

**TÜMÖR KÜÇÜLTÜCÜ ETKİYE SAHİP MYROSİNAZ
ENZİMİNİN ÇAŞIR (*Prangos ferulecea* L.) VE YABAN
KEREVİZİ (*Smyrnum olusatrum* L.) BİTKİLERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZE EDİLMESİ**

Bahar AYDİN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Nazan DEMİR

2011

Her hakkı saklıdır.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜMÖR KÜÇÜLTÜCÜ ETKİYE SAHİP MYROSİNAZ ENZİMİNİN
ÇAŞIR (*Prangos ferulecea* L.) VE YABAN KEREVİZİ (*Smyrniolum
olusatrum* L.) BİTKİLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI ve
KARAKTERİZE EDİLMESİ

Bahar AYDIN

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Tümör Küçültücü Etkiye Sahip Myrosinaz Enziminin Çasıır (*Prangos ferulecea L.*) ve Yaban Kerevizi (*Smyrniun olusatrum L.*) Bitkilerinden Saflaştırılması ve Karakterize Edilmesi

Prof.Dr. Nazan DEMİR danışmanlığında, Bahar AYDİN tarafından hazırlanan bu çalışma 30/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof Dr. Nazan DEMİR

İmza :

Üye : Prof.Dr. Yaşar DEMİR

İmza :

Üye : Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç.Dr. Mehmet YALÇIN

İmza :

Üye : Doç.Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

(imza)
Yukarıdaki sonucu onaylıyorum
Prof.Dr. Ömer AKBULUT
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:2009/249

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

ÖZET

Doktora Tezi

TÜMÖR KÜÇÜLTÜCÜ ETKİYE SAHİP MYROSİNAZ ENZİMİNİN ÇAŞIR (*Prangos ferulecea* L.) VE YABAN KEREVİZİ (*Smyrnum olusatrum* L.) BİTKİLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZE EDİLMESİ

Bahar AYDİN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Myrosinaz enzimi (tiyoglikozid glikohidrolaz, E.C. 3.2.3.1) hidrolazlar grubu üyesi olup glikozinolatların hidrolizlenmesi reaksiyonu gerçekleştiren bir enzimdir. Bu çalışmada Erzurum ve çevresinde yetişmekte olan çadır bitkisi (*Prangos ferulecea* L.) ve Mersin yöresi Tarsus'un dağ köylerinde yetişen yabancı kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden myrosinaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Myrosinaz enziminin saflaştırılmasında kromatografik yöntemlerden faydalanıldı. Myrosinaz enzimi 3 basamakta saflaştırıldı. İlk basamakta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı, 2. basamakta Sephakril S 200 anyon değiştirici kromatografisi kolonu kullanıldı ve 3. basamakta ise Konkavalin A Sepharoz afinite kromatografisi kullanılarak enzim saflaştırıldı. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabancı kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin saflığını kontrol etmek amacı ile SDS-PAGE elektorofezi uygulandı.

Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri tespit edilerek sinigrin substratı için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

Enzim aktivitesi üzerine Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} (10mM, 1mM ve 0,1mM) katyonlarının ve askorbik asit, EDTA ve SDS (10mM, 1mM ve 0,1mM) bileşiklerinin etkileri araştırıldı. Bunlara ek olarak kozmetikte kullanılan pantenol, cephalotin, betamethasone, linoleik asit ve E vitamininin (10mM, 1mM ve 0,1mM) ve cilt kanseri tedavisinde etkili olan TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ (500 ppm) moleküllerinin etkileri araştırıldı.

Ayrıca enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention pestisitlerinin etkisi araştırıldı.

2011, 112 sayfa

Anahtar Kelimeler: Myrosinaz, , saflaştırma, karakterizasyon, kanser tedavisi.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME MYROSINASE WHICH HAVE A DEGRADING EFFECT ON TUMOR FROM (*Prangos ferulecea* L.) and (*Smyrnum olusatrum* L.) PLANTS

Bahar AYDIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DEMİR

The enzyme responsible for the hydrolysis of glucosinolates is known as myrosinase (E.C. number 3.2.3.2, also known as: β -thioglucosidase, β -thioglucoside glucohydrolase). In this study; the myrosinase enzyme was purified and characterized from (*Prangos ferulecea* L.) which grows in Erzurum and (*Smyrnum olusatrum* L.) plants, which grows naturally in certain rural regions of Mersin. Three different steps were used for purification of the myrosinase from (*Prangos ferulecea* L.) and (*Smyrnum olusatrum* L.). First step was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation. Second step was Sephacryl S200 anion exchange chromatography and finally Concavali A affinity chromatography was used. SDS-polyacrilamide gel electrophoresis was applied for control of the myrosinase enzyme purified from the centaury (*Prangos ferulecea* L.) and (*Smyrnum olusatrum* L.) plants.

K_M and $V_{\max}$ values for sinigrin substrate were determined after setting optimal pH and temperature conditions of myrosinase enzyme.

Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} (10 mM, 1 mM ve 0,1 mM) cations and ascorbic acid, EDTA and SDS (10 mM, 1 mM ve 0,1 mM) on enzyme activity were researched. In addition to, effects pantenol, cephalotine, betamethasone (10 mM, 1 mM ve 0,1 mM) that used in cosmetic and TA_1 , TA_2 , TA_3 , TA_4 , TA_5 , TA_6 , TA_7 , TA_8 , TA_9 and TA_{10} (500 ppm) that benefit in skin cancer treatment.

Effects of 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm chloropyriphos-ethyl, methyl-parathion, dimethoate, diazinon, methamidophos, ethyl-parathion and fenthion pesticides on enzyme activity were researched.

2011, 112 pages

Keywords: Myrosinase, purification, characterization, cancer treatment.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma 2009/249 proje nolu Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesinin (BAP) bir parçası olup, Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımın her safhasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her türlü desteği sağlayan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR'e

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e

Bazı etken maddeleri temin eden Eczacılık Fakültesi Dekan Yrd. Sayın Prof. Dr. İnci GÜL'e

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na,

Hocama ait laboratuvarında birlikte çalıştığım grup arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan eşime ve canım aileme teşekkür ederim.

Bahar AYDİN

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.	27
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	27
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	27
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	28
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Protein tayini	33
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	33
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	33
3.2.2. Çasıır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden myrosinaz enziminin saflaştırılması	34
3.2.3. Homojenatın hazırlanması	34
3.2.4. Amonyum sülfat çöktürmesi	34
3.2.5. Çasıır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden myrosinaz enziminin saflaştırılma basamakları	35
3.2.6. Myrosinaz enziminin aktivite tayini.....	36
3.2.7. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimin saflığının ve alt birimlerinin var olup olmadığının kontrolü.....	37
3.2.8. Çasıır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar.....	38
3.2.8.a. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	38

3.2.8.b. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	39
3.2.8.c. Vmax ve Km değerlerinin belirlenmesi	39
3.2.9. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini	40
3.2.10. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması	41
3.2.11. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine kimyasal bileşiklerin etkisinin araştırılması	41
3.2.12. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerinin etkisinin araştırılması	42
3.2.13. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) ve yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin araştırılması	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	48
4.2. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) Bitkisinden Myrosinaz Enzimi Saflaştırma Sonuçları	49
4.2.1. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden myrosinaz eziminin saflaştırma basamakları	50
4.2.2. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi	51
4.2.3. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik.....	52
4.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini.....	54
4.2.5. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması.....	55
4.2.6. Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin etkisinin belirlenmesi.....	59

4.2.7. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin belirlenmesi	61
4.2.8. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin belirlenmesi	69
4.3. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden myrosinaz enzimi saflaştırma sonuçları	73
4.3.1. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırma basamakları	74
4.3.2. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi	75
4.3.3. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar	76
4.3.4. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini	79
4.3.5. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması	81
4.3.6. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin etkisinin belirlenmesi	84
4.3.7. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin belirlenmesi	87
4.3.8. Yabani kereviz (<i>Smyrniun olusatrum</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin belirlenmesi ..	95
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	99
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	112

SİMGELER DİZİNİ

μM	Mikromolar
Dak	Dakika
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EÜ	Enzim ünitesi
g	Gram
mM	Milimolar
nM	Nonomolar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TA ₁	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-fenilprop-2-en-one
TA ₂	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-p-tolilprop-2-en-one
TA ₃	1-(4-metoksifenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one
TA ₄	1-(4-klorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one
TA ₅	1-(4-bromofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one
TA ₆	1-(4-florofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one
TA ₇	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-one
TA ₈	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-one
TA ₉	1-(2,4-diklorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)prop-2-en-1-one
TA ₁₀	1-furan-2-il)-3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-one
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Enzimin aktif bölgesinin görünüşü	5
Şekil 1.2.	Enzim substrat etkileşmesi	7
Şekil 1.3.	Michaelis-Menten grafiği.....	10
Şekil 1.4.	Lineweaver- Burk grafiği.....	11
Şekil 2.1.	Glukosinolat molekülünün yapısı.	13
Şekil 2.2.	Alifatik, aromatik ve indol glukosinolat örnekleri.....	14
Şekil 2.3.	Glukosinolat parçalanma reaksiyanu	17
Şekil 2.4.	Enzimatik parçalanma sonucu oluşan glukosinolat hidroliz ürünleri ve kendiliğinden düzenlenmeleri	18
Şekil 2.5.	Myrosinaz enziminin üç boyutlu yapısı	20
Şekil 2.6.	Çaşır bitkisi (<i>Prangos ferulecea</i> L.)’nin görünümü.....	24
Şekil 2.7.	Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum</i> L.)’in görünümü	25
Şekil 4.1.	Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	48
Şekil 4.2.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden Konkavalin-A Sepharos 4B kolonu ile saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği	49
Şekil 4.3.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı	51
Şekil 4.4.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine pH’nın etkisi.....	52
Şekil 4.5.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	53
Şekil 4.6.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin sinigrin substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 4.7.	Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği.	55
Şekil 4.8.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayini için hazırlanan absorbans grafiği	55

Şekil 4.9.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi.....	56
Şekil 4.10.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi.....	56
Şekil 4.11.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi.....	57
Şekil 4.12.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} 'nin etkisi.....	57
Şekil 4.13.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.....	58
Şekil 4.14.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'ün etkisi	58
Şekil 4.15.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi	59
Şekil 4.16.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi.....	60
Şekil 4.17.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine β -merkaptetanölün etkisi	60
Şekil 4.18.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi.....	61
Şekil 4.19.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine pantenol'un etkisi	62
Şekil 4.20.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine betamethasone'un etkisi	62
Şekil 4.21.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine linoleik asit'in etkisi	63
Şekil 4.22.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sephalotin'in etkisi.....	63
Şekil 4.23.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine E vitamini'nin etkisi	64
Şekil 4.24.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA_1 'in etkisi	64

Şekil 4.25. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₂ 'in etkisi	65
Şekil 4.26. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₃ 'in etkisi	65
Şekil 4.27. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₄ 'in etkisi	66
Şekil 4.28. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₅ 'in etkisi	66
Şekil 4.29. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₆ 'in etkisi	67
Şekil 4.30. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₇ 'in etkisi	67
Şekil 4.31. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₈ 'in etkisi	68
Şekil 4.32. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₉ 'in etkisi	68
Şekil 4.33. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₁₀ 'in etkisi	69
Şekil 4.34. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine klorprifos etil'in etkisi	70
Şekil 4.35. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi.....	70
Şekil 4.36. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi	71
Şekil 4.37. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'un etkisi	71
Şekil 4.38. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metamidopos'un etkisi.....	72
Şekil 4.39. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi	72
Şekil 4.40. Çaçır (<i>Prangos ferulecea</i> L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine fenthion'un etkisi	73

Şekil 4.41. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden Konkavalin-A Sepharose 4B kolonu ile saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği	74
Şekil 4.42. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı	76
Şekil 4.43. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine pH'nın etkisi	77
Şekil 4.44. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan Mayrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	78
Şekil 4.45. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin sinigrin substratıyla elde edilen Linewear-Burk grafiği	79
Şekil 4.46. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği	80
Şekil 4.47. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayini için hazırlanan absorbans grafiği	80
Şekil 4.48. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi	81
Şekil 4.49. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi	82
Şekil 4.50. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi	82
Şekil 4.51. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} 'nin etkisi	83
Şekil 4.52. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi	83
Şekil 4.53. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'ün etkisi	84
Şekil 4.54. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi	85
Şekil 4.55. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinde saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi	85

Şekil 4.56. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine β -merkaptöetanolün etkisi.....	86
Şekil 4.57. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi	86
Şekil 4.58. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine pantenol' un etkisi	87
Şekil 4.59. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine betamethasone' un etkisi.....	88
Şekil 4.60. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine linoleik asit' in etkisi.....	88
Şekil 4.61. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sephalotin' in etkisi	89
Şekil 4.62. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine E vitamininin etkisi	89
Şekil 4.63. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₁ 'in etkisi.....	90
Şekil 4.64. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₂ 'in etkisi.....	90
Şekil 4.65. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₃ 'in etkisi.....	91
Şekil 4.66. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₄ 'in etkisi.....	91
Şekil 4.67. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₅ 'in etkisi.....	92
Şekil 4.68. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₆ 'in etkisi.....	92
Şekil 4.69. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₇ 'in etkisi.....	93
Şekil 4.70. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₈ 'in etkisi.....	93
Şekil 4.71. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₉ 'in etkisi.....	94

Şekil 4.72. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA ₁₀ 'ın etkisi.....	94
Şekil 4.73. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine klorprifos etil'in etkisi.....	95
Şekil 4.74. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi	96
Şekil 4.75. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi.....	96
Şekil 4.76. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'un etkisi.....	97
Şekil 4.77. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metamidopos'un etkisi	97
Şekil 4.78. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi	98
Şekil 4.79. Yabani kereviz (<i>Smyrnum olusatrum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine fenthion'un etkisi	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Kofaktör olarak metal iyonu ihtiva eden bazı enzimler	6
Çizelge 1.2.	Taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler	7
Çizelge 2.1.	Bazı glukosinolatların yaygın isimleri ve R-grupları	14
Çizelge 2.2.	Gıdalarda bulunan başlıca glukosinolatların sistematik ve yaygın isimleri.....	16
Çizelge 3.1.	TA _x moleküllerinin açık yapıları	43
Çizelge 3.2.	Pestisitlerin açık yapıları	46
Çizelge 4.1.	Çaşır (<i>Prangos ferulecea L.</i>) bitkisinde myrosinaz enziminin saflaştırılma basamakları	50
Çizelge 4.2.	Yabani kereviz (<i>Smyrniolum olusatrum L.</i>) bitkisinde myrosinaz enziminin saflaştırılma basamakları.....	75

1.GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmada oluşan tüm tepkimelerin uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere, genellikle protein yapısındaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını arttırarak çalışırlar (Onat vd. 2006).

Enzimin etki ettiği madde veya madde karışımına ise ‘‘substrat’’ denir. Yani enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürebildikleri bileşikler o enzimin substratlarıdır.

Enzimler, diğer kimyasal katalizörlerden birçok açıdan farklıdır. Her şeyden önce katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerden 10^5 - 10^{17} kat daha fazladır. Enzimler son derece spesifikler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimler de vardır. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrelerde bile aynı anda çok sayıda biyokimyasal reaksiyon birlikte meydana gelir.

Enzimler, hücrede gerçekleştirdikleri reaksiyonlarda yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar %100 verimle sonuçlanır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH’da, canlının vücut sıcaklığında (düşük sıcaklıkta), minimum enerjide gerçekleşir. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren pek çok reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve enerjide gerçekleştirilebilir (Lehninger 2000).

Enzimler diğer proteinler gibi yaklaşık olarak 12.000’den 1 milyona değişen molekül ağırlığına sahiptir. Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelendiğinden her enzimin aminoasit dizilimi kendine özgüdür. Bu nedenle her enzim farklı bir üç boyutlu yapıya sahiptir (Lehninger 2000).

Enzimler her biyokimyasal süreçte merkez konumdadır. Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besin molekülerin parçalandığı tepkime basamaklarını katalizler, böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Metabolik yollar, düzenleyici enzimlerin aktivitesi altında yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı aktivite arasındaki etkileşimi sağlarlar. (Lehninger 2005).

İlk enzim çalışmaları, sindirime ilişkin enzimlerin araştırılmaya başlandığı 1700'lü yılların sonunda başlamıştır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın sindiriminde etkili bitkisel enzimler üzerinde çalışmış (Onat vd. 2006) ve nişastanın tükürük tarafından parçalanması konusu ile devam etmiştir. Louis Pasteur 1850'lerde, şekerin alkole fermantasyonunun "ferment" adını verdiği organizmaların katalizi ile gerçekleştiğini ve bunların canlı hücrelerin yapılarından ayırt edilemeyeceğini öne sürmüştür. Bu görüş, 1897'de Eduard Buchner'in maya hücre ekstresinin şekeri alkole fermante edebildiğini göstermesine kadar sürmüştür. Fermantasyon olayında rol alan moleküllerin etkinliğini kaybetmeden canlı hücreden ayrılacaklarını gösteren bu olay biyokimya tarihinde dönüm noktası olmuştur (Gürgöl ve Ademoğlu 2006, 2010).

Summer'in (1926) kristalize formda üreaz enzimini ilk olarak elde etmesiyle enzim saflaştırma ve kristallendirme çalışmaları hız kazanmıştır. 1950 yılına dek aralarında pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi protolitik enzimlerin bulunduğu pek çok enzim saflaştırılarak kristalize edilmiştir. 1900'lü yılların başlarında Svedberg tarafından geliştirilen ultrasantrifüj tekniği ile enzimlerin molekül kütlelerine göre ayrımının yapılabileceğinin belirtilmesi, 1960 yılında ribonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması, 1965 yılında lizozimin üç boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar olmuştur.

1950-1960 yıllarında yapılan enzimolojik çalışmalardan enzimlerin yapısal esnekliği ile ilgili bilgiler ortaya çıkmış ve 1958 yılında Koshland, enzimlerin katalitik gücü ve özgünlüğünü açıklamak üzere etkileşme sonucu uygunluk modelini önermiştir.

Ribonükleaz enziminin aminoasitlerden başlayarak kimyasal olarak sentezi Merrifield ve grubu tarafından 1969 yılında gerçekleştirilmiştir (Yıldırım vd 2010).

Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırmaya tabi tutulmuş ve temel olarak altı ana sınıfa bölünmüştür. Bu sınıflamada her enzime (E.C.) harflerinden sonra 4 rakamdan oluşan bir enzim kod numarası verilmiştir. E.C. numarasının ilk rakamı enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam alıcı grubu (akseptör) ve dördüncü rakam ise o serideki sıra numarasını ifade eder (Onat vd 2006; Aksoy 2000). Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup şunlardır;

Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu sınıftandır.

Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini, fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalize eden, enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu gruptandır.

Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu gruba dahildir.

Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve

oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerizasyon reaksiyonlarını katalize ederler. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

Ligazlar: Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler.

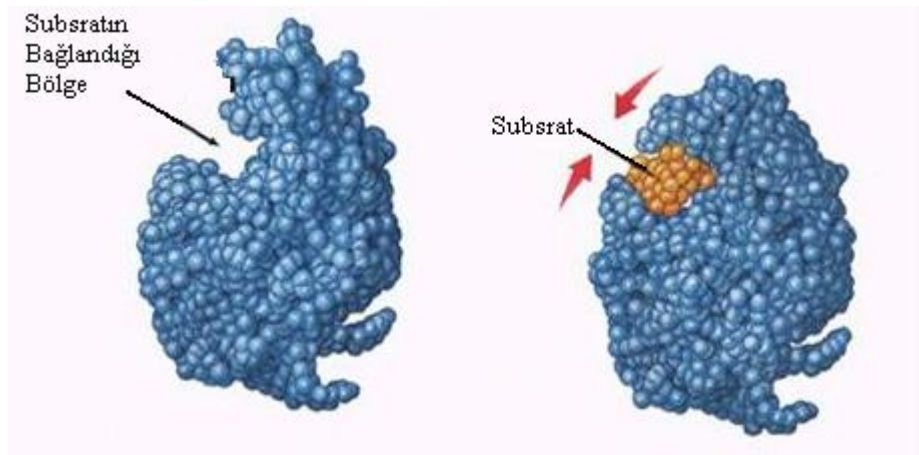
Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapısındadırlar. Hücre içerisinde meydana gelen tepkimelerin hızını ve özgüllüğünü düzenler ve çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Katalitik aktiviteleri doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa ya da alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Bu sebeple enzim moleküllerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için gereklidir. Yapılarındaki aminoasitlerin sıralanışı ve buna bağlı olarak kazandıkları üç boyutlu yapı enzimlerin kataliz görevini yapabilmelerini sağlayan en önemli etkidir (Onat vd 2006).

Enzimler salgılanma şekillerine göre hücre içi enzimler ve hücre dışı enzimler olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asitler gibi küçük molekül ağırlığına sahip hücre zarından geçebilme yeteneği olan moleküllerdir. Hücre dışı enzimler ise besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanırlar.

Escherichia coli gibi gram-negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Çünkü gram-negatif bakteri duvarları gram-pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptir. Bu yüzden gram-pozitif bakterilerde bazı enzimler doğrudan besiyerine salgılanır. Kararlılıkları çok değişken olan hücre içi enzimlerin aksine hücre dışı enzimlerin stabilitesi yüksek olup çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (John 1987).

Ayrıca enzim moleküllerinde aktif bölge denilen ve substratı bağlamada görev alan özel bir cep ya da yuva bulunur ve bu bölge substrata komplementer olan (üç boyutlu bir yüzey oluşturan) aminoasit yan zinciri içerir (Onat ve Emerk 1997).

Aktif bölge substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan, bağ yapım ve yıkımında görev alan rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup denir. Enzimlerin aktif bölgelerin bazı ortak özellikleri vardır. Bunlar arasında aktif bölgenin üç boyutlu olması, enzim hacmine göre çok daha küçük olması ve spesifik bir bağlanmanın söz konusu olması verilebilir (Onat ve Emerk 1997).



Şekil 1.1 Enzimin aktif bölgesinin görünüşü

Aktif bölge protein yüzeyinde çoğu zaman bir çatlak veya oyuk şeklinde olan üç boyutlu bir oluşumdur ve substrat buraya çoklu zayıf etkileşimlerle (elektrostatik

etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals bağları, hidrofobik etkileşimler) bağlanır (Hames and Hooper 2010).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazılarıda protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) olabildiği gibi, “koenzim” denilen kompleks bir organik bileşik (NAD^+ , FAD^+ , coenzim A) de olabilir. Bazen aktivite için her ikisi de gerekebilir. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir. Koenzimler ise geçici taşıyıcı olarak işlev yaparlar ve çoğunlukla diyetle küçük miktarlarda bulunan vitaminlerden türerler. Çizelge 1.2’de taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler ve transfer ettikleri gruplar verilmiştir (Lehninger 2005; Voet and Voet 1995).

Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine “holoenzim” adı verilir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştırılan enzim aktivitesini kaybeder. Enzimin yalnız protein kısmını ihtiva eden bu yapıya apoenzim veya apoprotein adı verilir (Onat ve Emerk 1997).

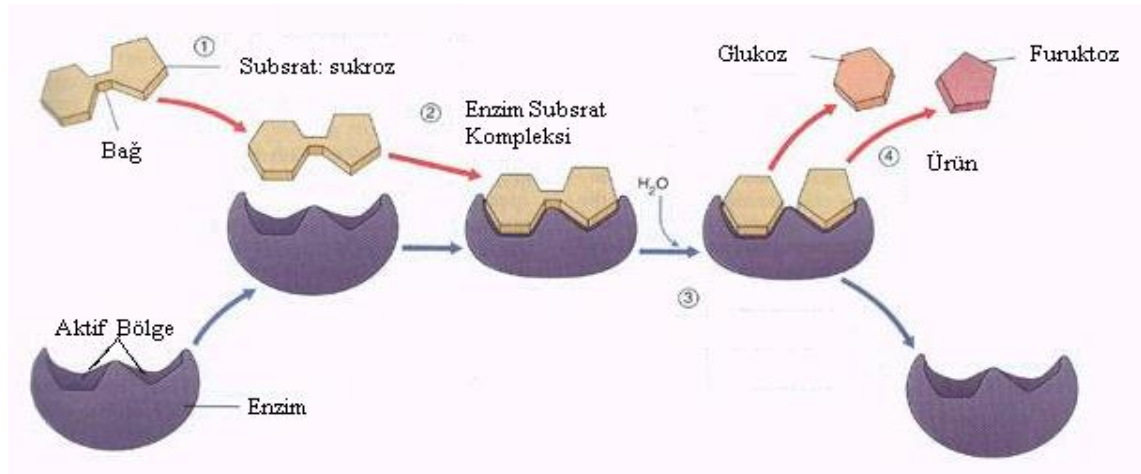
Çizelge 1.1. Kofaktör olarak metal iyonu ihtiva eden bazı enzimler

Kofaktör	Enzim
Cu^{2+}	Sitokrom oksidaz
Fe^{2+} ve Fe^{3+}	Sitokrom oksidaz, Katalaz, Peroksidaz
K^+	Piruvat kinaz
Mg^{2+}	Hekzokinaz, Glukoz 6- fosfataz, Piruvat kinaz
Mn^{2+}	Arjinaz, Ribonükleotit redüktaz
Se^{+2}	Glutatyon peroksidaz

Çizelge 1.2. Taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler

Koenzim	Transfer edilen grup	Besin öncüsü
Biyositin	CO ₂	Biyotin
Koenzim A	Açıl grupları	Pantotenik asit
FAD	Elektronlar	Riboflavin (B ₁₂ vitamini)
NAD ⁺	Hidrit iyonu (H ⁻)	Nikotinik asit (Niyasin)
Pridoksal fosfat	Amino grupları	Pridoksin (Vitamin B ₆)
Tetrahidrofolat	Tek karbonlu gruplar	Folat
Lipoamit	Elektronlar ve açıl grupları	
Tiamin pirofosfat	Aldehitler	Tiamin (vitamin B ₁)

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir enzim substrat kompleksi oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür. Bu komplekste enzim ve substrat arasındaki protein yapısını sabitleyen hidrojen bağları, hidrofobik ve iyonik etkileşimleri içeren bazı güçler tarafından oluşturulur. ES kompleksindeki her bir zayıf etkileşimin oluşumuna, etkileşimde kararlılığın derecesini sağlayan serbest enerji salınımı eşlik eder (Lehninger 2005).



Şekil 1.2. Enzim substrat etkileşmesi

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Enzimler aktivitelerinin maksimum olduğu optimum pH'ya sahiptir, daha yüksek veya daha düşük pH'da aktivite düşer. pH değişikliği ile

aminoasit zincirinin iyonik özellikleri değiştiği için denatüre olan enzimin katalitik aktivitesi kaybolmaktadır. Enzimin aktif merkezinin iyonizasyonu bozulabildiğinden enzim ile substrat etkileşimi değişmekte ve substrat molekülünün çözünürlüğünü değiştiren pH, (ES) oluşumunu etkilemektedir (Onat vd 2006).

Diğer kimyasal tepkimelerde olduğu gibi, enzimatik tepkimelerde de sıcaklığın artması ile moleküler arası çarpışmanın artışına bağlı olarak genellikle tepkimemin hızı artmaktadır. Ancak maksimum hıza ulaşıldıktan sonra sıcaklığın artışı ile hızda bir azalma gözlenmektedir. Maksimum hıza ulaşıldığındaki sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilmektedir. Enzimler protein yapısında oldukları için bu sıcaklığın üzerinde ikincil yapıyı oluşturan bağlar parçalanmakta ve molekül denatürasyona uğramaktadır. ES oluşumu bozulduğu için enzimatik tepkimenin hızı azalmaktadır (Onat vd 2006).

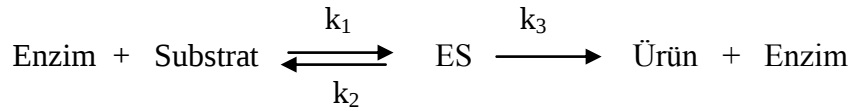
Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doymun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır (Murray *et al.* 2004)

Bir enzim reaksiyonun hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

Enzimatik reaksiyonların hızına etki eden bir diğer faktör ise inhibitörlerdir. İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, enzimin

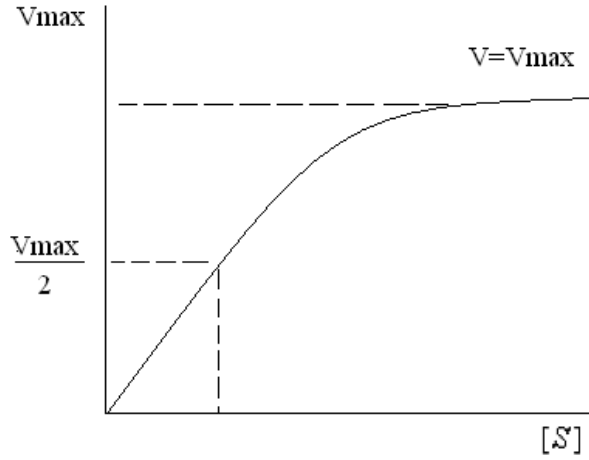
aktif merkezine bağlanıp, enzim substrat kompleksinin oluşumunu önlerler (Voet and Voet 1995).

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizmasını oluşturur. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır. İnhibitörler enzimli reaksiyon hızlarını azaltan veya tamamen durduran genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır.



Enzim (E) bir enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturmak üzere substratı (S) ile birleşir. ES kompleksi tekrar E+S oluşturmak üzere ayrışabilir veya E ve ürün (P) oluşturmak üzere kimyasal olarak ilerleyebilir. k_1 , k_2 , k_3 hız sabitleri katalitik sürecin her bir basamağı ile ilgili hızları tanımlar. Enzim ve ürünün geri tepkime ile ES kompleksine dönüşmesinin önemli oranda gerçekleşmediği varsayılır. Hemen hemen bütün substrat kulanılana kadar (ES) sabit kalır, bu sebeple yaklaşık olarak tüm tepkime boyunca ES'nin sentez hızı ES'nin tüketim hızına eşittir (Hamas and Hooper 2010).

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar, 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağılılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.3). Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



Şekil 1.3. Michaelis-Menten grafiği

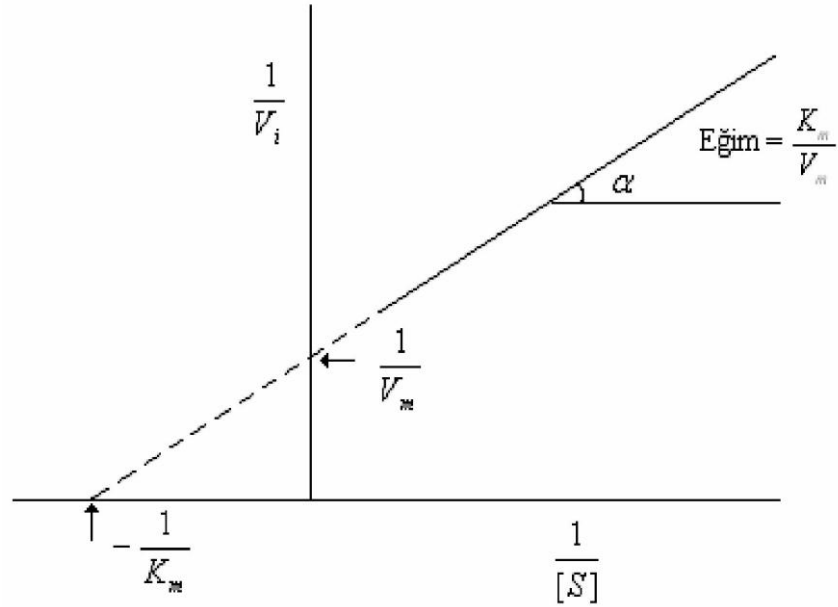
$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten Bağıntısı})$$

V_{max} : Hiperbol asimptotunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir ve maksimum hızın yarısına ulaşmak için gereken substrat miktarıdır. V_{max} ve K_m bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir. Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir. $V=V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder (Gürgöl ve Ademoğlu 2010).

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılan Lineweaver-Burk denklemidir.

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

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_{max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} 'tır (Şekil 1.4) (Aksoy 2000).



Şekil 1.4. Lineweaver-Burk grafiği

Enzimler biyolojik ortamda çok az miktarda bulundukları için miktar ölçümleri yerine aktivite ölçümleri yapılmaktadır (Champe and Harvey 1997) .

Enzim Aktivitesi: Optimum koşullarda ve birim zamanda substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzim Ünitesi (IU): Bir enzim için optimum koşullar altında 25°C’de, 1 dakikada, 1 mikromol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır.

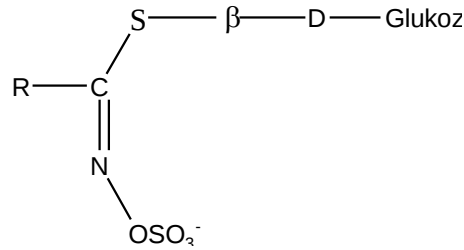
Katal: 1 saniyede 1 mol substratı katalizleyen enzim miktarıdır. Uluslararası enzim komisyonu tarafından belirlenen yeni bir birim olan katal çok büyük bir miktarı gösterir.

Spesifik Aktivite: 1 miligram protein başına düşen enzim aktivitesine denir. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır.

Turnover sayısı: Birim zamanda 1 mol enzimi ürüne dönüştüren substratın mol sayısıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

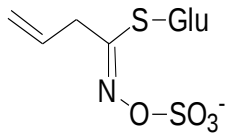
Myrosinaz enzimi son yıllarda tümör küçültücü etkisi sebebiyle büyük önem kazanmıştır. Myrosinaz enzimi ve glukosinolatlar ile ilgili Björkman'ın yapmış olduğu çalışma enzimin varlığının belirlenmesinde önemlidir (Björkman 1976). Myrosinaz enzimi (tiyoglukozid glukohidrolaz, E.C.3.2.3.1) hidrolazlar grubu üyesi olup glukosinolatların hidrolizlemesi reaksiyonunu gerçekleştiren enzimdir (Fenwich *et al.* 1983; Xue *et al.* 1992). Glukosinolatlar, glukoz ve kükürt içeren organik anyonlardır (Durham and Poulton 1989). Tüm glukosinolatlar β -D-tiyoglukoz grubuna bağlı sülfatlanmış bir aldoksim kısmı ve amino asitlerden türevlenen değişebilir bir yan zincirden oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Martin *et al.* 2008).



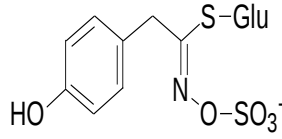
Şekil 2.1. Glukosinolat molekülünün yapısı. R; değişebilir yan zinciri ifade etmektedir

Yan zincirdeki değişiklik farklı glukosinolatların oluşumuna neden olmaktadır. Bu değişiklik sonucu bugün 100 den fazla üyesi olan büyük bir birleşik grubu oluşmuştur. Glukosinolatların yapısında bulunan sülfat grubu ise, bileşenlere güçlü asidik özellik kazandırmakta ve bitki dokularında bulunan K^+ katyonu ile tuz oluşturmaktadır (Fahey *et al.* 2001).

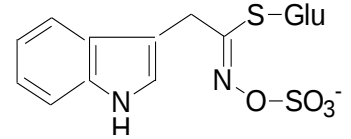
Glukosinolatlar; genellikle alifatik, aromatik ve indol-glukosinolatlar olmak üzere üç grup altında toplanırlar. Bu grupların temelini aminoasit farklılığı oluşturur; alifatik aminoasitler (metiyonin, alanin, valin, lösin, izolösin), aromatik amino asitler (tirozin, fenilalanin) veya triptofan olmasına göre farklı grup glukosinolatlar sentezlenmektedir (Mikkelsen and Halkier 2003; Martin *et al.* 2008).



Alifatik glukosinolatlar
2-propenilglukosinolat



Aromatik glukosinolatlar
p-hidroksibenzilglukosinolat



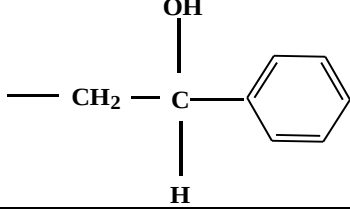
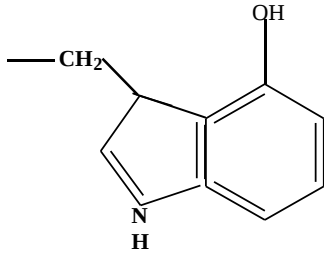
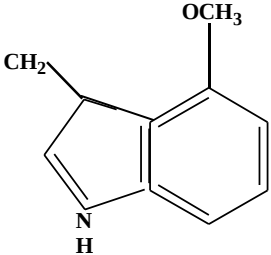
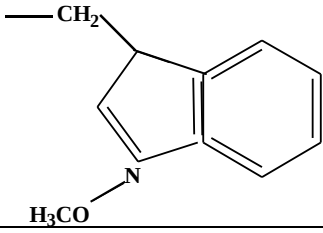
Indol glukosinolatlar
indol-3-glukosinolat

Şekil 2.2. Alifatik, aromatik ve indol glukosinolat örnekleri

Çizelge 2.1. Bazı glukosinolatların yaygın isimleri ve R-grupları (Malık *et al.* 2010)

Yaygın İsim	R grup yapısı	Bozulma ürünleri
Alifatik		
Glukoalizin	$\text{---}(\text{CH}_2)_5\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}\text{---CH}_3$	İzotiyosiyanat
Glukoherolin	$\text{---}(\text{CH}_2)_3\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}\text{---CH}_3$	İzotiyosiyanat
Glukonapin	$\text{---}(\text{CH}_2)_2\text{---}\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{CH}_3$	İzotiyosiyanat
Glukonapolieferin	$\text{---H}_2\text{C---}\overset{\text{CH}_2\text{---CH=CH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}\cdots\cdots\text{OH}$	Oksazolidine-2-tiyon
Glukoraphanin	$\text{---CH}_2(\text{CH}_2)_3\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}\text{CH}_3$	İzotiyosiyanat, nitril
Glukoraphenin	$\text{---CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{SCH}_3$	İzotiyosiyanat
Aromatik		
Glukobarbarin		Okzalidin -2-tiyon

Çizelge 2.1. (devam)

Yaygın İsim	R grup yapısı	Bozulma ürünleri
Aromatik		
Gulukosparin		İzotiyosiyanat, 5-fenil okzalidin-2- tasyon
Indol		
4-Hidroksiglikobrassicin		İndol-3-karbitol Tiyosiyanat
4Metilglukobrassicin		İndol-3-karbitol Tiyosiyanat
Neoglukobrassicin		İndol-3-karbitol Tiyosiyanat

Glukosinolatların kimyasal sentezi ilk olarak 1957 yılında Ettlinger ve Lundeen tarafından yapılmıştır (Rask *et al.* 2000).

Glukosinolatların bitkilerdeki varlığı dikotiledon (çift çenekli) angiospermilerin belirli familyaları ile sınırlıdır. Bu bileşenler 15 farklı familyada saptanmasına karşın

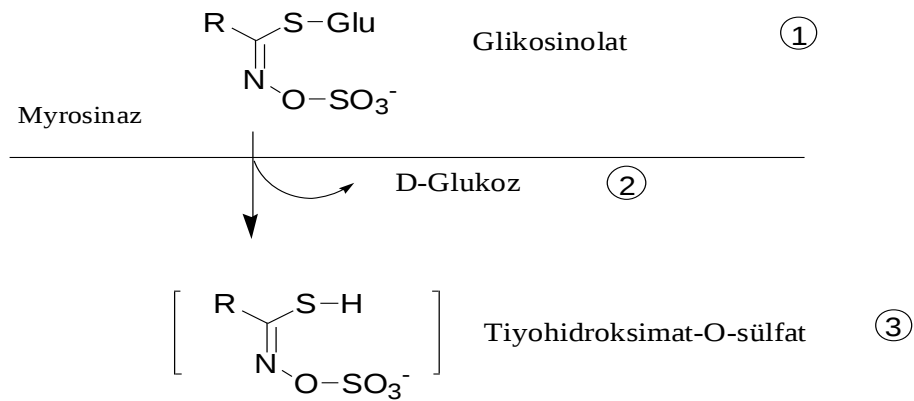
Capparaceae, Cruciferae, Moringaceae, Resedaceae ve Tovariaceae familyalarında baskındır. Bu familyalar içerisinde de Crucifer (turpgiller) familyasında yer alan lahana, brüksel lahanası, brokoli, tere, turp, karnabahar, kolza, hardal ve şalgam ekonomik öneme sahip bitkilerdir. Crucifer familyasının tüm üyelerinde glikosinolat varlığı, bu familyanın sınıflandırılmasında önemli bir kemotaksonomik kriter olarak kullanılmasına neden olmuştur. Ayrıca bu familya dışında papaya gibi glukosinolatların ara sıra görüldüğü familyalarda söz konusu olmaktadır (Minten *et al.* 2000).

Çizelge 2.2. Gıdalarda bulunan başlıca glukosinolatların sistematik ve yaygın isimleri

Sistematik isim/yan zincir	Yaygın isim
Metil glukosinolat (CH_3-)	Glukokapparin
2-propenil glukosinolat ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$)	Sinigrin
3-butenil glukosinolat ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)	Glukonapin
4-pentenil glukosinolat ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)	Glukobrassikanapin
3-metiltiyopropil glukosinolat	Glukoiberberin
4-metiltiyobütil glukosinolat ($\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)	Glukoerusin
3-metilsülfinilpropil glikosinolat ($\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)	Glukoiberin
4-metilsülfinilbütil glukosinolat	Glukorafanin
Benzil glukosinolat	Glukotropaeolin
p-hidroksibenzil glukosinolat	Sinalbin
3-indolmetil glukosinolat	Glukobrassicin
2-hidroksi-3-butenil glukosinolat ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$)	Progoitrin

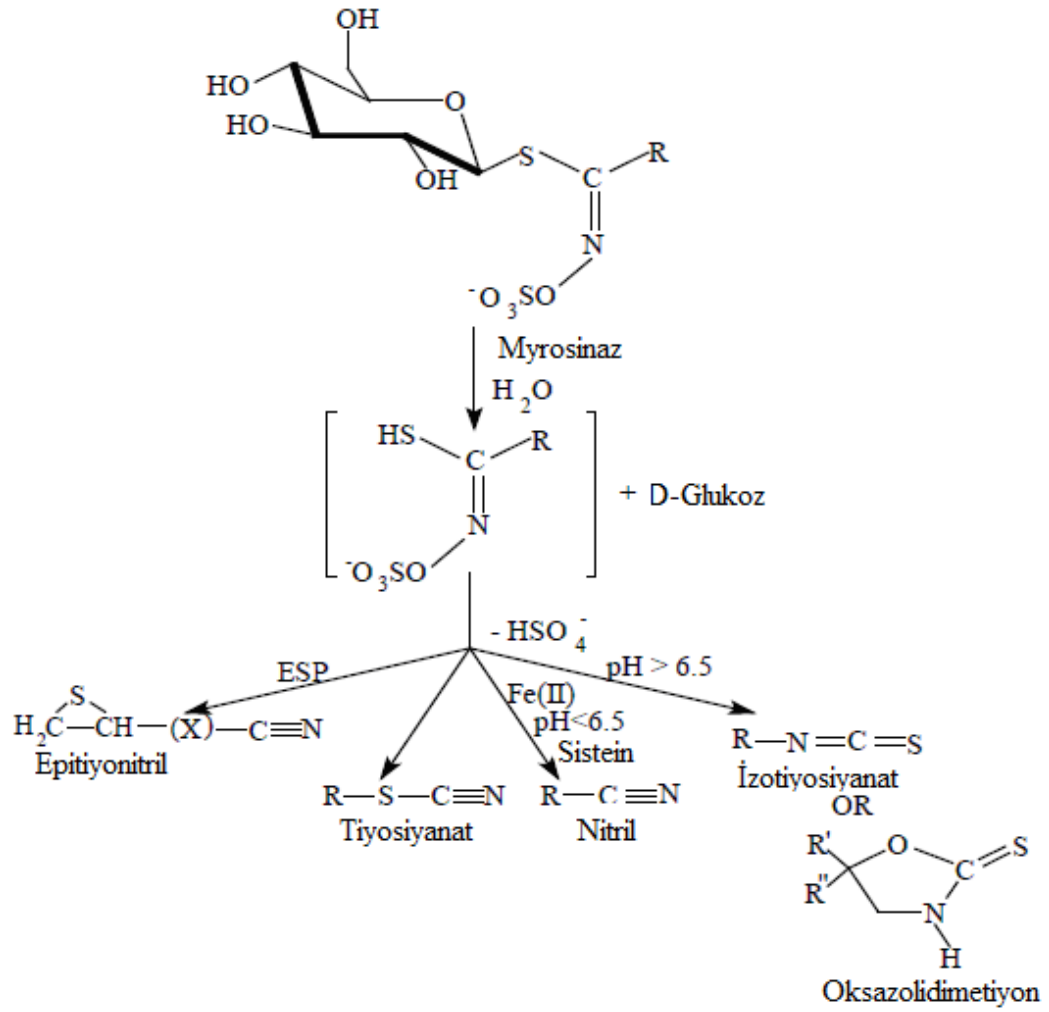
Glukosinolat içeren tüm bitkiler aynı zamanda myrosinazı (tiyoglukozid glukohidrolaz E.C 3.2.1.1) da içermektedirler (Bones and Rositter 1996; Fahey *et al.* 2001; Eyles *et al.* 2006; Bellostas *et al.* 2008). Myrosinaz enzimi glukosinolatların hidrolitik parçalanmasından sorumlu enzimdir ve mirosin olarak adlandırılan özelleşmiş bitki hücrelerinin vakuollerinde lokalize olmuştur. Bu enzimin mirosin hücreleri tarafından

salgılanabileceği gibi, enterik bakteriler veya funguslar tarafından da üretilbildiği saptanmıştır. Zarar görmemiş hücrelerde glukosinolatlar endojen enzim myrosinazdan farklı bir yerde muhafaza edilmektedirler (Leoni *et al.* 1997; Kelly *et al.* 1998; Song *et al.* 2005). Zarar görmemiş glukosinolatların çok az biyolojik etkiye sahip oldukları bilinmektedir, fakat bitki dokusunun donup çözülmesi sonucunda parçalanması ve çığnenme esnasında fiziksel zarara maruz kaldığında glukosinolat ve myrosinazın bölmelendirilmesi bozulur ve glukosinolatların myrosinaz tarafından katalizlenen parçalanma metabolizması meydana gelir (Shapiro *et al.* 2001; Quinsac *et al.* 1994). Bu enzimatik parçalanma sonucu kararsız bir ara bileşik olan tiyohidroksimat-O-sülfat ve D-glukoz açığa çıkar.



Şekil 2.3. Glukosinolat parçalanma reaksiyonu

Daha sonra kararsız ara bileşikte meydana gelen düzenlemeler sonucu glukoz, sülfat ve birçok aktif allelokimyasallar açığa çıkmaktadır (Foo *et al.* 2000). Reaksiyon koşulları ve substrata bağlı olarak çeşitlenen bu parçalanma ürünlerinin bazıları, izotiyosiyanat, nitril, tiyosiyanat, siyanittir (Gill and Macleod 1980; Trenerry *et al.* 2006). Enzimatik parçalanma sonucu oluşan glukosinolat hidroliz ürünleri ve kendiliğinden düzenlenmeleri Şekil 2.4’de gösterilmiştir (Daniela *et al.* 2006).



Şekil 2.4. Enzimatik parçalanma sonucu oluşan glukosinolat hidroliz ürünleri ve kendiliğinden düzenlenmeleri

İzotiyosiyanatlar nötral pH'da üretilmekte iken nitriller düşük pH'da üretilmektedirler. İndol glukosinolatlara 3-indolasetonitril, 3,3-diindolmetan örnek olarak verilebilir (Bones and Rossiter 1996).

Bitkilerde bulunan glukosinolat türlerinden glukoraphanın (4-metil sülfenilbutil glukosinolat)'ın myrosinaz enziminin hidrolizi sonucunda sulforaphane (4-metil sülfenilbutil izotiyosiyanat) ve nitril meydana gelmektedir. Sulforanlar özellikle pek çok türdeki tümör hücrelerini küçültmekte ve tümörlü dokularla savaşmaktadır (Talalay and Zhang 1996; Zhang and Talalay 1994; Liang *et al.* 2006).

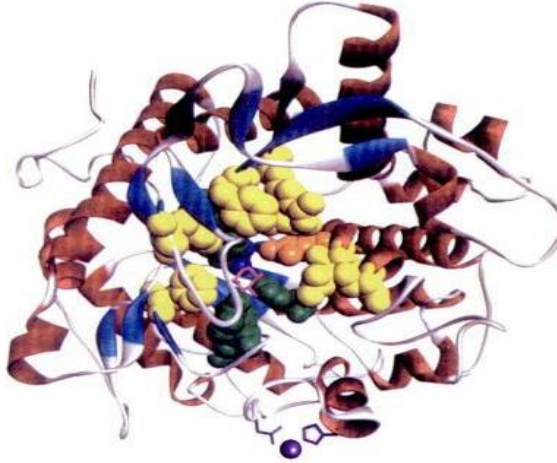
Ayrıca indoller izotiyosiyanatlar ve sulforafanlar gibi fitokimyasallar hücrel DNA zedelenmelerini baskılayan veya bloke eden enzimleri tetiklemekte, tümör büyüklüğünü ve östrojen benzeri hormonların etkinliğini azaltmaktadırlar. Ancak, açığa çıkan nitrilin sağlık açısından herhangi bir faydası tespit edilmemiştir ve normal hücrelere toksik etkisi de olabilir (Hasler 2002). İzotiyosiyanat oluşturan tiyoglukozitler kolayca enzimatik hidrolize uğrayabilirler ve yeni bir moleküler düzen kazanarak hardal yağlarını, glukoz ve sülfatı oluştururlar. İzotiyosiyanatların çoğu keskin tadları ile kendilerini belli ederler ve baharat olarak kullanılırlar. Yüksek derişimlerinde tahriş edici ve göz yaşartıcı özellik kazanırlar. Zengin oldukları bitkiler halk arasında ilaç olarak kullanılmaktadır.

İzotiyosiyanatlar $-N=C=S-$ grubundaki merkezi karbon atomundan kaynaklanan kuvvetli elektrofilik özelliğe sahiptir ve bu özelliğinden dolayı sülfür, azot ve oksijen gibi bazı nükleofillerle rahatlıkla tepkimeye girerler (London *et al.* 2000; Steinkellner *et al.* 2001). İzotiyosiyanatların antimikrobiyal etkili olduğu ve proteinlerin $-SH$ grupları ile reaksiyona girerek bu etkiyi gösterdiği düşünülmektedir (Zhang 2004).

İzotiyosiyanatlar, antioksidan yanıtlama elementlerini uyararak dokudaki glutatyon seviyesini yükseltir. Glutatyon, elektrofilik bileşenlerle konjuge olarak suda çözünen kararlı reaktif bileşikler oluşturma yeteneğinde bir direkt antioksidandır. Bütün hücrelerde doğal olarak milimolar konsantrasyonlarında zaten bulunan glutatyon miktarının bu şekilde yükselmesinin hücrel antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirdiği düşünülmektedir (Kassie and Knasmüller 2000; Conaway *et al.* 2002).

Myrosinaz enziminin tıpta ve farmasötik sanayi de önemli uygulamaları vardır. Yapılan çalışmalarda diyetle aldığımız glikosinolatların, kanser önleyici izotiyosiyanatların öncülleri oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle yüksek kalitedeki *Crucifer* (turpgiller, lahana) sebzelerinin tüketilmesi çeşitli kanser tiplerinin gelişme riskini azaltmaktadır (Hington *et al.* 2007). Glukosinolatların hidrolitik ürünlerinden olan izotiyosiyanatlar kanserin önlenmesinde pozitif etkiye sahiptirler. Bu kanser önleme etkisi

karsinojenlerin biyoaktivasyonundan sorumlu enzimlerinin inhibisyonu ve detoksifikasyon enzimlerinin uyarılmasından ileri gelmektedir (Choi *et al.* 2005).



Şekil 2.5. Myrosinaz enziminin üç boyutlu yapısı (Rask *et al.* 2000)

Freeman and Mossadeghi (1973) tarafından su teresi üzerine yapılan çalışmada su stresinin artması ile glukosinolat içeriğininde arttığını saptamışlardır.

Wattenberg (1977)'in fareler üzerinde yaptığı araştırmada karsinojen (DMBA-7,12-dimetilbenzilantrasen) uygulamasından önce glukotropaelin glukosinolatının parçalanma ürünü olan benzil izotiyosiyanatın, ağız yolu ile verildiğinde meme tümörü indüksiyonunu önlediğini bildirmiştir. Yine benzil ve 2-feniletıl izotiyosiyanatın mide tümörünü inhibe ettiğı saptanırken, benzil tiyosiyanatın herhangi bir etkisi görülmemiştir. Bu etki karsinojenin aktivasyonunun önlenmesinden kaynaklanmakta, kanser oluşumunun başlangıç aşaması olan DNA zarar görmesi bloklanmaktadır.

Daxenbichler *et al.* (1980) beyaz lahanadan lahana turşusu üretiminde, tüm glukosinolatların 2 haftalık fermentasyon basamağı sırasında tamamen hidrolize olduğunu saptamışlardır. Özellikle dondurma ve kurutma işlemlerinden önce, off-flavor gelişiminin önleğiğı haşlama işlemleri sırasında, istenmeyen katalaz ve peroksidaz enzimleri inaktive olurken lezzet oluşumundan sorumlu mirosinaz enziminin de inaktive olduğu saptanmıştır. Brüksel lahanası ve brokoli ile yapılan bir çalışmada, farklı

haşlama koşullarında, brokolide büyük glukosinolat kayıpları görülürken brüksel lahanasında çok az kayıplar saptanmıştır (Goodrich *et al.* 1989).

Lahanadaki bazı sülfür bileşiklerinin 15 bakteri türü ve 4 maya türü üzerindeki inhibitör etkisinin ve minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada lahanadaki aromadan sorumlu izotiyosiyanat olan allil izotiyosiyanatın minimum inhibitör konsantrasyonu değerleri (Gram pozitif, Gram negatif, patojen ve laktik asit bakterilerini de içeren) bakteriler için 50-500 ppm, mayalar için ise 1-4 ppm olarak bulunmuştur. Allil izotiyosiyanata karşı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin duyarlılığı arasında bir fark olmadığı bildirilmektedir. Allil izotiyosiyanatın asidik olmayan minimum işlenmiş gıdalarda koruyucu olarak kullanımı da düşünülmektedir. Allil izotiyosiyanat, doğal olarak bulunduğu gıdalarda da koruyucu olarak rol almaktadır (Kyung and Fleming 1997).

Baltimore’da yöresel süper marketlerden alınan 22 taze ve 7 donmuş brokoli örneğinin indükleyici aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, donmuş örneklerin indükleyici aktivitelerinin 9,000-15,000 birim/g arasında değişirken, taze örneklerin yaklaşık 8 misli aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Zhang *et al.* 1997).

Zhang *et al.* (1994) yaptıkları çalışmada tek oral doz uygulanan DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantrasen), dişi farelerde meme kanserini inhibe ettiği saptanmıştır. Glukonasturtin’in bir türevi olan ve büyük oranda su teresinde bulunan fenil izotiyosiyanatın, kemirgenlerde akciğer kanserine neden olan NNK (4-metilnitrozoamino-1-3-piridil-1-bütanon)’un aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Mithen *et al.* 2000).

Berteli *et al.* (1998) brokoli ile yaptıkları çalışmada, filiz, yaprak ve saplarda sulforafan miktarlarını tespit etmişlerdir. Solvent ekstraksiyonu ile elde ettikleri ekstraktları katı faz ekstraksiyonuna (SPE) tabi tutarak saflaştırılmış ve daha sonra RP-HPLC analizleri yapmışlardır.

Liang *et al.* (2006) brokoli tohumlarındaki sulforafan içeriği ve myrosinaz aktivitesi üzerine, Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} metal iyonlarının nötral pH da etkileri araştırılmış. Fe^{2+} ve Mg^{2+} un sulforafan ve glukoz oluşumunu azalttığı, Fe^{2+} , Fe^{3+} ün sulforafanı inhibe ettiği, Ca^{2+} iyonunun glukoz miktarını artırdığı fakat sulforafanı inhibe ettiği, sadece Zn^{2+} nin sulforan oluşumunu hızlandırdığı kaydedilmiştir.

Glukosinolat ve myrosinaz sistemleri Capari (*Capparis ovata Desf.*) bitkisinde araştırılmış ve karakterize edilmiş olup, tohum, çiçek ve çiçek tomurcuklarında glukokaparin, epiprogoitrin, sinigrin, glukonapin, ve glukobrassicin ihtiva ettiği belirtilmiştir. Ayrıca sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile elde edilen tek bandın 65 kDa olduğu kaydedilmiştir (Bor vd 2009).

Kuzey ve Güney Amerikada bulunan sekiz yerleşim yerinden toplanan yabani turp bitkisine ait kök, yaprak, çiçek, birincil ve ikincil dal kısımlarında glukosinolat içeriği ile ilgili yapılan çalışmada, 17 tür glukosinolatın varlığı kaydedilmiştir. Bunların %90'nının glukoerucin, glukoraphanin, glukobrassicin olduğu ayrıca çiçek kısımlarının yüksek glukosinolat ihtiva ettiği ve bu sekiz bölge içerisinde en iyi verimin Missisiphi bölgesinden elde edildiği açıklanmıştır (Malik *et al.* 2010).

Turpgiller familyasına ait brokoli, çin lahanası ve oxheart lahanası tohumlarında izotiyosiyonat ve antikanserojen bioaktivite potansiyelin tespitine ilişkin çalışmada, üç cinse ait etil asetat ekstraktlarının GC-MS analizi neticesinde 3-BITC (3-bütülen izotiyosiyonat) ile sulforaphan ihtiva ettikleri ve bu üç sebze içerisinde brokolideki toplam izosiyonat miktarının diğer iki türe oranla daha fazla olduğu belirtilmiştir (Wang *et al.* 2010).

Penas *et al.* (2011) tarafından İspanya'nın farklı bölgelerinde yetiştirilen 5 farklı beyaz lahanası çeşidinde biyoaktif bileşikler, myrosinaz aktivitesi ve antioksidan kapasitelerinin tespiti amacıyla yapılan çalışmada; yüksek glukosinolat konsantrasyonu, yüksek vitamin C seviyesi ve yüksek fenolik bileşik içeren kısımlarının yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu kaydedilmiştir.

Güney Amerika (Peru) kökenli yıllık mahsül veren ve kızıl turp benzeri köke sahip bir bitki olan yeşil, kırmızı ve siyah maca köklerinde glukosinolat ve myrosinaz aktivitesinin hasat öncesi, hasat dönemi ve hasat sonrası yapılan analizleri sonucu; hasat döneminde üç bitki türünde %80 oranında yüksek glukosinolat ihtiva ettikleri kaydedilmiştir. Bu üç türün hasattan 90 gün önce ve hasat sonrası 15-30 günlük periyod içerisinde glikosinolat miktarının azaldığı, hasat sonrası 30-45 günlük sürede ciddi bir azalma ile birlikte sıcaklık değişimlerine de bağlı olarak gerçekleşen hücre parçalanması sonucu yüksek myrosinaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Yabar *et al.* 2011).

Brokoli lahanasının ihtiva ettiği sağlığı önemli derecede etkileyen bileşikler ile metabolik enzim aktivitesi üzerine sukroz ve mannitolün etkilerinin tespiti amacıyla yapılan çalışma da; 88 mM sukroz ile muamelesi kontrol ile karşılaştırıldığında brokoli filizlerinde sulforaphan, askorbik asit ve antisiyanin içeriğinde anlamlı bir artış olduğu kaydedilmiştir. 176 mM sukroz ile muamele edilen brokoli filizlerinde antioksidan aktivitesinin belirgin ölçüde arttığı, myrosinaz aktivitesinin ise azaldığı, diğer yandan 176 mM mannitol muamelesi ile ciddi şekilde artış gözlemlendiği fakat bu artışın 176 mM sukroz'a oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Guo *et al.* 2011).

Lifli gıda içeriği bol olan beyaz lahana dış yapraklarının kurutulması sırasında anti kansorejen maddelerin gelişiminin incelenmesi ile ilgili yapılan çalışmada; ısıya duyarlı, enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan sulforafan üzerine sıcak havanın etkisi araştırılmıştır. Antioksidan ve antikansiyonerik aktiviteye sahip olduğu bilinen ve en önemli lifli besin kaynaklarından biri olan beyaz lahananın çok güçlü antikansorejen etkiye sahip glukosinolatların hidrolizi sonucu oluşan sulforafan ihtiva ettiği belirtilmiştir (Tanongkankit *et al.* 2011).



Şekil 2.6. Çaşır bitkisi (*Prangos ferulecea* L.)’nin görünümü.

Çaşır bitkisi *Prangos ferulecea* L. (Lindl.) ve *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) olarak bilinen 2 farklı türü vardır ve bu iki türde Erzurum ve çevresinde yetişmektedir. Çaşır bitkisi meyveleri uyarıcı ve gaz söktürücü etkilerinden dolayı anason meyvesi yerine kullanılmaktadır. Kökün kimyasal yapısında bulunan gummi-resina'nın bağırsaklardan kurt düşürücü etkisi olduğunda tespit edilmiştir. Ayrıca, Sivas İmranlı bölgesinde hayvan yaralarında oluşan kurtları öldürmek için de toz halinde yaraların üzerine konulduğu bilinmektedir (Öztürk ve Özçelik 1991). Bu bitkilerden izole edilen kumarinlerin birçoğunun kalp adalelerini kuvvetlendirdiği ve kalp çevresindeki damarlarda daralma yada tıkanmayı önlediği saptanmıştır. Ayrıca antibakteriyel ve antifungal etkisinin varlığı da bilinmektedir (Ulubelen *et al.* 1995).

Arapça “gavaşır” den adını alan çaşır bitkisinin diğer bölgelerde kullanılan adları ise çağ, çarşır, çansır, jajik, jag, hitlik, helizon, helige, kerkur, siyabu ve şeytan tersidir (Baytop 1984).

Bölgede ilkbaharda çaşır bitkilerinin 10-20 cm’lik taze sürgünleri tüketilmektedir. Genellikle suda haşlanıp tuzlanarak yenilmekte ya da salamurası yapıp kış mevsiminde peynir yerine katık olarak kullanılmaktadır (Alan ve Padem 1990). Ayrıca haşlandıktan sonra yumurtaya bulanıp kızartması yapılmakta ya da yumurta ile kavrulularak tüketilmektedir. Van ve Bayburt yöresinde otlu peynir yapımında da kullanılmaktadır (Baytop 1984; Özçelik ve Öztürk 1991).

Siirt, Hatay ve Van yöresinde bitkinin tümü ya da kurutulmuş yaprakları hayvan yemi olarak kullanıldığında et ve süt verimini arttırdığı bildirilmektedir (Tuzlacı 1985; Öztürk ve Özçelik 1991).

Antakya yöresinde bu bitkinin kısırlığa iyi geldiği ve bunun yapraklarını yiyen hayvanların (keçi) ikiz doğurduğu iddia edilmektedir (Baytop 1984).



Şekil 2.7. Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.)’in görünümü

Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) 70-150 cm yükseklikte, iki yıllık, sarı çiçekli ve otsu bir bitkidir. Tarsus’un dağ köylerinde yetişen, sarı kavak olarak bilinen kökü yenebilen bir bitkidir (Baytop 1997).

Meyvelerinin mide rahatsızlığı ve nefes darlığına iyi geldiği, yaprak ve kök kısımlarının idrar arttırıcı etkisinin olduğu kaydedilmiştir. Rozet yaprakları ise çiçekçiler tarafından çiçek demetlerini süslemek için kullanılmakta ve bu nedenle de bazı çiçekçiler bu bitkiye “yeşillik” adını vermektedirler (Baytop 1999).

Bertoli *et al.* (2004) tarafından İtalya Urbin'den toplanan yabani kereviz bitkisine ait kök, gövde ve yaprak kısımlarında GS ve GC-MS analizleri sonucu en önemli uçucu yağlardan myrcene, β -felandren, β -karyofillen, Furanadien, curzerene, germacrene B, ve germacrone'nin varlığı tespit edilmiştir.

Doğada bulunan gıda ilaç ve baharat bitkisi olarak kullanılan tüm bitkilerin kültüre alınması çok zordur. Zira bu bitkilerin kültüre alınması güç, zaman alıcı ve çok yönlü bir iştir. Yabani otlar arasında yer alan çadır ve kereviz bitkileri farklı yörelerde farklı isimlerle anılmakta ve uzun yıllardır gerek gıda ve gerekse tedavi amacıyla sevilerek tüketilmektedir. Bu nedenle kullanım alanı geniş doğada sınırlı miktarda bulunan ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalan bu bitkilerin kültüre alınması önem arz etmektedir.

Kanser ilaçlarının çoğu etkilerini kanser hücrelerinin proliferasyon ve bölünme fazlarını etkileyerek gösterirler. Bazı kemoterapi ajanları bazı spesifik kanser hücrelerine etkiliyken, diğer kanser hücrelerinde etkileri sınırlı olabilir. Bu nedenle farklı sitotoksik maddelerin, farklı hücrelerdeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması oldukça önemlidir (Boyle and Levin 2008).

Dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler yüzyıllardan beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde her bölgede farklı amaçlar ve yöntemlerle kullanılmaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında gıda, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılan bitkilerden henüz anti-kanser kapasiteleri belirlenmemiş olan 2 farklı tıbbi bitki türü çadır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkileri çalışma materyali olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada, antikansorejen ve tümör küçültücü etkiye sahip bir enzim olan myrosinaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan Tris (trihidroksimetilaminometan), konkavalin A, sephakril S 200, glukoz tayin kiti, sephadex G-100, standart serum albümin, N,N'-metilen bisakrikamid, akrilamid, β -merkaptotanol, amonyum persülfat (PER), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin), izopropil alkol, fosforik asit, SDS (sodyum dodesilsülfat), DTH (ditihiyoerythreitol), glisin, asetik asit, gliserin, coomassie brilliant blue G-250 ve R-250, brom timol mavisi, sodyum klorür, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, sodyum fosfat, sodyum nitrit, askorbik asit, paraokson, CaCl_2 , protein standartları, hidroklorik asit, sülfürik asit, etanol, metanol, aseton, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) sigma firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Peristaltik Pompa	:	Masterflex L/S™
pH metre	:	Selectra
Masa Santrifüjü	:	Hettich EBA 20
Derin Dondurucu	:	Il Shim
Spektrofotometre	:	Spekol 1300
Güç Kaynağı	:	Consort EV 231
Kar Makinesi	:	Angelantoni Indusrtie
Hassas Terazı	:	Denver APX 153
Buzdolabı	:	Arçelik ve Profilo
Elektroforez Tankı	:	Max Fill
Kromatografi Kolonu	:	Sigma
Otomatik Pipetler	:	Volac, Jencons

Çalkalayıcı	:	Ika
Magnetik Karıştırıcı	:	Ika
Su Banyosu	:	Memmert
Karıştırıcı	:	Heidolph

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanıldıkları yerler aşağıdaki gibidir.

1- Coomassie brilant blue G–250 renk reaktifi;

0,1 gr Coomassie brillant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2- Aktivite tayini için kullanılan çözeltiler;

20 mM sitrat tamponu (pH: 4); 1.921 gr. soydum sitrat 950 mL saf suda çözüldü. pH metre yardımıyla çözeltinin pH'sı 4'e ayarlandı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı. 2 N H₂SO₄; 22,4 ml H₂SO₄'den alınıp saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3- Kullanılan substrat çözeltisi;

20 mM'lık Sinigrin; 0.019 gr sinigrin 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

4- Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan tampon çözeltinin hazırlanması;

0,05 M'lık Na_3PO_4 içinde 1 mM ditihioerythritol, (pH: 7); 7,8025 gr Na_3PO_4 ve 0,1542 gr ditihioeritritol magnetik karıştırıcı yardımı ile 950 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak 0,5 N HCl ile pH: 7'e kadar titre edildi. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.

5- SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

0,65 mL 1M'lık Tris HCl (pH: 6,8), 1 mL %10'luk SDS, 1mL saf gliserin ve 1 mL % 0,1 lik brom timol mavisi karıştırılarak hacimleri saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu tampon kullanılmadan hemen önce 1 mL numune tamponuna 50 mikrolitre olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

6- SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu;

1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü ve üzerine %1'lik SDS'den 5 mL ilave edilerek son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

7- SDS poliakrilamid jel elektroforezi için hazırlanan boyama çözeltisi;

0,6 gram Coomassie brilant blue G-250, 6 mL fosforik asit ile magnetik karıştırıcı ile karıştırılırken bu çözeltinin üzerine 10 g TCA, 58 mL su, 15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 15 mL izopropilalkol karışımı çok yavaş bir şekilde ilave edildi.

8- Elektroforezde kullanılan renksizleştirme çözeltisi:

%7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 destile suyun karışımıyla hazırlandı.

9- Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler;

pH: 4-5 aralığının da 0,1 M asetat tamponu kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1,36 g CH_3COONa , 80 mL saf suda çözüldü ve çözeltinin pH'sı, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 6-7 aralığının da 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1,74 g K_2HPO_4 80 mL saf suda çözüldü ve çözeltinin pH'sı, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 8-9 aralığının da 0,1 M Tris tamponu kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1,21 g tris (trihidroksi metil amino metan) 80 mL saf suda çözüldü ve oluşan çözeltinin pH'sı, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10-Amonyum Sülfat çöktürmesi için kullanılan çözeltiler;

20 mM Tris 0,15 M NaCl (pH:7); 2,42 gr Tris ve 8,76 gr NaCl 950 mL saf suda çözüldü ve pH metre yardımıyla pH'sı 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi.

11- İyon değişimi kromatografisi için kullanılan çözeltiler;

20 mM Tris 0,15 M NaCl (pH:7); 2,42 gr Tris ve 8,76 gr NaCl 950 mL saf suda çözüldü ve pH metre yardımıyla pH'sı 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi. 20 mM Tris (pH:7); 2,42 gr Tris 950 ml saf suda çözüldü ve ortamın pH'sı pH metre yardımıyla 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L'ye tamamlandı.

12- Afinite kromatografisi için kullanılan çözeltiler;

20 mM Tris 0,15 M NaCl (pH: 7); 2,42 gr Tris ve 8,76 gr NaCl 950 mL saf suda çözüldü ve pH metre yardımıyla pH: 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi.

13- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bazı bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler;

10 mM'lık $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,110 g $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

10 mM'lık CaCl_2 : 0,055 g CaCl_2 saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$: 0,093 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık MnSO_4 : 0,075 g MnSO_4 saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık ZnCl_2 : 0,066 g ZnCl_2 saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık Fe_2SO_4 : 1,04 g Fe_2SO_4 saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık Askorbik asit: 0.088 g askorbik asit saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit): 0,073 g EDTA tartıldı ve 25 mL suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık SDS (Sodyum dodesil sülfat): 0,072 g SDS tartıldı ve 25 mL suda çözülerek hazırlandı.

Çalışmalar esnasında kullanılan yukarıdaki çözeltilerden, 1 mM'lık çözeltileri için; 10 mM'lık stok çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı. 0,1mM'lık çözeltileri için 1 mM'lık çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı

13- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine etken maddelerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler;

10 mM'lık Pantenol: 0.020 g pantenol tartıldı ve 10 mL suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık Sephalotin: 0.041 g sephalotin tartıldı ve 10 mL suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık Betamethason: 0.039 g betamethason tartıldı ve 10 mL suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık Linoleik asit: 0.028 g Linoleik asit tartıldı ve 10 mL etanolde çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık E vitamini: 0.043 g E vitamini tartıldı ve 10 mL etanolde çözülerek hazırlandı.

Yukarıdaki çözeltilerden, 1 mM'lık çözeltileri için; 10 mM'lık stok çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı. 0,1 mM'lık çözeltileri için 1 mM'lık çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

500 ppm'lik TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ etken maddeleri 0.007 g tartıldı ve 14 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometre’de köre karşı okundu.

3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

Bradford yöntemi ile saflaştırılan enzim çözeltilerinde, serumda ve trombosit çözeltilerinde protein tayini yapıldı. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250’nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein–boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu yöntem takip edildi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart serum albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml’ye tamamlandı ve 5 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vortex ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm’de 3 ml’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

3.2.2. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkilerinden myrosinaz enziminin saflaştırılması

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisi Erzurum yöresinden 2009 yılının Ağustos ayında toplanarak, çalışılncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkisi ise Mersin ili Çamlıyayla ilçesinden 2009 yılının Ağustos ayında toplanarak, çalışılncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3. Homojenatın hazırlanması

Dondurucuda muhafaza edilen 20 g çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisi ve 20 g yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkisi ayrı ayrı tartıldı, ilk önce sıvı azot kullanılarak mekanik olarak birkaç basamakta parçalanıp daha sonra 100 mL 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, tamponu içine alınıp parçalayıcı mikser kullanılarak homojenize edildi. Manyetik karıştırıcı kullanılarak yarım saat oda sıcaklığında karıştırıldı, homojenat yarım saat süreyle 5000xg de santrifüjlenerek bitkilerin posasının protein çözeltisinden uzaklaştırılması sağlandı.

3.2.4. Amonyum sülfat çöktürmesi

Hazırlanan homojenatlar ilk olarak amonyum sülfat çöktürme aralığı belirlemek için %0'dan %100'e kadar (%0-30, %30-50, %50-70 ve %70-100) aralıklarında amonyum sülfat ilave edilerek proteinlerin çöktüğü aralık belirlendi. Çöktürme esnasında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak iyice çözünmesi sağlandı. Çözünen tuzlu homejenat santrifüj tüplerine konularak 5000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Her bir çöktürmede çökelek ve homojenat için ayrı ayrı aktivite ölçümü yapılarak enzimin çöktüğü aralık belirlendi. Aktivite görülen çökelek veya homojenattan saflaştırılmaya devam edildi.

Homojenatta %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Kullanılan Amonyum sülfatın gram miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\text{Amonyum Sülfat Miktarı(Gram)} = \frac{1,77 \times V \times (S - S_0)}{3,54 - S}$$

V: Enzimli homojenat çözeltisinin hacmi

S₀: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

3.2.5. Çasıır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabancı kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkilerinden myrosinaz enziminin saflaştırılma basamakları

Myrosinaz enzimi çasıır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabancı kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkilerinden 3 basamakta saflaştırıldı.

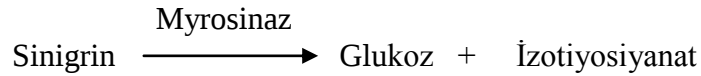
İlk basamakta homojenattaki proteinin (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi yapılarak çöktüğü aralık belirlendi. %50-70'lık amonyum sülfat konsantrasyon aralığında çöken proteinler 0,15M NaCl içeren 20mM Tris (pH:7,5) tamponu ile çözülüp, aktivite tayini yapılırca yüksek myrosinaz aktivitesine sahip olduğu görüldü.

İkinci basamakta ise, sephakril S-200 materyali kolona (3x70 cm) dolduruldu ve kolon 20 mM Tris, pH 7,5, tamponuyla 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar dengelendi. Aynı tampon içerisindeki amonyum sülfattan elde edilen homojenat kolona tatbik edildi. Enzim kolondan 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, tampon (pH 7,5) ile elüe edilerek alınan fraksiyonlarda aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren tüplerdeki elisyonlar birleştirilip havuz oluşturuldu ve Sephakril S-200 kolonunundan elde edilen havuz koncavalin-A Sepharose 4B materyali ile küçük bir erlen içerisinde hafifçe karıştırılarak bir gece boyunca bekletildi.

Üçüncü basamakta ise Konkavalin A afinite kolonu kullanılarak enzim saflaştırıldı. Yaklaşık 12 saat bekletilen Konkavalin-A Sepharose 4B materyali kolona (3x70 cm) dolduruldu ve 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, tampon (pH 7,5) ile elüe edilerek alınan fraksiyonlarda aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu ve karakterizasyon için saklandı. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans değerleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.42' de görülmektedir (Jones *et al.* 2001; Palmieri *et al.*1986).

3.2.6. Myrosinaz enziminin aktivite tayini

Myrosinaz enzim aktivitesi sinigrin'in hidrolizlenmesi metodu ile belirlendi.



1 myrosinaz enzim aktivitesi optimal şartlarda 1 dakikada 1 nmol substratın hidrolizlenmesi için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Palmieri *et al.* 1986). Aktivite ölçümünde 5 mM sinigrin, 20 mM sitrat tamponu (pH: 4) ve glukoz tayin kiti kullanıldı. Deney ve kör olmak üzere iki tüp belirlendi. Deney tüpüne 750 µL substrat, 500 µl tampon ve 500 µL enzim homojenatı koyuldu. Kör olan tüpede 750 µL substrat ve 1000 µL tampon koyularak tüpler 37°C'da 45 dk bekletildikten sonra 95°C'da da 10 dak bekletildikten sonra tüplerden 250 µL alındı ve üzerine 500 µL kit eklenerek 37°C 30 dak bekletildi. Daha sonra tüplerin üzerine 1mL 2N H₂SO₄ eklenerek 540 nm'de absorbansı ölçüldü.

Ölçülen absorbanslar ve standart glukoz grafiğinden yararlanılarak aktivite değerleri bulundu.

3.2.7. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimin saflığının ve alt birimlerinin var olup olmadığının kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra kesikli SDS-PAGE elektroforezi uygulanarak enzimin saflık derecesi ve alt birimlerinin olup olmadığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce saf su ile, sonra da alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara ince tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine kondu ve parafin kullanılarak jel hazırlama cihazına konularak sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımı ile döküldü. Jel içinde hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeylerinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu.

Katılaşmaya kadar (yaklaşık 30 dak.) beklendi. Katılaşınca üst kısmındaki %0,1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığma jeli üst kısma kadar ilave edildi. Üzerine dikkatli bir şekilde tarak yerleştirildi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü saf su ve yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına akım geçecek şekilde yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20 µg olacak şekilde hazırlandı ve toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı ve 3 dakika sıcak su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutularak enjektör yardımı ile yuvalara ekildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan anot (+) ve üst taraftan katot (-) bağlantıları yapıldı. Önce 100 voltta 1 saat kadar bekletildi. Daha sonra 150 voltta elektroforez bitene kadar yürütüldü. Elektroforez tankı su ile soğutuldu.

Elektroforez bittikten sonra akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Jel özel kabına konularak renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar

dolduruldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Boyama çözeltisinden çıkarılarak jel renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirilmek sureti ile jelin zemin rengi açılarak protein bantları belirginleşinceye kadar (yaklaşık 24 saat) çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkartılarak tarayıcı yardımı ile bilgisayara aktarıldı (Laemmli 1970).

Ayırma jelinin hazırlanması: 15 mL Tris HCl (pH: 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid %0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'luk amonyum persülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ (PER) ilave edildi.

Yığılma jelinin hazırlanması: 1 M'lık Tris HCl (pH: 6,8)'den 1,24 mL, %30'luk akrilamid %0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,80 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0,20 mL ilave edildi.

3.2.8. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar

Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri bulundu. Enzimin sinigrin substratı için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerden yararlanılarak hesaplandı.

3.2.8.a. Optimum pH'nın belirlenmesi

Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH çalışması enzimin substratı olan sinigrin ile yapıldı. Optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla altı farklı pH için üç farklı tampon çözelti hazırlandı. Bunlar;

- pH: 4–5 için asetat tamponu,
- pH: 6–7 için fosfat tamponu,
- pH: 8–9 için Tris-HCl

tamponudur. Tampon çözeltilerin pH'sı 0,1 N HCl veya 0,1 N NaOH kullanılarak ayarlandı. pH: 4–9 aralığında uygun tampon çözeltilerinde enzimin gösterdiği hidrolaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar grafik halinde Şekil 3.6'de verildi.

3.2.8.b. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH çalışması enzimin substratı olan sinigrin ile yapıldı. Bunun için 10°C -100°C arasında her bir sıcaklık için bir tüp ve o sıcaklığa ait bir kör oluşturuldu ve enzimin aktif olduğu sıcaklık aralığı belirlendi.

3.2.8.c. Vmax ve Km değerlerinin belirlenmesi

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin hız sabiti (K_m) ve maximum hızı (V_{max})'ın belirlenmesi için substrat olarak sinigrin kullanıldı. Yükselen substrat konsantrasyonuna karşı aktiviteyi bulmak amacıyla dört farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı.

Tayin işleminde şu prosedür takip edildi; Dört farklı tüp alınarak her bir tüpe 100 µL, 300 µL, 500 µL, 750 µL substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüplerinin içerisine 500 µL saflaştırılmış enzim ve toplam hacimlerini 1750 µL olacak şekilde tampon (20 mM Sitrata tamponu (pH 4)) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra tüpler 37°C'da 45 dk bekletildikten sonra 95°C'da da

10 dak bekletildikten sonra tüplerden 250 μ L alındı ve üzerine 500 μ L kit eklenerek 37°C 30 dk bekletildi.

Bekletilmelerinden sonra tüplerin üzerine 1ml 2N H₂SO₄ eklenerek 540 nm de absorbans değerleri ölçülerek aktivitesi belirlendi.

1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan çasır bitkisi için V_{max} ve K_M değerleri ise sırasıyla 0,166 mg/L.dak ve 0,96 mM olarak yabani kereviz bitkisi için V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 0,165 mg/L.dak ve 1.49 mM belirlendi.

3.2.9. Çasır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak tayin edildi. Bu amaçla 4 gram kuru Sephadex G-100, 200 ml tampon çözelti içerisine alındı ve 90°C'da 5 saat bekletildi. Jel içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trompu kullanılarak uzaklaştırıldı. 1,5 x 30 cm ebatlarındaki kromatografi kolonuna bir huni yardımı ile önce tampon çözelti ile dolduruldu. Daha sonrada jel materyali bir cam çubuk kullanılarak hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kolona dolduruldu ve kolon 24 saat süre ile aynı tamponla (0,05 M Na₃PO₄ /1 mM ditiyoerythritol, pH: 7) dengelendi. Dengeleme işlemine kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi.

Dengelenmiş Sephadex G-100 kolonuna öncelikle konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde standart protein çözeltisi (Sığır albumin-66000, karbonik anhidraz-29000, tripsin inhibitör-20000, α -laktalbumin-14200 içeren çözelti) yüklendi. Yüklenen standart protein çözeltisi kolondan 0,05 M Na₃PO₄ /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu kullanarak elüe edildi ve standart grafik çizildi. Fraksiyon toplayıcı

yardımıyla, elüatlar her tüpte 5'er mL olacak şekilde alındı. Spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar elüsyona devam edildi.

Standart protein çözeltisi kolondan geçirildikten sonra enzim saflaştırma basamakları sonucunda oluşturulan enzim havuzundan alınan 500 µL enzim kolona yüklendi ve 5mL'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Elüsyona spektrofotometrede 280 nm'de absorbans görülmeinceye kadar devam edildi. Sonuçlar standart protein çözeltisinden alınan sonuçlarla karşılaştırıldı (Whitaker 1963).

3.2.10. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} katyonlarının etkisi belirlendi.

Efektörlerin üç farklı konsantrasyonda ki (10^{-2} , 10^{-4} ve 10^{-6} M) çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 100, 200, 300, 400 ve 500 µL alındı ve toplam hacim tampon (20 mM Sitrata tamponu, pH: 4) ile 500 µL ye tamamlandı. Daha sonra tüplere 250 µL substrat çözeltisi ve 250 µL enzim ilave edildi. Her bir deneme için kör numune hazırlandı. Enzim yerine enzimin içinde bulunduğu tampon kullanılarak yapılan deneme kör olarak kabul edildi. Daha sonra tüpler 37°C 45 dk, daha sonra 95°C'da 10 dk bekletildikten sonra tüplerden 250 µL alındı ve üzerine 500 µL kit eklenerek 37°C 30 dk bekletildi. Bekletilmelerinden sonra tüplerin üzerine 1mL 2N H_2SO_4 eklenerek 540 nm de absorbans değerleri ölçülerek aktivitesi belirlendi.

3.2.11. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine kimyasal bileşiklerin etkisinin araştırılması

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM EDTA, askorbik asit, β -merkaptotanol, SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi.

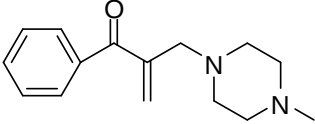
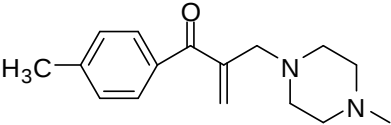
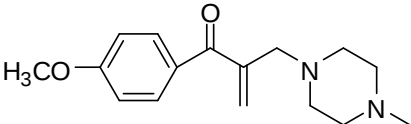
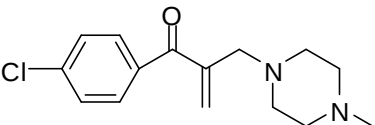
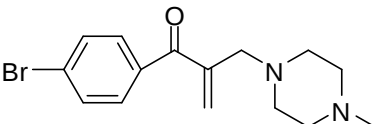
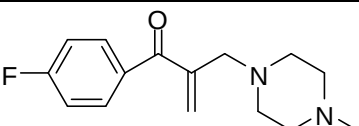
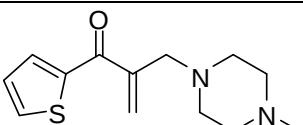
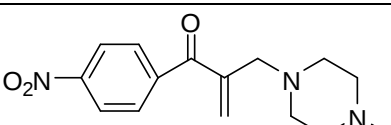
Bileşiklerin 10 mM konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 100, 200, 300, 400 ve 500 μ L alındı ve toplam hacim tampon (20 mM sitrat tamponu, pH: 4) ile 500 μ L ye tamamlandı. Daha sonra tüplere 250 μ L substrat çözeltisi ve 250 μ L enzim ilave edildi. Her bir deneme için kör hazırlandı. Enzim yerine enzimin içinde bulunduğu tampon kullanılarak yapılan deneme kör olarak kabul edildi. Daha sonra tüpler 37°C 45 dak. ardından 95°C'da 10 dak bekletildikten sonra tüplerden 250 μ L alındı ve üzerine 500 μ L kit eklenerek 37°C 30 dk bekletildi. Bekletilmelerinden sonra tüplerin üzerine 1mL 2N H₂SO₄ eklenerek 540 nm de absorbans değerleri ölçülerek aktivitesi belirlendi. Diğer 1 mM ve 0,1 mM bileşik çözeltileri için aynı işlemler tekrarlandı.

3.2.12. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerinin etkisinin araştırılması

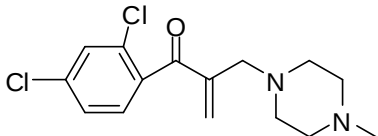
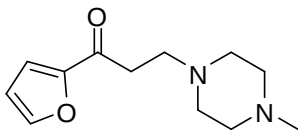
Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine, kozmetikte ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılan pantenol, cephalotin, betamethason, linoleik asit ve E vitaminin 10 mM, 1 mM, 0,1 mM'de etkileri belirlendi.

Ayrıca cilt kanseri tedavisinde iyileştirici etkisi olduğu bilinen, aşağıda açık yapıları gösterilmiş olan ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde sentezlenmiş olan TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin etkileride araştırıldı. TA_x moleküllerinin etkisi 500 ppm'de belirlendi. Bunun için aktivite, sinigrin varlığında belirlendi.

Çizelge 3.1. TA_x moleküllerinin açık yapıları

Formülü	Simgesi
	TA ₁
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-fenilprop-2-en-one	
	TA ₂
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-p-tolilprop-2-en-one	
	TA ₃
1-(4-metoksifenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one	
	TA ₄
1-(4-klorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one	
	TA ₅
1-(4-bromofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one	
	TA ₆
1-(4-florofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-one	
	TA ₇
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-one	
	TA ₈
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-one	

Çizelge 3.1. (devam)

Formülü	Simgesi
	TA ₉
1-(2,4-diklorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)prop-2-en-1-one	
	TA ₁₀
1-furan-2-il)-3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-one	

Pantenol, sephalotin, betamethasone, linoleik asit ve E vitamini denemeleri için kullanılan prosedür şöyledir:

Her üç konsantasyonda aktivite tayini için 500 µL enzim çözeltisi, 750 µL sinigrin çözeltisi, 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL ve 250 µL katyon çözeltisinin toplam hacmi saf su ile 1,5 mL'ye tamamlanacak şekilde ilave edildi. Kör tüplere enzim yerine sitrat tamponu konuldu. Tüpler 40 dak 37°C'de ve 10 dak 100°C'de su banyosunda bekletildi. Her bir tüpten 250 µL alınarak üzerine 500 µL glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37°C'de bekletildi ve son olarak 1'er mL 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm'de absorbansları ölçüldü. Diğer 1 mM ve 0,1 mM katyon çözeltileri için aynı prosedür takip edilmiştir.

TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ molekülleri denemeleri için kullanılan prosedür şöyledir:

Beş ayrı deney tüpüne 500 ppm 10 µL, 30 µL, 50 µL, 70 µL, 100 µL etken madde, 500 µL sitrat tamponu (20 mM pH:4), 300 µL sinigrin (20 mM), 80 µL saf myrosinase enzimi ilave edildi ve son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Kör tüplere ise etken

madde konulmadı. Tüpler 40 dak 37°C’de sonrasında 10 dak 100°C’de su banyosunda bekletildi. Her bir tüpten 250 µL alındı ve 500 µL üzerine glukoz tayin kiti ilave edildi ve tekrar 40 dak 37°C’de bekletildi. Son olarak 1’er mL 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm’de absorbanları ölçüldü.

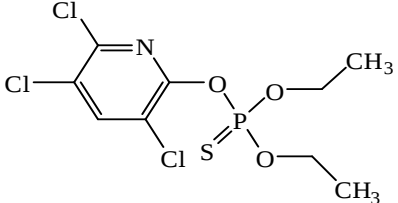
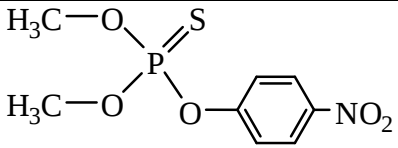
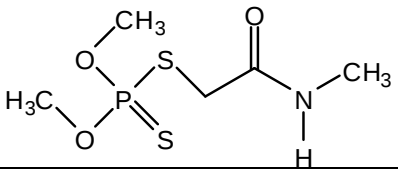
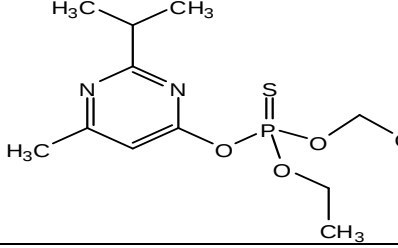
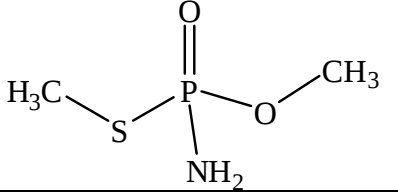
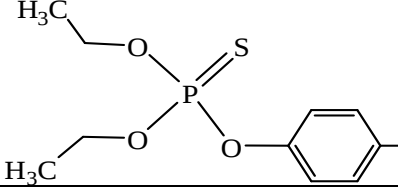
3.2.13. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin araştırılması

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention etkisi araştırıldı. Bunun için aktivite sinigrin varlığında belirlendi.

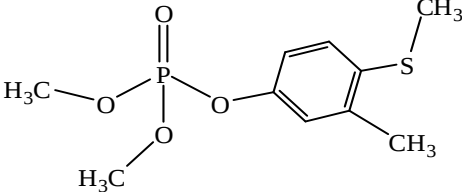
Aktivite tayini için 500 µL enzim çözeltisi, 750 µL sinigrin çözeltisi, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µL, 500µL 100 ppm pestisit çözeltisinin toplam hacimi (20 mM Sitrat tamponu pH: 4) ile 500 µL ye tamamlandı. Her bir deneme için kör numune hazırlandı. Enzim yerine enzimin içinde bulunduğu tampon kullanılarak yapılan deneme kör olarak kabul edildi. Tüpler 40 dak 37°C’de ve 10 dak 100°C’de su banyosunda bekletildi. Her bir tüpten 250 µL alınarak üzerine 500 µL glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37°C’de bekletildi ve son olarak 1’er mL 2 N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm’de absorbanları ölçüldü.

Diğer 10 ppm ve 1 ppm pestisit çözeltileri için işlem tekrarlandı.

Çizelge 3.2. Pestisitlerin açık yapıları

Formülü	Adı
	Kloroprifos etil
O,O-dietil O-3,5,6-trichloropiridin-2-il fosforotiyoat	
	Metil paratyon
O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotiyoat	
	Dimetoat
O,O-dimetil S-2-(metilamino)-2-oxoetil fosforditiyonat	
	Diazinon
O,O-dietil O-2-izopropil-6-metilpirimidin-4-il fosfortiyoat	
	Metamidopos
O,S-dimetil fosforamidotiyoat	
	Etil paratyon
O,O-dietil O-4-nitrofenil fosfortiyoat	

Çizelge 3.2. (devam)

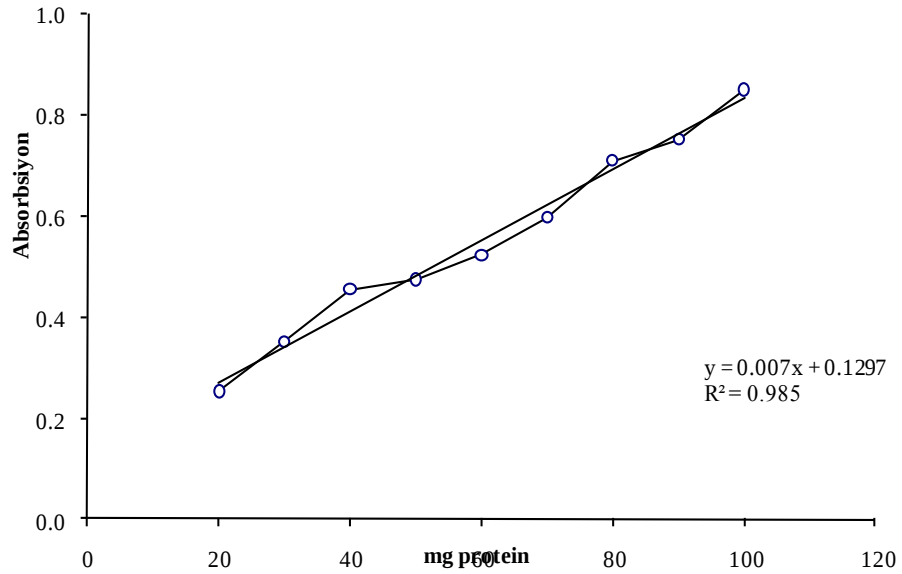
Formülü	Adı
	Fention
Dimetil 3-metil-4-(metiltiyo) fenil fosfat	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu bölümde tablo ve şekiller ile gösterilmiştir.

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

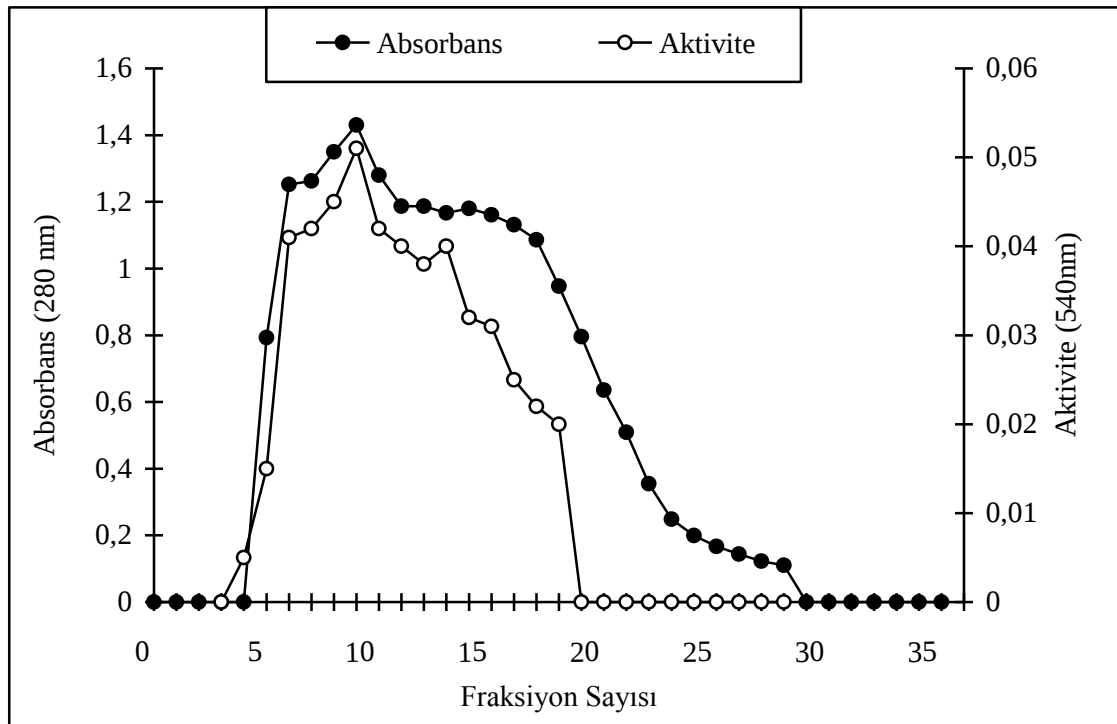
Protein kantitatif tayininde coomassie brilliant blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie brilliant blue yöntemi ile bir standart eğri hazırlandı. Standart serum albumin çözeltileri ile hazırlanan homojenatlarda ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) Bitkisinden Myrosinaz Enzimi Saflaştırma Sonuçları

Enzim, Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı gibi çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden 3 basamakta saflaştırıldı. 1. basamakta homojenata %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. %40 - %70’lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çökelek 0,15 M NaCl içeren 20mM Tris (pH:7,5) tamponu ile çözülüp, aktivite tayini yapılırca yüksek myrosinaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. 2. basamakta ise, Sephakil S200 kolonuna yüklendi, 3. basamakta ise konkavalin A afinite kolonu kullanılarak enzim saflaştırıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuz oluşturuldu ve karakterizasyon için saklandı. Bitkiden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 4.2. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden Konkavalin-A Sepharose 4B kolonu ile saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği

*Kolon çapı 1,5 cm ve boyu 30 cm, elüsyon hızı 20 mL/saat ve fraksiyon hacmi 5 mL.

4.2.1. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırma basamakları

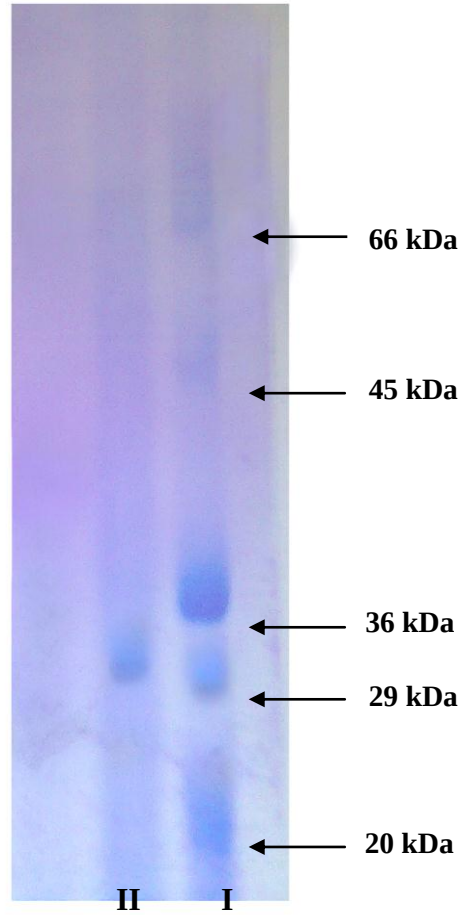
Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden sıvı azotla parçalayıp santufijleyerek homojenat elde edildi. Elde edilen homojenattan, amonyum sülfat çöktürme basamağı, Sephakil S200 ve Konkavalin A'dan elde edilen numunelerden 1'er mL alındı, myrosinaz aktivitesi tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre myrosinaz enziminin kaç kat saflaştığı hesaplandı ve sonuçlar aşağıdaki çizelgede gösterildi.

Çizelge 4.1. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinde myrosinaz enziminin saflaştırılma basamakları

	Aktivite (EU/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam			Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
			Hacim (ml)	Protein (mg)	Aktivite (EU)			
Ham Ekstrakt	0,077	4,2	100	420	7,7	0,018	100	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%50-70) Çöktürmesi	0,09	3,7	81	299	7,29	0,024	94,7	1,33
Sephakril S200 Elüsyonu	0,107	0,16	50	8	5,35	0,668	69,5	37,11
Konkavalin A (Saf Enzim)	0,135	0,032	30	0,96	4,05	4,218	52,6	234,3

4.2.2. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi

Kromatografik işlemler sonucu çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi yapıldı. Enzimin saf olduğu belirlendi ve jelin fotoğrafı çekildi. Şekil 4.3’de gösterildi.



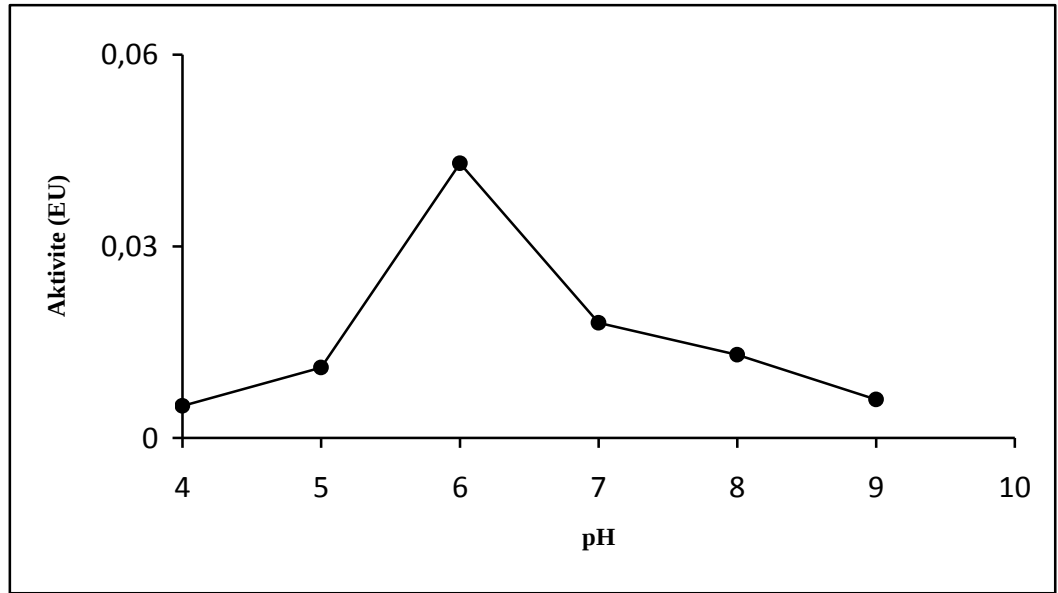
Şekil 4.3. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı

*I:standart protein; tripsin inhibitör (20 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), albumin (45 kDa) bovine albumin (66 kDa), II: çadır (*Prangos ferulecea* L.) saflaştırılan myrosinase enzimi.

4.2.3. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi ile yapılan kinetik çalışmalar

4.2.3.a. Myrosinaz enziminin optimum pH sonuçları

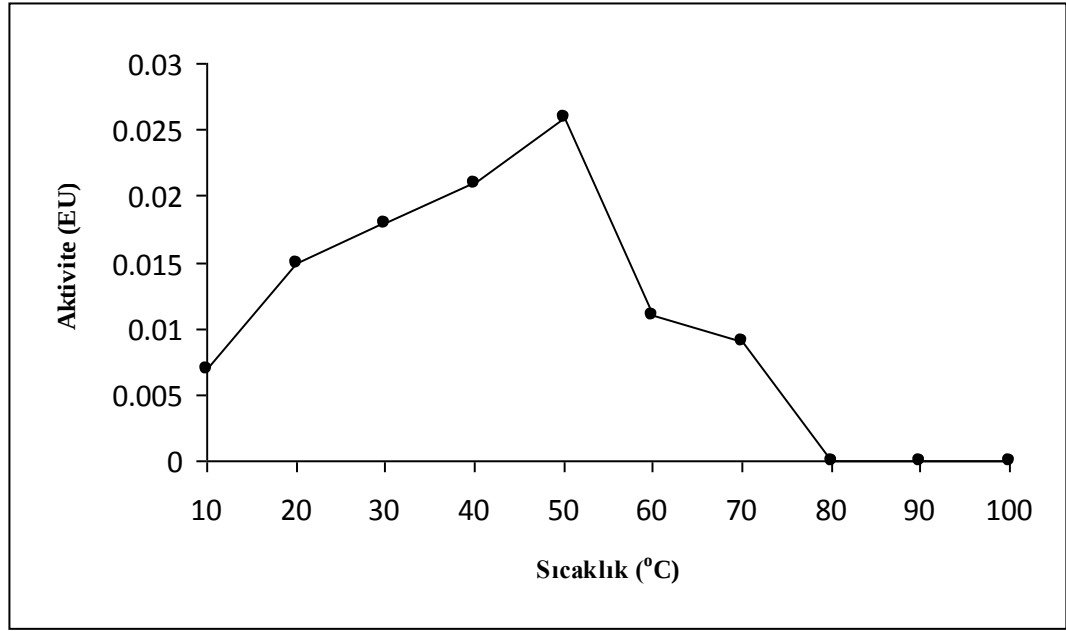
Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere deneyler Bölüm 3.2.8.a.' da belirtildiği şekilde yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite - pH grafiği Şekil 4.4' de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan Myrosinaz enzimi üzerine pH'nın etkisi

4.2.3.b. Myrosinaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere deneyler Bölüm 3.2.8.b.'de belirtildiği şekilde yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite–sıcaklık grafiği çizildi. Enzim için yapılan işlemlerin sonuçları Şekil 4.5'de gösterildi.

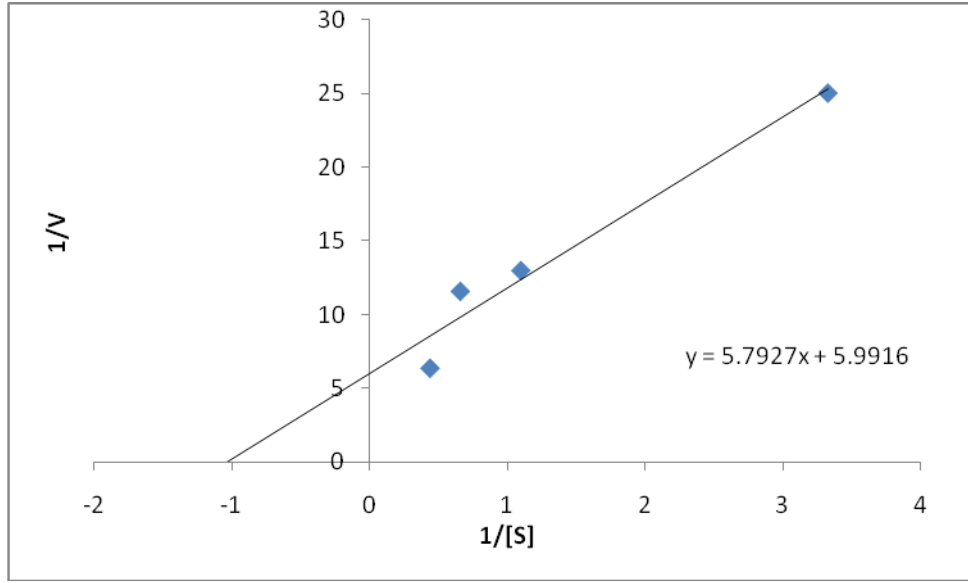


Şekil 4.5. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.2.3.c. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin hız sabiti (K_m) ve maximum hızı (V_{max})'ın belirlenmesi için substrat olarak sinigrin kullanıldı. Yükselen substrat konsantrasyonuna karşı aktiviteyi bulmak amacıyla dört farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan çaçır bitkisi için V_{max} ve K_M değerleri ise sırasıyla 0,166 mg/L.dak ve 0,96 mM olarak belirlendi.

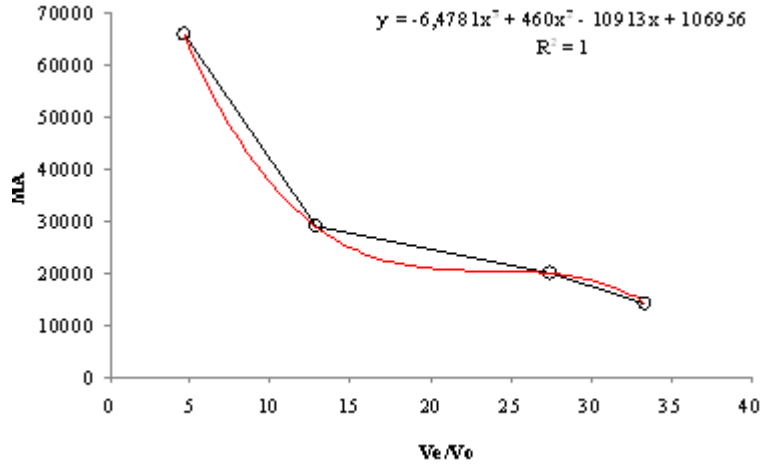


Şekil 4.6. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin sinigrin substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

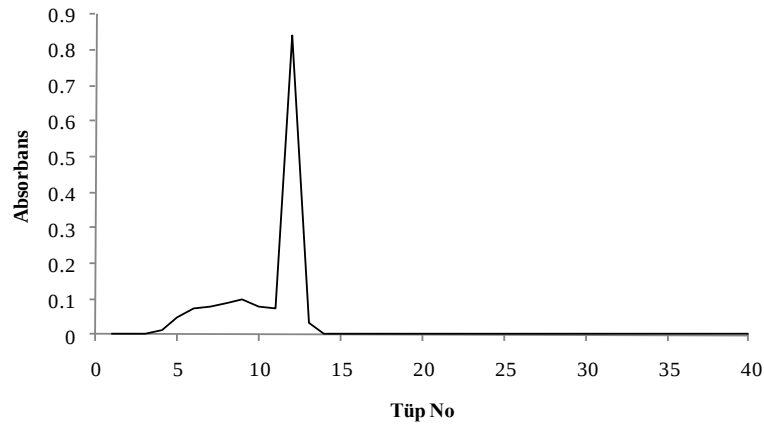
4.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak tayin edildi. Dengelenmiş kolona, bovine albumin 66000, carbonic anyhydrase 29000, tyripsin inhibitör 20000, α -lactalbumin 14200 içeren önce standart protein çözeltileri yüklenerek 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra molekül ağırlığı tayin edilecek olan saflaştırılmış myrosinaz enzimi kolondan geçirildi ve 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu.

Jel filtrasyon kromatografisi kullanarak çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden elde edilen myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 33982 D (≈ 34000 D) olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbans grafiği Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.



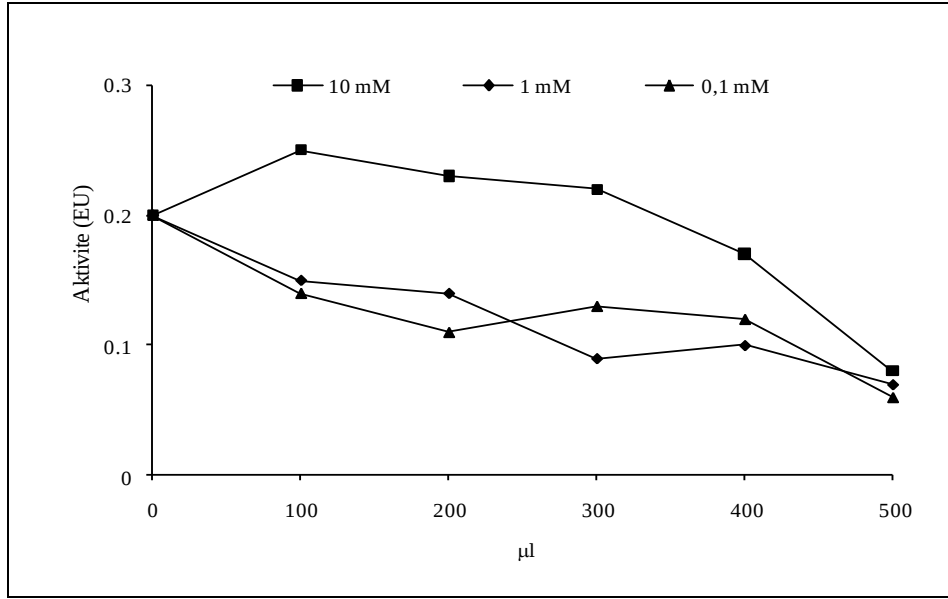
Şekil 4.7. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği. V_e : elüsyon hacmi, V_o : kolonun boşluk hacmi



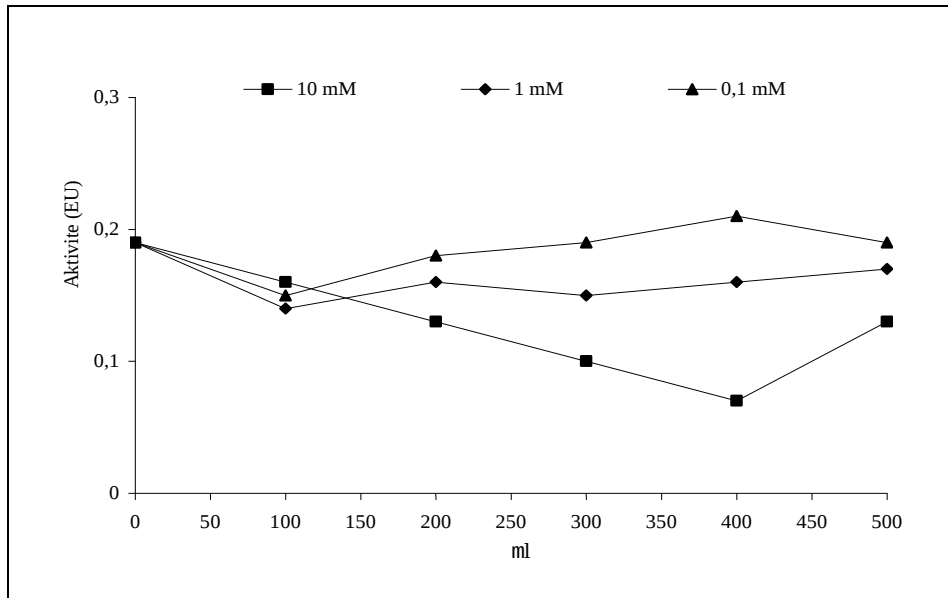
Şekil 4.8. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği.

4.2.5. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması

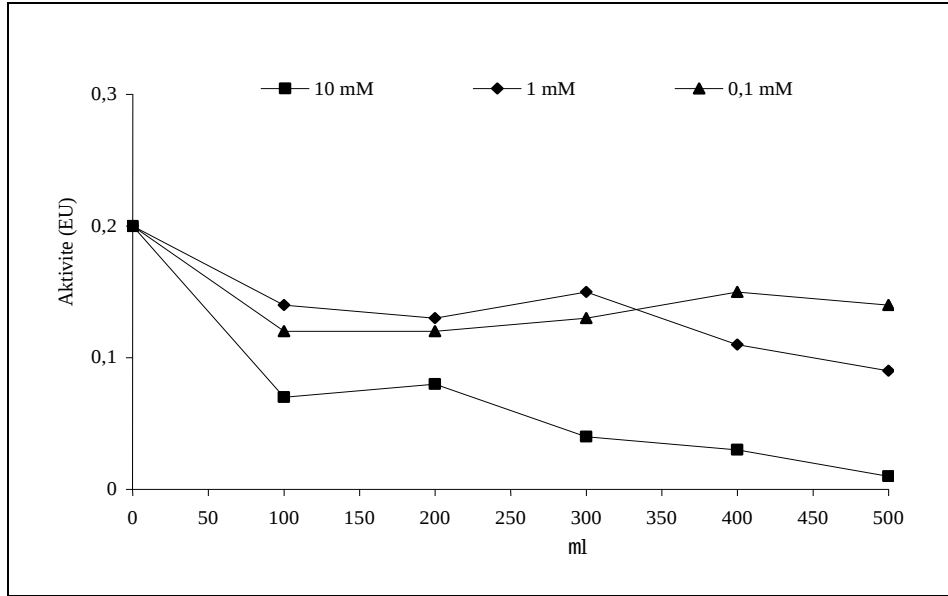
Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} katyonlarının etkisi belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de görülmektedir.



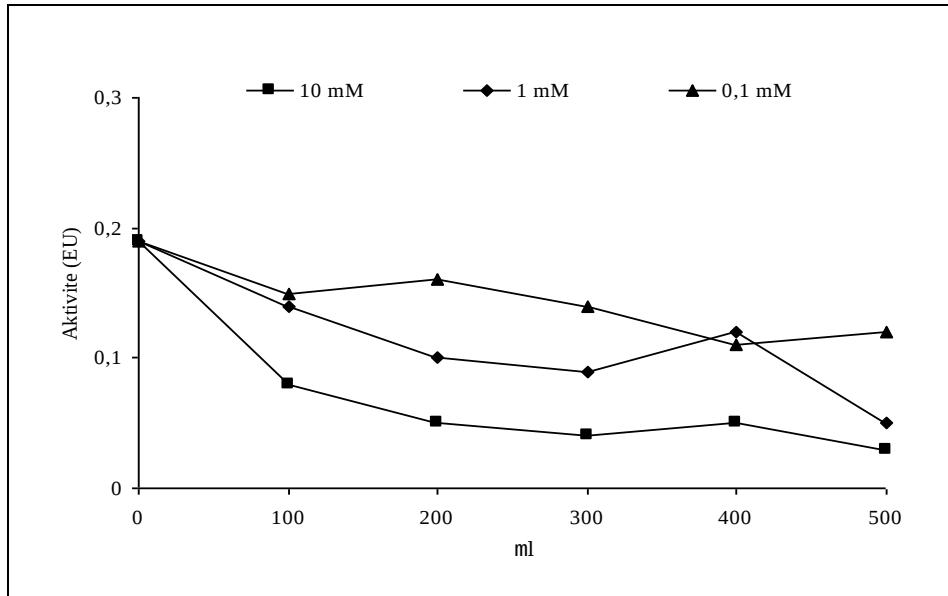
Şekil 4.9. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi.



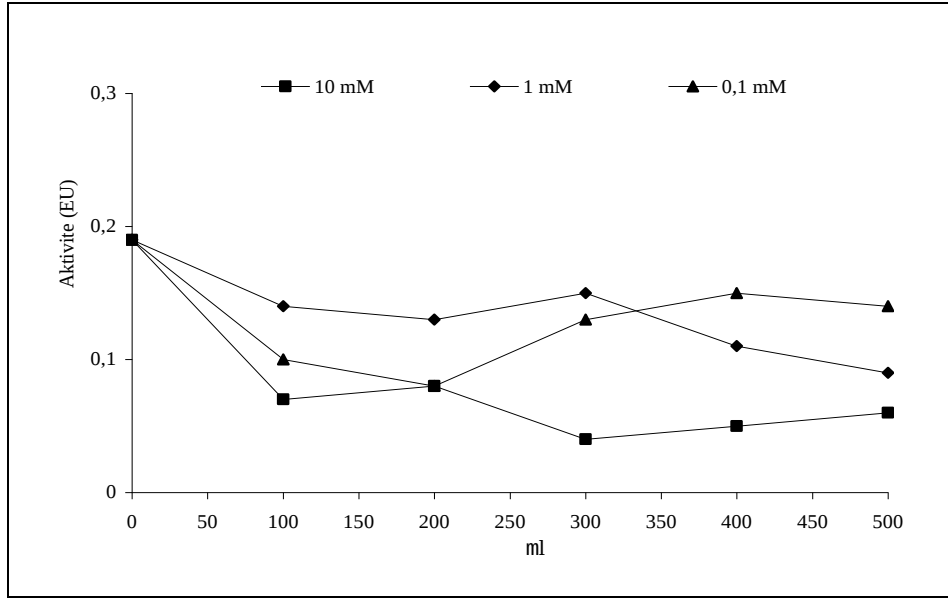
Şekil 4.10. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi.



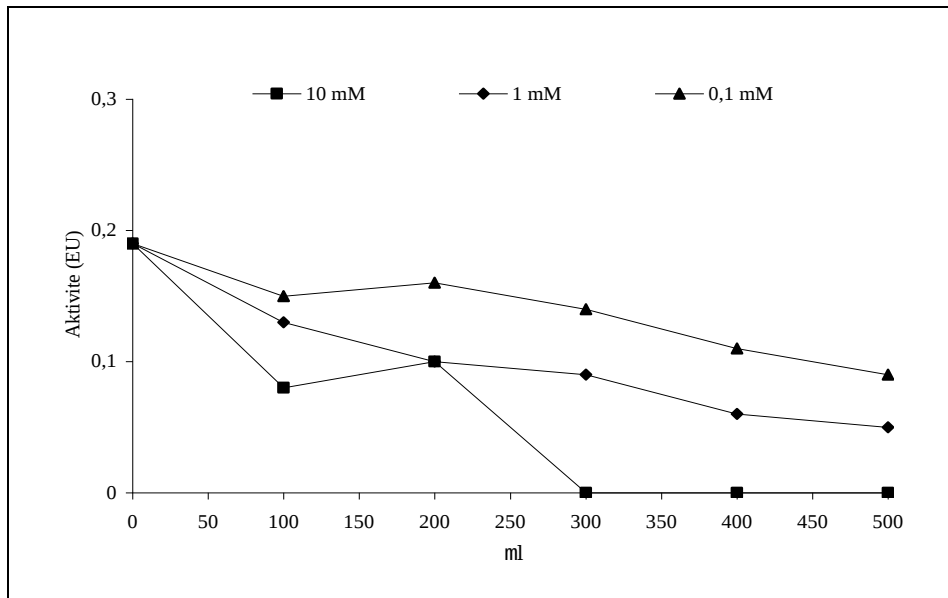
Şekil 4.11. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi.



Şekil 4.12. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} 'nin etkisi.



Şekil 4.13. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.

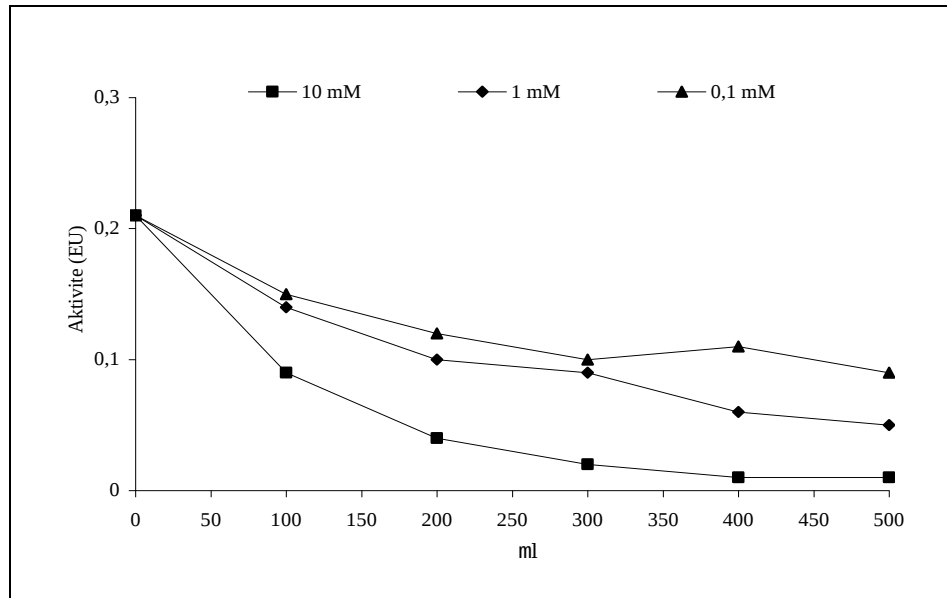


Şekil 4.14. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'ün etkisi

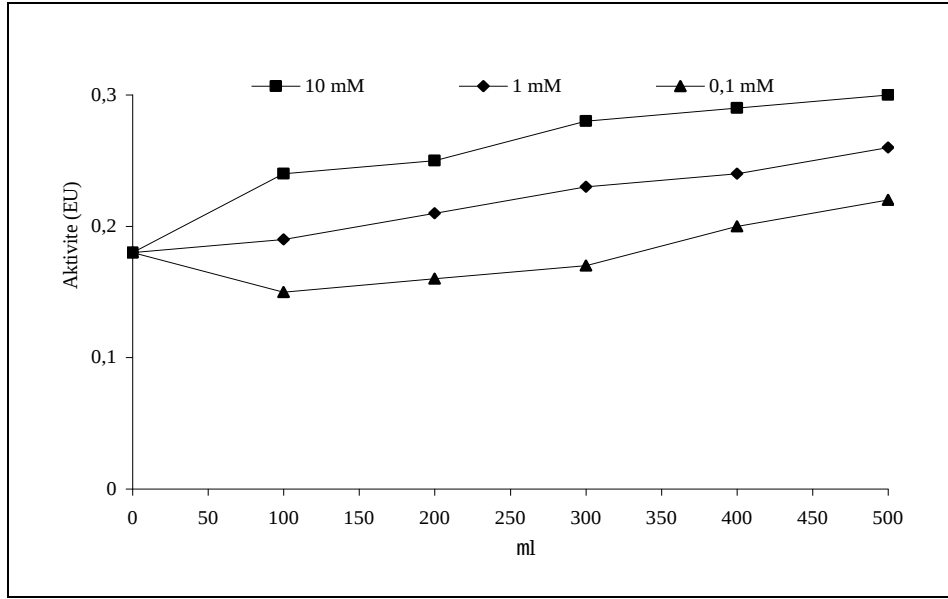
4.2.6. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin etkisinin belirlenmesi

Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM EDTA, Askorbik asit, β -Merkaptoetanol, SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi.

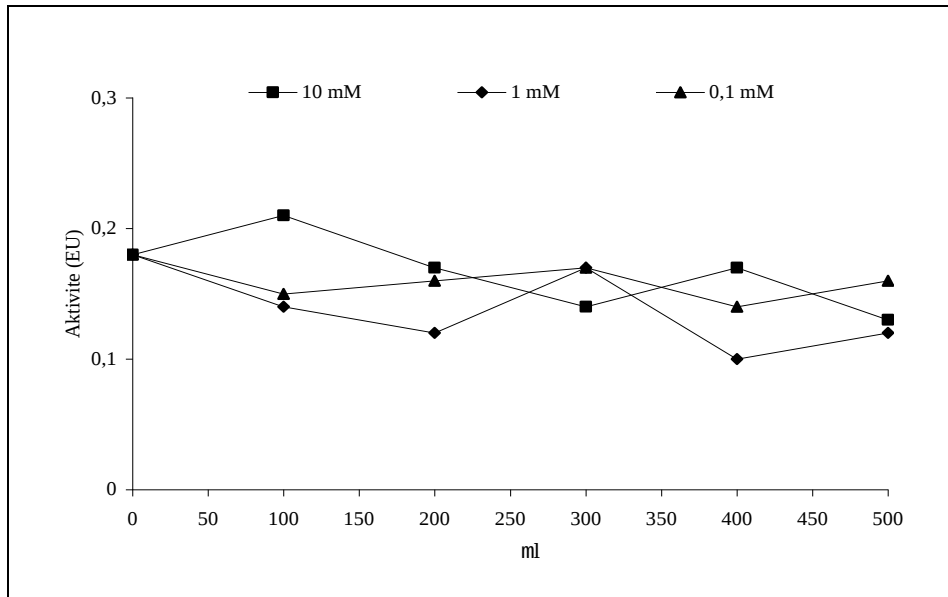
Sonuçlar Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de görülmektedir.



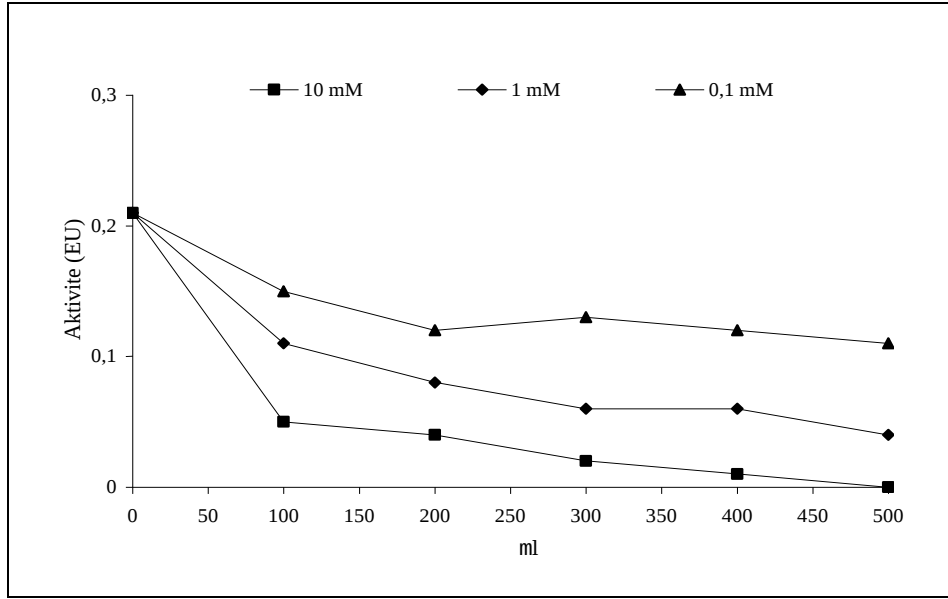
Şekil 4.15. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA’nın etkisi



Şekil 4.16. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Askorbik asit'in etkisi



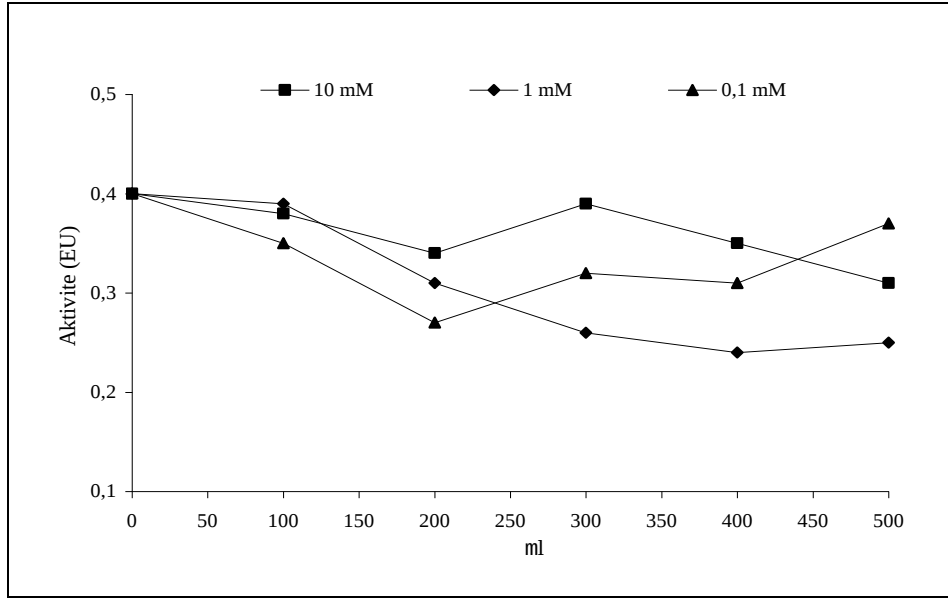
Şekil 4.17. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine β -merkaptetanölün etkisi



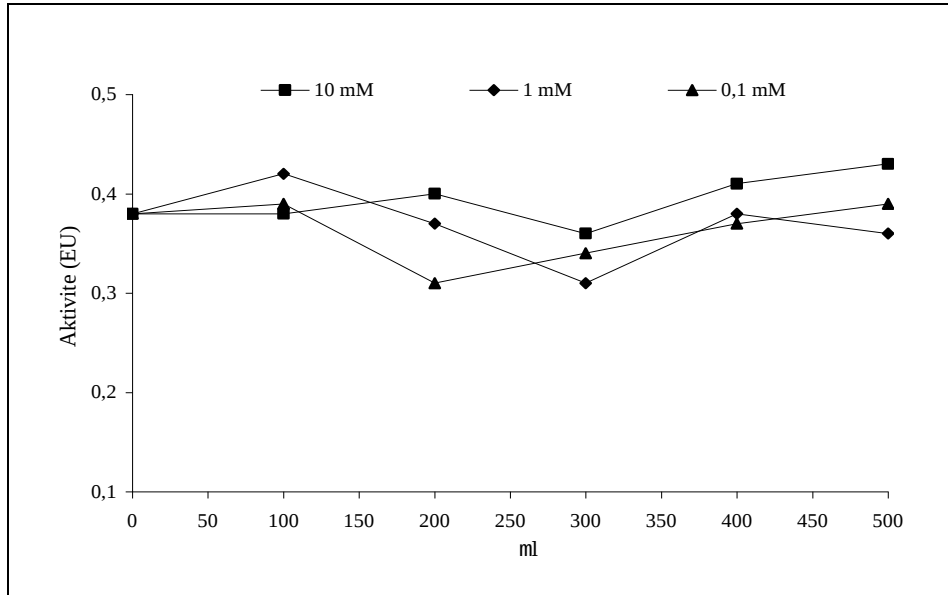
Şekil 4.18. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi

4.2.7. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin belirlenmesi

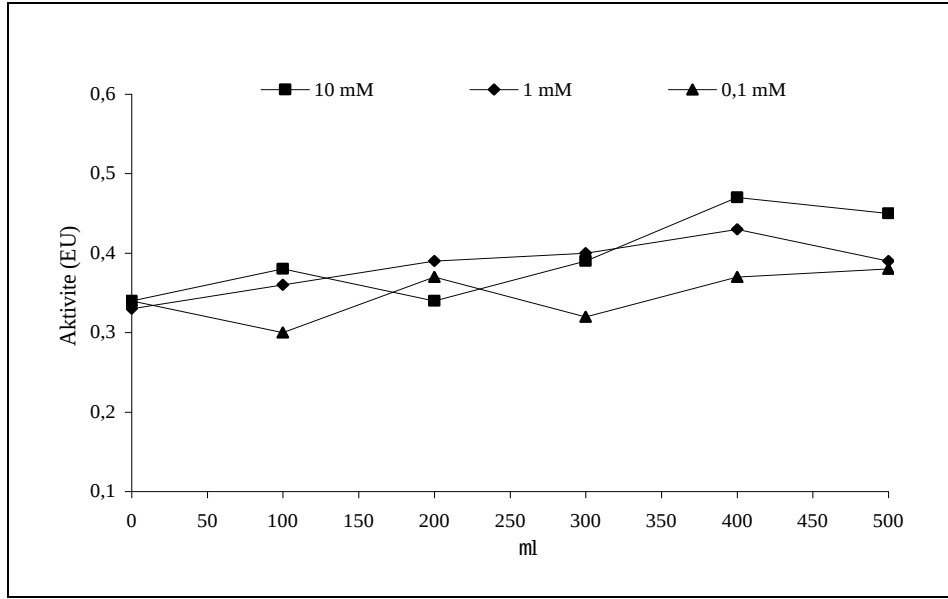
Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM'da pantenol, cephalotin, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin etkisi ve 500 ppm'de TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin etkisi 3.2.12'deki prosedür izlenerek belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26 Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de grafik halinde verilmiştir.



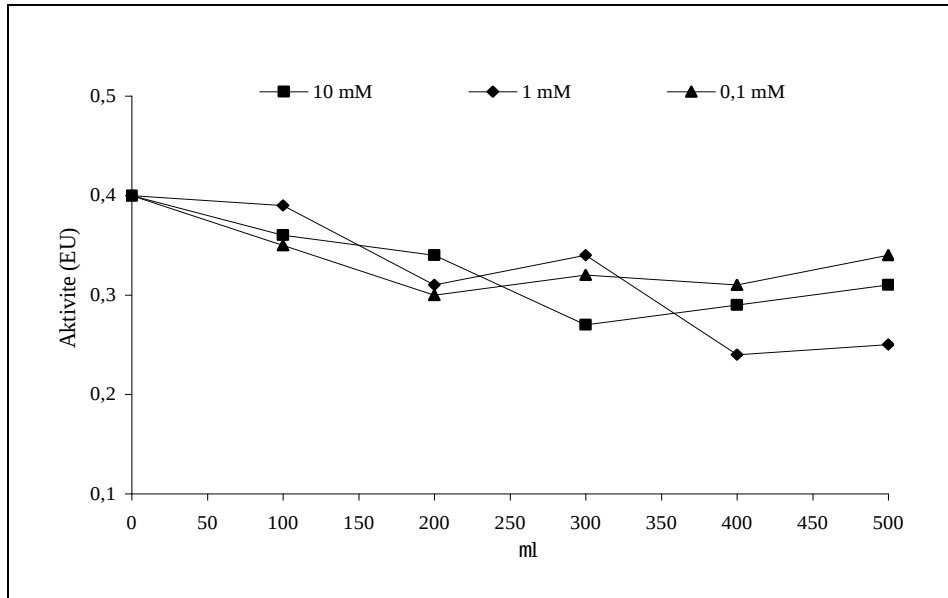
Şekil 4.19. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine pantenol' un etkisi



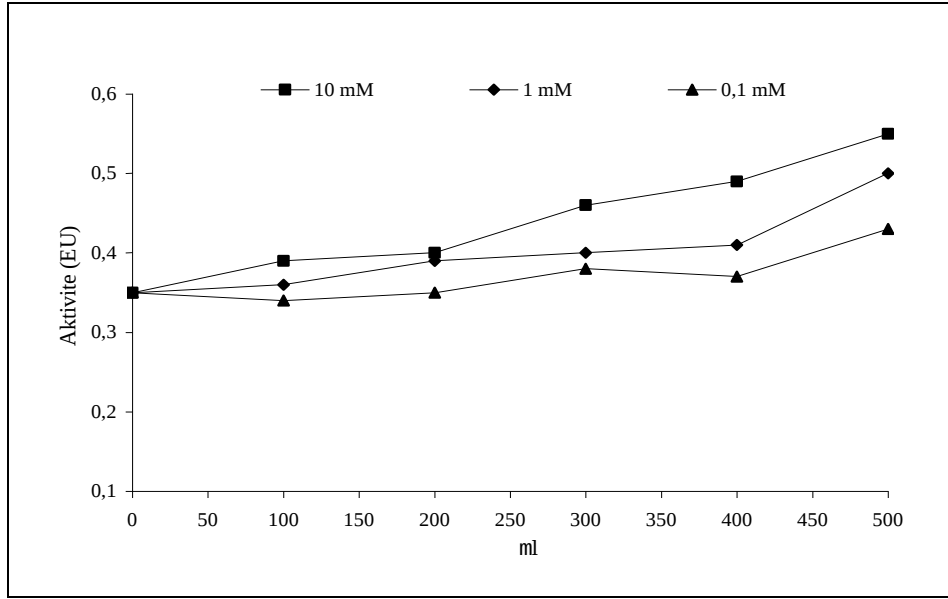
Şekil 4.20. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine betamethasone' un etkisi



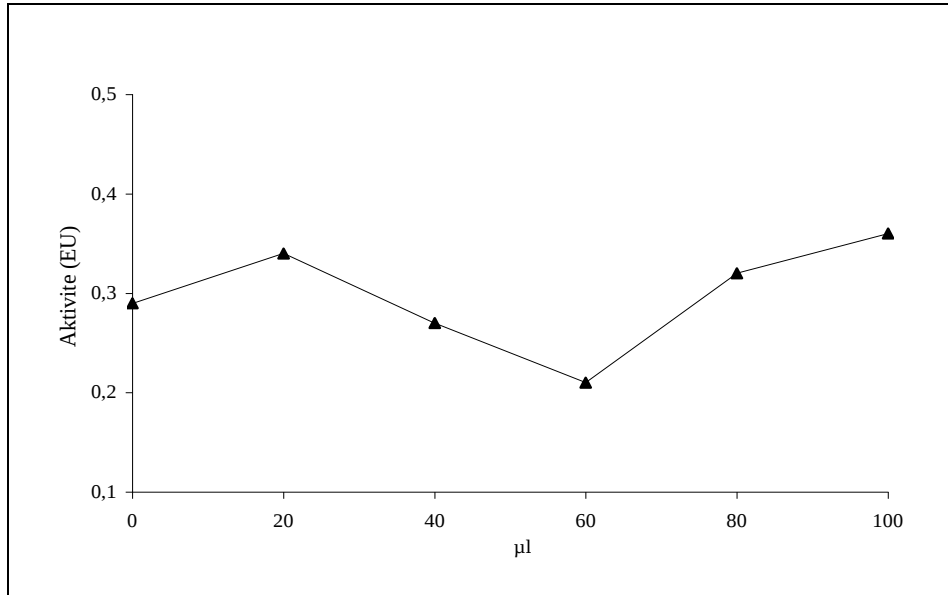
Şekil 4.21. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine linoleik asit' in etkisi



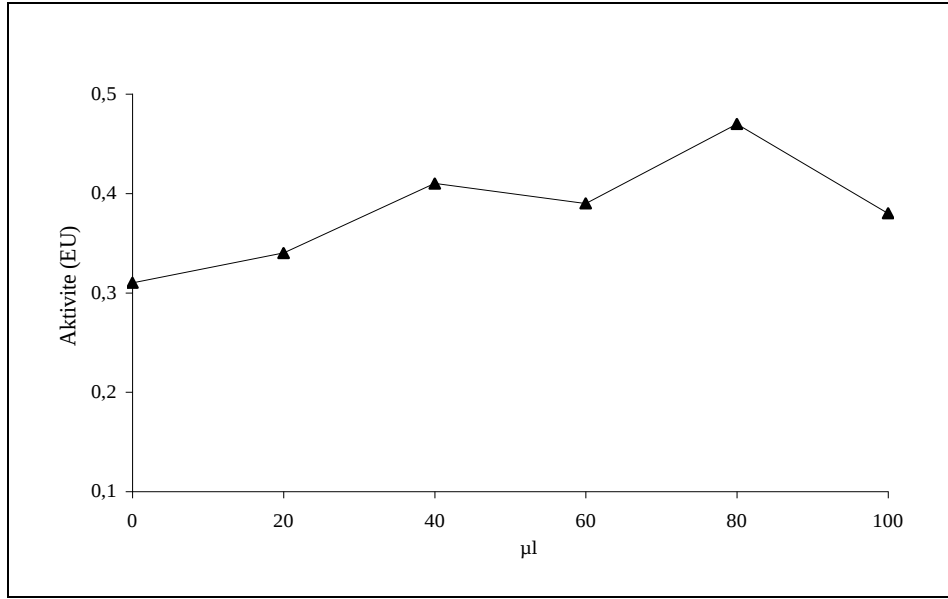
Şekil 4.22. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sephalotin' in etkisi



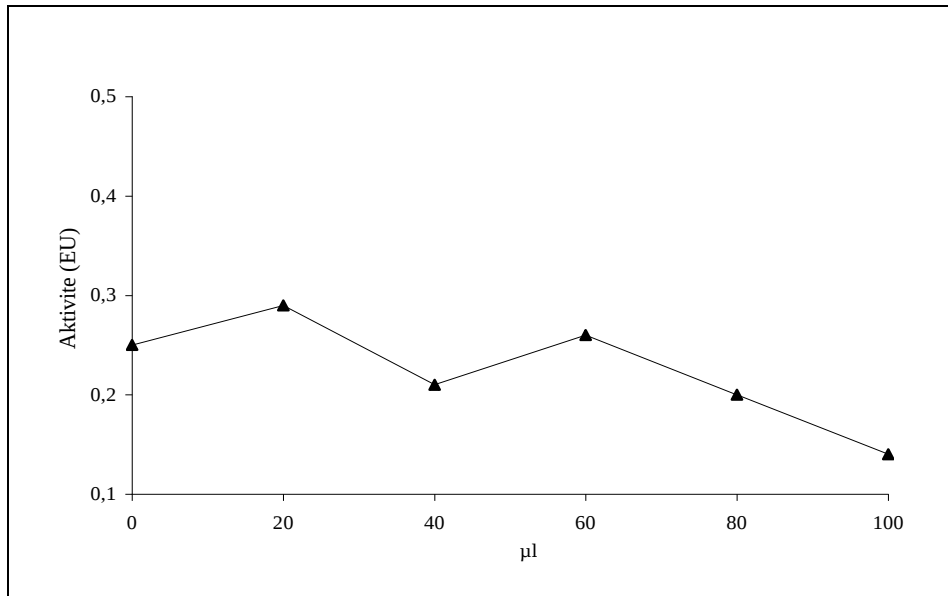
Şekil 4.23. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine E vitamini' nin etkisi



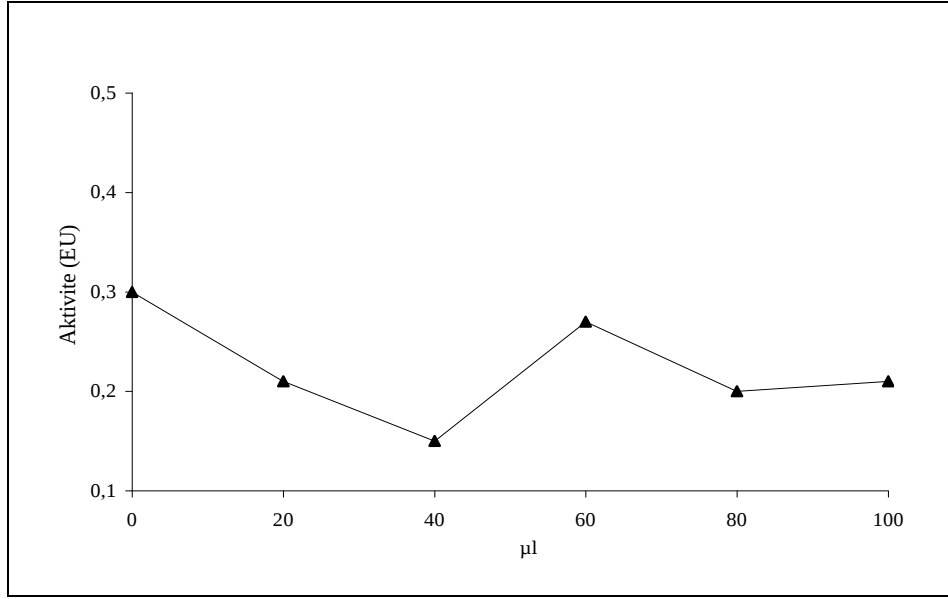
Şekil 4.24. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₁'in etkisi



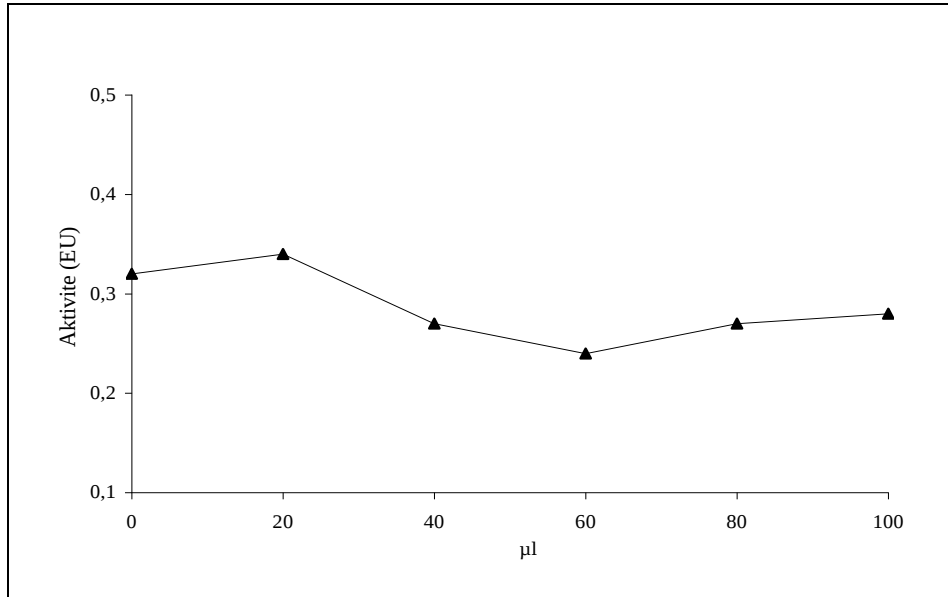
Şekil 4.25. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₂'nin etkisi



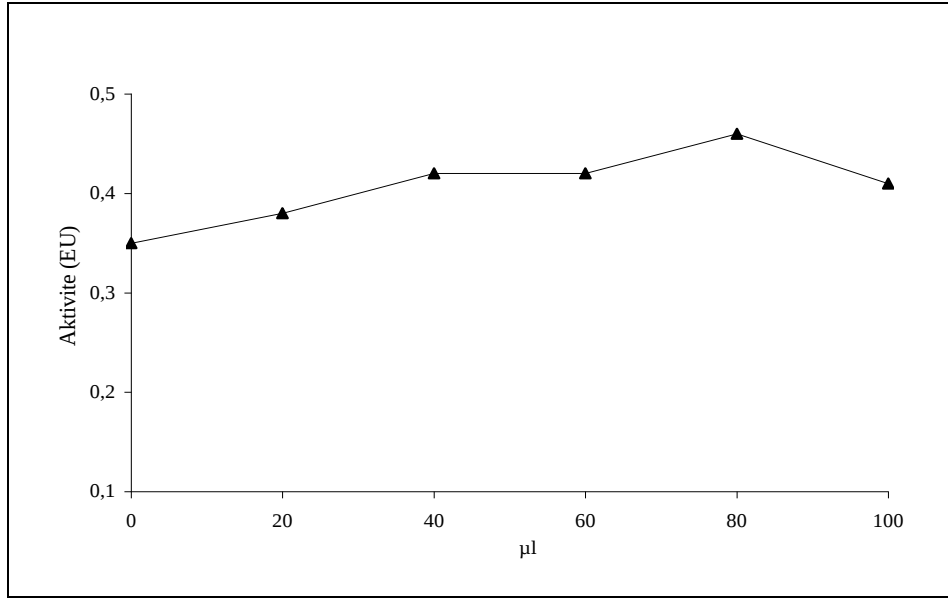
Şekil 4.26. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₃'ün etkisi



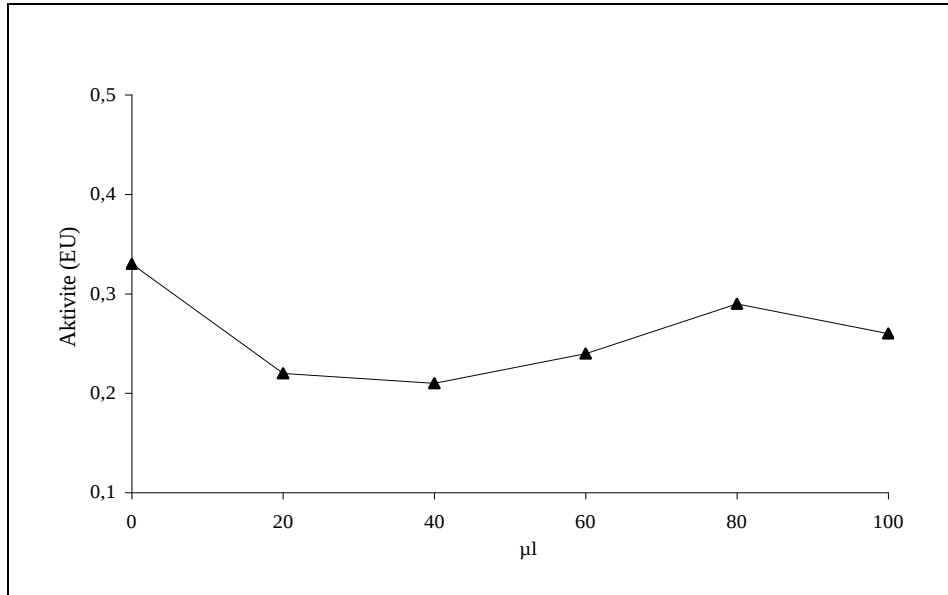
Şekil 4.27. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₄'ün etkisi



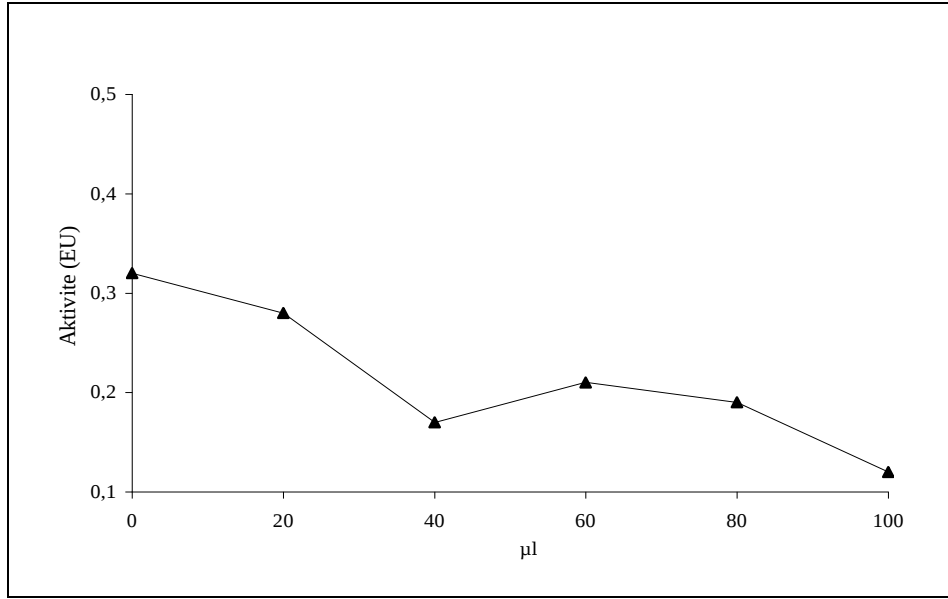
Şekil 4.28. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₅'in etkisi



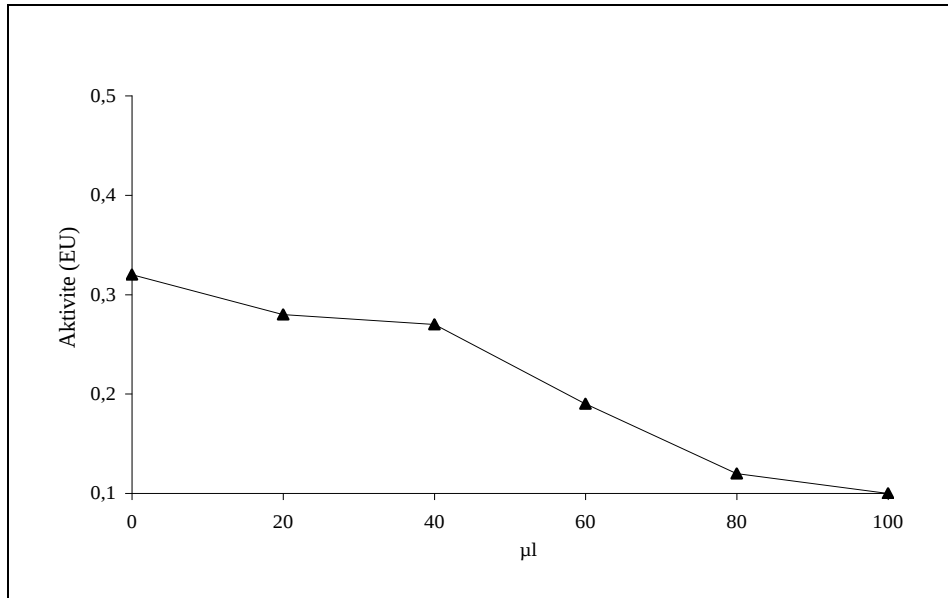
Şekil 4.29. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₆'nın etkisi



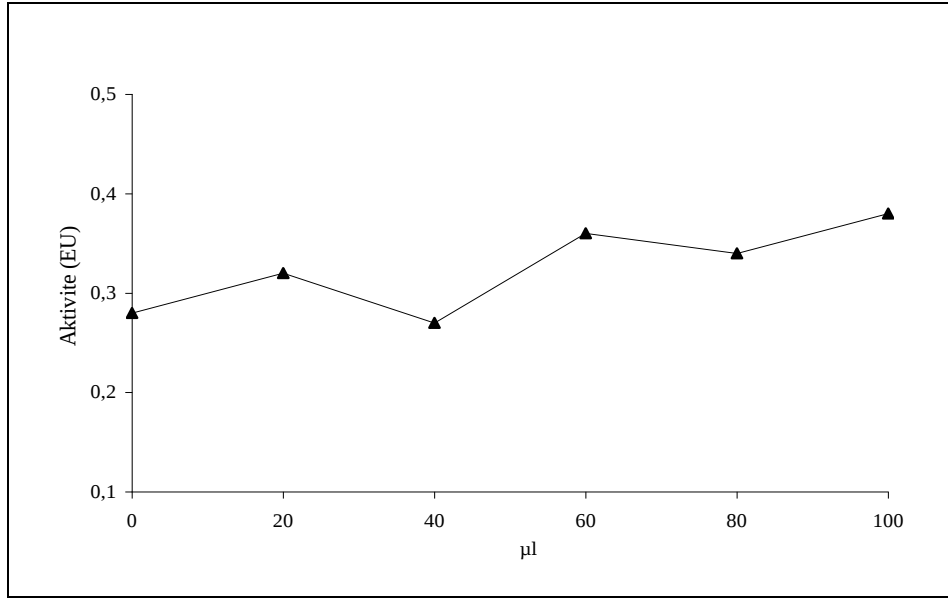
Şekil 4.30. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₇'nin etkisi



Şekil 4.31. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₈'in etkisi



Şekil 4.32. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₉'un etkisi

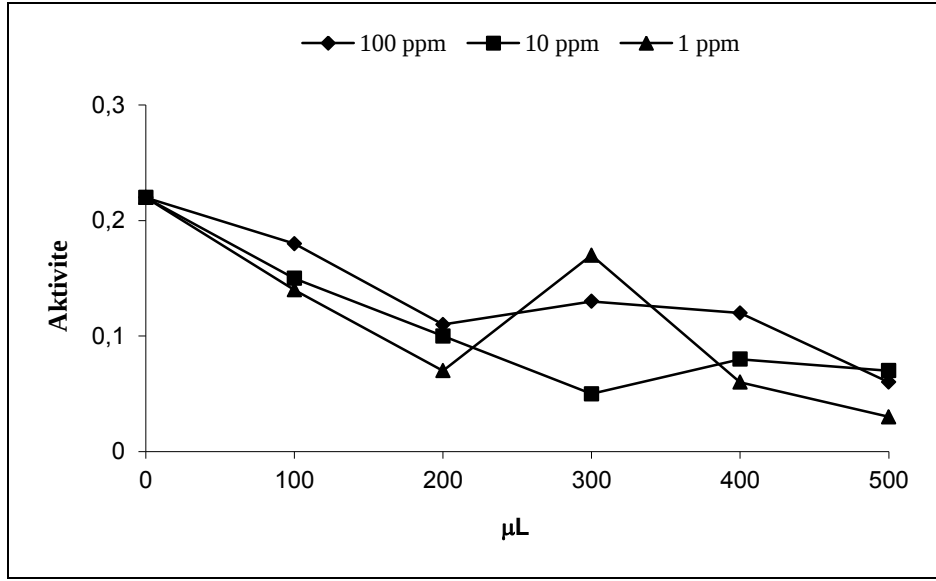


Şekil 4.33. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₁₀'un etkisi

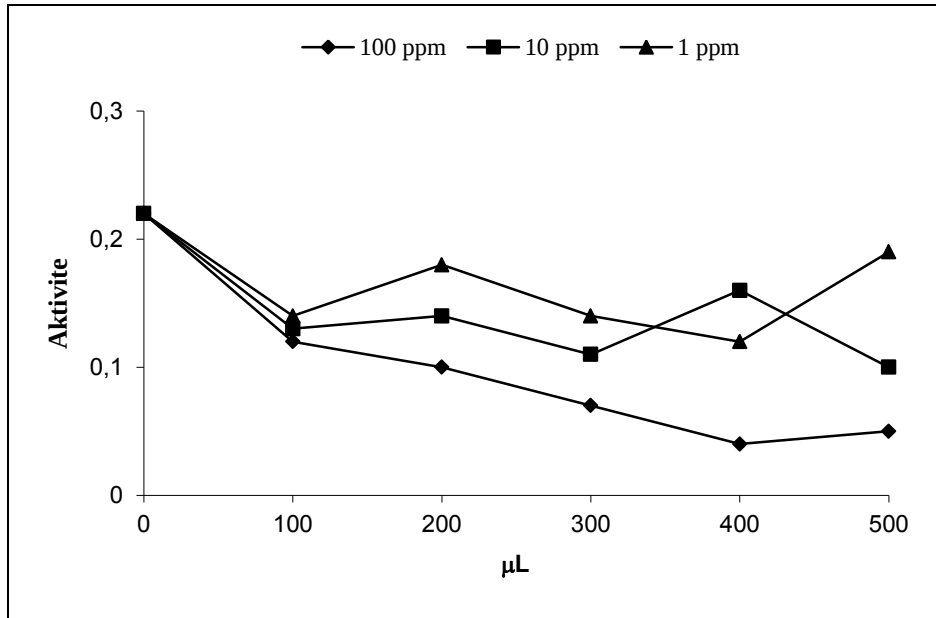
4.2.8. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin belirlenmesi

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention'un etkisi belirlendi.

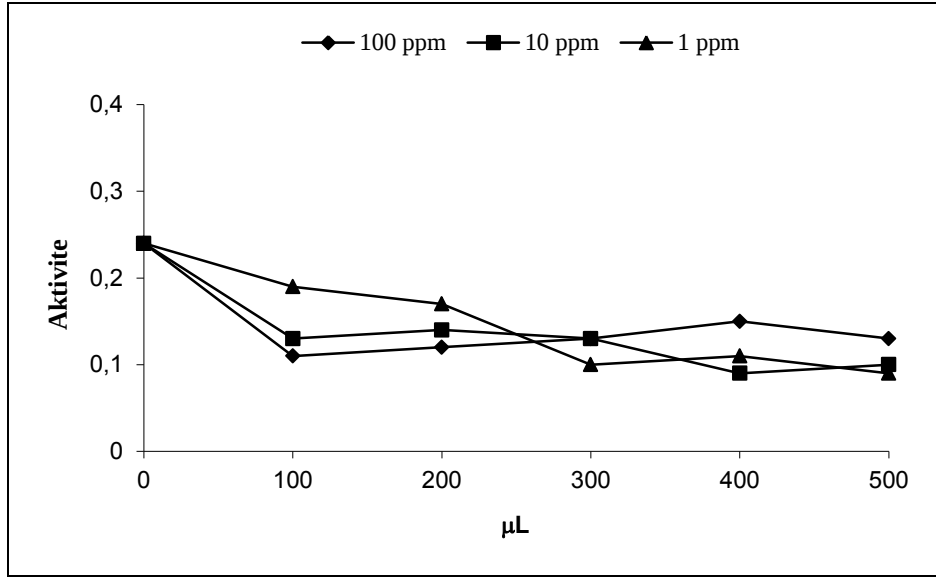
Sonuçlar Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'da görülmektedir.



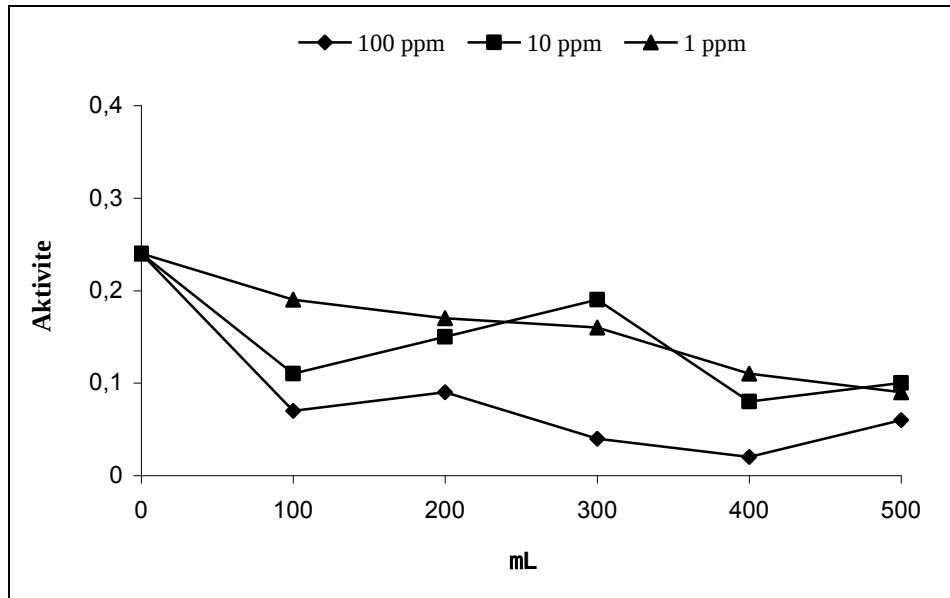
Şekil 4.34. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine klorprifos etil'in etkisi.



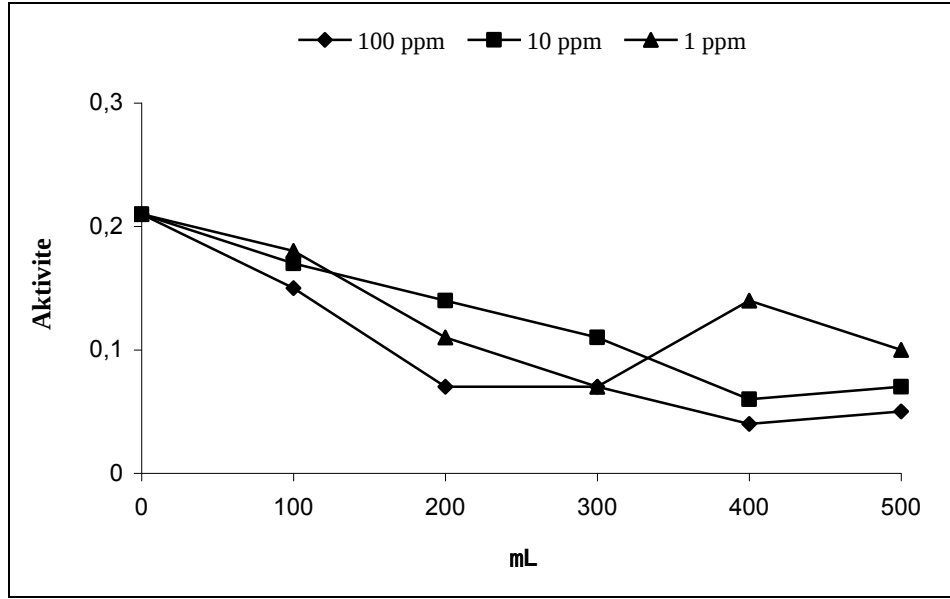
Şekil 4.35. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi.



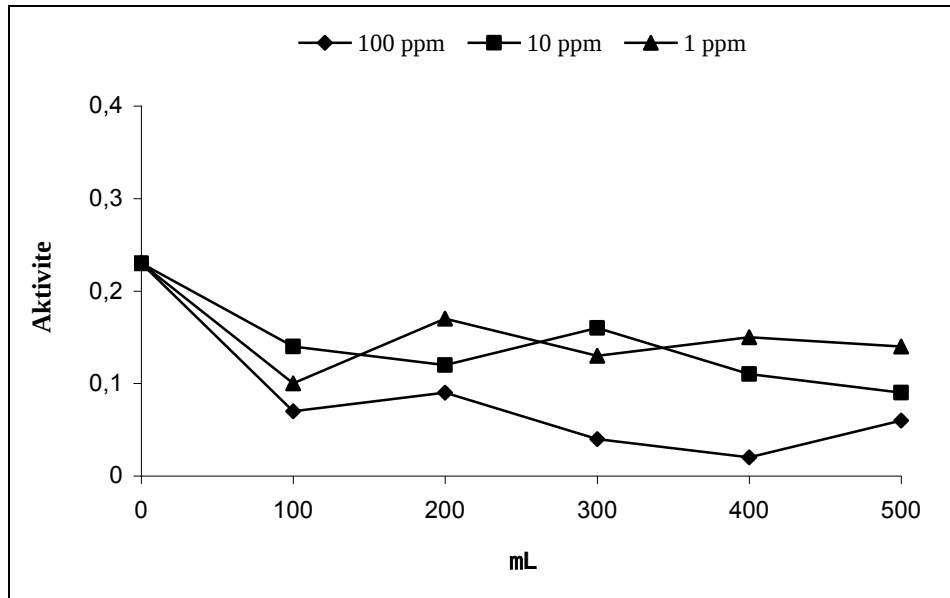
Şekil 4.36. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi.



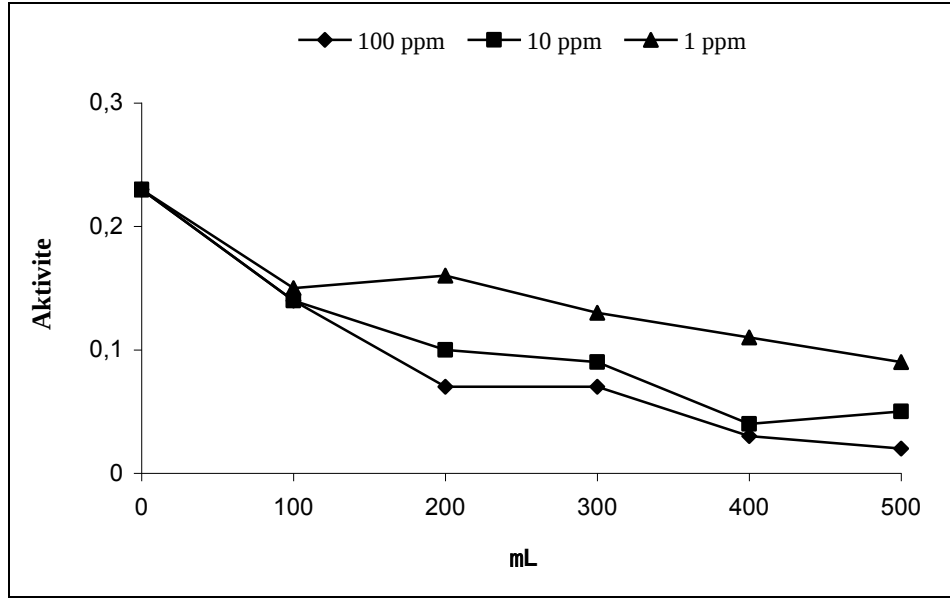
Şekil 4.37. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'un etkisi.



Şekil 4.38. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metamidopos'un etkisi.



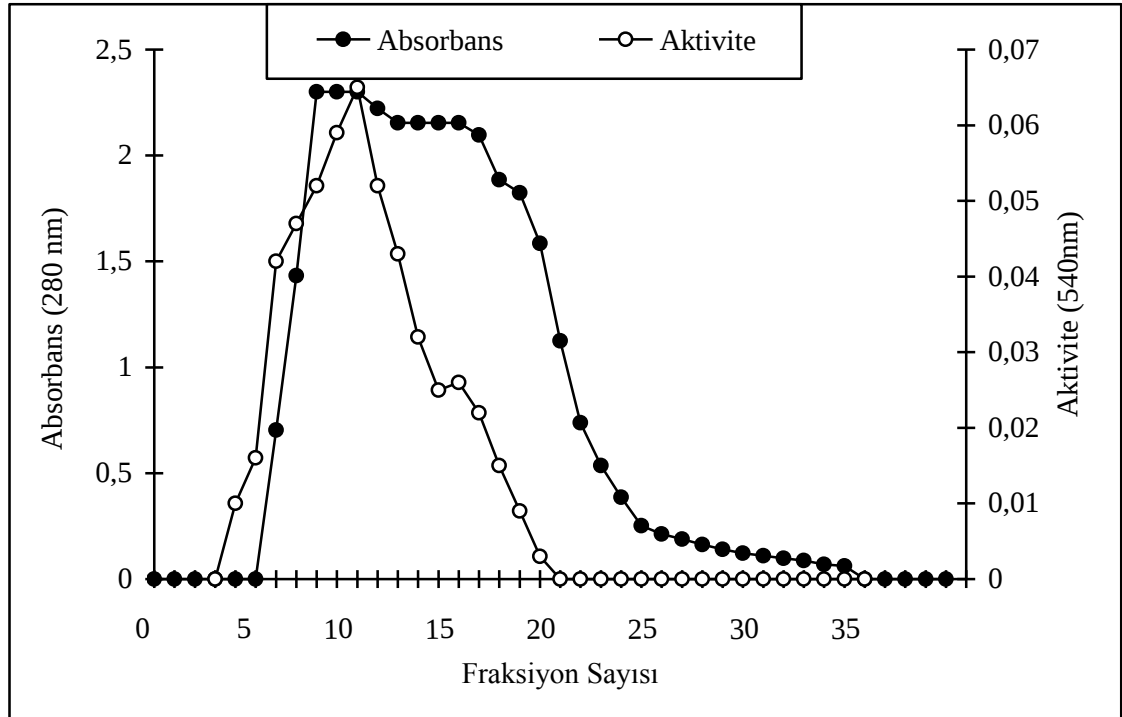
Şekil 4.39. Çaçır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi.



Şekil 4.40. Çadır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine fenthion'un etkisi

4.3. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırma sonuçları

Enzim, Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi çadır kabani kereviz (*Smyrniun olusatrum* L.) bitkisinden 3 basamakta saflaştırıldı. 1. basamakta homojenata %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. %40 - %70'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çökelek 0,15 M NaCl içeren 20mM Tris (pH:7,5) tamponu ile çözülüp, aktivite tayini yapılırken yüksek myrosinaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. 2. basamakta ise, Sephakil S200 kolonuna yüklendi, 3. basamakta ise Konkavalin A afinite kolonu kullanılarak enzim saflaştırıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuz oluşturuldu ve karakterizasyon için saklandı. Bitkiden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 4.41. Yabani Kereviz (*Smyrniolum olusatrum L.*) bitkisinden Konkavalin-A Sepharose 4B kolonu ile saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği
 *Kolon çapı 1,5 cm ve boyu 30 cm, elüsyon hızı 20 mL/saat ve fraksiyon hacmi 5 mL

4.3.1. Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum L.*) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırma basamakları

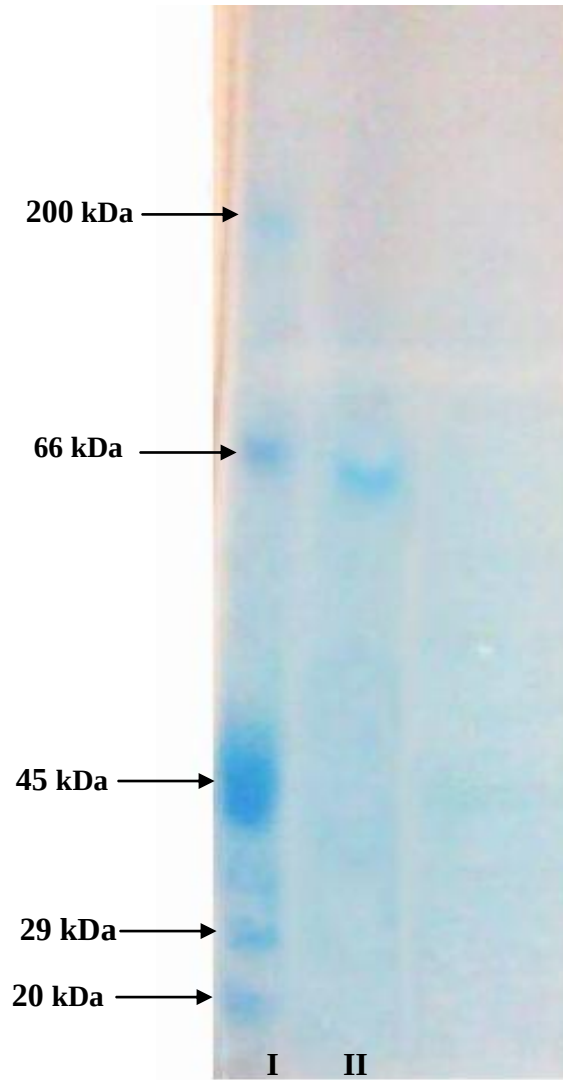
Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum L.*) bitkisinden homojenat elde edildi. Elde edilen homojenattan, amonyum sülfat çöktürmesi, Sephakril S200 ve Konkavalin A basamaklarından 1'er mL numune alındı ve myrosinaz aktivitesi tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre myrosinaz enziminin kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar aşağıdaki çizelgede gösterildi.

Çizelge 4.2. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinde myrosinaz enziminin saflaştırılma basamakları

	Aktivite (EU/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam			Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
			Hacim (ml)	Protein (mg)	Aktivite (EU)			
Ham Ekstrakt	0,073	6,5	70	455	5,11	0,011	100	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%50-70) Çöktürmesi	0,095	5,7	50	285	4,75	0,017	92,9	1,54
Sephakril S200 Elüsyonu	0,121	0,218	35	7,63	4,23	0,555	82,7	50,45
Konkavalin A (Saf Enzim)	0,193	0,075	20	1,5	3,86	2,573	75,5	233,90

4.3.2. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi

Kromatografik işlemler sonucu yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi yapıldı. Enzimin saf olduğu belirlendi ve jelin fotoğrafı çekildi. Şekil 4.42’de gösterildi.



Şekil 4.42. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı

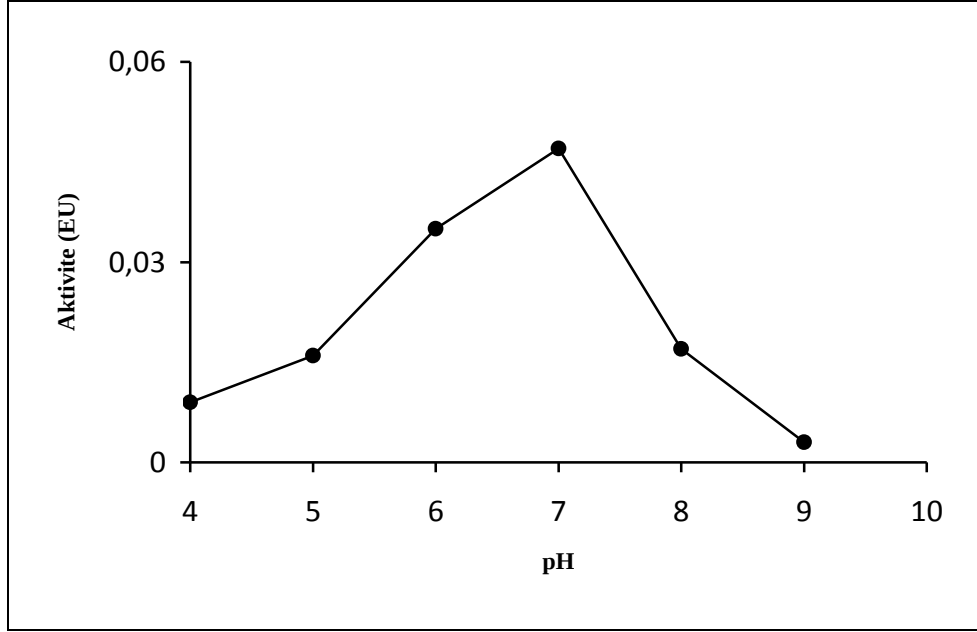
*I:standart protein; tripsin inhibitör (20 kDa) karbonik anhidraz (29 kDa), albumin (45 kDa) bovine albumin (66 kDa), myosin-porcine (200 kDa) II: Yabani Kerevizden saflaştırılan myrosinase enzimi.

4.3.3. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi ile yapılan kinetik çalışmalar

4.3.3.a. Myrosinaz enziminin optimum pH sonuçları

Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere deneyler bölüm 3.2.8.a'da belirtildiği şekilde

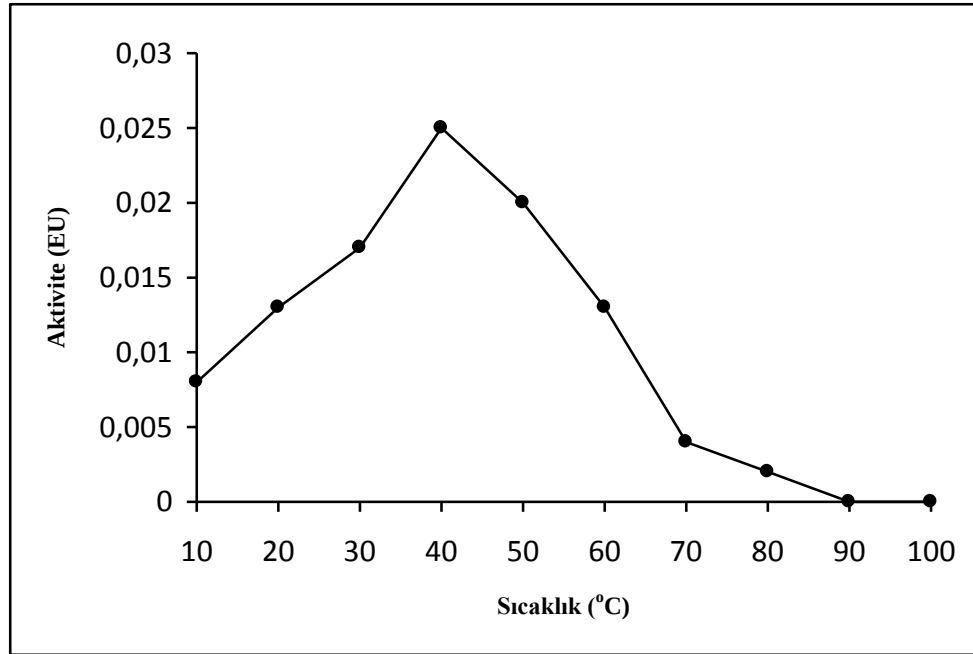
yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite - pH grafiği Şekil 4.43’de gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Yabani kereviz (*Smyrniololus L.*) bitkisinden saflaştırılan Myrosinaz enzimi üzerine pH’nın etkisi

4.3.3.b. Myrosinaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Yabani kereviz (*Smyrniololus L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere deneyler Bölüm 3.2.8.b.’de belirtildiği şekilde yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite–sıcaklık grafiği çizildi. Enzim için yapılan işlemlerin sonuçları Şekil 4.44’de gösterildi.

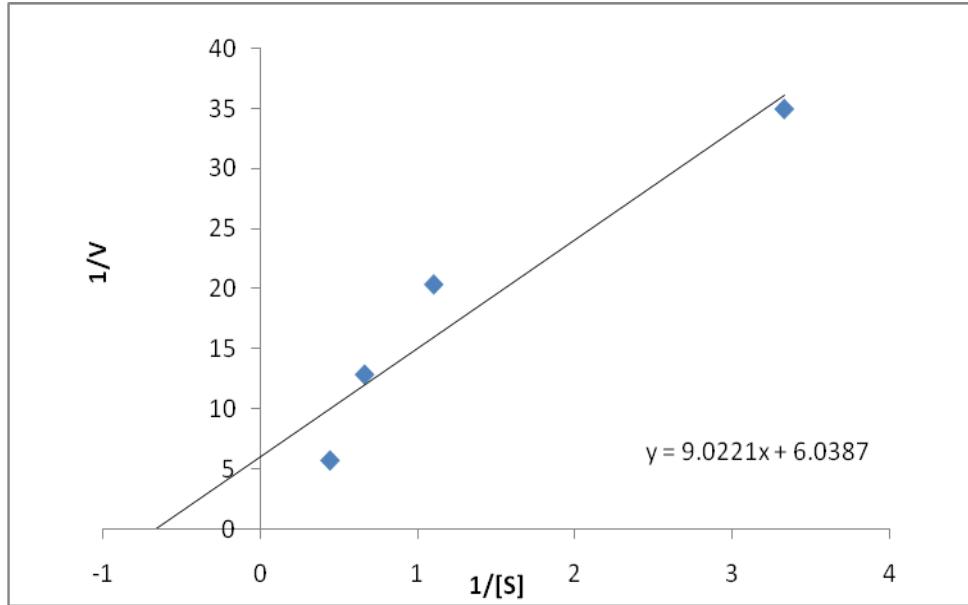


Şekil 4.44. Yabani kereviz (*Smyrniolusastrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

4.3.3.c. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

Yabani kereviz (*Smyrniolusastrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin hız sabiti (K_m) ve maximum hızı (V_{max})'ın belirlenmesi için substrat olarak sinigrin kullanıldı. Yükselen substrat konsantrasyonuna karşı aktiviteyi bulmak amacıyla dört farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan Yabani kereviz (*Smyrniolusastrum L.*) bitkisi için V_{max} ve K_M değerleri ise sırasıyla 0,165 mg/L.dak ve 0,49 mM olarak belirlendi.

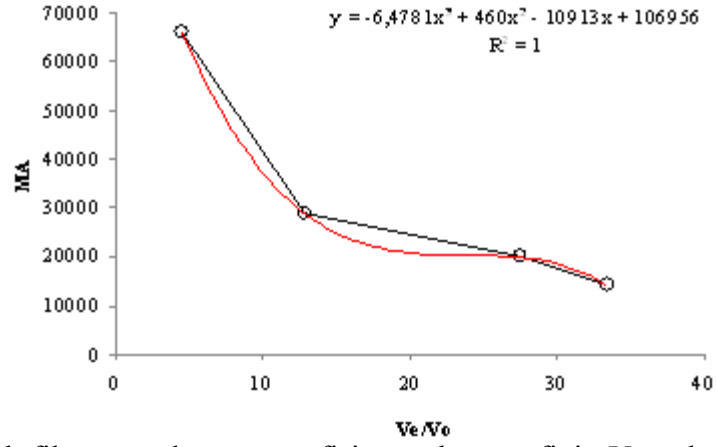


Şekil 4.45. Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin sinigrin substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

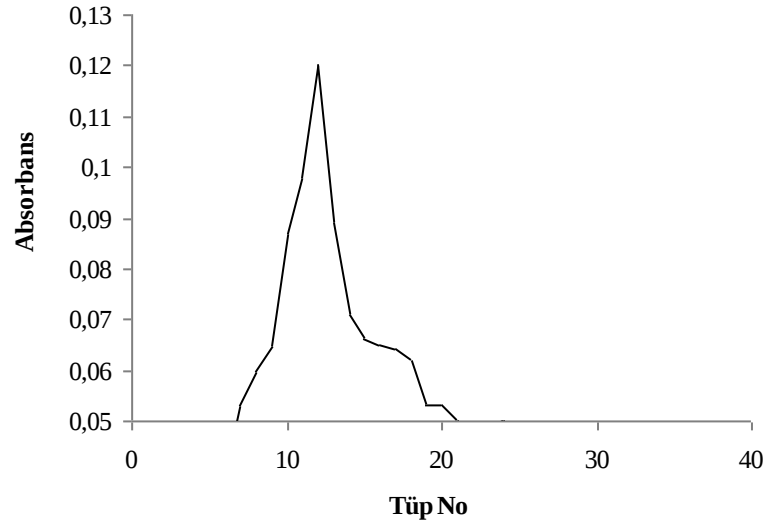
4.3.4. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak tayin edildi. Dengelenmiş kolona, bovine albumin 66000, carbonic anhydrase 29000, tripsin inhibitör 20000, α -lactalbumin 14200 içeren önce standart protein çözeltileri yüklenerek 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra molekül ağırlığı tayin edilecek olan saflaştırılmış myrosinaz enzimi kolondan geçirildi ve 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu.

Jel filtrasyon kromatografisi kullanarak Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 66000 D olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbans grafiği Şekil 4.46 ve Şekil 4.47’de verilmiştir.



Şekil 4.46. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği. V_e : elüsyon hacmi, V_o : kolonun boşluk hacmi.

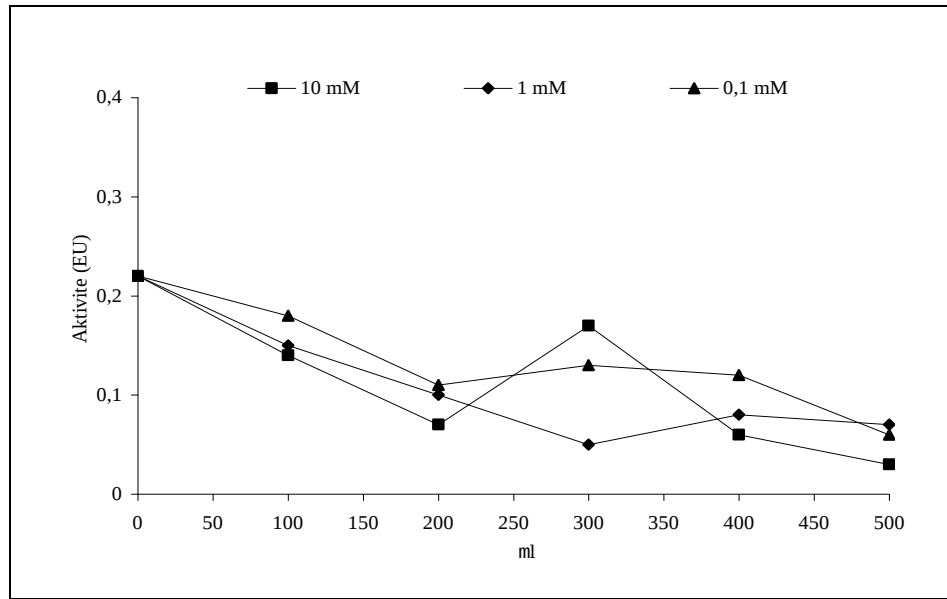


Şekil 4.47. Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum* L.) saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği.

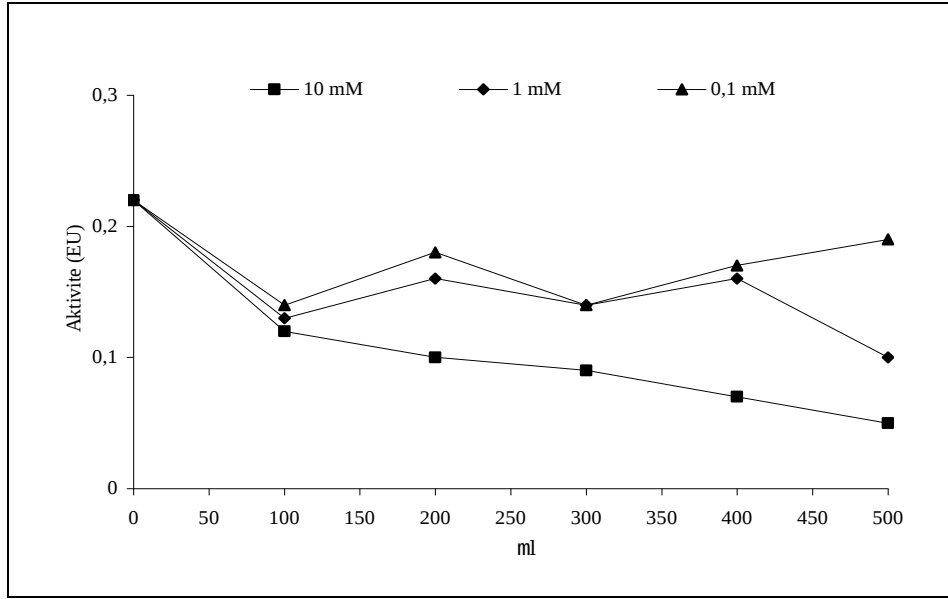
4.3.5. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması

Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{+2} , Fe^{+3} katyonlarının etkisi belirlendi.

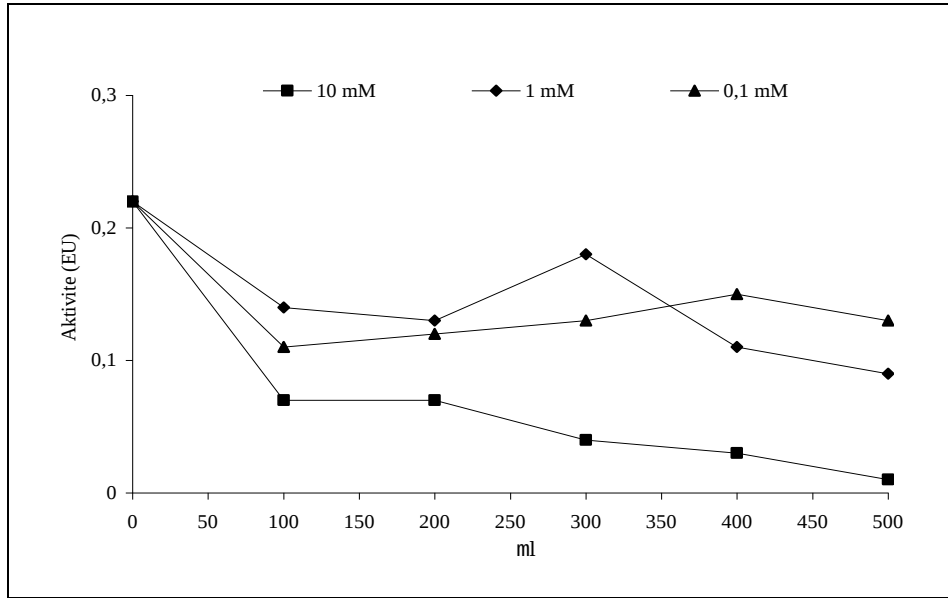
Sonuçlar şekil 4.48, şekil 4.49, şekil 4.50, şekil 4.51, şekil 4.52 ve şekil 4.53’de görülmektedir.



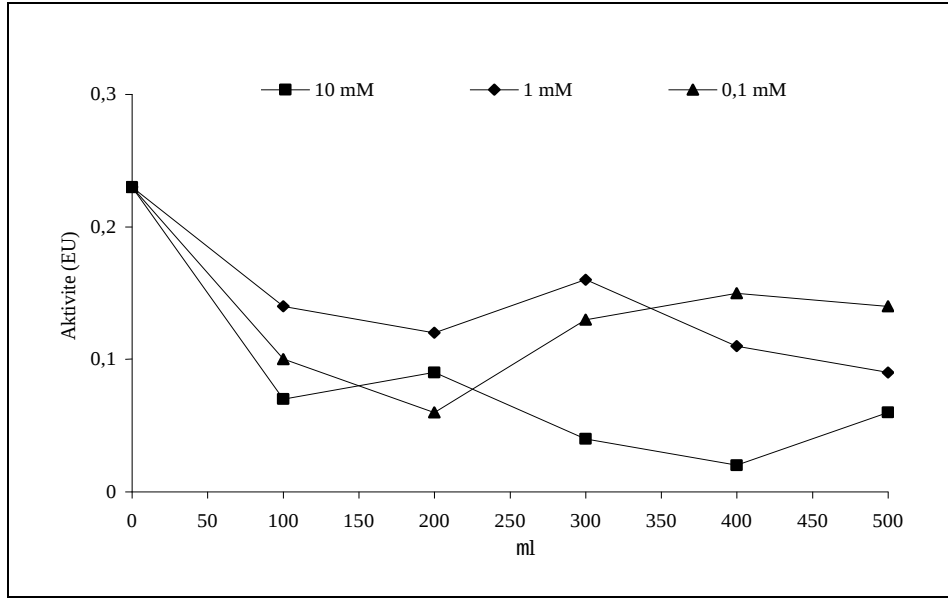
şekil 4.48. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} ’nin etkisi.



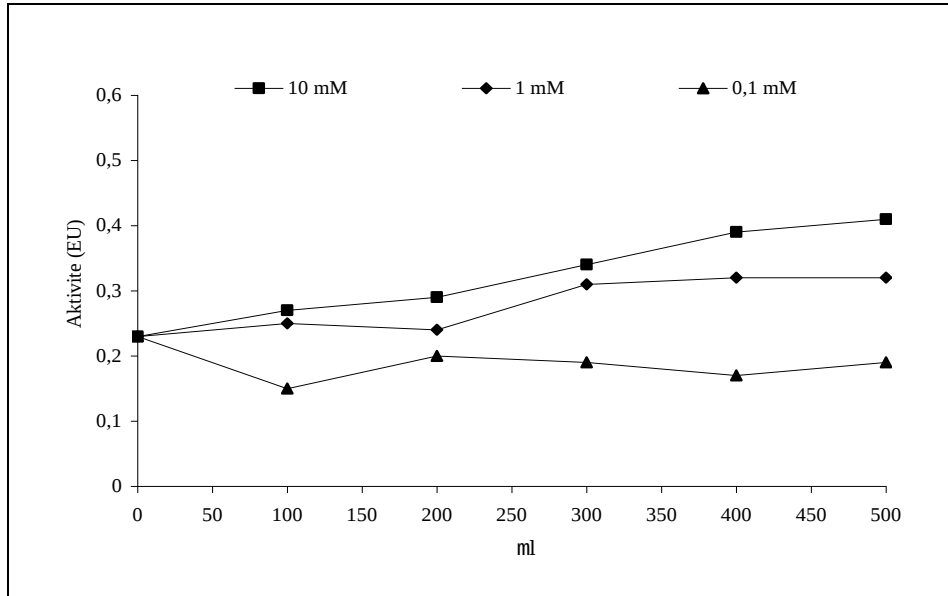
Şekil 4.49. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi.



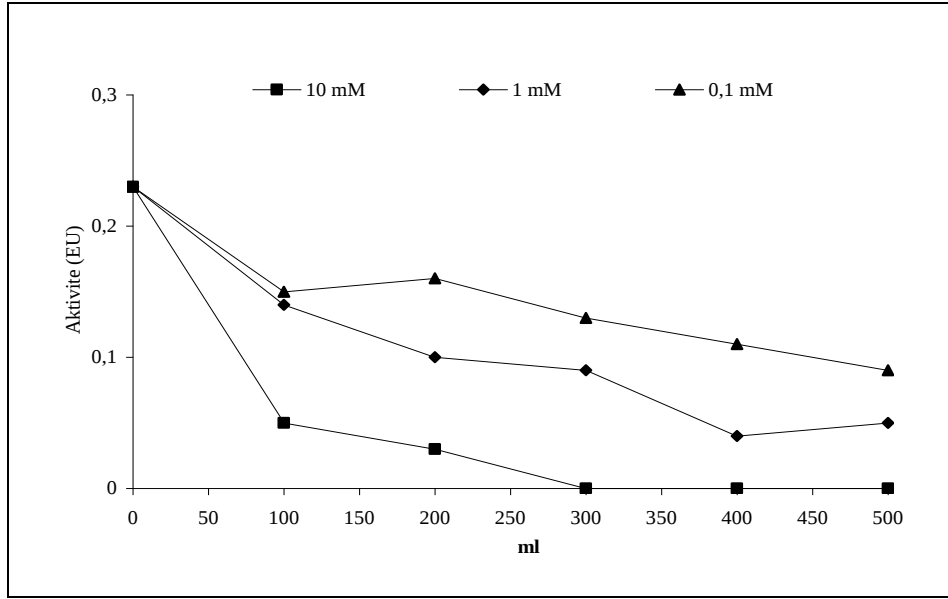
Şekil 4.50. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi.



Şekil 4.51. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} 'nin etkisi.



Şekil 4.52. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.

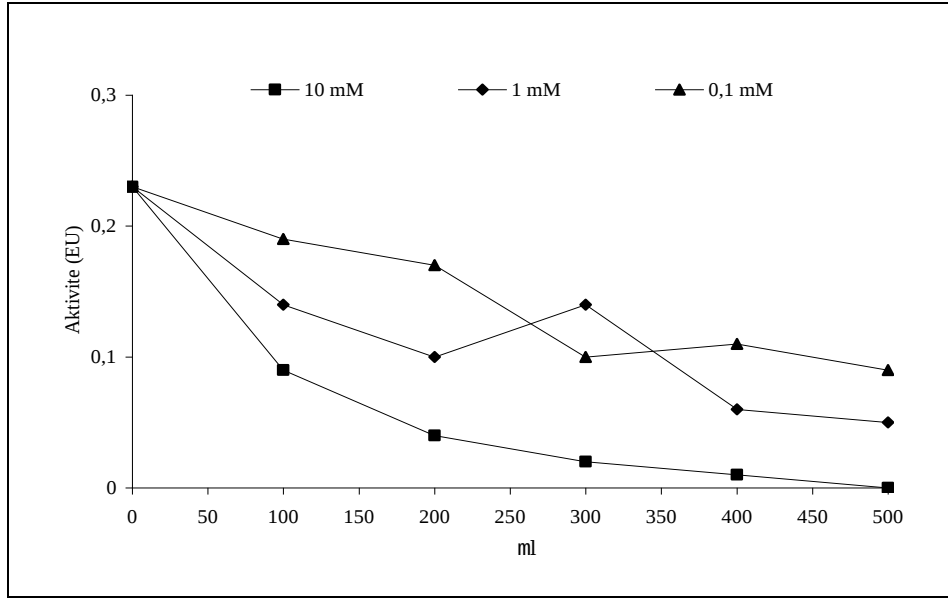


Şekil 4.53. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'ün etkisi.

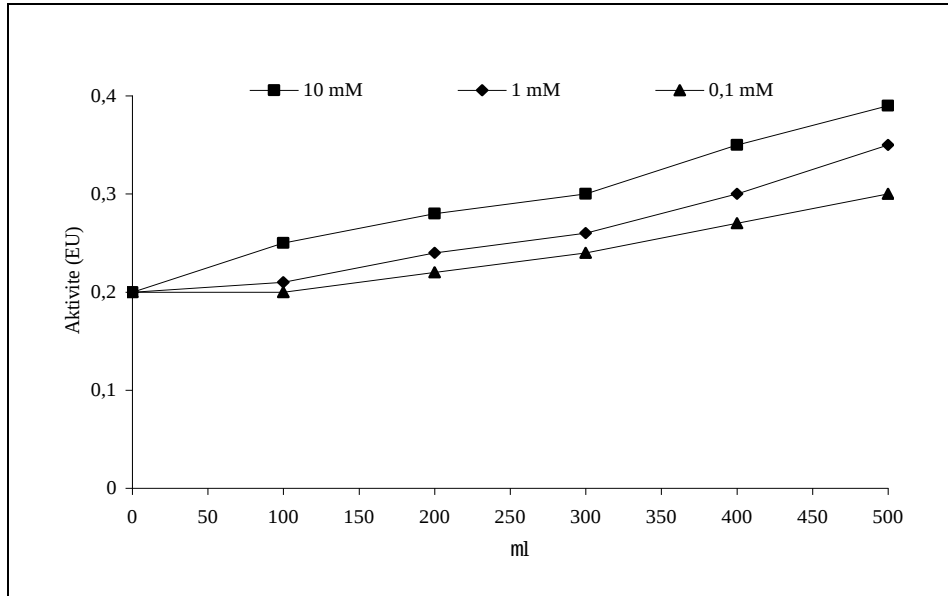
4.3.6. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin etkisinin belirlenmesi

Yabani kereviz (*Smyrniun Olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0.1 mM EDTA, Askorbik Asit, β -Merkaptoetanol, SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi.

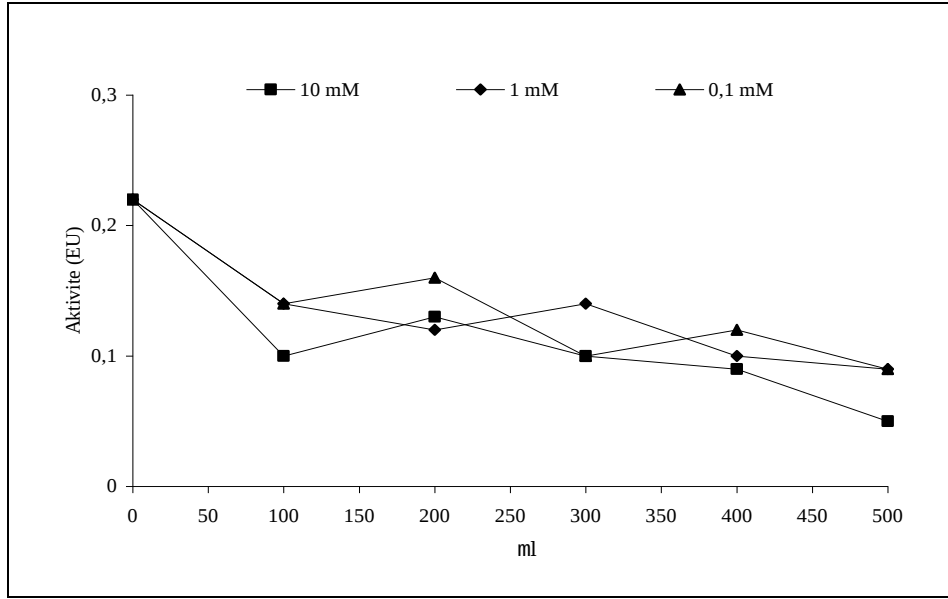
Sonuçlar Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56 ve Şekil 4.57'de görülmektedir.



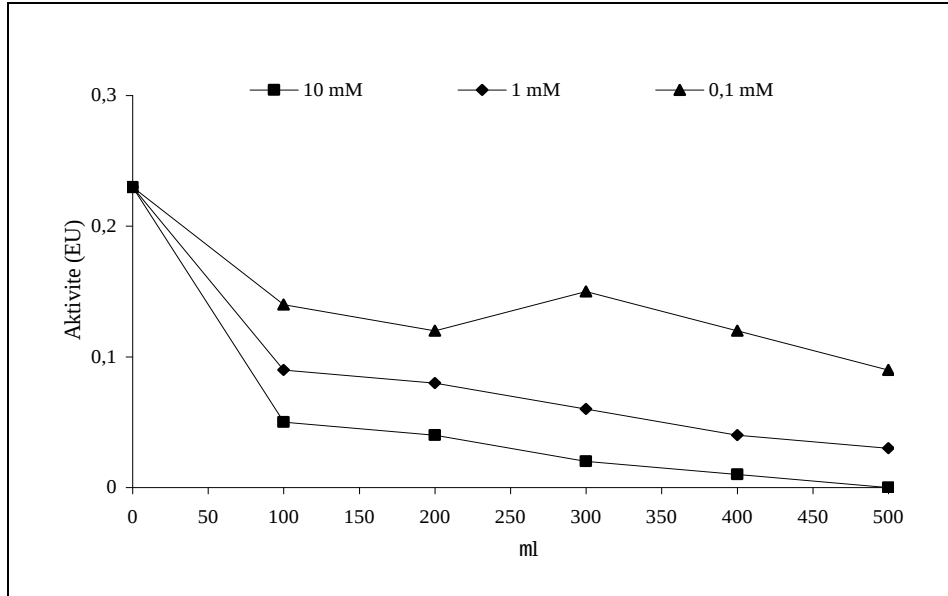
Şekil 4.54. Yabani Kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.



Şekil 4.55. Yabani Kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi.



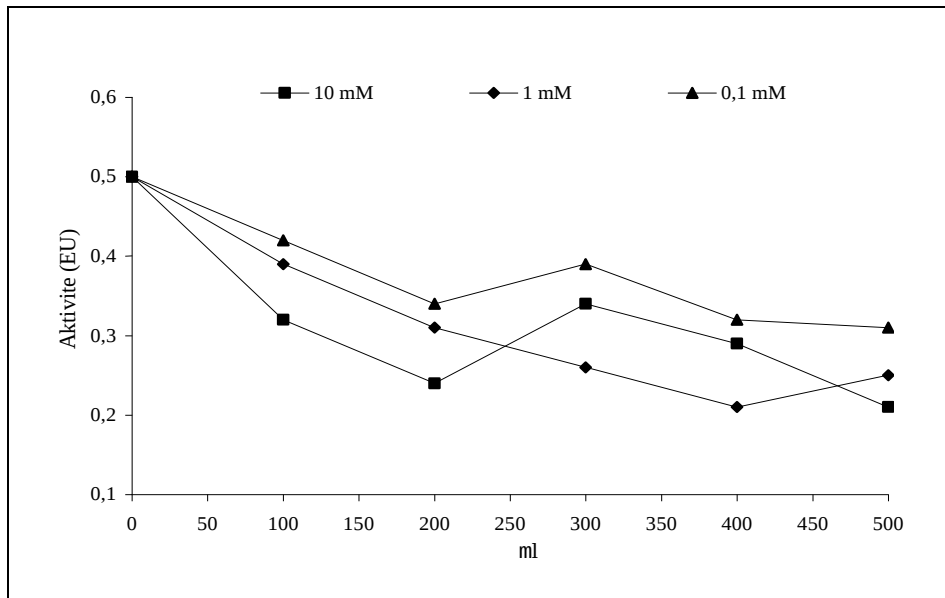
Şekil 4.56. Yabani Kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine β -merkaptetanolün etkisi.



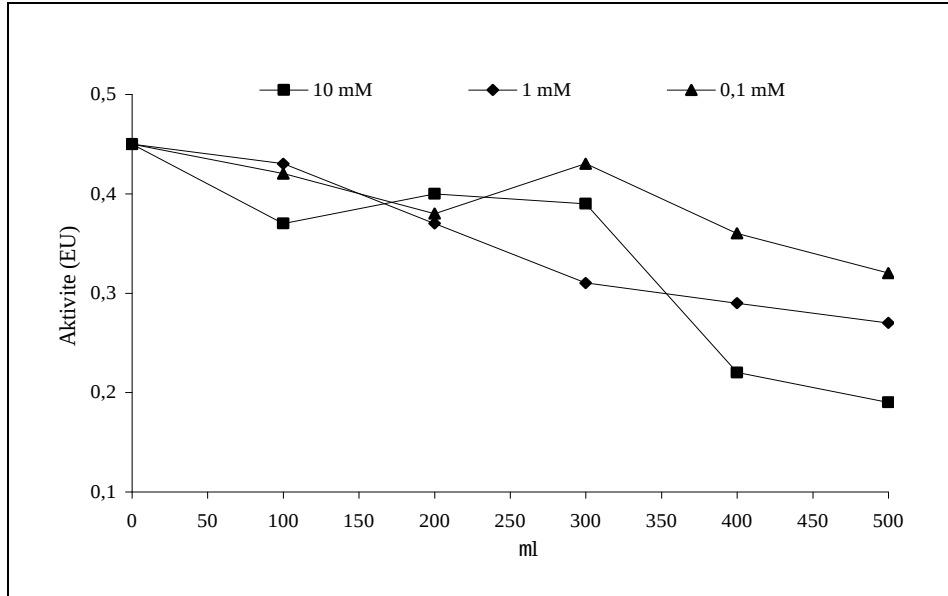
Şekil 4.57. Yabani Kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi.

4.3.7. Yabani kereviz (*Smyrniun Olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin belirlenmesi sonuçları

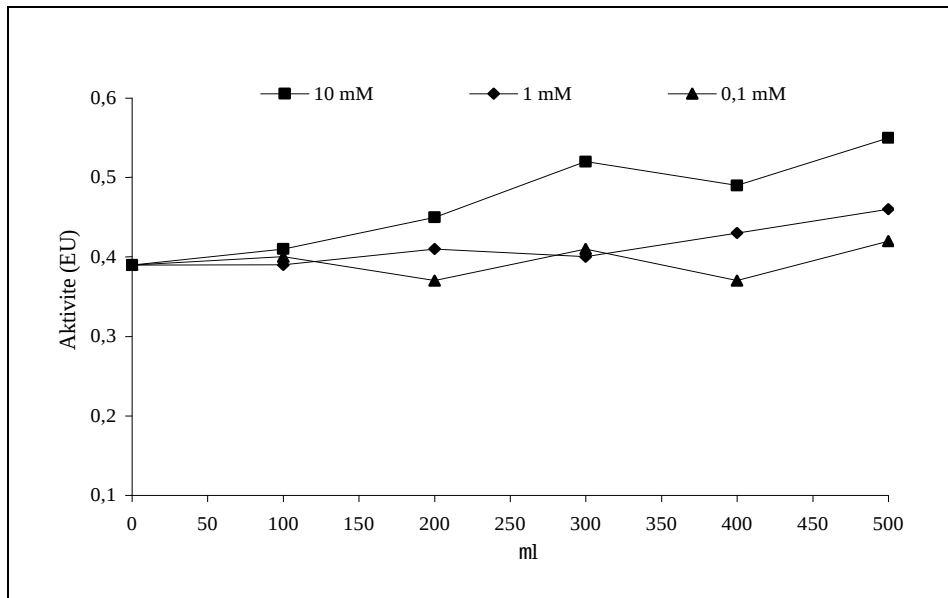
Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinase enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM’da pantenol, cephalotin, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin etkisi ve 500 ppm’de TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin etkisi 3.2.12’deki prosedür izlenerek belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.58, Şekil 4.59, Şekil 4.60, Şekil 4.61, Şekil 4.62, Şekil 4.63, Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66, Şekil 4.67, Şekil 4.68, Şekil 4.69, Şekil 4.70, Şekil 4.71 ve Şekil 4.72’de grafik halinde verilmiştir.



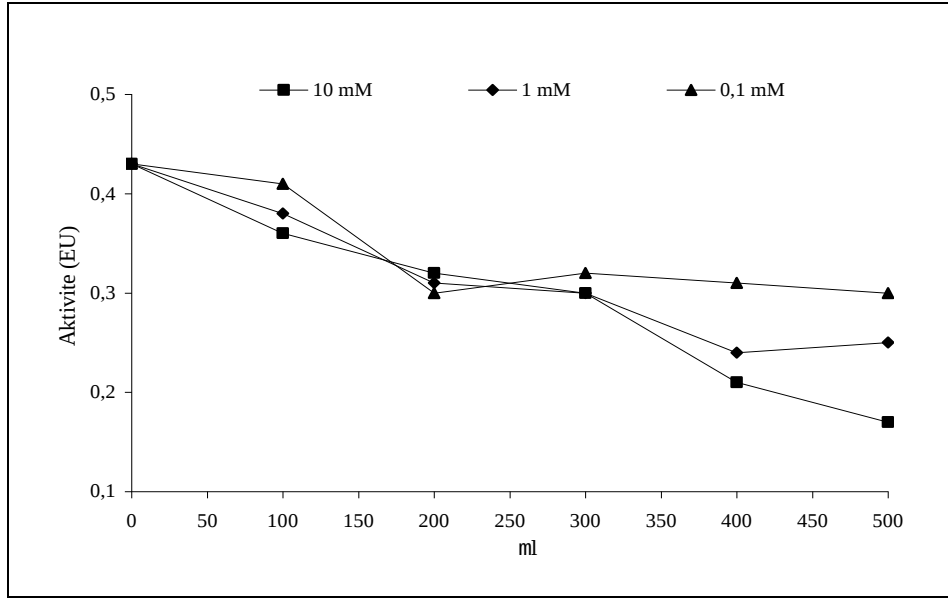
Şekil 4.58. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine pantenol’un etkisi



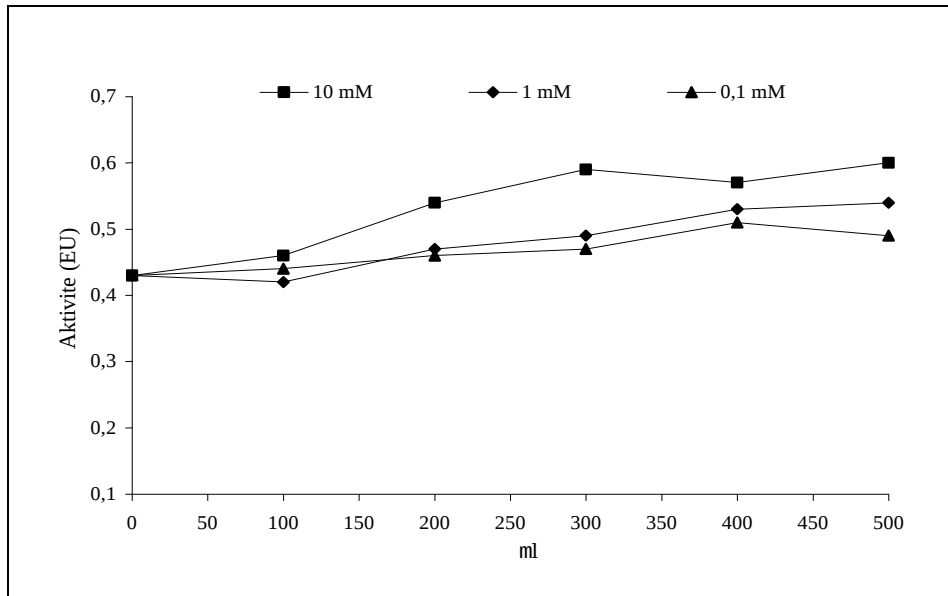
Şekil 4.59. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine betamethasone'un etkisi



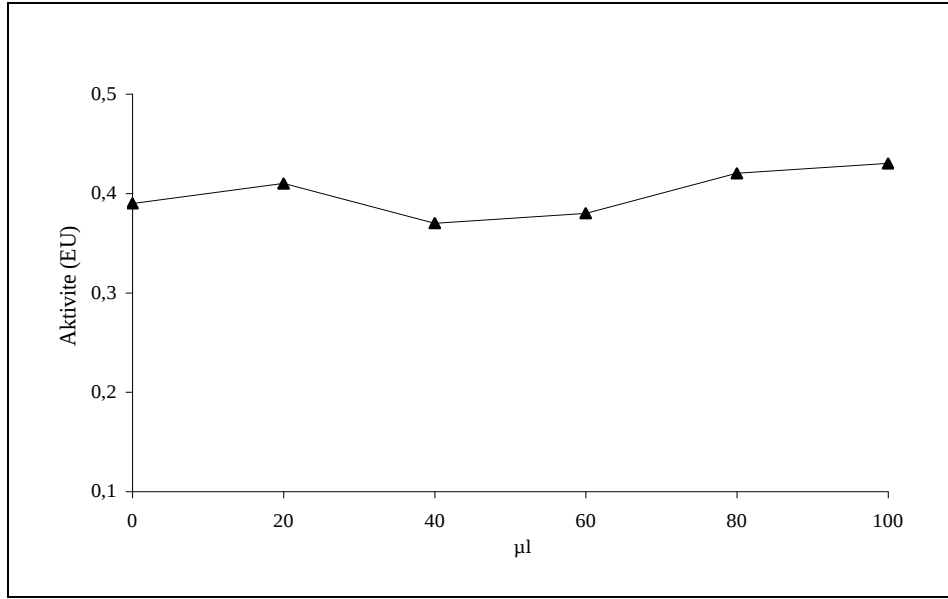
Şekil 4.60. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine linoleik asit'in etkisi



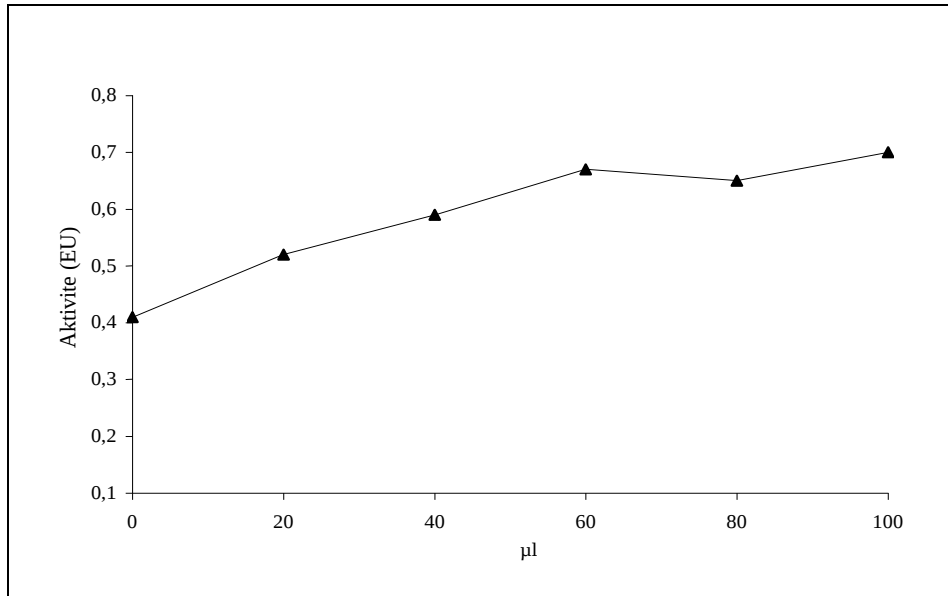
Şekil 4.61. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine cephalotin'in etkisi



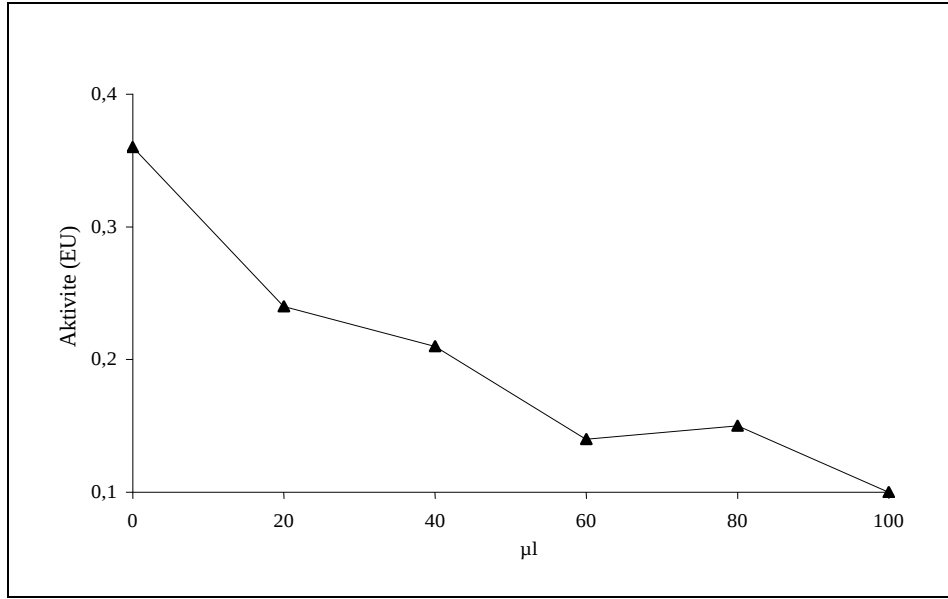
Şekil 4.62. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine E vitamininin etkisi



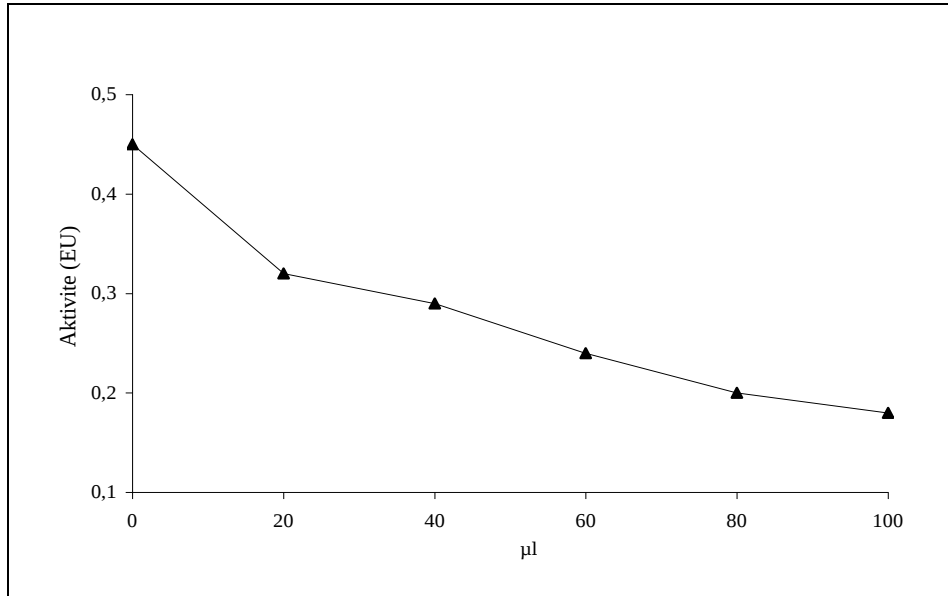
Şekil 4.63. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₁'in etkisi



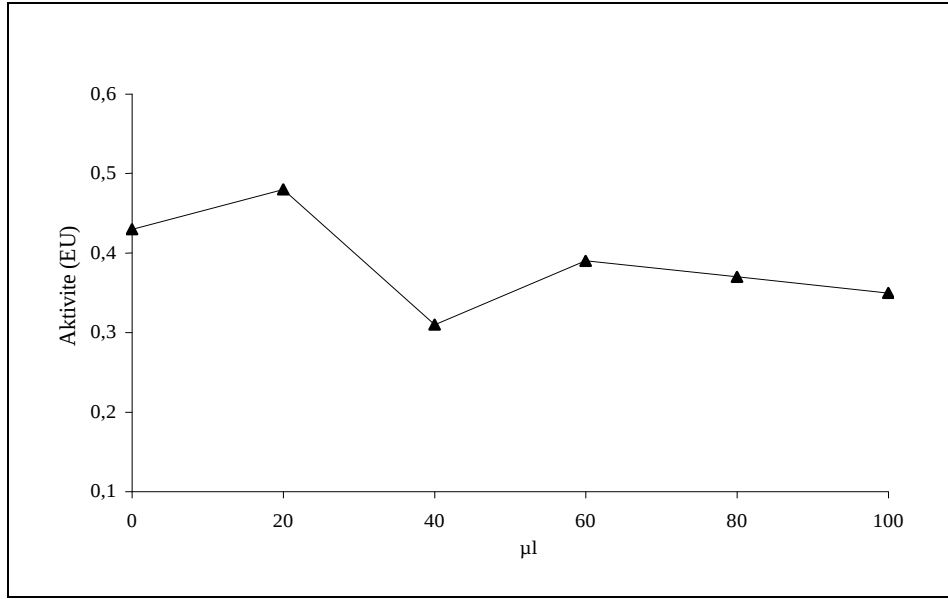
Şekil 4.64. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₂'in etkisi



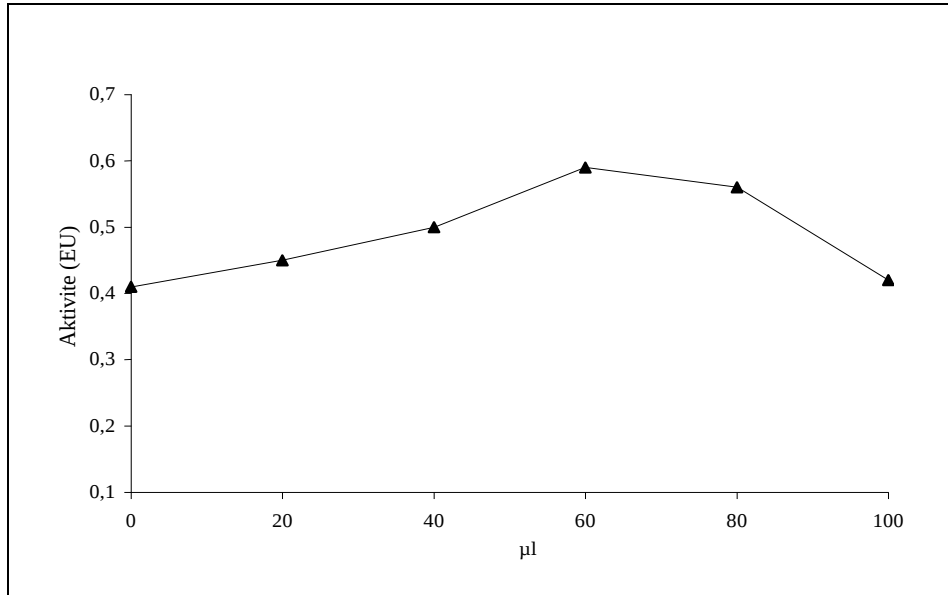
Şekil 4.65. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₃'in etkisi



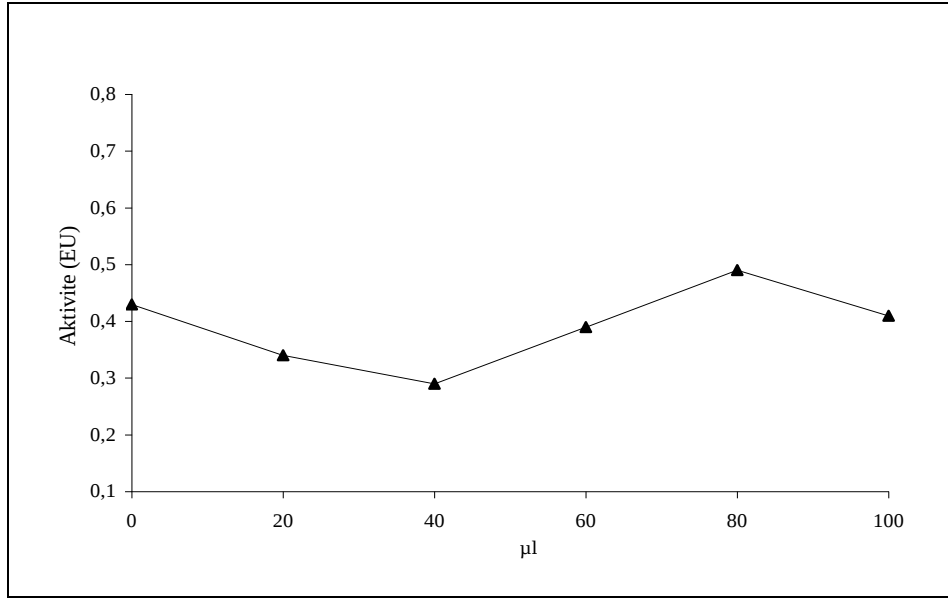
Şekil 4.66. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₄'in etkisi



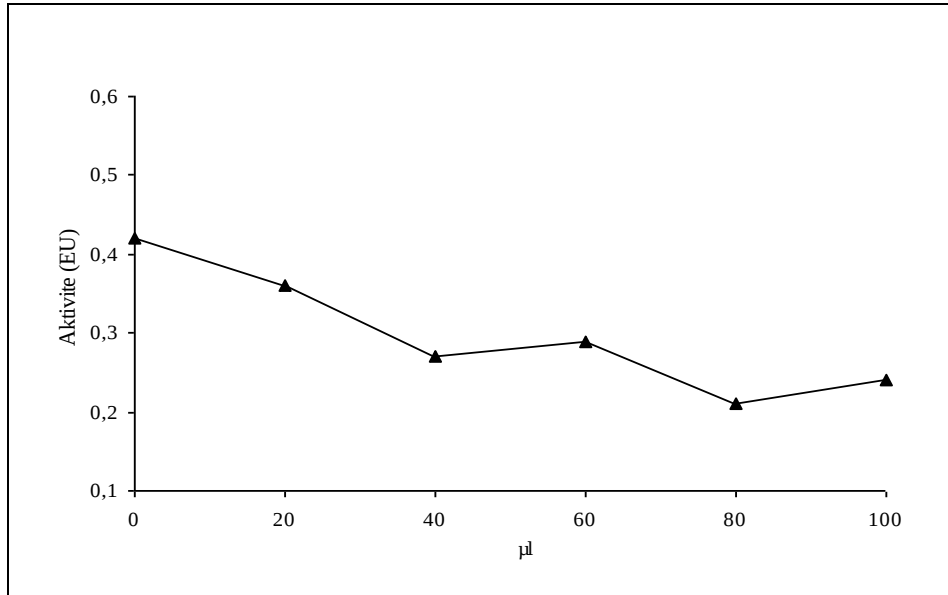
Şekil 4.67. Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₅'in etkisi



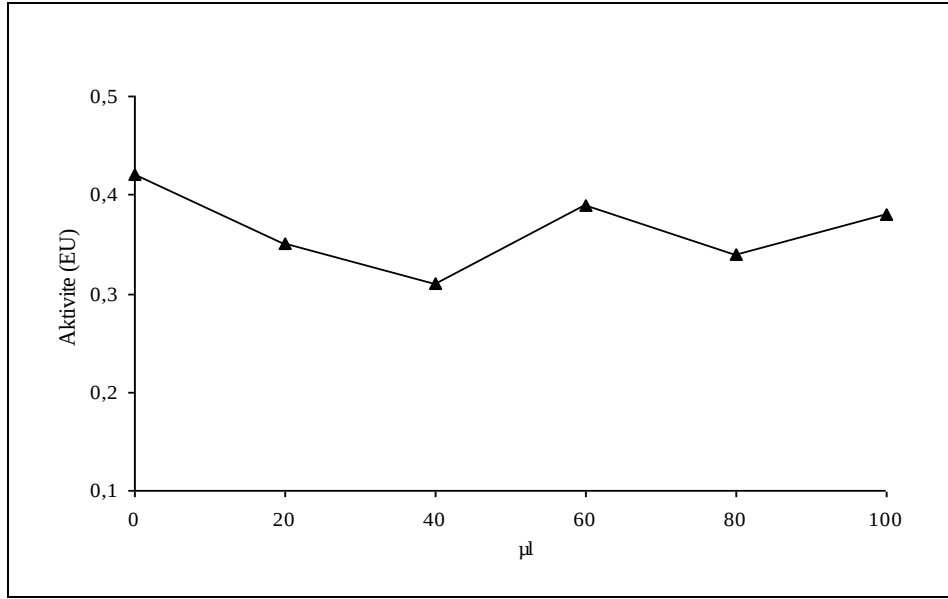
Şekil 4.68. Yabani kereviz (*Smyrniolus olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₆'in etkisi



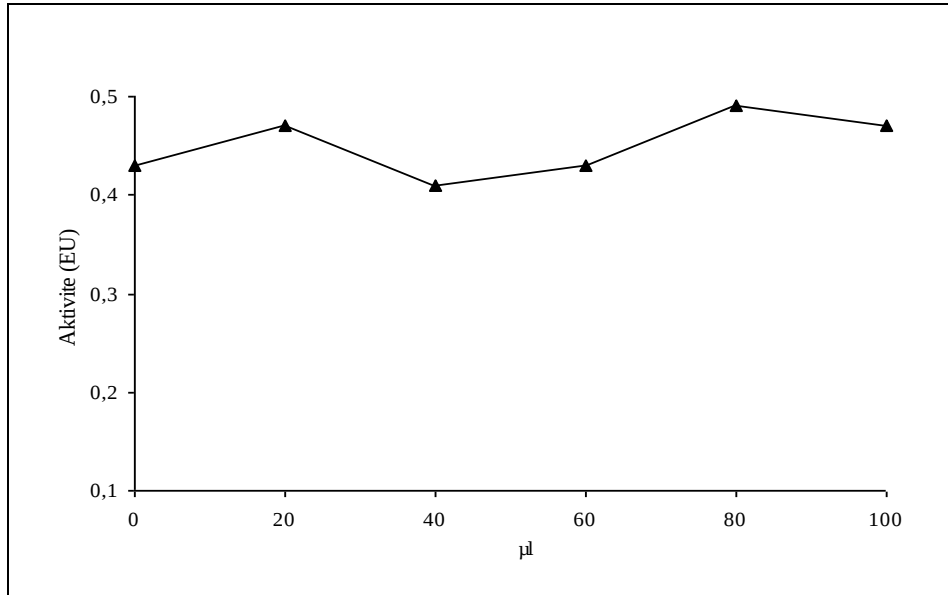
Şekil 4.69. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₇'in etkisi



Şekil 4.70. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₈'in etkisi



Şekil 4.71. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₉'in etkisi

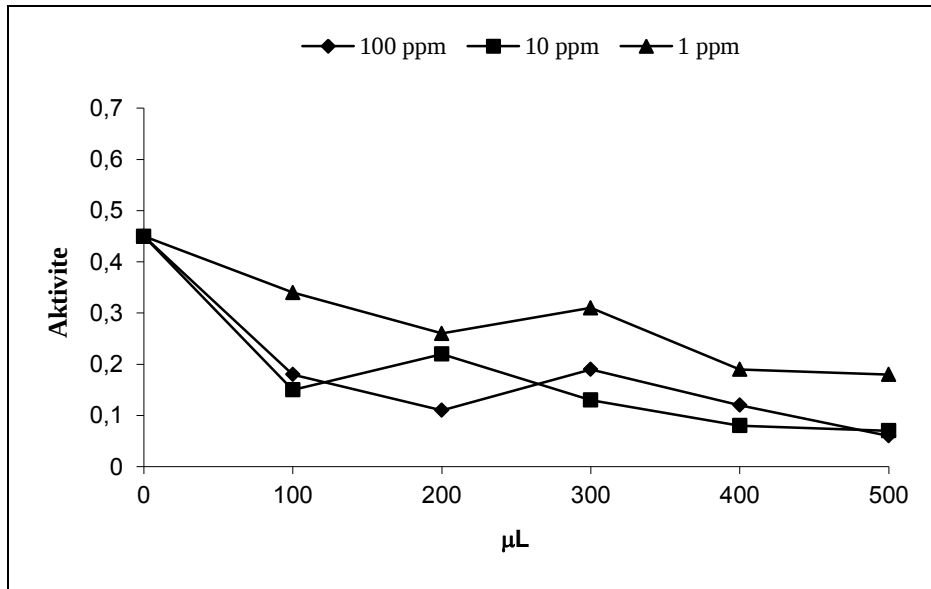


Şekil 4.72. Yabani kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine TA₁₀'in etkisi

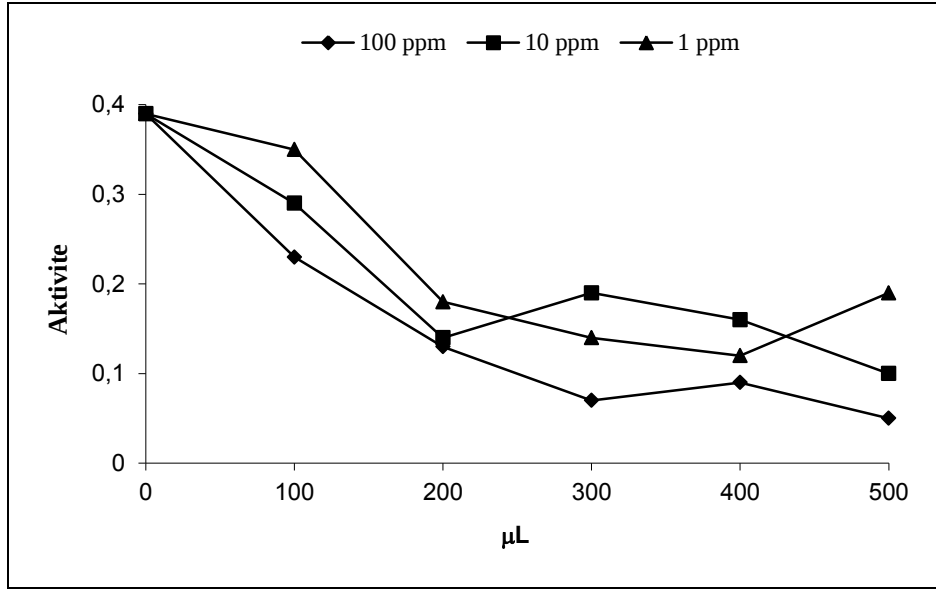
4.3.8. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin belirlenmesi

Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention' un etkisi belirlendi.

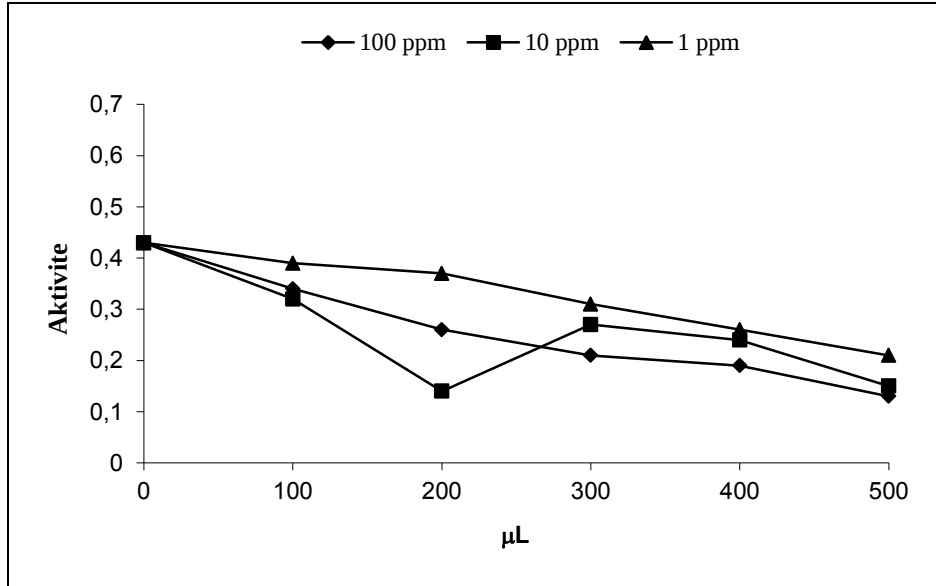
Sonuçlar Şekil 4.73, Şekil 4.74, Şekil 4.75, Şekil 4.76, Şekil 4.77, Şekil 4.78 ve Şekil 4.79'da görülmektedir.



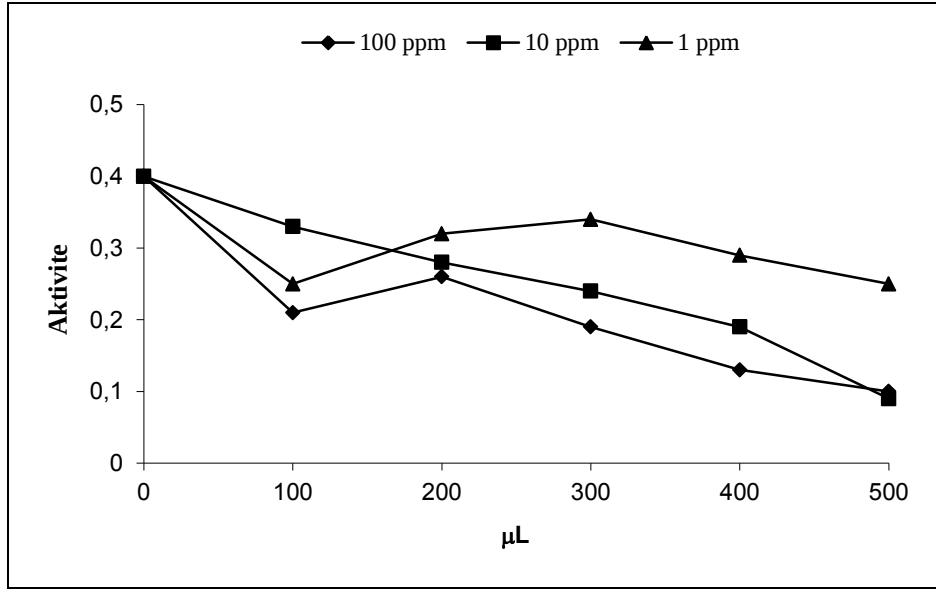
Şekil 4.73. Yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine klorprifos etil'in etkisi



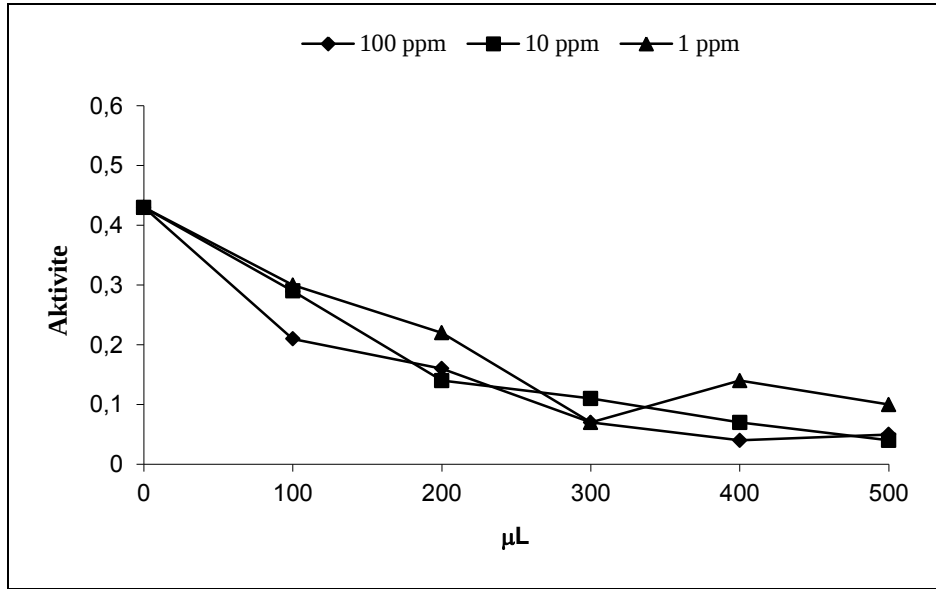
Şekil 4.74. Yabani kereviz (*Smyrniololus L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi



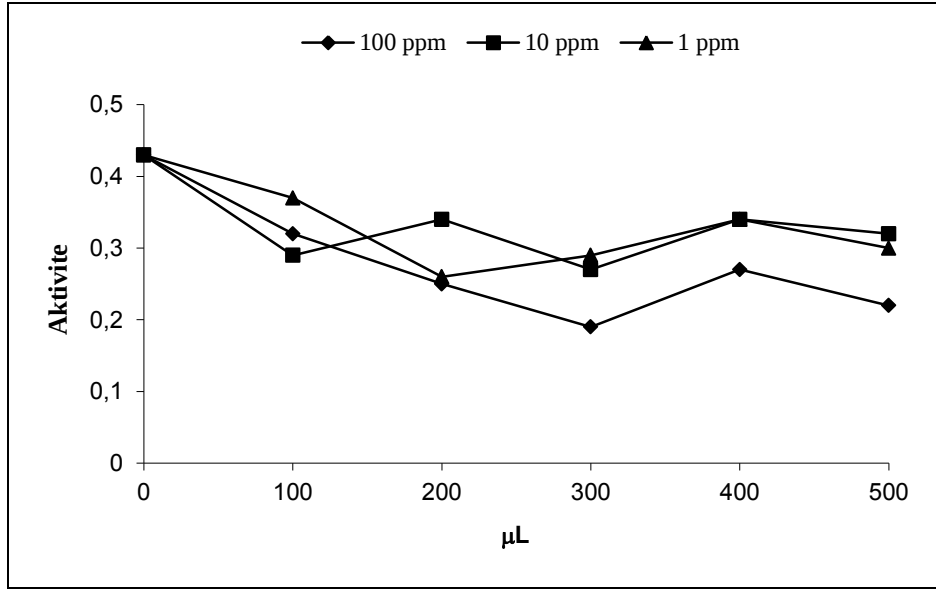
Şekil 4.75. Yabani kereviz (*Smyrniololus L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi



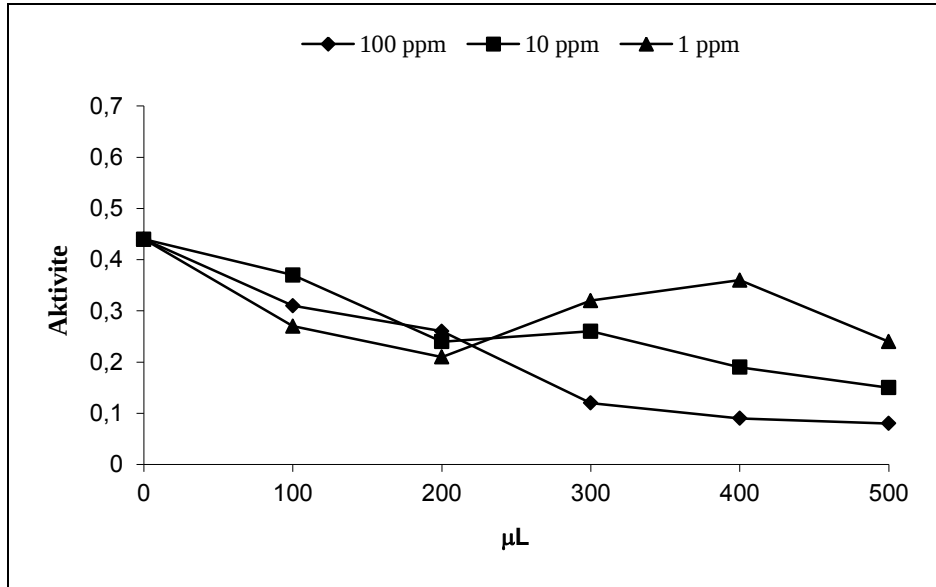
Şekil 4.76. Yabani kereviz (*Smyrniololus L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'un etkisi



Şekil 4.77. Yabani kereviz (*Smyrniololus L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine metamidopos'un etkisi



Şekil 4.78. Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi.



Şekil 4.79. Yabani kereviz (*Smyrniolus satrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine fenthion'un etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, myrosinaz enzimi çadır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden 3 basamakta saflaştırıldı ve karakterizasyonu yapıldı. Kullanılan yöntemlerin seçiliş sebebi şöyle açıklanabilir:

Literatür araştırmaları sonucunda myrosinaz enziminin saflaştırılması için önerilen saflaştırma teknikleri denenmiş, myrosinaz enzimi saf olarak en yüksek verimle elde edildiği için bu 3 metod sırasıyla kullanılmıştır.

Myrosinaz enzimi çadır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden 3 basamakta saflaştırılmıştır. Birinci basamakta amonyum sülfat çöktürmesiyle bitkilerde bulunan myrosinaz enzimi konsantre hale getirilmiş ve bir ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. İkinci basamakta anyon değiştirici materyal kullanılmıştır ve son basamakta ise afinite kromotofrafisinden yararlanılmıştır.

1. Basamakta, homojenata %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. %40 - %70'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çökelek 0,15 M NaCl içeren 20 mM Tris (pH:7,5) tamponu ile çözülüp, aktivite tayini yapılırken yüksek myrosinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

2. Basamakta, Sephakril S200 kolonuna yüklenmiştir. Absorbsiyon gösteren fraksiyonlar için myrosinaz aktivitesi testleri yapılmış ve daha sonra aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturulmuştur.

3. Basamakta ise bu enzim havuzu Konkavalin A afinite kolonuna yüklenmiştir. Absorbsiyon gösteren fraksiyonlar için myrosinaz aktivitesi testleri yapılmış ve daha sonra aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturulmuştur (Jones *et al.* 2001).

Kısmen saflaştırılması yapılan bitki homojenatı, Sephakril S-200 kolonuna yüklenmiştir ve kolon 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, (pH:7,5) %0,02 sodium azit tamponuyla 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar dengelenmiştir. Amonyum sülfattan elde edilen çökelek tampona alınmış ve kolona yüklenmiştir. Enzim kolondan aynı tampon ile elüe edilmiştir. Ardından tüm tüplerde aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturulmuştur.

Daha sonra bu enzim havuzu afinite kromatografisi materyali olan Koncavalin A ile 12 saat bektetildikten sonra kolona doldurulmuştur. 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, (pH:7,5) %0,02 sodium azit tamponu ile elüsyon yapılmıştır. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturulmuştur. Myrosinaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar karakterizasyon için kullanılmıştır (Jones *et al.* 2001; Palmieri *et al.* 1986).

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden 3 basamakta saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 4.2 ve Şekil 4.41'de verilmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Enzimin saf olduğu belirlenmiş ve jelin fotoğrafı çekilmiştir. Jelin fotoğrafı Şekil 4.3 ve Şekil 4.42'de gösterilmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden myrosinaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlarla aktivite-pH grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.43). Saflaştırılan myrosinaz enziminin her iki bitki içinde pH 4-8 aralığın da aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden myrosinaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek üzere deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlarla aktivite-sıcaklık grafiği çizilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.44). Saflaştırılan myrosinaz enziminin 30-60°C aralığında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı Jel filtrasyon kromatografisi kullanarak elde edilmiştir. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden elde edilen myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 33982 Da (≈ 34000 Da), Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 66000 Da olarak bulunmuştur. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorban grafiği Şekil 4.8 ve Şekil 4.47'de verilmiştir.

K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan çaşır bitkisi için V_{max} ve K_m değerleri ise sırasıyla 0,166 mg/L.dak ve 0,96 mM olarak yabani kereviz bitkisi için sırasıyla 0,165 mg/L.dak ve 1,49 mM belirlendi (Şekil.4.6 ve Şekil 4.45).

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM konsantrasyonların da Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} katyonların etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51, Şekil 4.52 ve Şekil 4.53'de gösterilmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM konsantrasyonların da EDTA, askorbik asit, β -merkaptoetanol, SDS

bileşiklerinin etkisi belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ile Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56, Şekil 4.57’de görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda β -merkaptotanol fazla etkilemezken, EDTA ve SDS’nin yüksek konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği, askorbik asidin ise ciddi şekilde aktive ettiği belirlenmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine, kozmetik ürünlerin içeriğinde yaygın olarak kullanılan pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin 10 mM, 1 mM, 0, 1 mM konsantrasyonların da etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23 ile Şekil 4.58, Şekil 4.59, Şekil 4.60, Şekil 4.61 ve Şekil 4.62’de verilmiştir. Myrosinaz enzimini cephalotine fazla etkilemezken pantenol, linoleik asit, betamethasone ve E vitamini kısmen aktive etmiştir.

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine kanser hastalıklarında iyileştirici özelliği olduğu bilinen TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin 500 ppm’de etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33 ile Şekil 4.63, Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66, Şekil 4.67, Şekil 4.68, Şekil 4.69, Şekil 4.70, Şekil 4.71 ve Şekil 4.72’de grafik halinde verilmiştir. Myrosinaz enzimini TA₂ ve TA₃ fazla etkilemezken, TA₉ tamamen inhibe etmiştir. TA₁, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, ve TA₁₀ molekülleri ise fazla etkilememiştir.

Son olarak saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention pestisitlerinin etkisi belirlendi. Sonuçlar şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40 ile Şekil 4.73, Şekil 4.74, Şekil 4.75, Şekil 4.76, Şekil 4.77, Şekil 4.78, Şekil 4.79’da görülmektedir. Pestisitlerle yapılan deneyler sonucunda enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir

Sonuç olarak;

Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisi için;

1. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi ve afinite kromotofrafisi ile saf enzim elde edilmiş ve karakterize edilmiştir.
2. Enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır.
3. Saflaştırılan myrosinaz enziminin pH'sının 6 olduğu ve pH: 4-8 aralığının da aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.
4. Saflaştırılan optimum sıcaklığının 35°C ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının 20-60°C olduğu belirlenmiştir.
5. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 0,166 mg/L.dak ve 0,96 mM olarak belirlenmiştir.
6. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 34 kDa olarak hesaplanmıştır.
7. Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine Fe²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺'nin myrosinaz enzim aktivitesini azalttığı, Zn²⁺'in yüksek konsantrasyonunun kısmen aktive ettiği ve Ca²⁺ ve Cu²⁺ ve'nin yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerinde fazla bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.

8. Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin etkisi araştırıldı. Myrosinaz enzimini cephalotine fazla etkilemezken pantenol, linoleik asit, betamethasone, ve E vitamini kısmen aktive etmiştir.

9. β -merkaptotanol fazla etkilemezken, EDTA ve SDS'nin yüksek konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği, askorbik asidin ise ciddi şekilde aktive ettiği belirlenmiştir.

10. Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin etkisi araştırıldı. Myrosinaz enzimini TA₁, TA₂ ve TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈ fazla etkilemezken, TA₉ ve TA₁₀ tamamen inhibe etmiştir.

11. Kullanılan organofosfatlı pestisitlerden klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention pestisitlerinin paraoksonaz enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkisi için;

1. Yabani kereviz (*Smyrniolum olusatrum* L.) bitkisinden sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi ve afinite kromatografisi ile saf enzim elde edilmiş ve karakterize edilmiştir.

2. Enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır.

3. Saflaştırılan myrosinaz enziminin pH'sının 7 olduğu ve pH: 4-8 aralığında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

4. Saflaştırılan optimum sıcaklığının 37°C ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının 20-65°C olduğu belirlenmiştir.

5. Yabani Kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 0,165 mg/L.dak ve 0,49 mM olarak belirlenmiştir.
6. Yabani Kereviz (*Smyrniun olusatrum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 66 kDa olarak hesaplanmıştır.
7. Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nın myrosinaz enzim aktivitesini arttırdığı, Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Cu^{2+} 'nın yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği, Mn^{2+} ve Ca^{2+} katyonlarının aktivite üzerinde fazla bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.
8. Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin etkisi araştırıldı. Myrosinaz enzimini linoleik fazla etkilemezken pantenol, cephalotine, betamethasone, ve E vitamini kısmen aktive etmiştir.
9. β -merkaptotanol, EDTA ve SDS'nin yüksek konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği, askorbik asidin ise ciddi şekilde aktive ettiği belirlenmiştir.
10. Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine TA_1 , TA_2 , TA_3 , TA_4 , TA_5 , TA_6 , TA_7 , TA_8 , TA_9 ve TA_{10} moleküllerinin etkisi araştırıldı. Myrosinaz enzimini TA_1 ve TA_2 kısmen aktive etmiş, TA_5 , TA_6 , TA_7 , TA_8 , TA_9 ve TA_{10} fazla etkilemezken, TA_3 , TA_4 tamamen inhibe etmiştir.
11. Kullanılan organofosfatlı pestisitlerden klorprifos etil, metil paratyon, dimetoat, diazinon, metamidopos, etil paratyon ve fention pestisitlerinin paraoksonaz enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

Modern tıpta halen kanser tedavisinde kullanılmakta olan yöntem ve ilaçların yanı sıra tıbbi bitkilerde ve besinlerde bulunan pek çok bileşiğin bazı deneysel karsinogenezis modellerinde etkili bir koruyucu ve anti-tümör ajanlar oldukları bilinmekle birlikte bunların çoğunun etki mekanizmaları çok iyi bilinmemektedir. Bu nedenle, bitkilerden yeni kanser ilaçlarının araştırılmasındaki asıl hedef, hedef olmayan hücrelere zarar vermeden doğrudan doğruya kanser hücreleri olmalıdır.

İnsan sağlığı açısından bazı kanser çeşitlerinin ve kalp damar hastalıkları gibi bazı hastalıkların önlenmesinde beslenmenin çok önemli rol oynadığı bilinmektedir. Gerek epidemiolojik ve gerekse *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda meyve ve sebze alımıyla tümör oluşumu arasında ters bir ilişkinin olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada halk tarafından gıda, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılan bitkilerden henüz anti-kanser kapasiteleri belirlenmemiş olan 2 farklı bitki türü olan Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinde tümör küçültücü etkiye sahip myrosinaz enzimi aranması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra myrosinaz enziminin kozmetik ürünlerinin ve kanser tedavisinde kullanılan ilaç içeriğindeki etken maddeler ile bazı organofosfatlı pestisitlerden geçimliliği araştırılmış. Çaşır (*Prangos ferulecea* L.) ve yabani kereviz (*Smyrnum olusatrum* L.) bitkilerinden saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerinede kinetik çalışmalar yapılmış olup, enzim üzerine bazı katyonların ve organik bileşiklerin etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında myrosinaz enziminin, optimum sıcaklık değeri ve özellikle cildin pH'sı dikkate alındığında optimum pH değeri kozmosötik amaçla kullanımı için oldukça uygun olduğu görülmektedir. Kozmetikte yaygın olarak kullanılan etken maddelerle geçimli olduğu görülmüştür. Ayrıca kanser hastalığında iyileştici özelliği olduğu bilinen TA_X serisi ile genel olarak geçimli olduğu görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aksoy, M., 2000. Beslenme Biyokimyası. Hatipoğlu Yayınevi Ankara, VII: 269-283.
- Alan, R. ve Padem, H., 1990. Erzurum ve Yöresinde Sebze Olarak Kullanılan Evelik, Kısalca, Kuş Ekmeği, mDeli Çadır ve Kısa yemlik Otlarının Besin değeri Üzeride Bir Araştırma. Doğa türk tarım ve Hayvancılık Dergisi, 14,48-57.
- Baytop, T., 1984. Türkiyede Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniv.Yay,No.2355,
- Baytop, T., 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları, Ankara, 578-256.
- Baytop, T., 1999. Türkiyede Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). Nobel Tıp Kitabevi, 2.Baskı, s.375-376.
- Bellostas, N., Petersen, I.L., Sorensen,J.C., Sorensen, H., 2008. A fast and gentle method for the isolation of myrosinase complexes from *Brassicaceous seeds*, J. Biochem. Biophys, Methods 70 918–925.
- Berteli, D., Plessi, M., Braghiroli, D., Monzani A., 1998. Separation by solid phase extraction and quantification by reserve phase HPLC of sulforaphane in brocccoli. Food Chem, 63(3), 417-421.
- Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Fratemale, D., Giamperi, L., Ricci, D., 2004. Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniun olusatrum* L. Flavour and Fragrance Journal, Volume 19, Issue 6,522-525.
- Björkman, R., 1976. Plant myrosinases. In JG Vaughan, AJ MacLoed, BMG Jones, eds, The Biology and Chemistry of the Cruciferae. Academic Press, London, pp 191-205
- Bones, A.M. and Rositter J.T., 1996. The mirosinazglukosinolat system.-an innate defense system in plants. *Physiol Plantarum*, 97 (1), 194-208.
- Bor, M., Özkur, Ö., Özdemir, F., 2009. Identification and Characterization of the Glucosinolate–Myrosinase System in Caper (*Capparis ovata* Desf.). *Plant Mol Biol Rep*, 27:518–525.
- Boyle, P. and Levin, B., 2008. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu, 150 cours Albert Thomas. 69372, Lyon Cedex 08, Fransa.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Champe, P.C. and Harvey, R.A., 1997. Lippincott’ s Illustrated Reviews Serisinden Biyokimya. Nobel Kitabevi Ltd Şti. İstanbul, 2. Baskı, 4: 47-59.
- Choi, M.M.F., Liang M.M.K., Lee A.W.M., (2005). A biosensing method with enzyme-immobilized eggshell membranes for determination of total glucosinolates in vegetables. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 91–99.
- Conaway, C., Yang Y.M., Chung F.L., 2002. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents : Their biological activity and metabolism in rodents and humans. *Current and Drug Metabolism*, 3:233-255.
- Daniela, M., Radu, F., Poiana, M., Jianu, I., 2006. Myrosinase activity in *armoracia rusticana*. *Buletin USAMV-CN*, 62/ (88-93).

- Daxenbichler, M.E., Van Etten, C.H., Williams, P.H., 1980. Glucosinolate products in commercial sauerkraut. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 809-811.
- Durham, P.L. and Poulton, J.E., 1989. Effect of Castanospermine and Related polyhydroxyalkaloids on Purified Myrosinase from *Lepidium sativum* Seedlings. *Plant Physiol.*, 90, 48-52.
- Eylen, D.V., Indrawati., Hendrickx, M., Loey, A.V., 2006. Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapis alba* L.) myrosinase. *Food Chemistry*.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56:5-51.
- Fenwich, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J., 1983. Glucosinolates and their breakdown products in feeds and plants. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*;18:123–201.
- Foo, H.L., Grønning, L.M., Goodenough, L, Bone, A.M., Danielsen, B.E., Whiting, D.A., Rossiter J.T., 2000. Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS Lett*;468:243–6.
- Freeman, G.G and Mossadeghi, N., 1973. Studies on relationship between water regime and flavour strength in watercress (*Rorippa nasturtium-aquaticum* (L), cabbage (*Brassica oleracea capitata*) and onion (*Allium cepa*). *J. Hortic. Sci.* 48, 365.
- Gill, V. and Macleod A.J., 1980. Studies on glucosinolates degradation in *Lepidium sativum* seed extract. *Phytochemistry* 19, 1369-1374.
- Goodrich, R.M., Anderson, J.L., Stoewsand, G.S., 1989. Glucosinolate changes in blanched broccoli and Brussels sprouts. *J. Food Proc. Preserv.*, 13, 275-280.
- Gou, R., Yuan, G., Wang, Q., 2011. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae*, 128- 159–165.
- Gürgöl, F. ve Ademoğlu, E., 2006. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul.* 9:161-184.
- Gürgöl, F. ve Ademoğlu, E., 2010 *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul.* 2. Baskı. 9:127-139.
- Hames, D., and Hooper, N., 2010 *Biyokimya. Nobel Yay.Dağ.Şti. Ankara.* 3. Baskıdan Çeviri. C: 83-104.
- Hasler, C.M., 2002. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges A Position Paper from the American Council on Science and Health *J Nutr.* 132: 3772-3781.
- Hington, J.V., Delage, B., Williams, D.E., Dashwood, R.H., 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55, 224–236.
- John, F.K., 1987. "Enzyme Technology" (H.J. REHM., G. REED editör), *Biotechnology*, Vol 7A, 37-62.
- Jones, A.M.E., Bridges, M., Bones, A.M., Cole, R., Rossiter, J.T., 2001. Insect Biochemistry and Molecular. 31:1-5.
- Kassie, F. And Knasmüller S., 2000. Genotoxic effect of allyl isothiocyanate and phenyl isothiocyanate, *Chemico-Biological Interactions*, 127:163-180.
- Kelly, P.J., Bones, A., Rossiter, J.T., 1998. Subcellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* 206, 370–377.

- Kyung, K.H. and Fleming H.P., 1997. Antimicrobial activity of sulphur compounds derived from cabbage. *J. Of Food Protection*, 60:67-71.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–85.
- Lehninger, A.L., 2000, *Principle of Biochem.* Worth Publishers Inc., New York, 207-244.
- Lehninger, A.L., 2005. *Principles of biochemistry.* New York, Worth Publishers Inc.
- Leoni, O., Iori R., Palmieri S. , Esposito E., Menegatti E., Cortesi R., Nastruzzi C., 1997. Mirosinaz-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and in vitro antiproliferative studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Vol. 5, No. 9, 1799-1806.
- Liang, H., Yuan Q., Xiao Q., (2006). Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed, 43.1-4, 19.
- London, S.J., Yuan, J.M., Chung, F.L., Gao, Y.T., Coetzee, G.A., Ross. R.K., 2000. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai China. *Lancet*;356:724–9.
- Malik, M.S., Riley, M., Norsworthy, J.K., Bridges, W., 2010. Variation of Glucosinolates in Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) Accessions. *J. Agric. Food Chem.* , 58, 11626–11632.
- Martin, N.T., Kuhlmann, F., Müller,C., Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (2008) 506-516.
- Mikkelsen, M.D. and Halkier B.A., 2003. Metabolic Engineering of valine ve isoleucine- derived glukosinolats in *Arabidopsis* expressing CYP79D2 from *Cassava*, *Plant Physiology*; 131 (2), 773-779.
- Mithen, R.F., Dekker, M., Verkerk. R., Rabot. S., Johnson, I.T., 2000. The nutritional signfinance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods *J. Sci. Food and Agric*, 80, 967-984.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., and Rodwell, W.W., 2004. Harper' in *Biyokimyası.Nobel Tıp Kitapevleeri*.8.74-121.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2006. İnsan Biyokimyası.Palme Yayıncılık Ankara, 2. Baskı.V;221-248.
- Onat, T., Emerk, K., 1997, *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, (2. Baskı) İzmir.
- Özçelik, H. ve Öztürk, M., 1991. Anatomik ve Ekolojik Araştırmalar, Ege Üniv. Fen Bil. Ens. Derg., 2, 3; 23-26.
- Öztürk, M. ve Özçelik H., 1991. Doğu Anadolu' nun Faydalı Bitkileri (Useful Plant of Anatolia). *SUKAV (Siirt İlinin Spor Kültür ve Arştırma Vakfı)*, s196.
- Palmieri, S., Iori, R., Leoni O., *J. Agric. Food Chem.* (1986) 34, 138-140.
- Penas, E., Frias, J., Villaluenga, C.M., Valverde, C.V., 2011. Bioactive Compounds, Myrosinase Activity, and Antioxidant Capacity of White Cabbages Grown in Different Locations of Spain. *J. Agric. Food Chem*, 59, 3772–3779.
- Quinsac, A., Charrier, A., Ribaillier, D., Peron, J.Y. (1994). Glucosinolates in etiolated sprouts of sea-kale (*Crambe maritima* L.). *J. Sci. Food Agric*, 65, 201–207.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer J., 2000. Mirosinaz: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*. *Plant Molecular Biology*, 42: 93-113.

- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations, Inc, New York, p: 403.
- Shapiro, T.A., Fahey, J.W., Wade, K.L., Stephenson, K.K., Talalay P. (2001). Chemopreventive glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 501–508.
- Song, L., Morrison, J.J., Botting, N.P., Thornalley, P.J., (2005). Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC– MS/MS. *Analytical Biochemistry* 347; 234–243.
- Steinkellner, H., Rabot S., Freywald C., Nobis E., Scharf G., Chabicovsky M., Knasmüller S. Kassie F., 2001. Effect of *Cruciferous* vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research*, 480-481:285-297.
- Talalay, P. and Zhang, Y., 1996. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Trans. Biochem. Soc.* 24:806-810.
- Tanongkankit, Y., Chiwchan, N., Devahastin S., 2011. Evolution of anticarcinogenic substance in dietary fibre powder from cabbage outer leaves during drying. *Food Chemistry*, 127- 67–73.
- Trenerry, V.C., Caridi, D., Elkins, A., Donkor, O., Jones, R., 2006. The determination of glucoraphanin in broccoli seeds and florets by solid phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*
- Tuzlacı, E., 1985. Türkiye’ de Bitkilerin yöresel Kullanışları (I). Vernacular Use of Plant in Turkey, Mar.Ünv. Eczacılık Dergisi, 1(1-2)101-106.
- Ulubelen, A, Gil, R.R., Cordell, G.A., Meriçli A.H., Meriçli, F., 1995. *Phytochemistry* 39, 417-422.
- Voet, D. and Voet, J.G., 1995, *Biochemistry*, (second edition), New York, p. 346-350.
- Wang, N., Shen, L., Qiu S., Wang, X., Wang, K., Hao, J., and Xu, M. 2010. Analysis of the isothiocyanates present in three Chinese Brassica vegetable seeds and their potential anticancer bioactivities. *Eur Food Res Technol*, 231:951–958.
- Wattenberg, L.W., 1977. Inhibition of carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbons by benzyl isothiocyanate and related compounds. *Journal of the National Cancer Institute*, 58, 395-398.
- Whitaker, J. R. Determination of Molecular Weight of Proteins by Gel Filtration on Sephadex, *Anal. Chem.* 35 (1963) 1950-1953.
- Xue, J., Lenman, M., Falk, A., Rask, L., 1992. The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase in Brassicaceae is encoded by a gene family. *Plant Mol Biol* 18: 387-398.
- Yabar, E., Pedreschi, R., Chirinos, R., Campos, D., 2011. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry*, 127 -1576–1583.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., 2010. Moleküler Biyoloji. Nobel Yayın Dağ.Şti. Ankara, 2.Baskı, 8: 249-299.
- Zhang, Y., Kensler T.W., Cho C.G., Posner G.H., Talalay, P., 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 91(8), 3147-3150.

- Zhang, Y., and Talalay, P., 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res. (suppl.)* 54:1976s-1981s.
- Zhang, Y., 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research*, 555 (2004) 173–190.
- Zhang, Y., Fahey J. W., Talalay P., 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:10367-10372.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Rize/Pazar’da doğdu. İlköğrenimini Pazar 50.Yıl İlköğretim Okulu’nda, orta ve lise öğrenimini Pazar Ahmet Tahtakılıç Anadolu Lisesinde tamamladı. 2000 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında doktora eğitimine başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda doktorasını 2011 yılında tamamladı.