

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* SSP. Vulgare)
BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

Sevgi ALTIN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZİNCAN
2017**

Her Hakkı Saklıdır

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Sevgi ALTIN

Salır

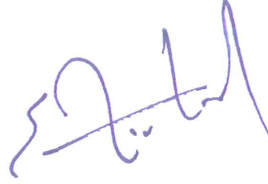
Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* SSP. Vulgare) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu adlı Yüksek Lisans tezi, Erzincan Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Sevgi ALTIN



Danışman
Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL



Kimya A.B.D. Başkanı
Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında Sevgi ALTIN tarafından hazırlanan bu çalışma 28/04/2017 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından KİMYA Anabilim Dalı KİMYA Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Başkan : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTAY

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

29..05/2017



Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* SSP. Vulgare)

BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU

Sevgi ALTIN

Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışmada POD farklı tekniklerle ekmeklik buğday (***Triticum aestivum ssp. Vulgare***) bitkisinden saflaştırıldı, karakterize edildi ve kinetik özelliklerinin yanısıra inhibisyonu da araştırıldı. Buğdaydaki POD, (NH₄)₂SO₄ çöktürme, diyaliz, CM-Sephadex ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan POD enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütleini belirlemek için SDS-PAGE yapıldı ve molekül kütleisi 38.8 kDa bulundu. Ham ekstredeki POD enzimi üzerine yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH sırasıyla 5,5, 0.1 M, 40 °C, 6,5 olarak tespit edildi. K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği çizilerek hesaplandı. Guaiakol ve H₂O₂ substratları için enzimin K_m değerleri sırasıyla 2,467 ve 7,307 olarak belirlendi. POD enzimi üzerine CTAB (setil trimetilamonyum bromür), EDTA(etilendiamintetra asetik asit), sitrik asit ve sodyum azidin inhibisyon etkisi incelenerek en yüksek inhibisyon etkisi CTAB ve sitrik asit (%95 ve %94 inhibisyon) gözlemlendi.

2017, 74 sayfa

Anahtar kelimeler: Enzim kinetiği , karakterizasyon , peroksidaz , saflaştırma

ABSTRACT

Master Thesis

Purification, Characterization, and Sensitivity to Pesticides of Peroxidase From
Wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*)

Sevgi ALTIN

Erzincan University

Institute of Sciences and Arts
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

The purification and characterization of peroxidase is currently growing of interested since peroxidases have implications in various industrial and biochemical areas. In this study, wheat peroxidase was purified and characterized using different techniques. Peroxidase from wheat was purified using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, dialysis, CM-Sephadex anion exchange chromatography and SDS-gel electrophoresis. Enzyme kinetics were studied using two substrates: guaiacol and hydrogen peroxide. K_m and V_{max} values were calculated from Lineweaver-Burk graph for each substrate patterns. K_m values for guaiacol and hydrogen peroxide were found as 2,467 and 7,307 respectively. Enzyme activity has been purified 284 folds. The pH and optimum temperature were 5,5 and 40 °C, respectively. Peroxidase had molecular mass of 38,8 kDa as determined by SDS-PAGE. The enzyme was highly inhibited by citric acid and setil trimetil amonyum bromür.

2017, 74 pages**Keywords:** Enzyme kinetic, peroxidase, purification, wheat

TEŞEKKÜR

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

Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyelerinden çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ekrem Köksal'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın gerek deneysel gerekse yazım kısmında her türlü yardımını esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice TOHMA'ya minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet KUZUCU'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Hümeysra KAFA'ya şükranlarımı sunarım.

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

Çalışmalarım esnasında varlıklarını her daim hissettiren , başarılı olabilmem için her türlü özveri ve fedakarlığı gösteren canım aileme anlayış, sabır ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Sevgi ALTIN
Nisan, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler.....	4
1.2.Peroksidazlar.....	14
1.2.1.Enzimkökeni.....	19
1.2.2.POD'un fizyolojik rolü.....	20
1.2.3.POD'un fiziki özellikleri.....	21
1.2.3.a. İzoenzimler.....	21
1.2.3.b. Nonprotein (protein olmayan) kısım.....	21
1.2.3.c. Substrat spesifikliğı.....	22
1.2.3.d. Optimum pH	23
1.2.3.e. Optimum sıcaklık	24
1.2.3.f. İzoelektrik nokta (pI)	24
1.2.3.g. Moleküler ağırlık.....	25
1.2.3.h. Katalitik özellikler.....	25
1.2.3.i. İnhibitörler ve aktivatörler	26
1.2.3.i. Michaelis-Menten sabiti (K_m).....	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1.Materyal.....	30
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	30
3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar	30

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	31
3.1.3. a. Enzim homojenatı ile ilgili çözeltiler.....	31
3.1.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz için kullanılan çözeltiler	31
3.1.3.c. İyon-değişim kromatografisi için kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.3.d. Jel-filtrasyon kromatografisi için kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.3.e. pH'nın etkisinin incelenmesi için kullanılan çözeltiler	31
3.1.3.f. Optimum pH çalışması sırasında kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.3.g. Sıcaklığın etkisinin incelenmesi için kullanılan çözeltiler.....	32
3.1.3.h. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	32
3.1.3.ı. Kantitatif protein miktarı tayininde kullanılan çözeltiler.....	32
3.1.3.i.SDS-Poliakrilamid jel elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	32
3.2.Yöntem	34
3.2.1. Buğday bitkisinin toplanması	34
3.2.2. Peroksidaz enziminin saflaştırılması çalışmaları.....	34
3.2.2.a. Enzim homojenatının hazırlanması.....	34
3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	34
3.2.2.c.Enzimin CM iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması.....	35
3.2.2.d. Enzimin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması.....	36
3.2.2.e. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)	38
3.2.2.f. Kantitatif protein miktarı tayini	39
3.2.3. POD'un karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar.....	41
3.2.3.a. Optimum pH çalışması	41
3.2.3.b. Optimum sıcaklık çalışmaları	41
3.2.3.c. Enzimin stabil olduğu pH'nın belirlenmesi.....	41
3.2.3.d. POD' un termal stabilizasyonun araştırılması	41
3.2.3.e. POD' un optimum tuz konsantrasyonunun belirlenmesi	42
3.2.4. POD üzerine kinetik çalışmalar	42
3.2.4.a. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	42
3.2.4.b. POD enzimi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	44
4.1.POD'un Saflaştırılması Çalışmaları Bulguları.....	44

4.1.1.Peroksidaz enziminin amonyum ,sülfat ile çöktürme ve diyaliz saflaştırması bulguları.....	44
4.1.2. Peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırma bulguları.....	45
4.1.3.Enzimin jel filtrasyon kromatografisi ile ilgili çalışma bulguları.....	46
4.1.4. Enzimin SDS-PAGE ile saflaştırma bulguları.....	47
4.1.5. Peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları.....	48
4.2.POD'un karakterizasyonu çalışmaları bulguları.....	49
4.2.1. POD'un optimum pH çalışması bulguları	49
4.2.2. POD'un stabil pH çalışması bulguları	50
4.2.3. POD için optimum sıcaklık çalışması bulguları	50
4.2.4. POD'un termal stabilizasyon çalışmaları ile ilgili bulgular.....	51
4.2.5. POD'un optimum tuz konsantrasyonu ile ilgili bulgular.....	52
4.3. POD'un kinetik özellikleri ile ilgili bulgular	52
4.3.1. POD'un K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili bulgular.....	52
4.3.2. Çeşitli kimyasalların POD'un aktivitesine inhibisyon etkisi.....	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACC	:1-Aminosiklopropan-1-karboksilik asit
AS	:Amonyum sülfat
A_{Kontrol}	:Kontrol numunesinin absorbanası
A_{Numune}	:Numune absorbanası
BSA	:Sığır serum albümin
CTAB	:Setiltrimetilamonyum bromür
E.C.	:Enzim komisyonu
E.Ü.	:Enzim ünitesi
EI	:Enzim inhibitör kompleksi
ES	:Enzim substrat kompleksi
ESI	:Enzim inhibitör substrat kompleksi
EDTA	:Etilendiamin tetraasetik asit
FCR	:Folin-Ciocalteu reaktifi
IAA	:İndol-3-asetik asit
NADH	:Nikotinamid adenin dinükleotid
PAGE	:Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	:Amonyum per sülfat
pI	:İzoelektrik nokta
POD	:Peroksidaz
SDS	:Sodyum dodesilsülfat
TCA	:Triklorasetik asit
TEMED	:N,N,N',N'- tetrametil-etilendiamin

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. 2012 yılı dünya dünya buğday ekilişi.....	1
Şekil 1.2. 2012 yılı dünya buğday üretimi.....	1
Şekil 1.3. 2012 yılı Türkiye buğday üretimi.....	2
Şekil 1.4. 2012 yılı Türkiye buğday ekilişi.....	2
Şekil 1.5. 2012 yılı bölgelere göre ekmeklik buğday üretimi.....	2
Şekil 1.6. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.7. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.8. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.9. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi	11
Şekil 1.10. Michaelis-Mentendenklemleri ve grafiği	11
Şekil 1.11. Lineweaver-Burk Grafiği	12
Şekil 1.12. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak H ₂ O ₂ 'i giderme mekanizması.....	15
Şekil 3.1. K _m ve V _{max} grafiksel gösterimi ve denklemi	43
Şekil 4.1. %Amonyum sülfat doyumluk tayini.....	45
Şekil 4.2. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırılmasıyla elde edilen elüatların, her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbansları.....	46
Şekil 4.3. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un jel filtrasyon kolonu ile saflaştırılmasıyla elde edilen elüatların, her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbansları.	47
Şekil 4.4. POD enziminin SDS-PAGE işlemi sonucu jelde görünümü	47
Şekil 4.5. Lowry yöntemiyle kantitatif protein tayininde kullanılan standart protein grafiği	48
Şekil 4.6. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un farklı pH'larda gösterdiği aktiviteler.....	49
Şekil 4.7. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un farklı pH'lardaki zamanla stabilitesi.	50

Şekil 4.8. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un optimum çalışma sıcaklığı.	51
Şekil 4.9. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un farklı sıcaklıklarda zamanla stabilitesi.....	51
Şekil 4.10. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un farklı tuz konsantrasyonlarındaki aktivitleri.....	52
Şekil 4.11. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'un H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiacol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.	53
Şekil 4.12. Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>vulgare</i>) elde edilen POD'unguaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.	53

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Lowry metodu ile kantitatif protein tayini	40
Tablo 4.1.Ekmeklik buğdaydan (<i>Triticum aestivum</i> ssp. vulgare) izole edilen peroksidaz enziminin amonyum sülfatla çöktürmede doygunluk noktası tayini.....	44
Tablo 4.2. Peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları	49
Tablo 4.3. Farkı kimyasalların peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi	54

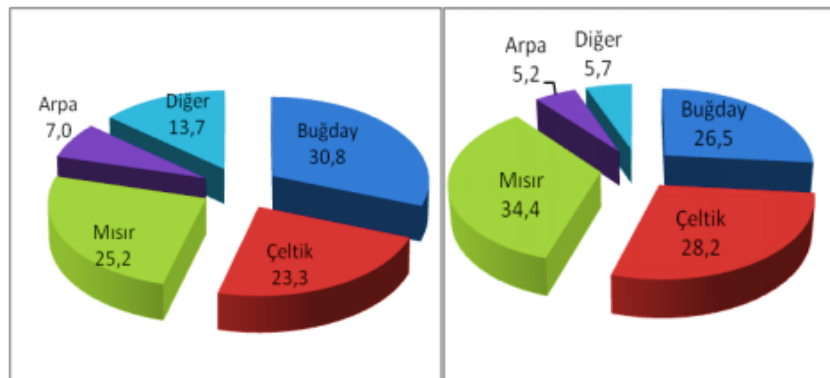
1. GİRİŞ

Buğday (*Triticum aestivum L.*), dünyada ve ülkemizde gerek ekiliş gerekse üretim bakımından ilk sıralarda yer alan ve insan besini olması yanında hayvan beslenmesinde de kullanılan önemli bir kültür bitkisidir. Buğdayın adaptasyon sınırının genişliği, üretim, taşıma, depolama ve işleme kolaylığı ve ekmek yapılabilme kabiliyetinden dolayı, birçok ülkede üretimin hızlandırılması çalışmaları arttırmıştır (Kün 1996).

Hızla artan nüfusun, parçalanmış ve azalan tarım alanlarından elde edilen üretimle yeterli ve dengeli beslenmesi, her geçen gün daha da güç hale gelmektedir. Bu nedenle artan besin ihtiyaçlarının karşılanmasında bölge ekolojik koşullarına iyi uyum gösteren, morfolojik ve fizyolojik yönden uygun, verim ve kalite özellikleri iyi olan genotiplerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

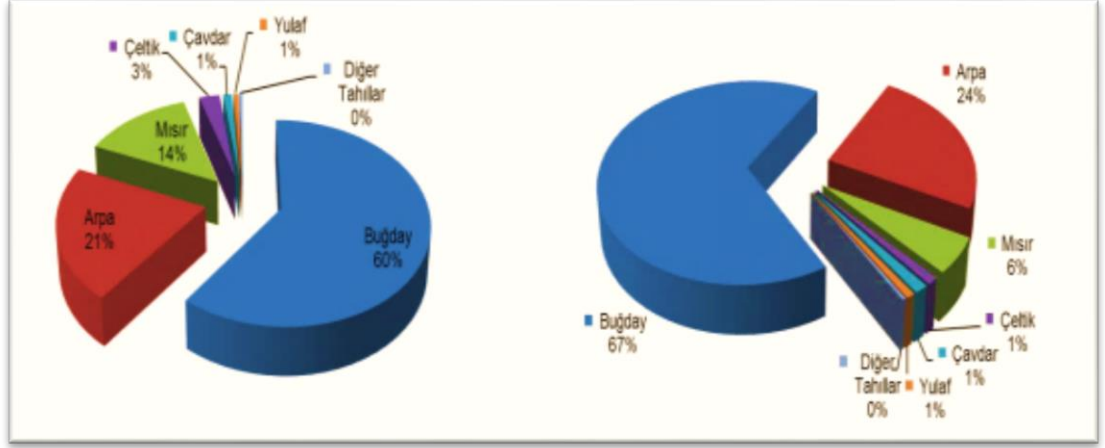
Ülkemizde 2006 yılında Türkiye genelinde ilk kez tarımsal işletmelerde yapılan bitkisel üretim ile ilgili araştırma sonucuna göre tahıllar içerisinde buğday % 64.8 pay ile en fazla ekiliş yapılan ürün olup, % 58.1 üretim payı ile de ilk sırada yer alan ürün olduğu belirlenmiştir (TÜİK 2006).

2012 yılı FAO verilerine göre dünya buğday ekiliş 216,6 milyon hektar, dünya buğday üretimi ise 674,9 milyon tondur (FAO 2012). 2012 yılı dünya buğday ekiliş ve üretimi yüzde oranları şekil 1.1 ve şekil 1.2’de verilmiştir.



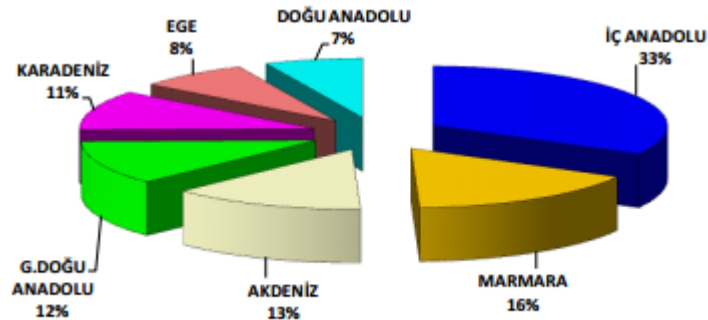
Şekil 1.1. 2012 Yılı Dünya Buğday Ekiliş **Şekil 1.2.** 2012 Yılı Dünya Buğday Üretimi

2012 yılı TÜİK verilerine göre Türkiye buğday ekilişi ve üretimi yüzde oranları şekil 1.3 ve şekil 1.4’te verilmiştir.



Şekil 1.3. 2012 Yılı Türkiye Buğday Üretimi Şekil 1.4. 2012 Yılı Türkiye Buğday Ekilişi

Güneydoğu Anadolu Bölgesi 1,2 milyon hektar buğday ekim alanı ve 3.8 milyon ton buğday üretimi ile Ülkemiz buğday alanlarının yaklaşık %12 sini kaplamaktadır (TUİK 2012). Bölgelere göre ekmeklik buğday üretimi yüzde payları şekil 5’te verilmiştir.



Şekil 1.5. 2012 Yılı Bölgelere Göre Ekmeklik Buğday Üretimi

Ülkemizde kişi başına düşen yıllık buğday üretimi 255 kg ve kişi başına gıda olarak buğday tüketimi 155-165 kg seviyesinde olup, 146 kg olan dünya ortalamasının üstündedir (Anonim 2007). Üretimin artırılması, ekim alanı artışı, verim artışı ya da her ikisinde birden artış sağlayarak mümkündür. Fakat üretim yapılan alanlar son

sınırına ulaşmıştır. Gelişmekte olan Ülkelerdeki buğday ekim alanlarının ancak % 0.14 kadar artacağı tahmin edilmektedir (Rosegrant ve ark. 1995). O halde, ekim alanlarının artırılması yoluyla üretimin artırılmayacağı düşünülecek olursa, üretimin artırılması için tek çıkış yolu birim alanda verimi artırmaktır.

Yıldırım ve ark. (2009), yağışa dayalı şartlarda ve sulu koşullarda yaptıkları bir çalışmada, durum buğdayında başaklanma döneminde ve tane doldurma dönemi ortalarında yapraktaki SPAD okumaları neticesinde, elde ettikleri klorofil değerleri ile tane verimi arasında önemli bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bitki boyu, başak uzunluğu, başakçık sayısı, başakta tane sayısı, başakta tane ağırlığı ve bin tane ağırlığı gibi özelliklerin verim üzerine etkili olduğunu gösteren çalışmalar da kaydedilmiştir (Johansson ve Svensson 1996).

Son yıllarda yürütülen çalışmalar, bitki örtüsü serinliği ve klorofil içeriği gibi fizyolojik özelliklerin bir seleksiyon kriteri olarak kullanılmasının buğday veriminde ilerleme sağladığını ortaya koymuştur (Fischer ve ark. 1998, Amthor 2001, Bavec ve Bavec 2001, Reynolds ve ark. 2001, Soltani ve Galeshi 2002, Koç ve ark. 2003, Yıldırım ve ark. 2009).

Buğdayda tane dolun dönemi boyunca gerçekleşen yüksek sıcaklıkların tane büyümesini hızlandırdığını, buna karşılık tane dolun süresini kısalttığını ve kısalan sürenin, artan dolun hızı tarafından telafi edilemediği durumlarda tane ağırlığının artan her derece için % 3-5 oranında azalması sonucunda verimde düşüşlerin ortaya çıktığı belirlenmiştir (Ganguli ve ark.1997).

Koç ve Barutçular (2000), yaptıkları bir çalışmada buğday bitkisinde yaprak alan indeksinin (YAI), çıkıştan itibaren önce yavaş yavaş daha sonra ise hızlı bir şekilde artarak çiçeklenmeden 2-3 hafta öncesine kadar en yüksek değerine ulaştığını, daha sonraki dönemlerde ise yaşlanma ile oluşan yaprak kayıpları sonucu giderek azaldığını belirtmişlerdir.

Dünya genelinde alışlagelmiş buğday ıslahı ile verim potansiyelinde önemli artışlar sağlanmış olmasına rağmen, birçok ıslahçı ve fizyolog gelecekteki başarıların disiplinler arası işbirliği ile gerçekleşeceği, verimle ilişkili özelliklerin (özellikle

fizyoloji) kullanımıyla ıslahta etkinliğin daha da arttırılabileceğini öne sürmüşlerdir (Jackson ve ark. 1996, Kuşçu 2006).

Buğdayda fizyoloji (Richards ve ark. 1996, Fischer ve ark. 1998, Reynolds ve ark. 1998, Reynolds ve ark. 2000) ve biyoteknoloji (Tanksley ve Nelson 1996) ile ilgili yeni seleksiyon tekniklerinin, geleneksel ıslah programlarını tamamlayıcı bir özelliğe sahip olduğunu gösteren çok sayıda araştırma sonucu bulunmaktadır. Bitki ıslahçıları ve fizyologları, erken generasyonlarda verim potansiyeli için seçim ölçütü olarak, verim yerine tek bitkiler üzerindeki morfolojik ve/veya fizyolojik özelliklerin kullanılmasını önermişlerdir (Hsu ve Walton 1971, Nass 1973, McVetty ve Evans 1980, Erkul ve Ünay 2009).

Birçok bitki ıslahçısının en önemli amacı verimi arttırmaktır. Bunun gerçekleştirilebilmesi, hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi yanında fizyolojik ve morfolojik özellikten kaynaklanan yüksek verimli çeşitlerin elde edilmesiyle mümkün olacağı düşünülmektedir. (Tosun ve Sağsöz 1994).

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir (Lehninger ve ark. 2005; Altıkatoğlu vd 2009; Voet ve Voet 2010). Bir canlıdaki parçalanma ve sentez reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Ayrıca enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için gerekli protein yapısındaki maddelerdir. Canlı dışında, in vitro olarak da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha arttırmaktadır. Enzim üretimi genlerin kontrolü altında gerçekleştirilmekte ve her enzimin kendine özgü sıcaklık, iyon tepkimesi, pH ve basınç koşulları bulunmaktadır (Karlson and Telefoncu 1998).

Enzimatik reaksiyonların hızlarını; sıcaklık, pH, zaman, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve inhibitör gibi faktörler etkilemektedir (Daniel ve ark. 2010). Sıcaklık enzimatik reaksiyonları hızlandıran faktörlerden birisi olup, normal şartlar altında enzimlerin çoğu 50-60 °C gibi sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Doğal sıcak su kaynaklarında çoğalmak üzere adapte olan mikroorganizmalardan

elde edilen enzimler, suyun kaynama noktasına yakın aktivitelerini kaybetmeyip, optimal sıcaklık gösterirler. Sıcaklık artışı belirli bir yere kadar aktiviteyi artırır, daha sonra aktivitede düşüş başlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir (Daniel ve ark. 2010). Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya, o enzimin optimum pH'sı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'yı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda muhafaza etmek için tamponlar kullanır. Optimum pH'nın her iki yanındaki pH değerlerinde aktivite kaybı söz konusudur. Bunun nedenleri, pH değişimine bağlı olarak enzimin ya da substratın taşıdığı yüklü grupların tabiatının değişimi ve enzim denatüre olmasıdır (Altunkaya ve Gökmen 2011).

Bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyon sürerken, reaksiyonun hızı giderek düşmektedir.

Bunun nedenleri;

- Ürünlerin birleşerek aksi yöndeki reaksiyonu işletmeleri
- Substratın tükenmesi
- Enzimin zamanla inaktive olması
- Reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu olabilir.

Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unu sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (Khatun ve ark. 2012). Ayrıca, enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden sürer. Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışmaktadır. Maksimum hız V_{max} ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat konsantrasyonuna Michaelis-Menten sabiti (K_m) denilmektedir. Ayrıca substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir V_{max} düzeyinde sabit kalır (Thongsook ve Barrett 2005). Enzimatik çalışmalarda, enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı o ölçüde artar. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde gerçekleşmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu

reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır (Al-Senaidy ve Ismael 2011). İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. Bunlar; substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu engeller (Turgut 2009).

Biyokimyasal katalizör olarak bilinen enzimler, reaksiyon hızını 10^{20} 'ye kadar artırırken, diğer katalizörler 10^2 - 10^3 kadar arttırabilmektedir. Enzimler sadece canlı hücreler tarafından sentezlenmektedir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada fonksiyon gösterir. Bu tip enzimlere 'intraselüler' (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara ise 'ekstraselüler' (hücre dışı) enzimler denir (Lehninger ve ark. 2005; Voet ve Voet 2010).

Enzimler;

- Bazı enzimler, yalnızca proteinden yani amino asitlerden oluşmuştur.
- Bazı enzimlerin yapısında proteinin yanısıra organik veya inorganik maddeler yer almaktadır. Protein yapısında olmayan bu maddelere kofaktör adı verilmektedir.
- Kofaktörü ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere 'haloenzim' adı verilmektedir.

Enzimlerde aktif merkezin bazı özellikleri;

- Aktif merkez, Enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez, Enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturur.
- Bazı enzimler, birden fazla sayıda aktif merkez içerir.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, Van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanır.
- Aktif merkez, belirli çeşit sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmaktadır.

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere 'substrat' denir. Substratlar enzimde 'aktif merkez' denilen özel bir cep şeklindeki bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katlanmaları sonucu oluşan aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur (Karlson and Telefoncu 1998).

Canlı sistemlerde tepkimelerin enzimatik olarak katalizi zorunludur. Bu zorunluluk canlı yaşamının faaliyetlerini aksatmadan işlevleri etkin kılmasını sağlar. Bu işlemler metabolizma içerisinde biyolojik katalizörler tarafından yapılmaktadır. Katalizlenme sürecinde tepkimeler uygun koşullarda oluşmazlar ise gerçekleşme süresi yavaşlar ve beklentilere cevap verme yeterliliği sınırlanır. Pek çok biyolojik molekülün reaksiyon verebilmesi için gerekli uygun koşulların oluşturmasının yanı sıra sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi optimum şartlara da gerekmektedir.

Kimyasal reaksiyonları hızlandıran bileşiklere katalizör denir. Enzimler; kinetik açıdan oldukça kararlı olan ve canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşturmadan %100'lük bir ürün oluşumunu sağlayan, katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) bir grubu hariç protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle oluşmaktadır.

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en büyük farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalizlemektedirler. Enzimlerin katalizleme güçleri "Turnover Sayısı" ile anlamlandırılmakta ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Bir takım enzimler katalizleme fonksiyonlarını sadece protein yapıları ile oluşturabilirken bazılarının ise bu fonksiyonları gerçekleştirmek için kofaktör denilen guruplara ihtiyaçları vardır. Bu guruplar bazen bir metal iyonu ya da kompleks bir organik bileşik (koenzim) olabilirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bir proteinin işlevi için ihtiyaç duyulan tüm yardımcı faktörleri içeren ve katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine holoenzim; kofaktörlerini yitirmiş sadece protein kısmını barındıran katalitik olarak inaktif bölüme ise apoenzim denir (Altan 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonların bilimine 'Enzim kinetiği' denir. Enzim kinetiğinde reaksiyon hızı ölçülür ve reaksiyon şartlarını değiştirmenin etkisi araştırılır. Bir enzimin kinetiğinin bu şekilde çalışılması enzimin katalitik

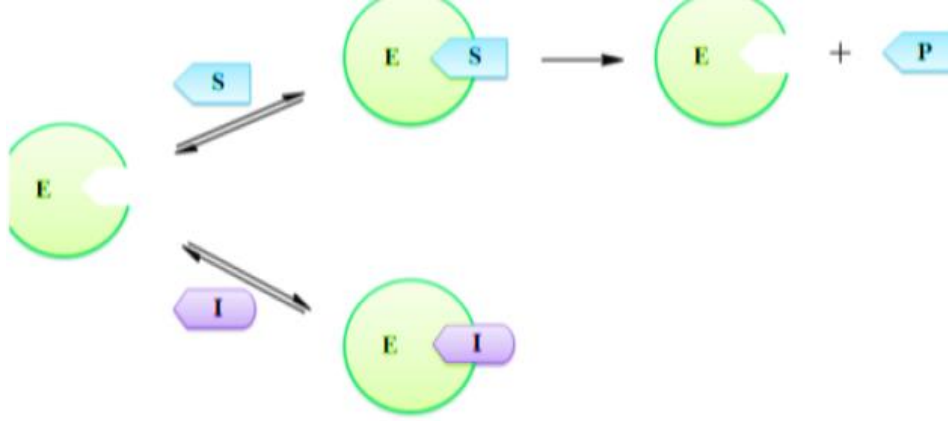
mekanizmasını, metabolizmadaki rolünü, aktivitesinin inhibitör veya aktivatörler tarafından nasıl kontrol edebileceğini ortaya koyabilir (Lehninger 2005; Voet ve Voet 2010).

Enzimlerin canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları, aktivitelerini artırıcı yönde etkileyen bileşiklere aktivatör denilmektedir. Bu aktivatörler genelde küçük iyonlar ya da fazla büyük olmayan bileşiklerdir (Gözükara 1989).

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve yok edilmesine de inhibisyon denir. Buna neden olan bileşiklere ise inhibitör adı verilir. Bu yapılar genelde küçük molekül ağırlığında bileşikler ya da iyonlardır. Enzimatik aktivite inhibisyonu, biyolojik sistemlerde kontrol mekanizması oluşturduğu için bu olay biyolojik sistemler açısından önemlidir. Hem enzim etki mekanizmalarının da hem de metabolik yolların aydınlatılmasında inhibitörler, biyokimyacılar açısından önemli bir yere sahiptir (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzimatik aktivite inhibisyonu iki ana gruba ayrılır;

1. Dönüşümlü inhibisyon: Bu inhibisyon türü üç gruba ayrılır. Bunlar;

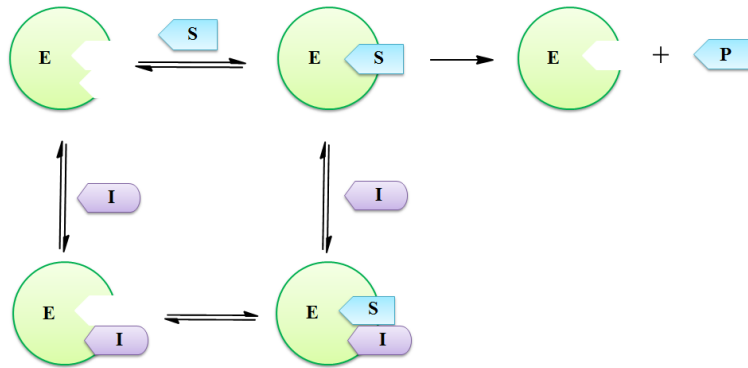
i. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon: Yapı itibarıyla inhibitör substrata benzemekte olup enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını önlemektedir. Fakat enzime dönüşümlü bağlanan inhibitörün substrat konsantrasyonu artırıldığı durumlarda inhibitörlerin inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabılır. Başka bir söylemle enzimin V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak max. hız) değeri değişmezken K_m (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değerinde artış gözlenir (Şekil 1.6) (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.6. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

(www.mustafaaltinisik.org)

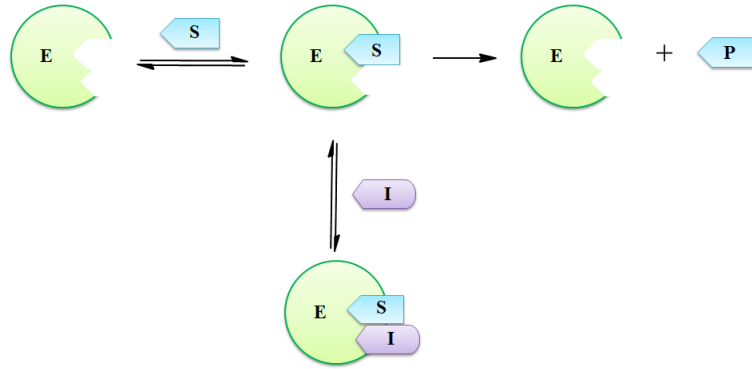
ii. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör ve substrat arasında enzim aktif bölgesine bağlanmada bir yarış yoktur. Çünkü inhibitör enziminin farklı bir bölgesine bağlanmaktadır. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_m değeri sabittir. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanabilmesi ile enzimin EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleksi oluşmaktadır (Şekil 1.7) (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.7. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

(www.mustafaaltinisik.org)

iii. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon türü ise; bir substratlı reaksiyonlarda ender görülürken, daha çok iki substratlı reaksiyonlarda yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. İnhibitör serbest enzime değil sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanabilmektedir. Bu veriler ışığında inhibitörlerin var olduğu durumlarda ortamdan sürekli olarak ES kompleksi uzaklaşır ve bunun bir sonucu olarak K_m azalır. Ayrıca bu ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} değeri de azalır (Şekil 1.8) (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

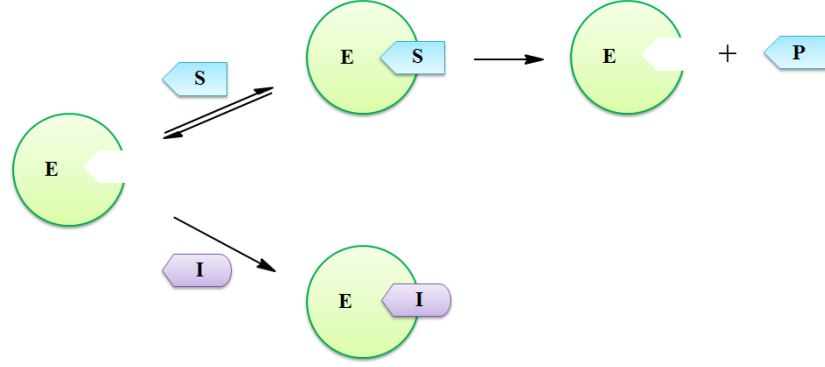


Şekil 1.8. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi
(www.mustafaaltinisik.org)

Multienzim sistemlerin birçoğu, sahip oldukları net reaksiyon hızlarını düzenleme kapasiteleri ile seri reaksiyonlar sergileyebilmektedir. Bu yüzden dönüşümlü inhibisyon sınıfının bir alt dalı olan nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyonunun özel bir türü olarak karşımıza çıkan lineer karışık tür inhibisyonun da; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Seri reaksiyonların son ürünü bu sistemlerin çoğunda belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini ya da dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Allosterik adı verilen bu enzimlerin gerçekleştirmiş olduğu bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir.

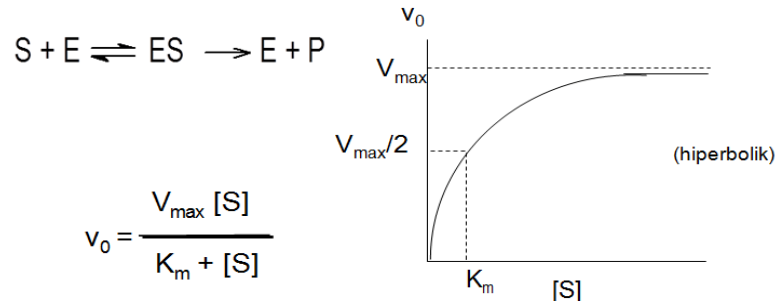
2. Dönüşümsüz inhibisyon: Bu inhibisyon türünde enzimlerin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. Çünkü inhibitörün enzime kovalent olarak bağlanması ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturması ile oluşan bir inhibisyon çeşididir. Dönüşümsüz inhibisyon da V_{max} azalır, K_m ise değişime uğramaz (Şekil 1.9) (Segel

1975; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu durum yarışmasız inhibisyona benzer bu nedenle iki inhibisyon türünü birbirinden ayırmak için değişik enzim konsantrasyonlarının da V_{max} ölçülerek bir grafik hazırlanır elde edilen eğriden inhibisyon türü belirlenir.



Şekil 1.9. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi (www.mustafaaltinisik.org)

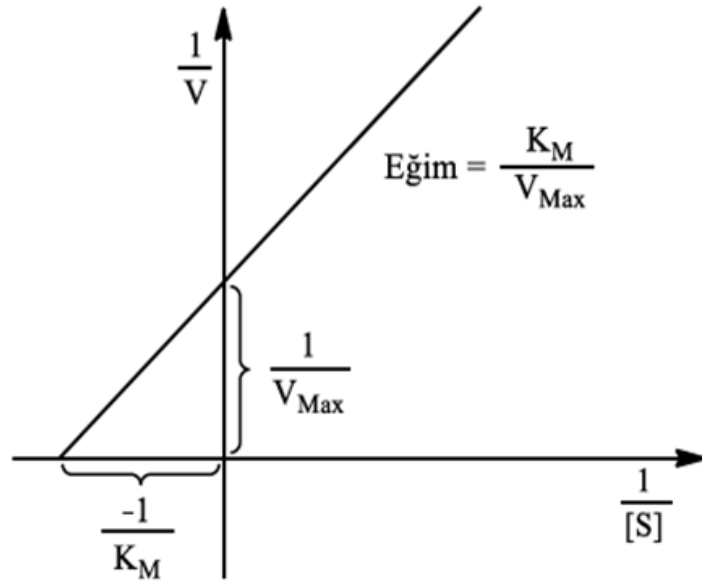
Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında MichaelisMenten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı araştırılır. Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır. Burada V_{max} ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis–Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir (Menten ve Michaelis 1913).



Şekil 1.10. Michaelis–Menten denkleminin ve grafiği

Michaelis–Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık derecede gerçekteşir. Üçüncü bölgede $[S] \ll K_m$ 'dir. $V = V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla gerçekteşir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılan eşitlik, Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver ve Burk 1934).

Michaelis-Menten denklemi; bir hiperbolik eğrinin denklemi olmasından ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan, bir enzime ait V_{max} ve K_m 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir. Bunlardan Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen Lineweaver-Burk denklemi, en sık yararlanılanıdır (Lineweaver ve Burk 1934).



şekil 1.11. Lineweaver-Burk grafiği (Wikipedia)

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

İlk olarak geleneksel yöntemle enzimler substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime / sözcük grubuna 'az' son eki eklenerek adlandırılırlar. Ancak yeni sınıflamada enzimlere, Enzim Kod (E.C.) numarası olarak 4 haneli bir numara verilmektedir. İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasına aittir.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır (Turgut 2009);

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme (elektron transferi) reaksiyonlarını katalize ederler.

2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalize ederler.

3. Hidrolazlar: Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler.

4. Liyazlar: C-C, C-O ve belli C-N bağlarının yıkımını katalize ederler.

5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri (izomerik şekil oluşumu reaksiyonları) katalize ederler.

6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların hidrolizi ile birlikte yürüyen karbon ve O, S, N arası bağ oluşumunu katalizlerler.

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimlerin yüksek sıcaklıklarda hızlı inaktivasyonu büyük bir problem oluşturmaktadır. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için çalışma koşullarında uzun süre stabil olmaları gerekmektedir. Enzimler protein mühendisliği, immobilizasyon teknikleri, stabilize edici katkı maddeleri ya da kimyasal modifikasyon yöntemleri ile uygulama koşullarında daha dirençli bir yapıya dönüştürülürler (Altıkatoğlu vd 2009). Endüstriyel alanda, özellikle enzimatik ve biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılan termofilik enzimler şu özelliklere sahiptir (Adıgüzel 2006);

1. Termofilik organizmalardan elde edilen enzimlerin termostabil özelliklerine bağlı olarak raf ömürleri uzundur.

2. Denatüre edici ajanlara karşı daha dirençlidirler. Bu özelliği organik çözücülere yüksek ve düşük pH'ya karşı gösterdikleri direnç mekanizmasıyla sağlarlar.

3. Uygun olmayan şartlarda çoğalabildiklerinden, genel bir direnç mekanizmasına sahiptirler.

4. Viskoziteyi ve çözünürlüğü arttırırlar.

5. Mezofilik şartlarda gelişen patojen mikroorganizmalar yüksek sıcaklık değerlerinde aktivitelerini kaybettiklerinden, mikrobiyal kontaminasyon engellenmiş olur.

6. Kararsız bileşikler tarafından reaksiyonların engellenmesini önlerler.

Modern enzim teknolojisi; gıda sanayinde, yiyeceklerin korunmasında, ham materyallerin daha etkili kullanılmasında, yiyeceklerin görüntü ve tat gibi özelliklerinin değiştirilerek kalitesinin arttırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, termofilik enzimler ilaç, yem, dericilik, kağıt, kozmetik sanayide ve ksenobiyotiklerin giderilmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Bunun yanı sıra enzimler çevredeki kirliliği alanında da etkilidirler. Özellikle işlem maliyetini düşürmek ve çevreye zararlı maddelerin gideriminde kullanılmaktadırlar (Rao ve ark. 1998; Wolfgang 2004).

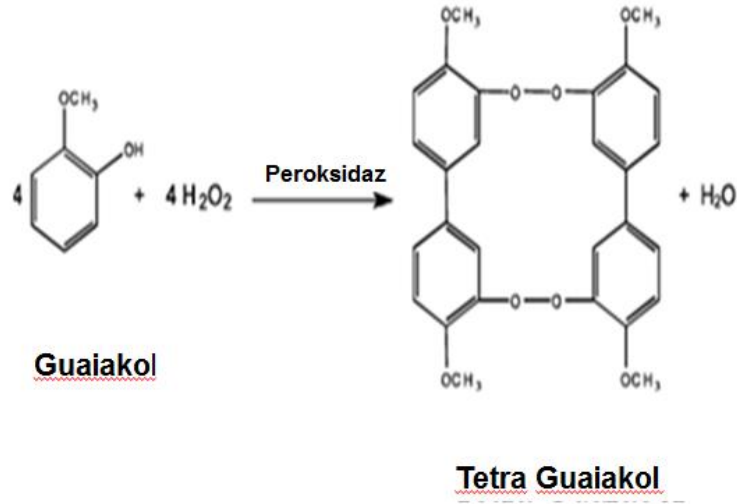
1.2. Peroksidaz

Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H_2O_2 bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Fodil ve ark. 2012).

POD'lar prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX ihtiva eden hem proteinleridir (Adams 1978; Whitaker 1994). POD'lar fenolik asitleri oksitleyen demir içeren enzimlerdir (Robinson, 1991). POD enzimlerinin spesifik aktivite, optimum pH, kofaktörler, substrat ilgisi ve inhibitörlere hassasiyet gibi biyokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren birçok izoenzimi vardır (Fric 1976). POD'ların organizma içerisinde ilk olarak protein kısmı sentezlenir. Ancak enzim fonksiyonel

olarak aktif değildir. Apoprotein ile hem grubunun birleştirilmesiyle enzim aktiflik formuna ulaşmış olur (Fric 1976; Van Huystee 1987).

Guaiakol, kateşin, klorojenik asit ve katekol gibi birtakım fenolik moleküller bitki POD'ları tarafından peroksit karşısında oksidasyonu gerçekleştirebilir (Onsa ve ark. 2004). Yukarıda sayılan aromatik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılarak metabolizmada meydana gelen H_2O_2 ' i suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürmektedirler (Şekil 1.12) (Robinson ve ark. 1987; Kämpf ve ark. 1984).



Şekil 1.12. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak H_2O_2 ' i giderme mekanizması

Canlı organizmada meydana gelen H_2O_2 oksitleyici özelliğe sahip olduğu için hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Hücre içinde bu görev antioksidan özellik gösteren katalaz ve POD enzimleri tarafından düzenlenmektedir (Halliwell 1984). Hücre içindeki H_2O_2 miktarı peroksidazlarda katalazlar tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer bölümlerinde POD enzimleri tarafından düzenlenmektedir (Scandalios ve ark. 1994).

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki POD enzimi bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry 1986), çimlenme (Morohashi 2002), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini ve ark. 1997),

savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa ve ark. 1991), lignin biyosentezi (Duarte ve ark. 2000), hormonal faaliyet (Wakamatsu ve Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga ve ark. 2001) gibi hayati fonksiyonlarda çok önemli görevler üstlenmektedir. POD'un organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılması bir başka önemli fonksiyonudur (Adam ve ark. 1999).

POD, hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi fenolik ve fenolik olmayan çok sayıda bileşiğin dehidrogenasyonunu da katalizler. Bu moleküller arasında 2-kresol, 2-toluidin, guaiakol, pirogallol, lökomalaşit yeşili, 4,4'-diaminodifenilen amin, propiyonil promozin, benzidin, o-tolidin, di-o-anisidin ve bazı azo-boya türevleri sayılabilir (Fortea ve ark. 2011; Fodil ve ark. 2012).

Peroksidazlar (lignin peroksidazları, mangan peroksidazları, myeloperoksidaz, bromoperoksidaz, katalaz-peroksidaz, askorbat peroksidaz ve mangan-bağımsız peroksidazları içerisine alır), lakkaz ve H₂O₂ oluşturan oksidazlar, lignin biyoyıkımını gerçekleştiren enzim sistemlerinin bileşenleridirler. Peroksidazların ekstraselüler lokasyonları ve endüstriyel uygulamalardaki potansiyeli (bu potansiyelin çoğu, *Phanerochaete chrysosporium* gibi Basidiomycota grubu funguslara ait peroksidazların lignin üzerine etkisini kapsamaktadır) yakın geçmişte fungal peroksidazlar üzerine yapılan çalışmalar sayısını arttırmıştır. *P. chrysosporium* türü kullanılarak üzerinde en fazla çalışma yapılan peroksidaz çeşidi; lignin ve mangan-bağımlı peroksidazdır (Jassey ve ark. 2012).

Birinci sınıf içerisinde yer alan enzimler intraselüler peroksidazlardır. Bu grup: mitokondriyal elektron transfer zincirinde bulunan ve muhtemelen toksik peroksidazlara karşı koruma sağlayan, çözünebilir bir protein olan maya sitokrom c peroksidazını; gelişmiş bitkilerdeki kloroplastlar ve sitozoldeki hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasından sorumlu ana enzim olan askorbat peroksidazları, hem peroksidaz hem de katalaz aktivitesi sergileyen bakteriyel peroksidazları içerisine almaktadır (Mittler ve Zilinskas 1994; Shigeoka ve ark. 2002; Shi ve ark 2008).

İkinci sınıfta ise, lignin peroksidazlar ve mangan-peroksidazlar gibi salınan fungal peroksidazları içerisine alır. Bunlar ligninin yıkımında rol alan monomerik

glikoproteinlerdir. Mangan peroksidaz söz konusu olduğunda Mn^{2+} indirgeyici substrat olarak görev yapar (Fodil ve ark. 2012). Lignin peroksidazların izo-formları, lignin ve ilişkili bileşiklerin depolimerizasyonunun başlangıcında merkezi bir rol oynarlar ve azoboyalar ile diğer aromatik kirleticiler üzerinde de etki gösterebilirler. Lignin peroksidazların, veratril alkolü veratraldehite okside ettikleri de bilinmektedir (Kirk ve Farrell 1987; Thakker ve. 1992). Mangan-peroksidazlar, aynı zamanda lignin ve bir grup fenolik lignin model bileşiklerinin oksidasyon ve depolimerizasyonunu da hidrojen peroksit aracılığı ile katalizlemektedir (Heinfling 1998; Janusz ve. 2013).

Üçüncü sınıf üyelerini ise, salınan bitkisel peroksidazlar oluşturur. Üçüncü sınıf peroksidazlar da, monomerik glikoprotein yapısındadır. Bu sınıf hurma yaprakları, brokoli, lahana, arpa, bezelye, pamuk, çilek gibi birçok bitki peroksidazını içeren geniş bir bitki profilini kapsamaktadır (McLellan ve Robinson 1987; Halpin ve ark 1989; Lee ve Klein 1990; Triplett ve Mellon 1992; Civello ve. 1995; Kristensen 1999; Deepa ve Arumughan 2002; Thongsook ve Barrett 2005; Nadaroğlu 2009).

Peroksidaz; bir oksidoredüktaz olup H_2O_2 ile çeşitli elektron donörlerinin oksidasyonunu katalize eder ve protestik grup olarak 'b' tip heme taşır. Bu mekanizmada enzim, Fe içeren bir porfirin katyon radikalı olan bir bileşik oluşturmak için peroksitin bir ekivalenti ile reaksiyon verir. Bu iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu olup bu reaksiyondaki hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. Bir oksitleme ekivalenti ortadaki oksiferrili vererek demir üzerine yerleşir. Bileşik II sonra I substrat radikalı vermek için organik substratı yükseltger. I, II ürününü vererek ikinci bir reaksiyona maruz kalır. Bileşik II normal bir porfirin ligand için düzenlenmiş oksiferril bir merkez içerir. Sonuç olarak bileşik II diğer substratla etkileşerek doğal haline geri indirgenir (Battistuzzi ve 2012).

Peroksidazlar ayrıca, geniş endüstriyel uygulamalara sahip olan bir enzimdir. Peroksidazlar pH, DNA, çinko, bakır ve diğer metallerin belirlenmesinde, gıda prosesi süresince şekillenen reaktif oksijen türleri için de indikatör, fenollü reçine sentezleri için ise katalizör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca peroksidaz enziminin,

endüstriyel atık sularının işlenmesinde, yapıştırıcılarda, bilgisayar çipleri, araba parçaları ile konserve kutuları ve davul astarları gibi çoğu üretim proseslerinde kullanımı hakkında birçok araştırma bulunmaktadır (Khatun ve. 2012).

POD yüksek hassasiyeti sayesinde klinik tanı ve mikroanalitik uygulamalar için oldukça önemli bir ayıraç olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Ek olarak POD kimya, ilaç ve gıda sanayilerinde yeni uygulamalarla dikkat çekmektedir (Kwak ve ark. 1996).

POD enzimi sağlık alanında, bağışıklık analiz kitlerinde ve laboratuvar deneylerinin klinik teşhisi için belirteçlerin önemli bir bileşeni olarak geniş bir şekilde kullanılmaktadır. POD atık sularda oluşan toksik fenollerin bozulmasında, sentetik boyaların renk giderilmesinde, organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunu katalize edebilir. Son zamanlarda POD enzimi, deterjan formulasyonunun katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Peroksidazlar aynı zamanda çeşitli polimerleri sentezlemek, organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunu ilerletmek ve biyotedavi dolayısıyla serbest radikallere yol açan gittikçe artan çekici katalizörlerdir (Humaira ve Qayyum 2010).

Pamuk elyafının bünyesinde pigment halinde bulunan renkli maddeler, ham pamuğun sarı/kahve renk/renklerinin oluşumundan sorumludur. Pişirme ve müteakip yıkamalar ile temiz elde edilse de, az miktarda pigment hala malzeme üzerinde kalmaktadır. Bu nedenle boyanacak ürünlerin önemli bir miktarı için ağartma işlemi gerekmektedir. Baskı yapılacak veya beyaz olarak kullanılacak malzemeler için ağartma şarttır. Pamuk üzerinden pigment boyar maddesini uzaklaştırmanın en iyi yolu oksidasyondur. Oksidan madde olarak sodyum hipoklorit (NaClO), sodyum klorit (NaClO_2) veya hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılır. Günümüzde en yaygın kullanılan ağartıcı kimyasal hidrojen peroksittir. Endüstride iplikler üzerine fazla miktarda hidrojen peroksit uygulanır ve ağartma işlemleri bittikten sonra bile ortamda hidrojen peroksit bulunur. Bu nedenle, ön terbiye işlemi bitirilmeden önce ortamdaki hidrojen peroksitin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için çok defa yıkama yapmanın yeterli olacağı düşünülse de, çevreye verilecek hidrojen peroksitin ekolojik zararları nedeniyle günümüzde, hidrojen peroksitin peroksidaz enzimi

yardımı ile parçalanması yoluna gidilmiştir. Böylece boyama işlemi öncesi kullanılan hidrojen peroksit, durulamaya gerek kalmadan enzimatik tepkime ile su ve oksijene dönüştürülür ve böylece çevreye verebileceği muhtemel zararın önüne geçilmiş olur (O'Neill ve. 2000).

Günümüzde 100.000'in üzerinde sentetik boya ticari olarak kullanılmakta ve yılda 700.000 ton boya üretimi yapılmaktadır. Bu boyaların %10-15'i boyama prosesleri sonucunda atık su ile çevreye verilmektedir (Wong ve ark. 1999). Ortama verilen bu tekstil boyar maddelerinin tüm canlılar üzerinde olumsuz etkileri bilinmektedir (Soares ve ark. 2001; Friedrich ve ark. 2005).

Farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemler veya bunların kombinasyonları kullanılmasına rağmen bütün bu yöntemler tekstil atık suyunun arıtılmasında çok da etkili olamamaktadır. Son dönemlerde uygun mantarlar ya da bakteriler kullanılan mikrobiyal arıtım yöntemleri üzerinde çalışmalar sürmektedir. Oksijensiz ortamlarda, atık suyun renginin giderilmesi işlemlerinde çoğunlukla çeşitli bakteri suşlarının birleşimi kullanılmaktadır (Gottlieb ve ark. 2003). Ancak böylesi boyaların parçalanması zehirli aminlerin ortaya çıkması ile sonuçlanır. Bu nedenle, bu bileşiklerin oksijenli ortamda oksidatif olarak parçalanması tavsiye edilmektedir (O'Neill ve ark. 2000).

1.2.1. Enzim kökeni

Bitki POD'ları, izoelektroforetik hareketlerine göre üç alt gruba (asidik, nötr ve katyonik) bölünebilir. Birincil yapıdaki farklılıklara dayanarak, bitki peroksidaz süper ailesi üç sınıfa ayrılabilir: Sınıf I, II ve III. Sınıf I POD'lar, bitkilerde, bakterilerde ve mayalarda hücre içi enzimleri içerir. Sitokrom c peroksidaz (CcP), askorbat peroksidaz (APX) ve bakterial katalaz peroksidazları içeren hücre içi peroksidazlardır. Sınıf II POD'lar manganaz peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi salgılanan "fungal enzimleri" hücre dışı peroksidazlarıdır. Sınıf III, klasik bitkilerden salgılanan peroksidazları içerir. Kararlı olması ve yabani turp (horseradish) köklerinden kolayca izole edilmesi nedeniyle birçok uygulamada yer alan

“horseradish peroksidaz” izoenzim C (HRP) III. Grup'ta yer almaktadır. Peroksidaz ailesinin yapı-fonksiyon ilişkileri ile ilgili çalışmaların çoğu, III. grup'un temsilcisi gibi alınan HRP ile çalışılmıştır (Rodriguez-Lopez 1996). Sınıf III peroksidaz enzimleri yaklaşık 300 amino aside sahiptir (Clemente, 2002).

Mevcut sınıflandırmaya göre, bitki peroksidaz süper ailesi prokaryotik enzimler (bakteriyel katalaz-peroksidazlar, maya sitokrom c peroksidaz, bitki askorbat peroksidazları), fungal enzimler (lignin ve manganez peroksidazlar ve bitki türü enzimler) ve bitkilerden elde edilenlerdir.

Bitki hücrelerinde çözünür, iyonik veya kovalent olarak hücre duvarı bileşenleri formlarına bağlıdır. Bu enzimler, çeşitli işlemlerde, örneğin hücre duvarına bağlı POD'lar, lignifikasyon süreci ve bitki savunma mekanizmaları ile hücre büyümesidir (Belcarz ve diğerleri, 2008).

POD' un birçok bitkide bulunduğu kayıt edilmiştir (Civello ve diğerleri, 1995). Bunlar arasında, bahar lahanası (Belcarz ve diğerleri, 2008), portakal (Clemente, 2002), kivi meyvesi (Fang ve diğerleri, 2008), nane yaprakları (Shalini ve diğerleri, 2008), kırmızıbiber (Serrano Martinez ve ark. 2008), yaban turpu (Veitch, 2004; Sariri ve diğerleri, 2006), kakao çekirdeği (Sakharov ve Ardila, 1999), havuç (Soysal ve Söylemez, 2005), mısır kökü (Maksimoviç Butterut), kabak (Agüero ve diğerleri, 2008), domates (Savic ve diğerleri, 2008) ve ayçiçeği kökleri (Jouili ve ark, 2008) örnek olarak gösterilebilir.

1.2.2. POD'un fizyolojik rolü

Bu enzim hormonların düzenlenmesi, savunma mekanizmaları, meyve ve sebzelerin büyümesi ve olgunlaşması sırasında indolasetik asidin bozunması ve lignin biyosentezi gibi birçok bitki fonksiyonunda bulunur. POD, lignin oluşum sürecinin geç evrelerine ve patojenik mikroorganizmalar tarafından hasar gören veya bu organlarla bulaşmış dokuların korunmasına katılır. Enzimin, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asidi (ACC) etilen haline dönüştürmek için in vitro kapasitesi zaten kurulmuştur. Dahası, fenollerin varlığında klorofili in- vitro olarak degrade edebilir ve indolasetik asidin oksidasyonuna katılabilir olduğu düşüncesiyle asit POD'ların lignifikasyon sürecine katılacağı bir model önerilmiştir (Civello ve diğerleri, 1995).

POD, bitkilerde hastalık, hücrel hasar, travma hasarı, enfeksiyon vb. gibi biyokimyasal bir gösterge olarak en yaygın kullanılan enzimdir. POD aktivitesi, meyvelerde olgunlaşma ve yaşlanma sırasında artmaktadır. Mango, üzüm, elma, armut ve muz bunlara örnektir . Etilen biyogenezini gibi, membran bütünlüğü, solunum kontrolü ve oksin ve sitokin oksidatif metabolizması gibi bitki sistemlerinde düzenleyici bir rol oynar (Ory ve Angelo, 1977).

1.2.3. POD'un Fiziki Özellikleri

1.2.3.a. İzoenzimler

Peroksidazın birden fazla formunun ortaya çıkması ilk olarak yabancıturpu köklerinde bulunmuştur. Bu doku, molekül ağırlığı ve amino asit bileşiminde benzer birkaç büyük izoenzim formları içerir (Ory ve Angelo, 1977). Sebze ve meyveler için düşük ve yüksek pI değerlerine sahip anyonik ve katyonik türler de dahil olmak üzere çeşitli isoperoksidazların hem çözünür hem de iyonik olarak bağlanmış formlar olarak ekstrakte edilebileceği bulundu (Forsyth ve Robinson, 1998).

POD'lar çok sayıda izoenzimatik formda bulunur ve izoelektrik noktalarına göre anyonik (asidik) ve katyonik (bazik) türlere ayrılırlar. Anyonik POD'lar lignifikasyon ve suberinizasyon süreçlerinde yer alırlar. Bununla birlikte, katyonik POD'lar, lignin ve süberinin biyosentezinde yer alır (Hatzilazarou ve ark., 2006).

Kore turpunda en az sekiz adet izoperoksidaz bulunmaktadır ve altısı homojenizasyon ile saflaştırılmıştır. Kore turp peroksidazlarının fiziko-kimyasal, katalitik ve immünolojik özellikleri, farklı isoperoksidazların in vivo fizyolojik substratlara karşı farklı özgülüklere sahip olabileceğini göstermiştir (Lee ve ark. 2001).

1.2.3.b. Nonprotein (protein olmayan) kısım

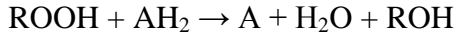
POD'lar, çok çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonu için H_2O_2 'yi düşüren heme içeren enzimlerdir. POD'lar, demir içeren peroksidazlar ve flavoprotein peroksidazlar olarak sınıflandırılmıştır. Demir içeren peroksidazlar

ayrıca ferriprotoporfirin peroksidazlar ve verdoperoksidazlar olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Ferriprotoporfirin grubu, yüksek bitkilerde (yaban turbu, turpgil, şalgam, incir sapı), hayvanlarda ve mikroorganizmalarda (maya sitokrom c peroksidaz) bulunur. Bu peroksidazın tamamında, hem grubundan ferriprotoporfirin III bulunur; bunlar, asidik aseton ile muamele gören protein molekülüdür. Ferriprotoporfirin III kofaktöründen ötürü saflaştırıldığında enzimler son derece kahverengi renktedir (Whitaker, 1993).

Flavoprotein peroksidazlar, *Streptococcus faecalis* de dahil olmak üzere çeşitli streptokoklardan ve birkaç hayvan dokusundan saflaştırılmıştır. Bu peroksidazların hem grubu FAD'dır (Whitaker, 1993).

1.2.3.c. Substrat spesifikliğı

POD'lar birçok maddenin oksidasyonunu katalize eden oksitleyici enzimlerdir. (Sariri ve diğeri, 2006). Bu enzim aşağıdaki tepkimeyi katalize eder:



Burada A bir hidrojen vericisidir (Göğüş ve Fadiloğlu, 2006). Bazı iyi bilinen peroksidaz substratları (hidrojen vericiler), yani kateşin, vanilin, o-dianisidin (Lee ve diğeri, 2001; Leon ve diğ., 2002; Clemente, 2002; Soysal ve Söylemez, 2005; Doğan ve diğeri, 2007; o-fenilendiamin (Lee ve diğeri, 2001; Sakharov ve diğeri, 2002; Leon ve diğeri, 2002; Doğan ve diğeri, 2007), diaminobenzidin ve tropolon (Ratcliffe ve ark.1994), 2,2-azino-bis-3 etilbenzotiazol-6-sülfonik asit (ABTS) (Rodrigo ve diğeri, 1996; Rani ve Abraham, 2006; Serrano-Martinez ve diğeri, 2008), guaiakol (Thongsook ve Barrett, 2005a; Ghamsari ve diğeri, 2007; Jouili ve diğeri, 2008; Rudra ve ark., 2008), katekol (Sakharov ve Ardila, 1999; Troiani ve ark., 2003) ve pirogalloldür (Soysal ve Söylemez, 2005).

POD substratları geleneksel olarak oksidasyon oranlarına göre iki gruba ayrılabilir. Yavaş oksitlenmiş substratlar grubu, elektron vericileri içerir. Özellikle, bitkilerde yüksek işlevsel etkinliğe sahip olan maddeler NADH, indol-3-asetik asit (IAA) ve askorbik asit (AA). POD, indol-3-asetik asitin hem hidrojen peroksit içeren hem de içermeyen oksidasyonunu katalize eder (Rogozhin ve Rogozhin, 2004).

POD'lar in vitro olarak yaygın olarak kullanılan bir indirgeyici substrat olan guaiakolü (o-metoksifenol) oksitleyen POD'lara guaiakol peroksidazlar denir. Bunlar sitozol, vakuol, hücre duvarı, apoplast ve hücre dışı ortamda bulunur, ancak organellerde yoktur ve bitki büyümesi ve gelişimi ile ilgili bir dizi proseste yer aldığı düşünülmektedir. Askorbat peroksidazlar, bitki peroksidazlarına ait tercihi gösteren başka bir bitki grubuna aittir (Ghamsari ve diğerleri, 2007).

1.2.3.d. Optimum pH

Farklı POD'lar tarafından kataliz için en uygun koşulların aynı olmadığı çok iyi bilinmektedir. POD reaksiyonlarının çeşitli pH bağımlılığı, farklı substratlar için farklı olduğu bildirilmiştir (Sakharov ve diğerleri, 2002) Öte yandan, değişik substratları kullanarak çeşitli kaynaklardan elde edilen peroksidazların optimum pH değerleri farklılık göstermektedir. (Thongsook ve Barrett, 2005a).

Çeşitli kaynaklardan arıtılmış POD 'ların optimum pH'larının çoğunlukla 4.5-6.5 aralığında olduğu bildirilmiştir. Asidik şalgam peroksidazları için optimum pH'ın, H vericisi olarak ABTS ile 5 ile 5.5 arasında olduğu bildirilmiştir (Duarte-Vazquez ve ark.2000). Domates suyundaki POD izoenziminin, H vericisi olarak guaiakol ile 5.5 optimum pH'ya sahip olduğu bildirilmiştir (Jen ve diğerleri, 1980). Çilek POD için optimum pH değeri pH 6 (Civello ve diğerleri, 1995), patates filizi ve yumruları için sırasıyla 4-4.5' tir (Boucoiran ve ark., 2000). Ispanak yaprağın için optimum pH 5.2 ve karnabahar için 5 (Köksal ve ark. 2007) olarak bulunmuştur. Palmiye ağaç yapraklarından heme-peroksidaz geniş bir pH aralığında dengelidir ve maksimum pH değeri pH 7.0'da bulunmuştur . (Sakharov 2001)

Tartary karabuğday kepeği POD'sının pH eğrisinin, substrat olarak guaiakol kullanıldığında pH 4.5 ile 9.0 arasında daha geniş bir stabil aralık, optimum pH'ı yaklaşık 6.5'de ve asidik ve alkalın koşullara karşı kararlı olduğu bulunmuştur (Zhang ve diğerleri, 1999). Vanilya POD yaklaşık 3.8 'lik bir pH'da maksimum aktiviteye sahiptir (Marquez ve diğerleri, 2008). Marul meyvesi için palmiye yaprağı POD için optimum pH değeri 5.0'dır (Deepa ve Arumughan, 2002). Fıstık POD için 3.6 (Ravindra ve Van-Huystee, 1984), 4.0'dır (Mdluli, 2005). Brokoli içerisindeki

POD izoenzimleri, nötr peroksidaz için 6.0 ve asitik peroksidaz için 4.0 optimum bir pH değerine sahip oldukları bildirilmiştir (Thongsook ve Barrett, 2005a).

1.2.3.e. Optimum sıcaklık

Farklı enzim kaynakları, farklı optimum sıcaklık değerlerini göstermektedir. Çeşitli kaynaklardan POD' un optimum sıcaklığı 25-40 °C aralığında değişir. Örneğin optimum sıcaklık değeri Vanilya POD için 16 °C (Marquez ve diğerleri, 2008) üzüm POD için 40 °C (Sciancalepore ve diğerleri, 1985), çilek POD için 30 °C (Civello ve diğerleri, 1995) ve ayçiçeği POD için ise 40 °C' dir (Jouili ve diğerleri, 2008) Ispanak yaprağı ve karnabahar için optimum sıcaklık değerleri sarasıyla 60 °C ve 30 °C olarak bulunmuştur (Köksal ve ark. 2007)

1.2.3.f. İzoelektrik nokta (pI)

Yüksek bitkilerde bulunan POD, bazik, nötr veya asidik pI'yi içerir ve tek bir sebze, geniş pI değerlerine sahip birkaç izoenzim içerebilir. Asidik POD'lar, şalgam köklerinde bulunur, pI 3 (Duarte-Vazquez ve ark., 2000); biber meyveleri, pI 3.8 (Pomar v.d., 1997); patates yumrusu filizi, pI 3'ün çözünür fraksiyonu (Boucoiran ve diğerleri, 2000) ve domatesin tuz ekstresi, pI 3.5 (Marangoni ve diğerleri, 1989). ve patates yumrusu filizlerinin çözünür fraksiyonu pI 10 olarak bulunmuştur (Boucoiran ve diğerleri, 2000) Nötr şalgam POD'sının pI'si 7.2 olarak bulunmuştur (Duarte-Vazquez ve diğerleri, 2001).

Olgunlaştırılan muz meyvelerden elde edilen POD, izoelektrik noktaları yaklaşık 3.3 ile 9.5 arasında değişen en az oniki izoenzimden oluşur (Ory ve Angelo, 1977). Yabanturpu POD'nun başlıca üç izoenzimi, 6.1, 6.9 ve 8.9 pI değerlerine sahiptir (Wong, 1995). Saflaştırılmış turp peroksidazın pI değerleri 4.5, 5.2 ve 9.0'dur (Clemente, 2002). Çilek meyvesinde iki POD izoenzimi tespit edilmiştir. Temel izotropik noktalar 9.5-10.0 olarak belirlenmiştir (Civello ve diğerleri, 1995). Kokulu sardunya kallusundan gelen isperoksidaz 3 farklı izoelektrik noktaya sahiptir: 9.1, 9.0, 8.6 (Lee ve diğerleri, 2001). Brussel filizindeki dört isperoksidazın izoelektrik noktaları 3.5, 4.9, 9.5, 8.8'dir (Forsyth ve Robinson 1998). Brokoli pI sırasıyla asidik,

nötr ve bazik POD'lar için yaklaşık 4, 5 ve 8 iken (Thongsook ve Barrett, 2005a) marula meyvesi için 5,7 dir (Mdluli, 2005).

1.2.3.g. Moleküler ağırlık

Çeşitli kaynaklardan POD'nun molekül ağırlığı 26-70 kDa arasında bildirilmiştir. Bildirilen molekül kütlelerden bazıları, fıstık POD için 42 kDa (Chibbar ve Huystee, 1984), çilek POD için 56 kDa (Civello ve diğerleri, 1995), brussel filiz POD için 26-48 kDa (Forsyth ve Robinson, 1998), turp için 40 -46 kDa (Paul ve Stigbrand, 1970), yeşil kuşkonmaz POD'u için 34 kDa (Wang ve Luh, 1983), yağ palmyesi yaprağı ve pirinç POD'ları için 48 kDa (Ito ve diğerleri, 1991; Deepa ve Arumughan, 2002) , karnabahar için 85 kDa (Köksal ve ark. 2007) ve domates için 43 kDa' dur (Jen ve diğ., 1980), portakal POD'nun on bir izoenzimi, 22-44 kDa (Clemente, 1998) arasında molekül ağırlığına, nötr ve bazik brokoli POD'ların moleküler kütleleri 43 kDa ve asidik peroksidazın moleküler kütlesi 48 kDa'dır (Thongsook ve Barrett, 2005a) ve çilek meyvesinde iki POD izoenzimi saptanmıştır; basit tipte ve molekül kütleleri sırasıyla 58.1 ve 65.5 kDa (Civello ve diğerleri, 1995). Gözlemlenen farklılıklar, bitki POD'larında bulunan glikan zincirlerinin sayısı ve kompozisyonunu içeren polipeptit zinciridir (Van Huystee ve ark, 1992; Duarte-Vazquez ve diğ., 2001).

1.2.3.h. Katalitik özellikler

POD'lar için bildirilen dört tür katalitik aktivite vardır. Bunlar peroksidatik, oksitleyici, katalitik ve hidroksilasyon reaksiyonlarıdır. POD, oksidatif reaksiyonları (oksijenin elektron alıcı olduğu) ve klasik peroksidatik reaksiyonları katalize eder (hidrojen peroksit elektron alıcıdır) (Kay ve diğerleri, 1967; Swedin ve Theorell, 1940). Daha genel olarak fizyolojik bakımdan en önemli olduğu düşünülen peroksidatik reaksiyon, diğer üç reaksiyondan daha kapsamlı olarak incelenmiştir. Peroksidatik reaksiyonlar, p-kresol, guaiakol, resorsinol, benzidin ve o-dianisidin gibi çok çeşitli hidrojen vericilerinin varlığında ortaya çıkar. Belli POD'lar NADH, glutatyon veya sitokrom c gibi belirli hidrojen vericiler için daha büyük bir afiniteye

sahip gibi görünmektedir. Fizyolojik önem taşıyan hidrojen vericilerinin aydınlatılmasına yönelik bir yaklaşım afinite kromotografisinin kullanılmasıdır. Hasat sonrası dokularda şu anda en bariz öneme sahip peroksidatik reaksiyon, fasulye ve kuşkonmaz gibi sebzelerin sertleşmesini derinden etkileyebilen lignifikasyondur.

Hidrojen verici yokluğunda, POD hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştürür, ancak bu reaksiyon peroksidatik ve oksitleyici reaksiyonlardan yaklaşık 1000 kat daha yavaştır.

Oksidatif reaksiyon, moleküler oksijen ve uygun bir hidrojen vericisinin varlığını gerektirir. Hidrojen verici olarak adlandırılan örnekler, indol-3-asetik asit (IAA), oksalasetik asit, askorbik asit ve hidrokinnondur. Peroksidazın IAA oksidaz fonksiyonu, hasat sonrası meyve ve sebzelerde son derece önemli görünmektedir. Sitokininlerin POD tarafından oksidize edildiğine dair yeni kanıtlar da vardır (Ray, 1958). Oksidatif fonksiyon, membran lipid oksidasyonu ve temel tiol gruplarının oksidasyonu gibi bozulma reaksiyonlarına katkıda bulunabilir. Bitki büyüme hormonunun, indol-3-asetik asitin oksidatif bozunmasını katalize eden enzimin bir peroksidaz olduğu yönünde önemli kanıtlar vardır (Ray, 1958).

1.2.3.1. İnhibitörler ve aktivatörler

İnhibitörler POD tarafından katalize edilen reaksiyon oranlarını değişik şekilde etkileyebilir. Siyanür, florür ve azid iyonları, heme demirinin altıncı koordinasyon pozisyonunda kararlı komplekslerin oluşmasıyla POD'nun katalitik aktivitesini inhibe ederek H_2O_2 ile reaksiyonu önler. Bir dizi organik bileşik ara oksitler ile reaksiyona girerek peroksidazı inhibe eder. (Vallee ve Ulmer, 1972).

Bazı maddeler POD'u kimyasal olarak tepkimeye sokarak etkisiz hale getirir. Örneğin, fenilhidrazinin geri döndürülemez inaktivasyon etkisi, serbest radikal ürünler (muhtemelen bir triptofan kalıntısı) ile POD'un fonksiyonel gruplarının modifikasyonundan kaynaklanmaktadır. (Rogozhin ve diğerleri, 2000).

Bazı metal iyonlarının POD aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi de bildirilmiştir. Eupatorium odoratum'dan izole edilen POD, Hg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} gibi metal iyonlarına

kararlı bulunurken; Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} 'in ilavesi ile enzim aktivitesinde hafif bir düşüş gözlemlenmiştir (Rani ve Abraham, 2006).

Denenen bazı metal iyonlarının vanilya fasulyesi POD (Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Ca^{2+}) üzerinde düşük inhibitör etkiye sahip olduğu, Fe^{2+} ve Hg^{2+} 'nin önemli peroksidaz önleme özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur (Marquez ve ark., 2008).

Bitki POD aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir (Marquez ve diğerleri, 2008). Sodyumun *Eupatorium odoratum*'dan izole edilen POD'un Cl^- varlığında aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Rani ve Abraham, 2006). Guaiakol veya o-dianisidin oksidasyon oranları $CaCl_2$ ile artırılmıştır (Vianello ve ark. 1997). Glikoz ve sükröz ile POD aktivasyonu gözlemlenmiştir (Nicoli ve diğerleri, 1991).

1.2.3.i. Michaelis-Menten sabiti (K_m)

Farklı kaynaklardan gelen POD'un farklı kinetiği vardır. Ayrıca, her bir POD izoenzimi, farklı hidrojen verici ile farklı reaksiyon oranını gösterir.

Yeşil bezelyenin üç izoenzimi bulunmuştur. Bu izoenzimler için, hidrojen verici olarak kullanılan guaiakolün K_m değerleri 10.2, 10.8 ve 10.2 mM olarak bulunmuş ve hidrojen peroksit için her izoenzim için 2.6, 7.2 ve 4.3 mM olarak bulunmuştur. Hidrojen verici olarak pirogallol için K_m değerleri 4.2, 6.2 ve 2.0 mM ve hidrojen peroksitte peroksitin her izoenzimi için 2.6, 2.8 ve 3.0 mM bulunmuştur (Halpin ve diğerleri, 1989).

Havuç POD'sının bulunan K_m değerleri, guaiakol için 1.4 mM, o-dianisidin için 7.7×10^{-3} mM ve pirogallol için 0.34 mM olarak bildirilmiştir (Soysal ve Söylemez, 2005). Vanilya fasulyesi peroksidazı için, guaiakol için K_M değeri 3.8 mM olarak bulunmuştur (Marquez ve diğerleri, 2008). Palmiye yaprağı peroksidazının K_m değeri 3.96 mM (Deepa ve Arumughan, 2002), ıspanak peroksidazı 1.66 mM (Chen ve Asada, 1989) ve bezelye peroksidazı 0.04 mM olarak (Mittler ve Zilinskas, 1991) bulunmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Küresel yetiştirilen ve tüketilen buğdayın yaklaşık %95'i ekmeklik buğdaydır (*Triticum aestivum*). Ekmeklik buğday yaklaşık 9000 yıl önce ortaya çıkmış nispeten yeni bir türdür (Feldman ve Darı 2001). Buğday tanesi yapısal, metabolik, koruyucu veya depolama işlevleri olan yüzlerce protein içerir (Shewry 2009). Bunlar ana depolama bileşenleri ve toplam tahıl proteinin % 8' inden sorumlu olan gluten proteinleri içerir (Wrigley ve ark., 1988).

POD yaygın olarak birçok bitkide mevcut olmakla beraber ticari olarak en önemli kaynağının yaban turpu kökleri olduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur. Diğer taraftan farklı POD enzim türlerinin mevcudiyeti yeni analitik metotların ve potansiyel endüstriyel işlemlerin gelişmesine katkı sağlamıştır (Gülçin ve Yıldırım 2005). POD enzimi birçok bitkiden, örneğin hurma yapraklarından (Deepa ve Arumughan 2002), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005), tatlı patates yumrularından (Leon ve ark. 2002), şalgamdan (Hamed ve ark. 1998; Duarte ve ark. 2001), ısırgan otundan (Gülçin 2002), kavundan (Rodriguez ve ark. 2000), bürüksel lahanasından (McLellan ve Robinson 1987), lahanadan (McLellan ve Robinson 1987), karalahanadan (Gülçin ve Yıldırım, 2005), arpadan (Kristensen 1999), bamyadan (Yemenicioglu ve ark. 1998), portakaldan (Clemente 1998), çay yapraklarından (Kvaratskhelia ve ark. 1997), biberden (Pomar ve ark. 1997), karnabahar (Köksal ve ark. 2007) havuçtan (Nair ve ark. 1996), tütünden (Gazaryan ve Lagrimini 1996), yeşil bezelyeden (Halpin ve ark. 1989; Lee ve Klein 1990), ıspanaktan (El Shamei 1987), pamuktan (Triplett ve Mellon 1992), domatesten (Jen ve ark. 1980; Signoret ve Crouzet 1982) , çilekten (Civello ve ark. 1995) , bal kabağından, karnabazardan ve ıspanak yaprağından (Köksal ve ark. 2007) saflaştırılmıştır.

Bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmaların hepsinde birçok izoenzim yapıları bulunmuştur. Çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılan bu izoenzimler için genelde farklı moleküler ağırlık, stabil sıcaklık, optimum pH, substrat spesifitesi ve fizyolojik rol belirlenmiştir (Tıpawan ve Barrett 2005).

Örneğin enzimin molekül kütlesi brokoli (Tıpawan ve Barrett 2005) ve domateste (Jen ve ark. 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yaprakları (Deepa ve Arumughan 2002) 48 kDa olarak tayin edilmiştir. Oldukça farklı molekül kütleleri ise kuşkonmazda (Civello ve ark. 1995) 34 kDa ve çilekte (Civello ve ark. 1995) 65 kDa olarak tayin edilmiştir. Ayrıca Gülçin ve Yıldırım (2005) tarafından kara lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) saflaştırılan peroksidazın molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla diğerlerinden farklı olarak 95 kDa olarak belirlenmiştir. Lahana yaprağı için POD molekül ağırlığı 67 kDa olarak belirlenmiştir (Pandit ve P. Kharatmol, 2013) Acorus calamus için 32kDa (Ghosh, 2006), biberiye için 33 kDa (Aghelan ve Shariat 2015), şalgam kökünde 36 kDa (Duarte-Vazquezve ark. 2001), Horseradish'ta 40 kDa ve *Aspergillus terreus* için 43 kDa'lık molekül ağırlığı olduğu bildirilmiştir. Köksal ve ark.(2007) tarafından yapılan bal kabağında peroksidazın saflaştırılması çalışmasında peroksidaz enziminin molekül ağırlığı 85 kDa olarak bulunmuştur. Literatüre göre bitki peroksidazı için en yüksek moleküler ağırlık 95 kDa kara lahanada için bildirilmiştir.(Gülçin ve Yıldırım, 2005)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Na₂HPO₄, NaCl, Tris-HCl, CH₃COONa.3H₂O, Guaiakol, H₂O₂, NH₄(SO₄)₂, Coomassie Brilliant Blue G250, Etanol, Akrilamid-bisakrilamid, SDS, Glisin, İzopropil alkol, TCA, metanol, asetik asit, sitrik asit, CTAB, EDTA, sodyum azid, PER, TEMED, Tris, β-merkapto etanol, CuSO₄.5H₂O, C₆H₅Na₃O₇, Na₂CO₃, NaOH, Phenol –Folin –Ciocalteu reaktifi.

3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	Perkin elmer lambda 35
Kar-buz makinesi	Mayo ZBS100
pH-metre	Hanna ph20
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Dikey elektroforez cihazı	Bio-rad mini protean tetra cell
Su banyosu	Memmert WNE 22
Çalkalayıcı	WiseShake
Vorteks	Daihan VM-10 1
Peristaltik pompa:	Ismatec MCP
Isıticılı magnetik karıştırıcı	Daihan MSH20A
UV-Spektrofotometre küveti	3 cm ³ 'lük kuartz küvet
Soğutmalı santrifüj	Selecta centrifiger

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3. a. Enzim homojenatı ile ilgili çözeltiler

1. Fosfat tamponu (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 7): 14,2 g Na₂HPO₄ 80 ml saf suda çözüldü ve pH'sı HCl ile 7'ye ayarlandı ve 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 HCl ile 7'ye ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

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

1. Diyaliz tamponunu için, 1 M Na₂HPO₄ (pH 7) çözeltisi kullanıldı (3.1.3.a).

3.1.3.c. İyon-değişim kromatografisi için kullanılan çözeltiler

1. Yıkama tamponu için 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 7) çözeltisi kullanıldı (3.1.3. a)

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

3. Gradient çözeltisi (1 M NaCl): 14,6 g NaCl alınarak hacmi yıkama tamponu ile 250 ml olacak şekilde hazırlandı.

3.1.3.d. Jel-filtrasyon kromatografisi için kullanılan çözeltiler

Elüsyon çözeltisi için 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 7) çözeltisi kullanıldı (3.1.3. a)

3.1.3.e. pH'nın etkisinin incelenmesi için kullanılan çözeltiler

Asetat tamponu, fosfat tamponu, tris tamponu, 45 mM'lık guaiakol, 22,5 mM'lık H₂O₂ bölüm 3.1.3.e'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

3.1.3.f. Optimum pH çalışması sırasında kullanılan çözeltiler

1. 45 mM'lık Guaiakol çözeltisinin hazırlanması: 247 µl guaiakol alındı ve toplam hacim saf su ile 50 ml'e tamamlandı.

2. 22,5 mM'lık H₂O₂ çözeltisinin hazırlanması: 254 µl %30'luk H₂O₂ alındı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'e tamamlandı.

3. 0,1 M'lık asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması: 100'er ml'lik üç adet beher alındı ve her birine 1,36 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tartılarak konuldu ve 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımıyla 0,1 M'lık HCl kullanılarak pH'ları ile sırayla 3,0, 3,5 ve 4,0'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'e tamamlandı.

4. 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 sırayla 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ve 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'e tamamlandı.

5. 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'e tamamlandı.

3.1.3.g. Sıcaklığın etkisinin incelenmesi için kullanılan çözeltiler

Asetat tamponu, fosfat tamponu, tris tamponu, 45 mM'lık guaiakol, 22,5 mM'lık H_2O_2 bölüm 3.1.3.e' de anlatıldığı gibi hazırlandı.

3.1.3.h. İyonik şiddet için kullanılan çözeltiler

45 mM'lık guaiakol, 22,5 mM'lık H_2O_2 bölüm 3.1.3.e' de anlatıldığı gibi hazırlandı. Bunlara ek olarak 0.025 -0.05-0.1-0.2-0.3-0.4-0.5 M 'lık Na_2HPO_4 hazırlandı.

3.1.3.i. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

45 mM'lık Guaiakol (3.1.3.e), 22,5 mM'lık H_2O_2 (3.1.3.e) çözeltilerine ek olarak H_2O_2 ve guaiakolden 10-20-40-50-60 mM hazırlandı.

3.1.3.i. Kantitatif protein miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

1. A reaktifi: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 gr $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

B reaktifi; 20 gr Na_2CO_3 ve 4 gr NaOH 1 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

C reaktifi; 50 mL B çözeltisine 1 mL A çözeltisi ilave edildi. A ve B reaktifleri hazırlandıktan sonra, numune sayısına göre C reaktifi hazırlanıp bekletilmeden kullanıldı.

D reaktifi (Phenol –Folin –Ciocalteu reaktifi): Bu reaktif numune sayısına göre her numuneye 250 µl olacak şekilde hesaplandı ve v/v oranında distile su ile hazırlandı.

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

1. Akrilamid-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. 1 M'luk HCl ile pH 6,8'e ayarlandı ve toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

4. 3 M'luk Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 8,8): 36,3 g Tris saf suda çözüldü ve pH' sı 8.8 olana kadar 0.1 N'lik HCl'den ilave edildi 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 çözümlenerek toplam hacim 1 litreye tamamlandı.

6. Jel sabitleme 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 çözümlenerek hazırlandı.

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

3.1.3.k. İnhibisyon için kullanılan çözeltiler

45 mM'luk Guaiakol (3.1.3.e), 22,5 mM'luk H₂O₂ (3.1.3.e) çözeltilerine ek olarak 5 mM sitrik asit, 20 mM EDTA, 20 mM CTAB ve 5 mM sodyum azid çözeltileri hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Buğday bitkisinin toplanması

Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum ssp. vulgare*) bitkisi Erzincan'ın Kalecik Köyü'ndeki tarlalardan hasat zamanında toplandı. Buğdayın kök kısımları makas ile kesilerek atıldı ve başak kısımları kullanılıncaya kadar +4°C de muhafaza edilerek saklandı.

3.2.2. Peroksidaz enziminin saflaştırılması çalışmaları

3.2.2.a. Enzim homojenatının hazırlanması

Homojenat hazırlanmasında 10 g taze Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum ssp. vulgare*) bitkisi sıvı azot içerisinde dondurulup öğütüldükten sonra pH'sı 7 olan 50 ml Na₂HPO₄ tamponu içinde 15 dk bekletildi. Daha sonra bir tülbent yardımı ile homojenat süzüldü. Soğutmalı santrifüjde 8.000xg'de yarım saat boyunca ön santrifüj işlemi yapıldı. Elde edilen süpernatant, kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Ham enzim ekstraktı süzüldükten sonra santrifüjde 8.000 rpm'de 30 dak süresince santrifüj yapıldı ve enzim homojenatı sırasıyla %0-10 %10-20 %20-30 %30-40 %40-50 %50-60 %60-70 %70-80 %80-90 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülle göre hesaplandı.

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

V = Süpernatant

S₁ = mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ = istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ az miktarlarda ilave edildi. Her ilave sırasında daha önce katılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ' ların çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdürüldü. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra belirtilen doygunluğa getirilen süspansiyon hızlı bir şekilde süzülerek 10.000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüj yapıldı.

Her santrifüj işleminden sonra hem çökelekte hem de süpernatantta aktiviteye bakıldı. Tüm bu işlemler $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. Diyaliz torbası, içinde pH: 7,0 olan 0,1 M'lık fosfat tamponuna karşı 12 saat süreyle diyaliz işlemi yapıldı. Bu işlemler magnetik karıştırıcı üzerinde $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

3.2.2.c. 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 gerekmektedir. Bu amaçla 100–120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 4 g jel 100 ml destile suya aktararak termostatlı su banyosunda $90\text{ }^\circ\text{C}$ '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 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 yüklendi. Daha sonra 10 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile yıkama işlemi yapıldı ve yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponu ile alttan alınan elüatların pH'sı ve 280 nm'deki absorban değerleri eşit oluncaya kadar işlem tekrarlandı. 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 elüsyonuna başlandı. 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. 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 numarasına karşılık-Aktivite/Absorbans grafiği hazırlandı. En yüksek aktivite gösteren elüatlar birleştirildi. Lowry metoduna göre kantitatif protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları tayin edildi.

3.2.2.d. Enzimin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması

Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve en etkili yöntem, jel filtrasyon kromatografisidir. Genel adıyla dışarılama kromatografisi olarak da bilinen bu kromatografide duran faz, polimer yuvalarına su emdirilip oluşturulan bir jel, yürüyen faz sıvıdır. Bu metotta bir kolona kuvvetli hidratize olmuş polimer materyal konulur. Bu materyal Sefadeks, Sefaroz gibi bir polisakkarit veya Biogel gibi bir poliakrilamid türevi olabilir. Jel partikülleri değişik büyüklükte porlara sahip şekilde hazırlanabilir.

Polimer materyal iyice yıkanır, tamponla dengelenir ve daha sonra aynı tampon içinde çözülmüş olan protein karışımı kolona uygulanır. Büyük moleküllü proteinler jel partiküllerinin porlarına giremezler ve hızlıca yürürler. Küçük moleküllü proteinler ise, porlara girerler ve akışları engellenir. Böylece elüatta önce büyük moleküllü proteinler, daha sonra da küçülen molekül büyüklüğüne göre proteinler toplanırlar. Bu işlem süzme işleminin tersidir. Elüatlar küçük fraksiyonlar halinde toplanarak, gerekli analizler yapılır.

Jel filtrasyon kromatografisi, diğer makromoleküller, virüsler, ribozomlar, hücre çekirdekleri ve hatta bakteriler gibi çok daha büyük yapıların karışımlarının ayrılmasında da kullanılabilir. Bu durumlarda sadece uygun porlu partiküller seçilmelidir. Bu metodda ayırma gücü o kadar büyüktür ki, bu basit metod proteinlerin molekül kütesinin tayininde de kullanılabilir. Jel filtrasyon

kromatografisinde en sık kullanılan duran faz, Sefadeks ticari adıyla bir İsveç firması tarafından piyasaya sürülen polimerdir. Sefadeks, bir karbonhidrat olan dextranın üç boyutlu hale getirilmesi ile elde edilir. Fazla miktarda hidroksil grubu içermesi dolayısıyla suya ve elektrolit çözeltilerine ilgisi fazladır. Bu sıvıları emerek yarı saydam jel tanecikleri oluşturur, bu esnada hacmi artar, elde edilen jel tanecikleri kolona doldurulabilir.

Jellerin özelliklerini belirlemede kullanılan temel terim “su kazanım değeri”dir. Bir gram kuru jelin yuvarlarının gözenekleri tarafından emilebilen su miktarına o jelin su kazanım değeri denir. Su kazanım değeri 10 ile çarpılarak ve önüne G harfi getirilerek jelin ticari adının sonuna yazılır. Örnek olarak Sefadeks G-15 jelinin su kazanım değeri 1,5’tur (1g madde 1,5 g su emebilir). Bir jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar. G-10 jeli ile molekül kütlesi ancak 700’e kadar olan moleküller ayrılabilirdiği halde G-200 jeliyle molekül kütlesi 5.000 ile 800.000 arasında olan bileşikler ayrılabilir.

Sefadeks’ten başka ticari adlarla piyasaya sürülen jeller de vardır. Bunlardan Amerika’da imal edilen ve Biogel ticari adıyla piyasaya sürülenler üç boyutlu poliakrilamid polimerleri yuvarlarından oluşmuştur. Daha büyük moleküllerin, mesela bazı proteinler ve virüslerin ayrılmasında agardan elde edilen ve nötral bir polisakkarit olan agaroz jeli (Sefaroz) kullanılır (agar, sülfat asidi ile esterleşmiş heksoz birimlerinden oluşan galaktozlardan oluşur).

Yukarıda bahsedilen jeller su veya sulu çözeltiler için uygun olanlardır. Jellerdeki hidrofil grupları bazı reaktiflerle etkileştirilerek hidrofob gruplara çevrilebilir. Ayrıca polistirenin üç boyutlu hale getirilmesiyle elde edilen jel yuvarları, lipitler gibi hidrofob maddelerin ayrılmasında kullanılabilir. Bu ayrılmalarda yürütücü sıvı olarak organik çözücüler kullanılabilir.

Kolonun Hazırlanması ve Dengelenmesi: Büyükçe bir beherde saf su veya tampon içine alınarak, oda sıcaklığında 1 gece veya 90°C’de su banyosunda 4-5 saat bekletilerek polimer materyal şişirildi. Şişirilen materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali, dengeleme tamponuyla dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH’sı ve 280 nm’de

absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işleminde devam edildi ve kolonun akış hızı yaklaşık 15- 20 ml/saat olarak ayarlandı. Örneğin Uygulanması ve Elüsyon: Örneğin uygulanmasından önce dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel düzeyine indirildi. Örneğin uygulanması için protein çözeltisinden küçük hacimde (% 10'luk gliserinli olabilir, yaklaşık 2-3 ml) kolona tatbik edildi. Bu protein çözeltisi jele iyice emdirildi ve üzerine birkaç ml elüsyon tamponu dikkatlice ilave edilerek tekrar jele iyice girişı sağlandı. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak elüsyona devam edildi; elüatlar yaklaşık 3'er ml olacak şekilde tüplerde toplandı.

Değerlendirme: Elüsyon tamponunun kör olarak kullanılmasıyla, toplanan elüatların tek tek veya 2-3 tüpte bir 280 nm de absorbansları ölçüldü. Elüsyon almaya 280 nm'deki absorbans değerleri sıfır oluncaya kadar devam edildi. Enzim saflaştırılması yapılacağı için 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde tek tek aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif protein tayini için alınan absorbans değerleri ve enzim aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Kromatografi işleminde sonunda enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve SDS-PAGE ile saflık kontrolü ve molekül tayini için +4 °C'de muhafaza edildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen enzim çözeltileri için Lowry metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapıldıktan sonra spesifik aktiviteleri belirlenerek saflaştırma oranları saptandı.

3.2.2.e. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Elde edilen enzim saflık kontrolünün yapılması amacı ile bu işlem kullanıldı. Bunun için elektroforez plakaları, su ve alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka birbirine üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tuturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle sıkıldı. Bu işlemler yapılırken hava almaması sağlandı. Jel yüzeyinin pürüzsüz olması için bir miktar etil alkol ilave edildi. Jel katılaşıncaya kadar beklendi. Katılaştıktan sonra yığma jeli üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice koyduktan sonra tarağın da üzerine nemli süzgeç

kağıdı yerleştirilerek bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi.

Oluşan boşluklar işaretlendi ve jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankına yürütme tamponu yerleştirildi. Örneklere, beta merkaptto etanol ve numune tamponu eklenerek 100 °C' de 30 dk kaynatıldı Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla yerleştirildi. Tank kapağı kapatılarak, (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) bağlandı. İlk olarak yarım saat boyunca sisteme 80 voltluk akım verildi. Daha sonra akım 150 volta ayrıldı, 4-5 saat oda sıcaklığında bekletildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice ayrıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde 30 dakika süre ile bırakıldı. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkarılan jel, özel kabına konularak boyama çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, 2 saatte yıkama çözeltisine bekletildi. Protein bantları belirginleştikten sonra jeller çözeltiden çıkarılarak %30'luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafları çekildi

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı; 15 mL Tris-HCl (pH 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat $[(NH_4)_2S_2O_8]$ ilave edildi.

Yığıma jelinin hazırlanması ise şöyle yapıldı; 1 M'lik Tris-HCl (pH 6.8)'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,8 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edildi.

3.2.2.f. Kantitatif protein miktarı tayini

Her bir saflaştırma basamağında elde edilen enzim çözeltisinin protein miktarları kantitatif olarak Lowry metoduna göre belirlendi. Lowry (Folin Fenol Metodu) metodu ile kantitatif protein tayininde, alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2})

proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden avantajlı tarafı, kısa sürede uygulanabilirliği, fazla bozucu faktörlerin bulunmaması ve protein-boya kompleksinin çözelti ortamında uzun süre dayanıklı olabilmesidir. Bu yöntemin hassasiyet aralığı 5-100 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bitkilerden elde edilen ham ekstratlar ile saflaştırma basamağında elde edilen çözeltilerde bulunan protein miktarları bu yöntemle tayin edildi (Lowry 1951).

Bu yöntem ile protein tayininin yapılması için lowry reaktifleri bölüm 3.13.1 daki gibi hazırlandı. Aşağıdaki tabloda (3.1) gösterildiği oranlarda reaktifler ve numunenin saflaştırma basamaklarından elde edilen çözeltilerden kullanılarak reaksiyon karışımı oluşturuldu, vortex ile karıştırıldı ve 10 dk inkübasyon için beklendi. Absorbanslar 750 nm'de kaydedildi. standart protein olarak BSA kullanıldı (2 mg/ml)

Tablo 3.1. Lowry metoyla protein tayini

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

Tüpler vortexlendi, 20-30 dk oda ısısında inkübe edildi. 750 nm' de numune ve standartın absorbansı köre karşı okundu.

3.2.3. POD'un karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar

3.2.3.a. Optimum pH çalışması

Optimum pH için pH 3.0'den 9.0'e kadar yedi farklı pH ortamında çalışıldı. pH 3.0'den 4.5'e kadar 1 M'lık asetat, pH 4.5'ten 7.5'e kadar 1 M'lık fosfat ve pH 8.0'den 9.0'a kadar da 1 M'lık Tris / HCl tamponları kullanıldı. Tamponları aktivite tayini sırasında taze hazırlandı ve spektrofotometrik olarak aktiviteleri ölçülüp, bulgular grafik halinde verildi.

3.2.3.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 10–70 °C aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak hazırlandı. Kuvete 1 ml guaiacol, 1 ml H₂O₂ ve 950 µl fosfat tamponu koyularak ayarlanan sıcaklıkta 5 dk bekletildikten sonra alınarak 50 µl homojenattan eklenerek 470 nm de tetraguaiakolün aktivite ölçümü yapıldı. Her bir sıcaklık için bu işlem tekrarlanarak sıcaklığın enzim üzerine olan etkisi belirlendi.

3.2.3.c. Enzimin stabil olduğu pH'nın belirlenmesi

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

3.2.3.d. POD' un termal stabilizasyonun araştırılması

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 30-60 °C aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak hazırlandı. Ependorf tüpe 300 µl enzim ilave edilip 30 °C ye ayarlanmış sirkülatörlü su banyosuna yerleştirildi. Her 10

dk da bir ependorf tüpteki enzimden 50 µl alınıp mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde aktivite ölçümü yapıldı.

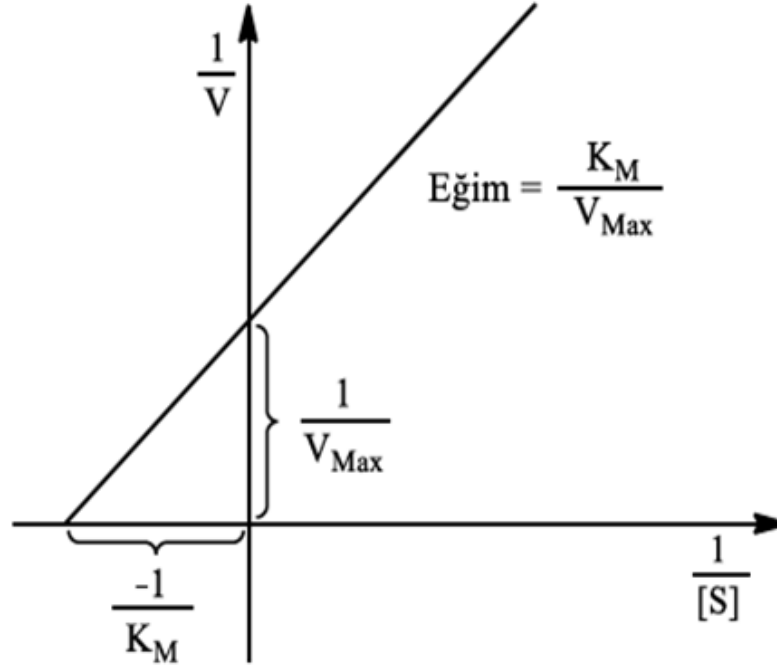
3.2.3.e. POD' un optimum tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

45 mM'lık Guaiakol ve 22,5 mM'lık H₂O₂ 3.1.3.e'de anlatıldığı şekilde hazırlandı. POD' un optimum tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 0,025 M'dan 0.5 M'a kadar yedi farklı konsantrasyonda Na₂HPO₄ çözeltisi hazırlandı. Kör küvetinin içeriği; 1 ml H₂O₂, 1ml Guaiakol ve 1 ml farklı konsantrasyonda hazırlanan Na₂HPO₄ çözeltisinden oluşurken numune küvetini içeriği; 1 ml H₂O₂, 1 ml Guaiakol, 950 µL farklı konsantrasyonda hazırlanmış Na₂HPO₄ ve 50 µL örnekten hazırlandı. Farklı konsantrasyondaki Na₂HPO₄' ın enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 470 nm de ölçülerek belirlendi.

3.2.4. POD üzerine kinetik çalışmalar

3.2.4.a. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

Peroksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar, 22,5 mM'lık H₂O₂ ve 45 mM'lık guaiakol ile yapıldı. Bunun için önce peroksidaz enzimi ile guaiakol, substratının konsantrasyonları sabit tutularak, H₂O₂ için 10-20-40-50-60 mM konsantrasyon aralıklarında optimum aktive ölçümleri yapılarak 1/V nin 1/S karşı grafikleri oluşturuldu. Daha sonra POD ile H₂O₂ substratının konsantrasyonları sabit tutularak, guaiakol substratı için 10-20-40-45-50-60mM konsantrasyon aralığında aktivite ölçümleri yapılarak 1/Vnin 1/S grafikler oluşturuldu. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri aşağıdaki formülden yararlanılarak bulundu:



Şekil 3.1. K_m ve V_{max} grafiksel gösterimi ve denklemini

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

3.2.4.b. POD enzimi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi

POD enzimi üzerine inhibisyon etkisini incelemek için EDTA , CTAB , sitrik asit ve sodyum azid kimyasalları kullanıldı. Önce ham ekstre için inhibitör eklemeyen aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra her bir inhibitör için 0-30 mM arası çözeltiler hazırlandı ve bu konsantrasyon aralığında POD enziminin aktivitesi ölçüldü. Bulunan aktivite değerleri başlangıçta ölçmüş olduğumuz ham ekstreinin aktivitesine bölünüp yüz ile çarpıldı. Bu işlem sonucu her bir inhibitör için en yüksek aktivitenin gözlemlendiği nokta maksimum inhibisyon değeri olarak kaydedildi. Bu sonuca göre inhibisyon değerleri EDTA ve CTAB için 20 mM, sitrik asit ve sodyum azid için 5 mM olarak belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. POD'un Saflaştırılması Çalışmaları Bulguları

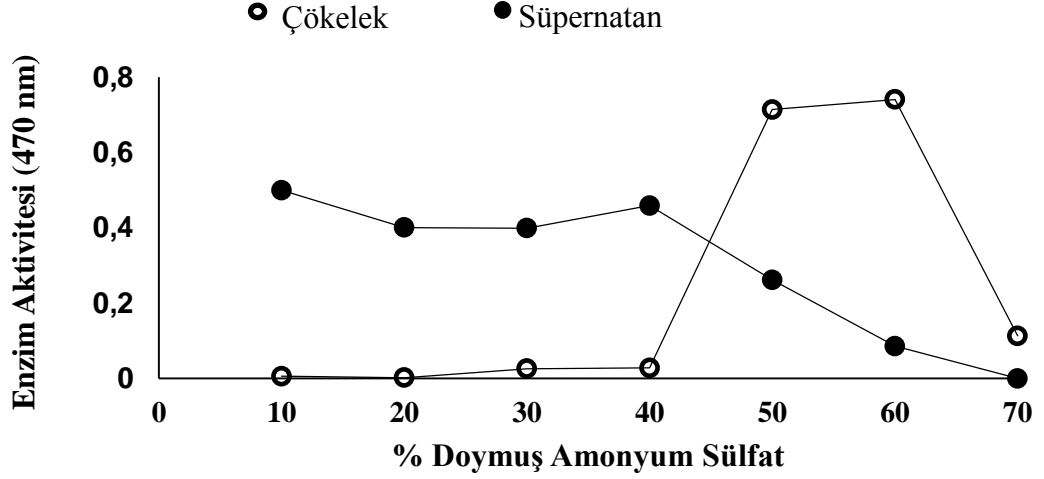
4.1.1. Peroksidaz enziminin amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz saflaştırması bulguları

Çalışmada kullanılan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) izole edilen peroksidaz enziminin çöktüğü amonyum sülfat doyunluğunu belirlemek için sırasıyla %0–10, %10–20, %20–30, %30–40, %40–50, %50–60, %60–70 doyunluklarında çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Her bir çöktürme basamağında elde edilen çökelek, çözünebileceği minimum hacimde (3 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 doyunluk aralığı tayin edildi. Peroksidaz enziminin %40-60 amonyum sülfat doyunluğu aralığında tamamına yakınının çöktüğü gözlemlendi. Bulgular tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) izole edilen peroksidaz enziminin amonyum sülfatla çöktürmede doyunluk noktası tayini

(NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürme Aralığı	Çökelek		Süpernatant	
	Hacim(ml)	Aktivite _{nm}	Hacim(ml)	Aktivite _{nm}
%0-10	4	0.006	53	0.500
%10-20	4	0.002	53	0.401
%20-30	4	0.026	53	0.399
%30-40	4	0.028	53	0.459
%40-50	4	0.714	53	0.262
%50-60	4	1.741	53	0.086
%60-70	4	0.113	53	-0.054

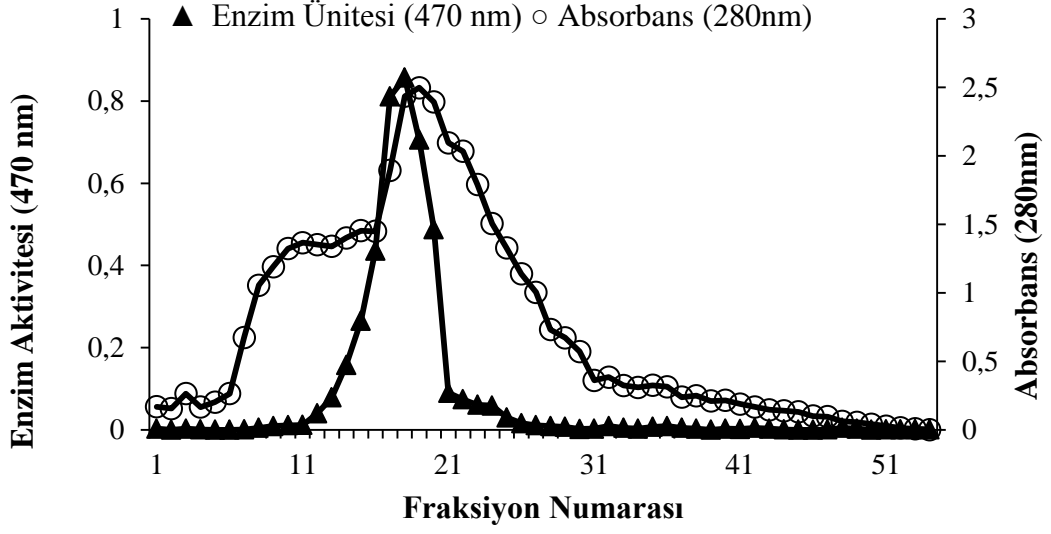
Diyaliz sonrası enzim saflaştırılırken her basamakta elde edilen enzim çözeltisinin Lowry metoduna göre protein tayini yapıldı ve enzim aktivitesi belirlendi.



Şekil 4.1. %AS çöktürme aralığı belirleme çalışması

4.1.2. Peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırma bulguları

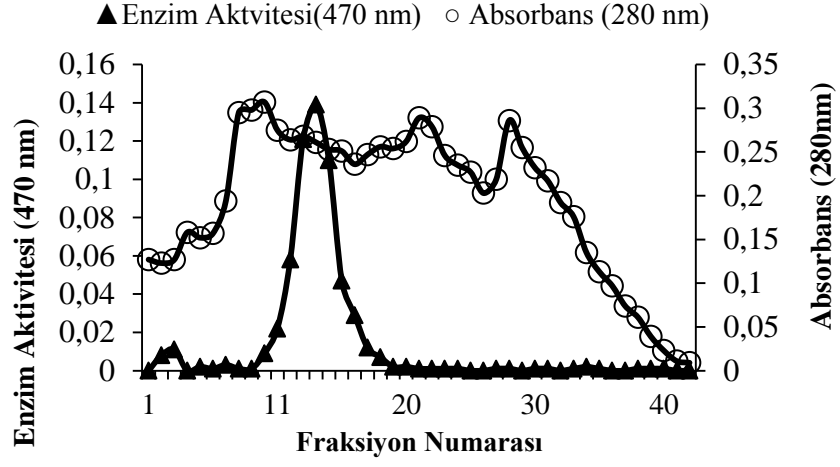
Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un CM-Sefadeks ile saflaştırması esnasında elüsyon yapılırken tüplerde bulunan protein akışı 280 nm'de absorbans ölçümü ile kontrol edildi. Enzim aktivite ölçümleri ise 470 nm'de guaiakol ve H₂O₂ substratları ile gerçekleştirilerek aktivite sonuçları grafik halinde gösterildi (şekil 4.2). En yüksek aktivitenin görüldüğü 19.-21. tüpler birleştirilerek 1 ml' si protein tayini için ayrılırken, 6 ml' si jel filtrasyon kromatografisi için kolona yüklendi. Bu basamak sonucunda POD 284 kat saflaştırıldı.



Şekil 4.2. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen peroksidaz enziminin CM-Sefadeks ile saflaştırılmasıyla elde edilen elüatların, her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbanları

4.1.3. Enzimin Sefadeks jel filtrasyon kromatografisi ile ilgili çalışma bulguları

İyon değişim kromatografisi sonucu en yüksek aktivitenin olduğu tüp Sefadeks kolonuna yüklendi. Kolon sonunda toplanan elüatların 280 nm 'de absorban ve 470 nm'de aktivitelerine bakılarak sonuçlar grafik halinde ifade edildi (şekil 4.3). Elüatların absorbanı 0' a ininceye kadar bu işleme devam edildi. Toplamda 53 tane tüp elde edildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü 15. tüpün 1 ml' si protein tayini için ayrılırken, 6 ml'si SDS-PAGE için saklandı.

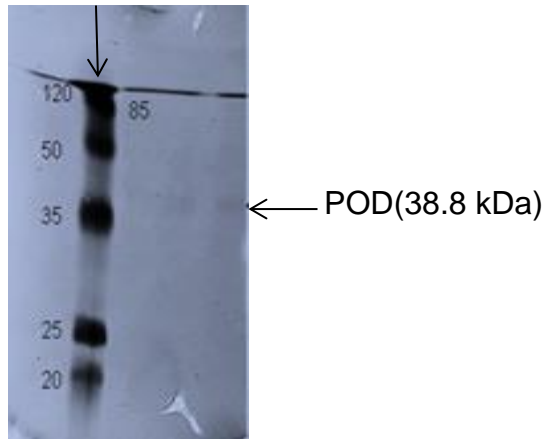


Şekil 4.3. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un jel filtrasyon kolonu ile saflaştırılmasıyla elde edilen elüatların, her bir fraksiyonda, enzim aktiviteleri ve 280 nm'deki absorbansları

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

Peroksidaz enziminin SDS-Page yöntemiyle saflık kontrolü ve molekül ağırlığının tayin edilmesine yönelik çalışmalarda jelde tek protein bandı Şekil.4.4.'de verilmektedir.

Marker(5 µl)

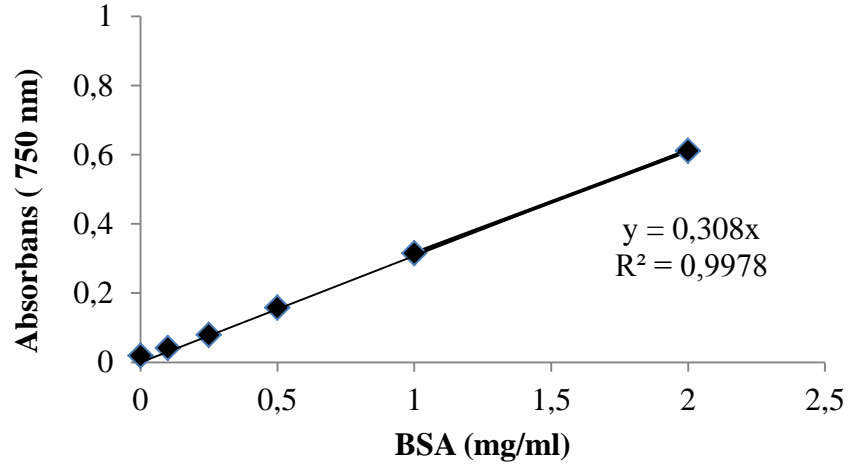


Şekil 4.4. POD enziminin SDS-PAGE işlemi sonucu jelde görünümü

4.1.5. Peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamaklarında elde edilen enzim çözeltilerindeki protein miktarları kantitatif olarak Lowry yöntemiyle belirlendi. Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve kromatografik işlemlerden sonra elde edilen enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak belirlendi. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.5'de gösterilen standart grafikten elde edilen denklemde yerine konularak hesaplandı (r^2 : 0,9978).

$$\text{Absorbans}_{(750)} = 0,308 \times \text{Protein } (\mu\text{g})$$



Şekil 4.5. Lowry yöntemiyle kantitatif protein tayininde kullanılan standart protein grafiği

Saf ekstrakt, diyaliz, jel filtrasyon ve iyon değişim kolonlarından alınan numuneler Lowry metoduna göre kantitatif olarak tayin edildi ve her basamakta enzimin kaç kat saflaştırıldığı hesaplanarak tablo halinde gösterildi (tablo 4.2).

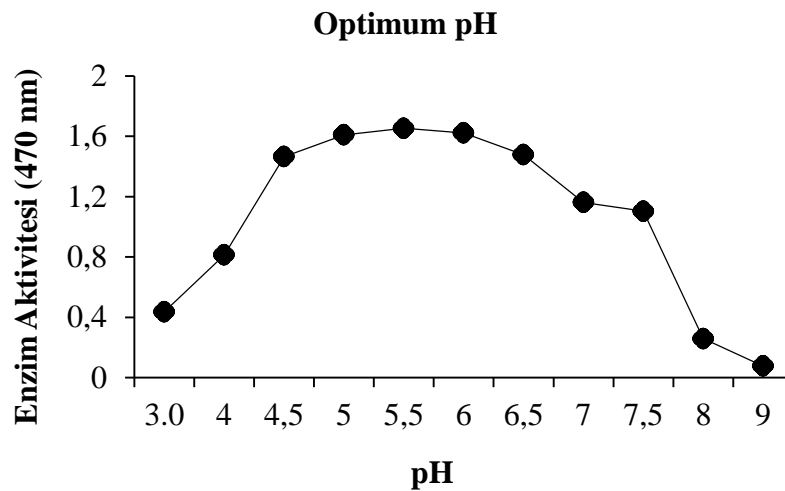
Tablo 4.2. Peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları

İşlem	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite U/mg protein	Saflaştırma (katları)
Saf ekstrakt	1,152	0,022	0,02	1
Diyaliz	0,892	0,903	1,01	53
İyon-değişim kromatografisi	0,535	0,139	0,26	14
Jel-filtrasyon kromatografisi	0,162	0,881	5,43	284

4.2. POD'un karakterizasyonu çalışmaları bulguları

4.2.1. POD'un optimum pH çalışması bulguları

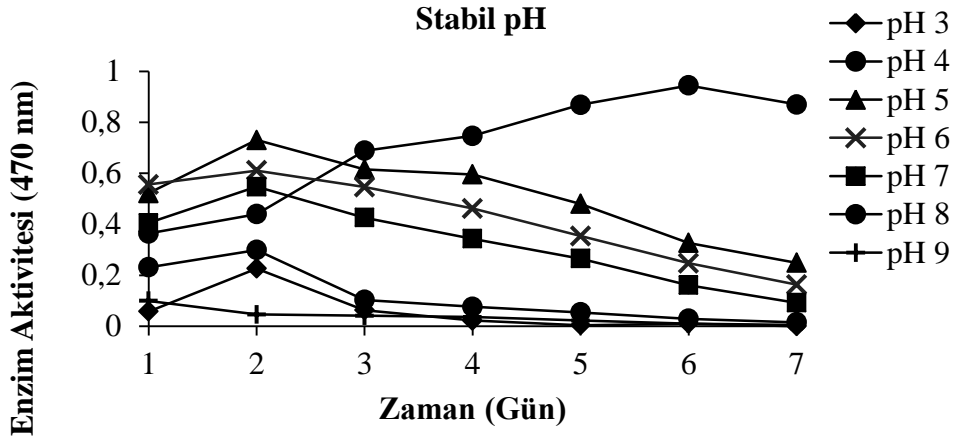
Optimum pH 'yı belirlemek için pH 3'ten 9'a kadar on üç farklı pH ortamında enzim aktivitesi çalışma yapıldı. pH 3'ten 4,5'e kadar asetat, pH 5'ten 7,5'e kadar fosfat ve pH 8'den 9'a kadar da Tris / HCl tamponları ile çalışıldı. H₂O₂ ve guaiakol substratları her ölçümde kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Bulgular Şekil 4.6'da görüldüğü gibi enzimin maksimum aktivite gösterdiği değer olarak fosfat tamponu içinde optimum pH :5.5 (fosfat tamponu) olarak belirlendi.



Şekil 4.6. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un farklı pH'larda Aktivite grafiği

4.2.2. POD'un stabil pH çalışması bulguları

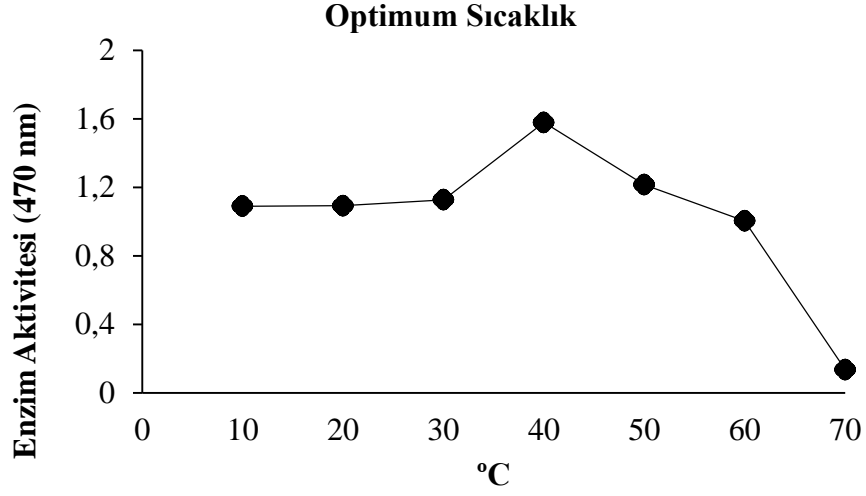
POD dört farklı pH'da (3,0–4,5) asetat tamponu ile altı farklı pH'da (5,0– 7,5) fosfat tamponu ile ve üç farklı pH'da (8,0–9,0) Tris/HCl tamponu ile on yedi gün boyunca +4 °C'de inkübe edildi ve her gün periyodik aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı.(Şekil 4.7). Grafiklerden de görülebileceği gibi POD pH'te (fosfat tamponunda) stabil olduğu belirlendi.



Şekil 4.7. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un farklı pH'lardaki zamanla stabilitesi

4.2.3. POD'un için optimum sıcaklık çalışması bulguları

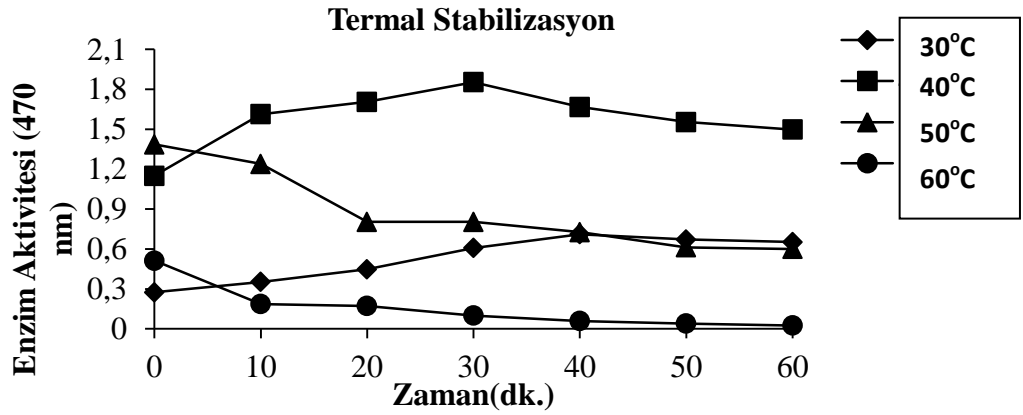
Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 10–70 °C aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak hazırlandı. Kuvete 1 ml guaiacol, 1 ml H₂O₂ ve 950 µl fosfat tamponu koyularak ayarlanan sıcaklıkta 5 dk bekletildikten sonra üzerine 50 µl homojenattan eklenerek 470 nm de aktivite ölçümü yapıldı. Her bir sıcaklık için bu işlem tekrarlandı ve enzim için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.(Şekil4.8).



Şekil 4.8. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un optimum çalışma sıcaklığı

4.2.4. POD'un termal stabilizasyon çalışmaları ile ilgili bulgular

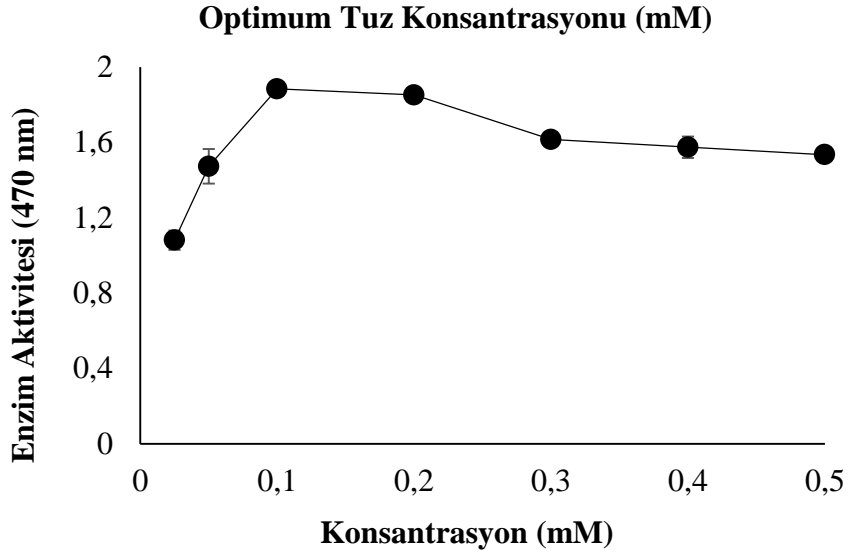
Peroksidaz enziminin termal stabilizasyonu ilgili çalışmalar enzimin optimum pH'sı ve 30-60 °C aralığında dört farklı sıcaklıkta ve bir saat boyunca her on dakikada bir aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Bulgular grafik olarak Şekil 4.9de gösterildiği gibi 40 °C olarak bulundu.



Şekil 4.9. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un farklı sıcaklıklarda zamanla stabilitesi

4.2.5. POD'un optimum tuz konsantrasyonu ile ilgili bulgular

Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum ssp. vulgare*) elde edilen POD'un optimum tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 0,05 M'dan 0.5 M'a kadar yedi farklı Na_2HPO_4 konsantrasyonda çalışma yapıldı. H_2O_2 substratı her ölçümde kullanılmakla beraber ikinci substrat olarak guaiakol substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı ve enzim için uygun optimum tuz konsantrasyonu tayin edildi. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi tuz konsantrasyonunun etkisi çok fazla olmamakla beraber, en uygun tuz konsantrasyonu 0.1 M olarak bulundu.



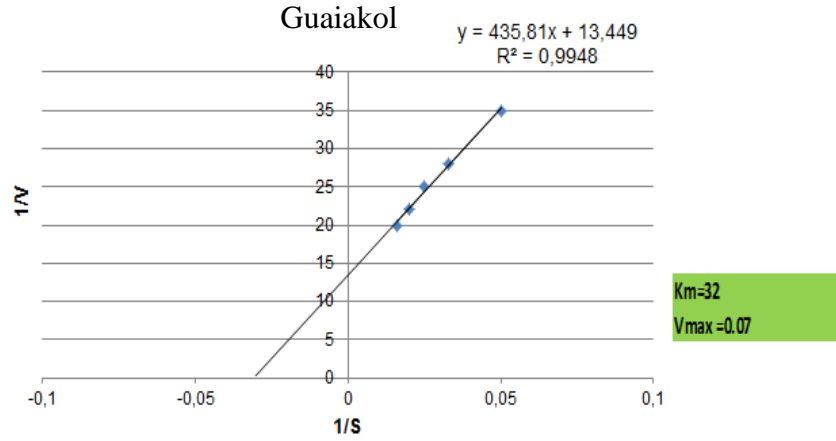
Şekil 4.10. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum ssp. vulgare*) elde edilen POD'un farklı tuz konsantrasyonlarındaki aktiviteleri

4.3. POD'un kinetik özellikleri ile ilgili bulgular

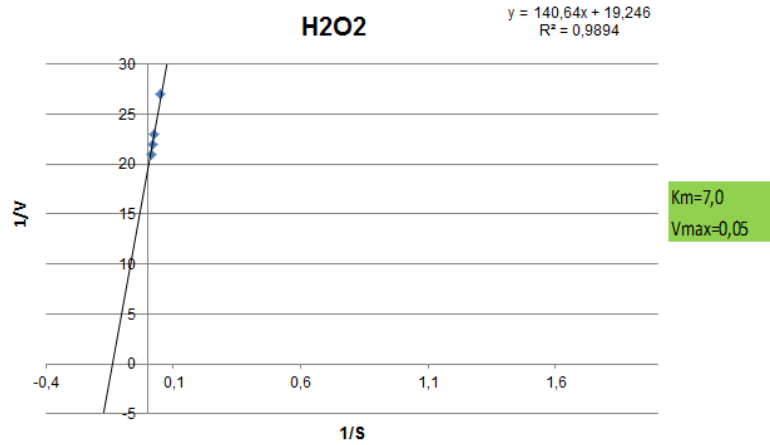
4.3.1. POD'un K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili bulgular

POD'un K_m ve V_{max} değerini belirlemek için, ilk olarak H_2O_2 sabit tutulup guaiakol değiştirildi, sonra da guaiakol sabit tutulup H_2O_2 değiştirilerek ölçüm yapıldı. Bunun için önce POD ile guaiakol konsantrasyonları sabit tutularak, H_2O_2 için beş farklı substrat konsantrasyonunda (10, 20, 40, 50, 60 mM) aktive ölçümleri yapılarak Lineveaver-Burk grafikleri çizildi. Daha sonra POD ile H_2O_2 substratının

konsantrasyonları sabit tutularak guaiakol için beş farklı substrat konsantrasyonunda (10-20-45-50-60 mM) optimum pH aktive ölçümleri yapıldı ve grafikler çizilerek Şekil 4.11 ve 4.12'deki gibi grafik halinde gösterildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her iki substrat için ayrı ayrı K_m değerleri hesaplandı. Sırasıyla guaiakol ve H_2O_2 için K_m değerleri 2,467 ve 7,307 olarak bulundu.



Şekil 4.11. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.12. Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elde edilen POD'un guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

4.3.2. Çeşitli kimyasalların POD'un aktivitesine inhibisyon etkisi

İnhibisyon çalışması için farklı konsantrasyonlarda inhibitörler hazırlanarak en yüksek inhibisyon etkisinin olduğu konsantrasyon değeri belirlendi. İnhibitör olarak sitrik asit, EDTA, CTAB ve sodyum azid kullanıldı. En etkili inhibitörün 5 mM konsantrasyonda % 94 inhibisyon ile sitrik asit olduğu bulundu. Çeşitli inhibitörlerin peroksidaz aktivitesi üzerindeki etkileri Tablo 4.3 'de gösterildi.

Tablo 4.3. Farklı kimyasalların peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi

Inhibitor	Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon
Sitrik asit	5	94
EDTA	20	89
CTAB	20	95
Sodyum azid	5	79

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidaz (POD) enzimi prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden bir oksidoredükdazdır. Bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur (Rompel ve ark. 2007). Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanıp, metabolizmada ortaya çıkan H_2O_2 'yi etkisiz hale getirerek H_2O 'ya indirgerler (Robert ve ark. 1993). Bitki peroksidazlarının yerine getirdiği önemli görevlerden bazıları aşağıda sıralanmıştır:

Savunma mekanizmalarında (Bartonek-Roxa ve ark. 1991), hormonal faaliyetlerde (Wakamatsu and Takahama 1993), kimya, ilaç ve gıda sanayilerinin yeni uygulamalarında (Kwak ve ark. 1996), organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonunda kullanılmaktadır (Adam ve ark. 1999). Lignin biyosentezi (Duarte ve ark. 2000) gibi hayati fonksiyonlarda tercih edilmektedir. Ayrıca POD'nin yüksek hassasiyeti sayesinde klinik tanı ve mikroanalitik uygulamalarda oldukça önemli bir ayıraç olduğu bilinmektedir.

Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucunda 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.

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).

Bu çalışmada buğdaydan POD'un saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik çalışmaları yapılarak en iyi etkinlik için optimum koşullar belirlendi. Km değerleri hem guaiacol hem de H₂O₂ substratı için tespit edildi. Farklı inhibitörlerinin enzim üzerine etkileri araştırıldı. Bu bilgiler, farklı türlerden peroksidaz enziminin saflaştırılmasında ve farklı peroksidaz uygulamaları için yararlı olabilmektedir.

POD'un saflaştırılmasına yönelik olan çalışmamızda enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, CM-Sefadex iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografi basamaklarıyla saflaştırıldı.

Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare)'dan CM-Selüloz iyon değişim kolonu ve jel filtrasyon kolonuyla saflaştırılan POD enziminin kinetik özellikleri, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi ve karakterizasyon özellikleri belirlendi.

Çalışmalarımız sırasında sırasıyla jel filtrasyon ve iyon değişim kolonundan elde edilen Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) elüatlarının 280 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü ve bu şekilde toplanan fraksiyonlara kalitatif protein tayini yapılmış oldu. Bu metot proteinlerin yapısındaki aromatik halkaya sahip amino asitlerin (tirozin, triptofan ve fenilalanin) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanır (Segel 1968).

Kantitatif protein tayini olarak Lowry metodu kullanıldı. İyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) peroksidaz enzim elüatları ve homojenatlardaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Lowry (Folin Fenol Metodu) metodu ile kantitatif protein tayini, alkali ortamda bakır iyonu (Cu⁺²) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks

oluşturur ve Cu^{+1} e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 750 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden avantajlı tarafı, kısa sürede uygulanabilirliği, fazla bozucu faktörlerin bulunmaması ve protein-boya kompleksinin çözelti ortamında uzun süre dayanıklı olabilmesidir. Bu yöntemin hassasiyet aralığı 5-100 $\mu\text{g/ml}$ ’dir. Bitkilerden elde edilen ham ekstratlar ile saflaştırma basamağında elde edilen çözeltilerde bulunan protein miktarları bu yöntemle tayin edildi (Lowry 1951).

İyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare) peroksidazının aktivitesi, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, H_2O_2 tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve yükseltgenme sonucu oluşan 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinon renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm’de izlenmesi esasına dayanır. (Şişecioğlu ve ark. 2010). Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlardaki POD enziminin aktivitesinin belirlenmesinde bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi, literatürde enzimin bilinen en iyi substratı guaiakol olması ve molar ekstinksiyon katsayısının literatürde verilmesidir ($\epsilon_{470\text{nm}}=5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi, 20 °C’de 1 dakikada 1 μmol guaiakol’ün yükseltgenmesini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Literatüre bakıldığında POD enzimini saflaştırabilmek için amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik adımlardan en az iki tanesi kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilebilmiştir. Biz bu çalışmamızda saflaştırma kısmında amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografilerini, enzimin saflık kontrolünde ve molekül kütlesinin tayininde ise SDS-PAGE yöntemini kullandık.

Literatür çalışmalarına bakıldığında POD enzimi afinite kromatografisi ile daha kısa sürede ve daha az masrafla yüksek verim elde edilmiştir.

Saflaştırılan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*) peroksidaz enziminin saflığının kontrolü için ve molekül kütlesinin tespiti için SDS-PAGE yapıldı. Yapılan SDS-PAGE sonucunda ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*) izole edilen peroksidaz enzimlerinin saf olduğu belirlendi (Şekil 4.4). Elde edilen tek bandın molekül ağırlığı çizilen grafikten 38.8 kDa olarak bulundu. Literatürde yapılan saflaştırma çalışmalarına göre peroksidaz enzimi için birçok izoenzim yapısı bulunmuştur. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen bu izoenzimlerin; molekül kütleleri SDS-PAGE metoduyla; siyah gram kabuğunda (Ajila ve Prasada Rao 2009) 38 kDa, at turpunda (Lavery ve ark. 2010) 37 kDa olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar bizim çalışmamızla uygunluk göstermektedir.

Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra enzimler için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*) POD enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, termal stabilizasyon ve stabil pH değerleri belirlendi.

Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 3.0-9,0 aralığında 0,1 M'lık Na_2HPO_4 tamponlarında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü ve POD enziminin optimum pH değeri 5.5 olarak belilendi.

Çeşitli kaynaklardan yapılan çalışmalarda POD' optimum pH'sı 4.5-6.5 arasında olduğu bildirilmiştir. Asidik şalgam peroksitleri için optimum pH 5-5.5 olarak bulunmuştur (Duarte-Vazquez ve ark. 2000). Sakharow ve arkadaşlarının palmiye (*Roystonea regia*) peroksidazı üzerinde guaiakol substratı ile yaptığı bir çalışmada optimum pH' yı fosfat/sitrat tamponunda 5,5 olarak bulmuşlardır (2001). Bu değer bizim bulduğumuz değerle uyum göstermektedir. 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 ve ark 2001). Bizim çalışmamızda bu sonuçlara paralel olarak optimum pH 5.5 olarak bulunmuştur. Enzimin stabil pH'sına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda enzimin oldukça dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Örneğin +4 °C'de yapılan stabil pH'ya ilişkin çalışmalarda, sekizinci

günde bile pH: 4’de fosfat tamponunda aktivitenin arttığı gözlemlendi. Bu aktivite artışının sebebi ise stabil pH ölçümleri esnasında enzim çözeltisi +4°C’de bekletildiği için enzimin reaktive olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kışlık bitkilerde katalaz ve peroksidaz gibi enzimlerin düşük sıcaklıklarda aktivitelerinin arttığı daha önce de görülmüştü (Gülçin and Yıldırım 2005).

Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare.) bitkisinden elde edilen POD’ un optimum sıcaklık belirlenmesinde substrat için optimum pH’da ve 10-60 °C aralığında aktiviteler belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi. Çalışmalardan elde edilen bulgulara göre peroksidaz enziminin stabil sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi. Criquet ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yonca peroksidazı için 2,7-diaminofluorence substratı ile optimum sıcaklığın 35°C olarak tespit edilmiştir (Criquet ve ark 2001). Aynı şekilde bir başka çalışma olan üzüm için peroksidaz enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olarak bulunmuştur (Scaincalepore ve ark. 1985)

Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizden sonra CM-Sefadexs iyon değişim kromatografisi kolonuna tatbik edildi. 10 mM’lık fosfat tamponunda bulunan 1 M’lık NaCl çözeltisi ile gradient oluşturularak elüsyon yapıldı. 470 nm’de guaiakol substratı ile aktivite gösteren aktif fraksiyonlar birleştirildi. Daha sonra birleştirilen bu aktif fraksiyonlar jel fitrasyon kolonu ile muamele edildi. Bu işlem sonrasında Lowry metoduna göre protein tayinleri yapıldı. Tablo 1’de gösterildiği gibi enzimin 284 kat saflaştırıldığı bulundu. Saflaştırılan peroksidazın molekül ağırlığı, SDS-PAGE yöntemi ile 38.8 kDa olarak hesaplandı. Sitrik asit, EDTA, CTAB ve sodyum azidin peroksidaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisine bakılarak en yüksek inhibisyonun 5 mM konsantrasyonda % 94 inhibisyon ile sitrik asit olduğu bulundu.

Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. vulgare.) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 3,0–9,0 aralığında üç farklı tamponla 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 substrat çiftleri ile enzimin gösterdiği

aktivite spektrofotometrik olarak ölçüldü. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi optimum pH 5.5 fosfat tamponu olarak belirlendi.

Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare.) elde edilen peroksidaz enziminin optimum tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla çalışmalarda H₂O₂ substratı ile beraber ikinci substrat olarak guaiakol kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı ve her bir substrat için enzimin optimum tuz konsantrasyonu belirlendi. Enzim aktivitesi üzerinde en uygun tuz konsantrasyonu 0.1 M olarak bulundu.

Peroksidaz enziminin termal stabilizasyonu ile ilgili çalışmalar enzimin her bir substratı için optimum pH’da ve 30-60 °C aralığında dört farklı sıcaklıkta ve bir saat boyunca her on dakikada bir aktivite ölçümü yapılarak gerçekleştirildi. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre 60 dakikalık zaman periyodunda enzimin 40 °C kararlı olduğu ve 60 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda ise stabilizasyonunun azaldığı gözlemlendi.

Çalışmada kullanılan peroksidaz enzimi için iki substrat için K_m değerleri Linweaver- Burk grafiklerinden elde edildi (Şekil 4.9-4.10). Ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum* ssp. vulgare.) saflaştırılan peroksidaz enziminin 25 °C ve pH: 5.5’de sabit H₂O₂ substratı konsantrasyonunda guaiakol substratı için K_m değeri sırasıyla 2.467 mM olarak belirlendi. Aynı şekilde guaiakol substratı sabit tutulduğunda ise H₂O₂ substratı için K_m değeri ise 7.303 mM olarak belirlendi.

KAYNAKLAR

Adam, W., Lazarus M., Saha-Moler C.R., Weichold O., Hoch U. and 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.

Adıgüzel, A., Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden Ğzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum* (2006).

Aghelan, Z., and Shariat, S. Z. Partial purification and biochemical characterization of peroxidase from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Advanced biomedical research* 4, 159 (2015)

Agostini, E., Medina M. I., Milrad de Forchetti S.R. and Tigier H., properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598 (1997).

Al-Senaïdy, A., Gsmael, M., Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293-298 (2011).

Altan, N., Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. *Palme yayıncılık*, 69-74, Ankara (2000).

Altıkatoğlu, M., Bağaran, Y., Ariöz, C., Kuzu, H., Thermal stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran. *Journal of Engineering and Natural Sciences. Sigma* 27, 216-225 (2009).

Altunkaya, A., Gökmen, V., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (*L. sativa*). *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2), 249–256 (2011).

Amthor, J.S., Effects of atmospheric CO₂ concentration on wheat yield: review of results from experiments using various approaches to control CO₂ concentration. *Field Crops Research*, 73:1-34 (2001).

Anonim, 2007 <http://www.gataem.gov.tr>

Anthon, G.E., Sekine, Y., Watanabe, N., Barrette, D.M. Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6153-6159 (2002).

Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., Swanson, B.G. Nonthermal preservation of foods, Macel Dekker, Inc. New York, pp. 354 (1998).

Barret, D.M., Theerakulkait, C. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Technology*, **49**, 62–65 (1995).

Bartonek-Roxa, E., Ericksson H. and Mattiasson B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–250.

Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C., Sola, M., Redox properties of heme peroxidases. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 500, 21-36 (2012).

Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P. Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, **69**, 627–636 (2008).

Bingöl, G., *Biyokimya. Güven Matbaası*, 169-174, Ankara (1983).

Boucoiran, C.F.S. Kijne, J.W. Recourt, K. Isolation and partial characterization of thermostable isoperoxidases from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 701-707 (2000).

Champe, P.C., Harvey R.A. and Ferrier D.R., Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: *Biyokimya. Nobel Tip Kitapevleri, Bursa* (2007).

Chen, G., Asada, K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cells Physiology*, 30, 1987–1998 (1989).

Chibbar, R.N., Van Huystee, R.B. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiology*, **75**, 956-958 (1984).

Clemente, E. 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry* 49, 29-36.

Clemente, E. Peroxidase from oranges (*Citrus sinenses* L.) Osbeck. *European Food Research and Technology*, **215**, 164–168 (2002).

Criquet, S., Joner, E. J., Leyval, C. 2,7-diaminofluorence is sensitive substrate for detetction and characterization of plant rout peroxidase activites. *Plant Sciences*, 161, 1063–1066 (2001).

Cruz, V.I., Fatibello-Filho, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxide. *The Analyst*, **123**, 1809-1812 (1998).

Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601 (1995).

Daniel RM, Peterson ME, Danson MJ, *et al.*, "The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity". *Biochem. J.* 425 (2): 353-60 (2010).

Deepa, S. S., Arumughan C., Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511 (2002).

Doerge, D.R., Divi R.L. and Churchwell M.I., Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10–17 (1997).

Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M. Partial characterization of peroxidase from the leaves plant (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*). *European Food Research and technology*, (in press) (2006).

Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Aklan, M. Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. *Journal of Food Engineering*, **79**, 375– 382 (2007).

Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez B., Regalado C. and Whitaker J.R., Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574–1579 (2000).

Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B.E., Regalado, C., Whitaker, J.R. 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 (2001).

Earnshaw, R.G., Appleyard, J., Hurst, R.M. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, **28**, 197– 219 (1995).

El Shamei, Z. 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 (1987).

Erkul,A., Ünay, A., Üç ekmeklik buğday (*Triticum astivum* L.) melezinde kantitatif Özelliklerin kalıtımı II. Morfo-fizyolojik Özellikler *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(2) : 63 – 68 (2009).

Fang, L., Jiang, B., Zhang, T. Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase. *Food Chemistry*, **109**, 802–807 (2008).

FAO, 2012. http://www.fao.org/index_en.htm

Feldman, M. "Sitogenetik ve buğdayda yabancı gen transferi moleküler yaklaşımlar." *Yedinci Uluslararası Buğday Genetik Sempozyumu* / TE Miller ve RMD Koebner tarafından düzenlendi. Cambridge:. Bitki Bilimi Araştırma Enstitüsü, Cambridge Laboratuvarı, c1988, 1988 tarafından yayınlanmıştır.

Fischer, R. A., Rees, D., Sayre, K. D., LU, Z. M., Condon, A. G., Largue-Saavedra, A., wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate and cooler canopies. *Crop Science*, 38: 1467-1475 (1998).

Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z., Ferradji, F., Bejar, S., Boutoumi, H., A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces sp.* Strain AH4: Purification and biochemical characterization. *Bioresource Technology* 11, 383-390 (2012).

Forsyth, J.L., Robinson, D.S. Purification of Brussels sprout isoperoxidases. *Food Chemistry*, 63, 221-234 (1998).

Fortea, M., Miranda, S., Martinez, A., Sanchez, P., Zafrilla, M., Cacha, A., Delicado, E., Kinetic characterization and thermal inactivation study of red alga peroxidase. *Food chemistry* 127, 1091-1096 (2011).

Fric, F., Oxidative Enzymes. *Encyclophedia of Plant Physiology*, Pirson, A., Zimmerman, M.H. (Ed). 4-17, New York (1976).

Friedrich, J., Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob V. Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths., in press (2005).

Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 165-186.

Ganguli, A.C., Mitchell, R.B., Wallace, M.C., and Vermeire L.T., Wildlife and fisheries management, *Texas Tech Univ.* Department of range, Lubbock, Texas, 79409-2125 (1997).

Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029–1 034 (1996).

Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo, S. Kinetic properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. Corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal*, 11, 137-146 (2007).

Ghosh, M. Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. *Annals of botany* 98, 1145-1153 (2006)

Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A., Forsythe, S., The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *J. Biotechnol.*, 101: 49–56 (2003).

Göğüş, F., Fadiloğlu, S. Food chemistry. *Nobel Yayın Dağıtım*. Ankara, pp. 260 (2006).

Gözükara, E.M., Biyokimya. Ofset Repromat LTD Şti., 792-795, Ankara (1989).

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., Yıldırım, A., Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. Acephala. *Asian Journal of Chemistry*, 17, 2175–2183 (2005).

Halliwell, B., Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77 (1984).

Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science* 54, 644 (1989).

Hamed, R. R., Maharem, T. M., Fatah, M. M. A., Ataya, F. S., Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. *Phytochemistry*, 48, 1291 (1998).

Hatzilazarou, S.P, Syros, T.D, Yupsanis, T.A., Bosabalidis, A. M., Economou, A. S. Peroxidases, lignin and anatomy during in vitro and ex vitro rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *Journal of Plant Physiology*, 163, 827-836 (2006).

Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Transformation of Industrial Dyes by Manganese Peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction. *Appl Environ Microbiol.* August; 64(8): 2788–2793 (1998).

Hiraga, S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y. and Matsui H., A large family of class III olant peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, 42 (5), 462-468 (2001).

Hsu, P., ve P.D. Walton. Relationships between yield and its components and structures above the flag leaf node in spring wheat. *Crop Sci.* 11:190-193 (1971).

Humaira A., Qayyum, H., Studies on bitter gourd peroxidase catalyzed removal of p-bromophenol from wastewater Desalination, 262 (1-3), p.267-272 <http://www.sigma.com.tr./Peroksidaz, Mart 2008> (2010).

Ito, H, Hiraoka, N., Ohbayashi, A., Ohashi, Y. Purification and characterization of rice peroxidases. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2445-2454 (1991).

Jackson, P., Robertson, M., Cooper, M., and Hammer, G., The role of physiological understanding in plant breeding: from a breeding perspective. *Field Crops Research*, 49: 11-37 (1996).

Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski, AJ., Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol.* 10;52(1):1-12 (2013).

Jassey, V., Chiapusio, G., Gilbert, D., Toussaint, M., Binet, P., Phenoloxidase and peroxidase activities in Sphagnum-dominated peatland in a warming climate. *Soil biology & biochemistry* 46, 49-52 (2012).

Jen, J.J, Seo, A, Flurkey, W.H, Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63 (1980).

Johansson, E., Svensson, G., Variation in bread-making quality: effects of weather parameters on protein concentration and quality in some Swedish wheat cultivars grown during (1996).

Jouili, H, Bouazizi, H, Rossignol, M, Borderies, G, Jamet, E., El Ferjani, E. Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 1-8 (2008).

Kampis, A, Bartuczkovacs O, Hoschke A. and Aosvigyazo V, Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295 (1984).

Karlson, P., Telefoncu, A. Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya, Sermet Mat., Kırıkkale, s.68 (1998).

Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M., Pervin, F., Absar, N., Rosma, A., Purification and characterization of peroxidase from moringa oleifera L. leaves. *Bioresources* 7(3), 3237-3251 (2012).

Kirk, T., Farrell, R., 'Enzymatic Combustion': The Microbial Degradation of Lignin *Annu Rev Microbiol.*, 41: 465-505 (1987).

Kay, E, Shannon, L.M, Lew, J.Y. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**, 2470-2473 (1967).

Keha, E. ve Küvrevioğlu Ö.İ, Biyokimya. *Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum (2009).

Koç, M., C. Barutcular, Buğdayda çiçeklenme dönemindeki yaprak alan indeksi ile verim arasındaki ilişkinin Çukurova koşullarındaki durumu *Turk J Agric For* 24 (2000) 585-593@ Tübitak (2000).

Koc, M., C. Barutcular, I. Genc, Photosynthesis and productivity of old and modern durum wheats in a Mediterranean Environment. *Crop Science*; 43, 6; p: 2089-2097 (2003).

Koksal, Ekrem, et al. "Purification and characterization of peroxidase from sweet gourd (Cucurbita Moschata Lam. Poir.)" *International Journal of Food Properties* 15.5: 1110-1119 (2012).

Koksal, E. "Peroxidase from leaves of spinach (Spinacia oleracea): Partial purification and some biochemical properties." *International Journal of Pharmacology* 7.1: 135-139 (2011).

Köksal, E., Karnabahar (*Brassica oleracea L.*) Peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı* (2007).

Kristensen, B.K, Bloch, H., Rasmussen, S.K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501 (1999).

- Kuşcu,A., Yazlık ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) veriminde son çeyrek yüzyılda gerçekleşen ilerlemenin morfolojik ve fizyolojik esasları. Doktora tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana**.149-151 (2006).
- Kün, E. **Tahıllar-I** (Serin İklim Tahılları). Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No:1451, Ankara (1996).
- Kvaratskhelia, M, Winkel, C, Thorneley, R.N.F. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology*, 114, 1237-1245 (1997).
- Kwak, S.S, Kim S.K, Park I.H. and Liu J.R. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568 (1996).
- Lee, H.C, Klein, B.P. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137–152 (1990).
- Lee, S.H, Kim, E.S, Lee, M.Y. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. *Phytochemistry*, **58**, 859–864 (2001).
- Lehninger, A.L, Principles of biochemistry. Worth publisher, Acedemic Press, New York (2005).
- Leon, J.C, Alpeeva, I.S, Chubar, T.A, Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019 (2002).
- Lineweaver, H., Burk, D., "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". ***Journal of the American Chemical Society*** 56 (3): 658–666 (1934).
- Lopez, P, Sala, F.J., de la Fuente, J.L., Condon, S., Raso, J., Burgos, J. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polyphenol oxidase by manothermosonication. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, **42**, 252–256 (1994).
- Lowry, Oliver H, et al. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J biol Chem* 193,1: 265-275 (1951).
- Maksimoviç, J.D, Maksimoviç, V, Zivanovic, B, Sukalovic, V.H.T, Vuletic, M. Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant science*, in press. doi: [10.1016/j.plantsci.2008.06.015](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.06.015) (2008).
- Marangoni, A. G., Brown, E. D., Stanley, D. W., Yada, R. Y. Tomato peroxidase: rapid purification and partial characterization. ***Journal of Food Science***, **54**, 1269-1271 (1989).
- Marquez, O, Waliszewski, K.N, Oliart, R.M., Padio, V.T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. ***Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie***, **41**, 1372–1379 (2008).

- Menten, L.; Michaelis, M.I. "Die Kinetik der Invertinwirkung", *Biochem Z* 49: 333–369 (1913).
- McLellan, K.M, Robinson, D.S. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319 (1987).
- McVetty, P.B.E. ve L.E. Evans. Breeding methodology in wheat. I. Determination of characters measured on f spaced plants for yield selection in spring wheat. *Crop Sci.* 20:584- 586 (1980).
- Mdluli, K.M. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chemistry*, **92**, 311–323 (2005).
- Mittler, R, Zilinskas, B. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology*, **97**, 962–968 (1991).
- Mittler, R., Zilinskas, BA., Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J* 5:397-405 (1994).
- Morohashi, Y, Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643-1650 (2002).
- Nadaroğlu, H., Purification and properties of peroxidase from prangos ferulacea (*Apiaceae*) and investigation by some chemicals, *Asian J Chem.*, 21(7) 5768-5776 (2009).
- Nair, A. R, Showalter, A. M. Purification and characterization of a woundinducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemistry Biophys. Research Communication*, 226, 254 (1996).
- Nass, H.G. Determination of characters for yield selection in spring wheat. *Can. J. Plant Sci.* 53:755-762 (1973).
- Nicoli, M.C, Elizalde, B.E, Pitotti, Lericci, C.R. Effects of sugars and maillard reactions products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry*, **15**, 169-184 (1991).
- Onsa, G.H, Saari N, Selamat J. and Bakar J., Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376 (2004).
- O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, SRR, Hawkes, FR., Hawkes, DL., Wilcox, SJ., Azo-Dye Degradation in An Anaerobic-Aerobic Treatment System Operating on Simulated Textile Effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 ,249-254 (2000).
- Ory, R.L., St. Angelo, A.J. *Enzyme in Food and Beverage Processing*. American Chemical Society. Washington, D.C. USA. pp. 143-171 (1977).

- Pandit, A. B., and P Kharatmol, P. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassicca olearacea* var. capitata). *Journal of Biochemical Technology* **4**, 531-540 (2013).
- Paul, K.G, Stigbrand, T. Four isoperoxidases from horseradish root. *Acta Chemica Scandinavica*, **24**, 3607-3617 (1970).
- Pomar, F, Bernal, M. A, Diaz, J, Merino, F. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, **46**, 1313– 1317 (1997).
- Pütter, J, Becker, R, Methods of enzymathic analysis:Peroxide. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, s 286 (1987).
- Rani, N.D, Abraham, T.E. Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time temperature indicator for food materials. *Journal of Food Engineering*, **77**, 594–600 (2006).
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., and deshpande, V.V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62** (3):597-635 (1998).
- Ratcliffe, B, Flurkey, W.H, Kuglin, J, Dawley, R. Tyrosine, laccase and peroxidase in mushrooms (*agaricus*, *crimini*, *oyster* and *shiitake*). *Journal of Food Science*, **59**, 824-827 (1994).
- Ravindra, N., Van-Huystee, R. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiology*, **75**, 956–958 (1984).
- Ray, P.M. Destruction of auxin. *Annual Review Plant Physiology*, **9**, 81- 118 (1958).
- Reynolds, M. P, Delgado, M. I., Gutierrez-Rodriguez, M., and Largue-Saavedra, A., Photosynthesis of wheat in a warm, irrigated environment-I: genetic diversity and crop productivity. *Field Crops Research*, **66**: 37-50 (2000).
- Reynolds, M. P, Singh, R. P., Ibrahim, A., Ageeb, O. A. A., Larguesaavedra, A., and Quick, J. S., Evaluating physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments. *Euphytica*, **100**:84-95 (1998).
- Richards, R. A, Rebetzke, G. J., Condon, A. G., and Mickelson, B. J., Targeting traits to increase the grain yield of wheat. *proc. 8th assembly. Wheat Breeding Society of Australia*, 54- 57 (1996).
- Robert. K.M, Petter A.M, Darly K.G. and Victor, W.R, Harper’ın Biyokimyası. *Barış Kitabevi*, 141, İstanbul (1993).
- Robinson, F.E. Maxwell S.R.J. and Thorpe G.H.G. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, **26**, 291–302 (1987).

Robinson, D.S. Peroxidases and Catalases in foods. Elsevier Science Publishers, UK, pp. 1–47 (1991).

Rodrigo, C. Rodrigo, M. Alvarruiz, A., Frigola, A. Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *Journal of Food Protection*, **59**, 1065-1071 (1996).

Rodriguez-Lopez, J.N, Smith A.T., and Thorneley R.N.F., Role of arginine 38 in horseradish peroxidase a critical residue for substrate binding and catalysis. *Journal Of Biological Chemistry*, **271**, 4023-4030 (1996).

Rodriguez Lopez, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., 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 (2000).

Rogozhin, V.V. Kutuzova, G.D., Ugarova, N.N. Inhibition of Horseradish Peroxidase by N-Ethylamide of o-Sulfobenzoylacetic Acid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **26**, 138-141 (2000).

Rogozhin, V.V. Rogozhin, T.V. The Role of Indole-3-Acetic Acid in Peroxidase Oxidation of Ascorbic Acid Catalyzed by Horseradish Peroxidase. *Biology Bulletin*, **31**, 342–345 (2004).

Rompel, A, Albers M, Naseri J.I. and Gerdemann C., Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1774**, 1422–1430 (2007).

Rosegrant, M.W, Agcaoili-Sombilla, M., Perez, N.D., Global food projections to 2020: implications for investment. Washington, DC, IFPRI (1995).

Rudra, S.G, Shivhare, U.S, Basu, S, Sarkar, B.C. Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase in Coriander Leaves. *Food Bioprocess Technology*, **1**, 187– 195 (2008).

Sakharov, I.Y, Ardila, G.B. Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. *Food Chemistry*, **65**, 51-54 (1999).

Sariri, R, Jafarian, V., Sajedi, R.H., Khajeh, K. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid. *Journal of Molecular Liquids*, **128**, 175–177 (2006).

Savic, S, Stikic, R., Radovic, B. V., Bogicevic, B., Jovanovic, Z., Sukalovic, V.H.-T. Comparative effects of regulated deficit irrigation (RDI) and partial rootzone drying (PRD) on growth and cell wall peroxidase activity in tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, **117**, 15–20 (2008).

Scandalios J.G, 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 (1994).

- Sciancalepore, V, Longone, V, Alвити, F.S. Partial purification and some properties of peroxidase from malvasi grapes. *American Society for Enology and Viticulture*, **36**, 105-110 (1985).
- Segel, I.H, Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York (1975).
- Serrano-Martinez, A, Fortea, M.I, del Amor, F.M., Nunez-Delicado, E. (2008). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum L.*) peroxidase. *Journal of Food Chemistry*, **107**,193-199.
- Shewry, PR "Buğday." *Deneysel Botanik Dergisi* 60,6: 1537-1553 (2009).
- Shalini, G.R, Shivhare, U.S, Basu, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering*, **85**, 147–153 (2008).
- Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, Hiraga S, Nakayama N, Nakamura T, Yukawa K, Hachinohe M, Matsumoto H, Komatsu S., Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. *Phytochemistry* 69:1295-1303 (2008).
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53:1305–1319 (2002).
- Signoret, A, Crouzet, J. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 459 (1982).
- Soares, G.M.B., Ferreir, M.C., Pessoa de Amorim, M.T., “Decolorization of an Antraquinone-Type Dye Using A Laccase Formulation”, *Bioresource Technology*, 79, 171-17 (2001).
- Soysal, Ç, Söylemez, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, **68**, 349–356 (2005).
- Swedin, B, Theorell, H. Dioximaleic acid oxidase action of peroxidase. *Nature*, **145**, 71 (1940).
- Tanskley, S. D., Nelson, J. C., Advanced back-cross qtl analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable qtl form nadapted germplasm in to elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 191-203 (1996).
- Telefoncu, A, *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir (1986).
- Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K., —Purification and Characterisation Of Laccase From *Monocillium indicum* Saxenall *Applied Microbiol Biotechnology*, 37: 321- 323 (1992).
- Thongsook, T, Barrett, D.M. (2005a). Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases. *Journal of Agricultural andFood Chemistry*, **53**, 3206-3214.

- Tıpawan, T. Barrett M. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3206–3214 (2005).
- Tosun, F., Sağsöz, S., Bitki Islahı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 172 (1994).
- Triplett, B. A, Mellon, J. E, Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science* 81, 147-154 (1992).
- Troianı, E.P, Troianı, C.T, Clemente, E. Peroxidase and polyphenol oxidase in grape. *Ciencia agrotecnologia*, **27**, 635-642 (2003).
- Turgut, K., Sakaraya bölgesinde yetiğen deve dikenı (Silybum marianum) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek lisan tezi, *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* (2009).
- TÜİK**, Türkiye istatistik kurumu. Bitkisel üretim istatistikleri, *tuik.gov.tr* (2006).
- TÜİK**, Türkiye istatistik kurumu. Bitkisel üretim istatistikleri, *tuik.gov.tr* (2012).
- Vallee, B, Ulmer, D. Biological effects of mercury, cadmium and lead. *Annual Review in Biochemistry*, **49**, 91–128 (1972).
- Van Huystee, R.B, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219 (1987).
- Van Huystee, R.B, Xo, Y.J., Odonnell, J.P. Variation in solet band absorption of peroxidase due to calcium. *Plant Physiology and Biochemistry*, **30**, 293-297 (1992).
- Veitch, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, **65**, 249–259 (2004).
- Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*, Wiley; 4 edition, New York (2010).
- Wakamatsu, K. and Takahama U. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171 (1993).
- Wang, Z, Luh, B.S. Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *Journal of Food Science*, **48**, 1412 (1983).
- Whitaker, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Science*.(2nd ed). CRC Pres. University of California, Davis, USA, pp. 230-290 (1993).
- Whitaker, J.R., Catalase and peroxidase. In *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Whitaker, J. R., Ed., pp 565-578, Dekker: New York (1994).
- Whitney, P.L, Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476 (1974).

- Williams, D.C, Lim, M.H, Chen, A.O., Pangborn, R.M., Whitaker, J.R. Blanching of vegetables for freezing which indicator enzyme to choose? *Food Technology*, **40**, 130–139 (1986).
- Wolfgang, A. Enzymes in industry: Production ad applications. WILEYVCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim (2004).
- Wong W.S.D. Food Enzymes Structure and Mechanism. Chapman and Hall, pp.321 (1995).
- Wong, Y., Yu, J., “Laccase-Catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes”, *Wat.Res.*, Elsevier, 33(16), 3512-3520 www.mustafaaltinisik.org. /Enzim, Nisan 2008 (1999).
- Wrigley, CW, JA Bietz, ve Y. Pomerantz. "Proteinler ve amino asitler yer alır."*Buğday: kimya ve teknoloji*". *Cilt I*. Ed. 3: 159-275 (1988).
- Yemenicioglu, A, Özkan, M, Cemeroglu, B. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4158–4163 (1998).
- Yıldırım, M, Akıncı, C, Koç, M, Barutçular, C, Bitki örtüsü serinliği ve klorofil miktarının makarnalık buğday ıslahında kullanım olanakları. *Anadolu Tarım Bilim. Derg*, 2009,24(3):158-166 (2009).
- Zhang, Z, Wang, Z, Lin, R. Purification and some properties of a peroxidase from Tartary buckwheat bran. *Fagopyrum*, **16**, 57-60 (1999).

ÖZGEÇMİŞ

1988 Erzincan'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Çağlayan'da tamamladı. 2009 yılında Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2013 yılında bölüm birincisi ve fakülte ikincisi olarak mezun oldu. 2014 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya alanında yüksek lisans öğrenimine başladı.