

**PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE
KROMATOGRAFİSİ TEKNİĞİ İLE KARATURP
(*Raphanus sativus* L.) ve ŞALGAMDAN (*Brassica rapa* L.)
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Ramazan KALIN

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2012
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
TEKNİĞİ İLE KARATURP (*Raphanus sativus* L.) ve ŞALGAMDAN
(*Brassica rapa* L.) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ramazan KALIN

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2012

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**Peroksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi Tekniği ile Karaturp (*Raphanus sativus* L.)
ve Şalgamdan (*Brassica rapa* L.) Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Ramazan KALIN tarafından hazırlanan bu çalışma 02.08.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (..../....) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

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

PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE KARATURP (*Raphanus sativus* L.) ve ŞALGAMDAN (*Brassica rapa* L.) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ramazan KALIN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Enzimin inhibitörü olan 4-aminobenzohidrazit molekülü tirozine kenetlendirilerek yeni bir afinite jeli hazırlandı. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden peroksidaz (POD) enzimi Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta sırasıyla %10,6 verimle 40,3 kat ve %9 verimle 269,3 kat saflaştırıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 470 nm’de ölçüldü. Enzimlerin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini belirlemek için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Molekül kütleleri karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD için yaklaşık 67,3 kDa ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD için yaklaşık 65,8 kDa olarak bulundu. Enzimler üzerinde yapılan kinetik çalışmalar neticesinde optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla karaturp (*Raphanus sativus* L.) için 6,5, 0,1 M, 30°C, 6,5 ve şalgam (*Brassica rapa* L.) için 6,5, 1 M, 30°C, 5,0 olarak tespit edildi. Guaiakol substratı için saf enzimlerin K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı ve karaturp (*Raphanus sativus* L.) için K_M 24,88 mM, V_{max} 3,23 EÜ/ml, şalgam (*Brassica rapa* L.) için K_M 4,09 mM, V_{max} 0,797 EÜ/ml olarak belirlendi. Ayrıca saf peroksidaz enzimleri üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda ayrı ayrı incelendi. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü her iki bitki peroksidazı içinde yarışmasız inhibisyon göstermekte olup, karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) için sırasıyla IC_{50} değeri 0,726 mM ve 1,167 mM olarak, K_i değerleri ise sırasıyla $0,5947 \pm 0,0122$ mM ve $1,1033 \pm 0,1016$ mM olarak tespit edildi.

2012, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Afinite, peroksidaz, saflaştırma, karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM RADISH (*Raphanus sativus* L.) ve BLACK TURNIP (*Brassica rapa* L.) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

Ramazan KALIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

A novel affinity gel was prepared by joining 4-aminobenzohydrazide, an inhibitor molecule of the enzyme, to tyrosine. Peroxidase (POD) enzymes of black radish (*Raphanus sativus* L.) and turnip (*Brassica rapa* L.) plants were purified in a single step by using Sepharose-4B-L-tyrosine-4-aminobenzohydrazide affinity chromatography as 10.6% yield, 40.3-fold and 9% yield, 269.3-fold, respectively. 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 black radish (*Raphanus sativus* L.) and turnip (*Brassica rapa* L.) was found to be approximately 67.3 kDa and 65.8 kDa, respectively. As a result of the kinetic studies on the enzymes; optimum pH, optimum ionic strength, the optimum temperature and stable pH were determined as 6.5, 0.1 M, 30°C, 6.5 for black radish (*Raphanus sativus* L.) and 6.5, 1 M, 30°C, 5.0 for turnip (*Brassica rapa* L.). K_M and V_{max} values were calculated for the pure enzyme using guaiacol as substrate and for black radish (*Raphanus sativus* L.) K_M and V_{max} values were found to be as 24.88 mM and 3.23 EU / ml, for turnip (*Brassica rapa* L.) they were found to be as 4.09 mM and 0.797 EU / mL. Also, inhibitory effect of 4-aminobenzohydrazide inhibitor on pure peroxidase enzymes were examined in vitro conditions separately. 4-aminobenzohydrazide have shown noncompetitive inhibition in both peroxidase enzymes of black radish (*Raphanus sativus* L.) and turnip (*Brassica rapa* L.), IC_{50} values were calculated as 0.726 mM and 1.167 mM, K_i values were calculated as 0,5947±0,0122 mM and 1,1033±0,1016 mM, respectively.

2012, 102 pages

Keywords: Affinity, peroxidase, purification, characterization

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

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

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkanlarını benden esirgemeyen 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 KÜFREVLİOĞLU'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, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na, İspir Hamza Polat Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ali ATASEVER'e

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım, doktora öğrencisi Sayın Ebru AKKEMİK, Sayın Arş. Gör. Zuhâl ALİM, Sayın Arş. Gör. Pınar TAŞER, Sayın Arş. Gör. Zeynep KÖKSAL ve yüksek lisans öğrencisi Sayın Pınar ANNAKKAYA başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve desteklerinden ötürü değerli arkadaşım Sayın Halil ŞENOL'a,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Ramazan KALIN

Ağustos 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	8
1.1.1. Serbest radikaller	8
1.1.2. Antioksidanlar	9
1.1.3. Antioksidan enzimler	11
1.2. Peroksidazlar (POD, E.C.1.11.1.7)	14
1.3. Afinite Kromatografisi	19
1.3.1. Matriks.....	22
1.3.2. Ligand.....	23
1.3.3. Uzantı kolu	23
1.3.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
2.1. Çalışmanın Amacı	31
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	32
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	32
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	33
3.2. Yöntemler	38
3.2.1. Protein tayini	38
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	38
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	38
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	39

3.3. Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) Bitkilerinden	
POD Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	41
3.3.1. Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) için	
homojenat hazırlanması	41
3.3.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi.....	41
3.3.3. Afinite jelinin hazırlanması	46
3.3.4. Afinite kolonunun paketlenmesi	48
3.3.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	48
3.3.6. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi	49
3.4. Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) Bitkilerinden	
Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	50
3.4.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları.....	50
3.4.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları.....	51
3.4.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları	51
3.4.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları	51
3.4.5. Guaiakol için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	52
3.4.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	53
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik	53
4.2. Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) Bitkilerinden	
POD Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları	54
4.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	54
4.2.2. POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları	56
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	57
4.3. Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) Bitkilerinden	
Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar ...	57
4.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları	63
4.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları.....	65
4.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları	68
4.3.5. Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik	
yapılan çalışma sonuçları	70

4.3.6. Kullanılan inhibitörün K_i ve IC_{50} değerlerinin bulunması yönelik yapılan çalışma sonuçları.....	73
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	83
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.2.	Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.3.	Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.4.	Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.5.	Lineweaver-Burk Grafiği.....	7
Şekil 1.6.	Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması.....	16
Şekil 1.7.	Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.....	17
Şekil 1.8.	Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü.....	18
Şekil 1.9.	Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	21
Şekil 1.10.	Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü.....	24
Şekil 2.1.	At turpu (HRP) peroksidazın X-ray kristalografi yapısı.....	27
Şekil 3.1.	Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.....	39
Şekil 3.2.	CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	47
Şekil 3.3.	4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli.....	48
Şekil 4.1.	Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumini).....	53
Şekil 4.2.	4-aminobenzohidrazit kolonundan karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını gösteren grafik.....	54
Şekil 4.3.	4-aminobenzohidrazit kolonundan şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını gösteren grafik.....	55
Şekil 4.4.	4-aminobenzohidrazit kolonundan karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	55

Şekil 4.5.	4-aminobenzohidrazit kolonundan şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	56
Şekil 4.6.	4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	58
Şekil 4.7.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen R_F -log M_K grafiği.....	58
Şekil 4.8.	4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	59
Şekil 4.9.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen R_F -log M_K grafiği.....	59
Şekil 4.10.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği	61
Şekil 4.11.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği.....	62
Şekil 4.12.	Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 (pH 6,5) tampon çözeltileri kullanılarak karaturptan (<i>Raphanus sativus</i> L.) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-İyonik şiddet (mM) grafiği....	64
Şekil 4.13.	Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 (pH 6,5) tampon çözeltileri kullanılarak şalgamdan (<i>Brassica rapa</i> L.) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-İyonik şiddet (mM) grafiği....	65
Şekil 4.14.	Karaturptan (<i>Raphanus sativus</i> L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/ml)-Sıcaklık (0C) grafiği.....	66
Şekil 4.15.	Şalgamdan (<i>Brassica rapa</i> L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/ml)-Sıcaklık (0C) grafiği.....	67
Şekil 4.16.	Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	69

Şekil 4.17.	Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği...	70
Şekil 4.18.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin guaiakol için K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	71
Şekil 4.19.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.)POD enziminin guaiakol için K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	72
Şekil 4.20.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği	74
Şekil 4.21.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği	76
Şekil 4.22.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik.....	79
Şekil 4.23.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik.....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Antioksidanların sınıflandırması.....	11
Çizelge 1.2.	Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	22
Çizelge 1.3.	Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller.....	25
Çizelge 3.1.	Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki kuvvet içeriği.....	40
Çizelge 4.1.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	57
Çizelge 4.2.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	57
Çizelge 4.3.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimleri için SDS-PAGE ile molekül tayini sonuçları.....	60
Çizelge 4.4.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	61
Çizelge 4.5.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	62
Çizelge 4.6.	Karaturptan (<i>Raphanus sativus</i> L.) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	63
Çizelge 4.7.	Şalgamdan (<i>Brassica rapa</i> L.) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	64
Çizelge 4.8.	Karaturptan (<i>Raphanus sativus</i> L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları.....	66

Çizelge 4.9.	Şalgamdan (<i>Brassica rapa</i> L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları.....	67
Çizelge 4.10.	Karaturptan (<i>Raphanus sativus</i> L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	68
Çizelge 4.11.	Şalgamdan (<i>Brassica rapa</i> L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	69
Çizelge 4.12.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enzimi için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi.....	71
Çizelge 4.13.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimi için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi.....	72
Çizelge 4.14.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge.....	73
Çizelge 4.15.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	74
Çizelge 4.16.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge.....	75
Çizelge 4.17.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	75

Çizelge 4.18.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan substrat konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge.....	77
Çizelge 4.19.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	78
Çizelge 4.20.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan substrat konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge.....	80
Çizelge 4.21.	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	81
Çizelge 4.22.	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.) ve şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.) POD enzimlerinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları.....	82

1. GİRİŞ

Kimya bilimi insanları; atom ve molekül yapılarının ilişkileri üzerinde yoğun çalışmalar yapmışlardır. Atom-molekül birlikteliği varlığını sürdürdüğü sürece, kimya bilimi; canlı yaşamını tanımada, anlamada, adlandırmada, olası ayrımları bütünleştirmede eldeki en temel meta ve değer olmaya devam edecektir.

Atom ve molekül birlikteliğini gerçeklik ekseninde irdelenecek olursak; canlıyı yaşamda tutan, yaşamsal fonksiyonlarını icra edebilmesini sağlayan, bütünü oluşturan küçük ayrıntılar gibidirler. Atom ve molekül birlikteliğinden oluşan koloniler, öz benliklerini yitirerek yeni ortamlarına adapte olurlar ve yeni yaşamlarına fayda sağlamak için çalışmalara başlarlar. Modern bilim bu birlikteliği spektroskopik tekniklerle açıklama girişiminde bulunurken canlı yaşamı da fonksiyonel tepkimelerle bu açıklamaları desteklemektedir.

Canlı sistemlerinde meydana gelen olayların anlık olabilmesi; yürüyen mekanizmanın aksamaması ve işlevini olağan sürecinde yerine getirebilmesi için önemlidir. Bu işlemler metabolizma içerisinde biyolojik katalizörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Örneğin; bir insanın yürüme girişiminde attığı bir adım, bir nesneyi bir yerden başka bir yere taşıma faaliyeti için gerekli olan kaldırma, yürütme, sürüklenme, bırakma gibi hareketler için yapılan işlemler yüzlerce reaksiyonun neticesinde gerçekleşen olaylardır. Canlı sistemlerde tepkimelerin enzimatik olarak katalizi şarttır. Bu gereklilik canlı yaşamının faaliyetlerini aksatmadan, farkında olmadan yaşamsal alışkanlıklara dönüştürdüğümüz zamansal süreçleri hızlandırarak işlevleri etkin kılan yapısal bir denklemin sonucuna ulaşmak için şarttır. 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.

Enzimler; kinetik yönden oldukça kararlı olan ve canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşturmada %100'lük bir ürün oluşumunu sağlayan, katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılarını korumaları aktiflikleri açısından oldukça önemlidir.

Bir enzim için en önemli özellikler katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir. Enzimlerin katalizleme güçleri "Turnover Sayısı" ile anlandırılmakta 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).

Günümüzde bilinen iki binden fazla enzim, kataliz ettiği tepkime (alkol dehidrogenaz) ya da substrat (üreaz) 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; Tekman ve Öner 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;

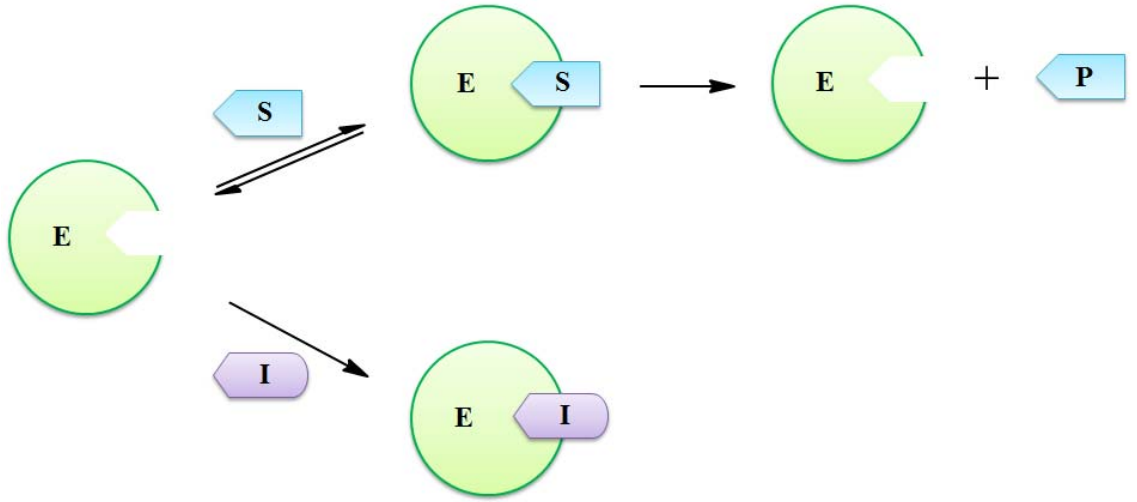
- 1. Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon ve Redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) taşıyan grupların transferini katalize eden enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Bağlara su sokarak bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize 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; Harvey *et al.* 2007; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin 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 inhibisyon iki ana gruba ayrılır. Bunlar;

- 1. Dönüşümsüz inhibisyon:** İnhibitörün enzime kovalent olarak bağlanması ya da zor ayrışa bilen bir kompleks oluşturması ile meydana gelen inhibisyon türüdür. Bu inhibisyon türünde enzimlerin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. Dönüşümsüz inhibisyon da V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak max. hız) azalır,

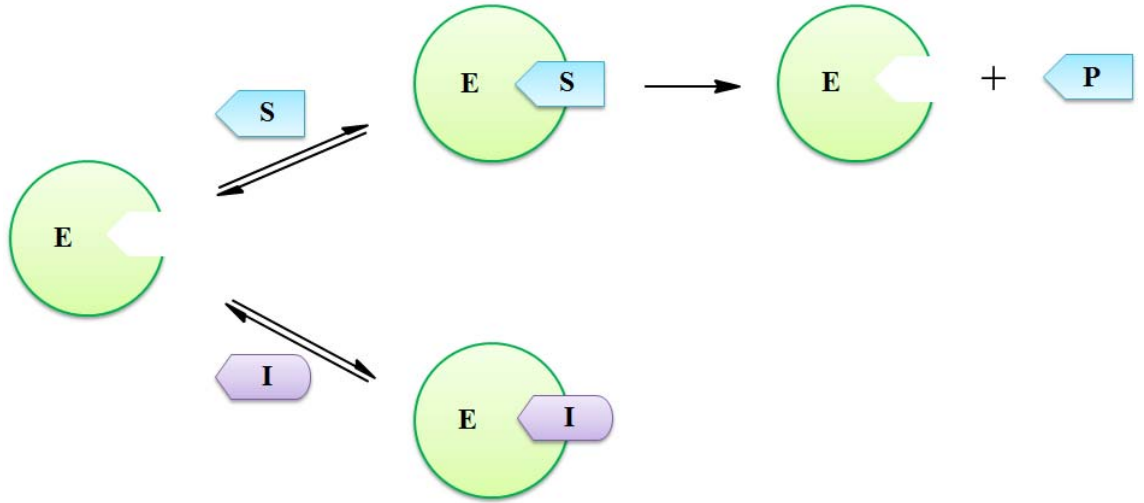
K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişime uğramaz (Şekil 1.1) (Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu durum yarışmasız inhibisyona benzer bu nedenle iki inhibisyon türünü birbirinden ayırmak için değişik enzim konsantrasyonların da V_{max} ölçülerek bir grafik hazırlanır elde edilen eğriden inhibisyon türüne karar verilir.



Şekil 6.1. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi

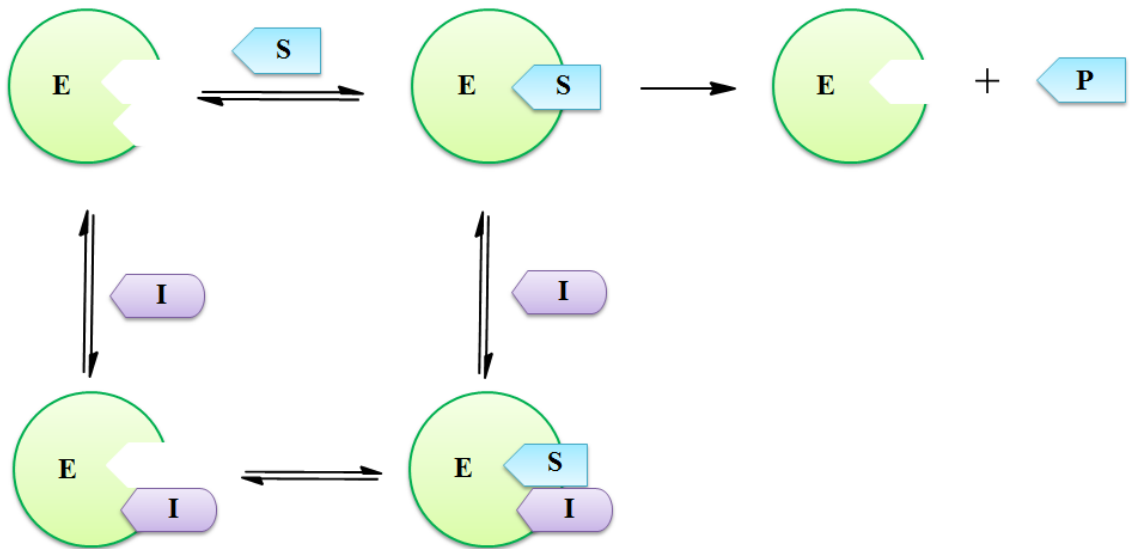
2. Dönüşümlü inhibisyon: Enzim ile inhibitör etkileşmesinin bir denge reaksiyonu oluşturduğu bu inhibisyon türü dönüşümsüz inhibisyonun aksi bir görünüm sergiler. Bu inhibisyon türü üç gruba ayrılır. Bunlar;

i. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon: Dönüşümlü inhibisyon türleri içerisinde yarışmalı inhibisyonun en basit olanıdır. Yapı itibariyle inhibitör substrata benzemekte ve 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 1.2) (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



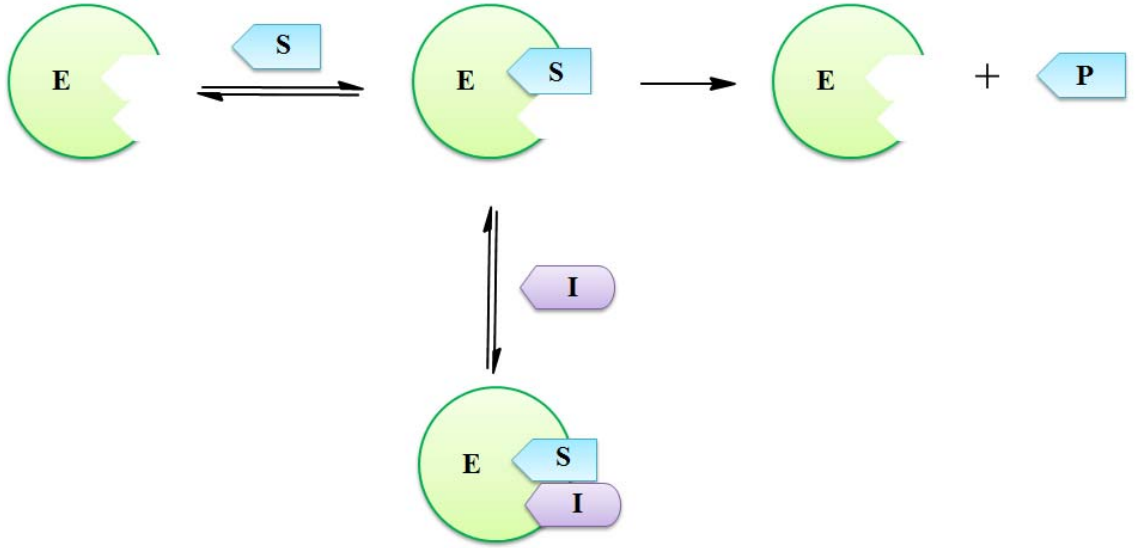
Şekil 1.7. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

ii. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: İnhibitör ve substrat arasında enzim aktif bölgesine bağlanma hususunda 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 1.3) (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrelioğlu 2009).



Şekil 1.8. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

iii. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon türü; 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 1.4) (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

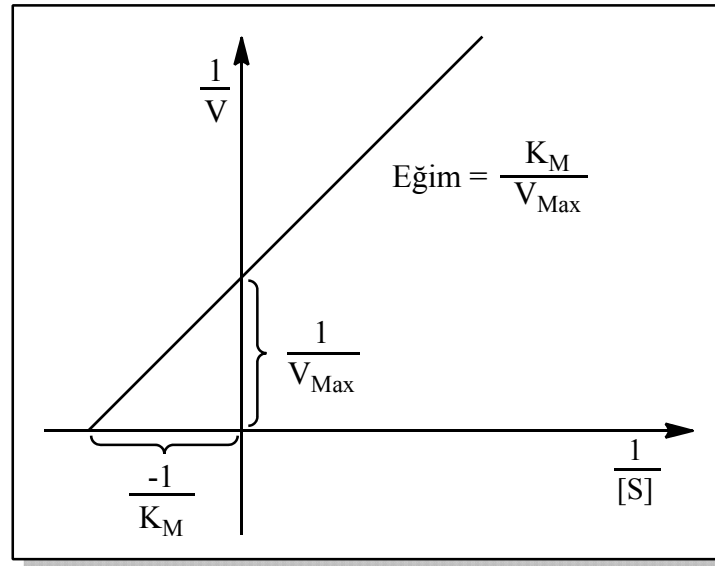


Şekil 1.9. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

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. Multienzim sistemlerin birçoğu, sahip oldukları net reaksiyon hızlarını düzenleme kapasiteleri ile seri reaksiyonlar gösterebilmektedirler. 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.

Allosterik enzimler; birden fazla polipeptit zinciri ihtiva ederek, inhibitörlerin enzimlere bağlanmasıyla, farklı alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerden de yararlanarak allosterik inhibisyonu oluştururlar. Bu enzimleri etkileyen maddelere modölatör adı verilir.

Michaelis-Menten kinetiğinden farklı olarak karşımıza çıkan allosterik enzim kinetiği; sigmoidal grafikler göstermektedirler. İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için iki temel yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en çok kullanılan Lineweaver–Burk eğrisi (Şekil 1.5); $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilerek kesim noktalarından değerlendirmeler yapılarak elde edilir. Bir diğer yöntem olan Dixon grafiği; en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V$ -[I] grafiği çizilerek kesim noktalarından hesaplanarak elde edilir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Stryer 1988; Gilbert 1992; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.10. Lineweaver-Burk Grafiği

1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

1.1.1. Serbest radikaller

Reaktif oksijen türleri solunum ve bağışıklık sistemine bağlı bazı hücrelerde olduğu gibi vücudun oksijeni normal kullanımı esnasında da sürekli üretilir. ROS süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot-}$) gibi serbest radikalleri; singlet oksijen (1O_2), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit ($NO^{\cdot-}$) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) gibi serbest radikal olmayan türleri içerir (Gülçin 2010). Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlıkları düşük, oldukça reaktif moleküllerdir (Abdollahi *et al.* 2003).

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 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). ROS'un fizyolojik konsantrasyonları hücrenin normal fonksiyonları için gerekli olabilir. Serbest radikaller nükleik asitler, lipitler, proteinler, karbohidratlar ve doymamış yağ asitleri gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilir (Gülçin 2010). Sonuç olarak ROS'un sıtma, yaşa bağlı bağışıklık sistemi hastalığı, kalp hastalıkları, felç, ateroskleroz, diyabet ve kanser gibi 100'den fazla hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (Gülçin 2012).

ROS'un kontrolsüz üretimi sebebiyle canlı metabolizmasında meydana gelen hasarları genel olarak şu şekilde sıralayabiliriz (Kehre and Smith 1994; Halliwell and Gutteridge 1999)

- ✓ DNA'nın tahrip olması
- ✓ Nükleotid yapıli koenzimlerin yıkımı
- ✓ Protein ve lipitlerle kovalent bağlantılar yapması
- ✓ Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değışiklikler
- ✓ Mukopolisakkaritlerin yıkımı
- ✓ Proteinlerin tahrip olması
- ✓ Lipit peroksidasyonu ve membran yapısının bozulması
- ✓ Membran proteinlerinin tahribi ve membran transport sistemlerinin bozulması
- ✓ Steroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- ✓ Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değışmesi
- ✓ Kolejen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerde aterofibrotik değışikliklerin oluşması.

1.1.2. Antioksidanlar

Reaktif Oksijen Türlerine karşı savunma mekanizması olarak, canlı metabolizmasında bu görevi 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 nötröle 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. Antimutajenik, antikarsinojenik, antiaging gibi pek çok biyolojik etkinin antioksidan kaynaklı olduğu bilinmektedir (Cook and Samman 1996). Antioksidanlar, oksidanları dört temel yol ile etkisiz hale getirirler. Bunlar (Gökpınar *et al.* 2006);

i. Giderme etkisi: Oksidanları daha zayıf olan yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu şekilde etki gösterirler.

ii. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen bağlanarak inaktif edilmesi olayıdır. Bu şekilde etki gösterenler vitaminler ve flavanoidler'dir.

iii. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlayarak onları inaktif etmesi olayıdır.

iv. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülün onarılmasına denir.

Koruyucu ajan olarak adlandırılırlar antioksidanlar insan vücudunda ROS'tan kaynaklı oksidatif hasarı azaltırlar ve lipid 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 lipid peroksidasyonunu geciktirerek uzun raf ömrü sağlarlar (Gülçin 2010). Antioksidanlar, gıda maddelerinin bozulmasını önlemek amacıyla katkı maddesi olarak oldukça yaygın kullanılırlar. Bu nedenle endüstride çok önemli rol oynarlar (Gülçin 2005). Eski zamanlardan bu yana, yemeklerde tatlandırıcı olarak kullanılan baharatlar da oldukça iyi antioksidan özellik gösterirler.

Gıda endüstrisinde BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Özellikle yağların acılaşmasını önlemek amacıyla kullanılırlar (Rehman 2003). Balık ve balık ürünlerinin işlenmesi, depolanması esnasında meydana gelen renk değişimlerinin en aza indirilmesi amacıyla da sentetik antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Lee 2005).

Aerobik canlılarda antioksidan savunma sistemleri, metabolizmada üretilen (endojen) ve dışarıdan diyetle alınan (ekzojen) olmak üzere iki ana sınıfta incelenir (Gülçin 2012).

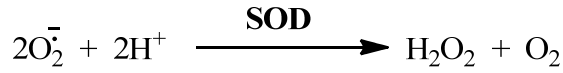
Çizelge 1.1. Antioksidanların sınıflandırması

ANTIOKSİDANLAR			
Endojen Antioksidanlar		Ekzojen Antioksidanlar	
Enzimler	Küçük moleküller	Sentetik	Doğal
Katalaz	Askorbik Asit	BHA	Tokoferoller
Peroksidaz	Glutasyon	BHT	Karotenler
Süperoksit dismutaz	Melatonin	TBHQ	Fenoller
Glutasyon peroksidaz	Serotonin	Propilgallat	Flavonlar
Glutasyon redüktaz	Adrenalin	Troloks	Katekinler
Glutasyon S transferaz			

Son zamanlarda BHT, BHA ve propilgallat en yaygın kullanılan antioksidan maddelerdir. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etki gibi zararlı etkilerinden dolayı bu tür maddelerin güvenilirliği sorgulanmıştır ve kullanımlarına bazı sınırlandırılmalar getirilmiştir. Bu sebeplerle sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidanlara ilgi artmıştır (Gülçin 2008; Göçer and Gülçin 2011; Gülçin 2012).

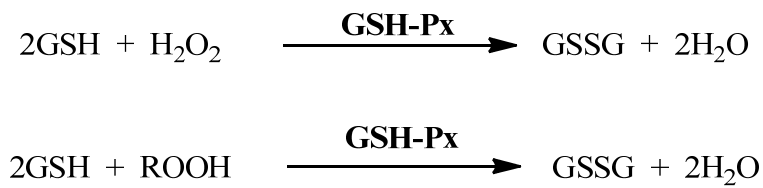
1.1.3. Antioksidan enzimler

Bir metaloenzim olan süperoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1), süperoksitin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyerek 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).



Hücre sitozolünde ve mitokondri matriksinde bulunan glutatyon peroksidaz enzimi (GSH-Px, E.C.1.11.1.9); 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; Greenberg *et al.* 1994;).

Glutatyon peroksidaz enzimi, sülfür içeren bir tripeptit olan glutatyonu (GSH) indirgeyici güç olarak kullanır. Glutatyon ise tüm memeli hücrelerinde en çok bulunan düşük molekül ağırlığına sahip bir tiyol molekülüdür (Al-Turk *et al.* 1987; Bast *et al.* 1991).



Disülfid bağları ile birbirlerine bağlanan glutatyonlar indirgeyici özelliklerini kaybederler yani okside glutatyon (GSSG) haline dönüşürler. Ancak GSSG'nin tekrar indirgenmiş hale dönüşmesi, antioksidan savunma sisteminin fonksiyonunu sürdürebilmesi için gereklidir. Koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD olan glutatyon 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).



Hücre içi hidrojen peroksit konsantrasyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan katalaz enzimi (CAT, E.C.1.11.1.6), süperoksit radikalının 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 proteinidir (Burk 1990; Bast *et al.* 1991).

Katalaz enzimi, H_2O_2 oluşumunun düşük hızlarda olduğu durumlarda ya da yüksek elektron donörü konsantrasyonlarında peroksidatik reaksiyonla;



H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik reaksiyonla;



olmak üzere 2 şekilde hidrojen peroksiti suya dönüştürerek detoksifeye eder (Muray *et al.* 1993).

Glutatyon S-transferaz (GST, E.C.2.5.1.18); metabolizma sonucu organizmada meydana gelen toksik bileşiklerin detoksifikasyonunda ve canlıda oluşabilecek hasarları önlemede 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). Ökaryotik ve prokaryotik canlı sistemlerin; stoplazmasında, mikrozomunda ve mitokondri içinde bulunur. Amino asit dizilişi, substrat seçiciliği ve kinetik enzim davranışına bağlı olarak GST enziminin 7 farklı çeşidi vardır. Bunlar; alpha (a), mu (m), pi (p), sigma (s), theta (u), kappa (k) ve zeta (z)'dir (Landi 2004).



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

Oksidoredüktaz enzim sınıfında olan peroksidaz enzimi; eletron verme eğiliminde olan bileşikler ile bu elektronları alıcı durumunda olan hidrojen peroksit bileşiği arasında gerçekleşen reaksiyonu katalizler. 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 iki sınıfa ayrılırlar. Bunlar; (Rompel *et al.* 2007).

- ✓ Hayvan peroksidazları
- ✓ Bitki, mantar ve bakteri peroksidazları

POD, organik ve inorganik substratların oksidasyonunu H_2O_2 kullanarak katalizler. Ayrıca fenoller ve hidrokinonlar gibi birçok aromatik molekülün dehidrogenasyonunu

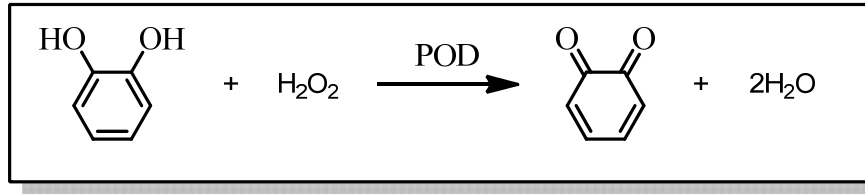
da katalizler. Bu bileşiklere 2-toluidin, pirogalol, guaiakol, lökomalaşit yeşili, 2-kresol, propiyonil promozin, 4,4'-diaminodifenilen amin, benzidin, di-*o*-anisidin, *o*-tolidin ve bazı azo boya türevleri örnek olarak verilebilir (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).

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



POD'un; spesifik aktivite, optimum pH, kofaktörler, substrat ilgisi ve inhibitörlere hassasiyet gibi biyokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren birçok izoenzimleri bulunmaktadır (Fric 1976). Peroksidazların 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).

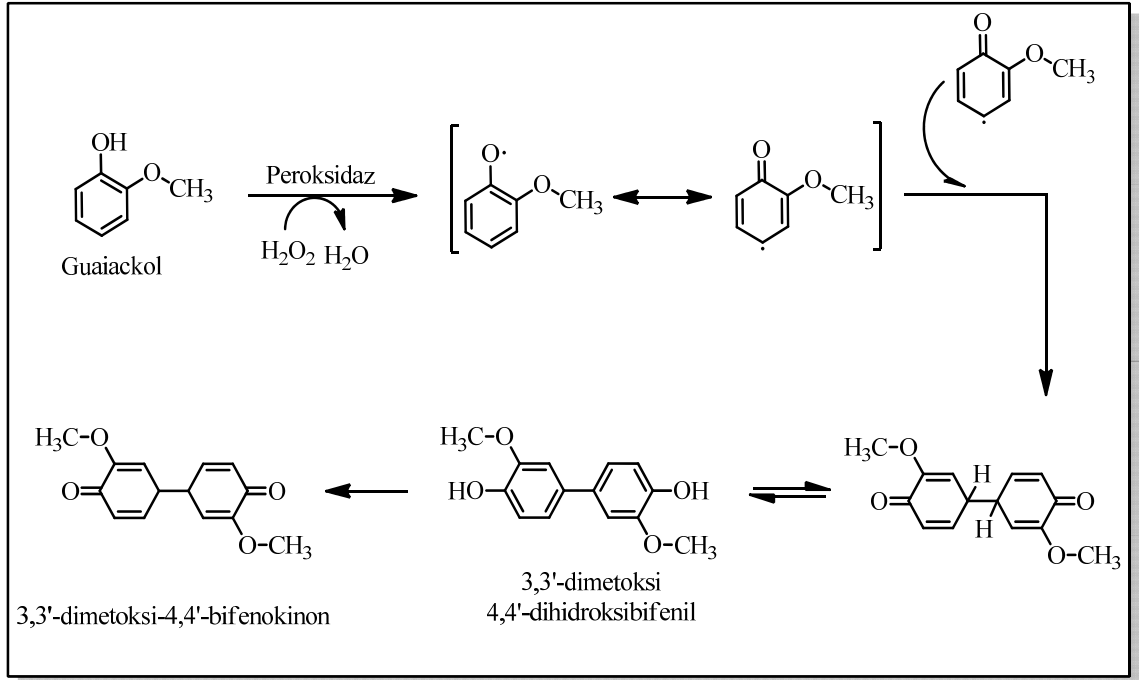
Bitki peroksidazları; guaiakol, katekin, klorogenik asit ve katekol gibi birtakım fenolik molekülün peroksit karşısında oksidasyonunu gerçekleştirebilir (Onsa *et al.* 2004). Yukarıda sayılan aromatik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılarak metabolizmada meydana gelen hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürürler (Robinson *et al.* 1987; Kamps *et al.* 1984). Bu reaksiyonlara katekolün oksidasyonunu örnek olarak verebiliriz.



Şekil 1.6. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması

Biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂ 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).

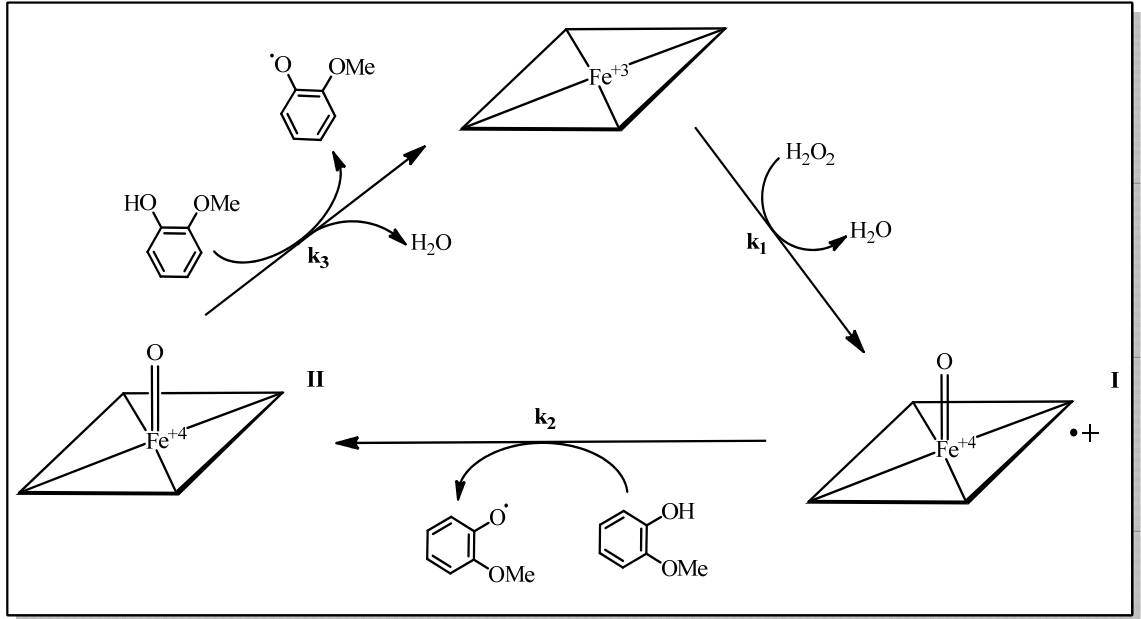
Yapılan çalışmalar sonucunda peroksidazın bulunduğu şartlarda substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgenme mekanizması açığa kavuşturulmuş ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgendiği tespit edilmiştir (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.7. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması

Biyolojik materyallerde ilk kez 1809 yılında yapılan renk reaksiyonunda guaiakol substrat olarak kullanılmıştır. Ancak peroksidaz teriminin kullanımı yaklaşık 100 yıl sonra olmuştur. 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 yükseltildiği reaksiyon mekanizması üç basamakta gerçekleşir (Şekil 2.3).



Şekil 1.8. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Bu mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi Fe(IV) içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I'ı oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Bu bir redoks reaksiyonu olup 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).

Peroksidazlar; enzimatik reaksiyonlar, enzim fonksiyonu ve protein yapı çalışmalarında model bir enzim olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun sebebi ise; aktivitelerinin kolay kromojenik metodlarla basitçe ölçülebilmesi ve yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Hiraga *et al.* 2001).

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).

1.3. Afinite Kromatografisi

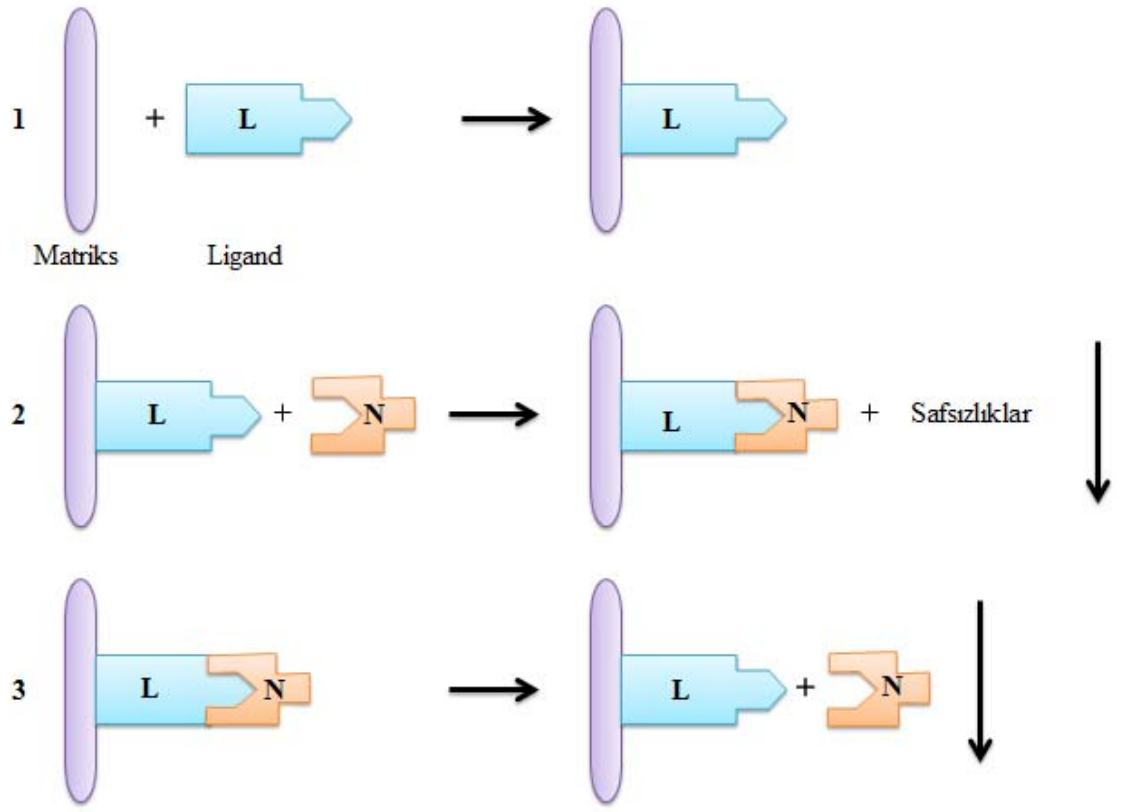
Saflaştırılması istenen molekülün matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir bağlandığı bir teknik olan afinite kromatografisi aynı zaman da bir çeşit adsorbsiyon kromatografisidir. Diğer tekniklerle, saflaştırılması 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 saflaştırılabilir. Yüksek seçicilik ve birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden dolayı, afinite kromatografisi birçok amaç için kullanılabilir. Bunlar;

- i. Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için.
- ii. Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabii şekillerini ayırmak için.
- iii. Büyük miktarlardaki kirleticiyi, küçük miktardaki biyolojik materyallerden ayırmak için.

Afinite kromatografisinin gelişim süreci; ilk olarak 1910 yılında yapılan amilazın, çözünmeyen nişastaya adsorbsiyonu ile izolasyonu amaçlanmış ancak ligandların kovalent olarak bağlanacakları dayanıklı kolon materyalleri bulunmadığı için bu uygulama etkisiz kalmıştır. Daha sonra 1967’de Axen Porath Ernback primer amino grubu bulunduran moleküllerin, siyanojen bromürle aktiveleştirilmiş polisakkarit matrikslerine bağlanabileceğini öngörmüştür. Bu gelişmeler afinite kromatografisinin ayırma teknikleri içerisinde kendisine bir yer edinme sürecini başlatmıştır. Gelişme süreci afinite kromatografisinin geçmiş denemelerdeki eksik yanlarını pozitif olarak geliştirmiş, hatta 1972 yılında Pharmacia Fine Chemicals tarafından siyanojen brömür ile aktiveleştirilmiş Sepharose jelini geliştirerek, immobilize edilecek ligandlar için dayanıklı ve hazır bir ortam oluşturmuştur. Ayrıca günümüzde yapılan çalışmalarda farklı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla matrikslere immobilize edilen bir seri ligand elde edilmiş; böylece birçok biyolojik maddeyi ve hücreleri güvenilir şekilde ayırabilecek spesifik adsorbanlar hazır hale getirilmiştir (Axen *et al.* 1967).

Afinite kromatografisinin genel prensibi:

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.6’da özetlenmiştir.



Şekil 1.9. 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)

Başarılı bir ayırım yapabilmek için, ön koşul niteliğinde olan 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 yöntem bulunması gerekmektedir.

Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Çizelge1.2'de gösterilmiştir (Axen and Ernback 1971).

Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit. glikoprotein, , hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, Nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon, Vitamin	Reseptör taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

1.3.1. Matriks

Afinite kromatografisi için Sephadex, Sepharose, Bio-gel gibi birçok farklı matriks kullanılmaktadır. Ancak bunlar içinden en çok inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jeli olan sepharose kullanılmaktadır. Kullanılan bu jel saflaştırma işlemlerinde başarılı bir matriks için gerekli bütün şartları taşımaktadır.

Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bir şekilde bağlanabilmesi için kolayca derivatize edilebilir. Bu iş için en çok kullanılan ve en iyi jel Sepharose-4B'dir. Afinite kromatografisinin gücü spesifik etkileşmelere bağlı olduğundan dolayı kullanılan jelin oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon göstermesi gerekir. Küresel ve rijit bir yapıya sahip olan sepharose jeli bu şartı sağlayan en iyi jeldir. Ayrıca sepharose jeli; yüksek ve düşük pH, deterjanlar ve disosiye edici maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklılık göstermektedir. Bazı durumlarda bu jel yerine yine bu jelin bir başka türevi kullanılabilir. Örneğin; organik çözücülerin, yüksek sıcaklıkların ve guanidin hidroklorür gibi parçalayıcı elüentlerin gerektiği durumlarda,

kovalent şekilde çapraz bağlanmış Sepharose-CL jeli kullanmak daha idealdir (Cuatrecasas 1970).

1.3.2. Ligand

Afinite kromatografisi için seçilecek ligandın iki önemli özelliğe sahip olması gerekir. Bunlar;

- i. Ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir.
- ii. Ligandın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır.

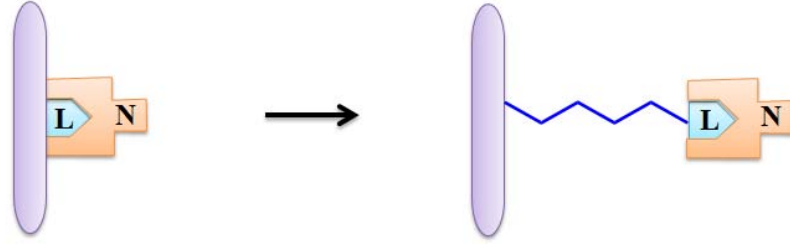
Seçilen ligandın, serbest çözeltilerde 10^{-4} - 10^{-8} M arasında maddeyi bağlama afinitesine sahip olması arzu edilen aralıktır. 10^{-4} M'dan daha büyük (bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilişki) ya da 10^{-8} M'dan daha küçük (bir hormon ve reseptörü arasındaki ilişki) ayrışma sabitine sahip olan etkileşimleri içeren bir afinite kromatografisinde, bağlı olan maddeyi denatüre etmeden elüsyonunu yapmak oldukça zorlaşacaktır.

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).

1.3.3. Uzantı kolu

Enzimlerin aktif bölgesi genellikle 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 (Şekil 1.7).



Şekil 1.10. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü

Uzantı kolunun işlevini tam olarak yerine getirebilmesi için uzunluğu çok önemlidir. Eğer uzantı kolu çok kısa olursa, kol etkisiz kalır ve ligand numunedeki saflaştırılacak maddeyi bağlayamaz. Aksine uzantı kolu çok uzun olursa, spesifik olmayan etkiler fazlalaşır ve böylece ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları çok uzun uzantı kolu kullanarak yaptığı deneyde, uzantı kolunun numunedeki maddelere hidrofobik etkileşimlerle bağlandığını gözlemlemiştir. Spesifik olmayan bu hidrofobik etkileşimler, afinite kromatografisi için arzu edilen bir durum değildir (Ocarra *et al.* 1974).

1.3.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi

Ligandı bağlayacak jelin seçiminde; ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi ve saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilmelidir.

Normal bağlanma reaksiyonunu minimum oranda engellemek için, ligandın matrikse kovalent bağlanması, molekülün en az etkili bölgesinden yapılmalıdır. Örneğin, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları aracılığıyla bağlanabilir; bu sayede inhibitörün enzimle spesifik bağlanma afinitesi korunmuş olur.

Şayet amino grupları bağlanma reaksiyonlarına girerlerse, inhibitör ile enzim arasındaki bağlanma istenmeyen başka bir grup tarafından gerçekleşecektir. Eğer liganlardaki bağlanma bölgeleri hakkında önceden bilgi bulunmuyorsa, deneme yanılma yöntemi ile bağlanma bölgesi belirlenebilir. Yaygın olarak ligandı immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bu gruplarla ligandların bağlanabileceği jeller Çizelge 1,3’de verilmiştir (Keha 1981).

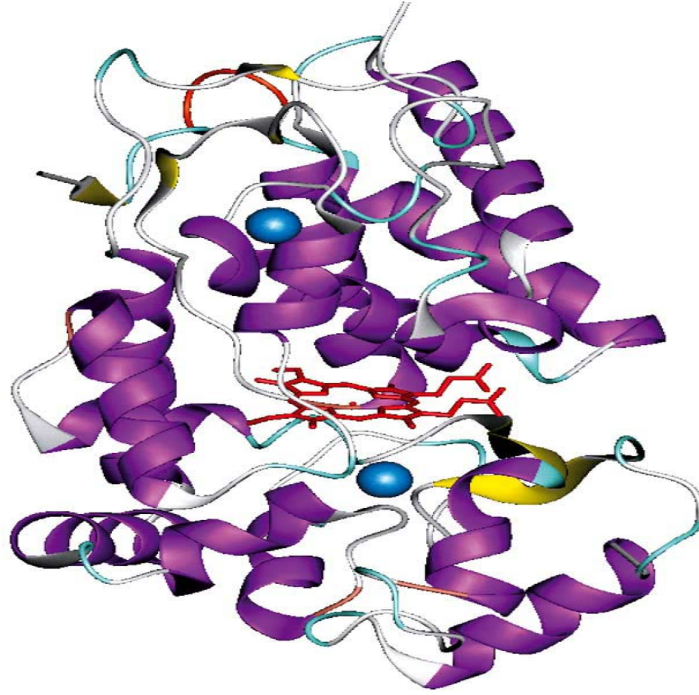
Çizelge 1.3. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller

Ligand	Fonksiyonel grup	Bağlanacak jel
Protein Peptid Aminoasit	Amino	CNBR ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		CH-Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH-Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Karboksil	AH-Sepharose 4B
	Tiyol	Tiyopropil-Sepharose 6B
		Aktifleştirilmiş tiyol Sepharose
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
Şeker	Hidroksil	Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Amino	CH-Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH-Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Karboksil	AH-Sepharose 4B
Polinükleotit	Amino	CNBR ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		Tiyopropil-Sepharose 6B

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Peroksidaz enzimi; hayvanlarda, at turpu, şalgam, ananas, brokoli, incir, baklagiller, karatırp, ıspanak ve patates gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Memelilerdeki peroksidaz enzimleri ise sütte, karaciğerde, dalakta, uterusu, tükruk bezlerinde, akciğer duvarlarında, sitoplazmada, mitokondride, mikrozom ile lizozomlarda lokalize olmuşlardır (Pütter and Becker 1987).

Yapılan çalışmalar sonucunda at turpu (HRP) peroksidazının üç boyutlu yapısı aydınlatılmıştır. At turpu peroksidazı 37 kDa ağırlığında olan ve 308 amino asit rezidüsü içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur (Welinder 1976). Saflaştırılan kaynağa bağılı olarak molekülün karbohidrat rezidü içeriğı %18-22 arasındadır. Üç boyutlu yapıya göre ferriprotoporfirin IX (hem grubu) ve iki kalsiyum atomu olmak üzere iki farklı tip metal merkez içerir. Bu iki merkez enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için önemlidir. İki kalsiyum atomu hem bölgesine distal ve proksimal pozisyonlarda olacak şekilde yerleşmiştir (Haschke and Friedhoff 1978). Üç boyutlu yapıda α -sarmal ve β -kırmalı yapılar bulunmaktadır. Ancak α -sarmal yapının daha hakim olduğu görülmektedir. X-Ray kristalografi yapısına (Şekil 2.1) göre hem grubu kırmızıyla, kalsiyum atomları maviyle, α -sarmal yapılar morla ve β -kırmalı yapı sarı renk ile gösterilmiştir (Veitch 2004).



Şekil 2.1. At turpu (HRP) peroksidazın X-ray kristalografi yapısı

1960’lardan beri peroksidaz enzimi ile ilgili farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırma çalışmaları yapılmaktadır. Afinite, iyon değişim, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi kullanılan saflaştırma metodlarından birkaç tanesidir (Singh and Singh 2002).

Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları kapsamında hem karaturp hemde diğer turp çeşitleri üzerinde birçok çalışma mevcuttur. Bu anlamda Türk karaturpundan (*Raphanus sativus* L.) peroksidaz enzimi (Şişecioğlu *et al.* 2010), kültürlenmiş karaturp (*Raphanus sativus* L.) köklerinden iki anyonik peroksidaz enzimi (Yazdi *et al.* 2000), karaturptan (*Raphanus sativus* L.) glutamik asit dekarboksilaz enzimi (De Frenne and Schneider 1970), turp (*Raphanus sativus* L.) köklerinden myrosinaz enzimi (Jwanny *et al.* 1995) ve japon turpu (*Raphanus sativus* L.) köklerinden askorbat peroksidaz enzimi (Ohya *et al.* 1997) saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

Literatürde karaturp (*Raphanus sativus* L.) ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Zilbeyaz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada karaturpun sulu ekstraktlarının kinetik rezolüsyon çalışmalarına etkisi araştırılmıştır (Zilbeyaz *et al.* 2012). *In vitro* ve *in vivo* deneysel koşullarda karaturpun (*Raphanus sativus* L.) sağlık için yararları incelenmiştir (Lugasi *et al.* 2003). Karaturpun (*Raphanus sativus* L.) verimi, kalitesi ve korunması üzerine bazı elementlerin etkisi araştırılmıştır (Koltunov 1986). Karaturp (*Raphanus sativus* L.) bitkisinin antimikrobial özellikleri belirlenmiştir (Negrash 1961). Doğal bal ile karaturp (*Raphanus sativus* L.) suyu karışımının kalay korozyonu üzerine etkisi araştırılmıştır (Radojcic *et al.* 2008). Başka bir çalışmada ise sıçanların kolon mukozası üzerine karaturpun (*Raphanus sativus* L.) etkisi incelenmiştir (Hagymasi *et al.* 2002). Yine sıçanlar üzerine yapılan başka bir çalışmada ise sıçan sindirim hiperlipidemileri üzerine karaturp (*Raphanus sativus* L.) suyunun antioksidan etkisi araştırılmıştır (Andrea *et al.* 2005).

Karaturpun (*Raphanus sativus* L.) dışında diğer turp çeşitleri ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilki, antioksidan enzimlerin turp (*Raphanus sativus* L.) dokularındaki kadmiyuma verdiği tepkilerin incelenmesidir (Vitoria *et al.* 2001). Çin turpunun (*Raphanus sativus* L.) besin kalitesi araştırılmıştır (Zhao-liang *et al.* 2008). Turp (*Raphanus sativus* L.) içindeki arsenatın alınımı, taşınımı ve dönüşümü araştırılmıştır (Smith *et al.* 2008). Başka bir çalışmada ise Avusturalya'da farklı sezonlar içinde yetiştirilen beyaz turpun (*Raphanus sativus* L.) keskinlik seviyeleri incelenmiştir (Coogan *et al.* 2001). Jing ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çin kırmızıturp (*Raphanus sativus* L.) köklerinde antosiyanin ve glukosinolat oluşumu araştırılmıştır (Jing *et al.* 2012). Diğer bir çalışmada ise İspanyol karaturpunun (*Raphanus sativus* L.) sulu ekstraktının detoksifikasyon özelliği incelenmiştir (Hanlon *et al.* 2009).

Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları kapsamında şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkisi üzerinde de birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda katyonik peroksidaz izoenzimleri (Hamed *et al.* 1998), lizozim enzimi (Bernier *et al.* 1971), sistin liyaz enzimi (Anderson and Thompson 1979), NAD-Glutamat dehidrogenaz enzimi

(Itagaki *et al.* 1988) ve F₁-ATPaz enzimi (O'Rourke and Wilson 1992) şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

Literatürde, karaturp (*Raphanus sativus* L.) gibi şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkisi üzerinde de enzim saflaştırması dışında birçok çalışma yapılmıştır. Şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidazlarının kimyasal bileşimi ve hidrodinamik özellikleri incelenmiştir (Mazza *et al.* 1973). Mısır şartlarında şalgamın (*Brassica rapa* L.) yetişmesi üzerine ozonun etkisi araştırılmıştır (Hassan *et al.* 1995). Şalgamın (*Brassica rapa* L.) klorofil biyosentezi ve genomik şablonunun stabilitesi üzerine kurşun kirliliğinin etkisi araştırılmıştır (Cenkci *et al.* 2010). Şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidazının immobilizasyonu için biyoafinite tabanlı ucuz ve yüksek verimli bir prosedür geliştirilmesi üzerine çalışma yapılmıştır (Kulshrestha and Husain 2006). İki anyonik şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidaz izoenziminin özellikleri araştırılmıştır (Agostini *et al.* 1997). Şalgam (*Brassica rapa* L.) köklerinden hazırlanan etanol ekstraktının farelerin glikoz ve lipit metabolizması üzerine etkisi araştırılmıştır (Jung *et al.* 2008). Şalgam (*Brassica rapa* L.) diyetinin kimyasal ve antioksidatif açıdan değerlendirilmesi üzerine çalışma yapılmıştır (Fernandes *et al.* 2007). Meng Hua ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise bir tetraploid şalgam (*Brassica rapa* L.) ve onun diploid progenitörünün, tuz stresine gösterdikleri uyum araştırılmıştır (Hua-bing *et al.* 2011).

POD enzimi birçok bitkiden saflaştırılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak karalâhanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tipawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), ıspanak yapraklarından (El Shamei 1987; Köksal 2012), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), arpadan (Kristensen 1999), ısırgan otundan (Gülçin 2002), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990), pamuktan (Triplett and Mellon 1992), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), bürüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987), domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), havuçtan (Nair *et al.* 1996), portakaldan (Clemente 1998), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002; Al-Senaidy 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), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), hindiba bitkisinden (Boeuf *et al.* 2000) ve papaya meyvesinden (Pandey *et al.* 2012) yapılan saflaştırma çalışmaları verilebilir.

Yapılan 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; at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008) ve domatesde (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, karalâhanada (Gülçin and Yıldırım 2005) 95 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44kDa, hurma yapraklarında (Al-Senaidy and Ismael 2011) 55 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak tespit edilmiştir. Bir diğer karakteristik özellik olan optimum pH değerlerinin ise 5,0-7,5 aralığında değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Tıpawan and Barrett 2005).

Peroksidaz enzimi birçok bitkide bulunmasına rağmen ticari olarak POD'un en önemli kaynağının at turpu kökleri olduğu bilinmektedir. Ayrıca farklı POD enzim türlerinin bulunması yeni analitik metotların ve potansiyel endüstriyel proseslerin ortaya çıkmasına öncülük etmiştir (Gülçin and Yıldırım 2005).

2.1. Çalışmanın Amacı

Peroksidaz enzimi üzerine birçok saflaştırma metodu bulunmaktadır. Ancak literatürde enzimin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması ile ilgili ayrıntılı bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk defa POD enzimini mevcut metotlara göre daha kısa sürede, daha az maliyetle ve daha yüksek bir verimle saflaştırılacak bir yöntem yani afinite tekniği bulunması çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Bu amaçla enzime ait daha önce bilinen inhibitörlerinden ligand olarak kullanılabilecekler için ön çalışmalar yapılarak afinite jeli hazırlanmıştır. Hazırlanan bu jeller kullanılarak farklı bitki dokularından POD enziminin saflaştırılması için denemeler yapılmıştır.

POD enziminin saflaştırılması için bulunacak bir afinite kromatografisi tekniğinin bu konuda çalışan araştırmacılara çok faydalı olacağı aynı zamanda diğer birçok peroksidaz enziminin saflaştırılmasına da ışık tutacağı kanaatindeyiz. Bu tez kapsamında;

- i. Peroksidaz enziminin daha önce bilinen inhibitörlerinden faydalanılarak ve sepharose 4B matriksi kullanılarak afinite jeli hazırlanmıştır.
- ii. Hazırlanan jeller kullanılarak peroksidaz enzimi saflaştırılmıştır.
- iii. Afinite ile saflaştırılan POD enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH, K_M ve V_{max} gibi kinetik parametreler çalışılmıştır.
- iv. Ligand olarak kullanılan inhibitör için kinetik parametreler belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalandım

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Sehoff pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic

Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturuu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
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_3 (pH:10) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanıldı): 2,1 g NaHCO_3 200 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 ml'ye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO_3 (pH:8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanıldı): 0,84 g NaHCO_3 80 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

3. 0,05 M Tris-SO₄ (pH:7,4) (4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanıldı): 1,211 g Tris 150 ml destile su içerisinde çözöldü. 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,3 M KH₂P0₄ (pH: 7,0) (Sıvı azot parçalamasından sonra bitki dokularının içine alındığı tampon): 4,08277 g KH₂P0₄, 80 ml destile suda çözöldü. 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 KH₂P0₄ (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon): 1,3609 g KH₂P0₄, 950 ml destile suda çözöldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 L tamamlandı.

2. 25 mM KH₂P0₄ (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonuna homojenatın tatbikinden sonra kolonu yıkamada kullanılan tampon): 1,3609 g KH₂P0₄ 350 ml destile suda çözöldü. 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 KH₂P0₄ (pH:6,8) (Peroksidaz enziminin elüe edilmesinde kullanılan tampon) 11,7 g NaCl ve 0,6805 g 180 ml destile suda çözöldü. 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 KH_2PO_4 (pH:6,0) (Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 1,3609 g KH_2PO_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 µl guaiakol alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
3. 22,5 mM H_2O_2 çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/ml olan H_2O_2 'den 228 µL alınarak destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler

1. 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 çözeltiye %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 mavisı 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-merkaptoetanol 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 kuvartz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbansları ölçüldü.

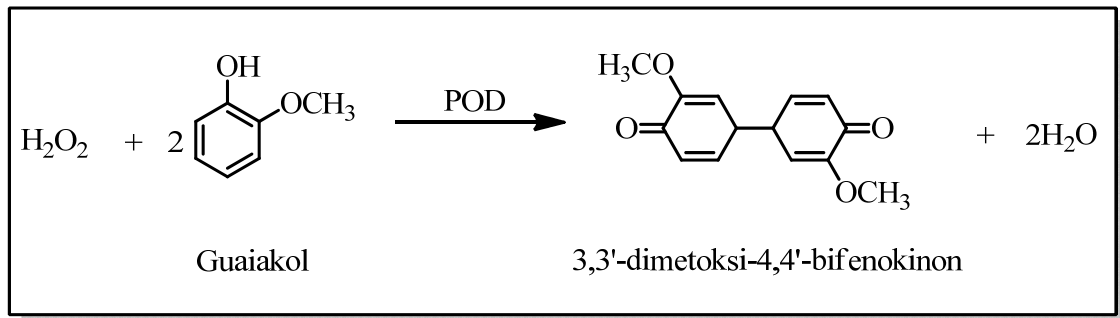
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

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 μ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullunıldı. Elde edilen

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

3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, 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 ($\mu\text{mol/ml}$)

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

D_f = Seyreltme katsayısı

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

Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak guaiakol kullanıldığından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi "20⁰C'de 1 dakikada 1 μmol guaiakol'ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı" olarak tanımlandı.

3.3. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve Şalgam (*Brassica rapa* L.) Bitkilerinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

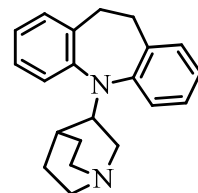
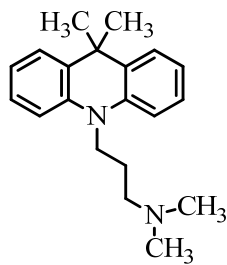
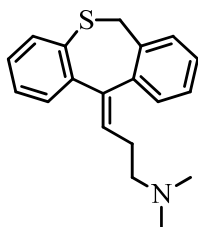
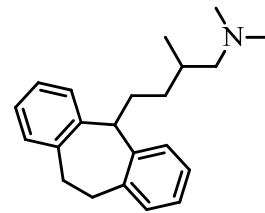
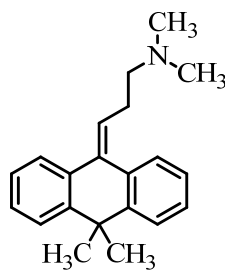
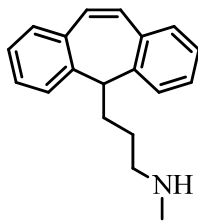
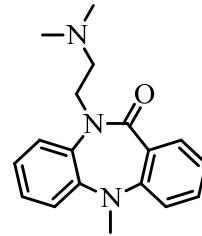
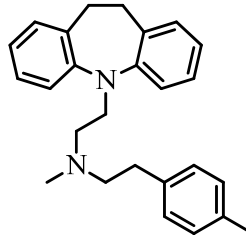
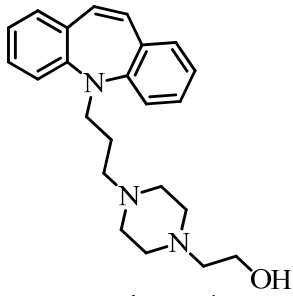
3.3.1. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) için homojenat hazırlanması

20 g taze karaturp (*Raphanus sativus* L.) 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. Şalgam (*Brassica rapa* L.) homojenatı için de aynı işlemler uygulandı.

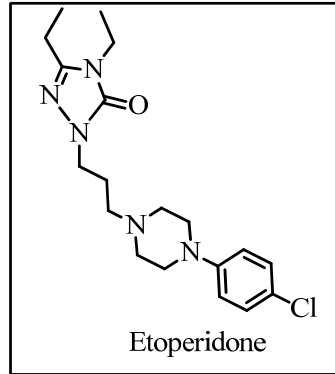
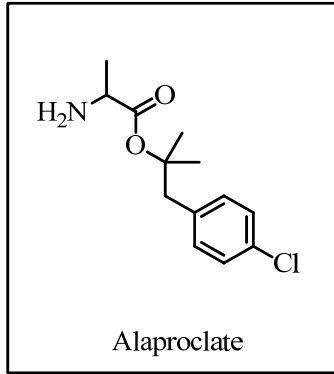
3.3.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi

Peroksidaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarından literatürdeki enzimin 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.

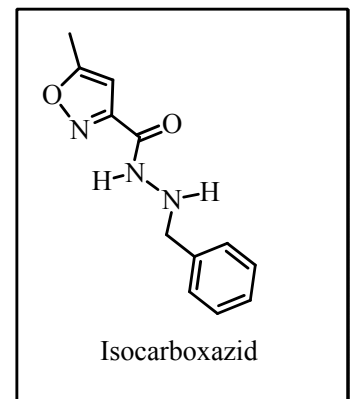
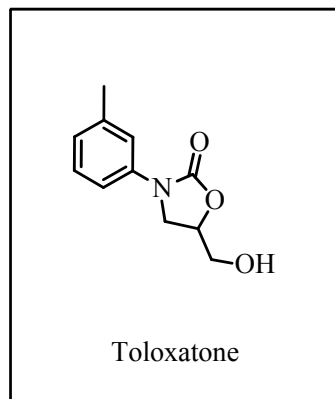
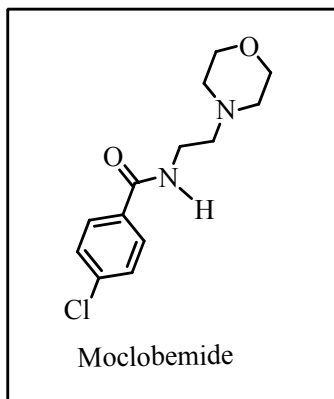
Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri



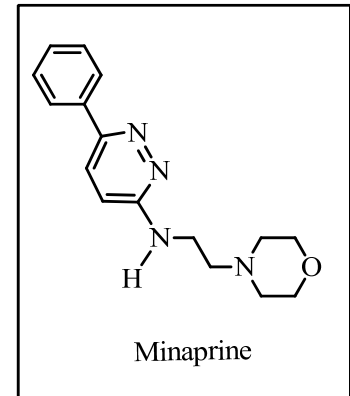
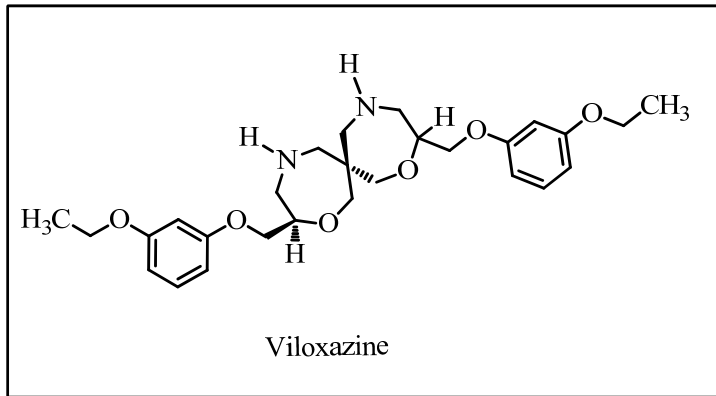
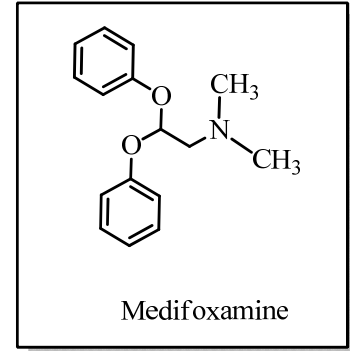
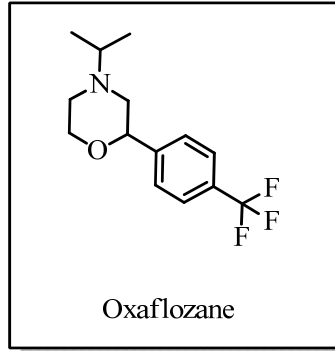
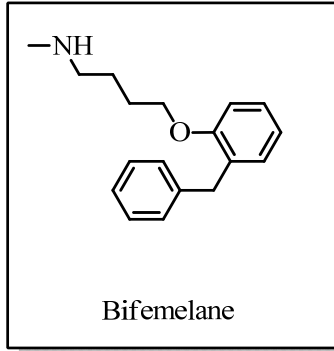
Seçici serotonin geri alım inhibitörleri



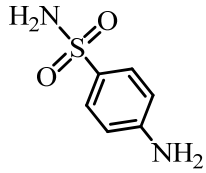
Seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri



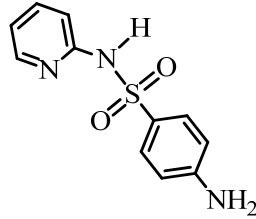
Antidepresanlar



Mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan inhibitörler

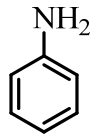


Sulphanylamide

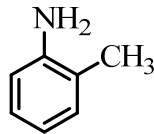
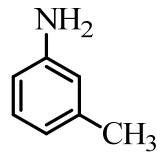
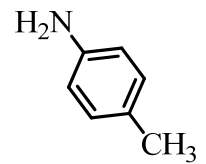
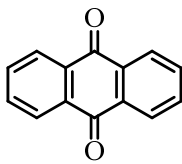


Sulphapyridine

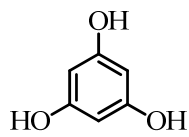
Bilinen diğer organik moleküller



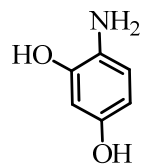
Aniline

*o*-Toluidine*m*-Toluidine*p*-Toluidine

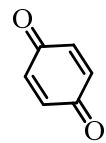
Anthracene-9,10-dione



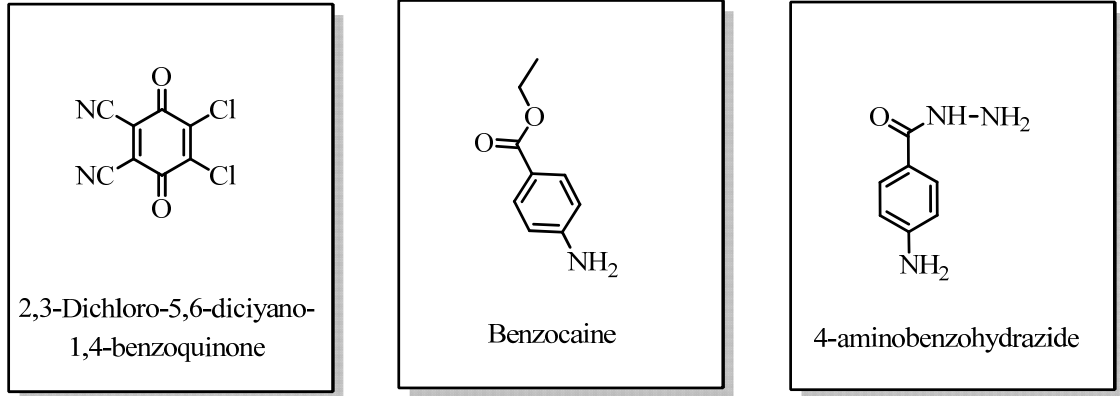
Floroglucinol



Resorsinol Aniline



Benzoquinone



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.

Bizde çalışmamızda 4-aminobenzohidrazit inhibitörünü afinite kolonunun ligandı olarak kullanmayı ve POD enzimini saflaştırmayı hedefledik.

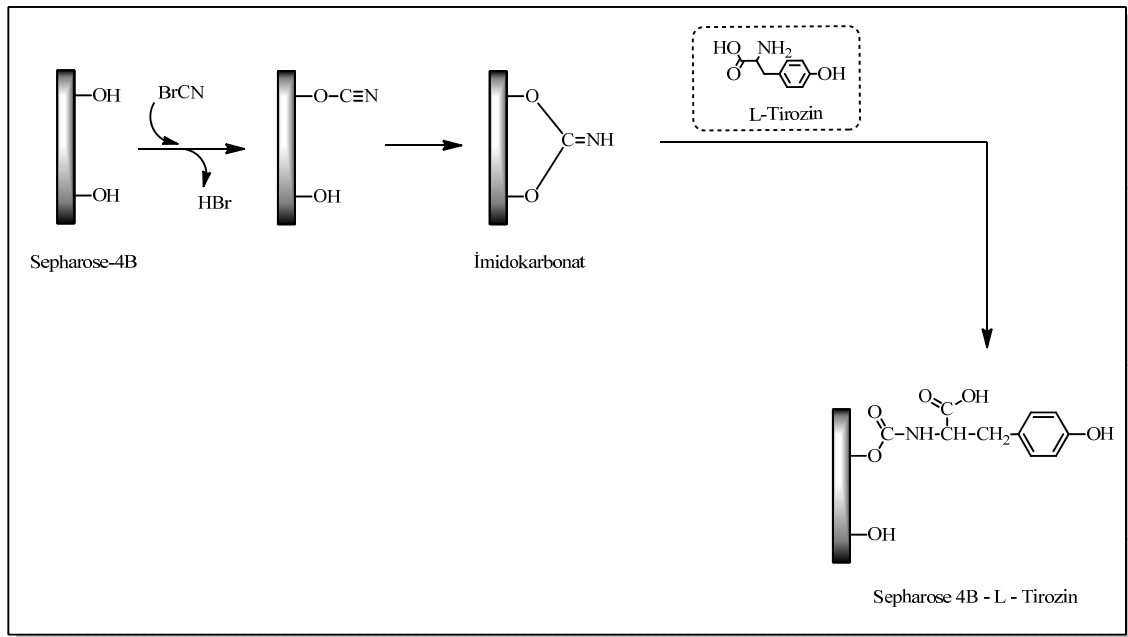
3.3.3. Afinite jelinin hazırlanması

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 NaHCO₃ 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 NaHCO₃ tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml’si içine alındı. (Şekil 3.2.)

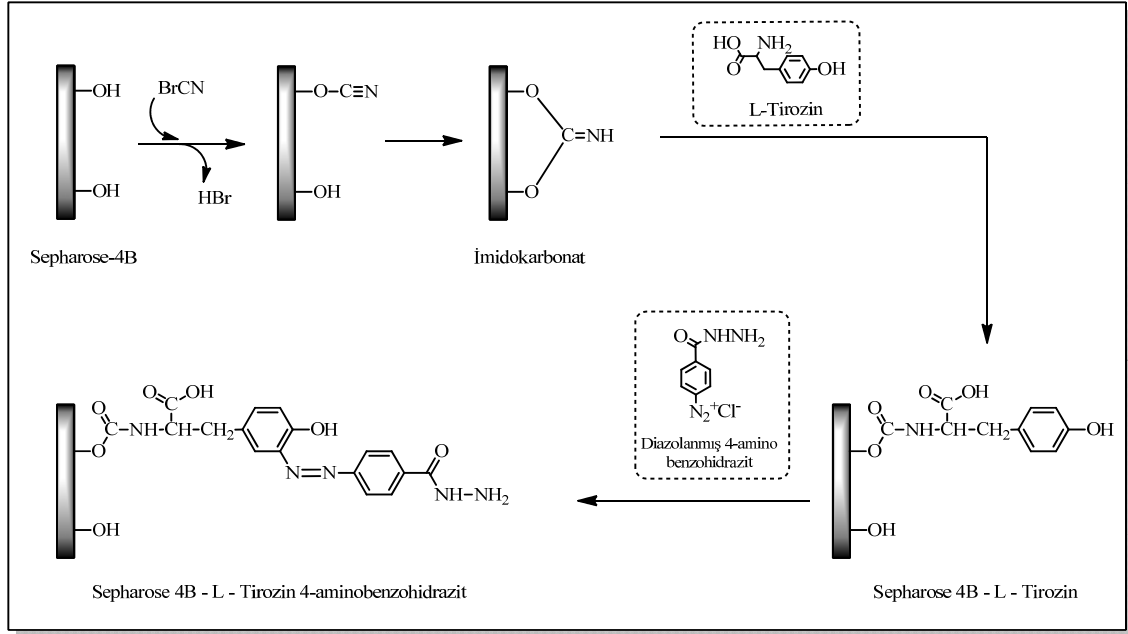


Şekil 3.2. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B’ye tirozin takılması

b. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirmesi:

İnhibitör’den 25 mg alınarak 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözöldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C’deki 5 ml çözölti, inhibitör çözöltisine 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-SO₄ (pH:7,4) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı

tampondan konularak saklandı (Whitney 1974). Hazırlanan jele bağlanma modeli Şekil 3.3 de verildi.



Şekil 3.3. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli

3.3.4. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (10 mM KH_2PO_4 pH: 6,8) içine alınarak jel süspanse edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm^2 'lik kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının 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 KH_2PO_4 pH:6,8 tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolon 25 mM KH_2PO_4 pH:6,8

  zeltisi ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM KH₂PO₄ pH:6,8 tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı ve el atlar 1,5'er ml halinde tüplere alındı. Her bir el atın 280 nm'deki absorbens değeri k re karşı ölçüldü.

3.3.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim sağlığının belirlenmesi

POD enzimi afinite kolonundan sağlaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak sağlaştırılan enzimlerin sağlık 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 kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine 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 (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

Yığma 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 yığma jeli hazırlandı. Daha sonra yığma

jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, 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 çözeltisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 ml gliserin ve 250 ml %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.4. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve Şalgam (*Brassica rapa* L.) Bitkilerinden 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 karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD için 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 mM'lık ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD için 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1500 mM'lık KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.4.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları

Peroksidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı 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°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 tesbit etmek için pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 10 mM KH_2PO_4 tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'sine 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. 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_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

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

3.4.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar

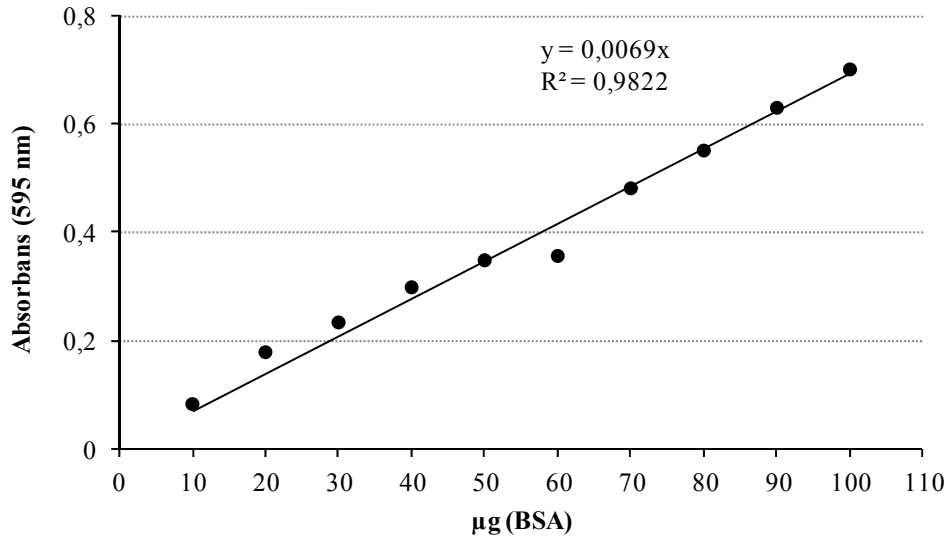
Ligand olarak kullanılan inhibitörün guaiakol substratına bağlı olarak, IC_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: oda sıcaklığında ve optimum pH'da, 45 mM guaiakol konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edilerek, % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi.

Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulundu.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden 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 μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4,1’de gösterildi.

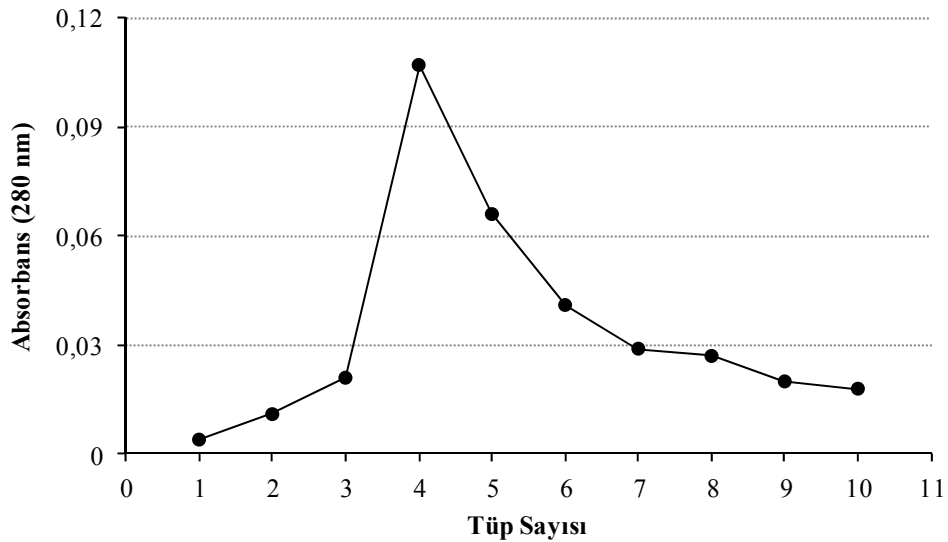


Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumini)

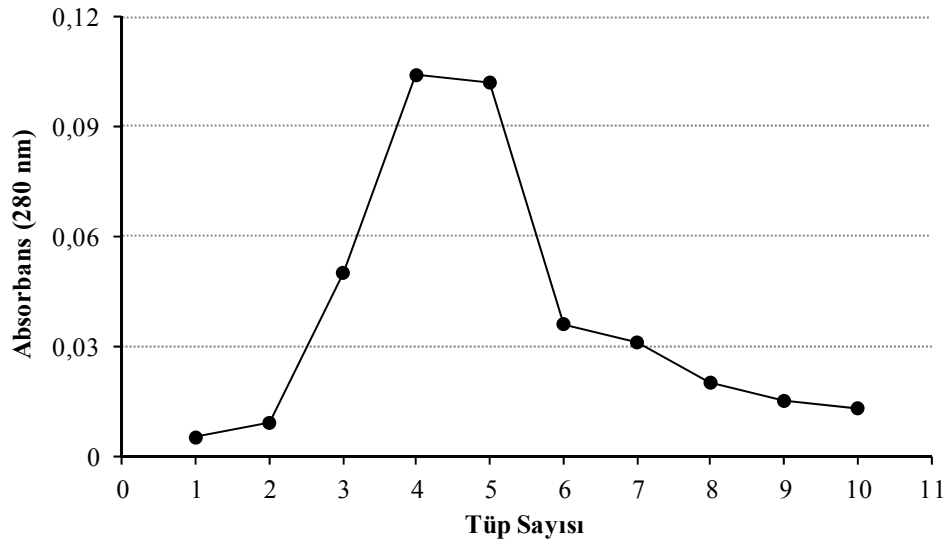
4.2. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve Şalgam (*Brassica rapa* L.) Bitkilerinden POD Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

4.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

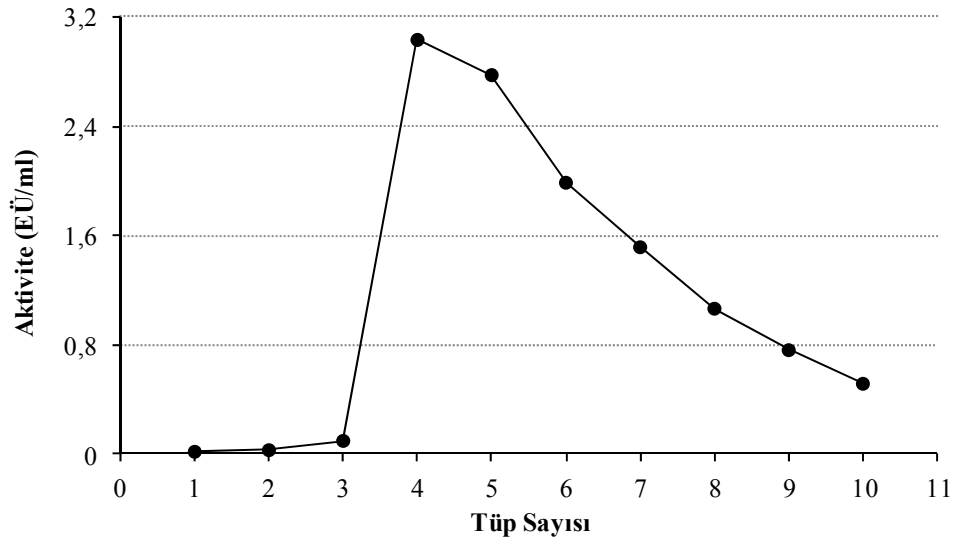
Bölüm 3.3.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 3.3.1’de belirtildiği gibi karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden hazırlanan homojenatlardan 5’er ml ayrı ayrı dengelenmiş kolona pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon 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 absorbens değerleri ölçülerek kalitatif protein tayinleri yapıldı. 280 nm’de ölçülen absorbens değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2, 4.3’te verildi. Absorbans gösteren tüplerin 470 nm’de aktivitelerine bakıldı. 470 nm’de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.4, 4.5’de gösterildi.



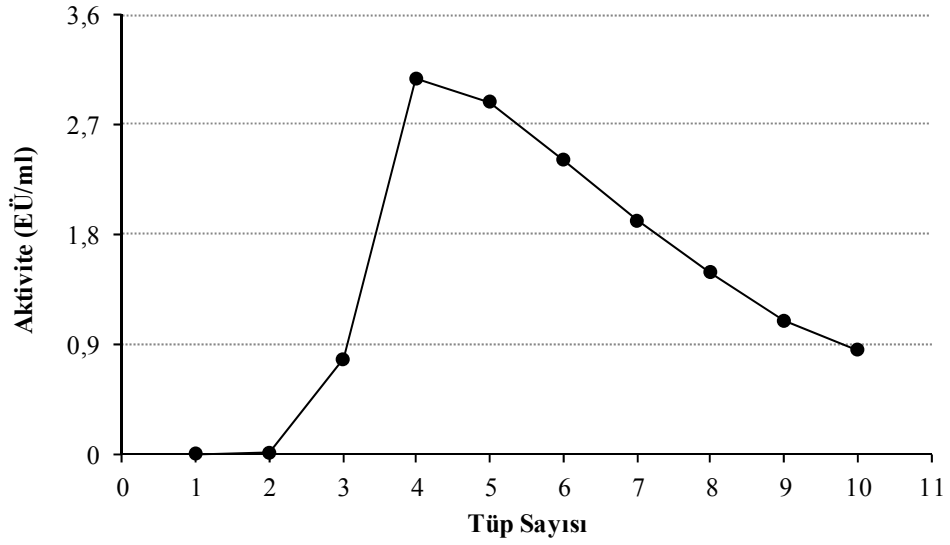
Şekil 4.2. 4-aminobenzohidrazit kolonundan karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm’deki absorbenslerini gösteren grafik



Şekil 4.3. 4-aminobenzohidrazit kolonundan şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm’deki absorbanslarını gösteren grafik



Şekil 4.4. 4-aminobenzohidrazit kolonundan karatürp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 470 nm’deki aktivitelerini gösteren grafik



Şekil 4.5. 4-aminobenzohidrazit kolunundan şalgam (*Brassica rapa* L.) 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 kolono pakatlendikten sonra 10 mM KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu ile dengelendi. 3.3.1'de belirtildiği gibi karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden hazırlanan homojenatlardan 5'er ml ayrı ayrı kolona tatbik edildi ve kolonlar 400 ml 25 mM KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi 1,5'er ml halinde elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı.

Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit kullanılan kolondan, karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. POD enziminin afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1, 4.2'de gösterildi.

Çizelge 4.1. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) 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	28,72	1,22	6,1	143,6	23,54	100	1
Sepharose 4B Afinite Kromatografisi	5	3,032	0,0033	0,016	15,16	947,5	10,6	40,3

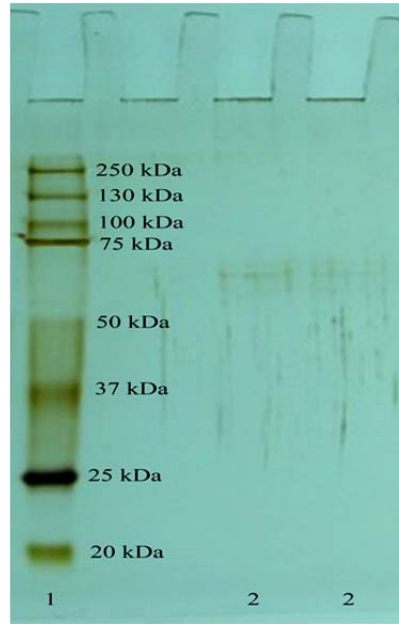
Çizelge 4.2. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

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	32,16	0,899	4,495	160,8	35,77	100	1
Sepharose 4B Afinite Kromatografisi	5	2,89	0,0003	0,0015	14,44	9626,67	9	269,13

4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

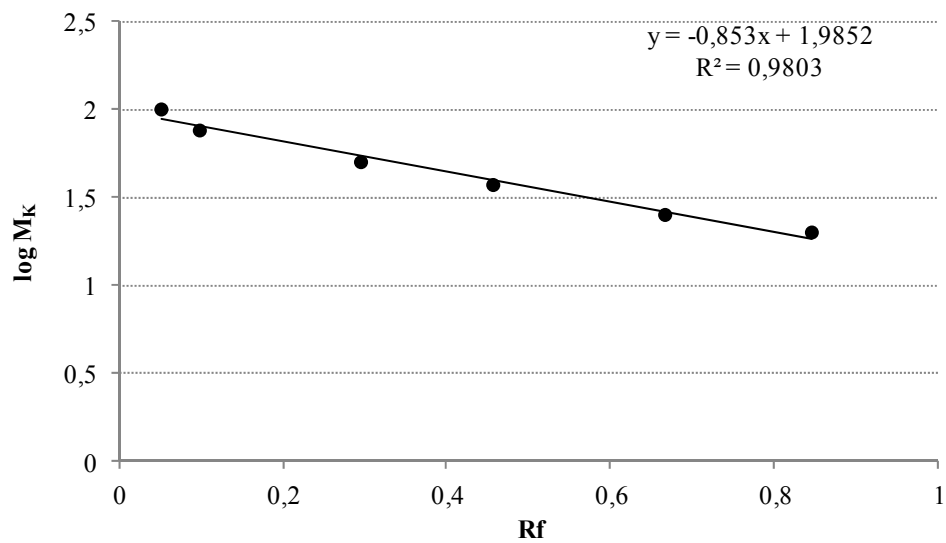
Kromatografik işlemler sonucu 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan peroksidaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütesini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için bölüm 3.3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforez kuyularına sırayla saflaştırılan POD’lar ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü. Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı

çekildi. Saflaştırılan POD enzimlerinin molekül kütleleri log M_K - R_f grafikleri çizilerek tespit edildi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9; Çizelge 4.3).

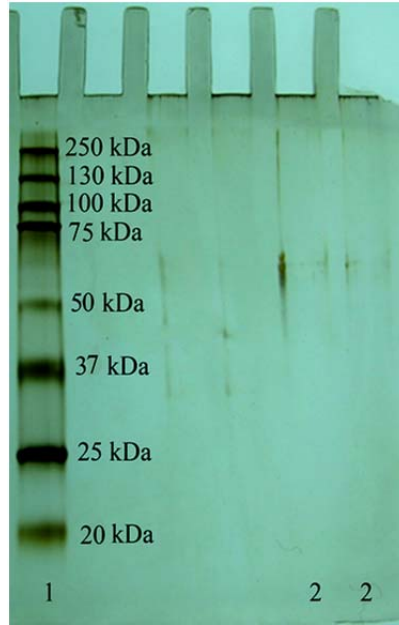


Şekil 4.6. 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

*(1 Nolu kuyu: Standart proteinler, 2 Nolu kuyular: Saflaştırılan karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD)

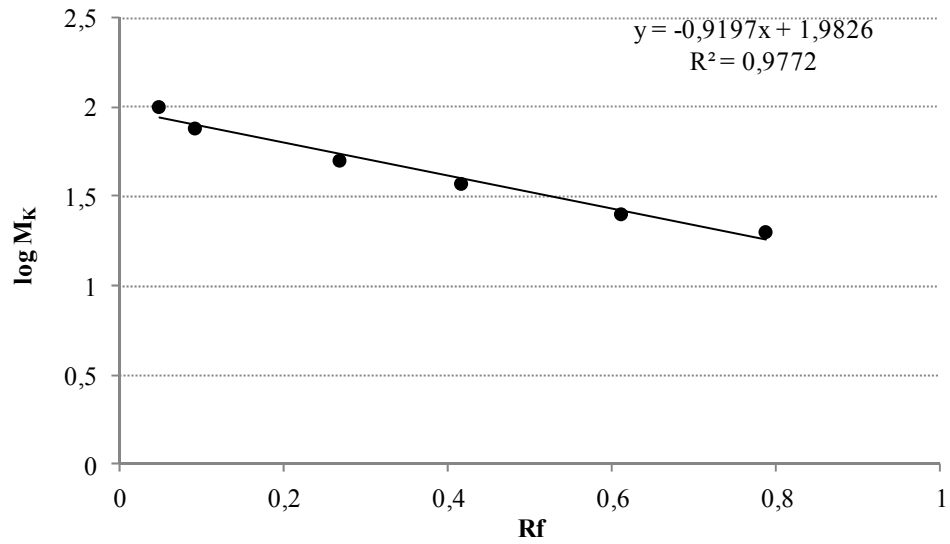


Şekil 4.7. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen R_f - $\log M_K$ grafiği



Şekil 4.8. 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

*(1 Nolu kuyu: Standart proteinler, 2 Nolu kuyular: Saflaştırılan şalgam (*Brassica rapa* L.) POD)



Şekil 4.9. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen R_f-log M_K grafiği

Çizelge 4.3. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimleri için SDS-PAGE ile molekül tayini sonuçları

Enzim	Bitki	Molekül Kütlesi
Peroksidaz POD	Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.)	67,3
	Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.)	65,8

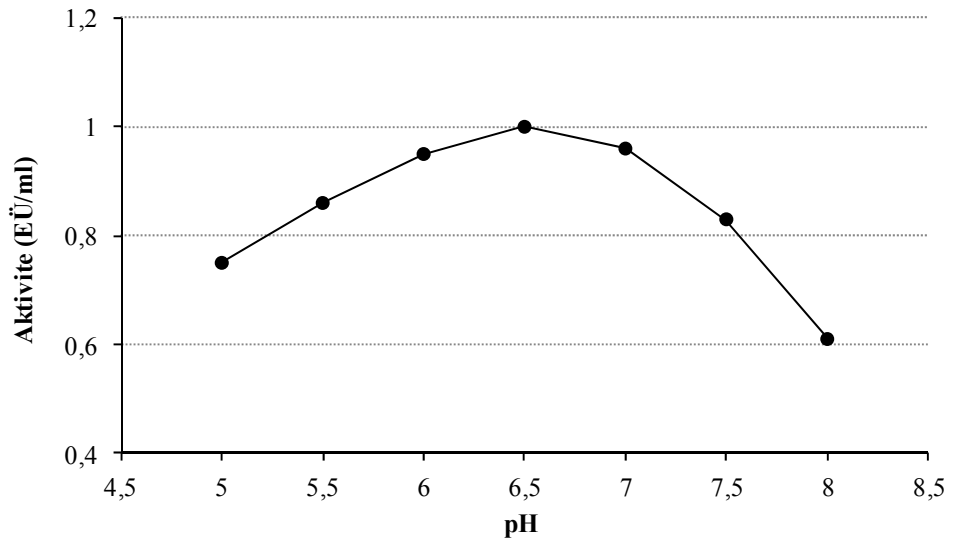
4.3. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve Şalgam (*Brassica rapa* L.) Bitkilerinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin optimum pH çalışması bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde; pH’sı 5,0-8,0 aralığında 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.4, 4.5; Şekil 4.10, 4.11). Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için optimum pH 0,1 M KH_2PO_4 pH=6,5 tamponu ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için optimum pH 0,1 M KH_2PO_4 pH=6,5 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

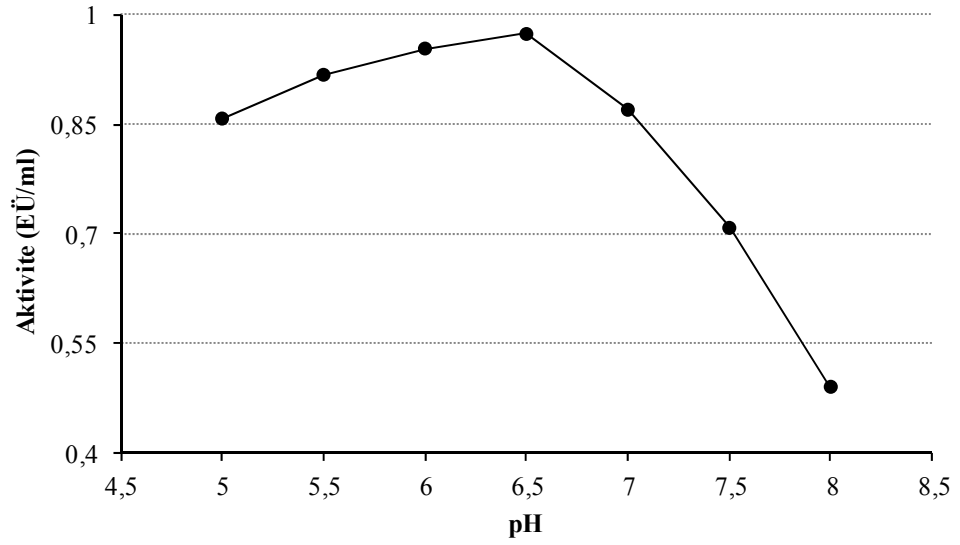
Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,75
5,5	0,86
6,0	0,95
6,5	1,00
7,0	0,96
7,5	0,83
8,0	0,61



Şekil 4.10. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği

Çizelge 4.5. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,858
5,5	0,918
6,0	0,954
6,5	0,974
7,0	0,870
7,5	0,708
8,0	0,490



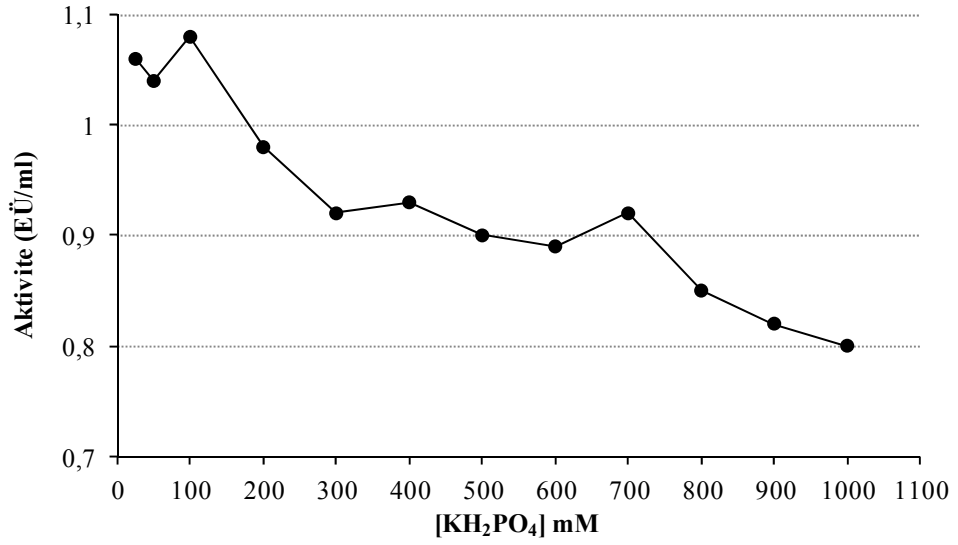
Şekil 4.11. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği

4.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla KH_2PO_4 tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 2.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar çizelge ve aktivite-konsantrasyon grafikleri halinde gösterildi (Çizelge 4.6, 4.7, Şekil 4.12, 4.13). Yapılan çalışmalar sonucu karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 0,1 M KH_2PO_4 (pH 6,5) tamponu ve şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 1 M KH_2PO_4 (pH 6,5) tamponu olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.6. Karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

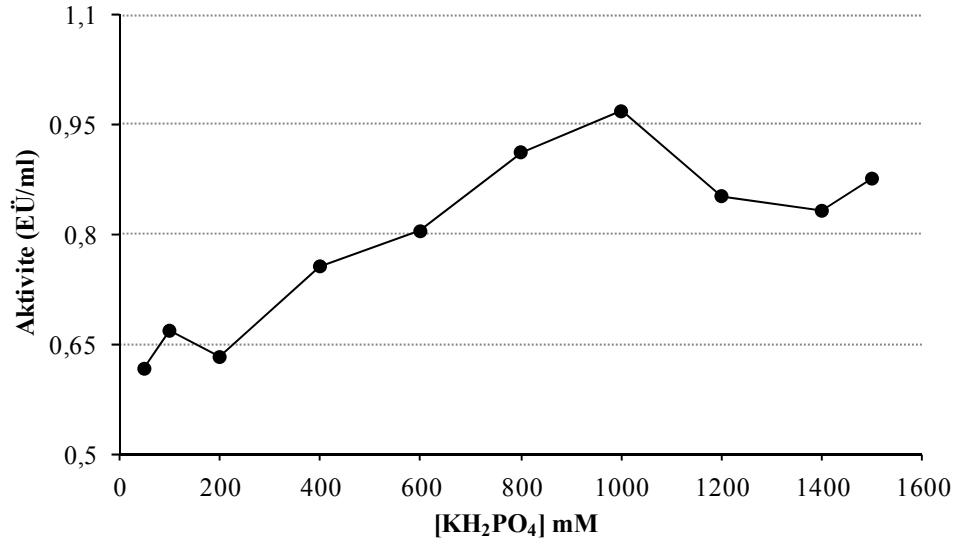
Potasyum Fosfat	
İyonik Şiddet (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
25	1,06
50	1,04
100	1,08
200	0,98
300	0,92
400	0,93
500	0,90
600	0,89
700	0,92
800	0,85
900	0,82
1000	0,80



Şekil 4.12. Değişik konsantrasyonlardaki KH₂PO₄ (pH 6,5) tampon çözeltileri kullanılarak karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-İyonik şiddet (mM) grafiği

Çizelge 4.7. Şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddeti için KH₂PO₄ (pH 6,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
İyonik Şiddet (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
50	0,616
100	0,668
200	0,632
400	0,756
600	0,804
800	0,912
1000	0,968
1200	0,852
1400	0,832
1500	0,876



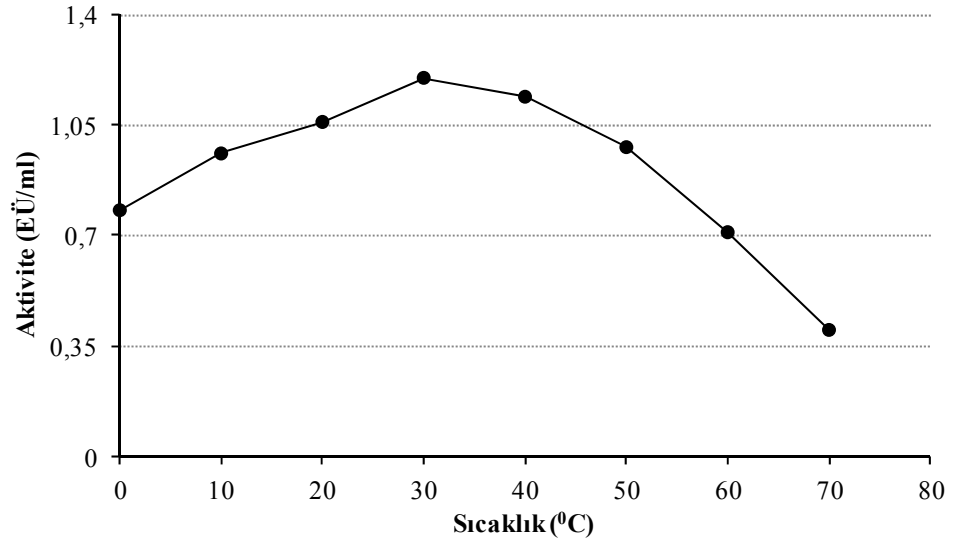
Şekil 4.13. Değişik konsantrasyonlardaki KH₂PO₄ (pH 6,5) tampon çözeltileri kullanılarak şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-İyonik şiddet (mM) grafiği

4.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum sıcaklığını belirlemek üzere karaturp (*Raphanus sativus* L.) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 0,1 M KH₂PO₄ (pH 6,5) tamponu ve şalgam (*Brassica rapa* L.) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 1 M KH₂PO₄ (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 4.8, 4,9’da ve Şekil 4.14, 4.15’de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu hem karaturp (*Raphanus sativus* L.) hemde şalgam (*Brassica rapa* L.) POD için optimum sıcaklık 30°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.8. Karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

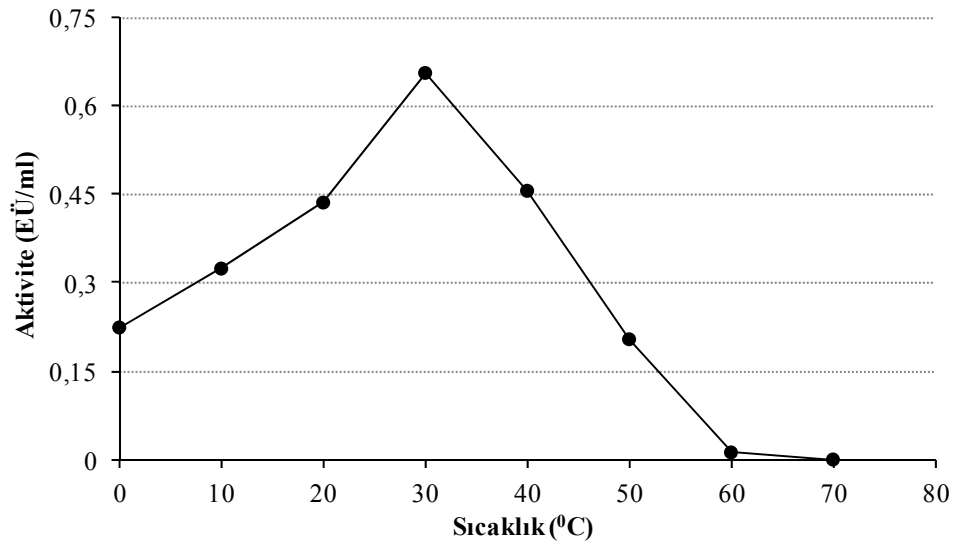
Potasyum Fosfat	
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,78
10	0,96
20	1,06
30	1,20
40	1,14
50	0,98
60	0,71
70	0,40



Şekil 4.14. Karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/ml)-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) grafiği

Çizelge 4.9. Şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,224
10	0,324
20	0,436
30	0,656
40	0,456
50	0,204
60	0,012
70	0,000



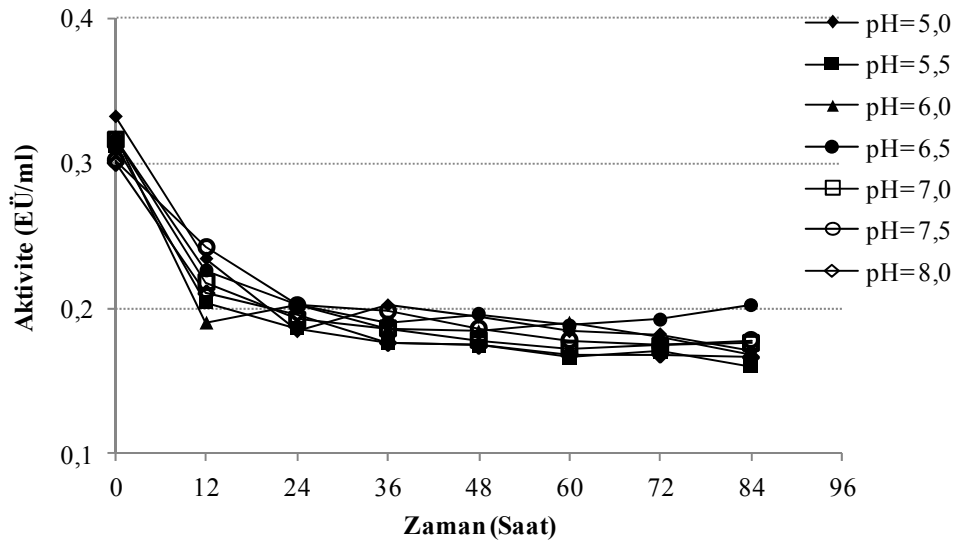
Şekil 4.15. Şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/ml)-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) grafiği

4.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin stabil pH'ları bölüm 3.4.4'te anlatıldığı şekilde; pH'ları 5,0-8,0 aralığında 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak hazırlanan enzim stoklarının gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.10, 4.11; Şekil 4.16, 4.17). Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için stabil pH, 10 mM KH_2PO_4 tamponunda pH: 6,5 ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için stabil pH, 10 mM KH_2PO_4 tamponunda pH: 5,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.10. Karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

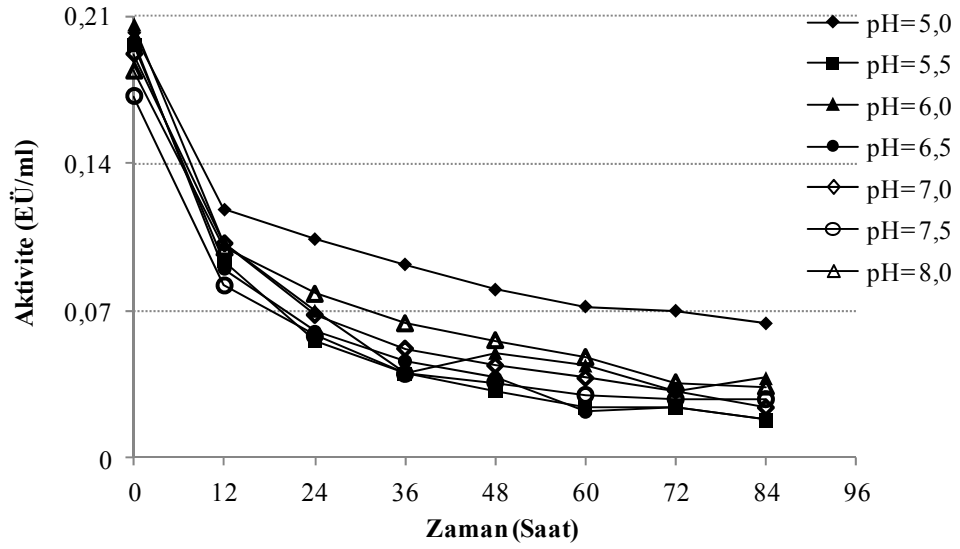
Potasyum Fosfat							
Zaman (Saat)	pH:5,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:5,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH:6,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:6,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH:7,0 Aktivite (EÜ/ml)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/ml)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/ml)
0	0,332	0,312	0,318	0,316	0,316	0,302	0,300
12	0,234	0,204	0,190	0,226	0,218	0,242	0,210
24	0,184	0,186	0,202	0,202	0,192	0,202	0,196
36	0,202	0,176	0,186	0,190	0,186	0,198	0,176
48	0,194	0,174	0,184	0,196	0,178	0,186	0,174
60	0,184	0,166	0,190	0,188	0,172	0,178	0,168
72	0,182	0,170	0,180	0,192	0,174	0,184	0,168
84	0,170	0,160	0,168	0,202	0,176	0,178	0,166



Şekil 4.16. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

Çizelge 4.11. Şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sı için 10 mM KH_2PO_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	0,202	0,196	0,206	0,198	0,192	0,172	0,184
12	0,118	0,094	0,102	0,090	0,102	0,082	0,100
24	0,104	0,056	0,070	0,060	0,068	0,058	0,078
36	0,092	0,040	0,040	0,046	0,052	0,040	0,064
48	0,080	0,032	0,050	0,038	0,044	0,036	0,056
60	0,072	0,024	0,044	0,022	0,038	0,030	0,048
72	0,070	0,024	0,032	0,024	0,032	0,028	0,036
84	0,064	0,018	0,038	0,018	0,024	0,028	0,034



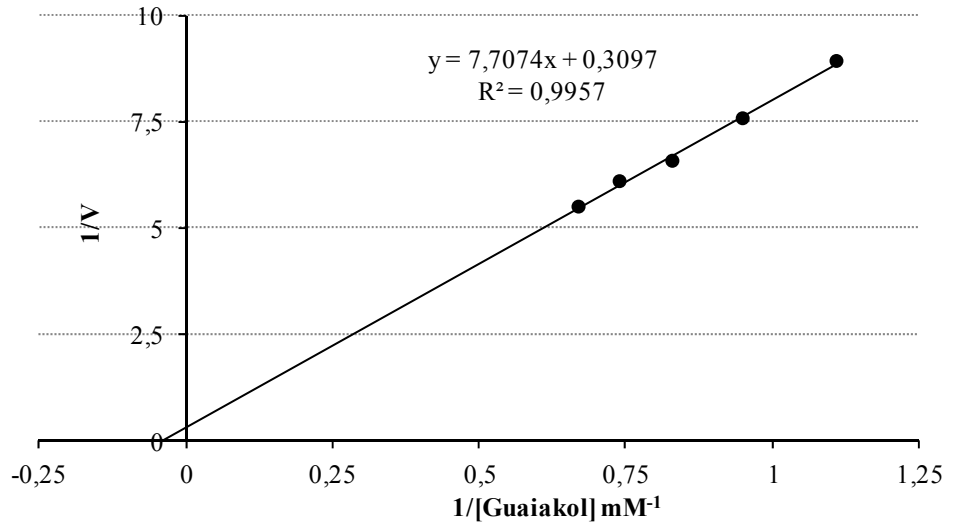
Şekil 4.17. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

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

Guaiakol substratı için karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden 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 4.12, 4.13 ve Şekil 4.18, 4.19'da görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda guaiakol için K_M değeri karaturpta (*Raphanus sativus* L.) 24,88 mM ve şalgamda (*Brassica rapa* L.) 4,09 mM bulunurken V_{max} ise karaturpta (*Raphanus sativus* L.) 3,23 EÜ/ml ve şalgamda (*Brassica rapa* L.) 0,797 EÜ/ml olarak tespit edildi.

Çizelge 4.12. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

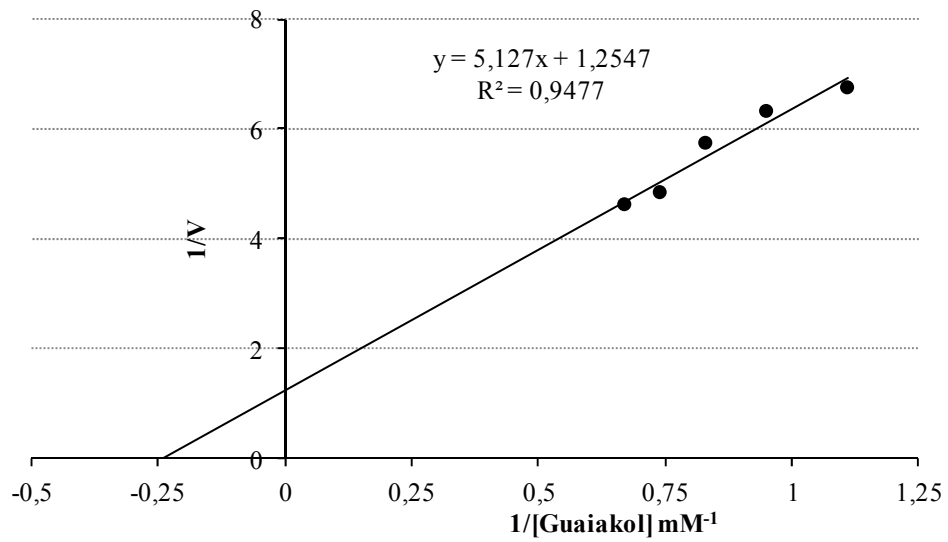
[Guaiakol] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
0,90	0,11
1,05	0,13
1,20	0,15
1,35	0,16
1,50	0,18



Şekil 4.18. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin guaiakol için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiğı

Çizelge 4.13. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

[Guaiakol] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
0,90	0,148
1,05	0,158
1,20	0,174
1,35	0,206
1,50	0,216



Şekil 4.19. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin guaiakol için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiğı

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

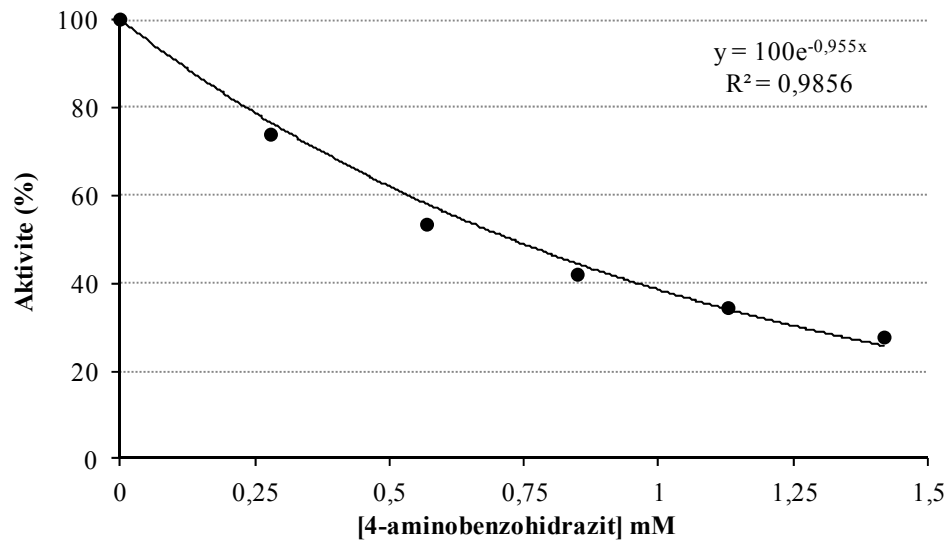
Bu çalışmada 4-aminobenzohidrazit inhibitörü saf suda çözülerek karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimi üzerine guaiakol substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda guaiakol (45 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.14, 4.15, 4.16, 4.17’de gösterildi ve % Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.20, 4.21’de gösterildi. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,726 mM ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için IC_{50} değeri 1,167 olarak tespit edildi.

Çizelge 4.14. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) 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	0,42	100
0,28	0,31	73,8
0,57	0,22	53,3
0,85	0,18	41,9
1,13	0,14	34,3
1,42	0,12	27,6

Çizelge 4.15. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü					
Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	POD (ml)
0,45	1,00	1,00	0,550	0,000	0,45	1,00	1,00	0,450	0,000	0,10
0,45	1,00	1,00	0,525	0,025	0,45	1,00	1,00	0,425	0,025	0,10
0,45	1,00	1,00	0,500	0,050	0,45	1,00	1,00	0,400	0,050	0,10
0,45	1,00	1,00	0,475	0,075	0,45	1,00	1,00	0,375	0,075	0,10
0,45	1,00	1,00	0,450	0,100	0,45	1,00	1,00	0,350	0,100	0,10
0,45	1,00	1,00	0,425	0,125	0,45	1,00	1,00	0,325	0,125	0,10



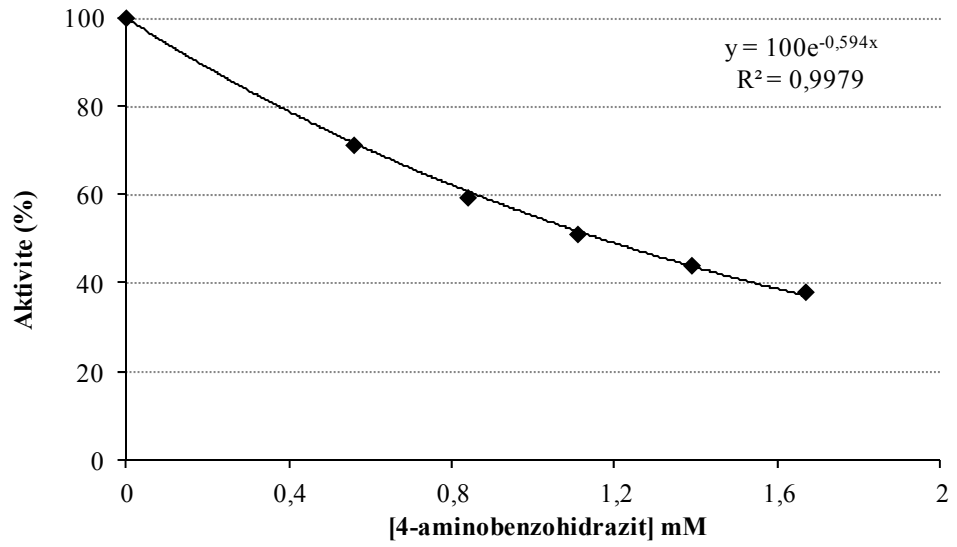
Şekil 4.20. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği

Çizelge 4.16. Şalgam (*Brassica rapa* L.) 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	1,012	100
0,56	0,720	71,2
0,84	0,600	59,3
1,11	0,516	51
1,39	0,444	43,9
1,67	0,384	37,9

Çizelge 4.17. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü					
Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	POD (ml)
0,45	1,00	1,00	0,550	0,000	0,45	1,00	1,00	0,500	0,000	0,05
0,45	1,00	1,00	0,500	0,050	0,45	1,00	1,00	0,450	0,050	0,05
0,45	1,00	1,00	0,475	0,075	0,45	1,00	1,00	0,425	0,075	0,05
0,45	1,00	1,00	0,450	0,100	0,45	1,00	1,00	0,400	0,100	0,05
0,45	1,00	1,00	0,425	0,125	0,45	1,00	1,00	0,375	0,125	0,05
0,45	1,00	1,00	0,400	0,150	0,45	1,00	1,00	0,350	0,150	0,05



Şekil 4.21. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi aktivitesi için 5 farklı 4-aminobenzohidrazit inhibitörü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği

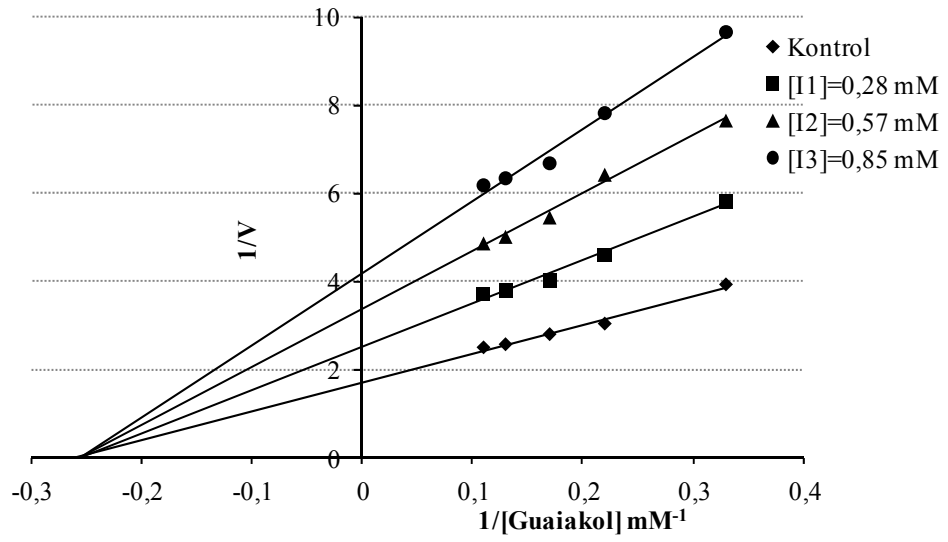
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.18, 4.19, 4.20, 4.21’de gösterildi. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.22, 4.23’te gösterildi. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için K_i sabiti $0,5947 \pm 0,0122$ mM inhibisyon tipi yarışmasız ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için K_i sabiti $1,1033 \pm 0,1016$ mM inhibisyon tipi ise yarışmasız olarak tespit edildi.

Çizelge 4.18. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) 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	0,260
	4,5	0,330
	6,0	0,360
	7,5	0,390
	9,0	0,400
0,28	3,0	0,170
	4,5	0,220
	6,0	0,250
	7,5	0,260
	9,0	0,270
0,57	3,0	0,130
	4,5	0,160
	6,0	0,180
	7,5	0,200
	9,0	0,210
0,85	3,0	0,110
	4,5	0,130
	6,0	0,150
	7,5	0,160
	9,0	0,162

Çizelge 4.19. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) 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 ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	POD (ml)
0,45	0,20	1,00	1,350	0,000	0,45	0,20	1,00	1,250	0,000	0,10
0,45	0,30	1,00	1,250	0,000	0,45	0,30	1,00	1,150	0,000	0,10
0,45	0,40	1,00	1,150	0,000	0,45	0,40	1,00	1,050	0,000	0,10
0,45	0,50	1,00	1,050	0,000	0,45	0,50	1,00	0,950	0,000	0,10
0,45	0,60	1,00	0,950	0,000	0,45	0,60	1,00	0,850	0,000	0,10
0,45	0,20	1,00	1,325	0,025	0,45	0,20	1,00	1,225	0,025	0,10
0,45	0,30	1,00	1,225	0,025	0,45	0,30	1,00	1,125	0,025	0,10
0,45	0,40	1,00	1,125	0,025	0,45	0,40	1,00	1,025	0,025	0,10
0,45	0,50	1,00	1,025	0,025	0,45	0,50	1,00	0,925	0,025	0,10
0,45	0,60	1,00	0,925	0,025	0,45	0,60	1,00	0,825	0,025	0,10
0,45	0,20	1,00	1,300	0,050	0,45	0,20	1,00	1,200	0,050	0,10
0,45	0,30	1,00	1,200	0,050	0,45	0,30	1,00	1,100	0,050	0,10
0,45	0,40	1,00	1,100	0,050	0,45	0,40	1,00	1,000	0,050	0,10
0,45	0,50	1,00	1,000	0,050	0,45	0,50	1,00	0,900	0,050	0,10
0,45	0,60	1,00	0,900	0,050	0,45	0,60	1,00	0,800	0,050	0,10
0,45	0,20	1,00	1,275	0,075	0,45	0,20	1,00	1,175	0,075	0,10
0,45	0,30	1,00	1,175	0,075	0,45	0,30	1,00	1,075	0,075	0,10
0,45	0,40	1,00	1,075	0,075	0,45	0,40	1,00	0,975	0,075	0,10
0,45	0,50	1,00	0,975	0,075	0,45	0,50	1,00	0,875	0,075	0,10
0,45	0,60	1,00	0,875	0,075	0,45	0,60	1,00	0,775	0,075	0,10



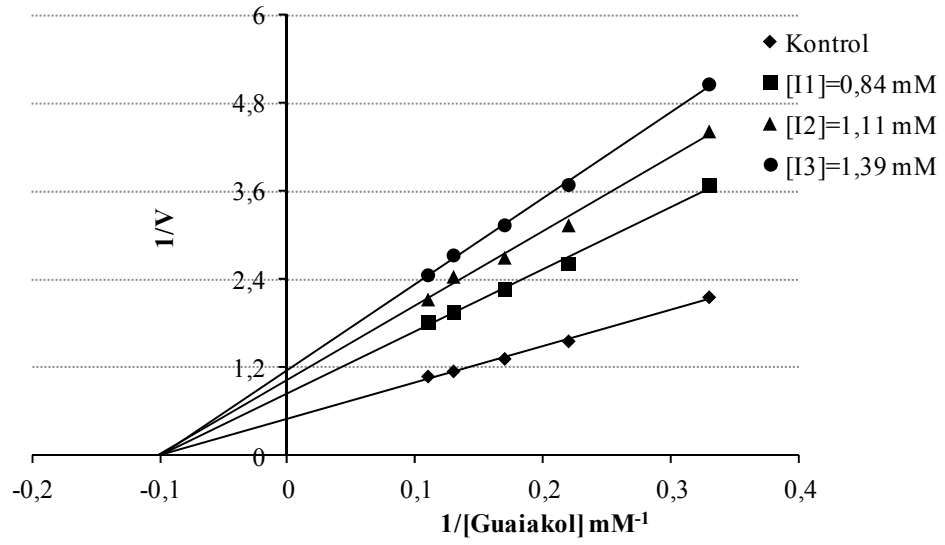
Şekil 4.22. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik

Çizelge 4.20. Şalgam (*Brassica rapa* L.) 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	0,468
	4,5	0,644
	6,0	0,764
	7,5	0,876
	9,0	0,936
0,84	3,0	0,264
	4,5	0,384
	6,0	0,444
	7,5	0,516
	9,0	0,552
1,11	3,0	0,232
	4,5	0,320
	6,0	0,372
	7,5	0,412
	9,0	0,472
1,39	3,0	0,196
	4,5	0,272
	6,0	0,320
	7,5	0,368
	9,0	0,408

Çizelge 4.21. Şalgam (*Brassica rapa* L.) 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 ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	Fosfat tamponu (ml)	Guaiakol (ml)	H ₂ O ₂ (ml)	Saf su (ml)	İnhibitör (ml)	POD (ml)
0,45	0,20	1,00	1,350	0,000	0,45	0,20	1,00	1,300	0,000	0,05
0,45	0,30	1,00	1,250	0,000	0,45	0,30	1,00	1,200	0,000	0,05
0,45	0,40	1,00	1,150	0,000	0,45	0,40	1,00	1,100	0,000	0,05
0,45	0,50	1,00	1,050	0,000	0,45	0,50	1,00	1,000	0,000	0,05
0,45	0,60	1,00	0,950	0,000	0,45	0,60	1,00	0,900	0,000	0,05
0,45	0,20	1,00	1,275	0,075	0,45	0,20	1,00	1,225	0,075	0,05
0,45	0,30	1,00	1,175	0,075	0,45	0,30	1,00	1,125	0,075	0,05
0,45	0,40	1,00	1,075	0,075	0,45	0,40	1,00	1,025	0,075	0,05
0,45	0,50	1,00	0,975	0,075	0,45	0,50	1,00	0,925	0,075	0,05
0,45	0,60	1,00	0,875	0,075	0,45	0,60	1,00	0,825	0,075	0,05
0,45	0,20	1,00	1,250	0,100	0,45	0,20	1,00	1,200	0,100	0,05
0,45	0,30	1,00	1,150	0,100	0,45	0,30	1,00	1,100	0,100	0,05
0,45	0,40	1,00	1,050	0,100	0,45	0,40	1,00	1,000	0,100	0,05
0,45	0,50	1,00	0,950	0,100	0,45	0,50	1,00	0,900	0,100	0,05
0,45	0,60	1,00	0,850	0,100	0,45	0,60	1,00	0,800	0,100	0,05
0,45	0,20	1,00	1,225	0,125	0,45	0,20	1,00	1,175	0,125	0,05
0,45	0,30	1,00	1,125	0,125	0,45	0,30	1,00	1,075	0,125	0,05
0,45	0,40	1,00	1,025	0,125	0,45	0,40	1,00	0,975	0,125	0,05
0,45	0,50	1,00	0,925	0,125	0,45	0,50	1,00	0,875	0,125	0,05
0,45	0,60	1,00	0,825	0,125	0,45	0,60	1,00	0,775	0,125	0,05



Şekil 4.23. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik

Çizelge 4.22. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları

Bitki	IC ₅₀ (mM)	[İnhibitör] (mM)	K _i değeri (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon tipi
Karaturp (<i>Raphanus sativus</i> L.)	0,726	0,28	0,608	0,5947±0,0122	Yarışmasız
		0,57	0,592		
		0,85	0,584		
Şalgam (<i>Brassica rapa</i> L.)	1,167	0,84	1,220	1,1033±0,1016	Yarışmasız
		1,11	1,056		
		1,39	1,034		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidaz (POD) enzimi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden bir glikoproteindir (Rompel *et al.* 2007). Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak, metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'yi etkisiz hale getirmektedir (Robert *et al.* 1993). Bitki peroksidazları hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) ve lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi hayati fonksiyonlarda çok önemli görevler aldığı bilinmektedir. Ayrıca POD organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonunda kullanılmaktadır (Adam *et al.* 1999). Peroksidaz enzimi yüksek hassasiyeti sayesinde klinik tanı ve mikروanalitik uygulamalar için oldukça önemli bir ayıraç olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda POD kimya, ilaç ve gıda sanayilerinin yeni uygulamalarında tercih edilmektedir (Kwak *et al.* 1996).

Afinite kromatografisi, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir teknik olarak bilinmektedir. Bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Spesifik ligand esasına dayanan bu yöntem proteinlerin saflaştırılması için kullanılmaktadır. Günümüzde diğer tekniklerle saflaştırılması bir çok basamak isteyen, daha fazla zaman gerektiren hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyal, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta çok kompleks karışımlardan saflaştırılmıştır. Genelde kolon dolgu maddesi olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Matrikse bağlanan ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekmektedir. Bazı durumlarda matriks ile ligand arasına, istenmeyen etkileşimleri ortadan kaldırmak için uzantı kolları sokulur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bu çalışmada özellikle bitkilerin yapraklarında, yaralanan gövdelerinde, çiçek ve saplarında, nükleus, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunan

peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. POD enziminin saflaştırılması üzerine literatürde birçok kromatografik metot bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler hem zaman açısından uzun sürmekte hemde maliyeti açısından bizim bulduğumuz yöntemle göre daha maliyetlidir (Özdemir *et al.* 2001).

Afinite kromatografisi çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları ortadan kaldırmak ve enzimi yüksek bir verimle izole etmek için saflaştırma işlemlerinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu sebeple karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden POD enzimlerinin saflaştırılması için ilk kez afinite jeli hazırlandı. Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit'in bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan enzimlerin kinetik özellikleri, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi ve kullanılan ligandın kinetik özellikleri belirlendi. Elde edilen değerleri tartışmadan önce araştırmada kullanılan metotları kısaca izah edelim.

Çalışmalarımız esnasında hazırlanan afinite kolonundan elde edilen karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) elüatlarının 280 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Bu sayede toplanan fraksiyonlara kalitatif protein tayini yapılmış oldu. Bu metot protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

Kantitatif protein tayinleri Bradford metoduna göre yapıldı. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidaz enzim çözeltileri ve homojenatlardaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin protein üzerindeki pozitif yüke bağlanması sonucu oluşan renkli kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı, bozucu etkilere karşı daha az hassas olması ve reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir olmasıdır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir

ve protein boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalabilmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidazlarının aktivitesi, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, H₂O₂ tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve yükseltgenme sonucu oluşan 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinon renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbands 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 ($E_{470nm}=5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi, 20⁰C’de 1 dakikada 1µmol guaiakol’ün yükseltgenmesini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

4-aminobenzohidrazit’in POD inhibitörü olduğu literatür’de biliniyordu (Kettle *et al.* 1997), fakat bu inhibitörün detaylı kinetik özellikleri hakkında bir çalışmaya rastlanmadı. 4-aminobenzohidrazit gibi inhibitörler yapılarında benzen halkasına bağlı serbest -NH₂ bulundurur. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile afinite jeli hazırlayarak karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin saflaştırılması bu kolonda yapıldı. Bu jelin sentezlendiği, 4-aminobenzohidrazit’in diazonyum tuzu oluşturarak uzantı koluna bağlanması sonucu jelin renklenmesinden anlaşılmaktadır. Zaten diazonyum tuzu oluşturabilen bileşiklerin renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir.

Hazırlanan afinite kolonuna karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) numunelerinin tatbiki için homojenatlar hazırlandı. Homojenat hazırlanırken hücreleri parçalamak için dondurma çözme tekniği kullanıldı. Bu teknik en etkili hücre parçalama tekniğidir ayrıca biyomoleküllerin bozulmaması için de düşük sıcaklık sağlamaktadır.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) homojenatları hazırlandıktan sonra bu homejenatlar ayrı ayrı 4-aminobenzohidrazit kolonundan geçirilmiş ve saflaştırılan POD enziminin kolona tutunarak diğer tüm kirliliklerin yıkama tamponu ile uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş POD enzimleri elüe edilmiştir. Elüe edilen tüm fraksiyonlara aktivite tayini ve kantitatif protein tayini yapılmıştır. Bulunan sonuçlar neticesinde hesaplamalar yapılarak karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimleri için saflaştırma tabloları çizilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2). Çizilen saflaştırma tablolarına göre tek kromatografik işlemle POD enzimi karaturptan (*Raphanus sativus* L.) 947,5 (EÜ/mg) ve %10,6 verimle 40,3 kat, şalgamdan (*Brassica rapa* L.) ise 9626,67 (EÜ/mg) ve %9 verimle 269,13 kat saflaştırılmıştır. Pandey ve arkadaşları papayadan (*Carica papaya*) POD enzimini üç kromatografik adımda 68,59 (EÜ/mg) ve %44,37 verimle 30,22 kat saflaştırmıştır (Pandey *et al.* 2012). Al-Senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 906,2 (EÜ/mg) ve %5,8 verimle 17 kat saflaştırmıştır (Al-Senaidy and Ismael 2011). Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından POD enzimini iki kromatografik adımda 96,4 (EÜ/mg) ve %4,2 verimle 22,6 kat saflaştırmıştır (Köksal 2011). Lavery ve arkadaşları at turpundan (*Armoracia rusticana*) POD enzimini iki kromatografik adımda 772,25 (EÜ/mg) ve %71,3 verimle 291 kat saflaştırmıştır (Lavery *et al.* 2010). Ajila ve Prasada Rao siyah gram kabuğundan (*Vigna mungo*) POD enzimini iki kromatografik adımda 1215291 (EÜ/mg) ve %44 verimle 44 kat saflaştırmıştır (Ajila and Prasada Rao 2009). Marquez ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden POD enzimini iki kromatografik adımda 1563,5 (EÜ/mg) ve %19 verimle 21 kat saflaştırmıştır (Marquez *et al.* 2008). Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) ve %0,2 verimle 19,33 kat saflaştırmıştır (Köksal and Gülçin 2008). Rudrappa ve arkadaşları kırmızı pancardan (*Beta vulgaris* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 10500 (EÜ/mg) ve %84,6 verimle 15 kat saflaştırmıştır (Rudrappa *et al.* 2007). Mdluli marula meyvesinden (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*) POD enzimini üç kromatografik adımda 361,469 (EÜ/mg) ve %1,3 verimle 19 kat saflaştırmıştır (Mdluli 2005). Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) ve %33 verimle 33,5 kat saflaştırmıştır (Gülçin

and Yıldırım 2005). Literatüre bakıldığında POD enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik adımların en az iki tanesi kullanılmıştır. Buda POD enziminin saflaştırma prosedürünün gerçekten çok uzun ve oldukça maliyetli olduğunu gösterir. Yapmış olduğumuz çalışmaların sonuçlarını literatürdeki çalışmalarla karşılaştırdığımızda daha kısa sürede ve daha az masrafla yüksek verimler elde ettiğimizi görmekteyiz.

Saflaştırılan karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidaz enzimlerinin saflıklarının kontrolü için ve molekül ağırlıklarının tespiti için bölüm 3.3.6'da anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yapıldı. Yapılan SDS-PAGE sonucunda karaturptan (*Raphanus sativus* L.) ve şalgamdan (*Brassica rapa* L.) izole edilen peroksidaz enzimlerinin saf olduğu belirlendi (Şekil 4.6, 4.7). Aynı ayrı elde edilen tek bantların molekül ağırlıkları çizilen R_F -log M_K grafiklerinden bulundu (Şekil 4.8, 4.9, Çizelge 4.3). Çizilen grafiklere göre karaturptan (*Raphanus sativus* L.) saflaştırılan POD enziminin mol kütlesi 67,3 kDa ve şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılan POD enziminin mol kütlesi 65,8 kDa olarak bulundu. Literatürde yapılan saflaştırma çalışmaları neticesinde peroksidaz enzimi için birçok izoenzim yapısı bulunmuştur. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen bu izoenzimlerin; molekül kütleleri SDS-PAGE metoduyla; at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008) ve domateste (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, kırmızı pancarda (Rudrappa *et al.* 2007) 45 kDa, karalâhanada (Gülçin and Yıldırım 2005) 95 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44kDa, siyah gram kabuğunda (Ajila and Prasada Rao 2009) 38 kDa, hurma yapraklarında (Al-Senaidy and Ismael 2011) 55 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak tespit edilmiştir. İzole edilen peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıkları 35-95 kDa arasında saflaştırılan kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimleri için bulduğumuz molekül ağırlıkları literatürle uyum içindedir.

Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra enzimler için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimleri için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH değerleri belirlendi.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 5,0-8,0 aralığında 0,1 M'lık KH_2PO_4 tamponlarında enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin her ikisi içinde optimum pH değeri 0,1 M'lık KH_2PO_4 tamponunda 6,5 olduğu tespit edildi. Köksal ve Gülçin karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum pH'yı fosfat tamponunda 5,0 olarak bulmuşlardır (Köksal and Gülçin 2008). Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) elden edilen peroksidazın optimum pH'sını Tris/HCl tamponunda 7,5 olarak bulmuşlardır (Gülçin and Yıldırım 2005). Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum pH değerini fosfat tamponunda 5,2 olarak bulmuştur (Köksal 2011). Lavery ve arkadaşları başka bir çalışmada at turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazının optimum pH'sını fosfat tamponunda 7,0 olarak tespit etmişlerdir (Lavery *et al.* 2010). Kumar ve arkadaşlarının karayip bitkisi (*Euphorbia cotinifolia*) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH fosfat tamponunda 7,0 olarak bulmuşlardır (Kumar *et al.* 2011). Peroksidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda genellikle optimum pH değeri 5,0-7,5 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bizim bulduğumuz optimum pH değerleri literatürde bulunan değerlerle uyum içindedir. Hem bizim bulduğumuz hemde literatürde bulunan optimum pH değerleri gösteriyor ki peroksidaz enzimi asidik bir pH'da daha aktiftir.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin optimum iyonik şiddetlerini belirlemek için 0,025 ile 1,0 M arasında, şalgam (*Brassica rapa* L.) için ise 0,05 ile 1,5 M arasında daha önce belirlenen optimum pH'da fosfat tamponu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de görüldüğü gibi optimum iyonik şiddet karaturp

(*Raphanus sativus* L.) POD için 0,1 M, şalgam (*Brassica rapa* L.) POD için ise 1,0 M bulunmuştur. Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum iyonik şiddetini 0,075 M olarak bulmuştur (Köksal *et al.* 2008). Köksal ve Gülçin karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum iyonik şiddeti 1,0 M olarak tespit etmişlerdir (Köksal and Gülçin 2008). Karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD için bulunun optimum iyonik şiddet değeri ıspanak (*Spinacia oleracea*) POD ile uyum içindeyken şalgam (*Brassica rapa* L.) POD ise karnabahar (*Brassica oleracea* L.) POD enzim ile uyum içindedir.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum sıcaklığını belirlemede optimum pH ve optimum iyonik şiddette 10'ar $^{\circ}\text{C}$ artışla 0-80 $^{\circ}\text{C}$ aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin her ikisi içinde optimum sıcaklık 30 $^{\circ}\text{C}$ olarak bulundu (Şekil 4.14, 4.15). Marquez ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 16 $^{\circ}\text{C}$ (Marquez *et al.* 2008), Al-senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 55 $^{\circ}\text{C}$ (Al-senaidy and Ismael 2011), Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 40 $^{\circ}\text{C}$ (Gülçin and Yıldırım 2005), Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 30 $^{\circ}\text{C}$ (Köksal and Gülçin 2008), Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 60 $^{\circ}\text{C}$ (Köksal 2011), Kumar ve arkadaşları karayip bitkisinden (*Euphorbia cotinifolia*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 50 $^{\circ}\text{C}$ (Kumar *et al.* 2011) olarak bulmuşlardır. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin optimum sıcaklıklarının karnabahar (*Brassica oleracea* L.) POD enziminin optimum sıcaklığı ile uyum göstermektedir.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin stabil oldukları pH'lar bulunurken pH'sı 5,0-8,0 aralığında olan 10 mM'lık fosfat tamponları kullanıldı. Bu tamponlarda hazırlanan enzim stoklarının 12 saat arayla 84 saat boyunca

aktivite ölçümleri yapılarak enzimlerin stabil oldukları pH'lar tespit edildi. Yapılan ölçümler neticesinde karaturp (*Raphanus sativus* L.) peroksidazı için stabil pH 6,5 bulunurken (Şekil 4.16), şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidazı için ise stabil pH değeri 5,0 bulunmuştur (Şekil 4.17). Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin stabil pH değerini 5,5 bulmuştur (Köksal 2011). Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sını 8,5 olarak tespit etmişlerdir (Köksal and Gülçin 2008). Başka bir çalışmada ise Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin stabil olduğu değeri 6,5 olarak bulmuşlardır (Gülçin and Yıldırım 2005). Literatürdeki bu çalışmalara bakıldığında sadece karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi karalâhana (*Brassica oleracea*) POD enzimi ile uyum içindedir. Şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi ise literatürden farklıdır.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin 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. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) peroksidazı için K_M değeri 24,88 mM ve V_{max} değeri 3,23 EÜ/ml.dk olarak, şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidazı için ise K_M değeri 4,09 ve V_{max} değeri 0,797 EÜ/ml.dk olarak tespit edildi. Marquez ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin K_M değerini 3.8 mmol olarak bulmuşlardır (Marquez *et al.* 2008). Deepa ve Arumughan palmya yapraklarından saflaştırılan POD enziminin K_M değerini 3,96 mM olarak bulmuşlardır (Deepa and Arumughan 2002). 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 (*Armoracia rusticana*) POD enziminin K_M değerini 0,5 mM olarak bulmuşlardır (Lavery *et al.* 2010). Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin K_M değerini 5,5 mM olarak bulmuşlardır (Gülçin and Yıldırım 2005). Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* 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 (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin K_M değerini 17,35 mM ve V_{max} değerini 1234 EÜ/ml.dk olarak bulmuştur (Köksal 2011). Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin K_M değerleri literatürde bulunan değerlere yakın olduğu görülmektedir. Ancak V_{max} değerleri literatürden oldukça farklıdır. K_M değeri enzim substrat kompleksinin sağlamlığının bir ölçüsüdür. K_M değerinin yüksek olması ES kompleksinin bağlanmasının zayıf olduğunu yani enzimin substrata ilgisinin az olduğunu gösterir. Yapmış olduğumuz çalışmalarda bulunan K_M değerlerine bakıldığında şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enziminin karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimine göre guaiakol substratına olan ilgisinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimleri üzerine ligand olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit inhibitörü için detaylı kinetik çalışma yapıldı. Her bir enzim için guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, guaiakol (45 mM) reaksiyon ortamına 5 farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite ölçüm yapıldı. Bulunan bu değerlerle % Aktivite- konsantrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.20, 4.21). Çizilen bu grafiklerden karaturp (*Raphanus sativus* L.) POD enzimi için IC_{50} değeri 0,726 mM olarak bulunmuşken şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimi için IC_{50} değeri 1,167 mM bulunmuştur.

IC_{50} değerleri bulunduktan sonra karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) bitkilerinden saflaştırılan POD enzimleriyle ayrı ayrı 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 4.21, 4.22). Çizilen bu grafiklerden karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) POD enzimlerinin inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) peroksidazın K_i sabiti $0,5947 \pm 0,0122$ mM, inhibisyon tipi yarışmasız, şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidazın K_i sabiti $1,1033 \pm 0,1016$ mM, inhibisyon tipi ise yarışmasız olarak bulunmuştur. Böylece

saflaştırmada kullanılan 4-aminobenzohidrazit ligandının detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilke bu tez kapsamında tespit edilmiş oldu.

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

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

Sonuç Olarak;

1. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidaz enzimlerinin mevcut yöntemler haricinde Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit jeli ile saflaştırılması ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirildi.
2. POD enziminin literatürde mevcut saflaştırma yöntemlerine üstünlüğü ortaya konularak hazırlanan kolonun çok uzun süre kullanılabildiği ve daha ekonomik olduğu tespit edildi.

3. Afinite ile saflaştırılan karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidaz enzimleri için ayrı ayrı optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH, K_M ve V_{max} gibi kinetik parametreler tespit edildi.
4. Bu çalışmada ligand olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit için detaylı kinetik parametreler K_i , IC_{50} ve inhibisyon tipleri karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgam (*Brassica rapa* L.) peroksidaz enzimlerinin her biri için ilk defa bulundu.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., 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., 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., 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-short time processing of vegetables. *Journal Food Technology*, 13, 281-297.
- Agostini, E., Medina, M. I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H., 1997. properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598.
- Ajila, C.M., 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., 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., Shaheen, O., 1987. Changes in glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology*, 34, 1-8.
- Anderson, N.W., Thompson, J.F., 1979. Cystine lyase: β -cystathionase from turnip roots. *Phytochemistry*, 18 (152), 1953-1958.
- Andrea, L., Anna, B., Krisztina, B., Ibolya, K., Agnes, K., 2005. Antioxidant effect of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) in alimentary hyperlipidaemia in rats. *Phytotherapy Research*, 19 (7), 587-591.
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214(5095), 1302-1304.
- Axen, R., Ernback, S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Bast, A., Haenen, G.R.M., Doelman, J.A., 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am.J. Med.* 91, 2-13.
- Bernier, I., Leemputten, E.V., Horisberger, M., Bush, D.A., Jolles, P., 1971. The turnip lysozyme. *Febs Letters*, 14 (2).
- Bingöl, G., 1983. Biyokimya. Güven Matbaası, 169-174, Ankara.
- Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240, 500-508.

- Boeuf, G., Bauw, G., Legrand, B., Rambour, S., 2000. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 217-224.
- Bradford, M.M., 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.
- Cenkci, S., Ciğerci, İ.H., Yıldız, M., Özay, C., Bozdağ, A., Terzi, H., 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in (*Brassica rapa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 67, 467-473.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa.
- Chu, Y.F., 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., 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.
- Coogan, R.C., Wills, R.B.H., Nguyen, V.Q., 2001. Pungency levels of white radish (*Raphanus sativus* L.) grown indifferent seasons in Australia. *Food Chemistry*, 72, 1-3.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Cuatrecasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography - derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059-3065.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419.
- De Frenne, E., Schneider, F., 1970. Glutamic acid decarboxylase from black radish. *Naturwissenschaften*, 57 (10), 498-499.
- Deby, C., 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., Arumugan 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., 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., 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.
- Fernandes, F., Valentao, P., Sousa, C., Pereira, J.A., Seabra, R. M., Andrade, P.B., 2007. Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.). *Food Chemistry*, 105, 1003–1010.
- 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., 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., McCay, P.B., 1985. GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: Properties of apotent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids*, 20 (10), 704-711.
- Gilbert, H.F., 1992. Basic concepts in biochemistry. Mc Graw-Hill Inc. Germany, 81.
- Goodwin, W.J., Lane, H.W., Bradford, K., Marshall, M.V., Griffin, A.C., Geopfert, H., 1983. Selenium and glutathione peroxidase levels in patients with epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Cancer*, 51, 110-115.
- Göçer, H., Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 821-825
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal antioksidanlar. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23, 85-89.
- 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, Erzurum.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 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 Technologies*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., Yıldırım, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica 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.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed., Clarendon Press, , 530-533, Oxford.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science*, 54, 644.
- Hamed, R.R., Maharem, T.M., Fatah, M.M.A., Ataya, F.S., 1997. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. *Phytochemistry*, 48 (8), 1291-1294.
- Hanlon, P. R., Robbins, M.G., Hammon, L.D., Barnes, D.M., 2009. Aqueous extract from the vegetative portion of Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzyme expression in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 356-365.
- Haschke, R.H., Friedhoff, J.M., 1978. Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 80, 1039–1042.
- Hassan, I.A., Ashmore, M.R., Bell, J.N.B, 1995. Effect of ozone on radish and turnip under Egyptian field conditions. *Environmental Pollution*, 89 (1), 107-114.
- Hiraga, S., Sasaki, K., 2001. A large family of class-III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 42, 462-468.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III olant peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, 42 (5), 462-468.
- Hua-bing, M., Si-si, J., Shui-jin, H., Xian-yong, L., Yuan-long, L., Wan-li, G., Li-xi, J., 2011. Comparison between a tetraploid turnip and its diploid progenitor (*Brassica rapa* L.): The adaptation to salinity stress. *Agricultural Sciences in China*, 10 (3), 363-375.
- Hussein, L., Arafah, A., 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.
- Itagaki, T., Dry, L.B., Wiskich, J.T., 1988. Purification and properties of NAD-glutamate dehydrogenase from turnip mitochondria. *Phytochemistry*, 27 (11), 3373-3378.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63.
- Jing, P., Zhao, S.J., Si-Yu Ruan, S.Y., Xie, Z.H., Dong, Y., Yu, L., 2012. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chemistry*, 133, 1569-1576.
- Jung, U.J., Baek, N., Chung, H., Bang, M., Jeong, T., Lee, K.T., Kang, Y., Lee, M., Kim, H., Yeo, J., Choi, M., 2008. Effects of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice. *Clinical Nutrition*, 27, 158-167.
- Jwanny, E.W., El-Sayed, S.T., Rashad, M.M., Mahmoud, A.E., Abdallah, N.M., 1995. Myrosinase from roots of *Raphanus sativus*. *Phytochemistry*, 39 (6), 1301-1303.
- Kampis, A., Bartuczakovacs, O., Hoschke, A., Aosvgyazo, V., 1984. Changes in peroxidasesactivity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Keha, E., 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.

- Kehre, J.P., Smith J.V., 1994. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; in Frei B(ed): natural antioxidants in human health and disease. Academic Press, 25-62, San Diego.
- Kettle, A.J., Gedye, C.A., Winterbourn, C.C., 1997. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochem. J.*, 321, 503-508.
- Koltunov, V. A., 1986. Influence of trace elements on the yield, quality and preservation of radish and black radish. *Visnik Sil's'kogospodars'koi Nauki*, 1, 40-44.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501
- Kulshrestha, Y., Husain, Q., 2006. Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Biomolecular engineering*, 23, 291-297.
- Kumar, R., 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., Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry*, 46, 1350-1357.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N.F. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology*, 114, 1237-1245.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- La Creta, F.P., Olszewski, J.J., Tew, K.D., 1988. Purification 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 assembly of the head 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.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D'Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, H.C., Klein, B.P. 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137-152.

- Lee, Y., 2005. Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 28, 1183-1190.
- 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., Sakharov, I. Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685 1934.
- 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., 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.
- Mazza, G., Job, C., Bouchet, M., 1973. Chemical composition and hydrodynamic characteristics of turnip peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 332 (2), 218-223.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione: *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 711-760.
- Mika, A., Buck, F., Lüthje, 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., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777–78.
- Nair, A. R., Showalter, A. M. 1996. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemistry biophys. Research Communication*, 226, 254.
- Negrash, A. K., 1961. Antimicrobial properties of the radish. II. The antimicrobial activity of the preparation obtained from acid substances of the root of the black radish. *Mikrobiologichnii Zhurnal*, 23 (5), 61-64.
- O'Rourke, J.F., Wilson, S.B., 1992. The F_1 -ATPase from turnip (*Brassica napus* L.) mitochondria: purification, subunit composition and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1098 (2), 224-232.

- Ocarra, P., Barry S., 1974. Griffin T spacer arms in affinity chromatography - use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. *Febs Letters*, 43, 169-175.
- Ohya, T., Morimura, Y., Saji, h., Mihara, T., Ikawa, T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Science*, 125, 137-145.
- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376.
- Özdemir, H., Aygül, İ., 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., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Appl Biochem Biotechnol.*, 167, 367-376.
- Pomar, F., Bernal, M. A., Diaz, J., Merino, F. 1997. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313–1317.
- Pütter, J., Becker, R., 1987. Methods of Enzymatic Analysis Peroxidases. Bergmeyer, Third Edition, VCH. 286, New York.
- Radojicic, I., Berkovic, K., Kovac, S., Vorkapic-Furac, J., 2008. Natural honey and black radish juice as tin corrosion inhibitors. *Corrosion Science*, 50, 1498-1504.
- Rehman, Z.U., 2003. Evaluation of antioxidant activity of methanolic extract from peanut hulls in fried potato chips. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 75-83.
- 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., Thorpe, G.H.G. 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rodriguez L, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia-Canovas, F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1537–1541.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., 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., Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571-1579.
- 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.
- Serrano-Martinez, A., Fortea, M.I., Del Amor, F.M., Nunez-Delicado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107, 193–199.
- Signoret, A., Crouzet, J. 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Singh, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Sipos P; Hagymasi K; Lugasi A; Feher E; Blazovics A., 2002. Effects of black radish root (*Raphanus sativus* L. var *niger*) on the colon mucosa in rats fed a fat rich diet. *Phytotherapy research*, 15 (7), 677-679.
- Smith, P.G., Koch, I., Reimer, K.J., 2008. Uptake, transport and transformation of arsenate in radishes (*Raphanus sativus*). *Science of The Total Environment*, 390, 188-197.
- Southorn, P.A., 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., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Tekman, S., Öner, N., 1986. Genel Kimya I. Fatih Yayınevi Matbaası, 335-337, İstanbul.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateryallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Tıpawan, T. Barrett M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Triplett, B. A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science*, 81, 147-154.
- Tzika, E.D., Sotiroudis, T.G., Papadimitriou, V., Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). *Eur Food Res Technol.*, 228, 487-495.
- Ursini, F., Maiorino, M., 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., Foriers, A., Rogiers, V., 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., 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.
- Veitch, N.C., Smith, A.T., 2001. Horseradish peroxidase. *Adv. Inorg. Chem.*, 51, 107–162.
- Vitoria, A.P., Lea P.J., Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57, 701-710.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Welinder, K.G., 1976. Covalent structure of the glycoprotein horseradishperoxidase. *FEBS Lett.*, 72, 19–23.
- 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.
- Yazdi, M.T., Khaleghparast, S., Rafati, H., 2000. Purification and partial characterization of two peroxidases from cultivated black radish (*Raphanus maritimus* sm.) root. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 11 (1), 11-18.
- Yemenicioglu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158–4163.
- Zhao-liang, L., Li-wang, L., Xiao-yan, L., Yi-qin, G., Xi-lin, H., Xian-wen, Z., Jin-lan, Y., Long-zhi, W., 2008. Analysis and evaluation of nutritional quality in Chinese radish (*Raphanus sativus* L.). *Agricultural Sciences in China*, 7 (7), 823-830.
- Zilbeyaz, K., Kilic, H., Sisecioglu, M., Ozdemir H., 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

1986 yılında Rize’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Rize’de tamamladı. 2005 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği’nden 2010 yılında mezun oldu. 2010-2011 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.