ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selçuk DALKAVRIYAN

Spirulina platensis'ten SÜPEROKSİT DİSMÜTAZ (SOD) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Spirulina platensis'TEN SÜPEROKSİT DİSMÜTAZ (SOD) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Selçuk DALKAVRIYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez …./…/.... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

……	……	……..
Prof.Dr.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ	Doç.Dr.Fatma ÇEVİK
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:.....

Prof. Dr. İlhami YEĞENGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2010YL…..

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Spirulina platensis'*TEN SÜPEROKSİT DİSMÜTAZ (SOD) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Selçuk DALKAVRIYAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl : 2011, Sayfa:55
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Doç. Dr. Fatma Çevik

Bu çalışmada, *Spirulina platensis'*ten Süperoksit Dismutaz(SOD) enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırılmasında, *Spirulina platensis* hücrelerinin sonikatör ile homojenizasyonu, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE selüloz anyon değiştirici kromatografisi basamakları sırasıyla uygulanmış ve her basamak sonrasında aktivite ve protein değerleri belirlenmiştir. Bu işlemler sonrasında SOD homojenata göre %81 verim ile 315 kat saflaştırılmıştır.

SOD 'ın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 5°C olarak hesaplanmıştır. V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 722 U/mg prot. ve 0,23 mM ksantin olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan SOD'ın 5°C ve oda sıcaklığında, tris baz tamponu (pH 7,8, 50 mM), %30 ve %50 (v/v) gliserol içeren çözeltilerdeki depolama kararlılığı araştırılmıştır. 20 günün sonunda oda sıcaklığında ve tris baz tamponu içerisinde depolanan SOD başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını kaybetmiştir. Buna karşın tris tamponu içerisinde 5°C'de depolanan SOD başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'si korunmuştur. %30 ve %50 gliserol içerisinde 5°C'de depolanan SOD ise başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %81 ve 77'sini korumuştur. *Spirulina platensis* SOD'ının 5, 40 ve 50°C'deki termal kararlılığı da araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Spirulinia platensis*, Süperoksit Dismutaz, Saflaştırma, Anyon Değiştirici Kromatoğrafi

ABSTRACT

MSc THESIS

PURIFICATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE(SOD) FROM *Spirulina platensis* AND ITS CHARACTERIZATION

Selçuk DALKAVRIYAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

Supervisor : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year: 2011, Pages: 55
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Assoc.Prof. Dr. Fatma ÇEVİK

In this study, superoxide dismutase (SOD) was purified from *Spirulinia platensis*. For this purpose homogenization, ultracentrifugation and DEAE cellulose anion exchange chromatography steps were sequentially used. Activities and protein amounts for fractions were determined after each step. The SOD was purified 315-fold and 81% efficiency after DEAE cellulose anion exchange chromatography with respect to that of homogenate.

Optimum temperature of SOD was determined as 5 °C and V_{max} and K_m were found as 722 U/mg prot. and 0.23 mM xanthine, respectively. Storage stability of purified SOD was investigated in tris base buffer (pH 7.8, 50 mM), 30% glycerol and 50% (v/v) glycerol solutions at 5 °C and room temperature. After 20 days, SOD in tris buffer solution lost almost all of its activity at room temperature, however, it protected about 50% of its initial activity at 5 °C. On the other hand, in 30 and 50% (v/v) glycerol solutions it protected about 81% and 77 of its initial activity, respectively at 5°C. Thermal stability of SOD from *Spirulina platensis* was also investigated at 5, 40 and 50˚C

Key Words: *Spirulinia platensis*, Superoxide Dismutase, Purification, Anion Exchange Chromatography.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında değerli zamanını, düşünce ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e, ayrıca sayın hocalarım, Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e, Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e

Çalışmalarım sırasında Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki arkadaşlarım, Dr.Deniz YILDIRIM, Dilek ALAGÖZ, Çağlar ÖZDEMİR ve M.Serkan YALÇIN'a ve değerli meslektaşlarım M.Durul AGAN'a, Aysel YALMAN'a

Hayatımın her döneminde yanımda olan benden; manevi desteklerini esirgemeyen değerli eşim Hacer DALKAVRIYAN'a ve oğlum Ege DALKAVRIYAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... .I
ABSTRACT..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER..... IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ..... X
SİMGELER VE KISALTMALAR..... XII
1. GİRİŞ..... 1
1.1. Serbest Radikaller……..... 1
1.2. Serbest Radikal Türleri……..... 2
1.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri……..... 3
1.2.2. Süperoksit Radikali……..... 3
1.2.3. Hidrojen Peroksit..... 3
1.2.4. Hidroksil Radikali..... 4
1.3. Serbest Radikallerin Etkileri 4
1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri..... 4
1.4.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar..... 5
1.4.1.1. Enzimler ……..... 5
1.4.1.2. Enzim Olmayanlar……..... 5
1.4.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)..... 6
1.4.3. Gıda Antioksidanları……. 6
1.5. Süperoksit Dismutaz (Süperoksit Oksidoredüktaz, E.C. 1.15.1.1., SOD)… 6
1.6. *Spirulina platensis*…….. . 7
1.7.Protein Saflaştırma Amacı ve Stratejisi..... 9
1.7.1.Protein Saflaştırmanın Amacı…..…….. 9
1.7.2.Ön Hazırlıklar……..... 11

1.7.2.1.Kaynak Seçmi……... 11
1.7.2.2.Protein Hakkındaki Bilgi Birikimi……... 12
1.7.3.Protein Saflaştırma Statejisi……. 12
1.7.3.1.Aktivitenin Korunması……..... 13
1.7.3.2.Stratejik Planlama……..... 14
1.8.Kromatoğrafi…….. 16
1.8.1.İyon Değişim Kromatoğrafisi…….. 16
1.8.2.2.Proteinlerin İyon-Değişim Kromatoğrafisi İle Saflaştırılması……..... 18
1.8.2.2.(1).İyon Değiştiricinin Seçimi…… 19
1.8.2.2.(2).Tampon Seçimi…… 20
1.8.2.2.(3). Kolon Seçimi……... 20
1.8.2.2.(4).Örnek Tatbiki Ve Elüsyon…… 21
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……. 22
3. MATERYAL VE METOD..... 29
3.1. Materyal..... 29
3.1.1.Kimyasallar…… 29
3.1.2.Kullanılan Cihazlar…… 30
3.2. Metod..... 30
3.2.1.Kültür Hazırlanması……... 30
3.2.2.Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Saflaştırılması……. 31
3.2.2.1.Homojenat Hazırlanması……...…… 31
3.2.2.2.Amonyum Sülfat İle Çöktürme…….. 31
3.2.2.3.DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi…….. 31
3.2.3.SOD Aktivitesi Tayini …….. 32
3.2.4.Protein Tayini…… 34
3.2.5.Saflaştırılan SOD'a Sıcaklığın Etkisi…… 35
3.2.6.Saflaştırılan SOD'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi… 35
3.2.7. Saflaştırılan SOD'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi…… 36
3.2.8. Saflaştırılan SOD'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi.... 36

4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 37
4.1. Bulgular..... 37
4.1.1. Protein Tayini……..... 37
4.1.2. SOD'ın Saflaştırılmasıİle İlgili Bulgular……..….. 37
4.1.2.1.Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Sonrasında Elde Edilen Bulgular……... 37
4.1.2.2.DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi Sonrasında Elde Edilen Bulgular…….. 38
4.1.3.Saflaştırılan SOD Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular ……..... 41
4.1.4. Michaelis-Menten Katsayısı (K_m) Ve Maksimum Hızın (V_{max}) Lineweaver-Burk İle Belirlenmesi..... 42
4.1.5. Saflaştırılan SOD'ı Termal Kararlılığının Belirlenmesi..... 42
4.1.6. Saflaştırılan SOD'ı Termal Kararlılığının Belirlenmesi..... 43
4.2. Tartışma..... 44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER…….. 49
5.1. Sonuçlar..... 49
5.2. Öneriler 50
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 55

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Protein Saflaştırma Tekniklerinin Özellikleri 15
Çizelge 4.1. SOD için Saflaştırma Basamaklarının Sonuçları……..... 36

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. *Spirulina platensis* için alınmış SEM görüntüsü..... 8
Şekil 1.2. İyon değiştiriciler a) Anyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar b)Katyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar…….. 17
Şekil 4.1. Standart Protein Grafiği……. 36
Şekil 4.2. DEAE-selüloz kromatoğrafisi kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' deki absorbansları ve 560 nm'de ölçülen aktivite değerleri..... 38
Şekil 4.3. DEAE-selüloz kromatografisi kolonundan 150 mM NaCI ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de ölçülen aktivite değerleri……. . 38
Şekil 4.4. DEAE-Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve NaCl tuz konsantrasyonu…… 39
Şekil 4.5. *Spirulina platensis*'ten saflaştırılan SOD aktivitesine sıcaklığın etkisi..... 40
Şekil 4.6. *Spirulina platensis'*ten saflaştırılan SOD için Lineweaver-Burk grafiği…… 41
Şekil 4.7. *Spirulina platensis* SOD'ın farklı zamanlarda termal kararlılığına bağlı olarak aktivitesinin değişimi……. 42
Şekil 4.8. *Spirulina platensis* SOD'ın farklı koşullardaki depolanmasına bağlı olarak aktivitesinin değişimi…….. 43

SİMGELER ve KISALTMALAR

Prot : Protein

SOD : Süperoksit dismutaz

DEAE : Diethylaminoethyl selüloz

1. GİRİŞ

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir ve dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller olup, bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler (Hurst ve ark.1997; Jornot ve ark.1998; Mills ve ark.1998).

Serbest radikaller elektron transferi, enerji üretimi ve diğer metabolik işlevlerde temel oluştururlar. Ancak radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlarda reaktif bir hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam ederken kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Serbest radikaller etkilediği atomun dolayısıyla o atomun bulunduğu maddenin görevini yapamamasına sebep olur. Sonuç olarak, etkilenen maddenin biyolojik önemine ve onun tamir edilip edilememesine bağlı olarak önemli veya önemsiz kalıcı veya geçici etkiler gösterir. Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (Cross, 1987). Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir. Yani içinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır, hücresel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir.

Serbest radikaller üç temel mekanizma ile oluşur:

1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması; Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa,

bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.

2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi; Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.

3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi; Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalin de paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur. Biyolojik sistemler de serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler (Hurst ve ark.1997; Jornot ve ark.1998; Mills ve ark.1998). Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral; organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.

1.2. Serbest Radikal Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler; oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları, nitrik oksit ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonuncu meydana gelir. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikal türleridirler. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

1.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit (O_2•-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH•^-$) dir (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Oksijenin elektronları öyle şekilde dağılmışlardır ki bu elektronlardan ikisi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen diradikal olarakta değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer (Lunec, 1990).

1.2.2. Süperoksit Radikali (O_2^-•)

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2•^-$

Süperoksit radikali, ksenobiyotikler gibi ajanlarla, ksantin oksidaz'ın rol aldığı enzimatik tepkimelerle, bazı oksidaz tepkimelerinde, fagositoz sırasında, elektron transport sistemi sırasında oluşur. Süperoksit radikali, SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyona girerek azalır (Halliwel ve ark, 1992).

1.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin, çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 membranlardan geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksitin dismutasyonu ile olur (Halliwel ve ark,1992).

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

1.2.4. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet -}$)

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir.

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\bullet -} + OH^-$$

Son derece reaktif bir oksidan moleküldür. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparark yeni radikallerin oluşmasına yol açar (Halliwel ve ark, 1992).

1.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom p450) peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bir anlamda serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır. Araştırmacılar, insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama 10.000 serbest radikalin hücumuna uğradığını belirtmektedirler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, nükleustaki genetik kodu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asite (DNA) etki edip, DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan 2000).

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar,

peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabildiği gibi serbest radikalin meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (Akkuş, 1995).

1.4.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

1.4.1.1. Enzimler

Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi
Süperoksit Dismutaz
Katalaz
Glutatyon Peroksidaz
Glutatyon-S-transferaz
Hidroperoksidaz

1.4.1.2. Enzim Olmayanlar

a) Lipid Fazda Bulunanlar

α - tokoferol (E vitamini)
β- karoten

b) Sıvı Fazda (Hücre Sitozolünde veya Kan Plazmasında) Bulunanlar

Askorbik asit, Melatonin, Ürat, Sistein, Serulplazmin, Transferin, Laktoferrin, Miyoglobin, Hemoglobin, Ferritin, Metionin, Albumin, Bilirubin, Glutatyon.

1.4.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)

Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Tungsten, Allopürinol, Oksipürinol, Folik asit, Pterin aldehid.
Soya Fasulyesi İnhibitörleri: Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
NADPH Oksidaz İnhibitörleri: Adenozin, Lokal Anestezikler, Kalsiyum Kanal Blokerleri, Non-Steroid Antiinflamatuar İlaçlar, Cetiedil, Difenilin İodunyum, Rekombinant Süperoksit Dismutaz, Trolox-C: E Vitamini Analoğudur.
Endojen Antioksidan Aktiviteyi Arttıran Maddeler: Glutatyon Peroksidaz aktivitesini arttıran Ebselen, Asetilsistein.
Diğer Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcıları: Mannitol, Albumin, DMSO.
Demir Redoks Döngüsünün İnhibitörleri: Desferroksamin, Serulplazmin
Nötrofil Adezyon İnhibitörleri
Sitokinler: TNF ve İnterlökin-I
Barbitüratlar
Demir Şelatörleri

1.4.3. Gıda Antioksidanları

Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT), Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), Sodyum Benzoat, Ethoxyquin, Propylgalate, Fe-Süperoksit Dismutaz (Akkuş, 1995).

1.5. Süperoksit Dismutaz (Süperoksit Oksidoredüktaz, E.C:1.15.1.1, SOD)

Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) süperoksit anyon radikallerinin dismutasyonunu moleküler oksijen ve hidrojen peroksite katalize eden, molekül ağırlığı 17-85 kDa aralığında olan metalloenzimlerdir. SOD enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir defanstır. SOD'nin fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H_2O_2 ve oksijene hızlıca dismutasyonunu

katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir (Fridovich, 1973; Lavelle ve ark. 1973; Petkau ve ark. 1975; Sheng ve ark. 2004).

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

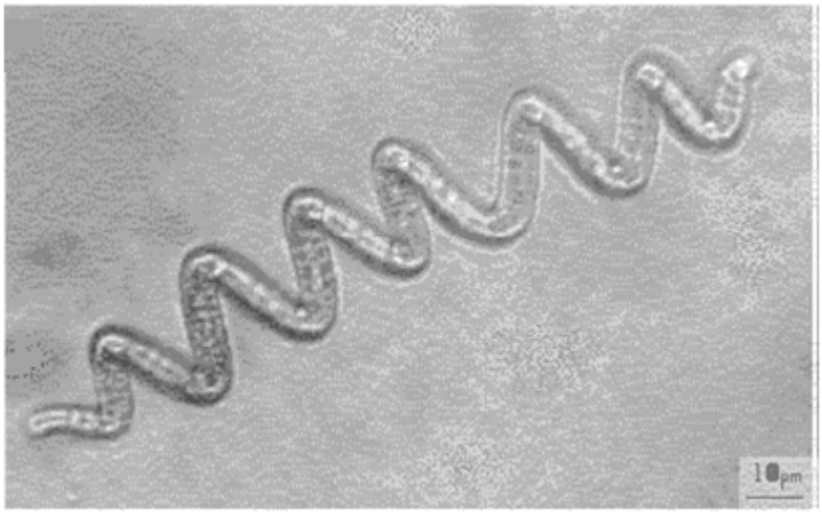
(a) Bakır ve Çinko içeren dismutazlar (Cu, Zn SOD) genel olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve kloroplastlarda bulunur. Tek disülfit bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerirler. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko; Co^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başarılır.

(b) Mangan içeren dismutazlar (Mn SOD) prokoryotlarda ve mitokondri matriksinde bulunur. Birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır.

(c) Demir içeren dismutazlar (Fe SOD) prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn süperoksit dismutaza benzer yapıdadır.

1.6. *Spirulina Platensis*

Spirulina platensis (Gom.) Geitler, en fazla kültürü yapılan, kozmetikte, tıpta, insan ve hayvan gıdası olarak çeşitli sanayi alanlarında yaygın olarak kullanılan Cyanophyceae (Mavi-yeşil Algler) sınıfından ipliksi, spiral şekilli bir prokaryotik organizmadır (Şekil 1). Mikroalgler, farklı kimyasal ve biyolojik bileşikleri üretme özelliği nedeniyle önemli organizmalardır. Vitaminler, pigmentler, proteinler, mineraller, lipid ve polisakkaritler elde edilen başlıca ürünlerdir. *Spiriluna Platensis*, değişik fizyolojik streslere iyi adapte olabilen, süperoksit dismütaz (SOD), katalaz ve peroksidaz gibi değişik enzimleri ihtiva eden bir organizmadır. (Borowitzka, 1992).



Şekil 1.1. *Spirulina platensis* için alınmış SEM görüntüsü (Koru ve Cirik / E. Ü. 2002).

Siyanobakteri ya Fe ve Ni veya Fe ve Mn formlarını kapsar. Fe-SOD'un Mehler Reaksiyonu ile reaktif oksijen türlerinin üretimini söndürmede rolü olduğuna işaret eden Fotosistem I ile bağlantılı olduğu görülmektedir. MnSOD öncelikle Fotosistem II ile ilişkilendirilir ve hem thylakoit hem de hücre zarında yerleşmiştir.Siyanobakterideki çevresel stres esnasında SOD'un önemi ırk yanında mutant kullanımını göstermiştir (Shırkey 2000). Bazı siyanobakterilerde Fe'in kullanılmasının kısıtlanması, Fe-SOD'a benzer dizilimi olan Cu-ZnSOD ifadesinin kullanılmasına öncülük eder. Hücresel SOD profili organizmalar ve çevresel durumlarla değişiklik gösterir. Fe ve Mn enzimlerinin geniş çaplı genom analizleri, siyanobakterinin bir veya daha fazla SOD genlerine sahip olduğunu göstermektedir. Gen profilindeki varyasyonlar, aynı grup organizmalar içinde değişik evrim modellerinin olduğunu akla getirmektedir. Bunun evrim devresi sırasında değişik çevrelere adaptasyonlarıyla ilgili bir bağlantısı olabilir. Bu nedenle bu organizmanın SOD profili, evrimsel geçmişi için ele alınarak kullanılabilir ve gelecekte oksidatif stresin çevresel düzenlemesi için bir model olarak hizmet edebilir.

Mikroalgler protein, yağ asitleri, vitaminler, mineraller, pigmentler ve daha pek çok değerli hücresel metabolitler bakımından zengin bir içeriğe sahip olmaları nedeniyle son yıllarda üzerinde en çok çalışılan organizmalardan biri durumuna

gelmiştir. Ülkemizde de mikroalgal biyoteknoloji üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda artış gözlenmektedir. Bu çalışmalar kapsamında özellikle üretiminin ve hasadının kolay olması nedeniyle mavi-yeşil alglerden *Spirulina platensis* türünün üretimi popüler hale gelmiştir.

1.7. Protein Saflaştırma Amacı Ve Stratejisi

İlk kez Berzelius tarafından kullanılan ve 1840 yılında ders kitaplarına geçen "protein" adı yunanca bir numara, birinci sırada olmak anlamına gelen "proteuo" kelimesinden türetilmiştir. Proteinler bu adı haklı olarak taşımaktadır. Sayısız hayat fonksiyonu proteinlere bağlıdır ve proteinsiz bir canlı söz konusu olamaz. Her hücrenin bileşeni olan proteinlerin enzimatik kataliz, transport, depolama, mekanik destek, koordine hareket, sinir impluslarının transmisyonu, immün koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi fonksiyonları vardır. Proteinlerin saflaştırılması hem bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının aydınlatılması hem de in vitro koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması açısından büyük önem taşır (Telefoncu,1996).

1.7.1. Protein Saflaştırmanın Amacı

Protein saflaştırmanın amacı saf protein elde etmek değil daha sonraki çalışmalar için kullanılabilecek bir protein preparatı hazırlamaktır. Bu çalışmalar; proteinin aktivitesinin araştırılması ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya tedavi edici amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir. Amaca uygun bir protein preparatı hazırlayabilmek için aşağıdaki hususların netleştirilmesi zorunludur.

- Gereksinim duyulan saf protein miktarı
- Ne düzeyde aktivite kaybının tolere edilebileceği
- Ne düzeyde saflık istendiği
- Saflaştırma işlemi için ne kadar zaman ve para harcanabileceği, v.b.

Biyoteknolji devrimini yaşadığımız günümüzde kullanım amacına göre gerekli protein miktarı birkaç mikrogram (klonlama çalışmaları) ile birkaç kilogram (endüstriyel ve farmasötik uygulamalar için) arasında değişir. Protein üretiminde zaman ve maliyet çok önemlidir. Gerekli protein miktarı ve saflık düzeyi kullanım amacına bağlıdır. Bilimsel araştırmalar için az miktarda protein yeterlidir fakat preperat kesinlikle zararlı yabancı aktivite içermemelidir. Endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekte üretim söz konusudur ve saflık ikinci derecede önem taşır. Tedavi edici uygulamalar için hazırlanan protein preperatının ise yüksek saflıkta olması gerekir. Protein aktivitesinin belirlenmesi hedeflenmiş ise kesinlikle aktif formda (örneğin; bir enzim, bir regülatör protein veya bir antikor gibi) elde edilmelidir. Bunun için çok az miktarda protein yeterlidir. Fakat amaç proteinin aktivitesinden yararlanmak ise daha fazla protein gerekecektir. İnert proteinlerin bulunması her iki amaç içinde engel oluşturmadığından, yabancı aktiviteler tamamen uzaklaştırılmış ise daha ileri düzeyde bir saflaştırma gereksizdir. Saflaştırmada uygulanacak her yeni adım zaman ve aktivite kaybına sebep olacağı gibi verimi düşürüp maliyeti arttıracaktır. Yapı araştırma çalışmalarında ise oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Bu durumda maliyet ve zaman ikinci derecede önemlidir. Fakat yapı-fonksiyon ilişkisi araştırılıyorsa saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybını minimize etmek için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir. Beirli bir miktar çıkış maddesinden elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının toplam verimine bağlıdır. Adım sayısı verim ile ters fakat saflık derecesi ile doğru orantılıdır. En az saflaştırma adımı ile amaca uygun saflıkta protein preparatı hazırlamak çok önemlidir. Özellikle afinite kromatoğrafisi ve afinite-ultrafiltrasyon teknikleri protein saflaştırılmasında adım sayısını dramatik biçimde düşürmektedir. Bir protein preparatının saflık düzeyini genel anlamda toplam protein yüzdesi belirlemekle birlikte başka grup maddelerden kaynaklanan safsızlıklarda önemlidir. Proteinin kullanım amacına bağımlı olarak istenen saflık düzeyide değişir. Tedavi edici amaçlı kullanaılacak protein preparatının çok saf olması istenir. Proses katkı maddeleri, nükleik asit kalıntıları v.b. safsızlıkların kesinlikle uzaklaştırılması gerekir. Yüksek düzeyde saflığa ulaşabilmek için yapılan saflaştırma adımları bir yandan protein verimini düşürürken diğer tarftan maliyeti

çok arttırır. Bilimsel araştırmalarda birkaç ilave saflaştırma basamağı önemli olmayabilir ancak ticari üretim durumunda en ekonomik koşullarda çalışılmalıdır. Saflaştırılan protein bir enzim ise ve yalnız enzimatik aktiviteden yararlanılacaksa toplam protein oranının % 80-90 arasında olması yeterlidir. Fakat protein olmayan safsızlıklar enzim aktivitesini olumsuz etkilememeli, preparat enzim aktivitesini interfere eden yabancı enzimleri özellikle proteolitik enzimleri içermemelidir. Yapı araştırmalarında kullanılacak proteinlerin saflık düzeyi tedavi edici amaçla kullanılanlar kadar olmasa bile en az % 95 saf protein içermelidir. Saflaştırma işlemleri süresince protein denatürasyonundan korunması ve biyolojik aktivitesini yitirmemesine özen gösterilmelidir. Bu şekilde hazırlanan protein preparatı her türlü çalışmada kullanılabilirken amaç yalnız polipeptid zincir dizisini (primer yapı) aydınlatmak ise daha sert koşullarda çalışılmasında sakınca yoktur. Protein saflaştırılmasındaki adımlar denatürasyon ve proteolizi minimuma düşürecek şekilde seçilmelidir (Telefoncu,1996).

1.7.2. Ön Hazırlıklar

1.7.2.1. Kaynak Seçimi

Seçilen kaynakta hedeflenen protein hem kararlı hem de bol bulunmalıdır. Ayrıca kaynağın kolay sağlanabilir, bol ve ucuz olmasıda önemlidir. Hayvansal kaynaklar seçilirken saflaştırılacak protein miktarına uygun büyüklükte hayvan seçilmeli ve yabani hayvanlar yerine evcil hayvanlar tercih edilmelidir. Bir zorunluluk yoksa, hayvansal kaynaklar yerine kültür ortamında üretilebilen bakteri, maya, mantar veya memeli hücreleri kullanılmalıdır. Böylece hücre çoğalması anında biyosentezleri yönlendirebilme olanağına kavuşulur ve ihtiyaca uygun boyutta reaktör ile üretim yapılabilir. Gen teknolojisinin sağladığı olanaklar sayesinde hücre metabolizması yoğun olarak hedeflenen proteinin biyosentezine yönlendirilebilmektedir. Seçilen konukçu (host) hücrenin proteini ekstraselüler bölgeye salgılaması saflaştırma açısından önemli üstünlükler sağlar.

Kuşkusuz hayvansal ve mikrobiyal kaynaklar yanında bitkisel kaynaklardan da saf protein üretiminde yararlanılabilir. Ancak mevsime, iklime bağımlılık ve transport gibi sorunlar bitkisel kaynakların kullanımını sınırlandırmaktadır.

1.7.2.2. Protein Hakkındaki Bilgi Birikimi

Proteinin moleküler yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri ekstraselüler veya intraselüler olması ve hücre içinde bulunduğu yerin bilinmesi saflaştırma prosesin belirlenmesinde çok yardımcı olur. Belirli bir proteinin hücre içindeki lokalizasyonu kaynağa bağımlı değildir, kimyasal yapısı ve molekül boyutu da genellikle benzerlik gösterir.

Proteinin fonksiyonel aktivitesi hücre içindeki lokalizasyonu hakkında bilgi verir. Örneğin; ekstraselüler büyüme faktörü reseptörleri plazma membranında bulunurken, transkripsiyonda görev alan enzimlerin çekirdekte lokalize olmaları doğaldır. Proteinin intraselüler veya ekstraselüler membrana bağlı olması veya organellerde bulunması, çözünüp çözünmemesi ekstraksiyon yöntemi seçiminde ve kullanılacak tamponunun bileşiminin belirlenmesinde etkilidir. Saflaştırılacak protein, glikoprotein veya lipoprotein ise özellikleri diğer safsızlık proteinlerinden ayrıcalık gösterir ve örneğin glikoproteinler lektin afinite kromatoğrafisi ile saflaştırılabilirler.

1.7.3. Protein Saflaştırma Stratejisi

Bir proteinin saflaştırılmasında uygun bir işlem dizisinin optimizasyonu çok önemlidir. En etkili, en hızlı ve en ekonomik ayırma ve saflaştırma proseslerinin mevcut bilgiler yardımıyla belirlenmesi hedeflenir. Bu nedenle saflaştırılacak proteinin bulunduğu kaynaklar, özellikleri ve stabilitesinin iyice tetkik edilmesi gerekir. Uygulanacak ayırma ve saflaştırma teknikleri proteinin biyolojik aktivitesini olumsuz etkilememelidir.

1.7.3.1. Aktivitenin Korunması

Özellikle intraselüler proteinler saflaştırma koşullarından çok etkilenirler. Hücre içerisinde indirgen koşullar egemen olup pH 6,5-7,5 arasındadır ve protein konsantrasyonuda yüksektir (~100 mg/ml). Hücre ve organellerin parçalanması sonucu ayrı kompartmanlarda bulunan ve birbirini etkiliyebilen çeşitli maddeler bir araya gelecekler, proteoliz etkinleşecek ve ortam pH'sı düşecektir. Ayrıca proteinlerin kolayca yükseltgenmeleri söz konusudur. Tüm bu problemlerin aşılabilmesi için tampon ve tampona katılacak maddelerin seçimi özel bir önem taşır. Düşük sıcaklıkta (~ 4 ºC) ve hızlı çalışma sonucu proteolizin etkinliği azalır. Proteolitik enzimler daha çok lizozomlarda lokalize olduklarından homojenizasyon koşullarında lizozom membranlarını dayanıklı kılmak için tampon çözeltiye maltoz ve sakkaroz gibi disakkaridler ilave edilebilir. Ayrıca tampona proteolitik enzim inhibitörlerinin katılması da çok etkili bir önlemdir. Çoğu proteolitik enzimlerin molekül kütleleri 20-30 kDa arasında olduğundan hedeflenen proteinin mol kütlesi daha büyük ise protein saflaştırma prosesinin ilk adımlarında jel geçirgenlik kromatoğrafisi uygulanabilir. Fakat bu tekniğin kapasite ve ayırma gücünün çok düşük olması gibi sakıncaları vardır. Asidik veya bazik pH koşulları, organik çözgenler ve sıcaklık protein denatürasyonuna neden olan ana parametrelerdir. Hücre içi pH koşullarına (pH 6,5-7,5) uygun tampon sistemler kullanılması, saflaştırmanın ilk adımlarında 4 ºC'de (proteolizi önlemek için), daha sonraki adımlarda ise oda sıcaklığında (20-25 ºC) çalışılması çoğu proteinler için denatürasyona neden olmaz. Organik çözgenler ile protein çöktürme adımı gerekli ise bu işlemin düşük sıcaklıkta yapılması uygundur. Enzim aktif merkezleri reaktif gruplar içerdiğinden substrat dışında birçok yabancı madde ile etkileşebilir ve enzim inaktif hale gelir. Hücre parçalanmasından sonra intraselüler enzimlerin karşılaştığı yükseltgen ortam özellikle HS-proteazların hızlı inaktivasyonuna sebep olur. Bunu önlemek için tampona 2-merkaptoetanol veya ditiyotreitol ilave edilir. 2-merkaptoetanol ancak 24 saat koruyucu etkiye sahiptir ve kokusu rahatsız edicidir. Ditiyotreitol hem daha düşük konsantrasyonda hem de uzun süre etkilidir. Yükseltgenler yanında Me2+ iyonları da HS-gruplarını bağlayarak inaktivasyona neden olurlar. Eğer protein veya

enzim kendisi metal iyonu içermiyor ise EDTA gibi kompleksleştiricilerin de tampona katılmasında yarar vardır. Ayrıca tampona saflaştırılacak enzimin substrat veya kofaktörünün katılmasıda inaktivasyona karşı etkili bir önlemdir. Protein saflaştırma adımlarında proteinin cam reaksiyon kaplarının yüzeyinde adsorpsiyonu büyük bir sorundur. Bu sorunu aşabilmek için polipropilen kaplar kullanılır. Özellikle seyreltik protein çözeltileri yüzey adsorpsiyonu ile önemli kayıplar verdikleri gibi kuarterner yapılı proteinlerin alt birimlerinin (subunit) ayrışmasıda söz konusudur. Ortama sığır serum albumini (< % 0,1) veya non-iyonik deterjanların (< % 0,1) katılması adsorpsiyon kayıplarını en aza indirgerse de her iki katkı maddesi protein saflaştırmada bazı sorunlara neden olabilir. Tampona şeker alkolleri (gliserin, sorbitol, mannitol v.b) ve bazı şekerlerin (glukoz, sakkaroz) katılması su aktivitesini düşüreceğinden denatürasyon ile fonksiyonel protein kaybını azaltır. Ayrıca % 20'den fazla gliserin katılırsa –20ºC'de donmadan protein çözeltisinin saklanması mümkündür. Protein saflaştırma işlemine uzun süreli ara verme (bir gece gibi) durumunda çözeltiye bakteriostatik ve proteaz inhibitörleri ilave edilmeli ve soğuk odada saklanmalıdır. Daha uzun süreli bekletmelerde çözelti dondurulmalıdır. Sıvı azot veya kuru buz-metanol karışımı ile şok dondurma tercih edilir. Yüksek konsantrasyonlarda amonyum sülfat proteinleri stabilize ettiğinden bir gece veya daha uzun depolama amonyum sülfat ile çöktürme adımından sonra yapılmalıdır.

1.7.3.2. Stratejik Planlama

Saflaştırmanın stratejik hedefi ucuz ve etkili yöntemler ile yüksek saflık ve verim ile protein kazanmaktır. Saflaştırmada kullanılacak tekniklerin seçimi ve sıralaması çok önemlidir. Çizelge 1.1'de protein saflaştırmada kullanılan temel tekniklerin bir kıyaslaması verilmiştir.

Çizelge 1.1. Protein saflaştırma tekniklerinin özellikleri (Telefoncu,1996)

Teknik	**Dayandığı Özellik**	**Kapasite**	**Etkinlik**	**Verim**	**Maliyet**
PH çöktürmesi	Yük	Yüksek	Çok düşük	Orta	Düşük
$(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi	Hidrofobisite	Yüksek	Çok düşük	Yüksek	Düşük
Ekstraksiyon	Değişik	Yüksek	Çok düşük	Yüksek	Düşük
Biyoafinite kromatoğrafisi	Biyoafinite	Yüksek	Yüksek	Değişebilir	Yüksek
İyon değişim kromatoğrafisi	Yük	Orta	Orta	Orta	Orta
Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi	Hidrofobisite	Orta	Orta	Orta	Orta
Kromatofokuslama (odaklama)	Yük/ pI	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Boya afinite kromatoğrafisi	Değişik	Orta	Yüksek	Orta	Orta
Ligand afinite kromatoğrafisi	Biyoaktivite	Orta-düşük	Çok yüksek	Düşük	Yüksek
Jel Geçirgenlik kromatoğrafisi	Molekül boyutu	Çok düşük	Düşük	Yüksek	Orta

Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik (yüksek kapasiteli) teknikler kullanılır. Böylece ortamdaki suyun büyük kısmı uzaklaştırılmış olur. Çöktürme, ekstraksiyon ve absorpsiyon kromatoğrafi teknikleri bu amaçla kullanılabilir. Ayrıca gücü açısından çöktürme ve ekstraksiyon teknikleri etkin değilken kromatoğrafik teknikler özellikle afinite kromatoğrafisi çok etkindir ve 1000 kattan fazla saflaştırma sağlar. Afinite-ultrafiltrasyon kombinasyonu gibi yüksek ayırma güçlü tekniklerin kullanılması saflaştırma prosesindeki adım sayısını çok düşürür. Fakat afinite tekniklerinin çok pahalı olduğu, bu nedenle çöktürme gibi ucuz teknikler ile kontaminantların önemli oranda uzaklaştırılmasından sonra uygulanmaları gerektiği unutulmamalıdır. Protein saflaştırmada uygulanacak teknikler genel olarak aşağıdaki sırayı izler:

- Homojenizasyon
- Çöktürme
- İyon değişim kromatoğrafisi

- Afinite kromatoğrafisi
- Jel Geçirgenlik kromatoğrafisi

Saflaştırmanın verimi protein tayini ile, kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatoğrafisi ile uzaklaştırılır.

1.8. Kromatoğrafi

Kromatoğrafi kelimesi Yunanca “chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında görünür renkli bitki pigmentlerin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir. Kromatoğrafi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Daima durağan faz (stasyonel faz) ve hareketli faz (mobil faz) vardır. Hareketli faz durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılır. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatoğrafik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir (Telefoncu,1996).

1.8.1. İyon-Değişim Kromatoğrafisi

Elektrostatik çekime dayanan bu adsorpsiyon kromatoğrafisinde örnekte bulunan bileşenler yüklü durağan faza olan afinitelerine göre ayrılırlar. İyon değiştiriciler iki kısımdan oluşur:

1. İçinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar

bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesi (matriks).

2. Hareketli karşı iyonlar. Karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirilebilirler (Boyer, 1993).

İyon değiştirici dolgu maddesi şayet pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olup, bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdiklerinden anyon değiştiriciler adını alırlar. Benzer şekilde şayet dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar pozitif olup, bu tür iyon değiştiriciler pozitif iyonları değiştirdiklerinden katyon değiştiriciler adını alırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.2. İyon değiştiriciler a) Anyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar b) Katyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar (Pharmacia Fine Chemicals AB,1980).

Dolgu maddesi alüminyum silikatlar, sentetik reçineler, polisakkaritler v.b. olabilir. Dolgu maddesinin tabiatı iyon değiştiricilerin mekanik kararlılığını, akış özelliğini, bozulabilen biyolojik maddelere karşı davranışını ve kısmen de kapasitesini belirler. İlk kullanılan iyon değiştiricileri sentetik reçineler olup suyun demineralizasyonunu ve su kalitesini düzeltmede ve atıklardan iyonların kazanılmasında kullanılmıştır. Bu tür iyon değiştiriciler yüksek derecede yüklü gruplarla kovalent olarak bağlanmış hidrofobik polimer dolgu maddeleri olup biyolojik maddelerin saflaştırılmasında uygun değildir zira yüksek yük yoğunluğu ve polimerlerin hidrofobik oluşu biyolojik maddelerin denatüre olmalarına sebep olur. Biyolojik maddelerin ayrımında ilk kullanılan iyon değiştiriciler Peterson ve Sober

(1956), tarafından geliştirilen selüloz iyon değiştiricilerdir. Hidrofilik tabiatı sebebiyle selülozun proteinleri denatüre etme eğilimi çok düşüktür. Pharmacia Fine Chemicals firması tarafından geliştirilen modifiye dekstran olan "Sephadex", çapraz bağlı agaroz olan "Sepharose" ve epiklorohidrin ile çapraz bağlanarak kuvvetlendirilmiş selüloz olan "Sephacel" iyon değiştiricileri, küresel tanecikli yüksek gözenekli ilk iyon değiştiricilerdir. Bu günlerde çok farklı destek maddesi vardır ancak protein fraksiyonlanması için en yaygın tercih edilen destek maddesi selülozdur (Johnstone ve Thorpe, 1982). Fiberli selülozik iyon değiştiricilerin peptid ve protein saflaştırılmasında tercih edilme sebebi peptid ve proteinlerin bu dolgu maddesinde çok kararlı olmalarıdır (Boyer, 1993).

İyon değiştiricilerin karşı iyonları absorplama kabiliyeti kantitatif olarak kapasite olarak tanımlanır. İyon değiştiricisinin total kapasitesi, o iyon değiştiricisinin kuru gramında bulunan yüklü ve potansiyel olarak yüklü grupların miktarıdır. Genel olarak miligram kuru ağırlık başına iyonlaşabilen grupların miliekivalenleri olarak ifade edilir ve deneysel olarak titrasyonla tayin edilir. İyon değiştiricisinin kapasitesi destek maddesinin gözeneğinin fonksiyonudur. İmalatçıların literatüründen protein için mevcut kapasite mikrogranüler, bilyelenmiş selüloz ve agaroz için çok benzerdir (0,11-0,15 g albumin / ml DEAE türevi iyon değiştiricisi). İyon değiştiricilerin yüksek kapasitesi çok büyük hacimlerin prosesine ve sonra konsantre şekilde eldesine imkan verir. İyon değişim kromatoğrafisi ile ayırmada temelde iki etap vardır: İlk etap örnek tatbiki ve iyon değiştirici üzerinde adsorpsiyon, ikinci etap ise adsorbe edilen örnek bileşenlerinin kolondan ayrılmış olarak elüe edilmeleri (Boyer, 1993).

1.8.1.1. Proteinlerin İyon-Değişim Kromatoğrafisi İle Saflaştırılması

Proteinler iyon değiştiricilere zıt yüklü gruplar arasındaki iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanırlar. Bağlanan proteinler ya tampon çözeltisinin iyonik gücü kademeli olarak arttırılarak ya da tampon çözeltisinin pH'ı değiştirilmek suretiyle protein yüzeyindeki etkileşen grupların yükü yok edilmek suretiyle kolondan ayrı ayrı elüe edilirler. Bütün bu işlemler esnasında iyonik değiştiricinin yükü sabit

kalacak bir pH aralığı seçilmelidir yoksa bütün proteinler kolondan ayrılmadan birlikte elüe olurlar. Bağlanma gücü hem proteinin izoelektrik noktasıyla hem de toplam yükü ile bağlantılıdır. Dolayısıyla aynı izoelektrik noktasına sahip iki protein denge izoelektrik fokuslama ile ayrılmazken iyon-değişim kromatoğrafisiyle ayrılabilirler (Johnstone ve Thorpe, 1982).

1.8.1.1.(1). İyon Değiştiricinin Seçimi

Amfoterik maddeler olan proteinlerin net yükleri değişkendir. Düşük pH'larda pozitif, yüksek pH'larda negatif ve izoelektrik noktada (pI) ise sıfır yüklüdür. Proteinlerde etkileşime giren yük grupları başlıca karboksil, amino veya tersiyer amino gruplarıdır. Dolayısıyla anyon değiştiricileri proteinlerin protonsuz karboksil gruplarını bağlarken protonlanmış amino gruplarını iter. Genel kaide olarak toplam aspartik asid ve glutamik asid artığı değişken proteinler anyonik değiştiriciler ile ayrılırken, lizin, arjinin ve histidin içeriği farklı proteinler katyonik değiştiricilerle ayrılabilirler. Ancak, bu kaide kesin bir kaide değildir, zira bağlanmayı etkileyen bir çok faktör vardır. Bu sebeple proteinlerin ayrılmasına teşebbüs edilmeden protein karışımının hem asidik hem de bazik şartlarda poliakrilamid jellerle elektroforezinin yapılmasında fayda vardır. Elektroforetik ayrımlar, yaklaşık olarak anyon ve katyon değişim kromatoğrafisinin analitik versiyonları olarak hizmet ederler. Örneğin, eğer karışımın iyi bir ayırımı alkalin elektroforezle elde edilirse o zaman preparatif olarak benzer pH'ta anyon değiştirici ile ayrılabilir. Prensipte amfoterik moleküller hem anyon hem de katyon değiştiricilerine bağlanabilirler ama büyük biyomoleküllerle çalışılırken kararlılık pH aralığınında dikkate alınması gerekir. Kararlı pH aralığı, biyomolekülün denatüre olmadığı pH aralığıdır. Çoğu kez ayrılmaya çalışılan proteinin izoelektrik noktası bilinmez ve bir protein karışımındaki proteinlerin birbirlerinden ayrılabilmesi için ne tip bir iyon değiştirici kullanılacağı ancak deneme yanılma yöntemi ile gerçekleştirilir. Az bir miktar örnek tampon çözeltide çözülür ve farklı iyon değiştiricilerin bulunduğu farklı test tüplerine eşit olarak konulur. 10-15 dakika bekletildikten sonra santrifüjlenerek çözeltinin 280 nm'de absorbansı okunur.

Bağıl olarak en düşük absorbans veren test tüpündeki iyon değiştirici uygun değiştiricidir (Pharmacia Fine Chemicals AB,1980).

1.8.1.1.(2). Tampon Seçimi

Tampon çözeltisinin pH'ı iyon değiştiricinin çalışma aralığında olmalı ve proteine zarar vermeyecek pH aralığında bir değerde olmalıdır. Proteinin değiştiriciye bağlanması için pH 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 sonuçta denatürasyon ve düşük geri kazanıma yol açar. Proteinlerin bağlandığı pH'taki tampon başlangıç tamponu olarak alınır, zira proteinler bağlanmalı ancak serbest kalacakları pH'a yakın pH'ta olmalıdır ki, çok yüksek güçte iyonik güç kullanılmadan kolondan elüe edilebilsinler. Başlangıç pH'ı aynı zamanda zayıf mı kuvvetli mi iyon değiştirici kullanılmasının gerektiğini gösterir. Zayıf iyon değiştiriciler, anyon değiştiricilerde pH 6'nın altında katyon değiştiricilerde pH 9'un üzerinde yüklerini kaybetmeğe başlarlar. Kuvvetli iyon değiştiriciler sadece çok düşük iyonizasyonlu maddelerin ayırımında kullanılır.

1.8.1.1.(3). Kolon Seçimi

Diğer kolon kromatoğrafilerinde de olduğu gibi kullanılan cam kolonun iç çapı, kolon boyunca aynı olmalı, çıkış noktasında "ölü hacim" mümkün olduğunca az olmalıdır. Çıkış musluğu deliğinin iç çapı 1 mm civarında olmalıdır. En kullanışlı kolonların boyu 90-100 cm olup çapı örneğin miktarınca belirlenir. Örneğin hacmi total kolon hacminin % 5'ini geçmemeli hatta iyi bir ayırım için % 1-2 tercih edilmelidir. Genelde 10-30 mg protein/100 ml reçine iyi bir yüklemedir. Daha fazla protein verimi arttırırken ayırımı düşürür. Dolayısıyla ürünün saflığı azalır. Az yükleme ise, ayırımı arttırırken verimi düşürür. İyon değişim kromatoğrafisinde genelde 20-30 cm kolon boyu uygundur. Hatta daha kısa kolon boyları tercih edilir.

Tatbik edilen örnek hacmi önemli değildir, zira bağlanan proteinler konsantrasyondan fazla etkilenmezler.

1.8.1.1.(4). Örnek Tatbiki Ve Elüsyon

Örnek tatbik edilmeden başlangıç tamponu ile dializ edilmelidir. Sonuç hacmin önemi yoktur. Örneğin uygulanmasından sonra kolon hacminin iki katı hacimdeki başlangıç tamponu ile yıkanmalıdır ki bağlanmamış proteinin tamamı kolondan elüe edilebilsin. Bağlanan proteinler bundan sonra artan iyonik güçteki tamponla veya pH'ı değiştirilmiş tamponla (anyon değiştiricilerde pH düşürülerek, katyon değiştiricilerde pH yükseltilerek) veya hem pH'ı değiştirilerek hem de iyonik güç arttırılarak elüe edilir. İyonik gücün değiştirilmesi genelde tercih edilir. Çünkü bu daha iyi kontrol edilebilir. Sonuç iyonik gücün 1,0 olması genellikle çoğu proteinleri elüe etmek için yeterlidir. Ya tampon konsantrasyonu arttırılır ya da tampon konsantrasyonu sabit tutulurken diğer iyonlar örneğin sodyum klorür iyonları arttırılır. Sodyum klorür iyonlarının arttırılması genelde daha iyi bir yöntemdir. Çünkü tamponlama kapasitesi dolayısıyla pH ayırım boyunca sabit kalır (Johnstone ve Thorpe, 1982).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Stepanik ve Ewing (1990), glutatyon peroksidaz'ı, katalaz'ı ve süperoksit dismutaz'ı insan eritrositlerinden DEAE-selüloz kullanarak saflaştırmışlardır. Glutatyon peroksidazı, süperoksit dismutaz ve katalazdan tiyol-disülfid değiştirici kromatoğrafi ile ayrıştırmışlar, moleküler eleme ve boya-ligand ilgi kromatoğrafisi ile % 90 saflıkta elde etmişlerdir. Katalaz ve süperoksit dismutazı birbirinden jel eleme kromatoğrafisi ile ayırıp saflaştırmışlardır. Katalazı amonyum sülfat çöktürmesi ile yaklaşık % 90 oranında saflaştırmışlardır. Süperoksit dismutazı ise aynı homojenlikte hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi ile saflaştırmışlardır. 820 ml yıkanmış eritrositlerden 45 mg SOD ve 232 mg katalaz elde etmişlerdir.

Kumagai ve ark. (1994), bakır çinko süperoksit dismutazı (Cu-Zn SOD) sığır eritrositlerinden pH kontrollü amonyum sülfat methanol ekstraksiyonu ile izole etmişlerdir. %90 amonyum sülfat doygunluğunda parçalanmış kırmızı hücre süspansiyonun pH'ını 5,0'a ayarlamışlardır. Eşit miktardaki methanol eklenmesi ile enzim spesifik aktivitesi 2000 ünite/mg protein den daha büyük değere ulaşmıştır. DEAE-Selüloz kolon kromatografisi kullanılarak yapılan ileri saflaştırmada, oldukça saflaşmış Cu-Zn SOD, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) bir tek band göstermiştir. Bu işlemi kullanarak 1 litre sığır kanından 4728 ünite/mg protein spesifik aktivitesine sahip 14 mg saf Cu-Zn SOD elde etmişlerdir.

Zhenfei ve ark. (1996), Cu-Zn SOD'yi bakla tohumlarından saflaştırmışlardır. Enzimi 2852 ünite/mg protein spesifik aktivite elde etmişler ve enzimin KCN ve H_2O_2 tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini bulmuşlardır. Enzimin pH=5-9'da 70 ˚C'ye kadar kararlı olduğunu, molekül ağırlığının 31 kDa ve alt ünitesinin 14 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Tarhan ve Tuzmen (2000), süperoksit dismutazı koyun eritrositlerinden izole etmişlerdir. SOD aktivitesini, optimize edilmiş deney koşulları altında 6-hidroksidopamin (6-OHDA)'in otooksitlenme hızındaki değişimi ile incelemişlerdir. Enzimin Cu ve Zn içerdiğini, kloroform-etanol karışımına duyarlı olmadığını, siyanür ve hidrojen peroksit ile inhibe edildiğini bulmuşlardır. Koyun eritrosit Cu-Zn

SOD'si için optimum pH'ı 9,4; optimum sıcaklığı 30˚C olarak belirtmişlerdir. Enzimin 2,5 saat inkübasyonla nötral pH'da 37˚C'ye kadar termal kararlılık gösterdiğini belirtmişlerdir

Osatomi ve ark. (2001), Cu-Zn SOD'yi Japon dil balığının pankreasından saflaştırmışlardır. Enzimi, etanol / kloroform muamelesi, aseton çöktürmesi ve QSefaroz, S-Sefaroz, Ultrajel AcA 54 kolon kromatoğrafileri kullanarak saflaştırmışlardır. İndirgeyici koşullar altında SDS-PAGE'de 17,8 kDa moleküler ağırlıkta tek bant elde ederken, indirgeyici olmayan koşullarda eşit miktarlarda 17,8 ve 36 kDa moleküler ağırlıkta iki bant elde etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin N terminal amino asit sırasını 25 amino asit için belirlemiş ve bu sırayı diğer Cu-Zn SOD'lerle karşılaştırmışlardır. Kılıç balığından elde edilen SOD'de N-terminal alanin artıklarının asetillenmediğini belirtmişlerdir. 60˚C'nin üzerinde enzimin termo kararlığının sığır Cu-Zn SOD'sinden daha düşük olduğunu belirtmişlerdir

Öztürk ve Tarhan (2001), tavuk karaciğerinden SOD'yi saflaştırmış ve kısmen karakterize etmişlerdir. Önce karaciğeri homojenize edip, hemoglobini çıkarmışlardır. Takiben protein çökeleğini, $(NH_4)_2SO_4$, metanol, $(NH_4)_2SO_4$-metanol ve polietilen glikol ile etkileştirmişlerdir. Polietilen glikol'u, PD-10 kolonu kullanarak kromatoğrafi ile uzaklaştırmışlardır. Enzim aktivitesi olan fraksiyonları ultrafiltreden geçirip, DEAE-iyon kromatoğrafisi ve Sefhadeks G-75 jel filtrasyon kromatoğrafisi ile % 7,3'lük verimle 286 kez saflaştırmışlardır. 4818,2 U/mg spesifik aktivitesine ulaşmışlardır. Enzimin her biri 16.000 Da moleküler ağırlığına sahip, Cu ve Zn içeren iki alt üniteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. SOD'nin, DTT ve β-merkaptoetanol ile inhibe edilmediğini CN^- ve H_2O_2 ile inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca SOD'nin 2 mM iyodoasetamid ile % 40 aktivite kaybettiğini gözlemlemişlerdir. Cu ve Zn içeren iki alt üniteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. SOD'nin, DTT ve β-merkaptoetanol ile inhibe edilmediğini CN^- ve H_2O_2 ile inhibe edildiğini belirtmişlerdir.

Aydemir ve Tarhan (2001), SOD'yi tavuk eritrositlerinden saflaştırmış ve kısmen karakterize etmişlerdir. Eritrosit membranlarını Triton X-100'ün varlığında dondurup-çözme metodu ile parçalamışlardır. Etanol çöktürmesinden sonra, SOD içeren çözeltiyi DEAE-Selüloz ve ardından Sephadex G-100 jel kolonlarına

uygulamışlardır. Tavuk eritrosit SOD'sini % 26 verimle 508 kat saflaştırmışlardır. 8480 U/mg spesifik aktivitesine ulaşmışlardır. Moleküler ağırlığı jel filtrasyon ile 30,6 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin yüksek termal kararlılığa sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Lie ve ark. (2004), amonyum sülfat ile çöktürüp, DEAE-Sefaroz iyon değiştirici ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatoğrafisi ile italyan işçi arısından SOD'yi 53,05 U/mg protein spesifik aktivitesi ile 104 kez saflaştırmışlardır. Elde edilen enzim SDS-PAGE'de tek band göstermiştir. Sıcaklığın SOD aktivitesi üzerine etkisini incelemiş ve enzimin oldukça kararlı olduğunu bulmuşlardır. Cu. Zn, Fe ve Mn içeriğini çalışmışlar ve enzimin Cu, Zn içerdiğini bulmuşlardır. Daireseldikroizm spektrumunu araştırmışlar ve proteinin % 26,1 α-heliks, % 53,8 β-tabaka ve % 22,0 rastgele halka içerdiğini bulmuşlardır. SOD'nin izoelektrik odaklanması ile enzimin zincir içi disülfid bağı içerdiğini göstermişlerdir. Amino asit bileşimini araştırmışlar ve enzimin 402 amino asit içerdiğini bulmuşlardır. Enzimin göreceli olarak yüksek miktarda aspartik asit, glisin, lösin, alanin, glutamik asit ve valin içerdiğini bulmuşlardır. Üre'nin enzimi inhibe ettiğini, ultraviyole absorpsiyonunda değişme yaptığını ve floresans emisyonunda azalma meydana getirdiğini bulmuşlardır. DTT'nin enzim aktivitesinde değişme, ultraviyole absorpsiyonunda artma, floresans emisyonunda azalma meydana getirdiğini bulmuşlardır

Sivaprakasam ve ark. (2004), Süperoksit dismutazı amonyum sülfat fraksiyonlaması, jel süzme ve iyon değişim kromatoğrafisi kullanarak guava'nın ham yeşil meyvelerinden % 47 geri kazanım ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin 40 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğunu ve 20 kDa'luk iki eşit alt üniteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enzimi pH=7,8'de maksimum aktivite göstermesi için 45 dakika ışığa maruz bırakmışlardır. Tipik Michaelis-Menten kinetiği gözlemlemişlerdir. Nitrobenzen tetrazolium ve riboflavin substratları için Km değerlerini sırasıyla 15 ve 2,3 mM bulmuşlardır. Enzimin 40˚C'ye kadar kararlı olduğunu ve % 76 inhibisyona kadar nitroblue tetrazolium'un inhibisyonunda doğrusal artış gözlemlemişlerdir. Mg^{2+}nin enzim aktivitesini % 48 arttırdığını, Mn^{+2}'nın aktiviteyi % 55 inhibe ettiğini, Cu^{2+}, Co^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının aktivite üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir. KCN, H_2O_2 ve NaN_3'in

enzimi sırasıyla % 36, % 71 ve % 33 inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte SDS, kloroform:etanol (1:1) karışımının, β-merkaptoetanol'ün aktivite üzerinde herhangi bir etki göstermediğini belirtmişlerdir.

Seatovic ve ark. (2004), Süperoksit dismutazı Sırbistan'ın termal kaplıca sularında bulunan *Thermotrix sp.*'dan saflaştırmışlardır. SOD'yi hücre ekstrakından amonyum sülfat çöktürmesi, Sefhadeks G 75 Jel Eleme Kromatoğrafisi ve QAESefhadeks iyon değişim kromatoğrafisi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesini 9191 U/mg protein bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzimi analiz etmişler ve kısmen karakterize etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını, jel kromatoğrafisi ile 37 kDa bulmuşlardır. SDS-PAGE ile enzimin iki eşit alt üniteden oluştuğunu belirtmişlerdir. İzoelektrik noktasını, izoelektrik odaklama ile 5,3 olarak bulmuşlardır. Enzim aktivitesinin optimum pH'ını 8-10 düzeyinde bulmuşlardır. SOD aktivitesi için optimum sıcaklığı 60 ˚C olarak bulmuşlardır. 40, 50, 60 ˚C'de bir saat inkübasyonla SOD aktivitesinin artığını belirtmişlerdir. Fakat 80 ˚C'de SOD'nin denatüre olduğunu belirtmişlerdir. 25 ˚C'de 24 saat inkübasyonla SOD aktivitesinde hafifçe azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Zunsheng ve ark. (2005), *Cordyceps militaris*'ten Cu-Zn SOD üretmişlerdir. Cu-Zn SOD'nin kültür süzüntüsünde var olduğunu ve protein oranı olarak hücrelerarası Cu-Zn SOD aktivitesinin, kültürün büyüme devresinde yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} ve Fe^{2+}'nin enzim biyosentezi üzerine etkisini araştırmışlardır. Cu-Zn SOD'yi *Cordyceps Militaris*'ten izole etmişler ve kısmen karakterize etmişlerdir. Saflaştırmayı $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, DEAE-Sefaroz hızlı akan anyon değişim kromatoğrafisi, CM-650 katyon değişim kromatoğrafisi ve sefadeks G-100 jel süzme kromatoğrafisi olmak üzere 4 basamakta gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin 35070 Da moleküler ağırlığına sahip olduğunu ve her biri bir Cu, Zn elementine sahip iki eşit alt üniteden oluştuğunu belirtmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin izoelektrik noktasını 7,0 olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzimin N-terminal amino asit dizisini 12 amino asit için belirlemişler ve bu diziyi diğer Cu-Zn SOD'lerinkiyle karşılaştırmışlardır. Optimum pH'ı 8,2-8,8 olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzimin pH 5,8-9,8'de kararlı kaldığını ve pH 7,8'de 25˚C'den 50˚C'ye kadar 1,5 saat inkübasyonla yine kararlı kaldığını

belirtmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin H_2O_2 ve KCN'e duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzim üzerine 2,5 mM NaN_3, PMSF, Triton x-100, β-merkaptoetanol ve DTT'nin 5 saat inkübasyonu ile herhangi bir inhibisyon etkisininin olmadığını bildirmişlerdir

Vyas ve Kumar (2005), kışın yetişen çay filizlerinden mangan içeren süperoksit dismutazı saflaştırmışlardır. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAEselüloz kolon kromatoğrafisi ve HPLC sistemi ile silika temelli moleküler dışlama kromatoğrafisi ile saflaştırmışlardır. 51 kat saflaştırmışlar ve 56,66 U/mg protein spesifik aktiviteye ulaşmışlardır. Denatüre PAGE ile tek band elde etmişlerdir. Enzimin 169 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın SDS-PAGE ile monomer ağırlığını 43 kDa bulmuşlardır. Böylece enzimin homotetramer olduğunu önermişlerdir. Saflaştırılmış enzim için optimum pH'ı 8,0 olarak bulmuşlardır. Optimum sıcaklığı ise 0˚C olarak bulmuşlardır. Enzimin geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Meenakshi Choudhary ve ark.(2006), kurşun, bakır ve çinkonun 0,05-0,20 mg/L üzerindeki konsantrasyonlarda, zehirli etkilerini bir siyanobakteri olan *Spirulina platensis*teki süperoksit dismütaz, prolin ve malondialdehit üzerinde araştırmışlardır. Kültür ortamındaki metal iyonu konsantrasyonu ile olarak, ağır metal stresi altındaki test mikroorganizmalarının büyümesindeki azalmaya rağmen, MDA, SOD ve prolin içeriğinin arttığını gözlemlemişlerdir. MDA miktarındaki artışın, ağır metal stresi altındaki test mikroorganizmalarında serbest radikal formlarının bir göstergesi olmasına karşın SOD ve prolin seviyesindeki artışın bir temizleme mekanizmasının varlığı sonucunda olduğunu göstermişlerdir..

Desai ve Sivakami(2007), Süperoksit Dismütazı bir siyonabakteri olan *Spirulina platensis'*in sonikasyonundan saflaştırmışlardır. Bu çalışmada laboratuvar ortamında yetiştirdikleri on iki günlük spirulina kültürünün 5-6 litresini kullanmışlar ve 290 U/mg spesifik aktiviteye sahip saf enzimi 100–200 μg olarak elde etmişlerdir. Saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-52 anyon değiştirici kromotografisini kullanmışlardır. Elde ettikleri saf enzimin aktivitesi için önemli olan amino asit içeriğini arginin, histidin, triptofan, tirozin, ve aspartik asit olarak tanımlamışlar ve amino asit kompozisyonunun metiyonin ve sistein den yoksun

olduğunu bulmuşlardır. H_2O_2 varlığında enzim aktivitesindeki inhibisyonun, SOD enziminin demir içeren bir enzim olabileceğini desteklediğini belirtmişlerdir.

Nedevaa ve ark.(2009), Yeni bir ısıca kararlı Cu/Zn SOD enzimini *Kluyveromyces marxianus* mayasından saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Saflaştırmada termal işlem, diyaliz, iyon değiştirici kromotografi, jel filtrasyonu, amonyum sülfat çöktürmesi kullanmışlardır. Saflaştırdıkları enzimin molekül ağırlığı 34 kDa olan bir homodimer olduğunu, türdeş diğer mayalardaki Cu/Zn SOD enzimi ile aynı yüksek N terminale sahip olduğunu açığa çıkarmışlardır. Enzimin yarı ömrünün 70˚C de 30 dakika, pH kararlılığının 7,5-8,5 arasında olduğunu ve enzimin inhibitörlere ve çeşitli kimyasallara karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.Bu karakteristik özellikler *Kluyveromyces marxianus*'deki Cu/Zn SOD enziminin geniş pratik bir uygulama alanının mümkün olabileceğini göstermektedir.

Li Hong Y. ve ark.(2010), SOD enzimini nötral pH tampon ekstraksiyonu, amonyum sülfat çöktürmesi, izoelektrik nokta çöktürmesi ve iyon değiştirici metodları kullanarak *Panax ginsengden* saflaştırmışlardır. SOD'u bir homodimer ve molekül ağırlığı 31,079 Da olarak bulmuşlardır. Enzimin spesifik aktivitesini Marklund yöntemi ile 9480,43 U/mg olarak belirlemişlerdir. SOD enziminin stokiometrik olarak 0,9±0,3 Fe içerdiğini metal analizi ile tespit etmişlerdir. Enzimin pH 4-9 aralığının üzerinde ve 70˚C de kararlı olduğunu, maksimum absorpsiyon dalga boyunun 278 nm olduğunu bulmuşlardır. Enzimin hidrojen peroksit, triklor metan, etanol ve üreye karşı hassas olduğunu ve demir içerikli olduğunu bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma, St. Louis, MO, Merck firmaları tarafından sağlanmıştır.

$NaHCO_3$,
K_2HPO_4,
K_2SO_4,
$MgSO_4$,
H_3BO_3,
$MnCl_2.4H_2O$,
EDTA,
$Na_2MnO_4.2H_2O$,
$Co(NO_3)_2.6H_2O$,
KCl,
NBT,
Sığır serum albumin,
Xantin oksidaz.
Ksantin
Na_2CO_3
$(NH_4)_2SO_4$
$CuCl_2.2\ H_2O$
NaOH
$CuSO_4.5\ H_2O$
Tri Sodyum Sitrat. $2\ H_2O$
Folin Ciocalteu
NaCl

DEAE-Selüloz
Tris Baz

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV-Vis Spektrofotometre (UNICAM)
pH Metre (Hanna 8417)
Magnetik Karıştırıcı (Are)
Girdap Karıştırıcı (Velp Scientifica)
Kromatoğrafi Kolonları
Su trompu
Santrifüj (Jouan MR 23i)
Kriyostat (Poly Science)
Etüv (ES 500)
Otomatik Pipet (Eppendorf)
Elektrikli Terazi (Sartorius)

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Kültür hazırlanmasında *Spirulina platensis* Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesinden temin edilmiş ve Ihena(1987) tarafından, önerilen ve aşağıda belirtilen inorganik besiyerinde çoğaltılmıştır.

10 g $NaHCO_3$, 924 ml deiyonize suda çözülür ve 0.25g K_2HPO_4, 25 ml deiyonize suda çözülür ve bu iki çözelti karıştırılır. Ardından 2.5 g $NaNO_3$, 1g K_2SO_4, 1g NaCl,0.2 g , 0.04 g $CaCl_2$, 0.01 g $FeSO_4$ ve 0.09g EDTA içeren 50 ml çözelti eklenir. Daha sonra 2.86 g H_3BO_3, 1.8g $MnCl_2.4H_2O$, 0,2g $ZnSO_4.7H_2O$, 0.039g $Na_2MnO_4.2H_2O$, 0.079 g $CuSO_4$, 0.049 g $Co(NO_3)_2.6H_2O$ 1 L deiyonize suda çözülür ve bu çözeltinin 1 ml si önceki çözeltiye eklenir. Bu çözelti, 105 ºC de 7

dakika otoklavda steril elde edilir. *Spirulina platensis* bu çözelti ortamında 21 günde olgun hale gelmiştir.

3.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Saflaştırılması

3.2.2.1. Homojenat Hazırlanması

21 gün sonunda olgun hale gelen *Spirulina platensis'*in 5-6 L'si Miracloth filtresi kullanılarak süzülmüş ve üst kısımda kalan hücrelerin hacmi 10 ml olarak ölçüldükten sonra 15 ml 7,8 tris baz tamponunda çözünerek ultrasonikasyon cihazı ile 20kHz frekansında ses dalgalarıyla 5 dakika süreyle parçalanmıştır. Sonikasyon sırasında açığa ısının proteinleri denatüre etmesini engellemek için homojenat sürekli soğutulmuş ve işlem aralıklarla yapılmıştır. Daha sonra elde edilen homojenata 4ºC de 20 dk, 12.000 rpm'de santrifüj yapılarak, süpernatant kısmı toplanmış ve çökelek kısmı atılmıştır.

3.2.2.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Süpernatanta %30-60'lık arası amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi yapılmış ve amonyum sülfat çöktürmeleri sonunda her bir çökelti ve süpernatantta SOD aktivitesine ve protein miktarına bakılmıştır. %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen süpernatantta SOD aktivitesi görüldü ve saflaştırma işlemine elde edilen bu süpernatant ile devam edilmiştir.

3.2.2.3. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi

%60'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu SOD aktivitesi görülen süpernatant diyaliz edildikten sonra DEAE-Selüloz kolonundan (1,7cmx14,5cm) geçirildi.

7,0 g DEAE-selüloz tartılıp, 100 ml 1,5 M pH=7.8 tris tamponunda, +4ºC'de bir gece bekletilerek, dengeye getirilmiş ve bu süre sonunda reçine saflaştırma

kolonuna dolduruldu ve yine aynı tamponla yıkanarak dengelendikten sonra SOD içeren süpernatant kolona yüklendmiş ve DEAE-selüloz kolonu başlangıç tamponu ile yıkanarak, SOD'ın DEAE- selüloz üzerine adsorbe olması sağlanmış, SOD'nin kolondan alınması için 25-225 mM NaCI içeren 50 mM pH=7.8 tris tamponu kullanılarak elüe edilmiş 3 ml'lik fraksiyonlar alınarak ve SOD aktivitesi gösteren fraksiyonlar biraraya toplanmıştır.

3.2.3. SOD Aktivitesi Tayini

SOD aktivitesi, Sun, Y. ve ark. (1988) tarafından önerilen yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($O_2 \cdot^-$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin (1), nitro blue tetrazolium (N.B.T) ile meydana getirdiği mavi renkli formazan boyasının 560 nm dalga boyunda verdiği optik dansititenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak (2) numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. SOD'nin bir ünitesi deneme koşulları altında N.B.T indirgenme hızının % 50 inhibisiyonudur.

$$\text{Ksantin} \xrightarrow{XOD} \text{Ürik asid} + O_2\bullet^- \quad (1)$$

$$\text{N.B.T.} + O_2\bullet^- \rightarrow \text{formazan boyası} \quad (2)$$

$$O_2\bullet^- + O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2 \quad (3)$$

Reaktif Çözeltisinin Hazırlanması

a. Ksantin (0,3 mM) 9,13mg ⟶ 200 ml saf suda çözülür.
b. EDTA (0,6 mM) 22,3 mg ⟶ 100 ml saf suda çözülür.
c. N.B.T. (150 mg/L) 12,3 mg ⟶ 100 ml saf suda çözülür.
d. Na_2CO_3 (400 mM) 2,544g ⟶ 60 ml saf suda çözülür.
e. Sığır serum (1g/L) 30 mg ⟶ 30ml saf suda çözülür.

Yukardaki çözeltiler karıştırılarak SOD enzimi için 490 ml reaktif çözeltisi hazırlanmıştır.

- Ksantin oksidaz (167 U/L) enziminden 18 µl alınıp , 3 ml 2 M $(NH_4)_2SO_4$ da çözülür;
- 2 M $(NH_4)_2SO_4$ 2,643 g 10 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- $CuCl_2.2H_2O$(0,8 mM) 13,6 mg 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.

SOD aktivitesi ölçümü aşağıda verilmiştir.

	Kör	Örnek
Reaktif	2,85 ml	2,85 ml
Örnek	----------	0,1 ml
Ksantin oksidaz (XOD)	50 µL	50 µL
25°C de oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi		
$CuCl_2$	0,1 ml	0,1 ml
Numune	0,1 ml	--------

560 nm de destile suya karşı okunur.

SOD için Aktivite Hesaplanması:

$$\frac{\text{Kör OD} - \text{Örnek OD}}{\text{Kör OD}} \times 20 \text{ U/ml SOD}$$

- Ksantin oksidaz iyice karıştırılmalıdır.

3.2.4. Protein Tayini

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

1. Çözelti A: 20 g Na_2CO_3 ve 4g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

2. Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3. Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir).

4. Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5. Standart protein çözeltisi: 100mL'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.

6. Standart protein eğrisini çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırası ile 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 mL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi su ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Saflaştırılan SOD Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Saflaştırılan SOD'a sıcaklığın etkisi 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40˚C'de SOD aktivitelerine bakılarak belirlenmiştir.

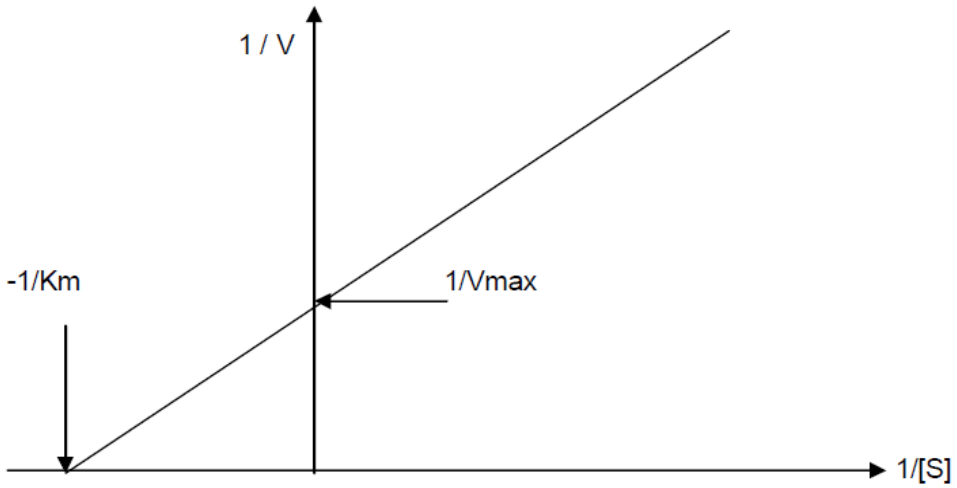
3.2.6. Saflaştırılan SOD'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Spirulina platensis'den saflaştırılan SOD için maksimum aktivitesi (V_{max}) ve Michealeis-Menten sabiti (K_m) gibi kinetik parametrelerinin hesaplanabilmesi için Lineweaver-Burk eşitliği kullanıldı. 1/[S]'ye karşı 1/V değerleri kullanılarak çizilen grafikte (Şekil 3.1.) elde edilen doğrunun denkleminden aşağıda verilen Lineweaver-Burk eşitliği elde edilmektedir.

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

(Lineweaver-Burk eşitliği)

V_{max} = Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız.
K_m = Michaelis-Menten sabiti.



Şekil 3.1. Lineweaver-Burk grafiği

Belirlenen optimum koşullarda 0,04-0,12mM ksantin derişimleri kullanılarak SOD için Michaelis-Menten sabiti(K_m), maksimum hızı(V_{max}) ve katalitik etkinliği ($kcat/K_m$)'nin hesaplanmasında Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.

3.2.7. Saflaştırılan SOD'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD'nin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta, 40˚C ve 50˚C'de 1, 3, 7 ve 15 saat bekletildikten sonra aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.8. Saflaştırılan SOD'nin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

SOD örnekleri 5˚C ve oda sıcaklığında

a) 50 mM pH 7.8 tris baz tamponunda

b) %30(v/v) ve %50(v/v) gliserol içerisinde bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve depolama süresine bağlı olarak bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Ayrıca yarı ömürleri ($t_{1/2}$) hesaplanmıştır.

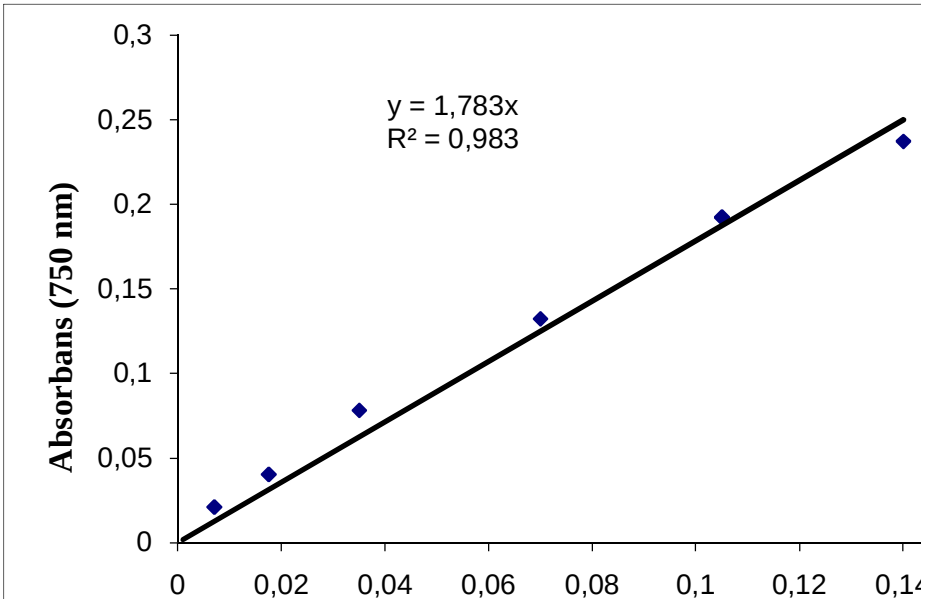
.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Protein Tayini

SOD'ın saflaştırılması basamaklarında ve spesifik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla örneklerin protein miktarları Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla sığır serum albumini kullanılarak standart protein grafiği çizilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Standart Protein Grafiği

4.1.2. Süperoksit Dismutaz'ın Saflaştırılması İle İlgili Bulgular

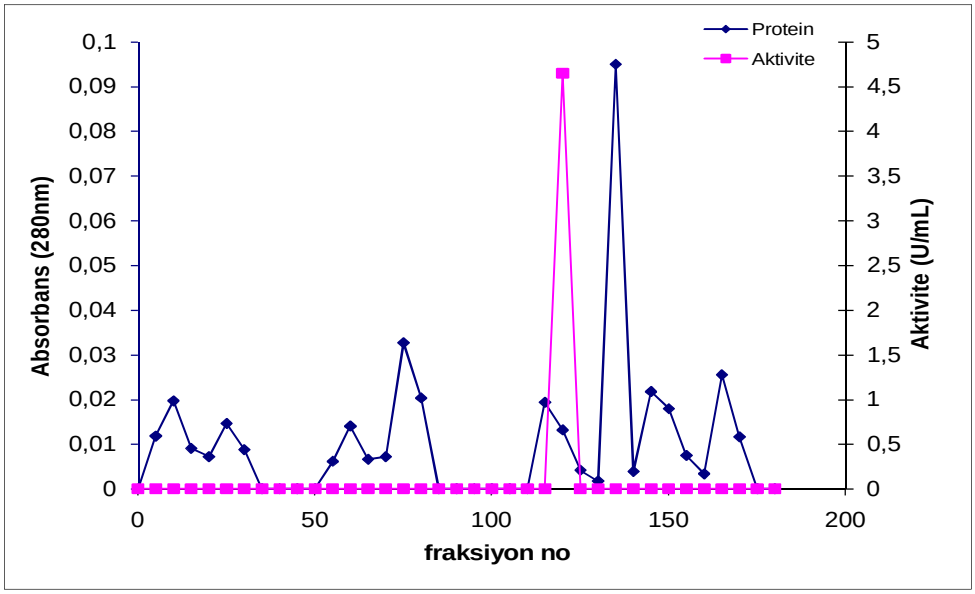
4.1.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Sonrasında Elde Edilen Bulgular

Materyal ve Metod bölümünde belirtilen şekilde hazırlanan kültür ortamında yetiştirlen *Spirulina platensis* Miracloth filtresi kullanılarak süzülmüş ve üst kısımda

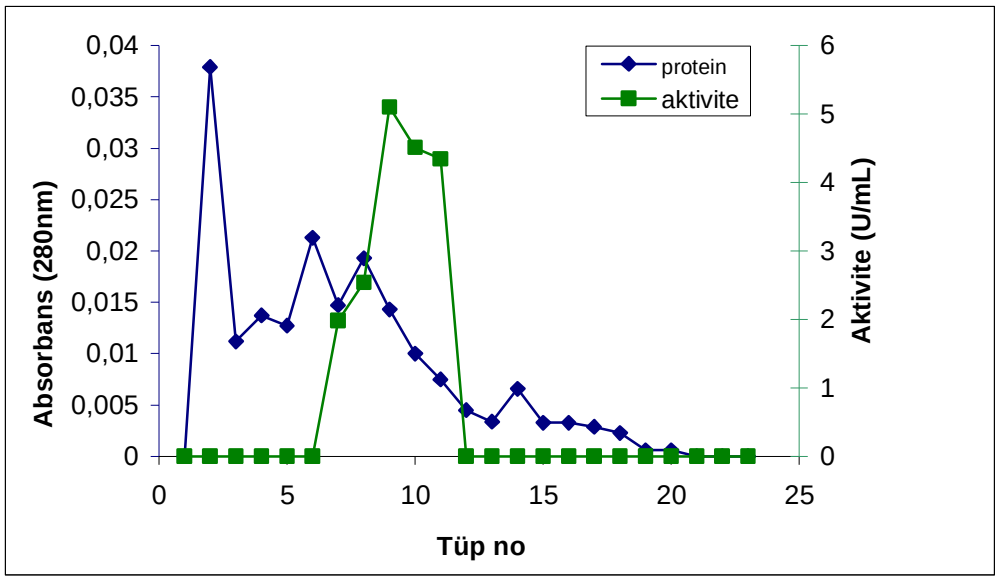
kalan hücreler ultrasonikasyon cihazı 20kHz frekansında ses dalgalarıyla 5 dakika süreyle parçalanmış ve açığa çıkan ısı artışının proteinleri denatüre etmemesi için işlem aralıklarla yapılarak homojenat sürekli soğutulmuştur. Elde edilen homojenata sırasıyla 30-40, 40-50 ve 50-60 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmış ve tüm fraksiyonlarda SOD aktivitesi ölçülerek ve amonyum sülfat çöktürmelerinde %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen süpernatantta en yüksek SOD aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen süpernatant çözeltisinden amonyum sülfatın uzaklaştırılması için pH 7,8 tris tamponuna karşı, 6 saat süreyle 1'er saat arayla +4 ºC de diyaliz yapılmış ve Sigma selüloz diyaliz kesesi kullanılmıştır.(12-14kDa molekül ağırlığındaki proteinleri geçirir) Sonrasında diyaliz kesesi içindeki süpernatantta protein miktarı 0,897 mg/mL, SOD'nin spesifik aktivite değeri de 13,65 U/mg olarak hesaplanmıştır.

4.1.2.2. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi Sonrasında Elde Edilen Bulgular

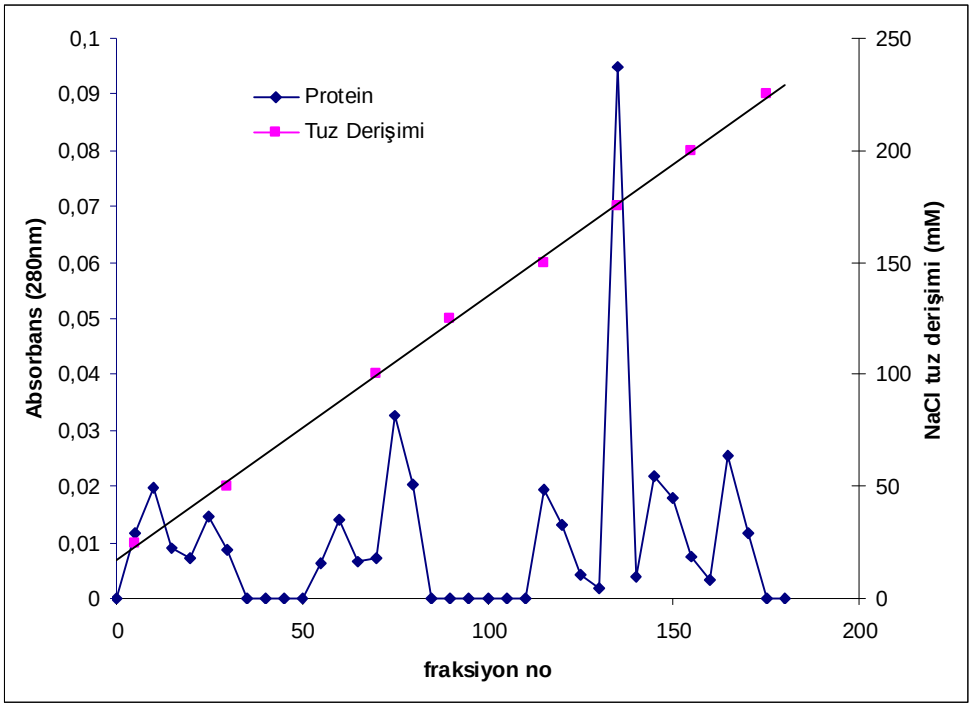
%60'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında diyaliz edilen SOD içeren süpernatant çözeltisi DEAE-selüloz kolonuna uygulanmış ve kolondan 25-225 mM arasındaki NaCI çözeltileri ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'de absorbansları ölçülerek ve protein içeren elüatlarda SOD aktivitesine bakılmıştır. 150 mM NaCI ile elüe edilen fraksiyonlarda SOD aktivitesi olduğu belirlenerek elüatların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de ölçülen SOD aktivitesi değerleri Şekil 4.2 ve 4.3 , 4,4'de verilmiştir.



Şekil 4.2. DEAE-Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de ölçülen aktivite değerleri.



Şekil 4.3. DEAE-Selüloz kolonundan 150 mM NaCI ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de ölçülen aktivite değerleri.



Şekil 4.4. DEAE-Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve NaCl tuz konsantrasyonu

DEAE-selüloz kromatoğrafisi sonucu SOD aktivitesi olduğu belirlenen fraksiyonlar bir araya toplanmış ve toplam protein ve aktivite değerleri ölçülerek spesifik aktivitesi hesaplanmıştır. Buna göre spesifik aktivite 78,81 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

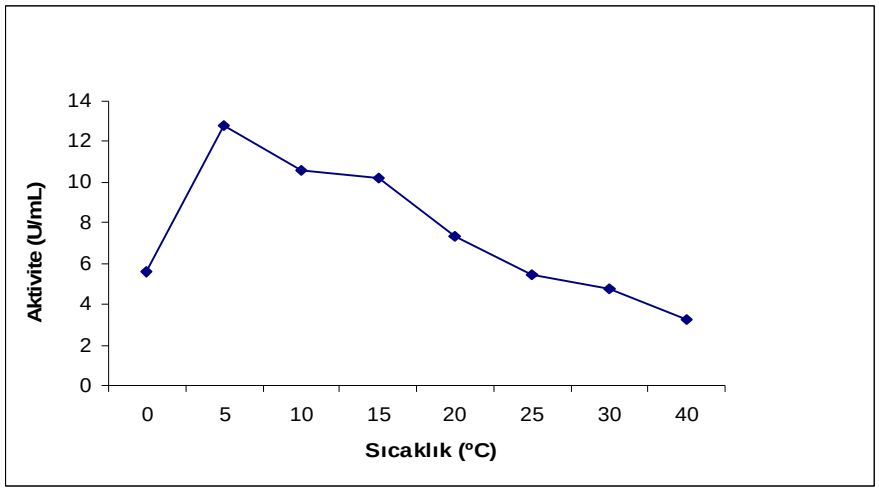
Spirulina platensis'ten saflaştırılan SOD'ın her bir saflaştırma basamağına ait bulgular Çizelge 4.1.'de özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1. SOD için saflaştırma tablosu ve her bir saflaştırma basamağına ait Parametreler

Aktivite tayin basamakları	V_T (mL)	$C_{protein}$ mg/ml	Toplam protein (mg)	Aktivite U/mL	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Toplam Aktivite (U)	Saflaştırma derecesi
Sonikasyon karışım	24 ml	18,67	448,08	4,85	0,25	165,6	1
Sentrifüj süpernatant	20ml	17,15	343	4,68	0,27	72,2	1,08
%60 süpernatant	17 ml	0,897	15,249	13,65	15,2	132,05	60,8
DEAE Selüloz Kromatoğrafisi Sonrası	29 ml	0,059	1,71	4,65	78,81	134,85	315,24

4.1.3. Saflaştırılan SOD Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

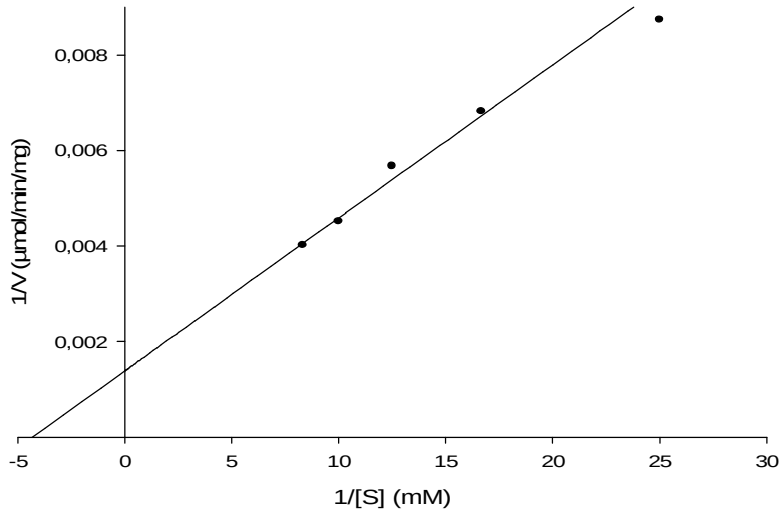
SOD enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 0-40ºC arasındaki sıcaklıklarda aktivitesi ölçülmüş ve aktivite-sıcaklık grafiği şekil 4. 5'de verilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 5 ºC olarak belirlenmiştir. Örnekler üç paralel olarak çalışılmış ve sonuçların ortalamaları kullanılmıştır.



Şekil 4.5. *Spirulina platensis'*ten saflaştırılan SOD aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.1.4. Michaelis-Menten Katsayısı (K_m) Ve Maksimum Hızın (V_{max}) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi

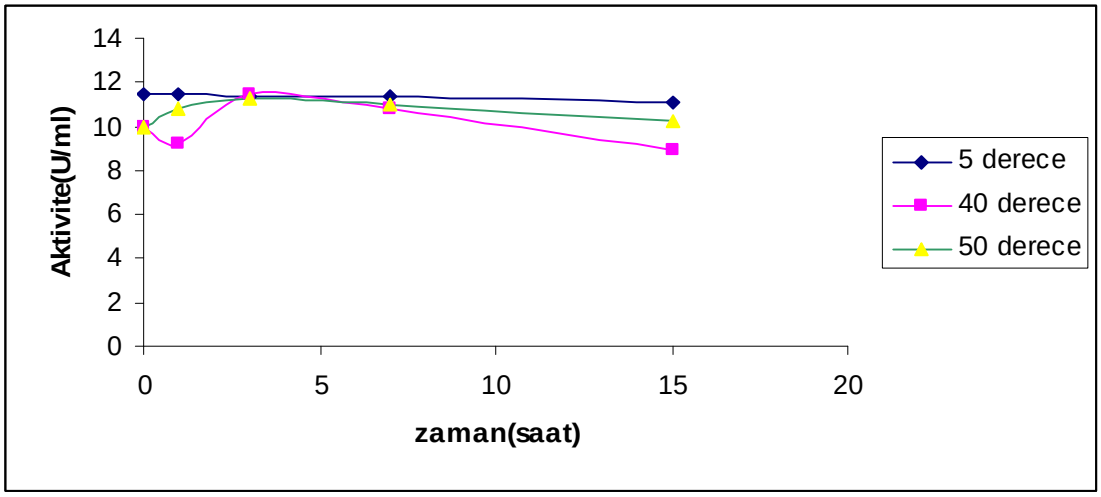
SOD enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanabilmesi için farklı substrat (ksantin) derişimlerinde aktivite değerleri ölçülmüştür ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül proğramı kullanılarak Lineweaver–Burk grafiği çizilmiştir. (Şekil 4.6) Bu proğramdan yararlanılarak hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,23mM ve 722 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. *Spirulina platensis'*ten saflaştırılan SOD için Lineweaver–Burk grafiği.

4.1.5. Saflaştırılan SOD'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD'nin 5˚C'de 40˚C ve 50˚C'de 1, 3, 7 ve 15 saat bekletildikten sonra aktiviteleri ölçüldü. 5˚C'de 15 saat sonunda başlangıç aktivitesinin %96'sını korurken, 40˚C'de ise başlangıç aktivitesinin %88,5'sını korurken 50˚C'de başlangıç aktivitesinin %100'ünü korumuştur.



Şekil 4.7. *Spirulina platensis* SOD'ın farklı zamanlarda termal kararlılığına bağlı olarak aktivitesinin değişimi.

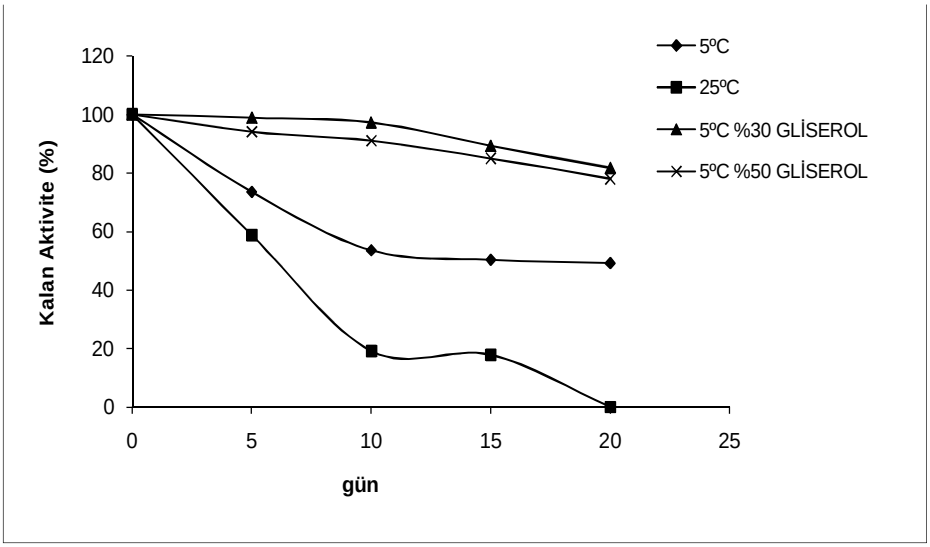
4.1.6. Saflaştırılan SOD'nin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırlan SOD örnekleri 5˚C ve oda sıcaklığında

a)50 mM pH 7,8 tris tamponunda

b)%30(v/v) ve %50(v/v) gliserol içerisinde bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve depolama süresine bağlı olarak bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. (Şekil 4.8)

Yapılan çalışmalar sonunda 50 mM tris tamponunda bekletilen SOD'ın 20 gün sonunda 5˚C başlangıç aktivitesinin sırasıyla %49'unu korurken oda sıcaklığında aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür. Aynı şekilde %30(v/v) ve %50(v/v) gliserol içerisinde bekletilen SOD'ın 5˚C 20 gün depolamanın sonrasında bile başlangıç aktivitesinin sırasıyla %81'ini ve %77'sini koruduğu belirlenmiştir..



Şekil 4.8. *Spirulina platensis* SOD'ın farklı koşullardaki depolanmasına bağlı olarak aktivitesinin değişimi

Yarılanma süreleri($t_{1/2}$) 5˚C için 15gün, 25˚C için 4,5 gün, 5˚C de %30(v/v) ve %50(v/v) gliserol için sırası ile 84,5 ve 60,2 gün olarak hesaplanmıştır.

4.2. Tartışma

Mikroalgler protein, yağ asitleri, vitaminler, mineraller, pigmentler ve daha pek çok değerli hücresel metabolitler bakımından zengin bir içeriğe sahip olmaları nedeniyle son yıllarda üzerinde en çok çalışılan organizmalardan biri durumuna gelmiştir. Ülkemizde de mikroalgal biyoteknoloji üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda artış gözlenmektedir. Bu çalışmalar kapsamında özellikle üretiminin ve hasadının kolay olması nedeniyle mavi-yeşil alglerden *Spirulina platensis* türünün üretimi popüler hale gelmiştir. Diğer canlı kaynaklarla kıyaslandığında Algler, özellikle doymamış yağ asitleri (PUFA), gamma linoleik asit (GLA), allofikosiyanin, c-fikosiyanin, miksoksantofil ve zeaksantin gibi pigmentler açısından oldukça zengindir (Borowitzka, 1992).

*Spirulina'*nın, in vivo ve in vitro deneyler sonucunda; bazı alerjileri, kanseri, karaciğer toksitisesini, viral ve kardiyo vasküler hastalıkları, hiperglisemiyi,

bağışıklık sistemi yetersizliğini ve yangılı süreçleri tedavide etkili olduğu kanıtlanmıştır(Chamarro ve ark.,2002).

Literatür araştırmasında SOD enzimini *Spirulina platensis*ten 2007 yılında Desai ve Sivakami tarafından saflaştırılıp karakterize edilmiştir, bunun dışında literatürde başka bir çalışma olmamasının belirlenmesi, çalışmamızın önemini artırmaktadır.

Bu çalışmada bir siyanobakteri olan *spirulina platensis'*te; antioksidan enzim olan SOD'un aktivitesi, depolama kararlılığı, optimum sıcaklığı, termal kararlılığı ve K_m ve V_{max} değerleri ve 5 ºC, 40 ºC ve 50ºC de yarı ömürleri hesaplanmıştır.

Enzim saflaştırma prosedüründe 21 günlük *Spirulina platensis* kültürünün 5-6 litresi kullanılmıştır. Hücreler tris tamponunda çözülerek sonikasyon işlemi ile parçalanmıştır. Elde edilen homojenat 12000 g'de 20 dakika santrifüj edilip süzüldükten sonra elde edilen 24 ml süpernatant ile yapılan çalışmalarda protein miktarı 18,67 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 0,25 U/mgprot. olarak bulunmuştur. Desai ve Sivakami (2007) ise SOD'un saflaştırılmasında 7 günlük *spirulina platensis* kültürünün 5-6 litresinden elde edilen 60 ml homojenatta protein miktarını 10 mg/ml ve spesifik aktiviteyi 6.0 U/mgprot olarak hesaplamışlardır.

*Sipurilina platensis'*ten elde edilen homojenatların sırasıyla %30-40, % 40-50 ,% 50-60 amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak SOD enziminin %60 süpernatantta en fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra süpernatant 1 saat aralıklarla 6 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızlık uzaklaştırılmıştır. Diyaliz sonrasında süpernatanta protein miktarı 0,897 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 15,2 U/mg olarak belirlenmiştir.

Spirulina platensis ile yapılan SOD enziminin saflaştırma çalışmasında DEAE-selüloz anyon değiştirici kolon kullanılmıştır. DEAE-selüloz kolonundan 25-225 mM tuz gradienti alınan protein örnekleri 3 mL hacmindeki fraksiyonlar ile halinde tüplere alınmıştır. Alınan arasında 150 mM tuz gradienti ile alınan eluatlar da SOD aktivitesi ölçülmüş ve örnekler bir araya getirilmiştir. Örneğin protein miktarı 1,71 mg, SOD enziminin spesifik aktivitesini 78,81 U/mgprot. olarak bulunmuştur. DEAE kolonunda elde edilen eluatlarda SOD enziminin spesifik aktivitesi başlangıca göre 315,24 kat artış göstermiştir. Desai ve sivakami(2007) de

SOD'u *Spirulina platensis'*ten DEAE-selüloz anyon değiştirici kolonunu kullanarak 48 kat saflaştırmışlar protein miktarını 1,05 mg, enzimin spesifik aktivitesini 290 U/mg prot. olarak bulmuşlardır. Ayrıca enzimin aminoasit içeriğinin methiyonin ve sisteinden yoksun olduğunu belirlemişlerdir.

Li Hong Y. ve ark.(2010), G-75 Sephadext kolonunu kullanarak *Panax ginseng'*ten SOD enzimini 308 kat ve % 56,96 verimle saflaştırmışlar ve protein miktarını 1,2 mg bulmuşlardır. Nedevaa ve ark.(2009), Cu/Zn SOD enzimini *Kluyveromyces marxianus* mayasından saflaştırıp karakterize etmişlerdir.Saflaştırmada termal işlem, diyaliz, iyon değiştirici kromotografi,jel filtrasyonu,amonyum sülfat çöktürmesi kullanmışlardır. Enzimi %53 verimle elde edip spesifik aktivitesini 996 U/ mg prot. olarak bulmuşlardır.

*Spirulina platensis'*ten elde edilen SOD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile 0-40ºC aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesi sırasında istenilen sıcaklıklar buz banyosu veya sıcak su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık 5ºC olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, Tarhan ve Tuzmen (2000), süperoksit dismutazı koyun eritrositlerinden izole ederken optimum sıcaklığı 30 ºC; Seatovic ve ark. (2004), Süperoksit dismutazı Sırbistan'ın termal kaplıca sularında bulunan *Thermotrix* sp.'dan saflaştırırken optimum sıcaklığı 60 ºC; Vyas ve Kumar (2005), kışın yetişen çay filizlerinden mangan içeren süperoksit dismutazı saflaştırırken optimum sıcaklığı 0 ˚C olarak tespit etmişlerdir.

Spirulina platensis ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında DEAE-selüloz kolonundan geçen eluatlar arasında, en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler biraraya toplanmış ve bu örnekler için 5˚C de tris tamponunda 5˚C de %30 ve %50 gliserol içerisinde bekletilen SOD'un 20 gün sonunda başlangıç aktivitesinin sırası ile %49'unu,%81'ini ve %77'ini korumuştur. Oda sıcaklığında ise başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Yarılanma süreleri($t_{1/2}$) 5˚C için 15gün, 25˚C için 4,5 gün, 5˚C de %30(v/v) ve %50(v/v) gliserol için sırası ile 84,5 ve 60,2 gün olarak hesaplanmıştır. Nedevaa ve ark.(2009), enzimin yarı ömrünün 70˚C de 30 dakika olarak belirlemişlerdir. Karadağ (2007) SOD enzimini insan eritrositlerinden saflaştırmış 5˚C'de, pH=6,8 fosfat tamponunda bekletilen enzimin 14 gün sonra

aktivitesini kaybettiğini, 5 °C'de % 30 gliserol, % 40 gliserol, % 50 gliserol'de bekletilen enzimin 28 gün sonra sırasıya başlangıç aktivitesinin, %78,5; % 83,8; % 79,5 koruduğunu ,–20 °C'de % 50 gliserol'de ise bekletilen enzim 28 gün sonra başlangıç aktivitesinin, 93,6'sını koruduğunu belirtmiştir.

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD enziminin . 50˚C'de 16 saat sonunda başlangıç aktivitesinin %100'ünü koruduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, Zhenfei ve ark. (1996), Cu-Zn SOD'yi bakla tohumlarından saflaştırırken, SOD enziminin 70 ˚C'ye kadar kararlı olduğunu, Tarhan ve Tuzmen (2000), süperoksit dismutazı koyun eritrositlerinden izole ederken SOD enziminin 37˚C'ye kadar termal kararlılık gösterdiğini, Sivaprakasam ve ark. (2004), Süperoksit dismutazı amonyum sülfat fraksiyonlaması, jel süzme ve iyon değişim kromatoğrafisi kullanarak guava'nın ham yeşil meyvelerinden % 47 geri kazanım ile saflaştırırıken SOD aktivitesinin 40˚C'ye kadar kararlı olduğunu bulmuşlardır. Desai ve sivakami(2007) ise Süperoksit dismutazı *spirulina* dan saflaştırdıktan sonra 50˚C'de termal kararlılığa sahip olduğunu, Li Hong Y. ve ark.(2010), *Panax ginseng*ten saflaştırdıkları SOD enziminin termal kararlılığını 70˚C olarak belirlemişlerdir.

Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Sp*irulina platensis'*ten elde edilen SOD enzimi için K_m değeri 0,23 mM; V_{max} değeri ise 722 U/mg prot. olarak elde edilmiştir. Sivaprakasam ve ark. (2004), Enzimi pH=7,8'de maksimum aktivite göstermesi için 45 dakika ışığa maruz bırakmışlardır. Tipik Michaelis-Menten kinetiği gözlemlemişlerdir. Nitrobenzen tetrazolium ve riboflavin substratları için Km değerlerini sırasıyla 15 ve 2,3 mM bulmuşlardır.

Sonuç olarak çeşitli kaynaklardan saflaştırılan SOD enzimi, %2,5-%90 arasındaki verimlerle 46-508 kat aralığında çeşitli kromotografik yöntemlerle saflaştırılmış, optimum sıcaklığı 0˚C ile 70˚C arasında hesaplanmıştır. Elde edilen saf enzimin spesifik aktivitesi 78-9500 U/mgprot. olarak ölçülmüş ve gliserol içerisinde aktivitesinin büyük bir kısmını koruduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. SOD enzimin saflaştırılmasında, 21 günlük *Spirulina platensis* kültürünün 5 litresi kullanılmıştır. *Spirulina platensis*'ten SOD'ın saflaştırılabilmesi için sırasıyla, hücrelerin sonikasyonu, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Selüloz anyon değiştirici kromatoğrafisi işlem basamakları uygulanmış ve sonuç olarak SOD % 81 verimle 315 kat saflaştırılmıştır.
2. DEAE selüloz kromatoğrafisi ile SOD'ın saflaştırılması işleminde kolona 25-225mM NaCl gradienti uygulanmış ve enzim 150 mM NaCI ile elüe edilerek, bir araya getirilen fraksiyonlar için ölçülen SOD spesifik aktivitesi yaklaşık 79 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.
3. Saflaştırılan SOD'ın aktivitesinin sıcaklıkla değişimi incelenmiş ve makimum aktivite gösterdiği sıcaklık 5°C olarak belirlenmiştir.
4. *Spirulina platensis*'ten saflaştırılan SOD için Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,23 mM ve 722 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.
5. *Spirulina platensis* SOD'ı 5°C'de 15 saat sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %96'sını korurken, 40°C'de ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık %89'unu, 50°C'de ise tamamını korumuştur.
6. *Spirulina platensis* SOD'ı 5°C'de, 50 mM tris baz tamponunda (pH 7,8) ve %30(v/v) ve %50(v/v) gliserol içerisinde 20 gün depolama süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitelerinin yaklaşık %50 ve 77'sini korumuştur. Oda sıcaklığında ise 20 gün depolama süresi sonunda aktivetisinin tamamını kaybetmiştir. Yarılanma süreleri($t_{1/2}$) 5˚C için 15 gün, 25˚C için 4,5 gün, 5˚C de %30(v/v) ve %50(v/v) gliserol için sırası ile 84,5 ve 60,2 gün olarak hesaplanmıştır.

5.2. Öneriler

1. Enzim saflaştırılmasında farklı yöntemler saflaştırma basamaklarına eklenerek denemeler ve kıyaslamalar yapılabilir.
2. Enzimin molekül ağırlığı ve alt ünitelerinin olup olmadığı SDS-PAGE ile belirlenebilir.
3. Saflaştırılan SOD'ın farklı yöntemler kullanarak immobilizasyonu üzerinde çalışmalar yapılabilir.
4.*Spirulina platensis*'in ihtiva ettiği diğer antioksidan enzimler araştırılıp, saflaştırma çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

AKKUŞ, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38(5) : 1-123.

AYDEMİR T., TARHAN L., 2001. Purification And Partial Characterisation Of Superoxide Dismutase From Chicken Erythrocytes. Turkish Journal Of Chemistry, 25: 451-459.

BOROWİTZKA, M:A., 1992. Vitamins and fine chemicals from micro-algae, In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J.(Eds), Micro-Algal Biotechnology, Cambridge University Pres, UK, 158-195 p.

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

CHAMARRO, G.,SALAZOR, M. ARAUJO, K.G., 2002 Update Pharmacology of s*pirulinia*, an unconventional food. Arch Latinoam Nutr., 52 (3):232-40

CROSS, C.E., HALLIWEL, B., BORISH, E.T., 1987. Ann İntern Med. 107: 526-545.

DESAİ, K., SİVAKAMİ,S.,2007 Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the *cyanobacterium*, *Spirulina platensis*. World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1661–1666

DÜNDAR, Y., ASLAN, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29 : 95-101

FRIDOVICH, I., 1973. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase, Biochem. Soc. Trans., 1: 48

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.M.C., 1984. Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage And Antioxidant Therapy. Lancet 23: 1396-1397.

HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J. M., 1990. Methods Enzymology, 186:1-85.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.M.C., CROSS C.E.,1992. Free Radicals,Antioxidants And Human Disease: Where Are We Now? J Lab Clin Med 119: 598-620.

HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVI, B., WILLIAMSON, G., 1997. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. Biochem. Soc. Trans., 25, S559.

IHENA, M., FERMENT, J., Technol. 65 (1987) 267–275.

JOHNSTONE, A., THORPE, R., 1982. Immunochemistry In Practice, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 9-16.

JORNOT, L., PETERSEN, H., JUNOD, A.F., 1998. Biochem J, 335: 85-94.

KARADAĞ, H., 2007 Süperoksit Dismutaz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi.

KUMAGAI Y., SHINYASHIKI M., SUN G.F., SHIMOJO N., SAGAI M., 1994. An Efficient Method For Purification Of Cuprozinc Superoxide-Dismutase From Bovine Erythrocytes. Experientia 50 (7): 673-676.

KORU, E., CİRİK, S., 2002. Biochemical Composition of *Spirulina* Biomass In Open-Air System, 1st.International Congress on the Chemistry of Natural Products 16-19 October, ICNP 2002, Trabzon.

LAVELLE, F., MICHELSON, A., DIMITRIJEVIC, L., 1973. Biological Protection by Superoxide Dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 55,350

LI, H.Y, Yu, Z., CAO Y.,. WANG W. N 2010

Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase from ***Panax ginseng*** (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.1428

LIE, M., JIA, L., KEWU, L.,YAN J., WEN, L.X., XIN, L., 2004. Isolation, Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase From Royal Jelly Of The Italian Worker Bee, Apis Mellifera. Acta Entomologica Sinica 47(2): 171-177.

LOWRY O.H, ROSEBROUGH N.J, FARR A.L., RONDALL, R.J., 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 261-275.

LUNEC J., 1990. Free radicals: their involvement in disease processes. Ann Clin Biochem, 27: 173-182.

MEENAKSHİ, C., 2006. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5 Ecotoxicology and Environmental Safety Volume 66, Issue 2, Pages 204-209

MILLS ,E.M., TAKEDA, K., YU, Z.X., 1998. Biol Chem, 273: 22165-8.

NEDEVAA, R., MOSHTANSKAB, V., VOELTERC, W., KUJUMDZİEVA, A., 2009. Purification and partial characterization of Cu/Zn superoxide dismutase from *Kluyveromyces marxianus* yeast. Journal of Chromatography B Volume 877, Issue 29, Pages 3529-3536

OSATOMI, K., MASUDA, Y., HARA, K., ISHIHARA, T., 2001. Purification, NTerminal Amino Acid Sequence And Some Properties Of Cu, Zn-Superoxide Dismutase From Japanese Flounder (*Paralichthys Olivaceus*) Hepato-Pancreas. Comparative Biochemistry And Physiology Part B, 128: 751-760.

ÖZTÜRK ÜREK, R., TARHAN L., 2001. Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase From Chicken Liver. Comparative Biochemistry And Physiology Part B 128: 205-212.

PETKAU, A., CHELACK, W., PLESKACH, S., MEEKER, B., BRADY, C., 1975. Radioprotection of Mice by Superoxide Dismutase. Biochem Biophys. Res. Commun. 65, 886

PETERSON E. A., SOBER H. A., 1956. Chromatography Of Proteins. I. Cellulose Ion-Exchange Adsorbents. J. Amer. Chem. Soc. 78: 751-755.

PHARMACIA FINE CHEMICALS AB,1980. Ion Exchange Chromatography: Principles And Methods, Rahmsi Lund, Sweden, pp 4-8.

SEATOVIC S., GLIGIC L., RADULOVIC Z., JANKOV R.M., 2004. Purification And Partial Characterization Of Superoxide Dismutase From The Thermophilic Bacteria *Thermothrix sp*. J.Serb.Chem.Soc. 69(1): 9-16.

SHIRKEY, B., KOVARCİK, DP., WRIGT, DJ., WILMONTH, G., (2000) Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant SodF mRNA in Nostoc Commune(cyanobacteria) after years of desiccation. J Bacteriol 182:189–197

SIVAPRAKASAM, G., SINGH, D., DHILLON, S., MALHOTRA, S.P.,

SHENG, L., ZHENG, X., TONG, H., LIU, S., DU, J., LIU, Q., 2004. Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves. Plant Science, 167 (6): 1235-1241.

STEPANIK, T.M., EWING,D.D., 1990. Coisolation Of Glutathione Peroxidase, Catalase And Superoxide Dismutase From Human Erythrocytes. Journal Of Biochemicial And Biophysicial Methods, 20(2): 157-169.

SUN Y., OBERLEY L.W., LI Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin. Chem., 34: 497-500.

TARHAN L., TUZMEN M.N., 2000. Some Properties Of Cu, Zn-Superoxide Dismutase From Sheep Erythrocyte. Turkish Journal Of Chemistry 24 (2): 109-116.

TELEFONCU, A., 1996. Protein Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Ege Üniversitesi, İzmir, 272s.

VYAS, D., KUMAR S., 2005. Purification And Partial Characterization Of A Low Temperature Responsive Mn-SOD From Tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze). Biochemical And Biophysical Research Communications, 329: 831–838.

ZHENFEI, G., YUN, L.S., MINGQI, L., 1996. Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase From Broad Bean Seeds. Journal of Tropical and Subtropical Botany 4(3): 60-64.

ZUNSHENG, W., ZHUOJING, H., SUXIA, L., QINSHENG, Y., 2005. Purification And Partial Characterization Of Cu, Zn Containing Superoxide Dismutase From Entomogenous Fungal Species *Cordyceps Militaris.* Enzyme And Microbial Technology 36: 862-869.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 1991 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde eğitimine başladı. 1997 yılında mezun olduktan sonra 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.