

**AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ TEKNİĞİ İLE  
PEROKSİDAZ ENZİMİNİN KIRMIZI PANCARDAN  
(*Beta vulgaris*) SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Sevilay İNAL**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Ana Bilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR  
2013  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE PEROKSİDAZ  
ENZİMİNİN KIRMIZI PANCARDAN ( *Beta vulgaris* )  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sevilay İNAL

KİMYA ANA BİLİM DALI

ERZURUM  
2013

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEZ ONAY FORMU



**Afinite Kromatografisi Tekniği ile Peroksidaz Enziminin Kırmızı Pancardan (*Beta Vulgaris*) Sıflaştırılması ve Karakterizasyonu**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Sevilay İNAL tarafından hazırlanan bu çalışma 15.07.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../....)** ile kabul edilmiştir.


Başkan : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVOĞLU

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum



Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU

**Enstitü Müdürü**

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE PEROKSİDAZ ENZİMİNİN KIRMIZI PANCARDAN (*Beta vulgaris*) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sevilay İNAL

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit afinite kolonu hazırlanarak kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden peroksidaz (POD) enzimi tek basamakta %38 verimle 196,9 kat saflaştırıldı. Kromatografik işlemler sırasında enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 470 nm'de ölçüldü. Saflaştırılan POD enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütleini belirlemek için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Molekül kütleini kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD 160 kDa bulundu. Saflaştırılan POD enzimi üzerine yapılan kinetik çalışmalar neticesinde optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla 6,5, 0,7 M, 70°C, 6,5 olarak tespit edildi. Guaiakol substratı için enzimin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı ve kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) için  $K_M$  9,09 mM ve  $V_{max}$  1,3812 EÜ/ml olarak belirlendi. Peroksidaz enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda incelendi. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü peroksidaz için yarışmasız inhibisyon göstermekte olup  $IC_{50}$  değeri 0,047 mM olarak,  $K_i$  değeri ise  $0,777\pm 0,17$  mM olarak tespit edildi.

**2013, 72 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Peroksidaz, saflaştırma, afinite, karakterizasyon

## ABSTRACT

Master Thesis

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM RED BEET (*BETA VULGARIS*) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

Sevilay İNAL

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this study, peroxidase (POD) enzymes of red beet (*Beta vulgaris*) plant were purified in a single step by using Sepharose-4B-L-tyrosine-4-aminobenzohydrazide affinity chromatography as 38% yield, 196.9-fold. Enzyme activity was measured spectrophotometrically at 470 nm. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed to check the purity and molecular weights of enzymes to determine and the observed single band. Molecular masses of enzymes for POD red beet (*Beta vulgaris*) was found to be approximately 160 kDa. As a result of the kinetic studies on the enzyme; optimum pH, optimum ionic strength, the optimum temperature and stable pH were determined as 6.5, 0.7 M, 70°C, 6.5 for red beet (*Beta vulgaris*).  $K_M$  and  $V_{max}$  values were calculated for the pure enzyme using guaiacol as substrate and for red beet (*Beta vulgaris*)  $K_M$  and  $V_{max}$  values were found to be as 9.09 mM and 1.3812 EU / ml. Also, inhibitory effect of 4-aminobenzohydrazide inhibitor on pure peroxidase enzyme was examined in vitro condition. 4-aminobenzohydrazide have shown noncompetitive inhibition in peroxidase enzyme of red beet (*Beta vulgaris*),  $IC_{50}$  value was calculated as 0.047 mM,  $K_i$  value was calculated as  $0,777 \pm 0,17$  mM.

**2013, 72 pages**

**Keywords:** Peroxidase, purification, affinity, characterization

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarın' da gerçekleştirilmiştir.

Tezimin gerek deneysel aşamasında gerekse yazım aşamasında üzerimden hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen, deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarından yararlanmamı sağlayan dekanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e ve Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVIÖĞLU'na ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye ve İspir Hamza Polat Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ali ATASEVER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım, doktora öğrencisi Sayın Ramazan KALIN, Sayın Arş. Gör. Zeynep KÖKSAL, doktora öğrencisi Sayın Arş. Gör. Pınar TAŞER ve yüksek lisans öğrencisi Sayın Yeliz DEMİR başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma, ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Sevilay İNAL

Temmuz 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Serbest Radikaller .....	6
1.2. Antioksidanlar .....	7
1.3. Antioksidan Enzimler .....	9
1.4. Peroksidazlar (POD, E.C.1.11.1.7) .....	11
1.5. Afinite Kromatografisi .....	15
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEMLER .....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyal .....	19
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	19
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	19
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	20
3.2. Yöntemler .....	24
3.2.1. Protein tayini .....	24
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini .....	24
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini .....	25
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini .....	25
3.3. Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları .....	27
3.3.1. Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) için homojenat hazırlanması .....	27
3.3.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi .....	27
3.3.3. Afinite jelinin hazırlanması .....	31

3.3.4. Afinite kolonunun paketlenmesi .....	33
3.3.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu .....	34
3.3.6. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi .....	34
3.4. Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) Bitkisinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları .....	36
3.4.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları .....	36
3.4.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları .....	36
3.4.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları .....	36
3.4.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları .....	37
3.4.5. Guaiakol için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	37
3.4.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar .....	37
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>38</b>
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik .....	38
4.2. Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları.. .....	39
4.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları .....	39
4.2.2. POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları .....	40
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları .....	41
4.3. Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) Bitkisinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar .....	43
4.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları .....	43
4.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları .....	44
4.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları .....	46
4.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları .....	48
4.3.5. Guaiakol substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları .....	49
4.3.6. Kullanılan inhibitörün $K_i$ ve $IC_{50}$ değerlerinin bulunması yönelik yapılan çalışma sonuçları .....	51
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>58</b>
KAYNAKLAR .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	73



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CAT	: Katalaz
E.C.	: Enzim komisyonu
E.Ü.	: Enzim ünitesi
EI	: Enzim inhibitör kompleksi
ES	: Enzim substrat kompleksi
ESI	: Enzim inhibitör substrat kompleksi
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-RD	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
ROS	: Reaktif oksijen türü
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2.	Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.3.	Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.4.	Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.5.	Lineweaver-Burk Grafiği.....	6
Şekil 1.6.	Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.....	13
Şekil 1.7.	Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü.....	14
Şekil 1.8.	Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	15
Şekil 3.1.	Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.....	26
Şekil 3.2.	CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	32
Şekil 3.3.	4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli.....	33
Şekil 4.1.	Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumini).....	38
Şekil 4.2.	4-aminobenzohidrazit kolonundan kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını gösteren grafik.....	39
Şekil 4.3.	4-aminobenzohidrazit kolonundan kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	40
Şekil 4.4.	4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	41
Şekil 4.5.	Kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen $R_f$ -log $M_K$ grafiği.....	42
Şekil 4.6.	Kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği ....	44
Şekil 4.7.	Değişik konsantrasyonlardaki $KH_2PO_4$ (pH 6,5) tampon çözeltileri	

	kullanılarak kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-İyonik şiddet (mM) grafiği.....	46
<b>Şekil 4.8.</b>	Kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/ml)-Sıcaklık ( <sup>0</sup> C) grafiği.....	47
<b>Şekil 4.9.</b>	Değişik pH'lardaki KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	49
<b>Şekil 4.10.</b>	Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin guaiakol için K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	50
<b>Şekil 4.11.</b>	Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> için K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	51
<b>Şekil 4.12.</b>	Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği .....	53
<b>Şekil 4.13.</b>	Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki kuvvet içeriği.....	26
<b>Çizelge 4.1.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	41
<b>Çizelge 4.2.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi için SDS-PAGE ile molekül tayini sonucu.....	42
<b>Çizelge 4.3.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	43
<b>Çizelge 4.4.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	45
<b>Çizelge 4.5.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları.....	47
<b>Çizelge 4.6.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	48
<b>Çizelge 4.7.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi.....	50
<b>Çizelge 4.8.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enzimi için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik $\text{H}_2\text{O}_2$ derişimi ve aktivite çizelgesi.....	51
<b>Çizelge 4.9.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge.....	52
<b>Çizelge 4.10.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin aktivitesi üzerine	

4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC <sub>50</sub> çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	53
<b>Çizelge 4.11.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K <sub>i</sub> değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	55
<b>Çizelge 4.12.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K <sub>i</sub> değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	56
<b>Çizelge 4.13.</b> Kırmızı Pancar ( <i>Beta vulgaris</i> ) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların sonuçları.....	57

## 1.GİRİŞ

Canlı sistemlerinde yürüyen mekanizmanın aksamaması ve işlevini olağan sürecinde yerine getirebilmesi çok önemlidir. Canlı sistemlerde tepkimelerin enzimatik olarak katalizi zorunluluğu vardır. Bu gereklilik canlı yaşamının faaliyetlerini aksatmadan işlevleri etkin kılmak için şarttır. Bu işlemler metabolizma içerisinde biyolojik katalizörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Katalizlenme sürecinde tepkimeler uygun koşullarda oluşmazlar ise gerçekleşme süresi yavaşlar ve beklentilere cevap verme yeterliliği kısıtlanır. Pek çok biyolojik molekülün reaksiyon verebilmesi için gerekli uygun koşulların oluşturmasının yanı sıra sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi optimum yapılarla sahip ortamlara ihtiyaç vardır.

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 mümkün olmaktadır.

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Enzimlerin katalizleme güçleri "Turnover Sayısı" ile anlamlandırılmakta ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak ifade edilmektedir. Bir takım enzimler katalizleme fonksiyonlarını sadece protein yapıları ile oluşturabilirken bazıları ise bu fonksiyonları için kofaktör denilen guruplara gerek duyarlar. 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).

Bu güne kadar bilinen yaklaşık iki binden fazla enzim, kataliz ettiği tepkime ya da substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek isimlendirilirler. Fakat yapılan bu isimlendirmeler birçok enzimin fonksiyonları hakkında gerekli bilgileri vermediği tespit edilmiştir. Bunun üzerine Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yapılan sistematik bir sınıflandırma ile her enzim için dört rakamlı bir kod numarası tanımlanmıştır. Tanımlanan dört rakamdan ilki enzimin bağlı bulunduğu grubu, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu ve sonuncusu ise ilk üç numarası aynı olan enzimler arasındaki dizilişi ifade eder (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;

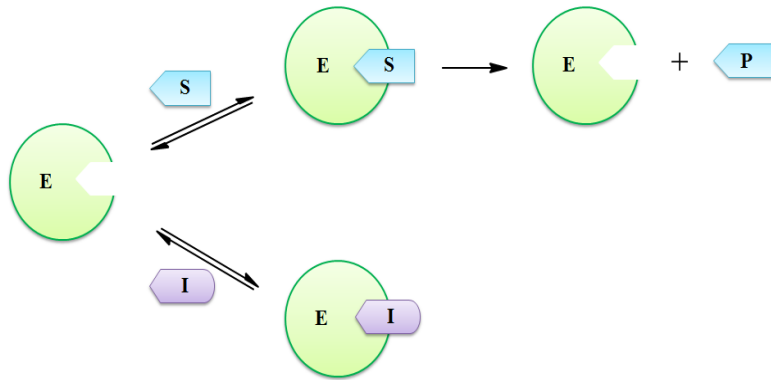
1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve Redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
2. Transferazlar: Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) taşıyan grupların transferini katalize eden enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Bağlara su sokarak bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların meydana getirildiği reaksiyonları katalize eden enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Optik veya geometrik izomerlerin dönüştürülmesini katalize eden enzimlerdir.
6. Ligazlar: Enerji açısından yüksek enerjili bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımı ile iki molekülün bağlanma reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir (Champe *et al.* 2007; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları, aktivitelerini artırıcı yönde etkileyen bileşiklere aktivatör denir. 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 önemli bir olgudur. Hem enzim etki mekanizmaların 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 itibariyle 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 kaldırılabilir. Başka bir söylemle enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken  $K_M$  değerinde artış gözlenir (Şekil 1.1) (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

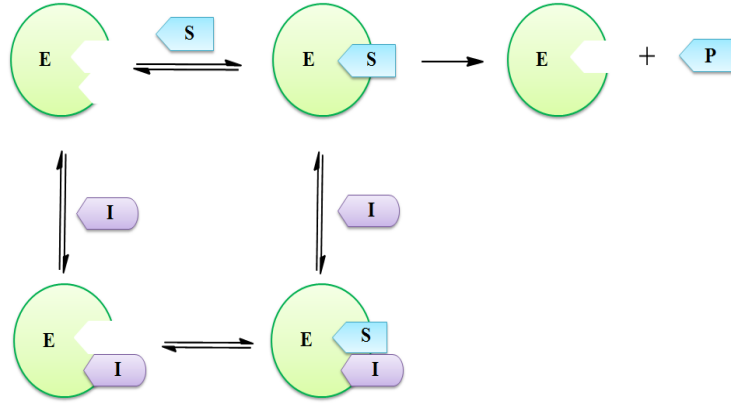


**Şekil 1.1.** Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

ii. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör ve substrat arasında enzim aktif bölgesine bağlanmada bir yarış söz konusu değildir. Çünkü inhibitör enziminin farklı bir bölgesine bağlanmaktadır. Enzimin  $V_{max}$  değeri

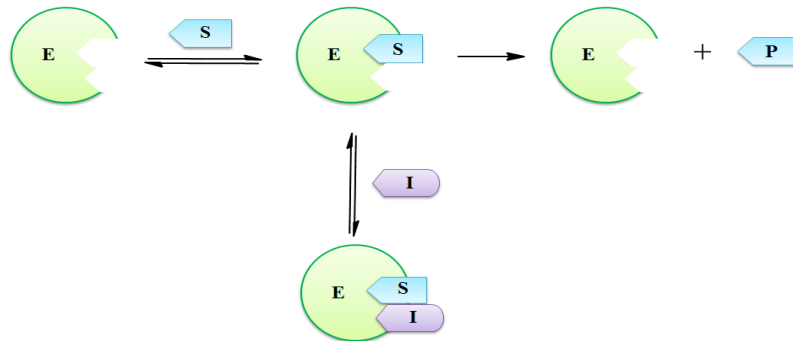


azalırken  $K_M$  değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanabilmesi ile enzimin EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Şekil 1.2) (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



**Şekil 1.2.** Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

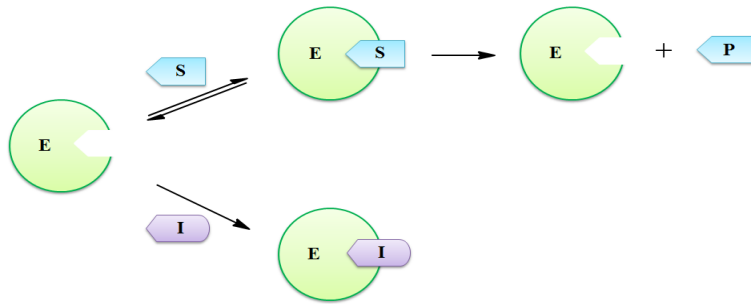
**iii.** Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon türü ise; bir substratlı reaksiyonlarda ender görülürken, daha çok iki substratlı reaksiyonlarda yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. İnhibitör serbest enzime değil sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanabilmektedir. Bu veriler ışığında 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 düşer (Şekil 1.3) (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



**Şekil 1.3.** Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

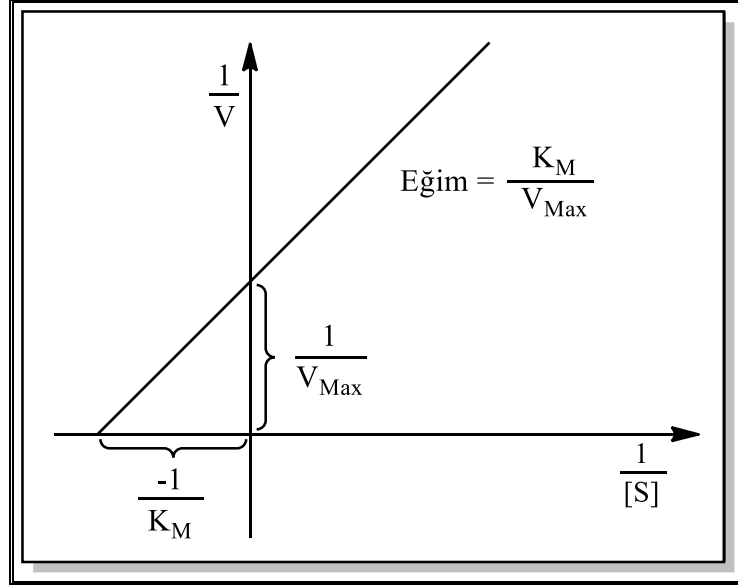
Multienzim sistemlerin birçoğu, sahip oldukları net reaksiyon hızlarını düzenleme kapasiteleri ile seri reaksiyonlar gösterebilmektedirler. Bu yüzden dönüşümlü inhibisyon sınıfının bir alt dalı olan nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyonunun özel bir türü olarak karşımıza çıkan lineer karışık tür inhibisyonun 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 meydana gelen inhibisyon türüdür. Dönüşümsüz inhibisyon da  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek max. hız) azalır,  $K_M$  ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişime uğramaz (Şekil 1.4) (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 türüne karar verilir.



**Şekil 1.4.** Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler Michaelis - Menten grafiğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden  $K_M$  sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren  $V_{max}$  değerinden elde edilir. Değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar bulunarak  $V$ -[S] grafiği (Michaelis - Menten) veya  $1/V$ - $1/[S]$  grafiği (Lineweaver – Burk grafiği) ile  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



**Şekil 1.5.** Lineweaver-Burk Grafiği

### 1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlıkları düşük, oldukça reaktif moleküllerdir (Abdollahi *et al.* 2003). Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir.

Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedir. Canlı metabolizmasında bu reaktif oksijen türleri farklı şekillerde meydana gelmektedir. Normal aerobik solunum, polimorfonükler lökositleri, makrofajları ve peroksizomları stimüle eder. Peroksizomlar hücre tarafından üretilen çoğu ROS (reaktif oksijen türleri) türünün en önemli endojen kaynağıdır. ROS'un ekzojen kaynakları ise sigara dumanı, radyasyon, çevre kirliliği, organik çözücüler, UV ışınları ve pestisitlerdir (Ak and Gülçin 2008). ROS'un kontrolsüz üretimi ve dengesiz antioksidan mekanizması birçok hastalık belirtilerinin yanı sıra erken yaşlanmayla da sonuçlanmaktadır (Gülçin 2008). Sonuç olarak ROS'un sıtma,

yaşa bağı bağışıklık sistemi hastalığı, kalp hastalıkları, felç, ateroskleroz, diyabet ve kanser gibi 100'den fazla hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (Gülçin 2012).

ROS'den canlı metabolizmasında meydana gelen bazı hasarlar örnek olarak aşağıdakileri verebiliriz:

Serbest radikaller DNA'da direkt hasara yol açabilirken, bir kısım faktörler de DNA da tamir bozuklukları oluşturup dolaylı olarak hasara yol açmaktadırlar. Serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrenin mutasyona uğramasına veya hücre ölümlerine sebep olmaktadır (Blakely 1990).

Glutasyon, triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden oluşan proteinler de serbest radikallerden kolayca etkilenme özelliğine sahiptir (Blakely 1990). Proteinlerde serbest radikallerin etkisiyle çeşitli fragmantasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir, sonuçta protein fonksiyonlarında bozulmalar ortaya çıkmaktadır (Blakely 1990).

Serbest radikaller membran lipidlerini de geri dönüşümsüz olarak hasar uğrattırlar. Reaktif oksijen türleri kolayca membran lipidlerinin yapısını bozarak doymamış aldehytlerin oluşmasını sağlarlar. Bu yapılar, serbest radikallere göre daha dayanıklı olup, hücrelerdeki biyomoleküllerin yapısını bozarak lipid peroksidasyonuna yol açarlar (Tamer 1998).

## **1.2. Antioksidanlar**

Canlı metabolizmasında reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmasını üstlenen çeşitli enzimler ve antioksidan maddeler bulunmaktadır. Oksidasyonu durduran her hangi bir madde antioksidan olarak adlandırılmaktadır. Antioksidan madde, hedef molekül olan serbest radikalden bir elektron alarak veya vererek onu nötrölize eder ve böylece serbest radikal zincirleme reaksiyonlarını durdurur. Antioksidan maddelerin özellikle serbest radikal haline dönüşmemeleri her durumda stabil olmalarından

kaynaklanmaktadır (Chu and Liu 2005). Canlı metabolizmasında antioksidan etkiye sahip bileşiklerin varlığı yaşam için oldukça önemlidir. Antioksidanlar, oksidanları dört temel yol ile etkisiz hale getirirler. Bunlar

**1. Süpürme etkisi (Scavenging):** Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

**2. Söndürme etkisi (Quenching):** Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.

**3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking):** Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

**4. Onarma etkisi (Repair):** Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

Antioksidanlar insan vücudunda ROS'tan kaynaklı oksidatif hasarı azaltıp lipit peroksidasyonu gibi birçok kronik hastalığın ilerlemesine engel olurlar (Gülçin 2008; Gülçin 2012). Antioksidan maddeler, ROS'un zararlı etkilerinden canlı metabolizmasını korudukları gibi, yiyeceklerin, ilaçların üretimi ve depolanması sırasında bozulmasının temel sebeplerinden biri olan lipit peroksidasyonunu geciktirerek uzun raf ömrü sağlarlar (Gülçin 2010). Antioksidanlar, gıda maddelerinin bozulmasını önlemek amacıyla katkı maddesi olarak oldukça yaygın kullanılırlar. Eski zamanlardan bu yana, yemeklerde tatlandırıcı olarak kullanılan baharatlar da çok iyi antioksidan kapasitesilerine sahiplerdir.

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

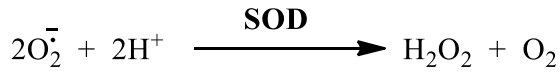
Enzim olarak (endojen); süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ...

Enzim olmayan antioksidanlar (endojen); bilirubin, melatonin, miyoglobin, glutatyon ferritin...

Eksojen antioksidanlar; vitaminler, gıda ile alınan antioksidanlar ve ilaçlardır.

### 1.3. Antioksidan Enzimler

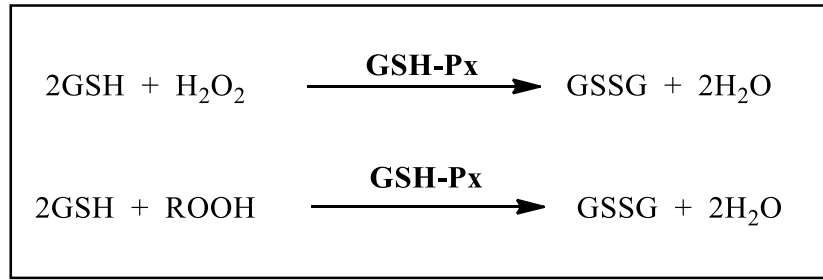
Süperoksit dismutaz (SOD); süperoksit serbest radikalinin ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen enzim olup antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur (Liu *et al.* 2008). Aktif bölgesinde Cu-Zn ve Mn olmak üzere iki tip SOD enzimi vardır. Bunlardan tetramerik Mn formu, esas olarak mitokondrial matrikste, kısmen sitoplazmada bulunur. Dimerik yapıya sahip olan Cu-Zn formu ise esas olarak sitoplazmada, kısmen de mitokondri intermembranöz alanda bulunur (Blum and Fridovich 1985; Deby and Goutier 1990; Marklund 1990).



Katalaz enzimi (CAT, E.C.1.11.1.6), hücre içi hidrojen peroksit konsantrasyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan süperoksit radikalinin dismutasyonu sonucu veya doğrudan oluşan  $H_2O_2$ 'nin suya dönüştürülerek detoksifiye edildiği reaksiyonu katalizler. Hücre içinde sitozolde ve daha çok peroksizomlarda bulunmaktadır. Aktif bölgesinde hem grubu bulunan bir hem proteindir (Burk 1990; Bast *et al.*1991). Katalaz enzimi,  $H_2O_2$  oluşumunun düşük olduğu durumlarda ya da yüksek elektron donörü konsantrasyonlarında peroksidatik reaksiyonla katalizler;



Glutasyon peroksidaz enzimi (GSH-Px, E.C.1.11.1.9) hücre sitozolünde ve mitokondri matriksinde bulunup; peroksitlerin suya dönüşümünü katalizlemektedir. Selenyum (Se) bağımlı ve (Se) bağımsız olmak üzere GSH-Px enziminin iki şekli bulunmaktadır. Se bağımsız enzim sadece organik peroksitleri (ROOH) suya dönüştürürken, Se bağımlı olan enzim hem organik peroksitleri hem de hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) suya dönüştürür (Meister and Anderson 1983; Giibson *et al.* 1985; Ursini *et al.* 1985; Southorn and Powis 1988; Vani *et al.* 1990). Glutasyon peroksidaz enzimi, sülfür içeren bir tripeptit olan glutasyonu (GSH) indirgeyici güç olarak kullanır. Glutasyon ise tüm memeli hücrelerinde en çok bulunan düşük molekül ağırlığına sahip bir tiyol molekülüdür (Al-Turk *et al.* 1987; Bast *et al.* 1991).



Birbirlerine disülfid bağları ile bağlanan glutasyonlar indirgeyici özelliklerini kaybederler yani okside glutasyon (GSSG) haline dönüşürler. Fakat GSSG'nin tekrar indirgenmiş hale dönüşmesi, antioksidan savunma sisteminin fonksiyonunu sürdürebilmesi için gereklidir. Koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD olan glutasyon redüktaz enzimi (GSH-RD, E.C.1.6.4.2), NADPH varlığında GSSG'nin indirgenme reaksiyonunu katalizler. Dimerik yapıda olan GSH-RD enzimi sitozol ve mitokondride bulunmaktadır (Meister and Anderson 1983; Hussein *et al.* 1988).



Metabolizma sonucu organizmada meydana gelen toksik bileşiklerin detoksifikasyonunda görev alan Glutasyon S-transferaz (GST, E.C.2.5.1.18) enzimi

ayrıca canlıda oluşabilecek hasarları önlemede de önemli rol oynamaktadır (Marss 1996). GST enzimi; endojen ve eksojen hidrofobik elektrofiller ile GSH arasındaki konjugasyonu katalizleyerek homeostasisi sağlar (La Creta *et al.* 1988; Vanderberghe *et al.* 1990).

#### **1.4. Peroksidazlar (POD, E.C.1.11.1.7)**

Peroksidazlar (EC:1.11.1.7), oksidleyici (oksidant) olarak hidrojen peroksit veya organik hidrojen peroksitleri kullanan oksidoredüktazlardır. Peroksidazların çoğu N-bağlı oligosakkarid bulunduran glikoproteinlerdir. Peroksidazlar prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX ihtiva eden hem proteinleridir (Adams 1978; Whitaker 1994). Peroksidazlar; başlıca bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda mevcuttur. Hem peroksidazları, birbirini takip eden benzerliğin temelinde hayvan peroksidazları; bitki, mantar ve bakteri peroksidazları olarak iki sınıfa ayrılırlar (Rompel *et al.* 2007).

Peroksidazlar amino asit dizilimleri dikkate alınarak üç gruba ayrılmaktadır. I.Grup sitokrom c peroksitaz (CcP), askorbat peroksitaz (APX), ve bakterial katalaz peroksitazları içeren hücre içi peroksitazlardır. II. Grup manganaz peroksitaz, lignin peroksitaz (LiP) gibi salgılanan “fungal enzimleri” kapsamaktadır. III. Grup ise bitki peroksitazlarını bulundurmaktadır. Kararlı olması ve yabancı turp (horseradish) köklerinden kolayca izole edilmesi nedeniyle birçok uygulamada yer alan “horseradish peroksitaz” izoenzim C (HRP) III. Grup'ta yer almaktadır. Peroksitaz ailesinin yapı-fonksiyon ilişkileri ile ilgili çalışmaların çoğu, III. grup'un temsilcisi gibi alınan HRP ile gerçekleştirilmiştir (Rodriguez-Lopez 1996).

Peroksitaz enzimlerinin spesifik aktivite, optimum pH, kofaktörler, substrat ilgisi ve inhibitörlere hassasiyet gibi biyokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren birçok izoenzimleri bulunmaktadır (Fric 1976). Peroksitazların organizma içerisinde ilk olarak protein kısmı sentezlenir. Ancak enzim fonksiyonel olarak aktif değildir. Apoprotein ile hem grubunun birleştirilmesiyle enzim aktiflik kazanmış olur (Fric 1976; Van Huystee 1987).



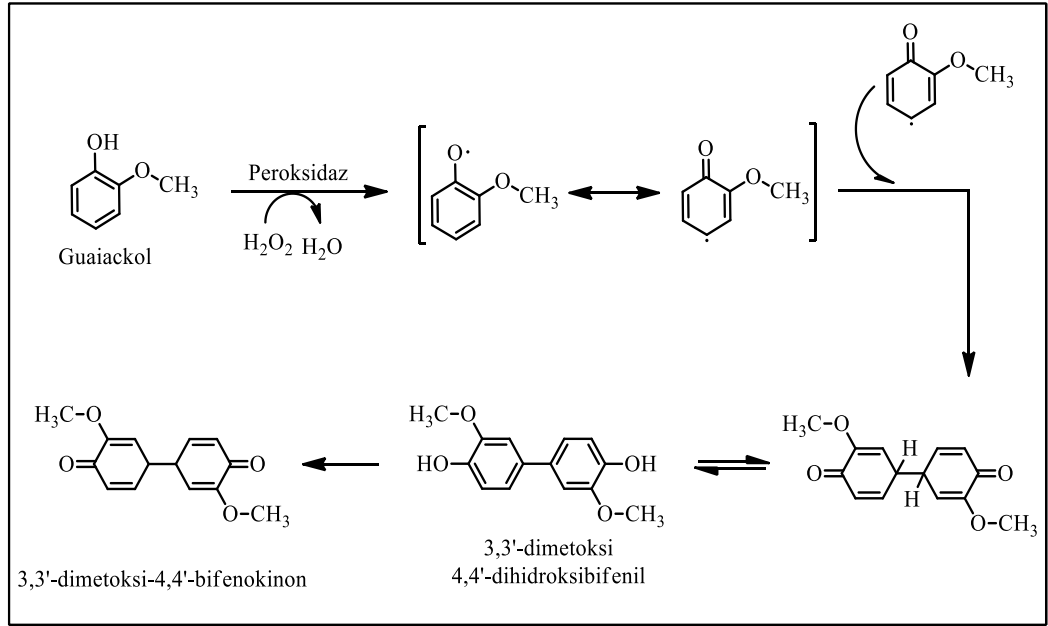
Peroksidazların katalizledikleri reaksiyonlar oldukça kompleks olmalarından dolayı aşağıdaki gibi genel bir denklem ile gösterilmektedirler (Van Huystee 1987).



Guaiakol, katekin, klorogenik asit ve katekol gibi birtakım fenolik moleküller bitki peroksidazları tarafından peroksit karşısında oksidasyonu gerçekleştirebilir (Onsa *et al.* 2004). Yukarıda sayılan aromatik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılarak metabolizmada meydana gelen hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürürler (Robinson *et al.* 1987; Kampis *et al.* 1984).

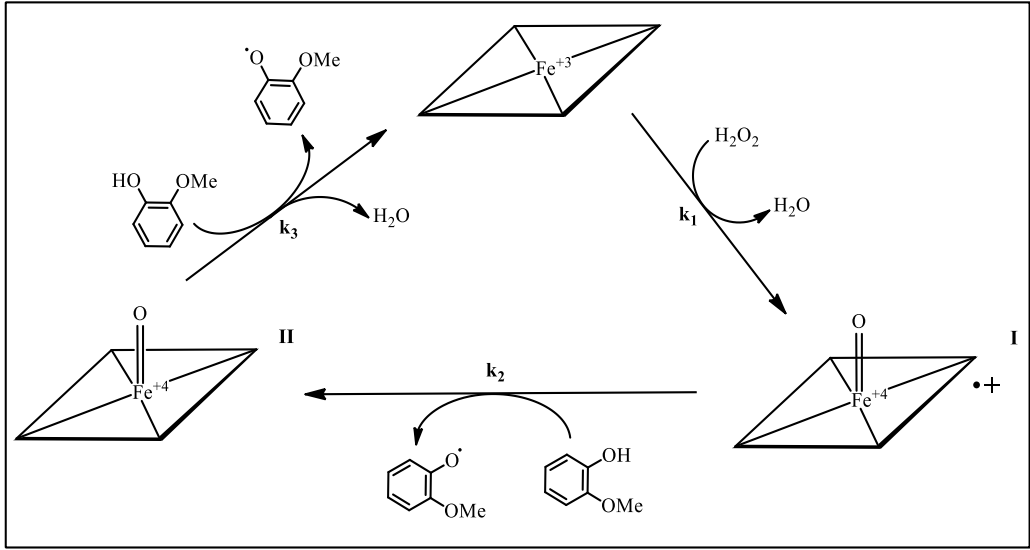
Canlı organizmada meydana gelen  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksitleyici özelliğe sahip olduğu için hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Hücre içinde bu görev antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984). Hücre içindeki hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda katalazlar tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer bölümlerinde peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Scandalios *et al.* 1994).

Peroksidaz enziminin bulunduğu şartlarda substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgenme mekanizması yapılan çalışmalar sonucunda açığa kavuşturulmuş ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgendiği tespit edilmiştir (Doerge *et al.* 1997)



**Şekil 1.6.** Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması

İlk kez 1809 yılında yapılan renk reaksiyonunda guaiakol substrat olarak kullanılmıştır. Bu kullanım at turpundan saflaştırılan enzim için yapılmıştır. Özellikle bitki fizyolojisinde artış gösteren fizyolojik fonksiyonların sayısının çoğunluğu peroksidazlarla ilişkilendirilmiştir (Van Huystee 1987). Yapılan çalışmalar sonucunda peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması aydınlatılmıştır. Hidrojen peroksitin indirgendiği ve guaiakol substratının yükseltgendiği reaksiyon mekanizması üç basamakta gerçekleşir (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7.** Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Görüldüğü üzere mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi Fe(IV) içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I'i oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Bir redoks reaksiyonu olan bu reaksiyonda hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. İkinci adımda ise katyon radikali halinde olan bileşik I ortamdaki substrattan (guaiakol) bir proton alarak Fe(IV) haline indirgenirken substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür. Oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan (guaiakol) tekrar bir proton almak suretiyle indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimerleşirler (Veitch 2004).

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki peroksidaz enzimi bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry 1986), çimlenme (Morohashi 2002), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) gibi hayati fonksiyonlarda çok önemli görevler almaktadır. POD'un organik

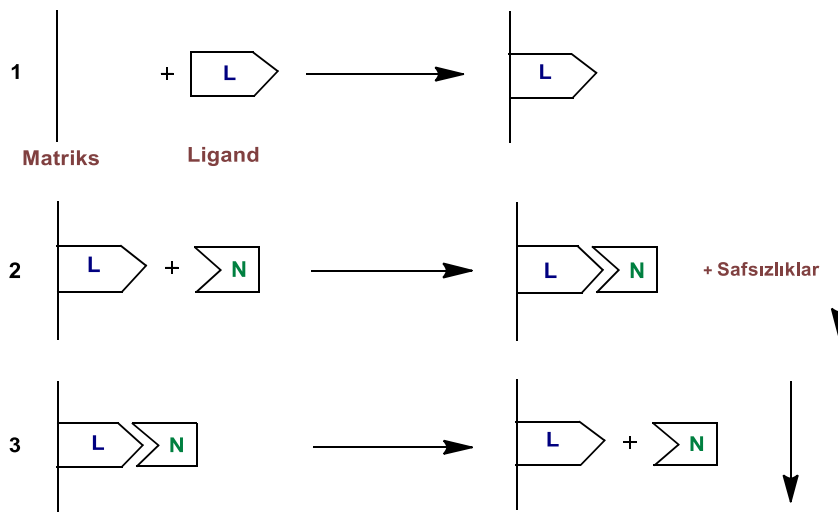
moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılması bir başka önemli fonksiyonudur (Adam *et al.* 1999).

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 *et al.* 1996).

### 1.5. Afinite Kromatografisi

Bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi saflaştırılması istenen molekülün matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Diğer tekniklerle, saflaştırılması birçok basamak isteyen, daha fazla zaman gerektiren hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyal, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta daha yüksek bir saflaştırma kat sayısı ile saflaştırılabilecek yeterliliktedir.

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.8’de özetlenmiştir.



**Şekil 1.8.** Afinite kromatografisinin genel prensibi  
(1)'de ligand matrikse kovalent bağlanır, (2)'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir.

Afinite kromatografisinde başarılı bir ayırım yapabilmek için, öncelikle biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç duyulmakta ayrıca bu işlem için immobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalı ve safsızlıklar aktıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir metot bulunması başta gelen gerekliliklerdir.

Afinite kromatografisinin gücü spesifik etkileşmelere bağlı olduğundan dolayı kullanılan jelin (matriks) oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon göstermesi gerekir. Ayrıca jelin; yüksek ve düşük pH ve deterjanlar gibi değişik şartlara dayanıklı olması gerekmektedir. Afinite kromatografisi için seçilecek ligandın iki önemli özelliğe sahip olması gerekir. Birincisi, ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi ise, ligandın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Afinite kromatografisi için kullanılacak ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahip ise bu ligandın matrikse bağlandığı bölgede önemlidir. Bu bağlanma ligandın saflaştırılacak molekülle en düşük ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup ile matriks arasında yapılmalıdır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

Genellikle enzimlerin aktif bölgeleri molekülün içi kısımlarına doğru yerleşmiştir. Bu yüzden küçük ligandların (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlanması sonucu hazırlanan adsorbanlarda, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında istenmeyen etkileşimler meydana gelebilir. Bu durumlar da istenmeyen bağlanmaları ortadan kaldırmak için ligand ile matriks arasına uzantı kolu adı verilen moleküller sokulur.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Peroksidaz enzimi; şalgam, brokoli, incir, baklagiller, at turpu, karaturp, ıspanak ve patates gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda, hayvanlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Memelilerdeki peroksidaz enzimleri ise sütte, karaciğerde, dalakta, uterusu, tükrük bezlerinde, akciğer duvarlarında, sitoplazmada, mitokondride, mikrozom ile lizozomlarda lokalize olmuşlardır (Pütter and Becker 1987). Peroksidaz enzimi ile ilgili farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırma çalışmaları yapılmaktadır. İyon değişim, afinite, amonyum sülfat çöktürmesi kullanılan saflaştırma metodlarından birkaç tanesidir (Singh and Singh 2002).

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Taze kesilmiş kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) kökünün biyokimyasal ve fizikokimyasal parametreleri üzerine gama ışınlarının etkileri incelenmiş (Latorre *et al.* 2010). Kırmızı pancarın (*Beta vulgaris*) hücre vakuollerinde antioksidan savunmasındaki enzimler araştırılmış (Pradedova *et al.* 2011). Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) cDNA' nın klonlanarak yeni bir ribozom-inaktivasyon proteinin kodlanması yapılmıştır (Hornung *et al.* 1996). Kırmızı pancarın (*Beta vulgaris*) beslenme ve fonksiyonel potansiyeli ile ilgili çalışma yapılmış (Ninfali and Angelina 2013), kırmızı pancarın (*Beta vulgaris*) genetik olarak transforme edilmiş bir hücre içi köklerinden peroksidaz enzimi saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Rudrappa *et al.* 2007). Yüksek basınçlı karbondioksit gazı ile kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) ekstraktında peroksidaz ve polifenol oksidaz inaktivasyonu yapılmıştır (Liu *et al.* 2007).

Literatürde POD enzimi birçok bitkiden saflaştırılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak *Leucaena leucocephala* ağacı meyvesinden (Pandey and Dwivedi 2011), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990), kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) (Rudrappa *et al.* 2007), karalâhanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), arpadan (Kristensen 1999), ısırgan otundan (Gülçin 2002), pamuktan (Triplett and

Mellon 1992), domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), havuçtan (Nair *et al.* 1996), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), portakaldan (Clemente 1998), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002, Al-Senaïdy and Ismael 2011), çay yapraklarından (Kvaratskhelia *et al.* 1997), biberden (Pomar *et al.* 1997), çilekten (Civello *et al.* 1995), at turpundan (Lavery *et al.* 2010), kırmızıbiberden (Martinez *et al.* 2008), marula meyvesinden (Mdluli *et al.* 2005), mısırdan (Mika *et al.* 2008), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009), hindiba bitkisinden (Boeuf *et al.* 2000) ve papaya meyvesinden (Pandey *et al.* 2012), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), bürüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987) saflaştırma çalışmaları verilebilir.

Literatürde yapılmış olan saflaştırma çalışmaları neticesinde peroksidaz enzimi için birçok izoenzim yapısı bulunmuştur. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen bu izoenzimlerin; moleküler ağırlık, substrat spesifitesi, optimum pH, stabil sıcaklık ve fizyolojik rol gibi karakteristik özelliklerinin farklı olduğu belirlenmiştir (Tıpawan and Barrett 2005). Örneğin bu karakteristik özelliklerden molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla; domatesde 43 kDa (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), çilekte 65 kDa (Civello *et al.* 1995), hurma yapraklarında 48 kDa (Deepa and Arumughan 2002), karalâhanada 95 kDa (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, zeytinde 44kDa (Tzika *et al.* 2009), at turpunda 37 kDa (Lavery *et al.* 2010), hurma yapraklarında 55 kDa (Al-Senaïdy and Ismael 2011) olarak tespit edilmiştir. Bir diğer karakteristik özellik olan optimum pH değerlerinin ise 5,0-7,5 aralığında değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Tıpawan and Barrett 2005).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalandım

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



Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Hassas terazi	: Denver Instrument
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Otomatik pipet	: Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Su banyosu	: Nüve
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu(-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH:10) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanıldı): 2,1 g NaHCO<sub>3</sub> 200 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 ml'ye tamamlandı.

2. 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH:8,8) ( tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanıldı): 0,84 g NaHCO<sub>3</sub> 80 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

3. 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH:7,4) (4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanıldı): 1,211 g Tris 150 ml destile su içerisinde çözüldü. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

### **Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler**

0,3 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7,0) (Sıvı azotla parçalama işleminden sonra bitki dokularının içine alındığı tampon): 4,08277 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:7,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

### **Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler**

1. 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon): 1,3609 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 L tamamlandı.

2. 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonuna homojenatın tatbikinden sonra kolonu yıkamada kullanılan tampon): 1,3609 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 350 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 400 ml'ye tamamlandı.

3. 1 M NaCl/25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:6,8) (Peroxidaz enziminin elüe edilmesinde kullanılan tampon) 11,7 g NaCl ve 0,6805 g 180 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile

pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 200 ml'ye tamamlandı.

### **Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler**

1. 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH:6,0) (Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.
2. 45 mM Guaiakol çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 498  $\mu\text{l}$  guaiakol alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
3. 22,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/ml olan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 228  $\mu\text{L}$  alınarak destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

### **Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler**

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiliye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

### **Elektroforez için kullanılan çözeltiler**

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH:8,8): 12,114 g Tris, 80 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:8,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH:6,8): 12,114 g Tris, 80 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:6,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözülerek elde edildi.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin, 450 ml saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.
7. %0,1'lük brom timol mavisini çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.
8. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptolanol ilave edildi.

#### **Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler**

1. Tespit çözeltisi: 60 ml saf su, 30 ml %96'lik etanol, 10 ml asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.
2. Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 45 ml etanol ve 80 ml saf su karıştırıldı, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 ml glutalaldehit eklenip saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.

3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 ml saf su'da çözülüp üzerine 30 µl formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf su'da çözülde ve üzerine 120 µl formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 ml gliserin ve 250 ml'lik % 5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

### **Çalışmamızda kullanılan inhibitör stok çözeltiler**

1. 0,034 M 4-aminobenzohidrazit çözeltisi: 0,0712 g 4-aminobenzohidrazit tartılıp 14 ml suda çözüldü.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Protein tayini**

#### **3.2.1.a. Kalitatif protein tayini**

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

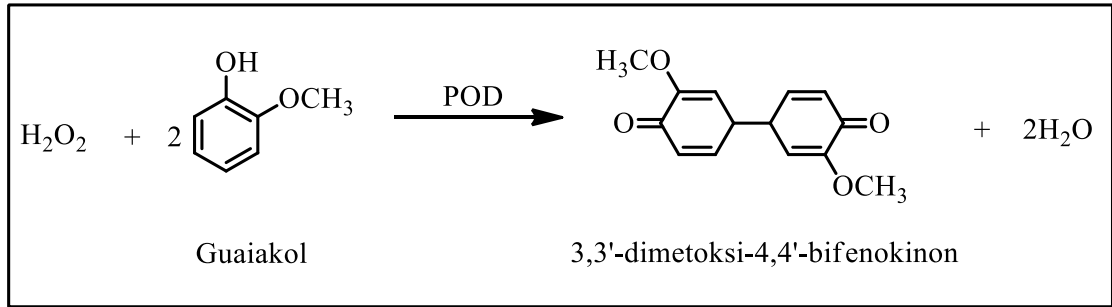
Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbanları ölçüldü.

### 3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{max}=465$  nm) ve mavi ( $\lambda_{max}=595$  nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100  $\mu$ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu$ l konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu$ g protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe sırasıyla 100, 250 ve 500  $\mu$ l alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford and Williams 1976).

### 3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür,  $H_2O_2$  tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Şekil 3.1) (Şişecioğlu *et al.* 2010).



**Şekil 3.1.** Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

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

**Çizelge 3.1.** Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki küvet içeriği

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

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

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

$D_f$  = Seyreltme katsayısı

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

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

### **3.3. Kırmızı Pancar (*Beta vulgaris*) Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları**

#### **3.3.1. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) için homojenat hazırlanması**

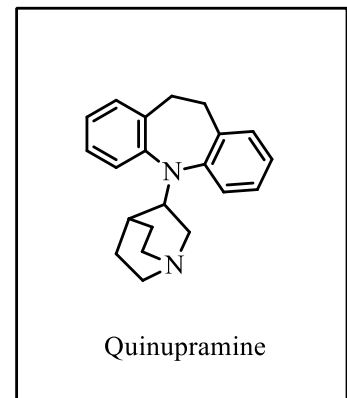
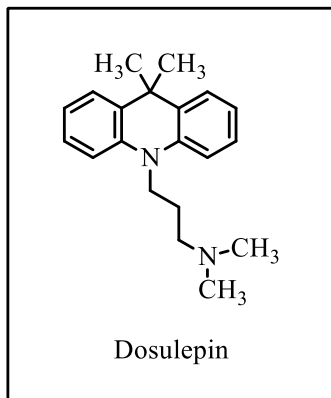
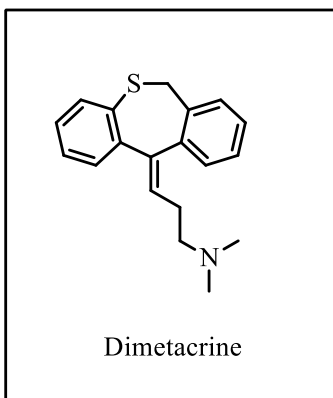
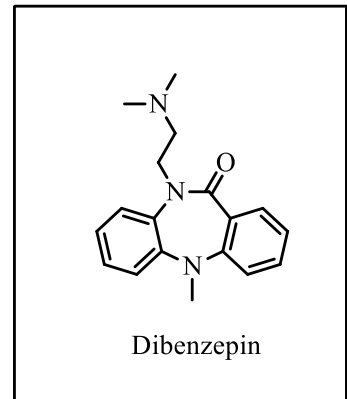
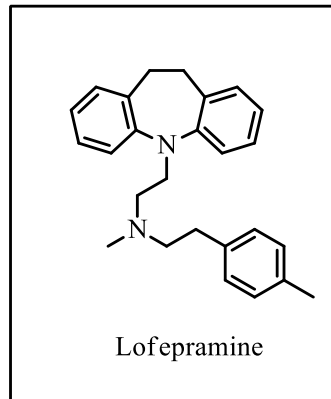
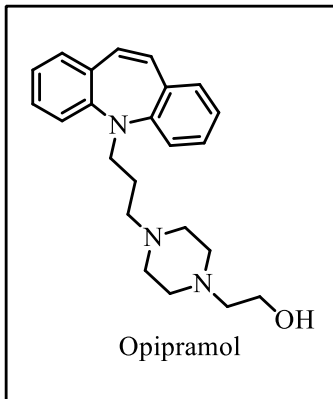
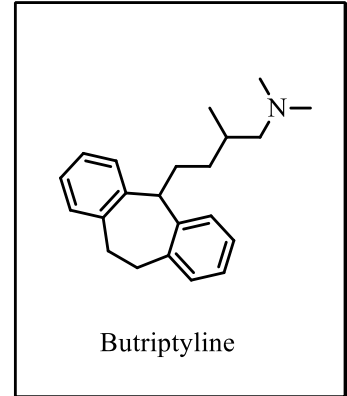
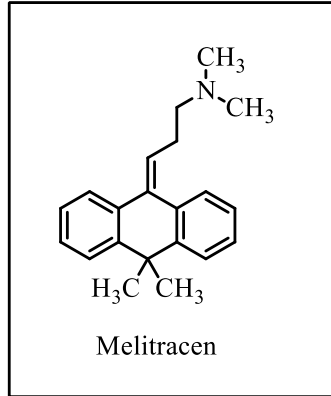
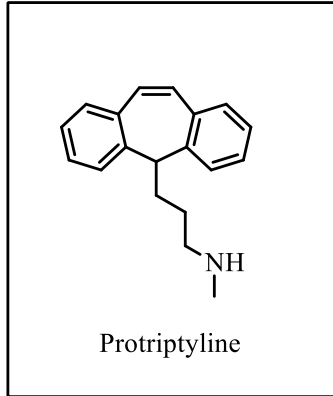
20 g taze kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) tartıldı ve blender cihazı ile küçük parçalara bölündü. Parçalar sıvı azot ilave edilerek toz haline getirildi ve üzerine 0,3 M pH:7,0 olan tampondan 50 ml ilave edilerek 1-2 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu karışım 2.400 rpm'de birkaç kez homojenizatörden geçirilerek bitki hücresinin parçalanması ve homojenize olması sağlandı. Homejenat süzüldü ve santrifüj tüplerine doldurularak 16.000 xg'de bir saat boyunca santrifüj edildi. Süpernatant çökelekten ayrıldı. Elde edilen süpernatant daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edildi

#### **3.3.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi**

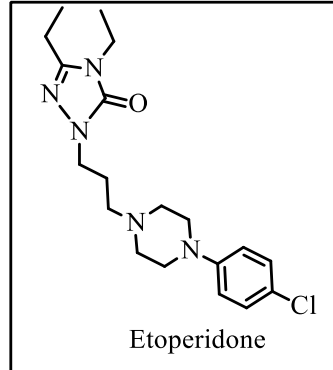
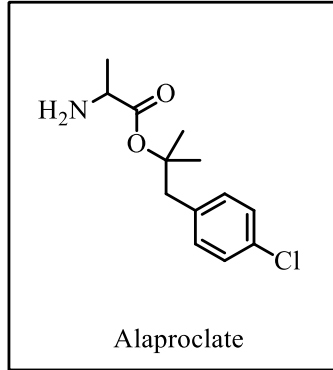
Peroksidaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarından enzimin literatürdeki inhibitörleri tespit edildi (Geike *et al.* 1975, Doerge 1986, Kumar and Bhatla 1995). Literatürde bulunan inhibitörlerden faydalanarak POD'un afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında en uygun diazonyum tuzu oluşturabilecek ligandlar seçilerek afinite jellerinin hazırlanması yapıldı. POD'un bilinen inhibitörleri aşağıda verilmiştir.



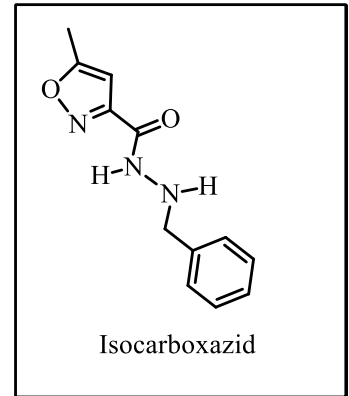
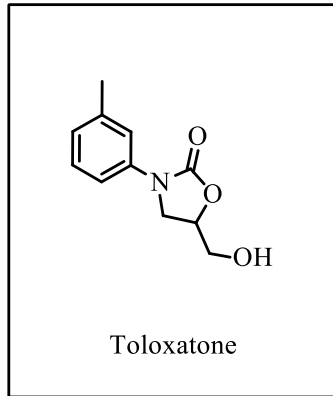
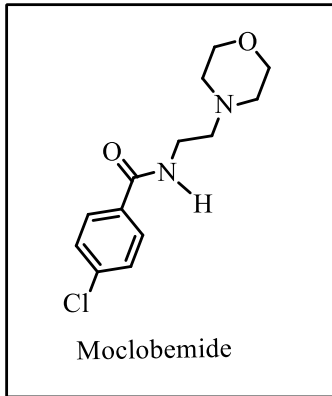
## Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri



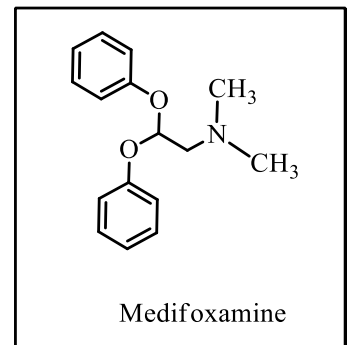
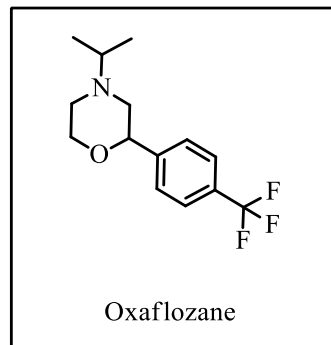
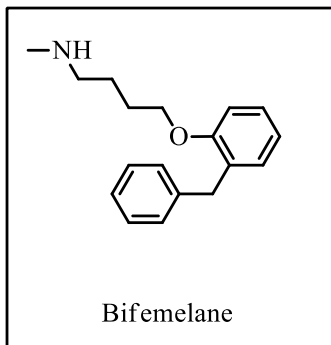
## Seçici serotonin geri alım inhibitörleri

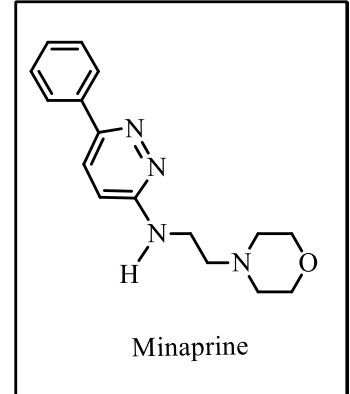
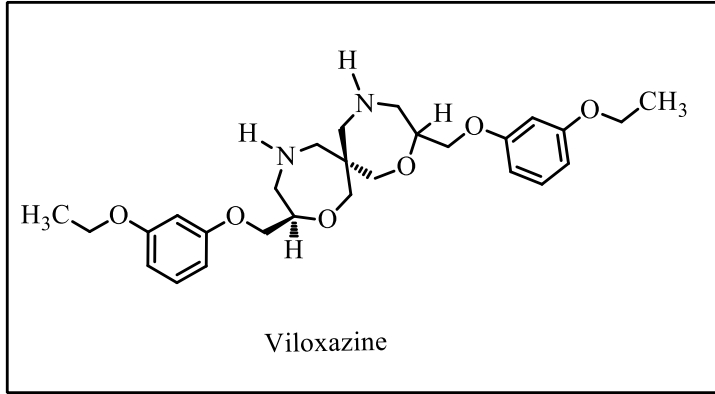


## Seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri

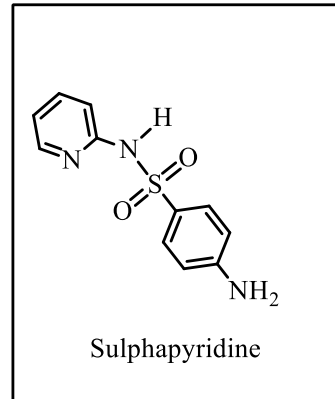
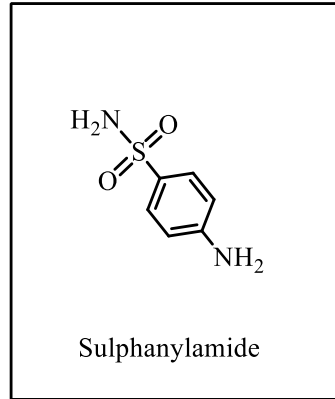


## Antidepresanlar

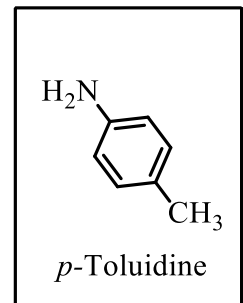
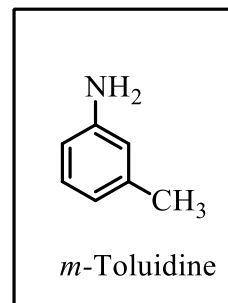
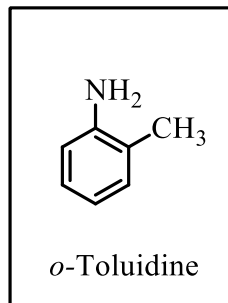
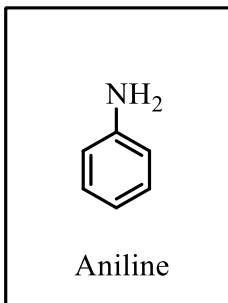


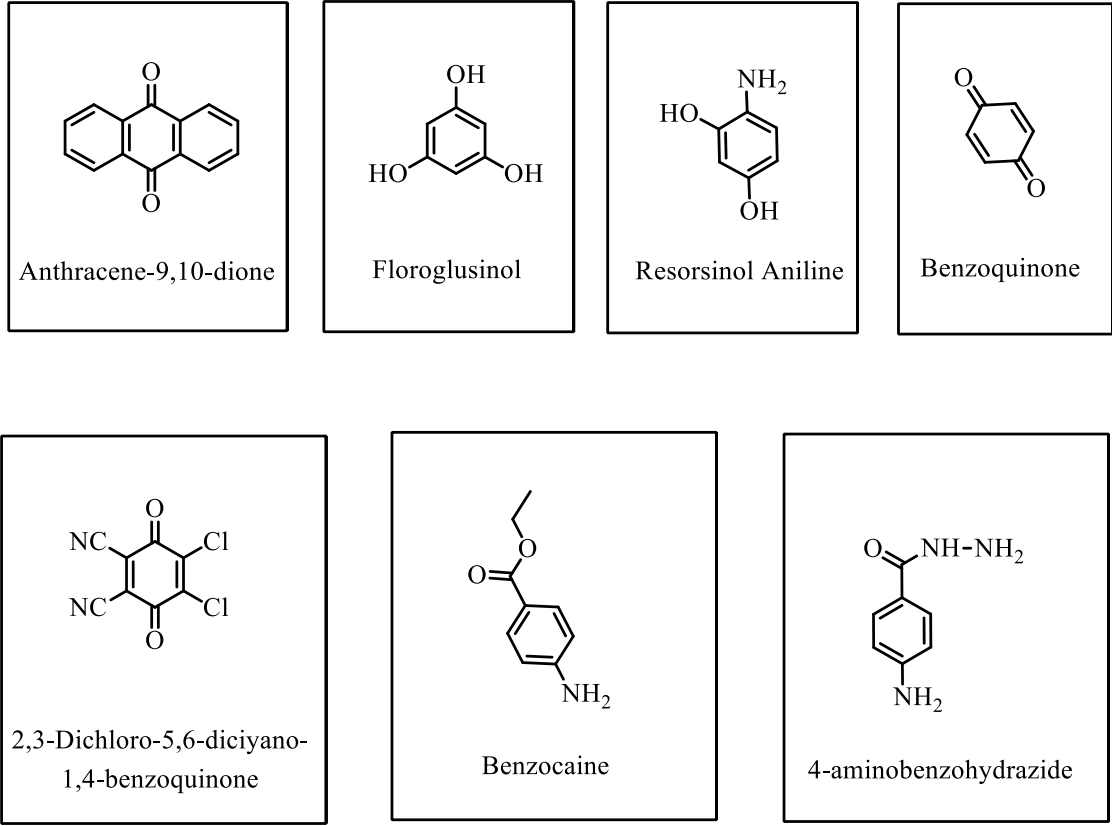


Mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan inhibitörler



Bilinen diğer organik moleküller





Bilinen bu inhibitörlerden molekül yapıları tirozin uzantı kolu ile diazonyum tuzu oluşturabilecek olanlar sülfanilamid, sülapiridin, o-toluidine, m-toluidine p-toluidine, aniline, benzokain ve 4-aminobenzohidrazit olduğu tespit edildi.

Bu tez kapsamında 4-aminobenzohidrazit molekülü afinite kolonunun ligandı olarak seçildi. Ve kırmızı pancar (*beta vulgaris*) POD enziminin saflaştırılmasında kullanıldı.

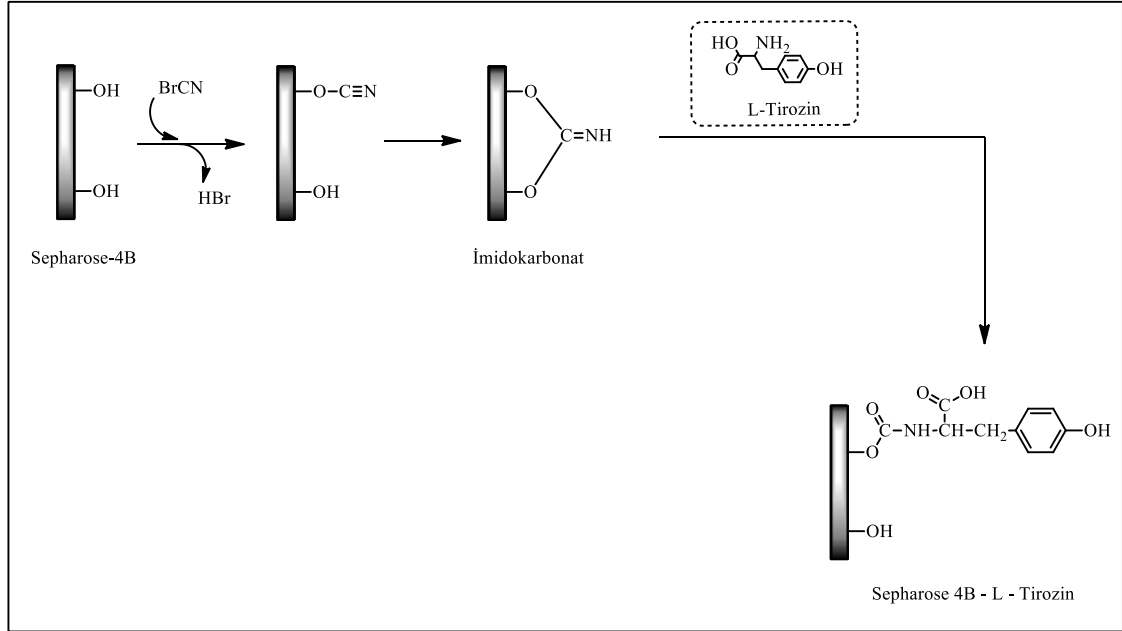
### 3.3.3. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak takıldı. Daha sonra 4-aminobenzohidrazit inhibitörü önceden hazırlanmış jele diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitör ise enzimi spesifik

olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Kullanılan afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

**a. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması:**

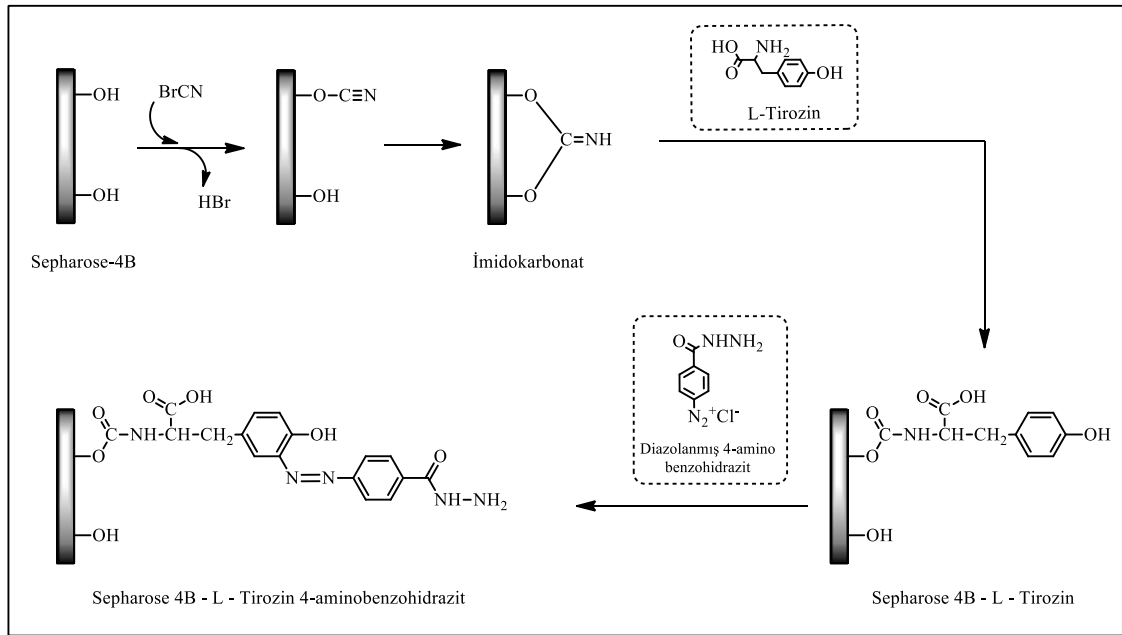
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı. (Şekil 3.2)



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

### b. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirmesi:

İnhibitör'den 25 mg alınarak 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, inhibitör çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH:9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH:7,4) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974). Hazırlanan jelle bağlanma modeli Şekil 3.3'te verildi.



Şekil 3.3. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli

### 3.3.4. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH: 6,8) içine alınarak jel süspansiyonu edildi ve su trompu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve

dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

### 3.3.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

3.5.3.a.'da belirtildiği gibi hazırlanan homojenatın 5 ml'si 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH:6,8 tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolon 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH:6,8 çözeltisi ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH:6,8 tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 50 ml/saat'e ayarlandı ve elüatlar 1,5'er ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'deki absorban değeri köre karşı ölçüldü.

### 3.3.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

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

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

**Ayırma jeli şöyle hazırlandı:** 5 ml 1 M Tris-HCl (pH: 8,8), 4,4 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10 SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,2 ml %10'luk amonyum persülfat  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (PER) ilave edildi.

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

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

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltilisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltilisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltilisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltilisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 ml gliserin ve 250 ml %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiliyle iyice yıkandı (Temel 2006).



### **3.4. Kırmızı Pancar (*Beta vulgaris*) Bitkisinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları**

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

#### **3.4.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları**

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

#### **3.4.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları**

Optimum iyonik şiddetleri belirlemek amacıyla optimum pH'da Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD için 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 mM'lık  $KH_2PO_4$  tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

#### **3.4.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları**

Peroksidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmali su banyosu kullanıldı. Optimum pH ve optimum iyonik şiddette olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda 5 dk bekletilerek istenilen sıcaklığa getirildi ve son olarak enzim çözeltisi pipetlendi. 0°C ile

80°C arasında 10'ar °C aralıklarla her sıcaklık için aktivite ölçümü yapıldı. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

#### **3.4.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları**

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 5 - 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 ve 8,0 olan 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'sine 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 4.5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

#### **3.4.5. Guaiakol için K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar**

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

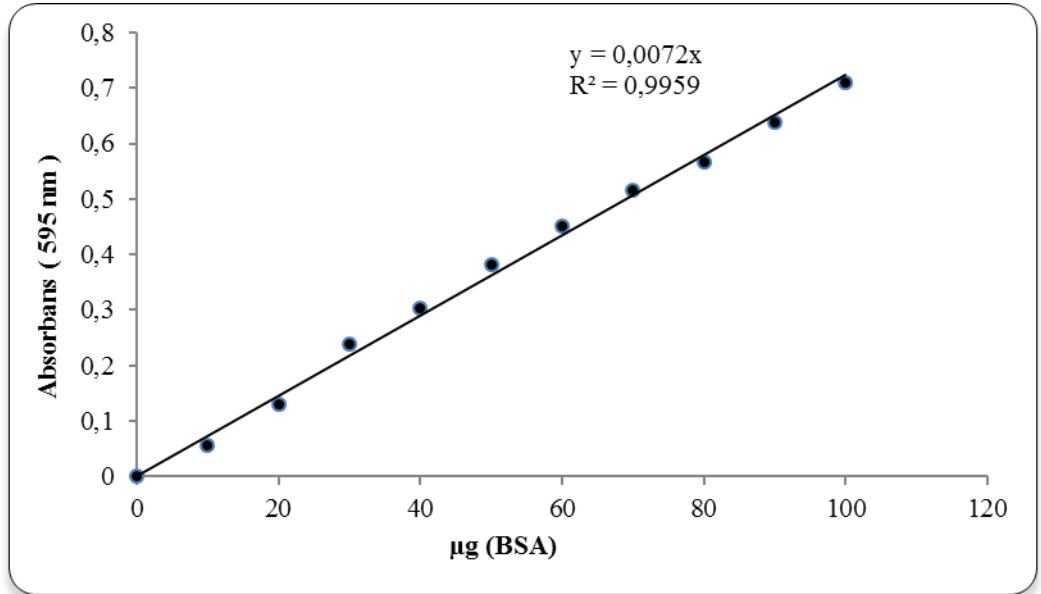
#### **3.4.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar**

Ligand olarak kullanılan inhibitörün guaiakol substratına bağlı olarak, IC<sub>50</sub> değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: oda sıcaklığında ve optimum pH'da, 45 mM guaiakol konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edilerek, % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K<sub>i</sub> değerlerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K<sub>i</sub> değerleri bulundu.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden hazırlanan homejenatlar ve afinite kolonundan saflaştırılan POD enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Bu amaçla 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Homojenatlar ve afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4,1’de gösterildi.

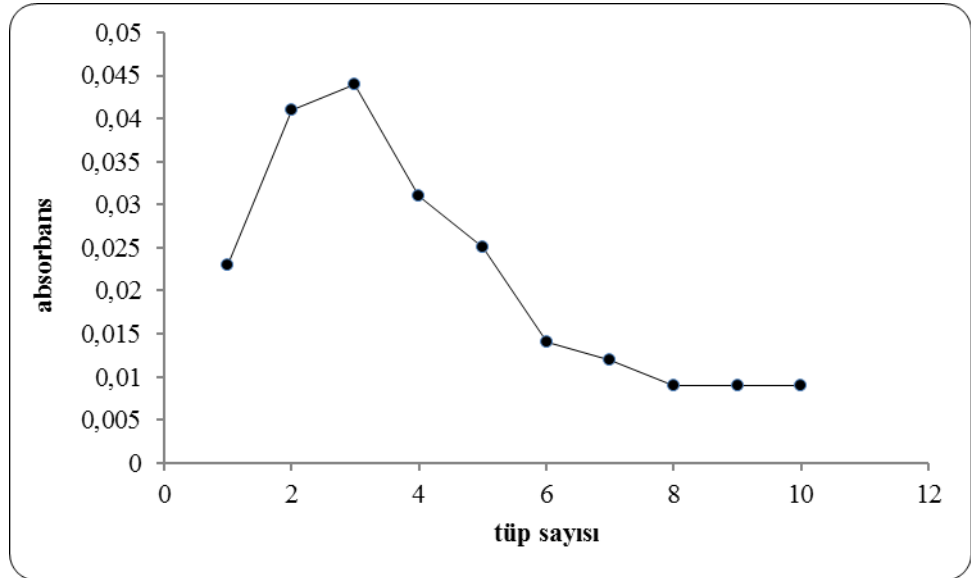


Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumini)

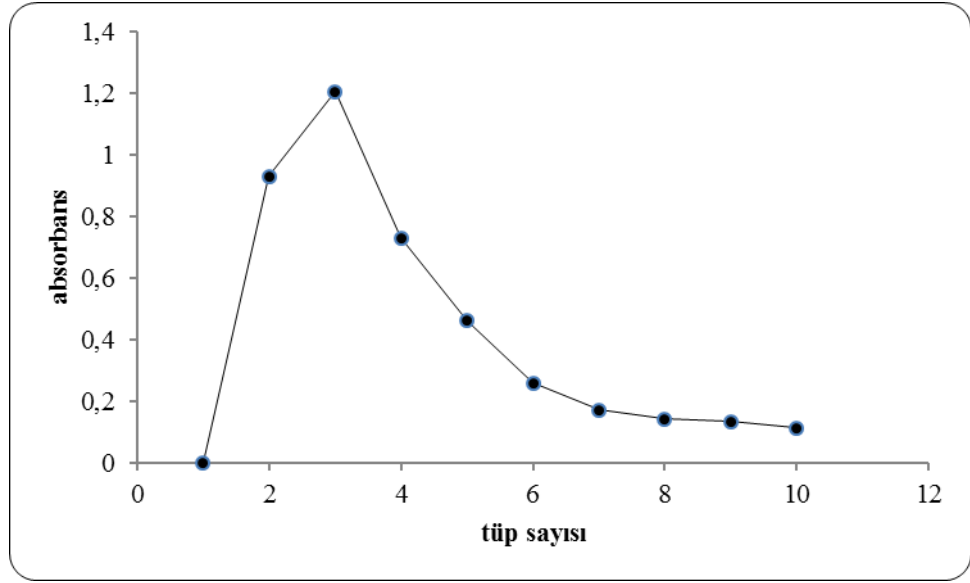
## 4.2. Kırmızı Pancar (*Beta vulgaris*) Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

### 4.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Bölüm 3.3.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 3.3.1’de belirtildiği gibi Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5’er ml ayrı ayrı dengelenmiş kolona pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 35 ml/saat’e ayarlanarak 1,5’er ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm’de absorban değerleri ölçülerek kalitatif protein tayinleri yapıldı. 280 nm’de ölçülen absorban değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2, 4.3’te verildi. Absorbans gösteren tüplerin 470 nm’de aktivite bakıldı. 470 nm’de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.2, 4.3’de gösterildi.



**Şekil 4.2.** 4-aminobenzohidrazit kolonundan Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm’deki absorbanlarını gösteren grafik



**Şekil 4.3.** 4-aminobenzohidrazit kolunundan Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik

#### 4.2.2.POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi hazırlanan jel kolona pakatlendikten sonra 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH:6,8) tamponu ile dengelendi. 3.3.1'de belirtildiği gibi Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5'er ml ayrı ayrı kolona tatbik edildi ve kolonlar 400 ml 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH:6,8) tamponu ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi 1,5'er ml halinde elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı.

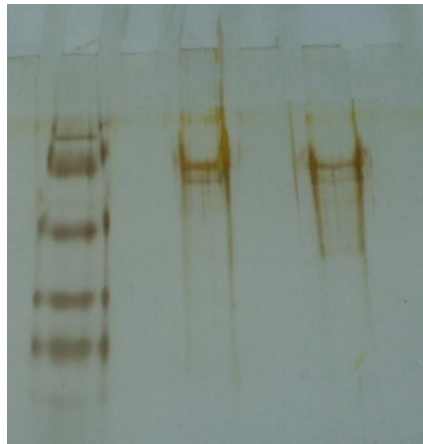
Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit kullanılan kolondan, Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. POD enziminin afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1'de gösterildi.

**Çizelge 4.1.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

Saflaştırma basamakları	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	5	2.54	0.26	1.45	12.7	8.76	100	1
Sepharose 4B Afinite Kromatografisi	5	0.966	0.00056	0.0028	4.83	1725	38	196.9

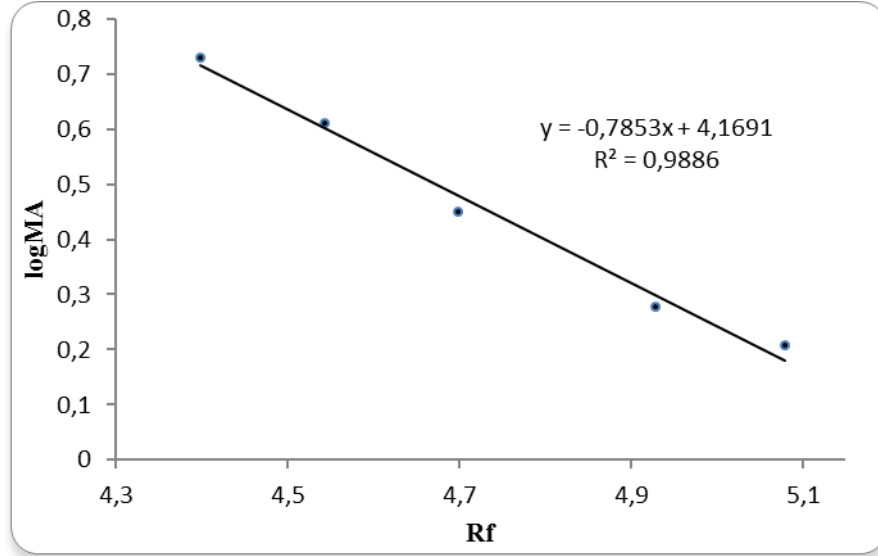
#### 4.2.3.SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılan peroksidaz enziminin saflığını kontrol etmek ve varsa alt birimlerinin molekül kütesini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforez kuyularına sırayla saflaştırılan POD'lar ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü.



**Şekil 4.4.** 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı (1 Nolu kuyu: Standart proteinler, 2 Nolu kuyular: Saflaştırılan Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD)

Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı çekildi. Safılaştırılan POD enzimlerinin molekül kütleleri  $\log M_K$ - $R_f$  grafikleri çizilerek tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen  $R_f$ -logMA grafiği

Çizelge 4.2. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimleri için SDS-PAGE ile molekül tayini sonuçları

Enzim	Bitki	Molekül Kütlesi
Peroksidaz POD	Kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> )	160

### 4.3. Kırmızı Pancar (*Beta vulgaris*) Bitkisinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

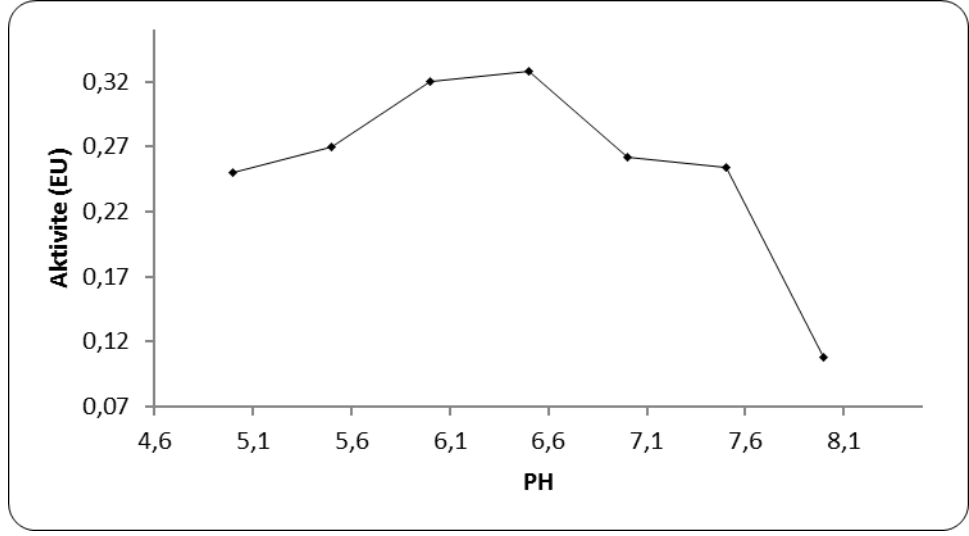
#### 4.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimlerinin optimum pH çalışması bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde; pH’sı 5,0-8,0 aralığında 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltileri kullanılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.3; Şekil 4.6 ). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için optimum pH 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=6,5 tamponu olarak belirlendi.

**Çizelge 4.3.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin optimum pH’sı için 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,250
5,5	0,320
6,0	0,262
6,5	0,328
7,0	0,270
7,5	0,108
8,0	0,254





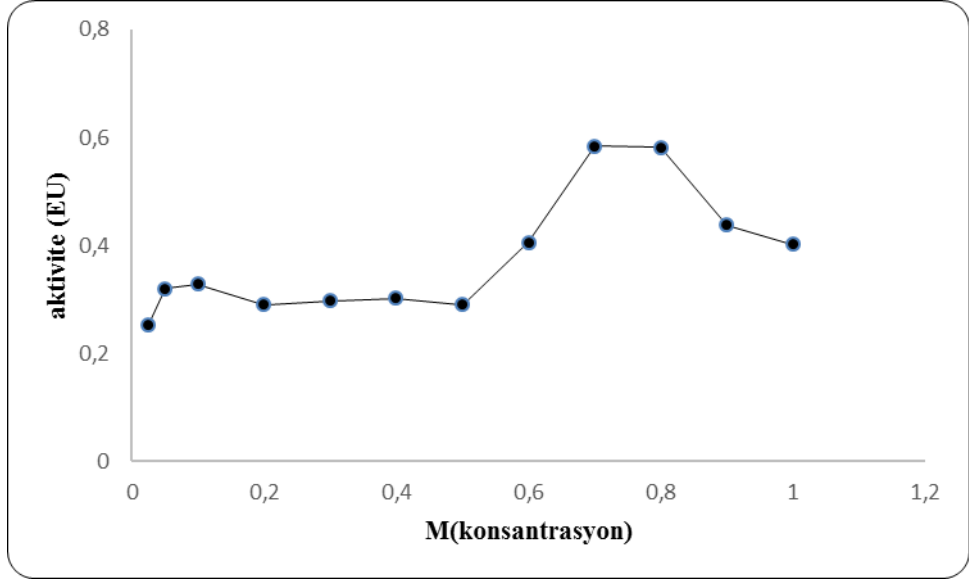
**Şekil 4.6.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği

#### 4.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimlerinin aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar çizelge ve aktivite-konsantrasyon grafiği halinde gösterildi (Çizelge 4.4, Şekil 4.7). Yapılan çalışmalar sonucu Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 0,7 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5) tamponu olduğu tespit edildi.

**Çizelge 4.4.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

<b>Potasyum Fosfat</b>	
<b>İyonik Şiddet (mM)</b>	<b>Aktivite (EÜ/ml)</b>
1000	0,402
900	0,438
800	0,582
700	0,584
600	0,406
500	0,29
400	0,302
300	0,298
200	0,29
100	0,328
50	0,32
25	0,254



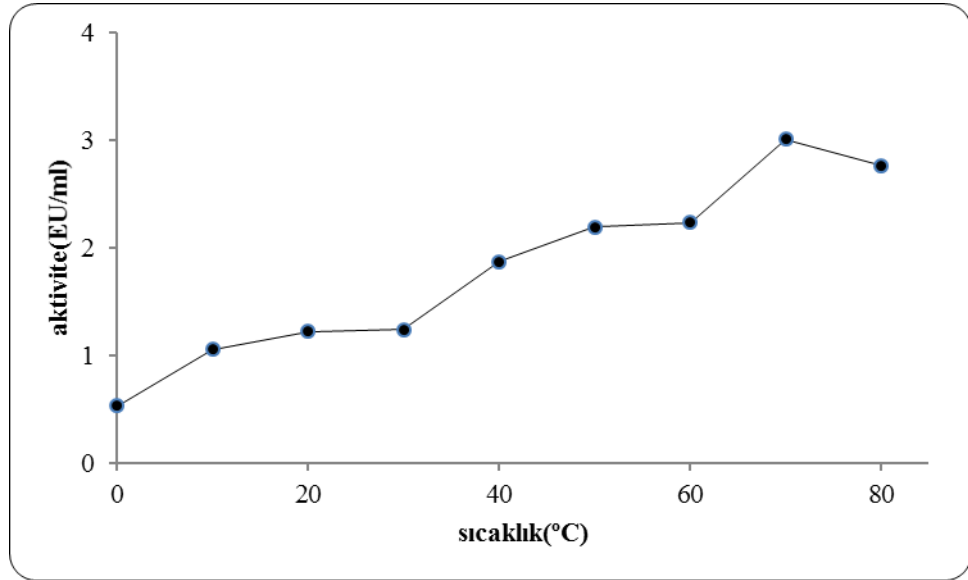
**Şekil 4.7.** Değişik konsantrasyonlardaki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5) tampon çözeltileri kullanılarak Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-İyonik şiddet (mM) grafiği

#### 4.3.3.Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum sıcaklığını belirlemek üzere Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 0,7 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5) tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.4.3'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'da ve Şekil 4.8'de gösterildi. Bu çalışmalar Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD için optimum sıcaklık 70°C olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.5.** Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,53
10	1,056
20	1,222
30	1,238
40	1,872
50	2,19
60	2,236
70	3,006



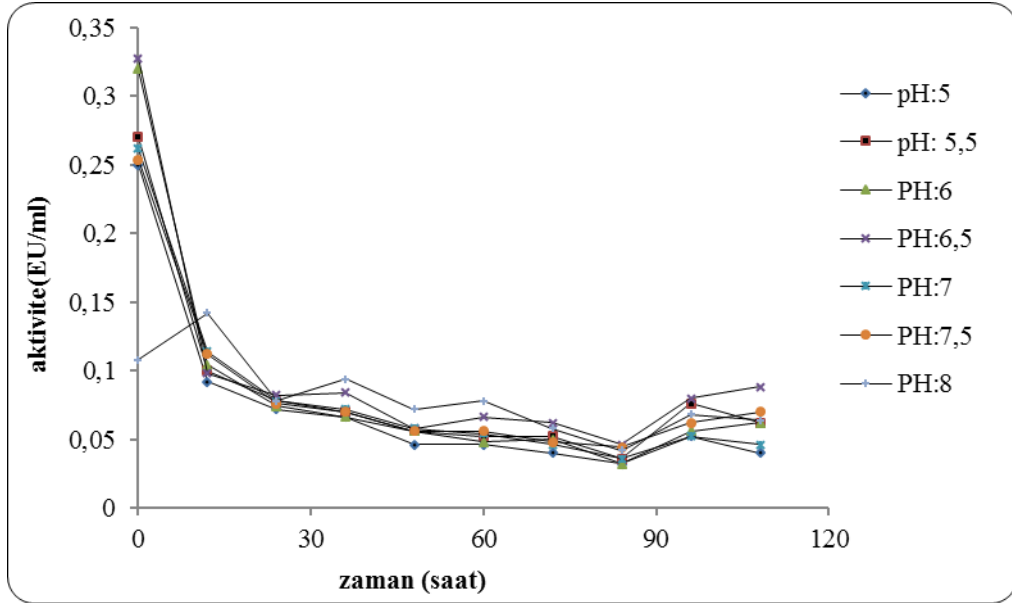
**Şekil 4.8.** Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/ml)-Sıcaklık (°C) grafiği

#### 4.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları

Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) POD enziminin stabil pH'sını bulmak için bölüm 3.4.4'te anlatıldığı şekilde; pH'ları 5,0-8,0 aralığında 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltileri içerisinde muhafaza edilen enzim stoklarının gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.6; Şekil 4.9. ). Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) POD enzimi için stabil pH, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponunda pH: 6,5 olarak belirlendi.

**Çizelge 4.6.** Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat							
Zaman (Saat)	pH:5,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:5,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH:6,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:6,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH:7,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/ml)
0	0,25	0,270	0,320	0,328	0,262	0,254	0,108
12	0,092	0,100	0,104	0,098	0,114	0,112	0,142
24	0,072	0,078	0,074	0,082	0,078	0,076	0,078
36	0,066	0,070	0,066	0,084	0,072	0,070	0,094
48	0,046	0,056	0,056	0,058	0,058	0,056	0,072
60	0,046	0,052	0,048	0,066	0,054	0,056	0,078
72	0,040	0,052	0,050	0,062	0,046	0,048	0,058
84	0,032	0,036	0,032	0,046	0,036	0,044	0,042
96	0,052	0,076	0,056	0,080	0,052	0,062	0,068
108	0,040	0,062	0,062	0,088	0,046	0,070	0,064



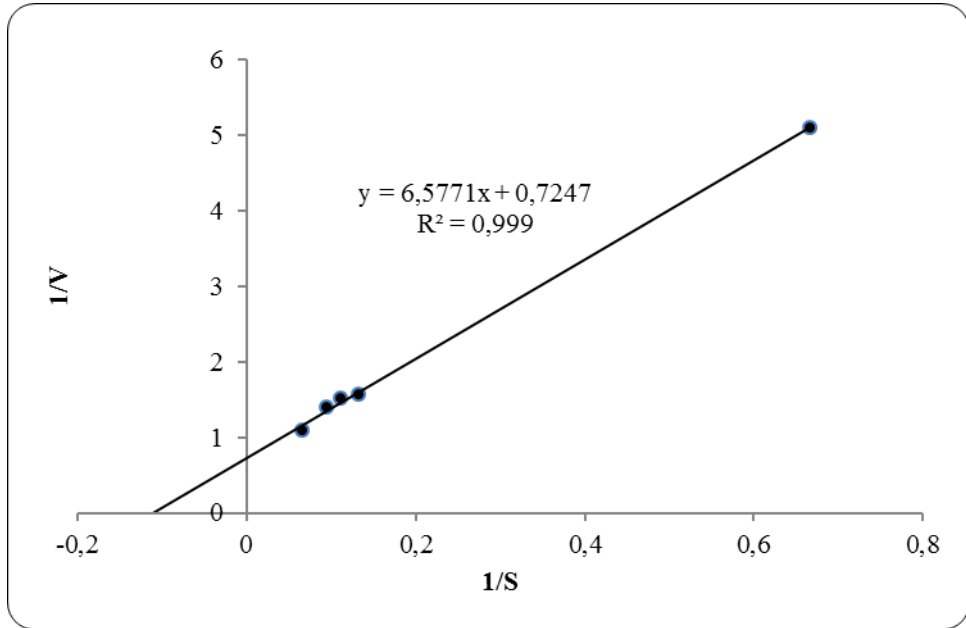
Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi kullanılarak Kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

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

Guaiakol substratı için Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi çalışmaları bölüm 3.4.5'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Her bir bitki POD için en az 5 farklı guaiakol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı.  $1/[\text{Guaiakol}]-1/V$  Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.10'da görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda guaiakol için  $K_M$  değeri Kırmızı pancarda (*Beta vulgaris*) 9,09 mM bulunurken  $V_{max}$  ise 1,3812 EÜ/ml olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.7.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

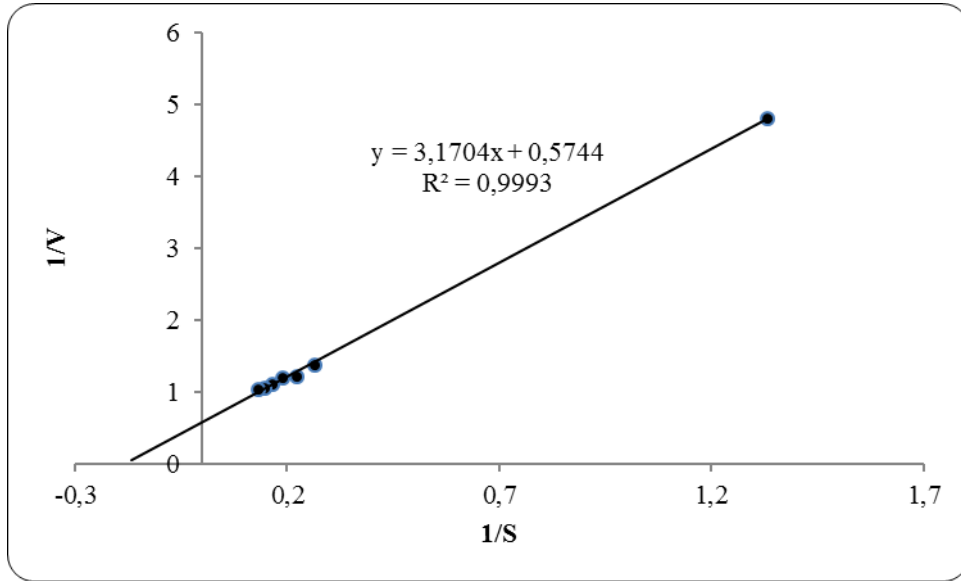
1/[Guaiakol] (mM <sup>-1</sup> )	Aktivite (EÜ/ml)
0,666	5,102
0,133	1,567
0,111	1,515
0,0952	1,396
0,066	1,089



**Şekil 4.10.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin guaiakol için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi grafiğı

**Çizelge 4.8.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunmasına yönelik  $H_2O_2$  derişimi ve aktivite çizelgesi

$1/[H_2O_2]$ ( $mM^{-1}$ )	Aktivite (EÜ/ml)
1,333	4,8076
0,266	1,38
0,222	1,2195
0,19	1,199
0,166	1,111



**Şekil 4.11.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin  $H_2O_2$  için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi grafiği

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

Bu çalışmada 4-aminobenzohidrazit inhibitörü saf suda çözülerek Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine guaiakol substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit substrat (guaiakol (45 mM)) konsantrasyonunda ve 5 farklı



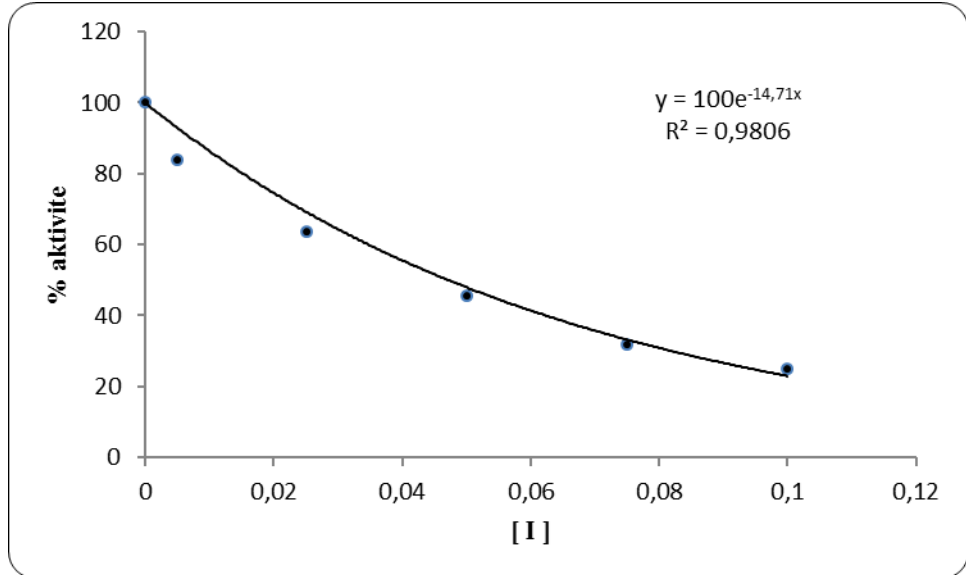
inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.9, 4.10'da gösterildi ve % Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.12'de gösterildi. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için IC<sub>50</sub> değeri 0,726 mM olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.9.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge

[4-aminobenzohidrazit] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)	% Aktivite
0,00	0,088	100
0,11	0,074	84,1
0,55	0,054	61,4
1,10	0,042	47,7
1,65	0,028	31,8
2,20	0,022	25,0

**Çizelge 4.10.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC<sub>50</sub> çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü					
Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	POD (ml)
0,450	1,00	1,00	0,550	0,000	0,45	1,00	1,00	0,450	0,000	0,100
0,450	1,00	1,00	0,545	0,005	0,45	1,00	1,00	0,445	0,005	0,100
0,450	1,00	1,00	0,525	0,025	0,45	1,00	1,00	0,425	0,025	0,100
0,450	1,00	1,00	0,500	0,050	0,45	1,00	1,00	0,400	0,050	0,100
0,450	1,00	1,00	0,475	0,075	0,45	1,00	1,00	0,375	0,075	0,100
0,450	1,00	1,00	0,450	0,100	0,45	1,00	1,00	0,350	0,100	0,100



**Şekil 4.12.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği

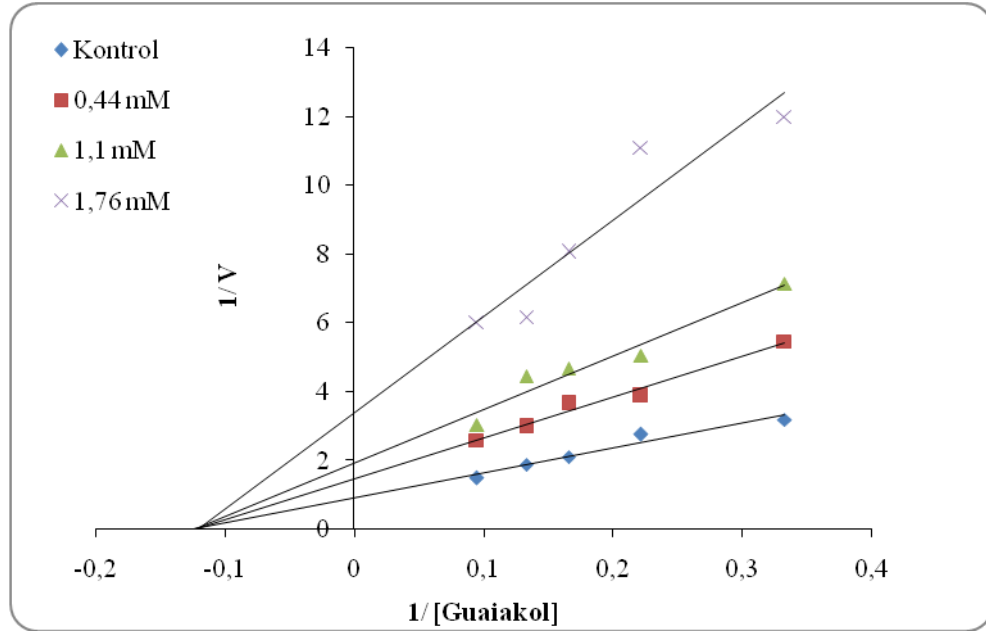
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı guaiakol konsantrasyonunda ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.11, 4.12'de gösterildi. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu (Şekil 4.13). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için  $K_i$  sabiti  $0,777\pm 0,1700$  mM inhibisyon tipi yarışmasız olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.11.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan substrat konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge

[4-aminobenzohidrazit] (mM)	[Guaiakol] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
Kontrol	3,0	0,284
	4,5	0,362
	6,0	0,476
	7,5	0,534
	10,5	0,676
0,44	3,0	0,222
	4,5	0,258
	6,0	0,274
	7,5	0,336
	10,5	0,386
1,1	3,0	0,140
	4,5	0,198
	6,0	0,214
	7,5	0,224
	10,5	0,330
1,76	3,0	0,058
	4,5	0,090
	6,0	0,124
	7,5	0,162
	10,5	0,194

**Çizelge 4.12.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü					
Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	POD (ml)
0,500	0,200	1,000	1,300	0,000	0,500	0,200	1,000	1,200	0,000	0,100
0,500	0,300	1,000	1,200	0,000	0,500	0,300	1,000	1,100	0,000	0,100
0,500	0,400	1,000	1,100	0,000	0,500	0,400	1,000	1,000	0,000	0,100
0,500	0,500	1,000	1,000	0,000	0,500	0,500	1,000	0,900	0,000	0,100
0,500	0,700	1,000	0,800	0,000	0,500	0,700	1,000	0,700	0,000	0,100
0,500	0,200	1,000	1,280	0,020	0,500	0,200	1,000	1,180	0,020	0,100
0,500	0,300	1,000	1,180	0,020	0,500	0,300	1,000	1,080	0,020	0,100
0,500	0,400	1,000	1,080	0,020	0,500	0,400	1,000	0,800	0,020	0,100
0,500	0,500	1,000	0,980	0,020	0,500	0,500	1,000	0,880	0,020	0,100
0,500	0,700	1,000	0,780	0,020	0,500	0,700	1,000	0,680	0,020	0,100
0,500	0,200	1,000	1,250	0,050	0,500	0,200	1,000	1,150	0,050	0,100
0,500	0,300	1,000	1,150	0,050	0,500	0,300	1,000	1,050	0,050	0,100
0,500	0,400	1,000	1,050	0,050	0,500	0,400	1,000	0,950	0,050	0,100
0,500	0,500	1,000	0,950	0,050	0,500	0,500	1,000	0,850	0,050	0,100
0,500	0,700	1,000	0,750	0,050	0,500	0,700	1,000	0,650	0,050	0,100
0,500	0,200	1,000	1,220	0,080	0,500	0,200	1,000	1,120	0,080	0,100
0,500	0,300	1,000	1,120	0,080	0,500	0,300	1,000	1,020	0,080	0,100
0,500	0,400	1,000	1,020	0,080	0,500	0,400	1,000	0,920	0,080	0,100
0,500	0,500	1,000	0,920	0,080	0,500	0,500	1,000	0,820	0,080	0,100
0,500	0,700	1,000	0,720	0,080	0,500	0,700	1,000	0,620	0,080	0,100



**Şekil 4.13.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafiği

**Çizelge 4.13.** Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları

Bitki	IC <sub>50</sub> (mM)	[ İnhibitör ] (mM)	K <sub>i</sub> değeri (mM)	Ortalama K <sub>i</sub> (mM)	İnhibisyon tipi
Kırmızı pancar ( <i>Beta vulgaris</i> )	0,047	0,44	0,71	0,776±0,177	Yarışmasız
		1,1	0,97		
		1,76	0,65		

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidaz (POD) enzimi prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden bir glikoprotein olup bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur (Rompel *et al.* 2007). Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanıp, metabolizmada ortaya çıkan  $H_2O_2$ 'yi etkisiz hale getirip  $H_2O$ 'ya indirgerler (Robert *et al.* 1993). Bitki peroksidazlarının aldığı önemli görevlerden bazıları aşağıda sıralanmıştır:

Savunma mekanizmalarında (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), hormonal faaliyetlerde (Wakamatsu and Takahama 1993), POD kimya, ilaç ve gıda sanayilerinin yeni uygulamalarında (Kwak *et al.* 1996), POD organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonunda (Adam *et al.* 1999).

Lignin Biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi hayati fonksiyonlarda tercih edilmektedir. Ayrıca POD'nin yüksek hassasiyeti sayesinde klinik tanı ve mikroanalitik uygulamalarda için oldukça önemli bir ayıraç olduğu bilinmektedir.

Afinite kromatografisi, spesifik ligantları esasına dayanarak proteinlerin ayrıldığı kromatografik bir saflaştırma yöntemidir. Saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir teknik olarak bilinmektedir. Günümüzde diğer tekniklerle saflaştırılması bir çok basamak isteyen, daha fazla zaman gerektiren biyolojik materyaller, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta çok kompleks karışımlardan saflaştırılmıştır. Kolon dolgu maddesi olarak genelde Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Saflaştırılacak madde için Matrikse bağlanan ligandın spesifik ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekmektedir. Bazı durumlarda matriks ile ligand arasına, istenmeyen etkileşmeleri ortadan kaldırmak için uzantı kolları sokulur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bitkilerin özellikle yapraklarında, gövdelerinde, çiçek ve saplarında, nükleus, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunan peroksidaz enzimi, bu çalışmada bitki

gövdesinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. POD enziminin saflaştırılması üzerine literatürde birçok kromatografik metot bulunmaktadır. Ancak bu yöntem hem zaman açısından kaybımız fazla hem de maliyeti açısından bizim bulduğumuz yöntemle göre daha fazla maliyetlidir

Kırmızı pancardan (*beta vulgaris*), ligand olarak 4-aminobenzohidrazit'in bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan POD enziminin kinetik özellikleri, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi ve kullanılan ligandın kinetik özellikleri belirlendi. Elde edilen değerleri tartışılmasından önce araştırmada kullanılan metotları kısaca izah edelim.

Çalışmalarımız sırasında afinite kolonundan elde edilen Kırmızı pancar (*beta vulgaris*) elüatlarının 280 nm'deki absorpsiyon 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 Bradford metodu kullanıldı. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Kırmızı pancar (*beta vulgaris*) peroksidaz enzim elüatları ve homojenatlardaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanması sonucu oluşan mavi renkli kompleksin 595 nm'de maksimum absorpsiyon vermesi esasına dayanır. Renk stabilitesi 1 saat gibi uzun bir süre dayanır. Yöntemin bozucu faktörleri diğer protein tayin yöntemlerinden daha azdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan kırmızı pancar (*beta vulgaris*) peroksidazının aktivitesi, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve yükseltgenme sonucu oluşan 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinon renkli bileşiğin meydana getirdiği absorpsiyon artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanır



(Şişecioğlu *et al.* 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 ( $\epsilon_{470nm}=5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi, 20°C'de 1 dakikada 1 µmol guaiakol'un yükseltgenmesini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Afinite kolonuna kırmızı pancar (*beta vulgaris*) numunesinin tatbiki için homojenat hazırlandı. Homojenat hazırlanırken bitki hücrelerini parçalamak için dondurma çözme tekniği kullanıldı. Bu biyomoleküllerin bozulmaması için düşük sıcaklık sağlayıp etkili hücre parçalama yöntemlerinden biridir.

Kırmızı pancar (*beta vulgaris*) homojenatı hazırlandıktan sonra 4-aminobenzohidrazit kolonundan geçirildi ve saflaştırılan POD enziminin kolona tutunarak diğer tüm kirlilikler yıkama tamponu ile uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş olan POD enzimleri fraksiyonlar halinde elüe edildi. Elüe edilen fraksiyonlara 280 nm'de total protein tayini, 470nm'de aktivite tayini ve 595 nm'de kantitatif protein tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlara hesaplamalar yapılarak kırmızı pancar (*beta vulgaris*) POD enzimi için saflaştırma tablosu çizildi (Çizelge 4.1). Çizilen saflaştırma tablolarına göre tek kromatografik işlemle POD enzimi kırmızı pancardan (*beta vulgaris*) 1725 EÜ/mg spesifik aktivite ile % 38 verimle 196,9 kat saflaştırılmıştır. Rudrappa ve arkadaşları üç kromatografik adımda kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*L.) POD enzimini 10500 EÜ/mg spesifik aktivite ile %84,6 verimle 15 kat saflaştırmıştır (Rudrappa *et al.* 2007). Gülçin ve Yıldırım üç kromatografik adımda karalâhanadan (*Brassicaoleracea*) POD enzimini 43805 EÜ/mg spesifik aktivite ile %33 verimle 33,5 kat saflaştırmıştır (Gülçin and Yıldırım 2005). Marquez ve arkadaşları iki kromatografik adımda vanilya çekirdeğinden POD enzimini 1563,5 EÜ/mg spesifik aktivite ile %19 verimle 21 kat saflaştırmıştır (Marquez *et al.* 2008). Köksal iki kromatografik adımda ıspanak (*Spinaciaolracea*) yapraklarından POD enzimini 96,4 EÜ/mg spesifik aktivite ile %4,2 verimle 22,6 kat saflaştırmıştır (Köksal 2011). Al-Senaıdy ve Ismael üç kromatografik adımda hurma yapraklarından (*Phoenix*

*dactylifera* L.) POD enzimini 906,2 EÜ/mg spesifik aktivite ile %5,8 verimle 17 kat saflaştırmıştır (Al-Senaidy and Ismael 2011). Pandey ve arkadaşları üç kromatografik adımda papayadan (*Carica papaya*) POD enzimini 68,59 EÜ/mg spesifik aktivite ile %44,37 verimle 30,22 kat saflaştırmıştır (Pandey *et al.* 2012). Lavery ve arkadaşları at turpundan (*Armoraciarusticana*) POD enzimini iki kromatografik adımda 772,25 EÜ/mg spesifik aktivite ile %71,3 verimle 291 kat saflaştırmıştır (Lavery *et al.* 2010). Ajila ve PrasadaRao siyah gram kabuğundan (*Vignamungo*) POD enzimini iki kromatografik adımda 1215291 EÜ/mg spesifik aktivite ile %44 verimle 44 kat saflaştırmıştır (Ajila and Prasada Rao 2009). Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassicaoleraceal* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 EÜ/mg spesifik aktivite ile %0,2 verimle 19,33 kat saflaştırmıştır (Köksal and Gülçin 2008). Mdluli marula meyvesinden (*Sclerocaryabirreassubsp Caffra*) POD enzimini üç kromatografik adımda 361,469 EÜ/mg spesifik aktivite ile %1,3 verimle 19 kat saflaştırmıştır (Mdluli 2005). Literatüre bakıldığında POD enzimini saflaştırabilmek için amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik adımlardan en az iki tanesi kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilebilmiştir. Bu işlemlere bakıldığında POD enziminin saflaştırma işleminin çok uzun ve oldukça maliyetli olduğunu gösterir. Literatürdeki çalışmalarla yapmış olduğumuz çalışmaların sonuçlarını karşılaştırdığımızda çalışmamızı daha kısa sürede ve daha az masrafla yüksek verimler elde ettiğimizi görmekteyiz.

Saflaştırılan kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) peroksidaz enziminin saflığının kontrolü için ve molekül kütesinin tespiti için bölüm 3.3.6'da anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yapıldı. Yapılan SDS-PAGE sonucunda kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) izole edilen peroksidaz enzimlerinin saf olduğu belirlendi (Şekil 4.4). Elde edilen tek bandın molekül ağırlığı çizilen  $R_f$ -log $M_K$  grafiğinden bulundu (Şekil 4.5, Çizelge 4.2). Çizilen grafiğe göre kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılan POD enziminin mol kütesi 160 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; domateste (Jen *et al.* 1980;

Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa, hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, karalâhanada (Gülçin and Yıldırım 2005) 95 kDa, brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008) ve vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, kırmızı pancarda (Rudrappa *et al.* 2007) 45 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44kDa, siyah gram kabuğunda (Ajila and Prasada Rao 2009) 38 kDa, at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, hurma yapraklarında (Al-Senaidy and Ismael 2011) 55 kDa ve olarak tespit edilmiştir. İzole edilen peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıkları saflaştırılan kaynağa göre değişiklik göstermektedir.

Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra enzimler için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH değerleri belirlendi.

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 5,0-8,0 aralığında 0,1 M'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponlarında enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin optimum pH değeri 0,1 M'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponunda 6,5 olduğu tespit edildi. Literatürdeki verilere göre Köksal ve Gülçin karnabahar (*Brassicaoleracea* L.) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum pH'yı fosfat tamponunda 5,0 olarak bulmuşlardır (Köksal and Gülçin 2008). Lavery ve arkadaşları başka bir çalışmada at turpu (*Armoraciarusticana*) peroksidazının optimum pH'sını fosfat tamponunda 7,0 olarak tespit etmişlerdir (Lavery *et al.* 2010). Kumar ve arkadaşlarının karayip bitkisi (*Euphorbiacotinifolia*) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH fosfat tamponunda 7,0 olarak bulmuşlardır (Kumar *et al.* 2011). Köksal ıspanak (*Spinaciaoleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum pH değerini fosfat tamponunda 5,2 olarak bulmuştur (Köksal 2011). Peroksidaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalarda optimum pH değeri 5,0-7,5 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bizim bulduğumuz optimum pH değeri literatürde bulunan değerlerle uyum içindedir. Bitki peroksidaz enziminin asidik ortamda daha aktif olduğu görülmektedir.

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için 0,025 ile 1,0 M arasında daha önce belirlenen optimum pH'da fosfat tamponu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda Şekil 4.7'de görüldüğü gibi optimum iyonik şiddet kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD için 0,7 M bulunmuştur. Köksal ıspanak (*Spinaciaolracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum iyonik şiddetini 0,075 M olarak bulmuştur (Köksal *et al.* 2008). Köksal ve Gülçin karnabahar (*BrassicaoleraceaL.*) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum iyonik şiddeti 1,0 M olarak tespit etmişlerdir (Köksal and Gülçin 2008). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD için bulunun optimum iyonik şiddet değeri karnabahar (*Brassicaoleracea L.*) POD ile uyum içindedir.

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemede optimum pH ve optimum iyonik şiddette 10'ar °C artışla 0-80°C aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin optimum sıcaklık 70°C olarak bulundu (Şekil 4.8). Al-senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera L.*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 55°C (Al-senaidy and Ismael 2011), Köksal ıspanak (*Spinaciaolracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 60°C (Köksal 2011), Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassicaoleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 40°C (Gülçin and Yıldırım 2005), Kumar ve arkadaşları karayip bitkisinden (*Euphorbiacotinifolia*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 50°C (Kumar *et al.* 2011) olarak bulmuşlardır. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin optimum sıcaklığı ıspanak (*Spinaciaolracea*) POD enziminin optimum sıcaklığı ile uyum göstermektedir. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin 70°C gibi yüksek sıcaklıkta aktivite göstermesinin sebebi kırmızı pancarın (*Beta vulgaris*) sıcak bölge bitkisi olduğundan kaynaklanmaktadır.

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin stabil olduğu pH bulunurken pH'sı 5,0-8,0 aralığında olan 10 mM'lık fosfat tamponları kullanıldı. Bu tamponlarda hazırlanan enzim stoklarının 12 saat arayla 108 saat boyunca aktivite ölçümleri yapılarak

enzimlerin stabil oldukları pH'lar tespit edildi. Yapılan ölçümler neticesinde kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) peroksidazı için stabil pH 6,5 bulunmuştur (Şekil 4.9). Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassicaoleracea*) saflaştırılan POD enziminin stabil olduğu değeri 6,5 olarak bulmuşlardır (Gülçin and Yıldırım 2005). Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassicaoleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sını 8,5 olarak tespit etmişlerdir (Köksal and Gülçin 2008). Köksal ıspanak (*Spinaciaolracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin stabil pH değerini 5,5 bulmuştur (Köksal 2011). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enzimi karalâhana (*Brassicaoleracea*) POD enzimi ile uyum içindedir.

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin guaiakol substratına olan ilgisini tespit etmek amacıyla her bir enzim için en az beş farklı guaiakol konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) peroksidazı için  $K_M$  değeri 9,09 mM ve  $V_{max}$  değeri 1,3812 EÜ/ml.dk olarak tespit edildi. Deepa ve Arumughan palmya yapraklarından saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 3,96 mM olarak bulmuşlardır (Deepa and Arumughan 2002).Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassicaoleracea*) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 5,5 mM olarak bulmuşlardır (Gülçin and Yıldırım 2005). Marquez ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 3.8 mmol olarak bulmuşlardır (Marquez *et al.* 2008). Al-senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 0,77 mM olarak bulmuşlardır (Al-senaidy and Ismael 2011). Lavery ve arkadaşları at turpu (*Armoraciarusticana*) POD enziminin  $K_M$  değerini 0,5 mM olarak bulmuşlardır (Lavery *et al.* 2010). Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassicaoleracea*L.) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 141,64 ve  $V_{max}$  değerini 7500 EÜ/ml.dk olarak bulmuşlardır (Köksal and Gülçin 2008). Köksal ıspanak (*Spinaciaolracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 17,35 mM ve  $V_{max}$  değerini 1234 EÜ/ml.dk olarak bulmuştur (Köksal 2011). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin  $K_M$  değeri literatürde bulunan değerlere yakın olduğu görülmektedir.

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine ligand olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit inhibitörü için detaylı kinetik çalışma yapıldı. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, guaiakol (45 mM) reaksiyon ortamına 5 farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite ölçüm yapıldı. Bulunan bu değerle % Aktivite- inhibitör konsantrasyonu grafiği çizildi (Şekil 4.12). Çizilen bu grafikten 4-aminobenzohidrazit için  $IC_{50}$  değeri 0,726 mM olarak bulunmuştur.

$IC_{50}$  değerleri bulunduktan sonra kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimine 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümlerden sonra  $1/V$  ve  $1/S$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.10). Çizilen bu grafikten kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) POD enziminin inhibisyon çeşidi ve  $K_i$  değeri bulundu. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) peroksidazın  $K_i$  sabiti  $0,776 \pm 0,177$  mM, inhibisyon tipi yarışmasız olarak bulunmuştur. Böylece saflaştırmada kullanılan 4-aminobenzohidrazit ligandının detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri bu tez kapsamında tespit edilmiş oldu.

### **Sonuç Olarak;**

Kırmızı pancar peroksidaz enzimi ilk defa 4 amino benzohidrazit ile tek kademedede ve az maliyetle afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Afinite ile saflaştırılan kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) peroksidaz enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH,  $K_M$  ve  $V_{max}$  gibi kinetik parametreler tespit edildi. 4-aminobenzohidrazit için detaylı kinetik parametreler  $K_i$ ,  $IC_{50}$  ve inhibisyon tipi yarışmasız olarak bulundu. 4-aminobenzohidrazit ve türevlerinin diğer bitki peroksidazlarının saflaştırılmasında araştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

**KAYNAKLAR**

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam A., Emmami B., Fooladian F. and Zafariet, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, 331-336.
- Abdurrahman, M. Al-Senaidy A.M. and Ismael M.A., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293-298.
- 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.
- Agostini, E., Medina M. I., Milrad de Forchetti S.R. and Tigier H., 1997. properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598.
- Ajila, C.M. and Prasada Rao U.J.S., 2009. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60, 36-44.
- Ak, T. and Gülçin İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological. Interaction*, 174, 27-37.
- Altan, N., 2000. Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. *Palme yayıncılık*, 69-74, Ankara.
- Al-Turk, W.A., Stohs S.J., El-Rashidy F.H., Othman S. and Shaheen O., 1987. Changes in glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology*, 34, 1-8.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson H. and Mattiasson B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Bast, A., Haenen G.R.M. and Doelman J.A., 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am.J. Med.* 91, 2-13.
- Bingöl, G., 1983. *Biyokimya. Güven Matbaası*, 169-174, Ankara.
- Boeuf, G., Bauw G., Legrand B. and Rambour S., 2000. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 217-224.
- Blakely, W.F., Fuciarelli A.F., Wegher B.J. and Dizdaroglu M., 1990. Hydrogen Peroxide-Induced Base Damage in Deoxyribonucleic Acid. *Radiation Research Book*, Vol. 121, No. 3, pp. 338-343.
- Blum, J. and Fridovich I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240, 500-508.
- Bradford. M.M. and Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274-274.
- Burk, R.F., 1990. Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmac. Ther.* 45, 383-385.

- Champe, P.C., Harvey R.A. and Ferrier D.R., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa.
- Chu, Y.F. and Liu R.H., 2005. Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes. *Life Sciences*, 77, 1892-1901.
- Civello, P. M., Martinez G. A., Chaves A. R. and Anon M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596-2601.
- Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29-36.
- Cuatrecasas, P., Fuchs S. and Anfinsen C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419.
- Deby, C. and Goutier R., 1990. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical Pharmacology*, 39, 399-405.
- Deepa, S. S. and Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503-511.
- Doerge, D.R., 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitrogens. *Biochemistry*, 25, 4724-4728.
- Doerge, D.R., Divi R.L. and Churchwell M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10-17.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez B., Regalado C. and Whitaker J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus L. var esculenta D.C.*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574-1579.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclophedia of Plant Physiology*, Pirson, A., Zimmerman, M.H. (Ed). 4-17, New York.
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 165-186.
- Gazaryan, I.G. and Lagrimini L.M. 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029-1034.
- Geike, F. and Parasher C.D., 1975. Simple screening-test for detection of lactoperoxidase inhibitors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 276, 77-78.
- Gibson, D.D., Hawrylko J. and McCay P.B., 1985. GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: Properties of apotent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids*, 20 (10), 704-711.
- Gözükara, E.M., 1989. Biyokimya. Ofset Repromat LTD Şti., 792-795, Ankara.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Ezurum.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.



- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ. and Yıldırım A., 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea var. Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halpin, B., Pressey R., Jen J. and Mondy N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science*, 54, 644.
- Hiraga, S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y. and Matsui H., 2001. A large family of class III olant peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, 42 (5), 462-468.
- Hussein, L., Arafah A. and Yamamah G., 1988. The vitamin B1 status among yung egyptians from the oasis in relation to glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency. *I. J. Vit. Nutr. Res.*, 59, 52-54.
- Jen, J.J., Seo A. and Flurkey W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60-63.
- Kampis, A., Bartuczkovacs O., Hoschke A. and Aosvigyazo V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293-295.
- Keha, E. ve Küvrevioğlu Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. *Doçentlik tezi*, Erzurum.
- Kristensen, B.K., Bloch H. and Rasmussen S.K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *Intenational Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Köksal, E. and Gülçin İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassicaoleracea L. var. botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15.
- Kumar, R. and Bhatla K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Cryst*, 51, 1094-1096.
- Kumar, R., Sing K.A., Sing V.K. and Jagannadham M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry*, 46, 1350-1357.
- Kvaratskhelia, M., Winkel C. and Thorneley R.N.F. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology*, 114, 1237-1245.
- Kwak, S.S., Kim S.K., Park I.H. and Liu J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- La Creta, F.P., Olszewski J.J. and Tew K.D., 1988. Prufication of glutathione-S-transferases from rat liver and walker 256 mammary carcinoma cells by high

- performance liquid chromatography and a glutathione affinity column. *J. Chromatog.*, 434, 83-93.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Landi, S., 2004. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Research*, 463, 247-283.
- Latorre, M.E., Narvaiz P., Rojas A.M., and Gerschenson L.N., 2010. Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red beet (*Beta vulgaris L. var. conditiva*) root. *Journal of Food Engineering*, 98, 178–191.
- Lavery, C.B., Macinnis M.C., Macdonald M.J., Williams J.B., Spencer C.A., Burke A.A., Irwin D.J.G. and D’Cunha G.B., 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, H.C. and Klein B.P. 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137–152.
- Lehninger, A.L., 2005. Principles of biochemistry. Worth publisher, Academic Press, New York.
- Leon, J.C, Alpeeva I.S., Chubar T.A., Galaev I. Yu., Csoregi E. and Sakharov I. Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lineweaver, H. and Burk D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685 1934.
- Liu, X., Gao Y., Peng X., Yang B., Xu H., and Zhao J., 2007. Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris L.*) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 24-31.
- Marklund, S.L., 1990. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem. J.*, 266, 213-219.
- Marquez, O., Waliszewski K.N., Oliart R.M. and Pardo V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT*, 41, 1372-1379.
- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127-158.
- Martinez, A.S., Fortea M.I., del Amor F.M., and Nñez-Delgado E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum L.*) peroxidase. *Food chemistry*, 107, 193–199.
- McLellan, K.M. and Robinson D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Meister, A. and Anderson M.E., 1983. Glutathione: *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 711-760.
- Mika, A., Buck F. and Lühje S., 2008. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays L.*) roots. *Journal of Proteomics*, 71, 412-424.

- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643-1650.
- Murakami, S., Takahara H. and Shiraiwa M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777–78.
- Nair, A. R. and Showalter A. M. 1996. Purification and characterization of a woundinducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemistry Research Communucation*, 226, 254.
- Ninfali, P., and Angelino D., 2013. Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris* cicla and rubra. *Sciverse Science Direct, Fitoterapia*.
- Onsa, G.H., Saari N., Selamat J. and Bakar J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376.
- Özdemir, H., Aygül İ. and Küfrevioğlu Ö.İ., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties. *Prep Biochem. and Biotech.*, 31(2), 125-134.
- Pandey, V.P. and Dwivedi U.N., 2011. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 168-173.
- Pandey, V.P., Singh S., Singh R. and Dwivedi U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Appl. Biochem Biotechnol.*, 167, 367-376.
- Pütter, J. and Becker R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis Peroxidases*. Bergmeyer, Third Edition, VCH. 286, New York.
- Pomar, F., Bernal M. A., Diaz J. and Merino F. 1997. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313–1317.
- Pradedova, E. V., Isheeva O. D., and Salyaev R. K., 2011. Antioxidant Defense Enzymes in Cell Vacuoles of Red Beet Roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 1, 40-48.
- Robert. K.M., Petter A.M., Darly K.G. and Victor, W.R., 1993. *Harper’ın Biyokimyası*. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Robinson, F.E., Maxwell S.R.J. and Thorpe G.H.G. 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Smith A.T., and Thorneley R.N.F., 1996. Role of arginine 38 in horseradish peroxidase a critical residue for substrate binding and catalysis. *Journal Of Biological Chemistry*, 271, 4023-4030.
- Rodriguez L, J. N., Espin J. C., Amor F. del, Tudela J., Martinez V., Cerda A. and Garcia-Canovas F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1537–1541.
- Rompel, A., Albers M., Naserı J.I. and Gerdemann C., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1422–1430.

- Rudrappa, T., Lakshmanan V., Kaunain R., Singara N.M. and Neelwarne B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- Saraiva, J.A., Nunes C.S. and Coimbra M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571-1579.
- Scandalios J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–316.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York.
- Singh, W. N. and Singh J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Signoret, A. and Crouzet J. 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Southorn, P.A. and Powis G., 1988. Free radicals in medicine. 1. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin.Proc*, 63, 381-389.
- Şişecioğlu, M., Gülçin İ., Çankaya M., Atasever A., Şehitoğlu M.H., Kaya H.B. and Özdemir H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Tıpawan, T. and Barrett M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Triplett, B. A. and Mellon J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science*, 81, 147-154.
- Tzika, E.D., Sotiroidis T.G., Papadimitriou V. and Xenakis A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). *Eur Food Res Technol.*, 228, 487-495.
- Ursini, F., Maiorino M. and Gregolin C., 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 839, 62-70.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219.
- Vandenbergh, Y., Foiriers A., Rogiers V. and Vercruyse A., 1990. Changes in expression and “de novo” synthesis of glutathione-S-transferase subunits in cultured adult rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol*, 39 (4), 685-690.
- Vani, M., Reddy G.P., Thyagaraju K. and Reddanna P.; 1990. Glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, xanthine oxidase, catalase, glutathione

- peroxidase and lipid peroxidation in liver of exercised rats. *Biochem.*, 21 (1), 17-26.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Wakamatsu, K. and Takahama U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Whitaker, J.R., 1994, Catalase and peroxidase. In *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Whitaker, J. R., Ed., pp 565-578, Dekker: New York.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Yemenicioglu, A., Özkan M. and Cemeroglu B. 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158–4163.
- Zilbeyaz, K., Kilic H., Sisecioglu M., Ozdemir H. and Gungor A.A., 2012. Preparation of enantiomerically pure p-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz–Scheffer epoxidation of E-chalcone. *Tetrahedron*, 23, 594-601.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Hatay'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Hatay'da tamamladı. 2006 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde yaptığı çift ana dal programından 2011 yılında mezun oldu. 2010-2011 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2012-2013 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.