıştır. Bu iki enzimde 4-amino benzohidrazit inhibitör olarak kullanılmasında inhibisyon tipi yarışmasız olarak belirlenmiştir.

Al-senaïdy and Ismael (2011), tarafından peroksidaz (POD) enzimini, Sefadeks 200 ve DEAE-sefaroze iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu çalışmada enzimin optimum pH'sını 5,0-6,0 arası olarak belirlemiş ve enzimin molekül kütlesini 55 kDa bulmuşlardır. Aynı zamanda K_m ve V_{max} parametreleri H_2O_2 ve guaiakol substratları için sırasıyla 0,045 ve 0,77 mM olarak belirlenmiştir.

POD enzimini çok sayıda bitki dokularından saflaştırılmıştır. Lahana (McLellan and Robinson 1987), karabuğday tohumu (Suzuki *et al.* 2006), *Leucaenaleucocephala* ağacı meyvesi (Pandey and Dwivedi 2011), kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) (Rudrappa *et al.* 2007), soya fasulyesi (Chen and Mabrouk 1999), brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), ısırgan otu (Gülçin 2002), vanilya çekirdeği (Marquez *et al.* 2008), kavun (Rodriguez *et al.* 2000), hurma yaprakları (Deepa and Arumughan 2002; Al-Senaïdy and Ismael 2011), at turpu (Lavery *et al.* 2010), marula meyvesi (Mdluliet *et al.* 2005), mısır (Mika *et al.* 2008), kırmızı biber (Martinez *et al.* 2008), çavdar yaprakları (Murakami *et al.* 2007), hindiba bitkisi (Boeuf *et al.* 2000) papaya meyvesi (Pandey *et al.* 2012), zeytin (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009), ve karalahanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), saflaştırma işlemlerini örnek olarak verebiliriz.

Lavery *et al.* (2010), POD enzimini at turpundan fenil Sefaroz CL-4B kromatografisini kullanarak 291 kat ve %71 verimle saflaştırmışlardır. Bu enzimin spesifik aktivitesi ve

molekül kütlelerini sırayla 772 U mg^{-1} ve 40 kDa olarak hesaplamışlardır. HRP enzimin optimum pH'sı $7,0$ ve optimum sıcaklığı ise 30°C şeklinde bulunmuştur.

Si and Cui (2012), yaptıkları çalışmada *Perenniporiasubacida*'dan peroksidaz enzimi; amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve sefaroz GL-6B afinite kromatografisini kullanarak üç basamakta enzimi saflaştırmışlardır. Bu çalışmada enzimin optimum pH'sı $5,5$, molekül kütlesi ise 43 kDa olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda substrat olarak *n*-Propanol kullanıldığında, dithiothreitol, *L*-sistein, sodyum azid ve EDTA moleküllerinin POD enzimini inhibe ettiği, Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} ve K^+ metal iyonlarının ise aktive ettiği belirlenmiştir. Ayrıca tekstil çalışmalarında kullanılan boyar bir bileşik olan nötral kırmızı ile POD enzimin tepkimesi sonucunda $\%75,31$ oranında renksizleşme tespit edilmiştir.

Gülçin ve Yıldırım (2005), yaptıkları bir çalışmada, *Brassica oleracea var. acephala* bitkisinden POD enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve CM-sefadeks kolon materyalini kullanarak enzimi saflaştırmış ve SDS-PAGE jel elektroforezi yöntemini kullanarak enzimin molekül kütlelerini 95 kDa olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada optimum sıcaklık, optimum pH ve stabil pH değerlerini sırayla 40°C , $7,5$ ve $6,5$ olarak belirlemişlerdir. İlgili enzimin K_m değeri guailkol ve H_2O_2 substratları kullanılarak sırayla $5,5$ ve 1 mM bulunmuştur.

Zeng *et al.* (2013), iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri ile lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini *Phanerochaete chrysosporium* mantar türünden saflaştırmışlardır. LiP ve MnP enzimlerin molekül kütleleri sırayla 36 kDa ve 45 kDa olarak bulunmuştur. Optimum pH LiP ve MnP için sırayla $3,0$ ve $4,5$ olup 30°C 'de iki enzimde en yüksek peroksidaz aktivitesi göstermiştir. Saflaştırılan MnP enzimi, Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Hg^{2+} metal iyonları tarafından inhibe olduğu; Mn^{2+} , Ca^{2+} ve Cu^{2+} iyonları tarafından aktive olduğu belirlenmiştir. LiP enzimi ise Ca^{2+} , Na^+ ve Co^{2+} metal iyonları tarafından aktive; K^+ , Hg^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} metal iyonları tarafından inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Mdluli (2005) Marula meyvesinden DEAE iyon değişim koromatografisi ve Sefadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisini kullanarak POD ve Polifenol oksidaz enzimlerini saflaştırmıştır. Enzimin moleköl kütlesi 71 kDa, İzoelektrik noktası 5,43 ve optimum pH'sını 4,0'da bulmuştur. K_m değeri ABTS'nin substrat olarak kullanılmasıyla 1,77 mg/mL şeklinde tespit etmiştir.

Başka bir çalışmada, horseradish POD etkisi ile azo boyar madde "Naftol Blue Black'in giderilmesi araştırılmıştır. Bu çalışmada saf enzime göre çevre koşulları altında daha dayanıklı olan, HRP dekstran kovalent konjugatı kullanılmıştır. Reaksiyon zamana bağlı olarak alınan absorpsiyon spektrumları yardımıyla izlenmiştir. Optimum koşulları belirlemek için reaksiyon farklı sıcaklık (25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70°C) ve pH'da (3–8) incelenmiştir. pH 6,0 7,0 ve 8,0'da reaksiyon 50°C'e sıcaklığının altında yavaş olarak gerçekleşip, fazla sıcaklıklarda ise enzimin denatürasyon olması sebebiyle boya giderme az izlenmiştir. pH 3,0'de ve daha az sıcaklıklarda ilk 10 dakikada boya giderme görünmüştür. En iyi sonuç, çalışılan tüm sıcaklıklar için %85 dolayında renk gidermenin ilk 5 dakikada gerçekleştiği pH 4,0 ve 5,0'de alınmıştır (Önder *et al.* 2009).

Aptiz and Vanpee (2001), çalışmalarında termostable intrasellüler olan POD enzimini, *B. Sphaericus*'dan saflaştırmışlar. Bu enzimin aktivitesini 2,4-dikolorofenol ve guaiakol substratları ile incelemişlerdir. Enzimin moleköl kütlesi 13 kDa (dimer) ve 26 kDa (tetramer) olarak bulmuşlardır. Enzimin optimum pH'sını ise 8,5 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, enzimin 90°C sıcaklığına ve pH 11,0'a kadar stabilitesini koruduğunu belirlemişlerdir.

Luo *et al.* (2010), yaptıkları çalışmada taze kesilmiş *Zizania Latifolia* bitkisinden POD enzimini anyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi ile izole etmişlerdir. İlgili enzimi 61,51 kat, %9,32 verimle saflaştırmışlardır. Ayrıca bu çalışmada POD enzimin üç izoformu (bir katyonik ve iki anyonik) saflaştırılmış ve SDS-PAGE yöntemi kullanılarak 20,6–22,1 kDa arasında moleköl kütlesine sahip oldukları bulunmuştur. Optimum pH ve optimum sıcaklıkları sırayla 6,0 ve 40°C olarak

tespit edilmiştir. Guailkol ve H₂O₂ substartları kullanılarak K_m değeri 10 mM belirlenmiştir.

Oliveira *et al.* (2009), tarafından yaptıkları bir çalışmada, MnP enzimini *B. Pumilus* ve *Paenibacillus* suşundan saflaştırmış veguaiacol, indulin AT, veratril alkol, liginosülfonik asit substratları kullanılarak aktivite ölçümü yapmışlardır. Saf MnP enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın; 30-60°C arası ve pH'nın 5-10 arası etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaların devamında MnP'nin 25-40 kDa kütleinde ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH ile sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 8,0 ve 25°C olduğunu tespit etmişlerdir.

Bergsten *et al.* (2009), reaktif mavi 214, reaktif kırmızı 198, reaktif mavi 21 boyar maddelerinin ilgili enzim vasıtasıyla atık sulardan gideriminde *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 kullanmışlardır. Bu çalışmada test izolatının direkt olarak kullanıldığı alanda; üç boyar 15 maddenin renginin, yüksek katalaz POD aktivitesi sonucunda etkin bir şekilde giderildiği görülmüştür.

Gong *et al.* (2015), peroksidaz ve polifenol oksidaz enziminin birbirleriyle olan ilişkisiyle ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada kestane çekirdeğinden ilgili enzimler saflaştırılmıştır. PPO ve POD enzimleri, DE-52 anyon-değişim kromatografisi tekniğiyle amonyom sülfat (30-80 g/100mL arası) çöktürmesi yapılarak enzimlerin aktiviteleri PPO ve POD için sırasıyla 4,6 ve 9,52 kat artırdığını bulmuşlardır. PPO ve POD enzimlerinin spesifik aktiviteleri ise sırasıyla 1,375 ve 16,500 EU/mg protein olarak bulunmuştur. SDS PAGE yöntemini kullanılarak PPO ve POD enzimlerin moleküler kütleleri sırayla 32,5 kDa ve 30,3 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzimler katekol ve 2-hidroksi fenol substratlarını kullanarak iki enzim için optimum pH değeri 7,0; optimum sıcaklık değeri ise saflaştırılmış PPO ve POD enzimleri için sırasıyla 40°C ve 50°C olarak bulunmuştur. Bu çalışmada PPO enzimi için katekol en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

Balasubramanian and Boopathy (2013), Hindistan cevizinin (*Cocos nucifera L.*) sıvı endosperminden peroksidaz enzimin saflaştırmışlar. Bu çalışmada iyon değişim, hidrofobik etkileşim, Sefadeks G75 kromatografileri ile enzimi 9,77 kat saflaştırmışlardır. SDS-PAGE yöntemini sonrası iki izoenzim (TCWP1 and TCWP2) izole edildiği için iki bant bulunmuştur. Optimum pH değerleri 4,5–5 arası ve optimum sıcaklık değeri ise 40°C olarak tespit edilmiştir.

Pandey *et al.* (2012), Papaya meyvesinden peroksidaz enzimini saflaştırmışlardır. Yetiştirilmiş Papaya meyvesinde peroksidaz enzimin aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi ile enzim 30,22 kat ve 44,37 yüzde verimle saflaştırılmıştır. Spesifik aktivitesi 68,59, SDS-PAGE işlemi sonucu trimer, dimer ve monomer olarak sırayla 240, 85, 70 kDa moleküler kütlelerini hesaplamışlardır. Enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığı sırayla 7, 40°C olarak bulunmuştur. *O*-diyanisidin, guailkol ve askorbik asit substratları kullanılarak K_m değerleri sırayla 0,125, 0,8 ve 5,2 mM olarak tespit edilmiştir. H_2O_2 için K_m 0.25 mM hesaplanmıştır. POD enzimini sodium azid, SDS, ve Triton X-100 maddeler tarafından inhibe olduğu, Ca^{2+} ve Mg^{2+} metal iyonları ile aktive olduğu tespit edilmiştir.

Somtürk *et al.* (2014), kırmızı lahanadan peroksidaz enzimini 4-amino benzohidrazid afinite kromatografisi yöntemiyle tek basamakta saflaştırmışdır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesini 3,550 EU/mg, yüzde verimini ise 2,9 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada enzimin moleküler kütlelerini SDS-PAGE yöntemini kullanılarak 69,3 kDa olarak tespit etmişlerdir. Optimum pH değeri 7,0 ve optimum sıcaklık ise 30°C olarak bulunmuştur. Guailkol substrat ile K_m ve V_{max} değerleri sırayla 0,048 mM ve 1,46 EU/mL şeklinde hesaplamışlar. 4-amino benzohidrazid maddesini inhibitör olarak POD enzim üzerine aktivitesi bakılmış ve sonuç olarak IC_{50} ve K_i değerleri sırayla 1,047 ve $0,702 \pm 0.05$ mM olarak belirlenmiştir.

Taslimi *et al.* (2013), yaptığı çalışmada POD enzimini Erzurum-Pasinler kaplıcasından izole edilen termofilik *Aerobacillus pallidus*'dan (P26) (Gen bank no:EU935591)

ekstraselüler olarak izole etmiş; CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi metotlarını kullanarak saflaştırmışlardır. Karakterizasyon işlemlerinde H_2O_2 , 4-metil katekol, pirogallol ve ABTS substratları kullanılarak her bir substrat için ayrı ayrı optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla $60^\circ C$, 7.0 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada en iyi aktivite veren pirogallol substratı kullanılarak stabilize pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmada her bir substrat için Lineveawer-Burk grafiklerinden V_{max} ve K_m değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Aynı zamanda POD aktivitesi üzerine etkileyen bazı metal iyonları araştırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi 31 kDa olarak bulunmuştur. Bu işlemde ilgili enziminin bazı tekstil boyalarının atık sularda giderilmesi çalışması da araştırılmıştır.

Goyal and Chugh (2013), Pearl millet hybrid HHB 94 (Bir tür sedef granülü) bitkisinden peroksidaz enzimini iyon değişim, jel filtrasyon ve sefadex G100 kromatografi çeşitleri ve amonyum sülfat çöktürmesi ile enzimi saflaştırmışlardır. Enzimi %41 verimle 33,2 kat saflaştırmışlar. Enzimin molekül kütlesini 30-31 kDa arasında bulmuşlardır. pH 5,6'da ve $30^\circ C$ 'de enzim maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. Stabil pH, 6-6,8 arasında ve stabil sıcaklık $35^\circ C$ altında tespit edilmiştir. O-diyansidin ve H_2O_2 substrat olarak kullanıldığında K_m değeri sırasıyla 0.10 ve 11 mM olarak hesaplanmıştır. DTT, β -merkaptolanol ve hidrazin bileşikleri ile enzimin fazla oranda inhibe olduğu, sodyum azid, sodyum boro hidrid, okzalik asit, EDTA, DTNB, Mn^{2+} , Na^+ ve K^+ molekülleri ile orta inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada peroksidaz enzimi Ca^{2+} ve Fe^{3+} metal iyonlarıyla aktivite olduğu tespit edilmiştir.

Hsu *et al.* (2012), yaptığı bir çalışmada, POD enzimin üç izoformlarını (POD-A, POD-B, POD-C) bambu kılıflarından PBE 94 tür olan kromatografi çeşiti ile saflaştırmışlar. POD-A basit bir peroksidaz enzim olduğu ve POD-B ve POD-C farklı izoelektrik pH'lara sahip oldukları ve asidik özellik gösterdikleri belirlenmiştir. Substrat olarak O-fenilenediyamin (OPD) kullanılarak optimum sıcaklık değerleri $45-55^\circ C$ arasında ve optimum pH değerinin ise 4,5 olduğu bulunmuştur. pH 4,5-10 arası, sıcaklığın ise $30-60^\circ C$ aralığında enzimlerin stabil oldukları belirlenmiştir.

Rojas-Reyes *et al.* (2014), yaptığı çalışmada Avokado meyvesinden POD enzimini Sefakril S200 jel kromatografisi ile izole edip ve molekül kütlesini 40 kDa, izoelektrik noktasını ise 4,7 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada altı çeşit substratın enzim üzerine etkisi incelenmiş ve ABTS kullanılarak optimum pH ile optimum sıcaklık değerleri sırayla 3,8, 51°C olarak belirlenmiştir. İnhibitör çalışmasında askorbik asit, DTT, β -merkaptoetanol, sodyum azid ve *L*-sistein gibi bileşiklerin enzim aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Şişecioglu *et al.* (2010), Türkiye’de mevcut olan siyah turpdan iyon değişim kromatografisi, CM-sefadeks ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleriyle POD enzimini 9.7 kat (%2 verimiyle) saflaştırılarak ve karakterizasyonu yapmışlardır. SDS-PAGE elektroforez metodu kullanılarak 66 kDa da enzimin tek bant gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada guailkol substratı kullanılarak enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, iyonik şiddet, stabil pH ve stabil sıcaklık değerlerini sırasıyla 6,0, 30°C, 1,0 M, 9,0, ve 60°C olarak bulmuşlardır.

Kumar *et al.* (2011), denizde bulunan bir bitkiden (*Euphorbia cotinifolia*) bakır-bitki peroksidazını (CCPP) anyon değişim kromatografisi tekniyle saflaştırmışlardır. İlgili enzimin molekül kütlesi ve optimum pH’sı sırayla 43,11 ve 8,1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada farklı substratlar kullanılmış ve guailkol substratı 50°C’da en iyi substrat olarak kabul edilmiştir.

Köksal ve Gülçin (2008), POD enzimini karnabahar tomurcuklarından iyon değişim, Sefadeks G-25, CM-sefadeks kromatografileri ve amonyum sülfat çöktürmesi ile 19.3 kat (%2 verimiyle) saflaştırmışlardır. Substrat olarak ABTS, guailkol, pirogallol, katekol ve 4-metil katekol kullanılmıştır. SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle enzimin molekül kütlesini 44 kDa bulmuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılacak kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, Guaiakol, Standart serum albumin, 4-aminobenzohidrazit, Amonyum sülfat, Sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Diyaliz torbası, Hidrojen peroksit, Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Sodyum klorür, Glutalaldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie brilliant blue R-250, Akrlamid, Coomassie brilliant blue G-250, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Tirozin, Gliserol, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum perklorat, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Sodyum azotür, Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, L-Tirozin, Fosforik asit, İzoproponal E. Merk AG'den; Potasyum fosfat, Triklor asetik asit (TCA), Sodyum hidroksit, Riedel de Haen'den; β -merkaptotanol Fluka'dan; Glisin Merk AG'den'den sağlandı.

3.1.2. Yararlanılacak alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Hassas terazi	: Denver Instrument

Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Otomatik pipet	: Eppendorf
Su banyosu	: Nüve
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolapları	: Siemens
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo

3.1.3. Kullanılacak çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla saf su kullanıldı. İn vitro olarak biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış alanları ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir.

3.1.3.a. Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
0,2 M NaHCO ₃ (pH:8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullandı):	0,84 g NaHCO ₃ 80 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.
0,1 M NaHCO ₃ (pH:10) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanıldı):	2,1 g NaHCO ₃ 200 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 mL'ye tamamlandı
0,05 M Tris-SO ₄ (pH:7,4) (4-	1,211 g Tris 150 mL destile su içerisinde

aminobenzohidrazit kenetlendirilmesinde Sepharose- 4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkamasında kullanıldı):	çözüldü. 1 N H ₂ SO ₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
---	--

3.1.3.b. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
25 mM KH ₂ PO ₄ (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonuna homojenatın tatbikinden sonra kolonu yıkamada kullanılan tampon):	1,3609 g KH ₂ PO ₄ 350 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destilesuyla 400 mL'ye tamamlandı..
10 mM KH ₂ PO ₄ (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon):	1,3609 g KH ₂ PO ₄ , 950 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destilesuyla 1 L tamamlandı.
1 M NaCl/25mM KH ₂ PO ₄ (pH:6,8) (Peroxidaz enziminin elüe edilmesinde kullanılan tampon):	11,7 g NaCl ve 0,6805 g 180 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destilesuyla 200 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
0,3 M KH_2PO_4 (pH: 7,0) (Sıvı azot parçalamasından sonra bitki dokularının içine alındığı tampon):	4,08277 g KH_2PO_4 , 80 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:7,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destilesuyla 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Aktivite ölçümünde kullanılacak çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
45 mM Guaiakol çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi):	498 μL guaiakol alınarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
0,1 M KH_2PO_4 (pH:6,0) (Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon):	1,3609 g KH_2PO_4 , 80 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.
22,5 mM H_2O_2 çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi):	%30'luk yoğunluğu 1,11 g/mL olan H_2O_2 'den 228 μL alınarak destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.e. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılacak çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):	100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiliye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi

çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.3.f. Elektroforez için kullanılacak çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
1 M Tris-HCl tamponu pH=6,8:	12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=6,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8:	12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Yürütme tamponu:	1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'lık SDS ilave edildi toplam hacim saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.
Numune tamponu:	0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'lık SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptan etanol ilave edildi.
Coomassie brillant blue boyasında kullanılan çözeltiler;	%7,5 asetik asit %5 metanol ve %87,5 destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.
(a) Renksizleştirme çözeltisi:	
(b) Renklendirme çözeltisi:	0,66 g coomassie brillant blue R-250'nin 120 mL

metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.

3.1.3.g. Gümüş boyamada kullanılacak çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Redüksiyon Çözeltisi:	4,8 g Sodyum asetat, 45 mL Etanol ve 80 mL saf su karıştırıldı, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 mL glutalaldehit eklenip saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
Tespit çözeltisi:	60 ml saf su, 30 mL %96'lik etanol, 10 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edilecek.
Yıkama Çözeltisi 1:	3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su'da çözüldü ve üzerine 120 µL formaldehit ilave edildi.
Boyama çözeltisi:	100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su'da çözülüp üzerine 30 mL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
Yıkama çözeltisi 2:	1 mL gliserin ve 250 mL'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbansları ölçüldü.

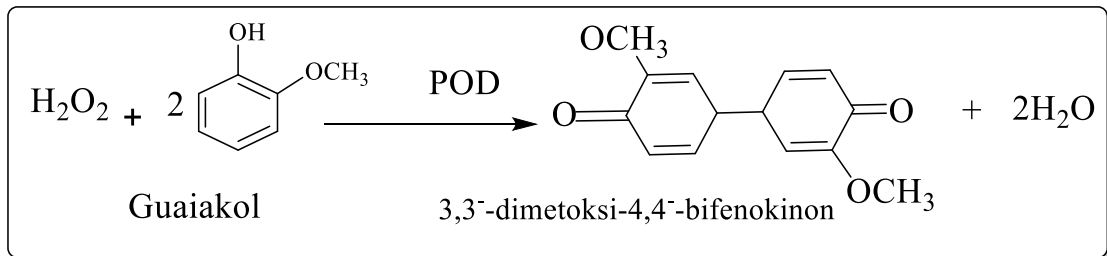
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 μ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μ g

protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe sırasıyla 100, 250 ve 500 µL alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5'er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, H₂O₂ tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışınının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Şişecioğlu *et al.* 2010).



Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

Reaksiyon enzim çözeltisinin ilavesiyle başlar ve 3 dakika süreyle her 1 dakikada bir olmak üzere oda sıcaklığında 470 nm'de absorbans artışı spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edildi.

Çizelge 3.1. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki küvet içeriği

Kullanılan Çözeltiler	Kör (mL)	Numune (mL)
Aktivite Tamponu (0,1M pH:6)	1,0	0,9
Guaiakol (45 mM)	1,0	1,0
Hidrojen peroksit (22,5 mM)	1,0	1,0
Enzim	-	0,1

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad c = A / \varepsilon \cdot b \quad V = c \cdot D_f$$

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon ($\mu\text{mol/ml}$)

ε = Ekstinksiyon kat sayısı ($5000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

D_f = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı ($\mu\text{mol} \times \text{dak. /ml}$)

Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak guaiakol kullanıldığından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi 20°C 'de 1 dakikada $1 \mu\text{mol}$ guaiakol'ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

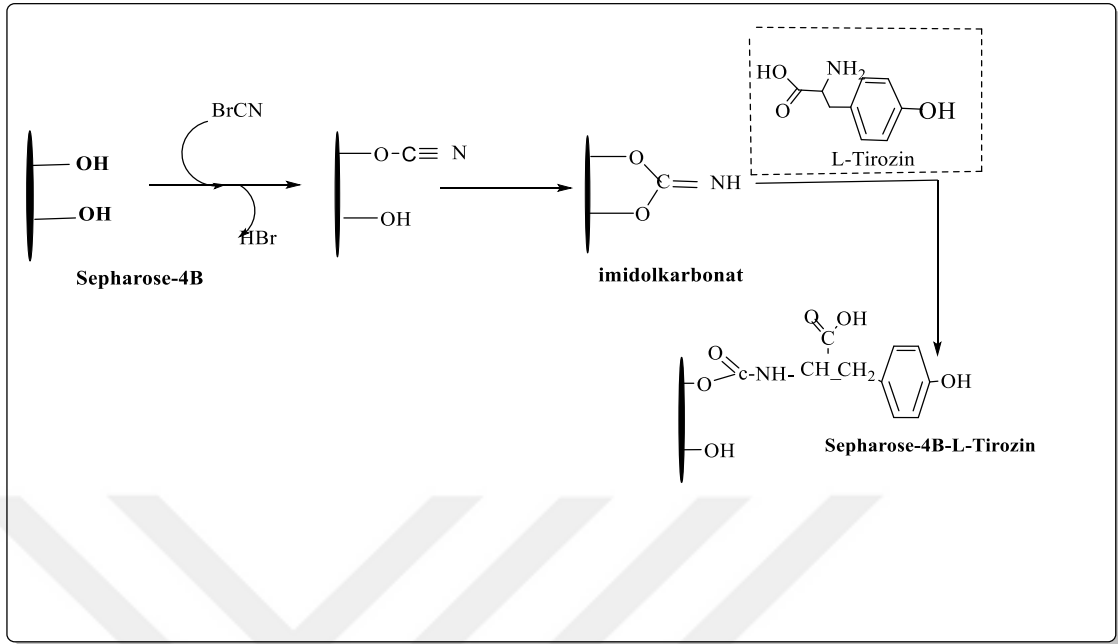
3.3. Tatlı Turp (*Raphanus Sativus*), Japon Turp (*R.sativus* L. var. *longipinnatus*) ve Karnabahar'dan (*Brassica oleracea*) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak takıldı, daha sonra 4-aminobenzohidrazit diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitör ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Kullanılacak inhibitör POD enziminin inhibitörüdür.

3.3.1.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması:

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagele karıştırılmış ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılıp 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

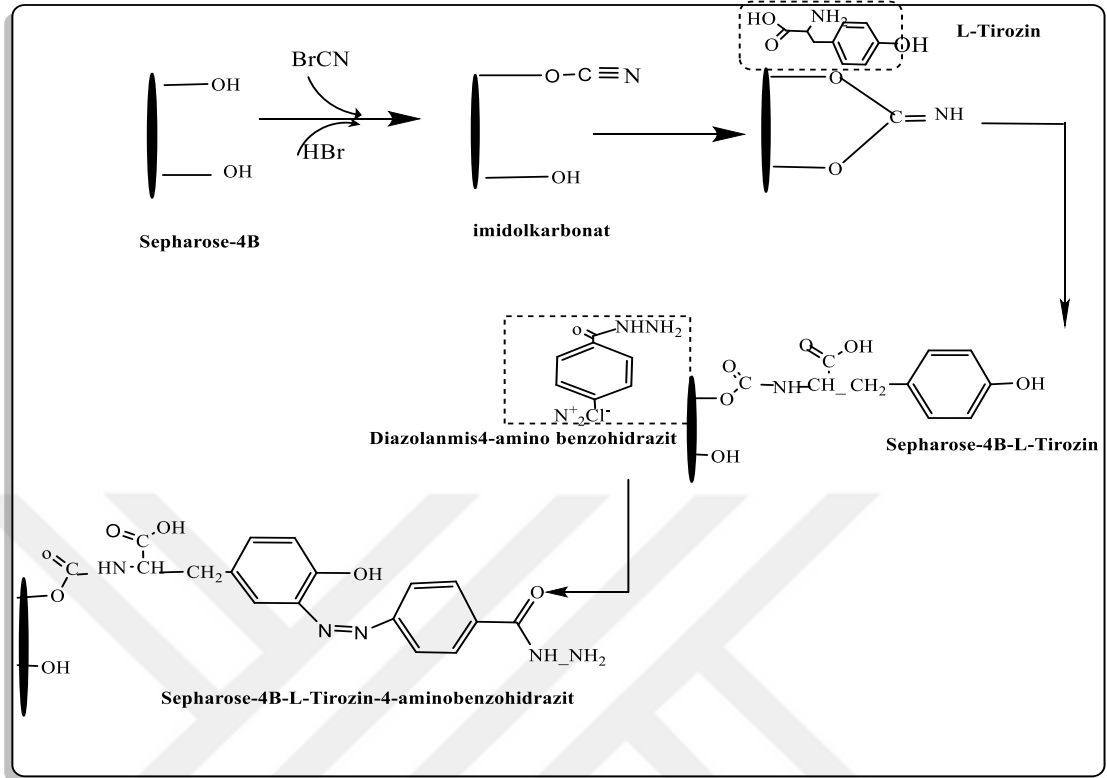


Şekil 3.2. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

3.3.1.b. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi:

4-aminobenzohidrazit'ten 25 mg alınarak 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözülmüş ve içerisinde 75mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, inhibitör çözeltilisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH:9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 10 mM KH₂PO₄ (pH:6,8) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).

Hazırlanan 4 amino benzo hidrazid afinite jeli ile peroksidaz enzimleri saflaştırılıp çalışılması planlanan benzo hidrazid ile üzerine inhibisyonlarına bakıldıktan sonra inhibisyon etkisi gösteren moleküller için afinite kolonu hazırlandı.



Şekil 3.3. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli

3.3.1.c. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jeller dengeleme tamponu (KH_2PO_4 , pH:6,8) içine alınarak jel süspanse edilecek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden bakıldı.

3.3.1.d. Homojenat hazırlanması

20 g taze tatlı turp (*Raphanus Sativus*) tartıldı ve blender cihazı ile küçük parçalara bölündü. Sonra sıvı azot ekledikten sonra toz haline getirildi ve üzerine 0,3 M pH:7,0 olan tampondan 60 mL ilave edilerek 1-2 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu karışım 2.400 rpm'de birkaç kere homojenizatörden geçirilerek bitki

hücrenin parçalanması ve homojenize olması sağlandı. Homejenat süzüldü ve santrifüj tüplerine doldurularak 13.000 xg'de bir saat boyunca santrifüj edildi. Süpernatant çökelektan ayrıldı. Elde edilen süpernatant daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere 40°C'de muhafaza edildi. Japon turp ve karnabahar homojenatları için de aynı işlemler yapıldı.

3.3.1.e. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan homojenatlar 10 mM fosfat (pH:6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM fosfat (pH:6,8) çözeltisi ile yıkanmıştır. Böylece peroksidaz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar ortamdan uzaklaştırıldı. Sonra 1M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi elüe edilmiştir. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı.

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez İle Enzim Saflığının Belirlenmesi

POD enzimi her bir afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi. Standart olarak moleköl ağırlığı belli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bunun için elektrofrez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konulandı. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

3.4.1. Ayırma jeli şöyle hazırlanacak

5 mL 1 M Tris-HCl (pH: 8,8), 4,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %10 SDS, 0,13 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 3,13 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

3.4.2. Yığma jeli şöyle hazırlanacak

0,41 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'luk SDS, 0,03 mL %5'lik TEMED ve 2,45 mL saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine %10'luk PER'den 0,1 mL ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar enjektörle dökülmüştür. Hava almamasına dikkat edildi. Belli bir süre jelin donması beklenmiş, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edilmiştir. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlanmıştır. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılmıştır. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirilecek. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltilisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltilisiyle karıştırıcıda

bekletildi. Bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı dökülmüştür. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

Hazırlanacak jellerin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelenmiştir. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden peroksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan peroksidaz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden peroksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

Peroksidaz enziminin saflaştırılmasında hazırlanan kolonlardan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH:6,8'da 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlendi ve (mg protein /g jel başına) grafik çizildi.

3.5.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

Peroksidaz enzimi için kolonlarda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH'sı 6,8 ile 8,5 arasında) değişen tamponlar kullanılarak en uygun pH için sonuçlar (mg protein /g jel başına) grafik edildi.

3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

Peroksidaz enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek, sonuçlar mg protein/g jel başına grafikte gösterildi.

3.6. Tatlı Turp (*Raphanus Sativus*), Japon Turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve Karnabahar (*Brassica oleracea*) Bitkilerinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırladığımız afinite kromotoğrafisi kolanlarından saflaştırılacak POD enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için guaiakol substratı kullanarak optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH ve guaiakol için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.6.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları

Peroksidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 0,1 M KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo haline verildi.

3.6.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları

Optimum iyonik şiddetleri belirlemek amacıyla optimum pH'da saflaştırdığımız POD'lar için 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1500 mM'lık KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.6.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları

Peroksidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı subanyosu kullanıldı. Optimum pH ve optimum iyonik şiddette olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda 5 dk bekletilerek istenilen sıcaklığa getirildi ve son olarak enzim çözeltisi pipetlendi. 0°C ile 80°C arasında 10'ar °C artışlarla her sıcaklık için aktivite ölçümü yapıldı. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.6.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 10 mM KH₂PO₄ tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo haline verildi.

3.6.5. Guaiakol için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; guaiakol kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. 1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. K_m ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak tabloda gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

3.6.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar

Ligand olarak kullanılan inhibitörün guaiakol substratına bağlı olarak, IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: oda sıcaklığında ve optimum pH'da, 45 mM guaiakol

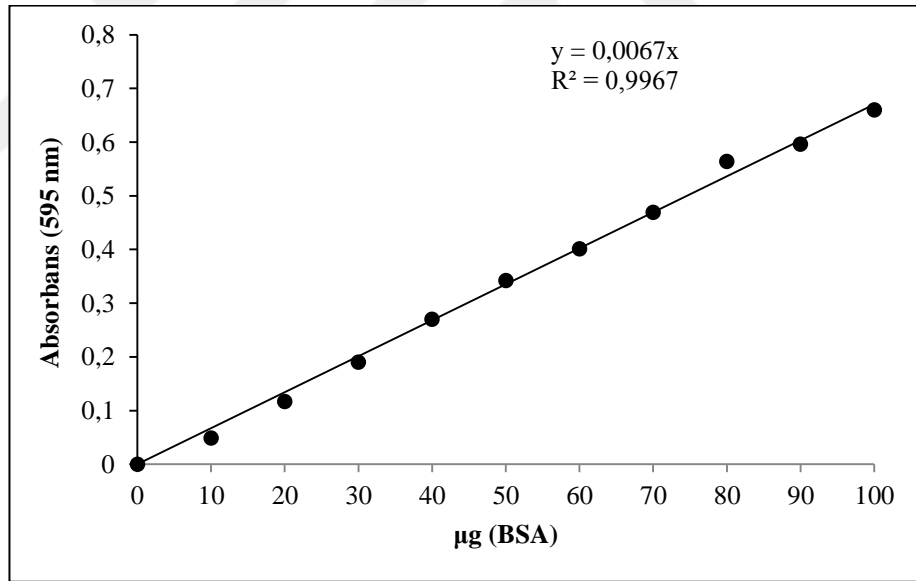
konsantrasyonunda ortama farklı konsantrasyonunda inhibitör çözeltilisi ilave edilerek, %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi. Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri tespit edildi.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden hazırladığımız homejenatlardan ve afinite kolonundan saflaştırılan POD enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford metoduyla tayin edilmiştir. Bu çalışmada önce standart grafik hazırlandı. Afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim ve homojenatlar çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.

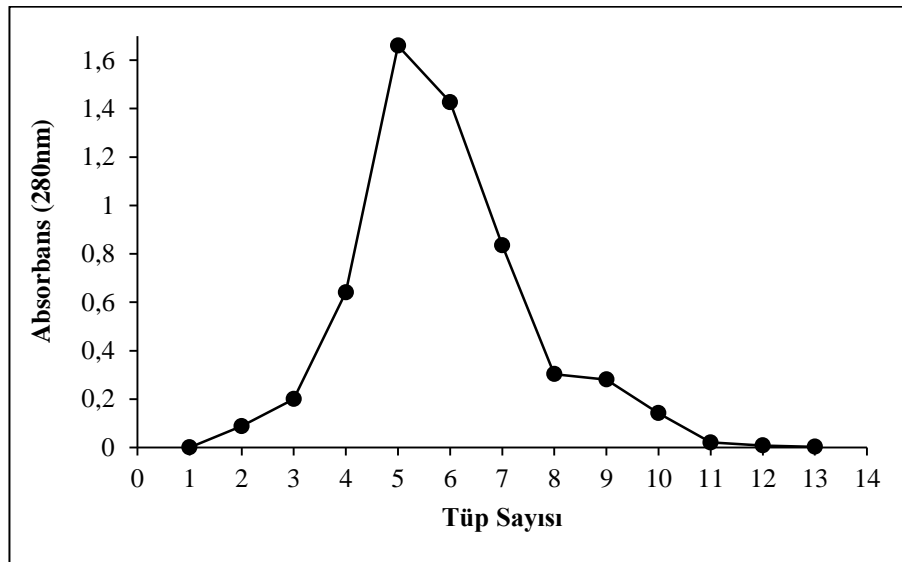


Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumin)

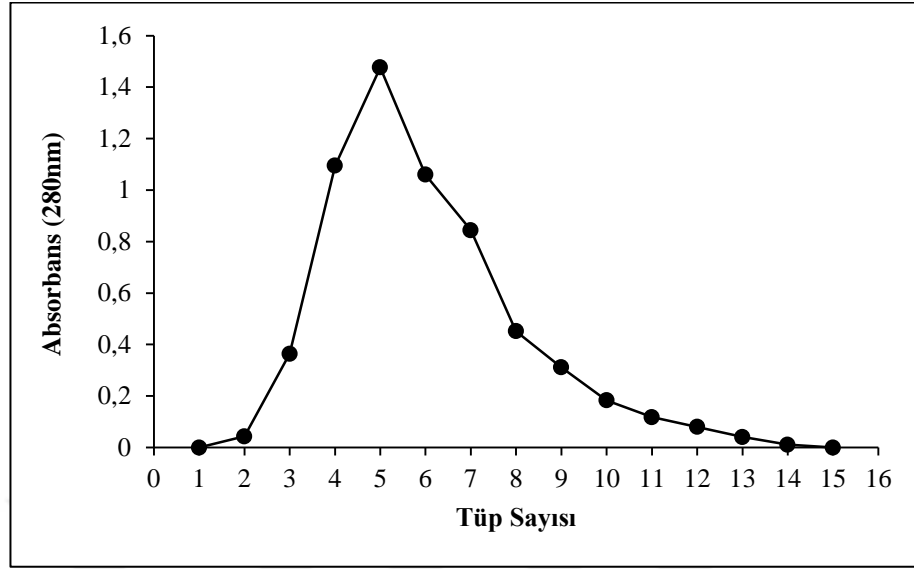
4.2. Tatlı Turp (*Raphanus Sativus*), Japon Turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve Karnabahar (*Brassica oleracea*) Bitkilerinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

4.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

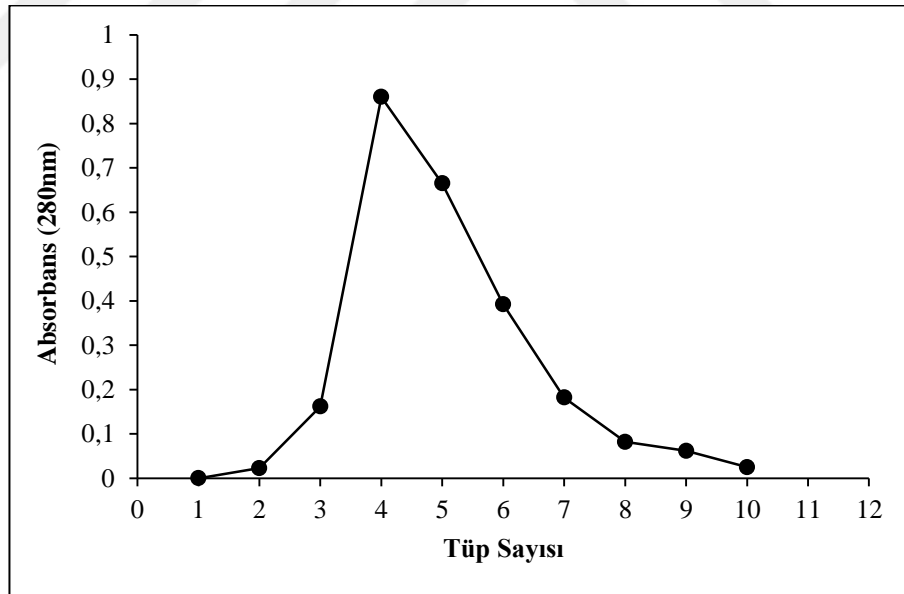
Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden hazırlanan homojenatlar'dan 5'er mL ayrı ayrı dengelenmiş kolona pipet vasıtasıyla tatbik edilmiştir. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 35 mL/saat'e ayarlanarak 1,5'er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'de absorbans değerleri ölçülerek kalitatif protein tayinleri yapılmıştır. 280 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri şekil 4.2, 4.3, 4.4'te verildi. Absorbans gösteren tüplerin 470 nm'de aktivitelerine bakılmıştır. 470 nm'de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri Şekil 4.5, 4.6, 4.7'de gibi çizildi.



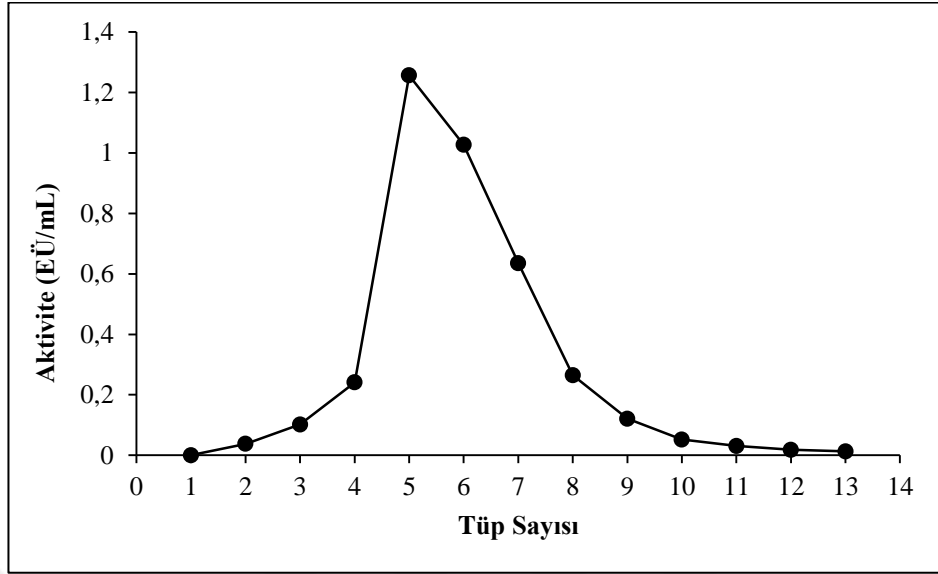
Şekil 4.2. 4-aminobenzohidrazit kolonundan tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını gösteren grafik



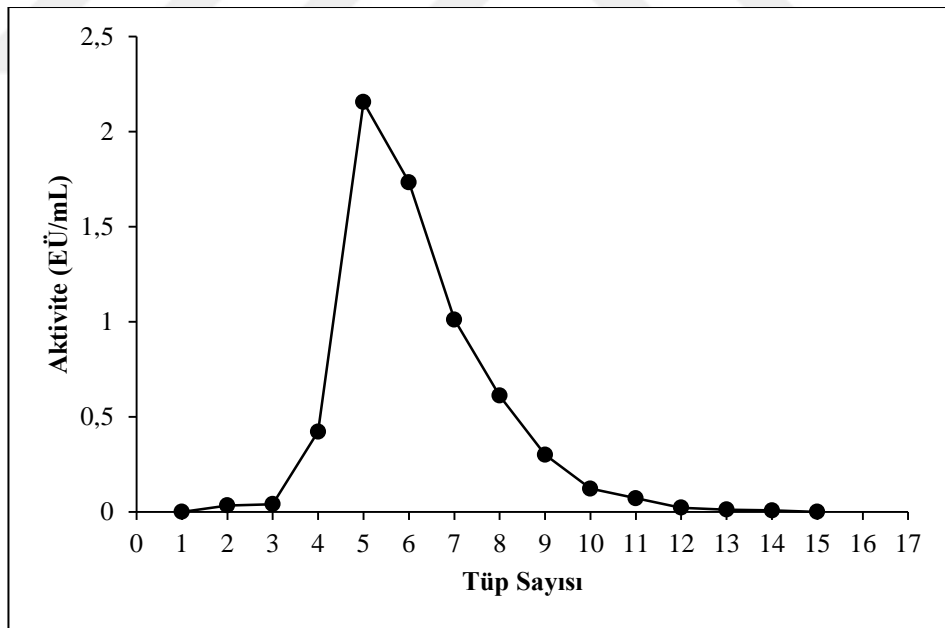
Şekil 4.3. 4-aminobenzohidrazit kolonundan japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını gösteren grafik



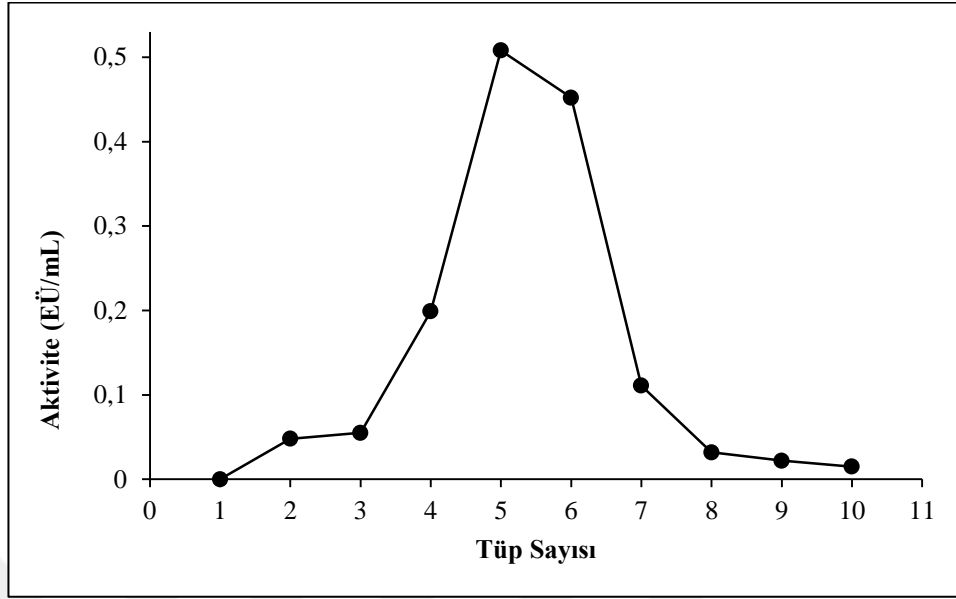
Şekil 4.4. 4-aminobenzohidrazit kolonundan karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını gösteren grafik



Şekil 4.5. 4-aminobenzohidrazit kolunundan tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik



Şekil 4.6. 4-aminobenzohidrazit kolunundan japon turp (*R. sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin afinite kromotografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik



Şekil 4.7. 4-aminobenzohidrazit kolonundan karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik

4.2.2. POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Hazırlanan jel kolona paketlendikten sonra 10 mM KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu ile dengelendi. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden hazırlanan homojenatlardan 5'er mL ayrı ayrı kolona tatbik edilmiş ve kolonlar 400 mL 25 mM KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlanmıştır. Sonra 1MNaCl/25 mM KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi 1,5'er mL halinde elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 mL/saat'e ayarlandı.

Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit kullanılan kolondan, tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. POD enziminin afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1, 4.2, 4.3'te gösterildi.

Çizelge 4.1. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

4-amino benzohidrazid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EÜ)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Yüzde Verim (%)	S. Katsayısı
Tatlı turpu	Homojenat	5	45,8	1,1403	229	5,7016	40,164	100	1
	Saf POD	1,5	30	0,029	45	0,0435	1034,48	19,65	25,75

Çizelge 4.2. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

4-amino benzohidrazid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EÜ)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Yüzde Verim (%)	S. Katsayısı
Japon turpu	Homojenat	5	50	1,194	250	5,97	41,87	100	1
	Saf POD	1,5	16	0,011	24	0,0165	1454,54	9,6	34,74

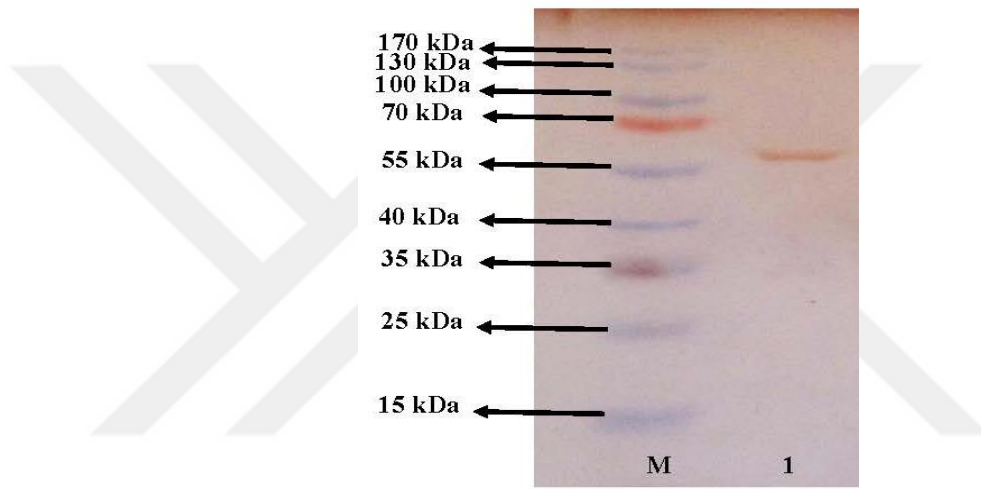
Çizelge 4.3. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

4-amino benzohidrazid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EÜ)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Yüzde Verim (%)	S. Katsayısı
karnabahar	Homojenat	5	40	1,84	200	9,245	21,633	100	1
	Saf POD	1,5	13	0,0283	19,5	0,04245	459,36	9,75	21,23

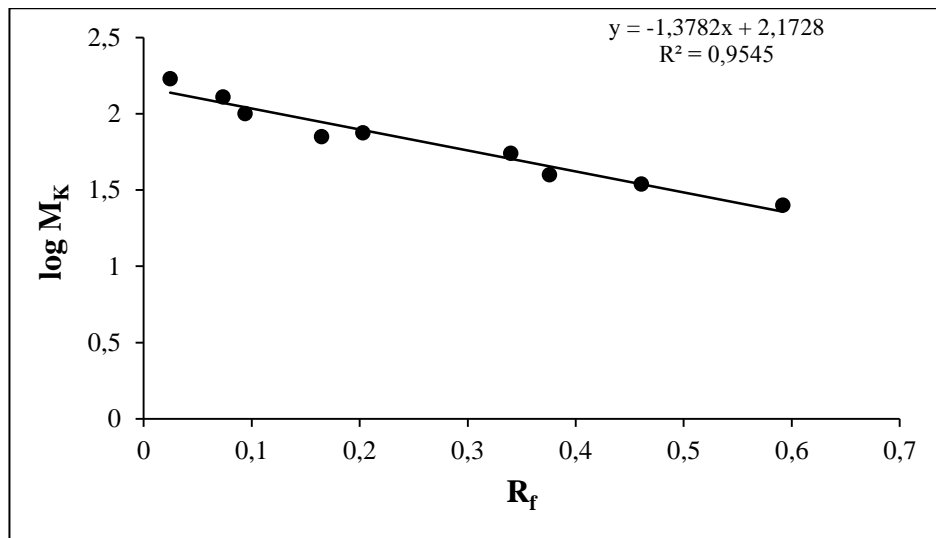
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar

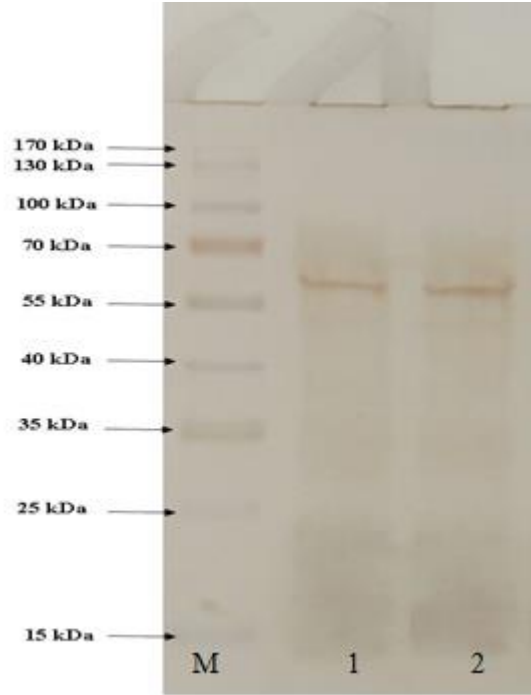
(*Brassica oleracea*) saflaştırılan peroksidaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforez kuyularına sırayla saflaştırılan POD’lar ve standart proteinler uygulanmış ve yürütüldü. Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı çekilmiştir. Saflaştırılan POD enzimlerinin molekül kütleleri log MK-Rf grafikleri çizilerek tespit edildi (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11; Çizelge 4.4).



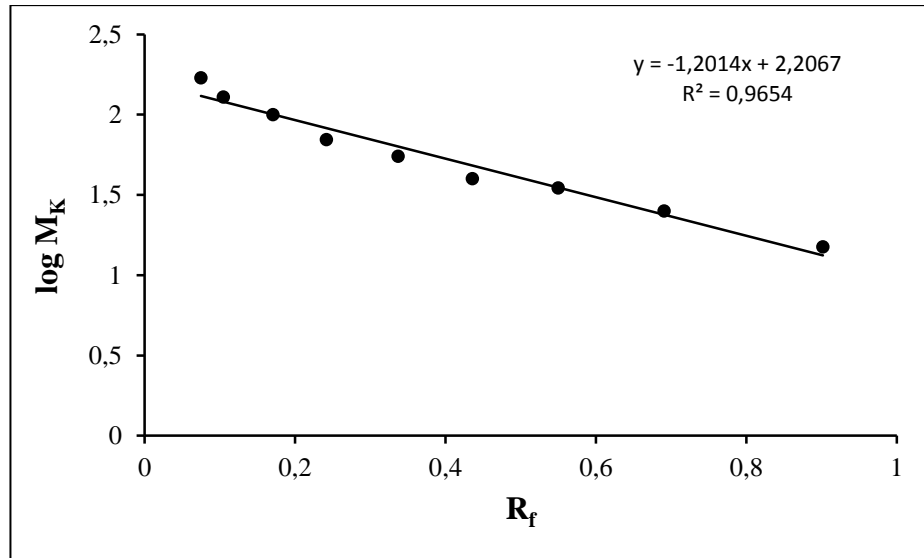
Şekil 4.8. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı
*M: Marker, 1: karnabahar



Şekil 4.9. 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen Rf-logM_K grafiği



Şekil 4.10. 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı
*M: Marker, 1: tatlı turp 2: japon Turp



Şekil 4.11. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen R_f-logM_k grafiği

Çizelge 4.4. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimleri için SDS-PAGE ile molekül kütlesi sonuçları

Enzim	Bitki	Moleküler Kütlesi
Peroksidaz (POD)	Tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>)	62,25
	Japon turp (<i>R.sativus L. var.</i>)	62,21
	Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>)	57,3

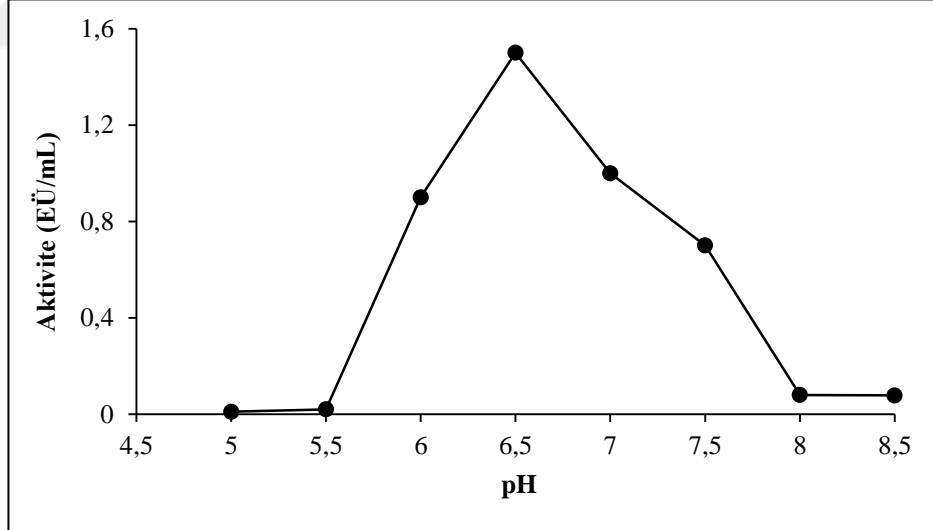
4.3. Tatlı Turp (*Raphanus Sativus*), Japon Turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve Karnabahar (*Brassica oleracea*) Bitkilerinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin optimum pH çalışması bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde; pH’sı 5,0-8,0 aralığında 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7; Şekil 4.12, 4.13, 4.14). Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için optimum pH 0,1 M KH_2PO_4 pH:6,5 tamponu ve japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için optimum pH 0,1 M KH_2PO_4 pH:6,5 tamponu ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için optimum pH 0,1 M KH_2PO_4 pH:6,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 MKH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

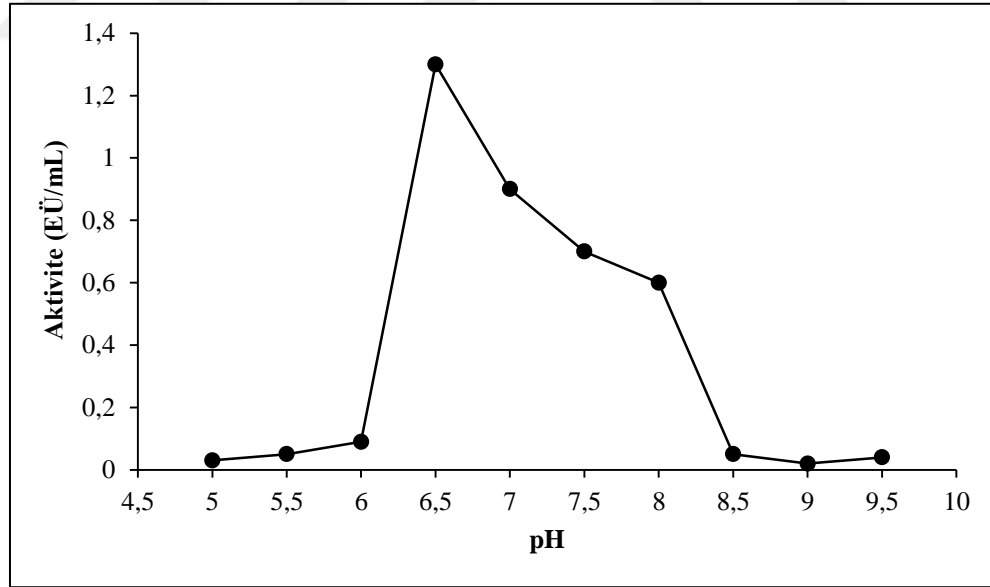
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,01
5,5	0,02
6,0	0,90
6,5	1,50
7,0	1,00
7,5	0,70
8,0	0,08
8,5	0,07



Şekil 4.12. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği

Çizelge 4.6. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 MKH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

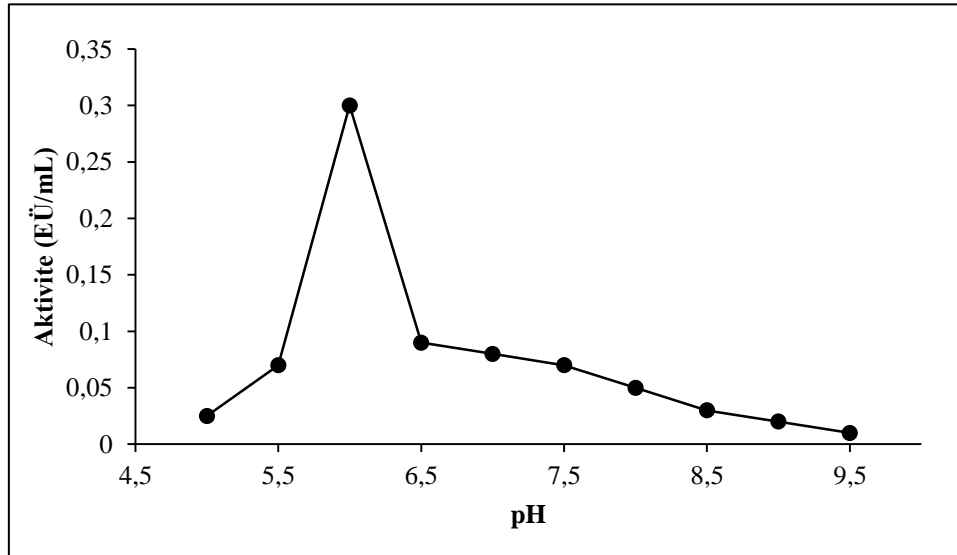
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,03
5,5	0,05
6,0	0,09
6,5	1,30
7,0	0,90
7,5	0,70
8,0	0,60
8,5	0,05



Şekil 4.13. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/mL)-pH grafiği

Çizelge 4.7. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,025
5,5	0,07
6,0	0,80
6,5	0,09
7,0	0,08
7,5	0,07
8,0	0,05
8,5	0,03
9,0	0,02
9,5	0,01



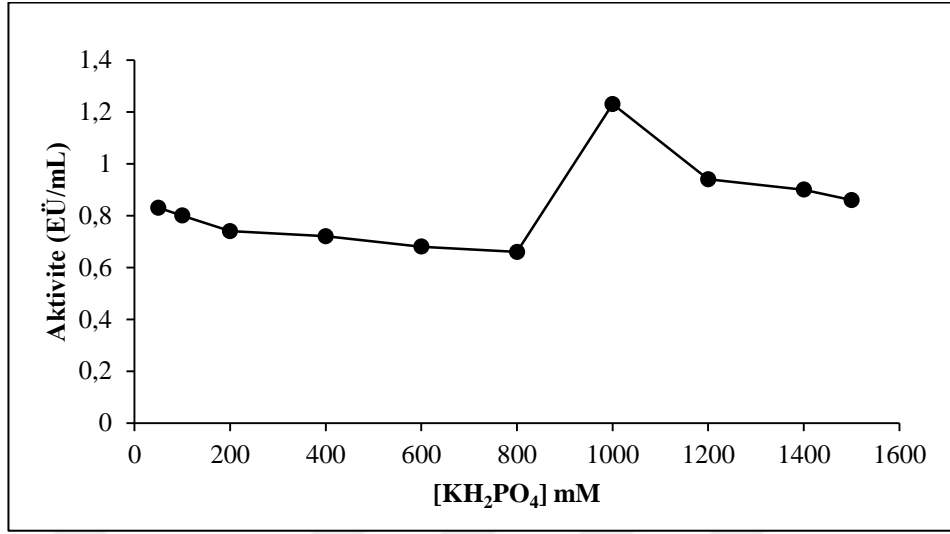
Şekil 4.14. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/mL)-pH grafiği

4.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla KH_2PO_4 tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar çizelge ve grafik halinde getirildi (Çizelge 4.8, 4.9, 4.10 Şekil 4.15, 4.16, 4.17). Yapılan çalışmalar sonucu tatlı turp (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 0,1 M KH_2PO_4 (pH:6,5) tamponu ve japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 1 M KH_2PO_4 (pH:6,5) tamponu ve karnabahar (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 1 M KH_2PO_4 (pH:6,5) tamponu olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.8. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 (pH:6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

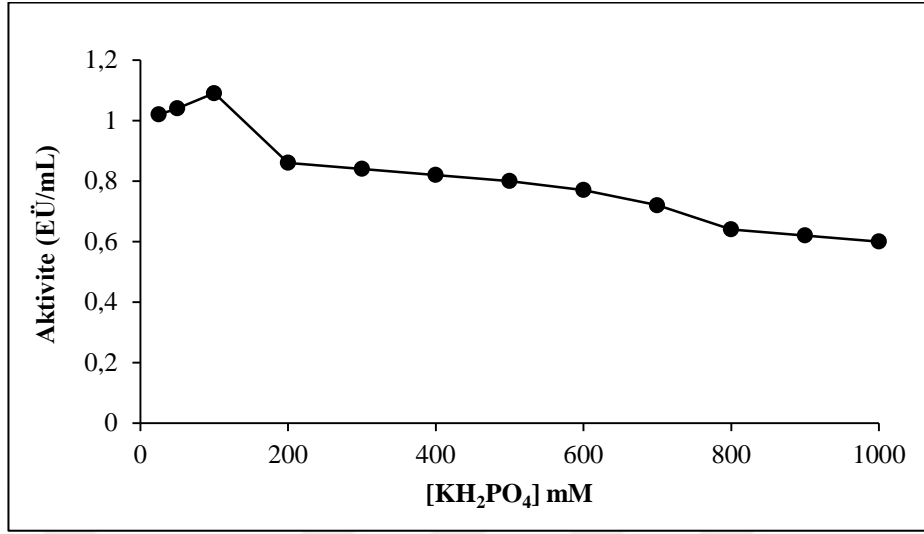
Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,050	0,83
0,100	0,80
0,200	0,74
0,400	0,72
0,600	0,68
0,800	0,66
1,000	1,23
1,200	0,94
1,400	0,90
1,500	0,86



Şekil 4.15. Değişik konsantrasyonlardaki KH₂PO₄ (pH:6,5) tampon çözeltileri kullanılarak tatlı turp (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-[KH₂PO₄] (mM) grafiği

Çizelge 4.9. Japon Tturp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH₂PO₄ (pH:6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

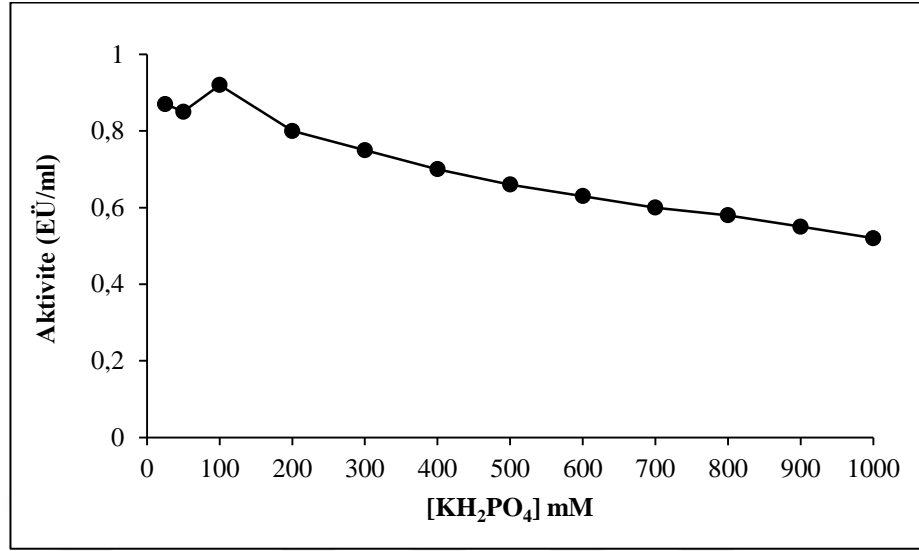
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,025	1,02
0,050	1,04
0,100	1,09
0,200	0,86
0,300	0,84
0,400	0,82
0,500	0,80
0,600	0,77
0,700	0,72
0,800	0,64
0,900	0,62
1,000	0,60



Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki KH₂PO₄ (pH:6,5) tampon çözeltileri kullanılarak japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-[KH₂PO₄] (mM) grafiği

Çizelge 4.10. Karnabahar (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH₂PO₄ (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

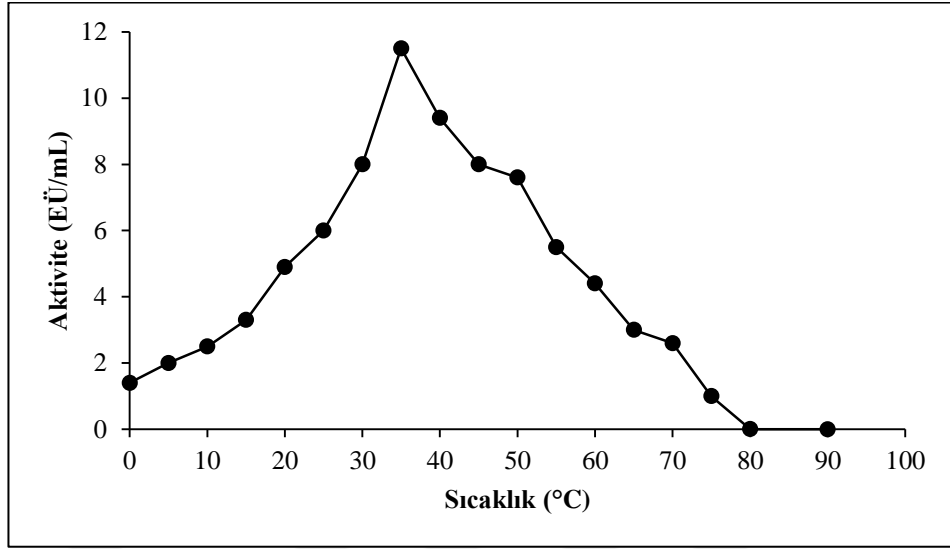
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
İyonik Şiddet (mM)	Aktivite (EÜ/mL)
0,025	0,87
0,050	0,85
0,100	0,92
0,200	0,80
0,300	0,75
0,400	0,70
0,500	0,66
0,600	0,63
0,700	0,60
0,800	0,58
0,900	0,55
1,000	0,52



Şekil 4.17. Değişik konsantrasyonlardaki KH₂PO₄ (pH:6,5) tampon çözeltileri kullanılarak Karnabahar (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-[KH₂PO₄] (mM) grafiği

4.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum sıcaklığını belirlemek üzere tatlı turp (*Raphanus Sativus*) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 0,1 M KH₂PO₄ (pH:6,5) tamponu ve japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 1 M KH₂PO₄ (pH:6,5) tamponu ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 1 M KH₂PO₄ (pH:6,5) tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 100°C'de bir olmak üzere bölüm 3.6.3'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11, 4.12 4,13'da ve Şekil 4.18, 4.19 4.20'de gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucu hem tatlı turp (*Raphanus Sativus*) hemde japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve hem karnabahar (*Brassica oleracea*) POD için optimum sıcaklık 30°C olarak tespit edildi.



Şekil 4.18. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (0°C) grafiği

Çizelge 4.11. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

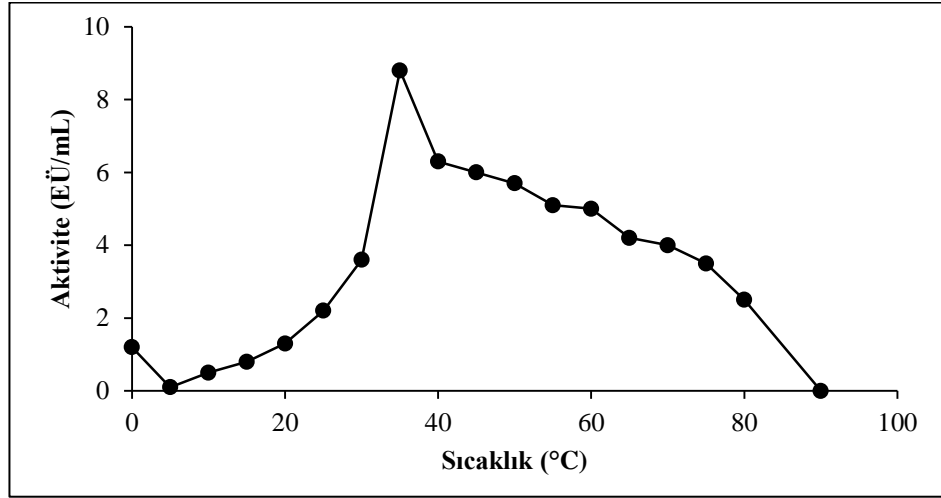
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	1,4
5	2,0
10	2,5
15	3,3
20	4,9
25	6,0
30	8,0
35	11,5
40	9,4
45	8,0
50	7,6
55	5,5

Çizelge 4.11. (devam)

60	4,4
70	3,0
75	2,6
80	1
85	0,004
90	0

Çizelge 4.12. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	1,2
5	0,1
10	0,5
15	0,8
20	1,3
25	2,2
30	3,6
35	8,8
40	6,3
45	6,0
50	5,7
55	5,1
60	5,0
70	4,2
75	4,0
80	3,5
85	2,5
90	0,0



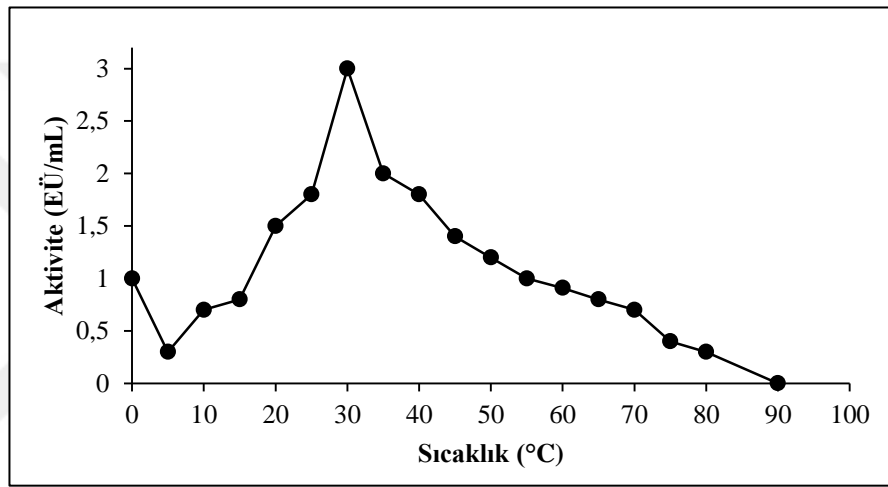
Şekil 4.19. Japon turp (*R. sativus L. var. longipinnatus*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği

Çizelge 4.13. Karnabahar (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	1,0
5	0,3
10	0,7
15	0,8
20	1,5
25	1,8
30	3,0
35	2,0
40	1,8
45	1,4
50	1,2
55	1,0
60	0,9

Çizelge 4.13. (devam)

70	0,8
75	0,7
80	0,4
85	0,3
90	0

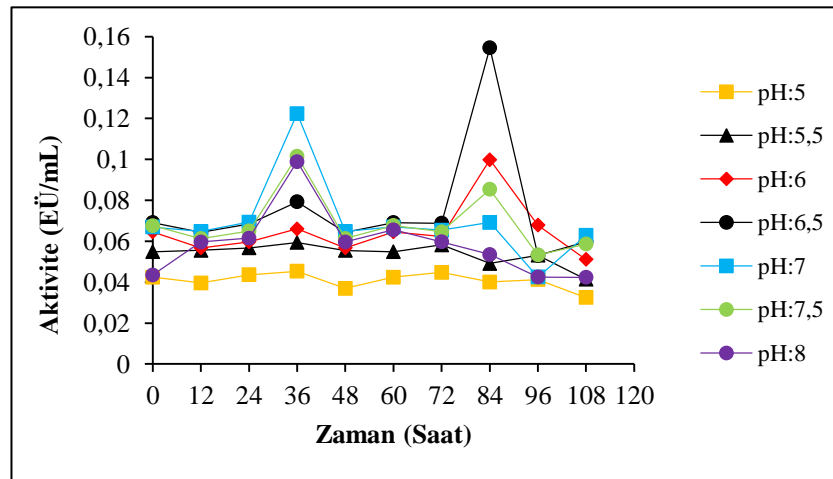
Şekil 4.20. Karnabahar (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği

4.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin stabil pH'ları bölüm 3.6.4'te anlatıldığı şekilde; pH'ları 5,0-8,0 aralığında 10 mM KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılarak hazırlanan enzim stoklarının gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.14, 4.15, 4.16; Şekil 4.21, 4.22, 4.23). Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için stabil pH, 10 mM KH₂PO₄ tamponunda pH:6,5 ve japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için stabil pH, 10 mM KH₂PO₄ tamponunda pH:5,0 ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için stabil pH, 10 mM KH₂PO₄ tamponunda pH:5,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.14. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

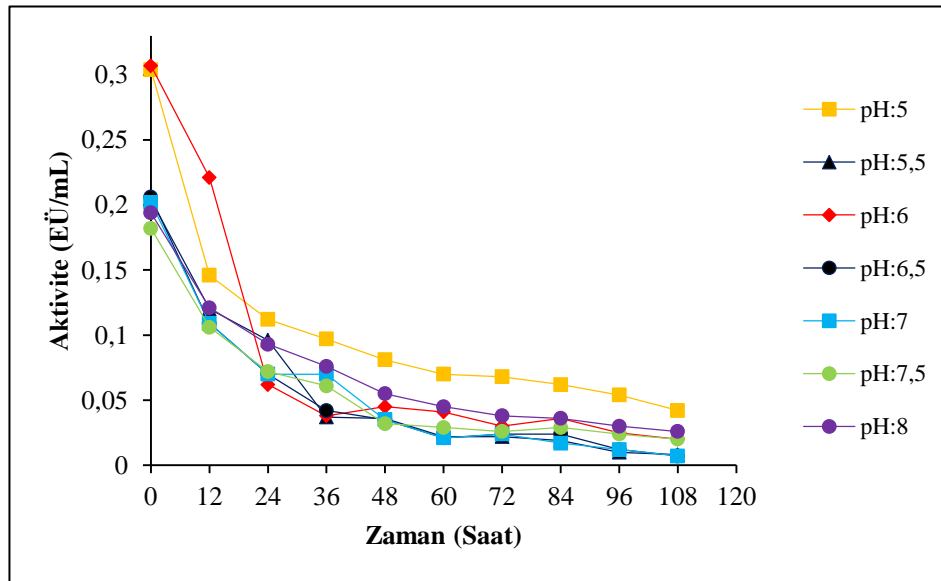
Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)							
Zaman (Saat)	pH:5,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:5,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:6,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:6,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)
0	0,042	0,054	0,064	0,069	0,066	0,067	0,043
12	0,039	0,055	0,056	0,064	0,064	0,061	0,059
24	0,043	0,056	0,059	0,068	0,069	0,065	0,061
36	0,045	0,059	0,066	0,079	0,122	0,101	0,098
48	0,036	0,055	0,056	0,064	0,064	0,061	0,059
60	0,042	0,054	0,064	0,069	0,066	0,067	0,065
72	0,044	0,058	0,062	0,068	0,065	0,064	0,059
84	0,040	0,049	0,099	0,154	0,069	0,085	0,053
96	0,041	0,053	0,067	0,053	0,042	0,053	0,042
108	0,032	0,041	0,051	0,059	0,062	0,058	0,042



Şekil 4.21. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

Çizelge 4.15. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

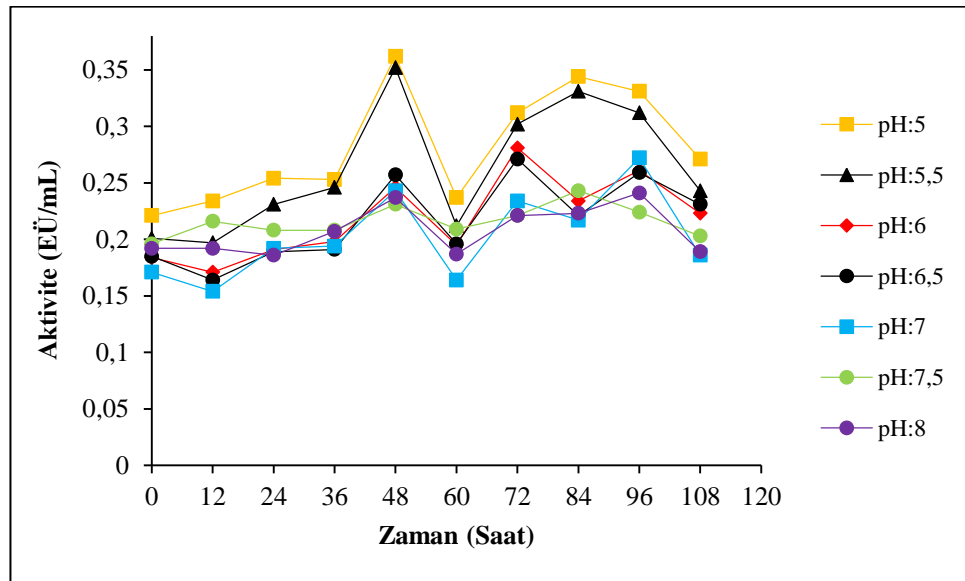
Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)							
Zaman (Saat)	pH:5,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:5,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:6,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:6,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)
0	0,304	0,204	0,307	0,206	0,202	0,182	0,194
12	0,146	0,122	0,221	0,109	0,109	0,106	0,121
24	0,112	0,096	0,062	0,072	0,071	0,072	0,093
36	0,097	0,037	0,038	0,042	0,071	0,061	0,076
48	0,081	0,036	0,045	0,035	0,035	0,032	0,055
60	0,07	0,022	0,041	0,021	0,021	0,029	0,045
72	0,068	0,022	0,032	0,024	0,024	0,026	0,038
84	0,062	0,019	0,036	0,024	0,017	0,029	0,036
96	0,054	0,011	0,025	0,012	0,012	0,024	0,031
108	0,042	0,0081	0,021	0,0071	0,0071	0,021	0,026



Şekil 4.22. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tamponu kullanılarak japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

Çizelge 4.16. Karnabahar (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)							
Zaman (Saat)	pH:5,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:5,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:6,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:6,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)
0	0,221	0,201	0,184	0,185	0,171	0,196	0,192
12	0,234	0,197	0,171	0,164	0,154	0,216	0,192
24	0,254	0,231	0,191	0,189	0,192	0,208	0,186
36	0,253	0,246	0,198	0,191	0,194	0,208	0,207
48	0,362	0,352	0,246	0,257	0,243	0,231	0,237
60	0,237	0,212	0,195	0,196	0,164	0,209	0,187
72	0,312	0,302	0,281	0,271	0,234	0,221	0,221
84	0,344	0,331	0,234	0,221	0,217	0,243	0,223
96	0,331	0,312	0,261	0,259	0,272	0,224	0,241
108	0,271	0,243	0,223	0,231	0,186	0,203	0,189



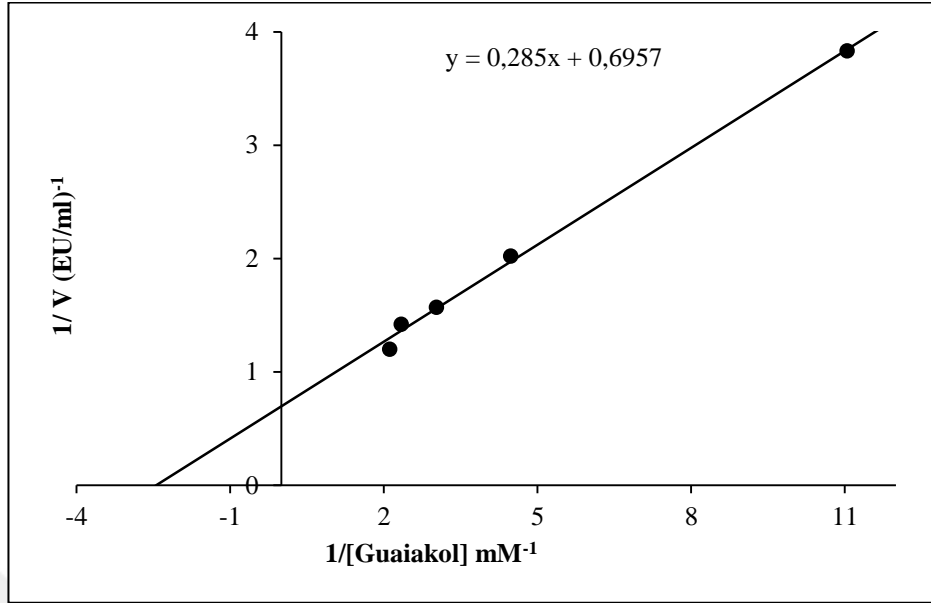
Şekil 4.23. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tamponu kullanılarak karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.3.5. Guaiakol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Guaiakol substratı için tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları bölüm 3.6.5'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Her bir bitki POD için enz az 5 farklı guaiakol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. $1/[Guaiakol]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17, 4.18, 4.19 ve Şekil 4.24, 4.25, 4.26'da görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda guaiakol için K_m değeri tatlı turp (*Raphanus Sativus*) 0,41 mM ve japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) 0,56 mM ve karnabahar (*Brassica oleracea*) 0,64 mM bulunurken V_{max} ise tatlı turp (*Raphanus Sativus*) 1,43 EÜ/mL ve japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) 1,51 EÜ/mL karnabahar (*Brassica oleracea*) 1,95 EÜ/mL olarak tespit edildi.

Çizelge 4.17. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

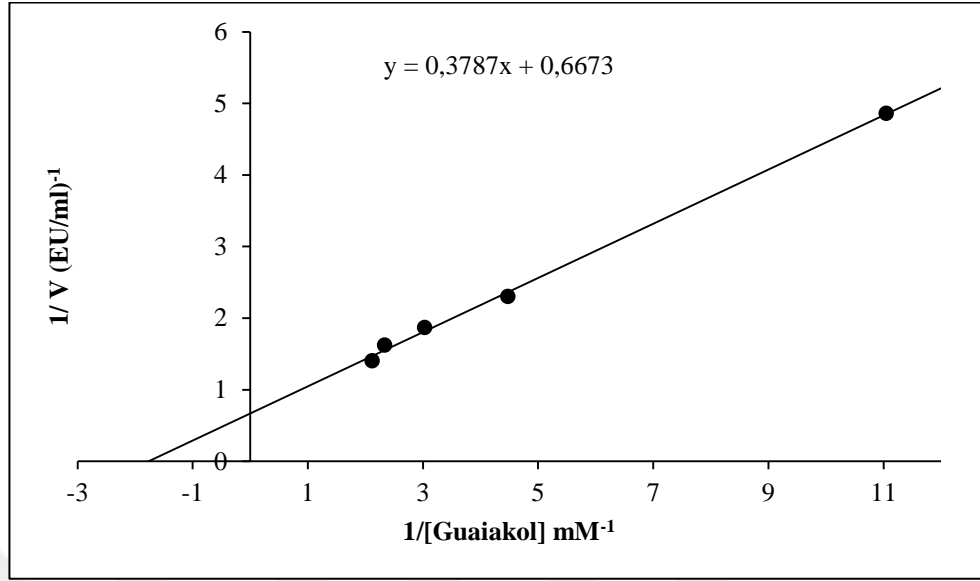
[Guaiakol](mM)	Aktivite (EÜ/mL)
11,04	3,83
4,48	2,02
3,03	1,57
2,34	1,42
2,12	1,20



Şekil 4.24. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin guaiakol için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

Çizelge 4.18. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

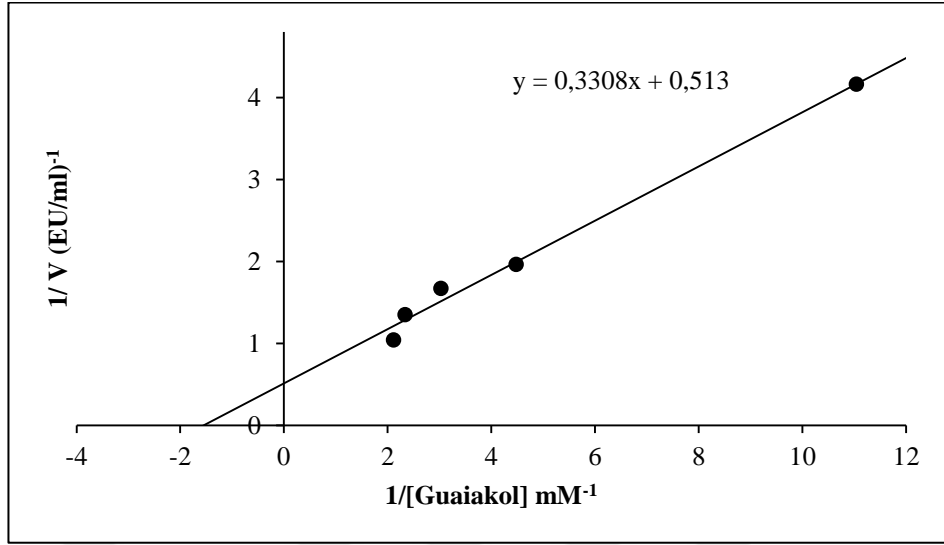
[Guaiakol] (mM)	Aktivite EÜ/mL)
11,04	4,86
4,48	2,30
3,03	1,87
2,34	1,62
2,12	1,40



Şekil 4.25. Japon turp (*R. sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin guaiakol için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

Çizelge 4.19. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

[Guaiakol](mM)	Aktivite (EÜ/mL)
11,48	4,16
4,48	1,96
3,03	1,67
2,34	1,35
2,12	1,04



Şekil 4.26. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin guaiakol için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

4.3.6. Kullanılan inhibitörün K_i ve IC_{50} değerlerinin bulunması yönelik yapılan çalışma sonuçları

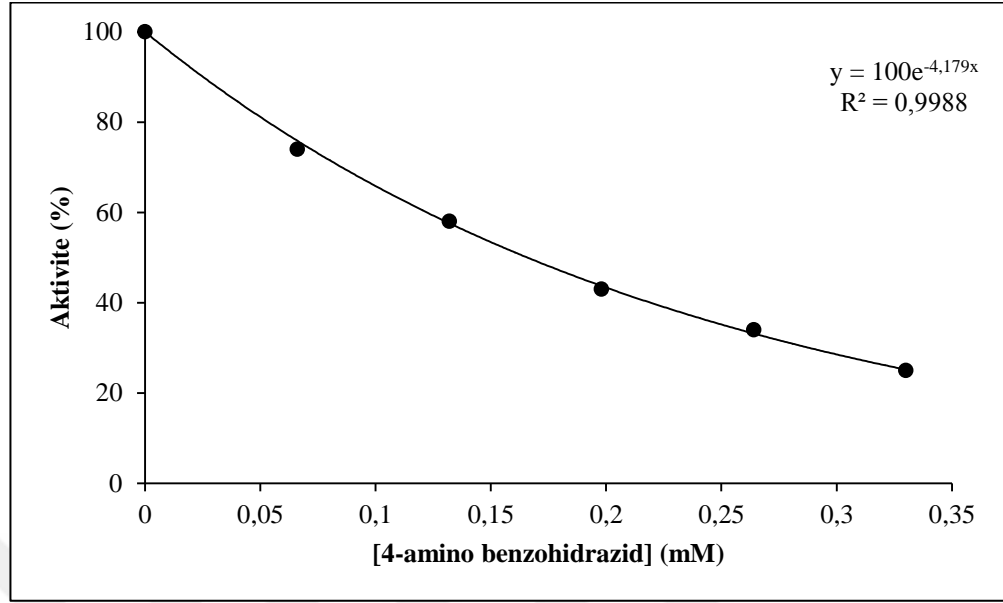
Bu çalışmada 4-aminobenzohidrazit inhibitörü saf suda çözülerek tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimi üzerine guaiakol substratı için etkisi incelendi. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda guaiakol (45 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.20,4.21, 4.22, 4.23, 4.24 4.25’de gösterilmiş ve % Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.27, 4.28, 4.29’de gösterildi. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,165 mM, japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) PO Denzimi için IC_{50} değeri 0,283 mM ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,163 mM olarak tespit edildi.

Çizelge 4.20. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge

[4-aminobenzohidrazit] (mM)	% Aktivite
0,000	100
0,066	74
0,132	58
0,198	43
0,264	34
0,330	25

Çizelge 4.21. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü							
Fosfat tamponu (mL)	Guaiakol (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	Fosfat tamponu (mL)	Guaiak ol (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Saf su (mL)	İnhibit ör (mL)	POD (mL)	%Aktivite	
1,0	0,5	1,0	0,490	0,010	1,0	0,5	1,0	0,385	0,010	0,060	0,085	
1,0	0,5	1,0	0,480	0,020	1,0	0,5	1,0	0,375	0,020	0,06	0,060	
1,0	0,5	1,0	0,470	0,030	1,0	0,5	1,0	0,350	0,030	0,06	0,045	
1,0	0,5	1,0	0,460	0,040	1,0	0,5	1,0	0,330	0,040	0,06	0,038	
1,0	0,5	1,0	0,450	0,050	1,0	0,5	1,0	0,300	0,050	0,06	0,025	



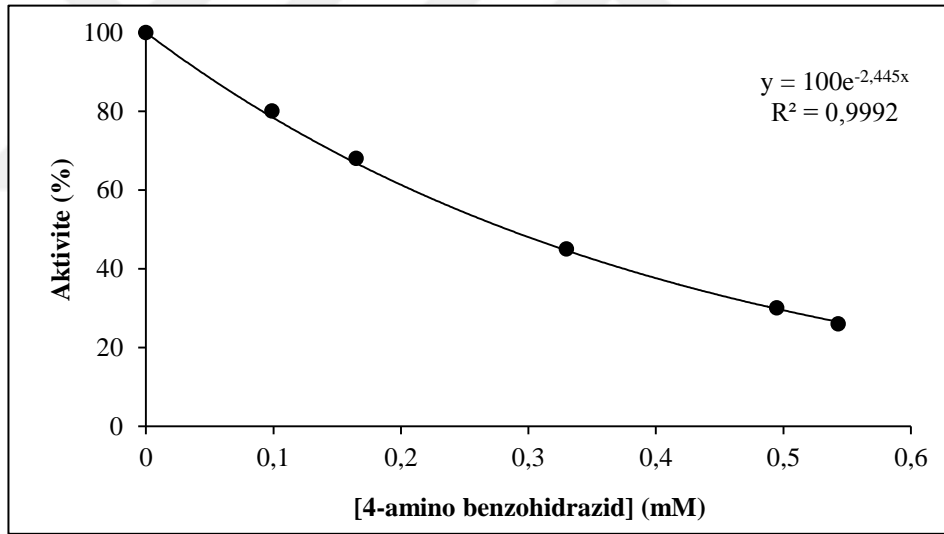
Şekil 4.27. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[4-amino benzohidrazid] grafiği

Çizelge 4.22. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge

[4-aminobenzohidrazit] (mM)	% Aktivite
0,000	100
0,099	80
0,165	68
0,330	45
0,495	30
0,543	26

Çizelge 4.23. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü						
Fosfat tamponu (mL)	Guaia kol (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	Fosfat tamponu (mL)	Guaia kol (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	%Aktivite
1,0	0,5	1,0	0,485	0,015	1,0	0,5	1,0	0,385	0,015	0,1	0,840
1,0	0,5	1,0	0,475	0,025	1,0	0,5	1,0	0,375	0,025	0,1	0,680
1,0	0,5	1,0	0,450	0,050	1,0	0,5	1,0	0,350	0,050	0,1	0,57
1,0	0,5	1,0	0,430	0,070	1,0	0,5	1,0	0,330	0,070	0,1	0,54
1,0	0,5	1,0	0,400	0,1	1,0	0,5	1,0	0,300	0,1	0,1	0,40



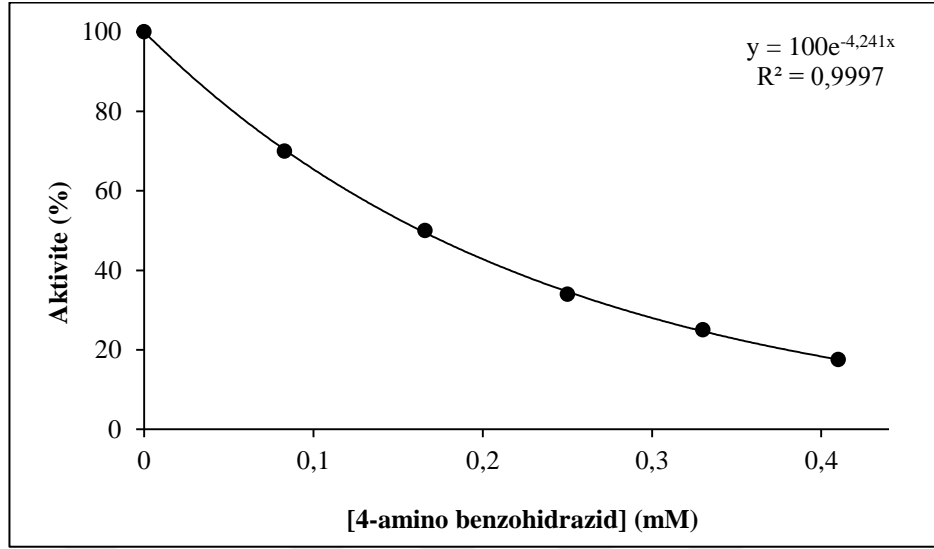
Şekil 4.28. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[4-aminobenzohidrazit] grafiği

Çizelge 4.24. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge

[4-aminobenzohidrazit] (mM)	% Aktivite
0,00	100
0,083	70
0,168	50
0,25	34
0,33	25
0,41	17,53

Çizelge 4.25. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü						
Fosfat tampo nu (mL)	Guaia kol (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Saf su (mL)	İnhibit ör (mL)	Fosfat tampo nu (mL)	Guaia kol (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Saf su (mL)	İnhibit ör (mL)	POD (mL)	%Akt ivie
1,0	0,5	1,0	0,450	0,050	1,0	0,5	1,0	0,400	0,050	0,05	0,090
1,0	0,5	1,0	0,500	0,100	1,0	0,5	1,0	0,450	0,100	0,05	0,070
1,0	0,5	1,0	0,550	0,150	1,0	0,5	1,0	0,500	0,150	0,05	0,051
1,0	0,5	1,0	0,600	0,200	1,0	0,5	1,0	0,550	0,200	0,05	0,035
1,0	0,5	1,0	0,650	0,250	1,0	0,5	1,0	0,600	0,250	0,05	0,028

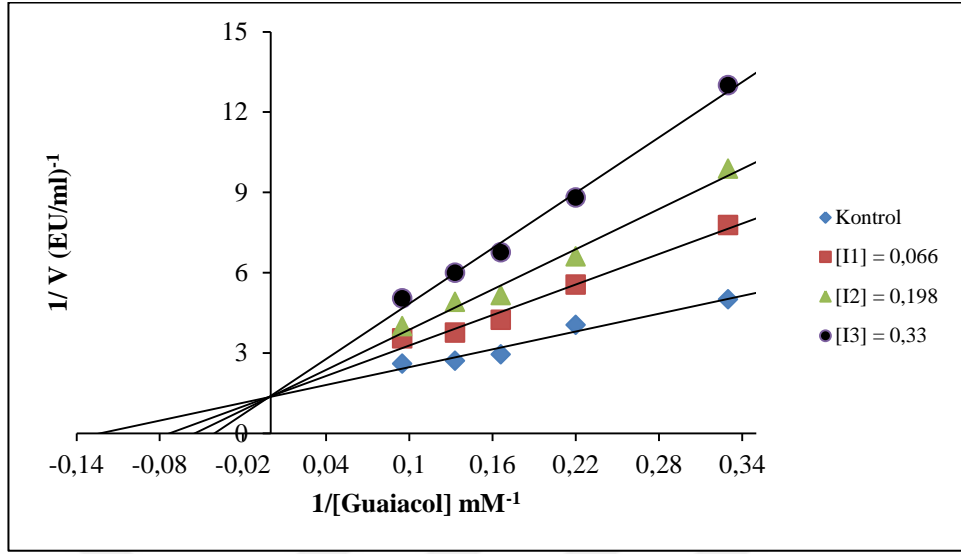


Şekil 4.29. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[4-amino benzohidrazid] grafiği

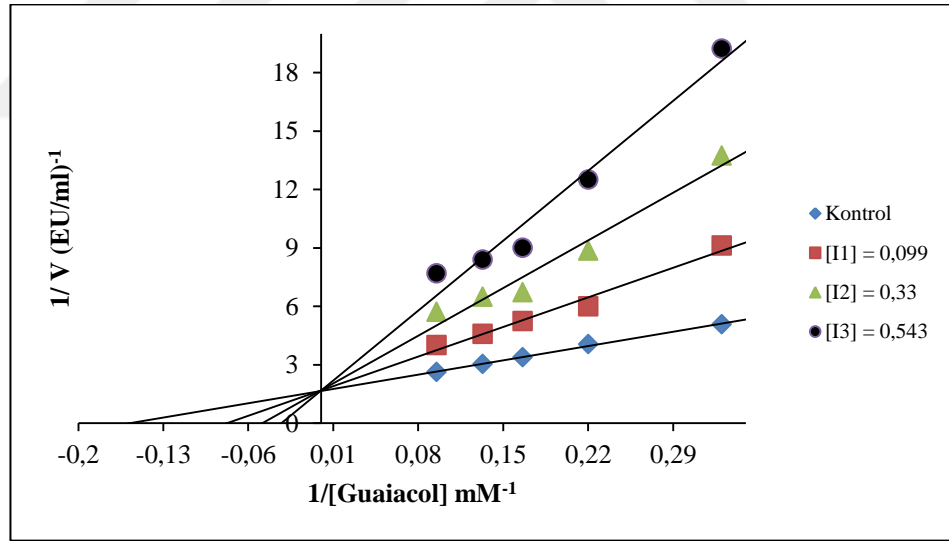
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılmıştır. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.26, 4.27, 4.28'de gösterilmiştir. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulunmuştur. Bu grafikler Şekil 4.30, 4.31, 4.32'de gösterilmiştir. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için K_i sabiti $0,1406 \pm 0,037$ mM inhibisyon tipi yarışmalı, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için K_i sabiti $0,1288 \pm 0,028$ mM inhibisyon tipi ise yarışmalı ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için K_i sabiti $0,4233 \pm 0,022$ mM inhibisyon tipi ise yarışmalı olarak izlenmiştir.

Çizelge 4.26. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü						1/V ($\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}$) ⁻¹	1/S mM^{-1}
İnhibitör no	Guaiacol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiacol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,800	0,2	1,0	1,0	-	0,750	0,06	2,083	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,700	0,3	1,0	1,0	-	0,650	0,06	1,762	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,600	0,4	1,0	1,0	-	0,555	0,06	1,72	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,500	0,5	1,0	1,0	-	0,450	0,06	1,30	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,400	0,6	1,0	1,0	-	0,350	0,06	1,190	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,020	0,780	0,2	1,0	1,0	0,020	0,720	0,06	10,869	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,020	0,680	0,3	1,0	1,0	0,020	0,620	0,06	5	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,020	0,580	0,4	1,0	1,0	0,020	0,520	0,06	4,098	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,020	0,480	0,5	1,0	1,0	0,020	0,420	0,06	3,333	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,020	0,380	0,6	1,0	1,0	0,020	0,320	0,06	2,777	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,030	0,770	0,2	1,0	1,0	0,030	0,710	0,06	7,142	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,030	0,670	0,3	1,0	1,0	0,030	0,610	0,06	5,952	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,030	0,570	0,4	1,0	1,0	0,030	0,510	0,06	4,719	0,17
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,410	0,06	3,787	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,030	0,370	0,6	1,0	1,0	0,030	0,310	0,06	3,333	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,040	0,760	0,2	1,0	1,0	0,040	0,700	0,06	10	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,040	0,660	0,3	1,0	1,0	0,040	0,600	0,06	6,578	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,040	0,560	0,4	1,0	1,0	0,040	0,500	0,06	5,555	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,040	0,460	0,5	1,0	1,0	0,040	0,400	0,06	4,385	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,040	0,360	0,6	1,0	1,0	0,040	0,300	0,06	4,032	0,09



Şekil 4.30. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik



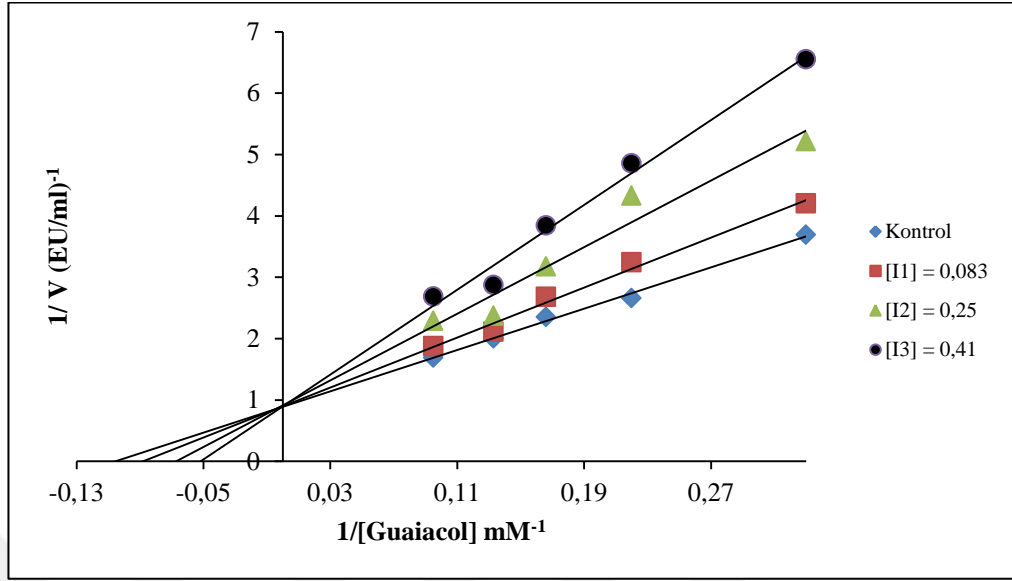
Şekil 4.31. Japon turp (*R. sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik

Çizelge 4.27. Japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör no	Guaiaacol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiaacol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (ml)	1/V (μmol/ ml. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,800	0,2	1,0	1,0	-	0,700	0,1	1,5625	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,700	0,3	1,0	1,0	-	0,600	0,1	1,412	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,600	0,4	1,0	1,0	-	0,500	0,1	1,351	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,500	0,5	1,0	1,0	-	0,400	0,1	1,25	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,400	0,6	1,0	1,0	-	0,300	0,1	0,36754	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,050	0,750	0,2	1,0	1,0	0,050	0,620	0,1	7,78976	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,650	0,3	1,0	1,0	0,05	0,550	0,1	5,434	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,550	0,4	1,0	1,0	0,050	0,450	0,1	3,623	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,350	0,1	3,521	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,350	0,6	1,0	1,0	0,050	0,250	0,1	2,777	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,075	0,725	0,2	1,0	1,0	0,075	0,625	0,1	13,2356	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,075	0,625	0,3	1,0	1,0	0,075	0,525	0,1	9,259	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,075	0,525	0,4	1,0	1,0	0,075	0,425	0,1	5,952	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,075	0,425	0,5	1,0	1,0	0,075	0,325	0,1	5,319	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,075	0,325	0,6	1,0	1,0	0,075	0,225	0,1	4,901	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,1	0,700	0,2	1,0	1,0	0,1	0,600	0,1	16	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,1	0,600	0,3	1,0	1,0	0,1	0,500	0,1	10	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,1	0,500	0,4	1,0	1,0	0,1	0,400	0,1	8,333	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,1	0,400	0,5	1,0	1,0	0,1	0,300	0,1	5,952	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,1	0,300	0,6	1,0	1,0	0,1	0,200	0,1	5,555	0,09

Çizelge 4.28. Karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör no	Guaiacol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiacol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (µmol/ ml. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,52	0,2	1,0	1,0	-	0,75	0,05	0,95	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,70	0,3	1,0	1,0	-	0,65	0,05	0,621	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,60	0,4	1,0	1,0	-	0,55	0,05	0,596	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,50	0,5	1,0	1,0	-	0,45	0,05	0,527	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,40	0,6	1,0	1,0	-	0,35	0,05	0,52	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,100	0,700	0,2	1,0	1,0	0,100	0,650	0,05	2,45604	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,100	0,600	0,3	1,0	1,0	0,100	0,550	0,05	1,811	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,100	0,500	0,4	1,0	1,0	0,100	0,450	0,05	1,160	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,350	0,05	1,096	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,100	0,300	0,6	1,0	1,0	0,100	0,250	0,05	1,077	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,150	0,650	0,2	1,0	1,0	0,150	0,600	0,05	2,75	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,150	0,550	0,3	1,0	1,0	0,150	0,500	0,05	2,5	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,150	0,450	0,4	1,0	1,0	0,150	0,400	0,05	1,26	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,150	0,350	0,5	1,0	1,0	0,150	0,300	0,05	1,19	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,150	0,250	0,6	1,0	1,0	0,150	0,200	0,05	1,16	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,200	0,600	0,2	1,0	1,0	0,200	0,550	0,05	4,433	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,200	0,500	0,3	1,0	1,0	0,200	0,450	0,05	3,52	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,200	0,400	0,4	1,0	1,0	0,200	0,350	0,05	2,31	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,200	0,300	0,5	1,0	1,0	0,200	0,250	0,05	1,74	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,200	0,200	0,6	1,0	1,0	0,200	0,150	0,05	1,66	0,09



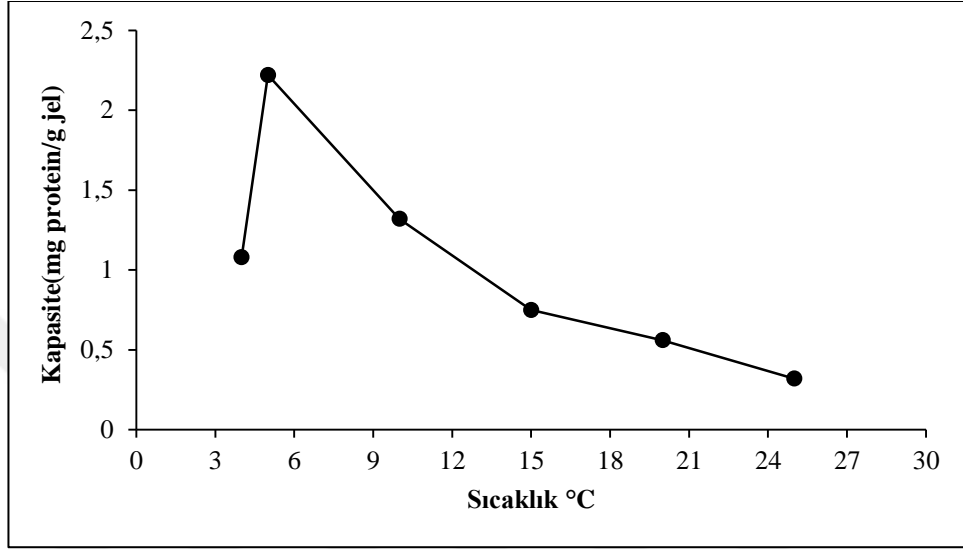
Şekil 4.32. Karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik

Çizelge 4.29. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları

	Bitkiler	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon tipi
4-Amino benzohidrazit	Tatlı turp (<i>Raphanus Sativus</i>)	0,1658	0,1406± 0,037	Yarışmalı
	Japon turp (<i>R.sativus L. var.</i>)	0,2834	0,1288±0,028	Yarışmalı
	Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i>)	0,1634	0,4233±0,022	Yarışmalı

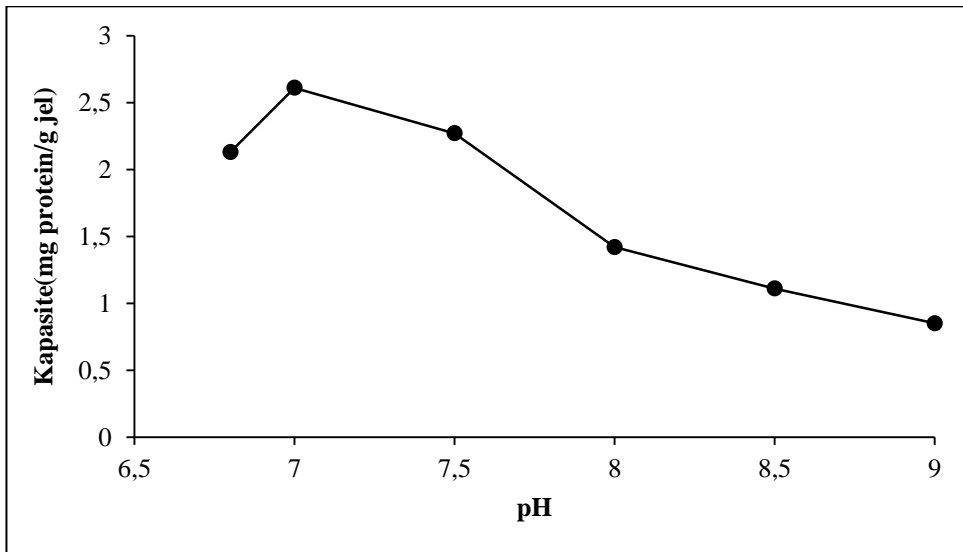
4.4. Amino benzohidrazitin Kolon Kapasite Grafikleri

4.4.1. Sıcaklık üzerine kolonun kapasite belirlenmesi



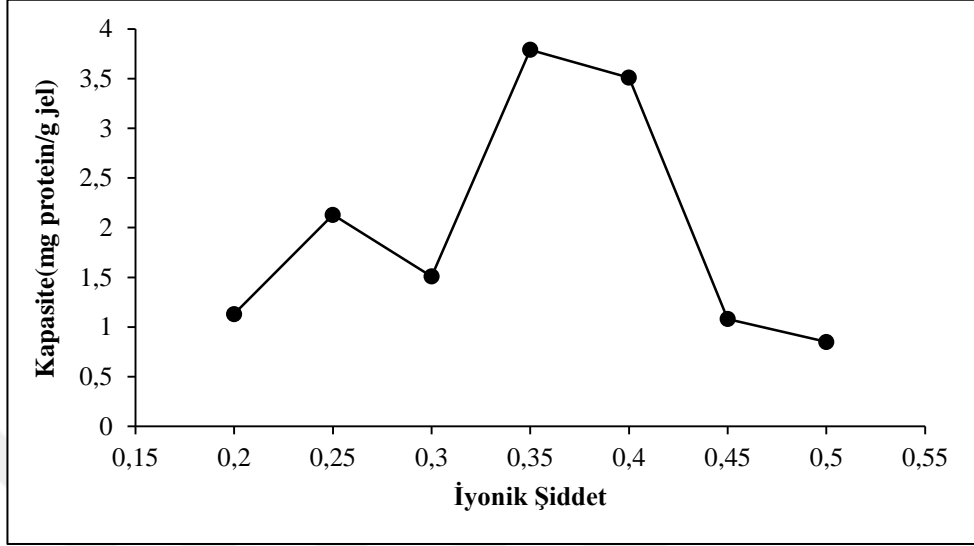
Şekil 4.33. Sıcaklık üzerine kolonun kapasite belirlenmesi

4.4.2. pH üzerine kolon kapasitnin belirlenmesi



Şekil 4.34. pH üzerine kolon kapasitnin belirlenmesi

4.4.3. İyonik şiddeti üzerine kolon kapasitenin belirlenmesi



Şekil 4.35. İyonik şiddeti üzerine kolon kapasitenin belirlenmesi

Sonuç olarak bu kolonun 5°C de, pH:7,0 de, 0,35 iyonik şiddette tutma kapasitesi 2,87 mg proteindir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerde POD enzimleri üzerine geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır. Bilim insanları bu enzimin sanayide önemli ve yararlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu enzimler hidrojen peroksiti elektron alıcısı olarak kullanıp, çok miktarda aromatik moleküllerin dehidrojenasyonunu katalizlerler. Aromatik bileşiklere hidrokinonlar, fenoller, hidrokinonid aminleri örnek olarak verilebilir (Pütter and Becker 1987; Van Huytstee 1987). Bitkilerde değişik fizyolojik reaksiyonlar meydana gelmektedir (Goyal and Chugh 2013). POD enzimleri hem grubu içeren metal proteinlerdir (Pandey *et al.* 2012). POD'lar bitkilerde bulunan zararlı maddeleri zararsız hale dönüştürülmesini sağlamaktadırlar. Yüksek bitkilerde çeşitli POD enzimlerin izoformları (asidik, bazik ve nötral POD'lar) mevcuttur (Balasubramanian and Boopathy 2013).

Peroksidaz bitki dokularında peroksit varlığında pirogallol, guaiakol, klorogenik asit, katekin ve katekol gibi birçok fenolik bileşiği yükseltgeyebilir (Onsa *et al.* 2004). Enzimin geniş oranda organik bileşikleri yükseltgemesi bitkinin rengi, tadı ve besinsel değeri ile ilişkilendirilmesine sebep olmuştur. Peroksidazlar yukarıda verilen farklı aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'i etkisiz hale getirirler (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987).

Afinite kromatografi tekniği; saflaştırılmasını istediğimiz bileşiğin, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir yöntem olarak belirlenmiştir. Afinite kromatografisi bir tür adsorpsiyon kromatografisidir. Özel ligand esasına dayanan bu metot proteinlerin saflaştırılması için kullanılmaktadır. Ayrıca başka metotlarla saflaştırılması bir çok basamak isteyen, daha çok zaman gerektiren hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyal afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta çok kompleks karışımlardan saflaştırılabilir. Genellikle kolon dolgu maddesi olarak Sepharose, Sephadex, Biogel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Matrikse bağlanan ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekmektedir. Bazı durumlarda

matriks ile ligand arasına, istenmeyen etkileşimleri ortadan kaldırmak için uzantı kolları sokulur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bu çalışmada özellikle bitkilerin yaralanan gövdelerinde, yapraklarında, nükleus, çiçek ve saplarında, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunan POD enziminin afinite kromatografi metoduyla saflaştırılması yapılmıştır. POD enziminin saflaştırılması üzerine literatürde birçok kromatografik metot bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler hem zaman açısından uzun sürmekte hemde maliyeti açısından bizim bulduğumuz yöntemle göre daha maliyetlidir (Özdemir *et al.* 2001).

Peroksidaz enzimini saflaştırma çalışmaları 1960'lerden beri yapılmakta olup farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırılmıştır. İyon değişim, afinite, hidrofobik ve metal afinite kromatografisi bildiklerimizden birkaç tanesidir (Singh and Singh 2002).

Kantitatif protein tayinleri Bradford metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemde afinite kolonundan elde edilen tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) elüatlarının protein miktarı belirlenmiştir. Bu yöntem negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin protein üzerindeki pozitif yüke bağlanması sonucu oluşan renkli kompleksin 595 nm'de maksimum absorpsiyon göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı, bozucu etkilere karşı daha az hassas olması ve reaksiyonun yüksek oranda tekrarlanabilir olmasıdır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşir ve protein boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalabilmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

Afinite kromatografisi, çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivite kaybını azaltmak ve daha fazla verimle saflaştırmasını sağlamak amacıyla tercih edilmektedir. Bu sebeple tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden POD enzimlerinin saflaştırılması için ilk defa kullanılan afinite jeli hazırlanmıştır. Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit'in bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan enzimlerin ve

kullanılan ligandın kinetik özellikleri, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi belirlenmiştir.

4-aminobenzohidrazit'in POD enzim üzerine inhibitörü olduğu literatür'de mevcuttur (Kettle *et al.* 1997), ancak bu inhibitörün detaylı kinetik özellikleri hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. 4-aminobenzohidrazit gibi bileşikler yapılarında benzen halkasına bağlı serbest -NH₂ grubu bulundurulur. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile afinite jeli hazırlayarak tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin saflaştırılması bu kolonda yapılmıştır. Bu jelin sentezlendiği, 4-aminobenzohidrazit'in diazonyum tuzu oluşturularak uzantı koluna bağlanması sonucu jelin renklenmesinden anlaşılmaktadır. Zaten diazonyum tuzu oluşturabilen bileşiklerin renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir.

Literatürlerde POD enziminin saflaştırılmasına yakın olan çalışmalarda, enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-25 yöntemi kullanarak saflaştırmışlardır (Luo *et al.* 2010; Pandey *et al.* 2012; Goyal and Chugh 2013).

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) homojenatları hazırlandıktan sonra bu homejenatlar ayrı ayrı 4-aminobenzohidrazit kolonundan geçirilmiş ve saflaştırılan POD enziminin kolona tutunarak diğer tüm kirliliklerin yıkama tamponu ile uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş POD enzimleri elüe edilmiştir. Elüe edilen tüm fraksiyonlara aktivite tayini ve kantitatif protein tayini yapılmıştır. Bulunan sonuçlar neticesinde hesaplamalar yapılarak tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimleri için saflaştırma tabloları çizilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3). Çizilen saflaştırma tablolarına göre tek kromatografik işlemle POD enzimi tatlı turp (*Raphanus Sativus*) 1034,48 (EÜ/mg) ve %19,65 verimle 25,75 kat, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) 1454,54 (EÜ/mg) ve %9,6 verimle 34,74 kat ve karnabahar (*Brassica*

oleracea) ise 459,36 (EÜ/mg) ve %9,75 verimle 21,23 kat saflaştırılmıştır. Erdem *et al.* (2015) POD enzimini %4.3 verimle 24,7 kat saflaştırmışlardır. Pandey *et al.* (2012) papayadan (*Carica papaya*) POD enzimini üç kromatografik adımda 68,59 (EÜ/mg) ve %44,37 verimle 30,22 kat saflaştırmıştır Kalın *et al.* (2015) karaturp ve şalgamdan POD enzimini sırayla 40.3 (%10.6 verim) kat ve 269,3 (%9 verim) kat saflaştırmışlardır. Al-Senaïdy and Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 906,2 (EÜ/mg) ve %5,8 verimle 17 kat saflaştırmıştır (Al- Senaïdy and Ismael 2011). Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından POD enzimini iki kromatografik adımda 96,4 (EÜ/mg) ve %4,2 verimle 22,6 kat saflaştırmıştır (Köksal 2011). Luo *et al.* (2010) taze kesilmiş *Zizania Latifolia* bitkisinden POD enzimini 61,51 kat (%9.32 verim) saflaştırmışlardır. (Luo *et al.* 2010). Lavery *et al.* (2010) at turpundan (*Armoracia rusticana*) POD enzimini iki kromatografik adımda 772,25 (EÜ/mg) ve %71,3 verimle 291 kat saflaştırmıştır. Gong *et al.* (2015) kestane çekirdeğinden POD enzimini 9,53 kat saflaştırmışlar. Ajila and Prasada Rao siyah gram kabuğundan (*Vigna mungo*) POD enzimini iki kromatografik adımda 1215291 (EÜ/mg) ve %44 verimle 44 kat saflaştırmıştır (Ajila and Prasada Rao 2009). Somtürket *et al.* (2014) kırmızı lahanadan POD enzimini 120,6 kat ve %2,9 verimle saflaştırmışlardır. Marquez *et al.* (2008) vanilya çekirdeğinden POD enzimini iki kromatografik adımda 1563,5 (EÜ/mg) ve %19 verimle 21 kat saflaştırmışlardır. Köksal and Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) ve %0,2 verimle 19,33 kat saflaştırmışlardır (Köksal and Gülçin 2008). Rudrappa *et al.* (2007) kırmızı pancardan (*Beta vulgaris* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 10500 (EÜ/mg) ve %84,6 verimle 15 kat saflaştırmıştır Mdluli marula meyvesinden (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*) POD enzimini üç kromatografik adımda 361,469 (EÜ/mg) ve %1,3 verimle 19 kat saflaştırmıştır (Mdluli 2005). Gülçin and Yıldırım karalahanadan (*Brassica oleracea*) POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) ve %33 verimle 33,5 kat saflaştırmıştır (Gülçin and Yıldırım 2005). Literatüre bakıldığında POD enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik adımların en az iki tanesi kullanılmıştır. Buda POD enziminin saflaştırma prosedürünün gerçekten çok uzun ve oldukça maliyetli olduğunu gösterir. Yapmış olduğumuz çalışmaların

sonuçlarını literatürdeki çalışmalarla karşılaştırdığımızda daha kısa sürede ve daha az masrafla yüksek verimler elde ettiğimizi görmekteyiz.

SDS-PAGE yöntemini kullanılarak tatlı turp'tan (*Raphanus Sativus*) saflaştırılan POD enziminin molekül kütlesi 62,25 KDa, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) için 62,21 KDa ve karnabahardan (*Brassica oleracea*) ise 57,3 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, farklı bitkilerden literatürlerde saflaştırılan peroksidazın molekül ağırlıkları ile uygunluk göstermektedir. Örnek olarak enzimin molekül kütlesi domates (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) ve brokolide (Tıpawan and Barrett 2005) 43 kDa, kırmızı lahanada (Somtürk *et al.* 2014) 69.3 kDa, karalahanada (Gülçin and Yıldırım 2005) 95 kDa, pirinçte (Hiraoka *et al.* 1991) ve hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, papaya meyvesinde (Pandey *et al.* 2012) 70 kDa, kuşkonmazda (Civello *et al.* 1995) 34 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa, avokado meyvesinde (Rojas-Reyes *et al.* 2014) 40 kDa, kırmızı pancarda (Rudrappa *et al.* 2007) 45 kDa, at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, siyah turpda (Şişecioğlu *et al.* 2010) 66 kDa, vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44kDa, siyah gram kabuğunda (Ajila and Prasada Rao 2009) 38 kDa olarak tespit edilmiştir.

Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra enzimler için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turpu (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimleri için optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık, K_m , V_{max} ve stabil pH değerleri belirlenmiştir.

Sakharow *et al.* (2011) palmye (*Roystonea regia*) peroksidazı üzerinde guaiakol substratı ile yaptığı bir çalışmada optimum pH fosfat/sitrat tamponunda 5,5 olarak bulunmuştur. Bu değer bizim bulduğumuz değerle uyum içindedir. Çalıştığımız bitkilerde elde edilen peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla çalışmalarda H_2O_2 substratı her ölçümde kullanılmakla beraber ikinci substrat olarak guaiakol substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı ve bu substrat için enzimin optimum tuz konsantrasyonu belirlendi.

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 5,0-9,5 aralığında 0,1 M'lık KH_2PO_4 tamponlarında enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Şekil 4.12, 4.13, 4.14'de görüldüğü gibi tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin sırayla optimum pH değeri 0,1-1 M'lık KH_2PO_4 tamponunda sırasıyla 6,5-6,5-6 olarak tespit edilmiştir. Somtürk *et al.* (2014) kırmızı lahanadan POD enzimin üzerine optimum pH'yı fosfat tamponunda 7,0 olarak bulmuştur. Taslimi *et al.* (2013) *Aerobacillus pallidus*'dan (P26) bakterisinden POD enzimin üzerine optimum pH değerini 7,0 olarak bulmuşlardır. Hsu *et al.* (2010) Bambu kılıflarından POD izoformlarını saflaştırıp, optimum pH değerini 4,5 olarak bulmuşlardır. Köksal and Gülçin (2008) karnabahar (*Brassica oleracea L.*) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum pH'yı fosfat tamponunda 5,0 olarak bulmuşlardır. Gülçin and Yıldırım (2005) karalâhanadan (*Brassica oleracea*) elden edilen peroksidazın optimum pH'sını Tris/HCl tamponunda 7,5 olarak bulmuşlardır. Rojas-Reyes *et al.* (2014) avokado meyvesinden POD enzimini saflaştırıp, optimum pH değerini 3,8 olarak tespit etmişlerdir. Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum pH değerini fosfat tamponunda 5,2 olarak bulmuştur (Köksal 2011). Lavery *et al.* (2010) yaptığı bir çalışmada at turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazının optimum pH'sını fosfat tamponunda 7,0 olarak tespit etmişlerdir. Kumar *et al.* (2011) karayip bitkisi (*Euphorbia cotinifolia*) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH'sını fosfat tamponunda 7,0 olarak bulmuşlardır. Peroksidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda genellikle optimum pH değeri 5,0-7,5 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bizim bulduğumuz optimum pH değerleri literatürde bulunan değerlerle uyum içindedir. Hem bizim bulduğumuz hemde literatürde bulunan optimum pH değerleri gösteriyor ki peroksidaz enzimi asidik bir pH'da daha aktiftir.

POD enziminin çalışılan bitkilerde aynı sıcaklıkta ve pH'da sabit H_2O_2 substratı konsantrasyonunda guaiakol substratı için K_m ve V_{max} değerleri tatlı turp (*Raphanus Sativus*) için 0,41 mM ve 1,43 EU/mL, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) için

0,56 mM ve 1,50 EU/mL ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için 0,64 mM ve 1,95 EU/mL olarak bulunmuştur. Benzer şekilde literatürlerde elde edilen K_m ve V_{max} değerleri şu şekilde tespit edilmiştir: Erdem *et al.* (2015) yılında beyaz lahanada guaiakol substratını kullanarak K_m ve V_{max} değerleri sırayla 3.19 mM ve 0.2 EU/mL olarak hesaplamışlardır. Kalın *et al.* (2014) şalgam ve karaturp bitkilerinden saflaştırmış oldukları POD enzimin guaiakol substratı ile karaturp ve şalgam için K_m ve V_{max} değerleri sırayla 24.88 mM ve 3.23 EU/mL, 4.09 mM ve 0.797 EU/mL bulmuşlardır. Somtürk *et al.* (2014) kırmızı lahanadan saflaştırılan POD enzimi için guaiakol substratını kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri sırayla 0.048 mM ve 1.46 EU/mL olarak hesaplamışlar.

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin optimum iyonik şiddetlerini belirlemek için 0,1 ile 1,0 M arasında optimum pH'da fosfat tamponu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda Şekil 4.15, 4.16, 4.17'de görüldüğü gibi optimum iyonik şiddet tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD için 1 M, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD için 0,1 M ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için ise 0,1 M bulunmuştur. Şişecioğlu *et al.* (2010) siyah turpdan POD enzimin üzerine optimum iyonik şiddetini 1.0 M bulmuşlardır. Köksal and Gülçin (2008) karnabahar (*Brassica oleracea L.*) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum iyonik şiddeti 1,0 M olarak tespit etmişlerdir. Köksal *et al.* (2008) ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum iyonik şiddetini 0,075 M olarak bulmuştur. Karaturp (*Raphanus sativus L.*) POD için bulunun optimum iyonik şiddet değeri ıspanak (*Spinacia oleracea*) POD ile uyum içindeyken şalgam (*Brassica rapa L.*) POD ise karnabahar (*Brassica oleracea L.*) POD enzim ile uyum içindedir.

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum sıcaklığını belirlemede optimum pH ve optimum iyonik şiddette 10'ar °C artışla 0-90°C aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen

bulgulara göre tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin sırayla optimum sıcaklık 35°C, 35°C, 30°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.18, 4.19, 4.20). Erdem *et al.* (2015) beyaz lahanadan POD enzimini saflaştırıp ve üzerine optimum sıcaklık değerini 30°C olarak belirlemişlerdir. Rudrappa *et al.* (2007) kırmızı pancardan POD enzimini saflaştırıp ve üzerine optimum sıcaklık değerini 30°C olarak bulmuşlardır. Lavery *et al.* (2010) at turpundan POD enzimini saflaştırıp ve optimum sıcaklığı 30°C olarak tespit etmişlerdir. Marquez *et al.* (2008) vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 16°C, Al-senaidy and Ismael (2011) hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera L.*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 55°C, Gülçin and Yıldırım (2005) karalahanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 40°C, Luo *et al.* (2010) taze kesilmiş *Zizania Latifolia* bitkisinden POD enzimini saflaştırıp optimum sıcaklık değerini 40°C olarak bulmuşlar. Köksal and Gülçin (2008) karnabahardan (*Brassica oleracea L.*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 30°C, Köksal (2011) (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 60°C, Gong *et al.* (2015) kestane çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını ise 50°C olarak belirlemişlerdir. Kumar *et al.* (2011) karayip bitkisinden (*Euphorbia cotinifolia*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 50°C olarak bulmuşlardır. Balasubramanian and Boopathy (2013) Hindistan cevizinden (*Cocos nucifera L.*) POD enzimini saflaştırmış ve optimum sıcaklık değerini 40°C olarak bulmuşlardır. Karaturp (*Raphanus sativus L.*) ve şalgam (*Brassica rapa L.*) POD enzimlerinin optimum sıcaklıklarının karnabahar (*Brassica oleracea L.*) POD enziminin optimum sıcaklığı ile uyum göstermektedir.

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin stabil oldukları pH'lar bulunurken pH'sı 5,0-8,0 aralığında olan 0,1-1 mM'lık fosfat tamponları kullanılmıştır. Bu tamponlarda hazırlanan enzim stoklarının 12 saat arayla 108 saat boyunca aktivite ölçümleri yapılarak enzimlerin stabil oldukları pH'lar tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler neticesinde tatlı turp (*Raphanus Sativus*) peroksidazı için stabil pH 6,5

bulunurken (Şekil 4.16), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) peroksidazı için ise stabil pH değeri 5,5 ve karnabahar (*Brassica oleracea*) için 5,5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.17). Köksal (2011) ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin stabil pH değerini 5,5 olarak bulmuştur. Köksal and Gülçin (2008) karnabahardan (*Brassica oleracea L.*) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sını 8,5 olarak tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Gülçin and Yıldırım (2005) karalahanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin stabil olduğu değeri 6,5 olarak bulmuşlardır. Literatürdeki bu çalışmalara bakıldığında tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi ile uyum içindedir.

Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimleri üzerine ligand olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit inhibitörü için detaylı kinetik çalışma yapılmıştır. Her bir enzim için guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, guaiakol (45 mM) reaksiyon ortamına 5 farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite ölçüm yapıldı. Bulunan bu değerlerle % Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.27, 4.28, 4.29). Çizilen bu grafiklerden tatlı turp (*Raphanus Sativus*) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,165 mM olarak bulunurken japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,283 mM ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,163 mM olarak bulunmuştur.

IC_{50} değerleri bulunduktan sonra tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimleriyle ayrı ayrı 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılmıştır. Yapılan ölçümlerden sonra $1/V$ ve $1/S$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.30, 4.31, 4.32). Çizilen bu grafiklerden tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) POD enzimlerinin inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*) peroksidazın K_i sabiti

0,1406±0,037 mM, inhibisyon tipi yarışmalı, japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) peroksidazın K_i sabitleri sırayla 0,1288±0,028 ve 0,4233±0,022 mM, inhibisyon tipi ise yarışmalı olarak bulunmuştur. Böylece saflaştırmada kullanılan 4-aminobenzohidrazit ligandının detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilk kez bu tez kapsamında tespit edilmiş oldu.

POD enziminin saflaştırılması ile ilgili birçok kromatografik yöntem olmasına rağmen enzimlerin saflaştırılmasında çok önemli bir yöntem olan afinite kromatografisi ile ilgili literatürde çok detaylı saflaştırma prosedürü yoktur. Bu çalışmada POD enziminin saflaştırılmasında kullandığımız siyanojen bromürle aktifleştirilmiş Sepharose 4B matrisine 4-aminobenzohidrazit ligandı bağlanarak hazırlanan afinite kolonu ile ilgili literatürde hiçbir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu amaç doğrultusunda ilk defa POD enzimi mevcut metotlara göre farklı bir afinite jeli hazırlanıp saflaştırılması yeni bir yöntem olarak literatüre katkı sağlayacak olması çalışmamızı önemli kılmaktadır. 4-aminobenzohidrazit gibi diazonyum tuzu oluşturabilecek POD inhibitörü enzimin saflaştırılmasında afinite kolonunun ligandı olarak ilk kez kullanılmıştır. Bu çalışmamız POD enziminin saflaştırılmasında diğer inhibitörlerin (anilin, sülfanilamid, benzokain ve o-toluidin gibi) araştırılması gerektiğini inhibitörler içerisinde en iyi ligand belirlenmesi için bir başlangıçtır. POD enzimi için bulduğumuz afinite kromatografisi tekniği mevcut yöntemlere göre birçok üstünlüğe sahiptir. Bunlar; maliyetinin düşük olması, kısa sürede yüksek verim elde edilmesi ve hazırlanan kolon materyalinin defalarca kullanılabilir olmasıdır.

Gelecek zamanlarda; tekstil alanında kullanılan ve canlılar üzerinde olumsuz etkisi olduğu bilinen sentetik veya yarısentetik boyaların gideriminde, tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar'dan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan peroksidaz enziminin yüksek verimlilikle kullanılabilceği düşünülmektedir.

Sonuç Olarak;

1. Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) peroksidaz enzimlerinin mevcut yöntemler haricinde Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit jeli ile saflaştırılması ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirildi.
2. Afinite ile saflaştırılan Tatlı turp (*Raphanus Sativus*), japon turp (*R.sativus L. var. longipinnatus*) ve karnabahar (*Brassica oleracea*) peroksidaz enzimleri için ayrı ayrı optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m ve V_{max} gibi kinetik parametreler tespit edildi.

KAYNAKLAR

- Al-Senaidy, A., Ğsmael, M., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 293-298.
- Altıkatoğlu, M., BaĞaran, 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.
- Altunkaya, A., Gökmen, V., 2011. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (*L. sativa*). *Food Technol. Biotechnol.* 49: 249–256
- Aptiz, A., Van Pée KH, K., 2001. Ğsolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus*. *Arch Microbial*, 175 175(6), 405-412.
- Asgher, M., Ramzan, M., Bilal, M., 2016. Purification and characterization of manganese peroxidases from native and mutant *Trametes versicolor* IBL-04. *Chinese Journal of Catalysis* 37: 561–570.
- Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.
- Balasubramanian, M., Boopathy, R., 2013. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocosnucifera* (L.): Biotransformation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90: 33– 42.
- Batçioğlu, K., Öztürk, C., Karagözler, A., Karataş, F., 2002, Comparison of the selenium level with GSH-Px activity in the liver of mice treated with 7,12 DMBA, *Cell Biochem Funct.*, 20, 115-118.
- Bergsten-Torralba, L.R., Nishikawa, M.M., Baptista, D.F., Magalhães, D.P., da Silva, M., 2009. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 808-817.
- Boeuf, G., Bauw, G., Legrand, B., Rambour, S., 2000. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 217-224.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419.
- Daniel, RM., Peterson, M.E., Danson, M.J., *et al.*, 2010. "The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity". *Biochem. J.* 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.
- Deepa, S. S., Arumughan, C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61: 503–511.

- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17: 137–148.
- Erdem, H.Ü., Kalın, R., Özdemir, N., Özdemir, H., 2015. Purification and Biochemical Characterization of Peroxidase Isolated from White Cabbage (*Brassica Oleracea var. capitata f. alba*). *International Journal of Food Properties*, 18:2099–2109.
- 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.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclophedia of Plant Physiology*, Pirson, A., Zimmerman, M.H. (Ed). 4-17, New York.
- Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., Wang, W., 2015. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Science and Technology* 60: 1095-1099.
- Goyal, P., Chugh, L.K., 2013. Partial Purification and characterization of peroxidase from pearl Millet (*Pennisetum Glaucum* [L.] R. Br.) Grains. *Journal of Food Biochemistry* 38: 150-158.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53: 281-285.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23: 871-876.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., Beydemir, S., 2013. Phenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 13: 408–430
- Gülçin, İ., Yıldırım, A., 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea var. Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Hage, D.S., 2006. *Handbook of Affinity Chromatography*, D.S. Hage and J. Cazes (Editors), CRC Pres, p 856, Boca Raton.
- Hsu, S.K., Chung, Y.C., Chang, C.T., Sung, H.Y., 2012. Purification and characterisation of two acidic peroxidase isoforms from the sheaths of bamboo shoots. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 1872–1881.
- Humaira A., Qayyum, H., 2010. Studies on bitter gourd peroxidase catalyzed removal of p -bromophenol from wastewater Desalination, 262 (1-3), p.267-272.
- Kalın, R., Atasver, A., Özdemir, H., 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots. *Food Chemistry* 150: 335–340.
- Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş birafinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Erzurum.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, 642s, İstanbul.

- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Purification and Characterization of Peroxidase from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) Buds. *Protein & Peptide Letters*, Vol:15, No.4.
- Kumar, R., Singh, K.A., Singh, V.K., Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry* 46: 1350–1357.
- Kumpalume, P., Ghose, S., 2003. Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation. In: Isolation and Purification of Proteins, R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson (Editors), Marcel Dekker, pp. 29-56, New York.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, 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.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society* 56 (3): 658–666.
- Luo, H., Jiang, J., Jiang, L., Zhang, L., Yu, Z., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Fresh-Cut *Zizania Latifolia*. *Journal of Food Biochemistry*, 36: 309–316.
- 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 characterisation of polyphenol oxidase 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 J* 5:397-405.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68: 777–788.
- Nadaroğlu, H., 2009. Purification and properties of peroxidase from prangos ferulacea (Apiaceae) and investigation by some chemicals, *Asian J Chem.*, 21: 5768-5776
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2000, *Enzymology and structure of catalases*, *Advances in Inorganic Chemistry*, 51, 51-106.
- Ocarra, P., Barry S., 1974. Griffin T spacer arms in affinity chromatography - use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. *Febs Letters*, 43, 169-175.
- Oliveira, P., Duarte, M., Ponezi, A., Durrant, L., 2009. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Brazilian journal of microbiology*, ISSN 1517-8382. 40:818-826.
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and Characterization of Peroxidase from Papaya (*Carica papaya*) Fruit. *Appl Biochem Biotechnol*, 167:367–376.

- Rojas-Reyes, J.O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Matinez, C.C., Waliszewski, K.N., Aguilar-Uscanga, M.G., 2014. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). *J Sci Food Agric*, 94: 1844–1853.
- 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, 1312–1320.
- 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: 1312–1320.
- 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.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Serrano-Martinez, A., Fortea, M.I., Del Amor, F.M., Nunez-Delgado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107: 193–199.
- Shahidi, F., 1996, *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCs Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
- Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., LIU, S., DU, J., LIU, Q., 2004, Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn-Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves, *Plant Science*, 167(6), 1235-1241.
- 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.
- Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N., 2014. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra) by Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol*, 173:1815–1828.
- Sroka, Z., and Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 41: 753-758
- 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*, 412: 1187-1196.
- Taslimi, P., Nadaroglu, H., Adiguzel, A., Bozoglu, C., and Gulluce, M., 2013. Removal of Some Textile Dyes from Aqueous Solution by Using a Catalase-Peroxidase from *Aeribacillus pallidus* (P26). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7: 2629-2640
- Telefoncu, A., 1997. *Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu*. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 s.

- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateryallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Thongsook, T., Barrett. D., 2005. Purification and partial characterization of Broccoli peroxidase. J.agric. food chem. 53: 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, 2006. Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız sistemlerde immobilize peroksidaz enzimin karakterizasyonu. Yüksek lisans tez.
- Turgut, K., 2009. Sakaraya bölgesinde yetişen deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tzika, E.D., Sotiroidis, T.G., Papadimitriou, V., Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea cv. Koroneiki*). Eur Food Res Technol., 228: 487-495.
- Voet, D., Voet, J.G., , 2010. Biochemistry, Wiley; 4 edition, New York. Whitaker, J.R., 1990. New and future uses of enzymes in food processing. Food Biotechnology, 4: 669-697.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. Analytical Biochemistry, 57, 467-476.
- Wilchek, M., Chaiken, I., 2000. An Overview of Affinity Chromatography. In: Affinity Chromatography-Methods and Protocols, P. Bailon, G.K. Ehrlich, Wen-Jian Fung and W. Berthold (Editors), Humana Press, pp. 1-6, New Jersey.
- Wolfgang, A. 2004. Enzymes in industry: Production and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Zeng, G.M., Zhao, M.H., Huang, D.L., Lai, C., Huang, C., Wei, Z., Xu, P., Li, N.J., Zhang, C., Li, F.L., Cheng, M., 2013. Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation 85: 166-172.
- Zou, H., Luo, Q., Zhou, D., 2001. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49: 199-240.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İran'da, Ardabil şehrin'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ardabil'de tamamladı. 2005-2011 yıllar arasında lisans ve yüksek lisansı bitirdi.2012 yılında doktora programını Atatürk Üniversitesinde kazanmış ve 2016 yılında aralık ayında Biyokimya Anabilim dalında mezun oldu.

