ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge GÜNGÖR

KATALAZ ENZİMİNİN KEREVİZDEN *(Apium graveolens*) SAFLAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2015

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATALAZ ENZİMİNİN KEREVİZDEN (*Apium graveolens*) SAFLAŞTIRILMASI

Özge GÜNGÖR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 29/12/2015 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof. Dr. Ramazan BİLGİN	Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL	Doç. Dr.M. Kemal SANGÜN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2014-3262

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KATALAZ ENZİMİNİN KEREVİZDEN (*Apium graveolens*) SAFLAŞTIRILMASI

Özge GÜNGÖR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl 2015, Sayfa: 49
Jüri : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Doç. Dr.M. Kemal SANGÜN

Bu çalışmada katalaz enzimi ilk kez kerevizden saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan katalaz enziminin molekül ağırlığının 237 kDa olduğu ve 58 kDa ağırlığında 4 eşit alt birimden oluştuğu belirlenmiştir. Kereviz (*Apium graveolens*) katalazının optimum sıcaklığının 30 °C ve optimum pH'ının 7,5 olduğu bulunmuştur. Katalaz enziminin depolama kararlılığı için belirli derişimlerde gliserol çözeltisi hazırlanmış ve enzim bu çözeltilerde bekletilmiştir. En yüksek kararlılığın % 20 gliserol çözeltisi içinde olduğu belirlenmiştir. Katalazın termal kararlılığının da 25 °C' de daha iyi olduğu bulunmuştur (% 28). Km ve Vmax değerleri Hidrojen peroksit substratı için sırasıyla 27,5 mM ve 87 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Kereviz (*Apium graveolens*), katalaz, saflaştırma, karakterizasyon

ABSTRACT

MSc THESIS

PURIFICATION OF CATALASE FROM CELERY (*Apium graveolens)*

Özge GÜNGÖR

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Year 2015, Pages: 49
Jury : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Assoc. Prof. Dr. M. Kemal SANGÜN

In this study, catalase enzyme was purified from celery leaves and characterizated. The molecular weight of the purified enzyme was estimated as 236 kDa and the enzyme was consist of four identical subnits with the molecular weight of 59 kDa each. The optimal temperature and pH were found 30°C and 7,5, respectively. Different glycerol solutions were prepared for storage stability of this enzyme and it was incubated in this solutions. The highest storage stability of this enzyme was determined in 20 % glycerol solution. Catalase enzyme showed better thermal stability (28 %) at 25°C than 40°C. Km and Vmax values were 27,5 mM and 87 U/mg protein respectively towards hydrogen peroxide.

Key Words: Celery (*Apium graveolens),* catalase enzyme, purification, characterization

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında benden yardım ve desteklerini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, beni her konuda aydınlatan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ramazan BİLGİN'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca tecrübeleriyle bana yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL ve Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkür ederim.

Çalışmamın bütün aşamalarında deneyimlerini benimle paylaşan izlemem gereken yöntem ve metodlar hakkında sürekli beni bilgilendiren, bilgi ve deneyimleri ile desteğini benden esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Deniz YILDIRIM'a, Öğr. Gör. Dr. Dilek ALAGÖZ'e ve Yrd. Doç. Dr. Özlem ALPTEKİN'E sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çlışmalarım boyunca beni manevi olarak destekleyen arkadaşlarım Arş. Gör. Ali TOPRAK, Yakup AKKOÇ'a ve bu süreçte benden manevi desteklerini hiç esirgemeyen bütün arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bütün eğitimim boyunca benden hem maddi hem de manevi desteklerini esirgemeyen annem Deniz GÜNGÖR, babam Yaşar GÜNGÖR ve kardeşim İnanç GÜNGÖR' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
1. GİRİŞ 1
1.1. Katalaz Enzimi 1
1.2. Katalazın Kullanım Alanları 2
1.3. Protein Saflaştırılması 3
1.3.1. Hücre parçalanması 4
1.3.2. Tuzla Çöktürme 5
1.3.3. Kromatografik yöntemler 5
1.3.3.1. Boyut Ayırma Kromatografisi 5
1.3.3.2. İyon Değişim Kromatografisi 6
1.3.4. Elektroforez 10
1.4. Kereviz *(Apium graveolens*) 11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
3. MATERYAL VE METOD 17
3.1. Materyal 17
3.1.1. Kimyasallar 17
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 17
3.2. Metod 18
3.2.1. Örneklerin Homjenizasyonu 18
3.2.2. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini 18
3.2.3. Protein Tayini 19
3.2.4. Katalaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürmesi 19
3.2.5. Proteinlerin Sephadex G 25 İçeren PD-10 Kolonuna Uygulanması 20

3.2.6. Sephadex A 25 Kolonunun Hazırlanması ve Proteinlerin Kolona Uygulanması 20
3.2.7. Katalaz Enzimi Üzerine pH'ın Etkisinin İncelenmesi 20
3.2.8. Katalaz Enzimi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 21
3.2.9. Katalaz Enzimi Örneklerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi.. 22
3.2.10. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi 22
3.2.11. Katalaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi 22
3.2.12. Katalaz Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi 22
3.2.12.1. SDS-PAGE Elektroforezi 22
3.2.12.2. Nativ-PAGE 24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 27
4.1. Bulgular 27
4.1.1. Enzim Homojenizasyonundan Elde Edilen Bulgular 27
4.1.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular 27
4.1.3. Sephadex G 25 Kolon Kromatografisi Sonucu Elde Edilen Bulgular 27
4.1.4. Sephadex A 25 Kolon Kromatografisi Sonucu Elde Edilen Bulgular 28
4.1.4. Katalaz Enzimi Üzerinde pH'ın Etkisi ile İlgili Bulgular 29
4.1.6. Katalaz Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi ile İlgili Bulgular 30
4.1.7. Termal Kararlılık İle İlgili Bulgular 31
4.1.8. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığına Ait Bulgular 32
4.4.9. Katalaz Enziminin Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 33
4.4.10. Katalaz Enziminin Moleküler Ağırlığının Tayini 34
4.2. Tartışma 36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 41
5.1. Sonuçlar 41
5.2. Öneriler 42
KAYNAKLAR 43
ÖZGEÇMİŞ 49

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Hücre parçalama teknikleri 4
Çizelge 1.2. İyon değiştirici kromatografide kullanılan bazı tamponlar..... 8
Çizelge 3.1. Elektroforez için jel hazırlama..... 23
Çizelge.4.1. Kereviz katalazı için saflaştırma sonuçları 29

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Katyon ve anyon değiştirici kolon dolgu maddesi (Berg, 2002)..... 9

Şekil 1.2. İyon değişim kromatografisinde kullanılan reçineler (Boyer, 1982) 10

Şekil.4.1. Sephadex G25 içeren PD-10 kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de..... 28

Şekil.4.2. Sephadex A25 kolonundan elde edilen eluatların 280nm'de okunan protein tayini ve aktivite değerleri. 29

Şekil.4.3. Kolondan alınan maksimum aktivite gösteren örnek için farklı pH' larda ölçülen bağıl aktivite değerleri. 30

Şekil.4.4. Kolondan alınan maksimum aktivite gösteren örnek için farklı sıcaklıklarda ölçülen bağıl aktivite değerleri. 31

Şekil.4.5. Katalaz enzimi için bağıl aktivitenin süreye bağlı değişimi. 31

Şekil.4.6. 4℃ de %10,%20,%30 luk gliserol çözeltileri içinde saklanan katalaz enziminin aktivitesinin zamana bağlı değişimi. 32

Şekil.4.7. 25℃ de %10,%20,%30 luk gliserol çözeltisi içinde saklanan katalaz enziminin aktivitesinin zamana bağlı değişimi. 33

Şekil.4.8. Katalaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği 34

Şekil.4.9. Kerevizden elde edilen katalaz enziminin NATİV PAGE görüntüsü (a) marker, (b) ham homojenat, (c) %30 amonyum sülfat çöktürmesi, (d) saflaştırılmış katalaz enzimi..... 35

Şekil.4.10. Katalaz enziminin SDS PAGE görüntüsü (a) marker, (b) homojenat, (c) %30 amonyum sülfat çöktürmesi, (d) saflaştırılmış katalaz..... 35

1. GİRİŞ

1.1. Katalaz Enzimi

Katalaz (EC 1.11.1.6) canlı organizmalarda gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşan aktif yapılardan hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene ayırmayı katalizleyen, oksidoredüktaz sınıfı enzimlerden biridir. Bilindiği gibi aktif yapılar arasında peroksitler, süperoksitler v.b. reaktifler vardır. Bu reaktif maddeler canlı hücreler için çok kritik öneme sahiptirler (Tayefi-Nasrabadi, 2008). Aktif yapılarından dolayı hücrenin ve hücre zarının yapısını bozan bu kimyasal ajanlar canlının yaşamını sürdürebilmesi için bir kısım reaksiyonların istenmeyen yan ürünleridirler. Bu reaktifler aktif yapılarından dolayı hücrelerde zarara hatta ölüme neden olabilmektedirler.

Katalaz enzimi saflaştırılan ve kristalize edilen ilk enzimlerden biridir. Son yıllarda ise insanlarda ve hayvanlar da kanser, diyabet ve yaşlanma ile bağlantılı olması sebebiyle çok dikkat çekmektedir. Katalaz enzimi bugüne kadar birçok farklı kaynaktan saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bunların arasında prokaryot ve ökaryot tek hücreli canlıların yanı sıra hayvanlar ve bitkiler de vardır. Katalazın, safran, hardal, ıspanak, pamuk, buğday, ayçiçeği, mısır, hint yağı bitkisi, biber, kozalak ve tütün gibi yüksek yapılı bitkilerde de çoklu formlarda bulunduğu tespit edilmiştir. (Tayefi-Nasrabadi, 2008).

Bitkilerde mitokondrial elektron taşıması, yağ asitlerinin β-oksidasyonu ve fotosentetik reaksiyonlar sonucu ortaya hidrojen peroksit çıkar (Scandalios ve ark., 1997). Bu nedenle katalaz bitkilerde büyüme, gelişme ve savunma gibi durumlarda çok önemli role sahiptir (Mura ve Ark., 2007; Conrath ve ark., 1997, Tayefi-Nasrabadi, 2008).

Katalaz enzimi dört eşit alt üniteden oluşan bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 240 kDa civarındadır.

Katalaz enzimi hem elektron alıcı hem de elektron verici olarak peroksiti kullanır. Katalaz enziminin reaksiyon mekanizması aşağıda kısaca verilmiştir.

Reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Katalazdaki hem grubuyla demir bağlanarak Bileşik I adlı yapıyı oluşturur.

$$CAT\text{-}Fe\text{-}OH + H_2O_2 \rightarrow CAT - Fe - OOH + H_2O$$
$$CAT\text{-}Fe\text{-}OOH + H_2O_2 \rightarrow CAT - Fe - OH + H_2O + O_2$$

Ortamda yeterli miktarda hidrojen peroksit varsa Bileşik I yukarıdaki reaksiyonu vererek hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar. (Kavakçıoğlu,. 2012).

1.2. Katalazın Kullanım Alanları

Katalaz 1901 yılında araştırmacı Leow tarafından hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayan enzim olarak tanımlanmıştır (Mhamdi ve ark., 2012). Hidrojen peroksitin canlıya olan etkisinden dolayı da birçok araştırmacı katalaz çalışmaya başlamıştır.

Bu enzim tekstil endüstrisinde, gıda endüstrisinde, farmasötik endüstrisinde, kağıt endüstrisinde, çevresel kirlenme çalışmalarında, lens suyunun temizliği gibi detoksifikasyon sistemlerinde kullanılmaktadır.

Kumaşın H_2O_2 ile ağartılmasından sonra H_2O_2' nin uzaklaşması için ilk yapılan işlem su ile yıkamaktır. Bu işlem boyama işleminden hemen önce yapılır. Bu yıkama suyuna geçen H_2O_2'nin parçalanması ve yıkama suyunun tekrar sisteme kazandırılması için katalaz enziminden faydalanılmaktadır (Paar, 2001).

Hidrojen peroksit reçine ve plastik üretiminde, oksidasyon ve köpükleştirme amacı ile kullanılmaktadır. Fakat hidrojen peroksit toksik bir madde olduğu için gerekli işlemler yapıldıktan sonra uzaklaştırılması gerekmektedir. Hidrojen peroksitin uzaklaştırılması için katalaz enzimi gereklidir. (Koç, erişim tarihi: 7 Temmuz 2015).

Kağıt sanayinde kağıdın ağartılmasından sonra kalan H_2O_2'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında katalaz kullanılmaktadır (Wiseman, 1986).

Tekstilde ağartma işlemi pamukta bulunan doğal renk pigmentlerinin hidrojen peroksit kullanılarak uzaklaştırılmasıdır. Ham pamukta kalan hidrojen peroksit ise yıkamayla uzaklaştırılsa da ortamda kalan peroksit çevre açısından zararlı olacağından enzimatik bir tepkimeyle su ve oksijene dönüştürülür. Tekstil endüstrisinde bu amaçla katalaz enzimi kullanılmaktadır (Sancar ve ark., 2012).

Gıdalarda özellikle soğuk sterilizasyon ajanı olarak kullanılan hidrojen perokisit, sütün işlenmesi sırasında ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Süt endüstrisinde ekşimeyi geciktirmek amacıyla süte hidrojen peroksit ilave edilir. Sütün tüketiciye ulaştırılmadan hidrojen peroksitin sütten uzaklaştırılması gerekir. Peynir üretiminde ise laktik asit bakterilerinin gelişimi, bu bakterilerin var oluşu hoş aromalı peynirlerin lezzet ve aromasını etkilediği için ve bu bakteriler perokside duyarlı olduğu için ortamdan uzaklaştırılmaları gereklidir. Hidrojen peroksitin uzaklaştırılması ise katalaz ilavesi ile mümkündür.

Katalaz enzimi ayrıca glukoz oksidaz enzimi ile birlikte glukoz içermeyen diyetetik içecekler, fruktoz içermeyen invert fleker ve glukoz içermeyen maltoz üretiminde de kullanılır. Fırın ürünlerinin yapımı sırasında, bu enzim kombinasyonu az miktarda hidrojen peroksit ile birlikte kullanılır. Bunun sebebi, gıdalarda kararmaya sebep olan glukozun okside olarak uzaklafltırlması için yeterli oksijeni sağlamaktır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

1.3. Protein Saflaştırılması

Proteinler canlıların en temel yapıtaşlarından biridir. Proteinler canlıda birçok amaçla kullanılır. Metabolizmaya katılmasını yanısıra temel bileşenleri de oluşturular.

Proteinler bugüne kadar birçok kaynaktan saflaştırılmıştır. Fakat en kolay şekilde mikroorganizmalardan elde edilmektedirler. Mikroorganizmalar hem çabuk ve kolay bir şekilde çoğalması hem de hücre yapısının daha kolay bozulmasından dolayı tercih edilmektedirler. Ancak tek kaynak mikroorganizmalar değildir.

Proteinler enzim olarak katalizör, hücre zarının yapısına katılarak transport sistemde ve çok zorunlu durumlarda besin olarak kullanılabilirler.

Protein saflaştırma çok adımlı bir süreçtir ve her adımda toplam protein miktarının belirlenmesi saflaştırmanın izlediği yolu takip etmek için gereklidir. Pratikte esas olan biyolojik ve biyokimyasal aktivitelerin belirlenmesidir. Bu nedenle hedef proteine özel analiz yöntemine ihtiyaç vardır. Eğer saflaştırılan enzimse ilave olarak aktivite tayinleri yapılır. Önemli bir faktörde saflaştırma adımının verimidir. (Scopes, 1994).

Protein saflaştırma işlemi saflaştırılan proteine göre spesifiklik gösterse de temel olarak işlem basamakları aynı şekilde gerçekleşmektedir. Bu işlem basamakları hücrenin parçalanması, tuzla çöktürme, kromatoğrafik yöntemler şeklinde bir yol izler.

1.3.1. Hücre parçalanması

Hücre parçalanmasının iki yöntemi vardır. Bunlar mekanik ve mekanik olmayan kimyasal yöntemlerdir. (Erarslan ve ark., 2000)

Çizelge 1.1. Hücre parçalama teknikleri

Mekanik olmayan/Kimyasal	Mekanik veya Fiziksel
· Isı ile parçalama · Dondurma- eritme · Litik enzimler · Alkali ile muamele · Deterjanlar	· Blender, öğütücü, homojenizatör · Aşındırıcı ile agitasyon · Sıvı ve katı ekstrüsyon(French Pres) · Ultrasonikasyon

Parçalama işlemi sonunda oluşan partiküller ortamdan bir şekilde uzaklaştırılmalıdır.

1.3.2. Tuzla Çöktürme

Birçok protein yüksek tuz konsantrasyonunda daha az çözünür hale gelir. Proteinin çökmesi için gerekli tuz konsantrasyonu her proteinde değişiklik gösterir. Bu sayede tuzla çöktürme proteinleri ayırmakta kullanılabilir. Aynı zamanda tuz çöktürmesi diğer saflaştırma basamaklarından elde edilen aktif fraksiyonları içeren seyreltik protein çözeltilerini deriştirmek için de kullanılabilir (Berg, 2002).

Homojenizasyon işleminden sonra tuzla çöktürme işlemi uygulanır. Bu işlem amonyum sülfat gibi yüksek çözünürlüğe sahip bir tuzla uygulanır. Tuz miktarı arttırıldıkça proteinlerin iyonik şiddeti arttırılarak (salting out) çökmeleri sağlanır. Belirli proteinler belirli yüzdelerde çökerek çözelti ortamından uzaklaşmaktadır.

1.3.3. Kromatografik yöntemler

Yapılan işlemlerden sonra elde edilen protein çözltisinden, istenilen proteinin elde edilmesi için çeşitli kromatografi türleri uygulanmaktadır. Kromatografik yöntemlerin temeli durgun ve hareketli fazlarda ayrıştırılacak olan çözeltinin ilerlemesine dayanır. Örneğin boyut eleme kromatoğrafisinde ayrılacak olan moleküllerin boyutlarına göre oluşturulan seçilmiş büyüklükte delikleri olan çapraz bağlı polimerlerden geçiş hızlarına göre ayrım yapılmaktadır.

1.3.3.1. Boyut Ayırma Kromatografisi

Boyut ayırma kromatografisi, proteinlerin boyutlarına göre ayırma işlemi uygulayan bir yötemdir. Bu teknik, bir veya daha fazla bileşenin izole edilmesinde, bir bileşiğin molekül ağırlığının tayin edilmesinde, tuzla çöktürme işlemi sonunda örneğin tuzdan arındırılmasında (desalting), protein yapısında olmayan kontaminantların (DNA, virüs) ve protein agregatlarının ortamdan uzaklastırılmasında kullanılmaktadır (Konak ve ark., 2014).

Örnek, içinde deksran, agaroz (karbohidrat yapılı) ya da poliakrilamid gibi çözünmeyen fakat, oldukça yüksek hidrate polimerlerden oluşan, gözenekli dolgu

maddesinin bulunduğu kolona uygulanır (Berg, 2002). Bu kolon çeşitli doğal reçinelerden oluşturulduğu gibi sentetik olarak da oluşturulabilir. Boyut ayırma kromatografisi ya da diğer adıyla jel filtrasyon kromatografisinde doğal reçinelerin ya da sentetik maddelerin jelleşmesi bu maddelerin birbirleriyle çapraz bağlar oluşturmasıyla gerçekleşir (Konak ve ark., 2014). Bu teknikte Sephadex, Sepharoz ve Bio-Gel gibi ticari olarak hazırlanan gözenekli (0,1mm) maddeler sıklıkla kullanılmaktadır.

Prensip olarak küçük boyutlu proteinlerin bu gözeneklere girerken büyük boyutlu olanların aralardan geçerek daha önce toplanmasına dayanır (Berg, 2002). Bunun yanısıra örnek hacmi, örnek hacminin kolon hacmine oranı, partikül boyutu, akış hızı, örneğin ve tampon çözeltinin viskozitesi de ayrımaya etki etmektedir (Konak ve ark., 2014).

Bu yöntemde büyük boyutlu proteinler ilk, daha küçük olanlar daha sonra ve en küçük boyutlu proteinler en sonra elde edilir (Berg, 2002).

1.3.3.2. İyon Değişim Kromatografisi

Proteinler, yapılarında yer alan amino asitlerin yan zincirlerinden dolayı yüklü gruplara sahiptir . Bu gruplar, onların çözücüler (solvent) ile etkilesimini arttırarak çözünürlüğünü etkiler. İyon değişitirici kromatografide proteinlerin sahip oldukları net yüke göre ayırım yapılmaktadır. Proteinlerin bir kısmı pH 7'de negatif bir kısmı da pozitif net yüklüdür. Bu yöntem, kolon kromatografisinde, net yüke sahip olan maddeler için kullanılan yaygın bir yöntemdir ve proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında uygulanmaktadır. İyon değişim kromatografisi; yüksek kapasitesi, nispeten düşük maliyeti ve titiz temizleme sisteminden dolayı proteinlerin saflaştırılması için ideal bir yöntemdir. Bu yöntem çok küçük ve orta boyutta proteinlerin saflaştırılmasının yanısıra immunoglobulin, plasmid DNAsı ve virus gibi oldukça büyük biyomoleküllerin ayrılmasında da kullanılmaktadır.

İyon değişim kromatografisi bir adsorbsiyon kromatografisidir ve ayırma işlemi ayrılacak olan maddenin yüküyle zıt yüke sahip olan sabit faz arasındaki tersinir elektrostatik etkileşimlere bağlıdır. Bu etkileşimleri sağlamak için öncelikle

kolon dolgu maddesinin pH ve iyonik güç açısından dengelenmesi gerekmektedir. Bu nedenle kolon tampon çözelti ile birkaç defa yıkanmalıdır. Daha sonra örnek kolona uygulanır. Örnek, genellikle farklı proteinlerden oluşan bir karışımdır ve tamponun iyonik şiddeti kademeli olarak arttırılarak, farklı güçlerde tutunan proteinler sırasıyla kolondan alınır. Böylece proteinler birbirlerinden ayrılmış olurlar. Kolondan belirli aralıklarla toplama işlemi bittikten sonra elde edilen protein fraksiyonlarının absorbans ya da floresans değerleri ölçülür. Böylece ilgili proteinin hangi elüatta geldiği belirlenir (Konak ve ark., 2014). Bu şekilde iyonik şiddetin arttırılmasıyla protein toplanması işleminin yanında, proteinler, tuz derişimi arttırılan ya da pH'ı değiştirilmiş tamponla (anyon değiştiricilerde pH düşürülerek, katyon değiştiricilerde pH yükseltilerek) veya tamponun hem pH'ı değiştirilerek hem de iyonik gücü arttırılarak da elüe edilebilirler. Genelde iyonik şiddetin değiştirilmesi tercih edilir, çünkü bu daha iyi kontrol edilebilir. Bu işlemde iyonik gücün 1,0 olması genellikle çoğu proteinleri elüe etmek için yeterlidir (Dalkavrıyan, 2011).

İyon değişim kromatografisiyle proteinlerin ayrılması ilk olarak yük türüne (katyonik veya anyonik), daha sonra da yük gücüne (güçlü veya zayıf anyonik-katyonik) bağlıdır. Bir protein ile iyon değiştirici arasındaki etkileşim sadece net yüke veya iyonik güce bağlı değildir, aynı zamanda proteinin yüzeyindeki yük dağılımından da etkilenmektedir. Bu nedenle bu teknikte mobil fazın pH'ı çok büyük bir öneme sahiptir (Konak ve ark., 2014). Tampon çözeltisinin pH'ı iyon değiştiricinin çalışma aralığında ve proteine zarar vermeyecek bir pH değerinde olmalıdır. Proteinin bağlanması için gerekli olan pH proteinin izoelektrik noktasının en az yarı, tercihen bir birim uzağında (anyon değiştiriciler için üstünde, katyon değiştiriciler için altında) olmalıdır. İzoelektrik noktasının çok üzerindeki veya çok altındaki pH'lar gereğinden daha kuvvetli bağlanmayı indüklediğinden dolayı alıkonma süresinin çok uzaması ve denatürasyona neden olmaktadır (Dalkavrıyan, 2011). pH değerinin artması anyon değişim kromatografisinde ayrılan bazik proteinlerin tutulma kapasitesini arttırırken, katyon değişim kromatografisinde ayrılan asidik proteinlerin tutulma kapasitesini düşürmektedir. Aşağıdaki çizelgede iyon değiştirici kromatografide kullanılan bazı tamponlar gösterilmiştir. (Konak ve ark., 2014)

Çizelge 1.2. İyon değiştirici kromatografide kullanılan bazı tamponlar

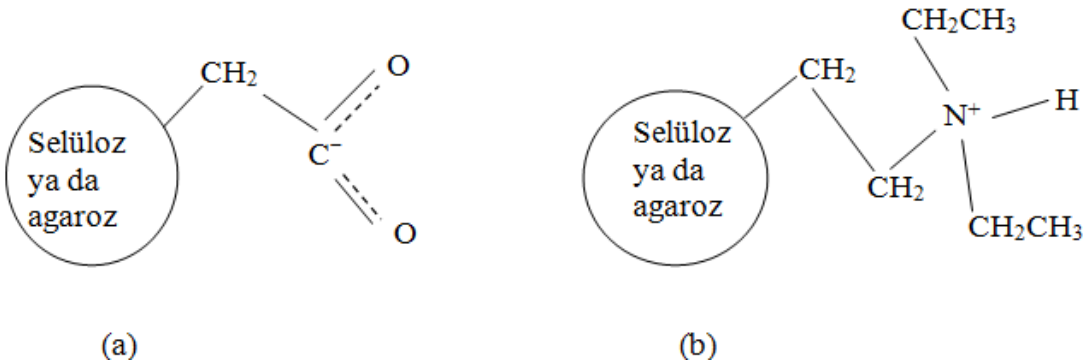
Tampon Tuzu	**pH Aralığı**	**Tampon Tuzu**	**pH Aralığı**
Amonyak	8.2–10.2	Sodyum asetat	4.2–5.4
Amonyum asetat	8.6–9.8	Sodyum borat	8.0–9.8
Amonyum fosfat	2.2–6.5	Sodyum dihidrojen	2.0–6.0/8.0–12
Sitrik asit	2.0–6.0	fosfat	
Disodyum hidrojen	2.6–6.5	Sodyum format	3.0–4.4
sitrat		Sodyum perklorat	8.0–9.8
Potasyum dihidrojen	2.0–8.0/9.0–13	Sodyum nitrat	8.0–10.0
fosfat		Trietanolamin	6.7–8.7
Potasyum hidrojen	2.2–6.5		
fitalat			

Proteinlerin bağlandığı pH'taki tampon başlangıç tamponu olarak alınır. Bu tamponun pH aralığı proteinlerin bağlanabileceği fakat ayrılmalarının gerçekleşeceği pH'a yakın olmalıdır. Aksi takdirde proteinleri kolondan ayırmak için gerekli iyonik şiddet çok yüksek olur ve proteinlerin kolondan alınması zorlaşır. Zayıf iyon değiştiriciler, anyon değiştiricilerde pH 6'nın altında katyon değiştiricilerde pH 9'un üzerinde yüklerini kaybetmeye başlarlar. Kuvvetli iyon değiştiriciler sadece çok düşük iyonizasyonlu maddelerin ayırımında kullanılır (Dalkavrıyan, 2011).

İyon değiştirici kromatografide de durgun faz genellikle selüloz, dekstran veya reçine gibi polimerlerden oluşmaktadır. İyon değişim kromatografisinde mobil fazda (tampon+örnek) bulunan yüklü moleküller durağan fazda (kolon dolgu maddesi) yer alan zıt yüklü moleküller ile etkileşime girerek bu fazda tutunmaktadır. Bu yöntemde kullanılan matriksler iki temel gruba ayrılmaktadır: katyon değiştiriciler ve anyon değiştiriciler.

Katyon değişim reçinelerinin yüzeylerinde negatif yüklü gruplar bulunmaktadır. Proteinler pI değerinin altındaki pH değerinde pozitif yüke sahip olduğu için katyon değişim kromatografisi pozitif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Anyon değişim reçinelerinin yüzeylerinde ise pozitif yüklü gruplar bulunmaktadır. Proteinler pI değerinin üzerindeki pH değerinde negatif

yüke sahip olduğu için anyon değişim kromatografisi de negatif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Konak ve ark., 2014).



Şekil 1.1. Katyon ve anyon değiştirici kolon dolgu maddesi (Berg, 2002)

Proteinlerde karboksil, amino veya tersiyer amino gruplar başlıca etkileşime giren gruplardır. Bu nedenle anyon değiştiriciler proteinlerin protonsuz karboksil gruplarını tutarken protonlanmış amino gruplarını iter. Proteinler amfoterik moleküllerdir ve hem anyon hem de katyon değiştiricilerine bağlanırlar. Çoğu kez ayrılmaya çalışılan proteinlerin izoelektrik noktası bilinmez ve bir protein karışımdaki proteinlerin birbirlerinden ayrılabilmesi için ne tip bir iyon değiştirici kullanılacağı ancak deneme yanılma yöntemiyle belirlenebilir.

İyon değiştirici kromatografide, yüke bağlı saflaştırma yapıldığı için iyon değiştirici kolon dolgu maddesinin yükü sabit olmalıdır, aksi takdirde proteinlerin yüke bağlı ayrımı gerçekleştirilemez. Bu durumda bütün proteinler birlikte geleceklerdir. Bağlanma gücü hem proteinin izoelektrik noktasına hem de toplam yüküne bağlıdır. Dolayısıyla aynı izoelektrik noktasına sahip iki protein, denge izoelektrik odaklama yöntemiyle birbirinden ayrılmazken iyon değişim kromatografisiyle ayrılabilirler (Dalkavrıyan, 2011) .

Ion-Exchange Resins

Name	Functional Group	Matrix	Class
Anion Exchangers			
AG I	Tetramethylammonium	Polystyrene	Strong
AG 3	Tertiary amine	Polystyrene	Weak
DEAE-Sephacel	Diethylaminoethyl	Sephacel	Weak
PEI-cellulose	Polyethyleneimine	Cellulose	Weak
DEAE-Sephadex	Diethylaminoethyl	Dextran	Weak
QAE-Sephadex	Diethyl-(2–hydroxyl-propyl)-aminoethyl	Dextran	Strong
Cation Exchangers			
AG 50	Sulfonic acid	Polystyrene	Strong
Bio-Rex 70	Carboxylic acid	Acrylic	Weak
CM-Sephacel	Carboxymethyl	Sephacel	Weak
P-Cellulose	Phosphate	Cellulose	Intermediate
CM-Sephadex	Carboxymethyl	Dextran	Weak
SP-Sephadex	Sulfopropyl	Dextran	Strong

Şekil 1.2. İyon değişim kromatografisinde kullanılan reçineler (Boyer, 1982)

1.3.4. Elektroforez

Elektroforez doğrudan bir saflaştırma aşaması olmamakla birlikte proteinlerin birbirinden ayrılması ve tanımlanmasında önemli bir yöntemdir. Elektroforez de iyon değiştirici kromatografi gibi proteinlerin net yüklerinden faydalanarak ayrıştırmayı sağlar. Prensip olarak net yüke sahip proteinlerin genellikle poliakrilamid jel üzerinde elektrik akımı yardımıyla yürütülmesine dayanır. Bu yöntem çok büyük miktarlarda proteinlere uygulanamamaktadır. Elektroforetik metodlar proteinlerin yapı ve işlevlerini ters etkiler. Elektroforezin avantajı proteinlerin hem birbirinden ayrıştırılması hem de görüntülenebilmesidir. Bu yöntem sayesinde karışımdaki proteinler ayrı ayrı görülebilir bu sayede karışımın kaç farklı protein ihtiva ettiğini ve özgün bir proteinin saflık derecesi tahmin edilebilir. Elektroforez daha ziyade saflık derecesi ve molekül ağırlığı tayininde kullanılır.

Genel olarak kullanılan elektroforez yöntemlerinden biri SDS eklenerek yapılan elektroforezdir. SDS etkisiyle net negatif yük artar ve proteinin iç yükü maskelenir böylece her proteinin yük kütle oranı benzer hale gelir. SDS varlığında proteinler yalnızca kütleleri temel alınarak ayrıştırılır. Ayrıca SDS alt birimi olan proteinleri de etkiler ve alt birimler de elektroforezde görülür (Lehninger, 2005).

1.4. Kereviz (*Apium graveolens*)

Kereviz (*Apium graveolens*), maydanozgiller Apiaceae familyası içinde, batı ve kuzey Avrupa sahil bölgelerinde ve özellikle de bu bölgelerin çukur ve sazlık kesimlerinde yetişmektedir, kökü vaprağı yenilebilen, iki senelik bir bitkidir. Yaprakları bir metreye kadar boy atabilir. Çiçekleri krem rengine çalan beyaz renkte, 2-3 mm. çapındadır. Kereviz ikiye ayrılır: yaprak kerevizi (*Apium graveolens var. dulce*) ve kök kerevizi *(Apium graveolens var. rapaceum*) (Doğan, ders notu). Bu çalışmada kök kerevizi kullanılmıştır.

Kereviz ilk olarak Antik Yunanlılar tarafından keşfedilmiştir ve kendine has kokusu ve tadından dolayı salata, çeşitli kokteyller, yemek vb. olarak kullanılmıştır. Tıbbi alanda faydaları keşfedildikten sonra orta çağ döneminde popüler bir hal almıştır. (Alsuhaibani, 2013)

Kereviz (*Apium graveolens*), insanlık tarihinde tıbbi amaçlı veya baharat olarak kullanıldığı bilinen önemli bitkilerden biridir. Bitkinin tümü, özellikle yapraklar ve kökleri, spesifik tat ve aromatik kokuya sahiptir (Başak ve ark., 2008)

Kereviz tıbbi amaçlı olarak birçok alanda etkilidir. Bunların arasında antihipertansif, antihiperlipidemik, antikarsinojenik, diüretik, antioksidan etkileri vardır. Kereviz betakaroten, folik asit, C vitamini, sodyum, magnezyum, silis, klorofil ve lif açısından çok zengin bir bitkidir (Asadi-Samani ve ark., 2015).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hirasawa ve ark., (1987), Ispanaktan (*Spinacea oleracea*) katalaz enzimini saflaştırmışlar ve ıspanak katalazının spektroskopik özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucu enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 25000 U/mg protein değerinde belirlemişlerdir. Ayrıca jel filtrasyonu yardımıyla enzimin moleküler ağırlığını da 125 kDa olarak bulmuşlardır

Havir ve Mchale, (1987), Tütün yapraklarından (*Nicotiano sylvestris*) katalaz enzimini; Sephadex G 25 kolonu kullanarak saflaştırmışlardır (biri tipik düşük peroksidatik aktivitesi olan CAT-I ve diğeri yüksek peroksidatik aktivitesi olan CAT-III izoenzimlerini). Bunların katalitik reaksiyonda Km değerleri CAT-I için 0,057 M ve CAT-III için 0,054 M olarak saptanmıştır.

Beaumont ve ark, (1990), Patates kökünden (*Solanum tuberosum*) katalaz enzimi; AcA-34 ultrajel kolonu ile saflaştırmışlardır. Yapılan aktivite çalışmaları sonucu enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 U/mg protein değerinde saptamışlardır. Molekül ağırlığı ölçümünde ise enzimin molekül ağırlığı 224 kDa bulmuşlardır. Ayrıca bu araştırmada enzim için siyanid ve azid inhibitörleri kullanmışlardır.

Mitchell ve ark., (1991), Lahanadan (*Trichoplusiani*) katalaz enzimini; ethanol-kloroform fraksiyonu ve standart kolon kromotogrofisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi 2,2x105 unite, moleküler ağırlığı 247-259 kDa aralığında saptanmıştır. Enzimin biyokimyasal özellikleri (substrat spesifikliğinin önemi, kinetiği, tersinmez inhibitör olan 3-1,2,4-triazol'ün mekanizmayı inaktive etmesi) saptanmıştır.

Mullen ve ark., (1993), Kuzey Carolina Çamından (*Pinus taeda*) katalaz enzimini saflaştırmışlardır. Katalazı çamdan saflaştırmak için DE-52 selüloz, Superdex-200 ve phenyl-sepharose CL-4B kullanmış ve katalazın spesifik aktivitesini 2215 U/mg protein olarak bulmuştur.

Dinçer, (2000), Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden katalaz enzimini saflaştırmıştır. Katalazı rokadan (*Eruca sativa*) saflaştırmak için sephadex G 25 kolon kromatografisi ve Q-sefaroz kolonu kullanmıştır. Katalazın spesifik aktivitesini 29865 U/mg , optimum pH 7,0-10,0 arasında, optimum sıcaklık 30 ^{o}C ve Km değerini 62,5 mM olarak belirlemiştir

Köksal, (2003), Katalaz enziminin karalahana bitkisinden *(Brassica oleracea L.Var. Acephala D.C.)* saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı pestisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerini incelemiştir. Karalahanadan kısmi olarak saflaştırılan katalaz enziminin optimum pH 7,8 ve optimum sıcaklık 25 ºC olarak bildirilmiştir. Km ve Vmax değerleri 0,0159 M ve 588,2 U/ml olarak bildirilmiştir.

Kailash, (2004), Keten tohumundan izole edilen keten lignanı bileşiğinin hipo kolesterolemik ve antiarteriosklerozik etkisini incelemiştir. Bu çalışmada keten tohumundan izole edilen enzim homojenatında katalaz enziminin kinetik aktiviteleri incelenmiş ve katalaz enziminin davranışları rapor edilmiştir.

Yörük ve ark., (2005), Van elmasından (*Golden delicious*) katalazı saflaştırmış ve bazı özelliklerini incelemiştir. Enzimin spesifik aktivitesini 29.43 U/mg protein olarak belirlemiştir. Optimum sıcaklığı 50 ^{o}C ve optimum pH 5,0 olarak bulunmuştur.

Sondaş, (2005), Nane (*Menta spicata)* ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden katalaz enzimini kısmı saflaştırmış, karekterizasyonunu ve bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Nane bitkisinde optimum pH 6,0 , optimum sıcaklık 40 ^{o}C , Vmax değeri 108,69 U/ml ve Km değeri 1,175 mM olarak, pırasa bitkisinde optimum pH 7,5 , optimum sıcaklık 30 ^{o}C , Vmax değeri 50 U/ml ve Km değeri 1,172 mM olarak bulunmuştur.

Malgorzata ve ark., (2005), Dondurulmuş soya fasulyesi filizlerindeki antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. 1 °C ye soğutulmuş filizlerdeki CAT ve SOD aktivitelerinin 25 °C dekine göre arttığı gözlenmiştir.

Lokman Ö. ve ark., (2005), Maydanozdan katalaz enzimini; Amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sephadex A 50 jelinin kullanıldığı iyon değişim kromotografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi 1126 U/mg, optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklığı ise 35 °C olarak saptanmıştır.

Demir, (2006) Aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından katalaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmıştır. Katalaz enziminin, spesifik aktivite değeri 89.68 U/mg protein olarak bulunmuş, enzimin molekül ağırlığı, SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi ile 60,95 kDa olarak saptamıştır. Enziminin Km değeri H_2O_2 için 7,87mM, Vmax değeri H_2O_2 için 42,19 U/ml olarak bulunmuştur.

Bozdemir, (2007), Keten tohumu (*Linum usitatissimum*) ekstraktında katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini incelemiş, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 17,56 U/mg protein, süperoksit dismutaz enziminin spesifik aktivitesi 4,90 U/mg protein olarak hesaplamıştır.

Kara, (2008), Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (*Cucurbita maxima ve moschata)* katalaz enzimini saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Enzim için optimum pH, optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 6,8-7,0 ve 25 °C olarak bulunmuştur. *Cucurbita maxima* için Km 17,68 mM, Vmax 81,300 U/ml; *Cucurbita moschata* için Km 20,029 mM, Vmax 58,139 U/ml olarak belirlemiştir

Seriner, (2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) katalaz enzimini; amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kolon kromatografisi kullanarak saflaştırmıştır. Katalaz enziminin spesifik aktivite değeri 26 U/mg protein olarak bulunmuş, DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırmanın son basamağında 393 U/mg protein olarak saptamıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında

1) Şimdiye kadar katalaz enzimi kaynağı olarak kullanılmamış, kerevizden *(Apium graveolens)* katalazı saflaştırılması,

2) Saflaştırılan katalaz enziminin, kinetik özellikleri (K_m, V_{max}), termal ve depolama kararlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kereviz bitkisinin kök kereviz türü kullanılmıştır (*Apium graveolens var. rapaceum*). Kullanılan kereviz bitkileri, Adana sebze halinden temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma, St. Louis, MO, Merck firmaları tarafından sağlanmıştır

3.1.1. Kimyasallar

PVP (çözünebilir polyvinylpyrolidone), PMSF(fenilmetilsülfonilflorit), DL-Dithiothreitol, EDTA (Etilendiamintetraasetikasit), PEG-4000 (polyetylen gylycol-4000), Sephadex G 25, Sephadex A 25, Fosforik asit, Asetik asit, Hidrojen peroksit (H_2O_2), Hidroklorik asit, Sodyum hidroksit, $CuSO_4$.5 H_2O, Folin-ciocalteu çözeltisi, Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Sığır serum albümin (BSA), Amonyum sülfat ($(NH4)_2SO_4$), Bakır klorür , Trizma base, Tris HCl, Akrilamid, N,N, Bis akrilamid, SDS (sodyumdodesilsülfat), Bromofenol Mavisi, Glisin, Amonyum Peroksidosülfat, Gliserol, Metanol, Asetik Asit, TEMED, $Na_2S_2O_3$.5H_2O, Na_2CO_3, Coomassie Brilliant Blue

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV-Vis Spektrofotometre (UNICAM), pH Metre (Hana 8417), Elektroforez (Bio Rad), Magnetik Karıştırıcı (Are), Kromatografi Kolonları, Santrifüj (Jouan MR23i), Etüv (ES 500), Otomatik Pipet (Eppendorf), Elektronik Terazi.

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin Homjenizasyonu

Kerevizin yapraklarında ve kökünde çalışmalar yapılmıştır. 10 g kereviz, 1 g PVP (çözülebilir polivinil poliprolidon) 50 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisine 1 mM PMSF (fenil metil sülfonil florid), 0,1 mM EDTA, 2 mM DL-Dithiothreiol ve 1,25 mM PEG-4000 eklenerek homojenize edilmiştir. Daha sonra soğutmalı santrifüjde 10500 *g*'de 25 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar 4 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini

Reaktif olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde 20 mM hidrojen peroksit çözeltisi ve katalaz enzimi içeren ekstraktlar kullanılmıştır. UV küvetlerinin birine 2.9 ml hidrojen peroksit çözeltisi ve 0.1 ml enzim çözeltisi, diğer küvete ise 50 mM pH 7 fosfat tamponu konulmuştur. 25 ºC de absorbansı okunmuştur. Bu sıcaklıkta absorbansın 0.450'den 0,400'e düşmesi için geçen süre belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = \frac{(3.45)(df)}{(zaman)(0.1)}$$

df= seyreltme faktörü.

Zaman= absorbansın 0.450'den 0,400'e düşmesi için geçen süre (dak.)

0.1= Küvete eklenen enzim çözeltisi miktarı (ml).

Aktivite değeri enzim içerisinde bulunan protein miktarına bölünürse spesifik aktivite bulunur.

Spesifik Aktivite = Aktivite / Protein miktarı (mg)

3.2.3. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry, ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri açıklanan A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A : 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 litreye tamamlanmıştır.
2. Çözelti B : 0.5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1' lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 ml' ye tamamlanmıştır.
3. Çözelti C : 50 ml A çözeltisi ile 1 ml B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır
4. (Kullanılacağı zaman taze hazırlanmıştır.)
5. Folin-Ciocalteu çözeltisi : Folin-Ciocalteu saf su ile 1/1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
6. Standart protein çözeltisi: 1 ml' de 1 mg sığır albümini çözeltisi hazırlanmıştır.
7. Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpüne sırayla 0, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µl standart sığır albümin konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi 1 ml' ye tamamlanmış, her tüpe 5 ml C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra her tüpe 1/1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.5 ml eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansı köre karşı 750 nm' de okunmuştur. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Katalaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Kerevizden elde edilen homojenatlarda sırasıyla % 10-20; 20-30, 30-40, 40-50 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) yavaş yavaş eklenmiştir. Çöktürme işlemi 10500 g'de 25 dakika boyunca yapılmıştır. Her

aşamada çökelekte ve süpernatantta aktivitelere ve protein miktarına bakılmıştır. Katalaz enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir.

3.2.5. Proteinlerin Sephadex G 25 İçeren PD-10 Kolonuna Uygulanması

Katalaz enzimini içeren 4 ml enzim ekstraktı Sephadex G 25 M jeli içeren kolona uygulanmıştır. Örneklerin kolondan alınması 50 mM pH 8,0 Tris-HCI tamponu ile yapılmıştır. Protein örnekleri 1,5 ml hacmindeki tüplerde toplanmış ve toplanan her tüp için protein miktarına ve katalaz enzim aktivitelerine bakılmıştır.

3.2.6. Sephadex A 25 Kolonunun Hazırlanması ve Proteinlerin Kolona Uygulanması

Katı Sephadex A 25 kolon dolgu maddesinden, 1 gram tartılmış ve kolona konulmuştur. Daha sonra 50 mM pH 8,0 Tris-HCl tamponu eklenerek kolon hazırlanmıştır. Kolondan tampon geçirilerek 2 gece bekletilmiştir.

Örnek uygulanmasında Sephadex G 25 içeren PD-10 kolondan alınan 3 ml örnek Sephadex A 25 kolonuna uygulanmıştır. Örnekler 1,5 ml lik tüplerde derişimleri değişen tamponlarla toplanmıştır. Tampon olarak pH 8,0; 100 mM, 250 mM ve 500 mM'lık Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. Toplanan örneklerin 280 nm de proteinlerine bakılmış ve aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.7. Katalaz Enzimi Üzerine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Optimum pH belirlemek için substrat olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde 15mM (w/w) hidrojen peroksit çözeltisi kullanılarak, pH 5,0'ten 8,5'a kadar tampon aralığında çalışılmıştır. pH 5,0 ten pH 6,5 için asetat tamponu pH 7,0'dan 7,5'e kadar fosfat tamponu, pH 8,0'de 8,5'e Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar grafikte gösterilmiştir.

3.2.8. Katalaz Enzimi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Sıcaklığın katalaz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması H_2O_2 substratıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimin optimum pH'sında ve 20-60 °C aralığındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır.

Aktivite ölçümleri Aebi tarafından önerilen ve Lartillot, S. ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Hidrojen peroksit için molar ekstinksiyon katsayısı 0,0396 cm^2 μmol^{-1} dir. 50 mM pH 8,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 10 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlanır. Kör olarak 2,5 ml tampon ve 0,5 ml 1M HCI içeren çözelti kullanılır. Hidrojen peroksitin başlangıçtaki absorbansını (As) belirlemek için; 2,5 ml substrat ve 0,5 ml 1 M HCI içeren çözeltinin 240 nm' de absorbansı ölçülür. Proteinin neden olacağı absorbansı (At) belirlemek için; 20 µl enzim çözeltisi, 2,5 ml tampon ve 0,5 ml 1 M HCI içeren çözeltinin absorbansı ölçülür. 20 µl test edilecek enzim çözeltisi (Ar) üzerine 2,5 ml substrat çözeltisi eklenir ve istenilen sıcaklıklarda 2 dk. bekletilir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 ml 1 M HCI çözeltisi ilave edilir.

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbans değişimi (A):

A=(As+At)-Ar dır.

Enzim aktivitesinin U/ml cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{Aktivite} = \frac{A.Vt}{\varepsilon.t.Ve}$$

Vt =Toplam reaksiyon hacmi (ml)

Ve=Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (ml)

$\varepsilon = H_2O_2$ in molar ekstinksiyon katsayısı (0,0396 cm^2 μmol^{-1})

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

Bu çalışmada her bir örnekteki protein miktarı belirlenerek aktivite µmol H_2O_2

mg prot.$^{-1}$ dk^{-1} olarak hesaplanmıştır.
Enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemle 240 nm de ölçülmüştür.

3.2.9. Katalaz Enzimi Örneklerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Katalaz örneği 40 °C ve 25 °C'de 1, 2, 5, 12 ve 24 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüş ve % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır.

3.2.10. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Katalaz enzimi örneği % 10, % 20, % 30 luk gliserol çözeltilerinde oda sıcaklığında ve 4 ºC'de bekletilerek 7. 15. ve 30. günlerde aktivitelerine bakılmıştır. Hangi çözelti ve hangi sıcaklıkta nasıl bir aktivite değişimi gösterdiği gözlemlenmiştir.

3.2.11. Katalaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta (7,5 ve 30 ºC) farklı H_2O_2 derişimleri (30-25-20-17,5-15-12,5-10-7,5-5 mM) kullanılarak ölçülen aktiviteler için Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır.

3.2.12. Katalaz Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Katalaz enziminin molekül ağırlığını belirlemek için Nativ-PAGE ve SDS-PAGE yapılmıştır.

3.2.12.1. SDS-PAGE Elektroforezi

Stok Çözeltiler Ve Tamponlar

1. Akrilamid/Bis akrilamid: 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N'N'-bis-metilenakrilamid deiyonize suda çözülüp 100 ml'ye tamamlanır.

2. % 10 (w/v) SDS: 10 g SDS 90 ml suda çözülüp 100 ml ye tamamlanır. Süzülüp 4 °C'de karanlıkta saklanır.
3. 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8: 15,125 g tris baz ,3,94 g tris asit çözülüp pH 8,8'e asit yada baz ile ayarlanır, 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.
4. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8: 0,291 g tris baz, 7,502 g tris asit çözülüp pH 6,8'e asit yada baz ile ayarlanır, 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.
5. Örnek Tamponu: 3,55 ml deiyonize su, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,5 ml gliserol, 0,2 ml % 0,5 (w/v) bromofenol mavisi ve 2 ml % 10 SDS eklenip karıştırılır.
6. Yürütücü Tampon, pH 8,3; 3,03 g Tris baz; 14,4 g Glisin ve 1 g SDS çözülüp 1000 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır. pH'ı asit veya baz ile ayarlanmaz. 4 ^{o}C 'de saklanır.
7. % 10 APS: 0,1 g amonyum persülfat 1 ml deiyonize suda çözülür. Kullanılacağı zaman hazırlanmalıdır.

Jelin Hazırlanması (10 ml)

TEMED ve % 10 APS hariç tüm ayıraçlar karıştırılarak monomer çözeltisi hazırlanır (Çizelge 3.1). 15 dakika degaze edilir.

Çizelge 3.1. % jel konsantrasyonlarına karşı eklenmesi gereken maddeler.

Çizelge 3.1. Elektroforez için jel hazırlama

% jel	Deiyonize su (ml)	%30 akrilamid/bis (ml)	Jel tamponu	%10(w/v)SDS
%5	5,7	1,7	2,5	0,1
%15	2,4	5,0	2,5	0,1

*Ayırma Jeli (Alt jel) (% 15) Tamponu = 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
*Konsantrasyon Jeli (Üst Jel) (% 5) Tamponu = 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Daha sonra 10 ml monomer çözeltisi için:

Ayırma Jeli (Alt Jel) (% 15) için: 50 µl % 10 APS; 5 µl TEMED

Konsantrasyon Jeli (Üst jel) (% 5) için:50 µl % 10 APS; 10 µl TEMED eklenip polimerleşmenin başlaması için hafifçe çalkalanır.

Alt jel hazırlanarak elektroforez plakaları arasına boşaltılır. 45 dakika beklenir. Polimerizasyonun hızlanması için jelin üst kısmına n-bütanol eklenerek hava ile teması önlenir. Jelleşme gerçekleştikten sonra jelin üstündeki bütanol alınır. Üst jel hazırlanıp, alt jelin üstüne dökülür. Elektroforez tarağı, monomer çözeltisi ile arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilir. 45 dakika polimerizasyona bırakılır. Polimerleşmeden sonra tarak jelden çıkarılır. Kuyucuklar oluşur. Elektroforez plakaları çıkarılıp, jel kasetinin içerisine yerleştirilip, tankın içine konur. Jel kasetinin içine ve dışına yürütücü tampon eklenir. Eppendrof tüplerine 10 µl (20 µg protein) protein örneği alınıp üzerine 20 µl β-merkaptoetanol, örnek tamponu eklenip 95 °C'de 4 dakika ısıtılır. Eppendrof tüplerinde hazırlanan örneklerden, 10 µl alınarak kuyucuklara konulur. Elektroforez cihazı, 150 V'a ayarlanıp elektroforeze başlanır. Tüm örnekler tek bir çizgi şeklinde olunca 200 V'a çıkarılır. Bromofenol mavisi jelin sonuna geldiğinde akım kesilir. Jel kasetinin içinden elektroforez plakaları çıkarılır. Cam plakalardan küçüğü çıkarılır. Jel, büyük cam plakadan ayrılarak boyama çözeltisine konur.

3.2.12.2. Nativ-PAGE

Alt ve üst jeller SDS eklenmeden yerine deiyonize su eklenerek hazırlanıp polimerleşmeden sonra kuyucuklar oluşturulur. Örneklerden 10 µl (20 µg protein) eppendorf tüplerine alınıp üzerine 20 µl örnek tamponu eklenir. Elektroforez plakaları çıkarılıp, jel kasetinin içerisine yerleştirilip, tankın içine konur. Eppendrof tüplerindeki örnekler, kuyucuklara konulur. Jel kasetinin içine ve dışına yürütücü tampon eklenir. Elektroforez cihazı, 150 V'a ayarlanıp elektroforeze başlanır. Tüm örnekler tek bir çizgi şeklinde olunca 200 V'a çıkarılır. Bromofenol mavisi jelin sonuna geldiğinde akım kesilir. Jel kasetinin içinden elektroforez plakaları çıkarılır.

Cam plakalardan küçüğü çıkarılır. Jel, büyük cam plaka ile birlikte boyama çözeltisine konur.

Boyama çözeltisi: % 0,05 (w/v) Coomasie Brilliant Blue R-250'nin % 45 metanol, % 45 destile su (v/v), % 10 asetik asit (v/v) karışımından hazırlanır. Jel bu çözeltiye konur. Boyama işlemi jelin kalınlığı ve poliakrilamit konsantrasyonuna göre farklılık gösterebilir. Daha sonra boyama çözeltisinden alınıp arıtma çözeltisine konur.

Arıtma çözeltisi: % 45 metanol (v/v), % 45 destile su (v/v), % 10 asetik asit (v/v) karışımında hazırlanır. Boyanın geri alınma işlemi 24 saat sürebilir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Enzim Homojenizasyonundan Elde Edilen Bulgular

Kerevizin kökünden ve yapraklarından homojenatlar hazırlanmıştır. Homojenat hazırlanmasında 10 g kereviz yaprakları (*Apium Graveolens*), 1 g PVP (50 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tampon içerisine) 1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 1.25 mM PEG-4000 ve 2 mM DL-dithiothreitol eklenerek homojenize edilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 10500*g*'de 25 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpenatantlarda aktivitelere bakılmış ve kökte aktivite gözlenmemesine karşın yapraklarda aktivite gözlenmiştir. Yapraklardan elde edilen süpenatantta protein miktarı 9,322 mg/ml ve spesifik aktivite 3,46 U/mg protein olarak bulunmuştur.

4.1.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular

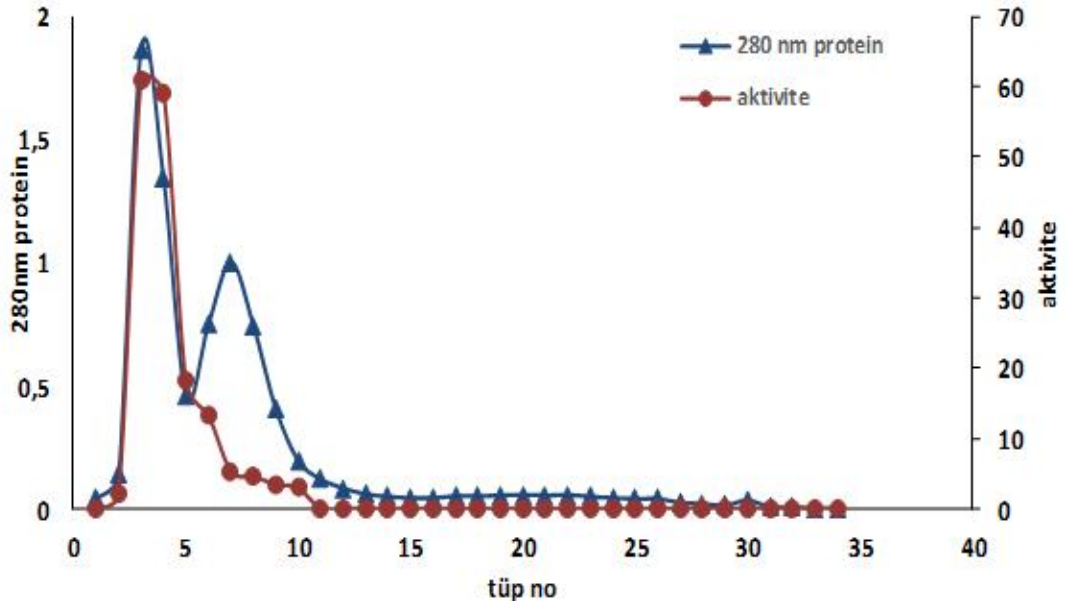
Kereviz yapraklarından elde edilen katalaz enzim homojenatları % 10 - % 50' lik amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Her uygulamada Amonyum sülfat yavaş yavaş eklenerek tamamının çözülmesi sağlanmıştır.Kararlılığa ulaşması için bir süre dolapta bekletilmiştir. Bu örnekler 10500 g' de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan çökelek ve süpernatantların hepsinde aktivitelere bakılmış ve protein tayini yapılmıştır. Tuzla çöktürme sonunda maksimum protein çökmesi % 30'luk amonyum sülfatta olmuştur. Protein tayini sonucunda 2,672 mg/ml protein bulunmuştur. Spesifik aktivite ise 35,213 U/mg proteindir.

4.1.3. Sephadex G 25 Kolon Kromatografisi Sonucu Elde Edilen Bulgular

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen örneklerin 4 ml'si Sephadex G 25 M içeren PD-10 kolonuna uygulanmıştır. Örneklerin kolondan

alınması 50 mM pH 8,0 Tris-HCI tamponu ile yapılmıştır. PD-10 kolonunda tuzdan ayrıştırılmış olan eluatlar 1,5'er ml hacminde toplanmış ve enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. En yüksek aktivitelere 3. ve 4. tüplerde ulaşılmıştır. Ayrıca 3. ve 4. tüpte elde edilen proteinin 280 nm'deki absorbansı sırasıyla 1,862 ve 1,345'tir. Aktiviteler ise 60,882 U/ml ve 59,142 U/ml olarak hesaplanmıştır.

Çalışma sonucu elde edilen veriler Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

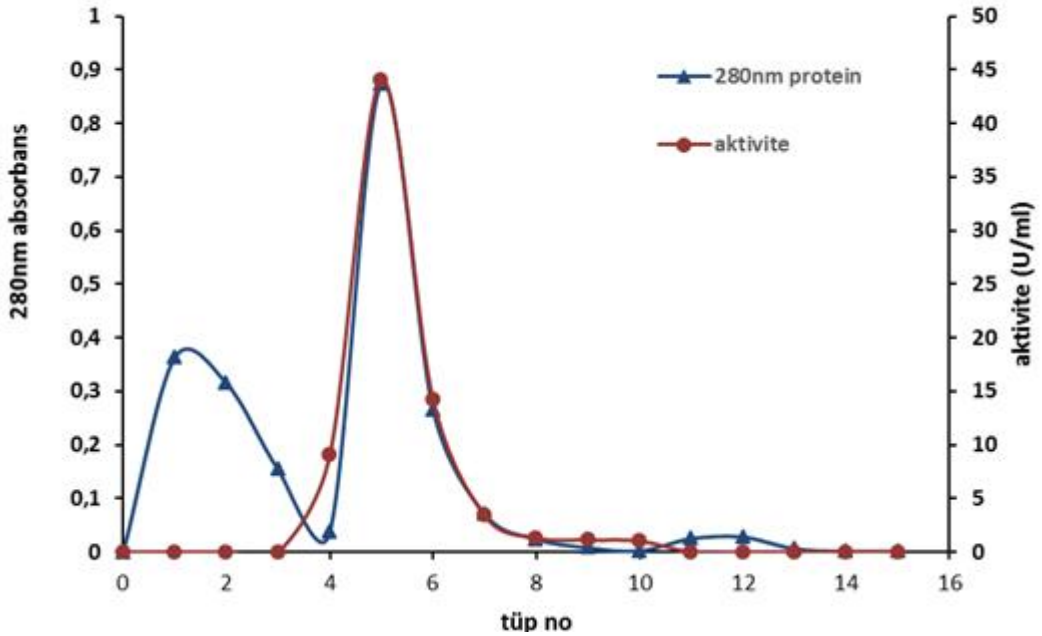


Şekil.4.1. Sephadex G 25 içeren PD-10 kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve aktivite değerleri.

4.1.4. Sephadex A 25 Kolon Kromatografisi Sonucu Elde Edilen Bulgular

Sephadex G 25 kolonundan toplanan eluatlardan en yüksek aktivite gösteren örnekler (3. ve 4. tüpler) bir araya getirilmiştir. Bu örnekler Sephadex A 25 kolonuna uygulanmıştır. Uygulanan işlem 500 mM pH 8,0 tris tamponu yardımıyla 1,5 ml'lik tüplerde toplanmış bu örneklerin protein tayini ve aktiviteleri ölçülmüştür. Sephadex A 25 kolonundan alınan örneklerde en yüksek aktivite bu fraksiyonlardan 5. tüpte elde edilmiştir. 5.tüpteki enzimin aktivitesi 44,05 U/ml protein absorbansı ise 280nm'de 0,8874 olarak bulunmuştur.

Bulgular şekil 4.2'de gösterilmiştir



Şekil.4.2. Sephadex A 25 kolonundan elde edilen eluatların 280nm'de okunan protein tayini ve aktivite değerleri.

Çizelge.4.1. Kereviz katalazı için saflaştırma sonuçları

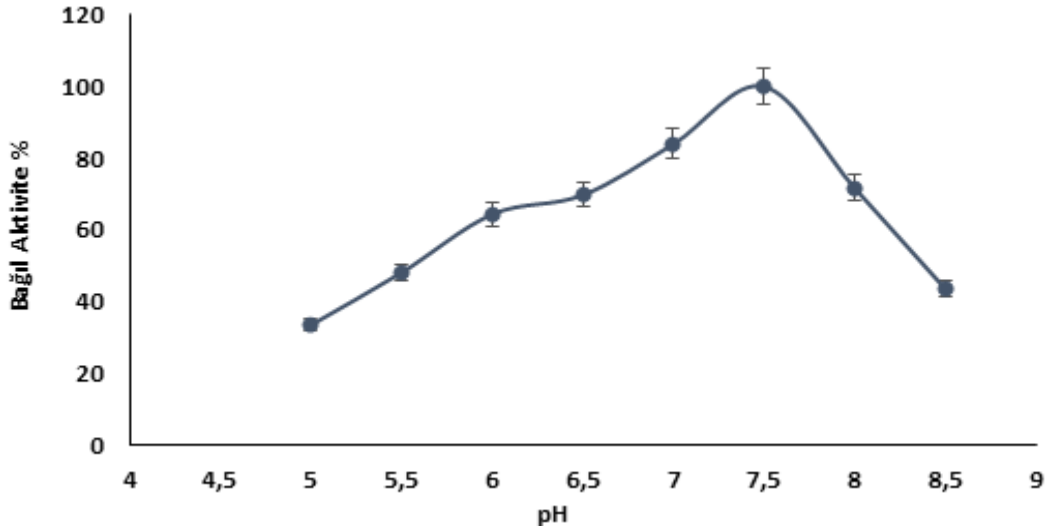
Saflaştırma basamağı	V_T	Prot.	Top.prot (mg)	Akt. (U/ml)	Top.akt. (U)	Spes.akt. (U/mg prot)	%verim	Safl. oranı
Ham hom.	25	9,32	233	32,33	808,35	3,46	100	1
%30 amonyum sülfat çökt.	4	2,67	10,7	94,09	376,36	35,21	46,5	10,17
Sephadex G 25	3	1,73	5,18	60,88	182,65	35,30	22,6	10,20
Sephadex A 25	1,5	0,65	0,97	44,05	66,06	67,86	8,3	19,61

4.1.4. Katalaz Enzimi Üzerinde pH'ın Etkisi ile İlgili Bulgular

Kolondan alınan en yüksek aktiviteyi gösteren eluat kullanılarak yapılan çalışmada katalazın maksimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için pH 5,0-8,5' tampon aralığı kullanılmıştır. Bu tamponları hazırlamak için, pH 5,0'dan pH 6,5'a kadar asetat tamponu, pH 7,0 dan, pH 7,5'e kadar fosfat tamponu pH 8,0 ve 8,5

kadar da tris-HCl tamponu kullanılarak 25 ^{o}C de yapılan pH çalışması sonucunda optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. pH 5'te enzim aktivitesinin % 34'ünü gösterirken pH 8,5'te aktivitesinin % 43'ünü göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar şekil 4.3.'te gösterilmiştir.

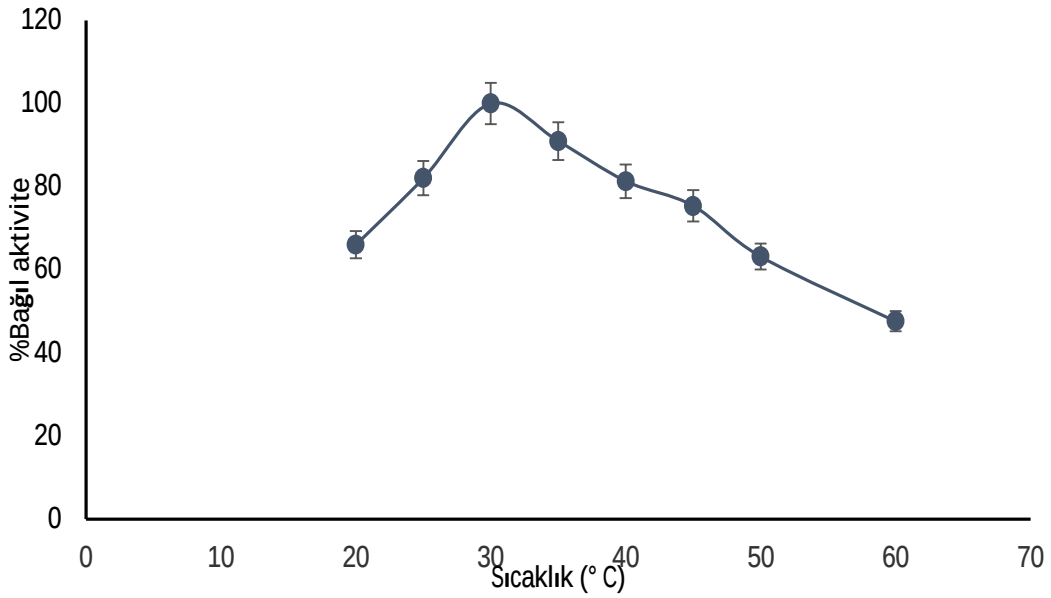


Şekil.4.3. Kolondan alınan maksimum aktivite gösteren örnek için farklı pH' larda ölçülen bağıl aktivite değerleri.

4.1.6. Katalaz Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi ile İlgili Bulgular

Katalaz enzimi üzerine sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla 20-60 ºC arasında optimum koşullarda sıcaklık çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda kereviz katalazının optimum sıcaklık değeri 30 ºC olarak belirlenmiştir. Diğer sıcaklıklara bakıldığında 20 °C' de enzim aktivitesinin % 65'ini gösterirken 60 °C sıcaklıkta enzim aktivitesinin sadece % 47'sini göstermektedir.

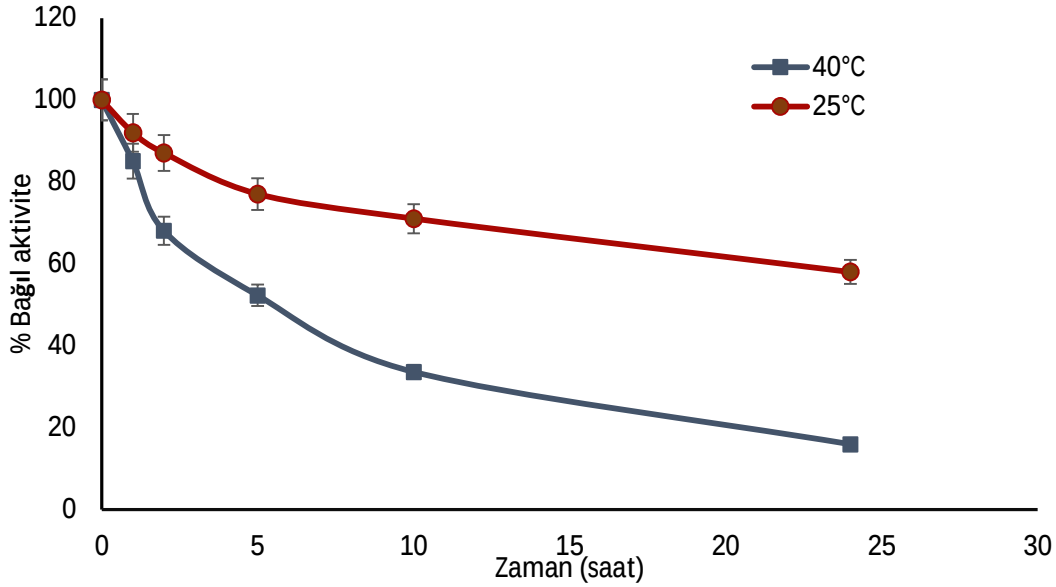
Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil.4.4. Kolondan alınan maksimum aktivite gösteren örnek için farklı sıcaklıklarda ölçülen bağıl aktivite değerleri.

4.1.7. Termal Kararlılık İle İlgili Bulgular

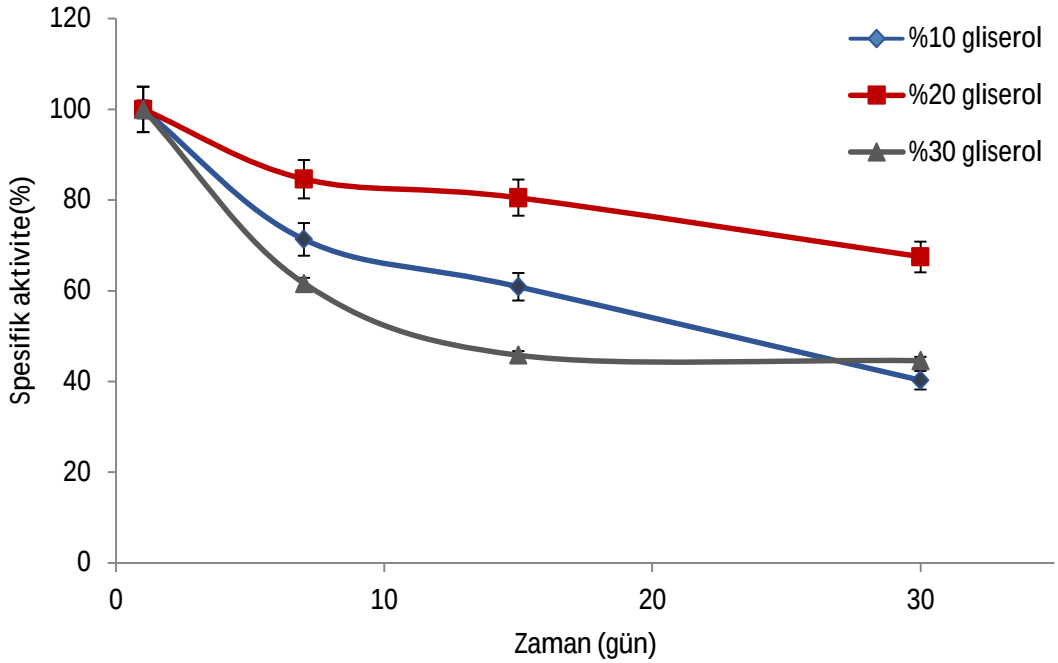
Katalaz örneği 40 °C ve 25 °C'de 1, 2, 5, 12 ve 24 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüş ve % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. 24 saat sonunda 40 °C'de aktivitesinin % 16'sını korurken 25 °C'de ise aktivitesinin % 58'ini koruduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir



Şekil.4.5. Katalaz enzimi için bağıl aktivitenin süreye bağlı değişimi.

4.1.8. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığına Ait Bulgular

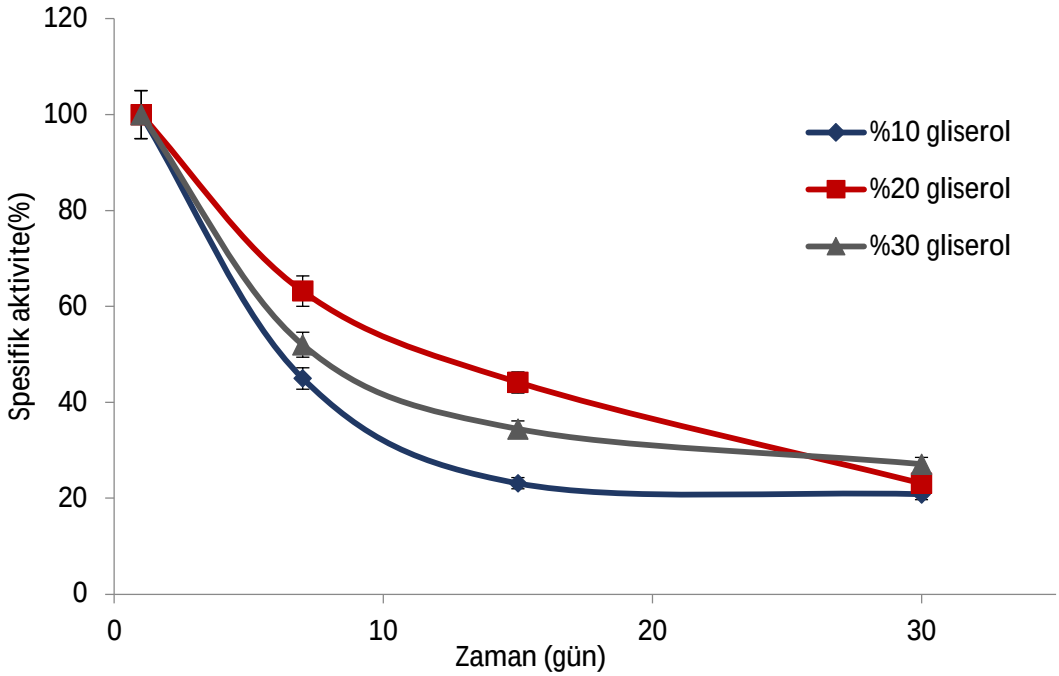
Katalaz enziminin depolama kararlılığını belirlemek için örnek % 10, % 20, % 30 luk gliserol çözeltilerinde 25 °C ve 4 ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Bu çalışma sonucunda ölçülen değerler Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 'de gösterilmiştir. Gliserol çözeltilerinin aktivite kaybını belirli bir oranda önlediği gözlemlenmiştir. En düşük ativite kaybının % 20'lik gliserol çözeltisi içinde ve 4 derecede olduğu ve bu koşullarda katalaz enzim aktivitesinin % 67'sini koruduğu belirlenmiştir. Şekil 4.6' da görüldüğü gibi diğer çalışma aralıklarında yani 4°C ve %10 - % 30'luk gliserol çözeltilerinde 30 günün sonunda % 10'luk gliserol çözeltisinin içinde saklanan katalaz enziminin kalan aktivitesinin % 40'ını; % 30'luk gliserol çözeltisindeki enzimin aktivitesinin ise % 44'ünü koruduğu belirlenmiştir.



Şekil.4.6. 4 ºC'de % 10,% 20,% 30 luk gliserol çözeltileri içinde saklanan katalaz enziminin aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.7'de ise oda sıcaklığında ve % 20 gliserol çözeltisi içindeki enzim, aktivitesinin % 23'ünü korumuştur. Bununla birlikte diğer çalışma aralıklarında yani 25 °C'de % 10 - %30'luk gliserol çözeltilerinde 30. günün sonunda % 10'luk gliserol

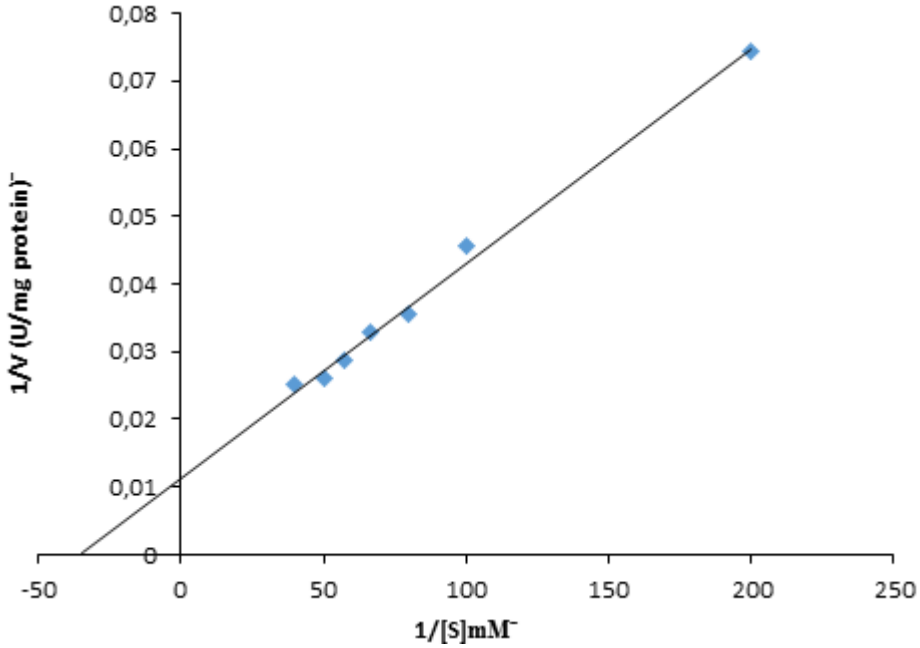
çözeltisi içinde bekletilen enzimin aktivitesinin % 21'ini; % 30'luk gliserol içindeki enzimin ise aktivitesinin % 27'sini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil.4.7. 25 ºC'de %10, % 20 ,% 30'luk gliserol çözeltisi içinde saklanan katalaz enziminin aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

4.4.9. Katalaz Enziminin Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta (7,5 ve 30 ºC) farklı H_2O_2 derişimleri (30-25-20-17,5-15-12,5-10-7,5-5 mM) kullanılarak ölçülen aktiviteler için Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve. Şekil 4.8'e gösterilmiştir. Grafiğe göre kinetik parametreler hesaplanmıştır. Km ve Vmax değerleri sırasıyla 27,5 mM ve 87 U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

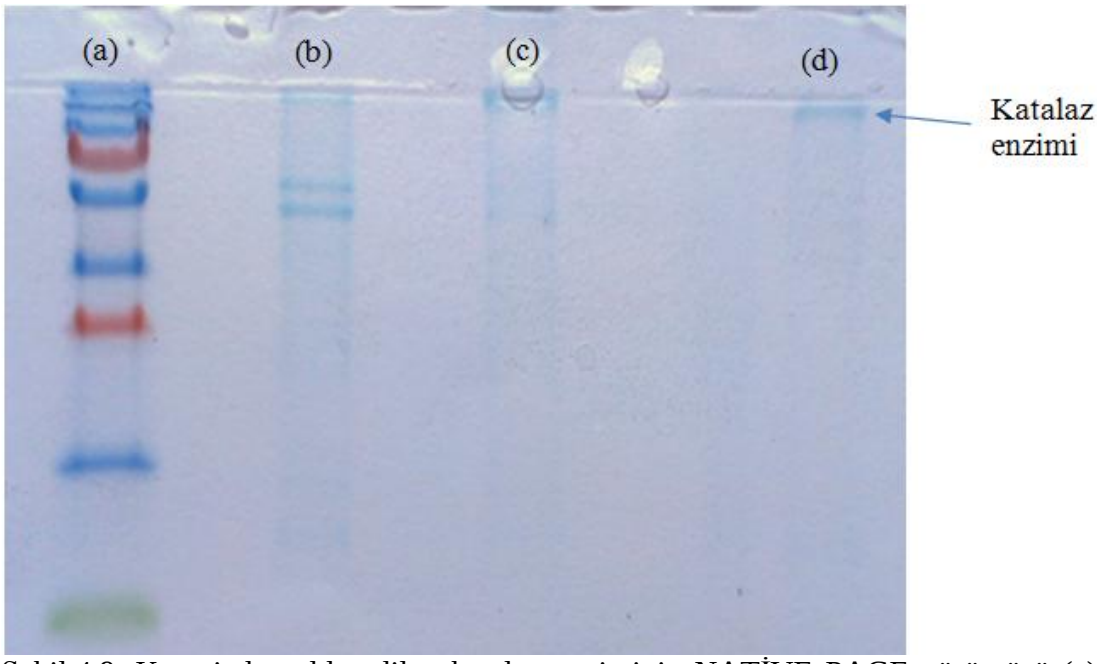


Şekil.4.8. Katalaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

4.4.10. Katalaz Enziminin Moleküler Ağırlığının Tayini

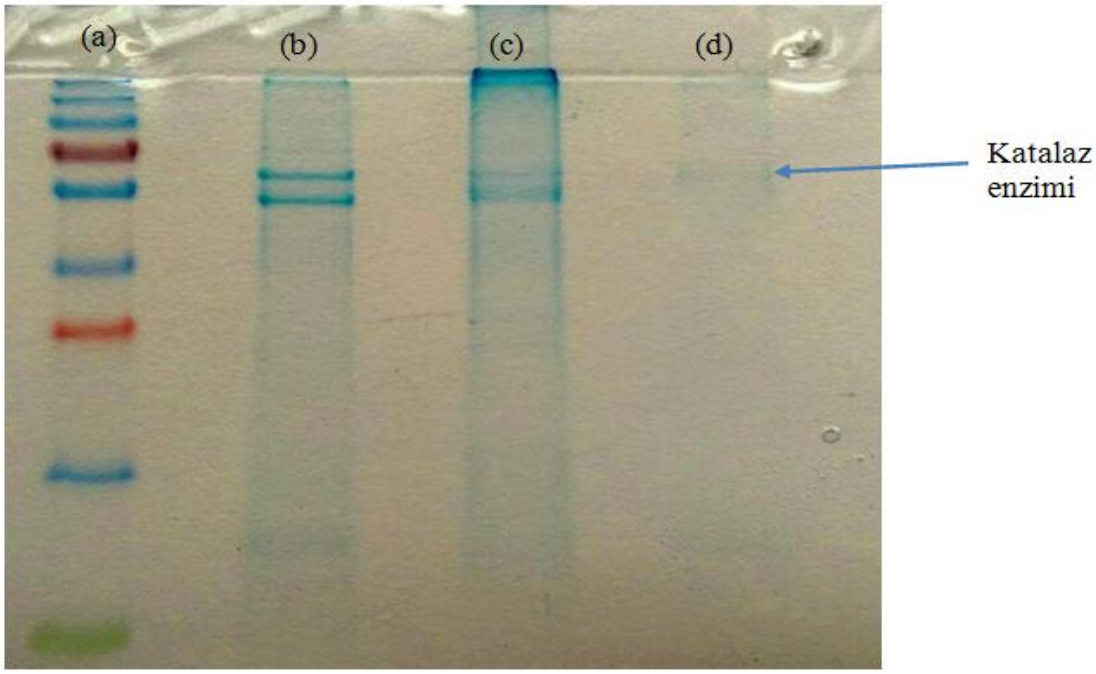
Kerevizden saflaştırılmış olan katalaz enziminin molekül ağırlığı uygulanan saflaştırma işlemlerinin ardından elektroforez yardımıyla ölçülmüştür. Enzimin molekül ağırlığını belirlemek için önce NATİVE-PAGE daha sonra da SDS-PAGE yapılmıştır. Elektroforez görüntülerinde enzimin saflaştırıldığı görülmektedir. Enzimin elektroforez sonuçları Şekil.4.9. 'da verilmiştir.

Kerevizden elde edilen katalaz enziminin NATİVE-PAGE de bakılan molekül ağırlığı 236 kDa olarak belirlenmiştir.



Şekil.4.9. Kerevizden elde edilen katalaz enziminin NATİVE PAGE görüntüsü (a) marker, (b) ham homojenat, (c) %30 amonyum sülfat çöktürmesi, (d) saflaştırılmış katalaz enzimi

Kerevizden elde edilen katalaz enziminin SDS-PAGE de bakıldığında alt birimleri yaklaşık olarak 59 kDa civarında bulunmuştur.



Şekil.4.10. Katalaz enziminin SDS PAGE görüntüsü (a) marker, (b) homojenat, (c) % 30 amonyum sülfat çöktürmesi, (d) saflaştırılmış katalaZ

4.2. Tartışma

Yapılan literatür taramasında katalaz enziminin birçok kaynaktan saflaştırıldığı görülmüş, fakat kereviz bitkisinden (*Apium graveolens*) saflaştırılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada kerevizden saflaştırılan katalaz enziminin aktivitesi, optimum sıcaklığı, optimum pH'sı belirlenmiş; depolama kararlılığı, termal kararlılığı ölçülmüş bununla birlikte Km ve Vmax değerleri bulunmuş ve de katalaz enziminin molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

Bu çalışmada ilk olarak kaba homojenat 10500 *g*'de 25 dak santrifüj edilip süzüldükten sonra homojenattaki protein miktarı ölçülmüş ve sonuç 9,322 mg/ml olarak belirlenmiştir. Spesifik aktivitesi ise 3,46 U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Literatüre bakıldığında çeşitli kayanaklardan yapılan saflaştırmalar sonucu farklı aktiviteler rapor edilmiştir. Seriner (2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) elde ettiği ham katalaz enziminin spesifik aktivite değerini 26,56 U/mg protein olarak bulmuştur. Bozdemir (2007), Keten tohumu (*Linum usitatissimum*) ekstraktında katalaz enziminin spesifik aktivitesini 15,94 U/mg protein olarak hesaplamıştır. Demir (2006) Aşotu yapraklarından elde ettiği ham katalazın spesifik aktivitesini 1,4 U/mg protein olarak belirlemiştir. Lokman Ö. ve ark. (2005) maydonozdan elde ettiği katalazın ham homojenatındaki spesifik aktivitesini 193 U/mg protein olarak bulmuştur. Mullen ve ark. (1993) Kuzey Carolina Çamından (*Pinus taeda L.*) elde ettiği ham katalaz homojenatının spesifik aktivitesini 16 U/mg protein olarak belirlemiştir.

Kereviz katalazının ham homojenatı % 10-60 aralıklarında amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve katalaz enziminin en fazla % 30 da çöktüğü gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda protein miktarı 2,672 mg/ml, spesifik aktivite ise 35,21 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada iki kolon kullanılmıştır. Kullanılan kolonlardan biri Sephadex G 25 M jeli içermektedir. PD-10 kolonundan alınan örnekler arasında en yüksek aktivite gösteren örnekler bir araya getirilmiş ve (3. ve 4. numaralı tüpler) enzimlerin protein tayinleri yapılmış bunun sonucunda protein miktarı 1,725 mg/ml olarak

bulunmuştur. Bu örneğin aktivitesi belirlenmiş, spesifik aktivitesi ise 35,30 U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Sephadex G 25 kolonundan elde edilen ve en yüksek aktiviteye sahip olan örnekler biraraya getirilmiş, örnek Sephadex A 25 kolonuna uygulanmıştır. Bu kolondan toplanan eluatların proteinlerine ve enzim aktivitelerine bakılmış; bunun sonucunda protein miktarı 0,649 mg/ml ve spesifik aktivitesi 67,862 U/mg protein bulunmuştur. Böylece katalaz enziminin spesifik aktivitesinde belirlenen artış 19,61 kat olmuştur.

Literatüre bakıldığında çeşitli spesifik aktivite değerleri belirlenmiştir.Seriner (2010), Hıyardan elde ettiği homojenatın DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırma işleminin son basamağında, spesifik aktiviteyi 393 U/mg protein olarak belirlemiştir. Demir (2006), Aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından katalaz enziminin, spesifik aktivite değerini 89,68 U/mg protein olarak bulmuştur. Lokman Ö. ve ark (2005), Maydanozdan (*Petroselinum hortense Hoffm., Apiaceae*) elde ettiği katalaz enziminin spesifik aktivitesini 1126 U/mg protein, olarak belirlemiştir. Mullen ve ark. (1993), Kuzey Carolina Çamından (*Pinus taeda L.)* elde ettiği katalazın spesifik aktivitesi 2215 U/mg proteindir. Beaumont ve ark (1990), Patates kökünden (*Solanum tuberosum*) katalazı saflaştırarak enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 U/mg protein değerinde bulmuştur.

Kerevizden (*Apium Graveolens*) elde edilen katalaz enziminin optimum pH sını saptamak için pH 5,0'ten 8,5'e kadar belirli aralıklarda ölçüm alınmış ve optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. Lokman Ö. ve ark (2005), Maydanozdan saflaştırılan katalaz enzimi için optimum pH 7,0; Sondaş (2005), Nane (M*enta spicata*) ve pırasa *(Allium porrum L.*) bitkilerinden kısmı saflaştırılan katalaz enzimi için, nane bitkisinde optimum pH 6,0 ; pırasa bitkisinde optimum pH 7,5; Yörük ve arkadaşları (2005), tarafından yapılan Van elmasından (*Golden Delicious*) saflaştırılan katalaz enzimi için pH 5,0; Kara (2008) kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) saflaştırılan katalaz için optimum pH 7,0; Seriner, (2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) saflaştırılan katalaz için optimum pH 7,0 olarak bulunan sonuçlar ile uygunluk göstermiştir.

Kerevizden elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 20 °C ile 60 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite çalışmaları yapılmış ve optimum sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir. Bu değer, Dinçer (2000), tarafından yapılan rokadan (*Eruca sativa*) kısmi saflaştırılan katalaz için 30 ºC; Yörük ve ark. (2005), tarafından yapılan Van elmasından (*Golden Delicious)* saflaştırılan katalaz enzimi için 50 ºC; Lokman Ö. ve ark. (2005), Maydanozdan saflaştırılan katalaz enzimini için 35 ºC; Sondaş (2005), Nane (*Menta spicata*) ve pırasa (A*llium porrum L.*) bitkilerinden kısmı saflaştırılan katalaz için, nane için 40 ºC pırasa için 30 ºC; Kara (2008), kabak çekirdeğinden *(Cucurbita moschata)* saflaştırılan katalaz için 25 ºC Seriner, (2010), Hıyardan (C*ucımus satıvus*) saflaştırılan katalaz için 30 ºC ile uygunluk içerisindedir.

Kereviz katalazının depolama kararlılığını belirlemek amacıyla katalaz enzimi % 10- 20 - 30 luk gliserol çözeltileri içerisinde, 25 °C ve 4 °C de, 30 gün boyunca bekletilmiştir. 30. günün sonunda aktivitenin en çok % 20'lik gliserol çözeltisinde ve 4 °C'de korunduğu gözlemlenmiştir. Bu örnekte aktivitenin % 67'sinin korunduğu ve gliserolün aktivite kaybının büyük ölçüde önüne geçtiği belirlenmiştir. Bunun nedeninin gliserolün su tutucu özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gliserol suyu kendi etrafına toplayarak enzimin su ile etkileşimini azaltır. Böylece enzimin aktivite kaybı azatılabilir.

Kerevizden elde edilen katalaz enziminin Km ve Vmax değerlerini belirlemek amacıyla optimum pH ve sıcaklıkta aktivite ölçümleri yapılmış ve bu ölçümlerle Linewiever-Burk grafiği çizilerek Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Kereviz katalazının Km'si 0,0275 mM, Vmax ise 87 U/mg protein olarak bulunmuştur. Havir ve ark. (1987) tarafından yapılan tütün yapraklarından *(Nicotina sylvestis)* saflaştırılan katalaz için Km değeri 0,0057 M olarak bulunmuştur.; Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (*Erucasativa*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için Km değeri 0,00625M'dır. Sondaş, (2005), tarafından yapılan Nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden kısmı saflaştırılan katalaz enzimlerinden, nane için Vmax değeri 108,69 U/ml ve Km değeri 1,175 mM, pırasa için Vmax değeri 50 U/ml ve Km değeri 1,172 mM'olarak hesaplanmıştır.; Kara (2008) tarafından yapılan kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) katalazın

karakterizasyonunda elde edilen katalaz için Km değeri 0,00209 M Vmax 58,139 U/ml olarak rapor edilmiştir.

Saflaştırılan kereviz katalaz enziminin yaklaşık 59 kDa ağırlığında 4 alt üniteden meydana geldiği ve molakül ağırlığının 236 kDa olduğu belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında Demir (2006) aşotundan **(***Coriandrum sativum)* katalaz enzim eldesinde enzimin SDS poliakrilamid jel elektroforezinden elde ettiği sonuçta proteinin molekül ağırlığını 60,95 kDa olarak belirlemiştir. Mullen ve ark. (1993) Kuzey Carolina çamından saflaştırdığı katalaz enziminin SDS-PAGE elektroforezi sonucunda molekül ağırlığını 59 kDa olarak belirlemiştir. Lokman (2007) maydonozdan (*Petroselinum hortense Hoffm., Apiaceae)* saflaştırdığı katalazın molekül agırlığını 182,338 olarak rapor etmiştir. Kandukuri ve ark., (2012) *Vigna mungo* adlı bir fasülye türünden biir bitkinin tohumlarından saflaştırdığı katalaz enziminin SDS-PAGE elektroforezi sonucu ağırlığını 56 kDa olarak bulmuştur. Tayefi-Nasrabadi (2008) yer lahanasından (*Brassica oleracea*) katalazın üç izoenzimini saflaştırmış ve ağırlıklarını sırasıyla 308, 258 ve 285 kDa olarak belirlemiştir. Kunce ve ark., (1988) pamuk tohumundan *(Gossypium hirsutum L.)* katalazı saflaştırmış ve molekül ağırlığını 57 kDa olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan katalaz enzimlerinin molekül ağırlıkları

Katalaz enziminin saflaştırıldığı kaynak	Saflaştırmanın yapıldığı bitki organı	Moleküler ağırlık (kDa)	Literatür
Gossypium hirsutum L.)	tohum	57	Kunce ve ark., (1988)
(Pinus taeda L.)	çenek	59	Mullen ve ark., (1993)
Coriandrum sativum	yaprak	60,95	Demir, 2006
Petroselinum hortense Hoffm., Apiaceae	yaprak	182.338	Lokman ve ark., (2007)
Brassica oleracea	kök	258, 285, 308	Tayefi- Nasrabadi, (2008)
Vigna mungo	tohum	56	Kandukuri ve ark., (2012)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant üzerinde yapılan çalışmalarda katalaz enziminin spesifik aktivitesi 3,46 U/mg protein olarak bulunmuştur.
2. Amonyum sülfat ile yapılan çöktürme işlemlerinde maksimum çökeltiye % 30' luk tuz derişiminde rastlanmıştır ve spesifik aktivite değeri 35,213 U/mg protein olarak bulunmuştur.
3. PD-10 kolon kromatografisi (Sephadex G 25) ile yapılan saflaştırma basamağında elde edilen katalaz enzminin spesifik aktivitesi 35,30 U/mg protein olarak tespit edilmiştir.
4. PD-10 Kolon kromatografisi (Sephadex G 25) sonucu en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler birleştirilerek Sephadex A 25 içeren kolondan geçirilmiştr. Bunun sonucunda elde edilen saf enzimin spesifik aktivitesi 67,86 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu işlem sonunda enzim 19,61 kat saflaştırılmıştır.
5. Sephadex A 25 kolonundan elde edilen örnekler üzerinde yapılan optimum pH ve sıcaklık çalışması sonucu enzim için optimum pH' nın 7,5 ; optimum sıcaklığın 30 °C olduğu görülmüştür.
6. Saflaştırılan katalaz'ın termal kararlılıkları karşılaştırıldığında; 40 °C'de 24 saat sonunda katalaz aktivitesinin % 16' sını korurken, 25 °C'de ise aktivitesinin % 58'ini koruduğu belirlenmiştir.
7. Saflaştırılan katalaz farklı koşullarda depolandıklarında 4 °C ve % 20'lik gliserol çözeltisinde aktivitesinin % 67' sini; oda sıcaklığında ve % 20 gliserol çözeltisinde ise 30 gün sonunda katalaz aktivitesinin % 23'ünü koruduğu gözlenmiştir.
8. Saflaştırılan katalazın Km değeri 27,5 mM ve Vmax 87 U /mg protein olarak belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

1. Katalaz başka kaynaklardan saflaştırılabilir.
2. Saflaştırılan enzimler belirli yüzdelerde gliserol içeren çözeltilerde saklanabilir.
3. Enzimin molekül ağırlığı LC-MS gibi daha ilieri bir yöntemle daha hassas olarak belirlenebilir.
4. Katalaz çeşitli desteklere immobilize edilebilir.

KAYNAKLAR

AEBI, H., WYSS, S.R., SCHERZ, B., SKVARIL, F., 1974. Heterogeneity of Erythrocyte Catalase. II. Isolation and Characterization of Normal and Variant Erythrocyte Catalase and Their Subunits. Eur J. Biochem, 48: 137-145.

AHANDANİ, E., RAFİEİAN-KOPAEİ, M., 2015. Medicinal Plants With Hepatoprotective Activity in Iranian Folk Medicine. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(2): 146-157.

AHANDANİ,E, RAFİEİAN-KOPAEİ, M. Medicinal Plants with Hepatoprotective Activity in Iranian Folk Medicine

ALSUHAİBANİ, Amnah, M., A., 2013. Antioxidant Activity of Celery In Vitro and Vivo. Journal Of American Science, 459-465.

ASADİ-SAMANİ,M., KAFASH-FARKHAD,N., AZİMİ,N., FASİHİ,A, ALİNİA-

BAŞAK, Ş.S.,2008. Apium graveolens Linn. (Apiaceae) Tohumu Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi ve In Vitro Antioksidan Aktivitesi. İTÜ dergisi, 6(1): 3-13

BEAUMONT, F., JOUVE, H. M., GAILLARD, J., PELMONT, J., 1990. Purification and Properties of a Catalase From Potato Tubers (Solanum Tuberosum). Plant Science, 72(1):19-26.7147.

BERG, J.M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., 2002, Biochemistry, W H Freeman, New York.

BOYER, R.F., 1993. Modern Experimental Biochemistry, 2nd Ed, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California., pp 75-80.

BOZDEMİR, Y., 2007. Keten Tohumu (Linum Usitatissimum) Ekstraktında Katalaz Ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri, Çukurova Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 45 sayfa

CAVACOPAULO, A., GUBITZ, G.M., 2002. Thermo-alkali-Stable Catalases from Newly Isolated Bacillus sp. For the Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents. Journal of Biotechnology, 89:147-153.

CONRATH, U., CHEN, Z., RICIGLIANO, J. R., KLESSIG, D. F., 1995. Two inducers of Plant Defense Responses, 2,6-Dichloroisonicotinic Acid and Salicylic Acid, Inhibit Catalase Activity in Tobacco, Plant Biology, Vol 92: 7143-7147

COOK, N. C., 1996. Flavonoids---Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. The Journal Of Nutritional Biochemistry., 7: 66-76.

DALKAVRIYAN, S., 2011. *Spirulina platensis*'ten Süperoksit Dismütaz (SOD) Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu

DEMİR,H., 2006. Aşotu (Coriandrum Sativum) Yapraklarından Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi. Mayıs 24-26, Bolu.

DİNÇER A., 2000. Roka (Eruca Sativa) Bitkisinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması. Celal Bayar Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 62 sayfa.

DOĞAN, O. " Bahçe Bitkileri Bölümü Kereviz Yetiştiriciliği" http://www.agri.ankara.edu.tr/bahce/10025_Kereviz.pdf (Erişim tarihi 11 Temmuz 2015)

ERARSLAN, A., 2000. Enzim Kinetiği Notları. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli, 84.

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A., 1987. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. Plant Physiol,84:450-455

KAİLASH, PRASAD, 2005. Hypocholesterolemic and Antiatherosclerotic Effect ofFlax Lignan Complex Isolated From Flaxseed. 179(2): 269-275

KANDUKURİ, S. S., NOOR, A., RANJİNİ, S. S., VİJAYALAKSHMİ, M. A., 2012. Purification and Characterization of Catalase from Sprouted Black Gram (Vigna Mungo) Seeds. Journal Of Chromatography B, 50-54

KARA D., 2008. Sakarya'da Yetişen İki Farklı Kabak Çekirdeğinden (Cucurbita Maxima Ve Moschata) Katalaz Enziminin Karakterizasyonu. Sakarya Üniversitesi -Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 71 Sayfa.

KAVAKÇIOĞLU, B., 2012. Isolatıon, purıfıcatıon and Characterızatıon of Catalase From Phanerochaete Chrysosporıum. Dokuz Eylül Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi 76 sayfa.

KOÇ, A., http://masarehberi.com/endustriyel-enzimlerin-kullanim-alanlari-katalazlar (Erişim tarihi: 7 Temmuz 2015).

KONAK, Ü. İ., TURHAN, İ., CERTEL, M., 2014. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. Akademik Gıda, 79-87

KÖKSAL, E., 2003. Katalaz Enziminin Kara Lahana Bitkisinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Pestisitlerle Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 55 Sayfa

KUNCE, M. C., TRELEASE, R. N., TURLEY, R., B., 1988. Purification and Biosynthesis of Cottonseed (Gossypium hirsutum L.) Catalase. Biochem. J. Vol 251: 147-155

LARTILLOT, S., KEDZIORA, P., ATHIAS, A., 1988. Purification and Characterization of A New Fungal Catalase. Prep. Biochemistry, 18(3): 241-246

LOKMAN, Ö., BÜLBÜL, M., ELMASTAŞ, M., ÇİFTÇİ, M., 2007. Purification and Apiaceae) Leaves. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 37-41.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDAL, R. J., 1951 Protein Measurement With The Folinphenol Reagent. J biol chem., 193-261.

MALGORZATA, M., CHRISTOPH, B., KATARYZYNA, S., KRYSTYANA, M., 2005. Antioxidant Enzymes And Isoflavonoids In Chilled Soybean. Journal Of Plant Physiolagy, 162(4): 403- 412

MHAMDI, A., NOCTOR, G., BAKER, A., 2012. Plant Catalases: Peroxisomal Redox Guardians, Archives of Biochemistry and Biophysics, 181- 194.

MİTCHELL, M. J., AHMAD, S., PARDINI, R.S., 1991. Purification And Properties of A Highly Active Catalase From Cabbage Loopers, Trichoplusia Ni. Insect Biochemistry, 21(6): 641-646

MULLEN, R. T., CİFFORD, D. J., 1993. Purification and Characterization of Catalase from Loblolly Pine (Pinus taeda L.) Megagametophytes. Plant Physiol, 103:477-483.

MURA, A., PİNTUS, F., MEDDA, R., FLORİS, G., RİNALDİ, A.C., PADİGLİA, A., 2007. Catalase And Antiquitin From Euphorbia Characias: Two Proteins Involved in Plant Defense. Biochemistry 72: 501-508.

NELSON, D. L., COX, M. M., 2005 , Proteinler Elektroforezle Ayrıştırlabilir ve Tanımlanabilir, N., Kılıç, Lehninger Biyokimya İlkeleri, Palme Yayıncılık, 134-135.

PAAR, A., COSTA, S., TZANOV, T., GUDELJ, M., ROBRA, K.H.,

SANCAR, B., PAKSOY, N., BALCI, O., KURTOĞLU, N., 2012. Pamuklu Dokuma Kumaşların Boyamaya Hazırlık İşlemlerinde Enzim Kullanım Olanaklarının İncelenmesi ve Kombine Proses Geliştirilmesi, Tekstil ve Mühendis, 19: 86, 7-13.

SCOPES, R.K., 1994. Protein Prufication: Principles and Practice. La Trobe Universty Bundoora, Victoria 3083.

SERİNER, R., 2010. Katalaz Enziminin Hıyardan (Cucımus Satıvus) Saflaştırılması,Yüksek Lisans Tezi, 34 sayfa.

SONDAŞ E., 2005. Nane (Menta spicata) ve Pırasa (Allium porrum L.) Bitkilerinden Katalaz Enziminin Kısmı Saflaştırılması, Karekterizasyonu ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi 41 sayfa.

TAYEFİ-NASRABADİ, H., 2008. Some Biochemical Properties of Catalase from Kohlrabi (Brassica oleracea gongylodes). Journal of Biological Sciences. 8(3): 649-653.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

YÖRÜK, I.H., DEMİR H., EKİCİ K., SAVRAN A., 2005. Purification and Properties of Catalase from Van Apple (Golden Delicious). , Pakistan J. Nutrition, 4(1),: 8- 10.

YÜZÜGÜLLÜ, Y., ÖGEL, Z. B., 2013. Çift Aktiviteli Katalaz-Fenol Oksidazının ve Diğer Katalazların Gıda Sanayisindeki Önemi. Gıda 38 (2): 111-118.

ÖZGEÇMİŞ

17.06.1987 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk ve orta ve öğrenimini Vakıfbank İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini İsmail Safa Özler Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2011 yılında mezun oldu ve 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.