T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PEROKSİDAZIN ÜÇ FAZLI AYIRMA YÖNTEMİ İLE PAZIDAN (*Beta Vulgaris* L. var. cicla) SAFLAŞTIRILMASI

Mehmet YAMAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

İSTANBUL-2018

Bu çalışma 18.12.2018 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Özlem SAÇAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

[Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 20453 numaralı projesi ile desteklenmiştir.]

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında biyokimya bilimini öğrenme sürecimde, tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesi esnasında bilgi ve birikimini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a en içten duygularımla teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca yardım severliği, hoşgörüsü ve paylaşımlarıyla her zaman bana destek olan, yol gösteren, teoride ve pratikte bilgilerimin oluşmasında büyük katkısı olan hocam Sayın Prof. Dr. Özlem SAÇAN'a en içten duygularımla teşekkür ederim. Bu süreçteki destek ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Sevim TUNALI'ya, Dr. Bertan Boran BAYRAK'a, Dr. İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a, Ar. Gör. Onur ERTİK'e ve Ar. Gör. Eda DAĞSUYU'na teşekkür ederim.

Bugünlerde olmamı sağlayan, emeklerini benim için harcayan ve anlayışları ile her zaman ideallerimin peşinden koşmamı destekleyen babam Ali YAMAN'a, annem Necla YAMAN'a, kardeşim Halil Can YAMAN'a ve çok değerli arkadaşlarım Ozan BİLEYCİ'ye ve Nuraydın ÖZKAYA'ya teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca hem bilgi ve hem de insan, olarak ilerlememe katkıda bulunan, yarının güzel çocuklarını yetiştiren saygıdeğer tüm öğretmenlerime şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Aralık 2018 Mehmet YAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **ivv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xiv**
SUMMARY ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2.1 ENZİMLER 3
2.2 ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI 4
2.3 ENZİMLERİN AKTİVİTE BİRİMLERİ 4
2.4 ENZİM AKTİVİTESİNİ BELİRLEME YÖNTEMLERİ 5
2.5 ENZİMLERİN YAPISI 5
2.6 ENZİM KİNETİĞİ 8
2.7 ENZİM İNHİBİSYONU 10
2.7.1 Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon 11
2.7.2 Karışık (Mixed) İnhibisyon 12
2.7.3 Yarışmasız (Non-Kompetitif) İnhibisyon 14
2.7.4 Yarı Yarışmalı (Un-Kompetitif) İnhibisyon 14
2.8 PEROKSİDAZLAR 16
2.9 PAZI (*Beta vulgaris* L. var. cicla) 17
2.10 ENZİMLERİN SAFLAŞTIRILMASI 17
2.10.1 Enzimlerin Saflaştırılmasında Temel Strateji 18
2.10.2 Enzim Saflaştırılmasında Kaynak Seçimi 18
2.10.3 Enzimin Kaynağından İzole Edilmesi 18
2.10.4 Soğuk Santrifüjleme 20
2.10.5 Amonyum Sülfat Çöktürmesi 20

2.10.6 Diyaliz 21
2.10.7 Proteinlerin İzoelektrik Noktaya Göre Çöktürülmesi 22
2.10.8 Kromatografik Yöntemler 22
2.11 ELEKTROFOREZ 24
2.12 ÜÇ FAZLI AYIRMA (TPP) YÖNTEMİ 24
3. MALZEME VE YÖNTEM 28
3.1 MALZEME 28
3.2 YÖNTEM 28
3.2.1 Pazı Ham Ekstresinin (Ham Enzim Çözeltisi) Hazırlanması 28
3.2.2 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi 28
3.2.3 Total Protein Miktarının Belirlenmesi 29
3.2.3.1 Ayıraçlar 29
3.2.3.2 Folin Ayıracının Hazırlanması 29
3.2.3.3 Deneyin Yapılışı 30
3.2.3.4 Sığır Serum Albumini Standart Grafiğinin Çizilmesi 30
3.2.4 TPP Yönteminin Uygulanması 31
3.2.4.1 Peroksidaz Enziminin Farklı Amonyum Sülfat Konsantrasyonları ile Çöktürülmesi 31
3.2.4.2 TPP Yöntemi Fazlarının Ayrılması 31
3.2.4.3 Farklı Tersiyer Bütanol : Tuza Doygun Enzim Çözeltisi Oranlarının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine Etkisinin İncelenmesi 32
3.2.4.4 Farklı Organik Çözücülerin TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine Etkisi 32
3.2.4.5 Farklı Tuzların TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine etkisi 32
3.2.4.6 Sıcaklığın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine Etkisi 33
3.2.4.7 pH'nın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 34
3.2.4.8 Ses Dalgalarının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 34
3.2.5 Saflaştırılan Peroksidazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 34
3.2.6 Saflaştırılan Peroksidazın Aktivitesine pH'nın Etkisinin İncelenmesi 35
3.2.7 Saflaştırılan Peroksidazın Çeşitli Substratlar Kullanılarak Bağıl (%) Aktivitesinin Belirlenmesi 36

3.2.8 Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin Çeşitli Substratlar İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi 36
3.2.9 Çeşitli Anorganik Maddelerin Saflaştırılmış Peroksidazın Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi 37
3.2.10 Çeşitli Organik Maddelerin Saflaştırılmış Peroksidazın Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi 37
3.2.11 Peroksidaz Aktivitesi Üzerinde Gözlenen İnhibisyon Etkisinin % Olarak Belirlenmesi 38
3.2.12 Bazı Peroksidaz İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi 38
3.2.13 Bazı Peroksidaz İnhibitörlerinin İnhibisyon Türünün Belirlenmesi 38

4. BULGULAR 40

4.1 PAZI PEROKSİDAZININ TPP İLE SAFLAŞTIRILMASI VE SAFLAŞTIRMA SONRASI AKTİVİTE GERİ KAZANIMI 40
4.1.1 Farklı Amonyum Sülfat Konsantrasyonlarının TPP ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 40
4.1.2 Farklı Tuzların TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 41
4.1.3 Tuz ile Doyurulmuş Ham Enzim Çözeltisi : Tersiyer Bütanol Oranının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 43
4.1.4 Farklı Organik Çözücülerin TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 44
4.1.5 Sıcaklığın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 45
4.1.6 pH'nın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 46
4.1.7 Farklı Sürelerde Etki Eden Ses Dalgalarının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi 47
4.1.8 Yüksek Hacimde Enzim Çözeltisi ile Uygulanan TPP Yöntemiyle Peroksidaz Saflaştırılması 49
4.2 TPP YÖNTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMIŞ PAZI PEROKSİDAZININ KARAKTERİZASYONU 50
4.2.1 Saflaştırılmış Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi 50
4.2.2 Saflaştırılmış Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi 51
4.2.3Saflaştırılmış Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Farklı Substratlar Kullanılarak Belirlenmesi 52
4.2.4 Saflaştırılmış Peroksidazın Farklı Substratlar için K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi 53
4.2.4.1 Saflaştırılmış Peroksidazın p-Fenilendiamin Dihidroklorür Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerinin Belirlenmesi 53

4.2.4.2 Saflaştırılmış Peroksidazın o-Fenilendiamin Dihidroklorür Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerinin Belirlenmesi 55

4.2.4.3 Saflaştırılmış Peroksidazın Gayakol Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerinin Belirlenmesi 57

4.2.4.4 Saflaştırılmış Peroksidazın Pirogallol Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerinin Belirlenmesi 59

4.2.4.5Saflaştırılmış Peroksidazın L-DOPA Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerinin Belirlenmesi 61

4.3 TPP YÖNTEMİ İLE SAFLAŞTIRILAN PAZI (*BETA VULGARİS*L. VAR. CİCLA) PEROKSİDAZININ İNHİBİSYONU 64

4.3.1 TPP Yöntemi ile Saflaştırılan Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) Peroksidazı Aktivitesi Üzerine Bazı İnorganik Maddelerin Etkisi..... 64

4.3.2 TPP Yöntemi ile Saflaştırılan Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) Peroksidazı Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Maddelerin Etkisi 66

4.4 BAZI PEROKSİDAZ İNHİBİTÖRLERİNİN IC_{50} DEĞERLERİNİN VE İNHİBİSYON TÜRÜNÜN BELİRLENMESİ..... 67

4.4.1 Glutatyonun IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi 67

4.4.2 1,4-Ditiyoeritritolün IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi 69

4.4.3 ß-Merkaptoetanolün IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi 71

4.4.4Askorbik Asitin IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi 73

4.4.5 Sodyum Bisülfit IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi 75

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 78

KAYNAKLAR 84

EKLER 92

ÖZGEÇMİŞ 93

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Enzimlerin sekonder yapıları ve protein örnekleri (Lipkowitz, 2006). 6

Şekil 2.2: Enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları. 7

Şekil 2.3: Basit bir enzimatik reaksiyonun şeması (Fogler, 2016)..... 8

Şekil 2.4: Michaelis – Menten kinetik eşitliği (Fogler, 2016) 8

Şekil 2.5: Lineweaver – Burk kinetik eşitliği (Fogler, 2016) 9

Şekil 2.6: Örnek bir Michaelis – Menten grafiği (Kaya, 2014) 9

Şekil 2.7: Örnek bir Lineweaver – Burk grafiği (Kaya, 2014) 10

Şekil 2.8: Yarışmalı inhibisyonun şeması (Cox ve Nelson, 2005)..... 11

Şekil 2.9: Yarışmalı inhibisyonda Lineweaver – Burk grafiğinin değişimi 12

Şekil 2.10: Karışık inhibisyonun şeması (Cox ve Nelson, 2005) 13

Şekil 2.11: Karışık inhibisyonda Lineweaver – Burk grafiğinin değişimi 13

Şekil 2.12: Yarışmasız inhibisyonda Linweaver – Burk grafiğinin değişimi..... 14

Şekil 2.13: Yarı –yarışmalı inhibisyonun şeması (Cox ve Nelson, 2005)..... 15

Şekil 2.14: Yarı - yarışmalı inhibisyonda Lineweaver – Burk grafiğinin değişimi 15

Şekil 2.15: Homojenizasyonda kullanılan aletler (Ay ve diğ., 2010) 20

Şekil 2.16: Amonyum sülfat çöktürmesinin şematik gösterimi (Ay ve diğ., 2010)..... 21

Şekil 2.17: Örnek bir diyaliz uygulaması (Ay ve diğ., 2010) 21

Şekil 2.18:TPP'nin fazlarının gösterimi (Dennison ve Lovrien, 1997)..... 25

Şekil 2.19: Farklı çözücülerle yapılmış TPP uygulamaları 25

Şekil 3.1: Peroksidaz aktivitesinin hesaplanması için gerekli formül..... 29

Şekil 3.2: Sığır serum albumini (BSA) standart grafiği 30

Şekil 3.3: İnhibisyon ile peroksidaz aktivitesindeki azalma..... 38

Şekil 3.4: İnhibisyon yüzdesinin hesaplanması 38

Şekil 4.1: Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırması üzerine etkisi 41
Şekil 4.2: Farklı tuzların %60 konsantrasyonlarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi. 42
Şekil 4.3: Farklı tersiyer bütanol oranlarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi. 43
Şekil 4.4: Farklı organik çözücülerin TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi 44
Sekil 4.5: Sıcaklığın TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi. 46
Şekil 4.6: pH'nın TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi. 47
Şekil 4.7: Farklı pH ve farklı sürelerde etki eden ses dalgalarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi. 48
Şekil 4.8: Saflaştırılmış peroksidaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi. 50
Şekil 4.9: Saflaştırılmış peroksidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. 51
Şekil 4.10: p-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Michaelis – Menten grafiği. 54
Şekil 4.11: p-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Lineweaver – Burk grafiği. 55
Şekil 4.12: o-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Michaelis – Menten grafiği. 56
Şekil 4.13: o-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Lineweaver – Burk grafiği. 57
Şekil 4.14: Gayakol substratı için Michaelis – Menten grafiği. 58
Şekil 4.15: Gayakol substratı için Lineweaver – Burk grafiği. 59
Şekil 4.16: Pirogallol substratı için Michaelis – Menten grafiği. 60
Şekil 4.17: Pirogallol substratı için Lineweaver – Burk grafiği. 61
Şekil 4.18: L-DOPA substratı için Michaelis – Menten grafiği 62
Şekil 4.19:L-DOPA substratı için Lineweaver – Burk grafiği. 63
Şekil 4.20: Glutatyon konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki. 68
Şekil 4.21: Glutatyon varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim. 68
Şekil 4.22: 1,4-Ditiyoeritritol konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki. 70

Şekil 4.23:1,4-Ditiyoeritritol varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim. 70

Şekil 4.24: ß-Merkaptoetanol konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki. 72

Şekil 4.25:ß-Merkaptoetanol varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim. 72

Şekil 4.26: Askorbik asit konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki. 74

Şekil 4.27: Askorbik asit varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim. 74

Şekil 4.28: Sodyum bisülfit varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim. 76

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Farklı tuzların belirli sıcaklıklardaki çözünürlükleri (Weast ve Astle, 1979)..... 33

Tablo 3.2: Farklı pH değerleri için hazırlanan tampon sistemler. 35

Tablo 4.1: Yüksek hacimde enzim çözeltisi ile uygulanan TPP yöntemiyle peroksidaz saflaştırılması. 49

Tablo 4.2: Farklı substratlar kullanılarak belirlenen peroksidaz aktiviteleri. 52

Tablo 4.3: p-Fenilendiamin Dihidroklorür substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi. 54

Tablo 4.4: o-Fenilendiamin dihidroklorür substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi 56

Tablo 4.5: Gayakol substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi. 58

Tablo 4.6: Pirogallol substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi. 60

Tablo 4.7: L-DOPA substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi. 62

Tablo 4.8: Çeşitli substratların K_m ve V_{max} değerleri. 63

Tablo 4.9: Bazı inorganik bileşiklerin peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. 65

Tablo 4.10: Bazı organik bileşiklerin peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. 66

Tablo 4.11: Bazı bileşiklerin peroksidaz üzerinde gösterdikleri inhibisyon türü ve IC_{50} değerleri 77

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
K_m	: Michaelis Menten sabiti
mU	: Enzim aktivite, ünite/1000
V	: Enzim aktivitesi
[S]	: Substrat konsantrasyonu,
V_{max}	: Maksimum başlangıç hızı

Kısaltmalar	Açıklama
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
E	: Enzim
EC	: Enzim komisyonu
EI	: Enzim-inhibitör kompleksi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
I	: İnhibitör
IU	: İnternasyonel ünite
IUBMB	: Uluslar arası biyokimya ve moleküler biyolji birliği
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
P	: Ürün
PAGE	: Poli akrilamid jel elektroforezi
PVP	: Poli vinil pirolidon
RCF	: Relatif santrifüj kuvveti
RNA	: Ribo nükleik asit
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TPP	: Üç fazlı ayırma

ÖZET

PEROKSİDAZIN ÜÇ FAZLI AYIRMA YÖNTEMİ İLE PAZIDAN (*Beta vulgaris* L. var. cicla) SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet YAMAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Peroksidazlar (E.C: 1.1.11.7) biyoteknoloji ve tıpta geniş bir alanda kullanılan enzimlerdir. Peroksidazlar doğada bitki hücrelerine, hayvan organ ve dokularına yaygın bir şekilde dağılmış hemoproteinlerdir. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) dünyanın birçok bölgesinde besin olarak kullanılan bir sebzedir.

Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi, enzim gibi doğal ürünlerin özütlenmesi, konsantre edilmesi ve saflaştırılması için kullanılan biyo-ayırma tekniğidir. Bu metod üç faz elde etmek için ham enzim çözeltisine tersiyer bütanol ve amonyum sülfat ilave edilmesini içerir. Bu teknik, biyomoleküllerin özütlenmesi ve saflaştırılması için kullanılan yeni bir ayırma prosesidir.

Bu çalışmada, tek adımlı TPP yöntemi ile pazıdan peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu ilk defa yapılmıştır. Enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver – Burk grafiklerinden hesaplanmıştır. Bazı organik ve inorganik maddelerin pazı peroksidazı aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada, 37^oC, %60 (w/v) amonyum sülfata doyurulmuş ham enzim çözeltisi : tersiyer bütanol oranı 1:1 optimum koşulları ile saflaştırma 7.4 kata erişmiştir. Enzim aktivitesi için

optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 40^{o}C ve pH 6.0 olarak belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2.597mM ve 480.800mU olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre, TPP peroksidazın pazıdan saflaştırılması için ilgi çekici bir metoddur. TPP yöntemi, endüstride peroksidazın saflaştrılmasnda basit, tek adımlı, hızlı ve ekonomik olması bakımından önemli bir proses olarak düşünülebilir.

Aralık 2018, [93] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Peroksidaz, Enzim, Üç fazlı ayırma, Saflaştırma, Pazı.]

SUMMARY

PURIFICATON OF PEROXIDASE FROM CHARD (*Beta vulgaris* L. var. cicla) BY THREE PHASE PARTITIONING METHOD

M.Sc. THESIS

Mehmet YAMAN

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Peroxidases (E.C:1.11.1.7) is one of the most widely used enzymes in biotechnology and medicine. Peroxidases are hemoproteins widely distributed in nature, which are found in plant cells, animal organs and tissues. Chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) is a vegetable appreciated in many parts of the world for its nutritional properties. Three phase partitioning (TPP) is a bioseperation technique, which has been used for the extraction, concentration and purification of enzymes as well as natural products. The method consists of simultaneous addition of ammonium sulfate and tertiary butanol to the crude enzyme extract in order to obtain the three phases. The technique is a novel separation process used for the extraction and purification of biomolecules. In this study, the purification and characterization of peroxidase from chard was carried out first time by using a single step TPP method.

The optimum temperature and pH were determined. The Km and Vmax values were calculated from Linewear-Burk graph. In addition, the inhibitory effect of different organic and inorganic substances on chard peroxidase activities were investigated**.**

In this study, at optimum conditions of 37^{o}C and 60 % (w/v) ammonium sulfate along with 1:1 ratio of t-butanol to crude extract, the purification is enhanced 7.4 fold. The optimum temperature and pH for enzyme activity were determined as 40^{o}C and pH 6.0, respectively. The Km and Vmax values were calculated as 2.597mM and 480.800mU respectively.

In ındustry TPP can be considered as an attractive method for purification of peroxidase due to its quick, single step and economic features.

December 2018, 93 pages.

Keywords: Three phase partitioning, Enzyme, Peroxidase, Chard.

1. GİRİŞ

Proteinler hücrelerde ve hücrelerin tüm bölümlerinde en çok bulunan, yirmi amino asidin farklı sayı ve kombinasyonlarından oluşmuş biyolojik makromoleküllerdir. Proteinler tek bir hücrede bile binlerce farklı çeşitte ve büyüklükte bulunabilirler ve biyolojik işlevleri çok fazla çeşitlilik gösterir.

Depo proteinleri, taşıma proteinleri, hormonlar, toksinler ve omurgalıların kanındaki koruyucu proteinlerin yanında hemen hemen bütün hücresel tepkimeler de enzimler adı verilen proteinlerin katalizörlüğünde yürümektedir (Cox ve Nelson, 2005).

Bu yüzden proteinlerin saflaştırılması klinik ve analitik çalışmalarda oldukça önemlidir. Ayrıca birçok proteinin hücre dışında da kendi özel aktivitesini göstermesi dolayısıyla endüstriyel kullanım amaçlı, çok miktarda ve düşük maliyetli protein saflaştırılması da gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Panesar ve diğ., 2010; Tripathi ve diğ., 2014).

Enzimler aktivasyon enerjisini etkin bir şekilde düşürerek biyokimyasal reaksiyonların yüksek hız ve yüksek seçicilikle gerçeklemesini sağlayan katalizörlerdir. Enzimler, ribozim adı verilen katalitik RNA parçaları dışında protein yapısında bulunurlar. Basit enzimler sadece protein yapıdan oluşurken konjuge enzimlerde protein yapı çeşitli organik ve inorganik maddeler ile desteklenmektedir.

Peroksidazlar (E.C 1.11.1.7) doğada oldukça yaygın olarak bulunan bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilebilen bir enzim türüdür. Peroksidaz enzimi şalgam, brokoli, incir, baklagiller, at turpu, karaturp, ıspanak ve patates gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda, hayvanlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Memelilerde ise peroksidaz enzimleri mikrozom ile lizozomlarda, karaciğerde, dalakta, uterusta, tükrük bezlerinde, akciğer duvarlarında ve sütte bulunur.

Çeşitli bilimsel çalışmalarda, klinik tanıda ve çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılan peroksidazlar birçok farklı yöntem ile saflaştırılmıştır ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Peroksidazların saflaştırılması için uygulanan jel filtrasyon kromatografisi (Hu ve diğ. 2012), iyon değişim kromatografisi (Aghelan ve Shariat, 2015) ve afinite kromatografisi

(Guo ve Ruckenstein, 2003) gibi klasik kromatografik saflaştırma yöntemlerinin verimliliği ve tekrarlanabilirliği düşük olmaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin maliyetleri yüksek ve uygulanma süreleri uzundur.

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) *Chenopodiaceae* familyasından otsu bir bitkidir. Ülkemizde bol miktarda yetişmektedir. Pazı ekstresinin peroksidaz aktivitesi bakımından oldukça zengin olduğu bulunmuş ve klasik yöntemlerle pazıdan peroksidaz enzimi başarıyla saflaştırılmıştır (Kahraman, 2003).

Geleneksel protein saflaştırma yöntemlerinin aksine, maliyetten ve zamandan tasarruf sağlayan TPP (üç fazlı ayırma) yöntemi, endüstri ve klinikte yaygın olarak kullanılan peroksidaz enziminin dışında; ß-galaktozidaz (Duman ve Kaya, 2013), α-galaktozidaz (Dhananjay ve Mulimani, 2009), naringinaz (Shanmugaprakash ve diğ., 2015), katalaz (Duman ve Kaya, 2013), pektinaz (Sharma ve Gupta, 2001), invertaz (Özer ve diğ., 2010), fosfolipaz (Gupta ve Sharma, 2001a), lakkaz (Rajeeva ve Lele, 2011) ve ksilinaz (Sharma ve Gupta, 2002) enzimlerinin de saflaştırılmasında kullanılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 ENZİMLER

Biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör görevini üstlenen enzimlerin reaksiyonları yüksek seçicilik ve yüksek verim ile gerçekleşir. Enzimlerin ettiği maddeler substrat olarak isimlendirilir.

Enzimler üç boyutlu yapı gösterirler ve bu yapılarının bozulması sonucu aktivitelerinin kaybına denatürasyon adı verilir. Enzimlerin üç boyutlu yapılarının kararlılığı ve gösterdikleri aktiviteleri bazı parametrelere bağlıdır.

Sıcaklık: Enzimler birçok farklı sıcaklıkta aktivite gösterebilirken bu sıcaklıkların dışında denatüre olurlar. Bir enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerine optimum sıcaklık değeri denir. Bitkisel kaynaklı enzimlerde optimum sıcaklık değeri 40-60°C civarında gözlenirken hayvansal kaynaklı enzimlerde bu değerler 30-50°C olarak gözlenmektedir.

pH: Bir enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerine optimum pH adı verilmektedir. Optimum pH değerinin altında ve üstünde enzim aktivitesi azalmaktadır. Bazı enzimlerde pH değişimlerine duyarlılık çok yüksek iken bazıları geniş bir pH aralığında işlevlerini sürdürebilmektedirler.

Substrat Konsantrasyonu: Bir enzimin miktarı sabit tutularak o enzimin substratının konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızının zamanla arttığı ancak bir süre sonra substrat konsantrasyonu doygunluğa ulaştığında reaksiyon hızının daha fazla artmadığı gözlenir.

Ortamdaki Enzim Miktarı: Yeteri kadar substrat bulunan bir ortam sağlandığında, enzim miktarındaki artış ile reaksiyon hızının doğrusal olarak arttığı gözlemlenmektedir.

Enzim Aktivitesini Etkileyen Diğer Maddelerin Varlığı: Enzimlerin substratlarına olan ilgilerini azaltarak, enzim yapısını bozarak veya enzim ile substratın bağlanmasını engelleyerek reaksiyon hızını düşüren ya da tamamen durduran maddelere inhibitör,

çeşitli etkilerle enzim aktivitesini arttıran kimyasal maddelere de aktivatör adı verilir (Uyanık, 2008).

2.2 ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Her enzimin katalizlediği reaksiyon türü baz alınarak verilmiş, dört rakamlı bir E.C (Enzim Komisyon) numarası bulunmaktadır. E.C rakamları Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBM) adlandırma ve sıralama komitesi tarafından belirlenmiştir. Birinci numara enzimin sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara alt-altsınıfını ve dördüncü numara da o enzimin kendine özgü sıra numarasını vermektedir. Bu düzenlemeye göre enzimler 6 ana sınıfa ayrılmıştır:

Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim sınıfıdır.

Transferazlar: Bir fonksiyonel grubun bir molekülden bir başka moleküle transferini katalizleyen enzim sınıfıdır.

Hidrolazlar: Suyun H^+ ve OH^- iyonları yardımı ile moleküllerin yıkılmasını katalizleyen enzim sınıfıdır.

Liyazlar: C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları yıkan enzim sınıfıdır. Bu yıkım işlemini hidroliz ve oksidasyon reaksiyonları gerçekleşmeden yaparlar.

İzomerazlar: Substratın molekül içi değişikliklerini kataliz eden enzim sınıfıdır.

Ligazlar: İki molekülün birleşmesini kataliz ederler. Bu birleşme için gereken enerji ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır.

2.3 ENZİM AKTİVİTE BİRİMLERİ

Molar (Moleküler) Aktivite: Bir tek enzim molekülü tarafından, o enzime ait optimal koşullarda bir dakikada ürüne çevrilen substrat molekül sayısıyla ölçülen aktivite birimidir.

İnternasyonal Ünite (IU): Enzime ait optimal sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonlarında bir dakikada bir mikromol substratın ürüne çevrilmesini kataliz eden enzim aktivitesidir.

Katal: Bir saniyede bir mol substratın ürüne çevrilmesi olarak tanımlanan enzim aktivitesine katal adı verilmektedir.

Spesifik Aktivite: Bir miligram proteindeki enzim ünitesi sayısına denir. Bu aktivite aynı zamanda enzim saflığının bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Enzimin saflığı arttıkça bir miligram proteindeki enzim miktarı ve spesifik aktivite artar (Telefoncu, 1997).

2.4 ENZİM AKTİVİTESİNİ BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Spektrofotometrik Yöntem: Enzimatik reaksiyona giren maddelerden veya reaksiyon ürünlerinden biri UV / görünür bölgede belirli bir dalga boyunda karakteristik bir absorbsiyon veriyorsa bu reaksiyonun hızı fotometrik olarak incelenebilir. Bu yöntem enzim aktivite tayinlerinde sıklıkla kullanılır (Huang ve diğ., 2016).

Florometrik Yöntem: Floresans olayına dayalı bir ölçüm yöntemidir. Çok düşük konsantrasyonlardaki madde miktarları tayin edilebildiğinden enzim aktivitesi ölçmek için uygun ve duyarlı bir yöntemdir (Amitha ve Trackman, 2002).

Polarimetrik Yöntem: Optikçe aktif maddelerin miktar tayininde kullanılır. Substrat olarak şekerleri kullanan enzimlerin aktiviteleri bu yöntem ile belirlenebilir (Gibbs ve diğ., 2003).

Manometrik Yöntem: Genellikle O_2 harcanan reaksiyonlarda ya da ürünlerden birinin gaz olduğu enzimatik reaksiyonlarda enzim aktivitesi basınç değişimi üzerinden ölçülebilir. Bu yönteme manometrik yöntem adı verilir.

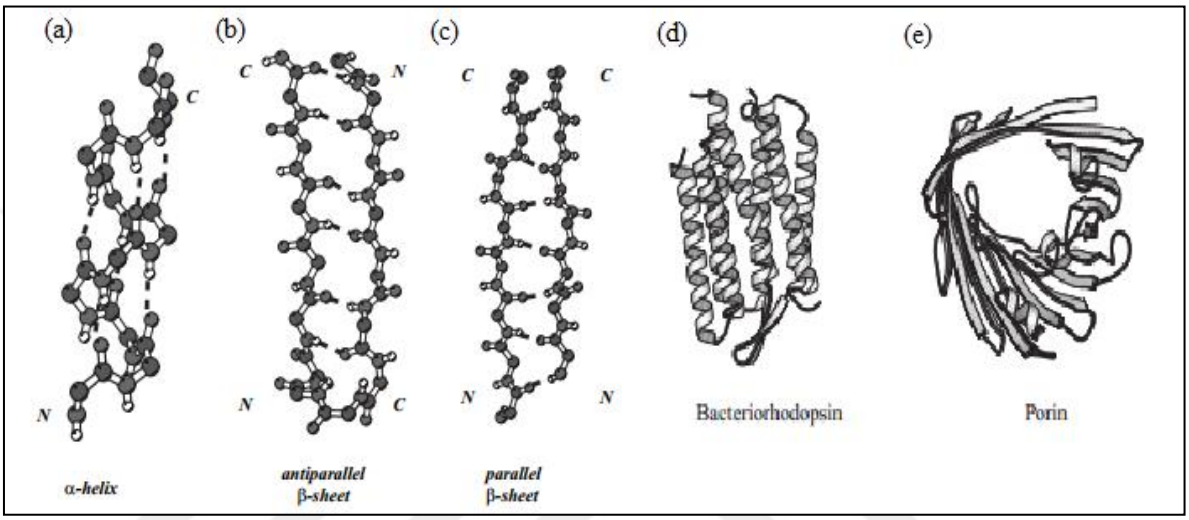
Kalorimetrik Yöntem: Enzimatik reaksiyonlardaki ısı değişiminin enzim aktivitesi ile ilişkilendirildiği aktivite tayin yöntemidir. Kalorimetrik yöntem sadece enzim aktivitesinin belirlenmesi için değil aynı zamanda enzim kinetiğinin de belirlenmesi için uygun bir yöntemdir.

2.5 ENZİMLERİN YAPISI

Enzimlerin birincil yapıları, sıklıkla kalıntı olarak bahsedilen yirmi farklı amino asidin hetero polimer zincirleridir. Bu zincir L- amino asitlerin karboksil ve amino grupları

arasında peptid bağı adı verilen özel bir kovalent bağın kurulmasıyla oluşur. Bu yapı bir enzimin işlevini yerine getirebilmesi için yeterli değildir.

Enzimlerin ikincil yapıları, primer yapılarının çeşitli uzaysal yönelmeleri ve hidrojen bağları ile oluşur. Bu yapılardan paralel ß-tabakaları, antiparalel ß-tabakaları ve α-heliks sarmal çok sık görülmektedir. Bu yapılar ve ilgili örnekleri Şekil 2.1' de gösterilmiştir.

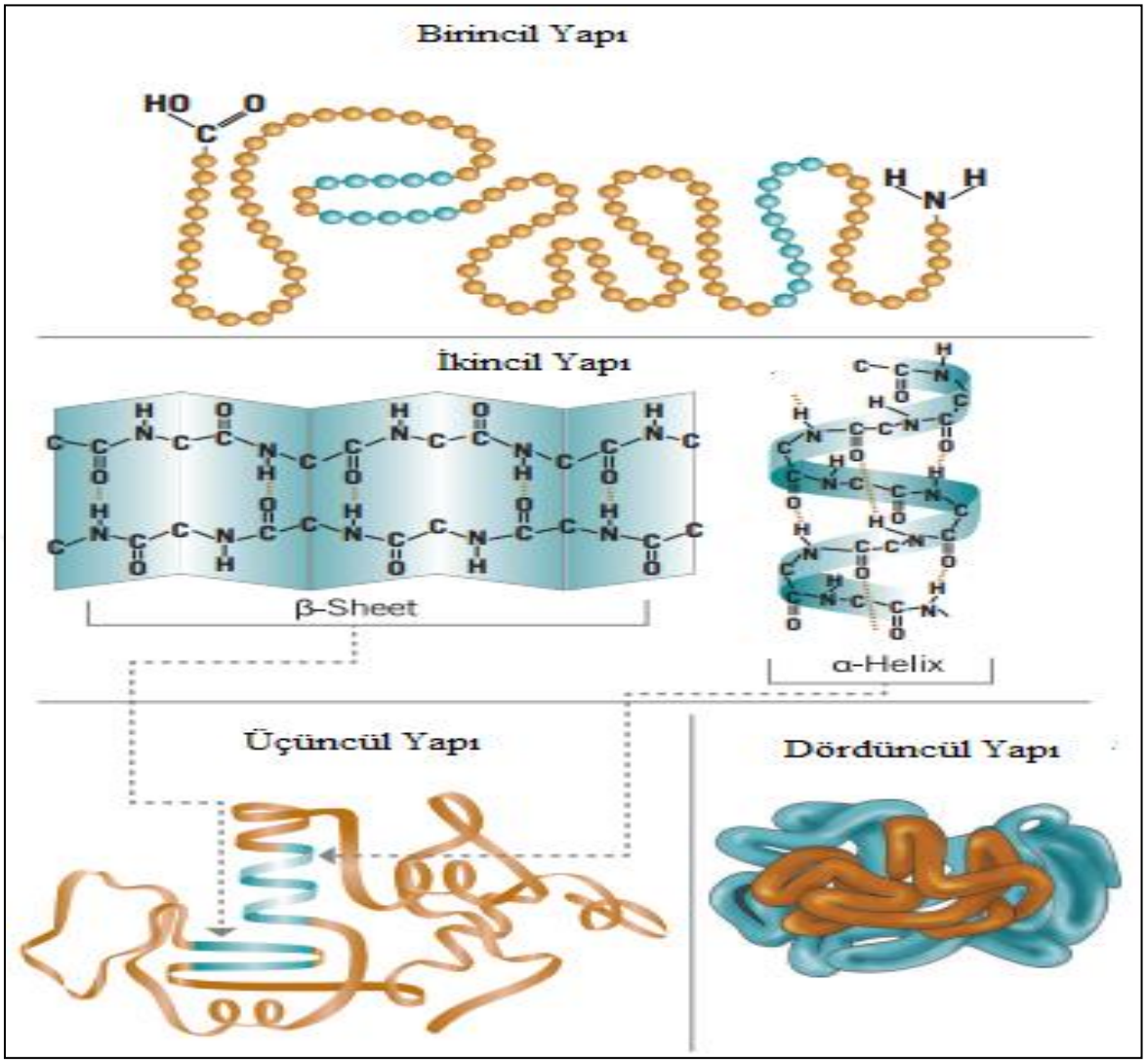


Şekil 2.1: Enzimlerin sekonder yapıları ve protein örnekleri. (a) α-heliks yapısı. (b) Antiparalel ß-tabakaları, (c) Paralel ß-tabakaları. (d) α-heliks yapısındaki bakteri orhodopsini. (e) Yoğun ß-tabakaları içeren porin proteini (Lipkowitz, 2006).

Enzimlerin üçüncül yapıları, yan yana uzayan amino asit diziliminin üç boyutlu katlanması sonucu oluşur. Polipeptid zincirinde birbirinden uzakta bulunan veya farklı tipte ikincil yapılarda bulunan amino asit kalıntıları katlanma sonucu etkileşimde bulunurlar. Birçok enzimin kendine özgü biyolojik işlevini üçüncül yapısı belirlemektedir.

Bazı enzimler alt birim denilen birden fazla polipeptid zinciri içerirler. Bu polipeptid zincirlerinin kendi içlerinde katlanması ve diğer zincirler ile etkileşimleri sonucu enzimlerin dördüncül yapısı oluşur. Dördüncül yapıya sahip olan enzimlerin seçiciliği ve işlevselliği çok yüksektir (Lipkowitz ve diğ., 2006). Şekil 2.2' de enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları gösterilmiştir.

Birçok enzim, yapısının kararlılığı ve biyolojik işlevini yerine getirebilmek için protein yapıda olmayan çeşitli organik maddelere, metal iyonlarına veya organometalik moleküllere ihtiyaç duyar.



Şekil 2.2: Enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları (Particle Sciences, 2009).

Protein yapıda olmayıp enzimlerin yapılarına katılan çeşitli organik moleküllere koenzim denir. Bazı koenzimlerin kökeni vitaminlerdir. B_2 vitamini olarak bilinen riboflavin FAD, B_3 vitamini olarak bilinen niasin NAD ve B_5 vitamini olarak bilinen pantotenik asit de koenzim A'nın yapısında bulunmaktadır. Kofaktörler, enzimlerin yapılarına katılan koenzim, metal iyonları ya da organometalik moleküllerdir. Birçok enzim aktif merkezinde bakır, demir, magnezyum gibi metallerin komplekslerini içermektedir.

Enzimlerin sadece protein yapı içeren kısmına apoenzim adı verilir. Bir apoenzim kofaktörü ile birleştiğinde holoenzim haline dönüşür (Cox ve Nelson, 2005).

2.6 ENZİM KİNETİĞİ

Bazı enzimler tek bir substratı ürüne çevirebildiği gibi hekzokinaz (E.C 2.7.1.1), peroksidaz gibi enzimlerin farklı substratları kullanabildikleri belirlenmiştir. Aynı zamanda glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (E.C 1.1.1.49) ve fosfoglukoz izomeraz (E.C 5.3.1.9) gibi farklı enzimlerin ikisi de glukoz-6-fosfat molekülünü substrat olarak kullanmaktadırlar. Bütün bu çeşitliliğin içinde enzimlerin substratlarına olan ilgileri ve substratlarını ürüne dönüştürme hızları aynı değildir. Enzimatik reaksiyonların hızlarının ve enzimlerin substratlarına ilgilerinin incelendiği bilim dalına enzim kinetiği adı verilir.

Enzim kinetiği yaygın şekilde Michaelis - Menten kinetik eşitliğine bağlı olarak hesaplanır. Çünkü Michaelis - Menten kinetiği, enzim kinetiğinin en basit ve en kolay uygulanabilir modellerinden biridir. Basit bir enzimatik reaksiyonun şeması Şekil 2.3' de gösterilmiştir.

$$E+S \leftrightarrow E.S \rightarrow E+P$$

Şekil 2.3: Basit bir enzimatik reaksiyonun şeması (Fogler, 2016).

Bu şemada E harfi enzimi, S harfi substratı ve P (Product) harfi de ürünü simgelemektedir. Bu enzimatik reaksiyon hızını belirleyen Michaelis – Menten kinetik denklemi Sekil 2.4' deki gibidir. Bu denklemde reaksiyon hızı (V), substrat konsantrasyonu ([S]) olarak ifade edilir.

V_{max} reaksiyondan elde edilebilecek maksimum hızdır. V_{max} değerine enzimi doyurucu substrat konsantrasyonunda erişilir. K_m ise (Michaelis sabiti) maksimum reaksiyon hızının yarısına ulaşıldığında ortamda bulunan substrat konsantrasyonudur. K_m, enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve değerin küçük olması istenir.

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

Şekil 2.4: Michaelis – Menten kinetik eşitliği (Fogler, 2016).

V_{max} ve K_m değerlerinin belirlenmesi için tipik yöntem, farklı substrat konsantrasyonlarında bir seri enzim aktivite tayini deneyleri yapılması ve reaksiyon

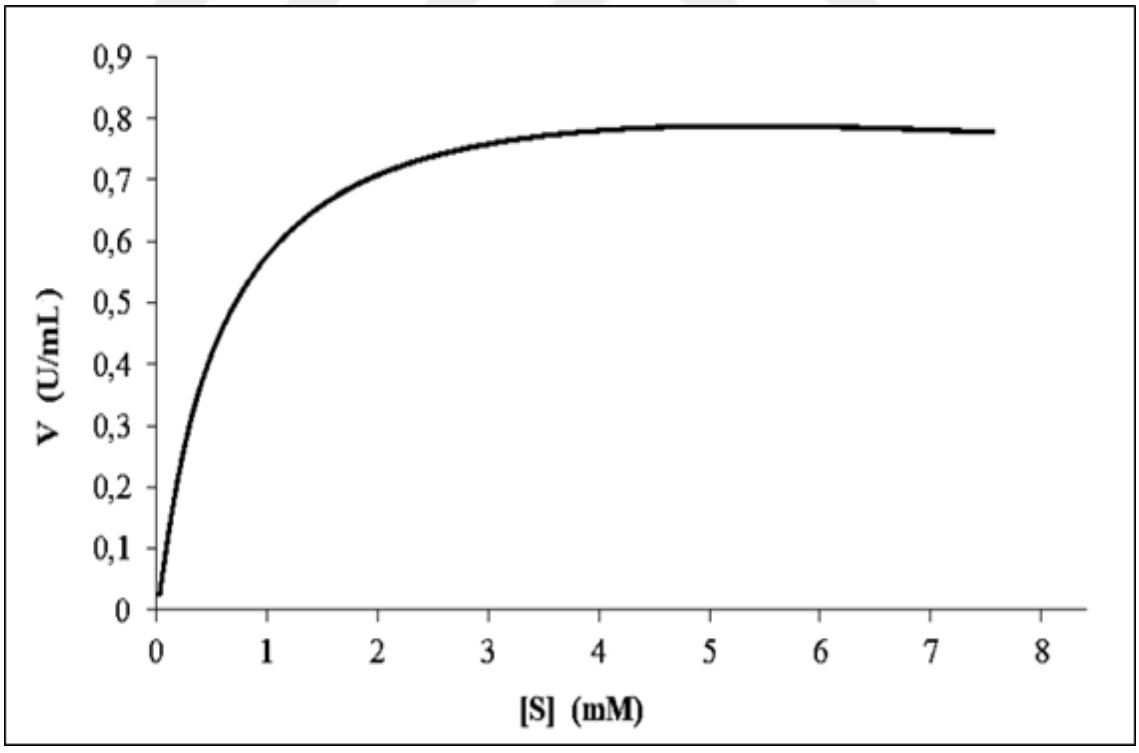
hızının ölçülmesidir. Reaksiyon hızını konsantrasyona göre grafiğe geçirilince ve Michaelis-Menten denklemi ile doğrusal olmayan regresyon yapılarak K_m ve V_{max} değerleri elde edilebilir.

Bununla birlikte K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için daha kesin bir yöntem lineerleştirilmiş Michaelis – Menten denklemini kullanmaktır. Farklı lineerleştirme yöntemleri olsa da en yaygın olarak kullanılan Şekil 2.5' de gösterilen Lineweaver – Burk eşitliğidir.

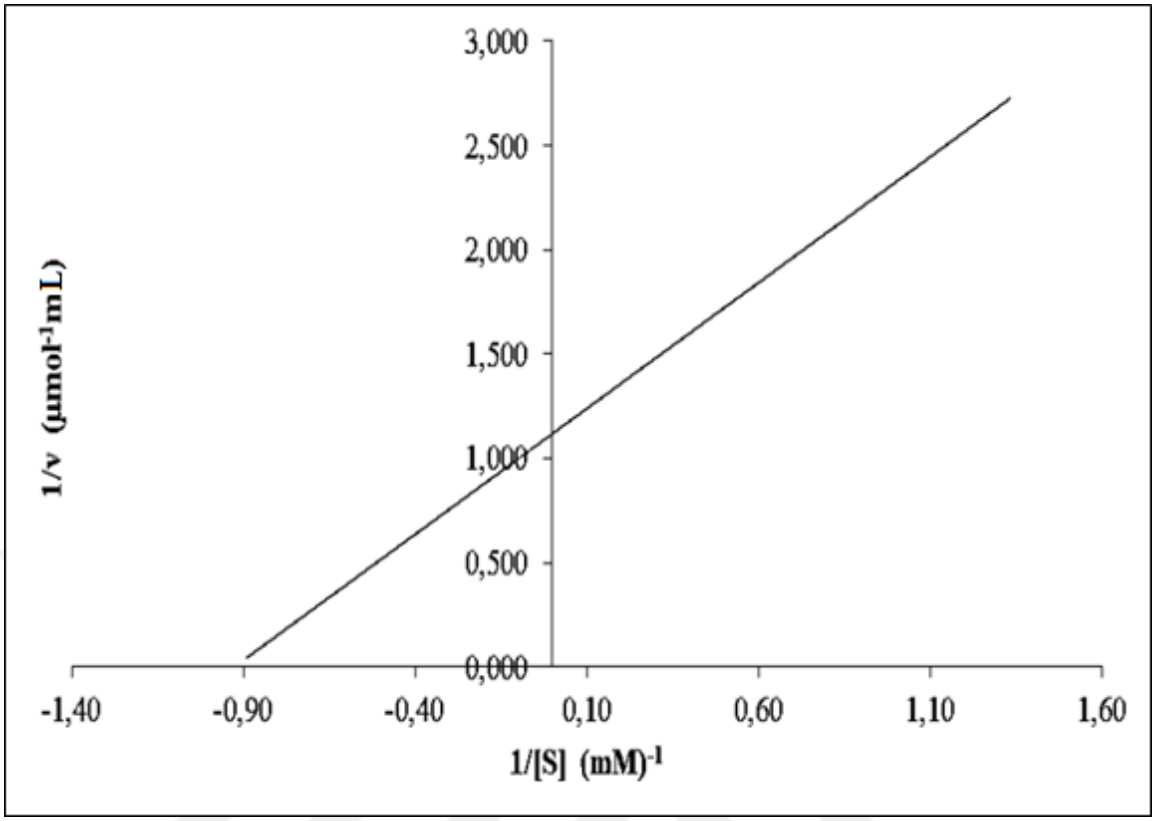
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Şekil 2.5: Lineweaver – Burk kinetik eşitliği (Fogler, 2016).

Michaelis – Menten grafiğinin bir örneği Şekil 2.6' de ve Lineweaver – Burk grafiğinin bir örneği Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Örnek bir Michaelis – Menten grafiği (Kaya, 2014).



Şekil 2.7: Örnek bir Lineweaver – Burk grafiği (Kaya, 2014).

3.

2.7 ENZİM İNHİBİSYONU

Enzimlerin katalitik aktivitelerinin bazı kimyasallar ile azaltılması ya da durdurulmasına enzim inhibisyonu denir. Tersinmez ve tersinir olarak iki ana başlık altında incelenebilir.

Dönüşümsüz enzim inhibisyonu sıcaklık artışı, pH değişimi, ortama sodyum dodesil sülfat (SDS) benzeri detarjanların veya ağır metal iyonlarının eklenmesi gibi çeşitli etkiler ile denatürasyon veya aktif merkeze güçlü bağlanma sonucu oluşur.

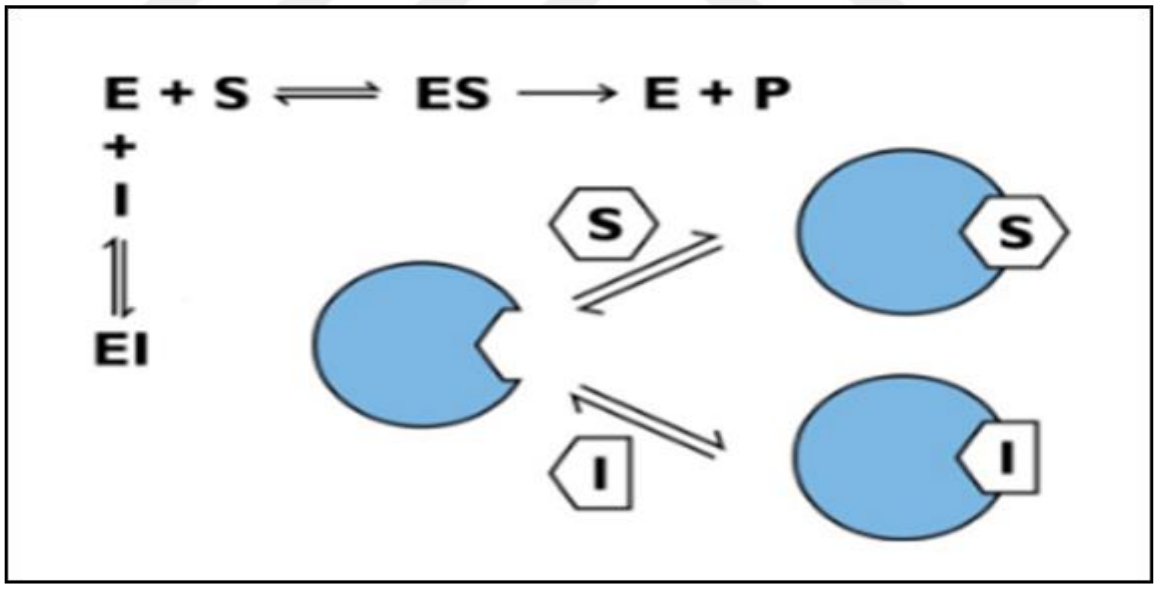
Dönüşümlü enzim inhibisyonu ise daha çok çeşitli organik maddelerin veya bazı metal iyonlarının ortama ilavesi sonucu gözlemlenir. Dönüşümlü inhibisyonun dört türü bulunmaktadır. Bunlar yarışmalı (competitive) inhibisyon, karışık (mixed) inhibisyon, yarı-yarışmalı (un-competitive) ve yarışmasız (non-competitive) inhibisyon olarak belirtilmiştir.

2.7.1 Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon

Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon tipinde inhibitör madde, substratın yapısına benzer bir yapı gösterir ve enzimin aktif bölgesi için substrat ile yarışır. İnhibitör, enzimin aktif bölgesini işgal ettiğinde substratın enzime bağlanması engellenmektedir. Bundan dolayı da enzimin substratına gösterdiği afinite azalır ve afinitenin bir ölçüsü olan K_m değeri artar.

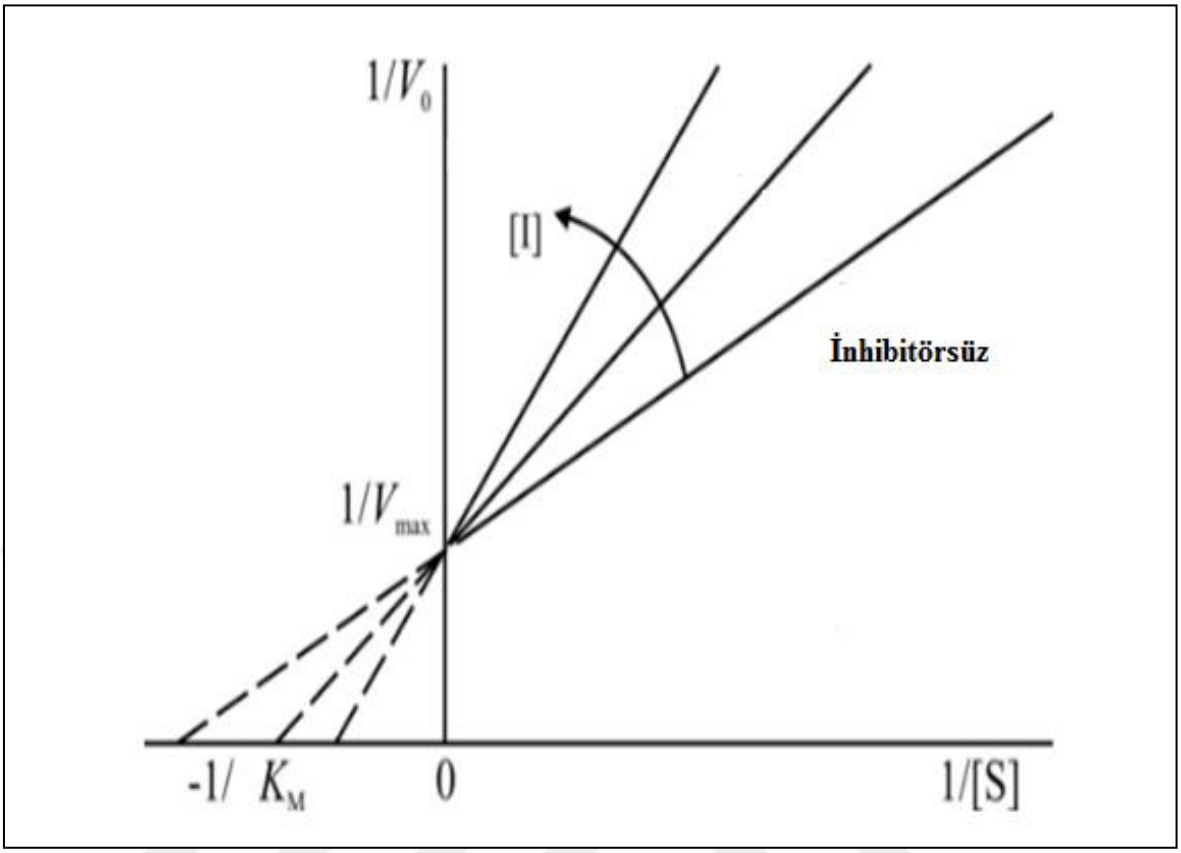
Substrat miktarı arttırıldığında enzimin substratını ürüne çevirirken ulaştığı maksimum başlangıç hızını yakalamak mümkündür. Ortamdaki substrat moleküllerinin miktarının artmasıyla enzimin inhibitöre olan ilgisi azalmakta ve inhibisyon ortadan kalkmaktadır. Dolayısı ile enzimin maksimum başlangıç hızı olarak belirtilen V_{max} değeri bu inhibisyon tipinde sabit kalır.

Şekil 2.8' de yarışmalı inhibisyonun bir şeması ve Şekil 2.9'da yarışmalı inhibisyona ait Lineweaver – Burk grafiğindeki değişimler gösterilmektedir.



Şekil 2.8: Yarışmalı inhibisyonun şeması (Cox ve Nelson, 2005).

Enzim, substrat ve inhibitör ortamı göz önüne alındığında iki farklı yapı ve bu yapılara ulaşmak için gereken iki farklı denge söz konusudur. Bu yapılardan biri ES olarak adlandırılan enzim-substrat kompleksi diğeri de EI olarak adlandırılan enzim-inhibitör kompleksidir. P ise üründür.



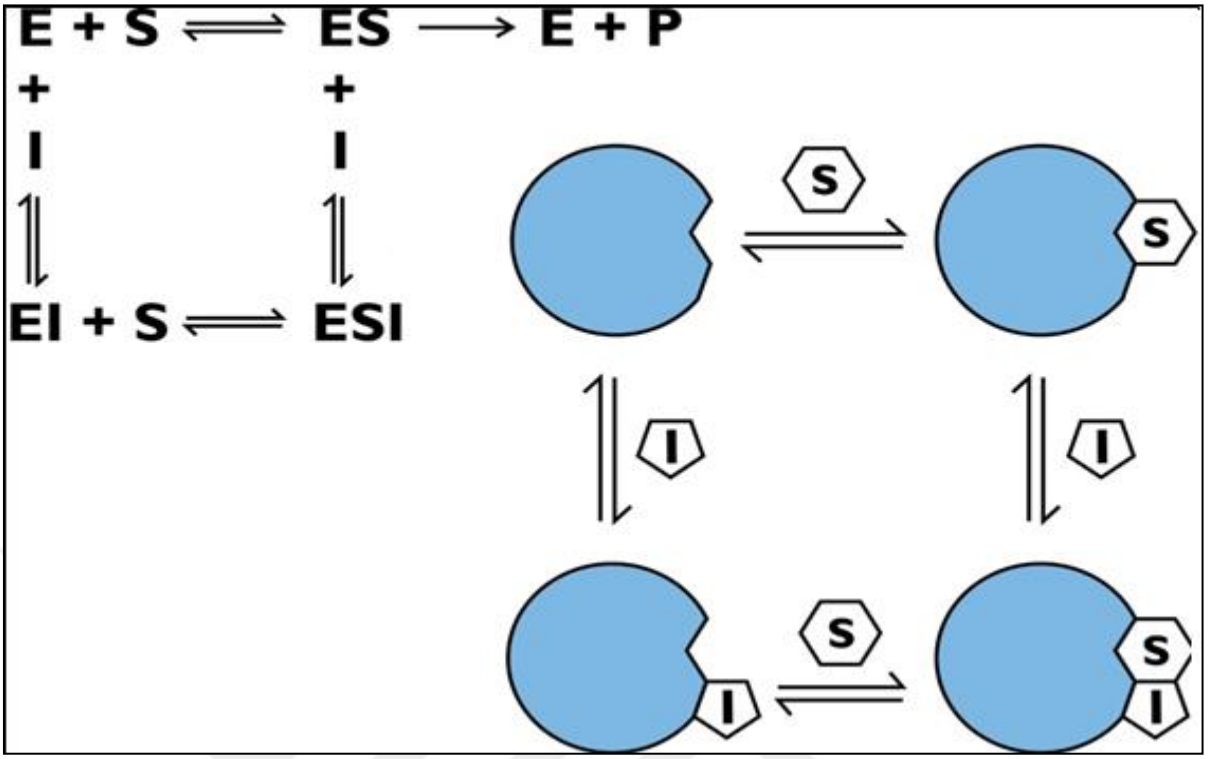
Şekil 2.9: Yarışmalı inhibisyonda Lineweaver – Burk grafiğinin değişimi (Cox ve Nelson, 2005).

2.7.2 Karışık (Mixed) İnhibisyon

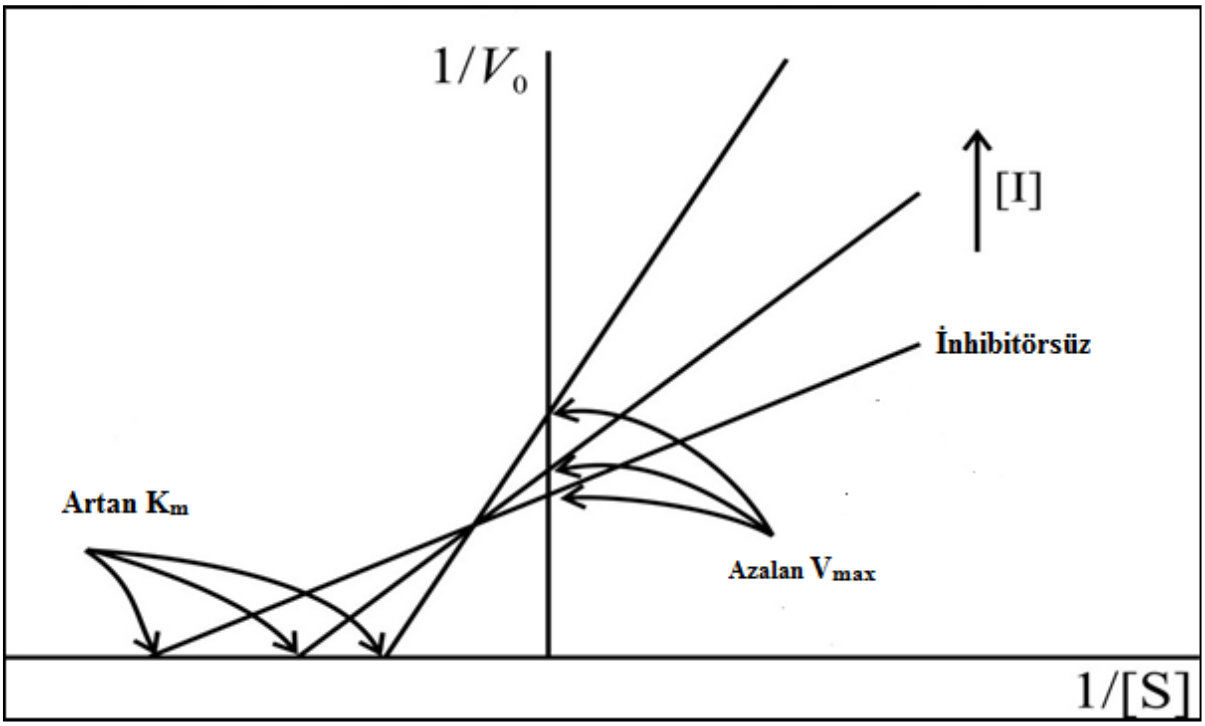
Karışık inhibisyon tipinde inhibitör enzimin aktif bölgesinin dışında bir yere bağlanarak enzim-inhibitör kompleksini (EI); ve/veya enzim-substrat kompleksine (ES) bağlanarak enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksini oluşturmaktadır. Bu yapılardan hangisinin gerçekleşeceği enzimin, substratın ve inhibitörün yapısına bağlıdır.

Bu inhibisyon tipinde V_{max} azalırken K_m artar. Ancak inhibitör ve substrat yapılarına bağlı olarak K_m değerinin azaldığı durumlar da gözlenebilir.

Bu tarz inhibitörler K_m ve V_{max} değerlerinin ikisinin de üzerinde etki gösterebilirler. Şekil 2.10'da karışık inhibisyonun şeması ve Şekil 2.11'de karışık inhibisyona ait Lineweaver – Burk grafiğindeki değişimler gösterilmiştir.



Şekil 2.10: Karışık inhibisyonun şeması (Cox ve Nelson, 2005).

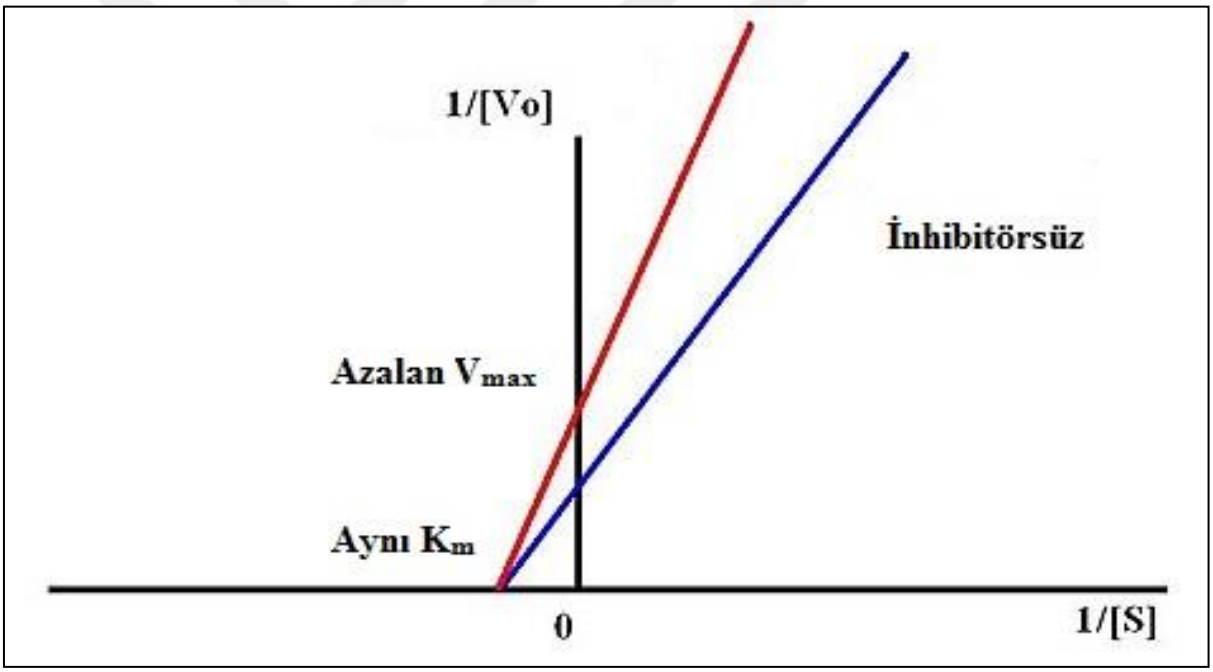


Şekil 2.11: Karışık inhibisyonda Lineweaver – Burk grafiğinin değişimi (Cox ve Nelson, 2005).

2.7.3 Yarışmasız (Non-Kompetitif) İnhibisyon

Karışık inhibisyon tipinin özel bir türü olan yarışmasız inhibisyon tipinde, inhibitör madde enzime aktif bölgenin dışından bağlanır. Substratın aktif bölgeye bağlanması engellenmez ancak enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişmeler sonucu reaksiyon hızında düşme gerçekleşir.

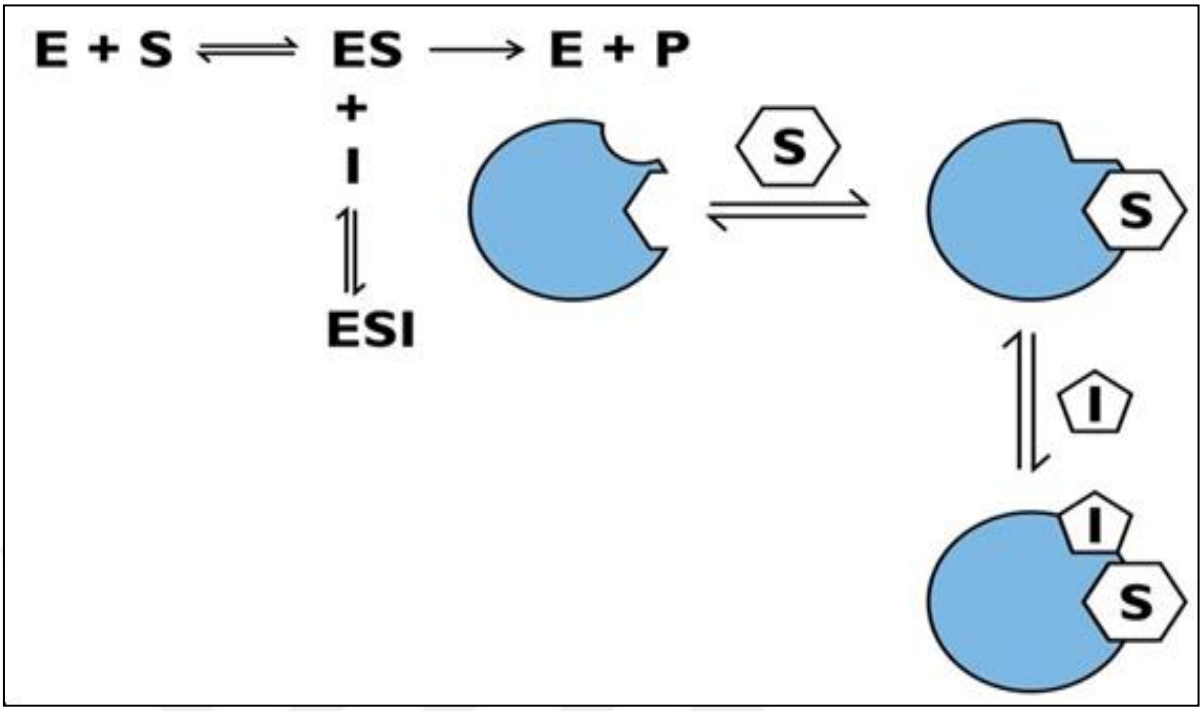
Aktif bölge inhibitör madde tarafından işgal edilmediği için substrat kolaylıkla enzime bağlanabilir. Bundan dolayı K_m değerinde bir değişme olmaz. Enzimin üç boyutlu yapısı inhibitör madde tarafından bozulduğu için reaksiyon hızının bir ölçüsü olan V_{max} azalır. Şekil 2.12' de yarışmasız inhibisyona ait Lineweaver – Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



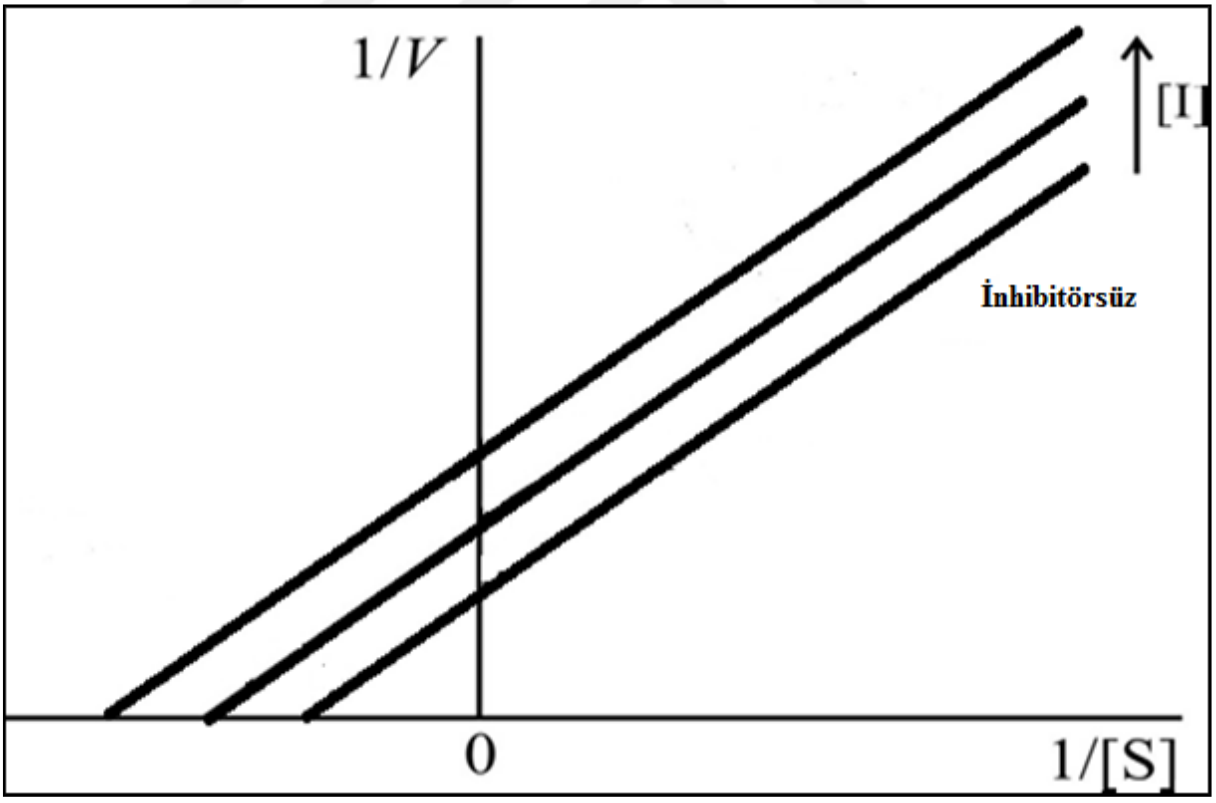
Şekil 2.12 Yarışmasız inhibisyonda Linweaver – Burk grafiğinin değişimi (Cox ve Nelson, 2005).

2.7.4 Yarı – Yarışmalı (Un - Kompetitif) İnhibisyon

Yarı – yarışmalı inhibisyon türünde inhibitör madde serbest enzime bağlanmaz. İnhibitör madde sadece enzim – substrat (ES) kompleksine bağlanarak enzim – substrat – inhibitör (ESI) kompleksini oluşturur. K_m ve V_{max} değerlerinin ikisi birden azalma gösterir. Şekil 2.13'de yarı – yarışmalı inhibisyona ait reaksiyon şeması ve Şekil 2.14'de yarı –yarışmalı inhibisyona ait Lineweaver – Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



Şekil 2.13: Yarı –yarışmalı inhibisyonun şeması (Cox ve Nelson, 2005).



Şekil 2.14: Yarı - yarışmalı inhibisyonda Lineweaver – Burk grafiğinin değişimi (Cox ve Nelson, 2005).

Şekillerde [I] ile gösterilen ifade inhibisyon konsantrasyonunu belirtmektedir.

2.8 PEROKSİDAZLAR

Peroksidazlar (E.C 1.11.1.7, H_2O_2 – oksidoredüktaz) hidrojen peroksit varlığında fenoller, hidrokinonlar, aromatik aminler, flavonoidler, sülfanoidler, indoller, 2-krezol, 2-toluidin, o-dianisidin, gayakol, pirogallol, 1-4-fenilen diamin, 1-2-fenilen diamin gibi çok sayıda organik ve inorganik substratın oksidasyonunu katalizleyen oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir.

Peroksidazlar yapılarında hem grubu içerirler ve reaksiyonlarının sonucunda hidrojen peroksit, su ve serbest radikale dönüşür. Genel olarak peroksidaz reaksiyonları şu şekilde özetlenebilir;

H_2O_2 + Hidrojen Donör $\longrightarrow$ H_2O + Oksitlenmiş Donör

Bitkilerin, hayvanların dokularında ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan peroksidazlar bütün bu organizmalarda birçok görevi yerine getirirler. Bitkilerde büyümenin ve gelişmenin kontrolü ve patojenlere karşı savunma, lignin biyosentezinde, hücre duvarı yapımında görev alırlar. Peroksidazlar, hayvan dokularında hidrojen peroksit oluşumu sonucu oluşabilecek oksidatif hasarın engellenmesinde oldukça önemli enzimlerdir (Kahraman, 2003).

Peroksidazlar birçok endüstriyel işlemde kullanılırlar. Yaban turbunun peroksidazı kağıt ve tekstil endüstrisindeki uygulamalarda kullanılmıştır. Peroksidazlar özellikle fenolik kirleticilerin bozunarak etkisiz hale getirilmesinde geniş kullanım alanı bulmuştur (Kirk ve diğ., 2002). Peroksidazlar organik moleküllerin biyotransfer reaksiyonlarında kullanılmaktadırlar (Sakharov ve diğ., 2001).

Peroksidazlar mikro analizde ve enzim elektrotlarının oluşturulmasında kullanılırlar. İmmunoenzimatik kitlerin %80'den fazlasında işaretleyici enzim olarak peroksidaz bulunmaktadır. Peroksidazlar sentetik boyaların renk giderilmesinde, organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunun kataliz edilmesinde, gıda prosesi süresince şekillenen reaktif oksijen türleri için indikatör ve fenollü reçine sentezleri için ise katalizör olarak kullanılmaktadır (Kahraman, 2003).

Isıl dayanıklılıklarının yüksek olması ve çok çeşitli substratları kullanabilmeleri bu enzimlerin endüstrideki kullanım alanlarını her geçen gün daha da arttırmaktadır

Peroksidazlar çeşitli bitkisel kaynaklardan saflaştırılmışlardır. Hurma yaprakları (*Phoenix dactylifera* L.) (Al-Senaidy ve Ismael, 2011), avokado (*Persea americana* Mill, cv. Hass.) (Rojas-Reyes ve diğ., 2014), Türk karaturbu (*Raphanus sativus* L.) (Şişecioğlu ve diğ., 2010), karnabahar (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) (Köksal ve Gülçin, 2008), domates (*Lycopersicon esculentum* var. Tropic) (Kokkinakis ve Brooks, 1979), jak meyvesi (*Artocarpus heterophyllus*) (Tao ve diğ., 2018), kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) (Somtürk ve diğ., 2014), kırmızı biber (*Capsicum annuum* L.) (Martinez ve diğ., 2008), papaya (*Carica papaya*) (Pandey ve diğ., 2012), çekirdeksiz kırmızı üzüm (*Vitis Vinifera*) (Fortea ve diğ., 2009) ve portakal kabukları (*Citrus sinenses*) (Vetal ve Rathod, 2016) bu kaynaklardan bazılarıdır.

Peroksidazlar çeşitli mantarlar ve bakterilerden de başarı ile saflaştırılmışlardır. *Streptomyces cyaneus* (Mliki ve Zimmermann, 1992) ve *Geotrichum candidum* (Kim ve Shoda, 1999) sırası ile peroksidaz için bakteri ve mantar kaynaklarıdır.

2.9 PAZI *(Beta vulgaris* L.var. cicla)

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) *Chenopodiaceae* familyasından otsu bir bitkidir. Kırlarda kendiliğinden yetişebildiği gibi sebze bahçelerinde de yetiştirilebilir. Mart ayından temmuz ayına kadar ekilebilir ve kışa kadar hasat edilebilir. İyi bakımı sağlanan bitkilerden yılda beş defa yaprak alabilmek mümkündür.

Pazının geniş yaprakları bulunur ve kökleri dallıdır. Serin topraklarda bolca yetişebilmektedir. Yapraklarının palmitik asit, stearik asit, oleik asit, şiringik asit, linoleik asit, glikolipitler, folik asit, ß-karoten, askorbik asit, E vitamini, pektin, polisakkaritler ve saponin içerdiği rapor edilmiştir. Ayrıca pazı yapraklarının anti-diyabetik özellik gösterdiği de bulunmuştur (Bolkent ve diğ., 2000).

2.10 ENZİMLERİN SAFLAŞTIRILMASI

İlgi duyulan bir enzimin yapısı, işlevi ve diğer maddelerle olan etkileşiminin tam olarak incelenebilmesi için o enzimin saflaştırılması gerekir. Protein yapıdaki her enzim, yapısındaki amino asitlerin sayısı ve türü bakımından farklılık gösterir. Bu çeşitlilik her bir enzimin izoelektrik nokta, boyut, molekül ağırlığı ve kimyasal maddelere farklı afiniteler göstermek gibi fiziksel ve kimyasal farklılıklar göstermelerine neden olur.

Enzimin saflaştırılmasında bu farklılıklar, hücrelerde bulunan binlerce çeşit protein içeriğinden sadece bir tür enzimin saflaştırılması için kullanılmaktadır.

2.10.1 Enzimlerin Saflaştırılmasında Temel Strateji

Enzim saflaştırmanın temel stratejisi en düşük maliyet ile en yüksek saflık derecesine ve aktivite geri kazanımına ulaşmaktır. Analitik ve klinik amaçlı çalışmalarda az miktarda; ancak mümkün olan en yüksek saflıkta enzim istenmektedir. Endüstriyel amaçlı saflaştırmalarda ise ekonomik, yüksek aktivite geri kazanımı ve enzim miktarı hedeflenirken saflık derecesinin çok yüksek olması hedeflenmez.

2.10.2 Enzim Saflaştırılmasında Kaynak Seçimi

Saflaştırılacak enzimin belirlenmesinden sonraki adım kaynak seçimidir. Kullanılacak kaynağın bulunabilir, ucuz ve enzim aktivitesi bakımından doyurucu olması kaynak seçiminde en önemli parametrelerdir.

Belirli bir enzim, bir bitkinin ya da bir hayvanın bütün dokularında eşit oranda bulunmaz. Bu yüzden kaynak bitki ya da hayvan olarak belirlendiğinde doku seçimi de önem kazanmaktadır. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokuların kullanılması saflaştırma işlemini daha verimli kılmakla birlikte kullanılan kaynak hacminin ve maliyetinin de az olmasını sağlar.

2.10.3 Enzimin Kaynağından İzole Edilmesi

Kaynak ve enzimin türüne göre çok farklı yöntemler seçilebilir. Hücrenin dışında bulunan enzimlerin izole edilmesi için hücreye bağlı olduğu kısımdan bazı ajanlar ile enzim ayrılması dışında genellikle başka bir işlem uygulanmaz. Hücre içindeki enzimler için ise hücre zarının ve hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Bu parçalanmanın sağlanması için fiziksel ya da kimyasal işlemler uygulanabilir.

Kimyasal İşlemler: Uygun tampon çözelti içerisine alınmış olan hücreler organik çözeltilerle, deterjanlarla veya enzimlerle muamele edilerek hücre duvarının yıkımı sağlanabilir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) hem hücre membranlarını çözmek hem de membran enzimlerinin çözelti içerisinde izole edilmesi işlemleri için kullanılabilir. Ancak,

saflaştırılacak enzimin saflaştırma sırasında üç boyutlu yapısının muhafaza edilmesi isteniyorsa SDS yerine daha hafif deterjan olan Triton X-100 kullanılabilir.

Fiziksel İşlemler: Bazı durumlarda bir doku veya hücrenin fiziksel yöntemlerle parçalanarak istenilen enzimin tampon çözelti içerisine geçmesi sağlanır. Bu işlem farklı yollarla yapılabilir.

Tekrarlı dondurma ve eritme işlemleri sonucu hücre membranı deforme edilerek parçalanması sağlanabilir.

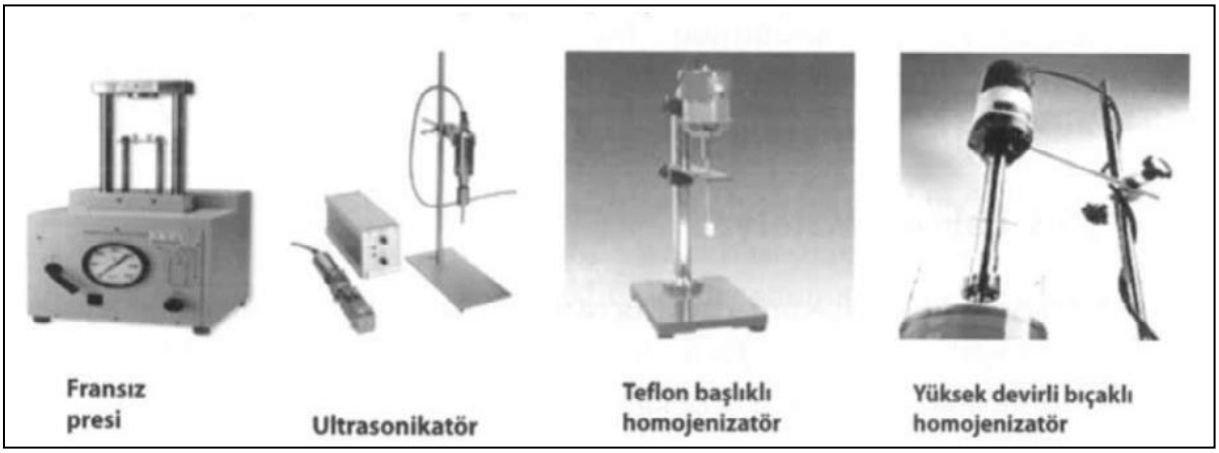
Osmotik basıncın ani değiştirilmesi ile hücre membranı parçalanabilir. Bu metoda osmotik şok adı verilir ve özellikle bakteri periplazmasına yerleşmiş proteinlerin izole edilmesinde kullanışlıdır.

Şiddetli ultrasonik dalgalar hücre duvarı ve zarının parçalanmasına sebep olmaktadır. Sonikasyon adı verilen bu yöntemde ses dalgaları proteinlerin direkt denatürasyonuna sebep olabilir ya da yöntemin uygulanması sırasında ortamın aşırı ısınması sonucu enzimler yüksek sıcaklıklarda dolaylı olarak denatürasyona uğrayabilirler. Bu yüzden bu işlem +4°C'de uygulanmalıdır (Şekil 2.15).

Cam homojenizatörler ile yapılan parçalamada hücreler veya doku parçacıkları pistonun düzenli dönüşü ya da vuruşu ile sağlanan mekanik güç ile parçalanır. Hücreler cam çeper ile piston arasında sıkıştırılır, hücre zarı parçalanır ve hücrenin içeriği tampon çözeltiye geçer. Elde edilen süspansiyon bütünlüğü bozulmamış birçok organeli içerir. Cam homojenizatörler ile yapılan parçalamada ortaya çıkan ısı ortamın sıcaklığını oldukça arttırabileceğinden bu işlem buz banyosu içerisinde uygulanmalıdır (Şekil 2.15).

Çelik bir kaba yerleştirilen hücre süspansiyonu üzerine uygulanan yüksek basınç ile hücrelerin küçük bir delikten parçalanarak geçirilmesi işlemine de Fransız presi denmektedir (Şekil 2.15).

Cam bilyeler kullanarak yapılan homojenizasyonda, küçük cam bilyelerin bulunduğu bilye değirmeninde hücre süspansiyonu yüksek hızda çalkalanır. Bu yöntemde hücre konsantrasyonu oldukça önemlidir ve hücre türüne göre değişmektedir. İpliksi mikroorganizmaların parçalanması için kullanışlı bir yöntemdir (Angal ve Harris, 1990).



Şekil 2.15: Homojenizasyonda kullanılan aletler (Ay ve diğ., 2010).

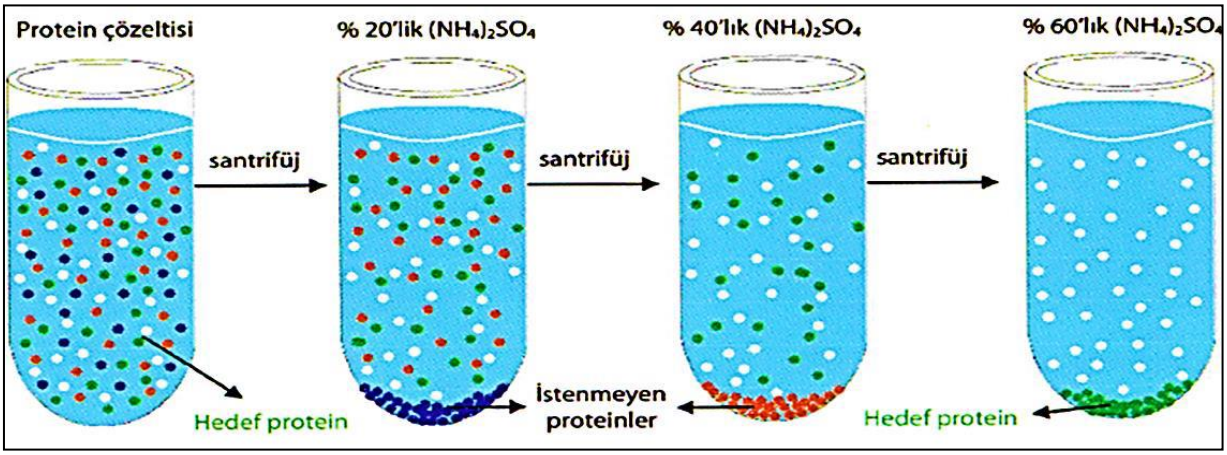
2.10.4 Soğuk Santrifüjleme

Enzim saflaştırma sürecinde değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. Santrifüj işlemi merkez-kaç kuvveti kullanılarak bir sıvı içinde süspansiyon halinde bulunan farklı kütlede veya yoğunlukta bulunan taneciklerin birbirinden ayrılması için kullanılır. Genellikle sıcaklığın 0-4°C arasında tutulduğu özel soğutmalı cihazlarda yapılan soğuk santrifüjleme işlemi homojenizasyon sırasında ve tuz ile protein çöktürme işleminin sonunda sıklıkla kullanılır.

Santrifüjleme işleminin sonunda tüpün alt kısmında kalan sıkışık çökelti topağına pelet, üstte kalan sıvı faza ise süpernatan adı verilir.

2.10.5 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

İçerisinde protein bulunan bir çözeltiye giderek artan miktarlarda amonyum sülfat ilavesi yapıldıkça farklı proteinlerin çökmesi sağlanır. Amonyum sülfat kullanılmasının başlıca sebepleri enzim aktivitesinin yüksek oranda geri kazanımına olanak vermesi ve suda oldukça iyi çözünürlük göstermesidir. Şekil 2.16' da örnek bir amonyum sülfat çöktürmesi gösterilmiştir.

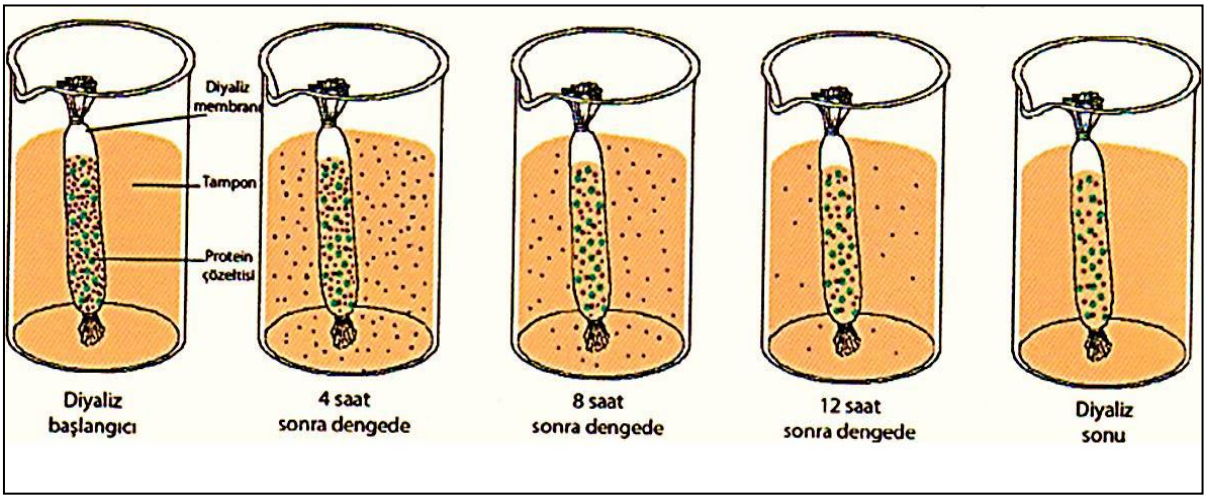


Şekil 2.16: Amonyum sülfat çöktürmesinin şematik gösterimi (Ay ve diğ., 2010).

Genellikle amonyum sülfat çöktürmesinden sonra santrifüj işlemi uygulanır ve sonrasında pelette ve süpernatanda aktivite tayini yapılır. Bu işlem farklı amonyum sülfat konsantrasyonları için tekrarlanır ve istenilen enzimi en iyi çöktüren amonyum sülfat konsantrasyonu belirlenir.

2.10.6 Diyaliz

Diyaliz işlemi, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra uygulanır. Enzim ile bir arada bulunan tuzun ve istenmeyen küçük moleküllerin uzaklaştırılması için diyaliz işlemi yapılabilir. Diyalizde selüloz, asetat ve polietilen gibi yarı geçirgen bir membran kullanılır ve genellikle bir gece düşük konsantrasyonlu tampon çözelti içerisinde bekletilerek bu işlem gerçekleştirilir. Şekil 2.17'de örnek bir diyaliz uygulaması gösterilmiştir.



Şekil 2.17: Örnek bir diyaliz uygulaması (Ay ve diğ., 2010).

2.10.7 Proteinlerin İzoelektrik Noktaya Göre Çöktürülmesi

Proteinlerin net yüklerinin 0 olduğu bir pH noktası bulunmaktadır ve bu noktaya izoelektrik nokta (pI) denir. Proteinler pI değerinin altında net pozitif yüklü iken pI değerinin üzerinde net negatif yüke sahiptirler. Bir proteinin net yükünün 0 olması o proteinin yapısında tamamen yüksüz yapıların olduğu anlamına gelmez.

Farklı pH değerleri proteinlerin çözünürlüğünü de etkilemektedir. İzoelektrik noktaları civarında proteinlerin çözünürlüğü genelde kayda değer biçimde düşmektedir. Bu yöntemde genellikle hedef protein yapılı enzimler direk çöktürülmez. Bunun yerine genellikle pI değerinin altındaki bir pH ayarlanarak istenmeyen proteinlerin ayrılması ve santrifüjleme ile uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Bunun sebebi pI değeri sağlandığında proteinlerin denatürasyona uğrayabilmeleridir.

2.10.8 Kromatografik Yöntemler

Proteinlerin saflaştırıldığı yöntemler arasında en yüksek saflık oranını veren yöntemler kromatografik yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerde saflaştırma sonrası enzim aktivitesinde geri kazanım oldukça düşük olabilmektedir. Bu yöntemlerde proteinlerin büyüklük, moleküler ağırlık, elektriksel yük ve afinitelerinin farklılıklarından yararlanılır.

Jel Filtrasyon Kromatografisi: Bu kromatografi türü aynı zamanda boyut dışlama ya da moleküler eleme kromatografisi olarak da bilinmektedir. Proteinlerin ve diğer biyolojik moleküllerin boyut farklılığına dayalı ayırma yöntemidir.

Kolon matriksi dekstran veya agaroz gibi doğal polimerlerden oluşabildiği gibi poliakrilamid gibi sentetik polimerlerden de oluşabilir. Çapraz bağlanma miktarına bağlı olarak farklı gözenek boyutlarına sahip jeller oluşturulur. Bu kromatografide kullanılan ticari ilk matriks Sephadex olarak bilinen epiklorhidrin ile çapraz bağlanan dekstran moleküllerinden oluşan dolgu materyalidir.

Jel filtrasyon kromatografisinde başarılı bir ayrım yapabilmek kolon dolgu materyaline, gözenek yarıçapına ve kolon uzunluğuna bağlıdır. Örnek hacmi, örnek hacminin kolon hacmine oranı, partikül boyutu, akış hızı ve tampon çözeltinin viskozitesi de ayrılmayı etkileyen faktörlerden örnek ile ilgili olanlardır.

Günümüzde jellerin geliştirilmesi ile daha hızlı ve daha çeşitli molekül ağırlığına sahip proteinlerin ayrılması mümkün kılınmıştır (Konak ve diğ., 2014).

İyon Değiştirme Kromatografisi: Bütün proteinler yapılarındaki aminoasitlerin yan zincirlerinden dolayı yüzeylerinde onların çözücü ile etkileşimini belirleyen yüklü gruplara sahiptir. Dolayısı ile belirli bir pH değerinde proteinler farklı net yüklere sahiptirler. Proteinlerin iyon değiştirme kromatografisi ile ayrılmasının temelinde de bu farklı yüklere sahip olmaları vardır.

Ayırma işlemi yüklü moleküller ve bu moleküllere zıt yüke sahip immobilize iyon değiştirici gruplar arasındaki adsorbsiyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Kolon materyali ile zıt yüklü olan proteinler kolona adsorblanırken, kolon materyali ile aynı yüklü proteinler kolonu çabuk terk eder. DEAE (Dietilaminoetil) anyon değiştirici olarak, CM (karboksimetil) katyon değiştirici olarak en çok kullanılan kolon dolgu maddeleridir.

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi: Proteinlerin hidrofobik yapıdaki yan zincirleri proteinlerin üçüncül ve dördüncül yapılarının kararlılığını arttırmanın yanında biyolojik fonksiyonlarını göstermelerinde de etkili olmaktadır.

Hidrofobik özellik büyük bir protein molekülünün tüm yüzeyinde eşit olmamaktadır. En fazla hidrofobik özellik gösteren protein kolonda daha uzun süre tutulmaktadır. Bu yöntem genellikle iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile birlikte üç boyutlu yapının kolay bozulabildiği protein örneklerinde kullanılmaktadır.

Afinite Kromatografisi: Bu kromatografi türü moleküler tanımaya dayalı, protein moleküllerinin fiziksel ya da kimyasal özelliklerine değil biyolojik fonksiyonlarına göre ayrılmalarını sağlayan bir türdür. Hedef proteinin çözünmeyen bir kolon dolgu maddesi üzerine immobilize edilen ve hedef moleküle bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesine dayanır.

Afinite kromatografisi yüksek seçicilik özelliğine sahip, hızlı ve kullanımı kolay bir yöntemdir. Tek bir adımda bir proteinin yüksek oranda saflaştırılmasını sağlar. Ancak kullanılan materyaller pahalı olduğu için büyük ölçekli saflaştırma işlemleri için uygun değildir. Biyoafinite, immunoafinite, DNA afinitesi, lektin afinitesi, boronat afinitesi, biyomimik afinitesi gibi alt dallara ayrılmaktadır (Konak ve diğ., 2014).

2.11 ELEKTROFOREZ

Elektroforez hem analitik amaçla hem de biyokimyasal ayırma amacıyla kullanılabilen bir laboratuvar tekniğidir. Proteinlerin saflaştırılması sürecinde değişik aşamalarda proteinlerin görüntülenmesi, saflaştırma sonucunda proteinlerin saflığının değerlendirilmesi, yaklaşık molekül ağırlığının tayin edilmesinde ve izoelektrik noktalarının belirlenmesi için kullanılır. Çeşitli elektroforez türleri vardır. Bunların başlıcaları poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), agaroz jel elektroforezi, değişken alanlı jel elektroforezi, izoelektrik odaklanma, iki boyutlu elektroforez, kılcal elektroforez ve immunoelektroforezdir.

PAGE işleminde elektroforetik mobiliteye göre proteinlerin ve nükleik asitlerin ayrıştırılması gerçekleştirilebilir. Elektroforetik mobilite moleküllerin yükleri, uzunlukları ve konformasyonlarına göre değişiklik gösteren bir özelliktir. Bu sebeple elektroforez sonucunda her protein kendine özgü bir bant göstermektedir (Cox ve Nelson, 2005).

Proteinler denatüre edilerek veya denatüre edilmeden elektroforez işlemine tabi tutulabilirler. Native-PAGE işleminde proteinler denatüre edilmeden elektroforez uygulamasına tabi tutularak toplam molekül ağırlıkları belirlenebilir. Eğer protein yapı birden fazla alt birim içeriyorsa bu işlem sonucunda alt birim sayısı ve her bir alt birimin ağırlığını belirlemek mümkün değildir.

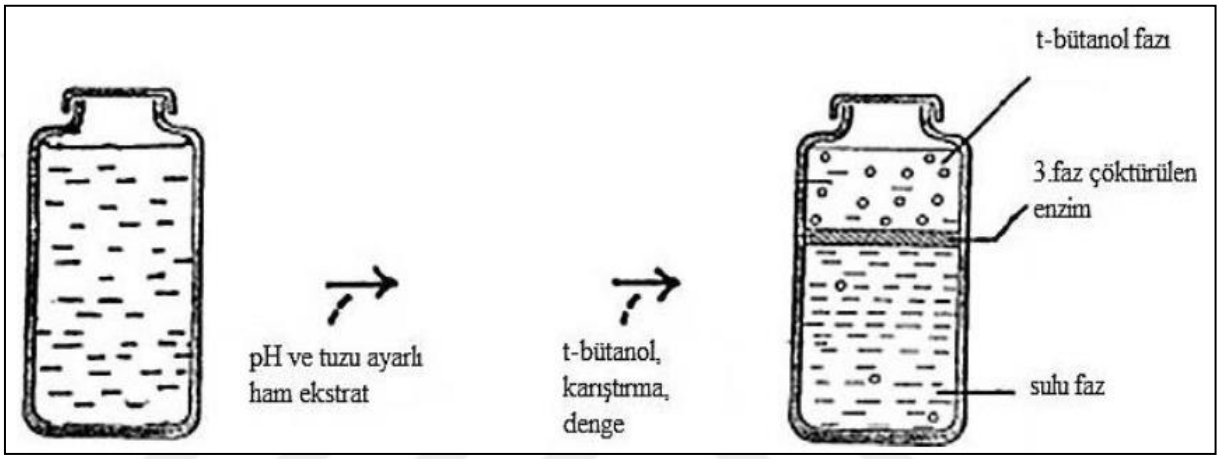
Çok yaygın bir yöntem olan SDS- poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) proteinler SDS deterjanı ile denatüre edilir ve üç boyutlu yapılarını kaybederler. Negatif yüklü deterjan molekülleri ile kaplanan protein moleküllerinin yük/kütle oranları benzer olur ve elektriksel alan içerisinde farklı hızlarda hareket ederek tamamen molekül ağırlığına göre ayrılırlar. Bir jel içerisinde ayrılan proteinlerin yerleri Commassie-Brilliant Blue boyası ve gümüş boyası ile boyama yöntemleriyle tespit edilir. SDS-PAGE yönteminde bir proteinin kaç alt birim içerdiği ve bu alt birimlerin ağırlıklarının ne kadar olduğu kolaylıkla belirlenebilir (Bollag ve diğ., 1996).

2.12 ÜÇ FAZLI AYIRMA (TPP) YÖNTEMİ

TPP yöntemi proteinleri saflaştırmak için uygulanan en hızlı ve en etkili yöntemlerden biridir. Ham enzim çözeltisine yüksek konsantrasyonlarda amonyum sülfat (0.8 - 2.4 M)

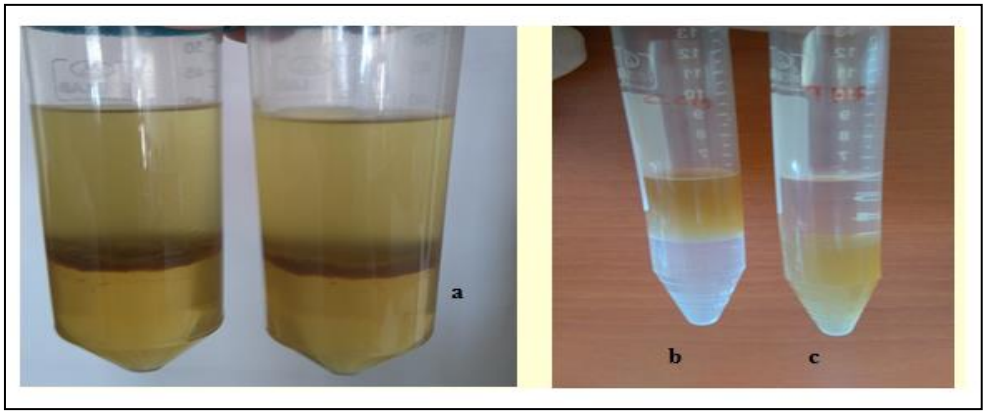
ve suda çözünürlüğü az olan alifatik bir alkolün ilavesi ile uyglanan bir yöntemdir. Bu yöntemde alifatik alkol olarak genellikle tersiyer bütanol kullanılır.

Tersiyer bütanolden başka metanol, etanol, 1-propanol ve 2-propanol gibi alkoller de kullanılabilir. Bu alkoller suda çözünmelerine rağmen kozmotrop tuzları çözmemektedirler. Bu nedenle üstte alkol fazı ve altta tuzlu sulu faz olmak üzere iki sıvı faz ve arada da batmama özelliği kazanmış katı bir protein fazı oluşur (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: TPP'nin uygulanması ile oluşan fazların gösterimi (Dennison ve Lovrien, 1997).

Üç fazın oluşumundan sonra fazlar ayrılıp analiz edildiğinde hücre komponentlerinin büyük bir bölümünün alkol fazına geçtiği, proteinlerin ise ara faz ve sulu alt faz arasında dağılım gösterdiği görülmektedir. Sulu alt fazda ve tampon çözelti içerisinde çözünmüş ara fazda hedef enzim aktivitesi arandığında ve toplam protein miktarlarına bakıldığında enzim saflaştırılması görülebilmektedir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19: Farklı çözücülerle yapılmış TPP uygulamaları. a) Tersiyer bütanol b) Kloroform c) Tetrahidro furan.

TPP yönteminde fenolik bileşikler ve yağ asitleri hedef enzimin ortamından kolayca uzaklaştırılır. Bu sayede sadece proteinlerden enzim ayrılması değil, diğer maddelerden de hedef enzimin ayrılması sağlanmış olur.

Alt ve orta fazda bulunan protein türü ve miktarı birçok parametreye bağlıdır. Kullanılan tuzun cinsi ve konsantrasyonu (genellikle amonyum sülfat), ortama ilave edilen alkolün cinsi ve tuz ile doygunlaştırılmış enzim çözeltisine oranı, pH, sıcaklık ve fazların ayrılması için beklenilen süre gibi faktörler bunlardan başlıcalarıdır (Dennison ve Lovrien, 1997).

Biyolojik ve kimyasal proseslerde proteinlerin çöktürülmesi tuzların ortama ilavesi ile yapılabilir. Dolayısı ile birçok farklı tuzu kullanmak mümkün iken bu tuzların belirli bir proteini çöktürme kapasitesi aynı olmamaktadır. İyonların yumurta sarısı proteinini çöktürme gücü Hofmeister serisinde gösterilmiştir.

Katyonlar : $Mg^{++} > Li^{+} > Na^{+} = K^{+} > NH_4^{+}$

Anyonlar : $SO_4^{--} > H_2PO_4^{-} >$ asetat $> Cl^{-} > NO_3^{-} > Br^{-} > I^{-}$ (Nostro ve Ninham, 2012).

Sıralama proteinleri çöktürme kapasitelerine göre verilmiştir. Liyotropik su çekme gücüne göre sıralanan seride klordan önceki anyonlar kozmotrop ve klordan sonraki anyonlar ise kaotrop olarak adlandırılır. Kozmotrop ifadesi konumlayıcı yani dengeleyici görev yapar. Tuz içeren çözeltiler, içerdiği tuzun kaotropik ya da kozmotropik özellik göstermesine bağlı olarak proteinler üzerinde değişik etkiler gösterirler.

Kozmotrop etki gösteren tuzlar çözeltinin iyonik gücünü yükseltirler. Proteinler kozmotrop bir tuzun varlığında sudan uzaklaşır, kümeleşir ve çökerler. Bu olay salting-out olarak isimlendirilir. Kaotrop etki gösteren tuzlar iyonik gücün düşmesine sebep olurlar. Proteinler kaotrop bir tuzun varlığında suda daha iyi çözünme gösterirler. Bu olaya da salting-in denir. Kullanılan tuzun değişik konsantrasyonları TPP ile oluşan üç fazın ara ve alt fazında farklı tür ve miktarda proteinin geçmesini sağlar. TPP'de tuz etkisi bu şekilde açıklanabilir. Tersiyer bütanol, iso-propanol, tetrahidrofuran, n-propanol, kloroform gibi farklı organik çözücülerin TPP yöntemi ile protein saflaştırılmasına etkisi tuz ilavesi sonucu oluşan protein çökeltilerine batmama özelliği kazandırarak üçüncü fazın oluşumunu sağlamaktır. En iyi enzim aktivitesi geri kazanımı ve saflaştırma oranı

genellikle tersiyer bütanol kullanımında gerçekleşse de diğer çözücüler ile daha yüksek saflaştırma oranı görülebilmektedir (Bayraktar ve Önal, 2013).

Tersiyer bütanol oda sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıklarda kozmotrop davranır. Sıcaklığın belirli bir seviyeye kadar yükselmesi TPP sonucunda gerçekleşen saflaşmayı arttırma eğiliminde iken daha yüksek sıcaklıklar enzim aktivitesini etkileyeceğinden saflaştırma oranı ve aktivite geri kazanımı düşük olabilir.

Genel olarak TPP yöntemi diğer büyük ve küçük ölçekli çalışmalarda uygulanan yöntemlerle kıyaslandığında çok büyük miktarlarda enzim saflaştırmasına imkan verir. Geleneksel kromatografik yöntemlerin maliyeti TPP yöntemine oranla yüksek ve uygulanma süreleri çok uzundur. TPP sonucunda ara fazda toplanan enzimin tampon çözeltide çözülmesi sonucu enzim aktivitesinin hemen hemen hepsi geri kazanılmaktadır.

TPP yöntemi uygulanırken kullanılan amonyum sülfat miktarı diğer yöntemlere kıyasla düşüktür ve geri kazanımı kolaydır. Enzim saflaştırılmasında aynı konsantrasyonda farklı tuzların etkisinin incelenmesine olanak sağlayan TPP; saflaştırma sonrası optimum sıcaklık ve optimum pH gibi deneysel çalışmaları da kolaylaştırır. Saflaştırma esnasında her bir fazın bileşenleri kontrol edilerek sadece tek bir protein değil birden fazla proteinin saflaştırılması da mümkün olabilmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 .MALZEME

Tampon çözeltiler için gerekli kimyasalların tümü, tersiyer bütanol, amonyum sülfat, elektroforez kimyasalları ve diğer tüm kimyasallar Merck AG (Almanya) ve Sigma Chemical Ltd. (ABD) firmalarından analitik saflıkta temin edildi.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Pazı Ham Ekstresinin (Ham Enzim Çözeltisi) Hazırlanması

60 gram pazı tartıldı. Üzerine, içerisinde 0.05 gram polivinilpirolidon (PVP) çözünmüş 100 mL 0.1M, pH 7.0 KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 fosfat tamponu ilave edildi ve +4 °C'de 5 dakika boyunca 30 saniye yavaş, 30 saniye hızlı devirde çalıştırılan ticari bir blender ile parçalama işlemi gerçekleştirildi. 4 saat +4°C'de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 1 gece +4°C'de buzdolabında dinlenmeye bırakıldı.

Bir gece bekletilen parçalanmış pazı ekstresi +4°C'de 2 kat tülbent ile süzüldü. Süzüntü hacmi 122mL olarak ölçüldü ve bir sonraki aşama için ayrıldı. Süzüntü 12000 Speed 13525 RCF ve +4°C'de 30 dakika santrifüje edildi. Çöken pelet hücre atıkları olarak değerlendirilerek uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatan +4°C'de süzgeç kağıdı ile tekrar süzüldü. Son süzüntü hacmi 109mL olarak ölçüldü. Bu çözelti ham enzim çözeltisi olarak isimlendirildi.

3.2.2 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Pazıdan peroksidaz enziminin saflaştırılması ve saflaştırma sonrası pazı peroksidazının karakterizasyonu sırasında tüm basamaklardaki peroksidaz aktivitesi p-fenilen diamin substratı kullanılarak literatürde belirtildiği şekilde yapıldı (Kahraman, 2003).

Aktivite tayini için p-fenilen diamin substratının 4.6mM sulu çözeltisinden 1.7mL, 8.8mM hidrojen peroksit çözeltisinden 1mL ve 60mM pH 6.8 KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 fosfat tamponundan 9.7mL alınarak karıştırıldı. 3mL'lik cam küvette bu karışımın 2.9mL'sine 0.1mL enzim çözeltisi ilave edildi.

Küvet 3 kez ters-düz edilerek enzimin karışması sağlandıktan sonra spektrofotometrede 485nm dalga boyunda oluşan rengin absorbans değeri okundu. 3 dakika boyunca her dakika absorbans okunması gerçekleştirildi. 3 dakika sonundaki absorbans farkından enzim ünitesi Şekil 3.1'deki formüle göre hesaplandı. Aktivite tayini oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve dakikada 0.3' den büyük absorbans gözlendiğinde enzim çözeltisi 10 kat seyreltildi.

$$\text{Peroksidaz Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD \text{ / dakika x seyreltme faktörü}}{\text{enzim çözeltisi mL'si}}$$

Şekil 3.1: Peroksidaz aktivitesinin hesaplanması için gerekli formül.

3.2.3 Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Pazıdan peroksidaz enziminin TPP yöntemi ile saflaştırılması esnasında ham enzim çözeltisindeki, TPP sonrası elde edilen üst, ara ve alt fazdaki toplam protein miktarları Lowry metodu kullanılarak belirlendi (Lowry ve diğ., 1951).

3.2.3.1 *Ayıraçlar*

A ayıracı: %2 Na_2CO_3 çözeltisi (0.1N NaOH'deki çözeltisi)

B ayıracı: %0.5 $CuSO_4$ (%1 dipotasyum tartarattaki çözeltisi)

Folin Ayıracı: Aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

Çalışma Folin Ayıracı: Folin ayıracı 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

C ayıracı: 50mL A ayıracına 1mL B ayıracı ilave edildi.

3.2.3.2 *Folin Ayıracının Hazırlanması*

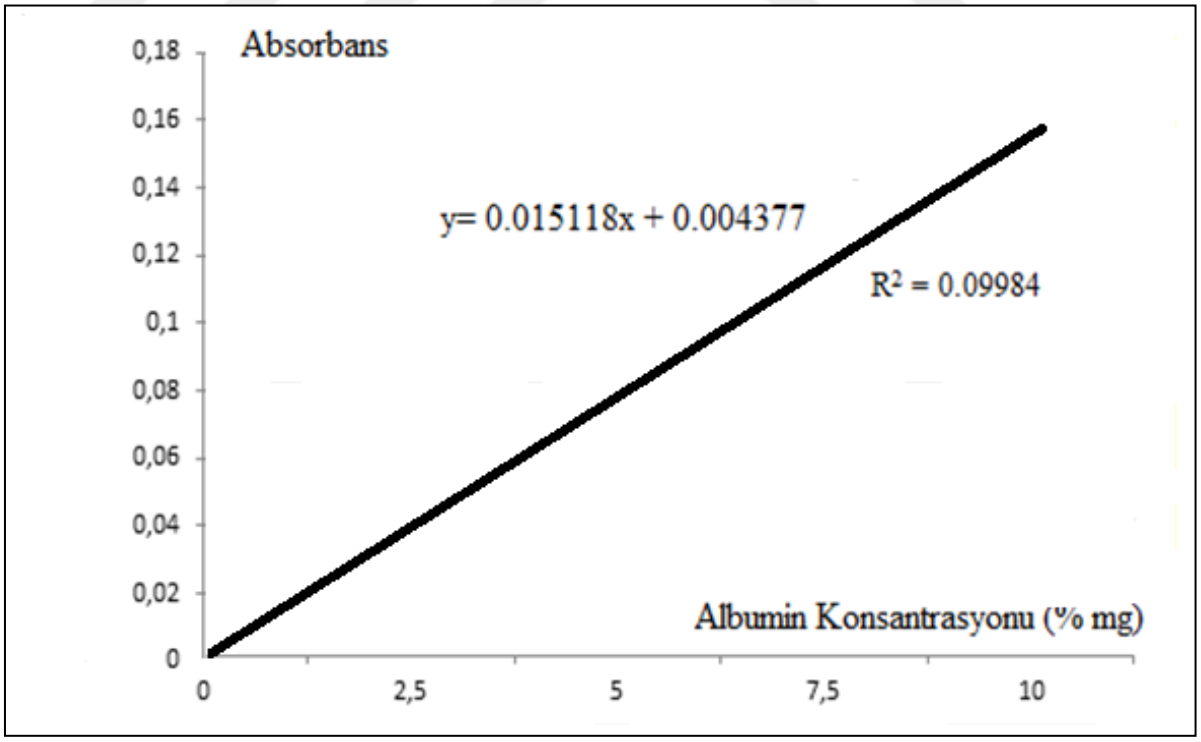
1500mL'lik yuvarlak dipli balona 100g sodyum tungstat ($Na_2WO_4.2H_2O$), 25g sodyum molibdat ($Na_2MoO_4.2H_2O$), 700mL distile su, 50mL %85 H_3PO_4 ve 100mL derişik HCl konuldu. Geri soğutucu altında 10 saat kaynatıldı. Karışıma 150g Li_2SO_4, 50mL distile su ve birkaç damla brom ilave edildi. Bromun fazlasının ortamdan uzaklaştırılması için çeker ocakta 15dk kaynatıldı, soğutuldu ve hacmi distile su ile 1000mL'ye tamamlandı.

3.2.3.3 *Deneyin Yapılışı*

Bir cam deney tüpüne protein miktarı tayin edilecek çözeltiden 0.5mL konuldu. Üzerine 2.5mL C ayıracı eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. 10dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0.25mL çalışma Folin ayıracı ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 30dk oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan mavi-lacivert çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 500nm dalgaboyunda ayıraç körüne karşı okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albümini (BSA) ile çizilen standart grafiğe uygulanması ile protein miktarı %mg olarak hesaplandı.

3.2.3.4. *Sığır Serum Albumini Standart Grafiğinin Çizilmesi*

Sığır serum albumininin serum fizyolojikteki (% 0.9 NaCl) %2.5mg, %5mg, %7.5mg ve %10mg'lık standart çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Lowry deneyi uygulandı. Deney on kez tekrarlandı. Elde edilen absorbans değerlerine en küçük kareler yöntemi uygulandı ve sığır serum albümini regresyon denklemi elde edildi. Standart eğri grafiği çizildi.



Şekil 3.2: Sığır serum albumini (BSA) standart grafiği

3.2.4 TPP Yönteminin Uygulanması

Pazıdan peroksidaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırılmasında en uygun şartların belirlenmesi için farklı denemeler yapıldı. Bu denemeler; enzim çözeltisinin farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında doygunlaştırılması, amonyum sülfat yerine kullanılabilecek farklı tuzların taranması, amonyum sülfat ile doyurulmuş enzim çözeltisinin farklı oranlarda tersiyer bütanol ile karıştırılarak üç fazın oluşturulması, tersiyer bütanol yerine kullanılabilecek farklı organik çözücülerin taranması, TPP'de oluşan üç fazın ayrılması için optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesini içermektedir.

3.2.4.1 *Peroksidaz Enziminin Farklı Amonyum Sülfat Konsantrasyonları ile Çöktürülmesi*

3'er mL enzim çözeltileri öncelikle %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 doygun amonyum sülfat konsantrasyonlarına getirildi. Bu konsantrasyonlar için enzim çözeltisine eklenmesi gereken amonyum sülfat miktarı literatürde belirtilen tabloya göre belirlendi ve +4 °C'de ilave edildi (Kahraman, 2003).

Amonyum sülfatın çözünmesi gerçekleştikten sonra 10 dakika +4°C'de dinlendirilme işlemi uygulandı. Elde edilen çözeltiye tuza doygun enzim çözeltisi adı verildi.

3.2.4.2 *TPP Yöntemi Fazlarının Ayrılması*

Farklı konsantrasyonlarda tuza doygun enzim çözeltisinin 3mL'sinin üzerine 3 mL tersiyer bütanol ilavesi yapıldı. Ağzı sıkıca kapatılan Falcon tüpü 100 kez ters-düz edilerek maddelerin karışması sağlandı. 30 dakika 37°C sıcak su banyosunda hafif çalkalayarak fazların oluşması için bekletildi.

Üst faz ayrılarak atıldıktan sonra ara ve alt fazlar 10 dakika, 0°C, 5000 Speed 2124RCF'de soğutmalı santrifüj edildi. Alt faz dekante edildikten sonra katı ara faz 3mL başlangıç hacmine uygun olacak şekilde 0.1M KH_2PO_4 – Na_2HPO_4, pH = 7.0 fosfat tamponunda çözüldü. Tampon çözelti içerisindeki partiküllerin giderilmesi ve ara fazın homojen çözeltisinin oluşturulması için 10 dakika, 0°C, 5000 Speed 2124RCF'de

soğutmalı santrifüj işlemi tekrarlandı. Elde edilen ara faz çözeltisi ve daha önce ayrılan sulu alt fazda enzim aktivite tayini ve total protein tayini deneyleri yapıldı.

3.2.4.3 *Farklı Tersiyer bütanol: Tuza Doygun Enzim Çözeltisi Oranlarının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine Etkisinin İncelenmesi*

Amonyum sülfat doygunluğu %60 olarak ayarlanmış ham enzim çözeltisi üzerine tersiyer bütanol ilavesi ile TPP fazlarının oluşumu gerçekleştirildikten sonra fazların ayrılması gerçekleştirildi.

Bu işlemler tuza doygun enzim çözeltisi: tersiyer bütanol oranları sırasıyla 1:0.5, 1:1, 1:1.5 ve 1:2 olacak şekilde ayarlanarak tekrarlandı. Elde edilen tüm ara faz çözeltileri ve sulu alt fazlarda peroksidaz enzim aktivite ve total protein tayini yapılarak fazların bileşimi analiz edildi.

3.2.4.4 *Farklı Organik Çözücülerin TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine Etkisi*

Amonyum sülfat doygunluğu %60 olarak ayarlanmış ham enzim çözeltisi 1:1 organik çözücü oranı sabit tutularak TPP fazları oluşturuldu. Fazların ayrılması gerçekleştirildi.

Bu işlem sırasıyla iso-propanol, n-propanol, tersiyer bütanol, tetrahidrofuran, n-amil alkol, iso-amil alkol, kloroform, karbon tetraklorür çözücüleri kullanılarak tekrarlandı.

Elde edilen tüm ara faz çözeltileri ve sulu alt fazlarda peroksidaz enzim aktivite ve total protein tayini yapılarak fazların bileşimi analiz edildi.

3.2.4.5 *Farklı Tuzların TPP Yöntemi ile Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Üzerine Etkisi*

3'er mL ham enzim çözeltisi sırasıyla $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4, $MgSO_4$, NaCl, KCl, $MgCl_2$, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, tuzlarının Tablo 3.1' de belirtilen sıcaklıklarda %60 doygun konsantrasyonlarına getirildi.

Çözünme işlemi gerçekleştikten sonra 10 dakika çözünürlük sıcaklığında dinlendirme işlemi uygulandı. Tuza doygun enzim çözeltisinden 3 mL alınarak bir Falcon tüpüne

konuldu. Üzerine tuza doygun enzim çözeltisi 1:1 tersiyer bütanol oranı olacak şekilde 3mL tersiyer bütanol ilavesi yapıldı. Fazlar ayrıldı.

Elde edilen tüm ara faz çözeltileri ve sulu alt fazlarda peroksidaz enzim aktivite ve total protein tayini yapılarak fazların bileşimi analiz edildi.

Tablo 3.1: Farklı tuzların belirli sıcaklıklardaki çözünürlükleri (Weast ve Astle, 1979).

Tuzun Adı	Sıcaklık (°C)	Çözünürlük
$(NH_4)_2S0_4$	25	760g/L
Na_2SO_4	20	160g/L
$MgSO_4$	20	360g/L
$MgSO_4$	0	200g/L
NaCl	25	360g/L
KH_2PO_4	25	250g/L
Na_2HPO_4	25	118g/L
KCl	25	355g/L
$MgCl_2$	25	546g/L

3.2.4.6 *Sıcaklığın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi*

Amonyum sülfat doygunluğu %60 olarak ayarlanmış ham enzim çözeltisi 1:1 tersiyer bütanol oranı sabit tutuldu.

Su banyosunun sıcaklığı sırasıyla 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55 olarak ayarlanarak 30 dakika fazların oluşması beklendi. Fazların ayrılması işlemi gerçekleştirildi.

Elde edilen tüm ara faz çözeltileri ve sulu alt fazlarda peroksidaz enzim aktivite ve total protein tayini yapılarak fazların bileşimi analiz edildi.

3.2.4.7 *pH'nın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi*

Ham enzim çözeltisi, amonyum sülfat ile doyurulmadan önce 0.1N HCl veya 0.1N NaOH ilave edilerek pH değeri 3, 4, 5, 6, 8, 9 olarak ayarlandı.

Amonyum sülfat doygunluğu %60 olarak ayarlanmış ham enzim çözeltisi 1:1 tersiyer bütanol oranı sabit tutularak fazların oluşması beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra elde edilen tüm ara faz çözeltileri ve sulu alt fazlarda peroksidaz enzim aktivite ve total protein tayini yapılarak fazların bileşimi analiz edildi.

Ham enzim çözeltisine HCl veya NaOH ilavesi sırasında hacim artışı ölçüldü. Hacim artışının seyreltmeye sebep olması dolayısı ile sonuçlar seyreltme katsayısı ile çarpılarak hesaplandı.

3.2.4.8 *Ses Dalgalarının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi*

TPP yönteminin faz oluşumunun gerçekleşmesi esnasında 37°C su banyosu içeren bir sonikatör kullanıldı. Sonikatörün oluşturduğu ses dalgalarının frekansı 35 kHz olarak sabitlendi.

Uygulama süresi olarak 5, 15 ve 30 dakika belirlendi. Farklı pH değerinde ses dalgalarının etkisinin incelenmesi için ham enzim çözeltisine 0.1N HCl ilavesi yapılarak pH değeri 5 ve 6'ya ayarlandı.

Elde edilen tüm ara faz çözeltileri ve sulu alt fazlarda peroksidaz enzim aktivite ve total protein tayini yapılarak fazların bileşimi analiz edildi. Ham enzim çözeltisine HCl ilavesi sırasında hacim artışı ölçüldü. Hacim artışının seyreltmeye sebep olması dolayısı ile sonuçlar seyreltme katsayısı ile çarpılarak hesaplandı.

3.2.5 Saflaştırılmış Peroksidazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Peroksidaz enziminin p-fenilen diamin substratına karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C' lerde bekletilen peroksidaz enzimine aktivite tayini yapıldı.

0.1mL saflaştırılmış peroksidaz enzimi 0.1M KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 pH 7.0 fosfat tamponu kullanılarak 10 kat seyreltildi. 30 dakika yukarıda belirtilen sıcaklıklarda bekletildi.

En yüksek aktivitenin ölçüldüğü sıcaklığın değerine (%100) bağlı olarak diğer sıcaklıkların bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı.

3.2.6 Saflaştırılmış Peroksidazın Aktivitesine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

0.3mL saflaştırılmış peroksidaz enzimi 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9,10 pH değerlerinde hazırlanmış farklı tampon çözeltiler ile 3mL'ye tamamlanmak koşuluyla 10 kat seyreltildi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra pH değeri, pH metre yardımı ile ölçülerek kontrol edildikten sonra peroksidaz aktivite tayini yapıldı.

Aktivite tayininde kullanılan 60mM KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 pH 6.8 fosfat tamponu yerine hazırlanan tampon çözeltilerin 60mM konsantrasyonları hazırlandı ve uygun pH değerine göre kullanıldı.

En yüksek aktivitenin ölçüldüğü pH değerine (%100) bağlı olarak diğer pH'ların bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı.

Farklı pH değerlerinde tampon çözeltilerin hazırlanması için kullanılan tampon sistemleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Farklı pH değerleri için hazırlanan tampon sistemler

Tampon Sistemi	pH
Glisin – HCl	2-3
Sodyum Asetat – Asetik Asit	4-5
KH_2PO_4 – Na_2HPO_4	6-7-8
Glisin – NaOH	9-10

3.2.7 Saflaştırılmış Peroksidazın Çeşitli Substratlar Kullanılarak Bağıl (%) Aktivitesinin Belirlenmesi

p-Fenilen diamin dihidroklorür, o-fenilen diamin dihidroklorür, gayakol, pirogallol, L-DOPA ve o-dianisidin dihidroklorür substratlarının 4.6mM konsantrasyonunda sulu çözeltileri hazırlandı.

Aktivite tayini için yukarıda belirtilen substratların 4.6mM sulu çözeltisinden 1.7mL, 8.8mM hidrojen peroksit çözeltisinden 1mL ve 60mM pH 6.8 KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 fosfat tamponundan 9.7mL alınarak enzim aktivite tayin deneyine uygun olacak şekilde karıştırıldı. 3mL'lik cam küvette bu karışımın 2.9mL'sine 0.1mL enzim çözeltisi ilave edildi.

Kontrol olarak p-fenilen diamin dihidroklorür substratı seçildi ve aktivite değeri %100 olarak kabul edildi. Diğer substratların aktivite değerleri bağıl (%) olarak hesaplandı.

3.2.8 Saflaştırılmış Peroksidaz Enziminin Çeşitli Substratlar İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

p-Fenilendiamin dihidroklorür ve o-fenilendiamin dihidroklorür substratları için 4.6mM substrat konsantrasyonu N olarak kabul edildi.

Buna bağlı olarak N/20, N/15, N/12.5, N/10, N/7.5, N/5 konsantrasyonlarında seyreltildi ve aktivite tayin çözeltisi bu değişik substrat konsantrasyonlarında hazırlandı.

Gayakol substratı için N/15, N/12.5, N/10, N/7.5, N/5, N/2 konsantrasyonlarında seyreltildi ve aktivite tayin çözeltisi bu değişik substrat konsantrasyonlarında hazırlandı.

Pirogallol substratı için N/12.5, N/10, N/7.5, N/5, N/2 konsantrasyonlarında seyreltildi ve aktivite tayin çözeltisi bu değişik substrat konsantrasyonlarında hazırlandı.

L-DOPA substratı için N/10, N/7.5, N/5, N/2 konsantrasyonlarında seyreltildi ve aktivite tayin çözeltisi bu değişik substrat konsantrasyonlarında hazırlandı.

Peroksidaz enziminin farklı substratları için Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesinde başlangıç hız koşullarında yatışkın hal yaklaşımına göre türetilmiş Michaelis – Menten denklemi ve onun türetilmiş formu kullanıldı.

3.2.9 Çeşitli Anorganik Maddelerin Saflaştırılmış Peroksidazın Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Potasyum klorür, sodyum klorür, potasyum florür, sodyum florür, magnezyum klorür, kalsiyum klorür, alüminyum (III) klorür, krom (III) klorür, demir (III) klorür, potasyum siyanür, potasyum tiyosiyanat, sodyum azid, sodyum selenat, bakır (II) klorür, sodyum bisülfit, kadmiyum (II) klorür ve vanadyum (III) klorür bileşiklerinin 25mL, 50mM çözeltileri hazırlandı. 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM ve 25mM konsantrasyonlarına seyreltmeleri yapıldı.

3.2.10 Çeşitli Organik Maddelerin Saflaştırılmış Peroksidazın Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Glutatyon, ß-merkapto etanol, sistein klorür, 1,4-ditiyoeritritol, metiyonin, benzoik asit, aspartik asit, askorbik asit, trikloro asetik asit, glutamik asit organik bileşiklerinin 25mL, 50mM çözeltileri hazırlandı. 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM ve 25mM konsantrasyonlarına seyreltmeleri yapıldı.

Küvette aktivite tayini için ayarlanan çözelti içerisine inhibitör madde, aktivite tayin protokolünde belirlenen 3 mL toplam hacmin geçilmemesi için tampon çözelti miktarı azaltılarak ilave edildi.

İnhibitör eşliğinde peroksidaz enzim aktivite tayini için p-fenilen diamin substratının 4.6mM sulu çözeltisinden 1.7mL, 8.8mM hidrojen peroksit çözeltisinden 1mL ve 60mM pH 6.8 KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 fosfat tamponundan 9.25mL (9.7mL yerine) alınarak karıştırıldı. 3mL'lik cam küvette bu karışımın 2.8mL'sine 0.1mL enzim çözeltisi ve 0.1mL inhibitör çözeltisi ilave edildi.

Tüp 3 kez ters-düz edilerek enzimin karışması sağlandıktan sonra spektrofotometrede 485nm dalga boyunda oluşan rengin absorbans değeri okundu. 3 dakika boyunca her dakika absorbans okunması gerçekleştirildi. 3 dakika sonundaki absorbans farkından enzim ünitesi Şekil 3.1'deki formüle göre hesaplandı.

3.2.11 Peroksidaz Aktivitesi Üzerinde Gözlenen İnhibisyon Etkisinin % Olarak Belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesi ortamdaki inhibitör maddelerin varlığında azalma göstermektedir. Bu azalmanın % olarak belirlenmesi ve inhibitörün gösterdiği % inhibisyon değerleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 de gösterilen formüllere göre hesaplandı.

$$\% \text{ Aktivite} = \frac{\text{İnhibitör Eşliğinde Enzim Aktivitesi}}{\text{İnhibitörsüz Enzim Aktivitesi}} \times 100$$

Şekil 3.3: İnhibisyon ile peroksidaz aktivitesindeki azalma.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{İnhibitörsüz Enzim Aktivitesi - İnhibitör Eşliğindeki Enzim Aktivitesi}}{\text{İnhibitörsüz Enzim Aktivitesi}} \times 100$$

Şekil 3.4: İnhibisyon yüzdesinin hesaplanması.

3.2.12 Bazı Peroksidaz İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesi üzerinde Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de belirlenen inhibitör konsantrasyonlarında %100 inhibisyon etkisi gösteren glutatyon, ß-merkapto etanol, 1,4-ditiyoeritritol, askorbik asit, potasyum siyanür ve sodyum bisülfit bileşiklerinin 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM ve 750 µM çözeltileri hazırlanarak bölüm 3.2.10'da bahsedilen ortama inhibitör ilave edilerek yapılan enzim aktivite tayini protokolü uygulandı.

Elde edilen inhibisyon yüzdeleri grafiğe aktarıldı ve grafiğin denkleminden enzim aktivitesi üzerinde %50 inhibisyon etkisi gösteren inhibisyon konsantrasyonu belirlenerek IC_{50} değerleri bulundu.

3.2.13 Bazı Peroksidaz İnhibitörlerinin Gösterdiği İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Glutatyon, ß-merkapto etanol, 1.4-ditiyoeritritol, potasyum siyanür, sodyum bisülfit ve askorbik asidin belirlenen IC_{50} değerlerinde konsantrasyonları hazırlandı (Tablo 4.9).

Aktivite tayininde kullanılan 4.6mM p-fenilen diamin çözeltisi N kabul edilerek, N/12, N/10, N/8, N/6, N/4 ve N/2 konsantrasyonlarına seyreltildi.

Bölüm 3.2.10'da bahsedilen inhibitör eşliğinde peroksidaz aktivite tayin protokolü uygulandı. Sabit inhibitör konsantrasyonunda (IC_{50}) farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak enzimin substrat konsantrasyonu – aktivite değerleri belirlendi. Belirlenen değerler 1/[S] ve 1/V olarak hesaplandı. Lineweaver – Burk grafiği oluşturularak elde edilen doğrudan K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı ve grafikte meydana gelen değişimlere göre inhibisyon türüne karar verildi

4. BULGULAR

4.1 PAZI (*Beta vulgaris* L. var. cicla) PEROKSİDAZININ TPP İLE SAFLAŞTIRILMASI VE SAFLAŞTIRMA SONRASI AKTİVİTE GERİ KAZANIMI

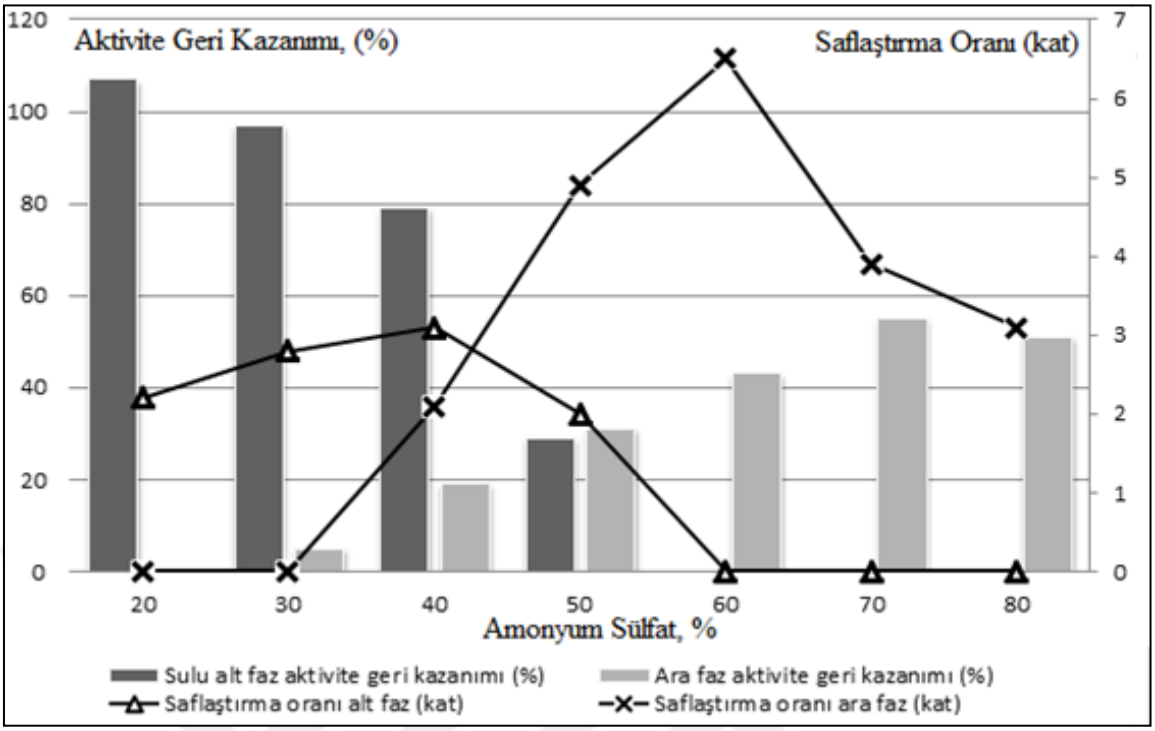
Peroksidaz saflaştırmasında TPP yöntemi kullanılmıştır. Saflaştırma çalışmasında tuz türü ve konsantrasyonu, organik çözücü ve tuz ile doygunlaştırılmış enzim çözeltisine oranı, pH, sıcaklık gibi durumlardan etkilenmektedir. Bu sebepten dolayı bu çalışmada amonyum sülfatın farklı konsantrasyonlarının, %60 tuz konsantrasyonunda farklı tuzların, farklı tersiyer bütanol oranlarının, %60 amonyum sülfat ile doygunlaştırılmış enzim çözeltisi 1:1 organik çözücü oranıyla farklı organik çözücülerin, pH'nın, 5, 10 ve 15 dakika süreyle etki eden ses dalgalarının ve sıcaklığın saflaştırma oranı ve peroksidaz aktivite geri kazanımı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

4.1.1 Farklı $(NH_4)_2SO_4$ Konsantrasyonlarının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

Ham enzim çözeltisi farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat ile doygunlaştırıldıktan sonra 1:1 tersiyer bütanol oranı sabit kalacak şekilde TPP yöntemi uygulandı. Oluşan fazların bileşimleri analiz edildi.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi amonyum sülfat doygunluğunun yükselmesiyle birlikte peroksidaz enziminin ara faza geçtiği ve alt fazdaki peroksidaz aktivitesinin azaldığı görülmüştür.

Peroksidaz aktivitesi %60 $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu ile birlikte tamamen ara faza geçmiştir. Peroksidazın aktivite geri kazanımı %55 ile %70 $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğunda ve saflaştırma oranı 6.5 kat olarak en iyi %60 $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğunda gözlenmiştir.



% Konsantrasyon	%20	%30	%40	%50	%60	%70	%80
Sulu alt faz aktivite geri kazanımı (%)	107	97	79	29	0	0	0
Ara faz aktivite geri kazanımı (%)	0	5	19	31	43	55	51
Saflaştırma oranı alt faz (kat)	2,2	2,8	3,1	2	0	0	0
Saflaştırma oranı ara faz (kat)	0	0	2,1	4,9	6,5	3,9	3,1

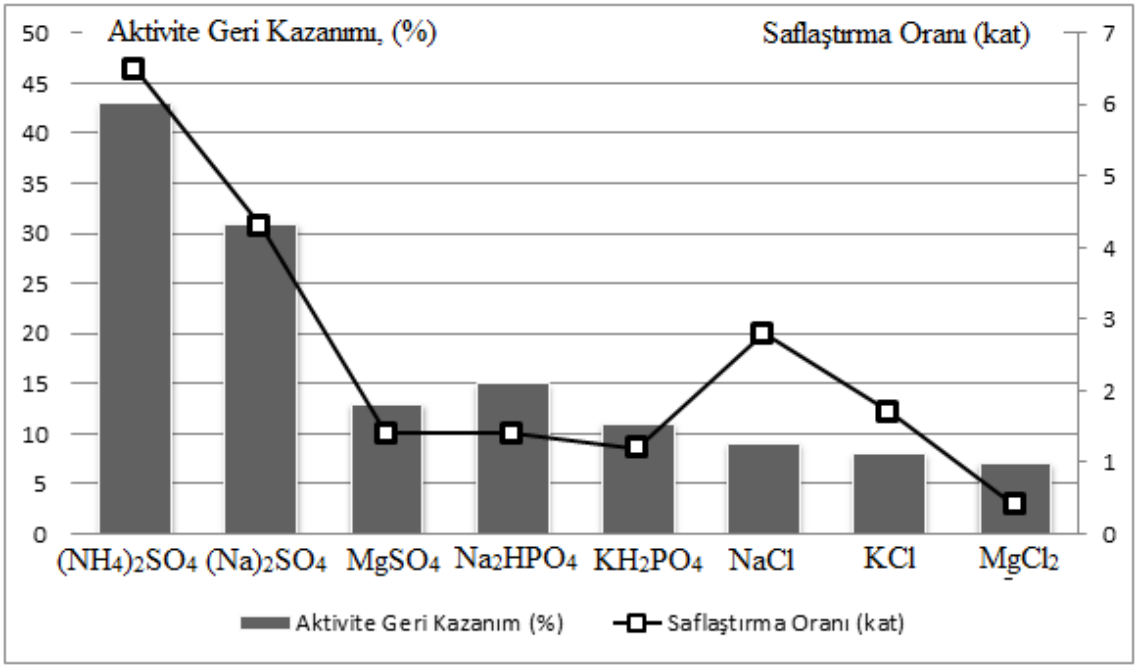
Şekil 4.1: Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının TPP yöntemiyle peroksidaz saflaştırması üzerine etkisi

4.1.2 Farklı Tuzların TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

Çalışmada peroksidaz enziminin saflaştırılması için en uygun amonyum sülfat doygunluğu %60 olarak bulunmuştur. Farklı özellikteki tuzlar kullanılarak ham enzim çözeltisi %60 oranında doygunluğuna ulaştırılarak çöktürülmüş ve daha sonra TPP yöntemi uygulanmıştır. Fazların bileşimleri analiz edilmiştir.

TPP yöntemi uygulanırken farklı özellikteki tuzlar ile %60 doyurulmuş enzim çözeltisi 1:1 oranında tersiyer bütanol oranı kullanıldı. Sıcaklık 37°C'de, pH = 7.0'de tutuldu ve fazların ayrılması için 30 dakika beklendi.

Şekil 4.2'de TPP yöntemi uygulandıktan sonra ayrılan ara fazda gerçekleşen saflaştırma oranı ve peroksidaz aktivite geri kazanımı gösterilmektedir.



Tuzlar	$(NH_4)_2SO_4$	$(Na)_2SO_4$	$MgSO_4$	Na_2HPO_4	KH_2PO_4	NaCl	KCl	$MgCl_2$
Aktivite Geri Kazanım (%)	43	31	13	15	11	9	8	7
Saflaştırma Oranı (kat)	6,5	4,3	1,4	1,4	1,2	2,8	1,7	0,4

Şekil 4.2: Farklı tuzların %60 konsantrasyonlarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi.

En yüksek aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranı amonyum sülfat ile elde edildi. Tek değerlikli amonyum ve sodyum sülfat tuzlarının, iki değerlikli magnezyum sülfat tuzundan daha yüksek aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranı verdiği görüldü (Şekil 4.2).

Sodyum ve potasyum klorür tuzlarının iki değerlikli magnezyum klorürden ve sodyum fosfatın, potasyum fosfattan daha yüksek aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranı gösterdiği görüldü (Şekil 4.2).

Sonuç olarak peroksidaz saflaştırılmasında tek değerlikli tuzlar ile saflaştırma oranı ve aktivite geri kazanımı daha yüksek olmaktadır. Ayrıca tek değerlikli tuzların da

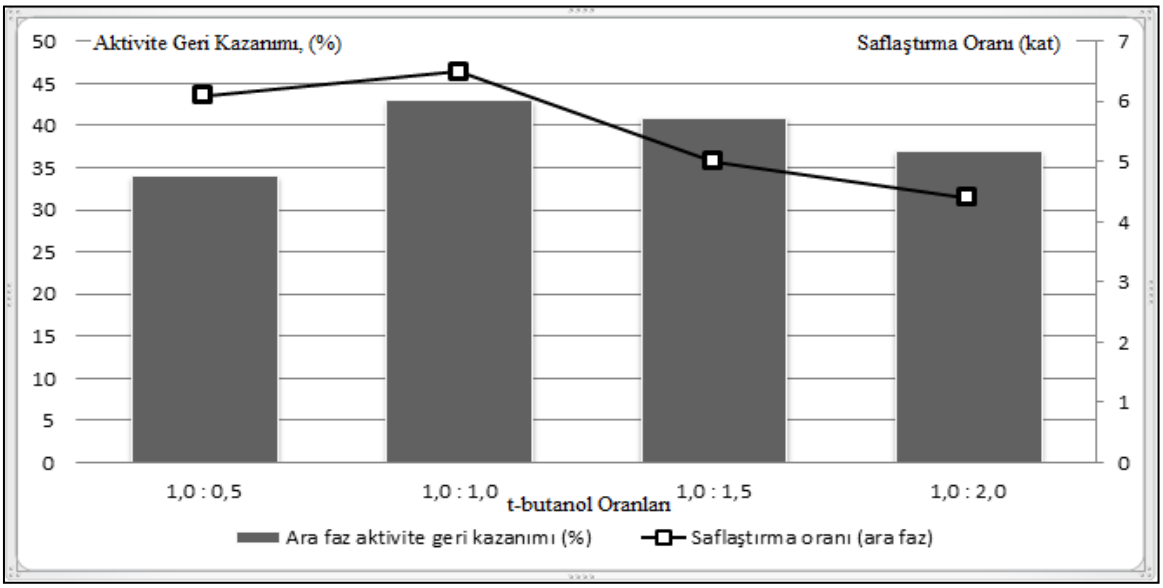
peroksidaz aktivite geri kazanımına ve saflaştırma oranına etkisi amonyum > sodyum > potasyum olarak belirlenmiştir. Bu sıralama Hofmeister serisi ile uyumlu değildir.

Sülfat anyonlarının pazı peroksidazı saflaştırmasında fosfat ve klorür anyonlarından daha etkili olduğu bulunmuştur. Sıralama sülfat > fosfat > klorür şeklinde belirlenmiştir ve bu sıralama Hofmeister serisi ile uyumludur (Şekil 4.2).

4.1.3 Tuz ile Doyurulmuş Ham Enzim Çözeltisi : Tersiyer bütanol Oranının TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

%60 Amonyum sülfat doygunluğuna ulaştırılmış enzim çözeltisine ilave edilen tersiyer bütanolün miktarına bağlı olarak saflaştırma oranı ve aktivite geri kazanımı değişmektedir.

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi en yüksek peroksidaz aktivite geri kazanımı 1.0:1.0 tersiyer bütanol oranında %43 olarak bulunmuştur. En yüksek saflaştırma oranı da aynı 1.0:1.0 tersiyer bütanol oranında 6.5 kat olarak bulunmuştur. TPP yöntemi uygulanırken sıcaklık 37°C'de pH 7.0'de tutuldu ve fazların ayrılması için 30 dakika beklenmiştir (Şekil 4.3).



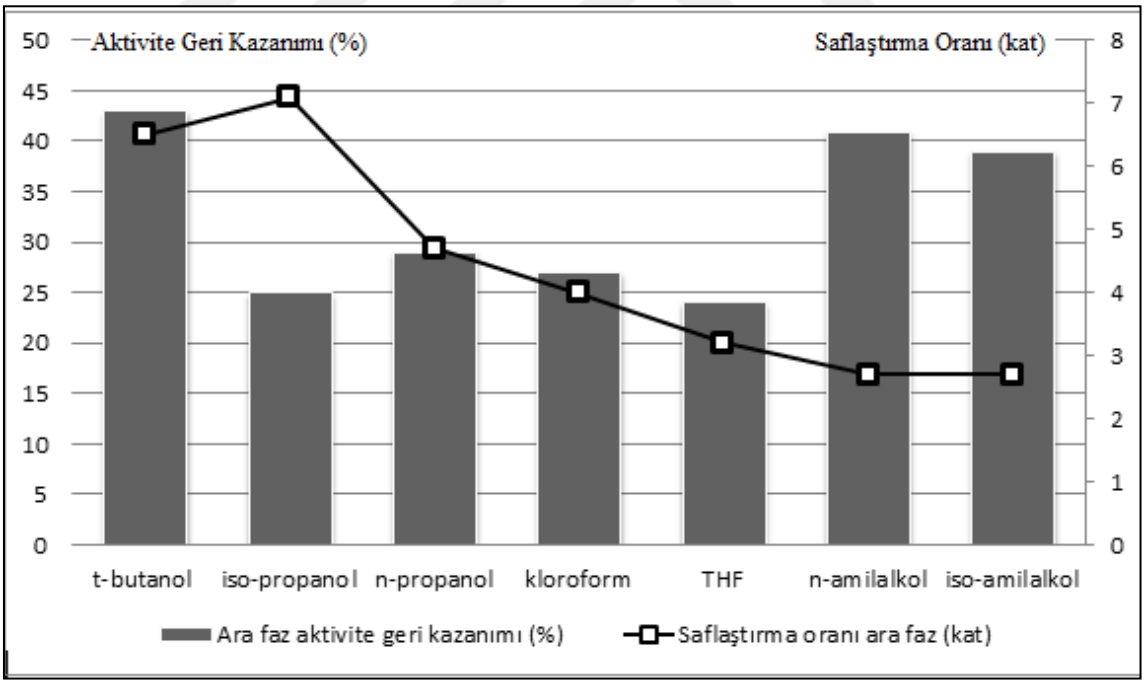
Ham enzim çözeltisi : t-Butanol	1,0 : 0,5	1,0 : 1,0	1,0 : 1,5	1,0 : 2,0
Ara faz aktivite geri kazanımı (%)	34	43	41	37
Saflaştırma oranı (ara faz)	6,1	6,5	5	4,4

Şekil 4.3: Farklı tersiyer bütanol oranlarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi.

Literatürde genellikle 1mL ham enzim çözeltisine 0.5mL – 1mL tersiyer bütanole gereksinim duyulmaktadır. Ancak bu oranın aşıldığı çalışmalar da mevcuttur (Kaya, 2015). Bu çalışmada pazı peroksidazı için en yüksek geri kazanım ve saflaştırma oranı 3mL tuza doyurulmuş enzim çözeltisine 3mL tersiyer bütanol ilavesi sonucunda elde edilmiştir. Bu bağlamda sonuçlar literatür ile uyumludur.

4.1.4 Farklı Organik Çözücülerin TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

TPP yöntemi ile enzim saflaştırılmasında tersiyer bütanol yerine farklı organik çözücülerin kullanılması mümkündür. tersiyer bütanol oranı belirlendikten sonra aynı oranda kullanılan farklı çözeltilerin TPP sonrası peroksidaz aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranına etkisi incelendi. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi TPP sonrası elde edilen ara fazda peroksidaz aktivite geri kazanımının en yüksek olduğu organik çözücü tersiyer bütanoldür.



Çözücüler	t-butanol	iso-propanol	n-propanol	kloroform	THF	n-amilalkol	iso-amilalkol
Ara faz aktivite geri kazanımı (%)	43	25	29	27	24	41	39
Saflaştırma oranı ara faz (kat)	6,5	7,1	4,7	4	3,2	2,7	2,7

Şekil 4.4: Farklı organik çözücülerin TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi

En yüksek saflaştırma oranı tersiyer bütanol ile değil iso-propanol ile uygulanan TPP yönteminde görülmüştür. Ancak iso-propanol ile yapılan TPP'de peroksidaz aktivite geri kazanımı oldukça düşük kalmaktadır (Şekil 4.4).

Tetrahidrofuran (THF), kloroform ($CHCl_3$) gibi organik çözücüler ile uygulanan TPP yönteminde üç fazın oluştuğu ve ara fazda peroksidaz saflaştırmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Ancak karbon tetraklorür (CCl_4) gibi hidrojene sahip olmayan non-polar bir kimyasal madde ile uygulanan TPP yönteminde üç fazın ayrılamadığı görülmüştür.

CCl_4 ve $CHCl_3$ ile uygulanan TPP yöntemlerinde CCl_4 ve $CHCl_3$ yoğunluğunun fazla olması sebebiyle sulu fazın üstte kaldığı gözlenmiştir.

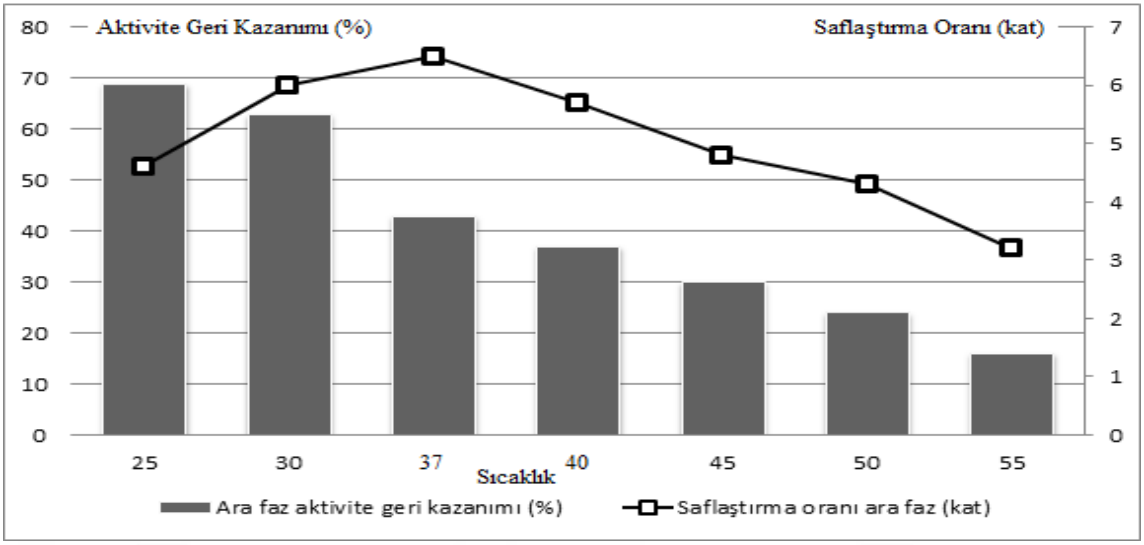
TPP yöntemi uygulanırken %60 amonyum sülfat ile doyurulmuş enzim çözeltisi 1:1 organik çözelti oranı kullanıldı. Sıcaklık 37°C'de, pH 7.0'de tutuldu ve fazların ayrılması için 30 dakika beklendi.

4.1.5 Sıcaklığın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

Sıcaklık TPP yönteminin uygulanması sırasında fazların ayrılması ve bileşimi üzerinde etkili bir parametredir. Farklı sıcaklıklarda yapılan TPP uygulamalarının sonuçları şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Enzim aktivite geri kazanımı en yüksek 25°C'de %69 olarak bulunmuştur. Sıcaklık arttıkça enzim aktivite kazanımında düşme gözlenmiştir. Saflaştırma oranında sıcaklıkla belirli bir seviyeye kadar artma daha sonra azalma gözlenmiştir. Saflaştırma oranının en yüksek olduğu sıcaklık ise 6.5 kat ile 37°C'olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).

TPP yöntemi uygulanırken %60 amonyum sülfat ile doyurulmuş enzim çözeltisi 1:1 organik çözelti oranı kullanıldı. pH 7.0'de tutuldu ve fazların ayrılması için 30 dakika beklendi.



Sıcaklık (°C)	25	30	37	40	45	50	55
Ara faz aktivite geri kazanımı (%)	69	63	43	37	30	24	16
Saflaştırma oranı ara faz (kat)	4,6	6	6,5	5,7	4,8	4,3	3,2

Sekil 4.5: Sıcaklığın TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi.

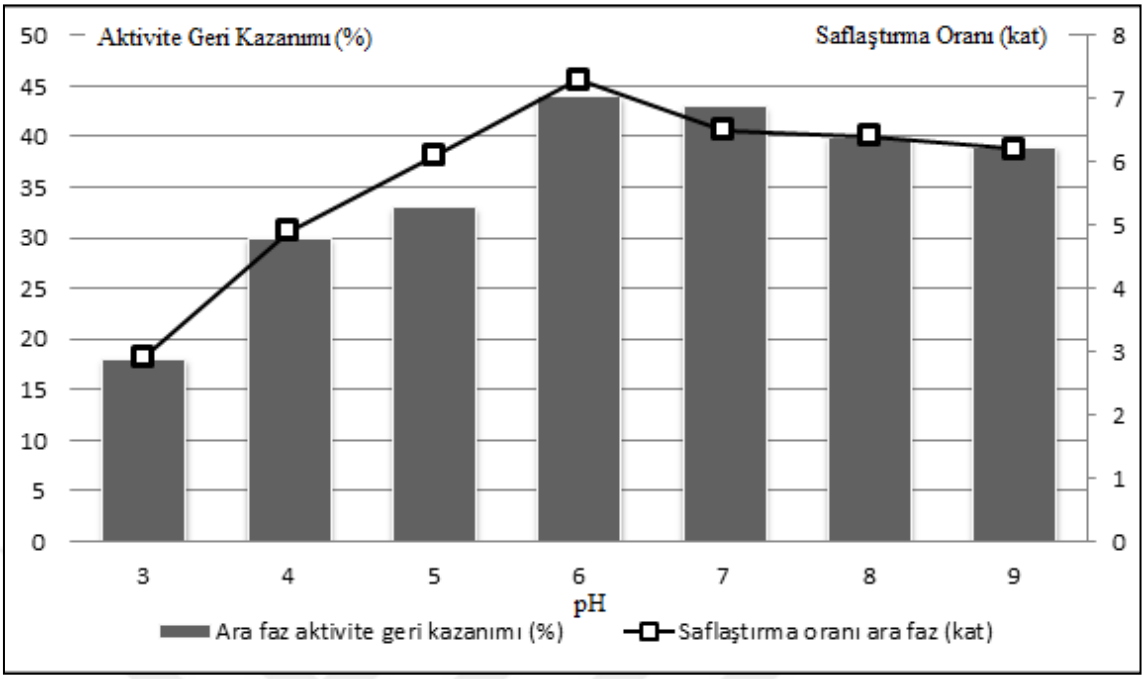
4.1.6 pH'nın TPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

pH değişimleri bir protein molekülündeki elektrostatik etkileşimleri ve protein molekülünün yapısındaki aspartik asit, glutamik asit ve lizin gibi amino asitlerin yüklerini değiştirir.

Değişen elektrostatik etkileşimler TPP yöntemiyle oluşan fazlardaki enzim düzeni etkilemektedir. TPP'nin pH değeri PI değerinden daha düşük olduğunda amino asitler dolayısı ile protein pozitif yüklü hale gelir ve molekül ara faza geçebilir.

Şekil 4.6'de farklı pH değerlerinin TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi gösterilmiştir.

En yüksek peroksidaz aktivite geri kazanımı pH 6.0'da %44, en yüksek saflaştırma oranı yine pH 6.0'da 7.3 kat olarak bulunmuştur. Literatürde pazıdan elde edilen peroksidaz aktivitesinin en yüksek olduğu pH değerleri 5.0 – 7.0 olarak belirlenmiştir (Kahraman, 2003). Sonuçlar bu bağlamda literatür ile uyumludur.



pH	3	4	5	6	7	8	9
Ara faz aktivite geri kazanımı (%)	18	30	33	44	43	40	39
Saflaştırma oranı ara faz (kat)	2,9	4,9	6,1	7,3	6,5	6,4	6,2

Şekil 4.6: pH'nın TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi.

pH'nın TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi incelenirken amonyum sülfatın %60 doygun konsatrasyonu ve tuza doygun enzim çözeltisi ile tersiyer bütanol'ün 1:1'lik oranı kullanıldı. Sıcaklık 37°C'de tutuldu ve fazların ayrılması için 30 dakika beklendi.

4.1.7 Farklı Sürelerde Etki Eden Ses DalgalarınınTPP Yöntemi ile Peroksidaz Saflaştırılması Üzerine Etkisi

Belirli bir frekanstaki ses dalgaları enzimlerin denatürasyonuna sebebiyet vermeden TPP yönteminde oluşan üç faz arasındaki kütle transferini hızlandırarak yöntemin süresini oldukça kısaltma, enzim aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranını arttırma potansiyeline sahiptir (Niphadkar ve Rathod, 2015).

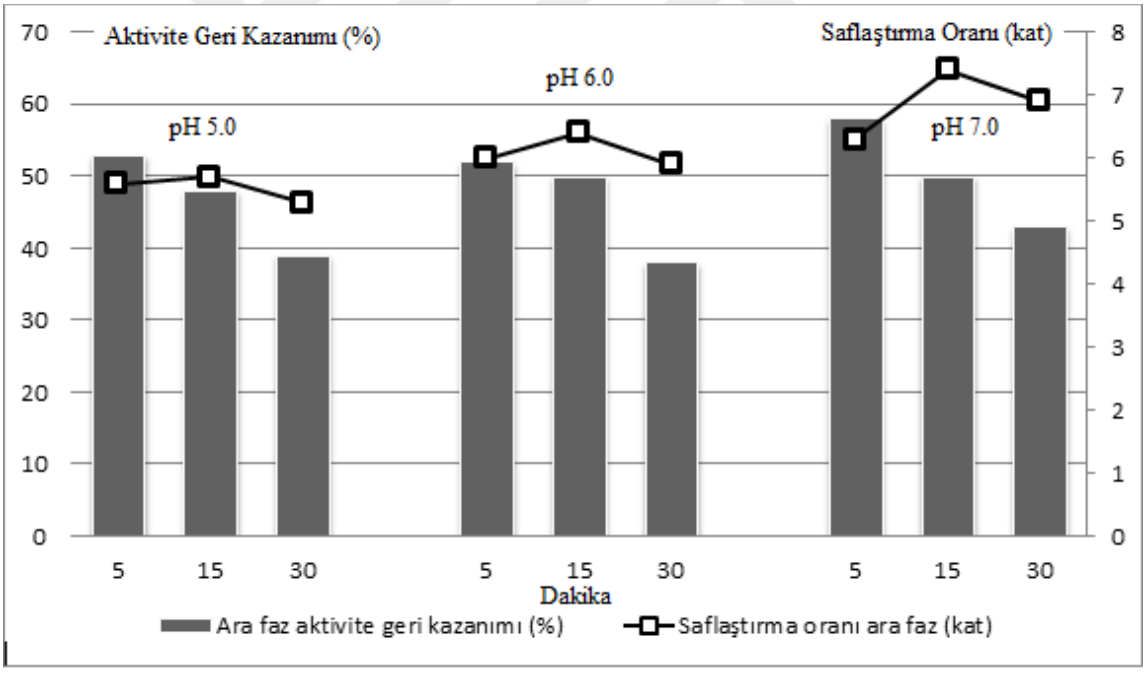
Farklı pH değerlerinde 5, 15 ve 30 dakika boyunca sonikatörde bekletilerek TPP yönteminin faz ayrılması gerçekleştirilmiştir. Ara fazlar ayrılmış ve analiz edilmiştir.

Şekil 4.7'de farklı pH ve farklı sürelerde sonikatörde bekletilerek gerçekleştirilen TPP yönteminin peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi gösterilmiştir.

pH'nın yükselmesi ile peroksidaz aktivite geri kazanımı ve saflaştırma oranlarında artma gözlenmiştir. En uygun pH, su banyosunda faz ayrılmasının beklenmesi ile 6.0 olarak belirlenmişken sonikatör ile fazların ayrılması beklendiğinde 7.0 olarak belirlenmiştir.

Sonikatör ile fazların ayrılması daha kısa sürede gerçekleşmektedir. 5 dakika sonunda peroksidaz aktivite geri kazanımı en yüksek değerindedir. 5. dakikadan sonra enzim aktivite geri kazanımı anlamlı bir şekilde düşmektedir.

15 dakika sonikatör ile fazların ayrılması sonucu en yüksek saflaştırma adımlarına ulaşılmıştır. Etkin faz ayrılması için gerekli sürenin 15 dakika olduğu belirlenmiştir. 15. dakikadan sonra saflaştırma adımı düşmektedir.



	pH 5.0			pH 6.0			pH 7.0		
Süre (Dakika)	5	15	30	5	15	30	5	15	30
Ara faz aktivite geri kazanımı (%)	53	48	39	52	50	38	58	50	43
Saflaştırma oranı ara faz (kat)	5,6	5,7	5,3	6	6,4	5,9	6,3	7,4	6,9

Şekil 4.7: Farklı pH ve farklı sürelerde etki eden ses dalgalarının TPP yöntemi ile peroksidaz saflaştırılması üzerine etkisi.

Sonuç olarak; pazıdan peroksidaz saflaştırılması için %60 amonyum sülfat doygunluğunda enzim çözeltisi 1:1 tersiyer bütanol oranı, pH 7.0, 37°C ve sonikatörde 15 dakika faz ayrımı beklenerek yapılan TPP uygulamasının en ideal sonucu verdiği belirlenmiştir.

Bu koşullar altında yapılan saflaştırma işleminde 7.4 kat saflık oranı ve %50 peroksidaz aktivite geri kazanımına ulaşılmıştır.

4.1.8 Yüksek Hacimde Enzim Çözeltisi ile Uygulanan TPP Yöntemiyle Peroksidaz Saflaştırılması

32mL enzim çözeltisi %60 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Hacim artışı gözlendi ve son hacim 39mL olarak belirlendi.

39mL %60 amonyum sülfat doygun enzim çözeltisinin tamamı alındı ve üzerine 39mL tersiyer bütanol ilave edildi. pH 7.0 ve 37°C'de sonikatör kullanılarak 15 dakika fazların ayrılması için beklendi. Ara fazda analiz yapıldı. Tablo 4.1'de yüksek hacimde enzim çözeltisi ile uygulanan TPP yöntemiyle peroksidaz saflaştırılması gösterilmektedir.

Tablo 4.1:Yüksek hacimde enzim çözeltisi ile uygulanan TPP yöntemiyle peroksidaz saflaştırılması.

Basamak	Hacim (mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Aktivite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Oranı (kat)	Aktivite Geri Kazanımı
Ham Ekstre	39	2,53	1,38	0,54	1	%100
TPP Ara Fazı	39	0,19	0,76	4,00	7,4	%54

Peroksidazın optimum pH, optimum sıcaklık özelliklerinin belirlenmesi, değişik substratlara ilgisinin bulunması ve çeşitli kimyasal maddelerin peroksidaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi gibi çalışmanın ileri aşamalarının gerçekleştirilebilmesi için tek seferde yüksek miktarda peroksidaz saflaştırılması yapıldı.

3mL ile yapılan saflaştırma ile 39mL ile yapılan saflaştırma işleminin saflaştırma oranları 7.4 kat olarak aynı bulunmuştur.

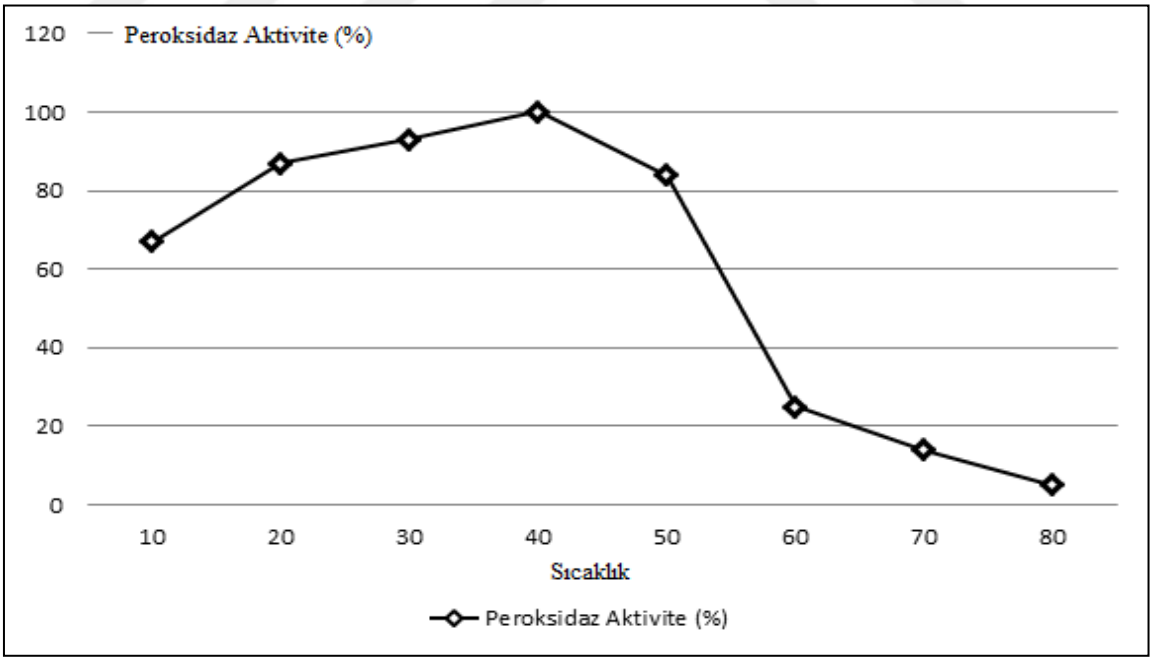
Aktivite geri kazanımı 3mL'de %50 ve 39mL'de %54 olarak belirlenmiştir. Ara fazın yüksek miktarlarda daha etkin bir şekilde ayrılması ve toplanması gözlemlenmiştir. Bu durumun aktivite geri kazanımını arttırdığı görülmüştür.

4.2 TPP YÖNTEMİ İLE SAFLAŞTIRILAN PAZI (*BETA VULGARİS* L. VAR. CİCLA) PEROKSİDAZININ KARAKTERİZASYONU

Çalışmada pazıdan saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın ve pH'nın etkisi incelendi. Aynı aktivite tayin yöntemi kullanılarak peroksidaz enziminin farklı substratlar ile gösterdiği aktiviteler belirlendi. p-fenilen diamin dihidroklorür, o-fenilendiamin dihidroklorür, gayakol, pirogallol ve L-DOPA substratları için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver – Burk grafikleri kullanılarak hesaplandı.

4.2.1 Saflaştırılmış Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

10-80°C aralığında her bir denemede 10 derece sıcaklık artışı gerçekleştirilerek yapılmıştır.Çalışmada pazıdan saflaştırılan peroksidaz için optimum sıcaklık değeri Şekil 4.8'den de görülebileceği gibi 40°C olarak bulunmuştur.



Sıcaklık (°C)	10	20	30	40	50	60	70	80
Peroksidaz Aktivite (%)	67	87	93	100	84	25	14	5

Şekil 4.8: Saflaştırılmış peroksidaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

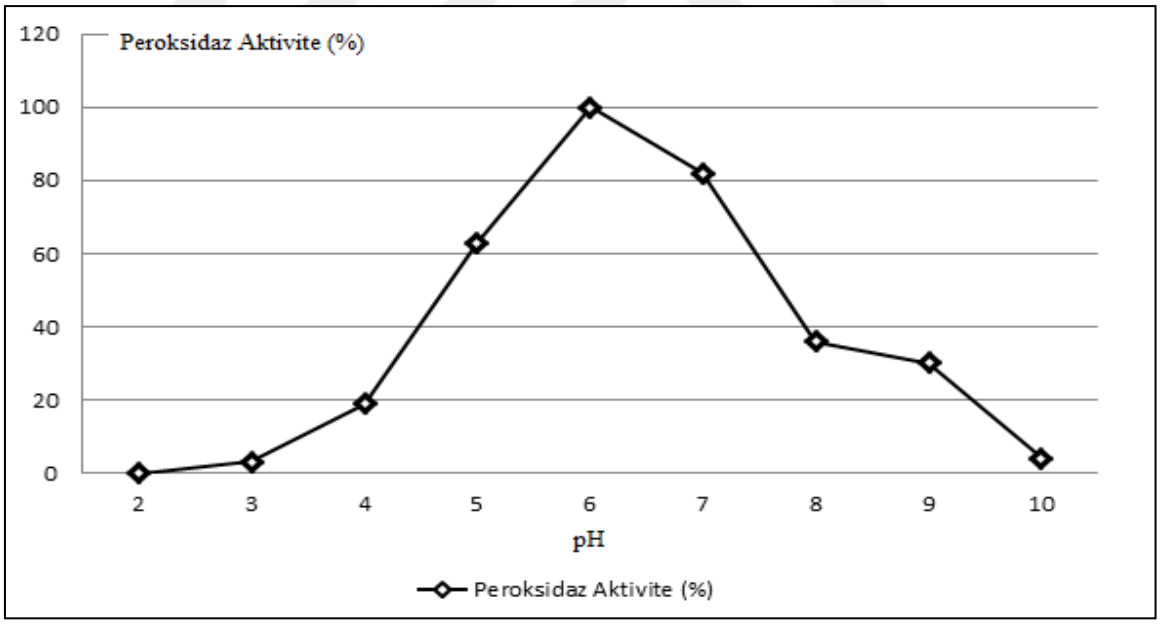
Enzimin sıcaklığa olan dayanıklılığının oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. 10°C'den 70°C'ye kadar enzim aktivite göstermektedir. 20-50°C arasında ise oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

40°C'de gözlenen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve 10°C'de kalan enzim aktivitesi %67, 20°C'de %87, 30°C'de %93, 50°C'de %84, 60°C'de %25 ve 70°C'de %14 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

4.2.2Saflaştırılmış Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Farklı tampon çözelti sistemleri ile pH 2.0 – 10.0 aralığında tampon çözeltiler hazırlandı. Farklı pH değerlerinde hazırlanan bu tampon çözeltilerde çözünen p-Fenilen diamin substratı kullanılarak peroksidaz enziminin optimum pH değeri belirlendi.

Çalışmada pazıdan saflaştırılan peroksidaz enziminin geniş bir pH aralığında aktivite gösterebildiği ancak optimum pH değerinin 6.0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).



pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peroksidaz Aktivite (%)	0	3	19	63	100	82	36	30	4

Şekil 4.9: Saflaştırılmış peroksidaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

Enzimin pH 6.0'da gösterdiği aktivite %100 kabul edilmiş ve pH 3.0 da kalan enzim aktivitesi %3, pH 4.0'da %19, pH 5.0'da %63, pH 7.0'da %82, pH 8.0'da %36 ve pH 9.0'da %30 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

4.2.3 Saflaştırılmış Peroksidaz Aktivitesinin Farklı Substratlar Kullanılarak Belirlenmesi

Akivite tayin yöntemi, 4.6mM p-fenilen diamin dihidroklorür kontrol olarak kullanılarak farklı substratlar için tekrarlandı. Şeffaf homojen çözelti oluşturan tüm substratlar ile peroksidaz aktivitesi tayin edildi.

o-fenilendiamin dihidroklorür, p-fenilendiamin dihidroklorür, gayakol, pirogallol, katekol, 4-metil katekol, L-DOPA substratlarının peroksidaz reaksiyonu sonucunda mor-kahverengi veya şeffaf renk verdiği belirlenirken o-dianisidin dihidroklorür substratının sarı renk verdiği belirlendi.

Tablo 4.2: Farklı substratlar kullanılarak belirlenen peroksidaz aktiviteleri.

Substratın Adı	Bağıl Aktivite (%)
p-Fenilendiamin dihidroklorür	100
o-Fenilendiamin dihidroklorür	48,6
Gayakol	30,2
Pirogallol	29.1
L-DOPA	13,7
4-Metil katekol	3,7
Katekol	2,6
o-Dianisidin dihidroklorür	179,2

485nm'de spektrofotometrik aktivite tayini sonucunda sarı renk veren o-dianisidin dihidroklorür substratının kontrolden yüksek absorbans ve aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer substratlar kontolden düşük absorbans ve aktivite göstermiştir.

p-Fenilendiamin dihidroklorür ve o-fenilendiamin dihidroklorür substratlarının aktiviteleri incelendiğinde bağlı grupların pozisyonlarına göre p- pozisyonunda aktivitenin o-pozisyonuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).

4.2.4 Saflaştırılmış Peroksidazın Farklı Substratlar İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Pazı peroksidazı birçok farklı substrata karşı aktivite göstermektedir. Ancak her substrata karşı farklı aktivite gösterdiği yukarıda belirtilmiştir. K_m ve V_{max} değerleri bir enzimin substratına olan ilgisini ve başlangıç hızını gösteren önemli parametrelerdir.

Bu amaçla pazı peroksidazının, peroksidazlar için bilinen substratlarına karşı olan K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Saflaştırma denemelerde aktivite tayini için kullanılan p-fenilendiamin dihidroklorür o-fenilendiamin dihidroklorür, gayakol, pirogallol ve L-DOPA için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

4.2.4.1 Saflaştırılmış Peroksidazın p-Fenilendiamin Dihidroklorür Substratı İçin Km ve Vmax Değerinin Belirlenmesi

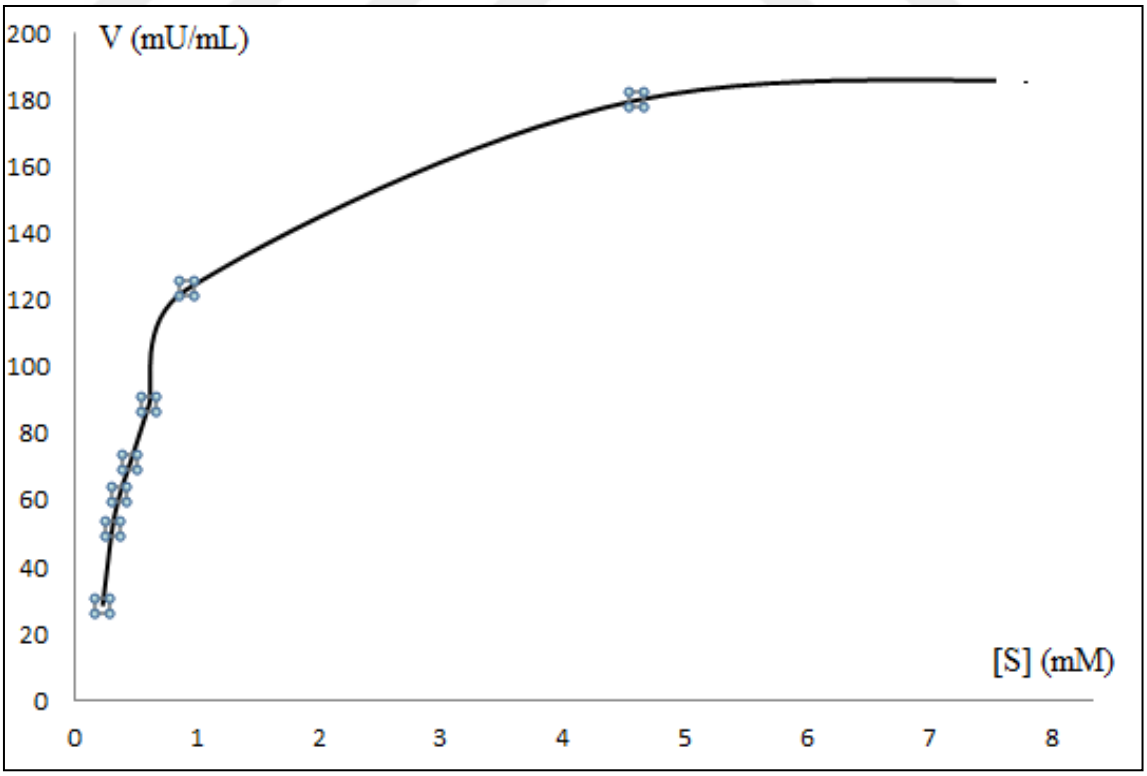
p-Fenilendiamin dihidroklorür ve o-fenilendiamin dihidroklorür substratları için 4.6mM substrat konsantrasyonu N olarak kabul edildi. Buna bağlı olarak N/20, N/15, N/12.5, N/10, N/7.5, N/5 seyreltmeleri yapılarak peroksidaz aktivite tayini denemeleri yapıldı.

Kontrol denemeleri için 180 mU/mL aktiviteye sahip peroksidaz enzimi kullanıldı, p-Fenilendiamin dihidroklorür substatının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim ünitesi Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Aktivite değerleri V, substrat konsantrasyonu [S] olarak belirlendi.

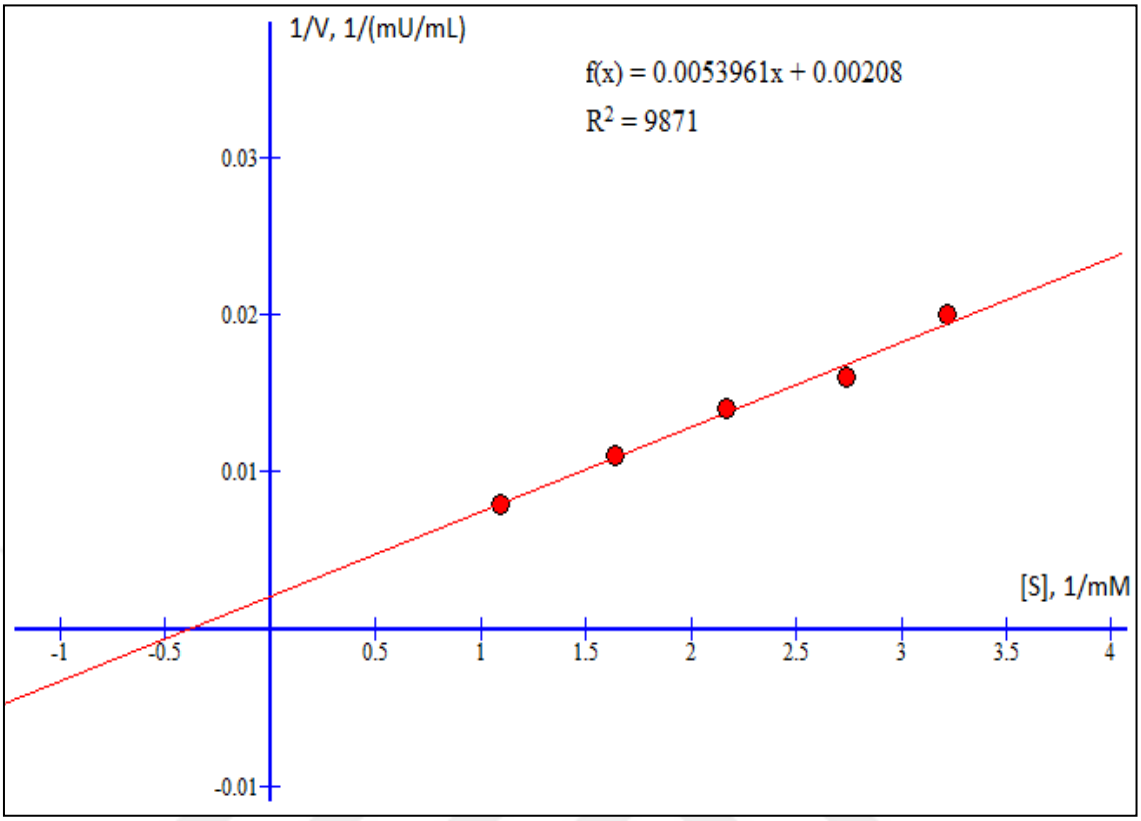
Elde edilen Michaelis – Menten grafiği Şekil 4.10'da ve Lineweaver – Burk grafiği Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: p-Fenilendiamin dihidroklorür Substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi.

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (mU/mL)
0.23	28.33
0.31	51.66
0.37	61.66
0.46	71.66
0.61	88.33
0.92	123.33
4.6	180.00



Şekil 4.10 p-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Michaelis – Menten grafiği.



Şekil 4.11: p-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Lineweaver – Burk grafiği.

Yukarıdaki grafiğin denkleminden elde edilen $-1/K_m$ ve $1/V_{max}$ değerleri sırasıyla -0.385 ve 0.00208 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bağlı olarak;

K_m değeri = **2.597**mM ve V_{max} değeri = **480.800**mU olarak bulunmuştur.

4.2.4.2 Saflaştırılmış Peroksidazın o-Fenilendiamin Dihidroklorür Substratı İçin Km ve Vmax Değerinin Belirlenmesi

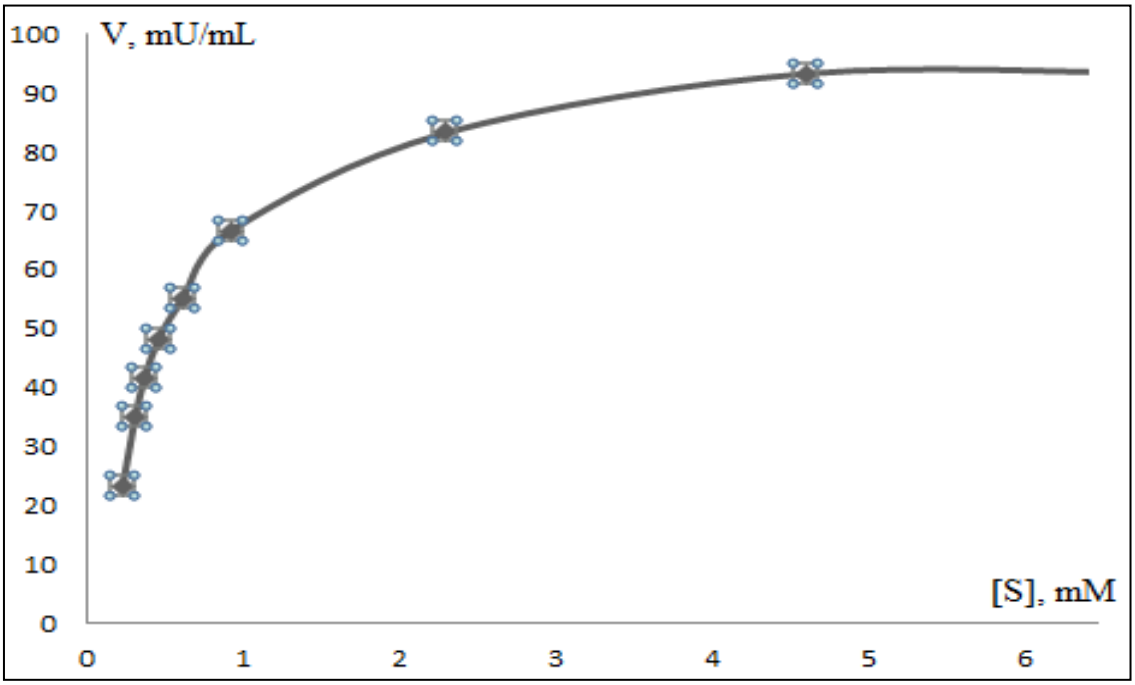
Kontrol denemeleri için 186.66mU/mL aktiviteye sahip peroksidaz enzimi kullanıldı.

o-Fenilendiamin dihidroklorür substatının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim ünitesi Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

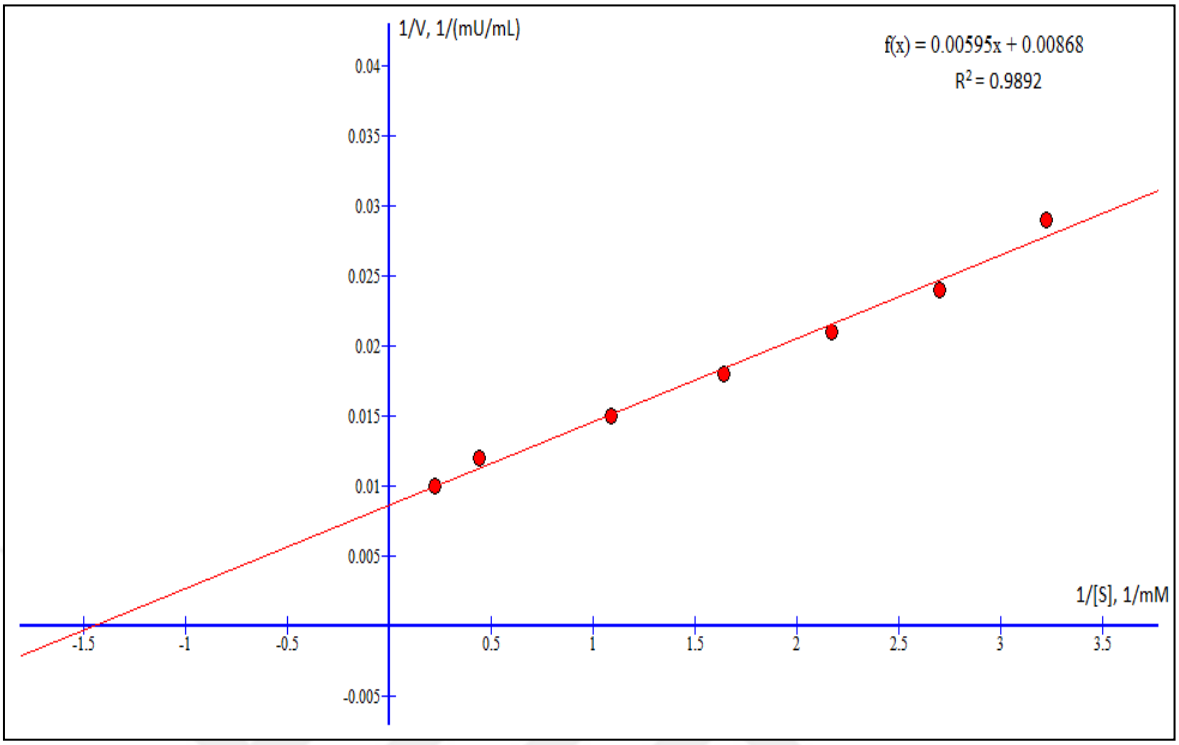
Aktivite değerleri V, substrat konsantrasyonu [S] olarak belirlendi. Elde edilen Michaelis – Menten grafiği Şekil 4.12'da ve Lineweaver – Burk grafiği Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: o-Fenilendiamin dihidroklorür substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi.

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (mU/mL)
0.23	23.33
0.31	35.00
0.37	41.66
0.46	48.33
0.61	55.00
0.92	66.67
2.3	83.33
4.6	93.33



Şekil 4.12: o-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Michaelis – Menten grafiği.



Şekil 4.13: o-Fenilendiamin dihidroklorür substratı için Lineweaver – Burk grafiği.

Yukarıdaki grafiğin denkleminden elde edilen $-1/K_m$ ve $1/V_{max}$ değerleri sırasıyla 1.459 ve 0.00868 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bağlı olarak;

K_m değeri = **0.685**mM ve V_{max} değeri = **115.242**mU olarak bulunmuştur.

4.2.4.3Saflaştırılmış Peroksidazın Gayakol Substratı İçin Km ve Vmax Değerinin Belirlenmesi

Gayakol substratı için N/15, N/12.5, N/10, N/7.5, N/5, N/2 seyreltmeleri yapılarak peroksidaz aktivite tayini denemeleri yapıldı.

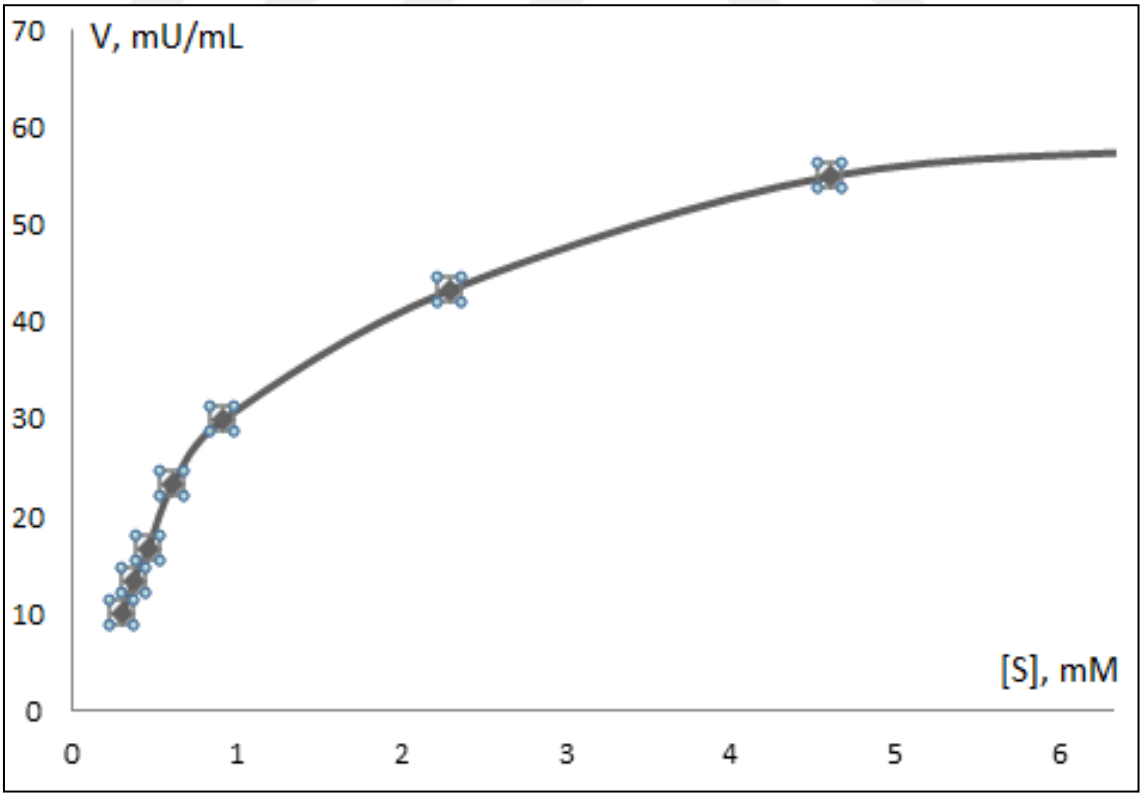
Kontrol denemeleri için 183.33mU/mL aktiviteye sahip peroksidaz enzimi kullanıldı.

Gayakol substatının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim ünitesi Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

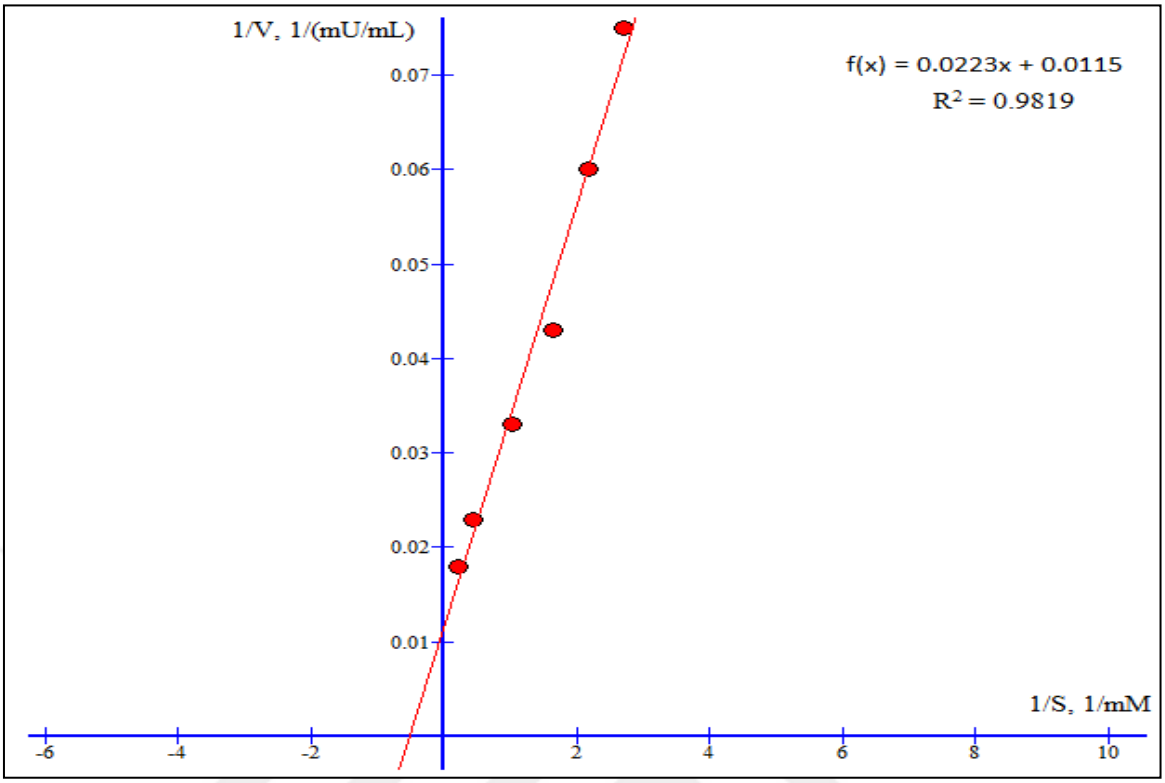
Aktivite değerleri V, substrat konsantrasyonu [S] olarak belirlendi. Elde edilen Michaelis – Menten grafiği Şekil 4.14'da ve Lineweaver – Burk grafiği Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Gayakol substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi.

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (mU/mL)
0.31	10.00
0.37	13.33
0.46	16.66
0.61	23.33
0.92	30.00
2.3	43.33
4.6	55.00



Şekil 4.14 Gayakol substratı için Michaelis – Menten grafiği.



Şekil 4.15: Gayakol substratı için Lineweaver – Burk grafiği.

Yukarıdaki grafiğin denkleminden elde edilen $-1/K_m$ ve $1/V_{max}$ değerleri sırasıyla -0.516 ve 0.0115 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bağlı olarak;

K_m değeri = **1.938**mM ve V_{max} değeri = **86.957**mU olarak bulunmuştur.

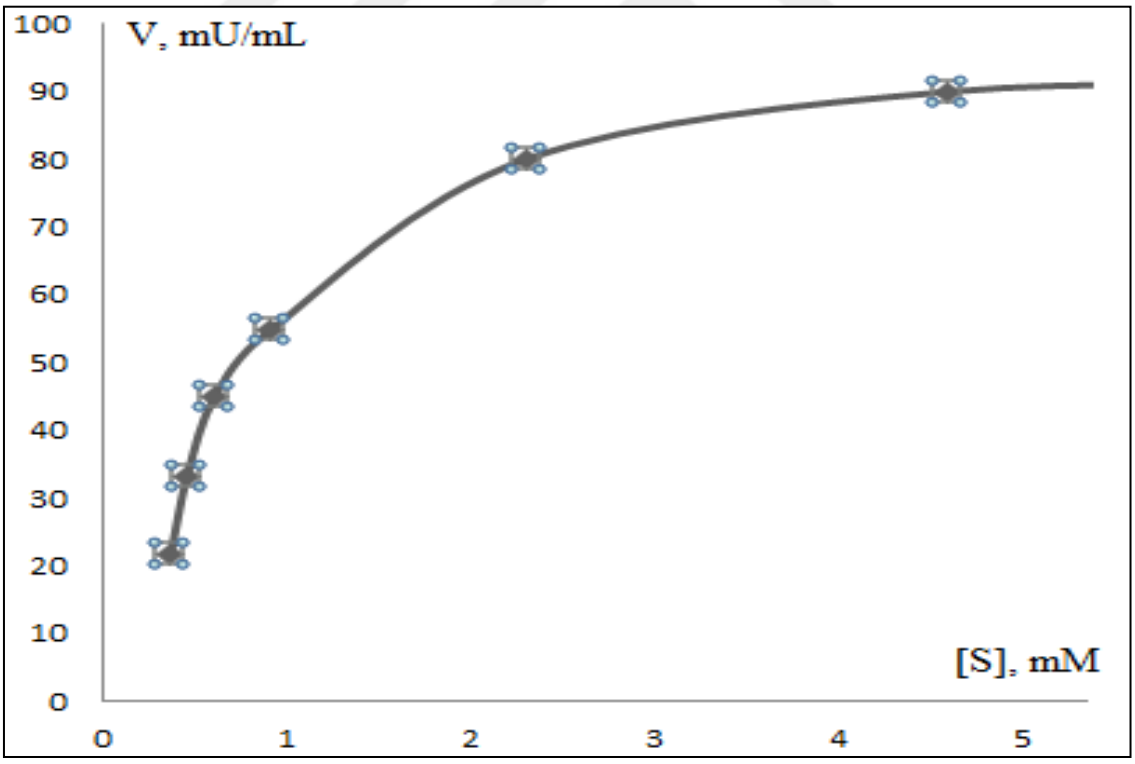
4.2.4.4 Saflaştırılmış Peroksidazın Pirogallol Substratı İçin Km ve Vmax Değerinin Belirlenmesi

Pirogallol substratı için N/12.5, N/10, N/7.5, N/5, N/2 seyreltmeleri yapılarak peroksidaz aktivite tayini denemeleri yapıldı. Kontrol denemeleri için 180.00mU/mL aktiviteye sahip peroksidaz enzimi kullanıldı.

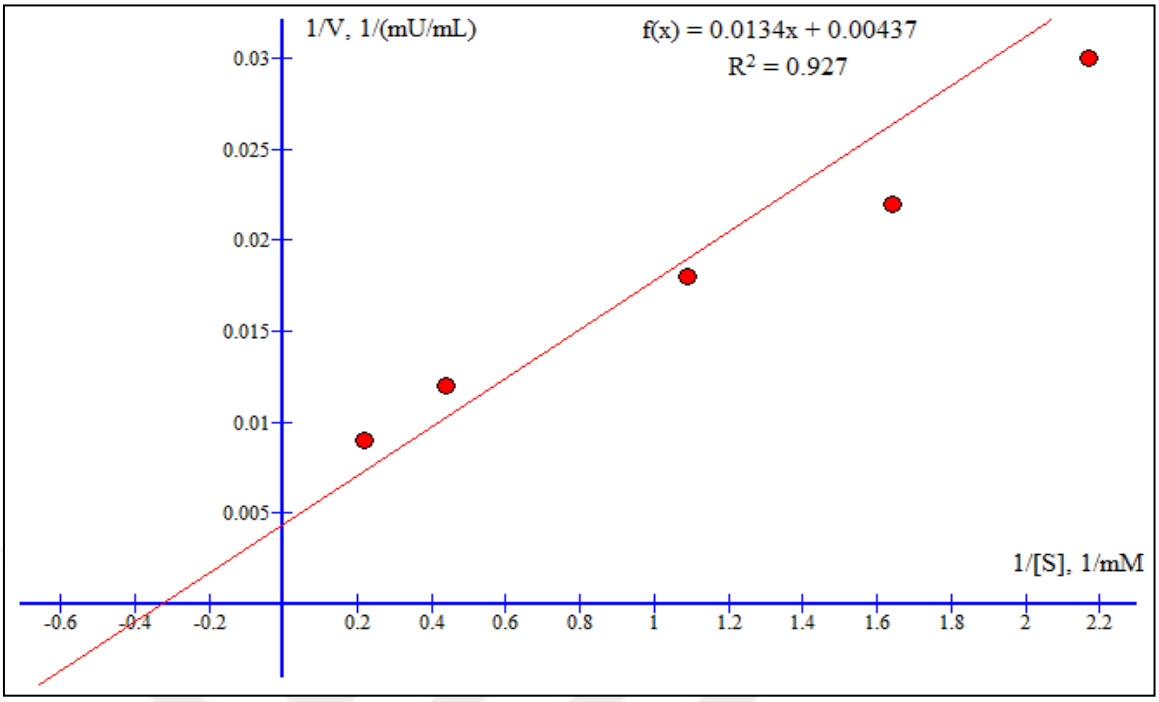
Pirogallol substatının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim ünitesi Tablo 4.6'de gösterilmiştir. Aktivite değerleri V, substrat konsantrasyonu [S] olarak belirlendi. Elde edilen Michaelis – Menten grafiği Şekil 4.16'da ve Lineweaver – Burk grafiği Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Pirogallol substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi.

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (mU/mL)
0.37	21.67
0.46	33.33
0.61	45.00
0.92	55.00
2.3	85.00
4.6	90.00



Şekil 4.16: Pirogallol substratı için Michaelis – Menten grafiği.



Şekil 4.17: Pirogallol substratı için Lineweaver – Burk grafiği.

Yukarıdaki grafiğin denkleminden elde edilen $-1/K_m$ ve $1/V_{max}$ değerleri sırasıyla -0.326 ve 0.00437 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bağlı olarak;

K_m değeri = **3.067**mM ve V_{max} değeri = **228.833**mU olarak bulunmuştur.

4.2.4.5 Saflaştırılmış Peroksidazın L-DOPA Substratı İçin Km ve Vmax Değerinin Belirlenmesi

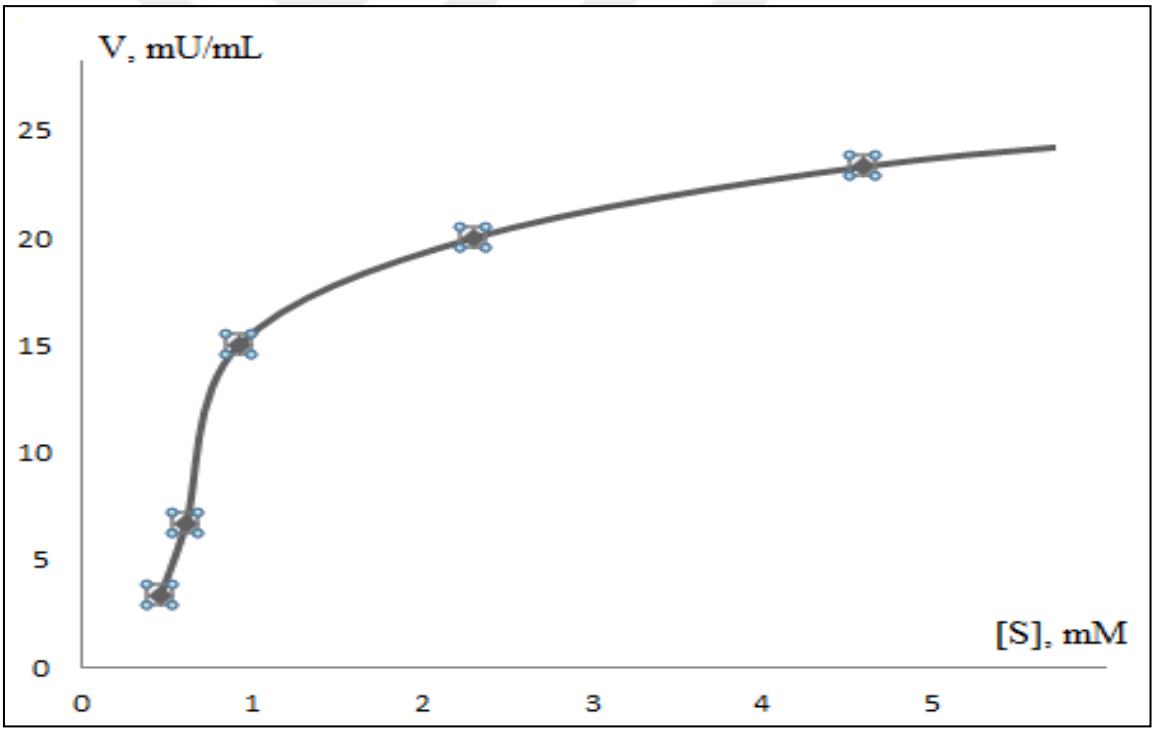
L-DOPA substratı için N/10, N/7.5, N/5, N/2 seyreltmeleri yapılarak peroksidaz aktivite tayini denemeleri yapıldı.

Kontrol denemeleri için 180.00mU/mL aktiviteye sahip peroksidaz enzimi kullanıldı.

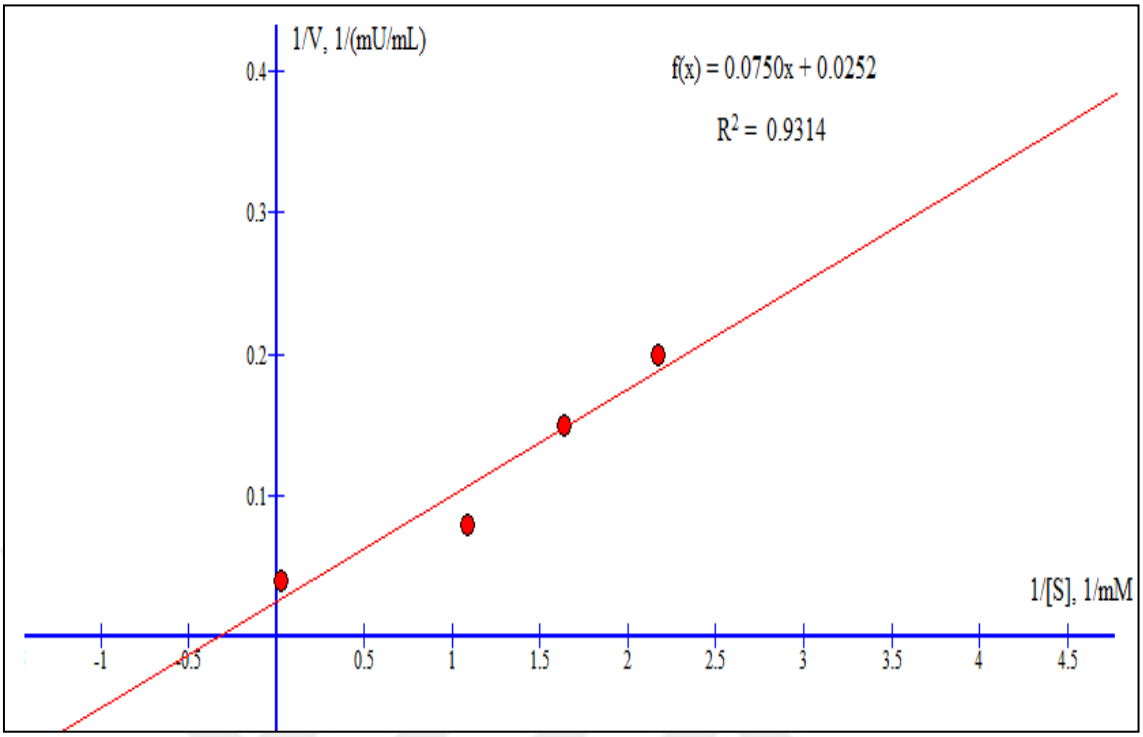
L-DOPA substatının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim ünitesi Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Aktivite değerleri V, substrat konsantrasyonu [S] olarak belirlendi. Elde edilen Michaelis – Menten grafiği Şekil 4.18'de ve Lineweaver – Burk grafiği Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.7 L-DOPA substratının farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen peroksidaz aktivitesi.

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (mU/mL)
0.46	5.00
0.61	6.66
0.92	15.00
2.3	20.00
4.6	23.33



Şekil 4.18: L-DOPA substratı için Michaelis – Menten grafiği.



Şekil 4.19:L-DOPA substratı için Lineweaver – Burk grafiği.

Yukarıdaki grafiğin denkleminden elde edilen $-1/K_m$ ve $1/V_{max}$ değerleri sırasıyla -0.336 ve 0.0252 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bağlı olarak;

K_m değeri = **2.976**mM ve V_{max} değeri = **39.683**mU olarak bulunmuştur.

Tablo 4.8: Peroksidaz için çeşitli substratların K_m ve V_{max} değerleri.

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (mU)
p - Fenilendiamin	2.597	480.800
o- Fenilendiamin	0.685	115.242
Gayakol	1.938	86.957
Pirogallol	3.067	228.833
L-DOPA	2.976	39.683

Pazıdan saflaştırılan peroksidaz enzimi en yüksek V_{max} değerini p-fenilendiamin substratına, en düşük K_m değerini ise o-fenilendiamin substratına karşı göstermiştir (Tablo 4.8).

4.3 TPP YÖNTEMİ İLE SAFLAŞTIRILAN PAZI (*BETA VULGARİS* L. VAR. CİCLA) PEROKSİDAZININ İNHİBİSYONU

Pazıdan saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine bazı inorganik ve organik maddelerin etkisi incelendi. İnhibitör etki gösteren bazı kimyasalların IC_{50} değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.

4.3.1 TPP Yöntemi ile Saflaştırılan Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) Peroksidazı Aktivitesi Üzerine Bazı İnorganik Maddelerin Etkisi

Potasyum klorür, sodyum klorür, potasyum florür, sodyum florür, magenzyum klorür, kalsiyum klorür, alüminyum (III) klorür, krom (III) klorür, demir (III) klorür, potasyum siyanür, potasyum tiyosiyanat, sodyum azid, sodyum selenat, bakır (II) klorür, sodyum bisülfit, kadmiyum (II) klorür ve vanadyum (III) klorür bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Bazı bileşiklerin aktivite çözeltisine ilavesi ile renk oluşumu gözlenmiştir. Bazılarının ise özellikle yüksek konsantrasyonlarda küvet içinde şeffaflığın bozulması ve absorbansın okunamamasına sebep olduğu görülmüştür. Tablo 4.9'da görülen X değerleri o konsantrasyonlarda yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı inhibisyon yüzdesinin belirlenemediği anlamına gelmektedir.

Tablo 4.9'da görüldüğü üzere, belirtilen konsantrasyonlarda, aynı katyonları içeren (Na^+ ve K^+) florürler, klorürlere oranla pazıdan saflaştırılan peroksidazı daha fazla inhibe etmektedir. $CuCl_2$ ve $ZnCl_2$'nin pazı peroksidazı aktivitesi üzerinde bir değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür. Diğer +2 değerlikli Ca, Mg ve Cd metallerin klorürlerinin pazı peroksidazı aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği gözlenmiştir. +3 değerlikli Al ve Cr metallerinin klorürlerinin pazı peroksidazı aktivitesi üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu ve Vanadyum (III) klorürün pazı peroksidazını tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. $FeCl_3$ bileşiğinin pazı peroksidazı aktivitesinde artmaya sebep olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.9: Bazı inorganik bileşiklerin peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.

Bileşiğin Adı	Derişime Bağlı İnhibisyon (%)				
	Derişim (2.5mM)	Derişim (5mM)	Derişim (10mM)	Derişim (20mM)	Derişim (50mM)
Potasyum klorür	0	1.4	4.2	5.6	9.8
Sodyum klorür	0	1.2	3.4	6.8	8.0
Potasyum florür	0	3.5	7.0	8.9	11.6
Sodyum florür	0	4.7	7.0	10.4	12.3
Magnezyum klorür	4.8	10.3	17.5	21.7	X
Kalsiyum klorür	1.3	4.0	6.7	14.7	X
Alüminyum (III) klorür	5.0	7.5	10.1	14.9	X
Krom (III) klorür	7.3	12.3	17.1	X	X
Demir (III) klorür*	2.8	6.9	8.3	X	X
Bakır (II) klorür	0	0	0	0	X
Çinko (II) klorür	0	0	0	0	X
Kadmiyum (II) klorür	4.6	9.1	11.4	25.0	X
Vanadyum (III) klorür	100	100	100	100	100
Potasyum siyanür	88.9	94.2	100	100	100
Potasyum tiyosiyanat	5.6	11.1	15.3	15.3	X
Sodyum bisülfit	94.3	96.0	100	100	100
Sodyum azid	0	9.4	12.0	14.7	18.7
Sodyum selenat	0	2.9	5.8	8.6	12.8

*Demir (III) klorür pazı peroksidazı üzerinde aktivatör etki göstermiştir.

Potasyum siyanürün pazı peroksidazını tamamen inhibe edebildiği, potasyum tiyosiyanatın çok daha zayıf inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Sodyum bileşiklerinden sodyum bisülfit pazı peroksidazını tamamen inhibe edebilirken sodyum azid ve sodyum selenatın daha zayıf inhibisyon gösterdikleri gözlenmiştir (Tablo 4.9).

4.3.2 TPP Yöntemi ile Saflaştırılan Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) Peroksidazı Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Maddelerin Etkisi

Glutatyon, ß-merkapto etanol, sistein klorür, 1,4-ditiyoeritritol, metiyonin, benzoik asit, aspartik asit, askorbik asit, trikloro asetik asit, glutamik asit organik bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10: Bazı organik bileşiklerin peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.

Bileşiğin Adı	Derişime Bağlı İnhibisyon (%)					
	Derişim (1mM)	Derişim (2.5mM)	Derişim (5mM)	Derişim (10mM)	Derişim (20mM)	Derişim (50mM)
Glutatyon	87.5	89.6	91.7	100	100	100
ß-merkapto etanol	85.4	91.7	100	100	100	100
Sistein klorür	100	100	100	100	100	100
1,4-ditiyoeritritol	94.6	97.3	100	100	100	100
Metiyonin	0	3.0	5.9	7.6	9.2	X
Benzoik asit	0	3.8	7.7	11.6	17.3	X
Aspartik asit	0	3.8	7.7	15.4	17.3	X
Askorbik asit	97.3	100	100	100	100	100
Trikloroasetik asit	0	0	4.3	10.4	10.4	14.6
Glutamik asit	0	0	0	2.3	8.4	12.5

Tablo 4.10'da görüldüğü gibi, belirtilen konsantrasyonlarda, SH fonksiyonel grubu içeren glutatyon, ß-merkapto etanol, sistein klorür ve 1,4-ditiyoeritritol bileşiklerinin pazı

peroksidazını tamamen inhibe edebildiği ancak SH grubu yerine S-CH_3 grubu içeren metiyoninin çok daha zayıf inhibisyona sebep olduğu gözlenmiştir.

Benzoik asit, aspartik asit, trikloro asetik asit ve glutamik asit bileşiklerinin pazı peroksidazı aktivitesi üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu, askorbik asitin ise pazı peroksidazı aktivitesini çalışılan konsantrasyonda tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir.

4.4 BAZI PEROKSİDAZ İNHİBİTÖRLERİNİN IC_{50} DEĞERLERİNİN VE İNHİBİSYON TÜRÜNÜN BELİRLENMESİ

Peroksidaz aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi gösteren glutatyon, ß-merkaptoetanol, 1,4-ditiyoeritritol, askorbik asit, potasyum siyanür ve sodyum bisülfit bileşiklerinin IC_{50} değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi.

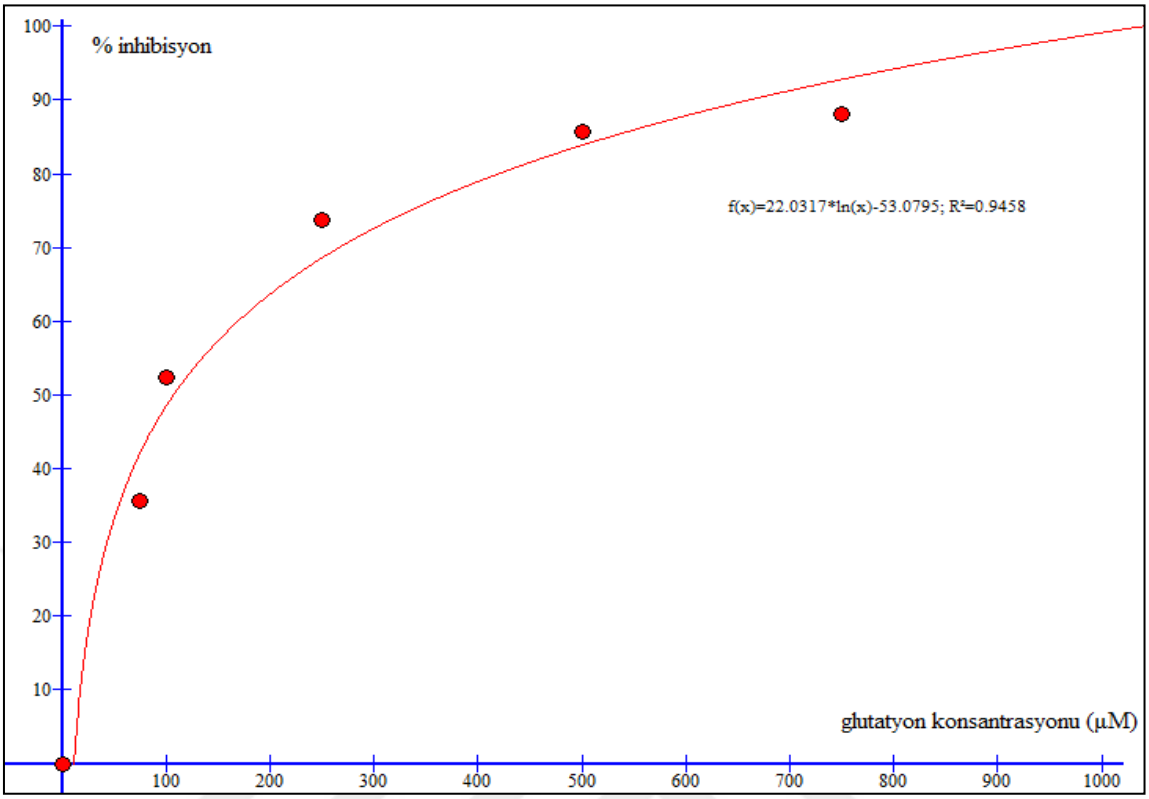
4.4.1 Glutatyonun IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Tablo 4.10' da görüldüğü gibi glutatyonun 10mM konsantrasyonu pazı peroksidazını tamamen inhibe etmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda IC_{50} taraması yapılmış ve inhibisyon yüzdesi – inhibitör konsantrasyonu grafiği çizilmiştir.

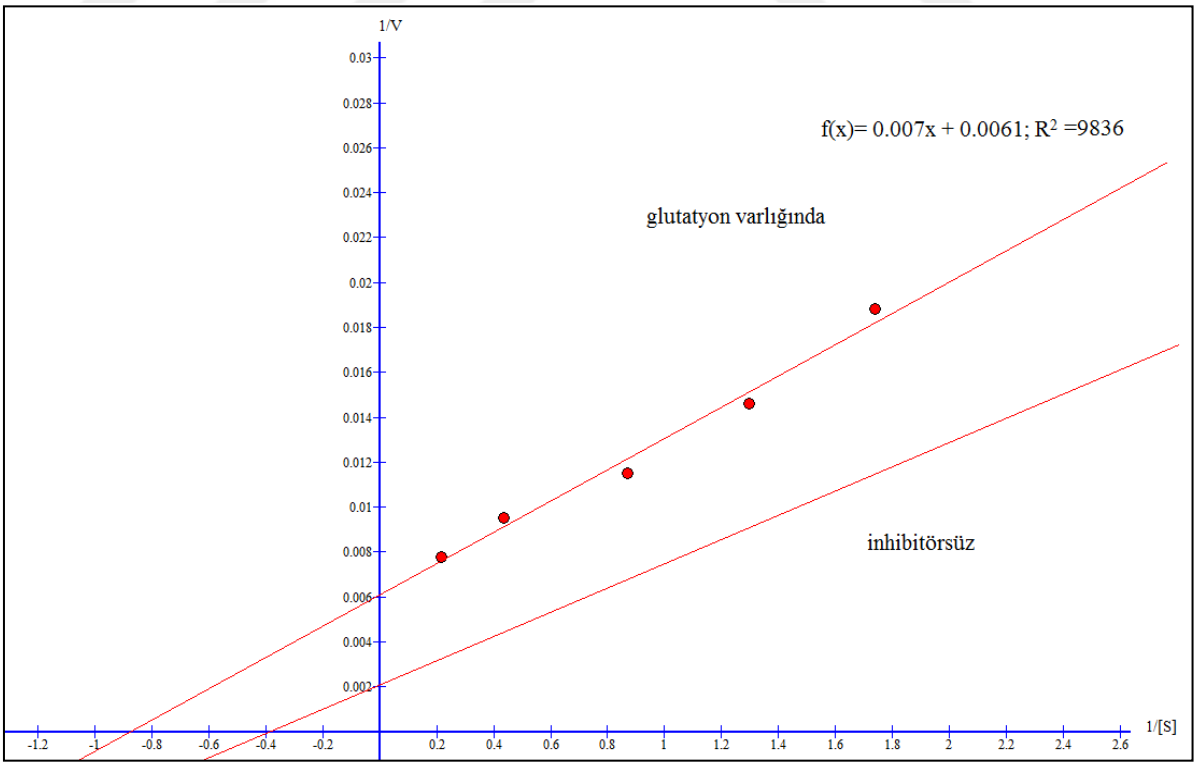
Şekil 4.20' de glutatyon konsantrasyonu ve % inhibisyon arasındaki ilişki gösterilmiştir. Elde edilen denklemden **IC_{50} değeri 98 µm** olarak belirlenmiştir.

İnhibitörsüz ve 98 µm glutatyon varlığında farklı substrat konsantrasyonları ile peroksidaz aktivite tayini deneyleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile Lineweaver – Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerlerindeki değişmeler incelenerek inhibisyon türüne karar verildi.

Şekil 4.21' de inhibitörsüz ve 98 µm glutatyon varlığıda Lineweaver- Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



Şekil 4.20: Glutatyon konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki.



Şekil 4.21: Glutatyon varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim.

Şekil 4.21'deki Lineweaver – Burk grafiği incelendiğinde ortamda 98 µm glutatyon varlığında **Km = 1.148**mMve**V_{max} = 163.934**mU değerleri gözlenmektedir. Bu değerler ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **K_m = 2.597**mM ve **V_{max} = 480.800**mU değerlerinden daha küçüktür.

Karışık inhibisyonda inhibitör madde hem Km hem de Vmax değerine etki etmektedir. Glutatyon bir tiyol tipi inhibitördür ve pazı peroksidazının p-fenilendiamin substratına gösterdiği Km ve Vmax değerlerinin ikisini birden etkilemiştir. Bu etki neredeyse aynı oranda olduğundan Lineweaver – Burk grafiklerinde birbirine paralele yakın iki doğrunun oluşmasına sebep olmuştur.

Bu sebepler ile glutatyonun pazı peroksidazı üzerindeki inhibitör etkisinin **karışık – yarı-yarışmalı inhibisyon** olduğu belirlenmiştir.

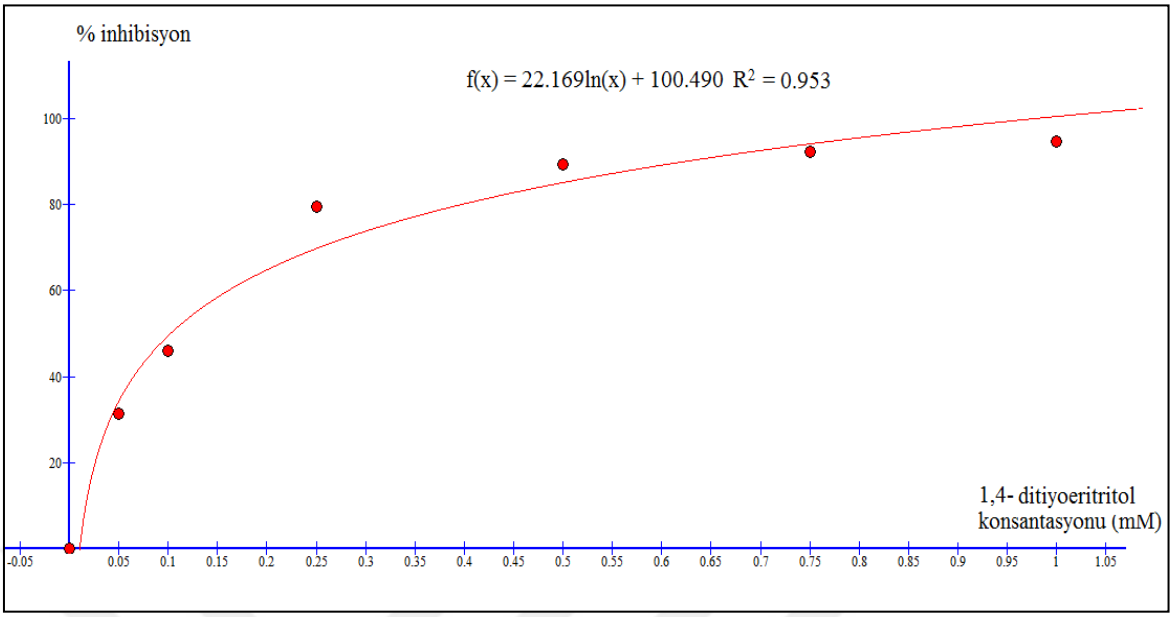
4.4.2 1,4-Ditiyoeritritolün IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Tablo 4.8' de görüldüğü gibi 1,4-ditiyoeritritolün 5mM konsantrasyonu pazı peroksidazını tamamen inhibe etmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda IC_{50} taraması yapılmış ve inhibisyon yüzdesi – inhibitör konsantrasyonu grafiği çizilmiştir.

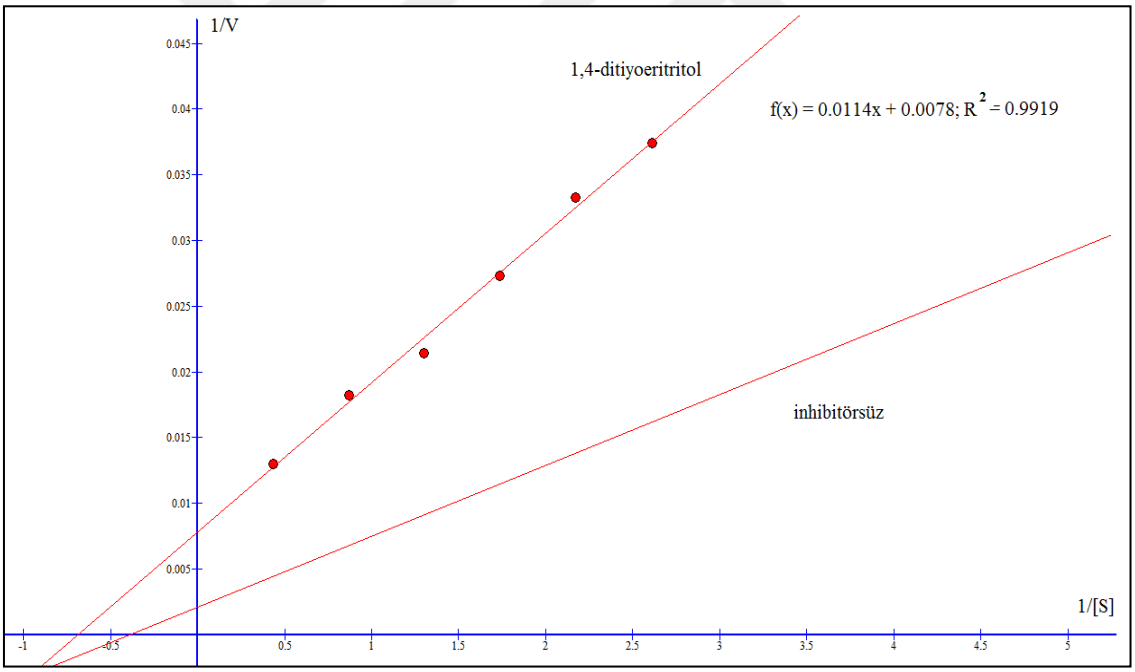
Şekil 4.22' de 1,4-ditiyoeritritol konsantrasyonu ve % inhibisyon arasındaki ilişki gösterilmiştir. Elde edilen denklemden **IC_{50} değeri 103µm** olarak belirlenmiştir.

İnhibitörsüz ve 103µm 1,4-ditiyoeritritol varlığında farklı substrat konsantrasyonları ile peroksidaz aktivite tayini deneyleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile Lineweaver – Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerlerindeki değişmeler incelenerek inhibisyon türüne karar verildi.

Şekil 4.23' de inhibitörsüz ve 103µm 1,4-ditiyoeritritol varlığıda Lineweaver- Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



Şekil 4.22:1,4-Ditiyoeritritol konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki.



Şekil 4.23:1,4-Ditiyoeritritol varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim.

Şekil 4.23'deki Lineweaver – Burk grafiği incelendiğinde ortamda 103µm1,4-ditiyoeritritol varlığında **Km = 1.461**mMve**V_{max} = 128.205**mU değerleri gözlenmektedir. Bu değerler ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **K_m = 2.597**mM ve **V_{max} = 480.800**mU değerlerinden daha küçüktür.

Karışık inhibisyonda inhibitör madde hem Km hem de Vmax değerine etki etmektedir. 1,4-ditiyoreritritol de bir tiyol tipi inhibitördür ve pazı peroksidazının p-fenilen diamin substratına gösterdiği Km ve Vmax değerlerinin ikisini birden etkilemiştir. Bu sebeple 1,4-ditiyoeritritolün pazı peroksidazı üzerindeki inhibitör etkisinin **karışık inhibisyon** olduğu belirlenmiştir.

Daha önce yaban turbu peroksidazı üzerinde yapılan çalışmalar sonucu tiyol tipi inhibitörlerin aynı şekilde karışık – yarı-yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur (Sariri ve diğ., 2006). Bu bağlamda sonuçlar literatür ile uyumludur.

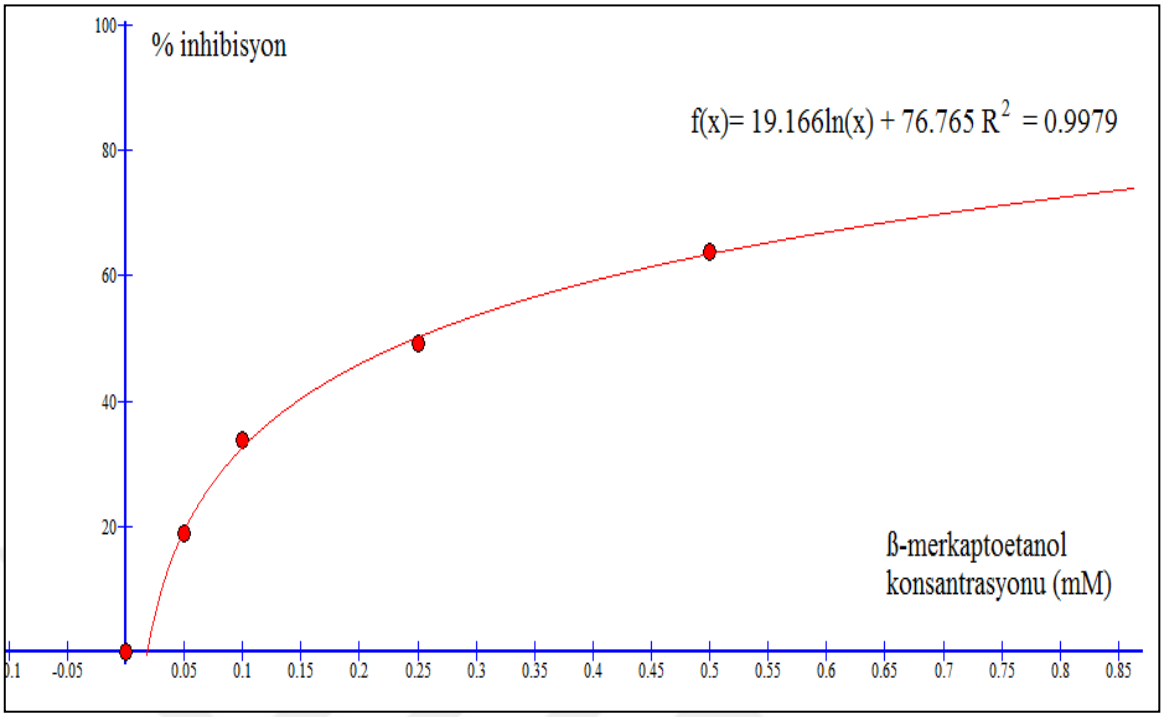
4.4.3 ß-Merkaptoetanolün IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Tablo 4.8' de görüldüğü gibi ß-merkaptoetanolün 5mM konsantrasyonu pazı peroksidazını tamamen inhibe etmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda IC_{50} taraması yapılmış ve inhibisyon yüzdesi – inhibitör konsantrasyonu grafiği çizilmiştir.

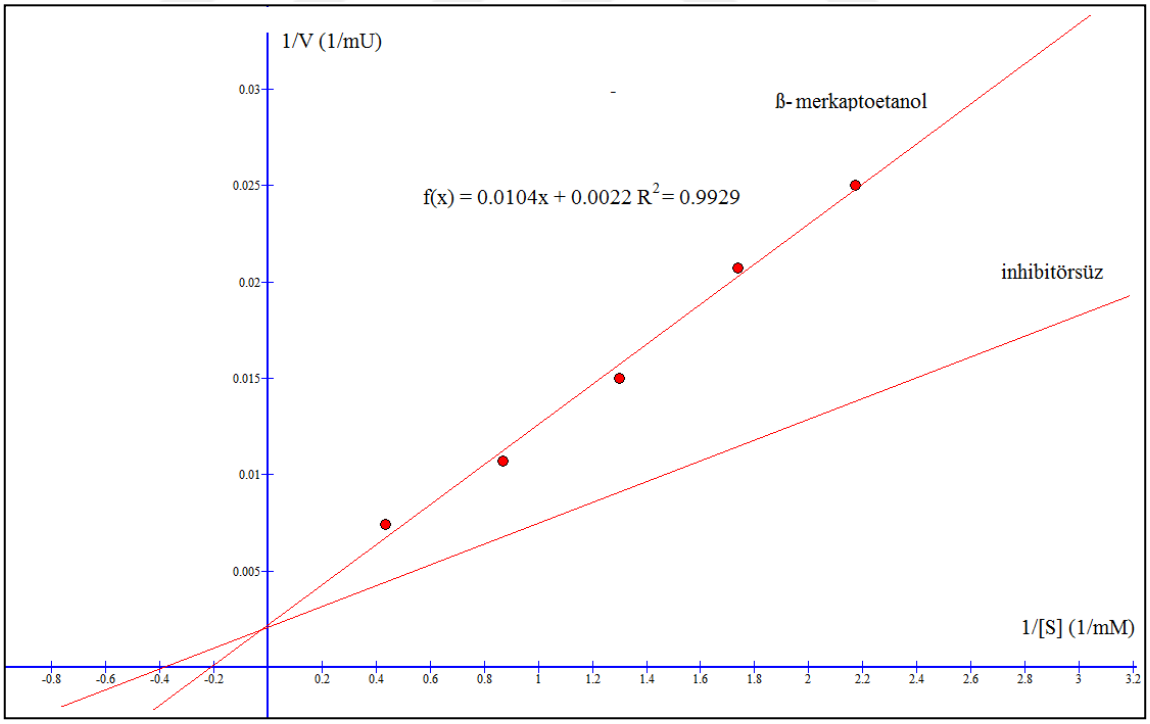
Şekil 4.24' de ß-merkaptoetanol konsantrasyonu ve % inhibisyon arasındaki ilişki gösterilmiştir. Elde edilen denklemden **IC_{50} değeri 248µm** olarak belirlenmiştir.

İnhibitörsüz ve 248µm ß-merkaptoetanol varlığında farklı substrat konsantrasyonları ile peroksidaz aktivite tayini deneyleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile Lineweaver – Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerlerindeki değişmeler incelenerek inhibisyon türüne karar verildi.

Şekil 4.25' de inhibitörsüz ve 103µm 1,4-ditiyoeritritol varlığıda Lineweaver- Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



Şekil 4.24:ß-Merkaptoetanol konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki.



Şekil 4.25:ß-Merkaptoetanol varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim.

Şekil 4.25'deki Lineweaver – Burk grafiği incelendiğinde ortamda 248 µm ß-merkapto etanol varlığında **Km = 4.717**mM ve $\mathbf{V_{max}}$ **= 454.545**mU değerleri gözlenmektedir. K_m

değeri ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **K_m = 2.597**mM değerinde büyük ve V_{max} değeri ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **V_{max} = 480.800**mU değerlerine yakındır.

Yarışmalı inhibisyon tipinde K_m değeri artarken V_{max} değerinde değişme gözlenmez. ß-Merkaptoetanol bir tiyol ve alkol tipi inhibitördür ve pazı peroksidazının p-fenilen diamin substratına gösterdiği Km ve Vmax değerlerinden K_m'yi arttırırken V_{max}'a çok az etki etmiştir. Bu sebeple ß-merkaptoetanolün pazı peroksidazı üzerindeki inhibitör etkisinin **yarışmalı inhibisyon** olduğu belirlenmiştir.

ß-merkaptoetanolün –OH grupları enzimin aktif merkezi için substrat ile yarışmaktadır. Bu yüzden tiyol grubunun gösterdiği karışık inhibisyon türü değil, alkol grubunun gösterdiği yarışmalı inhibisyon türü daha baskındır.

Daha önce yaban turbu peroksidazı üzerinde yapılan çalışmalar sonucu tiyol ve alkol tipi inhibitörlerin aynı şekilde yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur (Sariri ve diğ., 2006-2). Bu bağlamda sonuçlar literatür ile uyumludur.

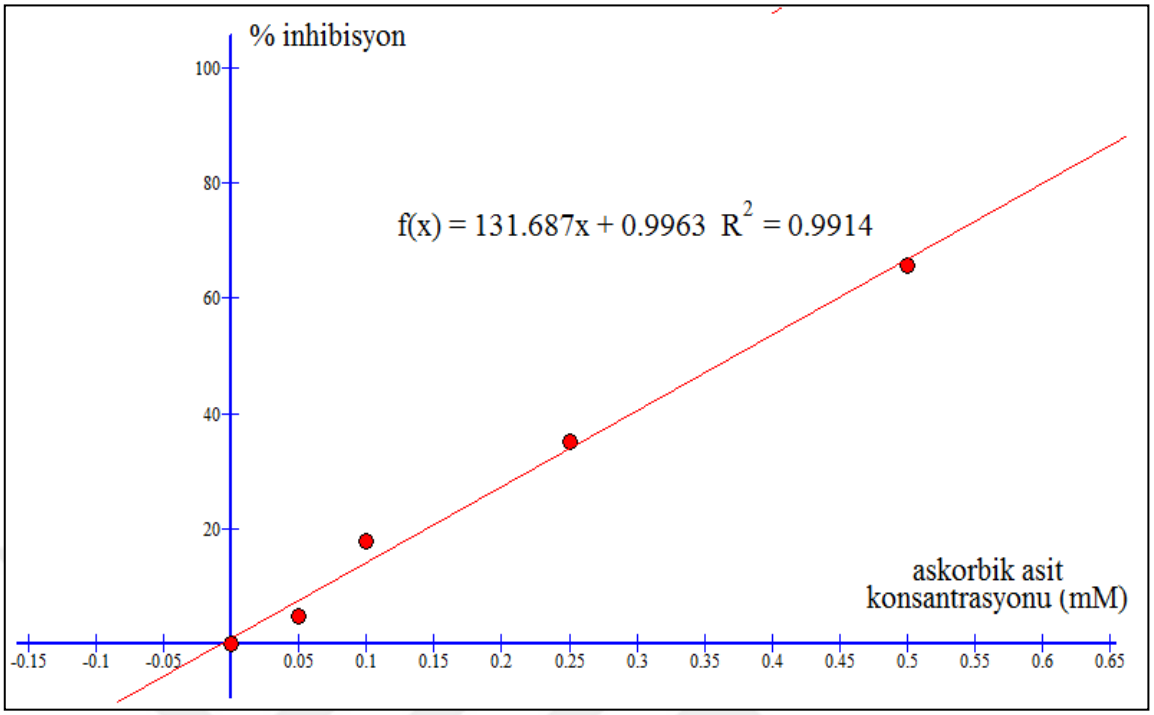
4.4.4 Askorbik Asitin IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Tablo 4.8' de görüldüğü gibi askorbik asitin 2.5mM konsantrasyonu pazı peroksidazını tamamen inhibe etmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda IC_{50} taraması yapılmış ve inhibisyon yüzdesi – inhibitör konsantrasyonu grafiği çizilmiştir.

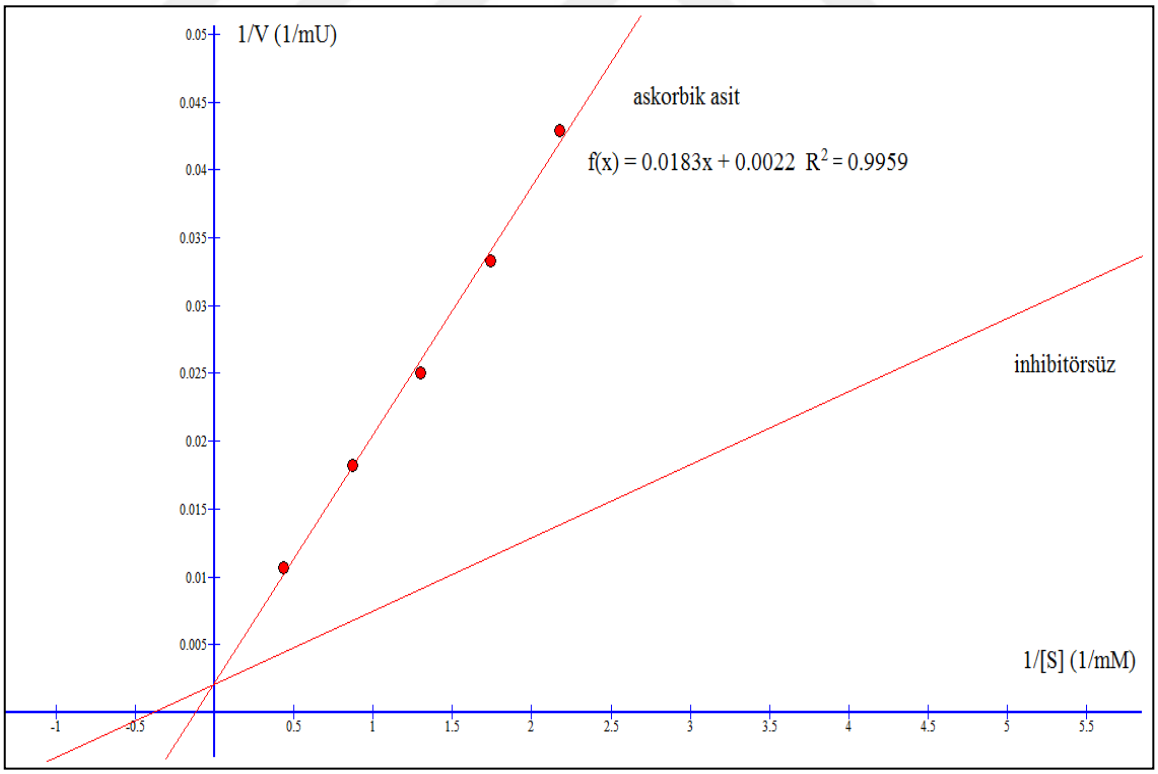
Şekil 4.26' da askorbik asit konsantrasyonu ve % inhibisyon arasındaki ilişki gösterilmiştir. Elde edilen denklemden **IC_{50} değeri 372µm** olarak belirlenmiştir.

İnhibitörsüz ve 372µm askorbik asit varlığında farklı substrat konsantrasyonları ile peroksidaz aktivite tayini deneyleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile Lineweaver – Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerlerindeki değişmeler incelenerek inhibisyon türüne karar verildi.

Şekil 4.27' de inhibitörsüz ve 372µm askorbik asit varlığıda Lineweaver- Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



Şekil 4.26: Askorbik asit konsantrasyonu ile % inhibisyon arasındaki ilişki.



Şekil 4.27: Askorbik asit varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim.

Şekil 4.27'deki Lineweaver – Burk grafiği incelendiğinde ortamda 372µm askorbik asit varlığında **Km = 8.332**mM ve $\mathbf{V_{max}}$ **= 454.545** mU değerleri gözlenmektedir. K_m değeri

ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **K_m = 2.597**mM değerinden büyük ve V_{max} değeri ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **V_{max} = 480.800**mU değerlerine yakındır.

Yarışmalı inhibisyon tipinde K_m değeri artarken V_{max} değerinde bir değişme gözlenmez. Askorbik asit bir alkol tipi inhibitördür ve pazı peroksidazının p-fenilen diamin substratına gösterdiği Km ve Vmax değerlerinden K_m'yi arttırırken V_{max}'a çok az etki etmiştir.

Bu sebeple askorbik asidin pazı peroksidazı üzerindeki inhibitör etkisinin **yarışmalı inhibisyon** olduğu belirlenmiştir.

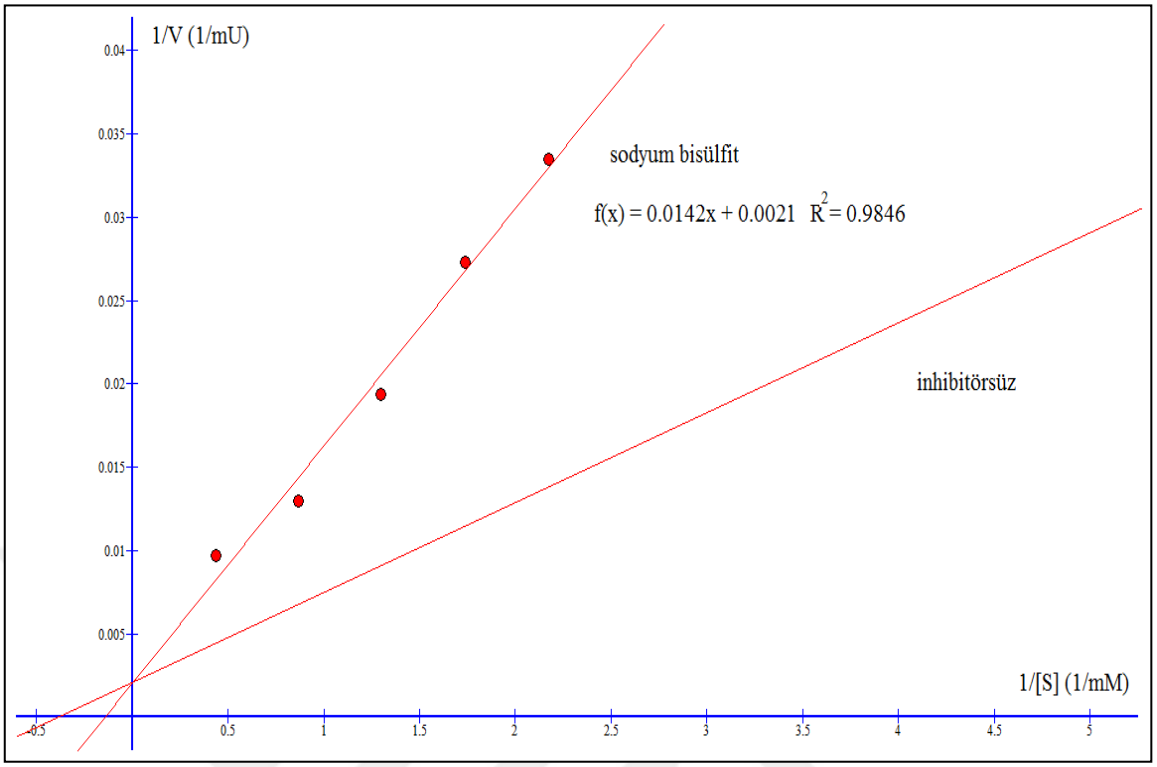
4.4.5 Sodyum Bisülfit IC_{50} Değerinin ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

Tablo 4.8' de görüldüğü gibi sodyum bisülfidin 10mM konsantrasyonu pazı peroksidazını tamamen inhibe etmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda IC_{50} taraması yapılmış ve inhibisyon yüzdesi – inhibitör konsantrasyonu grafiği çizilmiştir.

Sodyum bisülfit için 0.25mM, 0.5mM, 0.75mM ve 1.0mM konsantrasyonları taranmış ve 1mM sodyum bisülfit konsantrasyonu pazı peroksidazını %50.01 oranında inhibe ettiği deneysel olarak bulunmuştur. Sodyum bisülfit için **IC_{50} değeri 1mM** olarak belirlenmiştir.

İnhibitörsüz ve 1mm sodyum bisülfit varlığında farklı substrat konsantrasyonları ile peroksidaz aktivite tayini deneyleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile Lineweaver – Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerlerindeki değişmeler incelenerek inhibisyon türüne karar verildi.

Şekil 4.28' de inhibitörsüz ve 1mm sodyum bisülfit varlığında Lineweaver- Burk grafiğindeki değişmeler gösterilmiştir.



Şekil 4.28: Sodyum bisülfit varlığında Lineweaver – Burk grafikleri üzerinde değişim.

Şekil 4.28'deki Lineweaver – Burk grafiği incelendiğinde ortamda 1mM sodyum bisülfit varlığında **Km = 6.757**mM ve **V_{max} = 476.190** mU değerleri gözlenmektedir. K_m değeri ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **K_m = 2.597** mM değerinden büyük ve V_{max} değeri ortamda inhibitör olmadığında gözlenen **V_{max} = 480.800** mU değerlerine yakındır.

Yarışmalı inhibisyon tipinde K_m değeri artarken V_{max} değerinde bir değişme gözlenmez. Sodyum biülfit pazı peroksidazının p-fenilen diamin substratına gösterdiği Km ve Vmax değerlerinden K_m'yi arttırırken V_{max}'a çok az etki etmiştir.

Bu sebeple sodyum bisülfidin pazı peroksidazı üzerindeki inhibitör etkisinin **yarışmalı inhibisyon** olduğu belirlenmiştir.

Çeşitli maddelerin IC_{50} değerleri ve inhibisyon türleri Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11: Çeşitli maddelerin IC_{50}değerleri ve inhibisyon türleri.

Maddenin Adı	IC_{50} Değeri (μM)	İnhibisyon Türü
Glutatyon	98	Karışık – Yarı yarışmalı
1,4-Ditiyoeritritol	103	Karışık
ß-Merkaptoetanol	248	Yarışmalı
Askorbik Asit	372	Yarışmalı
Sodyum bisülfit	1000	Yarışmalı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere göre çalışmada saflaştırma oranları da değişmektedir. Dünyada enzimlerin endüstride kullanımları hızlı bir şekilde artmaktadır. Ancak bu biyolojik katalizörlerin saflaştırma işlemleri çok pahalıdır. Bu da enzimlerin kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda enzimlerin saflaştırma kademelerini düşürerek maliyet ve zaman tasarrufu yapmak mümkün olabilmektedir.

Bu amaçla üç faz ayırma ile (TPP) enzim saflaştırılması önemli bir yöntemdir. Bu yöntemle tersiyer bütanol ve amonyum sülfat kullanılarak enzim çözeltisi tuzlu ara fazda çöktürülür. Bu yöntem basit, hızlı sonuç veren ve düşük maliyetli bir sistemdir. Bu nedenle endüstriyel kullanımlar için cazip yöntemlerden biridir. TPP yöntemi ile ß-galaktozidaz (Choonia ve Lele, 2013), fosfolipaz D (Sharma ve Gupta, 2001a), naringinaz (Shanmugaprakash ve diğ., 2015), pektinazlar (Sharma ve Gupta 2001), α – galaktozidaz (Şen ve diğ., 2011; Bayraktar ve Önal, 2013), invertaz (Akdere ve diğ., 2010), katalaz (Duman ve Kaya, 2013a) ve ekso-inulinaz (Kumar ve diğ., 2011) çeşitli enzimler saflaştırılmıştır.

Bu çalışmada enzim saflaştırma yöntemi olarak üç faz ayırma tekniği (TPP) kullanılmıştır. Bu teknik basit, hızlı ve ekonomik bir tekniktir. Bu teknikte kromatografik ayırmalardaki çok adımlı işlemlere ve donanımlara gereksinim yoktur. Bu teknikte ayırma işlemleri oda sıcaklığında gerçekleşmektedir.

Peroksidazlar bitkilerde kök, kauçuk, yaprak, çiçek, tohum ve meyvelerde bulunur (Neves 2002; Lopez-Molina ve diğ., 2003; Maciel ve diğ., 2007; Lavery ve diğ., 2010; Zia ve diğ., 2011). Peroksidazlar birçok hücresel süreçte rol oynamaktadırlar. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu (Fry 1986), hücre uzaması (Liszkay ve diğ., 2004), reaktif oksijen ve azot türlerinin metabolizması (Almagro ve diğ., 2009), suberin ve lignin oluşumu (Passardi ve diğ., 2007), meyve sebzelerin büyüme dönemleri süresince indolasetik asit miktarının düzenlenmesi ve savunma mekanizmaları (Barnotek – Roxa ve diğ., 1991), bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Agostini ve diğ., 1997),

oksidatif stres (Hiraga ve diğ., 2001) ve hormonal faaliyet (Wakamatsu ve Takahama, 1993) gibi olaylarda önemli görevler üstlenirler.

Klasik yöntemlerle peroksidaz enzimi pazıdan (*Beta vulgaris* L. var. cicla) (Kahraman 2003), moringa yaprakları (*Moringa oleifera* L.) (Khatun ve diğ., 2012), kabak (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) (Somtürk ve diğ., 2014), elma ve portakal tohumları (Zia ve diğ., 2011), pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) (Kouakou ve diğ., 2008), tütün (Gazaryan ve Lagrimini, 1996), karayip bitkisi (*Euphorbia cotinifolia*) (Kumar ve diğ., 2011), tatlı patates (*Ipomoea batatas*) (Rompel ve diğ., 2007), yaban turbu (*Raphanus sativus* L.) (Valetti ve Pico, 2013), *Copaifera langsdorffii* (Maciel ve diğ, 2007), ağaç baklagilleri (*Leucaena leucocephala*) (Pandey ve Dwivedi, 2010), papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) (Chen ve diğ., 2012), zeytin (*Olea europaea* L.) (Saraiva ve diğ., 2007) ve yağ palmiyesi yaprakları (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Deepa ve Arumughan, 2002) gibi çeşitli bitkisel kaynaklardan saflaştırılmıştır.

TPP yöntemi kullanılarak da peroksidaz enzimi portakal kabukları (*Citrus sinensis*) (Vetal ve Rathod, 2015), *Ipomoea palmata* (Narayan ve diğ., 2008) ve mavi yıldız (*Amsonia orientalis*) (Karakus ve diğ.,2018) gibi çeşitli bitkisel kaynaklardan saflaştırılmıştır.

Elma ve portakaldan peroksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sellüloz ve Sephadex veya Sefadeks G-75 üzerinden saflaştırılarak elma tohumlarından 8.34 kat, portakal kabuklarından ise 30.64 kat saflaştırılmıştır (Zia ve diğ., 2011). Türk kara turbu peroksidazı amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sephadex ion değiştirici kromatografi ile 9.7 kat saflaştırılmıştır (Şişecioğlu ve diğ., 2010).

Yaban turbundan peroksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon yöntemi ile 45.77 kat, afinite kromatografisi tekniği ile kırmızı lahanadan 120.6 kat saflaştırılmıştır (Somtürk ve diğ., 2014). Yine kolon kromatografisi yöntemleriyle peroksidaz enzimi palmiye ağacı yapraklarından 73 kat (Sakharov ve diğ., 2001), avokadodan 14.5 kat (Rojas – Reyes ve diğ., 2014) oranında saflaştırılmıştır.

Peroksidaz enzimi buğdaydan üç kromatografik yöntemle 284 kat (Altın ve diğ., 2017), kuru fasulyeden 0.86 kat (Koktepe ve diğ., 2017), *Artocarpus lakoocha* kauçuklarndan 4

kat (Sonkar ve diğ., 2015), hurma yapraklarından 17 kat (Al-Senaidy ve diğ., 2011) ve vanilya çekirdeğinden 21 kat olarak (Marquez ve diğ., 2008) saflaştırılmıştır.

Literatürde peroksidaz enziminin saflaştırma yöntemleri maliyet açsından oldukça pahalı ve zaman açısından uzun bir süre gerektirmektedir.

Sadece amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemleri uygulanarak yapılan bir diğer çalışmada da peroksidaz enzimi *Calotropis procera* bitkisinden 2.04 kat orannda saflaştırılmıştır (Mafulul ve diğ., 2018).

Üç fazlı ayırma yöntemi (TPP) kullanılarak mavi yıldız (*Amsonia orientalis*) bitkisinden peroksidaz enzimi 12.5 kat (Karakus ve diğ., 2018), *Ipomoea palmata* bitkisinden 18.36 kat (Narayan ve diğ., 2008) olarak saflaştırılmıştır.

TPP yöntemi kullanılarak yapılan saflaştırmalarda saflaşma oranı genelde fazla değildir. Ancak tekniğin kolay, ucuz, tek adımlı ve kısa süreli olması klinik ve endüstride kullanılacak olan peroksidazın istenilen kaynaktan kolaylıkla saflaştırılabileceğini bize göstermektedir. Çalışmamızda antidiyabetik (Bolkent ve diğ., 2000), hepatoprotektif ve antioksidan aktivite (Sacan ve Yanardag, 2010) özelliğe sahip olan pazıdan peroksidaz enzimi 7.5 kat saflaştırılmıştır.

Klasik yöntemler kullanılarak peroksidaz enzimi pazıdan 43.55 kat saflaştırılmıştır (Kahraman, 2003). Bu çalışmada pazı bitkisi aynı olmasına rağmen TPP yöntemi ile daha kısa sürede daha ucuz ve tek adımlı bir yöntemle peroksidaz enzimi saflaştırılmıştır. Ancak saflaştırma oranı klasik yönteme göre daha düşük değerdedir.

Peroksidazlar saflaştırıldıkları kaynağa göre farklı optimum pH değerlerine sahiptirler. Klasik yöntemlerle *Calotropis procera* yapraklarından saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum pH değeri 6 (Mafulul ve diğ., 2018), kırmızı lahanadan saflaştırılan peroksidazın 7 (Somtürk ve diğ., 2014), yaban turbu köklerinden saflaştırılan peroksidazın 6 (Sarika ve diğ., 2015), *Copaifera langsdorffii* yapraklarından saflaştırılan peroksidazın 6 (Maciel ve diğ., 2007), ağaç baklagillerinden saflaştırılan peroksidazn 5 (Pandey ve Dwivedi, 2010), papayadan saflaştrılan peroksidazın 4.6 (Chen ve diğ., 2012), hurma yapraklarından saflaştrılan peroksidazın 5-6 (Al-Senaidy ve diğ., 2011), zeytinden saflaştırılan peroksidazın 7 (Saraiva ve diğ., 2007), buğday germinden saflaştırılan

peroksidazın 5.5 (Converso ve Fernandez, 1995) ve moringa yapraklarından saflaştırılan peroksidazın optimum pHsı 6 (Khatun ve diğ., 2012) olarak bulunmuştur.

Polielektrolit çöktürme yöntemi ile saflaştırılan turp peroksidazının optimum pH değeri 4 (Valetti ve Pico, 2013), üç fazlı ayırma yöntemi ile *Amsonia orientalis* bitkisinden saflaştırılan peroksidazın optimum pH değeri 6 olarak bulunmuştur (Karakus ve diğ., 2018).

Çalışmamızda üç fazlı ayırma yöntemi ile pazıdan saflaştırılan peroksidazın optimum pH değeri 6 bulunmuştur. Pazıdan klasik yöntemlerle saflaştırılan peroksidazın optimum pH değeri de 6 bulunmuştur (Kahraman 2003). Üç fazlı ayırma yöntemi ile saflaştırdığımız pazı peroksidazının optimum pH değerleri literatür ile uygunluk göstermektedir.

Peroksidaz enzim aktivitesi üzerine temperatürün etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda peroksidazların ısıya dayanıklı enzimlerden biri olduğu literatürde belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda peroksidazın optimum temperatürünün 25-60^{o}C arasında değiştiği görülmektedir (Kahraman 2003).

Peroksidaz enziminin optimum sıcaklık değerleri buğday için 40^{o}C (Altın ve diğ., 2017), kuru fasulye için 30 ^{o}C (Koktepe ve diğ., 2017), beyaz lahana için 30^{o}C (Erdem ve diğ., 2015), üzüm için 40 ^{o}C (Sciancalepore ve diğ., 1985), mor lahana için 40^{o}C (Somtürk ve diğ., 2014), kara lahana için 40^{o}C (Gulcin ve Yildirim, 2005), karayip bitkisi için 50 ^{o}C (Kumar ve diğ., 2011), kantalup kavunu için 30^{o}C (Lamikanra ve Watson, 2000) ve ayçiçeği için 40^{o}C (Jouli ve diğ., 2008) olarak bulunmuştur. Çeşitli bitkilerden saflaştırılan peroksidazlarn optimum temperatür değerleri yaklaşık 30^{o}C civarındadır.

Üç fazlı ayırma tekniği ile saflaştırılan portakal kabuğu peroksidazı için optimum sıcaklık 30^{o}C (Vetal ve Rathod, 2015), *Ipomoea palmata* peroksidazı için 37^{o}C (Narayan ve diğ., 2008) ve mavi yıldız (*Amsonia orientalis*) peroksidazı için 25^{o}C (Karakus ve diğ., 2018) olarak bulunmuştur.

Literatür verileri ve çalışmadan elde edilen sonuçlar peroksidaz enziminin genelde 30^{o}C ya da 40^{o}C sıcaklıkta maksimum aktiviteye ulaştığını göstermektedir. Çalışmamızda pazıdan TPP yöntemi ile saflaştırdığımız peroksidazın optimum temperatürü de 40^{o}C olarak bulunmuştur. Bu bağlamda sonuçlar literatür ile uyumludur.

K_m ve V_{max} değerleri enzimin substrata karşı olan ilgisini ve maksimum aktivite değerlerini göstermektedir. K_m değeri enzim substrat kompleksinin sağlamlığının bir ölçüsüdür. K_m değerinin yüksek olması enzimin substrata ilgisinin az olduğunu, düşük olması ise enzimin substrata ilgisinin yüksek olduğunu gösterir. Çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre K_m değerinin düşük olması enzimin substrata olan ilgisinin yüksek olduğunu göstermektedir. Pazıdan saflaştırılan peroksidaz enzimi incelenen substratlar arasında en düşük K_m değerini 0.685 mM ile o-fenilendiaminin verdiği saptanmıştır. Aktivite tayin deneylerinde substrat olarak kullanılan p-fenilendiamine karşı K_m değeri 2.597 mM ve V_{max} değeri 480.800 mU olarak tespit edilmiştir. TPP ile pazıdan saflaştırılan peroksidaz enzimi en yüksek Vmax değerini p-fenilendiamin substratına karşı göstermiştir.

Klasik yöntemlerle saflaştırılan pazı peroksidazının 3,3- diamino benzidine karşı gösterdiği K_m değerinin 0.023mM ve Vmax değerinin ise 0.061 U olduğu bulunmuştur. TPP yöntemi ile saflaştırılan pazı peroksidazının o-fenilendiamine karşı ilgisinin 3,3-diamino benzidine göre daha fazla olduğu saptanmştır.

TPP yöntemi kullanılarak mavi yıldız bitkisinden peroksidaz enzimi saflaştırılmıştır (Karakus ve diğ, 2018). Bu yöntemde substrat olarak pirogallol kullanılmıştır. Enzimin pirogallole ve hidrojen perokside karşı ilgisi yani K_m değerleri 1.88 mM ve 2.0 mM olarak bulunmuştur. Bu değer bizim çalışmamızdaki değerlerden daha yüksektir.

Çalşmamızda çeşitli anorganik ve organik maddelerin pazıdan TPP yöntemi ile saflaştırılmış peroksidaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir (Tablo 4.9 ve Tablo 4.10) Vanadyum (III) klorür 2.5 – 50 mM konsanrasyonlarında, potasyum siyanür ise 10 – 50 mM konsantrasyonlarında enzimi %100 oranında inhibe etmişlerdir. Literatürde vanadyumun bitki ve memeli peroksidazlarının inhibitörü olduğu ileri sürülmektedir (Serra ve diğ, 1989). Vanadyumun peroksidaz enzimini aktive ettiği de ileri sürülmektedir (Yu ve Whittaker, 1989).

Çalışmamızda peroksidaz enziminin glutatyon, ß-merkaptoetanol, 1,4 ditiyoeritritol, gibi SH grubu içeren maddeler ile 5 – 50 mM konsantrasyon aralığında enzimi %100 oranında inhibe etmektedir. Antioksidan bir madde olan askorbik asit ise enzimi 2.5 – 50 mM arasında %100 oranında inhibe etmektedir. Sistein klorür ise 1– 50 mM konsantrasyonları

arasında enzimi %100 oranında inhibe etmiştir. Tiyol gruplarının peroksidaz enzimini inhibe ettiği literatürde belirtilmiştir (Sariri ve diğ., 2006).

Rojas – Reyes tarafından avokado bitkisinden saflaştırılan peroksidaz enziminin ditiyoeritritol, ß-merkaptoetanol, askorbik asit ve L-sistein tarafından yüksek oranda inhibe edildiği saptanmıştır (Rojas – Reyes ve diğ., 2014). Çalışmamızda da aynı maddelerin pazıdan saflaştırılan peroksidaz enzimini inhibe ettiği görülmüştür. Sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda da glutatyon, ß-merkaptoetanol, 1,4 ditiyoeritritol, askorbik asit ve sodyum bisülfitin enzimi yüksek oranda inhibe ettiği görülmektedir. Bu maddelerin %100 enzimi inhibe ettiği konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlarda inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. IC_{50} değerleri ve inhibisyon türleri incelendiğinde IC_{50} değeri en düşük olan glutatyonda olduğu bulunmuştur. Glutatyon yapısında bulunan SH grupları ile enzimi karışık–yarı yarışmalı bir şekilde inhibe etmektedir.

Peroksidaz enziminin ticari öneminin yüksek ve uygulama alanlarının çok olması nedeniyle bitki peroksidaz enzimleri için saflaştırma çalışmaları zamanla önemli bir hal almıştır. Çalşmamızda ülkemizde bol miktarda yetişen pazıdan üç fazlı ayırma yöntemi (TPP) ile peroksidaz enzimi saflaştırılmıştır. Pazı bitkisel kaynaklı peroksidazlar için uygun bir enzim kaynağıdır. Üç fazlı ayırma tekniği ile yapılan ön tarama işlemi sonrasında organik çözücü olarak tersiyer bütanol ve tuz olarak da amonyum sülfat kullanılmıştır. Pazıdan (*Beta vulgaris* L. var. cicla) saflaştırılan peroksidaz enzimi %60 amonyum sülfat doygunluğu, 1:1 (v/v) tuza doygun enzim çözeltisi: tersiyer bütanol oranı, pH 7 ve 37^{o}C ayırma sıcaklığı içeren üç fazlı ayırma tekniği ile %54 aktivite geri kazanım ve 7.4 kat oranında saflaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, peroksidazın üç fazlı ayırma tekniği ile saflaştırılması ucuz, tek basamakta ve kolaylıkla yapılabilmektedir. Saflaştırma sonucunda yüksek bir aktivite geri kazanımı elde edilmektedir. Bu nedenle bu yöntemin peroksidaz enzim saflaştırılması için endüstri alanındaki uygulamalarda kolaylıkla kullanılabileceği öne sürülebilir.

KAYNAKLAR

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

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

Akardere, E., Özer, B., Çelem, E.B., Önal, S., 2010, Three-phase partitioning of invertase from baker's yeast, *Seperation and Purification Technology*, 72, 335-339.

Almagro, L., Gomez Ros, L.V., Belchi-Navarro Bru, S.R., Ros Barcelo, A., Pedreno, M.A, 2009, Class III peroxidases in plant defence reactions, *Journal of Experimental Botany*, 60, 377-390.

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

Altın, S., Tohma, H., Gülçin, İ., Köksal, E., 2017, Purification, characterization and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* ssp vulgare), *International Journal of Food Properties*, 20, 1949-1959.

Amitha, H.P., Trackman, P.C., 2002, A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples, *Analytical Biochemistry*, 300, 245-251.

Angal S., Harris, E., 1990, *Protein Purification Applications*, IRL Press at Oxford University Press, UK.

Ay, T., Bingöl, G., Binici, M., Diler, S.B., Cansaran, A., Demirağ, M.K., Dere, E., Doğan, N., Doğan, B., Ekici, N., Gülnaz, O., Kanlı, A., Olguner, E., Polat, F., Sözbilen, M., Şimşekli, Y., Yıldırım, C., 2010, *Biyolojide Özel Konular*, Pegem Akademi, ISBN: 9786053640608.

Barnotek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991, The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1080, 245-250.

Bayraktar, H., Önal, S., 2013, Concentration and purification of alpha galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning, *Seperation and Purification Technology*, 118, 835-841.

Bolkent, Ş., Yanardağ, R., Tabakoğlu-Oğuz, A., Özsoy-Saçan, Ö., 2000, Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on pancreatic B cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study, *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (1-2), 251-259.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996, *Protein Methods*, 2nd. edition, Wiley-Liss, New York. ISBN: 978-0-471-11837-4.

Chen, L.C., Chung, Y.C., Chang, C.T., 2012, Characterization of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) latex and its application in the determination on micromolar hydrogen peroxide in milk, *Food Chemistry*, 135, 2529-2535.

Choonia, H.S., Lele, S.S., 2013, Three phase partitioning of ß-galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate, *Seperation and Purification Technology*, 110, 44-50.

Converso, D.A., Fernandez, M.E., 1995, Peroxidase isozymes from wheat germ : purification and properties, *Phytochemistry*, 40. 1341-1345.

Cox, M.M., Nelson D.L., 2005, *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, 3. basım, Palme Yayıncılık, ISBN: 975-8982-18-4.

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

Dennison, C., Lovrien, R., 1997, Three phase partitioning: concentration and purification of proteins, *Protein Expressions and Purification*, 11, 149-161.

Dhananjay, S.K., Mulimani, V.H., 2009, Three-phase partitioning of alpha galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36. 123-126.

Duman, Y.A., Kaya, E., 2013, Purification, recovery and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*) ß-galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique, *Protein Expression and Purification*, 91, 155-160.

Duman, Y.A., Kaya, E., 2013a, Three-phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1119-1126.

Erdem, H.U., Kalin, R., Ozdemir, N., Ozdemir, H., 2015, Purification and biochemical characterization of peroxidase isolated from white cabbage (*Brassica oleracea* Var. Capitata F. *Alba*), *International Journal of Food Chemistry*, 18, 2099-2109

Fogler, H.S., 2016, *Elements of Chemical Reaction Engineering*, 5th Edition, Pearson Education Inc., USA, ISBN: 978-0-13-388751-8.

Fortea, M.I., Miranda, S.L., Martinez, A.S., Carreno, J., Delicado, E.N., 2009, Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol peroxidase from table grape (Crimson seedless), *Food Chemistry*, 113 (4), 1008-1014.

Fry, S.C., 1986, Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annual Review of Plant Physiology, 37, 165-186.

Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., 1996, Purificaion and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase, Phytochemistry, 41 (4), 1029-1034.

Gibbs, P.R., Uehara, C.S., Nguyen, P.T., Willson, R.C., 2003, Imaging polarimetry for high throughput chiral screening, *Biotechnology Progress*, 19, 1329-1334.

Gulcin, I., Yildirim, A., 2005, Purification and characterization of peroxidase from *Brasica oleracea* Var. Acephala, *Asian Journal of Chemistry*, 17, 4

Guo, W., Ruckenstein, E., 2003, Seperation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity choromatography, *Journal of Membrane Science*, 211. 101-111.

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

Hu, Y., Wu, J., Luo, P., Mo, Y., 2012, Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems, *African Journal of Biotechnology*, 11 (11), 2752-2756.

Huang, G., Zhu, F., Chen, Y., Chen, S., Liu, Z., Li, X., Gan, L., Zhang, L., Yu, Y., 2016, A spectrophotometric assay for monoamine oxidase activity with 2,4-dinitrophenylhydrazine as a derivatized reagent, *Analytical Biochemistry*, 512, 18-25.

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

Kahraman, S., 2003, *Peroksidazın pazıdan (Beta vulgaris* L. var. cicla*.) saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karakus, Y.Y., Acemi, A., Işık, S., Duman, Y., 2018, Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three phase partitioning and its biochemical characterization, *Seperation Science and Technology*, 53:5, 756-766.

Kaya, E., 2014, *Kurutulmuş nohut granüllerinden (Cicer arietinum) ß-galaktozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

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

Kim, S.J., Shoda, M., 1999, Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3), 1029-1035.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002, Industrial enzyme applications, *Current Opinion In Biotechnology*, 12, 345-351.

Kokkinakis, D.M., Brooks, J.L., 1979, Tomato peroxidase: purification, characterization and catalytic properties, *Plant Physiology*, 63 (1), 93-99.

Koktepe, T., Altın, S., Tohma, H., Gülçin, İ., Köksal, E., 2017, Purification, characterization and selected inhibition properties of peroxidase from haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *International Journal of Food Properties*, 20, 1944-1953.

Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M., 2014, Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması, *Akademik Gıda*, 12 (2), 79-87.

Kouakou, T.H., Due, E.A., Kouadio, N.E., Niamke, S., Kouadio, Y.J., Merillon, J.M., 2008, Purification and characterization of cell suspensions peroxidase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157 (3), 575-592.

Köksal, E., Gülçin. İ., 2008, Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds, *Protein and Peptide Letters*, 15 (4), 320-326.

Kumar, R., Sing, K.A., Sing, V.K., Jagannadham, M.V., 2011, Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Carribbean plant : *Euphorbia cotinifolia, Process Biochemistry*, 46, 1350-1357.

Kumar, V.V., Premkumar, M.P., Sathyaselvabala, V.K., Dineshkirupa, S., Nandagopal, J., Sivanesan, S., 2011, *Aspergillus niger* exo-inulinase purification by three phase partitioning, *Engineering in Life Sciences*, 6, 607-614.

Lamikanra, O., Watson, M.A., 2000, Cantalupe melon peroxidase: Characterization and effects of additives on activity, *Molecular Nutrition and Food Research*, 44, 168- 172.

Lavery, C.B., Maclnnis, M.C., MacDonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A, Irwin, D.J., D'Cunha, G.B., 2010, Purification of peroxidase from horseradish (Armoracia rusticana) roots, *Journal of Agricultural abd Food Chemistry*, 58, 8471.

Lipkowitz, K.B., Cundari, T.R., Gillet, V.J., 2006, *Reviews In Computational Chemistry*, Volume 22, John Wiley & Sons, New Jersey, ISBN: 1069-3599.

Liszkay, A., Van der Zalm, E., Schopfer, P., 2004, Production of reactive oxygen intermediates by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth, *Plant Physiology*, 136, 3114-3123.

Lopez – Molina, D., Heering, H.A., Smulevich, G., Tudela, J., Thorneley, R.N., Garcia – Canovas, F., Rodriguez – Lopez, J.N., 2003, Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94, 243.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 265-275.

Maciel, H.P.F., Gouvea, C.M.C.P., Toyama, M., Smolka, M., Marangoni, S., Pastore, G.M., 2007, Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves, *Qumica Nova*, 30, 1067.

Mafulul, S.G., Joel, E.B., Barde, L.A., Lenka, J.L., Ameh, A.A., Phililus, M.G., 2018, Extraction, partial purification of peroxidase from *Calotropis procera* leaves, *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*, 18 (1), 1-10.

Martinez, A.S., Fortea, M.I., del Amor F.M., Delicado, E.N., 2008, Kinetic characterization and thermal inactivation of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase, *Food Chemistry*, 107 (1), 193-199.

Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., Pardio, V.T., 2008, Purification and characterization of cell wall bound peroxidase from vanilla bean. *LWT*, 41, 1372-1379.

Mliki, A., Zimmermann, W., 1992, Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyaneus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 916-919.

Narayan, A.V., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., 2008, Extraction and purification of *Ipomoea* peroxidase employing three-phase partitioning, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 263-272.

Neves, V.A., 2002, Ionically bound peroxidase from peach fruit, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 7.

Niphadkar, S.S., Rathod, V.K., 2015, Ultrasound assisted three phase partitioning of polyphenol oxidase from potato peel (*Solanum tuberosum*), *Biotechnology Progress*, 31, 1340-1347.

Nostro, L.P., Ninham, B.W., 2012, Hofmeister phenomena: an update on ion specifity in biology, *Chemical Reviews*, 112 (4), 2286-2322.

Özer, B., Akardere, E., Çelem, E.B., Önal, S., 2010, Three phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, *Biochemical Engineering Journal*, 50, 110-115.

Pandey, V.P., Dwivedi, U., 2010, Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 168-173.

Pandey, V.P., Singh. S., Singh, R., Dwivedi, U., 2012, Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167 (2), 367-376.

Panesar, P.S., Kumari S. and Panesar, R., 2010, Potential applications of immobilized ß-galactosidase in food processing industries, *Enzyme Research*, 2010:473137.

Particle Sciences - Technical Brief, 2009, *Protein Structure*, Vol 8, PA-USA.

Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Margis – Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007, Peroxibase : the peroxidase database, *Phytochemistry*, 68, 1605-1611.

Rajeeva, S., Lele, S.S., 2011, Three phase partitioning for concentration and purificaition of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp*. WR-1, *Biochemical Engineering Journal*, 54 (2), 103-110.

Rojas-Reyes, J.O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Matinez, C.C., Waliszewski, K.N., Aguilar-Uscanga, M.G., 2014, Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 1844-1853.

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

Sacan, O., Yanardag, R., 2010, Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla), *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), 1275-1280.

Sakharov, I.Y., Vesga, M.K., Galaev, B.I.Y., Sakharova, I.V., Pletjushkina, O.Y., 2001, Peroksidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties, *Plant Science*, 161, 853-860.

Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007, Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurence of a peçtin binding peroxidase, *Food Chemistry*, 101, 1571-1579.

Sarika, D., Ashwin Kumar, P.S.S., Arshad, S., Sukumaran, M.K., 2015, Purification and evaluation of horseradish peroxidase activity, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4 (7), 367-375.

Sariri, R., Sajedi, R.H., Jafarian, V., 2006, Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors, *Journal of Molecular Liquids*, 123, 20-23.

Sciancalepore, V., Longone, V., Alviti, F.S., 1985, Partial purification and some properties of peroxidase from malvasi grapes, *American Society for Enology and Viticulture*, 36, 105-110.

Serra, M.A., Sabboni, E., Marchesini, A., Pintar, A., Valoti, M., 1989, Vanadate as an inhibitör of plant and mammalian peroxidases, *Biological Trace Element Research*, 23, 151-164.

Shanmugaprakash, M., Vinothkumar, V., Ragupathy, J., Amala Reddy, D., 2015, Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344, *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 418-423.

Sharma, A., Gupta, M.N., 2001, Purification of pectinases by three phase partitioning, *Biotechnology Letters*, 23, 1625-1627.

Sharma, S., Gupta, M.N., 2001a, Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three phase partitioning and its characterization, *Protein Expression and Purification*, 21 (2), 310-316.

Sharma, A., Gupta, M.N., 2002, Macro-affinity ligand facilitated three phase partitioning (MLFTPP) for purification of xylanase, *Biotechnology and Bioengineering*, 80 (2), 228-232.

Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N., 2014, Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173 (7), 1815-1828.

Sonkar, K.S., Pachauri, M., Kumar, A., Shukla, A., 2015, Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakooch*a purification, characterization and wound healing studies, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4 (2), 180-190.

Şen, A., Eryılmaz, M., Bayaktar, H., Önal, S., 2011, Purification of α-galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three phase partitioning, *Seperation and Purification Technology*, 83, 130-136.

Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, H., Kaya, H.B., Özdemir, H., 2010, Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.), *Journal of Medicinal Plant Research*, 4 (12), 1187-1196.

Tao, Y.M., Wang, S., Luo, H.L., Yan, W.W., 2018, Peroxidase from jakfruit: purification, characterization and thermal inactivation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 898-905.

Telefoncu, A., 1997, *Enzimoloji*, Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir.

Tripathi, R., Singh, J., Bharti, R., Thakur, I.S., 2014, Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production, *Energy Procedia*, 54, 518-529.

Uyanık, A., 2008, *Beta-galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Valetti, N.W., Pico, G., 2013, A friendly method for *Raphanus sativus* (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation, *Seperation and Purification Technology*, 119, 1-6.

Vetal, M.D., Rathod, V.K., 2016, Ultrasound assisted three phase partitioning of peroxidase from waste orange peels, *Green Processing and Synthesis*, 5 (2), 205-212.

Vetal, M.D., Rathod, V.K., 2015, Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*), *Food and Bioproducts Processing*, 94, 284-289.

Wakamatsu, K., Takahama, U., 1993, Changes in peroxiase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus, Physiologia Plantarum, 88, 167-171.

Weast, R.C., Astle, M.J., 1979, *Handbook of Chemistry and Physics*, 59th edition, Sunset Books, USA, ISBN:0849304598.

Yu, H., Whittaker, J.W., 1989, Vanadate activation of bromoperoxidase from *Corallina officinalis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160, 87-92.

Zia, M.A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H.M.N., Abbas, R.Z., 2011, Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds, *African Journal of Biotechnology*, 10, 6300-6303.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mehmet YAMAN
Doğum Yeri	FATİH
Doğum Tarihi	01.10.1989
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	0531 926 92 07
E-Posta Adresi	yaman.mehmet@windowslive.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Kocaeli Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	13.02.2018

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Biyokimya Programı

Makale ve Bildiriler
Yaman, M., Yanardağ, R., 2018, Purification of peroxidase from chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) by three phase partitioning, *International Symposium on Graduate Research in Science*, 4-6 October, Istanbul-Türkiye, 275.