

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞEVKETİBOSTAN (*CNICUS BENEDICTUS*)
BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla ABAK

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Haziran 2021

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞEVKETİBOSTAN (*CNICUS BENEDICTUS*)
BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ ENZİMİNİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla ABAK

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 29.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Çağla ABAK
29.06.2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince her türlü desteğini, yardımını, fedakarlığını sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmalarına ışık tutan, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olup beni her konuda destekleyen çalışma arkadaşım, Duygu YAMAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni cesaretlendiren, maddi, manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve her konuda sonuna kadar yanımda bulunan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
1.1. Peroksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı.....	4
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER.....	5
2.1. Enzimlerin Tanımı.....	5
2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması.....	5
2.1.2. Enzimlere etki eden faktörler.....	6
2.1.2.1. Substrat konsantrasyonu.....	6
2.1.2.2. pH.....	7
2.1.2.3. Sıcaklık.....	8
2.1.2.4. Enzim konsantrasyonu.....	8
2.1.2.5. Zaman.....	9
2.1.2.6. İnhibitör etkisi.....	9
2.1.3. Enzim aktivite birimleri.....	10
2.1.4. Enzimlerin yapısı.....	10

2.1.5. Enzim kinetiği.....	11
2.1.6. Enzim inhibisyonu.....	14
2.1.6.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon.....	14
2.1.6.2. Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon.....	15
2.1.6.3. Yarı yarışmalı (un-kompetitif) inhibisyon.....	16
2.1.6.4. Karışık (mixed) inhibisyon.....	17
2.2. Serbest Radikaller.....	18
2.3. Antioksidan Enzimler.....	19
2.4. Peroksidaz Enzimi.....	20
2.4.1. Peroksidaz enziminin substratları.....	22
2.5. Şevketibostan (<i>Cnicus benedictus</i>).....	24
2.5.1. Faydaları.....	25
2.5.2. Besin değeri.....	26
 BÖLÜM 3.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	27
3.1. Kullanılan Materyal ve Malzemeler.....	27
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	27
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	27
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	28
3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu.....	29
3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması.....	29
3.2.2. Üçlü-faz ayırma tekniği (TPP).....	29
3.2.3. Tersiyer bütanol oranının optimizasyonu.....	30
3.2.4. Bradford yöntemi ile protein miktar tayini.....	30
3.2.5. SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez).....	31
3.3. Şevketibostan Bitkisinden Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu.....	33
3.3.1. POD aktivite tayini.....	33
3.3.2. Substrat spesifikliğı.....	33
3.3.3. pH etkisi.....	34

3.3.4. Sıcaklık etkisi.....	35
3.3.5. Enzim kinetiği.....	35
3.3.6. Şevketibostan bitkisinden POD aktivitesi üzerine madde etkisi.....	35
3.3.6.1. İnhibitör etkisi.....	35
3.3.6.2. Metallerin etkisi.....	36
3.3.6.3. Organik çözücü etkisi.....	36
3.3.6.4. İyonik şiddet etkisi.....	37
3.3.6.5. Enzimin tuz toleransı.....	37
3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı.....	37
 BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR.....	38
4.1. Peroksidaz (POD) Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması.....	38
4.2. Tersiyer Bütanol Oranının Optimizasyonu.....	39
4.3. SDS-PAGE ile Enzim Saflık Kontrolü.....	39
4.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	41
4.5. Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	41
4.5.1. pH etkisi.....	41
4.5.2. Sıcaklık.....	42
4.5.3. Enzim kinetiği.....	42
4.5.4. İnhibitör etkisi.....	53
4.5.5. Metal etkisi.....	55
4.5.6. Organik çözücü etkisi.....	57
4.5.7. Optimum iyonik şiddet.....	58
4.5.8. Enzimin tuz toleransı.....	58
4.5.9. Enzimin depolanma kararlılığı.....	59
 BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	61
KAYNAKLAR.....	66

ÖZGEÇMİŞ.....	74
---------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	:	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
APS	:	Amonyum persülfat
APX	:	Askorbat peroksidaz
AsA	:	Askorbik asit
BSA	:	Sığır serum albümin
CAT	:	Katalaz
dk	:	Dakika
DMF	:	N, N-Dimetilformamid
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
EC	:	Enzim komisyonu
EÜ	:	Enzim ünitesi
g	:	Gram
GSHPx	:	Glutatyon peroksidaz
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
I ₅₀	:	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	:	Kilodalton
K _i	:	İnhibisyon sabiti
kj	:	Kilojoule
K _m	:	Michaelis-Menten sabiti
M	:	Molar
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
NaN ₃	:	Sodyum azid
POD	:	Peroksidaz
PVP	:	Polivinil pirolidon

ROS	:	Reaktif oksijen türleri
S	:	Substrat
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
sn	:	Saniye
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin
TPP	:	Üçlü-faz Ayırma Tekniği (Three Phase Partitioning)
$V_{\max}$	:	Maksimum hız
μL	:	Mikrolitre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Substrat konsantrasyon grafiği.....	7
Şekil 2.2.	Optimum pH grafiği.....	7
Şekil 2.3.	Optimum sıcaklık grafiği.....	8
Şekil 2.4.	Enzim konsantrasyon grafiği.....	9
Şekil 2.5.	Enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları.....	11
Şekil 2.6.	Michaelis-Menten grafiği.....	12
Şekil 2.7.	Lineweaver-Burk grafiği.....	13
Şekil 2.8.	Yarışmalı inhibisyon şeması.....	15
Şekil 2.9.	Yarışmalı inhibisyonda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi.....	15
Şekil 2.10.	Yarışmasız inhibisyonda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi...	16
Şekil 2.11.	Yarı yarışmalı inhibisyon şeması.....	16
Şekil 2.12.	Yarı yarışmalı inhibisyonda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi.....	17
Şekil 2.13.	Karışık inhibisyon grafiği.....	18
Şekil 2.14.	Karışık inhibisyonda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi.....	18
Şekil 2.15.	POD fenolik substratı kullanılarak hidrojen peroksit giderme mekanizması.....	22
Şekil 2.16.	Peroksidaz enziminin bazı substratları.....	23
Şekil 2.17.	Şevketibostan çiçeği.....	24
Şekil 2.18.	Şevketibostan.....	24
Şekil 2.19.	Şevketibostan genel görünümü.....	25
Şekil 2.20.	Şevketibostan pazardan alınmış hali.....	25
Şekil 3.1.	Bradford yönteminde kullanılan standart grafiği.....	30
Şekil 4.1.	TPP ara faz POD aktivite değişimi.....	38
Şekil 4.2.	Tersiyer bütanol ara faz POD aktivite değişimi.....	39
Şekil 4.3.	SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel fotoğrafı.....	40

Şekil 4.4.	SDS-PAGE sonucu çizilen Rf-log MW grafiği.....	40
Şekil 4.5.	Şevketibostan POD enzimi optimum pH grafiği.....	41
Şekil 4.6.	Şevketibostan POD enzimi optimum sıcaklık grafiği.....	42
Şekil 4.7.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı 4-metil katekol substratının doygunluk grafiği.....	43
Şekil 4.8.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı 4-metil katekol substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	43
Şekil 4.9.	Şevketibostan POD enzimi için sabit 4-metil katekol konsantrasyonu H ₂ O ₂ farklı substratının doygunluk grafiği.....	44
Şekil 4.10.	Şevketibostan POD enzimi için sabit 4-metil katekol konsantrasyonu farklı H ₂ O ₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	44
Şekil 4.11.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı pirogallol substratının doygunluk grafiği.....	45
Şekil 4.12.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı pirogallol substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	45
Şekil 4.13.	Şevketibostan POD enzimi için sabit pirogallol konsantrasyonu farklı H ₂ O ₂ substratının doygunluk grafiği.....	46
Şekil 4.14.	Şevketibostan POD enzimi için sabit pirogallol konsantrasyonu farklı H ₂ O ₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 4.15.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı o-fenilendiamin substratının doygunluk grafiği.....	47
Şekil 4.16.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı o-fenilendiamin substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 4.17.	Şevketibostan POD enzimi için sabit o-fenilendiamin konsantrasyonu farklı H ₂ O ₂ substratının doygunluk grafiği.....	48
Şekil 4.18.	Şevketibostan POD enzimi için sabit o-fenilendiamin konsantrasyonu farklı H ₂ O ₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 4.19.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu farklı kafeik asit substratının doygunluk grafiği.....	49

Şekil 4.20.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı kafeik asit substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 4.21.	Şevketibostan POD enzimi için sabit kafeik asit konsantrasyonu farklı H_2O_2 substratının doygunluk grafiği.....	50
Şekil 4.22.	Şevketibostan POD enzimi için sabit kafeik asit konsantrasyonu farklı H_2O_2 substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 4.23.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı gallik asit substratının doygunluk grafiği.....	51
Şekil 4.24.	Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı gallik asit substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 4.25.	Şevketibostan POD enzimi için sabit gallik asit konsantrasyonu farklı H_2O_2 substratının doygunluk grafiği.....	52
Şekil 4.26.	Şevketibostan POD enzimi için sabit gallik asit konsantrasyonu farklı H_2O_2 substratının Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 4.27.	Şevketibostan POD enzimi üzerine askorbik asit etkisi.....	53
Şekil 4.28.	Şevketibostan POD enzimi üzerine sodyum azid etkisi.....	54
Şekil 4.29.	Şevketibostan POD enzimi askorbik asit Lineweaver-Burk grafiği.....	54
Şekil 4.30.	Şevketibostan POD enzimi NaN_3 Lineweaver-Burk grafiği.....	55
Şekil 4.31.	Şevketibostan POD enzimi üzerine metal etkisi grafiği.....	56
Şekil 4.32.	Şevketibostan POD enzimi üzerine organik çözücü etkisi grafiği.....	57
Şekil 4.33.	Şevketibostan POD enzimi üzerine optimum iyonik şiddet grafiği.....	58
Şekil 4.34.	Şevketibostan POD enzimi NaCl tuz tolerans grafiği.....	59
Şekil 4.35.	Şevketibostan POD enziminin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki aktivitesinin zamanla değişim grafiği.....	59
Şekil 4.36.	Şevketibostan POD enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişim grafiği.....	60

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri.....	19
Tablo 2.2. Antioksidan kaynak türleri ve örnekler.....	20
Tablo 2.3. Peroksidaz familyasının sınıflandırılması.....	21
Tablo 3.1. % 15'lik ayırma jeli için kullanılan miktarlar.....	31
Tablo 3.2. % 5'lik yürütme jeli için kullanılan miktarlar.....	31
Tablo 3.3. Yükleme (numune) tamponu için kullanılan miktarlar.....	32
Tablo 3.4. Yürütme tamponu için kullanılan miktarlar.....	32
Tablo 3.5. 0,1 M sitrik tamponunun hazırlanması.....	34
Tablo 3.6. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması.....	35
Tablo 4.1. Şevketibostan POD enziminin TPP ile saflaştırılma sonuçları.....	38
Tablo 4.2. Şevketibostan POD enzimi substrat spesifikliğı K_m ve V_{max} değerleri.....	53
Tablo 4.3. Şevketibostan POD enzimi üzerine inhibisyon türleri, K_i ve I_{50} değerleri.....	55
Tablo 4.4. Şevketibostan POD enzimi üzerine metal etkisi sonuçları.....	56
Tablo 4.5. Şevketibostan POD enzimi üzerine organik çözücü etkisi sonuçları.....	57

ÖZET

Anahtar kelimeler: Peroksidaz, Şevketibostan, *Cnicus benedictus*, üçlü-faz ayırma tekniği (TPP), SDS-PAGE

Bu çalışmada, Peroksidaz (POD) enzimi Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Öncelikle, POD enzimi üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) ile saflaştırılmış ve SDS-PAGE yöntemiyle saflık kontrolü yapılmıştır. POD enziminin molekül ağırlığı 63 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin kinetik karakterizasyon çalışmalarında, substrat spesifikliğini belirlemek için 4-metil katekol, H₂O₂, o-fenilendiamin, gallik asit, kafeik asit ve pirogallol substratları kullanılmıştır. Kullanılan tüm substratlar için Michaelis-Menten (K_m) sabiti ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri hesaplanmıştır. Enziminin karakterizasyon çalışmalarında ayrıca optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddeti, tuz toleransı ve enzimin depolanma kararlılığı incelenmiştir. Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) POD enziminin optimum pH'sı 7,0 ve optimum sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuştur. Şevketibostan POD enzimini askorbik asit, sodyum azid (NaN₃), Fe⁺³, Fe⁺², Hg⁺², Sn⁺², Pb⁺², Cd⁺², Cu⁺², K⁺, Na⁺, Ca⁺ metalleri, DMSO, DMF, etanol, aseton ve t-butanol organik çözücülerini inhibe etmektedir.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME PEROXIDASE FROM SEVKETIBOSTAN (*CNICUS BENEDICTUS*) PLANT

SUMMARY

Keywords: Peroxidase, Sevketibostan, *Cnicus benedictus*, triple-phase separation technique (TPP), SDS-PAGE

In this study, Peroxidase (POD) enzyme was purified from Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) and its kinetic properties were investigated. First, POD enzyme was purified by the triple-phase separation technique (TPP) and its purity was checked by SDS-PAGE method. The molecular weight of the POD enzyme was found to be 63 kDa. In the kinetic characterization studies of the enzyme, 4-methyl catechol, H₂O₂, o-phenylene diamine, gallic acid, caffeic acid and pyrogallol substrates were used to determine the substrate specificity. Michaelis-Menten (K_m) constant and maximum reaction rate (V_{max}) values were calculated for all substrates used. In the characterization studies of the enzyme, optimum pH, optimum temperature, optimum ionic strength, salt tolerance and storage stability of the enzyme were investigated. POD enzyme from Sevketibostan (*Cnicus benedictus*) was found to have an optimum pH of 7.0 and an optimum temperature of 30 °C. Sevketibostan POD enzyme ascorbic acid, sodium azide (NaN₃), Fe⁺³, Fe⁺², Hg⁺², Sn⁺², Pb⁺², Cd⁺², Cu⁺², K⁺, Na⁺, Ca⁺ metals, DMSO, DMF inhibits ethanol, acetone and t-butanol organic solvents.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Oksijen insanların yaşamı için oldukça önemli olmasına rağmen, metabolizmada üretilen bazı serbest radikaller (reaktif oksijen türleri) (ROS) vücuda zarar verebilmektedir. Çoğunluğunu reaktif oksijen türlerinin oluşturması, doğal oksijen molekülüyle kıyaslandığında, kimyasal reaktivitelerinin daha fazla oksijen formlarında olduğu gözlemlenmiştir [1, 2].

Stres durumlarında ROS düzeylerini kontrol edebilmek ve bitki dokularındaki hücreleri korumak için serbest radikalleri ortamdan kaldıran POD (peroksidaz), CAT (katalaz), SOD (süperoksit dismutaz), APX (askorbat peroksidaz) vb. birçok enzimler ve moleküler ağırlıkları küçük olan antioksidanları (glutatyon, fenolik bileşikler, askorbat, tokoferoller vb.) içermektedirler [3].

Bitkilerin tüm kısımları doğal antioksidanlardan oluşmaktadır. Vitaminler, flavonoidler, karotenoidler, glutatyon, fenoller gibi metabolitleri içermektedirler. Fonksiyonel etkileri; serbest radikal giderimi, enzim inhibitörleri, peroksit parçalayıcı gibi bitki kaynaklı antioksidanlardır [4]. Meyve ve pek çok antioksidanları bulundurlar [5]. Bol bol sebzelerde, tohumlarda, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, kabuklarda, çiçeklerde, yapraklarda ve köklerde antioksidan bileşikler bulunmaktadır [6].

1.1. Peroksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Vitali ve arkadaşları (1998) POD enzimini yabani sinamekiden saflaştırmıştır. SDS-PAGE yöntemiyle molekül ağırlığını yaklaşık 43 kDa, jel filtrasyon yöntemiyle 50 kDa olarak elde etmişlerdir [7].

Mdluli (2005) POD enzimini maruldan saflaştırmıştır. Jel filtrasyonu, Triton X114 ve DEAE iyon değişimi yöntemleriyle molekül ağırlığını 71 kDa olarak bulunmuştur. POD, ABTS ve hidrojen peroksit ile pH 4,0'te maksimum aktivite, K_m 'si 1,77 mM olarak elde etmiştir [8].

Spitzer ve arkadaşları (1924) POD enziminin çalışmalarında yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Bitki ve hayvan dokularında ve tüm yaşam organizmalarında var olduğuna değinilmiştir. POD enziminin farklı özelliğinden dolayı bozunmalara dirençli olduğuna da vurgulanmıştır [9].

Manu ve arkadaşı (2009) POD enzimini buğday kepeğinden anyon değişimi, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve katyon değişimi yöntemleriyle saflaştırmışlardır. Optimum pH'ını 4,8, molekül ağırlığını 44 kDa ve karbohidrat içeriğini %13,8 olarak elde etmişlerdir [10].

Serrano martinez ve arkadaşları (2008) POD enzimini tatlı kırmızı biberden Triton X-114 ve amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırmışlardır. ABTS substratı ile optimum pH'ını 4,5 ve K_m 'si 1,32 mM, V_{max} 'ı 0,495 olarak bulunmuştur. Askorbik asitin indirgeyici etkisi en aktif olarak belirlenmiştir [11].

Rodriguez ve arkadaşları (2000) POD enzimini kavundan anyon değişim kromatografisiyle kısmen saflaştırmıştır. Askorbik asit ile yapılan çalışmalarda aktivite göstermemiştir ancak guaiakolü büyük oranda yükseltmiştir. Optimum pH'ı 5,5 olduğu elde edilmiştir [12].

Belcarz ve arkadaşları (2008) POD enzimini lahanadan izole ederek kısmen saflaştırmıştır. Optimum pH'ı 6,0, optimum sıcaklığı 40 °C olarak bulunmuştur. Kinetik çalışmalar sonucunda guaiacol (6,41 ve 13,89)'ün, o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM) ve ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM)'nin K_m 'leri daha yüksek değerlere sahip olduğu bulunmuştur [13].

Depa ve arkadaşları (2002) POD enzimini hurma yaprağı yağından anyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi ve moleküler dışlama kromatografisi yöntemleriyle saflaştırmıştır. Optimum pH'ı 5,0 bulunmuştur. K_m değerleri guaiakol 3,96 mM, ABTS 1 mM ve pirogallol 0,84 mM olarak bulunmuştur [14].

Saraiva ve arkadaşları (2007) POD enzimini zeytinden elektroforetik homojenlik açısından saflaştırmıştır. Optimum pH'ı 7,0 ve optimum sıcaklığını 34,7 °C olarak bulunmuştur. K_m değerleri hidrojen peroksit 41,0 mM ve fenol 0,53 mM olarak bulunmuştur. POD enzimi ile yükseltgenen fenol bileşiği aktivasyon enerjisi 99,1 kJ mol⁻¹ olarak bulunmuştur [15].

POD enzimi literatür araştırmalarında birçok bitki, hayvan ve mikroorganizmadan saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmalara; *Leucaena leucocephala* ağacı meyvesinden [16], yeşil bezelyeden [17], bürüksel lahanasından [18], kırmızı pancardan [19], brokoliden [20], kara lahanadan [21], bamyadan, [22], ısırgan otundan [23], tütünden [24], pamuktan [25], arpadan [26], domatesten [27], vanilya çekirdeğinden [28], havuçtan [29], portakaldan [30], biberden [31], çay yapraklarından [32], çilekten [33], at turpundan [34], mısırdan [35], çavdar yapraklarından [36], hindiba bitkisinden [37], papaya meyvesinden [38], tatlı patates yumrularından [39], kiwano bitkisinden [40], karahindiba bitkisinden [41], kuru fasulyeden [42], deve dikenini bitkisinden [43], pazıdan [44], portakal ve limon çiçeklerinden [45] kısmi saflaştırma çalışmaları örnek olarak verilebilir.

POD enzimi bitkiden saflaştırılması ile ilgili çalışmalarda pek çok izoenzim yapıları bildirilmiştir. Bitki kaynaklarından saflaştırılan bu izoenzimler, farklı optimum pH, optimum sıcaklık, molekül ağırlığı ve substrat konsantrasyonu elde edilmiştir [46]. Örnek olarak POD enzimin molekül kütlesi hurma yapraklarında [14] 48 kDa, çilekte [33] 65 kDa, brokoli [20] ve domateste [27] 43 kDa, kara lahanadan [21] 95 kDa olarak bildirilmiştir.

1.2. Çalışmanın Amacı

Endüstriyel çalışmalarda enzimler sürekli olarak kullanılmaktadır ve elde edilen sonuçlar yüksek verime sahiptir. Bu sebeple enzimlerin farklı kaynaklar kullanılarak saflaştırılması, izole edilmesi, içerisinde bulunan özelliklerin karakterize edilmesi ile enzimlerin kullanılabilirliği endüstride araştırılmakta ve bu çalışmaların zamanla sayısı ve değeri artmaktadır.

Peroksidaz enzimleri, kimya, ilaç, gıda gibi pek çok endüstri alanlarında kullanılmaktadır. Peroksidaz enzimi sentetik boyalardan renk giderilmesinde, endüstriyel atık suların işlenmesinde en çok tercih edilen enzimdir. Aktivite ölçüm kolaylığı, bozunmaya karşı direnci ve termal kararlılığının yüksek olması endüstride tercih edilme sebeplerindendir. Bu gibi etkiler düşünüldüğünde yapılan yeni çalışmaların daha verimli sonuçlar elde edebileceği açısından peroksidaz enzimi önem arz etmektedir.

Literatür araştırmalarında Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisiyle enzim, saflaştırma ve enzim karakterizasyonu çalışmalarının yapılmamış olması materyal olarak seçilmesinde en önemli etken olmuştur.

Bu çalışmanın amacı Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden POD enziminin izolasyonu, kısmi saflaştırılması, optimum sıcaklık, optimum pH, optimum iyonik şiddet, substrat spesifikliğı, tuz toleransı ve farklı kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesidir.

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1. Enzimlerin Tanımı

Enzimler, protein yapısında bulunan ve biyolojik aktiviteye sahip canlı hücreler tarafından sentezlenen moleküllerdir. Enzimler tarafından tüm biyokimyasal reaksiyonlar katalizlenir. Enzimler invitro sistemlerde hücreden ayrı aktivite gösterebilirler. Enzimler biyokimyasal olaylar için son derece önemlidirler [47].

Enzimlerin etki ederek değişime uğrattığı moleküllere enzimin substratı denir. Her zaman tek substratlı enzim bulunmayabilir, birden fazla substratlı enzimlerde vardır. Enzimler kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, tıpta, peynir, ekmek üretiminde birçok kullanım alanına sahiptirler [48].

2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Substrat, enzimlerin ürüne dönüştürdüğü maddelere verilen addır. Enzimler katalizledikleri tepkimenin sonuna -az eki getirilerek (glukoz oksidaz, alkol dehidrojenaz), substrat adının sonuna -az eki getirilerek (lipaz, amilaz, maltaz), katalizledikleri substrat adının sonuna -az veya -olitik eki getirilerek (proteolitik enzimler, esteraz), üretildikleri kaynağın sonuna -in eki getirilerek (pankreatin, papain) adlandırılırlar [49-51].

Enzimler basit ve bileşik (kompleks) enzimler olmak üzere iki kısımda incelenirler:

Basit Enzimler: Sadece protein kullanılarak oluşan tek veya çok alt birimlere bulunduran enzimlerdir. Tripsin, pepsin, üreaz gibi enzimler örnek verilebilir.

Bileşik (Kompleks) Enzimler: Protein birlikte metal ya da organik bir molekül bulunduran enzimlere denilir. Karbonik anhidraz, heksokinaz, laktat dehidrojenaz, piruvat karboksilaz gibi enzimler örnek verilebilir [52].

Enzimler altı fonksiyonel sınıfa Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından ayrılmıştır. Bu sınıflandırma da enzimler, spesifik tepkime, tepkime türü, substrat ya da substratları belirten dört basamaklı numaralar (E.C) ile tanımlanırlar.

1. Oksidoredüktazlar: Kimyasal gruplara etki ederek yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler. Örnek olarak laktat dehidrojenaz ve katalaz verilebilir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların alıcı-vericiler arasında taşındığı reaksiyonları katalizlerler. Örnek olarak heksokinaz ve aspartat transaminaz verilebilir.
3. Hidrolazlar: Su katılarak parçalanın bağların hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler. Örnek olarak lipaz ve kolesterol verilebilir.
4. Liyazlar: ksidasyon ve hidroliz hariç bağ kıran reaksiyonları katalizlerler. Örnek olarak adenilat sükras ve piruvat dekarboksilaz verilebilir.
5. İzomerazlar: İzomerizasyon tepkimelerini katalizlerler. Örnek olarak trioz ve fosfat izomeraz verilebilir.
6. Ligazlar: ATP enerjisi ile iki molekülü birleştirirler. Sentetazlar olarak da adlandırılırlar. Örnek olarak DNA ligaz verilebilir. [52,53]

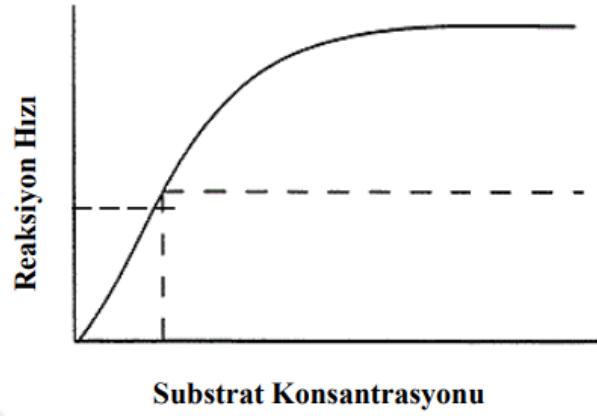
2.1.2. Enzimlere etki eden faktörler

Enzimlerin aktivasyonunu substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, zaman, inhibitör etkisi gibi birçok faktör bulunur.

2.1.2.1. Substrat konsantrasyonu

Sabit konsantrasyonda bulunan enzim, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. Enzim substrat doygunluk noktasına gelene kadar doğrusal olarak artmaktadır. Doygunluğa ulaştığı andan itibaren reaksiyon hızı

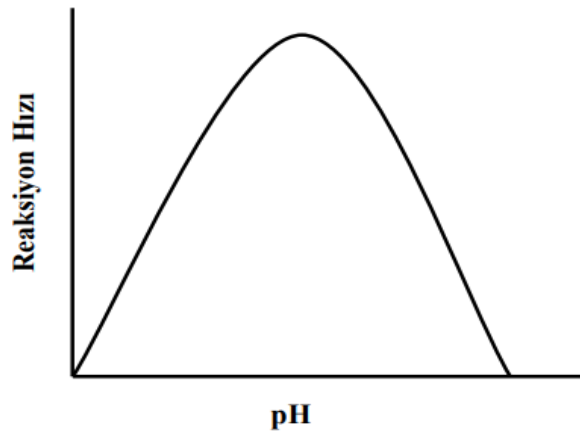
değişmeden devam etmektedir. Böylece enzim maksimum hız noktasına ulaşmıştır. $V_{\max}$ maksimum hızı göstermektedir. Şekil 2.1.'de substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisinin grafiği gösterilmiştir [54].



Şekil 2.1. Substrat konsantrasyon grafiği [54]

2.1.2.2. pH

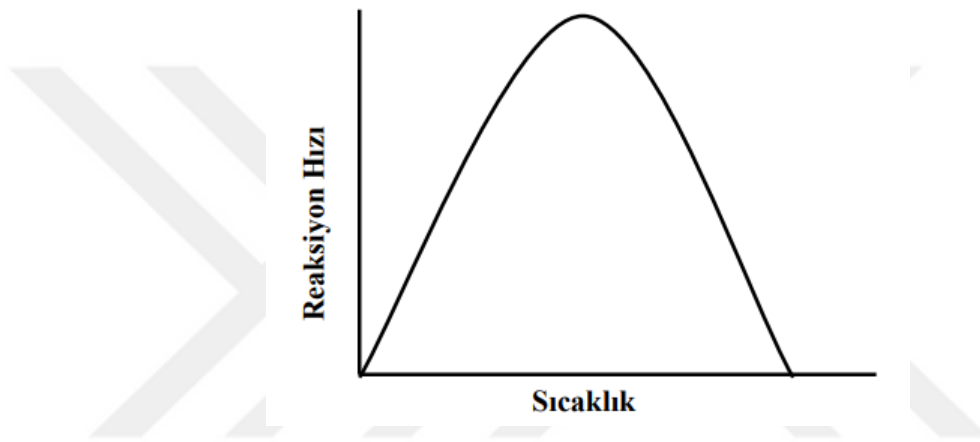
Enzimlerin aktivitesi H^+ iyon konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Tüm enzimlerin aktiviteleri farklı pH değerlerine sahiptirler. Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri pH'ya optimum pH'ı denilmektedir. Optimum pH'ının alt ve üst pH değerlerinde enzim aktivitesi yavaşlamaktadır. Bu sebeple enzimin optimum pH'ını dengede tutabilmek için tampon çözeltiler kullanılır. Şekil 2.2.'de pH değişiminin reaksiyon hızına etkisi gösterilmiştir [54].



Şekil 2.2. Optimum pH grafiği [54]

2.1.2.3. Sıcaklık

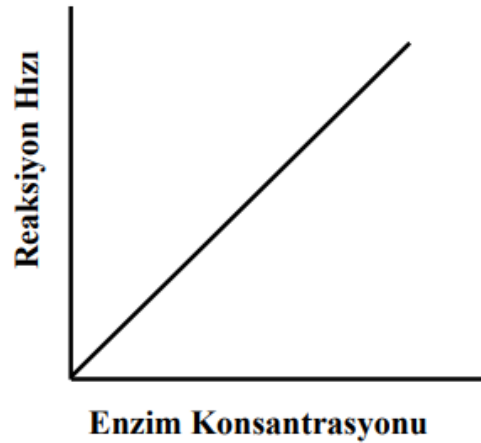
Sıcaklık enzimatik reaksiyonun hızını artırır. Kimyasal tepkimelerin sıcaklıkları 10 °C'lik arttırıldıklarında tepkimelerin hızı iki katına çıkmaktadır. Enzimler yapılarında protein bulundurdıklarından sıcaklık değişimleriyle denatürasyona uğrarlar. Enzimler yüksek sıcaklıklarda yapısal bozulmalardan dolayı tersinmez, düşük sıcaklıklarda tersinirdirler. Optimum sıcaklık o enzimin maksimum aktivitesi olarak adlandırılır. Şekil 2.3.'de optimum sıcaklık grafiği gösterilmiştir [54].



Şekil 2.3. Optimum sıcaklık grafiği [54]

2.1.2.4. Enzim konsantrasyonu

Bir reaksiyonda yeteri kadar substrat bulunuyorsa enzim konsantrasyonu enzimatik reaksiyonu ile doğrusal olarak artmaktadır. Enzimler substratları ile reaksiyona girerek onları değişikliğe uğratırlar, bu nedenle reaksiyonda ne kadar çok substrat var ise o kadar çok enzim-substrat kompleksi kurulmuş olur ve o kadar fazla ürün oluşur. Ortamda enzim ne kadar çok olursa birim zamanda elde edilen ürünlerde o kadar çok olacaktır. Bir enzimatik reaksiyonda ölçülen ilk hız (V_0), enzim konsantrasyonu $[E]$ ile doğru orantılıdır. Şekil 2.4.'de grafiği gösterilmiştir [49, 56].



Şekil 2.4. Enzim konsantrasyon grafiği [56]

2.1.2.5. Zaman

Enzim reaksiyonunun hızı belirlenen zamanda elde edilen ürünün miktarıyla belirlenir. Enzimatik reaksiyonlarda enzim başta hızlı çalışırken zamanla reaksiyonun hızı giderek azalır. Bu azalmanın sebepleri;

- Substrat konsantrasyonunun azalması
- Fazla ürün birikimiyle enzimin denatüre olması
- Reaksiyon dengesinin girenlere kayması
- Reaksiyon oluşumunu engelleyen ürünlerin oluşması olabilir [43, 56].

2.1.2.6. İnhibitör etkisi

Enzimatik reaksiyonların aktivitesini azaltan ya da tamamen durduran moleküllere inhibitör denilir. Genellikle inhibitörler küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Enzim reaksiyonlarında inhibisyon ile aktivitenin azalması ya da tamamen durdurması biyolojik sistemler için önemlidir [41].

Enzim aktivitesin de inhibisyonun önemi;

- Enzim kataliz mekanizmasında kaynak olarak kullanılabilir.
- İlaç ve toksik maddelerin üretilmesini sağlar.
- Biyolojik sistemlerde kontrol mekanizması olarak kullanılmasıdır [53].

2.1.3. Enzim aktivite birimleri

Enzimlerin biyolojik reaksiyonlarda az miktarlarda bulunurlar ve miktarlarının ölçülmesi oldukça zordur fakat aktiviteleri ölçülebilmektedir. Enzimlerin aktiviteleri birçok şekilde ifade edilebilmektedir. Bunlar;

Enzim ünitesi (U): 1 enzim ünitesi (EU) optimum şartlarda (sıcaklık, pH, substrat derişimi) bir dakikada 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Ünit (birim) aktivite (IU) çok fazla kullanılan enzim aktivite birimidir. Spesifik aktivite: 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesidir. Enzim saflık miktarının ölçüsüdür. U/mg protein olarak hesaplanır.

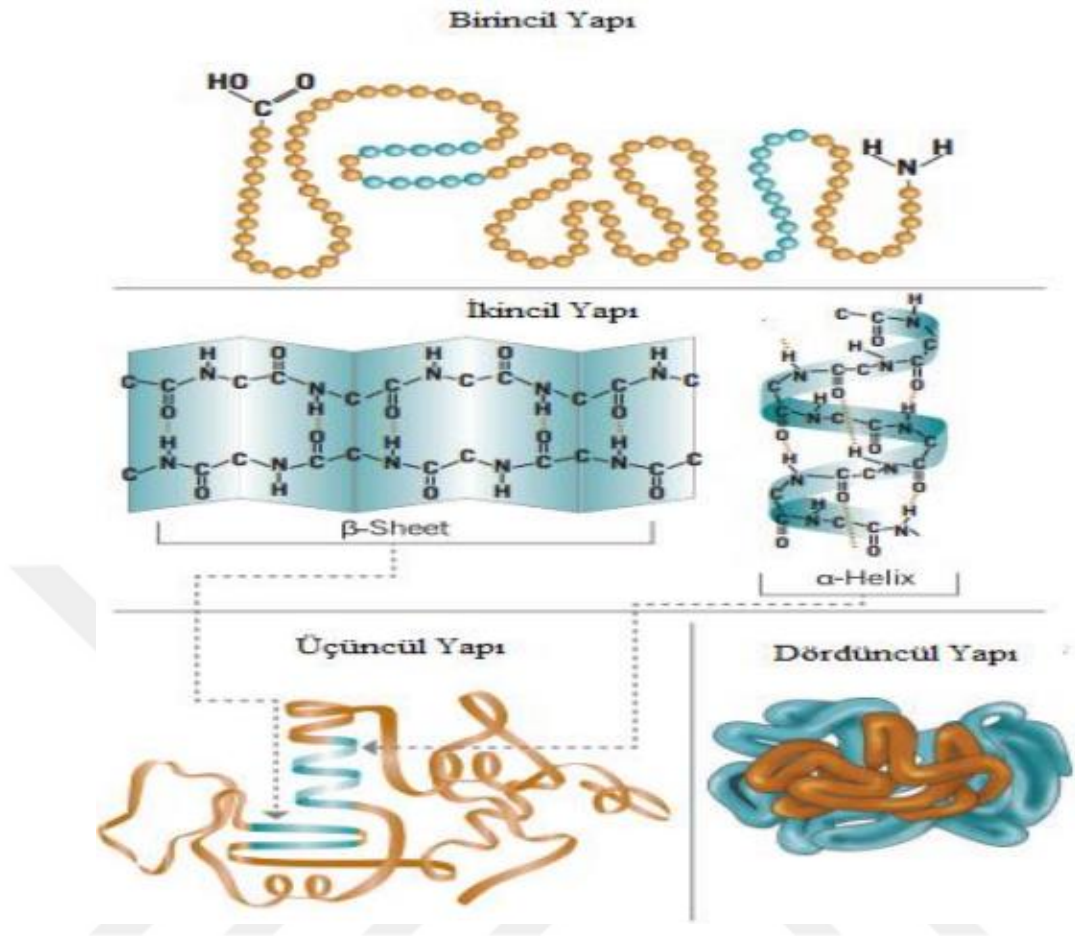
Katal: Bir saniyede bir mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır [49, 53]

2.1.4. Enzimlerin yapısı

Enzimler, üç boyutlu konfigürasyonlarla kıvrılmış polipeptit zincirlerinden meydana gelirler. Bir amino asidin α -karboksil karbonu ile başka bir amino asidin azotu arasında meydana gelen C-N bağları peptit bağlarıdır. Enzimlerin üç boyutlu yapıları Şekil 2.5.'de gösterilmiştir.

Enzimlerin üç boyutlu yapısı;

1. Birincil (primer) yapı: Polipeptit zincirindeki amino asitlerin doğrusal sırlanmasını ve sayısını ifade eder. Amino asitler kıvrılma sıralarını içerdikleri bilindiği üzere, yapay kıvrımları açıldıktan sonra, uygun pH, sıcaklık ve iyonik güç durumlarında inkübe olan proteinlerin kendiliğinden doğal hallerine dönmesiyle ispatlanmıştır.
2. İkincil (sekonder) yapı: Tekrarlanan konformasyonları ifade eder. Enzimler Küresel (globüler) ve fibril (lifsel) olarak iki sınıfa ayrılır. α -heliks ve β -tabakası yapıları örnek verilebilir.
3. Üçüncül (tersiyer) yapı: Hidrojen bağları, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerle yönetilir.
4. Dördüncül (kuaterner) yapı: Oligopeptitlerden meydana gelen hidrojen bağları ve iyonik bağlarla oluşturulan protein ve protein etkileşimlerinden oluşurlar.

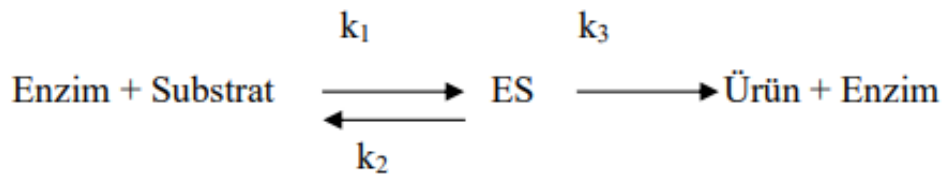


Şekil 2.5. Enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları [44]

2.1.5. Enzim kinetiği

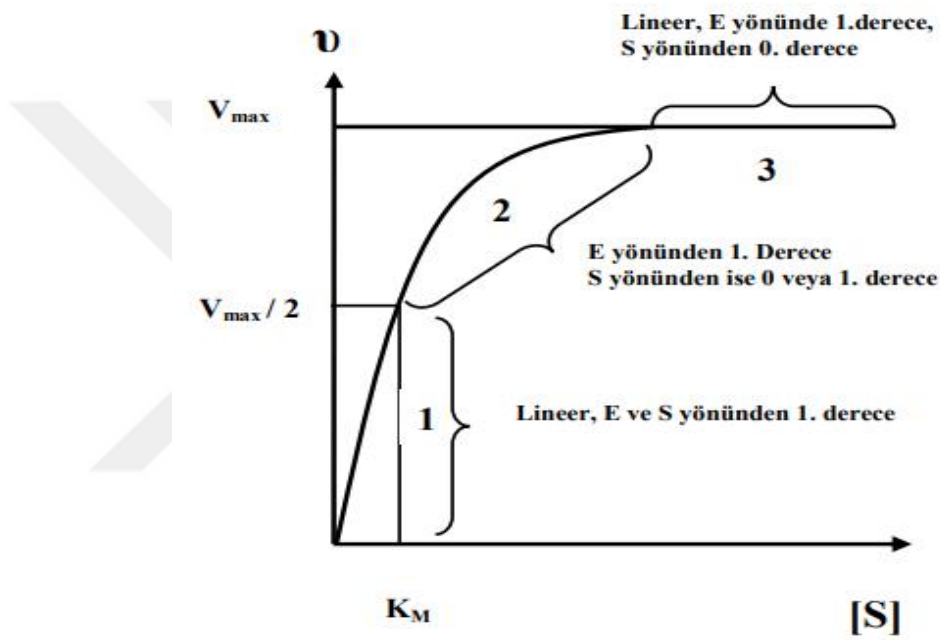
Enzim kinetiği üzerine ilk çalışmaları Michaelis Menten adlı araştırmacılar 1913 yılında yapmışlardır. Bu araştırma sonucunda enzim (E) ilk olarak substrat (S) ile birleşir ve (ES) kompleksi meydana gelir. Daha sonra enzim substratını ürüne çevirir, enzim ve ürün oluşur.

Michaelis-Menten mekanizması;



Bu denklemde k_1 ; ES kompleksini oluşturan hız sabiti, k_2 ; ES kompleksinin enzim ve substrata ayrılması için kullanılan hız sabiti ve k_3 ; enzim ve ürün oluşmasını sağlayan hız sabitidir.

Enzimatik reaksiyonlarda substrat konsantrasyonunun artışıyla reaksiyon hızının sonuçları grafik haline getirildiğinde hiperbolik eğri elde edildiği görülmüştür (Şekil 2.6.). Böylece Michaelis-Menten bağıntısı elde edilmiştir.



Şekil 2.6. Michaelis-Menten grafiği [49]

Michaelis-Menten denklemi;

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.1)$$

K_m ; enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Maksimum hızın yarısına ifade eden substrat konsantrasyonunu gösterir. V_{max} ; maksimum hızı gösterir. Enzim aktivitelerini belirleyen K_m ve V_{max} enzim sabitleridir.

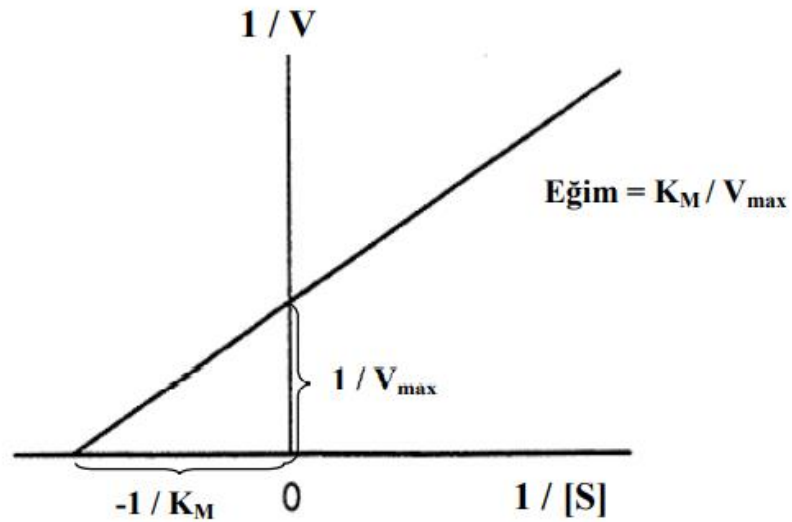
Michaelis-Menten denklemine göre K_m ve reaksiyon hızına $[S]$ bağlıdır ve üç kısımdan oluşmaktadır. Bu sonuçlar Michaelis-Menten denkleminde yerlerine yazılarak bulunmuştur.

1. $[S] \ll K_m$ ise; hız $[S]$ 'nuna bağlıdır.
2. $[S] \gg K_m$ ise; hız V_{max} 'a eşittir.
3. $[S] = K_m$ ise; hız $V_{max}/2$ 'ye eşit olur.

Michaelis-Menten grafiği hiperbol bir eğri olduğundan, doğru denklemine dönüştürmek gerekmektedir. Elde edilen bu doğru denklemi Lineweaver-Burk denklemi kullanılır.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

Bu denklemde $1/[S]$ ve $1/[V]$ değerleri kullanılarak doğru elde edilir. Oluşan doğrunun eğimi K_m/V_{max} 'tır, Şekil 2.7.'de gösterilmiştir [49,56].



Şekil 2.7. Lineweaver-Burk grafiği [49]

2.1.6. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibitörleri dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar.

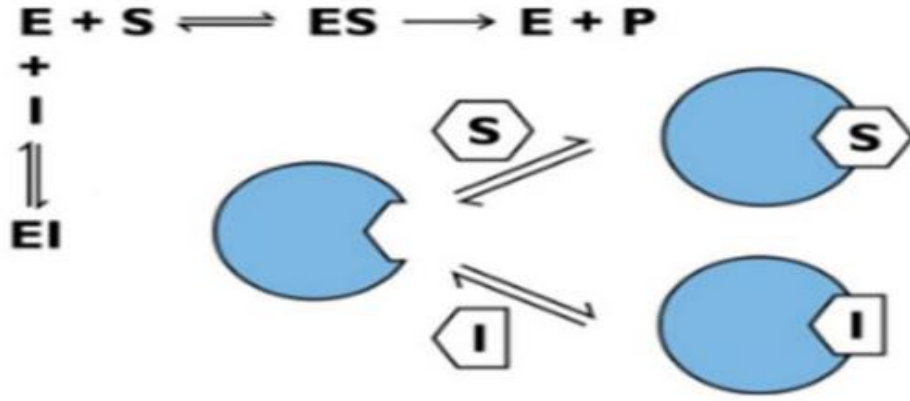
Dönüşümsüz inhibisyon: Enzime inhibitör kovalent bağlarla sıkıca tutunmasıyla meydana gelen inhibisyon türüdür. Bu nedenle diyaliz vb. yöntemler kullanılarak enzim aktivitesini geri kazanamaz.

Dönüşümlü inhibisyon: Tersinir inhibisyon olarak da adlandırılır. Enzimlerden inhibitörler diyaliz, seyreltme vb. yöntemlerle kolayca ayrılabilirler. Böylece enzim aktivitesi tekrar elde edilmiş olur. Dönüşümlü inhibisyon ortamda bazı metal iyonlarının ya da organik maddelerin eklenmesiyle meydana gelir. Bu inhibisyon türü 4 gruba ayrılır;

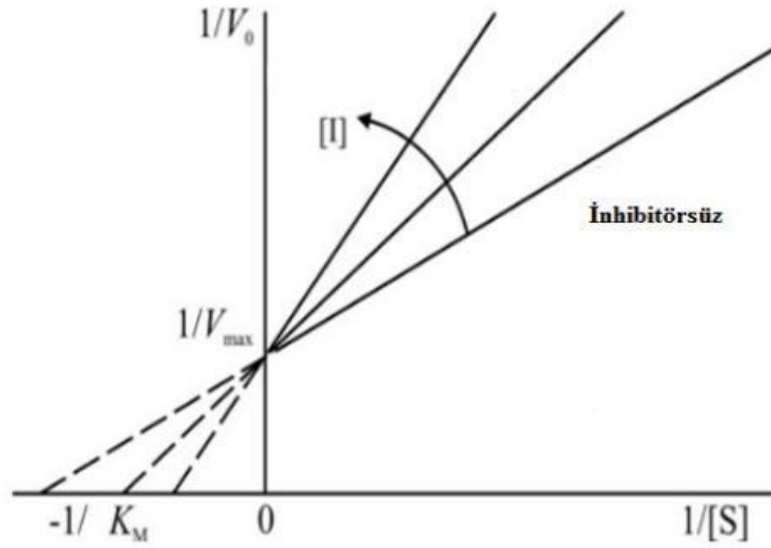
- Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon,
- Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon,
- Yarı yarışmalı (un-kompetitif) inhibisyon
- Karışık (mixed) inhibisyon [42,52].

2.1.6.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

İnhibitör ile substrat, enzimin aktif merkezine bağlanabilmek için aralarında yarış halindedirler. İnhibitör enzimin aktif merkezine bağlanarak enzimin bağlanmasını engellemektedir. Bu sebeple enzim substrat ilgisini azaltarak K_m değerini artırır. Yarışmalı inhibisyon şeması ve Linewear-Burk grafiğinin değişimi Şekil 2.8. ve 2.9.'da gösterilmiştir [57].



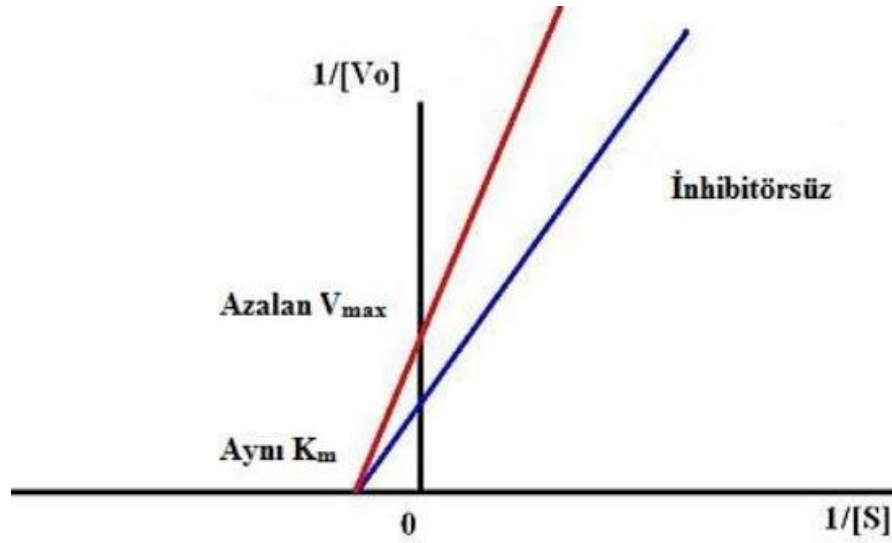
Şekil 2.8. Yarışmalı inhibisyon şeması [57]



Şekil 2.9. Yarışmalı inhibisyonda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi [57]

2.1.6.2. Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon

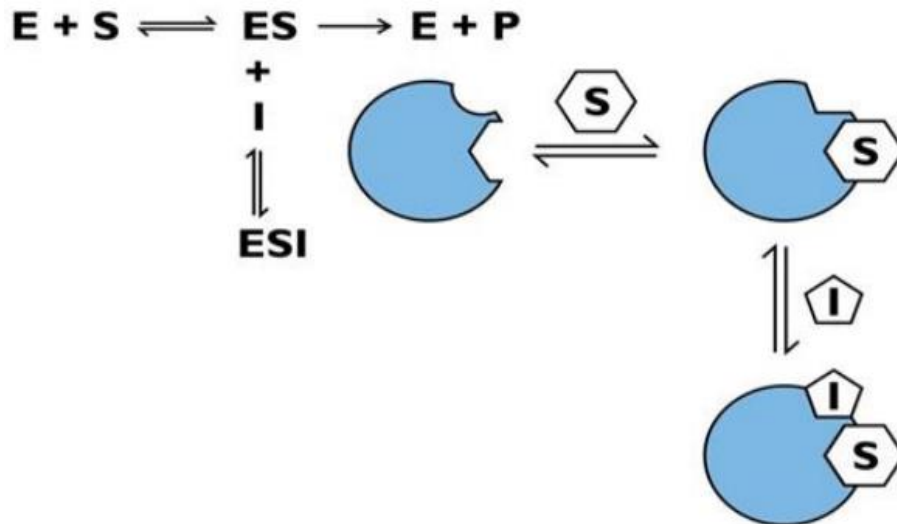
İnhibitör ve substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanırlar. Enzimin aktif bölgesine substratın bağlanmasını inhibitörler engellemezler ve reaksiyon hızının düşmesine enzimin üç boyutlu yapısındaki değişimler neden olmaktadır. Substrat konsantrasyonunu arttırmak inhibisyonu ortadan kaldıramayacağından $V_{\max}$ değeri azalırken K_m değeri değişmeden sabit kalır. Yarışmasız inhibisyon Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi Şekil 2.10.'da gösterilmiştir [57].



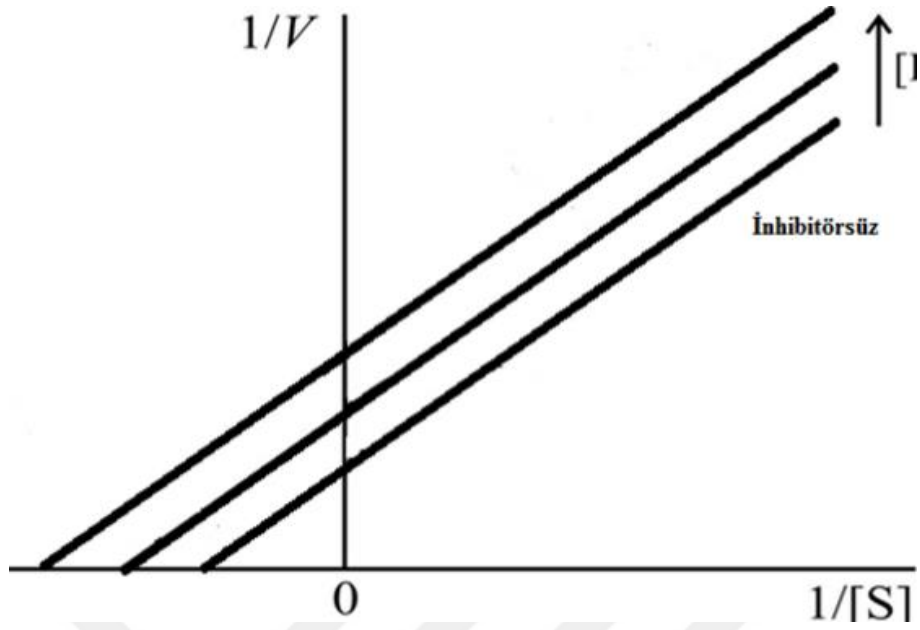
Şekil 2.10. Yarışmasız inhibisyonda Linweaver-Burk grafiğinin değişimi [57]

2.1.6.3. Yarı yarışmalı (un-kompetitif) inhibisyon

İnhibitör serbest halde bulunan enzimin aktif bölgesine bağlanmaz, oluşan enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır ve enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksini oluşturur. Böylece K_m ve V_{max} değerlerinde azalma gözlemlenir. Yarı yarışmalı inhibisyon şeması ve Linewear-Burk grafiğinin değişimi Şekil 2.11. ve 2.12.'de gösterilmiştir [57].



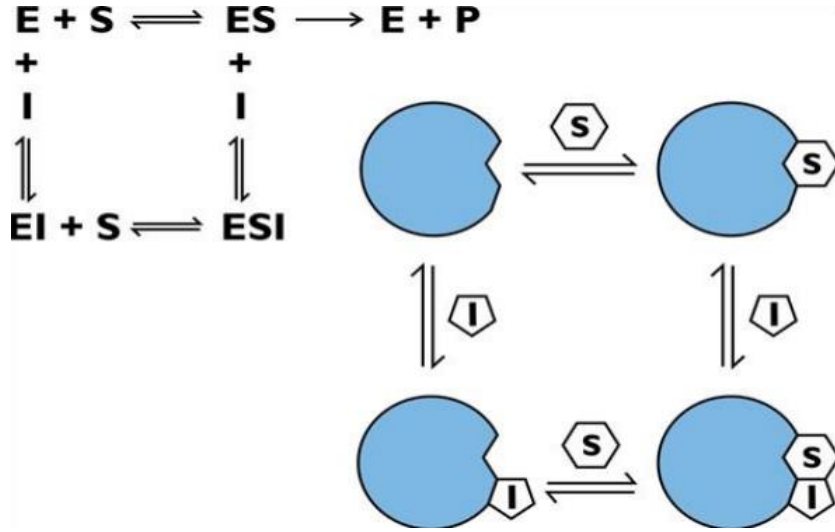
Şekil 2.11. Yarı yarışmalı inhibisyon şeması [57]



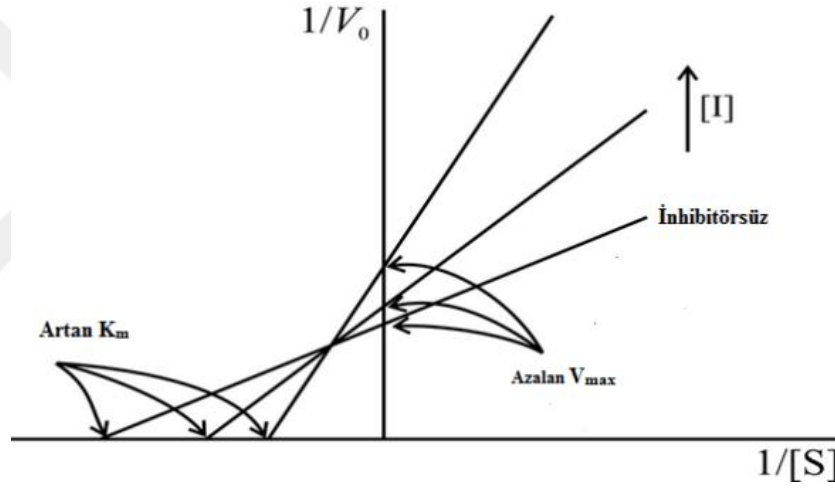
Şekil 2.12. Yarı yarışmalı inhibisyonunda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi [57]

2.1.6.4. Karışık (mixed) inhibisyon

Enzimin, inhibitörün ve substratların yapılarına bağlı olarak iki farklı yapı meydana gelebilir. Bunlar; inhibitörün enzim-substrat (ES) kompleksiyle bağ yaparak enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksini ya da enzimin aktif bölgesine bağlanmayarak enzim-inhibitör (EI) kompleksini oluşturmaktadır. Böylece $V_{\max}$ azalır, K_m değeri artar. İnhibitör ve substratlara bağlı K_m değerinin azaldığı da gözlemlenmiştir. Karışık inhibisyon şeması ve Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi Şekil 2.13. ve 2.14.'de gösterilmiştir [57].



Şekil 2.13. Karışık inhibisyon şeması [57]



Şekil 2.14. Karışık inhibisyonunda Lineweaver-Burk grafiğinin değişimi [57]

2.2. Serbest Radikaller

Moleküller ile kolay bir şekilde elektron alışverişine giren ve onların yapısını bozan moleküllere serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) denilmektedir [58]. Serbest radikaller en az bir veya daha çok eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, kısa ömürlü ve molekül ağırlıkları genellikle düşük reaktif moleküllerdir [59]. Serbest radikaller, DNA, karbohidratlar, lipidler, protein ve dokularda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) biyolojik olarak materyallere zarar verebilmektedirler.

Enzimlerin aktif merkezinde zincir reaksiyonları, biyolojik sistemlerde molekülün aktive olması ile başlar. Oksidoredüktazların aktif bölgeleri, fonksiyonel aminoasitler ve prostetik gruplardan oluşmaktadır. Serbest radikallerin oluşumunu katalizleyen elektron transport sistemindeki flavinli enzimler ve hem grubu içeren peroksidazlar, peroksidaz benzeri enzimler olarak iki gruba sahiptir [60].

Serbest radikaller veya reaktif oksijen türleri; hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit ($NO\bullet$), lipid oksitler ($LOO\bullet$), süperoksit iyonu ($O_2\bullet$), ferriloksit ($FeO_2\bullet$), hidroksil iyonu ($OH\bullet$)'dur [61]. Hücre içinde elde edilen serbest radikaller hücre zarında fonksiyon kaybına ve yıkıma sebep olurlar [62]. Tablo 2.1.'de bitkiler de oluşan serbest radikaller gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri [63]

Radikaller	Formülü	Non-radikaller	Formülü
Süperoksit	$O_2\bullet$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Peroksil	$ROO\bullet$	Hipohalöz asit	HOX
Alkoksil	$RO\bullet$	N-Halojenli aminler	R-NH-X
Hidroksil	$OH\bullet$	Lipid hiddroperoksit	LOOH
Organik	R	Ozon	O_3
Organik peroksit	RCOO	Azot dioksit	NO_2

2.3. Antioksidan Enzimler

Serbest radikallere ve bunların sebep olduğu zararlara karşı organizma da bir savunma sistemi vardır. Bu savunma sistemine antioksidan denir [64].

Antioksidan savunma sistemi enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidan olmak üzere 2 gruba ayrılır.

Enzimatik Antioksidan: vücuttaki bütün hücrelerde bulunur ve hepsi vücut tarafından üretilir. Peroksidaz (POD), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattını oluşturan enzimsel antioksidanlardır.

Enzimatik Olmayan Antioksidan: askorbik asit (C vitamini), tokoferoller ve karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar vücut tarafından üretilemediklerinden diyetle dışarıdan alınmaları gerekmektedir.

Enzimler günümüzde kimya endüstrisinde, boya, ilaç, temizlik, gıda ve dericilik maddeleri üretiminde, tıp, veterinerlik tekstil endüstrisinde, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında yaygın olarak kullanılmaktadır [65].

Biyolojik sistemlerde başlıca antioksidan etkiye sahip peroksidaz (POD), glutatyon peroksidaz (GSHPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerdendir [66]. Antioksidanların kaynak türleri Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Antioksidan kaynak türleri ve örnekler [66]

Kaynak türleri	Örnek
Eksojen	-Vitaminler -Gıda ile alınan antioksidanlar -İlaçlar
Endojen (enzim olan)	-Süperoksit dismutaz -Katalaz -Glutatyon peroksidaz
Enojen (enzim olmayan)	-Bilirubin -Melatonin -Miyogloblin

2.4. Peroksidaz Enzimi

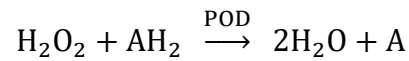
Peroksidaz (EC 1.11. 1.7) enzimi, hidrojen peroksit varlığında flavonoidler, fenoller, hidrokinonlar, sülfonoidler, aromatik aminler, pirogallol gibi pek çok organik ve inorganik substratın oksidasyonunu katalize eden bir oksidoredüktazdır. Hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile verme eğilimindeki atomları almaya hazır olan alıcı H_2O_2 bileşiği arasında gerçekleşen reaksiyonu katalizleyen peroksidaz enzimidir [67, 68].

Peroksidaz enzimi, hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunur [69]. Bitkilerin büyümesini ve gelişmesine yardımcı olan hücre duvarında yer alan enzimlerden biridir [70]. Bitki peroksidaz üst familyası kendi içinde üç sınıfa ayrılmaktadır. Tablo 2.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.3. Peroksidaz familyasının sınıflandırılması [71]

Süper Aile	Enzim	Kaynak	Moleküler Kütle (kDa)
Hayvan Peroksidazları	Eosinophil Peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	75-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutatyon Peroksiaz	Hayvan Bitki	6-22 75-112
	Prostaglandin Endoperoksit Sentaz	Hayvan	115-140
Katalaz	Katalaz	Hayvan, Bitki, Mantar, Maya	140-530
Bitki Peroksidazları (Sınıf I)	Sitokrom c Peroksidaz	Maya, Bakteri	32-63
	Katalaz Peroksidaz	Bakteri, Mantar	150-240
Bitki Peroksidazları (Sınıf II)	Askorbat Peroksidaz	Bitki	30-58
Bitki Peroksidazları (Sınıf III)	Mangan Peroksidaz	Mantar	43-49
	Ligninaz	Mantar	40-43
	Peroksidaz (POD)	Bitki	28-60

Peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar kompleks yapılarda olduklarından aşağıdaki genel denklem ile gösterilmektedir [72].



Bu reaksiyonda, yükseltgenme ve indirme reaksiyonudur. Hidrojen peroksit indirgeniyorken, enzim yükseltgenmektedir [73].

POD enzimi H_2O_2 'i kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu katalizleyerek, hidrokinonlar, fenoller, hidrokinoid aminler ve daha fazla aromatik bileşiklerin dehidrogenasyonunu katalizler. Katalizlenen moleküllere örnek olarak; guaiakol, o-dianisidin, pirogallol, azo boya türevleri ve o-fenilen diamin sayılabilir [74, 75].

POD bitkilerde hidrojen peroksit ile pirogallol, guaiakol, katekol ve klorogenik asit gibi fenolik grup bulunduran bileşiği yükseltgeyebilir. Şekil 2.15.'de örnek olarak mekanizması gösterilmiştir [76]. Bitkilerin organik bileşikleri yükseltgemesi besin değeri, tadı ve rengi gibi özelliklerinin benzer olmasından dolayı ilişkilendirilmiştir [77].



Şekil 2.15. POD fenolik substratı kullanarak hidrojen peroksit giderme mekanizması [76]

POD enzimi bitkilerde savunma mekanizmaları [78], meyve ve sebzelerin indoleasetik asit miktar ayarlanması [79], hormonal faaliyet [80] ve lignin biyosentezi [81] gibi yaşam fonksiyonlarında önemli rolü olduğunu bildirmiştir. POD bitkisel kaynaklı gıdalarda çokça bulunmaktadır [67]. Bitkilerde POD çiçek ve sap kısımlarında, yapraklarda, nükleus, hücre membranında, ribozom ve hücre duvarlarında bulunmaktadır [82, 83].

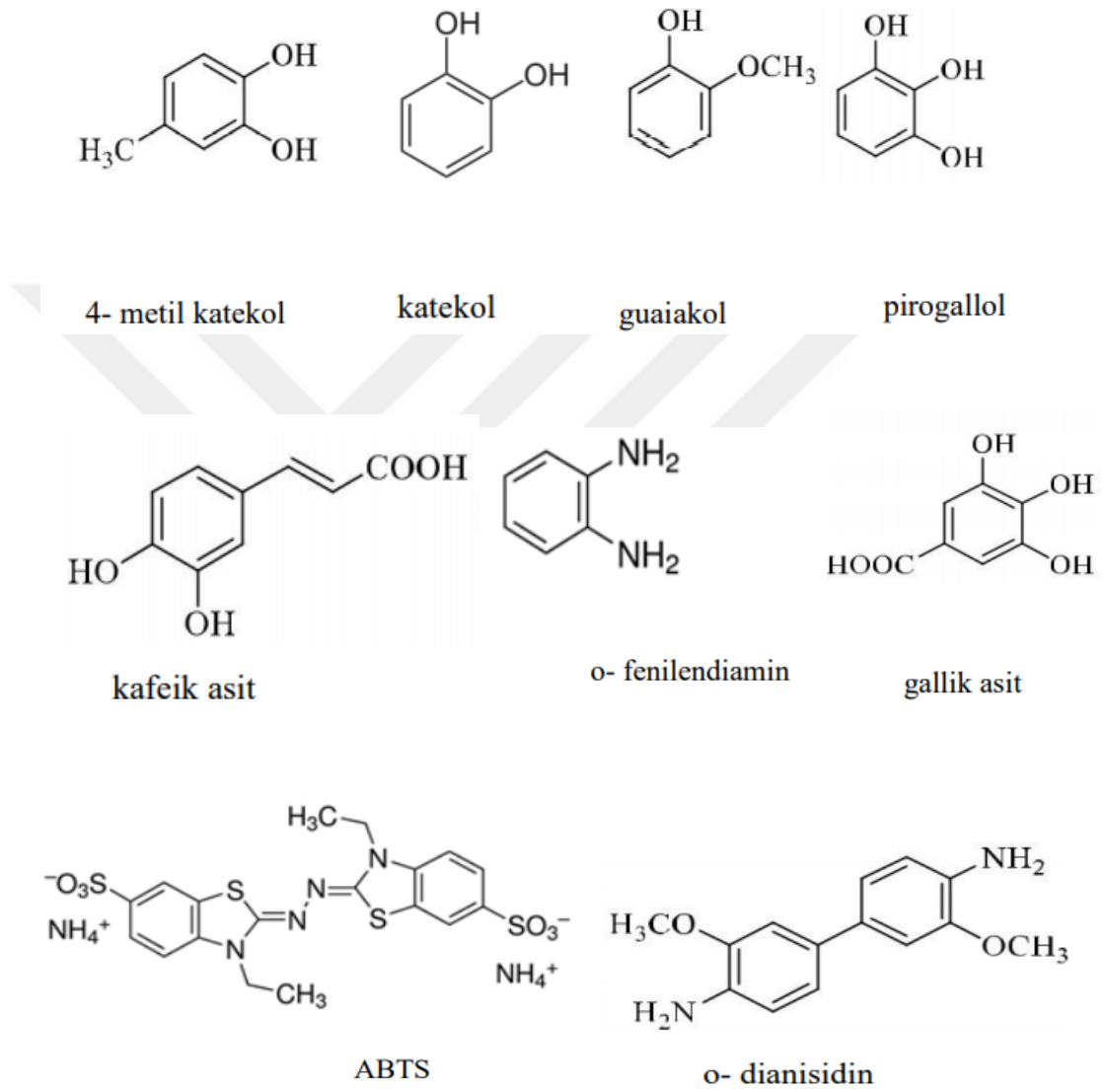
2.4.1. Peroksidaz enziminin substratları

POD aktivitesi ölçümünde indirgeyici substratlar belirli özelliklere sahip olmalıdır. Bunlar;

- Kimyasal dayanıklılığı yüksek olmalıdır.
- Belirlenmiş oksidasyon ürünü olmalıdır.
- Suda yüksek çözünürlüğe sahip olmalıdır.
- Kanserojen etkisi olmamalıdır.

-Reaksiyonda oluşan ürünleri kolayca ölçülebilmelidir.

POD enzim aktivite ölçümünde indirgeyici olarak kullanılan substratların bazıları Şekil 2.16.'da gösterilmiştir. [84]



Şekil 2.16. Peroksidaz enziminin bazı substratları [84]

2.5. Şevketibostan (*Cnicus benedictus*)

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*), Asteraceae (papatyagiller) familyasına ait bir bitkidir. Bostanotu, akkız, mübarekdikenî şevketotu bilinen diğer isimleridir [85].

Şevketibostan'ın Batı Asya ve Güney Avrupa ana vatanı olarak bilinmektedir [86, 87]. Ülkemizde Karadeniz, Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde kırlarda, bahçelerde ve tarla kenarlarında yabani olarak yetişmektedir [88]. Ege bölgesinde, İzmir çevresinde sebze olarak kullanıldığı bilinmektedir [89, 90].

Şevketibostan yabani bir bitkidir. Dikenli bir yapıya sahip olmasından dolayı pazarlarda belirli dönemlerde bulunabilmektedir. Şevketibostan 50-60 cm yüksekliğine kadar büyüeyebilen dikenli yapraklara sahiptir. Yaprak ve sap kısımları tüylü, yaprakları yeşil, sapı beyazca ve sarı çiçekleri vardır. [91]. Ekim'den Mayıs aylarına kadar, İzmir çevresindeki yerel pazarlarda görmek mümkündür.

Şevketibostan bitkisinin fotoğrafları Şekil 4.17. ve 4.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. Şevketibostan çiçeği



Şekil 2.18. Şevketibostan



Şekil 2.19. Şevketibostan genel görünümü



Şekil 2.20. Şevketibostan pazardan alınmış hali

2.5.1. Faydaları

Şevketibostan tıbbi özelliklere de sahip olan bir bitkidir. Toprak üstü ve kök kısımları taş düşürücü ve idrar arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Ruhsatlandırılmış Türkiye’de ilaç üretiminde kullanılan bitkilerden birisidir. Şevketibostan bol miktarda vitamin ve mineraller bulundurur [92].

Şevketibostan tıbbi amaçlı olarak, idrar söktürücü, ateş düşürücü, adet söktürücü, karaciğer güçlendirici, iştah arttırıcı, sarılık azaltıcı, sindirime yardımcı ve gaz depolanmasını azaltıcı birçok hastalığın tedavisinde güçlendirici olarak kullanılmıştır. Böbreklerdeki taş ve kumu düşürmek amacıyla da kullanılmıştır. Günümüzde, şişkinlik, hazımsızlık, sindirim güçlüğü (dispepsi) tedavisine kullanılmakta, iç kanama (hemoraji) ve diyare hastalıklarında kanamayı durdurma amacıyla, anne sütü arttırıcı, ağrılı adet ve yaraların iyileştirilmesinde tavsiye edilmektedir. Ayrıca antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve antikanser gibi özellikleri incelenmiş ve olumlu sonuçlar elde edildiği raporlanmıştır [93].

2.4.2. Besin değerleri

100 g Şevketibostan bitkisi tüketiildiğinde 17 kcal enerji sağlamaktadır. Besin iğeriği; 0,48 g protein, 1,45 g karbohidrat, 0,13 g yağ, 4,21 g lif, 3,24 mg demir, 35 mg fosfor, 125 mg kalsiyum, 22 mg magnezyum, 328 mg potasyum, 52 mg sodyum, 0,40 mg çinko, 20,4 mg C vitamini, 20,4 mg L-askorbik asit, 0,012 mg tiamin, 0,033 mg riboflavin ve 0,477 mg niasin bulunmaktadır [94].



BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Malzemeler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çalışmalar boyunca kullanılan cihazlar ve aletler;

Spektrofotometre	: SHIMADZU UV-2600
Vortex	: Heidolp Reaxtop
Mikropipetler	: Brand Transferpette® S 200 ve 1000 µL'lik
Derin Dondurucu	: Uğur UD 100BK
Su Banyosu	: Nüve Nb20
Santrifüj Cihazı	: Nüve NF 200
Blender	: Hotmix 2155 Beko
pH Metre	: Lab 850 SCHOTT
Protein Elektroforezi	: P8DS Owl Thermo Scientific
Hassas Terazî	: ATX 220 SHIMADZU
Isıtıcı	: MSH-20A DAIHAN
Buzdolabı	: Beko

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada bitki kaynağı olarak Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisi POD enziminin izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılmıştır.

Polivinil pirolidon (PVP), Triton X-100, L-askorbik asit (AsA), disodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, amonyum sülfat, t-bütanol, sitrik asit monohidrat, tris

amino metan hidroklorid, sodyum sitrat, tizma-base, glisin, gliserol, sodyum hidroksit, asetik asit, sıgır serum albümin (BSA), fosforik asit, hidroklorik asit, etanol, DMSO, metanol, DMF, kloroform, aseton, SDS (sodyumdodesilsülfat), amonyum persülfat (APS), bromofenol mavisi, Coomassie Brilliant Blue R-250, TEMED (N,N,N',N',-tetrametiletilendiamin), β -merkaptotanol, Coomassie Brilliant G-250, hidrojen peroksit (H_2O_2), 4-metil katekol, pirogallol, o-fenilendiamin, gallik asit, kafeik asit, sodyum azid (NaN_3), L-sistein, NaCl, $FeCl_3$, $FeCl_2$, KCl, $CaCl_2$, $HgCl_2$, $SnCl_2$, $PbCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$ kimyasalları kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Fosfat tamponu (0,1 M, pH:7,0): 6,981 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ve 4,758 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartılarak 350 mL saf suda çözülerek 0,1 M NaOH ile pH 7,0'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

50 mM'lık 4-metil katekol çözeltisinin hazırlanması: 0,124 g 4-metil katekol tartılarak 20 mL saf su ile toplam hacim tamamlanarak çözelti hazırlandı.

25 mM'lık H_2O_2 çözeltisinin hazırlanması: 255 μL %30'luk H_2O_2 alınarak 100 mL saf su ile tamamlanarak çözelti hazırlandı.

1,5 M, pH:8,8 Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması: 12,114 g tartılarak 60 mL'ye yakın saf su ile çözülerek pH:8,8'e 1,5 M HCl ile ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

1 M pH:6,8 Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması: 12,114 g tartılarak 60 mL'ye yakın saf su ile çözülerek pH:6,8'e 1 M HCl ile ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

%10'luk SDS hazırlanması: 3 g SDS tartılarak 30 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

%10'luk APS hazırlanması: 0,1 g APS tartılarak 1 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu

3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması

Kullanılan enzim kaynağı taze olarak İzmir ilinden getirilen Şevketibostan bitkisinden yapılmıştır. Şevketibostan bitkisi kök ve sap kısımlarından ayrılarak yaprakları -20 °C'de dondurucuda depolanmıştır. Ham enzim özütü hazırlanırken dondurucuda depolanmış şevketibostan bitkisinin yapraklarından 20 gram tartılarak, içerisinde 0,001 M askorbik asit bulunan 60 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltisi, %0,5 PVP ve %4 Triton X-100 kullanılarak parçalama işlemi 5 dakika boyunca blender yardımıyla yapılmıştır. Homojenat 3 kat tülbentten süzülür ve süzgeç kağıdı ile tekrardan süzildükten sonra 4500 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi çökelti oluşmayana kadar devam edilmiştir. Elde edilen süpernant ham enzim ekstraktı olarak enzim karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır ve -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Üçlü-faz ayırma tekniği (TPP)

Üçlü-faz ayırma tekniği için ham enzim ekstraktına katı amonyum sülfat ve t-bütanol eklenerek çöktürme işlemi yapılmıştır. Farklı amonyum sülfat doygunlukları kullanılmıştır. %40, %50, %60, %70, %80, %90 doygunlukta olacak şekilde hesaplamalar yapıp katı amonyum sülfat tartılmıştır. Ham enzim ekstraktından 2 mL alınarak üzerine farklı doygunluklarda tartılan amonyum sülfat miktarları yavaş yavaş eklenmiştir, eklenen amonyum sülfat miktarlarının çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Doygunluğa ulaşan ham ekstrakta 1:1 (v/v) oranında t-bütanol eklenmiş ve tüp ters düz edilerek birkaç defa tam karışma işlemi yapılmıştır. Oluşan karışım 1 saat 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon işleminden sonra daha belirgin fazlar elde edebilmek için 4500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra karışım 3 faza ayrılarak üst faz, orta (ara) faz ve alt faz oluşmuştur. Organik çözücü bulunduran üst faz yani t-bütanol pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde

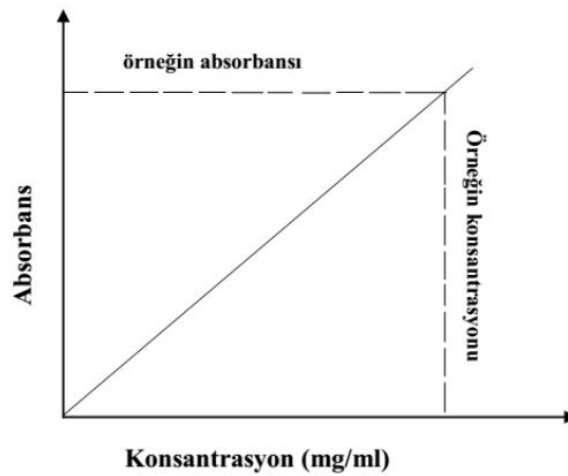
atılmıştır. Ara faz ve alt faz birbirinden ayrılarak ara faz 1 mL fosfat tamponunda (0,1 M, pH 7,0) çözülmüştür. Her faz için peroksidaz enzim aktivite tayini uygulanmıştır.

3.2.3. Tersiyer bütanol oranının optimizasyonu

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen uygun miktar belirlenerek t-bütanol optimizasyonu için kullanılmıştır. 1 mL enzim ekstraktı üzerine farklı miktarlarda tert-bütanol 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 (v/v) olacak şekilde eklenmiştir. Farklı miktarlarda t-bütanol eklenen örnekler 1 saat 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz pipet yardımıyla atılmıştır ve orta faz ile alt faz birbirinden ayrılması sağlanarak ara faz 1 mL (0,1 M, pH 7,0) fosfat tamponunda çözülmüştür. Her faz için peroksidaz enzim aktivite tayini uygulanmıştır.

3.2.4. Bradford yöntemi ile protein miktar tayini

Standart protein grafiği için stok standart protein çözeltisi 1 mg/mL BSA kullanılmıştır. Stok çözeltiden 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL, 100 µL alınarak Bradford çözeltisi ile hacimleri 1 mL'ye tamamlanmıştır. 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılır ve absorbansları 595 nm'de ölçülmüştür. Grafik ölçüm sonuçları yardımıyla çizilmiştir (Şekil 3.1.). Bu işlemler ham enzim ekstraktı içinde uygulanmıştır ve grafik yardımıyla protein miktarı tayin edilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford yönteminde kullanılan standart grafiği

3.2.5. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez)

Tablo 3.1. %15'lik ayırma jeli için kullanılan miktarlar

Kimyasallar	Miktar
1,5 M Tris HCl (pH:8,8) Tamponu	2,6 mL
%10 SDS	0,1 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	5 mL
Destile Su	2,2 mL
%10 APS	0,1 mL
TEMED	10 µL

Ayırma jeli hazırlanırken Tablo 3.1.'de belirtilen sıraya göre tüm kimyasallar boş bir beher de karıştırılır. Buradaki en önemli kısım TEMED'in en son eklenmesidir. Çünkü TEMED jelin oluşmasına yani polimerleşmesine yardımcı olur bu yüzden en son konulmalıdır.

Hazırlanan çözelti karıştırılıp jel oluşmasını sağlamak için iki cam plaka arasına yüklenir, üstteki boş kalan kısmına propanal ya da su eklenerek polimerleşme olması beklenir. Propanol ya da su konulmasının nedeni yükleme jeli konulduğu zaman numunenin yürüyebilmesidir.

Jelin polimerleşmesi için 15-20 dk oda sıcaklığında bekletilir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra üst kısmına konulan propanol ya da su bir süzgeç kağıdı yardımıyla alınır. Yürütme jelinin yüklenmesine hazır hale getirilmiş olur.

Tablo 3.2. %5'lik yürütme jeli için kullanılan miktarlar

Kimyasallar	Miktar
1 M Tris HCl (pH:6,8) Tamponu	1,25 mL
%10 SDS	0,05 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL
Destile Su	2,975 mL
%10 APS	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

Yürütme jeli Tablo 3.2.'de belirtildiği gibi tüm kimyasallar boş bir behere konularak, karıştırılır. TEMED eklendikten sonra ayırma jelinin üzerine yüklenir ve hızlı bir şekilde tarak yerleştirilmelidir. Tarak sayesinde numunelerin ekleneceği kuyucuklar oluşur. Yükleme jelinin oluşması için de 15-20 dk oda sıcaklığında bekletilir.

Tablo 3.3. Yükleme (numune) tamponu için kullanılan miktarlar

Kimyasallar	Miktar
1 M Tris-Base (pH:6,8)	0,9 mL
%10 SDS	4,5 mL
Destile Su	2,1 mL
Gliserol	3,75 mL
Bromofenol Blue	6 mg

Enzim çözeltisini jele yüklemeyen önce denatüre etmek gerekir. Bunun için yükleme (numune) tamponu kullanılır. Yükleme tamponu hazırlanırken Tablo 3.3.'de gösterilen kimyasallar kullanılır. Ham enzim çözeltisinden 1'e 1,5 oranında yükleme tamponu konulup, karıştırılır. 15 dk boyunca 95 °C de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon işlemi bittikten sonra buzda bekletilmelidir.

Tablo 3.4. Yürütme tamponu için kullanılan miktarlar

Kimyasallar	Miktar
Tris-Base	9 g
Glisin	48,3 g
SDS	3 g

Yürütme tamponunu hazırlamak için Tablo 3.4.'de yazan miktarlarda kimyasallar tartılır ve bir miktar suda çözülüp, 1L'ye tamamlanır.

Hazırlanan jel SDS tankına yerleştirilir ve içerisine yürütme tamponu eklenir. Jel üzerinden tarak çıkarılır ve oluşan kuyucuklara denatüre edilen enzim çözeltileri konulur. Sonuçları yorumlamak için baştaki ya da sondaki kuyucuğa Marker konulmalıdır. Elektroforez tankı kapatılarak jel üzerinde proteinler yürütme jeli boyunca 20 mA'de, ayırma jeli boyunca 25 mA'de yürütülmüştür. Yürütme işlemi

sonlandıktan sonra, jel elektroforez tankından dikkatli bir şekilde çıkartılarak boya sabitleme (fiksator) çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilmiştir.

Boya sabitleme işleminden sonra jel boyama çözeltisine yerleştirilerek 4 saat bekletilmiştir. Protein bantlarının görünür hale gelmesi için boya giderme çözeltisinde bekletilmiştir. Jelden boya tamamen uzaklaşana kadar bu işlem tekrarlanmıştır ve protein bantlarının görünümü kaydedilmiştir.

3.3. Şevketibostan Bitkisinden Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu

POD enziminin kinetik özelliklerinin araştırılmasında substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, tuz toleransı, depolanma kararlılığı ve çeşitli

3.3.1. POD aktivite tayini

Peroksidaz enziminin aktivitesi için (0,1 M, pH 7,0) fosfat tamponu, 50 mM 4-metil katekol, 25 mM H₂O₂ ve ham enzim ekstraktı kullanılmıştır. Absorbans değişimi 420 nm'de 60 saniye boyunca ölçülmüştür. Sıcaklık, pH, substrat spesifikliği, enzim aktivitesi tayinleri içinde aynı yöntem uygulanmıştır. Ölçümler aktivite tayininde 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.3.2. Substrat spesifikliği

Peroksidaz enziminin 5 farklı substrat kullanılarak substrat spesifikliği aktivitesi belirlenmiştir. Kullanılan substratlar; 4-metil katekol, pirogallol, o-fenilendiamin, kafeik asit, gallik asit ve hidrojen peroksittir. Her substrat için 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 mM konsantrasyonlarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Her bir substrat için kaydedilen sonuçlar yardımıyla grafikler çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplanarak substratlar birbirleriyle kıyaslanmıştır. Kullanılan tüm substratlarda enzim aktivitesi göstermiştir.

3.3.3. pH etkisi

Sabit H_2O_2 substratı varlığında POD enzim aktivitesi, pH 3,0-9,0 hazırlanan tamponlar kullanılarak ölçülmüştür. Enzim aktivite tayini spektrofotometrik yöntemle 420 nm’de 60 sn boyunca absorbans artışı gözlemlenerek gerçekleştirilmiştir.

Tampon çözeltilerin hazırlanışı aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

pH 3,0-5,5 tamponlarının hazırlanması;

Toplam hacimleri 250 mL olan farklı iki çözelti hazırlanarak bunlardan Tablo 3.5.’de belirtilen miktarlarda karıştırılarak pH’ları ölçülerek hazırlanmıştır.

1. çözelti: Sitrik asit monohidrattan 5,26 g tartılarak 250 mL saf su ile tamamlanmıştır.
2. çözelti: Sodyum sitrattan 7,353 g tartılarak 250 mL saf su ile tamamlanmıştır.

Tablo 3.5. 0,1 M sitrik asit tamponunun hazırlanması

pH	1. çözelti (mL)	2. çözelti (mL)
3,5	15	10
4,0	25	20
4,5	25	28
5,0	15	30
5,5	10	35

pH 6,0-7,5 tamponları için fosfat tamponu kullanılmıştır.

pH 8,0-9,0 tamponlarının hazırlanması;

Trizma HCl ve Trizma Base kullanılarak farklı iki çözelti hazırlanmıştır ve Tablo 3.6.’da belirtilen miktarlarda karıştırılarak pH’ları ölçülerek hazırlanmıştır.

1. çözelti: Tris amino metan hidrokloritten 3 g tartılarak 100 mL saf su tamamlanmıştır.
2. çözelti: Trizma-base den 3 gram tartılarak 150 mL saf su tamamlanmıştır.

Tablo 3.6. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması

pH	1. çözelti (mL)	2. çözelti (mL)
8,0	45	42
8,5	15	27
9,0	6	40

3.3.4. Sıcaklık etkisi

POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’lerde enzim aktivitesine 420 nm’de 60 sn boyunca absorbanstaki artışı izlenmiştir. Sıcaklık değişimleri için yüksek sıcaklıklarda sıcak su banyosu ve düşük sıcaklıklarda ise buz banyosu kullanılmıştır. 10 mM’lık 4-metil katekol substratı kullanılmıştır.

3.3.5. Enzim kinetiği

0,05 mM ile 10 mM arasında değişen substrat çözeltileri kullanılarak enzim kinetiği ölçülmüştür. Kinetik çalışmalarda 5 farklı substrat (4-metil katekol, pirogallol, o-fenilendiamin, kafik asit, gallik asit) çözeltileri kullanılarak Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve POD enzimin maksimum hızının (V_{max}) hesaplanması için spektrofotometrik olarak 420 nm’de 60 sn absorban artışı izlenmiştir. İlk hız değerleri elde edilen sonuçlar kullanılarak absorban-zaman grafiğinden hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinde ilk hız değerleri kullanılarak ($1/V$ ’ye karşı $1/[S]$) V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

3.3.6. Şevketibostan bitkisinden POD aktivitesi üzerine madde etkileri

3.3.6.1. İnhibitör etkisi

POD enziminin inhibitörlerin etkilerini incelemek üzere askorbik asit, sodyum azid ve L-sistein kullanılarak üç farklı inhibitör ile aktivite tayinleri yapılmıştır. Kullanılan her inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanarak sonuçlar kaydedilmiştir.

İnhibitör etkisi aktivite tayininde sabit enzim (100 μ L), 1 mM'lık H_2O_2 (120 μ L), 3 mM'lık 4-metil katekol (180 μ L) ve farklı inhibitör konsantrasyonları kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile 420 nm'de 60 sn aktiviteleri ölçülmüştür. Kullanılan inhibitörler için ayrı ayrı % Bağlı Aktivite-[I] grafikleri çizilerek enzim aktivite birimini yarıya indiren substrat konsantrasyonu I_{50} hesaplanmıştır.

3.3.6.2. Metallerin etkisi

POD enzimine metal etkisi tayininde $FeCl_3$, $FeCl_2$, KCl , $NaCl$, $CaCl_2$, $HgCl_2$, $SnCl_2$, $PbCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$ metalleri 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanarak sabit enzimle beraber 1 saat inkübe edilerek aktivite ölçümü yapmaya hazır hale getirilmiştir. 3 mM 4-metil katekol, 1 mM H_2O_2 ve inkübe edilen metalli enzim çözeltisi kullanılarak spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. % Kalan aktivite değerleri metalli ve metalsiz enzim aktivite değerleri karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

3.3.6.3. Organik çözücü etkisi

POD enzim aktivitesinin organik çözücüler varlığında etkisini gözlemlemek amacıyla 5 adet organik çözücü kullanılmıştır. DMSO, DMF, etanol, aseton, t-bütanol kullanılan organik çözücülerdir.

Enzim aktivite tayininde sabit enzim (100 μ L), 3 mM 4-metil katekol (180 μ L), 1 mM H_2O_2 (120 μ L) substratları ve %5, %10, %15, %20, %25, %30 olmak üzere organik çözücüler kullanılmıştır. UV-Vis spektrofotometrisi ile 420 nm'de 60 sn boyunca aktivite ölçümleri yapılmıştır. % Kalan aktivite değerleri organik çözücü bulunmayan ve organik çözücü bulunan enzim aktivite değerleri karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

3.3.6.4. İyonik şiddet etkisi

POD enzim aktivitesini belirlemek üzere 1-5 mM arasında değişen NaCl çözeltileri kullanılarak optimum iyonik şiddet etkisi belirlenmiştir.

Enzim aktivite tayininde sabit enzim (100 µL), 3 mM 4-metil katekol, 1 mM H₂O₂ substratları kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki NaCl ile Uv-Vis spektrofotometrisi ile 60 sn boyunca 420 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır.

3.3.6.5. Enzimin tuz toleransı

POD enziminin tuz toleransını belirlemek için 1-5 mM arasında değişen NaCl çözeltileri ile enzim 2 saat boyunca inkübasyona bırakılır. İnkübasyon işleminden sonra enzim aktivite tayini yapılır. Enzim aktivite tayini için 1 mM H₂O₂, 3 mM 4-metil katekol substratları ve sabit enzim kullanılarak Uv-Vis spektrofotometrisi ile 60 sn boyunca 420 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır.

3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı

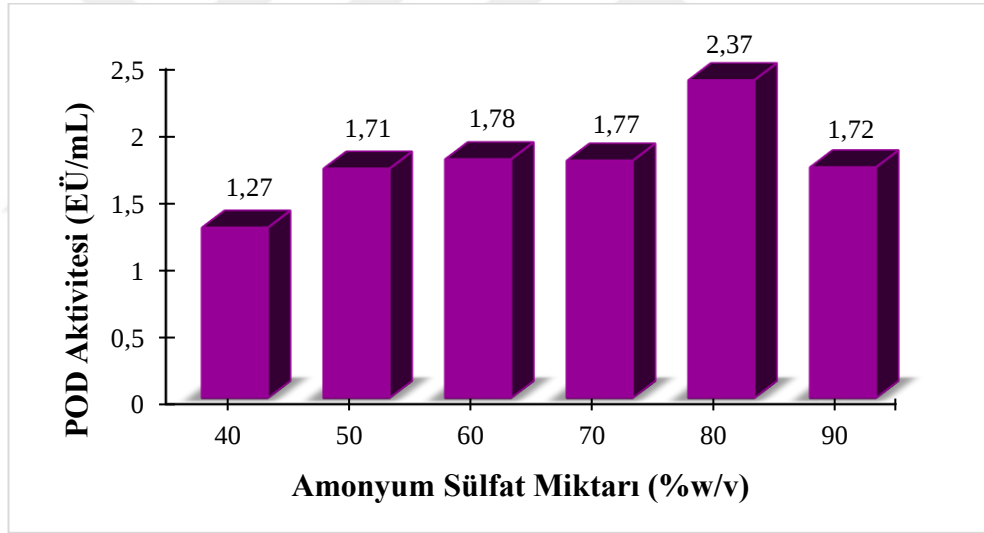
POD enzimi -20 °C ve oda sıcaklığında (25°C) depolanma kararlılığı çalışılmıştır.

Farklı sıcaklıklardaki depolanma kararlılığının tespit edilebilmesi için -20 °C enzim depolanma kararlılığı 3-4 günde bir ve 25 °C enzim depolanma kararlılığı için saat başı ham enzim özütünün 420 nm’de 60 sn boyunca spektrofotometrik kinetik ölçümleri yapılmış ve kaydedilmiştir. 3 mM 4-metil katekol ve 1 mM H₂O₂ substratları kullanılmıştır.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR

4.1. Peroksidaz (POD) Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması

POD enziminin aktivite tayini üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) 420 nm’de spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile POD aktivite değişimi Şekil 4.1.’de ve Şevketibostan peroksidaz enziminin saflaştırma sonuçları Tablo 4.1.’de gösterilmiştir.



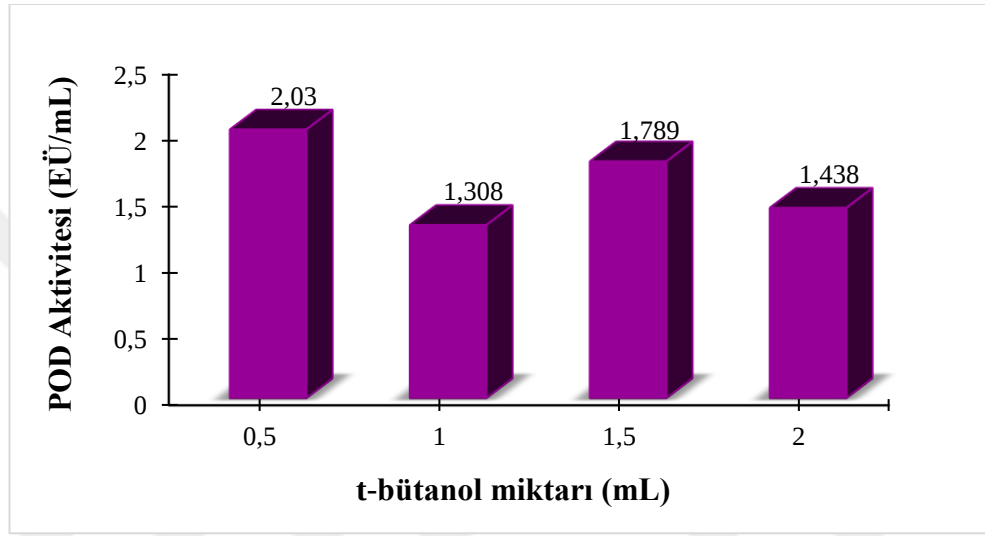
Şekil 4.1. TPP ara faz POD aktivite değişimi

Tablo 4.1. Şevketibostan POD enziminin TPP ile saflaştırma sonuçları

Adım	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Saflaştırma Verimi (%)
Ham Ekstrakt	30	0,57	17,1	0,161	4,83	3,54	1	100
TPP (Ara Faz)	2	4,74	9,48	0,0652	0,1304	72,69	20,53	55,44

4.2. Tersiyer Bütanol Oranının Optimizasyonu

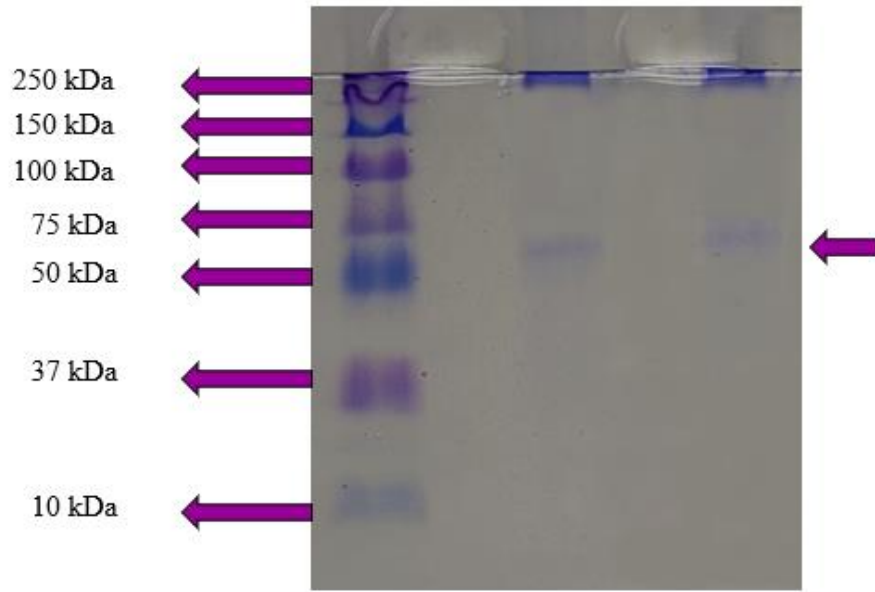
TPP yöntem sonuçlarına göre en uygun amonyum sülfat miktarı kullanılarak farklı oranlarda t-bütanol ve sabit ham ekstraktı kullanılmıştır. Değişen t-bütanol oranları 0,5-1,0-1,5-2,0 mL ve ham enzim ekstraktından 1 mL olarak kullanılmıştır. Bu yöntem sonucunda POD enziminin elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Tersiyer bütanol ara faz POD aktivite değişimi

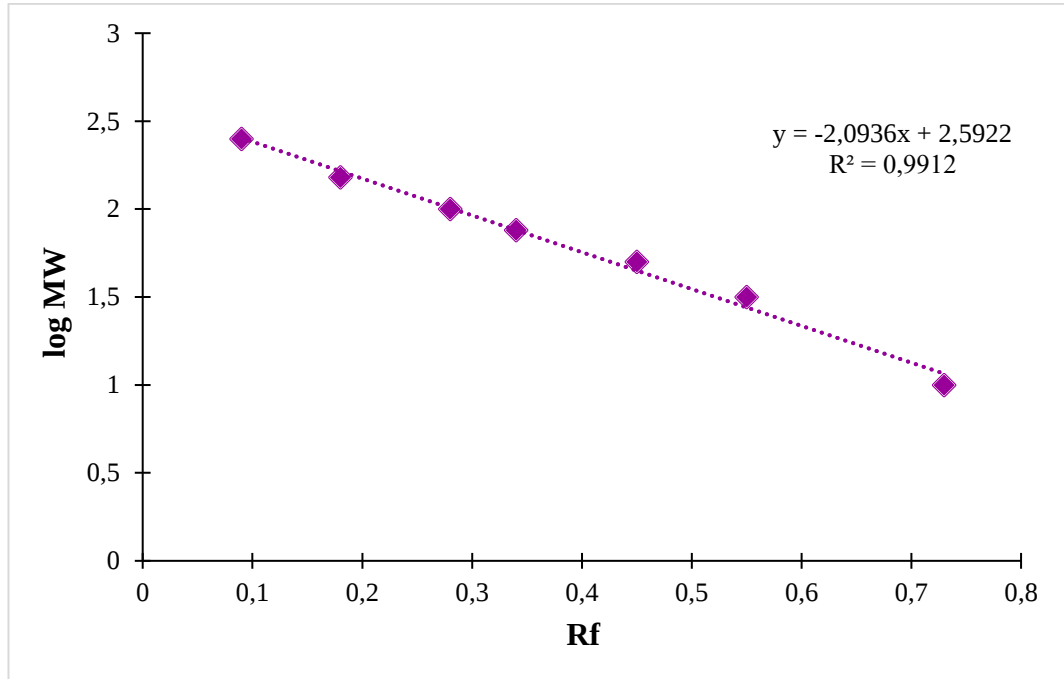
4.3. SDS-PAGE ile Enzim Saflık Kontrolü

Bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı gibi SDS jel elektroforezi sonuçlarına uygun olarak standart protein karışımındaki, enzim kaynağı ve örnek protein bantları Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Enzimin molekül ağırlığı Rf-log MW grafiğinden 63 kDa olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel fotoğrafı

SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel üzerinde oluşan standart protein ve enzim için jel üzerindeki uzaklıkları ölçülerek Rf değerleri hesaplanarak Rf-log MW grafiği çizilmiştir ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Elde edilen standart grafik denkleminde Şevketibostan POD enziminin molekül ağırlığı bulunmuştur.



Şekil 4.4. SDS-PAGE sonucu çizilen Rf- log MW grafiği

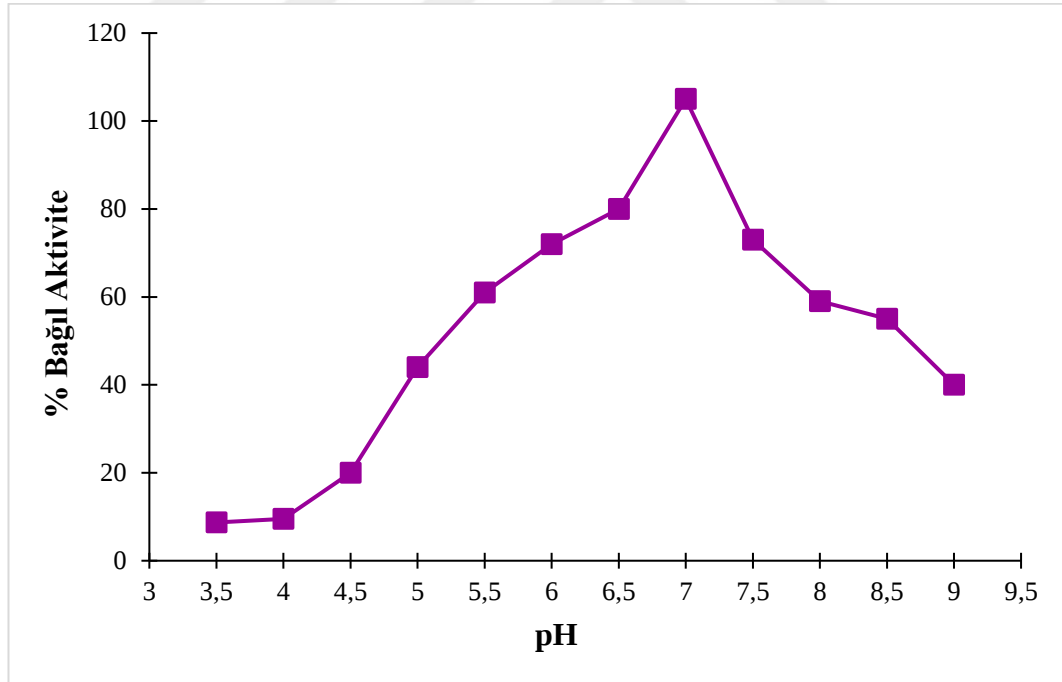
4.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Şevketibostan bitkisinden Bradford yöntemi ile toplam protein miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar da 100 μL 'sinde ham ekstratta 0,161 mg/mL protein bulunmuştur.

4.5. Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu

4.5.1. pH etkisi

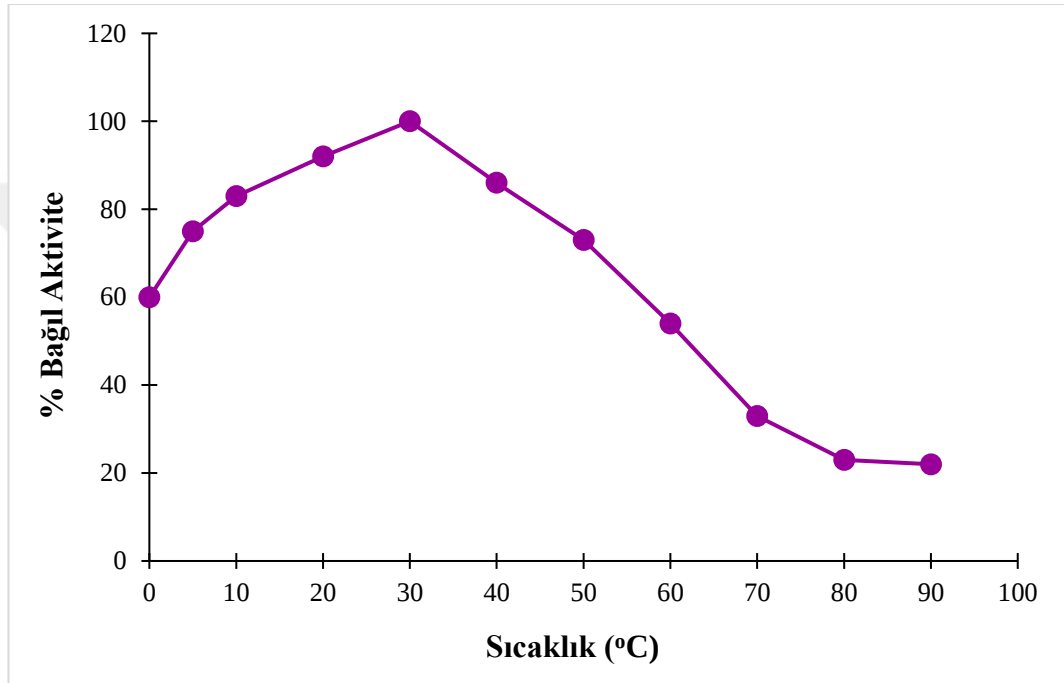
POD enzimi 3,5 ile 9 pH'ları arasında değişen tamponlar hazırlanarak 4-metil katekol ve H_2O_2 substratları kullanılarak 420 nm'de 60sn boyunca aktivite ölçümleri yapılmıştır. Spektrofometrik yöntemle ölçülen sonuçlar kullanılarak 4-metil katekol substratı için optimum pH'ı 7,0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Şevketibostan POD enzimi optimum pH grafiği

4.5.2. Sıcaklık

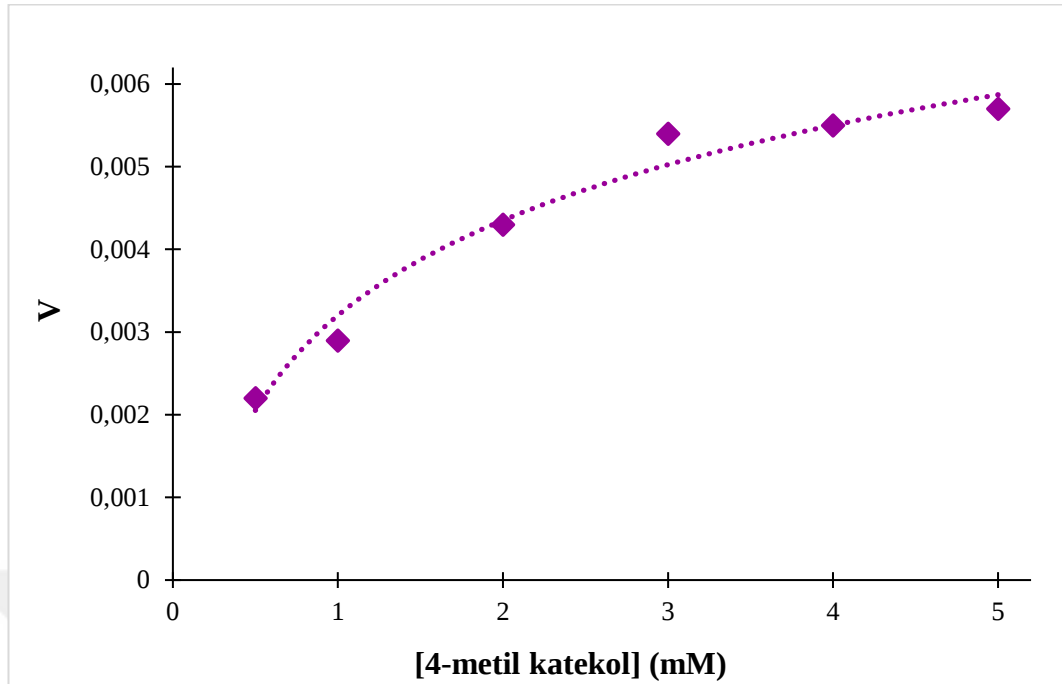
POD enzimi 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’lerde 4-metil katekol ve H₂O₂ substratları kullanılarak 420 nm’de 60 sn boyunca aktivite ölçümleri yapılmıştır. Spektrofometrik yöntemle ölçülen sonuçlar kullanılarak 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.6.).



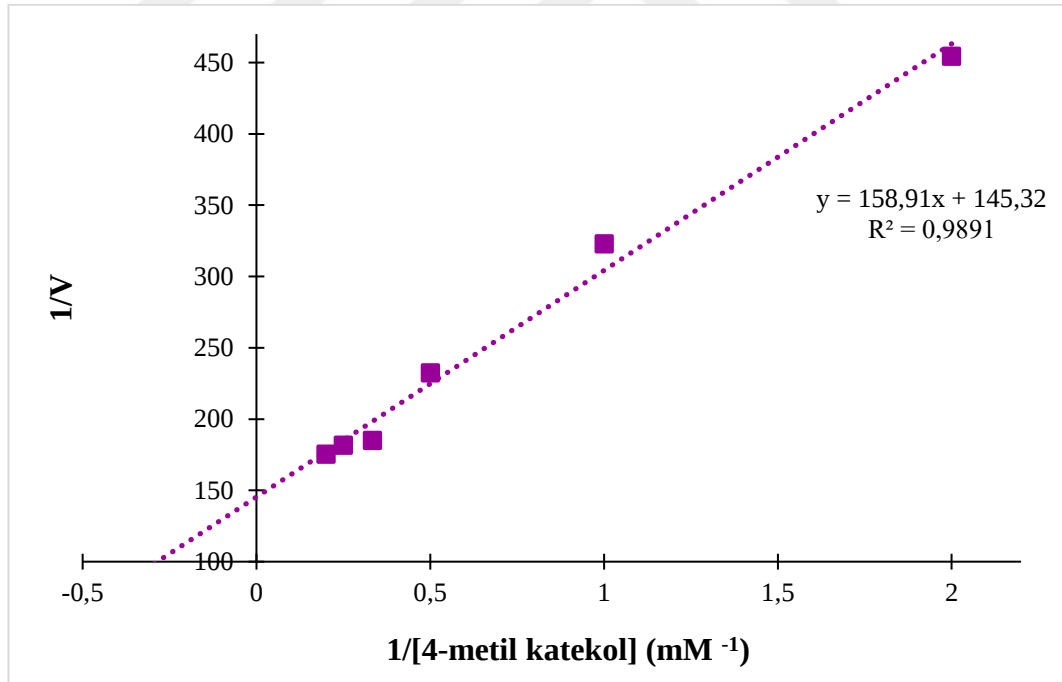
Şekil 4.6. Şevketibostan POD enzimi optimum sıcaklık grafiği

4.5.3. Enzim kinetiği

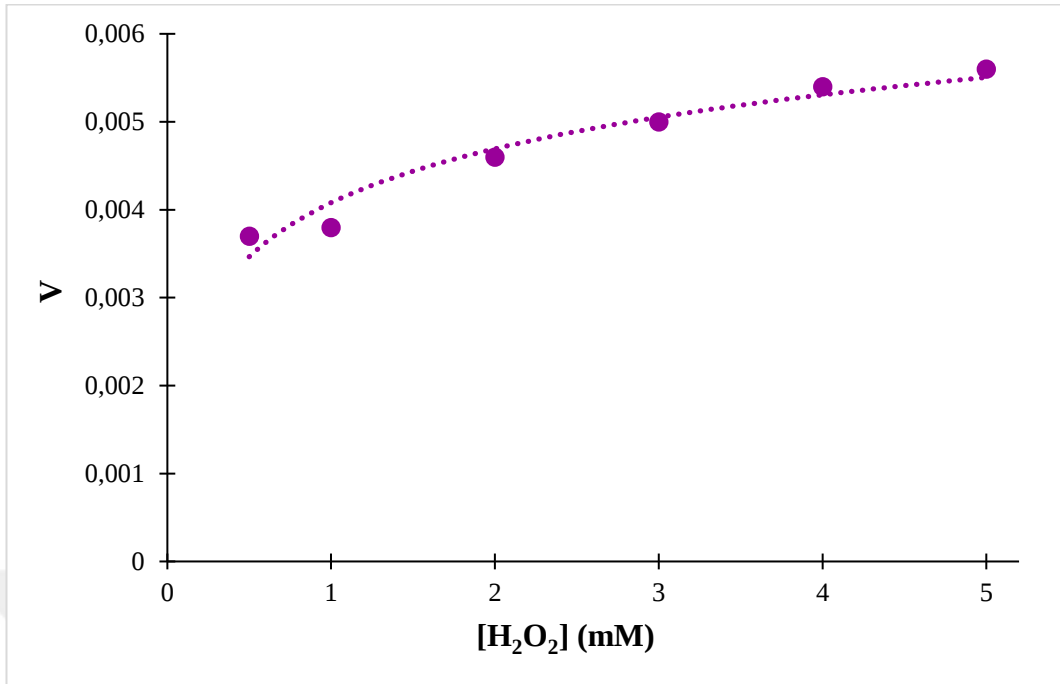
POD enzim kinetiği 4-metil katekol, H₂O₂, pirogallol, o-fenileniamin, kafeik asit ve gallik asit substratları kullanılarak 420 nm’de 60 sn boyunca spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her substrat için Şekil 4.7.-4.26.’da Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerde oluşan denklemler kullanılarak her substrat için V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2.’de gösterilmiştir.



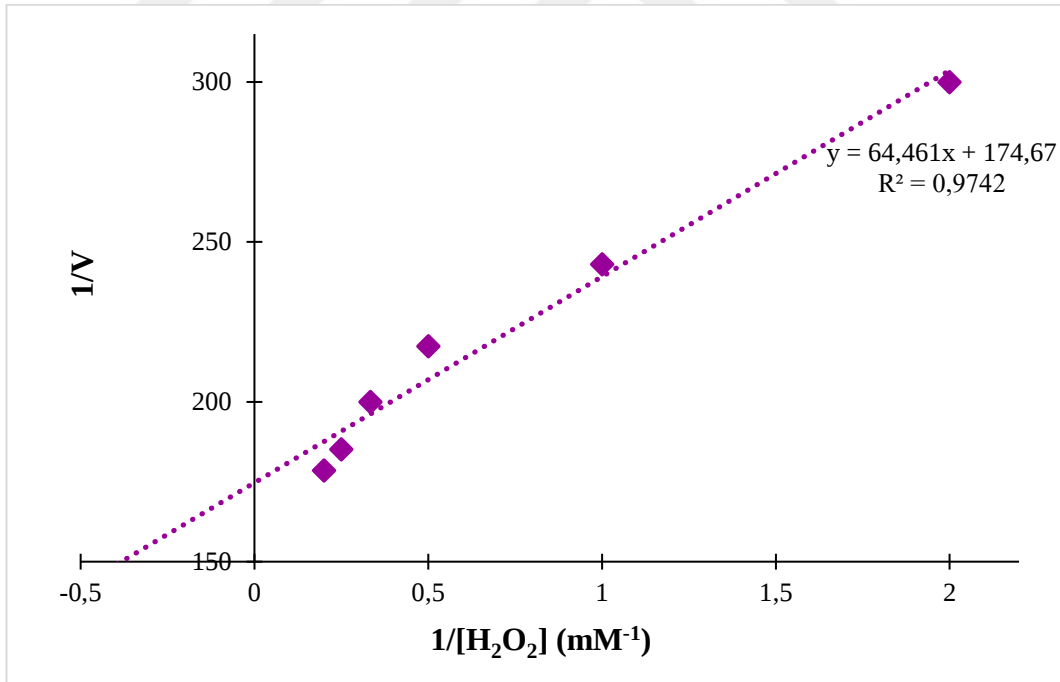
Şekil 4.7. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı 4-metil katekol substratının doygunluk eğrisi



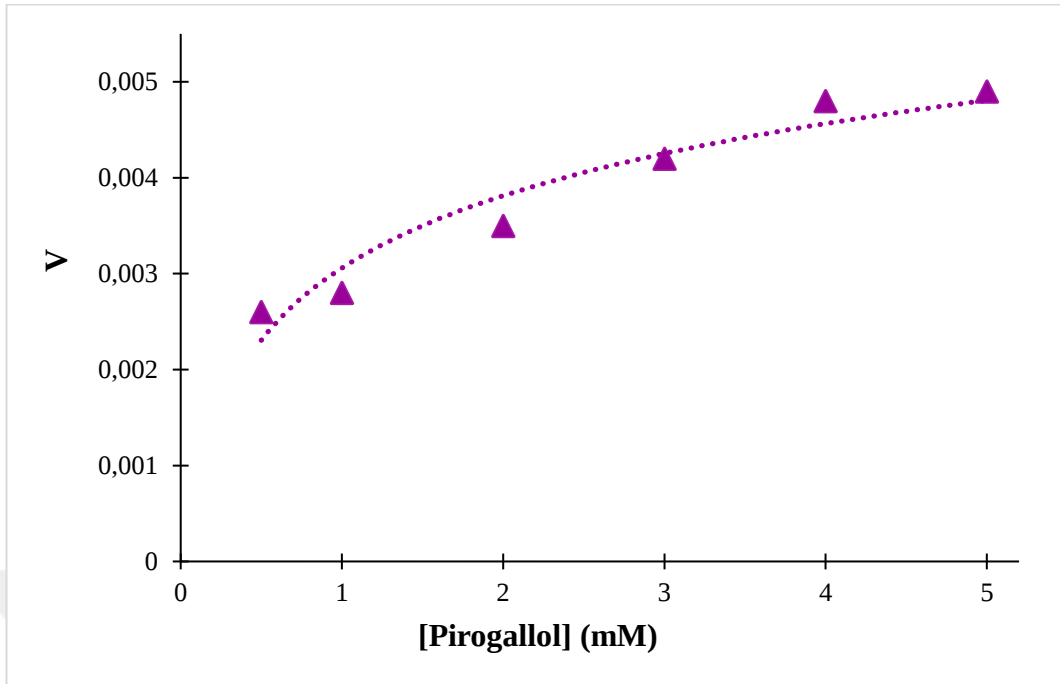
Şekil 4.8. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı 4-metil katekol substratının Lineweaver-Burk grafiği



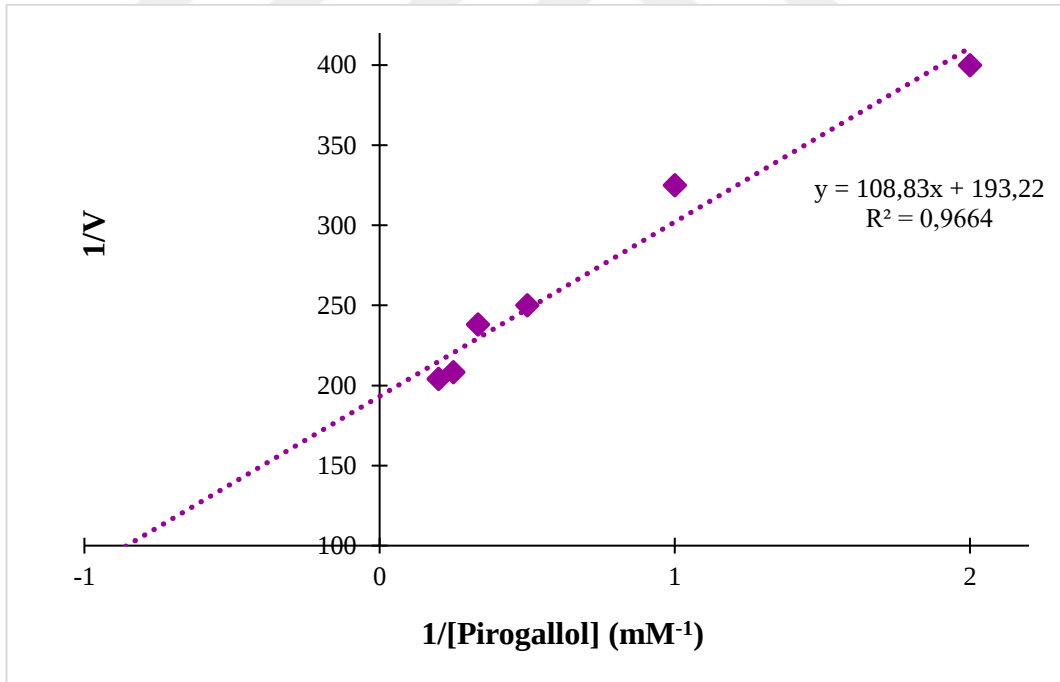
Şekil 4.9. Şevketibostan POD enzimi için sabit 4-metil katekol konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının doyumluk eğrisi



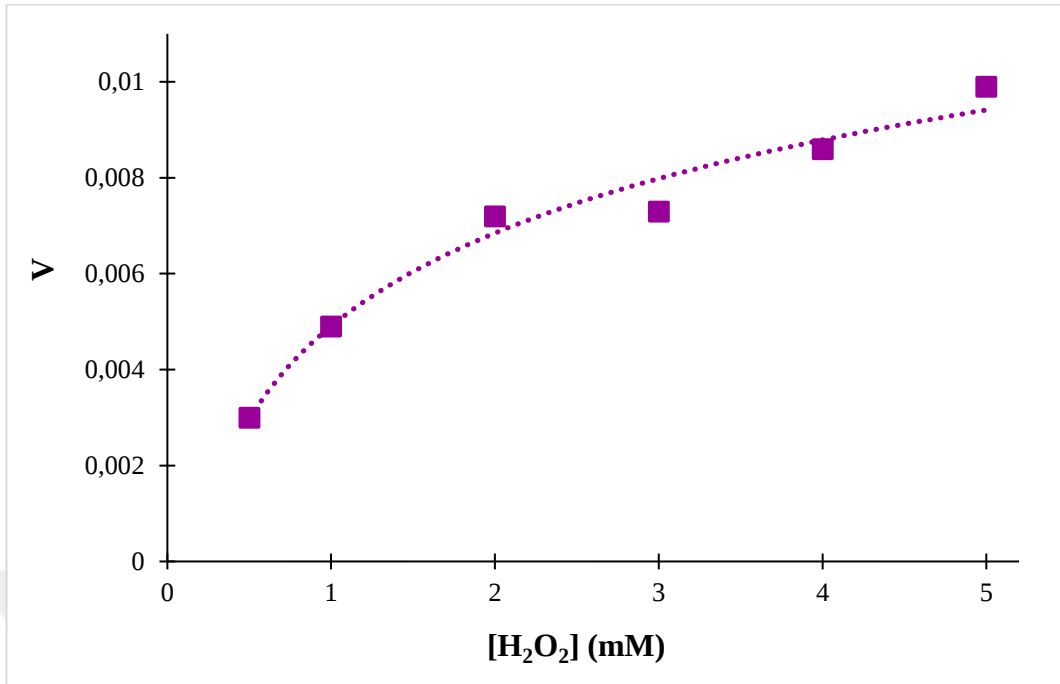
Şekil 4.10. Şevketibostan POD enzimi için sabit 4-metil katekol konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği



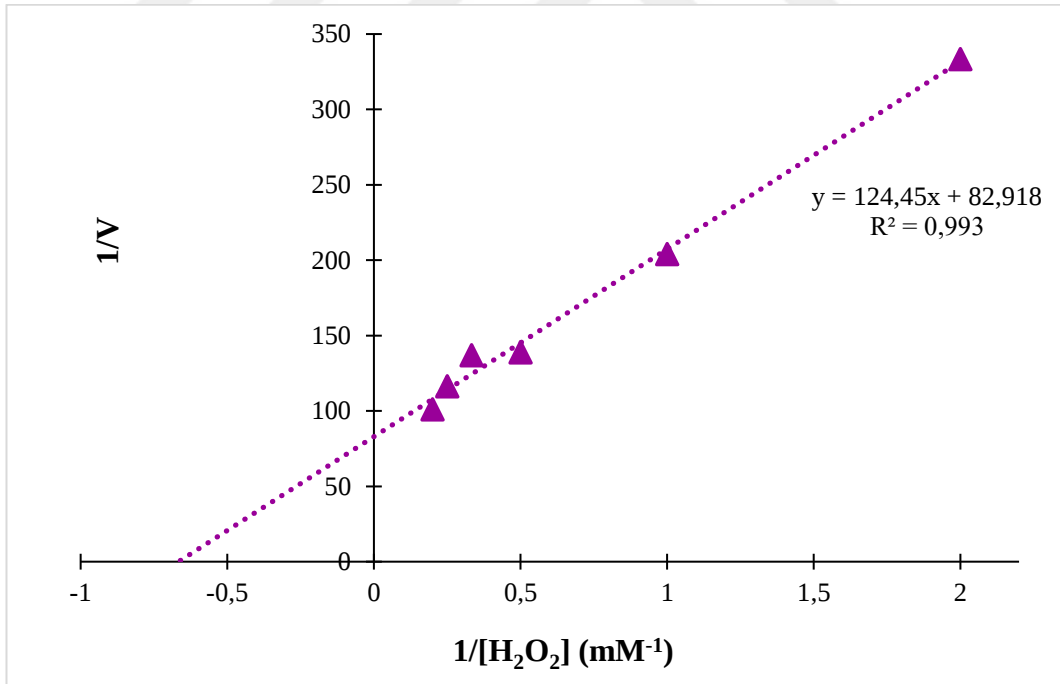
Şekil 4.11. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı pirogallol substratının doygunluk eğrisi



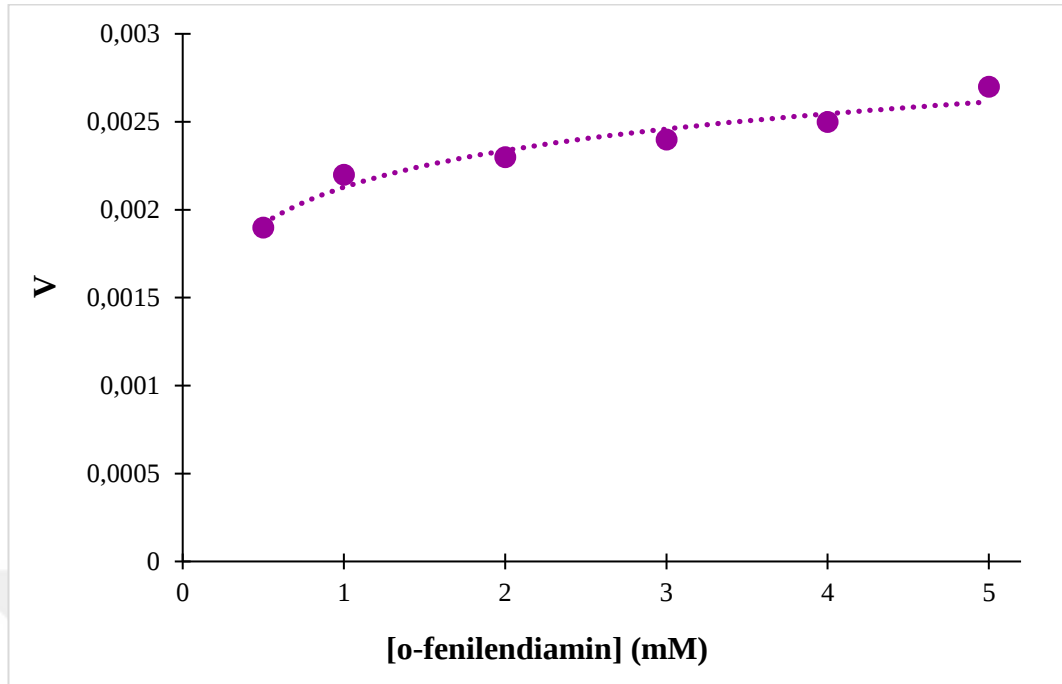
Şekil 4.12. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı pirogallol substratının Lineweaver-Burk grafiği



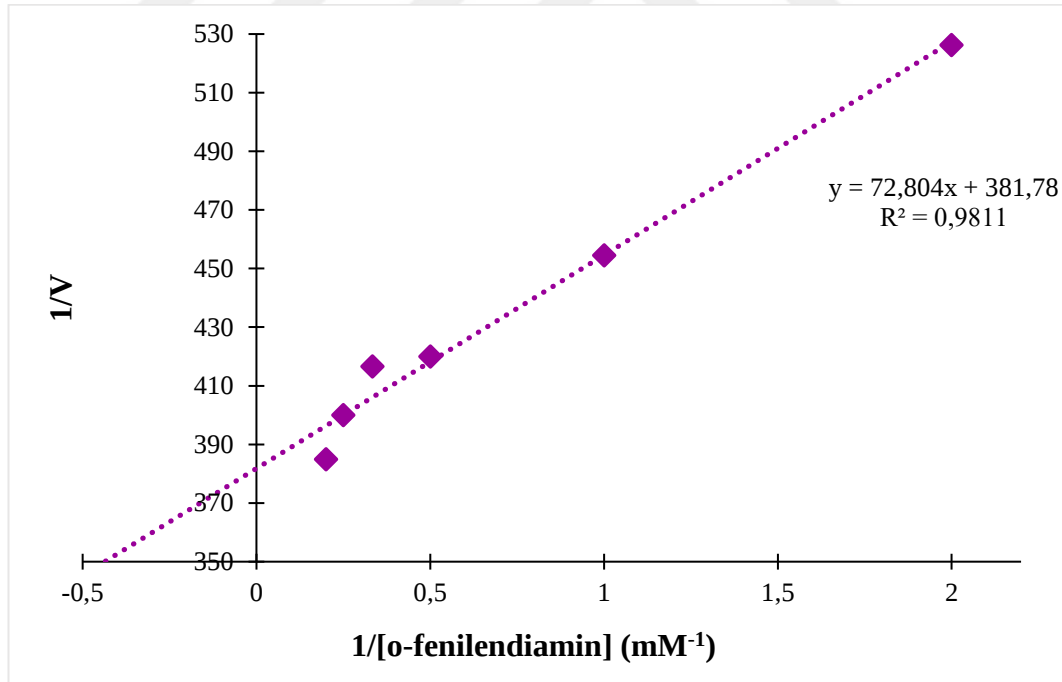
Şekil 4.13. Şevketibostan POD enzimi için sabit pirogallol konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının doygunluk eğrisi



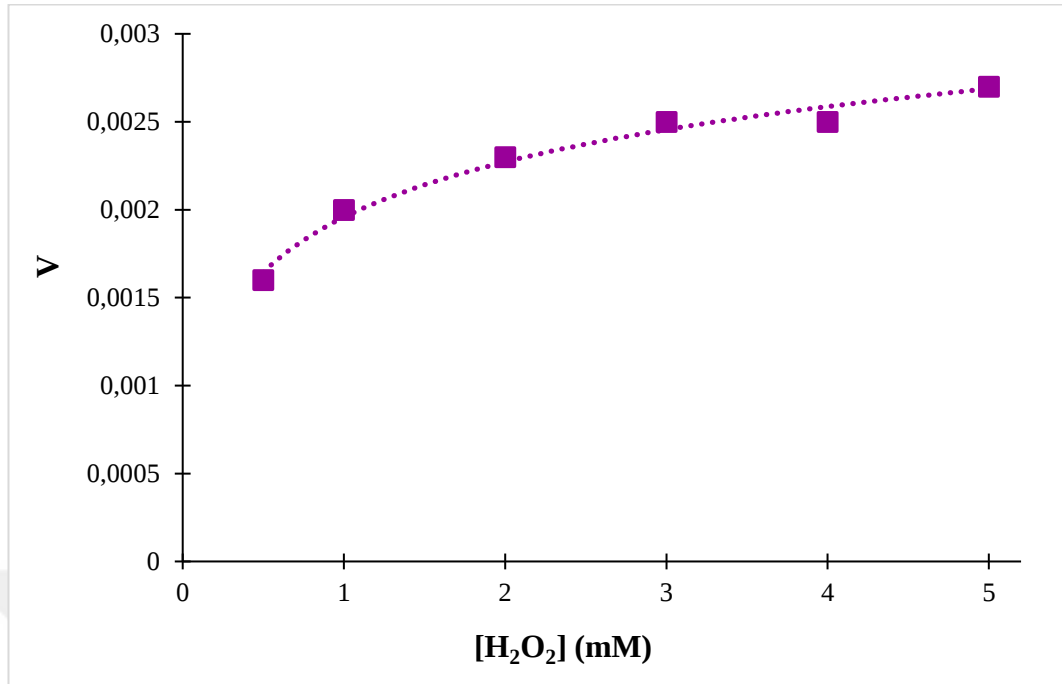
Şekil 4.14. Şevketibostan POD enzimi için sabit pirogallol konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği



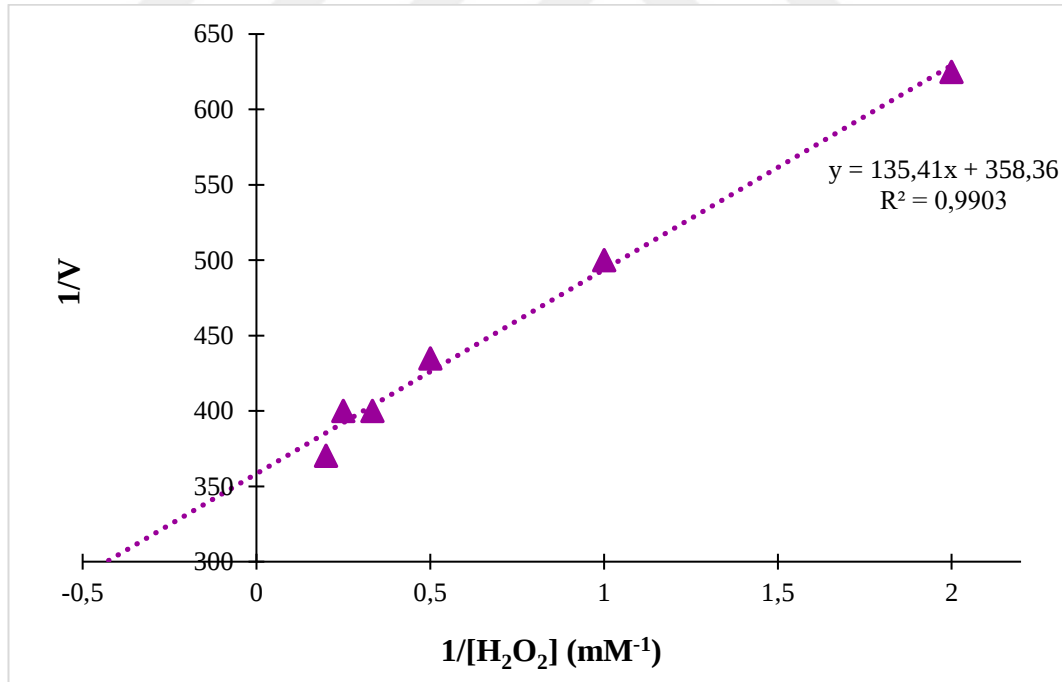
Şekil 4.15. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı o-fenilendiamin substratının doygunluk eğrisi



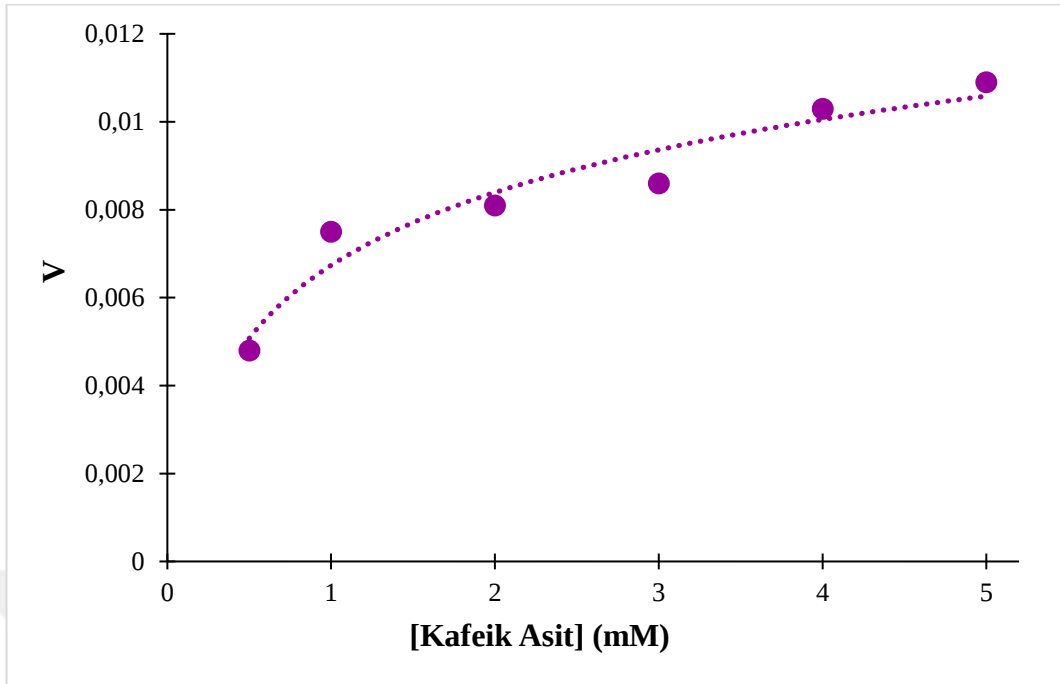
Şekil 4.16. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı o-fenilendiamin substratının Lineweaver-Burk grafiği



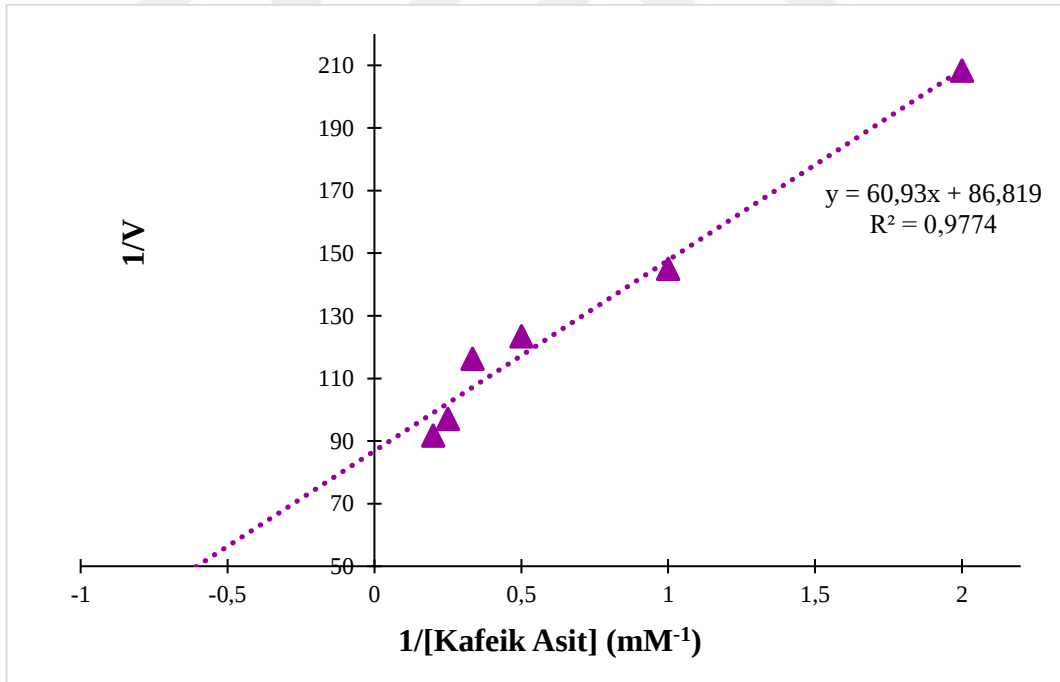
Şekil 4.17. Şevketibostan POD enzimi için sabit o-fenileniamin konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının doyumluk eğrisi



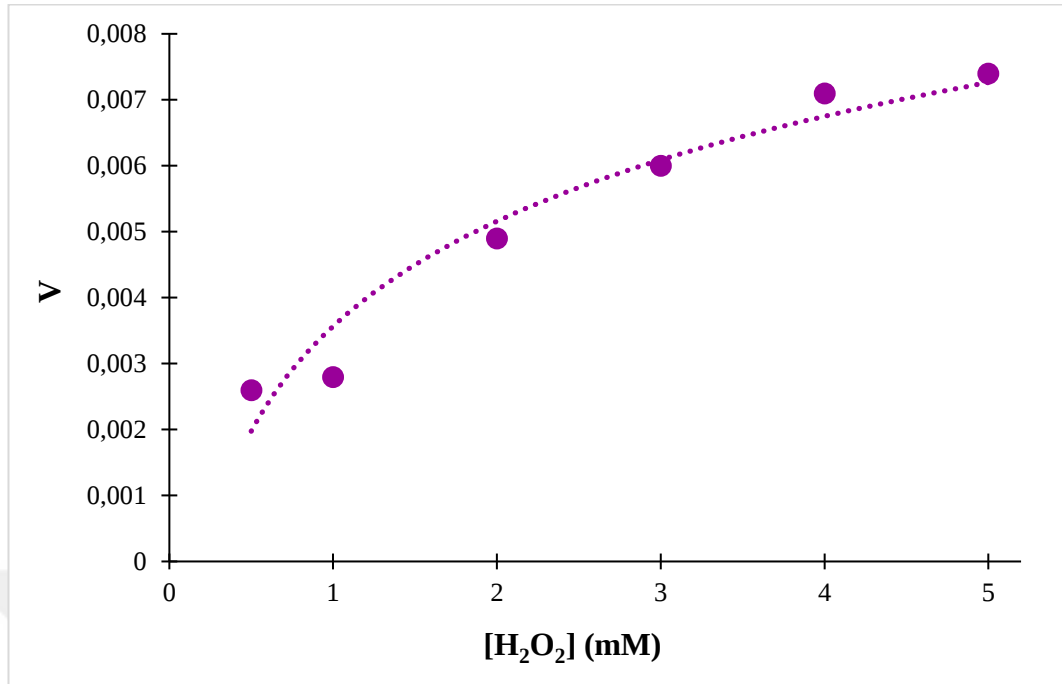
Şekil 4.18. Şevketibostan POD enzimi için sabit o-fenilendiamin konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği



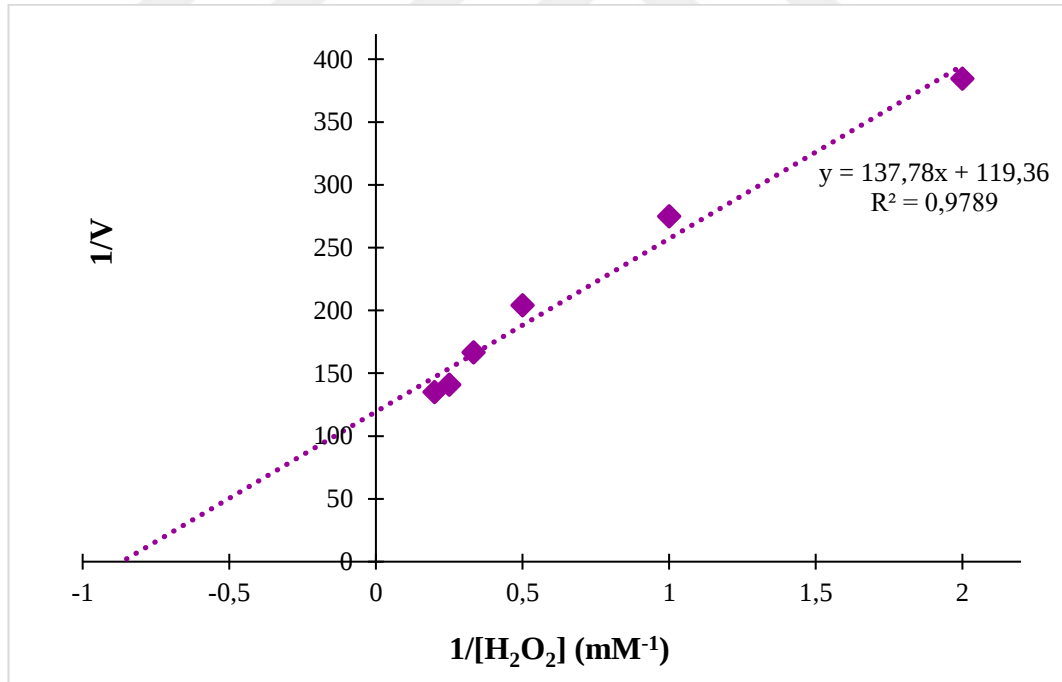
Şekil 4.19. Şevketibostan POD enzimi için sabit kafeik asit konsantrasyonu farklı H_2O_2 substratının doygunluk eğrisi



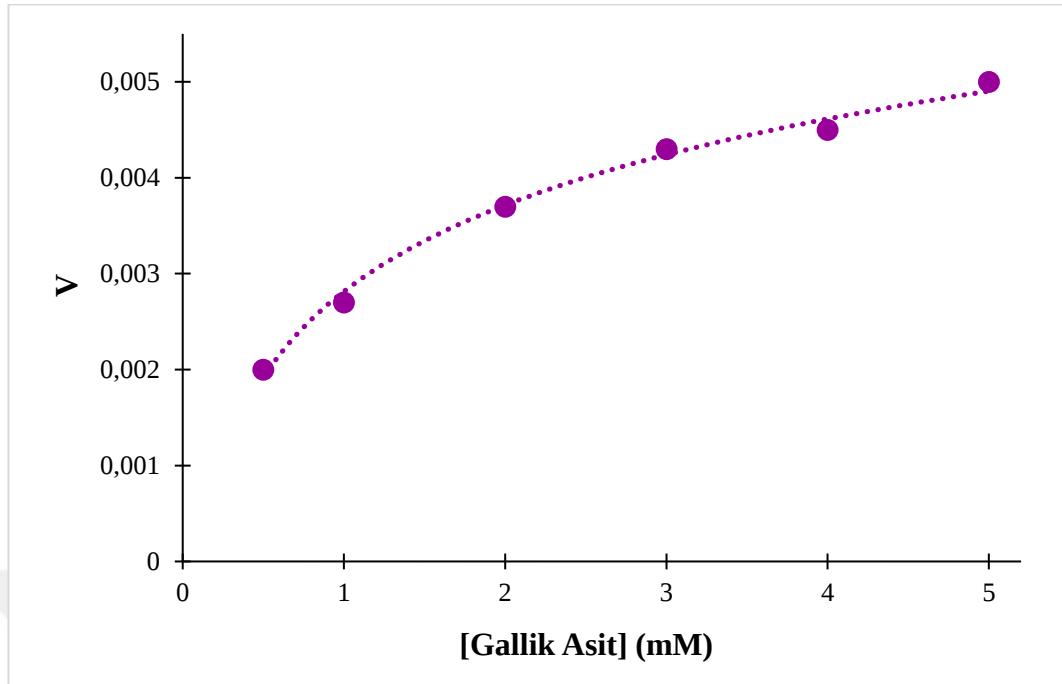
Şekil 4.20. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı kafeik asit substratının Lineweaver-Burk grafiği



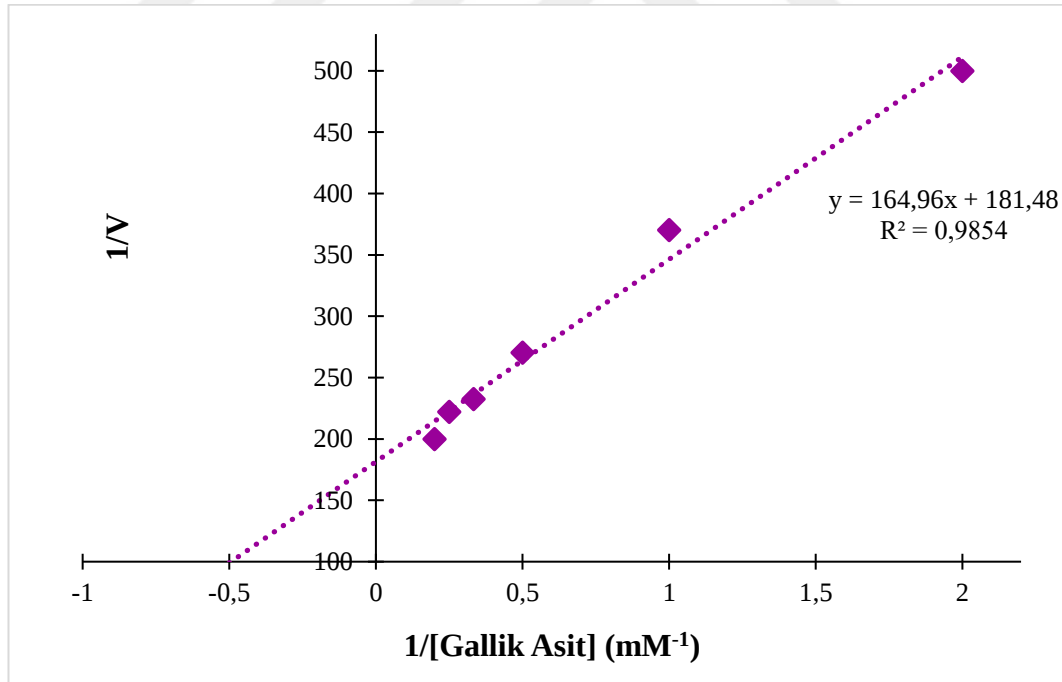
Şekil 4.21. Şevketibostan POD enzimi için sabit kafeik asit konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının doygunluk eğrisi



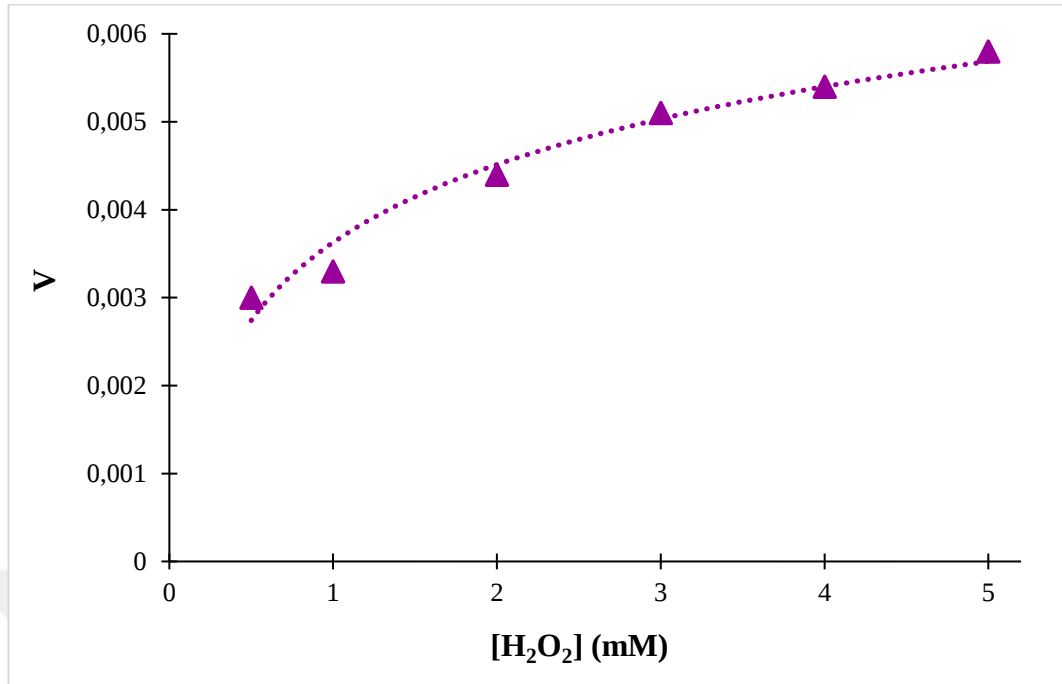
Şekil 4.22. Şevketibostan POD enzimi için sabit kafeik asit konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği



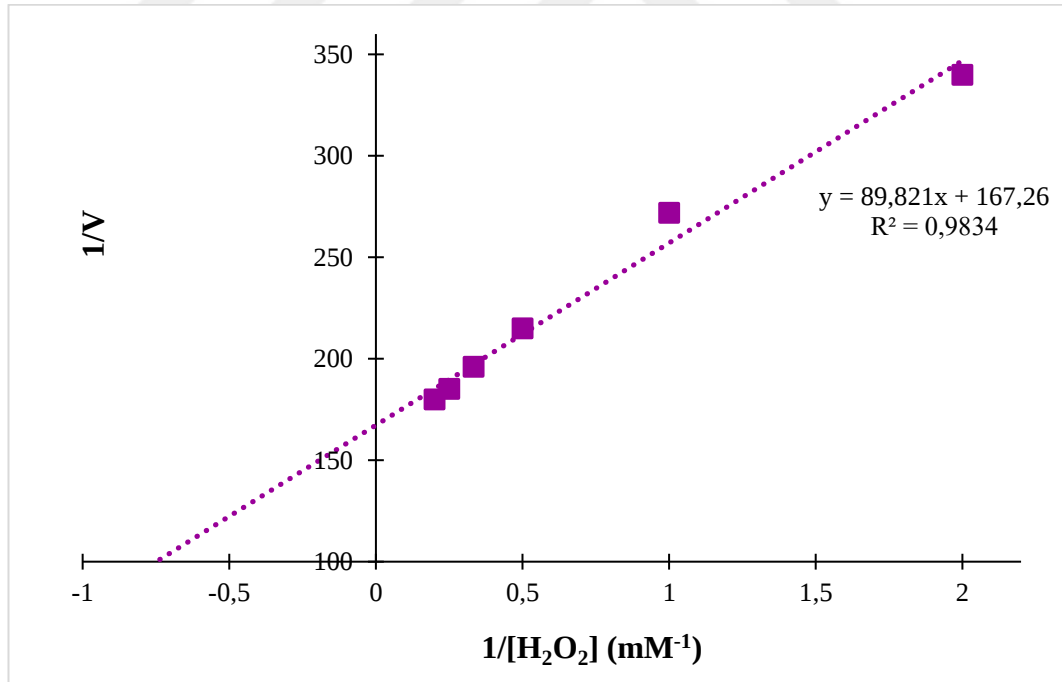
Şekil 4.23. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı gallik asit substratının doygunluk eğrisi



Şekil 4.24. Şevketibostan POD enzimi için sabit H_2O_2 konsantrasyonu farklı gallik asit substratının Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.25. Şevketibostan POD enzimi için sabit gallik asit konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının doygunluk eğrisi



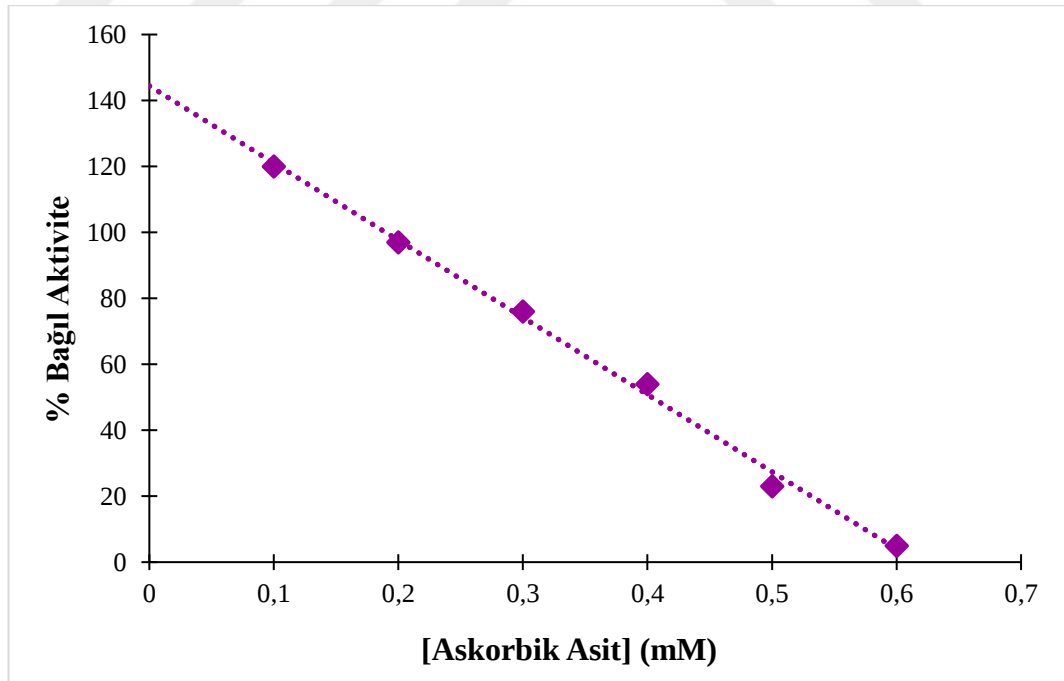
Şekil 4.26. Şevketibostan POD enzimi için sabit gallik asit konsantrasyonu farklı H₂O₂ substratının Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.2. Şevketibostan POD enzimi substrat spesifikliği K_m ve V_{max} değerleri

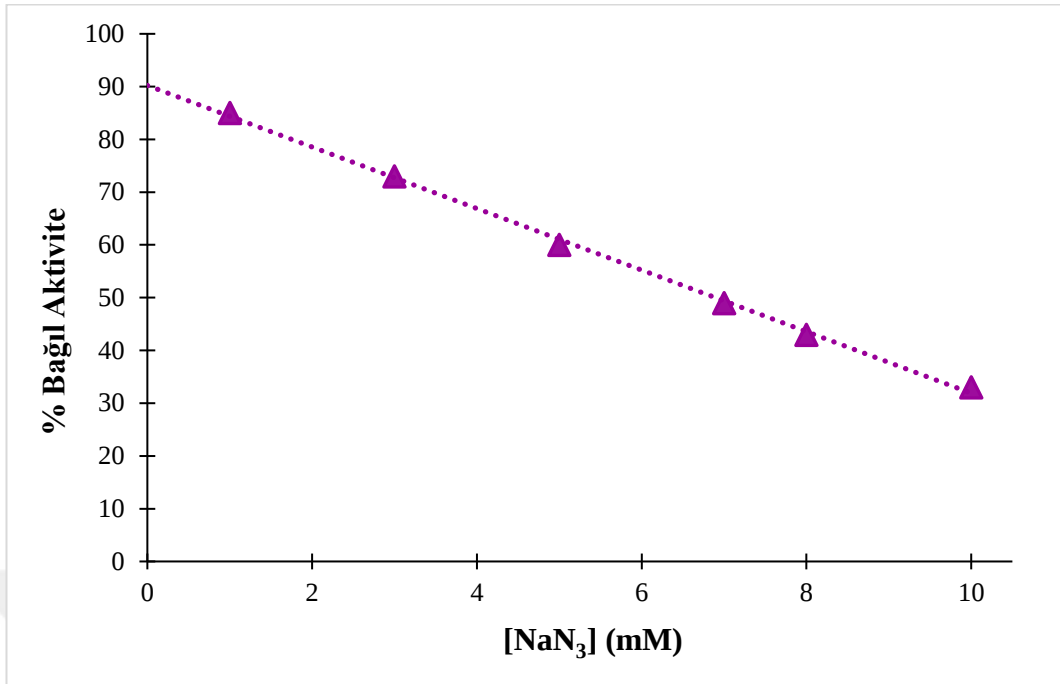
Substrat	K_m (mM)	V_{max} (EÜ/dk)	K_m (mM)	V_{max} (EÜ/dk)
	Sabit H_2O_2	Sabit H_2O_2		
4-metil katekol	1,094	0,0068	0,37	0,0057
Pirogallol	0,56	0,0052	1,50	0,012
o-fenilendiamin	0,206	0,0027	0,38	0,0028
Kafeik Asit	0,70	0,011	1,16	0,0082
Gallik Asit	0,91	0,0055	0,53	0,0006

4.5.4. İnhibitör etkisi

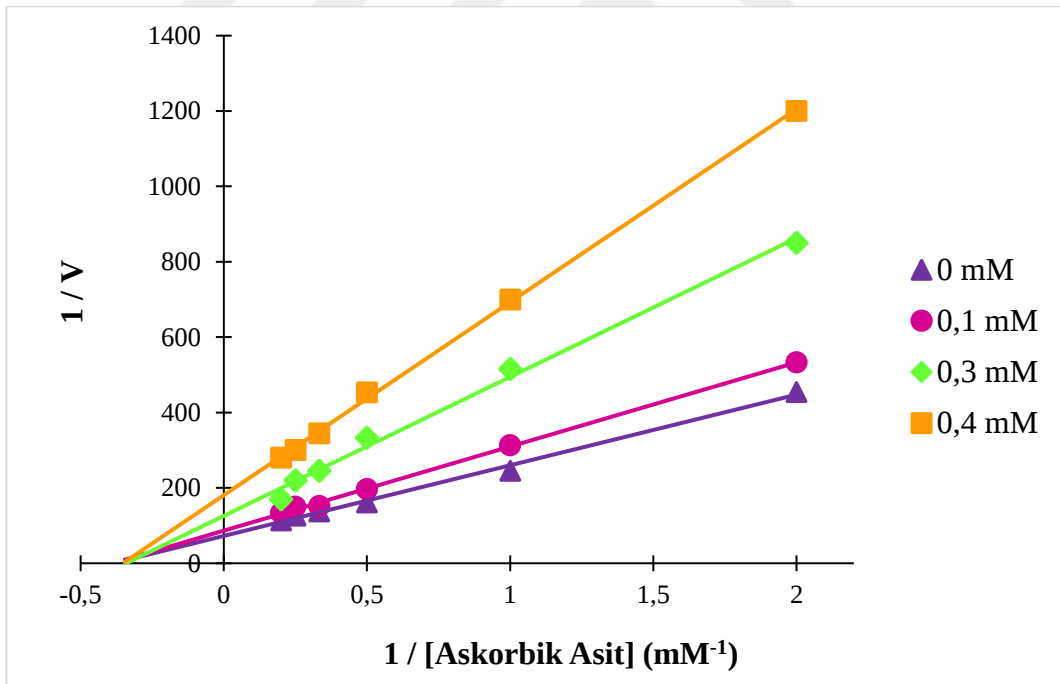
Şevketibostan bitkisinden POD enzimi üzerine üç farklı inhibitör etkisi incelenmiştir. Çalışmada askorbik asit, L-sistein ve NaN_3 inhibitörleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda askorbik asit ve NaN_3 inhibitör etkisi gösterirken L-sistein göstermemiştir. Askorbik asit ve NaN_3 inhibitörlerinin % bağıl aktivite ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.27.-4.30.'da gösterilmiştir. Grafiklerden elde edilen sonuçlar ile K_i ve I_{50} değerleri hesaplanarak Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.



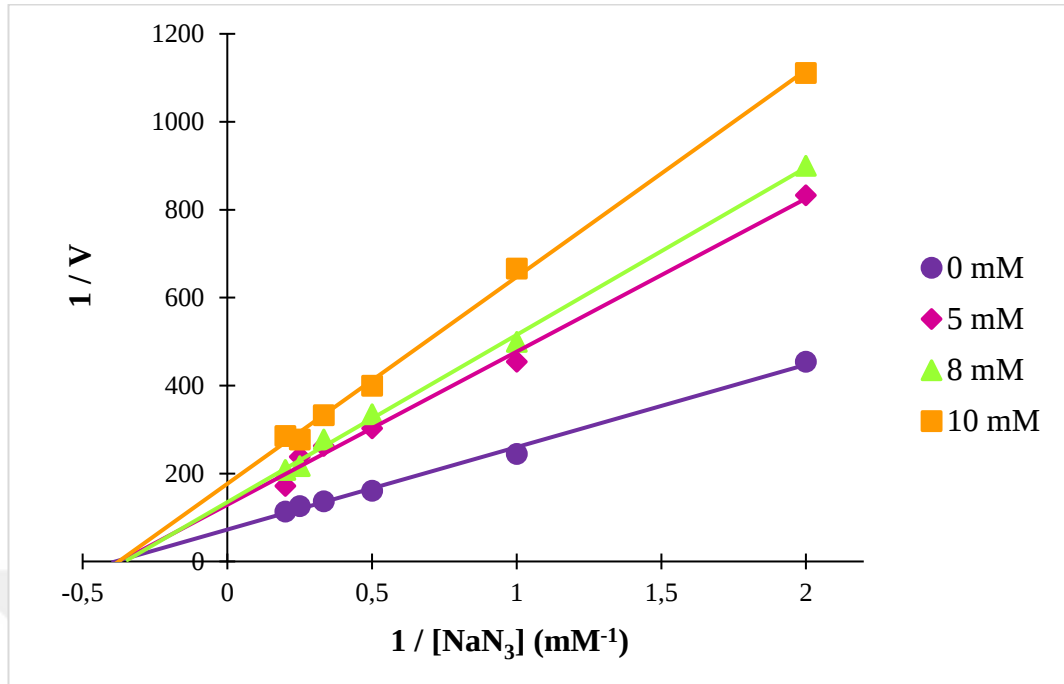
Şekil 4.27. Şevketibostan POD enzimi üzerine askorbik asit etkisi



Şekil 4.28. Şevketibostan POD enzimi üzerine sodyum azid etkisi



Şekil 4.29. Şevketibostan POD enzimi askorbik asit Lineweaver-Burk grafiği



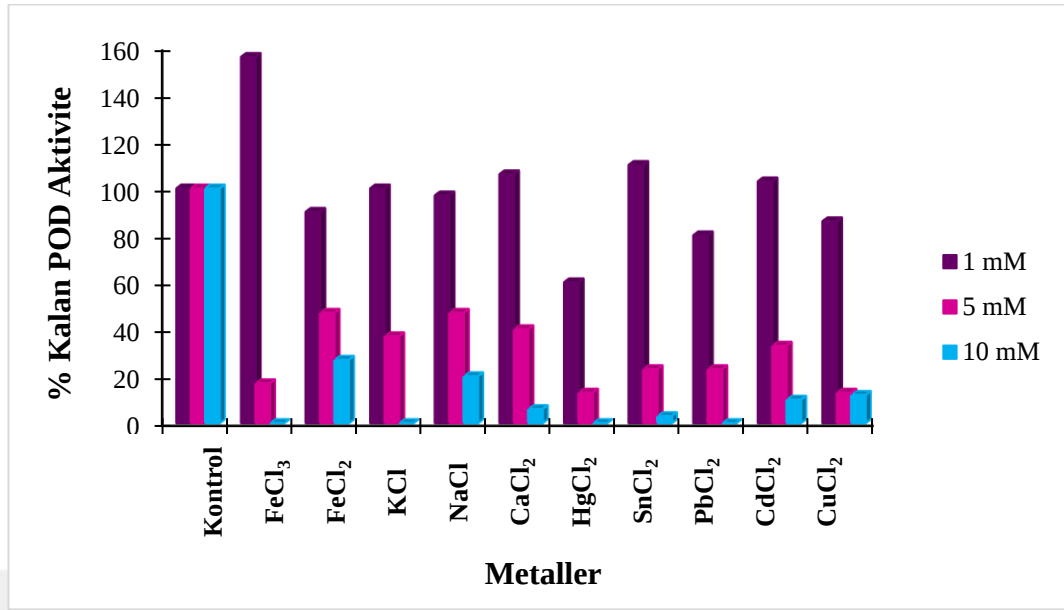
Şekil 4.30. Şevketibostan POD enzimi NaN_3 Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.3. Şevketibostan POD enzimi üzerine inhibisyon türleri, K_i ve I_{50} değerleri

İnhibitör	K_i (mM)	I_{50} (mM)	İnhibisyon Türü
Askorbik Asit	0,52	0,39	Non-kompetitif
NaN_3	6,57	6,15	Non-kompetitif

4.5.5. Metal etkisi

Şevketibostan bitkisinden Bölüm 3.3.6.2.'de anlatıldığı gibi POD enzimine metal etkisi tayininde Fe^{+3} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Sn^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , K^+ , Na^+ , Ca^+ metalleri 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler kullanılarak aktiviteye etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile % kalan POD aktivite değerleri Şekil 4.31.'de grafik halinde gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Şevketibostan POD enzimi üzerine metal etkisi grafiği

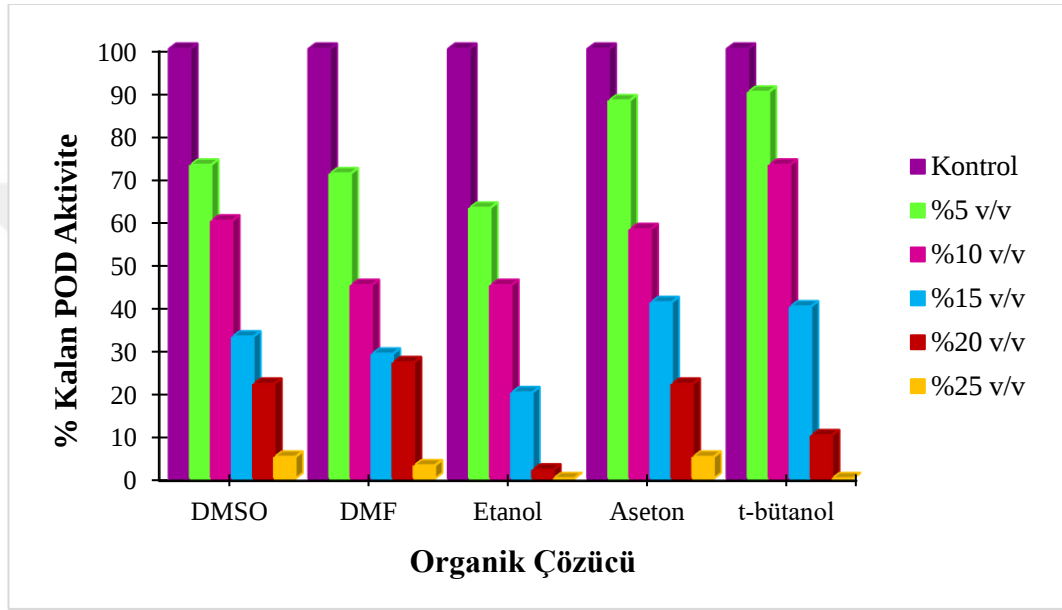
Tablo 4.4.'de Şevketibostan bitkisinden POD enzimi üzerine metal etkilerinin sonuçları gösterilmiştir. Sonuçlara göre 1 mM konsantrasyonda Fe^{+3} , K^{+} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Cd^{+2} metalleri POD enzimini aktive ederken, diğer metaller inhibe etmiştir.

Tablo 4.4. Şevketibostan POD enzimi üzerine metal etkisi sonuçları

% Kalan POD Aktivite			
Metaller	Metal Konsantrasyonu		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100
Fe^{+3}	156	17	-
Fe^{+2}	90	47	17
K^{+}	100	37	-
Na^{+}	97	47	20
Ca^{+2}	106	40	6
Hg^{+2}	60	13	-
Sn^{+2}	110	23	3
Pb^{+2}	80	23	-
Cd^{+2}	103	33	10
Cu^{+2}	86	13	12

4.5.6. Organik çözücü etkisi

Şevketibostan bitkisinden POD enzimi üzerine DMSO, DMF, etanol, aseton ve t-bütanol organik çözücülerinin %5, %10, %15, %20, %25 (v/v) olacak şekilde aktiviteye etkisi incelenmiştir. % kalan POD aktivite değerleri hesaplanarak Şekil 4.32.'de grafik halinde gösterilmiştir.



Şekil 4.32. Şevketibostan POD enzimi üzerine organik çözücü etkisi grafiği

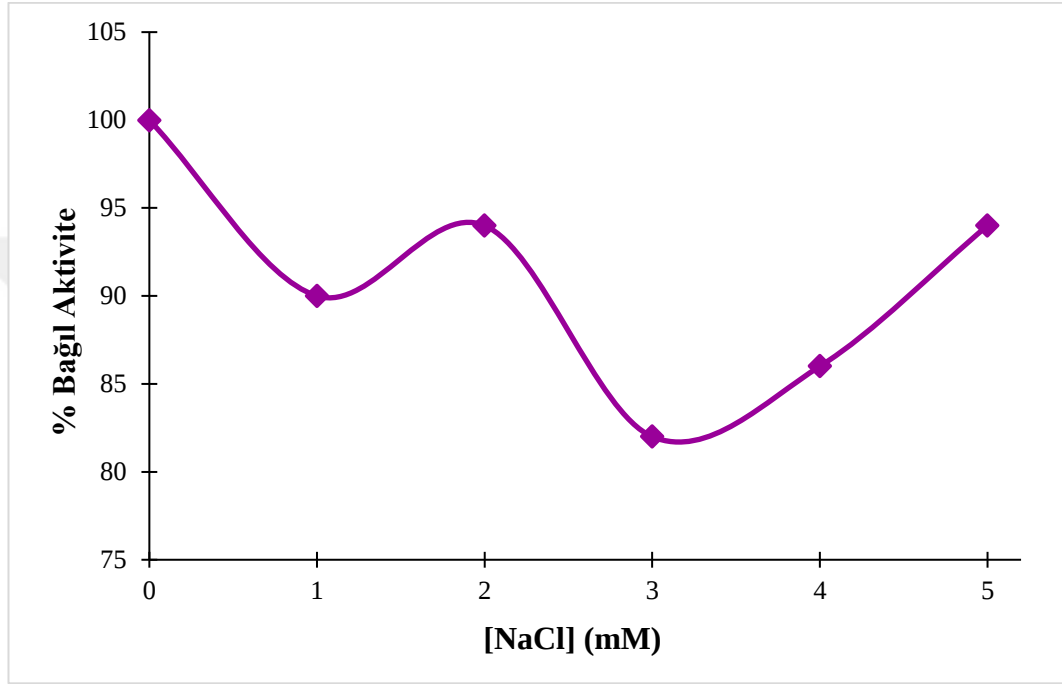
Tablo 4.5.'de Şevketibostan bitkisinden POD enzimi üzerine organik çözücü etkilerinin sonuçları gösterilmiştir. Sonuç olarak yüzde organik çözücü miktarı arttıkça enzimin inhibe olduğu görülmüştür.

Tablo 4.5. Şevketibostan POD enzimi üzerine organik çözücü etkisi sonuçları

% Kalan POD Aktivite					
Organik Çözücü (v/v)	%5	%10	%15	%20	%25
Kontrol	100	100	100	100	100
DMSO	73	60	33	22	5
DMF	71	45	29	27	3
Etanol	63	45	20	2	-
Aseton	88	58	41	22	5
t-bütanol	90	73	40	10	-

4.5.7. Optimum iyonik şiddet

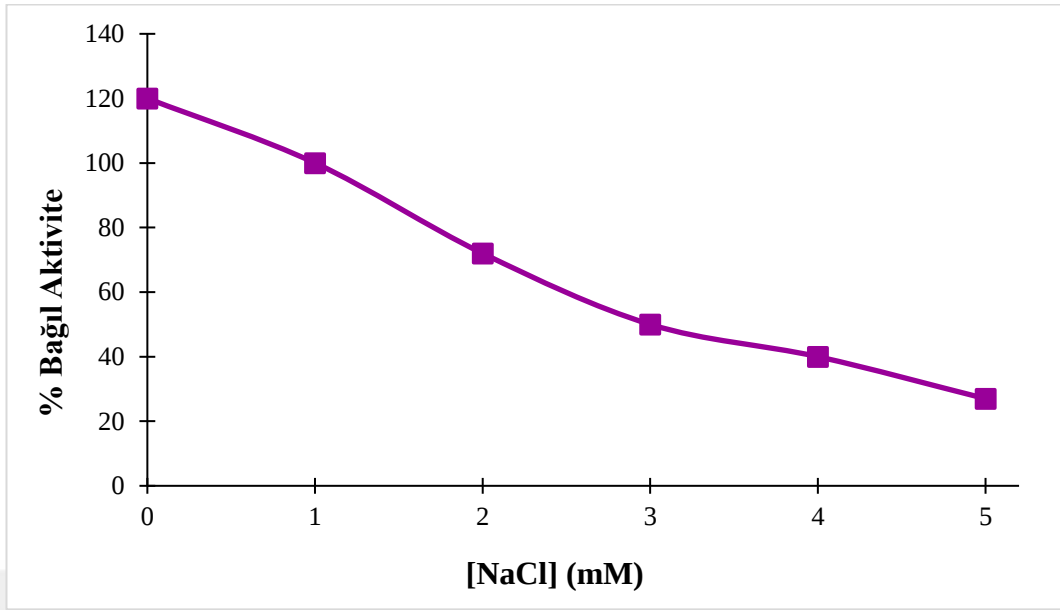
Şevketibostan bitkisinden POD enzimi üzerine NaCl'ün 1 mM ile 5 mM arasında değişen çözeltileri hazırlanarak aktiviteye etkisi incelenmiştir. Sonuçlar hesaplanarak % bağıl aktivite grafiği oluşturulmuştur ve Şekil 4.33.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Şevketibostan POD enzimi üzerine optimum iyonik şiddet grafiği

4.5.8. Enzimin tuz toleransı

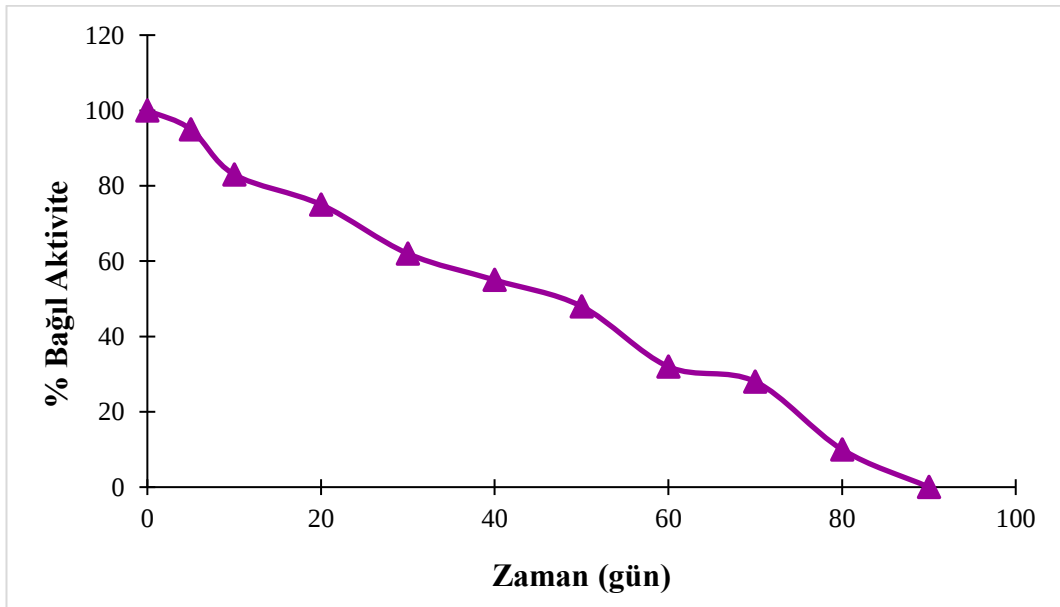
Şevketibostan bitkisinden POD enziminin tuz toleransını NaCl'ün 1 mM ile 5 mM arasında değişen çözeltilerde 2 saat inkübe edilerek aktiviteye etkisi incelenmiştir. Sonuçlar hesaplanarak % bağıl aktivite grafiği oluşturulmuştur ve Şekil 4.34.'e gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Şevketibostan POD enzimi NaCl tuz tolerans grafiği

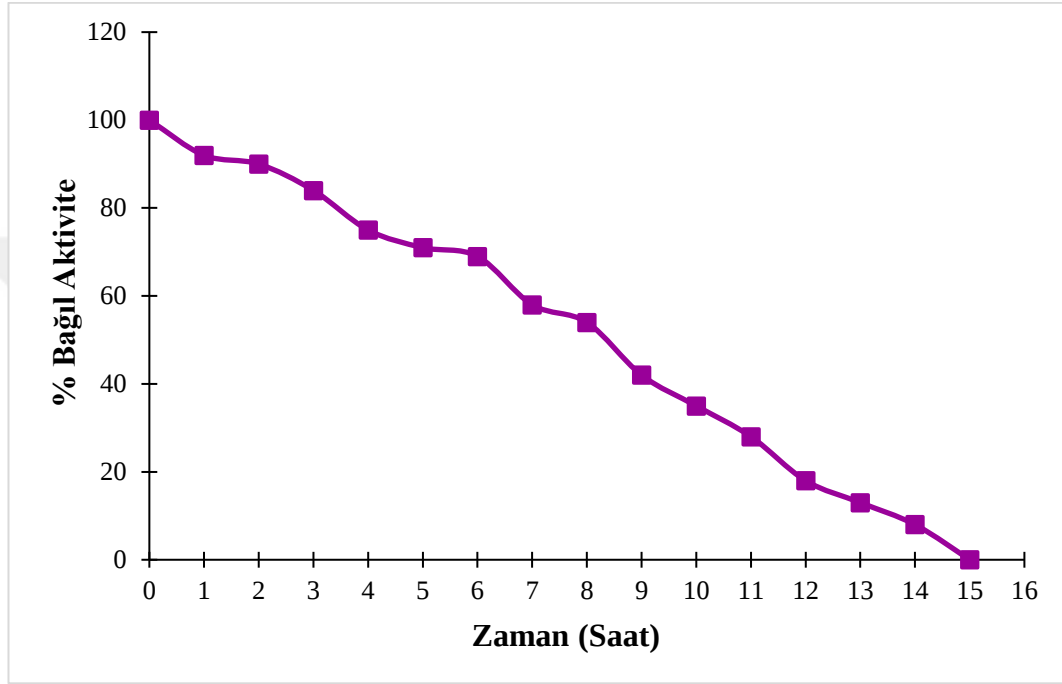
4.5.9. Enzimin depolanma kararlılığı

Şevketibostan bitkisinden POD enziminin depolanma kararlılığı için -20 °C 'de 3-4 günde bir spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn boyunca 3 mM 4-metil katekol ve 1 mM H₂O₂ substratları kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile % bağıl aktivite grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.35.).



Şekil 4.35. Şevketibostan POD enziminin -20 °C'deki aktivitesinin zamanla değişim grafiği

Şevketibostan bitkisinden POD enziminin depolanma kararlılığı için 25 °C’de (oda sıcaklığında) her saat başı spektrofotometrik yöntemle 420 nm’de 60 sn süresince 3 mM 4-metil katekol ve 1 mM H₂O₂ substratları kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile % bağıl aktivite grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.36.).



Şekil 4.36. Şevketibostan POD enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişim grafiği

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen peroksidaz (POD) enzimi incelenmiştir.

POD enzim aktivitesi H_2O_2 ve 4-metil katekol substratları kullanılarak spektrofotometrik yöntemle UV-Vis ile 420 nm’de 60 sn boyunca absorbans artışları gözlemlenerek yapılmıştır. POD enziminde H_2O_2 substratı varlığında yapılmıştır. Bunun sebebi olarak hidrojen peroksitin suya indirgenmesiyle enzimin yükseltgenmesidir. POD enzimi yükseltgenerek ortamda bulunan substratı da yükseltger ve ortamdan harcanmadan çıkmış olur.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinin yaprak kısımlarından POD enzimi izole edilerek ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen POD enzimi -20 °C’de izole edilmiştir. +4 °C’de ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden peroksidaz (POD) enzimi üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) ile saflaştırılmıştır. TPP ile saflaştırılan POD enzimi SDS-PAGE yöntemi ile 63 kDa olarak bulunmuştur. Köktepe (2018) kuru fasulyeden POD molekül ağırlığını 45 kDa olarak bulmuştur [42]. Köksal (2007) karnabahardan POD molekül ağırlığını 44 kDa olarak bulmuştur [63]. Pandey ve arkadaşları (2012) papaya meyvesinden POD molekül ağırlığını 70 kDa olarak bulmuşlardır [38]. Gülçin ve arkadaşları (2005) kara lahanada POD molekül ağırlığını 95 kDa olarak bulmuşlardır [21]. Deepa ve arkadaşları (2002) hurma yaprağı yağından POD molekül ağırlığını 48 kDa olarak bulmuşlardır [14]. Literatür sonuçları ile hesaplanan POD molekül ağırlığının uygun olduğunu göstermiştir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enziminin optimum pH'ını belirlemek için 4-metil katekol ve H₂O₂ substratları kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda optimum pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur. Pomar ve arkadaşları (1997) biber asidik POD enziminin optimum pH değerlerinin 6,0-9,0 arasında değiştiğini bulmuşlardır [31]. Saraiva ve arkadaşları (2007) zeytinden optimum pH'ı 7,0 olarak bulmuşlardır [15]. Fang ve arkadaşları (2008) kividenden pH değerlerinin 6,0-8,5 arasında değiştiğini bulmuşlardır [75]. Literatür sonuçları ile hesaplanan optimum pH değerinin uygun olduğunu göstermiştir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 4-metil katekol ve H₂O₂ substratları 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C'lerde çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak bulunmuştur. Köksal (2007) karnabahardan POD enziminin optimum sıcaklık değerlerini 25-50 °C arasında değiştiğini göstermişlerdir [63]. Belcarz ve arkadaşları (2008) lahanadan POD enziminin optimum sıcaklık değerini 40 °C olarak bulmuştur [13]. Saraiva ve arkadaşları (2007) zeytinden optimum sıcaklık değerini 34,7 °C olarak bulmuşlardır [15]. Literatür sonuçları ile hesaplanan optimum sıcaklık değerinin uygun olduğunu göstermiştir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için beş farklı substrat kullanılarak aktivite tayinleri yapılmıştır. Substrat olarak 4-metil katekol, pirogallol, o-fenilendiamin, kafeik asit, gallik asit ve H₂O₂ kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak doygunluk eğrileri ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Enzim kinetiği çalışmaları sonucunda POD enziminin substrat spesifikliğı büyükten küçüğe doğru sıralanırsa o-fenilendiamin, pirogallol, kafeik asit, gallik asit ve 4-metil katekol olarak bulunmuştur. Turgut (2009) deve dikenini bitkisinden POD enziminin substrat spesifikliğı büyükten küçüğe doğru sıralaması o-fenilendiamin, pirogallol, o-dianisidin, kafeik asit, ABTS, 4-metil katekol, katekol, guaiakol olarak bulmuştur [43]. Düzcan (2010) karahindibadan POD enziminin substrat spesifikliğı büyükten küçüğe doğru sıralaması kafeik asit, ABTS, o-dianisidin, gallik asit, pirogallol, o-

fenilendiamin, 4- metil katekol, katekol, guaiakol olarak bulmuştur [41]. Literatür çalışmaları ile Şevketibostan bitkisinden POD enziminin substrat spesifikliği uygunluk göstermiştir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enzimine inhibitör etkisini belirlemek için üç farklı inhibitör kullanılarak aktivite tayinleri yapılmıştır. İnhibitör olarak askorbik asit, NaN_3 ve L-sistein kullanılmıştır. İlk olarak enzim aktivitesini yarıya (%50) düşüren inhibitör konsantrasyonu (I_{50}) bulunmuştur. I_{50} değerleri baz alınarak bu değer alt ve üst değerleri kullanılarak tekrar aktivite ölçümleri yapılmıştır. Her inhibitör için belirlenen konsantrasyonlardaki sonuçlar ile $1/V-1/[S]$ grafikleri çizilmiştir. Bu grafikten yararlanarak inhibitörlü konsantrasyonlar ve inhibitörsüz konsantrasyon değerleri kullanılarak K_i ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada L-sistein inhibitör etkisi göstermemiştir. Askorbik asit ve NaN_3 inhibitörleri yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon sonucuna ulaşılmıştır. Turgut (2009) deve dikeninde Askorbik asit, NaN_3 inhibisyona uğrattığını bulmuştur [43]. Düzcan (2010) karahindiba bitkisinde Askorbik asit, NaN_3 ve L-sisteinin inhibisyona uğrattığını bulmuştur [41]. Denli (2013) kiwano bitkisinde NaN_3 ve L-sisteinin inhibisyona uğrattığını bulmuştur [40]. Çalışma sonucunda L-sistein hariç diğer inhibitörlerin POD enzimi üzerinde literatür sonuçları ile benzer etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enzimine metal etkisini belirlemek için Fe^{+3} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Sn^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , K^+ , Na^+ , Ca^+ metalleri 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri kullanılarak aktiviteye etkisi incelenmiştir. Sonuçlar grafik halinde Şekil 4.31.'de sunulmuştur. Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinde Fe^{+2} , Na^+ , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} metalleri POD enzimini inhibe ettiği, Fe^{+3} , K^+ , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Cd^{+2} metallerinin ise POD enzimini aktivasyona uğrattığı sonuçları elde edilmiştir. Denli (2013) kiwano bitkisinde metal etkisi çalışmasında Mg^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} enzim üzerinde inhibisyona, Fe^{+3} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Al^{+3} metallerinin ise aktivasyona sebep olduğunu bulmuştur [40]. Literatür sonuçları ile enzim üzerine metal etkisi sonuçlarının uygun olduğunu göstermiştir.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enzimine organik çözücü etkisini belirlemek için DMSO, DMF, etanol, aseton ve t-bütanol çözücülerini %5, %10, %15, %20, %25 (v/v) olacak şekilde aktiviteye etkisi incelenmiştir. Sonuçlar grafik halinde Şekil 4.32.'de sunulmuştur ve yüzde organik çözücü miktarı arttıkça enzimin inhibe olduğu görülmüştür.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enzimine optimum iyonik şiddet ve enzimin tuz toleransını belirlemek için NaCl'ün 1 mM ile 5 mM arasında değişen çözeltileri hazırlanarak aktiviteye etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.33. ve Şekil 4.34.'de sunulmuştur. Optimum iyonik şiddet çalışmaları sonucunda NaCl çözeltisinin 5 mM konsantrasyonunda optimum iyonik şiddet göstermektedir. Tuz toleransı çalışmaları sonucunda NaCl ile 2 saat inkübe edilen enzimin aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Denli (2013) kiwano bitkisinde optimum iyonik şiddeti 4 mM olarak bulmuştur [40]. Literatür çalışmaları ile optimum iyonik şiddet sonuçları benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden izole edilen POD enzimine oda sıcaklığında ve -20 °C'deki depolanma kararlılığı incelenmiştir. -20 °C'de izole edilen enzim 3-4 günde bir spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans artışı izlenerek sonuçlar kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar % bağıl aktivite-zaman (gün) grafiği Şekil 4.35.'te gösterilmiştir. Oda sıcaklığındaki enzim depolanma kararlılığı için her saat başı aktivite ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar % bağıl aktivite-zaman (saat) grafiği Şekil 4.36.'da gösterilmiştir. Sonuçlara göre Şevketibostan (*Cnicus benedictus*)'dan izole edilen POD enzimi saat ve gün geçtikçe aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden peroksidaz (POD) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyon çalışmaları ilk kez çalışılmıştır.

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisi Türkiye'nin birçok yerinde kendi kendine büyüyen yabani bir bitkidir ve yetiştiriciliğine yeni başlanmıştır. Bu sebeple Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinin enzim çalışmasının yapılması literatüre

katkı sağlayacağı gibi yapılacak olan çalışmalara ek kaynak olarak ışıık tutacağı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Diplock, A., Healthy lifestyles nutrition and physical activity, antioxidant nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, 59, 1998.
- [2] Nawar, W.W., Lipids in “food chemistry”, O.R. Fennema (Ed), Marcel Dekker 225-319, 1996.
- [3] Blokhina, O., Academic Dissertation, ISSN1239-9469, ISBN 951-45-9631-5, ISBN 951-45-9632-3, ISBN 951-45-9633, 2000.
- [4] Larson, R.A., The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. 27, 969–978, 1998.
- [5] Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., Antioxidant capacity of tea and common vegetables, journal of agricultural and food chemistry. 44, 3426–3431, 1996.
- [6] Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants. Hudson B.J.F. Ed., Elsevier, Amsterdam, 17-192, 1990.
- [7] Vitali, A., Botta, B., Delle Monache, G., Zappitelli, S., et al., Purification and Partial Characterization of a Peroxidase From Plant Cell Cultures of *Cassia Didymobotrya* And Biotransformation Studies, Biochem. J., 331, 513-519, 1998.
- [8] Mdluli, M.K., Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*), Food Chemistry, 92: 311–323, 2005.
- [9] Spitzer, G., Taylor, M.C., The Effect of Heat on the Activity of the Enzyme Peroxidase as Found in Milk, Journal of Dairy Science, Vol. 7 No. 3 234-244, 1924.
- [10] Manu, B.T., Prasada Rao, U.J.S., Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran, Food Chemistry, 114: 66–71, 2009.

- [11] Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., Del Amor, F.M., Nuñez-Delgado, E., Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase, Food Chemistry, 107: 193–199, 2008.
- [12] Rodríguez, J., N-Lo'pez., Espín, J.C., Amor, F.D., et al., Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivated under Different Salinity Conditions, J. Agric. Food Chem, 48, 1537-1541, 2000.
- [13] Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P., Spring cabbage peroxidases Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis, Phytochemistry, 69: 627–636, 2008.
- [14] Deepa, S.S., Arumugan, C., Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf, Phytochemistry, 61: 503–511, 2002.
- [15] Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase—Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase, Food Chemistry, 101: 1571–1579, 2007.
- [16] Pandey, V.P. and Dwivedi U.N., Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68, 168-173, 2011.
- [17] Halpin, B., Pressey R., Jen J. and Mondy N., Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). Journal Food Science, 54, 644, 1989.
- [18] McLellan, K.M. and Robinson, D.S., Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. Food Chemistry, 23, 305–319, 1987.
- [19] Rudrappa, T., Lakshmanan V., Kaunain R., Singara N.M. and Neelwarne B., Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). Food Chemistry, 105, 1312–1320, 2007.
- [20] Tipawan, T. and Barrett M., Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 3206–3214, 2005.
- [21] Gülçin, İ. and Yıldırım A., Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. Asian Journal of Chemistry, 17, 2005.

- [22] Yemenicioglu, A., Özkan, M., and Cemeroglu B., Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4158–4163, 1998.
- [23] Gülçin, İ., Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2002.
- [24] Gazaryan, I.G. and Lagrimini L.M., Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. Phytochemistry, 41, 1029–1034, 1996.
- [25] Triplett, B.A. and Mellon J.E., Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). Plant Science, 81, 147-154, 1992.
- [26] Kristensen, B.K., Bloch H. and Rasmussen S.K., Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. Plant Physiology, 120, 501, 1999.
- [27] Jen, J.J., Seo A. and Flurkey W.H., Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. Journal Food Science, 45, 60–63, 1980.
- [28] Marquez, O., Waliszewski K.N., Oliart R.M. and Padio V.T., Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. LWT, 41, 1372-1379, 2008.
- [29] Nair, A.R. and Showalter A.M., Purification and characterization of a woundinducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. Biochemistry biophys. Research Communucation, 226, 254, 1996.
- [30] Clemente, E., Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. Phytochemistry, 49, 29-36, 1998.
- [31] Pomar, F., Bernal M.A., Diaz J. and Merino F., Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. Phytochemistry, 46, 1313–1317, 1997.
- [32] Kvaratskhelia, M., Winkel C. and Thorneley R.N.F., Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. Plant Physiology, 114, 1237-1245, 1997.
- [33] Civello, P.M., Martinez G.A., Chaves A.R. and Anon M.C., Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2596–2601, 1995.

- [34] Lavery, C.B., Macinnis M.C., Macdonald M.J., Williams J.B., Spencer C.A., Burke A.A., Irwin D.J.G. and D'Cunha G.B., Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 8471-8476, 2010.
- [35] Mika, A., Buck F. and L  thje S., Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays L.*) roots. Journal of Proteomics, 71, 412-424, 2008.
- [36] Murakami, S., Takahara H. and Shiraiwa M., Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. Phytochemistry, 68, 777–78, 2007.
- [37] Boeuf, G., Bauw G., Legrand B. and Rambour S., Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. Plant Physiol. Biochem., 38, 217-224, 2000.
- [38] Pandey, V.P., Singh S., Singh R. and Dwivedi U.N., Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. Appl. Biochem Biotechnol., 167, 367-376, 2012.
- [39] Leon, J.C., Alpeeva I.S., Chubar T.A., Galaev I.Yu., Csoregi E. and Sakharov I.Yu., Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. Plant Science, 163, 1011–1019, 2002.
- [40] Denli, Z., Kiwano (*cucumis metuliferus*) bitksinde peroksidaz enzimlerinin kinetik özelliklerinin incelenmesi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013.
- [41] Düzcan, B., Karahindiba (*taraxacum officinale*) bitkisinden süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin karakterizasyonu, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [42] K  ktepe, T.N., Kuru fasulye (*phaseolus vulgaris L.*) bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018.
- [43] Turgut, H.  ., Sakarya bölgesinde yetişen deve dikenini (*silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [44] Yaman, M., Peroksidazın üç fazlı ayırma yöntemi ile pazıdan (*beta vulgaris L. var. cicla*) saflaştırılması. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Lisansüstü Eēitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018.

- [45] Uçkaya, F., *Citrus sinensis* (L.) osbeck (portakal) ve *citrus limon* (L.) burm.f. (limon) çiçeklerinden proteaz ve peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması ve endüstride kullanımlarının araştırılması. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2015.
- [46] Thongsook, T., Barrett, D.M., Purification and partial characterization of broccoli (*brassica oleracea* var. *italica*) peroxidases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 3206–3214, 2005.
- [47] Ohya, T., Morimura, Y., Saji, H., Mihara, T., Ikawa, T., Purification and Characterization of Ascorbate Peroxidase in Roots of Japanese Radish, Plant Sci. 125, 137–145, 1997.
- [48] Tüzün, C., Biyokimya, Palme yayıncılık, 81, Ankara, 2005.
- [49] Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum, 89-138, 2011.
- [50] Lehninger, A.L., Principles of Biochemistry, Worth Publisher, Academic Press, 587-665, New York, 1982.
- [51] Bingöl, G., Biyokimya, Güven Matbaası, Ankara, 169-174, 1983.
- [52] Tekman, Ş., Öner, N., Genel Kimya, I. Cilt, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, 335-367, 1986.
- [53] Yıldız, S., Enzimler. 1. Baskı, Fakülte Kitabevi Yayınları, Isparta, 15-90, 2007.
- [54] Holme, D.J., Peck, H., Analytical Biochemistry, Prentice Hall, England, 259-261, 2005.
- [55] Sakharov, I.Y., Vesga, M.K., Galaev, B.I.Y., Sakharova, I.V., Pletjushkina, O.Y., Peroxidase from leaves of royal palm tree Roystonea regia: purification and some properties, Plant Science, 161, 853-860, 2001.
- [56] Özata, A., Kutlu, M., Enzimoloji Ders Notları. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları; No. 1254, Fen Fakültesi Yayınları; No. 15, Eskişehir, 1-107, 2000.
- [57] Cox, M.M., Nelson D.L., Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, 3. basım, Palme Yayıncılık, ISBN: 975-8982-18-4, 2005.
- [58] Halliwell, B., Chirico, S., Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement and Significance, Am. J. Clin. Nutr., 57, 715-725, 1993.

- [59] Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam A., Emmami B., Fooladian F. and Zafariet, K., Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmiuminduced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, 331-336, 2003.
- [60] Akpoyraz, M., Durak, İ., Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine) Vol. 48: 253-262, 1995.
- [61] Lam, C.W., Free radicals, nutritional anti-oxidants and trace elements. www.cpy.cuhk, 2000.
- [62] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1-4, 1984.
- [63] Köksal, E., Karnabahar (*Brassica oleracea L.*) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2007.
- [64] Akkuş. İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- [65] Dündar, Y., Aslan, R., Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar, İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi, 2(2): 134-142, 1999.
- [66] Mavi, A., İnsan Eritrosit ve Lökositlerinden Süperoksit Dismutaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 52-53, 2005.
- [67] Adams, J.B., The inactivation and generation of peroxidase in Relation to the high temperature-short time processing of vegetables. *Journal Food Technology*, 13: 281-297, 1987.
- [68] Whitaker, J.R., Catalase and peroxidase. In *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, 565- 578, 1994.
- [69] Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250(1), 10-17, 1997.
- [70] Chen, E.L., Chen, Y.A., Chen, L.M., Liu, Z.H., Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 439-444, 2002.
- [71] Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42(5), 462-468, 2001.

- [72] Van Huystee, R.B., Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219, 1987.
- [73] Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C., Sola, M., Redox properties of heme peroxidases. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 500, 21-36, 2012.
- [74] Pütter, J., Becker, R., *Methods of Enzymathic Analysis: Peroxide*. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, 286, 1987.
- [75] Fang, L., Jiang, B., Zhang, T., Effect of Combined High Pressure and Thermal Treatment on Kiwifruit Peroxidase, *Food Chemistry*, 109, 802–807, 2008.
- [76] Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., Purification and Characterization of Membrane Bound Peroxidases from Metroxylon Sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376, 2004.
- [77] Robinson, F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G., An Investigation of The Antioxidant Activity of Black Tea Using Enhanced Chemiluminescence, *Free Radical Research*, 26, 291–302, 1987.
- [78] Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., The cDNA Sequence of a Neutral Horseradish Peroxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1080, 245–250, 1991.
- [79] Agostini, E., Medina, M.I., Milrad De Forchetti, S.R., Tigier, H., Properties of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from Turnip (*Brassica Napus L.*) Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598, 1997.
- [80] Wakamatsu, K., Takahama, U., Changes in Peroxidase Activity and in Peroxidase Isozymes in Carrot Callus. *Physiologia Plantarum* 88, 167-171, 1993.
- [81] Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica Napus L. Var Esculenta D.C.*) Peroxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1574–1579, 2000.
- [82] Banci, L., Structural Properties Of Peroxidases. *Journal Ofbiotechnology*, 53, 253–263, 1997.
- [83] Hamed, R.R., Maharem, T.M., Fatah, M.M.A., Ataya, F.S., Purification of Peroxidase Isoenzymes from Turnip Roots, *Phytochemistry*, 48, 1291, 1998.

- [84] Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A., Aosvignyazo, V., Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 17, 293-295, 1984.
- [85] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Şevketibostan>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2021.
- [86] Ülger D., *Cnicus benedictus*'un Besleyici ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- [87] Kemper, K.J., Blessed Thistle (*Cnicus benedictus*), 1999. [http://www.longwoodherbal.org/blessed thistle/ blessed thistle.pdf](http://www.longwoodherbal.org/blessed%20thistle/blessed%20thistle.pdf).
- [88] Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Ed: Davis P.H., Vol.1-9, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1965-1985.
- [89] Abak K., Düzenli A., Use of some wild plants as vegetables in Turkey, *Acta Horticulturae*, 242, 107-114, 1989.
- [90] Berkan T., Şevketi Bostan Bitkisinde Yapılan Farmakolojik Çalışmalar, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji Kürsüsü, Bornova, İzmir, 1977.
- [91] Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C.W., The complete German commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines, Ed., Klein S., Rister R.S., The American Botanical Council, Austin/Texas, Integrative Medicine Communications, Boston, s 216, 1998.
- [92] Başer K.H.C., 60 yıllık bir Türk bitkisel ilacı Lityazol Cemil, TAB Bülteni, 7-8, 13-18, 1993.
- [93] Emre, G., Ezine (Çanakkale) yöresinin geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkileri. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2003.
- [94] <http://www.turkomp.gov.tr/food-sevketi-bostan-695>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2021.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çağla ABAK

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyokimya	2021
Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi / Kimya Bölümü	2017
Lise	Ümraniye Anadolu İmam Hatip Lisesi	2012

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2019-2020	Sakarya Üniversitesi / Kimya Bölümü	Kısmi Zamanlı Asistan
2018	Çekmeköy Etüt Merkezi	Kimya Öğretmeni

YABANCI DİL

İngilizce

ESERLER

1. Octa-substituted Zinc(II), Cu(II), and Co(II) phthalocyanines with 1-(4-hydroxyphenyl)propane-1-one: Synthesis, sensitive protonation behaviors, Ag(I) induced H-type aggregation properties, antibacterial– antioxidant activity, and molecular docking studies