

**KARNABAHAR (*Brassica oleracea* L.) PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve
KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN ve
ANTİRADİKAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Ekrem KÖKSAL

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN

**2007
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KARNABA HAR (*Brassica oleracea* L.) PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU,
ANTİOKSİDAN VE
ANTİRADİKAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Ekrem KÖKSAL

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

KARNABAHAR (*Brassica oleracea* L.) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU, ANTIOKSİDAN VE ANTİRADİKAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Ekrem KÖKSAL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin antioksidan ve radikal giderme aktivitelerini değerlendirmek için 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH[·]) serbest radikal giderme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD⁺) radikal giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikali (O₂^{·-}) giderme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivite, potasyum ferriksiyanit indirgeme metodu ile toplam indirgeme kuvveti, Kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi ve ferröz iyonları (Fe²⁺) şelatlama aktivitesi çalışıldı. Ayrıca α-tokoferol ve α-tokoferolün suda çözünen bir analogu olan troloks referans antioksidan bileşikleri olarak kullanıldı. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstraktları 30 µg/ml konsantrasyonunda linoleik asit emülsiyonunun lipid peroksidasyonunu sırasıyla %63,1 ve %77,4 inhibe ettiği gözlemlendi. Diğer taraftan aynı konsantrasyonda α-tokoferol ve troloksun linoleik asit emülsiyonunun lipid peroksidasyonunu sırasıyla %81,3 ve %68,1 inhibe ettiği görüldü. Ayrıca her iki ekstre etkili bir şekilde DPPH[·], ABTS, DMPD ve O₂^{·-} radikal giderme aktiviteleri, toplam antioksidan aktivite, indirgeme kuvveti, hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktivitesi gösterdiler.

Ayrıca çalışmamızda karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden bir primer antioksidan enzim olan peroksidaz enzimi de amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-25 saflaştırma basamakları ile %0,2 verimle ve 19,33 kat saflaştırıldı. Guaiakol/H₂O₂, pirogallol/H₂O₂, ABTS/H₂O₂, katekol/H₂O₂ ve 4-metil katekol/H₂O₂ substrat çiftleri kullanılarak her bir substrat için ayrı ayrı optimum pH, optimum sıcaklık, optimum tuz konsantrasyonu, stabil pH, stabil sıcaklık ve termal stabilizasyon şartları belirlendi. Ayrıca her bir substrat çifti için Lineveawer-Burk grafiklerinden K_m ve V_{max} değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin molekül kütlesi 44 kDa olarak bulundu. Enzimin izoenzimlerini belirlemek için doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bir bant gözlemlendi.

2007, 123 sayfa

Anahtar kelimeler: Karnabahar, *Brassica oleracea* L., Peroksidaz, Enzim, Antioksidan aktivite

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF PEROXIDASE FROM CAULIFLOWER (*Brassica oleracea* L.) AND DETERMINATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL ACTIVITIES

Ekrem KÖKSAL

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In order to evaluate antioxidant and radical scavenging activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.), different in vitro methodologies such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH·) free radical scavenging activity, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) radical scavenging activity, superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity, total antioxidant activity by ferric thiocyanate method, total reducing power by potassium ferricyanide reduction method, cupric ion (Cu^{2+}) reduction capacity by Cuprac method, hydrogen peroxide scavenging activity and ferrous ions (Fe^{2+}) chelating activities were performed separately. Also, α -tocopherol and trolox, a water-soluble analogue of α -tocopherol, were used as the reference antioxidant compounds. The water and ethanol extracts from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) showed 63,1% and 77,4% inhibition on lipid peroxidation of linoleic acid emulsion at the 30 μ g/mL concentration, respectively. On the other hand, α -tocopherol and trolox demonstrated inhibition of 81,3% and 68,1% on peroxidation of linoleic acid emulsion, respectively, at the same concentration. In addition, both extracts showed DPPH·, ABTS, DMPD and $O_2^{\cdot-}$ radical scavenging activities, total antioxidant activity, reducing power, hydrogen peroxide scavenging and metal chelating activities.

Also, peroxidase, a primer antioxidant enzyme, was purified with 19,33 fold and 0,2% efficiency from Cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by ammonium sulphate precipitation, dialysis, CM-Sephadex ion-exchange chromatography and Sephadex G-25 purification steps. Optimum pH, optimum temperature, optimum salt concentration, stabil pH, stabil temperature, thermal inactivation conditions were determined for each guaiacol/ H_2O_2 , pyrogallol/ H_2O_2 , ABTS/ H_2O_2 , catechol/ H_2O_2 and 4-methyl catechol/ H_2O_2 substrate patterns. K_m and V_{max} values were calculated from Lineveawer-Burk graph for each substrate. Molecular weight of the enzyme was found 44 kDa by gel filtration column chromatography. Native polyacrylamide gel electrophoresis was performed for isoenzyme determination and a single band was observed.

2007, 123 pages

Keywords: Cauliflower, *Brassica oleracea* L., Peroxidase, Enzym, Antioxidant activity

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakóltesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakóltesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım boyunca her türlü yardımını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakóltesi, Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan SEÇEN'e, Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİÖĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Münir OKTAY'a, Sayın Doç. Dr. şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Arř.Gör. Deniz EKİNCİ'ye, Sayın Hatice şERBETçİ'ye, Sayın Murat şENTÜRK'e, Sayın Arř.Gör. Melda şİşECİÖĞLU'na, Araştırma Laboratuvarında alışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım esnasında eşim ve kızımdan görmüş olduğum destekten dolayı kendilerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekrem KÖKSAL

Haziran, 2007

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | X |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xvii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 22 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 25 |
| 3.1. Materyal..... | 25 |
| 3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler..... | 25 |
| 3.1.2 Yararlanılan alet ve cihazlar..... | 25 |
| 3.1.3 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması..... | 26 |
| 3.1.3.a. Toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler..... | 26 |
| 3.1.3.b. Fe ⁺³ -Fe ⁺² indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 26 |
| 3.1.3.c. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 27 |
| 3.1.3.d. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 27 |
| 3.1.3.e. ABTS ⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 27 |
| 3.1.3.f. DMPD ⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 28 |
| 3.1.3.g. Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 29 |
| 3.1.3.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 29 |
| 3.1.3.i. Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler..... | 30 |
| 3.1.3.j. Enzim homojenatı ile ilgili çözeltiler..... | 30 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.1.3.k. | Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz için kullanılan çözeltiler..... | 30 |
| 3.1.3.l. | Peroksidaz enziminin iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması sırasında kullanılan çözeltiler..... | 30 |
| 3.1.3.m. | Peroksidaz enziminin jel-filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması sırasında kullanılan çözeltiler..... | 31 |
| 3.1.3.n. | Optimum pH çalışması sırasında kullanılan çözeltiler..... | 31 |
| 3.1.3.o. | Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisinin incelenmesi ile ilgili çözeltiler..... | 32 |
| 3.1.3.ö. | Enzimin stabil pH'sının bulunması ile ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltiler..... | 32 |
| 3.1.3.p. | Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltiler..... | 32 |
| 3.1.3.r. | Kantitatif protein miktarı tayininde kullanılan çözeltiler..... | 33 |
| 3.1.3.s. | SDS-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS PAGE) için kullanılan çözeltiler..... | 33 |
| 3.1.3.ş. | Peroksidaz enziminin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi ile ilgili çözeltiler..... | 34 |
| 3.2. | Yöntem..... | 35 |
| 3.2.1. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin toplanması ve kurutulması..... | 35 |
| 3.2.2. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisi ekstralarının hazırlanması..... | 35 |
| 3.2.2.a. | Su ekstrasının hazırlanması..... | 35 |
| 3.2.2.b. | Etanol ekstrasının hazırlanması..... | 36 |
| 3.2.3. | Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini..... | 36 |
| 3.2.4. | Toplam indirgeme kuvveti tayini..... | 36 |
| 3.2.5. | Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini..... | 37 |
| 3.2.6. | Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini..... | 37 |
| 3.2.7. | DPPH [•] serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini..... | 38 |
| 3.2.8. | ABTS ^{•+} giderme aktivitesi tayini..... | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.9. | DMPD ^{•+} radikali giderme aktivitesi tayini..... | 38 |
| 3.2.10. | Hidrojen peroksit giderme aktivitesi tayini..... | 39 |
| 3.2.11. | Ferröz iyonları (Fe ²⁺) şelatlama aktivitesi tayini..... | 40 |
| 3.2.12. | Toplam fenolik bileşik miktarı tayini..... | 40 |
| 3.2.13. | Toplam flavonoit miktarı tayini..... | 42 |
| 3.3. | Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları..... | 42 |
| 3.3.1. | Enzim homojenatının hazırlanması..... | 42 |
| 3.3.2. | Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz..... | 42 |
| 3.3.3. | Enzimin CM-Sefadeks A50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması..... | 43 |
| 3.3.4. | Enzimin Sefadeks G-25 ile muamele edilmesi çalışmaları..... | 44 |
| 3.4. | Enzim ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar..... | 44 |
| 3.4.1. | Optimum pH çalışması | 44 |
| 3.4.2. | Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisinin incelenmesi..... | 44 |
| 3.4.3. | Enzimin stabil olduğu pH'nın bulunması | 45 |
| 3.4.4. | Enzim için termal stabilizasyon çalışması..... | 45 |
| 3.4.5. | Enzim için K _m ve V _{max} değerlerinin bulunması..... | 45 |
| 3.4.6. | Kalitatif protein miktarı tayini..... | 46 |
| 3.4.7. | Kantitatif protein miktarı tayini..... | 46 |
| 3.4.8. | Enzimlerin molekül kütlesinin jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesi..... | 47 |
| 3.4.9. | SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)..... | 49 |
| 3.4.10. | Enzimin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi..... | 50 |
| 3.5. | İstatiksel Analizler..... | 51 |
| 4. | ARAŞTIRMA BULGULARI | 52 |
| 4.1. | Antioksidan Araştırma Bulguları..... | 52 |
| 4.1.1. | Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite bulguları..... | 52 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.1.2. | Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kuvveti (FRAP metodu) bulguları..... | 55 |
| 4.1.3. | Kuprik iyonlarını (Fe^{3+}) kupröz iyonlarına (Fe_{2+}) indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları..... | 56 |
| 4.1.4. | DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi bulguları..... | 57 |
| 4.1.5. | ABTS ⁺⁺ giderme aktivitesi bulguları..... | 59 |
| 4.1.6. | DMPD ⁺⁺ giderme aktivitesi bulguları..... | 62 |
| 4.1.7. | Süperoksit radikalleri giderme aktivitesi bulguları..... | 64 |
| 4.1.8. | Hidrojen peroksit giderme aktivitesi bulguları..... | 66 |
| 4.1.9. | Metal iyonları şelatlama aktivitesi bulguları..... | 66 |
| 4.1.10. | Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları..... | 68 |
| 4.1.11. | Toplam flavonoit miktarı tayini bulguları..... | 69 |
| 4.2. | Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları..... | 71 |
| 4.2.1. | Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik..... | 71 |
| 4.2.2. | Peroksidaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz ile saflaştırması bulguları..... | 72 |
| 4.2.3. | Peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırma bulguları..... | 74 |
| 4.2.4. | Enzimin Sefadeks G-25 ile muamele edilmesi ile ilgili çalışma bulguları | 75 |
| 4.2.5. | Enzimin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi ile ilgili çalışma bulguları..... | 75 |
| 4.2.6. | Enzimlerin molekül kütlelerinin belirlenmesi ile ilgili çalışma bulguları..... | 76 |
| 4.2.7. | Peroksidaz enziminin optimum pH çalışması bulguları | 78 |
| 4.2.8. | Peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonu çalışması bulguları..... | 79 |
| 4.2.9. | Peroksidaz enziminin stabil pH çalışması bulguları..... | 80 |
| 4.2.10. | Peroksidaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışması bulguları..... | 83 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.2.11. | Peroksidaz enziminin termal stabilizasyon çalışmaları ile ilgili bulgular..... | 84 |
| 4.2.12. | Peroksidaz enziminin Km ve Vmax değerleri ile ilgili bulgular | 87 |
| 5. | TARTIşMA VE SONUÇ | 94 |
| | KAYNAKLAR | 113 |
| | ZGEMİş | 124 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------------------|--|
| BHA | : Bütillenmiş hidroksianisol |
| BHT | : Bütillenmiş hidroksitoluen |
| PG | : Propil gallat |
| NBT | : Nitroblue tetrazolium |
| NBT ²⁺ | : Yükseltgenmiş nitroblue tetrazolium |
| TCA | : Triklorasetik asit |
| DPPH | : 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil |
| DPPH• | : 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali |
| DPPH-H | : İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil |
| ABTS | : 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit |
| ABTS ^{•+} | : 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit radikali |
| Troloks | : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid |
| GAE | : Gallik asit ekivalent |
| QE | : Kuersetin ekivalent |
| FCR | : Folin-Ciocalteu reaktifi |
| PMS | : Fenazin metasülfat |
| DMPD | : N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür |
| DMPD ^{•+} | : N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür radikali |
| (AH) _n | : Antioksidan |
| A _{Kontrol} | : Kontrol numunesinin absorbansı |
| A _{Numune} | : Numune absorbansı |
| E.C. | : Enzim Komisyonu |
| E.Ü. | : Enzim Ünitesi |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 1.1. | Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması..... | 6 |
| Şekil 1.2. | α -Tokoferolun lipit serbest radikallerini söndürdüktan sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi..... | 11 |
| Şekil 1.3. | Önemli bir antioksidan olan β -karotenin yapısı..... | 12 |
| Şekil 1.4. | Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojenperoksiti giderme mekanizması..... | 19 |
| Şekil 1.5. | Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması..... | 20 |
| Şekil 4.1. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen su ekstresinin farklı konsantrasyonlarda (10-30 μ g/ml) toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 53 |
| Şekil 4.2. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarda (10-30 μ g/ml) toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 53 |
| Şekil 4.3. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin 30 μ g/ml konsantrasyonunda lipit peroksidasyonunu inhibisyon yüzdelerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 54 |
| Şekil 4.4. | Doğal bir antioksidan olan α -tokoferol ve onun suda çözünen analogu olan troloksun kimyasal yapıları..... | 55 |
| Şekil 4.5. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 μ g/ml) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 56 |
| Şekil 4.6. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin elde edilen su ve etanol | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonları (Cu ²⁺) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 57 |
| Şekil 4.7. | DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği..... | 58 |
| Şekil 4.8. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) DPPH serbest radikalini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 59 |
| Şekil 4.9. | ABTS'nin açık kimyasal yapısı..... | 60 |
| Şekil 4.10. | ABTS ^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS ^{•+} için hazırlanan standart grafik..... | 61 |
| Şekil 4.11. | Farklı konsantrasyonlardaki karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin (10-20 µg/ml) ABTS ^{•+} giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 62 |
| Şekil 4.12. | DMPD ^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan DMPD ^{•+} için hazırlanan standart grafik | 63 |
| Şekil 4.13. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) DMPD ^{•+} giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 64 |
| Şekil 4.14. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen su ve etanol ekstreleri ile birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloksun aynı konsantrasyonunda (30 µg/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktiviteleri ile karşılaştırması..... | 65 |
| Şekil 4.15. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen su ve etanol ekstrelerinin | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 66 |
| Şekil 4.16. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının farklı konsantrasyonunda (10-20 µg/ml) ferröz iyonları (Fe ²⁺) şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 67 |
| Şekil 4.17. | Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan galik asitin açık yapısı | 68 |
| Şekil 4.18. | Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için gallik asit ile hazırlanan standart grafik..... | 69 |
| Şekil 4.19. | Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı..... | 70 |
| Şekil 4.20. | Toplam flavonoid miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği..... | 71 |
| Şekil 4.21. | Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayininde kullanılan standart protein grafiği..... | 72 |
| Şekil 4.22. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırma çalışmalarında elüsyon sonucu elde edilen elüatların 280 nm'deki absorbanslarına karşılık çizilen enzim aktivite grafiği..... | 75 |
| Şekil 4.23. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin izoenzimlerinin belirlemek amacı ile elde edilen doğal poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı..... | 76 |
| Şekil 4.24. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlesini belirlemek amacıyla kullanılan standart proteinlerin Kav değerlerine karşılık çizilen Log M _A grafiği..... | 77 |

| | | |
|--------------|---|----|
| Şekil 4.25. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlesinin belirlemek amacıyla elde edilen eluatların protein akışını gözlemek için 280 nm'deki absorbanları ile 470 nm'deki enzim aktiviteleri..... | 77 |
| Şekil 4.26. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin pH 3.0'ten 9,0'a kadar üç farklı tamponda ve on üç farklı pH'da elde edilen pH-Aktivite grafiği..... | 79 |
| Şekil 4.27. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek amacıyla elde edilen Enzim aktivitesi-[Na ₂ HPO ₄] grafiği..... | 80 |
| Şekil 4.28. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre bekletildikten sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları..... | 81 |
| Şekil 4. 29. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre bekletildikten sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları..... | 81 |
| Şekil 4.30. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları..... | 82 |
| Şekil 4.31. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları..... | 82 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Şekil 4.32. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları..... | 83 |
| Şekil 4.33. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol, ABTS, pirogallol, katekol ve 4-metil katekol substratları ile elde edilen sıcaklık-aktivite grafiği..... | 84 |
| Şekil 4.34. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği..... | 85 |
| Şekil 4.35. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği..... | 85 |
| Şekil 4.36. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin pirogallol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği..... | 86 |
| Şekil 4.37. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği..... | 86 |
| Şekil 4.38. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği..... | 87 |
| Şekil 4.39. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 88 |
| Şekil 4.40. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 88 |
| Şekil 4.41. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea L.</i>) elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı pirogallol substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 89 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Şekil 4.42. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin pirogallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 89 |
| Şekil 4.43. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 90 |
| Şekil 4.44. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 90 |
| Şekil 4.45. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 91 |
| Şekil 4.46. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 91 |
| Şekil 4.47. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 92 |
| Şekil 4.48. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği..... | 92 |
| Şekil 5.1. | L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe ²⁺) arasındaki öne sürülen metal şelatlama mekanizması..... | 99 |
| Şekil 5.2. | Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi..... | 102 |
| Şekil 5.3. | L-Karnitin ile DPPH radikali arasında öne sürülen radikal giderme | |

| | | |
|------------|---|-----|
| | mekanizması..... | 102 |
| Şekil 5.4. | ABTS'nin açık kimyasal yapısı..... | 103 |
| Şekil 5.5. | Kararlı bir radikal olan DMPD ^{•+} 'nin oluşum ve giderilme mekanizması..... | 105 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | | |
|--------------|--|-----|
| Çizelge 1.1. | Reaktif oksijen türleri..... | 2 |
| Çizelge 1.2. | Reaktif azot türleri..... | 2 |
| Çizelge 1.3. | Oksijen molekülü için elektronların orbitallere yerleşme şekilleri, bağ uzunlukları ve bağ ayrışma enerjileri..... | 4 |
| Çizelge 4.1. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının GAE olarak miktarı..... | 69 |
| Çizelge 4.2. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin amonyum sülfatla çöktürmede doygunluk noktası tayini..... | 73 |
| Çizelge 4.3. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin saflaştırılma basamakları ve saflaştırma oranı..... | 74 |
| Çizelge 4.4. | Karnabahardan (<i>Brassica oleracea</i> L.) elde edilen peroksidaz enziminin substrat spesifitesi ile ilgili toplu bulgular | 93 |
| Çizelge 5.1. | Karnabahar (<i>Brassica oleracea</i> L.) bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstralarının antioksidan ve antiradikal çalışmaları ile ilgili toplu bulgular..... | 106 |
| Çizelge 5.2. | Enzim karakterizasyon çalışması bulguları..... | 108 |

1.GİRİŞ

Oksidasyon canlı organizmalar için çok önemli bir prosestir. Oksijen ise hem yaşamın ve hem de ölümün molekülü olarak bilinmektedir. Oksijen insanların hayatlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir moleküldür. Oksijen anaeroplara için öldürücü ya da gelişimi durdurucu etkiye sahiptir. *Bacteroides fragilis* gibi bazı anaeroplara düşük oksijen konsantrasyonunda yaşayabilirlerken *Clostridia* gibi türler ancak oksijenin hiç olmadığı ortamlarda yaşayabilirler. Oksijenin anaeroplara üzerine zararlı etkisi, anaeroplara önemli hücre bileşenlerinin oksijen ile oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Oksijenin eksik indirgenmesi ayrıca reaktif oksijen türlerinin de (ROS) oluşmasına sebep olmaktadır. Hücreye zarar veren bu reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Oksijenin bu yükseltgeyici özelliğinden anaeroplara yanısıra aeroplara da zarar görmektedirler. %40'lık oksijen konsantrasyonunda protein agregatları birikimi, proteaz aktivitesi artışı ve yaşlanmada hızlanma görülmüştür (Davies 2000).

Oksijen, radyasyona maruz bırakılan hayvan ve bakteri hücre kültürlerindeki radyasyon hasarını artırır (Halliwell and Gutteridge 1989). Moleküler oksijenin oksidasyon yeteneği nispeten az olmasına rağmen süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin aktivitesi nispeten daha yüksektir. Yüksek oksijen konsantrasyonunda, bu reaktif türlerini uzaklaştıracak sistemler yetersiz kalmakta ve özellikle doymamış yağ asitleri oksidasyona uğramaktadır. Dolayısıyla yüksek lipit içeriğine sahip olan sinir ve membran dokuları yüksek oksijen konsantrasyonunda kolayca oksidatif hasara uğramaktadır (Sohal 2002).

Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra bazı reaktif azot türleri de (RNS) vücutta meydana gelmektedir. Çizelge 1.1 ve 1.2'de gösterilen reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan önemli faktörlerdendir (Aruoma and Cuppett 1997).

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türleri

| Radikaller | Formülü | Nonradikaller | Formülü |
|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| Süperoksit | $O_2^{\bullet -}$ | Hidrojen peroksit | H_2O_2 |
| Hidroksi | OH^{\bullet} | Hipokloröz asit | $HOCl$ |
| Peroksi | ROO^{\bullet} | Hipobromöz asit | $HOBr$ |
| Alkoksi | RO^{\bullet} | Ozon | O_3 |
| Hidroperoksi | HOO^{\bullet} | Singlet oksijen | $^1\Delta_g \ ^1O_2$ |

Çizelge 1.2. Reaktif azot türleri

| Radikaller | Formülü | Nonradikaller | Formülü |
|-------------------|-----------------|------------------------|----------------|
| Nitrik oksit | NO^{\bullet} | Nitröz asit | HNO_2 |
| Azot dioksit | NOO^{\bullet} | Nitrozil katyonu | NO^+ |
| | | Nitroksi anyonu | NO^- |
| | | Diazot tetraoksit | N_2O_4 |
| | | Peroksinitrit | $ONOO^-$ |
| | | Peroksinitröz asit | $ONOOH$ |
| | | Nitronyum katyonu | NO_2^+ |
| | | Alkilperoksi nitritler | $ROONO$ |

Reaktif türlerden bazıları insan metabolizmasının vazgeçilmez bir parçasıdır ve anormal şartlarda konsantrasyona bağlı olarak artış görülebilir. Bazı reaktif türler ise insan vücudunda çok az üretilir ya da hiç üretilmez; dış kaynaklı olarak alınabilir. Sigara dumanı, hava kirliliği, pestisitler, radyasyon, serbest geçiş metali iyonları gibi iç ya da dış kaynağa bağlı olarak reaktif türler meydana gelebilir (Gülçin *et al.* 2003).

Radikaller eşleşmemiş elektronları eşleştirme (karşısındaki atom ya da molekülden elektron alma veya verme) eğiliminde oldukları için kararsızdırlar ve bu kararsızlıkları onların kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar.

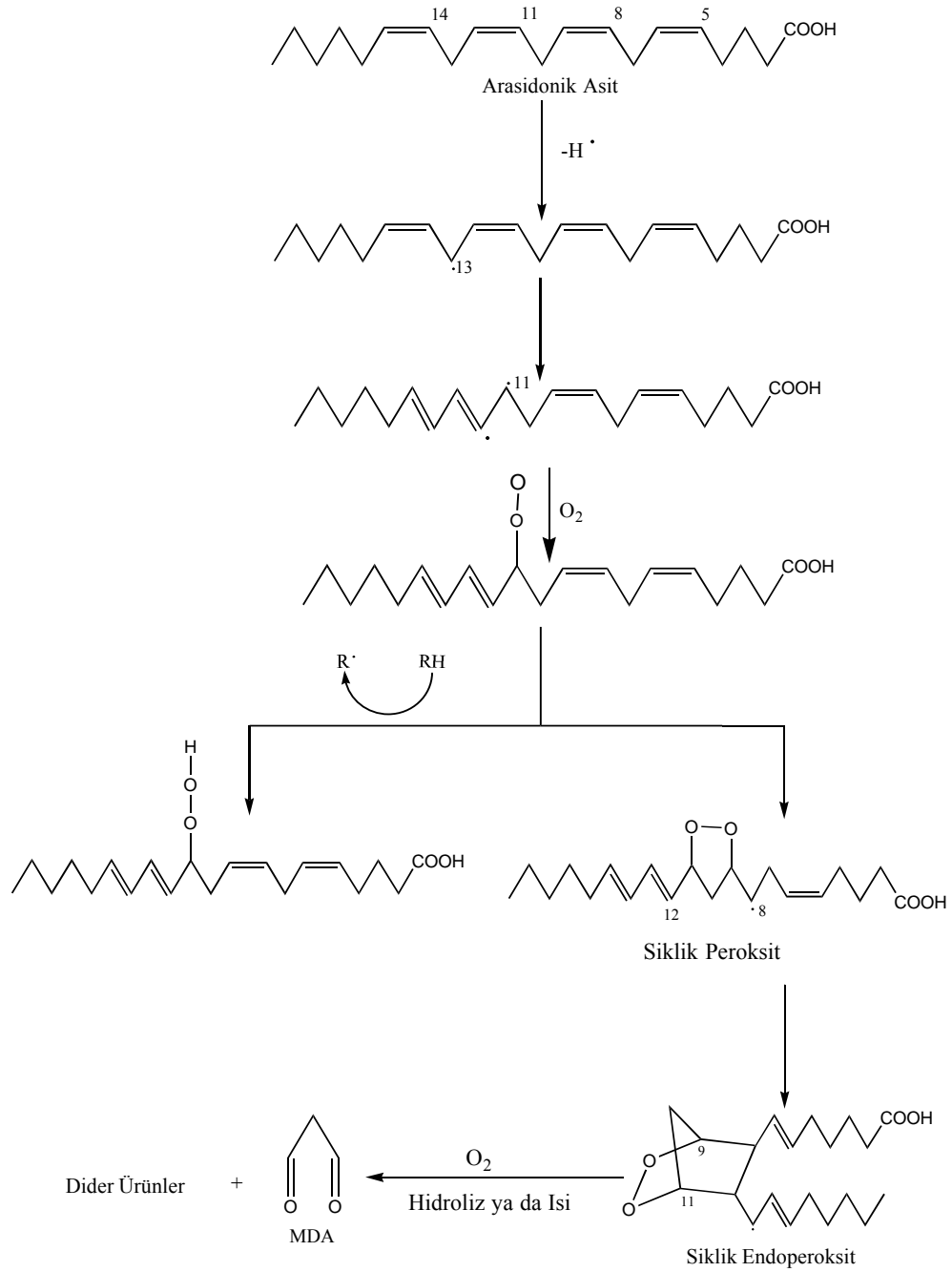
O₂ molekülü radikal oluşturmasından dolayı biyolojik sistemler için bir tehlike olması gayet normaldir. Ancak, radikal formu olmasına rağmen O₂'in beklenildiği kadar reaktif olmadığı görülmüştür. Çünkü O₂'in, π^*2p orbitallerindeki aynı spin kuantum sayısına sahip elektronlarını eş zamanlı olarak eşleştirebilmesi güçtür. Oksijenin aynı anda elektronlarını eşleştirebilmesi için karşısındaki elektron verici veya alıcı da aynı spin kuantum sayısına sahip iki eşleşmemiş elektron içermelidir. Ancak birçok atom ya da moleküllerdeki elektron çiftleri bu şarta uymamaktadır. Çünkü Pauli prensibine göre bir elektron çifti bir orbitale zıt spinli olarak yerleşebilir. Bu sebeple moleküler oksijen, radikal olmayan (bütün elektronları eşleşmiş) atom ve moleküllerden her defasında sadece bir elektron alabilir, iki elektronunu birden eşleştiremez. Bu duruma "spin sınırlaması" denir. Spin sınırlaması, oksijenle reaksiyona girebilecek birçok biyomolekülün öngörülen reaksiyon hızında azalmaya sebep olur. Dolayısıyla spin sınırlaması, hayatın devamlılığı açısından kritik bir öneme sahiptir (Gutteridge 1989; Nohl *et al.* 2003). Ancak oksijen molekülüne enerji ya da elektron sağlanması durumunda bu spin sınırlaması ortadan kalkar ve reaktif türler oluşur. Örneğin; bu spin sınırlamasının temel haldeki oksijene göre daha yüksek enerjili olan singlet oksijende ($1\Sigma_g^+O_2$) olmaması (Çizelge 1.3.), onun niçin daha reaktif olduğunu da açıklamaktadır (Mavi 2005).

Çizelge 1.3. Oksijen molekülü için elektronların orbitallere yerleşme şekilleri, bağ uzunlukları ve bağ ayrışma enerjileri

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| <i>Enerji</i> ↑ | $\sigma^* 2p_x$ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | | | | |
| | $\pi^* 2p_y, \pi^* 2p_z$ | ↑ | ↑ | ↑↓ | ○ | ↑↓ | ↑ | ↑↓ | ↑↓ | ↑ | ↓ |
| | $\pi 2p_y, \pi 2p_z$ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ |
| | $\sigma 2p_x$ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ |
| | $\sigma^* 2s$ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ |
| | $\sigma 2s$ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ |
| | $\sigma^* 1s$ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ |
| | $\sigma 1s$ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ |
| | Temel Hal O ₂ (³ Σ _g ⁻ O ₂) | Singlet O ₂ (¹ Δ _g O ₂) | Süperoksit (O ₂ ^{•-}) | Peroksit iyonu (O ₂ ⁻²) | Singlet O ₂ (¹ Σ _g ⁺ O ₂) | | | | | | |

Reaktif türlerin zararlı etkilerinin temel sebebi radikal olmaları, radikal oluşumuna sebep olabilmeleri veya yükseltgeme potansiyellerinin daha yüksek olmalarından kaynaklanmaktadır. Oksidatif stres sürecinde meydana gelen reaktif oksijen türleri nükleik asitleri, proteinleri ve lipitleri oksitleyebilir (Stadtman 2002). Reaktif oksijen türleri ile biyomoleküller arasındaki reaksiyon, radikalik zincir reaksiyonu şeklinde olduğu için, oksidatif hasar da zincirleme şeklindedir. Bu zincirleme reaksiyon, yeni reaktif türler oluşturmakta ve bunlar da başka biyomoleküllere zarar vermektedir. Bu durum organizmada ilerleyen dönemlerde daha belirgin hal almaktadır. Oksidatif stres süresince üretilen reaktif türlerin yaşlanmaya sebep olduğu da bilinmektedir. Çünkü yaşlanmayla beraber reaktif oksijen türlerinin biyomoleküller üzerindeki oksidatif hasarında bir artış söz konusudur (Berlett and Stadtman 1997; Szweida *et al.* 2002; Stadtman 2002; Sohal 2002; Grune *et al.* 2004). Ayrıca oksidatif hasarın birçok hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber, *in vivo* olarak proteinlerin fonksiyonel olarak değişmeleri için yeterli olacak derecede oksidasyon bilinmemektedir (Heinecke 2002).

Reaktif oksijen türleri tarafından en fazla etkilenen moleküllerin, hücre membranının ana bileşeni olan lipitler olduğu düşünülmektedir. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekül varlığında lipit peroksidasyonu kolaylıkla başlar. Oksijenin sebep olduğu lipit oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur (Aruoma and Cuppett 1997). Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları için de zararlıdır (Davies 2000). Şekil 1.1’de araşidonik asidin otooksidasyon mekanizması gösterilmektedir.



Şekil1.1. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması

Ayrıca zamanla arterlerin yağ birikmesi sonucu daralması ve sertleşmesi olayı olarak bilinen aterosklerozisin gelişmesinde lipit peroksidasyonunun, özellikle de LDL'nin oksidatif modifikasyonunun katkısı oldukça büyüktür (Devaraj and Jialal 1998; Kaul *et al.* 2001; Heinecke 2002).

Proteinler de lipitler gibi oksidatif stresten etkilenirler. Proteinlerin oksidasyonu genellikle OH• tarafından başlatılır ve sürecin seyri oksijen, süperoksit ya da onun protonlanmış hali olan HO₂• tarafından belirlenir (Berlett and Stadtman 1997). Diğer reaktif türler de protein oksidasyonunda yer alabilirler (Dalle-Donne *et al.* 2003). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidülerinin yan zincirlerini de oksitleyebilir. Bu şekilde istenmeyen protein-protein etkileşimleri oluşabilir ve proteini parçalayabilecek şekilde protein iskeletini oksitleyebilirler. Benzer oksidatif hasarlar serbest geçiş metal iyonlarının varlığında da olmaktadır (Berlett and Stadtman 1997; Stadtman 2002). Protein yan zincirlerinde bulunan özellikle prolin, arginin, lisin ve treonin amino asitleri oksitlendiği zaman aldehitler ve ketonlarda olduğu gibi karbonil grupları oluşur. Bu gruplar kimyasal olarak kararlıdır ve proteinlerin oksidatif parçalanmasında da oluşabilmektedirler (Dalle-Donne *et al.* 2003). Ayrıca kanser çeşitleri, parkinson ve alzheimer gibi birçok hastalığın DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Evans *et al.* 2004).

Reaktif türlerin yukarıda bahsedilen olumsuz bazı etkilerine karşılık, aeroplara bu etkileri önleyecek ya da tolere edecek sistemlere sahiptir. Oksidatif hasarın önündeki en önemli engel, atmosferdeki oksijen konsantrasyonu (150 mmHg) ile dokulardaki oksijen konsantrasyonu (30 mmHg) arasındaki büyük farktır. Bu avantaja ilave olarak endojen antioksidan sistemler ve ekzojen olarak alınan antioksidanlar da mevcuttur (Mavi 2005).

Bu reaktif oksijen ve azot türlerine karşı özellikle aeroplara çeşitli savunma sistemlerine sahiptirler. Bu sistemler genel olarak "Antioksidan Sistem" olarak bilinirler. Organizmada sürekli reaktif oksijen ve azot türleri (ROS ve RNS) üretilmekte, buna karşılık antioksidan sistem tarafından istenilmeyen bu etkiler giderilmektedir. Bu durum bir denge halinde süreklilik arz eder. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması durumu ise "Oksidatif Stres" olarak değerlendirilir.

Oksidatif stres durumunda reaktif oksijen ve azot türlerinin miktarında artış olur ve dolayısıyla bu ürünlerin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere metabolizmadaki birçok sistem olumsuz etkilenir (Lambeth

2004). Olumsuz etkilenen bu sistemler, diğ er periferik sistemleri de etkilerler. Bu durum zincirleme olarak devam eder. Bu durum radikalik zincir reaksiyonu sonlanıncaya kadar antioksidan sistem tarafından prosesin bir yerinde devam eder. Aksi durumda bu reaktif türler hücrenin doğrudan ya da dolaylı olarak ölümüne sebep olurlar (Moldovan and Moldovan 2004).

Bitki ve hayvan hücrelerinde çok sayıda savunma ve korunma mekanizması mevcuttur. Organizmanın normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendisini koruması için bu mekanizmalar gereklidir (Fridovich 1976; Meal 1976). Bu bakımdan biyolojik sistemlerde antioksidan savunma mekanizmasının araştırılması ile ilgili çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Çünkü yaşlanmaya sebep olan en önemli faktörlerden biri de oksidatif hasarın radikalik mekanizmaya sahip olmasıdır (Ramarathnam *et al.* 1988).

Canlılarda oksidan etkiye karşı iki çeşit savunma sistemi vardır. Bunlar endojen ve ekzojen antioksidan etkilerdir. Endojen antioksidan sistem, antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştıran sistemler (proteazlar ve fosfolipazlar), yeni bileşikleri sentezleyen sistemler, tamir sistemleri, metal bağlayıcılar (Hemoglobin, Miyogloblin, Ferritin, Seruloplazmin) gibi alt sistemlerden oluşur. Ayrıca glutatyon ve ürik asit gibi vücut içi k  k molekül kütleli bileşikler de birer antioksidan olarak görev yaparlar. Dış kaynaklı olarak alınan antioksidanlar vücut içi antioksidan sisteme destek olur. Dışarıdan alınan antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sentetik olarak kullanılanlar bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerb tilhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG), troloks ve diğer sentetik antioksidanlardır (Mavi 2005). En yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Branen 1975; Imaida *et al.* 1983). Bunun sonucu olarak tüketiciler bunların sağlık açısından güvenirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır (Branen 1975; Ito *et al.* 1983; Gülçin *et al.* 2004a; 2004b). Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiğine dair bazı çalışmalar mevcuttur. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan bazı

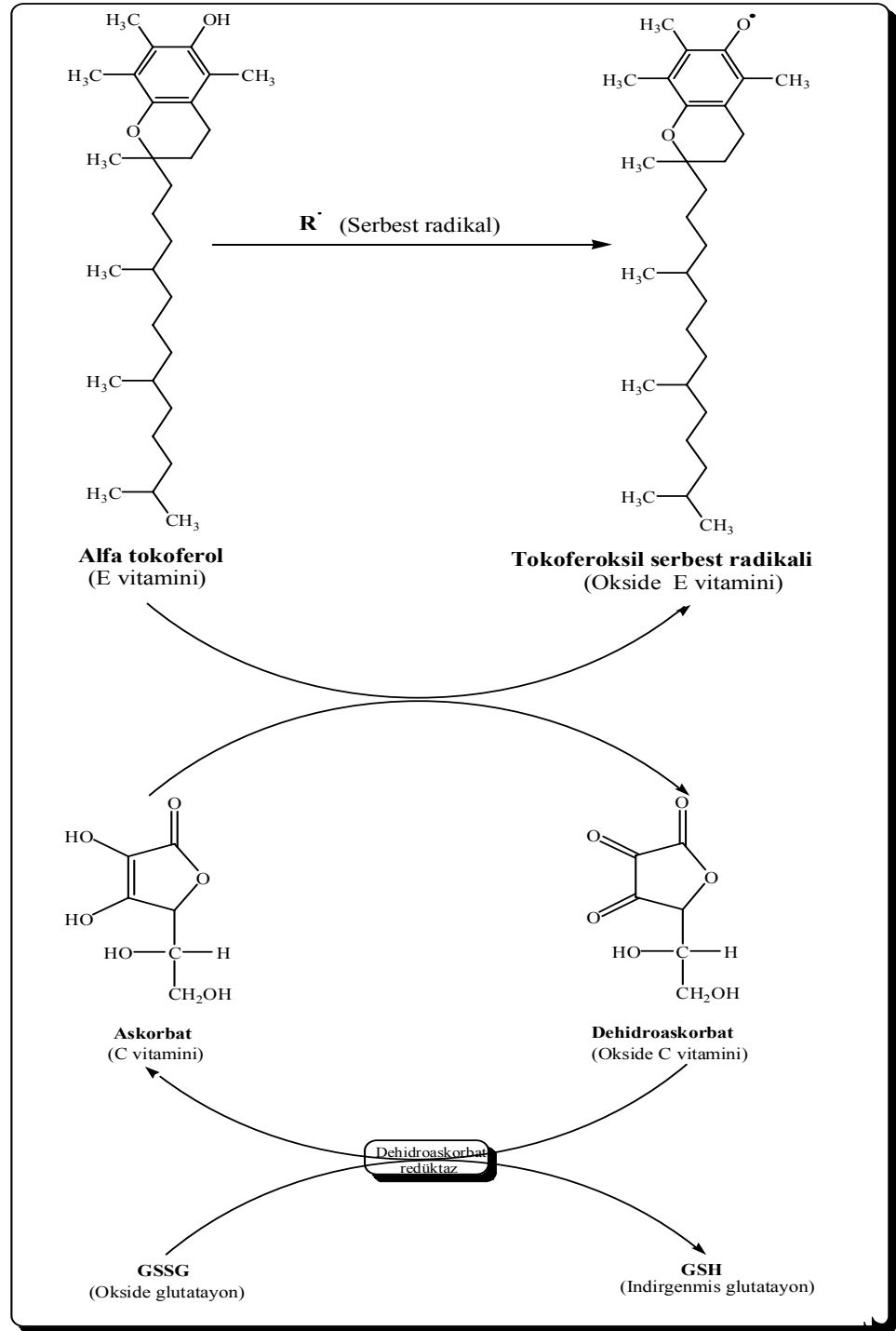
araştırmalar, BHT gibi bazı sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılmadığını ve adipoz dokuda depolandığını göstermiştir (Halliwell and Gutteridge 1989).

Sentetik antioksidanlar geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen, bu istenilmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımları ciddi bir şekilde sınırlandırılmıştır (Gülçin *et al.* 2005a). Birer doğal antioksidan olan α -tokoferol ve askorbik asit, BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktivite göstermelerine rağmen, besin maddelerinin üretim ve muhafazasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Osawa and Namiki 1981; Nisihina *et al.* 1991).

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında mevcuttur. Bunlar karotenoitler, vitaminler, fenoller, flavonoitler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen kuençeri, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler (Larson 1988). Sebze ve meyveler de birçok antioksidan içerirler (Cao *et al.* 1996). Doğal antioksidan bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır (Pratt *et al.* 1990). Bundan dolayı bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanser ve ölüm oranında düşüş meydana getirmektedir (Ames *et al.* 1993). En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoitler ve skualen sayılabilir. Askorbik asit bitkiler ve birçok memeli tarafından karaciğerde glukozdan sentezlenir. Askorbik asit bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Bunlardan en önemlisi, kollagenin biyosentezinde yer alan prolinin hidroksiproline enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılmasıdır. Ayrıca askorbik asit dopamin- β -hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir (Padayatty *et al.* 2003; Arrigoni and De Tullio 2002).

Askorbik asitin en önemli özelliği indirgeyici bir molekül olmasıdır. Askorbik asit Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilir. *In vivo* olarak indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin söndürülmesinde de önemli rolü vardır. Ayrıca α -tokoferol lipit

serbest radikallerini söndürdükten sonra Şekil 1.2’de görüldüğü gibi tokoferoksil radikaline dönüşmektedir. Tokoferoksil radikali ise askorbik asit tarafından tekrar yenilenir ve tekrar α -tokoferole dönüştürülmektedir.



Şekil 1.2. α -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi

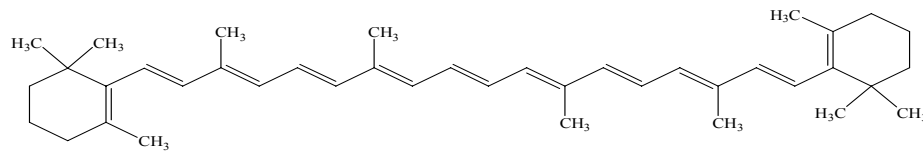
Demir ve bakır iyonlarının, hidroksilasyonu gerçekleştirebilmeleri için hidroksilaz enzimlerinin aktif merkezlerinde indirgenmiş halde bulunmaları gerekir. Bu özellik, bir kofaktör olan askorbik asit tarafından sağlanır. Bir molekülün indirgeme kapasitesi

onun antioksidan potansiyelinin bir göstergesidir. Oksidasyona uğrayan moleküller, indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı askorbik asit tarafından indirgenebilirler. Bu sebeple askorbik asit antioksidan kapasite sergilemektedir (Halliwell and Gutteridge 1989).

Diğer bir önemli antioksidan E vitamini'dir. Tokoferoller, E vitamini olarak da bilinir. Tokoferoller içerisinde biyolojik açıdan en önemli olanı α -tokoferoldür. Tokoferoller, gıda maddelerinin bozulmasını engelleyen ve uzun ömürlü olmalarında rol oynayan önemli bir doğal antioksidan gruptur (Ruiz-Lopez *et al.* 1995).

Mitokondri membranında yaklaşık 2000 fosfolipid başına bir α -tokoferol bulunmaktadır. E vitamini eksikliğinde birçok canlıda bazı olumsuz etkiler görülmüştür. Bu etkiler ise ekzojen antioksidanlar tarafından tolere edilmektedir. Bu durum, E vitamininin *in vivo* olarak lipit peroksidasyonunu önleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir (Halliwell and Gutteridge 1989).

Bir başka antioksidan olan β -karoten bitkilerde bulunan ve α -tokoferol gibi peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girebilen bir moleküldür. Bu sebeple lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu engelleyebilir. Ayrıca iyi bir singlet oksijen söndürücüdür (Halliwell and Gutteridge 1989).



Beta Karoten

Şekil 1.3. Önemli bir antioksidan olan β -karotenin yapısı

Flavonoitler ise, bitkiler tarafından sentezlenen fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Fenolik yapılarından dolayı antioksidan özellik göstermektedirler. Bazı flavonoitler, etkili bir şekilde hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korur (Groot and Rauen 1998). Diğer iki önemli doğal antioksidan ise karotenler ve skualendir.

Karotenler hücreyi ışık, hava ve diğer foto sensitizasyon etkilerinden koruyan ve bu ortamlarda antioksidan olarak görev yapan bileşiklerdir (Krinsky 1989). Skualen ise bir serbest radikal söndürücüsü olmakla beraber aynı zamanda singlet oksijen kuençeri olarak da görev yapmaktadır (Kohno *et al.* 1995).

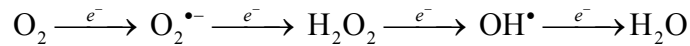
Doğal antioksidanların yanı sıra sentetik antioksidanlar da mevcuttur. Bunlar genellikle gıda sektöründe, gıdaların raf ömrünün uzatılması amacı ile kullanılır. Gıda maddelerinde, peroksidasyon prosesini geciktirmek veya önlemek ancak antioksidan bileşiklerin ilavesiyle mümkün olabilir. Bu ise pahalı bir metottur. Gıda maddelerinin bozulmalarını engellemek için yıllardan beri sentetik antioksidan olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer-bütillhidrokinon (TBHQ) kullanılmaktadır. Fenolik bileşik olmaları, onların etkili birer antioksidan olmalarını sağlar.

Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıl ve baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunur (Foo and Porter 1981; Namiki 1990). Bu kaynaklarda bulunan antioksidanlar; tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler gibi fenolik bileşikler, alkaloidler, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir (Larson 1988; Hudson 1990; Aruoma and Cuppett 1997; Endo *et al.* 1985). Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar yirminci yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserejen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir (Haigh 1986; Van Esch 1986). Sentetik antioksidanlar hakkındaki bu şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi arttırmış ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjistik etkiden dolayı birlikte antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ancak tokoferol ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi nispeten sentetik antioksidanlardan daha düşüktür (Nishina 1991).

Günlük hayatta taze olarak tüketilen birçok bitkinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Yaygın bir şekilde kullandığımız brokoli (Gülçin *et al.* 2004b), rezene (Oktay *et al.* 2004), anason (Gülçin *et al.* 2003), nane (Elmastas *et al.* 2005), defne (Elmastas *et al.* 2006), reyhan (Gülçin *et al.* 2007), lavanta (Gülçin *et al.* 2004), karabiber (Gülçin 2005), karanfil (Gülçin *et al.* 2004), mantar (Elmastas *et al.* 2006), ışgın (Oktay *et al.* 2007) ve kızılcık (Gülçin *et al.* 2005) bu bitkiler arasında sayılabilir.

Biyolojik sistemlerde katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GSSG-Rx) ve süperoksit dismutaz (SOD) antioksidan etkiye sahip başlıca enzimlerdendir. Vücutta görev yapan antioksidan enzimler aktivitelerini doğrudan ve dolaylı olarak gerçekleştirmelerine göre iki ayrı grupta incelenebilir. Doğrudan antioksidan aktivite gösteren enzimlerin en önemlileri arasında CAT, POD ve SOD sayılabilir. Dolaylı yoldan aktivite gösteren enzimlerin en önemlileri ise glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz ve kinon redüktaz enzimleridir. Bundan dolayı savunma sisteminde CAT, POD, GSSG-Rx ve SOD gibi antioksidan enzimler büyük öneme sahiptir (Mavi 2005).

Canlılardaki elektron akışı serbest enerjinin elde edildiği birçok basamağı takip eder ve son olarak bu akış oksidatif fosforilasyonda O₂ molekülünde durur. Çünkü indirgenme potansiyeli daha yüksek bir bileşiğin ortamda mevcudiyeti söz konusu değildir. Problemsiz işleyen bir sistemde O₂ suya kadar indirgenir.



Genellikle biyolojik sistemlerde oksijene iki elektron ilavesinden H₂O₂ oluşurken, dört elektron ilavesinden H₂O oluşur.

Oksijen ve diğer reaktif türevleri aktivitesi yüksek moleküllerdir ve organizmanın en önemli molekülleri olan proteinler, lipitler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek biyolojik fonksiyon azalmasına ya da tamamen yok olmasına sebep olurlar (Halliwell

1996). Reaktif oksijen türlerinden H_2O_2 üzerinde tez çalışmamızda araştırılacak olan peroksidaz enziminin substratı olması sebebiyle özellikle durulacaktır.

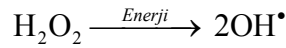
Reaktif oksijen türlerinin ana kaynağının süperoksit radikali olduğu, onun da ana kaynağının mitokondri olduğu düşünülmektedir (Stadtman 2002; Nohl *et al.* 2003). Çünkü mitokondride oksijene her seferinde sadece bir elektron transfer edilebilmesinden dolayı, elektron transferi sırasında süperoksit radikali oluşumu kaçınılmazdır. Süperoksit, dismutasyon reaksiyonu ile bir başka reaktif oksijen türü olan H_2O_2 'i oluşturur. Hidrojen peroksit ise toksik özelliğinden çok, geçiş metalleri varlığında aktivitesi yüksek olan $OH\cdot$ radikali oluşturma potansiyeline sahip olmasından dolayı önemlidir. Artan yaşla beraber mitokondride $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 üretim hızı artar (Sohal 2002).

Reaktif bir tür olan H_2O_2 suda rahatlıkla çözünebilen ve mekanizması bilinmemesine rağmen hücre membranından su gibi kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Genellikle 50 μM ve üzeri konsantrasyonlardaki H_2O_2 , muamele süresine ve fizyolojik şartlara bağlı olmakla beraber birçok hayvan, bitki ve bakteri hücre kültürü üzerine toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple H_2O_2 'in *in vivo* olarak çok toksik olduğu ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu da katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından yapılmaktadır. Hidrojen peroksitin bu istenmeyen etkisine rağmen katalaz aktivitesinin yokluğu ile ilgili olan akatalasemi hastalığı mevcut olan insanlarda ölümcül bir fenotip değişikliği yoktur (Gutteridge 1989; Aruoma 1998; Halliwell *et al.* 2000)

Hidrojen peroksit *in vivo* olarak süperoksitin enzimatik ya da non-enzimatik dismutasyonu ile oluşturulur. Ayrıca glukoz oksidaz, D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, ksantin oksidaz, glikolat oksidaz ve monoamin oksidaz gibi bir çok oksidaz enzimi tarafından da üretilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989; Gutteridge 1994; Halliwell *et al.* 2000; Touyz and Schiffrin 2004). Hidrojen peroksit, süperoksidi uzaklaştırmaktan sorumlu olan enzimlerden Cu-Zn süperoksit dismutazı inaktive etmektedir (Hodgson and Fridovich 1975; Sampson and Beckman 2001). Ancak 20–50

μM ve daha düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 birçok hücre tipi için sınırlı bir sitotoksititeye sahiptir. Ayrıca H_2O_2 'nin sinyal iletiminde haberci molekül olarak davrandığını gösteren kanıtlar mevcuttur (Foyer *et al.* 1997; Rhee 1999; Jones and Morice 2000; Neill *et al.* 2002; Rojkind *et al.* 2002; Stone 2004).

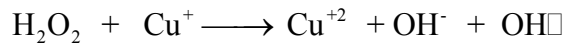
Hidrojen peroksitin aktivitesi zayıftır. Bu sebeple lipid, DNA ve protein gibi biyolojik molekülleri kolayca oksitleyemez. Ancak bazı enzimlerin sülfhidril gruplarını (-SH) oksitleyerek doğrudan inaktive eder. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz bunlardan biridir. Bir radikal olmamasına rağmen, H_2O_2 'in tehlikeli oluşu, onun hücre membranından kolayca difüze olabilmesi ve $\text{OH}\cdot$ radikaline dönüşmeye her an hazır olmasından kaynaklanır (Asad *et al.* 2004). Çünkü H_2O_2 'in ultraviyole ışık veya geçiş metallere iyonlarıyla etkileşmesi (Fenton reaksiyonu) sonucu $\text{OH}\cdot$ radikali oluşturur (Gutteridge 1989; Halliwell *et al.* 2000). Hidrojen peroksitteki O-O bağı nispeten zayıf olduğu için kolaylıkla parçalanabilir. Bu bağı homolitik parçalanmasından aktivitesi çok yüksek olan $\text{OH}\cdot$ radikali oluşur.



Bu homolitik parçalanma demir tarafından da gerçekleştirilebilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1990; Gutteridge 1989).



Benzer reaksiyon Cu^+ varlığında da meydana gelmektedir (Gaetke and Chow 2003).



Bu reaksiyon sırasında oluşan $\text{OH}\cdot$, yeni radikallerin oluşumunda ve böylece de DNA hasarında önemli bir rol oynamaktadır (Henle and Linn 1997). Yukarıda anlatılan oksidan maddelere karşı canlı organizmadaki antioksidan savunma sisteminde glutatyon peroksidaz (GPOD), CAT ve SOD gibi "Primer Antioksidan Enzimler" büyük öneme

sahiptir (Yu 1994). Bunların arasında GPOD ve katalaz CAT enzimleri, glukoz G6PD ve glutasyon redüktaz (GR) enzimlerinin efektörleridir, bazen de substratlarına etki ederler. Bundan dolayı her iki enzim (G6PD ve GR) “Destekleyici Antioksidan Enzimler” olarak adlandırılır (Saltman 1989, Gülçin 2002).

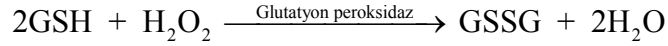
Antioksidan enzimler ve endojen antioksidanların her ikisinde de oksidasyonu önleme mekanizması aynıdır (Lesham 1988). Bu her iki tür mekanizmada da hücre hasarlarına sebep olan serbest radikaller giderilerek oksidatif hasarları engellenmektedir. SOD, POD ve CAT gibi antioksidan enzimler, bitki dokularında oksi-radikal detoksifikasyon prosesinde büyük öneme sahiptirler (Salin 1987). Antioksidan enzimler aynı zamanda serbest oksijen radikallerini gidererek biyolojik oksidatif hasarları engellediği bildirilmektedir. Başka bir deyişle biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türleri antioksidan bileşikler gibi enzimler tarafından da giderilmektedir (Harris 1992).

Peroksidaz (POD, E.C: 1.11.1.7), hidrojen atomlarını vermek eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H_2O_2 bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Adams 1978; Whitaker 1994). Hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda, H_2O_2 'ten başka bir substrata ihtiyaç duymayan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer kompartımanlarında aktivitesini göstermek için H_2O_2 'ten başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Scandalus *et al.* 1994). POD, hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrogenasyonunu da katalizler. Bu moleküller arasında 2-kresol, 2-toluidin, guaiakol, pirogalol, lökomalaşit yeşili, 4,4'-diaminodifenil amin, propiyonil promozin, benzidin, *o*-tolidin, di-*o*-anisidin ve bazı azo boya türevleri sayılabilir (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).

Yüksek bitkiler üç ana peroksidazdan biri olan ferriprotoporfirin peroksidaz içerirler. Ferriprotoporfirin peroksidazlar bir prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX (hematin ya da hem) ihtiva ederler (Adams 1978; Whitaker 1994). Ayrıca peroksidaz enziminin

hem çözülmüş hem de membran yapısında yer alan formları da mevcuttur (Robinson *et al.* 1991).

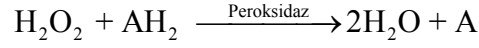
Canlılarda görev yapan farklı peroksidaz enzimleri vardır. Peroksidaz enzimlerinin en önemlilerinden biri olan glutatyon peroksidazın önceleri sadece hayvanlarda yaygın olarak bulunduğu kabul edilirken (Halliwell and Gutteridge 1989), yakın dönemlerde yapılan çalışmalar bitkilerde de H₂O₂ giderilmesi için glutatyon peroksidazın görev yaptığını göstermiştir (Eshdat *et al.* 1997). Substratı glutatyon olan bu enzim aneoroplarda bulunmaz.



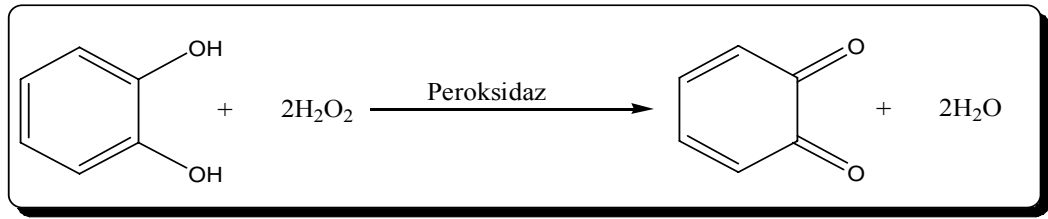
Diğer bir peroksidaz türü olan askorbat peroksidaz (E.C. 1.11.1.11) izoenzimleri birçok farklı bitkide bulunmuştur. Aynı anda bitki hücrelerinin farklı kompartımanlarında lokalize olmuş durumdadır. Örneğin kloroplastlarda (Asada 1994; Laloue *et al.* 1997) ve sitozolde (Elia *et al.* 1992; Ohya *et al.* 1997; Caldwell 2003) askorbat peroksidaz izoenzimleri tespit edilmiştir. Bu enzimler indirgeme substratı olarak özellikle askorbat kullanır ve askorbat-glutatyon veya Halliwell-Asada yolu olarak bilinen reaksiyon döngüsüne katılırlar. Döngü enzimler tarafından askorbatın indirgenmiş formunun yeniden oluşturulması ile tamamlanır ve burada AFR-Redüktaz enzimi görev alır (Inze *et al.* 1995). Dalton ve arkadaşları askorbat-glutatyon yolu enzimlerini soya fasulyesi bitkisinde bildirmişlerdir (1993). Daha sonrada benzer çalışmalar bezelye yapraklarında da gerçekleştirilmiştir (Jimenez *et al.* 1997).

Peroksidaz enziminin bitkilerde hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997) ve lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi hayati fonksiyonlarda rol aldığı bildirilmiştir. POD sahip olduğu pek çok fonksiyondan dolayı bitkilerde genelde farklı izoenzimleri şeklinde bulunur. POD birçok bitki temelli gıdalarda mevcuttur (Adams *et al.* 1978).

Peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar komplekstir ve aşağıda genel formülü verilen reaksiyonları katalizlerler (Van Huystee 1987).

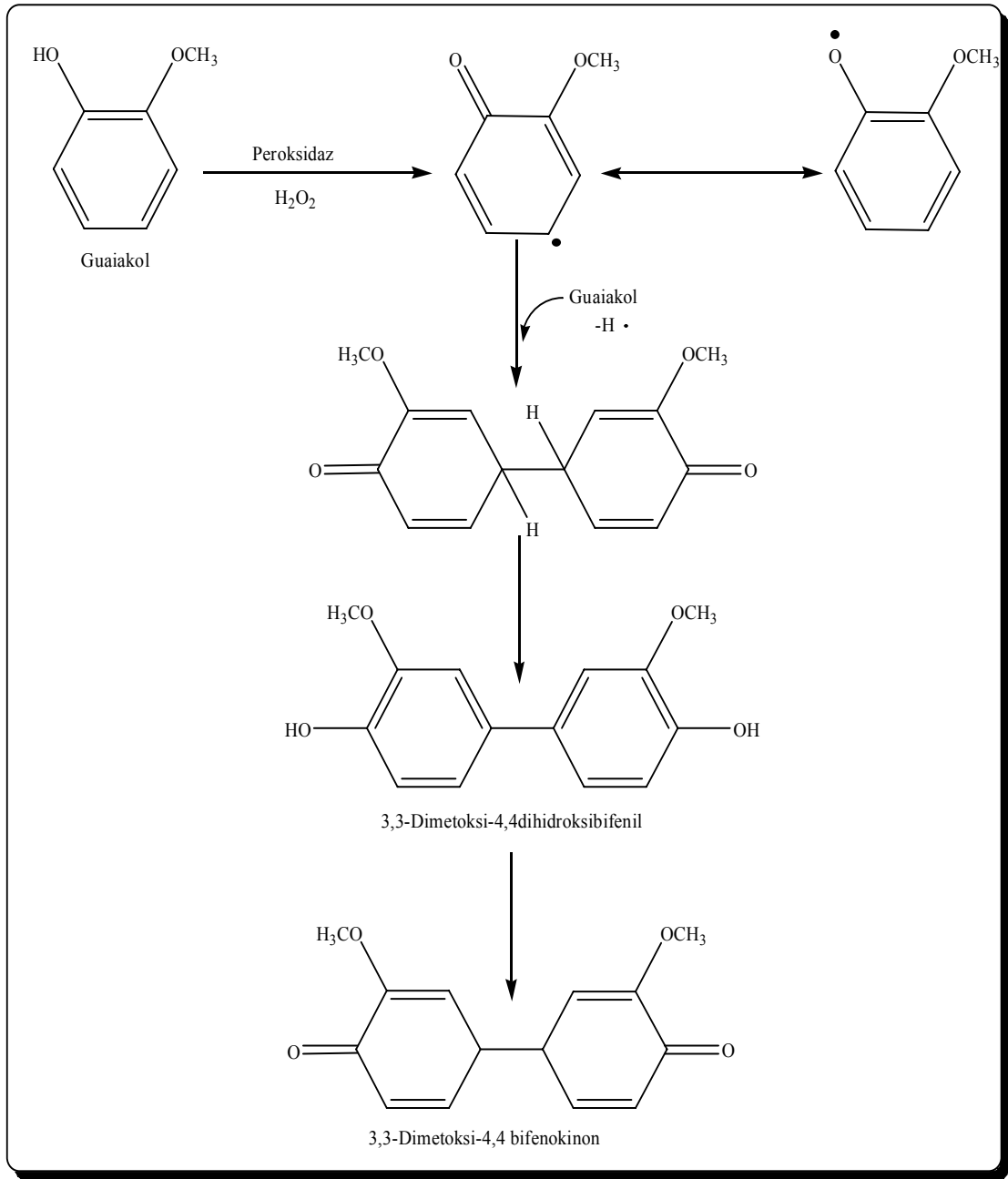


Peroksidaz bitki dokularında peroksit karşısında guaiakol, pirogalol, klorogenik asit, katekin ve katekol gibi birçok fenolik bileşiği yükseltgeyebilir (Onsa *et al.* 2004). Enzimin geniş oranda organik bileşikleri yükseltgemesi bitkinin rengi, tadı ve besinsel değeri ile ilişkilendirilmesine sebep olmuştur.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



Şekil 1.4. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojenperoksiti giderme mekanizması

Peroksidaz varlığında yapılan çalışmalarda guaiakol substratının oksidasyon mekanizması aydınlatılmış ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona okside olduğu bulunmuştur (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.5. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması

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

POD un diğer önemli bir fonksiyonu çeşitli organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılmasıdır (Adam *et al.* 1999). POD yüksek hassasiyetinden dolayı mikroanalitik ve klinik tanı için de önemli bir ayıraç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, ilaç, kimya ve gıda sanayinde POD için yeni uygulamalar önerilmektedir (Kwak *et al.* 1996).

Brassica (lahana) familyasının önemli bir üyesi olan karnabaharın (*Brassica oleracea* L.) beyaz, yeşil ve mor türlerinin olduğu bilinmektedir. Normalde pişirilerek yenilen bu bitkinin, salata olarak kullanımı da oldukça yaygındır. Nemli bölgelerde yetişen bu soğuk iklim bitkisi Akdeniz bölgesinde 2000 yıl öncesine kadar uzanan kültüre sahiptir. Günümüzde dünyanın pek çok yerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Yılın her döneminde bulunabilen karnabahar (*Brassica oleracea* L.), özellikle bahar ve yağışlı dönemlerde daha bol bulunmaktadır (Boriss *et al.* 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.), brokoli, lahana, şalgam ve hardal gibi sebzelerle aynı familyaya aittir ve onlar gibi serin iklimlerde yetişir ancak iklim şartlarına karşı bu ailenin diğer üyelerinin hepsinden daha hassastır, sıcak hava ve kuraklık gibi olumsuz şartlardan çok çabuk etkilenir. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) düşük kalorili bir sebze olup, C vitamini ve potasyum açısından zengindir. Taze karnabahar (*Brassica oleracea* L.) tüketimi 1960'lerden beri %25 artış göstermekle beraber, son yıllarda pek çok ülkede karnabahar (*Brassica oleracea* L.) üretiminde ciddi artış gözlenmiştir. Farklı rakım aralıklarında farklı karnabahar varyetelerinin yetiştiği bildirilmiştir (Tanaka *et al.* 1997).

Literatürde karnabahar (*Brassica oleracea* L.) ile ilgili birçok çalışma mevcut olup, özellikle günlük diyetle önemli bir yere sahip olan bu bitki üzerinde farklı kimyasal maddelerin etkisi incelenmiştir. Karnabahar ekstrelerinin sulfonilüre herbisitlerine karşı tolerasyon etkileri çalışılmıştır (Sikkema *et al.* 2006). Diğer bir çalışmada topraktaki tuz oranının karnabahar bitkisinin yetişmesi, verimi ve mineral kompozisyonu üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır (De Pascale *et al.* 2005). Zobayed ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise farklı havalandırma etkisine maruz bırakılan karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin in vitro yaprak anatomisi çalışılmıştır (Zobayed *et al.* 2001). Ayrıca karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisi üzerinde krom, bakır ve kobalt metallerinin fototoksitesi de araştırılmıştır (Chatterjee and Chatterjee 2000). Everearts tarafından yapılan bir çalışmada ise karnabahar bitkisinin yetiştirilmesi sürecinde bitki yapısındaki azot dengesi incelenmiştir (2000). Son zamanlarda yapılan bir çalışma da ise karnabahar bitkisinin hasat zamanı ile ilişkili olarak antioksidan özellikleri ve lipidik profili çalışılmıştır (Scalzo *et al.* 2007). Ayrıca dondurulmuş karnabahar ürünlerinde bazı antioksidatif bileşiklerin içeriği üzerine geleneksel ve modifiye teknolojik dondurma usullerinin etkisi araştırılmıştır (Gebczynski and Kmiecik 2007).

Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları kapsamında ise karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisi üzerinde birçok çalışma mevcut olup ve birçok enzim saflaştırılarak

karakterize edilmiştir. Ayrıca yine bu bitkiden protein fosfataz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Andreava *et al.* 2001). Ayrıca DNA polimeraz ve endotransglikolizaz karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılmış ve karakterize edilmiş enzimler arasındadır. İlâveten karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen sistein proteaz enziminin inhibisyon özellikleri de çalışılmıştır (Halls *et al.* 2006.).

POD yaygın olarak birçok bitkide mevcut olmakla beraber ticari olarak en önemli kaynağının at turpu kökleri olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan farklı POD enzim türlerinin mevcudiyeti yeni analitik metotların ve potansiyel endüstriyel proseslerin oluşmasına yol açmaktadır (Gülçin and Yıldırım 2005).

POD enzimi birçok bitkiden saflaştırılmıştır. Örnek olarak hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), şalgamdan (Hamed *et al.* 1998; Duarte *et al.* 2001), ısırgan otundan (Gülçin 2002), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), bürüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), kara lahanadan (Gülçin and Yıldırım, 2005), arpadan (Kristensen 1999), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), portakaldan (Clemente 1998), çay yapraklarından (Kvaratskhelia *et al.* 1997), biberden (Pomar *et al.* 1997), havuçtan (Nair *et al.* 1996), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990), ıspanaktan (El Shamei 1987), pamuktan (Triplett and Mellon 1992), domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) ve çilekten (Civello *et al.* 1995) yapılan saflaştırma çalışmaları verilebilir. Memelilerdeki peroksidaz enzimleri ise sütte, karaciğerde, dalakda, uterusda, tükrük bezlerinde, ve akciğer duvarlarında, sitoplazmada, mitokondride, mikrozom ile lizozomlarda lokalize olmuşlardır (Pütter and Becker 1987).

Bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmaların hepsinde birçok izoenzim yapıları bildirilmiştir. Çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılan bu izoenzimler için genelde farklı moleküler ağırlık, stabil sıcaklık, optimum pH, substrat spesifitesi ve fizyolojik rol tespit edilmiştir (Tıpawan and Barrett 2005). Örneğin enzimin molekül kütlesi brokoli (Tıpawan and Barrett 2005) ve domateste (Jen *et al.* 1980; Signoret and

Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yaprakları (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa olarak tespit edilmiştir. Oldukça farklı molekül kütleleri ise kuşkonmazda (Civello *et al.* 1995) 34 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak bildirilmiştir. Son zamanlarda Gülçin ve Yıldırım (2005) tarafından kara lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) saflaştırılan peroksidazın molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla 95 kDa olarak bulunmuştur. Yine optimum pH değerleride 4,5–6,5 aralığında değişiklik göstermekte (Tıpawan and Barrett 2005) ve enzimin asidik şartlarda daha iyi fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), riboflavin, metiyonin, nitroblu tetrazolium (NBT), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, 3-(2-piridil)-5,6-bis (4-fenil-sulfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin), linoleik asit, α -tokoferol, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween-20) ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany'den satın alındı. Amonyum tiyosiyanat ve 2,2'-bipiridin ise Merck'ten satın alındı.

3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

| | |
|----------------------------|---------------------------------------|
| UV-VIS Spektrofotometre | : Shimadzu, UV-1208 |
| Derin dondurucu | : Sanyo, Japan |
| pH-metre | : Hanna Instrument |
| Hassas terazi | : Scaltec SBA 41 |
| İnkübatör | : Elektro-Mag (0-300°C) |
| Otomatik pipetler | : Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors |
| Liyofilizatör | : Labconco |
| Çalkalayıcı | : Nüve SL 350 |
| Vorteks | : Fisons, Whirlimixer |
| Evaporatör | : Heidolph 94200, Bioblock Scientific |
| Saf su cihazı | : Firstream Calypso MK 1 Glass Still |
| Magnetik karıştırıcı | : Stuart Scientific |
| UV-Spektrofotometre küveti | : 3 cm ³ 'lük Kuartz Küvet |
| Dispenser | : Sigma |

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.a. Toplam antioksidan aktivite tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,04 M pH: 7,4 fosfat tamponu hazırlanması: 1,135 g Na_2HPO_4 alındı 180 ml destile suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı. Destile su ile toplam hacmi 200 ml'ye tamamlandı.
2. Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 0,017 M'lık linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265 μl linoleik asit 50 ml ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.
3. %3,5'luk HCl çözeltisinin hazırlanması: %37'lik HCl'den 9,46 ml alınarak 100 ml'ye destile suyla tamamlandı.
4. 20 mM FeCl_2 çözeltisi hazırlanması: 281 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$, %3,5'luk HCl ile çözümlenerek hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamamlandı.
5. %30'luk NH_4SCN çözeltisinin hazırlanması: 15 g NH_4SCN saf suda çözüldü, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na_2HPO_4 yaklaşık 180 ml destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 ml olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 ml'ye destile su ile tamamlandı.

3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 150 ml'ye destile suyla tamamlandı.
4. %0,1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması: 165 mg FeCl₃.6H₂O destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,01 M'lık CuCl₂ çözeltisinin hazırlanması: 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.
2. $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.
3. 1 M'lık CH₃COONH₄ tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 7,7 g CH₃COONH₄ alındı ve 80 ml saf suda çözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı

3.1.3.d. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

1. 10^{-3} M'lık DPPH• çözeltisinin hazırlanması: 39 mg DPPH• etanolde tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca etanolde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.e. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 2,84 g Na₂HPO₄ 180 ml destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

2. 2 mM'lık ABTS çözeltisinin hazırlanması: 11 mg ABTS 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg $K_2O_8S_2$ 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.f. $DMPD^{++}$ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0.1 M'lık asetat tamponunun hazırlanması (pH 5,25): 2,05 g CH_3COONa 230 ml saf suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 5,25'e ayarlandı, toplam hacim destile su ile 250 ml'ye tamamlandı.
2. 0,1 M'lık $DMPD$ çözeltisinin hazırlanması: 209 mg $DMPD$ 10 ml destile suda çözülerek hazırlandı.
3. 0,001 M'lık $DMPD^{++}$ çözeltisinin hazırlanması: 0,1 M'lık $DMPD$ çözeltisinden 1 ml alındı 100 ml'lik ve 0,1 M'lık (pH 5,25) asetat tamponuna aktarıldı. Bunun üzerine 0,2 ml ve 0,05 M'lık $FeCl_3$ ilave edilerek hazırlandı.
4. 0,05 M'lık $FeCl_3$ çözeltisinin hazırlanması: 0,81 g $FeCl_3$ 100 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

3.1.3.g. Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,05 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,8): 1,42 g Na_2HPO_4 yaklaşık 180 ml destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 7,8'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 200 ml olacak şekilde tamamlandı.
2. $1,33 \times 10^{-5}$ M'lık riboflavin çözeltisinin hazırlanması: 12 mg riboflavin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.
3. $4,46 \times 10^{-5}$ M'lık metiyonin çözeltisinin hazırlanması: 0,665 mg metiyonin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.
4. $8,15 \times 10^{-8}$ M'lık NBT çözeltisinin hazırlanması: 6,1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 ml'ye fosfat tamponuyla (pH 7,4, 0,1 M) tamamlandı.

3.1.3.i. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 1,38 g NaH_2PO_4 , 80 ml destile suda çözüldü, pH metre kullanarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 43 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisinin hazırlanması: %30'luk H_2O_2 'den 440 μl alındı ve 100 ml 0,1 M'lık fosfat tamponunda çözüldü.

3.1.3.i. Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 2 mM'lık FeCl_2 çözeltisinin hazırlanması: 0,014 g $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.

2. 5 mM'lık ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 0,0062 g ferrozin 25 ml saf etanolda tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

3.1.3. j. Enzim homojenatı ile ilgili çözeltiler

1. Homojenat tamponu (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 7): 14,2 g Na₂HPO₄ ve 0,05 g PVP, 80 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 7'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. Aktivite ölçüm çözeltisi (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 7): 14,2 g Na₂HPO₄, 80 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 7'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.k. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz için kullanılan çözeltiler

1. Diyaliz tamponunun hazırlanması (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 7): 14,2 g Na₂HPO₄, 800 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 7 ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.l. Peroksidaz enziminin iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması sırasında kullanılan çözeltiler

1. Yıkama tamponu (10 mM Na₂HPO₄, pH: 6,5): 1,42 g Na₂HPO₄, 80 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 6,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. Elüsyon çözeltisi (10 mM Na₂HPO₄, pH: 6,5): 35,5 g Na₂HPO₄, 220 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 6,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

3. Gradient oluşturma çözeltilisi (1 M NaCl): 14,6 g NaCl alınarak hacmi yıkama tamponu ile 250 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.m. Peroksidaz enziminin jel-filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması sırasında kullanılan çözeltiler

1. Elüsyon çözeltilisi (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 7): 1,42 g Na₂HPO₄, 80 ml saf suda çözüldü ve pH'sı 7 ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.n. Optimum pH çalışması sırasında kullanılan çözeltiler

1. 45 mM'lık Guaiakol çözeltilisinin hazırlanması: 247 µl guaiakol alındı ve toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 5 mM'lık ABTS çözeltilisinin hazırlanması: 0,055 g ABTS alındı ve 100 ml saf suda çözüldü.
3. 5 mM'lık Pirogalol çözeltilisinin hazırlanması: 0,063 g pirogalol alındı 100 ml saf suda çözüldü.
4. 5 mM'lık Katekol çözeltilisinin hazırlanması: 0,055 g katekol alındı ve 100 ml saf suda çözüldü.
5. 5 mM'lık 4-Metil Katekol çözeltilisinin hazırlanması: 0,062 g 4-metil katekol alındı 100 ml saf suda çözüldü.
6. 22,5 mM'lık H₂O₂ çözeltilisinin hazırlanması: 254 µl %30'luk H₂O₂ alındı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
7. 0,1 M'lık asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması: 100'er ml'lik üç adet beher alındı ve her birine 1,36 g CH₃COONa.3H₂O tartılarak konuldu ve 80 ml saf suda çözüldü.

pH metre yardımıyla 0,1 M'lık HCl kullanılarak pH'ları yine sırayla 3,0, 3,5 ve 4,0'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

8. 0,1 M'lık Fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması: 100'er ml'lik altı adet behere alındı ve her birine 1,42 g Na_2HPO_4 tartılarak konuldu ve 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımıyla 0,1 M'lık HCl kullanılarak pH'ları yine sırayla 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ve 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
9. 0,2 M Tris-0,1 M HCl tampon çözeltilerinin hazırlanması: 100'er ml'lik üç adet behere sırasıyla her birine 2,423 g Tris tartılarak konuldu ve 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımıyla 0,1 M'lık HCl kullanılarak pH'ları yine sırayla 8,0, 8,5 ve 9,0'a ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.o. Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisinin incelenmesi ile ilgili çözeltiler

1. Aktivite ölçüm çözeltisi (0,1 M Na_2HPO_4 , pH: 7): 3.1.3.j'de anlatıldığı gibi hazırlandı.
2. Substrat çözeltilerinin hazırlanması: Bölüm 3.1.3.n'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

3.1.3.ö. Enzimin stabil pH'sının bulunması ile ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltiler

1. Substrat çözeltilerinin hazırlanması: Bölüm 3.1.3.n'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.1.3.p. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltiler

1. Substrat çözeltilerinin hazırlanması: Bölüm 3.1.3.n'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.1.3.r. Kantitatif protein miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

1. Coomassie Brilliant Blue G250 reaktifinin hazırlanması: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 50 ml %95'lik etanolda çözülerek 100 ml %89'luk fosforik asit ilave edildi. Daha sonra çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

3.1.3.s. SDS-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler

1. Akrlamid-bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid karışımı 100 ml suda çözüldü.
2. %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS 90 g saf suda çözüldü.
3. 0,5 M'luk Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 6,8): 6 g Tris 40 ml suda çözüldü ve pH 6,8'e 1 M HCl ile ayarlandı ve toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
4. 3 M'luk Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 8,8): 36,3 g Tris alındı ve 48 ml 1 M'luk HCl ile karıştırıldı ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
5. 0,25 M'luk Tris, 1,92 M'luk Glisin, %1'lik SDS (pH 8,3) çözeltisinin hazırlanması: 3,03 g Tris, 14,4 g glisin ve 1 g SDS suda çözülerek toplam hacim 1 litreye tamamlandı.
6. Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karışım hazırlandı.

7. Jel boyama çözeltisinin hazırlanması: 0,1 g Coomassie Blue R₂₅₀, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karışımda çözülerek hazırlandı.

8. Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karışım hazırlandı.

3.1.3.ş. Peroksidaz enziminin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi ile ilgili çözeltiler

1. Akrilamid-bisakrilamid çözeltisi: 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

2. 0,5 M'lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 6,8): 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

3. 3 M'lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 8,8): 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

4. 0,25 M'lık Tris, 1,92 M'lık Glisin, %1'lik SDS (pH 8,3) çözeltisinin hazırlanması: 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

5. Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

6. Jel boyama çözeltisinin hazırlanması: 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

7. Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: 3.1.3.s'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

8. 45mM'lık Guaiakol çözeltisinin hazırlanması: 3.1.3.n'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin toplanması ve kurutulması

Deneyleerde kullanılan karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisi marketten günlük olarak temin edildi, küçük parçalara ayrıldı ve oda sıcaklığında gölgede kurutuldu. Kurutulan nünuneler antioksidan ile ilgili çalışmalarda kullanılıncaya kadar da karanlıkta muhafaza edildi. Enzim çalışmalarda kullanılan karnabahar (*Brassica oleracea* L.) ise her gün taze olarak temin edildi

3.2.2. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisi ekstralarının hazırlanması

3.2.2.a Su ekstralarının hazırlanması

Antioksidan ve antiradikal aktivite ile ilgili çalışmalarda kullanılan karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden 50 g tartıldı ve blender cihazı ile öğütüldü. Su ekstralarının hazırlanması literatürde belirtildiği gibi yapıldı (Gülçin 2005). Su ekstrasi için blenderde öğütülmüş ve toz haline getirilmiş 20 g karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisi 1 L'lik ağzı kapalı beherde numunenin yirmi katı saf su ile (400 ml) manyetik karıştırıcıda ve suyun kaynama sıcaklığında on dakika boyunca karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına getirilerek soğutuldu, tülbent bezinden süzöldü ve kaba atıklar atıldı. Daha sonra elde edilen ham çözelti adi süzgeç kâğıdından süzöldü. Elde edilen süzöntü 500 ml'lik balona aktarıldı ve derin dondurucuda (-84°C) bir gece boyunca dondurulduktan sonra liyofilizatörde bütün suyu uzaklaştırılıncaya kadar liyofilize edildi.

3.2.2.b Etanol ekstresinin hazırlanması

Etanol ekstresinin hazırlanması da literatürde belirtildiği gibi yapıldı (Gülçin 2005). Etanol ekstresi için yine blenderde öğütülmüş ve toz haline getirilmiş karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden 20 g numune 1 litrelik ağzı kapalı erlenlerde numunenin yirmi katı etanol ile (400 ml) manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen etanol ekstresi süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzülmüş ekstreler birleştirilerek evaporatörde 40°C’de etanol uzaklaştırıldı.

3.2.3. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Mitsuda *et al.* 1966). Öncelikle stok çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla 20 mg su ekstresi 20 ml saf suda ve yine aynı şekilde 20 mg etanol ekstresi ise 20 ml etanolde çözünerek hazırlandı. İstenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözelti, vezin kaplarına otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 2,5 ml’ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak 2,5 ml tampon çözelti ve 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37°C’de gerçekleştirildi. Her on saatte bir vezin kaplarından 100’er µl alındı 4,7 ml etanol bulunan deney tüplerine konuldu 100 µl Fe²⁺ çözeltisi daha sonra da 100 µl SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 4,8 ml etanol bulunan deney tüpüne 100 µl Fe²⁺ ve 100 µl SCN⁻ çözeltilerinin ilavesiyle hazırlandı. Numunelerin 500 nm’deki absorbanları köre karşı okundu.

3.2.4. Toplam indirgeme kuvveti tayini

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (Yen and Chen 1995). Taze hazırlanan stok çözeltilerden 15, 30 ve 45 µg/ml olacak şekilde alındı ve deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] ilave edildikten sonra karışım 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 ml alındı ve bunun üzerinden 2,5 ml destile su ve %0,1'lik 0,5 ml $FeCl_3$ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

3.2.5. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının kullandığı Kuprak metodunun (2006) hafif bir modifikasyonuna göre yapıldı. Bunu için deney tüplerine 0,01 M'lık 0,25 ml $CuCl_2$ çözeltisi ilave edildi. Bunun üzerine 0,25 ml $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 1 M'lık amonyum asetat tamponu aktarıldı. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/ml) karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstraları veya standartlar ilave edildi. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini göstermektedir.

3.2.6. Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının süperoksit anyon radikallerini giderme etkisi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürününün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. Bu amaçla Zhishen ve arkadaşlarının (1999) kullandığı metot hafif bir modifikasyonla kullanıldı. Numune ve standartların konsantrasyonları 15 µg/ml oluşacak şekilde 0,05 M'lık ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu ile hazırlandı. Numune içeren tampon çözeltilere riboflavin, metiyonin ve NBT'den $1,33 \times 10^{-5}$ M,

$4,46 \times 10^{-5}$ M ve $8,15 \times 10^{-8}$ M konsantrasyonlarına denk gelen miktarları sırasıyla ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 40 dakika boyunca 20 W'lık floresan ışığı ile uyarıldı. Absorbans, sudan oluşan köre karşı 560 nm'de kaydedildi.

3.2.7. DPPH' serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini

DPPH serbest radikal giderme Blois metoduna (1958) göre yapıldı. Serbest radikal olarak DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde destile etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 ml ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedildi. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml DPPH' çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

3.2.8. ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayini

ABTS^{•+} giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmaya göre belirlendi. Öncelikle 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiliye 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS^{•+} elde edildi. ABTS^{•+} çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı. Farklı konsantrasyonlardaki karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının stok çözeltisine 1 ml ABTS^{•+} çözeltisi ilave edildikten sonra 30 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 737 nm'de absorbansları kaydedildi.

3.2.9. DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının DMPD^{•+} giderme aktivitesi, Fogliano ve arkadaşlarının uyguladıkları metoda göre yapıldı (1999). DMPD^{•+} elde edildi. DMPD^{•+} çözeltisi günlük taze olarak hazırlanan bu solüsyonun absorbansı 12 saate kadar sabittir. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının veya standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10–30 µg/ml) deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 0,5 ml ye tamamlandı. Bunun üzerine 1 ml DMPD^{•+} çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorbans değerleri 505 nm’de ölçüldü. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı. Reaksiyon ortamında giderilen DMPD^{•+} miktarı (mM), DMPD^{•+} çözeltisi (5-100 mM) ile hazırlanan grafikten elde edilen aşağıdaki denklemden hesaplandı (Şekil 4.12; r²:0.9993):

$$\text{Absorbance } (\lambda_{505}) = 0.0088 \times [\text{DMPD}^{\bullet+}]$$

DMPD^{•+} giderme kapasitesi aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı:

$$\text{DMPD}^{\bullet+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100$$

Burada A_C, DMPD^{•+}’nin başlangıç konsantrasyonu ve A_S, karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının varlığında DMPD^{•+}’nin kalan konsantrasyonunun absorbansıdır (Fogliano *et al.* 1999).

3.2.10. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının hidrojen peroksit giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (1989). Bunun için pH’sı 7,4 olan fosfat tamponunda 43 mM’lık hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı. H₂O₂ konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, H₂O₂’in 230 nm’de absorbans göstermesiyle belirlendi. 30 µg/ml konsantrasyonunda alınan karnabahar

(*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının hacmi 4 ml'ye kadar tampon çözelti ile tamamlandı. Daha sonra 0,6 ml hidrojen peroksit (43 mM) çözeltisi ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hidrojen peroksitin azalan miktarı 230 nm'de azalan absorbans olarak kaydedildi. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.2.11. Ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının metal şelatlama aktivitesi Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (1994). Bu işlem için 2 mM'lık ve 0,05 ml $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve 0,35 ml saf su içeren çözelti, 10 ve 20 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarını oluşturacak karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarını ihtiva eden 0,2 ml'lik çözeltiye ilave edildi. Son hacim 4 ml olacak şekilde destile etanol ilave edildi. Reaksiyon 0,2 ml ve 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilave edilmesiyle başlatıldı. Çözelti vorteksde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'deki absorbansı ferrozin hariç geriye kalan çözeltiden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol, ekstre numunesi yerine saf su kullanılarak hazırlandı.

3.2.12. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı FCR ile belirlendi (Singleton *et al.* 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Bunun için önce bir standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg gallik asit 25 ml destile suda çözüldü ve 1 mg/ml konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 100, 200, 400, 500 ve 600 μg gallik asit içeren çözelti erlenlere aktarıldı ve hacim destile suyla 23 ml'ye tamamlandı. Erlenlere sırasıyla 0,5 ml FCR ve 3 dakika sonra da %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 1,5 ml ilave edildi. Karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansı 760 nm'de destile sudan oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol için numune yerine destile su kullanıldı.

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin her iki ekstresinde bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Gülçin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre değerlendirildi (Gülçin 2005). Daha önce hazırlanan her bir stok çözeltilerden 1000 µl alındı vezin kaplarına aktarıldı ve hacim 23 ml'ye destile suyla tamamlandı. Karışıma 0,5 ml FCR ve 3 dakika sonra da 1,5 ml %2'lik Na₂CO₃ ilave edildi. Numuneler iki saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda numunelerin absorpsiyonu saf sudan oluşan köre karşı 760 nm'de okundu. Bu işlemler üçer defa tekrarlandı. Numunelerin absorpsiyon değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalent miktarı standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklem yardımıyla bulundu. Bulgular gallik asit ekivalent (GAE) ve mikrogram olarak verildi (r²: 9439).

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 760\text{nm})} = 0.0014 \times [\text{GAE } (\mu\text{g})]$$

3.2.13. Toplam flavonoid miktarı tayini

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin her iki ekstresinde bulunan toplam flavonoid miktarı Park ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre toplam olarak belirlendi (Park *et al.* 1997). Standart flavonoid bileşik olarak kuersetin kullanıldı. Bunun için önce standart grafik çizildi. Bu amaçla 25 mg kuersetin 25 ml destile suda çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 10, 20, 30, 40 ve 50 µg kuersetin içeren çözeltiler deney tüplerine aktarıldı. Daha sonra bunun üzerine sırasıyla 0,1 ml (1 M) suda hazırlanmış CH₃COOK ve 0,1 ml (%10) Al(NO₃)₃ çözeltilerini içeren 4,3 ml etanol çözeltisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorpsiyonları etanolden oluşan köre karşı kaydedildi. Toplam flavonoid konsantrasyonu kuersetinin standart olarak kullanıldığı aşağıda verilen standart grafik denkleminde mikrogram kuersetin ekivalent (QE) ve mikrogram olarak hesaplandı (r²: 9939).

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 415)} = 0.0141 \times [\text{QE}] + 0.4297$$

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin her iki ekstresinde bulunan toplam flavonoit miktarını belirlemek için toplam fenolik bileşik miktarı tayininde kullanılan stok çözeltilerden deney tüplerine sırasıyla 1000 µg ekstre ihtiva eden stok çözelti aktarıldı. Daha sonra ise deney tüplerine aktarılan farklı miktarlardaki ekstreler 0,1 ml (1 M) suda hazırlanmış potasyum asetat ve 0,1 ml (%10) alüminyum nitrat çözeltilerini içeren 4,3 ml etanol çözeltisi ile seyreltildi ve vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm’de absorbansları aynı şekilde kaydedildi.

3.3. Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1. Enzim homojenatının hazırlanması

Homojenat hazırlanmasında 10 g taze karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisi sıvı azot içerisinde dondurulup öğütüldükten sonra %0,5 PVP içeren 50 mM’lık, pH’sı 7 olan 25 ml KH₂PO₄ tamponuna ilave edildi. Soğutmalı santrifüjde 13.000xg’de bir saat boyunca santrifüj edildi. Süpernatant çökelekten ayrıldı. Elde edilen süpernatant kullanılmaya kadar 4°C’de muhafaza edildi (Havir and McHale 1987; Gülçin 2002).

3.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinde bulunan peroksidaz enzimi homojenatı sırasıyla %0–10, %10–20, %20–30, %30–40, %40–50, %50–60, %60–70, %70–80 ve %80–90 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında 13.000xg’de bir saat boyunca santrifüj yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatanda bulunan enzim aktivitesine bakıldı. Bütün bu işlemler +4°C’de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş ilave edildi. Her defasında daha önce katılan (NH₄)₂SO₄’ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi. Numune önce 0,1 M'lık fosfat tamponuna (pH: 7) karşı 6 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde ve buzdolabında +4°C gerçekleştirildi. Diyaliz bittikten sonra aktivite tayin metotlarında anlatıldığı şekilde enzim aktivitesine bakıldı. Ayrıca Bradford metoduna göre protein tayini yapıldı.

3.3.3. Enzimin CM-Sefadex A50 iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması

Bu işlem için CM-Sefadex A50 iyon değişim kromatografisi kullanıldı. Çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-Sefadex A50 iyon değişim materyalinin öncelikle şişirilmesi gerekir. Bu amaçla 100–120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 4 g jel 100 ml destile suya aktararak termostatlı su banyosunda 90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk NaOH içinde 1 saat bekletildikten sonra 0,5 N HCl ile nötralize edildi. Jel materyali havası uzaklaştırılıp 5x30 cm²xcm ebadındaki kolona paketlenildikten sonra 100 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15 ml/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek diyalizden elde edilen enzim çözeltisi otomatik pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Daha sonra 10 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) ile yıkama işlemi yapıldı ve yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponunu ile alttan alınan elüatların pH'sı ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml, 100 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 100 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) ile hazırlanmış 250 ml, 1 M NaCl dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başlatıldı. Elüatlar, kolon akış hızı 15 ml/saat'e ayarlanarak 3 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı ve her bir elüatın 280 nm'de absorbansına ve 470 nm'de guaiakol substratı ile aktiviteye bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve Tüp Sayısı-Aktivite/Absorbans grafiği çizildi. Enzimin sıcaktan dolayı aktivite kaybına uğramaması için hem alınan elüatlar ve hem de gradient mikserin içindeki elüsyon tamponunun etrafı buz ile kapatılarak ortamın soğuk olması sağlandı. Birleştirilen elüatlar ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduna

göre kantitatif protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.3.4. Enzimin Sefadeks G–25 ile muamele edilmesi

Enzimin Sefadeks G–25 ile muamele edilmesi ile ilgili çalışmalarda iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen enzim çözeltisi kullanıldı. Sefadeks G-25 materyali kendi kütesinin on katı kadar su ve moleköl kütesi 5 kDa'dan küçük partikülleri absorblaması sebebi ile tatbik edilecek enzim çözeltisinin kütesi ölçölerek onda bir oranında Sefadeks G-25 ile karıştırıldı ve 10 dakika kadar bekletildikten sonra 1000xg de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatanda aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapıldı.

3.4. Enzimler ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.4.1. Optimum pH çalışması

Optimum pH çalışması için pH 3,0–9,0 aralığında çalışıldı. pH 3,0–4,5 arası için 0,1 M'lık asetat tamponu, pH 4,5–7,5 arası için 0,1 M'lık fosfat tamponu ve pH 8,0–9,0 için de 0,1 M'lık Tris/HCl tamponu kullanıldı. Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçölerek, bulgular grafik halinde verildi.

3.4.2. Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisinin incelenmesi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalar her substrat için enzimin optimum pH'sında ve 0–80°C aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak ayarlandı. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktarılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Bulgular grafik halinde verildi.

3.4.3. Enzimin stabil olduğu pH'nın bulunması

Peroksidaz enziminin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için üç farklı pH'da (3,0–4,5) asetat tamponu ile altı farklı pH'da (5,0–7,5) fosfat tamponu ile, ve üç farklı pH'da (8,0–9,0) Tris/HCl tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 500 mililitresine, 250 µl enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C'de muhafaza edildi. Başlangıçta aktivite ölçüldükten sonra 240 saat boyunca her 48 saatte bir aktivite ölçümü yapılarak enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi.

3.4.4. Enzimin için termal stabilizasyon çalışması

Peroksidaz enziminin termal stabilizasyonu ilgili çalışmalar enzimin her bir substrat için optimum pH'sında ve 30-90°C aralığında yedi farklı sıcaklıkta yapıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak ayarlandı. Çalışılan her bir sıcaklık değerinde deney tüpü içerisine 300 µl enzim çözeltisi konuldu ve aktivite ölçümü yapıldı. İçersine enzim çözeltisi konulan tüp bir saat boyunca çalışılan sıcaklığa ayarlanmış olan sirkülatörlü su banyosunda bekletildi ve her on dakikada bir aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan işlem her substrat için 30-90°C aralığında tekrar edildi.

3.4.5. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

Peroksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar, 22,5 mM'lık H_2O_2 ve 45 mM'lık guaiakol, 5 mM'lık pirogalol, 5 mM'lık ABTS, 5 mM'lık katekol ve 5 mM'lık 4-metil katekol substratları ile yapıldı. Bunun için önce peroksidaz enzimi ile guaiakol, pirogalol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol substratlarının konsantrasyonları sabit tutularak, H_2O_2 için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri

yapıldı ve Lineveawer-Burk grafikleri belirlendi. Daha sonra peroksidaz enzimi ile H_2O_2 substratının konsantrasyonları sabit tutularak, guaiakol, pirogalol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol substratları için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktivite ölçümleri yapıldı ve grafikler çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.4.6. Kalitatif protein miktarı tayini

İyon değişim ve jel filtrasyon gibi kolon kromatografi işlemlerinde alınan bütün fraksiyonların kalitatif protein tayinleri yapıldı. Kalitatif protein tayininin esası, proteinlerin yapısında bulunan ve aromatik halkaya sahip triptofan, trozin ve fenilalanin amino asitlerinin 280 nm'de UV-ışınlarını absorblayıp maksimum absorbans göstermeleri esasına dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetler kullanılarak, spektrofotometre ile absorbansları köre karşı okundu.

3.4.7. Kantitatif protein miktarı tayini

Her bir saflaştırma basamağında elde edilen enzim çözeltisinin protein miktarları kantitatif olarak Bradford metoduna göre belirlendi. Bradford (Coomassie Blue) metodu ile kantitatif protein tayini, fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden avantajlı tarafı, kısa sürede uygulanabilirliği, fazla bozucu faktörlerin bulunmaması ve protein-boya kompleksinin çözelti ortamında uzun süre kalabilmesidir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-60 μg arasındadır. Bitkilerden elde edilen ham ekstratlar ile saflaştırma basamağında elde edilen çözeltilerde bulunan protein miktarları bu yöntemle belirlendi (Bradford 1976).

Bu yöntem ile protein tayininin yapılması için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Standart grafik için 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır serum albümini

kullanıldı. Bir dizi deney tüpüne hazırlanan standart sığır serum albümininden sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µl ilave edildi. Hacimleri saf su ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir tüpe Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 4,9 ml ilave edildi. Kör olarak numune yerine 100 µl aktivite tayin tamponu ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik halinde hazırlandı. Daha sonra karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden hazırlanan ham ekstrakt ve saflaştırma basamaklarından elde edilen çözeltilerden 100 µl alındı ve üzerilerine 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Üç ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınarak standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.4.8. Enzimin molekül kütlesinin jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesi

Enzimin molekül kütlesinin tayini için önceden jel materyalinin şişirilmesi ve paketlenmesi gerekir. Bu amaçla 100 ml yatak hacmi elde etmek için 5 g Sefadex G-150, 150 ml saf su içine alındı. Su banyosunda 90°C'de bekletilerek polimer materyal şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM'lık ve pH'sı 7,5 olan Tris/HCl tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçülerek bu değerler aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 4 ml/saat olarak ayarlandı.

Enzimin molekül kütlesinin tayininde kullanılacak olan standart grafik için kolondan önce blue dekstran; 2.000.000 Da, β -galaktozidaz 116.000 Da, bovin serum albümin 66.000, chicken serum albümin; 45.000 Da, karbonik anhidraz; 25.000 Da proteinleri tek tek geçirildi. Daha sonra molekül kütlesi tespit edilecek enzim çözeltisi geçirildi.

Elüsyon işlemi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Numune tatbiki için %10'luk gliserinli enzim çözeltisinden 2 ml kolona tatbik edildi. Bu enzim çözeltisinin jel tarafından emdirildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üst kısmı elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 3'er ml olacak şekilde tüplere toplandı.

Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak, 280 nm'de toplanan elüatların absorbansları kaydedildi. Elüsyon almaya 280 nm'deki absorbans değerleri sıfır oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri ile peroksidaz enzimi için 470 nm'de alınan aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Kromatografi işlemi sonunda enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen enzim çözeltisi için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteleri belirlendi ve böylece saflaştırılma oranları hesaplandı. Daha sonra enzimin molekül kütesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$K_{av} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

V :Void hacim

V_E :Elüsyon hacmi

V_T :Kolon yatak hacmi

Elüatlar kolondan 3'er ml'lik hacimler halinde alındı ve her bir elüat için 280 nm'de toplanan elüatların absorbansları ölçülerek kaydedildi. Kör olarak 50 mM'lık ve pH'sı 7,5 olan elüsyon tamponu kullanıldı. Elüsyon almaya 280 nm'deki absorbans değerleri sıfır oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı ve 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri ile peroksidaz enzimi için 470 nm'de alınan aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi.

3.4.9. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Enzimin saflaştırıldıktan sonra %3–8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle aktarıldı. Bu işlemler yapılırken hava almamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %10'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar yaklaşık yarım saat beklendi. Katılaştıktan sonra üzerindeki %10'luk SDS döküldü. Daha sonra yığıma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra tarağın da üstüne nemli süzgeç kâğıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün 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 hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirildi. Daha sonra akım 150 volta ayarlanarak 4–5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA+ %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak,

renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1–2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Bundan sonra jeller %30'luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafları çekildi.

Renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi, %0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250 %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Renksizleştirme çözeltisi ise, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir. Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 10,7 ml %30'luk akrilamid, %0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %0,1 SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen daimin) ve 11,9 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5' lik amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, %0,1'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0,2 ml ilave edildi.

3.4.10.Enzimin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi

Elektroforez çalışmalarında enzimlerin kaynağı olarak, kinetik çalışmalarda kullanılacak olan kaynaklar kullanıldı. Laemmli tarafından anlatıldığı gibi tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforez işlemi sodyum dodesilsülfat (SDS) kullanılmadan gerçekleştirildi (Laemmli 1970). Böylece enzimin aktif formu korunmuş oldu.

Numune yürütüldükten sonra elektroforez cihazından çıkarılan jel 45 mM'lık guaiakol, 22,5'lik mM H₂O₂ ve 5 mM'lık ABTS, 22,5 mM'lık H₂O₂ ihtiva eden soğuk 0,1 M'lık fosfat tamponunda yaklaşık bir saat bekletildi. Bir saat sonra substrat çözeltilerine daldırılan jellerde bantlar belirginleşti. Bu işlemten sonra saf su içine alındı ve fotoğrafı çekilene kadar burada muhafaza edildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 22,5 ml 1M'lık Tris-HCl (pH: 8,8), 19,8 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,3 ml, %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen daimin) ve 14,1 ml su karıştırıldı. Bu karışım üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'lik amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı. %3'lük yığma jelin hazırlanması sırasında 1M'lık Tris- HCl (pH: 6,8)'den 1,86 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1,99 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 11,04 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük olarak hazırlanmış olan %1,5' lik PER'den ilave edildi.

3.5. İstatiksel Analizler

Antioksidan ve antiradikal ile ilgili yapılan analizler ayrı ayrı yapılmış üç analizin ortalamasıdır. Verilerin analizleri SPSS (version 11,5 for Windows, SPSS Inc.) programı ile yapıldı ve mean±standart olarak kaydedildi. Varians analizleri ise ANOVA prosedürüne göre değerlendirildi. Değerler arasındaki farklar ise Duncan's multiple testine göre yapıldı. $P<0,05$ değerleri önemli, $p<0,01$ değerleri ise çok önemli olarak görüldü.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

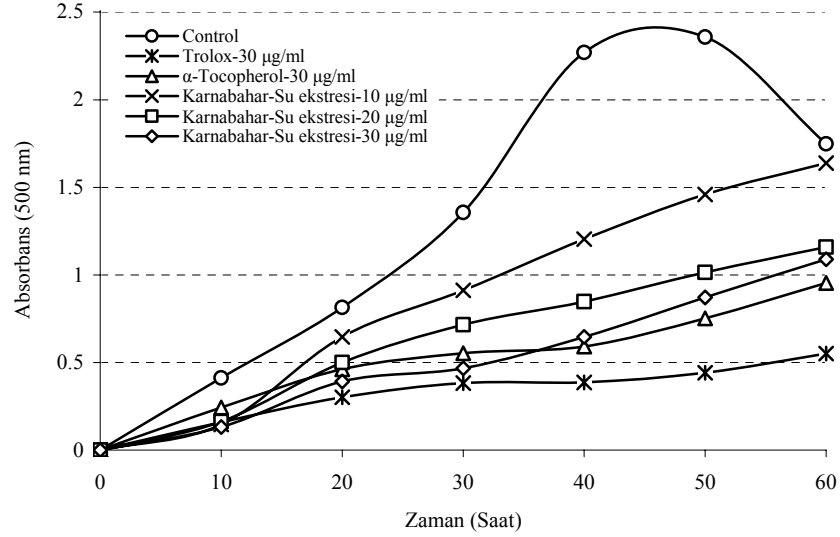
Son yirmi yılda antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımları hakkında oldukça fazla sayıda çalışmalar yapıldı ve bu yoğun çalışmalar halen devam etmektedir. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır (Kulkarni *et al.* 2006). Sıklıkla kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin bulunmasından sonra araştırmalar tamamen bitkisel orijinli antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin *et al.* 2006a). Antioksidan aktivite tayin metodları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme kapasitesinin araştırılması, DPPH•, ABTS^{•+}, DMPD^{•+} ve O₂^{•-} radikal gidermesi, metal şelatlama kapasitesi, serbest olmayan bir reaktif oksijen türü olan H₂O₂'nin giderilmesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin 2005; Gülçin 2006b). Mevcut çalışmada da bu metotlar kullanıldı ve bulgular bir doğal ve standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

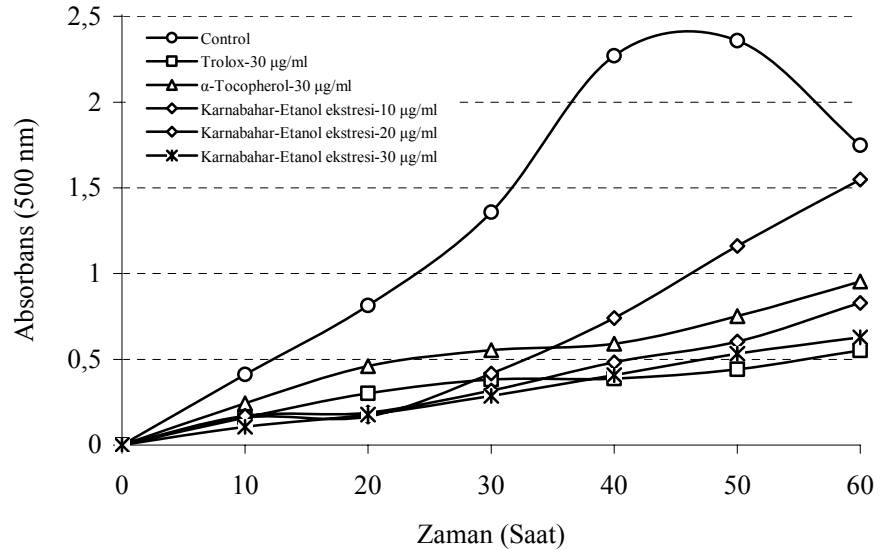
4.1.1. Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite bulguları

Çalışmada kullandığımız karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının toplam antioksidan aktivite tayini için sırasıyla 10, 20 ve 30 μ g/ml konsantrasyonları kullanıldı

(Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Şekilde de görüldüğü gibi karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 4.1. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ekstresinin farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/ml) toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması



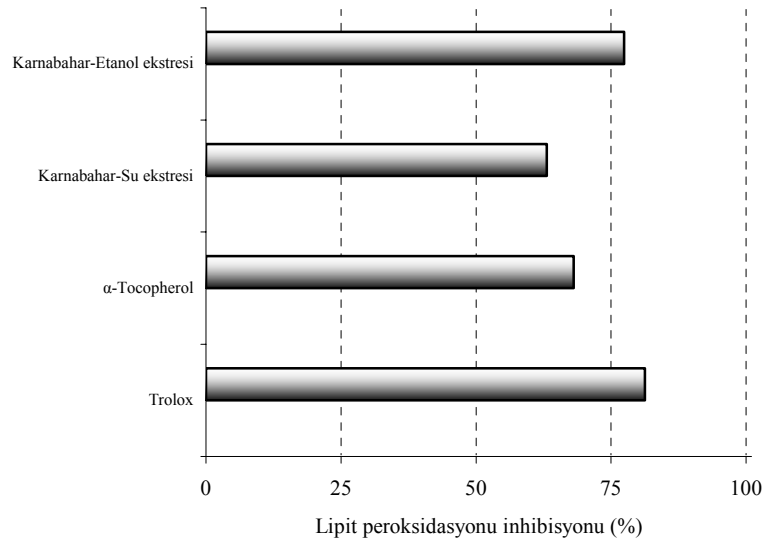
Şekil 4.2. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/ml) toplam antioksidan aktivitesinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Her iki ekstrenin ve kullanılan standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunu inhibe etme yüzdeleri, kontrol değerinin maksimumuna ulaştığı inkübasyon süresi olan ellinci saat temel alınarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{Lipit peroksidasyonu inhibisyonu (\%)} = 100 - \left(\frac{A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100 \right)$$

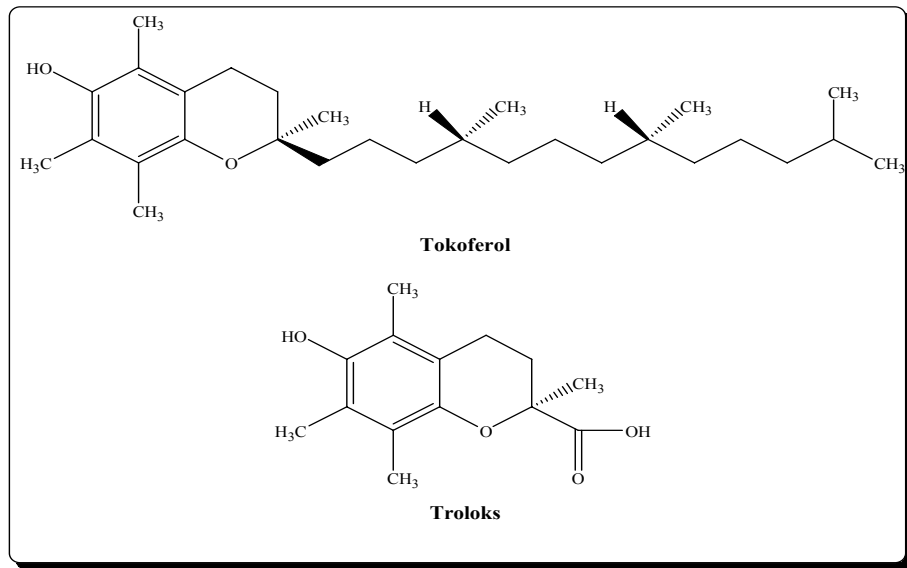
Burada A_{Numune} farklı konsantrasyonlardaki ekstre değerlerinin maksimumuna ulaştığı inkübasyon anındaki absorbans değeri, A_{Kontrol} ise kontrol değerinin maksimumuna ulaştığı inkübasyon anındaki absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak α -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi karşılaştırmalar yapıldığında 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstraktları linoleik asit emülsiyonu peroksidasyonunu sırasıyla %63,1 ve %77,4 inhibe ederken aynı konsantrasyonda α -tokoferol ve troloks linoleik asit peroksidasyonunu yine sırasıyla %81,3 ve %68,1 inhibe ettikleri gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının 30 µg/ml konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu inhibe yüzdelilerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Çalışmamızda referans antioksidan olarak kullanılan doğal bir antioksidan α-tokoferol ile α-tokoferolün suda çözünen analogu olan troloksun kimyasal yapıları Şekil 4.4’de verilmiştir.

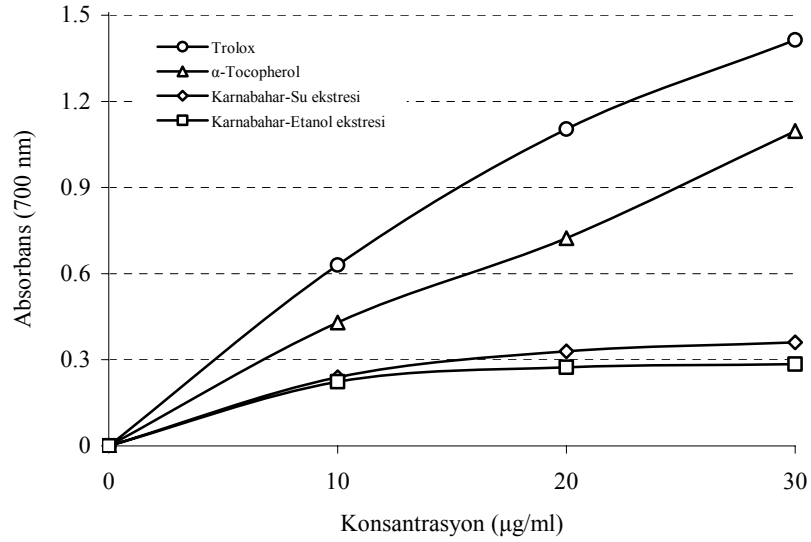


Şekil 4.4. Doğal bir antioksidan olan α-tokoferol ve onun suda çözünen analogu olan troloksun kimyasal yapıları

4.1.2. Ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme kuvveti (FRAP metodu) bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir (Gülçin 2006c; Gülçin *et al.* 2006d). Çalışmada kullanılan karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının indirgeme kapasitesi de toplam antioksidan aktivite gibi artan ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Her iki ekstrenin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm’deki absorbanları ölçülerek

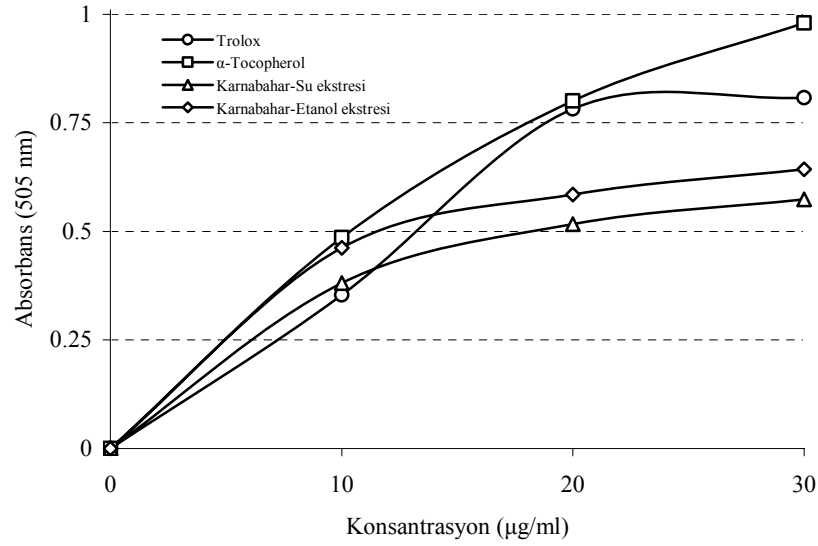
belirlenmiştir (Şekil 4.5). Şekilden de görülebileceği gibi kullanılan standartlar her iki ekstreden daha yüksek indirgeme kapasitesi sergilemiştir.



Şekil 4.5. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.

4.1.3. Kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi gibi ekstrelerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Her iki ekstrenin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 µg/ml) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbanları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.

4.1.4. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının ile çalışmada kullanılan α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,9974, Şekil 3.8).

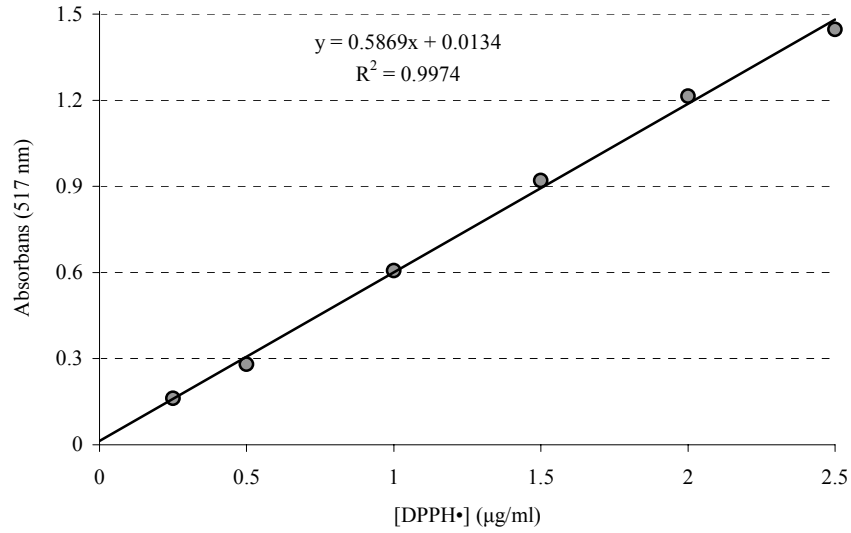
$$\text{Absorbans}_{(\lambda 517\text{nm})} = 0.5869 \times [\text{DPPH}\square] + 0.0134$$

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{DPPH}\bullet \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Numüne}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100$$

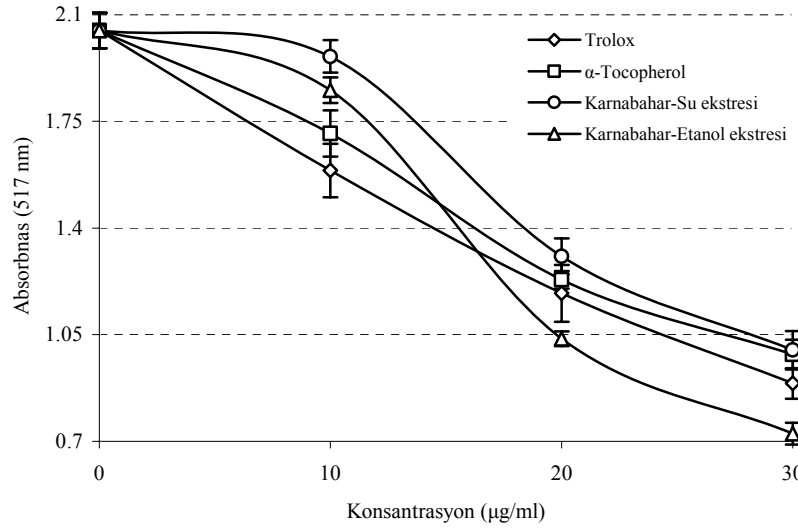
Burada A_{Numune} DPPH radikal çözeltilisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, A_{Kontrol} ise sadece DPPH radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak α -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.4).

DPPH radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH radikali miktarı Şekil 4.7 verilen standart grafikten elde edilen denklem ile hesaplandı.



Şekil 4.7. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.8'de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. DPPH radikali giderme aktivite değerleri kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak bulgular anlamlı bulundu ($p < 0.05$).



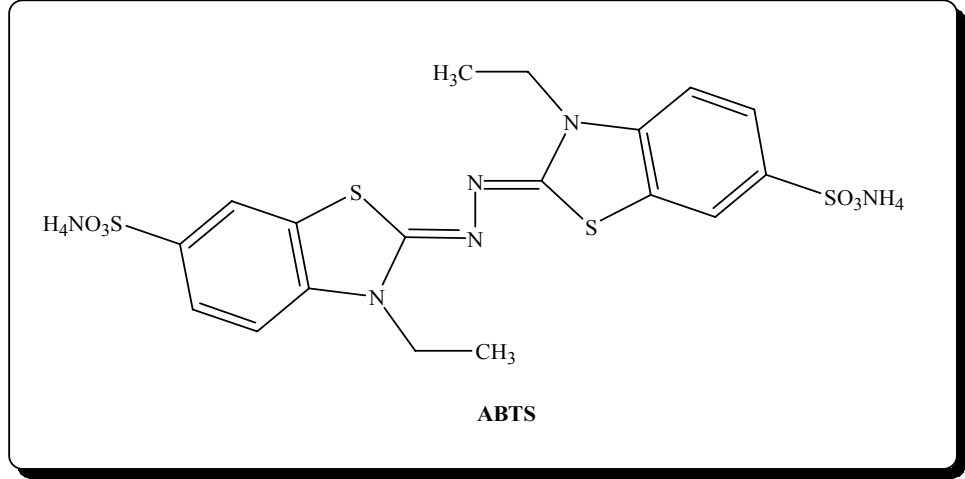
Şekil 4.8. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/ml) DPPH serbest radikallerini giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstreleri ile standart antioksidanlar 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler: Etanol ekstresi > trolox > α-tocopherol ≈ su ekstresi. Bu değerler yine sırasıyla %64,6, %56,5, %51,9, ve %51,2 olarak hesaplandı. Bulgulardan da anlaşıldığı gibi karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen her iki ekstrenin de α-tokoferol ve troloks ile benzer DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediği gözlemlendi.

4.1.5. ABTS^{•+} giderme aktivitesi bulguları

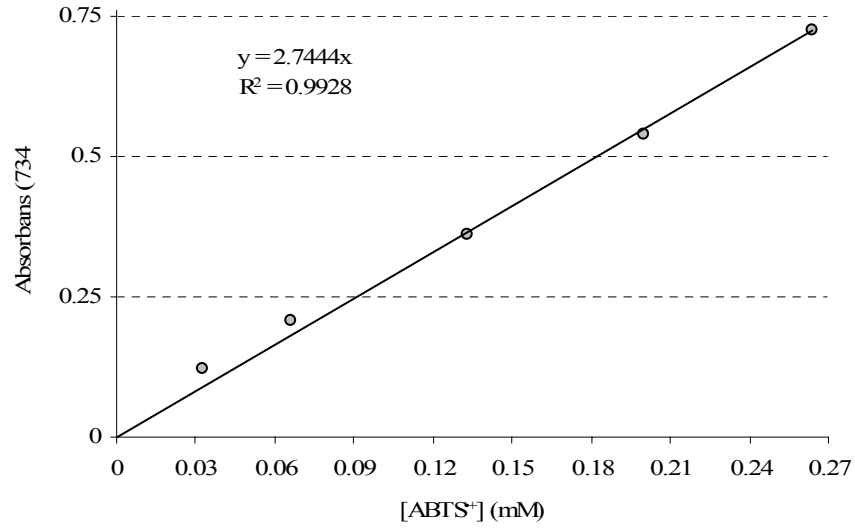
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS^{•+} giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstrelerin veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller *et al.* 1996; Gülçin *et al.* 2007). Bunun için öncelikle ABTS'den ABTS^{•+}'nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS'nin kimyasal yapısı Şekil 3.11'de görülmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiliye 2,45

mM'lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin 2007). Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorbands değeri $0,750 \pm 0,025$ olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi.



Şekil 4.9. ABTS'nin açık kimyasal yapısı

Bu aşamadan sonra karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstratları ile çalışmada kullanılan α - tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,9928, Şekil 3.12).



Şekil 4.10. ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS^{•+} için hazırlanan standart grafik

$$\text{Absorbans}_{(2734)} = 2.7444 \times [\text{ABTS}^{\bullet+}]$$

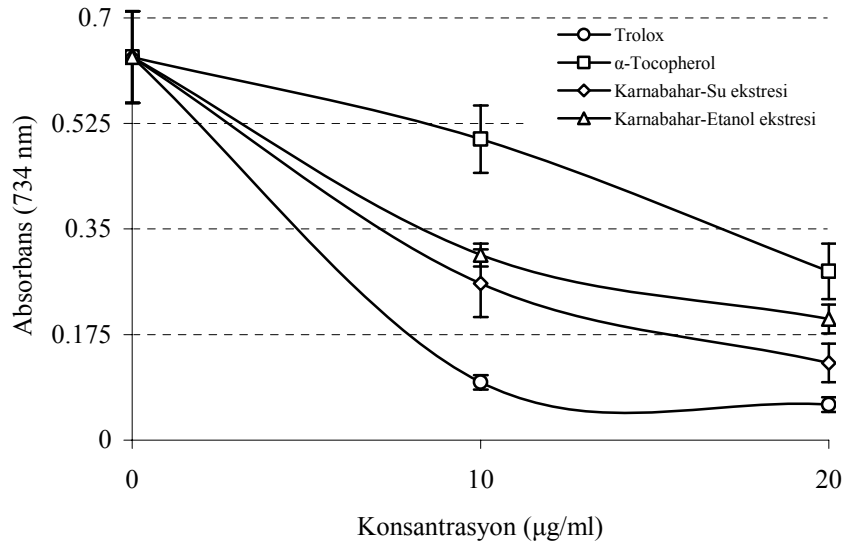
ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan ABTS^{•+} miktarı standart grafikten elde edilen ve yukarıda verilen denklemden hesaplandı.

ABTS^{•+} giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Numüne}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100$$

Burada $A_{\text{Numüne}}$ ABTS^{•+} çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, A_{Kontrol} ise sadece ABTS^{•+} çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak α -tokoferol ve trolox kullanıldı (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Şekil 4.11’de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlardaki karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının (10–30 $\mu\text{g/ml}$) ABTS^{•+} giderme aktivitelerinin birer

standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile mukayese edilmiştir. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında $\text{ABTS}^{+\cdot}$ giderme aktiviteleri (%79,8 ve %68,3) trolokstan (%90,7) daha düşük, fakat α -tokoferoldan (%55,9) daha yüksek olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının (10–20 $\mu\text{g/ml}$) $\text{ABTS}^{+\cdot}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.1.6. $\text{DMPD}^{+\cdot}$ giderme aktivitesi bulguları

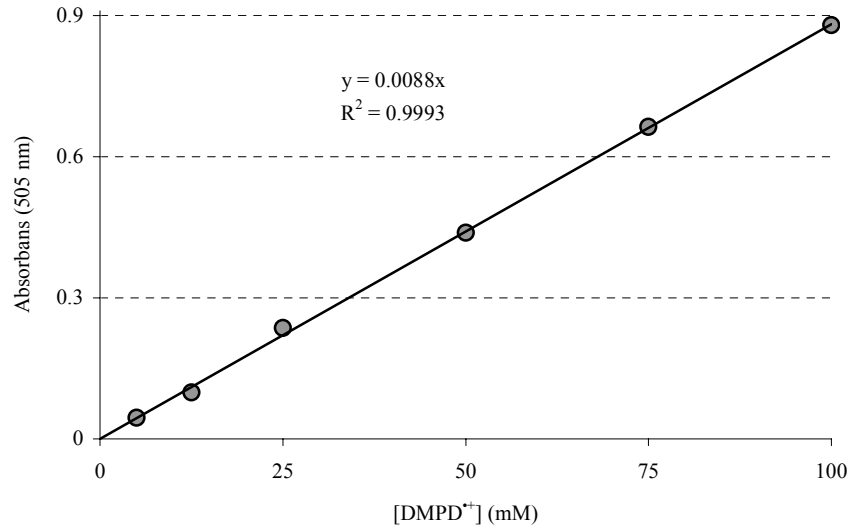
Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstraları ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan ekstralar ile α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin $\text{DMPD}^{+\cdot}$ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı (r^2 : 0,9993, Şekil 3.12).

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 505)} = 0.0088 \times [\text{DMPD}^{+\cdot}]$$

DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD^{•+} miktarı standart grafikten elde edilen ve yukarıda verilen denklemden hesaplandı. DMPD^{•+} miktarındaki azalma yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

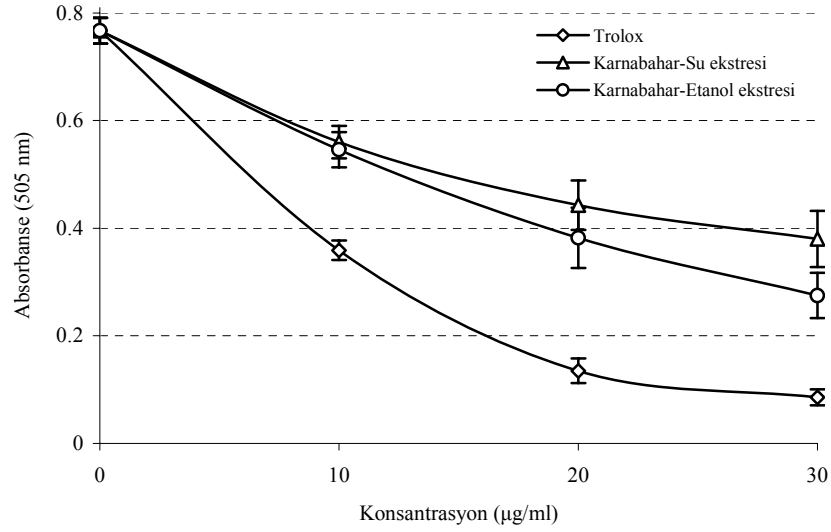
$$\text{DMPD}^{\bullet+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Numüne}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100$$

Burada $A_{\text{Numüne}}$ DMPD^{•+} çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbands değeri, A_{Kontrol} ise sadece DMPD^{•+} çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbandsını ifade eder. Pozitif kontrol olarak α - tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 4.12. DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan DMPD^{•+} için hazırlanan standart grafik

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstratlarının DMPD^{•+} giderme aktivitesi Şekil 4.13'ten görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. DMPD^{•+} giderme aktivite değerleri kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulgular bulundu ($p < 0.005$).



Şekil 4.13. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda (10–30 µg/ml) DMPD⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstreleri ile standart bir antioksidan olan troloks 30 µg/ml konsantrasyonunda sırasıyla şu şekilde DMPD⁺ giderme aktivitesi gösterdiler: Trolox > etanol ekstresi > su ekstresi. Bu değerler yine sırasıyla %88,8, %50,5 ve %64,1 olarak hesaplandı.

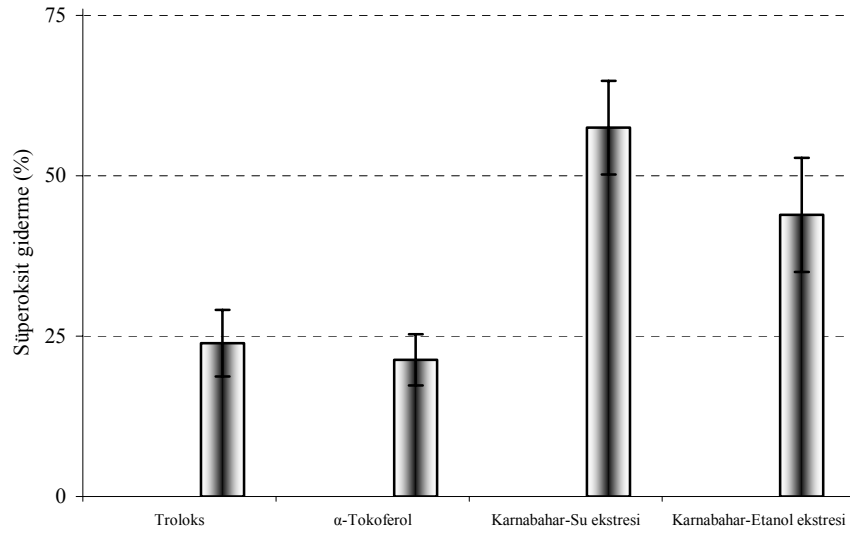
4.1.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstrelerinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktiviteleri riboflavin/metiyonin/ışık metoduna göre yapıldı. Ortamdan giderilen süperoksit anyon radikalleri aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

$$O_2^{\cdot -} \text{ Giderme etkisi (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100$$

Formülde verilen A_{Kontrol} kontrol nümunesinin absorbans değeridir. A_{Numune} ise çalışmada kullanılan antioksidan numunelerin varlığındaki absorbans değeridir (Gülçin *et al.* 2004a).

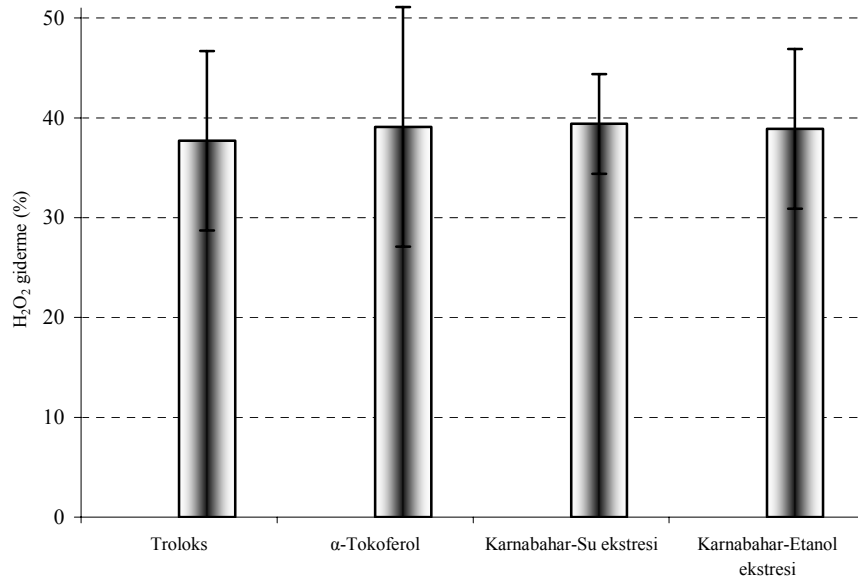
Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstreleri ile çalışmada kullanılan standart antioksidan maddelerin 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi sırasıyla şu şekilde su ekstresi > alkol ekstresi > troloks \approx α -tokoferol bulunmuştur. Bu değerler yine sırasıyla %57,5, %43,9, %23,9 ve %21,3 şeklindedir. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi, bulgular standartlar ile kıyaslandığında her iki ekstrenin de etkili bir şekilde süperoksit anyon radikallerini giderdiği gözlemlendi.



Şekil 4.14. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstreleri ile birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloksun aynı konsantrasyonunda (30 $\mu\text{l/mg}$) süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin ile karşılaştırması

4.1.8. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi bulguları

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstreleri 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesi birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması Şekil 4.15'te verilmiştir. Her iki ekstrenin de kullanılan konsantrasyonda (30 µg/ml) hidrojen peroksiti sırasıyla %39,4 ve %38,9 giderdiği gözlemlendi. Aynı konsantrasyonda α-tokoferol ve troloks ise hidrojen peroksiti sırasıyla %37,7 ve %39,1 giderdiği belirlendi.



Şekil 4.15. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstrelerinin 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

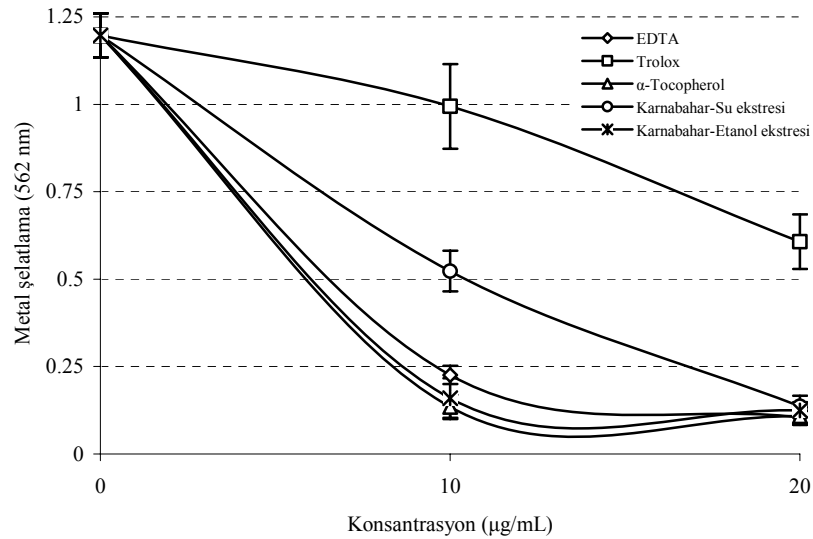
4.1.9. Metal iyonları şelatlama aktivitesi bulguları

Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Şelatlanan metal iyonu miktarı aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{Ferröz iyonları (Fe}^{2+}\text{) şelatlama aktivitesi (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Nümune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100$$

Formülde verilen A_{Kontrol} değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozun ve Fe^{2+} iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbands değeridir. $A_{\text{Nümune}}$ ise su veya etanol ekstralarının ya da çalışmada kullanılan standart antioksidanların absorbands değeridir (Gülçin *et al.* 2004b).

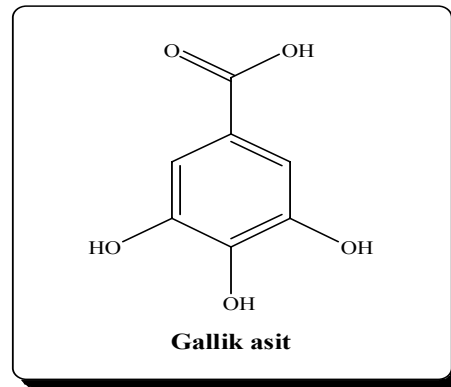
Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen ekstralar ve çalışmada kullanılan standartların 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi sırasıyla EDTA \approx α -tocopherol \approx etanol ekstresi \approx su ekstresi $>$ trolox şeklindedir. Bu değerler yine sırasıyla %91,2, %90,9, %89,5, %88,6, ve %49,3 olarak bulundu. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, bulgular standartlar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak her iki ekstrenin metal şelatlama aktivitesi EDTA ve α -tokoferola benzer ($p > 0,05$) ve trolokstan ise daha yüksek bulundu ($p < 0,01$).



Şekil 4.16. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının farklı konsantrasyonunda (10 $\mu\text{g/ml}$) ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.1.10. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları

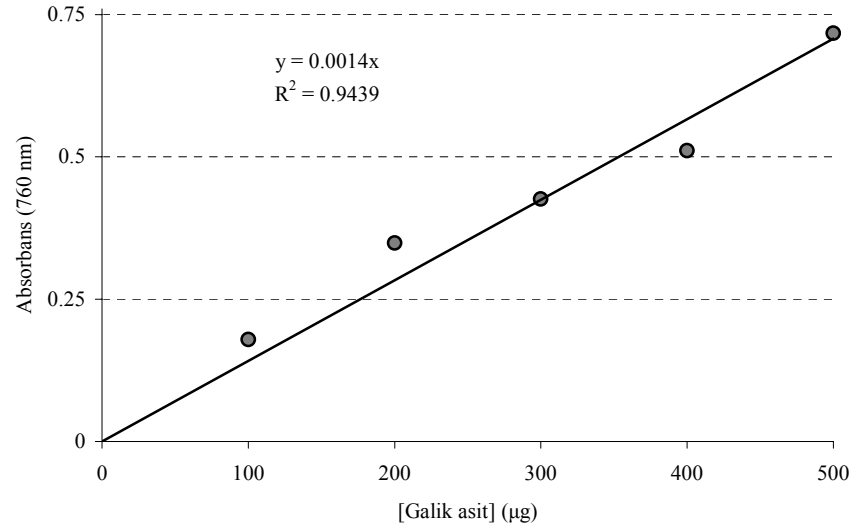
Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı için standart fenolik bileşik olarak kullanılan galik asitin açık yapısı Şekil 4.17'de görülmektedir.



Şekil 4.17. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan galik asitin açık yapısı

Bunun için öncelikle galik asitten standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formülden de yine her iki ekstrada bulunan toplam fenolik bileşik miktarları galik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9944). Bu amaçla hazırlanan standart galik asit grafiği Şekil 4.18'de verilmiştir.

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 730 \text{ nm})} = 0.0014 \times [\text{Galik asit}]$$



Şekil 4.18. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini için galik asit ile hazırlanan standart grafik

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının 1 mg'da bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Tablo 4.1'de verilmiştir. Tablo da görüldüğü gibi karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının 1 mg'da sırasıyla 31,4 ve 140,0 µg GAE olarak fenolik bileşik bulundu.

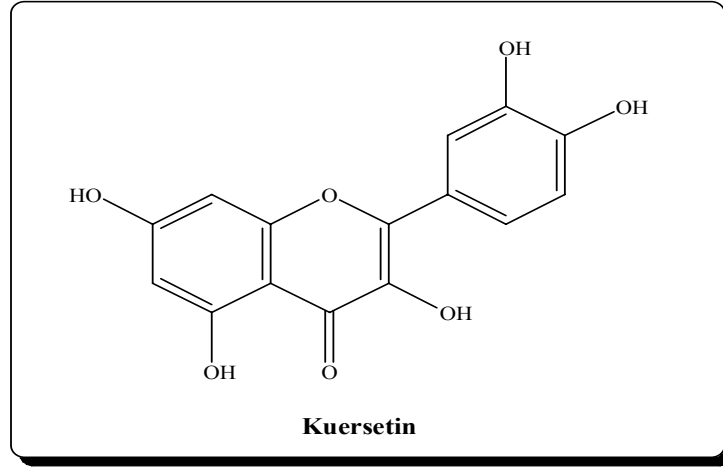
Çizelge 4.1. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarının 1 mg'ında bulunan toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının ekivalent olarak miktarı

| | Toplam fenolik bileşik (µg GAE /mg ekstre) | Toplam flavonoid bileşik (µg QE /mg ekstre) |
|-----------------|---|--|
| Su ekstresi | 31,4 | 0,45 |
| Etanol ekstresi | 140 | 1,01 |

4.1.11. Toplam flavonoid miktarı tayini bulguları

Şekil 4.19'da açık yapısı verilen ve birçok çalışmada standart antioksidan olarak kullanılan kuersetin (Büyükokuroğlu *et al.* 2001; Gülçin, 2002; Gülçin *et al.* 2004c)

çalışmamızda da standart flavonoit olarak kullanıldı (Türkoğlu *et al.* 2006). Flavonoidler iki fenil halaksının propan zinciri ile birleşmesinden meydana gelen difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir.

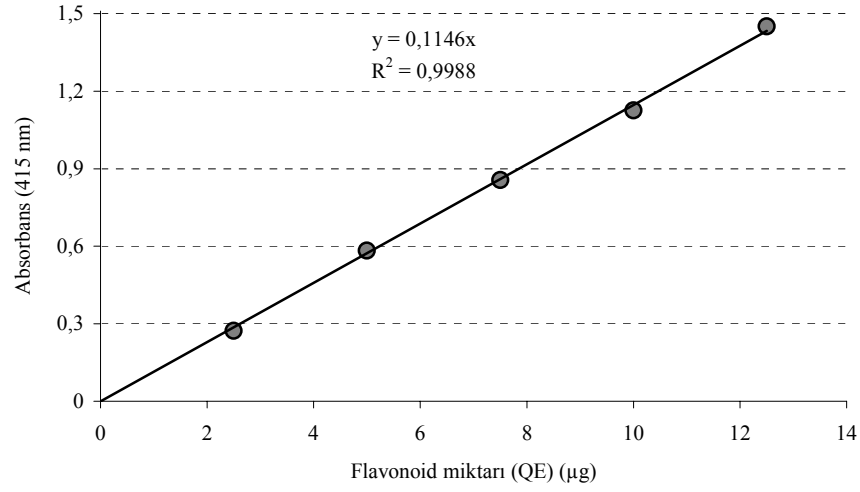


Şekil 4.19. Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kuersetinin açık yapısı

Flavonoidler antioksidan özelliğe sahip olup, koroner kalp hastalıkları gibi birçok hastalığı önleyen önemli bir doğal bileşik gurubudur. Bitkilerden elde edilen flavonoidlerin UV ışınlarını absorblayan özellikleri ve antioksidan aktivitelerinden dolayı kanser tedavisinde kemoprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Hertog *et al.* 1995). Ayrıca flavonoidlerin lösemi (Larocca *et al.* 1990; Hirano *et al.* 1994) ve yumurtalık kanseri (Benavente-Garcia *et al.* 1997) gibi kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoid miktarı için öncelikle kuersetin kullanılarak bir standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla her iki ekstrada bulunan toplam flavonoid miktarı kuersetin ekivalent (QE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9989). Bu amaçla hazırlanan standart galik asit grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir.

$$\text{Absorbans} = 0.1146 \times [\text{Flavonoid}]$$



Şekil 4.20. Toplam flavonoid miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği

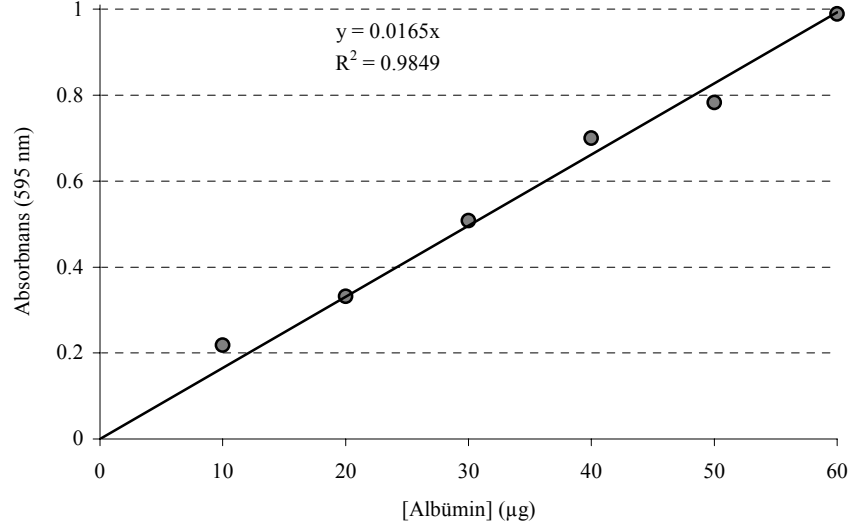
Toplam flavonoid miktarı tayininde karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen 1 mg su ve etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoid miktarı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen 1 mg su ve etanol ekstralarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarı sırasıyla 0,45 µg ve 1,01 µg QE olarak bulundu.

4.2. Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.2.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Saflaştırma basamaklarında elde edilen enzim çözeltilerindeki protein miktarları kantitatif olarak Bradford yöntemiyle tayin edildi (1976). Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve kromatografik işlemlerden sonra elde edilen enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak hesaplandı. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.21’de gösterilen standart grafikten elde edilen aşağıdaki denklemden yerine konularak bulundu (r^2 : 0,9849).

$$\text{Absorbans}_{(\lambda 595)} = 0,0165 \times \text{Protein } (\mu\text{g})$$



Şekil 4.21. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayininde kullanılan standart protein grafiği

4.2.2. Peroksidaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz saflaştırma bulguları

Çalışmada kullanılan karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) izole edilen peroksidaz enziminin çöktüğü amonyum sülfat doygunluğunu belirlemek için sırasıyla %0–10, %10–20, %20–30, %30–40, %40–50, %50–60, %60–70, %70–80 ve %80–90 doygunluklarında çöktürme yapıldı. Peroksidaz enziminin %30–90 amonyum sülfat doygunluğu aralığında tamamına yakınının çöktüğü belirlendi. Her bir çöktürme basamağında elde edilen çökelek, çözünebileceği minimum hacimde (2 ml) ilgili enzimin homojenat tamponu olan 0,1 M'lık fosfat tamponunda çözüldü. Hem çökeleklere ve hem de süpernatantlarda enzim aktivitesine ayrı ayrı bakıldı. Böylece

enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığı belirlendi. Bulgular Çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) izole edilen peroksidaz enziminin amonyum sülfatla çöktürmede doygunluk noktası tayini

| (NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürme Aralığı | Çökelek | | | Süpernatant | | |
|--|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| | Toplam Hacim (ml) | Enzim (EU/ml.dak) | Toplam Aktivite | Toplam Hacim (ml) | Enzim (EU/ml.dak) | Toplam Aktivite |
| Homojenat | - | - | - | 50 | 464 | 23200 |
| %0-10 | 2 | 148 | 296 | 45 | 549 | 24705 |
| %10-20 | 2 | 206 | 412 | 45 | 738 | 33210 |
| %20-30 | 2 | 182 | 364 | 44 | 595 | 26180 |
| %30-40 | 2 | 1281 | 2562 | 44 | 651 | 28644 |
| %40-50 | 2 | 2048 | 4096 | 44 | 930 | 40920 |
| %50-60 | 2 | 1904 | 3808 | 43 | 588 | 25284 |
| %60-70 | 2 | 2073 | 4146 | 43 | 290 | 12470 |
| %70-80 | 2 | 2533 | 5066 | 42 | 166 | 6972 |
| %80-90 | 2 | 1801 | 3602 | 40 | 83 | 3320 |

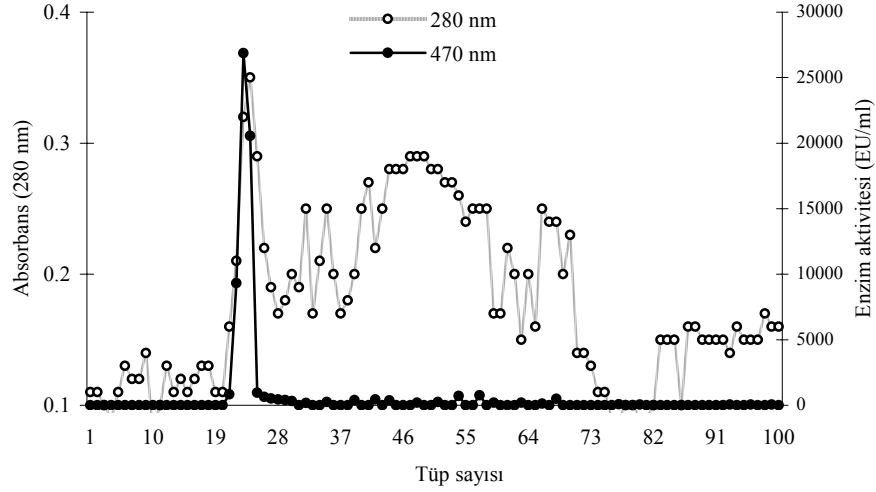
Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz edilmesi sonucu enzim saflaştırılırken her basamakta elde edilen enzim çözeltisinin Bradford metoduna göre kantitatif protein tayini için 595 nm’de absorbansı ve enzim aktivitesi tayini için de her substrat için ilgili dalga boyunda aktivite tayinleri yapıldı. Bulgular, saflaştırma basamakları ve saflaştırma oranları olarak Çizelge 4.3’te verilmiştir.

4.2.3. Peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırma bulguları

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırması esnasında elüsyon yapılırken tüplerde bulunan protein akışı 280 nm’de absorbans ölçümü ile kontrol edildi. Enzim aktivite ölçümleri ise 470 nm’de guaiakol substratı ile yapıldı. CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ile saflaştırması esnasında elde edilen eluatların 280 nm’deki absorbans değerleri ile 470 nm’deki enzim aktiviteleri kaydedildi. Enzim amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyalizden sonra CM-Sefadeks ile saflaştırılma ve Sefadeks G-25 ile derişikleştirme saflaştırma basamaklarının her birinde elde edilen enzim çözeltisinin kantitatif protein tayini için 595 nm’de absorbansı ve enzim aktivitesi tayini için de 470 nm’de aktivite tayinleri yapıldı. Bulgular ve saflaştırma basamakları ile saflaştırma oranları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin saflaştırılma basamakları ve saflaştırma oranı

| Saflaştırma Basamakları | Toplam Hacim (ml) | Aktivite (EU/ml.dak) | Toplam Aktivite (EU/ml.dak) | Protein Miktarı (mg/ml) | Toplam Protein Miktarı (mg) | Spesifik Aktivite (EU/mg) | Verim (%) | Saflaştırma oranı |
|--|-------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|-------------------|
| Homojenat | 100 | 21960 | 2196000 | 0,909 | 90,9 | 24158,4 | 100 | 1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi | 12 | 69560 | 834720 | 2,121 | 25,452 | 32795,9 | 28 | 1,358 |
| Diyaliz | 12,4 | 59440 | 737056 | 1,393 | 17,2 | 42670,5 | 19 | 1,766 |
| CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi | 20 | 22800 | 456000 | 0,097 | 1,94 | 235051,6 | 2 | 9,7 |
| Sefadeks-G-25 | 2,5 | 38760 | 96900 | 0,083 | 0,2 | 466987,9 | 0,2 | 19,33 |



Şekil 4.22. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırma çalışmalarında elüsyon sonucu elde edilen elüatların 280 nm'deki absorbanslarına karşılık çizilen enzim aktivite grafiği

4.2.4. Enzimin Sefadeks G–25 ile muamele edilmesi ile ilgili çalışma bulguları

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin Sefadeks G–25 ile derişikleştirilmesi ve saflaştırılması ile ilgili çalışmalarda iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen enzim çözeltilisi kullanıldı. Enzim çözeltilisinin kütlesi ölçülerek onda bir oranında Sefadeks G–25 ile karıştırıldı ve 10 dakika kadar bekletildikten sonra 1000xg de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatanda aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapılarak bulgular Çizelge 4.2'de verildi.

4.2.5. Enzimin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi ile ilgili çalışma bulguları

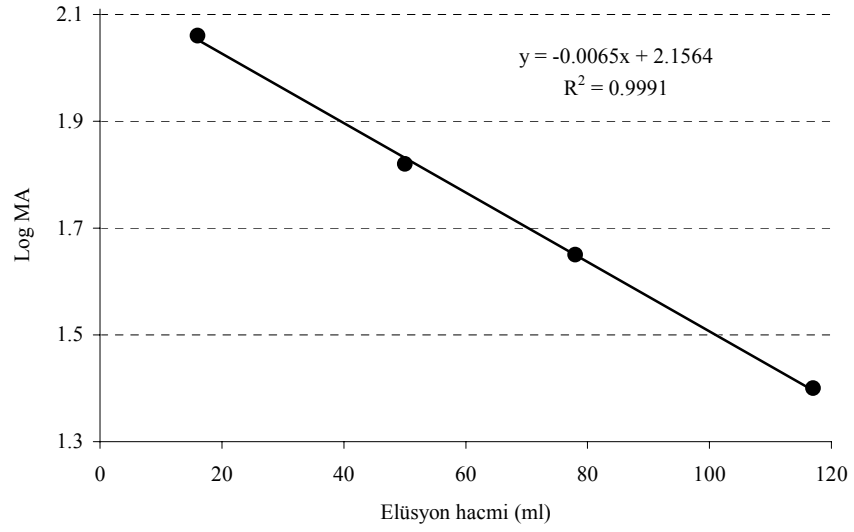
Peroksidaz enziminin izo enzimlerine ayrılmasına yönelik çalışmaların bulguları Şekil 4.23'de verildi. Şekil 4.23'de görüldüğü gibi guaiakol substratı içersine batırılan jelde tek protein bandı görülmektedir.



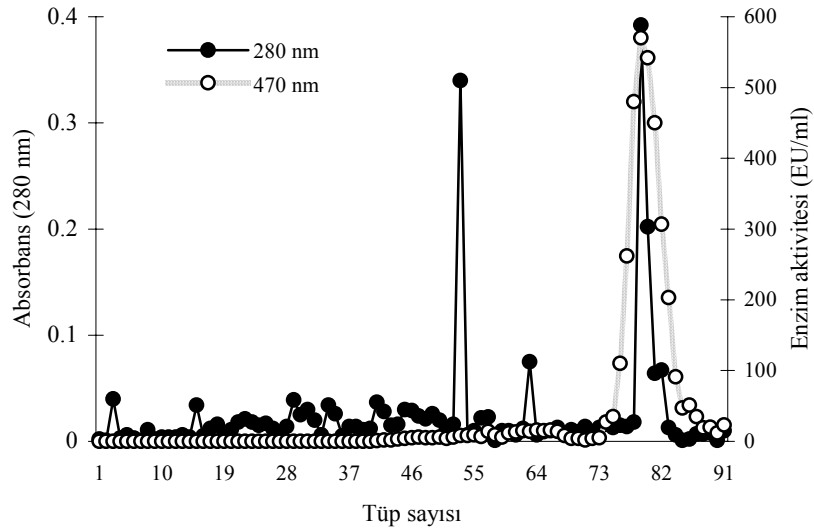
Şekil 4.23. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin izo enzimlerinin belirlemek amacı ile elde edilen doğal poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı

4.2.6. Enzimlerin molekül kütlelerinin belirlenmesi ile ilgili çalışma bulguları

Enzimin doğal halinin molekül kütlelerini bulmak amacı ile jel filtrasyon kromatografisi Bölüm 3.4.8’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Öncelikle kolondan standart proteinler geçirildi ve $\log M_A - K_{av}$ grafiği çizildi (Şekil 4.24). Daha sonra peroksidaz enzim çözeltisi kolondan geçirildi. Bu işlemler sırasında standart proteinlere ait elüatların 280 nm’deki absorbanları ve peroksidaz enzim çözeltisine ait elüatların aktiviteleri belirlendi. Bulgular Şekil 4.6’da verildi. Standart grafiğe (Şekil 4.24) göre enzimin doğal halinin molekül kütlesi 44 kDa’dur.



Şekil 4.24. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlesinin belirlemek amacıyla kullanılan standart proteinlerin Kav değerlerine karşılık çizilen Log M_A grafiği



Şekil 4.25. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlesinin belirlemek amacıyla elde edilen eluatların protein akışını gözlemek için 280 nm'deki absorbanları ile 470 nm'deki enzim aktiviteleri

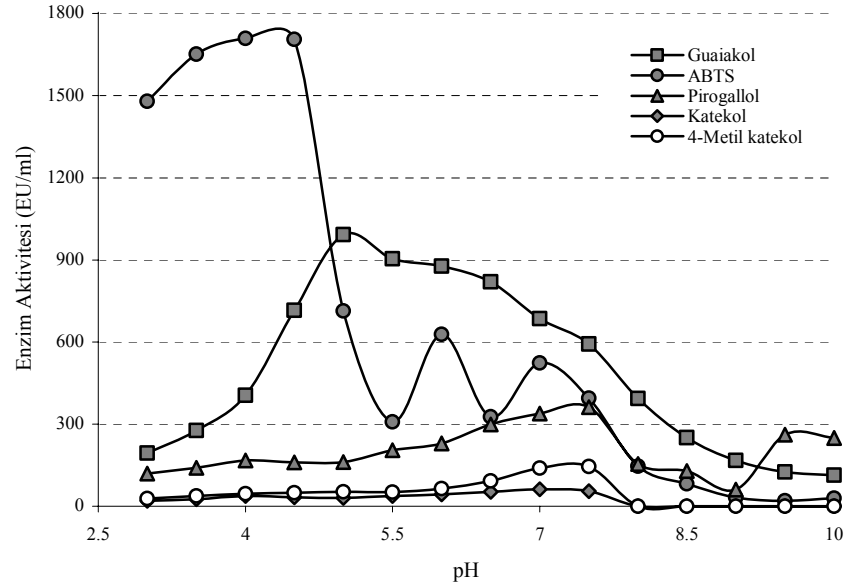
Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütesinin belirlemek amacıyla öncelikle kolondan standart proteinlerin geçirilmesi ile bir standart grafik elde edildi. Bu grafikten elde edilen aşağıdaki denklemden enzimin molekül kütesi tespit edildi

$$\text{Log } M_A = -0.0065 \times K_{av} + 2.1564$$

Jel filtrasyon kromatografisiyle elüe edilen enzimin elüsyon hacmi yukarıda verilen denklemden yerine konulduğunda karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan peroksidaz enziminin molekül kütesi 44 kDa olarak bulundu.

4.2.7. Peroksidaz enziminin optimum pH çalışması bulguları

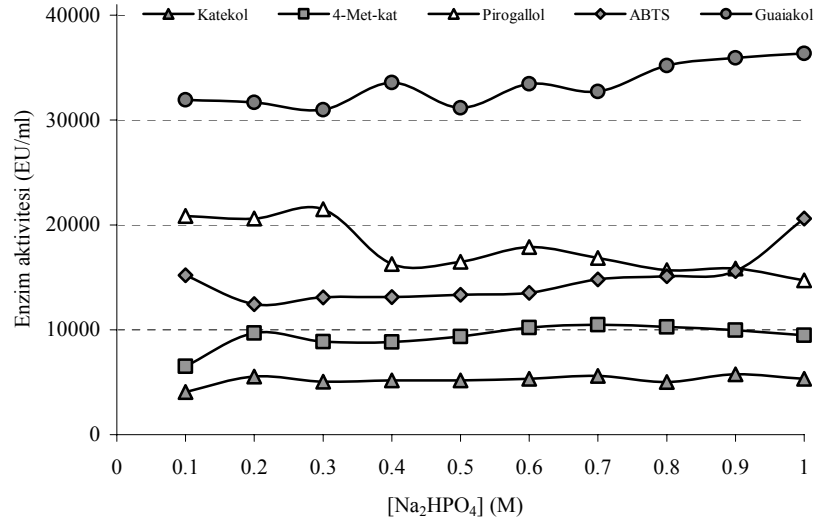
Optimum pH için pH 3'ten 9'a kadar on üç farklı pH ortamında çalışıldı. pH 3'ten 4,5'e kadar asetat, pH 5'ten 7,5'e kadar fosfat ve pH 8'den 9'a kadar da Tris / HCl tamponları kullanıldı. H₂O₂ substratı her ölçümde kullanılmakla beraber ikinci substrat olarak guaiakol, ABTS, pirogalol, katekol ve 4-metil katekol substratları ayrı ayrı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Bulgular Şekil 4.26'da görüldüğü gibi optimum pH değerleri sırasıyla guaiakol için 5 (fosfat tamponu), ABTS için 4 (asetat tamponu), pirogalol için 7,5 (fosfat tamponu), katekol için 7 (fosfat tamponu) ve 4-metil katekol için 7,5 (fosfat tamponu) olarak bulundu.



Şekil 4.26. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin pH 3,0'ten 9,0'a kadar üç farklı tamponda ve on üç farklı pH'da elde edilen pH-Aktivite grafiği

4.2.8 Peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonu çalışması bulguları

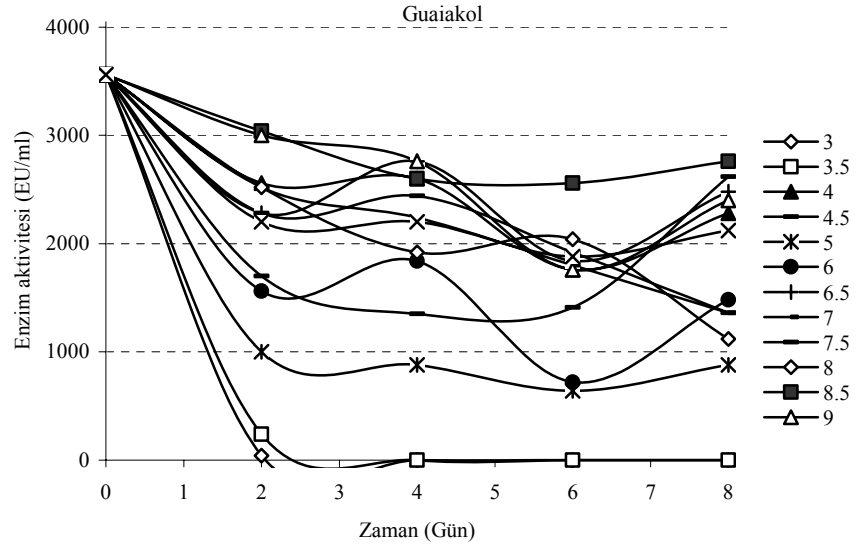
Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 0,1 M'dan 1 M'a kadar on farklı Na_2HPO_4 konsantrasyonda her bir substrat için ayrı ayrı çalışıldı. H_2O_2 substratı her ölçümde kullanılmakla beraber ikinci substrat olarak guaiakol, ABTS, pirogallol, katekol ve 4-metil katekol substratları ayrı ayrı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı ve enzimin her bir substrat için uygun optimum tuz konsantrasyonu belirlendi. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi tuz konsantrasyonunun etkisi çok fazla olmamakla beraber, en uygun tuz konsantrasyonu guaiakol ve ABTS substratları için 1 M, pirogallol substratı için 0,3 M, katekol ve 4-metil katekol substratları için ise 0,7 M olarak bulundu.



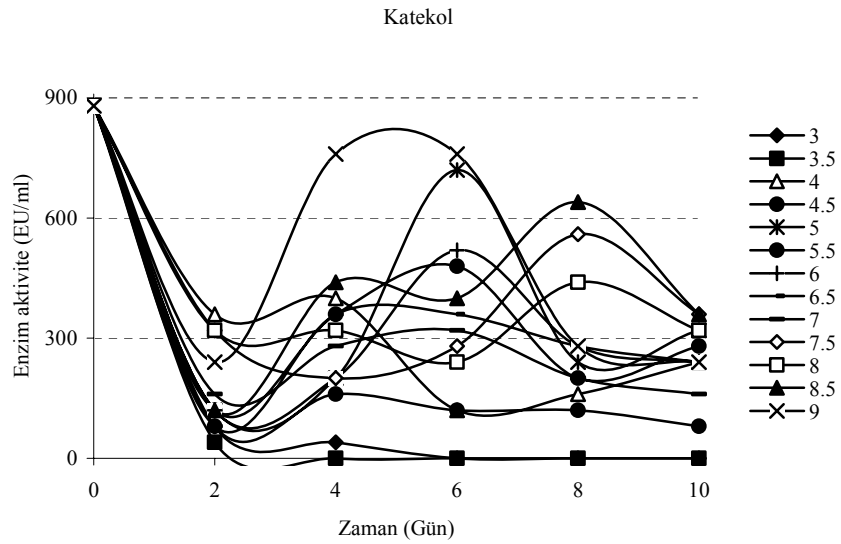
Şekil 4.27.Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonu belirlemek amacıyla elde edilen Enzim Aktivitesi-[Na₂HPO₄] grafiği

4.2.9. Peroksidaz enziminin stabil pH çalışması bulguları

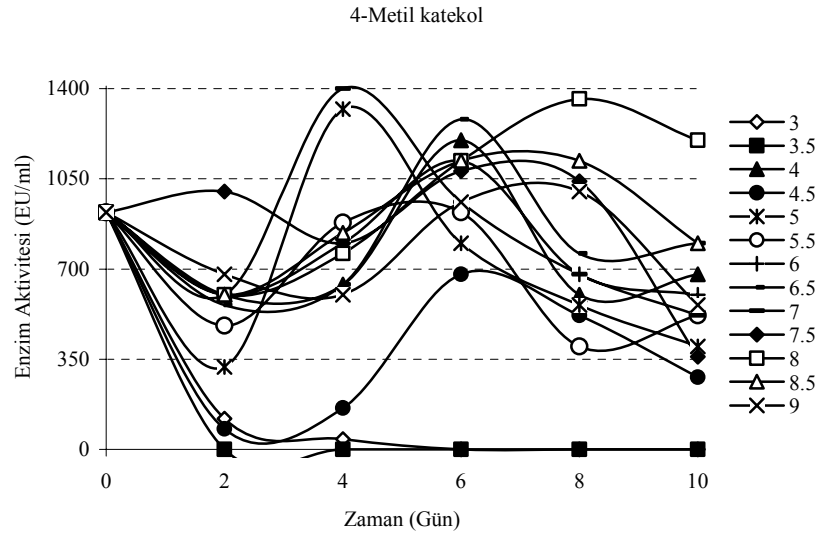
Peroksidaz enzimi dört farklı pH'da (3,0–4,5) asetat tamponu ile altı farklı pH'da (5,0–7,5) fosfat tamponu ile ve üç farklı pH'da (8,0–9,0) Tris/HCl tamponu ile on gün boyunca +4°C'de inkübe edildi ve iki günde bir periyodik aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı ve bulgular Şekil 4.28-4.32'de verildi. Grafiklerden de görülebileceği gibi peroksidaz enziminin stabil pH'sı guaiakol için 8,5 (fosfat tamponu), ABTS için 6 (fosfat tamponu), pirogallol için 7,5 (fosfat tamponu), katekol için 7 (fosfat tamponu) ve 4-metil katekol için 8,5 (Tris/HCl tamponu) olarak bulundu.



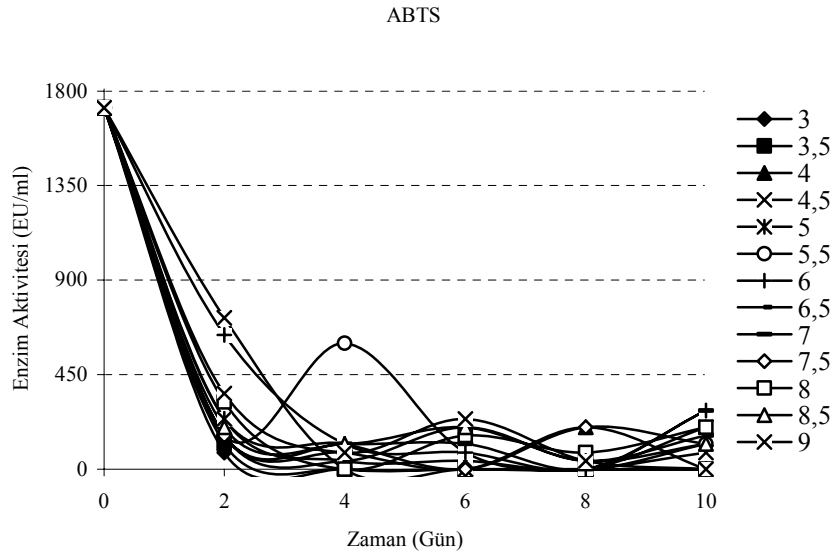
Şekil 4.28. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre beklendikten sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları



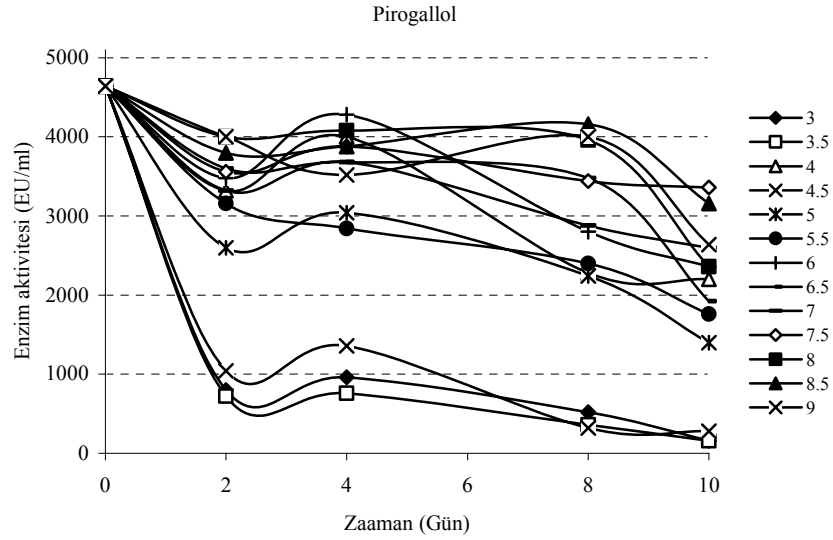
Şekil 4.29. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre beklendikten sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları



Şekil 4.30. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları



Şekil 4.31. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları

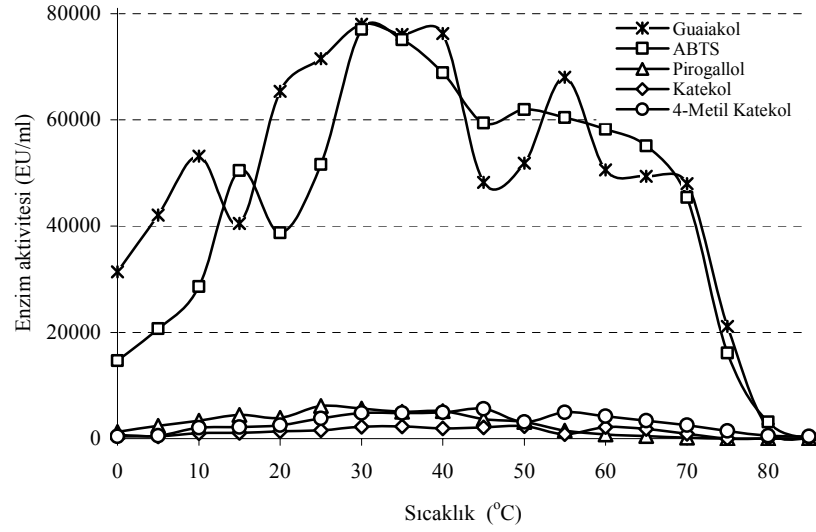


Şekil 4.32. Karnabahardan (*Brassica oleracea L.*) elde edilen peroksidaz enziminin pirogalol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için on iki farklı pH'da belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları

Bu bulgulara göre enzimin stabil pH'sı ile ilgili yapılan çalışmalarda en uygun substrat guaiakol, en uygun tampon Tris/HCl tamponu ve en uygun pH ise 8,5 olarak belirlendi.

4.2.10. Peroksidaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışması bulguları

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla enzimin 22,5 mM'lık H_2O_2 ve 45 mM'lık guaiakol substratları için maksimum aktivite gösterdiği pH 5'de, ABTS substratı için maksimum aktivite gösterdiği pH 4'de, pirogalol substratı için maksimum aktivite gösterdiği pH 7,5'de, katekol substratı için maksimum aktivite gösterdiği pH 7'de, 4-metil katekol substratı için maksimum aktivite gösterdiği pH 7,5'de çalışıldı. Bu pH'larda 0-100°C arasında ve her 5°C'de bir aktivite ölçümü yapıldı ve bulgular Şekil 4.33'de verildi.

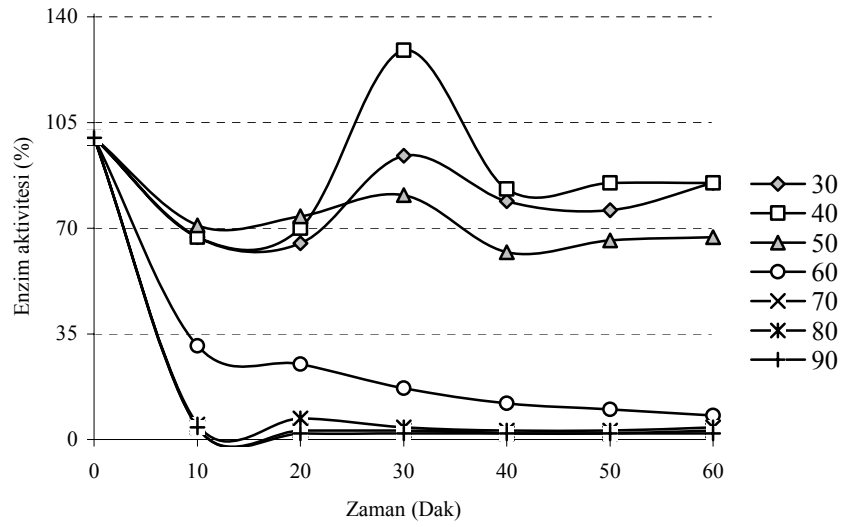


Şekil 4.33.Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol, ABTS, pirogalol, katekol ve 4-metil katekol substratları ile elde edilen sıcaklık-aktivite grafiği.

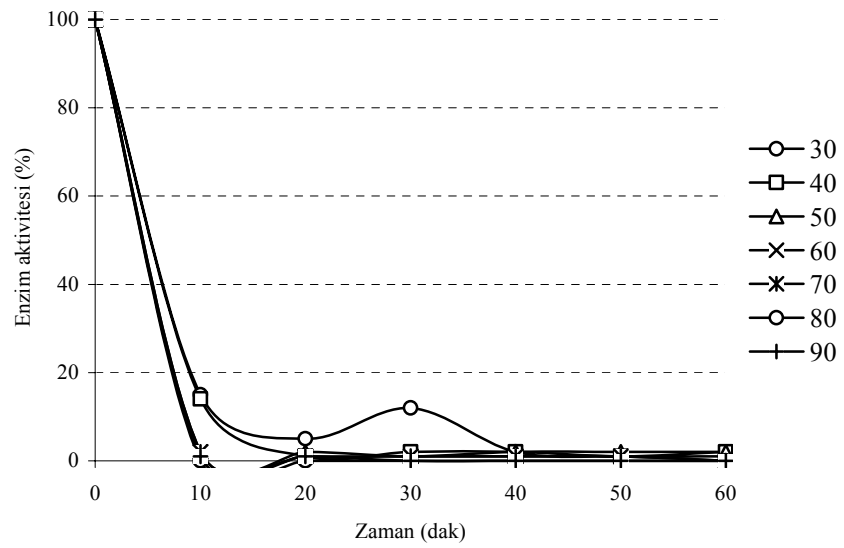
Bu bulgulara göre peroksidaz enzimi optimum sıcaklığı guaiakol ve ABTS substratları için 30°C, pirogalol substratı için 25°C, katekol substratı için 50°C ve 4-metil katekol substratı için ise 45°C olarak belirlendi.

4.2.11. Peroksidaz enziminin termal stabilizasyon çalışmaları ile ilgili bulgular

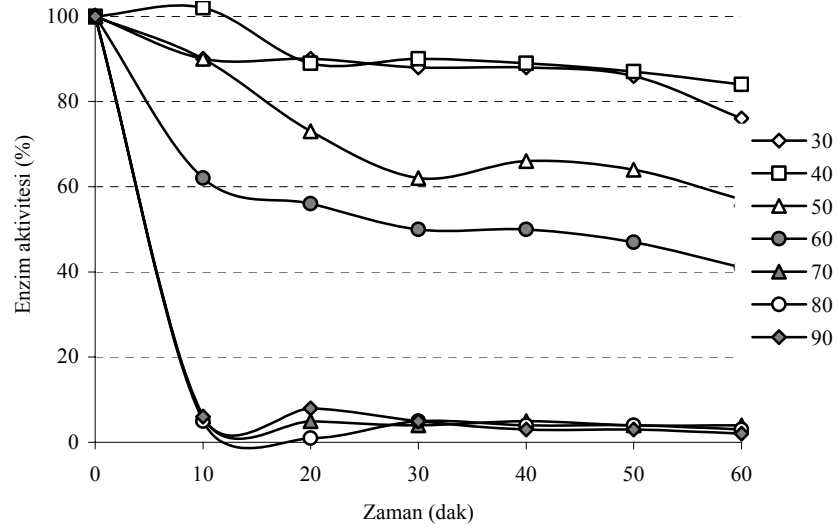
Peroksidaz enziminin termal stabilizasyonu ilgili çalışmalarda enzimin her bir substrat için optimum pH'sında ve 30-90°C aralığında yedi farklı sıcaklıkta ve bir saat boyunca her on dakikada bir aktivite ölçümü yapılarak gerçekleştirildi. Bulgular grafik olarak Şekil 4.34–4.38'de verildi.



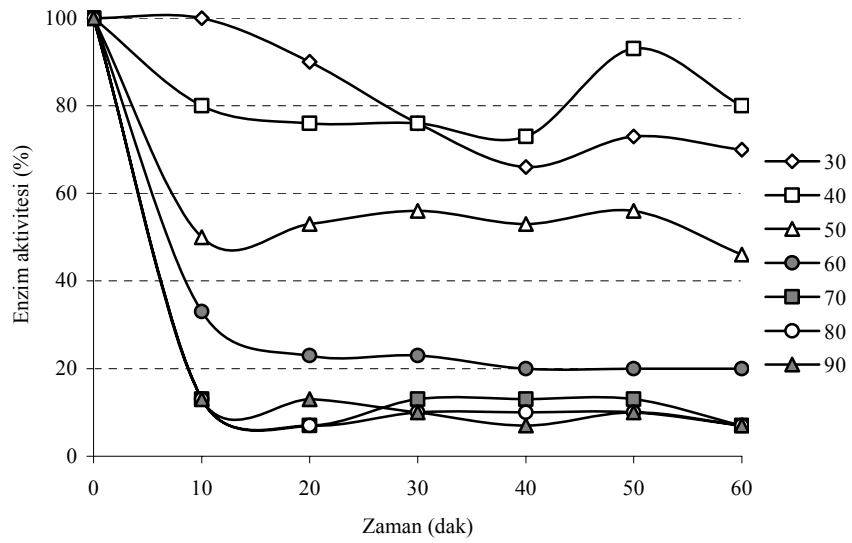
Şekil 4.34. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği



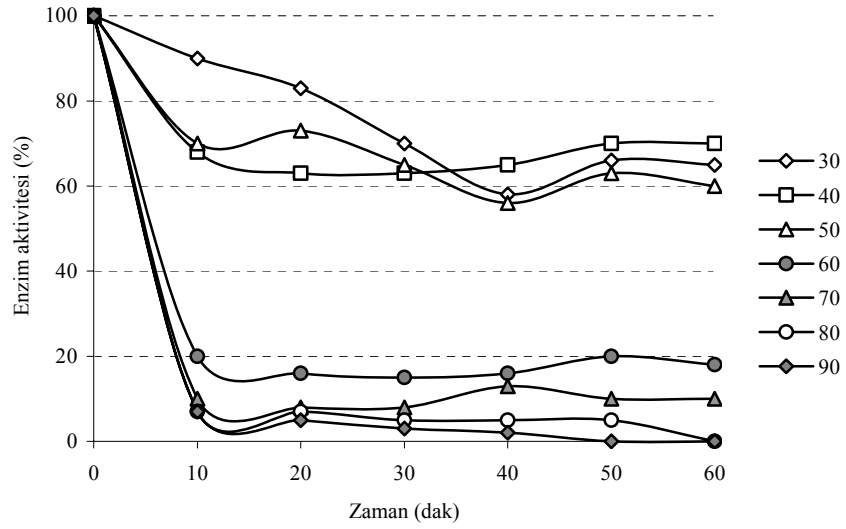
Şekil 4.35. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği



Şekil 4.36. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin pirogalol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği



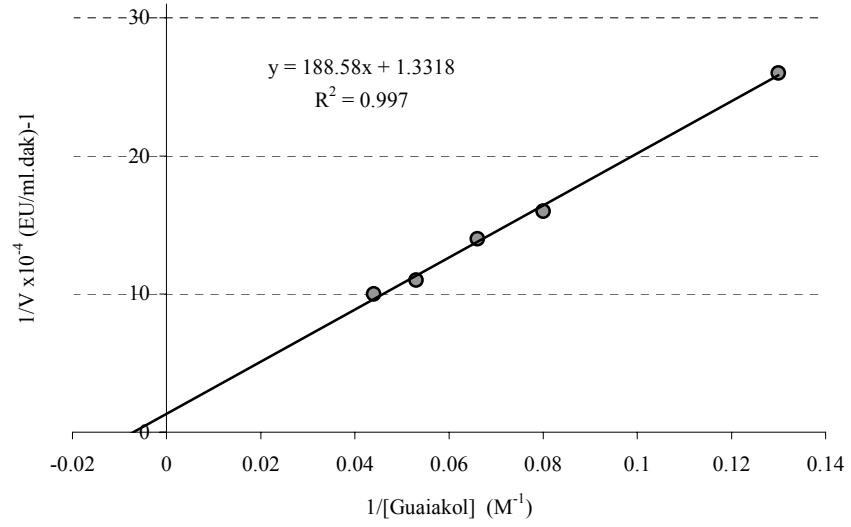
Şekil 4.37. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği



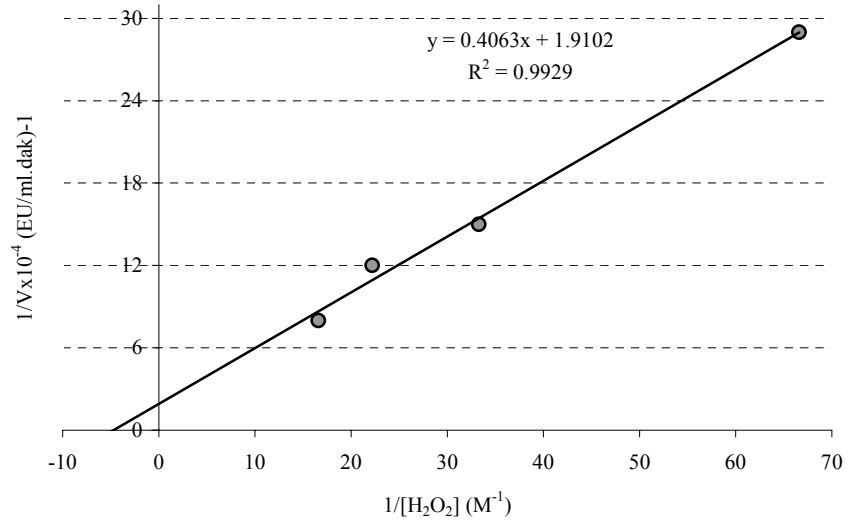
Şekil 4.38. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile yapılan termal stabilizasyon grafiği

4.2.12. Peroksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili bulgular

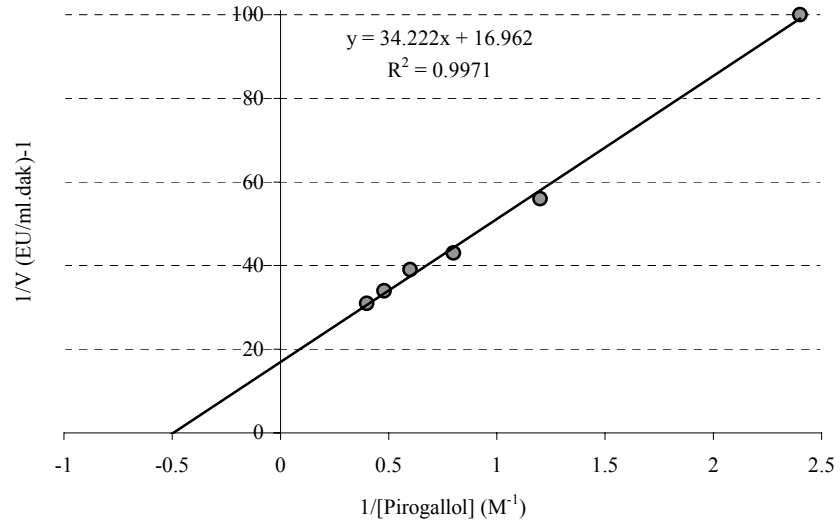
Peroksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar 22,5 mM'lık H_2O_2 ve 5 mM'lık guaiakol, 5 mM'lık pirogalol, 5 mM'lık ABTS, 5 mM'lık katekol ve 5 mM'lık 4-metil katekol substratları ile yapıldı. Bunun için önce peroksidaz enzimi ile guaiakol, pirogalol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol substratlarının konsantrasyonları sabit tutularak, H_2O_2 için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri yapıldı ve Lineveawer-Burk grafikleri belirlendi. Daha sonra peroksidaz enzimi ile H_2O_2 substratının konsantrasyonları sabit tutularak guaiakol, pirogalol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol substratları için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri yapıldı ve grafikler çizilerek Şekil 4.39–4.48'de verildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı ve bulgular Çizelge 4.4'de verildi.



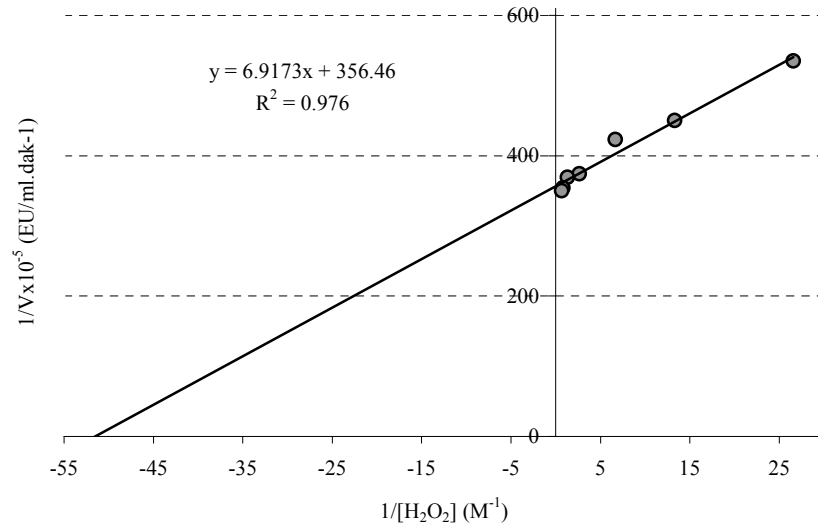
Şekil 4.39.Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.



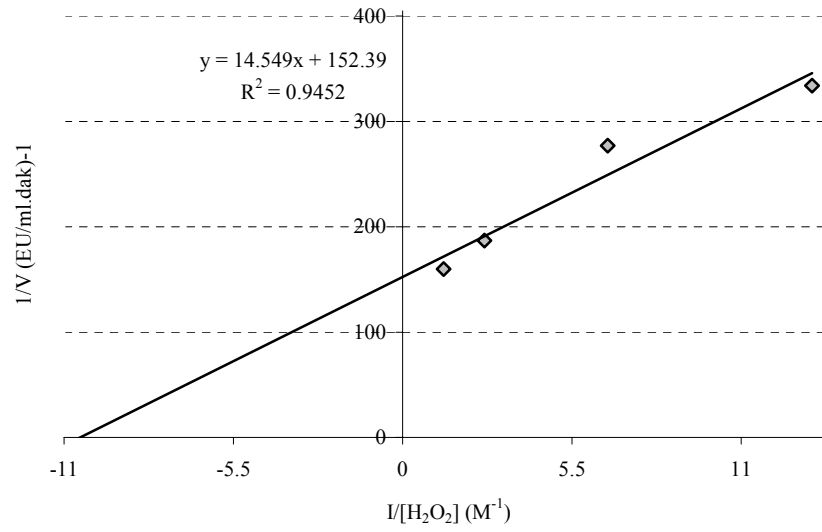
Şekil 4.40.Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



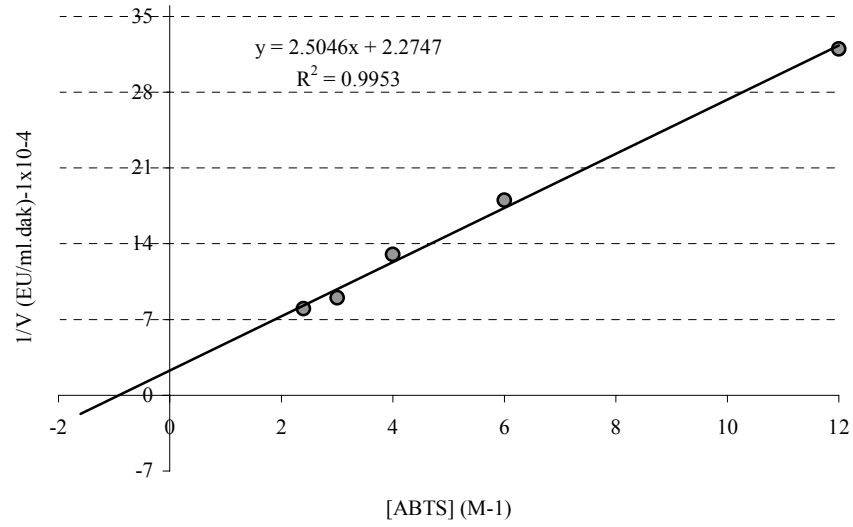
Şekil 4.41.Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı pirogalol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



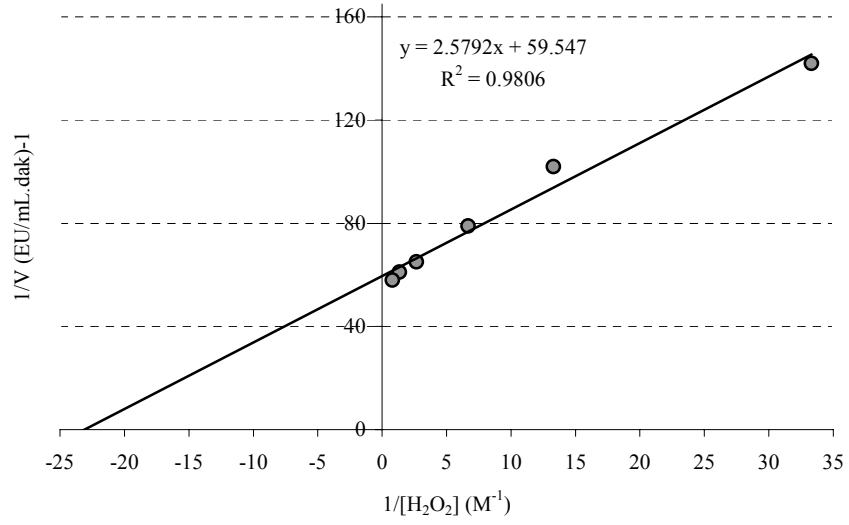
Şekil 4.42.Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin pirogalol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



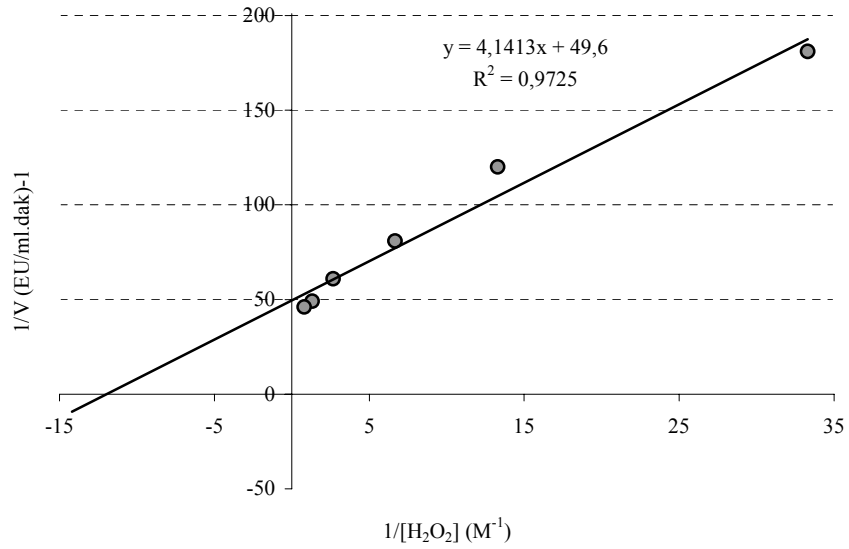
Şekil 4.43. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.



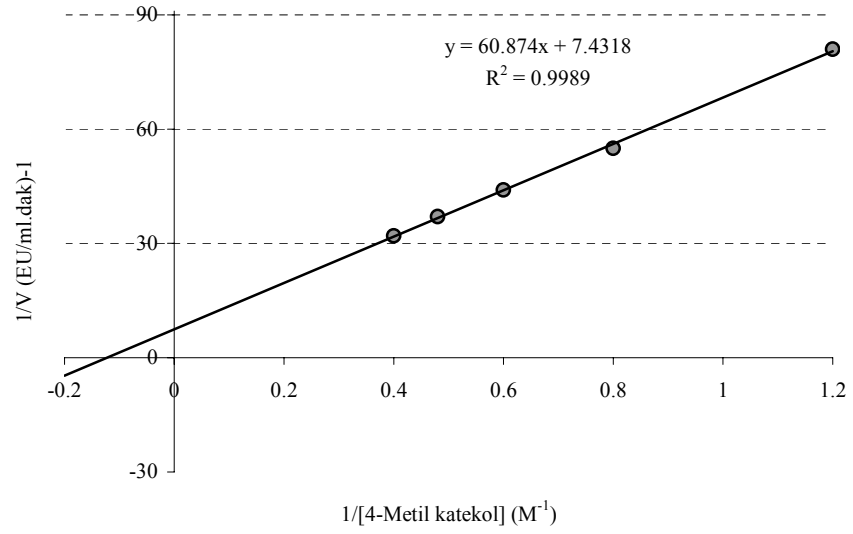
Şekil 4.44. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



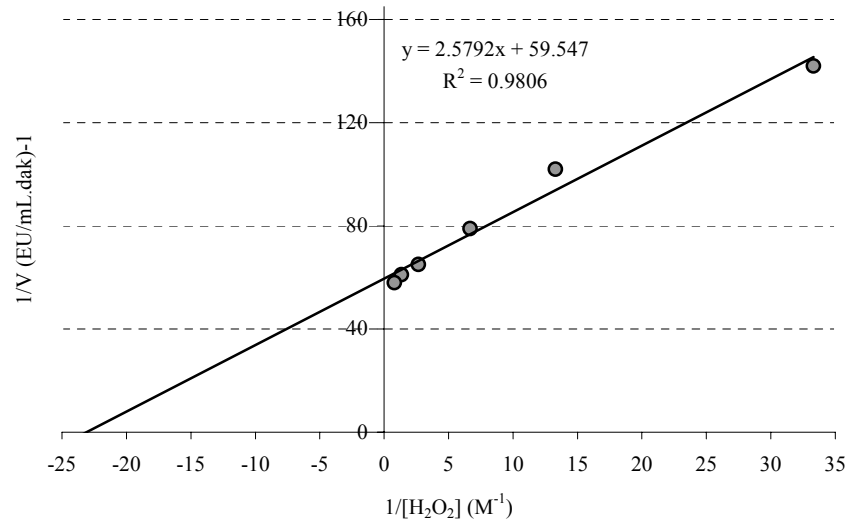
Şekil 4.45. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.46. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.47. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.48. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.4. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) izole edilen peroksidaz enziminin substrat spesifitesi ile ilgili toplu bulgular

| Substrat | Optimum pH | Optimum Sıcaklık (°C) | K _m (mM) | V _{max} (EU/ml.dak) |
|-----------------|------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|
| Guaiakol | 5 | 30 | 141,64 | 7500 |
| ABTS | 4 | 30 | 1,1 | 4400 |
| Pirogalol | 7,5 | 25 | 2.01 | 590 |
| Katekol | 7 | 50 | 3,41 | 300 |
| 4-Metil katekol | 7,5 | 45 | 8,19 | 1340 |

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut çalışmada karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan aktivite, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, Kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) küpröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitesi, ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi, serbest olmayan bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit giderme aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺⁺ giderme aktivitesi, DMPD⁺⁺ giderme aktivitesi ile riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi. Kullanılan antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan aktiviteler kozmetik ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan α -tokoferol ve onun da suda çözünen bir analogu olan troloks ile kıyaslamaları yapıldı. Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Kronik hastalıkların, DNA hasarlarının, mutasyonların, karsinogenezin azaltılması, patojenik bakteriyel gelişiminin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde serbest radiakal gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir (Zhu *et al.* 2002).

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının çalışılan konsantrasyonlarda (10–30 μ g/ml), artan konsantrasyon ile beraber toplam antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamada, DPPH, ABTS ve DMPD radikal giderme aktivitelerinde de artış görülmüştür. Bunun yanı sıra süperoksit anyon radikallerini giderme, serbest olmayan bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit giderme aktivitelerinde ise konsantrasyona bağlı olarak herhangi bir artış gözlenmedi.

Antioksidan ve antiradikal çalışmaların mukayesesinde α -tokoferol ve troloks gibi standart maddeler kullanıldı. Bazı antioksidan analizlerde karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının aktivitesinin kullanılan standartların aynı konsantrasyonlardaki aktivitelerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının toplam antioksidan özellikleri ile indirgeme kapasiteleri arasında korelasyonun olduğu görülmektedir. Fenolik bileşikler özellikle flavonoidler hidroksil guruplarında bulunan hidrojenlerini kolaylıkla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalının rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir.

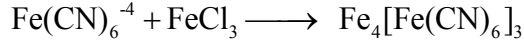
Lipit peroksidasyonu, gıda maddelerinin işlenmesinde ve muhafazasında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Yağlarda ve yağlı yiyeceklerde sadece yiyecekleri bozmakla kalmaz, aynı zamanda kansere, mutasyonlara ve yaşlanmaya sebep olan peroksi (ROO•) ve hidroksi (OH•) radikalleri ile reaktif oksijen türleri ve serbest radikalleri de meydana getirir (Yagi 1987). Lipitlerin oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur. Çoklu doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre hidrojen koparmasıyla oluşan radikalın çift bağın konjugasyonu ile kararlı hale getirmesi ve böylece de hidrojenin daha kolay koparılmasına sebep olmasından dolayı, otooksidasyona daha yatkındırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Bitkilerden elde edilen ekstre veya onlardan saflaştırılmış maddelerin toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için birçok metot mevcuttur (Miller *et al.* 1996). Ferrik tiyosiyanat metoduna göre toplam antioksidan kapasite biyoaktif bileşenleri için en çok kullanılan parametreden biridir. Ferrik tiyosiyonat metodu, lipit peroksidasyonu boyunca meydana gelen peroksidin miktarını ölçer. Bu analizde, hava oksijeni tarafından oksitlenen ve emülsiyonda linoleik asidin peroksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksitler dolaylı olarak ölçülür. Bu metodun esası, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan hidroperoksidin spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülmesine dayanır. Yüksek absorban, peroksidasyon sonucu oluşan peroksid miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan hidroperoksit ise Fe²⁺'yi Fe³⁺'e yükseltir. Daha sonra Fe³⁺, ilave edilen amonyum tiyosiyanat ile kompleks oluşturularak 500 nm'de maksimum absorban verir. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen su ve etanol ekstraları 30 µg/ml konsantrasyonunda linoleik asit emülsiyonu peroksidasyonunu sırasıyla %63,1 ve

%77,4 inhibe ederken aynı konsantrasyonda α -tokoferol ve troloks linoleik asit peroksidasyonunu sırasıyla %81,3 ve %68,1 inhibe ettikleri gözlenmiştir.

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstralarının toplam antioksidan aktivitesinde olduğu gibi indirgeme kapasitesinde de artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi. İlk bakışta oksidasyonun indirgeme gücü yüksek olan ekstrallerce daha kuvvetli bir şekilde bastırılacağı düşünülebilir. İndirgeme gücü bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir faktördür (Meir *et al.* 1995). Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden gidebilir. Örneğin, oksidasyonun geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir. Ama bileşiğin sadece metal şelatlama özelliğinin olması bile böyle bir sistemde oksidasyonu durduracak veya hızını yavaşlatacaktır. Enzimatik sistemlerde katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin antioksidan özelliği, onların indirgeme güçlerinden veya fenolik bileşik içeriklerinden değil, hidrojen peroksiti uzaklaştırabilme özelliklerinden kaynaklanır (Halliwell and Gutteridge 1989). Oksidasyonun singlet oksijen tarafından indüklendiği sistemlerde ise etkili antioksidanlar karotenoitlerde olduğu gibi singlet oksijeni giderebilen bileşiklerdir (Halliwell and Gutteridge 1989). Özetle antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini geçiş metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu engelleme, radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock 1997).

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Arabshahi-Delouee and Urooj 2006). Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgenmesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin ya da ham ekstraktın indirgeme kapasitesi $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+3}$ 'nin $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+2}$ 'ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne Fe^{3+} 'un ilavesi, 700 nm'de güçlü absorbanza sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ oluşumuna yol açar. Absorbansdaki

artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermektedir.



Bu analizde test çözeltisinin sarı rengi, antioksidan örneklerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir (Benzie and Strain 1996). İndirgeme potansiyelini ölçmek için tasarlanmış pek çok sayıda analiz modeli vardır (Wood *et al.* 2006). Mevcut çalışmada ferrik iyonlarını (Fe^{3+}), ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesinin yanısıra kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitesi de araştırıldı.

Kuprak metodu son zamanlarda Apak ve grubu tarafından indirgeme gücü analizi için geliştirilen diğer önemli bir metottur. Bu metot, düşük maliyetli, hızlı ve kararlı bir metottur. Ayrıca indirgeyici ajanın tipine veya hidrofiliğine bakılmaksızın, farklı antioksidanlar için uygulanabilir bir metottur. Kuprak metodu bir kromojenik redoks reaksiyonu olup fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da gerçekleştirilir (pH: 7) (Apak *et al.* 2004). Bu metot, glutasyon gibi tiyol gurubu içeren antioksidanların aktivitelerinin ölçümünde sıklıkla kullanılır (Huang *et al.* 2005).

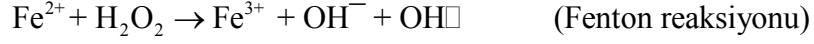
Yapılan çalışmalarda her iki indirgeme metodu arasında bir korelasyon vardır. Her iki metot için kullanılan standartlar her iki ekstreden daha yüksek indirgeme kapasitesi sergilemiştir. Bu bulgular da gösteriyorki her iki ekstrenin antioksidan mekanizması indirgeme kapasitesinden ziyade diğer mekanizmalar üzerinden yürümektedir.

In vivo olarak serbest demir ve bakırın varlığı kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+})

formunda demir ihtiyacı olan hücelere taşınır ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şeklinde ferritin ve hemosiferin proteinlerinde depolanır. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer “demir havuzu” olan ferritin ve hemosiferinde depolanırlar. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmanın bir formda olup, seruplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994). Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde hidroksil radikali oluşur (Chevion *et al.* 1993). Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya lizis olmuş hücelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Bu durum hücre ve dolayısıyla doku hasarını daha da hızlandırır. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalığı, substantia nigra da mevcut hücelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücelerin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır. Böylece Parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır. Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigranın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunun yanısıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol guruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Haugaard 1968; Pacific *et al.* 1991).

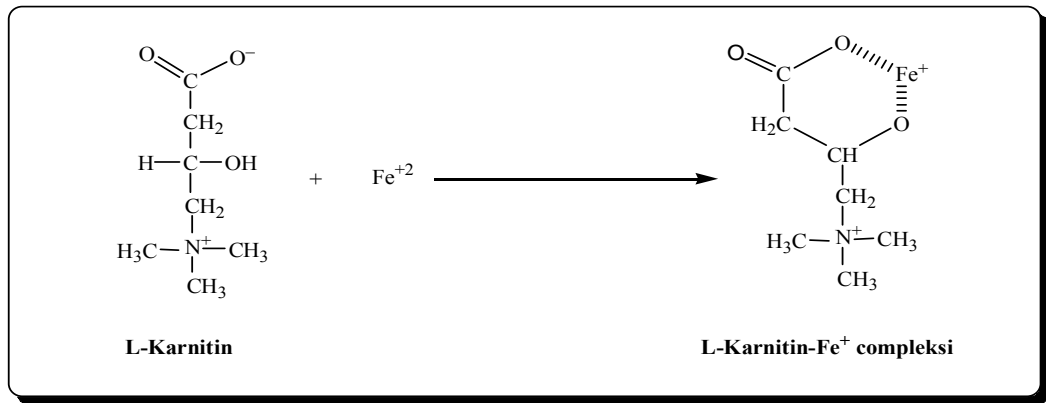
Ferröz (Fe^{+2}) iyonu gibi iyonik türler, organizmada ROS üretimini kolaylaştırdığı için, demir şelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Demir organizmalar için esansiyel bir mineraldir, fakat aşırısı hücre hasarına sebep olabilir. Geçiş metalleri arasında demir yüksek aktivitesinden dolayı lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinir. Metal iyonları arasında, ferröz iyonları (Fe^{2+}), bilinen en önemli prooksidan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar (Fe^{3+}) da meydana gelebilir, fakat ferröz iyonları (Fe^{2+}), ferrik iyonlarından (Fe^{3+}) on kata daha fazla reaktiftirler (Miller 1996). Bu reaksiyonlar

sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH radikalleri de oluşabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1984; Gülçin 2007).



Böylece ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi ferröz iyonları (Fe^{2+}) konsantrasyonlarını minimuma indirme ve dolayısıyla oksidatif hasara sebep olan serbest radikal oluşumu inhibisyonu ile yakından ilgilidir (Gülçin 2007b).

Ferrozin, ferröz iyonları (Fe^{2+}) gibi iki değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorban sergilemektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşumu bloke olur. Dolayısıyla metal şelatlama aktivitesinde 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun bir göstergesidir. Daha önce Gülçin tarafından L-karnitinin antioksidan aktivitesinin araştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada L-karnitinin ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) konsantrasyona bağlı olarak şelatladığı gözlenmiş ve Şekil 5.1'de görüldüğü gibi L-karnitinin ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) arasındaki metal şelatlama mekanizması aydınlatılmıştır (2006c).



Şekil 5.1. L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) arasındaki öne sürülen metal şelatlama mekanizması

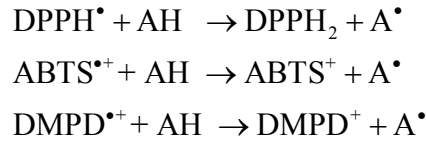
Ayrıca Şekil'3.16 ve 3.18'de görüldüğü gibi karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinin su ve etanol ekstreleri etkili bir şekilde ferröz (Fe^{2+}) iyonlarını şelatlama aktivitesine sahiptir. Her iki ekstre 20 $\mu g/ml$ konsantrasyonda ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) sırasıyla %89,5 ve %88,6 şelatladığı gözlemlendi. EDTA, kuvvetli bir metal şelatlayıcıdır ve mevcut çalışmada standart metal şelatör olarak kullanıldı. Elde edilen verilere bakıldığında her iki ekstre kayda değer bir şekilde ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) bağladığı ve bir peroksidasyon inhibitörü olarak rol oynadığı görülmektedir.

Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit hücre membranında bir uçtan diğer uca difüze olarak birçok bileşiği oksitleyebilir. Hidrojen peroksit çok reaktif değildir, fakat hücrede serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan dolayı zamanla hücre için toksik olabilir. Hücre kültüründe hidrojen peroksit ilavesiyle geçiş metal iyonları varlığında oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksi iyonlarının oluşmasına sebep olur. Birçok hücre tipinde 20–50 mg' ın üzerinde olduğunda toksisiteye sebep olabilir. Bütün bunlardan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerini oksidatif hasardan korumak için bu sistemlerden hidrojen peroksiti uzaklaştırmak oldukça önemlidir. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen her iki ekstre de, kullanılan konsantrasyonda (30 $\mu g/ml$) hidrojen peroksiti sırasıyla %39,4 ve %38,9 giderdiği gözlemlendi. Aynı konsantrasyonda kullanılan α -tokoferol ve troloks ise (%37,7 ve %39,1) benzer aktivite sergiledikleri gözlemlendi.

Antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri, biyolojik sistemlerde, gıda ve farmasötik sanayilerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek açısından oldukça önemlidir. Bu sistemlerde serbest radikaller meydana gelmekte ve dolayısıyla farmasötik ve gıda sanayinde lipid peroksidasyonunu hızlandırmakta ve ürünün kalitesini düşürmektedir (Min 1998). Son zamanlarda sentetik serbest radikallerin giderilmesi ile ilgili birçok metod geliştirilmiştir. Bunların başında DPPH radikal giderme aktivitesi (Gülçin 2006d), ABTS⁺ giderme aktivitesi (Gülçin *et al.* 2006a), DMPD⁺ giderme aktivitesi (Basile *et al.* 2006), PMS–NADH–NBT sistemi (Gülçin 2005), ksantin-ksantin oksidaz sistemi (Nagai *et al.* 2001) ve riboflavin-

metiyonin-ışık sistemi (Zhishen *et al.* 1999) gibi sistemlerde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi radikal giderme metotları kullanılmaktadır. Bu kromojen radikal giderme metotları uygulama kolaylığı, hassaslıkları ve analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği gibi avantajlardan dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Awika *et al.* 2003; Van den Berg *et al.* 2000; Yu *et al.* 2002).

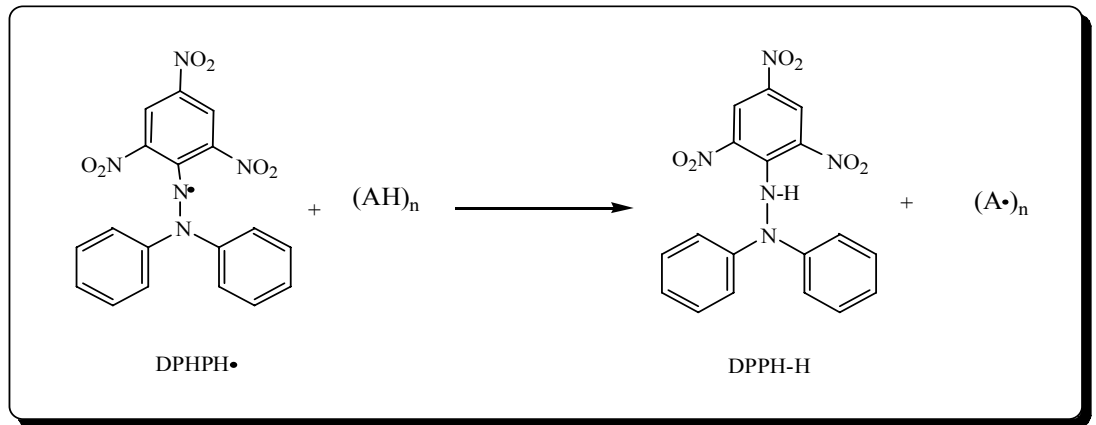
DPPH•, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} radikallerinin kullanımına dayanan metotlar, yiyecek, içecek ve bitkisel ekstraların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılan en popüler spektrofotometrik metotlardır. Ayrıca DPPH•, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} giderme metodları hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı antioksidan ekstre veya bileşiklerin aktivitesini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özçelik *et al.* 2003). Bir antioksidan madde, bu radikal çözeltilerinden birine eklendiğinde; DPPH•, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} oluşumunu tersine çeviren antioksidanların varlığından dolayı bir renksizleşme oluşur.



Menekşe renkli DPPH•, pembe renkli DMPD^{•+} ve yeşil-mavi renkli ABTS^{•+} kromojenlerini kullanmak kolaydır. Bu metotlar yüksek duyarlılığa sahiptir ve aynı zamanda çok sayıda nümunenin analizinde uygundur (Awika *et al.* 2003).

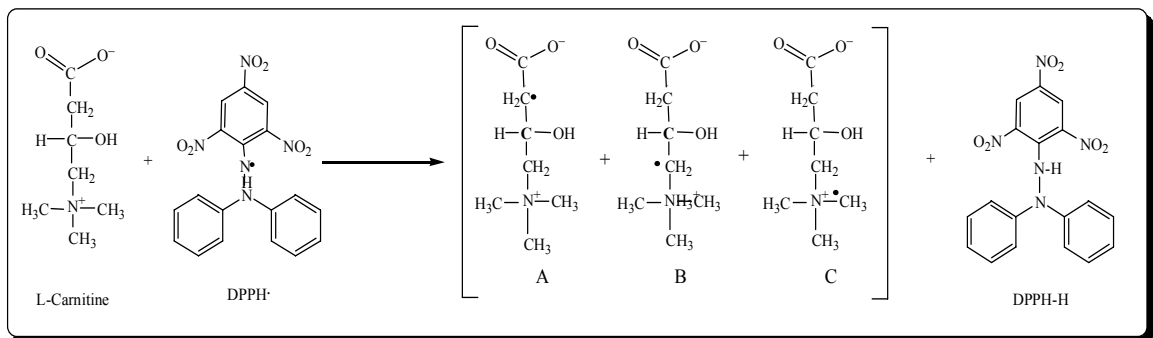
DPPH radikali uzun ömürlü ve azot merkezli bir radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik *et al.* 2003). Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası hidrojen veren guruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi redüksiyon sonucu oluşan, 517 nm'de herhangi bir absorbans vermeyen ve radikal olmayan bir DPPH-H molekülü

oluşmaktadır. Dolayısıyla DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal türlerin $(AH)_n$ varlığında DPPH radikali Şekil 5.2'de belirtildiği gibi indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002).



Şekil 5.2. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi

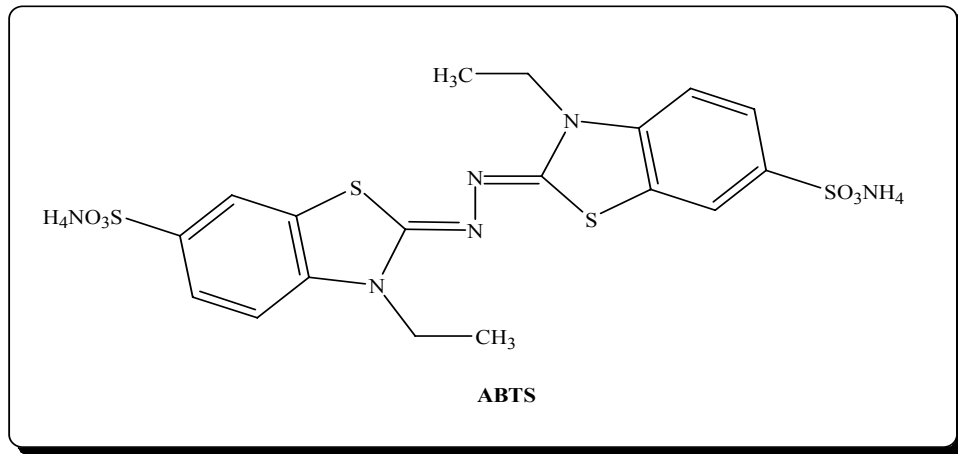
Gülçin tarafından DPPH radikal giderme aktivitesi ile ilgili yapılan mekanistik bir çalışmada L-karnitin ile DPPH radikal giderme aktivitesi arasındaki mekanizma aydınlatılmıştır ve bu mekanizma Şekil 5.3'te özetlenmiştir (Gülçin 2006c).



Şekil 5.3. L-Karnitin ile DPPH radikali arasında öne sürülen radikal giderme mekanizması

L-Karnitinde bulunan karbonil gurubu, α -karbonundaki konjugasyon ile oluşan radikali stabil hale getirir. L-Karnitin molekülünde karboksilat gurubu bir adet karbonil birimine sahiptir. L-Karnitindeki iki nolü karbon atomundan bir hidrojeni kolayca koparılabilir ve bir L-karnitin ara ürün radikali oluşabilir. Koparılan hidrojen tarafından da DPPH radikali söndürülebilir. Teorik olarak enerji hesaplamaları yapıldığında da gerçekten Şekil 3.10'da görüldüğü gibi karnitin ara ürün radikallerinden A'nın oluşumunun daha muhtemel olduğu ve diğer ara ürünlerden daha stabil bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.

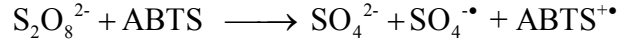
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi $ABTS^{*+}$ giderme aktivitesi de sulu karışım ve içeceklerin ekstralarının veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller *et al.* 1996; Gülçin 2006b). ABTS'nin açık yapısı Şekil 4.12'de görülmektedir.



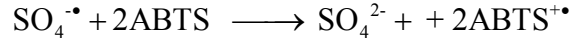
Şekil 5.4. ABTS'nin açık kimyasal yapısı

Bu metotta öncelikle ABTS radikali oluşturmak gerekmektedir. Burada tanımlanan ABTS oluşumu için geliştirilen teknik, ABTS ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon sonucu mavi yeşil ABTS kromoforunun doğrudan oluşumu ve oluşan bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesini içerir. Bu metodun esası oluşturulan $ABTS^{*+}$ katyonunun 734 nm de maksimum absorpsiyon göstermesi esasına dayanır.

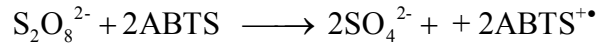
ABTS radikal katyonu farklı oksidan maddelerle hazırlanabilir. Oksidan olarak $K_2S_2O_8$ kullanılabilirdiği gibi Mn_2O_3 'de kullanılabilir. Potasyum persülfat veya Mn_2O_3 varlığında ABTS'den ABTS radikalleri ($ABTS^{+\bullet}$) meydana gelebilir. ABTS radikalleri ABTS / $K_2S_2O_8$ şu şekilde oluşmaktadır.



burda peroksidisülfatın yıkımı elektron transferinden sonra meydana gelebilir. Aşırı ABTS varlığında, sülfat radikali şu reaksiyona göre tepkime verir.

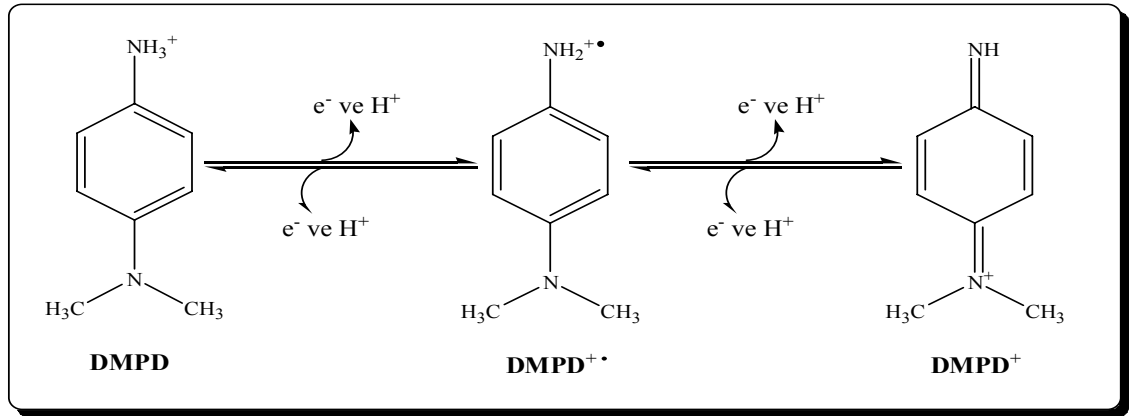


net reaksiyon ise şöyle cereyan eder:



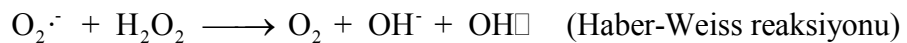
ABTS radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktifdirler ve bir H atom transferini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferini içerir (Kaviarasan *et al.* 2007).

Deneyisel çalışmalarda kullanılan üçüncü bir medot ise $DMPD^{+\bullet}$ giderme aktivitesidir. $DMPD^{+\bullet}$ giderme analizinin temeli, asidik pH ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında $DMPD$ 'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu ($DMPD^{+\bullet}$) oluşturması esasına dayanır. $DMPD^{+\bullet}$ 505 nm'de maksimum absorbans gösterir. Şekil 5.5'de görüldüğü gibi $DMPD^{+\bullet}$ 'ye bir H atomu transfer edebilen antioksidanlar rengi söndürür ve solüsyonda bir renksizleşme meydana gelir. Bu reaksiyon on dakikadan daha kısadır. Radikal katyonunun oluşumu yavaştır. Bunun için yapılan çalışmalarda en iyi bulgular, son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk solüsyonu veren $FeCl_3$ ile elde edilir. Üstelik bu metot düşük maliyeti ve yüksek tekrar edilebilirlik imkânı da sağlar.



Şekil 5.5. Kararlı bir radikal olan $\text{DMPD}^{\bullet+}$ 'nin oluşum ve giderilme mekanizması

Radikal giderme kapsamında yapılan çalışmalarda süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi de araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri lipit peroksidasyonunu direk başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Bu radikaller biyolojik makro moleküller ile direk etkileşip doku hasarlarına sebep olan reaktif radikallerden biridir (Halliwell and Gutteridge 1984). Ayrıca lipit peroksidasyonunu başlatan hidroksi radikali gibi daha aktif radikalleri oluşturmak için transformasyona uğrayabilirler. Süperoksit anyon radikalleri çok reaktif değildir, fakat akonitaz gibi dehidratazların demir sülfür guruplarını yükseltgeyerek inaktivasyona ve Fe^{2+} iyonlarının salınımına sebep olurlar. Görüldüğü gibi süperoksit anyon radikalleri Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeyebilirler. Fe^{2+} ise Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksit moleküllerinden oldukça reaktif olan $\text{OH}\cdot$ radikallerinin oluşumuna sebep olabilirler. Bunun yanı sıra Haber-Weiss reaksiyonu ile doğrudan hidrojen peroksitle etkileşip hidroksil iyonu ve hidroksil radikali de oluşturabilir (Gülçin *et al.* 2007c).



Ayrıca süperoksit anyon radikalleri katalaz ve peroksidaz enzimlerini de inaktive edebilir, oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilir ve eritrosit membranını da parçalayabilir (Fridovich 1983; Mavi 2005). Bütün bunların yanı sıra lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, hidroksil

radikali ve singlet oksijen gibi diğerk reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli rol oynamaktadır (Pietta 2000). Sitokrom c gibi bazı demir komplekslerini de kolaylıkla indirgeyebilir (Gülçin 2005).

Bu metotta süperoksit anyon radikalleri riboflavin/metiyonin/ışık sisteminde çözünen oksijenden elde edildi. Elde edilen süperoksit anyon radikalleri NBT'yi NBT²⁺'ye yükseltir. Azalan absorbans süperoksit radikallerinin giderildiğinin göstergesidir.

Radikal giderme ile ilgili bulgular gösteriyorki, karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen her iki ekstre de etkili bir şekilde radikal gidermekte ve bu aktiviteler süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi dışında artan ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Çizelge 5.1' de görüldüğü gibi verilen toplu bulgulara bakıldığında etanol ekstresinin su ekstresinden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi.

Çizelge 5.1. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden elde edilen su ve etanol ekstralarının antioksidan ve antiradikal çalışmaları ile ilgili toplu bulgular

| Antioksidan metotlar | Karnabahar | | Standart antioksidanlar | |
|--|-------------|-----------------|-------------------------|---------|
| | Su ekstresi | Etanol ekstresi | α -Tokoferol | Troloks |
| Total antioksidan aktivite | 88,6 | 80,1 | 68,1 | 81,3 |
| Fe ³⁺ -Fe ³⁺ indirgeme kuvveti | 0,453 | 0,759 | 1,097 | 1,414 |
| Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kuvveti | 0,496 | 0,572 | 0,980 | 0,808 |
| Metal iyonu şelatlama aktivitesi | 88,6 | 80,1 | 90,9 | 49,3 |
| Hidrojen peroksit giderme aktivitesi | 51,2 | 41,4 | 39,1 | 37,7 |
| DPPH• giderme aktivitesi | 51,2 | 64,6 | 51,9 | 56,5 |
| ABTS ^{•+} giderme aktivitesi | 79,8 | 68,3 | 55,9 | 90,7 |
| DMPD ^{•+} giderme aktivitesi | 50,5 | 64,2 | - | 88,8 |
| O ₂ ⁻ giderme aktivitesi | 57,5 | 43,9 | 21,3 | 23,9 |
| Toplam fenolik bileşik miktarı | 78,6 | 175,7 | - | - |
| Toplam flavonoit bileşik miktarı | 5,1 | 4,2 | - | - |

Fenolik bileşikler, singlet oksijen kuvençeri, superoksit anyon ve hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri gidericisi ve metal iyonları şelatörlüğü gibi özelliklerinden dolayı yüksek seviyeli antioksidan bileşikler olarak adlandırılır. Yapılan toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktar tayininde gerçekten etanol ekstresinin su ekstresinden daha fazla fenolik ve flavonoit bileşik içerdiği görülmektedir. Gerçekten 1 mg su ekstresi 31,4 µg GAE fenolik bileşik ve 0,45 µg QE flavonoit içerirken, aynı miktardaki etanol ekstresi 140 µg GAE fenolik bileşik ve 1,01 µg QE flavonoit içerdiği görüldü.

Peroksidazlar hidrojen peroksiti elektron alıcısı olarak kullanıp, çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrojenasyonunu katalizlerler. Bu reaksiyonlar sonucunda bitkilerde değişik fizyolojik olaylar meydana gelmektedir (Banci 1997). Bu fizyolojik proseslerin başında serbest haldeki fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile hücre duvarında lignin ve suberin biyosentezi gelmektedir. Ayrıca hücre duvarına bağlı fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile çapraz bağlanmalar meydana gelir ve hücre duvarı sertleşir. Böylece hücre oksidanı olan H₂O₂'nin kontrolü sağlanarak hücre duvarına katılması sağlanılır. Peroksidazların bu fizyolojik etkileri sonucu olumsuz çevre faktörlerinin hücreye nüfuzu önlenmiş olur. Bitkisel kaynaklı peroksidazlar yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon, çiçek ve saplarında ve epikotillerde, nükleus, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunmaktadır (Banci 1997; Hamed *et al.* 1997).

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 3,0–9,0 aralığında çalışıldı. pH 3,0–4,5 arası için 0,1 M'lık asetat tamponu, pH 4,5–7,5 arası için 0,1 M'lık fosfat tamponu ve pH 8,0–9,0 için de 0,1 M'lık Tris/HCl tamponları ile guaiakol/H₂O₂, pirogalol/H₂O₂, ABTS/H₂O₂, katekol/H₂O₂, 4-metil katekol/H₂O₂ substrat çiftleri ile enzimin gösterdiği aktivite spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çizelge 5.2'de görüldüğü gibi optimum pH ve tampon sırasıyla guaiakol için 5 (fosfat tamponu), ABTS için 4 (asetat tamponu), pirogalol için 7,5 (fosfat tamponu), katekol için 7 (fosfat tamponu) ve 4-metil katekol için 7,5 (fosfat tamponu) olarak bulundu.

Çizelge 5.2 Enzim karakterizasyon çalışması sonuçları

| | Guaiakol | Pirogalol | ABTS | Katekol | 4-Metil katekol |
|-----------------------------------|----------|-----------|------|---------|-----------------|
| Optimum pH | 5 | 7,5 | 4 | 7 | 7,5 |
| Optimum sıcaklık | 30°C | 25°C | 30°C | 50°C | 45°C |
| Optimum tuz konsantrasyonu | 1 M | 0,3 M | 1M | 0,7 M | 0,7 M |
| K_m | 141,64 | 2,01 | 1,1 | 3,41 | 8,19 |
| V_{max} | 7500 | 590 | 4400 | 300 | 1340 |

Sakharow ve arkadaşlarının palmye (*Roystonea regia*) peroksidazı üzerinde guaiakol substratı ile yaptığı bir çalışmada optimum pH fosfat/sitrat tamponunda 5,5 olarak bulunmuştur (2001). Bu değer bizim bulduğumuz değerle uyum içindedir. Yine Criquet ve arkadaşlarının yonca peroksidazı üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada 2,7-diaminofluorene, pirogalol ve guaiakol substratlarının her üçü için de optimum pH'nın 5,5 ile 6 civarında olduğu kaydedilmiştir (Criquet *et al.* 2001). Kara lahanadan elde edilen peroksidazın optimum pH'sı ise 0,2 M Tris/HCl tamponunda 7,5 olarak bulunmuştur (Gülçin and Yıldırım 2005). Enzimin stabil pH'sına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda enzimin oldukça dayanıklı olduğu gözlemlendi. Örneğin +4°C'de yapılan stabil pH'ya ilişkin çalışmalarda, sekizinci günde bile pH: 8,5'da Tris/HCl tamponunda ve guaiakol substratı ile enzim aktivitesinin %77,5'ni aynı pH ve tamponda katekol substratı ile enzim aktivitesinin %40,9'unu koruduğu gözlemlendi. Ayrıca pH: 8'de Tris/HCl tamponunda katekol substratı ile enzim aktivitesinin %23,3 arttığı gözlemlendi. Bu artışın sebebi ise stabil pH esnasında enzim çözeltisi +4°C'de bekletildiği için enzimin reaktif olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kışlık bitkilerde katalaz ve peroksidaz gibi enzimlerin düşük sıcaklıklarda aktivitesinin arttığı daha önce de görülmüştü (Gülçin and Yıldırım 2005). Yine stabil pH'ya ilişkin yapılan çalışmalarda, sekizinci günde pH: 8,5'da ve Tris/HCl tamponunda ABTS substratı ile enzim aktivitesinin %16,3'ünü ve pirogalol substratı ile Tris/HCl tamponunda aktivitesinin %72,4'nü koruduğu gözlemlendi. Bununla beraber peroksidaz enziminin stabil pH'sı guaiakol substratı için 8,5 (fosfat tamponu), ABTS için 6 (fosfat tamponu), pirogalol için 7,5 (fosfat tamponu), katekol için 7 (fosfat tamponu) ve 4-metil katekol için 8,5 (Tris/HCl tamponu) olarak bulundu.

Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin optimum sıcaklık belirlenmesinde her bir substrat için optimum pH'da ve 0-80°C aralığında aktiviteler belirlendi. Enzimin guaiakol ve ABTS substratları ile yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında 20 ile 70°C'ler arasında oldukça aktif olduğu gözlemlendi. Çalışmalardan elde edilen bulgulara göre peroksidaz enziminin stabil sıcaklığı pirogalol substratı için 25°C, guaiakol ve ABTS substratları için 30°C, 4-metil katekol substratı için ise 45°C, ve katekol substratı için 50°C olarak belirlendi. Criquet ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yonca peroksidazı için 2,7-diaminofluorence substratı ile optimum sıcaklığın 35°C olduğu bildirilmiştir (Criquet *et al.* 2001).

Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) elde edilen peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla çalışmalarda H₂O₂ substratı her ölçümde kullanılmakla beraber ikinci substrat olarak guaiakol, ABTS, pirogalol, katekol ve 4-metil katekol substratları ayrı ayrı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı ve her bir substrat için enzimin optimum tuz konsantrasyonu belirlendi. Enzim aktivitesi üzerinde tuz konsantrasyonunun etkisi çok fazla olmamakla beraber, en uygun tuz konsantrasyonu pirogalol için 0,3 M, guaiakol ve ABTS için 1M, katekol ve 4-metil katekol için ise 0,7 M olarak bulundu.

Peroksidaz enziminin termal stabilizasyonu ile ilgili çalışmalar enzimin her bir substratı için optimum pH'da ve 30-90°C aralığında yedi farklı sıcaklıkta ve bir saat boyunca her on dakikada bir aktivite ölçümü yapılarak gerçekleştirildi. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre çalışılan bütün substratlarda 60 dakikalık zaman periyodunda enzimin genellikle 30–60°C kararlı olduğu ve 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise stabilizasyonunun azaldığı gözlemlendi.

Jel filtrasyon kromatografisi ile peroksidaz enziminin molekül kütlesi 44 kDa olarak bulundu. Bu bulgu, farklı bitkilerden saflaştırılan peroksidazın molekül kütlesi ile

uygunluk göstermektedir. Örneğin enzimin molekül kütlesi brokoli (Tıpawan and Barrett 2005) ve domateste (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yaprakları (Deepa and Arumughan 2002) ve pirinçte (Hiraoka *et al.* 1991) 48 kDa olarak bulunmuştur. Oldukça farklı molekül kütleleri ise kuşkonmazda (Civello *et al.* 1995) 34 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak bildirilmiştir. Son zamanlarda Gülçin ve Yıldırım (2005) tarafından kara lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) saflaştırılan peroksidazın molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla 95 kDa olarak bulunmuştur. Yine optimum pH değerleride 4,5–6,5 aralığında değişiklik göstermekte (Tıpawan and Barrett 2005) ve enzimin asidik şartlarda daha iyi fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmada kullanılan enzimin bütün substratları için K_m ve V_{max} değerleri Linweaver-Burk grafiklerinden elde edildi (Şekil 4.39 ve 4.40). Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan peroksidaz enziminin 25°C ve pH: 5’de sabit H₂O₂ substratı konsantrasyonunda guaiakol substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 141,64 mM ve 7500 EU/ml.dak olarak bulundu. Aynı şekilde guaiakol substratı sabit tutulduğunda ise H₂O₂ substratı için K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,21 mM ve 5200 EU/ml.dak olarak bulundu. Gülçin ve Yıldırım tarafından kara lahanadan elde edilen peroksidazın substrat spesifitesi üzerine yapılan bir çalışmada ise guaiakol/H₂O substrat çifti için sabit H₂O₂ substratı konsantrasyonunda guaiakol substratı için K_m değeri 5,5 mM /1 mM olarak bulunmuştur (2005). Ayrıca karabaş kekiği (*Thymbra spicata* L. Var. *spicata*) üzerinde yapılan bir çalışmada ise karabaş kekiğinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı için sırasıyla K_m ve V_{max} değerleri 16,83 mM ve 3580 EU/ml.dak olarak bulunmuştur (Doğan *et al.* 2007). Sonuçlara bakıldığında karabaş kekiğinden elde edilen peroksidaz ile karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile yapılan çalışmada benzer K_m ve V_{max} değerlerine sahip olduğu gözlemlendi.

Peroksidaz enziminin aynı sıcaklıkta ve pH: 7’de sabit H₂O₂ substratı konsantrasyonunda katekol substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,41 mM ve 300 EU/ml.dak olarak bulundu. Benzer şekilde katekol substratı sabit tutulduğunda ise H₂O₂

substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 23,08 mM ve 160 EU/ml.dak olarak bulundu. Doğan ve arkadaşları tarafından karabaş kekiği (*Thymbra spicata* L. Var. *spicata*) üzerinde yapılan çalışmada, karabaş kekiğinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı için sırasıyla K_m ve V_{max} değerleri 12,88 mM ve 4783 EU/ml.dak olarak bulunmuştur (Doğan *et al.* 2007).

pH: 7,5’de 4-metil katekol substratı için yapılan çalışmalarda ise H_2O_2 substratı sabit tutulduğunda K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8,19 mM ve 1340 EU/ml.dak olarak hesaplandı. Aynı şekilde H_2O_2 substratı için yapılan çalışmada ise 4-metil katekol substratı sabit tutulduğunda H_2O_2 için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,0835 mM ve 202 EU/ml.dak olarak hesaplandı.

pH: 4’de ABTS/ H_2O_2 substrat için yapılan çalışmalarda ise H_2O_2 substratı sabit tutulduğunda ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,1 mM ve 4400 EU/ml.dak olarak hesaplandı. Yine benzer şekilde ABTS substratı sabit tutulduğunda ise H_2O_2 substrat için bu değerler 0,095 mM ve 65 EU/ml.dak olarak hesaplandı. Doğan ve arkadaşları tarafından karabaş kekiği ile yapılan çalışmada, karabaş kekiğinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı için sırasıyla K_m ve V_{max} değerleri 1,7 mM ve 4326 EU/ml.dak olarak bulunmuştur (Doğan *et al.* 2007). Her iki enzimin de ABTS substratına olan ilgisi hemen hemen aynıdır.

pH: 7,5’ta pirogalol ve H_2O_2 substratları için yapılan çalışmada ise H_2O_2 substratı sabit tutulduğunda pirogalol substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,01 mM ve 590 EU/ml.dak olarak hesaplandı. Gülçin ve Yıldırım tarafından kara lahanadan elde edilen peroksidazın pirogalol substratı ile ilgili yapılan çalışmada ise pirogalol substrat için K_m değeri 1,92 mM olarak bulunmuştur (2005). Bu sonuçlar gösteriyor ki kara lahana ve karnabahardan elde edilen peroksidaz enzimlerinin ABTS substratına olan ilgileri aynıdır. Yine benzer şekilde pirogalol substratı sabit tutulduğunda ise H_2O_2 substrat için bu değerler 0,0194 M ve 280 EU/ml.dak olarak hesaplandı. Çizelge 5.2’deki toplu sonuçlara bakıldığında enzimin substratlara olan ilgisi ABTS > pirogalol > katekol > 4-metil katekol > guaiakol şekindedir.

Peroksidaz enziminin saflaştırılmasına yönelik olan çalışmalarda enzim amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G–25 ile muamele basamaklarına kadar saflaştırıldı. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizden sonra CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi kolonuna tatbik edildi. 10 mM’lık fosfat tamponunda bulunan 1 M’lık NaCl zeltisi ile gradient oluşturularak elüsyon yapıldı. 470 nm’de guaiakol substratı ile aktivite gösteren aktif fraksiyonlar birleştirildi. Bradford metoduna göre protein tayinleri yapıldı. Çizelge 4.3’de gösterildiği gibi enzim %0,2 verimle 9,7 kat saflaştırıldı. Daha sonra CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen aktif fraksiyonlar birleştirildi Sefadeks G–25 ile muamele edildi. Bu işlem sonrasında enzim %0,2 verimle 19,33 kat saflaştırıldı.

KAYNAKLAR

- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U., Scherier, P. 1999. Biotransformations with peroxidases. *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74–108.
- Adams, J.B., 1978. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature-shorttime processing of vegetables. *Journal Food Technology*, 13, 281–297.
- Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H. 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus L.*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596–598.
- Ames, B.M., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of national Academy of Sciences USA*, 90, 7915–7922.
- Andreeva, A.V., Soloveva, O.V., Kakuev, D.L., Kutuzov, M.A. 2001. Purification of plant protein phosphatase PP7 and evidence for its redox regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396, 65–70.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir S.E., Erça E. 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292–304.
- Apak R, Güçlü K; Özyürek M; Karademir S.E. 2004. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: The CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7970–7981.
- Arabshahi-Delouee S, Urooj A, 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233–1240.
- Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1569 (1-3), 1-9.
- Aruoma, O.I., 1998. Free Radicals, Oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 199–212.
- Aruoma, O.I., Cuppett, S.L., 1997, *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept*. AOCS Press, Champaign, Illinois, p 241.
- Asad, N.R., Asad, L.M.B.O., Bonacossa de Almeida, C.E., Felzenszwalb, I., Cabral-Neto, J.B., Leitão, A.C., 2004. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. coli* genome. *Genetics and Molecular Biology*, 27 (2), 291-303.
- Asada K., 1994. Production and action of oxygen species in photosynthetic tissues, in: Foyer, Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77–104.
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L. and Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657–6662.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, 53, 253–263.

- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta* 1080, 245–250.
- Benavente-Garcia, O., Casillo, O., Marin, F., Ortuno, A. and Del-Rio, J., 1997. Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505–4515.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stres. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (33), 20313–20316.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199–1200.
- Boriss, H.; Brunke, H.; Kreith, M. 2006. Commodity Profile: Cauliflower Agricultural Issues Center University of California. (09.09.2006) <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantites of utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Branen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 52, 59-63.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491–495.
- Caldwell, C. R., 2003. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4589–4595.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426–3431.
- Chatterjee, J., Chatterjee, C. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, 109, 69–74.
- Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhstein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N., 1993. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible productive criteria for tissue injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 1102–1106.
- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601.
- Clemente, E. 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry* 49, 29-36.
- Criquet, S., Joner, E. J., Leyval, C. 2001. 2,7-diaminofluorence is sensitive substrate for detetction and characterization of plant rout peroxidase activites. *Plant Sciences*, 161, 1063–1066.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine*. 329.
- Dalton, D.A., Langeberg, L., Treneman, N.C., 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol Plant*, 87, 365-370.

- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 279-289.
- De Pascale, S., Maggio, A., Barbieri, G., 2005. Soil salinization affects growth, yield and mineral composition of cauliflower and broccoli. *European Journal Agronomy*, 23, 254-264.
- Deepa, S. S., Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503-511.
- Devaraj, S., Jialal, I., 1998. The effects of alpha-tocopherol on critical cells in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 9, 11-15.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM., 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.
- Diplock, A.T., 1997, Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radical Research*, 27, 511-532.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10-17.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M. 2006. Partial characterization of peroxidase from the leaves plant (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*). *European Food Research and technology*, (in press).
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1574-1579.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B.E., Regalado, C., Whitaker, J.R. 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus* L. Var. *purpletop white globe*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4450-4456.
- El Shamei, Z. 1987. The purification and properties of peroxidase in spinach. I. Isolation and purification. In *Biotechnology and Food Industry*, proceedings of the international symposium held in Budapest, Hungary, pp 257-265.
- Elia M.R., Borraccino G., Dipierro S., 1992. Ascorbate peroxidase from potato tubers. *Plant Science*, 85, 17-21.
- Elmastas, M. Türkecul, İ. Öztürk, L. Gülçin, İ., Işıldak Ö. Aboul-Enein, H.Y., 2006. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448.
- 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.
- Endo, Y., Usuki, R., Kareda, T., 1985. Antioxidant effects on chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark II. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62, 1387-1390.

- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G., 1997. Plant glutathione peroxidases, *Physiologia Plantarum*, 100, 234–240.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567, 1–61
- Everaarts, A.P. 2000. Nitrogen balance during growth of cauliflower. *Scientia Horticulturae* 83, 173–186.
- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A., 1999 Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1035–1040.
- Foo, L.Y., Porter, L.J., 1981. The structure of tannins of some edible fruits. *Journal Science Food Agricultural*, 32, 711–716.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*, 100, 241–254
- Fridovich, I. In *free radical in biology*; Pryor, W.A., Ed; Academic: New York, 1976, Vol 1, pp 239–271.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239–257.
- Gaetke, L.M., Chow C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189, 147–163.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M. 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029–1034.
- Gebczynski, P. Kmiecik, W., 2007. Effects of traditional and modified technology, in the production of frozen cauliflower, on the contents of selected antioxidative compounds. *Food Chemistry*, 101, 229–235.
- Groot, H., Rauen, M., 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental Clinic Pharmacology*, 12, 249–255.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., Davies, K.J.A., 2004. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and ‘aggresomes’ during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 2519–2530.
- Gutteridge, J.M.C., 1989. Iron and oxygen: A biologically damaging mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica Suppl*, 361, 78–85.
- Gutteridge, J.M.C., 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133–140.
- Gülçin, İ. 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* 32, 431–438.
- Gülçin, İ., (2006b). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217 (2–3), 213–220.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56, 491–499.
- Gülçin, İ., Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine 2006c. *Life Sciences*, 78, 803–811.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L. 2006a. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *European Food Research and Technology*, 223, 759–767.

- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., Köksal, E., 2007c. A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6, 410–418.
- Gülçin, İ., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007a. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21 (4), 354–361.
- Gülçin, İ., Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2002, s114.
- Gülçin, İ., Köksal E., Elmastas, M., Aboul-Enein H.Y. 2007. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. KOCH var. *joannis*. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 372–382.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004c. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205–215.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. 2004a. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: a-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Medica*, 70, 561–563.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006b. Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber, *Phytomedicine*, 13, 343–351.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006d. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*. 20, 130–134.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003, Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, 83, 371–382.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., Aslan, A. 2002a. Determinations of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 325–329.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004c. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, 393–400.
- Gülçin, İ., Yıldırım, A., 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17, 2175–2183.
- Haigh, R., 1986, Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1031–1036.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1–4.
- Halliwell, B., 1994, Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutritional Review*, 52, 253-265.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidant in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50.
- Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10–13
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, 543, Oxford

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Halls, C.E., Rogers, S.W., Oufattole, M., Ostergard, O., Svensson, B., Rogers J.C. 2006. A kunitz-type cysteine protease inhibitor from cauliflower and *Arabidopsis*. *Plant Science*, 170, 1102–1110.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science* 54, 644.
- Hamed, R. R., Maharem, T. M., Fatah, M. M. A., Ataya, F. S., 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. *Phytochemistry*, 48, 1291.
- Harris, E. D., 1992, Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB Journal*, 6, 2675-2683.
- Haugaard, N. 1968, Cellular mechanism of oxygen toxicity. *Physiology Review*, 48, 311-373.
- Havir, E.A., Mchale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases-peroxidases. *FEBS Letters*, 492, 177–182.
- Heinecke, J.W., 2002. Oxidized amino acids: Culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1090-1101.
- Henle, E.S., Linn, S., 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 19095–19098.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1995, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.
- Hirano, T., Gotoh, M., Oka, K., 1994. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Science*, 55, 1061–1069.
- Hodgson, E.K., Fridovich, I., 1975. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Interaction of the enzyme. *Biochemistry*, 14 (24), 5294–5299
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Hudson, B.J.F., 1990, *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London and New York, p 1–316.
- Imaida, K., Fukushima. S., Shivai. T., Ohtani. M., Nakanishi. K., Ito. N., 1983. Promoting activities of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl trans peptidase-positive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis*, 4, 969–978.
- Inze D., Van Montagu M., 1995 Oxidative stress in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 153–158.
- Ito, N., Fukushima, S.; Hasegawa, A.; Shibata, M.; Ogiso, T. 1983. Carcinogenicity of buthylated hydroxianisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* 70, 343–347.

- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63.
- Jimenez A., Hernandez J.A., del Rio L.A., Sevilla F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114, 275–284.
- Jones, R.D., Morice A.H., 2000. Hydrogen peroxide-an intracellular signal in the pulmonary circulation: involvement in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacology and Therapeutics*, 88, 153-161.
- Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A., Aosvignyazo, V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Kaul, N., Devaraj, S., Jialal, I. 2001. alpha-Tocopherol and atherosclerosis. *Experimental Biology and Medicine*, 226 (1), 5–12.
- Kaviarasan S., Naik G.H., Gangabthagirathi R., Anuradha C.V., Priyadarsinin K.I., 2007. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103, 31–37.
- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagagaoka, S., Takahashi, M., Mukai, K. 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in *n*-butanol. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1256, 52–56.
- Krinsky, N.I. 1989. Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617–635.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501.
- Kulkarni, S.D., Tilak, J.C., Acharya R., Rajurkar, N.S., Devasagayam, T.P.A., Reddy, A.V.R. 2006. Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as an adjunct of growth under different conditions. *Phytotherapy Research*, 20, 218–227.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N.F. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology*, 114, 1237-1245.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Laemmli, D.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683.
- Laloue H., Weber-Lotfi F., Lucau-Danila A., Guillemaut P., 1997. Identification of ascorbate and guaiacol peroxidases in needle chloroplasts of spruce trees, *Plant Physiology and Biochemistry*, 35, 341–346.
- Lambeth, J.D., 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181–189.
- Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti-Panici, P., Scambia, G., Mancuso, S., Capelli, A., Ranelletti, F., 1990. Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids. *British Journal of Hematology*, 75, 489–495.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969–978.
- Lee, H.C., Klein, B.P. 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137–152.

- Lee, M.Y., Kim, S.S. 1994. Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish roots. *Phytochemistry*, 35, 287–290.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu. 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lesham, Y.Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 5, 39–49.
- Mavi, A., 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.52–53.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Meal, J.F. In free radical in biology; Pryor, W.A., Ed; Academic, New York, 1976, Vol VI, pp 51-67.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43, 1813-1819.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. *Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, p 618–649.
- Min, D.B., 1998. Lipit oxidation of edible oil. In *Food Lipits chemistry, nutrition, and biotechnology*, Akoh, C.C., Min, D.B., (Eds), Marcel Dekker, New York, pp. 283–296.
- Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwami K. 1966. Antioxidativ action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210–214.
- Moldovan, L., Moldovan, N.I., 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 395-412.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75,237–240.
- Nair, A. R., Showalter, A. M. 1996. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemistry Biophys. Research Communucation*, 226, 254.
- Namiki, M., 1990, Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 273-3.
- Neill, S., Desikan R., Hancock J., 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 388–395.
- Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., 1991. Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 735-739.
- Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A., Staniek, K., 2003. Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Report*, 8, 135-141.
- Ohya T., Morimura Y., Saji H., Mihara T., Ikawa T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish, *Plant Science*, 125, 137–145.
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of isgın (*Rheum ribes* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3047–3055.

- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376.
- Osawa, T.; Namiki, M. A. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agricultural and Biological Chemistry* 45, 735–739.
- Özcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Science*, 68, 487–490.
- Pacific, R.E., Davis, K.J.A. 1991. Protein, lipid and DNA repair system in oxydative stress: the free radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37, 166–180.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S.L., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22, 18–35.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologiae Technologia*, 40, 97–106.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
- Pomar, F., Bernal, M. A., Diaz, J., Merino, F. 1997. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313–1317.
- Pratt, D.E.; Hudson, B.J.F. 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants.; Hudson B.J.F. Ed.; Elsevier; Amsterdam, pp 17-192.
- Pütter, J., Becker, R., 1987, *Methods of enzymathic analysis: Peroxide*. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, s 286.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M., Kawakishi, S., 1988. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation, and partial characterization. *Journal Agricultural Food Cemistry*, 36, 732–737.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice- Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rhee, S.G., 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental and Molecular Medicine*, 31, 53–59
- Robinson F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G. 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence . *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Robinson, D. S., 1991. Peroxidases and catalases in foods. In *Oxidative Enzymes in Food*, 1st ed., Robinson, D. S., Eskin, N. A. M., Eds., Elsevier Applied Science: London, U.K., pp 1-37.
- Rodrigo, C., Rodrigo, M., Alvarruiz, A., Frigola, A., 1978. Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *Journal of Food Protection* 59, 1065–1071.
- Rodriguez Lopez, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., 2000 Garcia-Canovas, -F. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1537–1541.

- Rojkind, M., Domínguez-Rosales, J.-A., Nieto, N., Greenwel, P., 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1872–1891.
- Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003–1008.
- Ruiz-Lopez, M.D., Artacho, R., Fernandez Pinena, M.A., Lopez, G., Serrana, H., Lopez Martinez, M.C. 1995. Stability of α -tocopherol in virgin oil durin microwave heating. *Lebensm WissTechnol*, 28, 644-646.
- Salin, M.L., Day, E.D., Crapo, J.D., 1978. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187, 223–228.
- Saltman, P., 1989. Oxidative stress: a radical review. *Seminars in Haematol.* 26: 249 – 256.
- Sampson, J.B., Beckman, J.S., 2001. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu,Zn superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392 (1), 8–13.
- Scalzo, R.L., Bianchi, G., Genna, A., Summa, C. 2007. Antioxidant properties and lipidic profile as quality indexes of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) in relation to harvest time. *Food Chemistry*, 100, 1019–1025.
- Scandalios J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–316.
- Signoret, A., Crouzet, J. 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 459.
- Sikkema, P.H., Soltani, N., McNaughton, K., Robinson, D.E. 2006. Broccoli, cabbage and cauliflower tolerance to sulfonylurea herbicides. *Crop Protection*, 25, 225–229.
- Singh, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Singleton, V.L., Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152–178.
- Sohal, R.S., 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 37–44.
- Stadtman, E.R., 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597–604.
- Stone, J.R., 2004. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422, 119–124.
- Szweda, P.A., Friguet, B., Szweda, L.I., 2002. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 29–36.
- Tanaka, J. S., Nakagawa, Y., Sakuoka, R. Cauliflower CTAHR Department of Horticulture CTAHR Fact Sheet Home Garden Vegetable no. 7 January 1997.
- Tipawan, T. Barrett M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3206–3214.

- Triplett, B. A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science* 81, 147-154.
- Türkoglu A., Duru M.E., Mercan, N., Kivrak İ., Gezer, K., 2006, Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 267–273.
- Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H., van den Vijgh, W., Bast, A. 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70, 391–395.
- Van Esch, G. J., 1986, Toxicology of tert-butyl-hydroquinone (TBHQ). *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1063–1066.
- Van Huystee, R.B., 1987, Some molecular aspect of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review in Plant Physiology*, 38, 205.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum* 88, 167–171.
- Whitaker, J.R., 1994, Catalase and peroxidase. In *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Whitaker, J. R., Ed., Dekker: New York, 1994, pp 565-578.
- Wood LG, Gibson PG, Garg ML 2006. A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of Sciences of Food and Agriculture* 86, 2057–2066.
- Yagi, K., 1987, Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids*, 45, 337–341.
- Yemenicioglu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4158–4163.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., 1995, Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27–32.
- Yu, L., Halley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1619–1624.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry*, 64, 555–559.
- Zhu, Q.Y., Hackman R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., 2002. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6929-6934.
- Zobayed, S.M.A., Armstrong, J., Armstrong, W. 2001. Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Science* 161, 537–548.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Erzincan’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzincan’da tamamladı. 1993–1994 Eğitim ve Öğretim yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği bölümünden 1998 yılında mezun oldu. Ekim 1999–2000’de Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisansa başladı ve Mart 2003’de “Katalaz enziminin kara lahana bitkisinden (*Brassica oleracea* L. Var. *Acephala* DC.) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı pestisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin incelenmesi” konulu tezini tamamladı. 2003–2004 Eğitim ve Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde doktora çalışmalarına başladı. Halen Erzurum Lisesi’nde Kimya öğretmenliği yapmakta olup, evli ve bir çocuk babasıdır.