

**\*SUPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİMİNİN NARDAN(*PUNİCA GRANATUM L.*)  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Purification Of Superoxide Dismutase From *Punica granatum L.* And Its  
Characterization

Çağlar ÖZDEMİR  
Kimya Anabilim Dalı

Ramazan BİLGİN  
Kimya Anabilim Dalı

**ÖZET**

Bu çalışmada, *Punica granatum*'dan Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırılmasında, homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kolon kromatografisi basamakları uygulanmıştır.

Santrifüj sonrası süperoksit dismutaz enziminin spesifik aktivite değeri 10U/mg protein olarak bulunurken DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırmanın son basamağında 166 U/mg protein değerine ulaşarak 16.60 kat artış göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Punica granatum* , Süperoksit Dismutaz, Saflaştırma

**ABSTRACT**

In this study, superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) was purified from *Punica granatum* . For this purpose *Punica granatum* homogenized, centrifugation step, fractioned with ammonium sulphate precipitation and applied on DEAE chromatography separation was applied *Punica granatum* was purified 16.60 fold in *Punica granatum* samples and specific activity of enzyme in *Punica granatum* was found as 166 U/mg respectively.

**Key Words:** *Punica granatum*, Superoxide Dismutase, Purification

**Giriş**

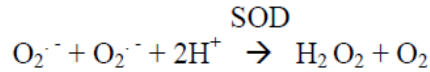
Enzimler reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin büyük bir çoğunluğu protein yapısında olmasına rağmen bazı RNA moleküllerinin enzimler gibi biyokimyasal reaksiyonları katalizledikleri bilinmektedir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur

---

\* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

ve bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple yaşam birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret olan bir sistem olarak tanımlanmıştır. Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna – az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) süperoksit anyon radikallerinin dismutasyonunu moleküler oksijen ve hidrojen peroksit katalize eden, molekül ağırlığı 17-85 k DA 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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).



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 disülfid 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<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başlar.

**(b)** Mangan içeren dismutazlar (Mn SOD) prokaryotlarda 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.

Nar (*Punica granatum*) belgelere göre İsa'dan 2500 yıl önce, Finike ve Mısırlılarca tanınan, kullanılan ve kültürü yapılan bir bitkidir. Lythraceae familyasından olan içinde küçük çekirdekler ve meyve gövdesini oluşturan yüzlerce tanecikten oluşmuş, hafif ekşi ve bazen tatlı tadı olan, ılıman iklimlerde yetişen bir meyve türüdür. Linne tarafından *Punica granatum* L. olarak isimlendirilmiştir. İngilizcede Pomegranate, Almancada Granatbaum, Fransızcada Grenadier, Arapçada Gulnar, Türkçe'de ise Nar Ağacı olarak adlandırılır. Ülkemizde de Güney Doğu Anadolu Bölgesinden, Doğu Karadeniz Bölgesine kadar çok soğuk yöreler

dışında her bölgede nar yetişebilmektedir. Narın yetişmesi için yer seçimi de çok önemli bir konu değildir. Deniz yüzeyinden çok yüksek yerlerde de 800-900 m de yetiştiği görülmüştür. Ekonomik ömrü 25-30 yıl olan bu bitkiden aynı kökten 100 yılı aşkın bir süre yararlanılabilir (Manav,1988).

## **Materyal ve Metot**

### **Materyal**

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma, St. Louis, MO, Merck firmaları tarafından sağlanmıştır. Araştırmada enzim kaynağı olarak kullanılan Nar (*Punica granatum*) örnekleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden sağlanmıştır

Kimyasallar; Sığır serum albümin (BSA), amonyum sülfat, hidrojen peroksit, sodyum klorür, bakır sülfat, DEAE-selüloz, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, folin-ciocalteu çözültisi, sodyum sitrat, Tris HCl, Polyvinilpyrrolodine, sodyum fosfat

Araç ve gereçler; UV-Vis Spektrofotometre (UNICAM), pH Metre (Hanna 8417), Magnetik Karıştırıcı (Are), Kromatografi Kolonları, Santrifüj (Jouan MR 23i) Kriyostat (Poly Science), Otomatik Pipet (Eppendorf), Elektrikli Terazi (Sartorius

### **Metot**

Homojenat hazırlanmasında 10 g nar taneleri, 10 g nar kabuğu ve 10 g nar taneleri ve zar homojenatları ayrı ayrı öğütüldükten sonra % 0,5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7,0 olan 25 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda homojenize edilmiştir. En yüksek aktivite nar taneleri homojenatında elde edilmiştir. Bundan sonraki en yüksek aktivite nar tanelerinde görüldüğü için tüm çalışmalar nar tanelerinde yapılmıştır. Soğutmalı santrifüjde 12.000xg'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant çökelektan ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. (Havir ve McHale 1987).

Narda (*Punica granatum*) bulunan SOD enziminin homojenatları sırasıyla %0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır.

%20'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucu SOD aktivitesi görülen süpernatant diyaliz edildikten sonra elde DEAE-Selüloz kolonundan (0.82cmx25cm) geçirilmiştir.

Saflaştırılan SOD'a sıcaklığın etkisi 5, 10, 15, 20, 25 °C'de SOD aktivitelerine bakılarak belirlenmiştir.

SOD örnekleri 5°C ve oda sıcaklığında 50mM pH 7.8 tris baz tamponunda depolanma kararlılığının belirlenmesi amacıyla, aynı enzim homojenatı kullanılmak üzere 1, 3, 7 ve 14. gün boyunca aktivite değerleri gözlemlenmiştir.

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD'nin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta, 40°C ve 50°C'de 1, 3, 5, 8 ve 16 saat bekletildikten sonra aktiviteleri ölçülmüştür.

Belirlenen optimum koşullarda 0,01-0,12mM ksantin derişimleri kullanılarak SOD için Michaelis-Menten sabiti (Km), maksimum hızı (Vmax) ve katalitik etkinliği (kcat/Km)'nin hesaplanmasında Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.

### Araştırma Bulguları

10 g nar, öğütüldükten sonra % 0.5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7 olan 25 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda homojenize edilmiştir.

Kaba homojenat tüplere alınarak 12.000g'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Santrifuj sonrasında elde edilen çökelti ve supernatantlar toplanarak bir araya getirilmiştir.

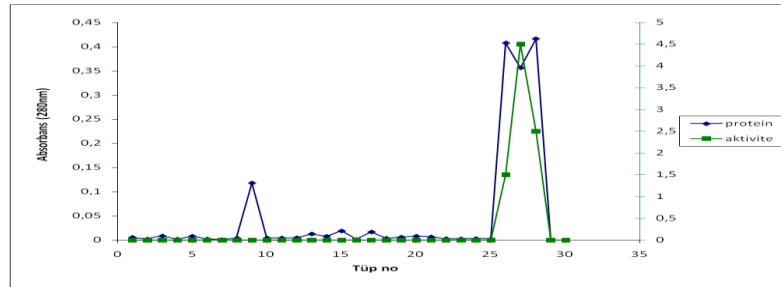
Çökeltide aktivite saptanamamıştır. Üst fazdaki protein miktarı 0,69 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 10 U/mg olarak bulunmuştur.

Narda( *Punica granatum*) bulunan SOD enziminin homojenatları sırasıyla 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 50-60 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme 12.000xg'de 20 dakika boyunca yapılmıştır.

Yapılan çöktürme işleminde maksimum çözeltiye %20'lik (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'da rastlanmıştır. Elde edilen süpernatant çözeltisinden amonyum sülfatın uzaklaştırılması için diyaliz yapıldı ve diyaliz sonrasında protein miktarı 0,217 mg/mL, SOD'nin spesifik aktivite değeri de 6.50 U/mg olarak hesaplanmıştır

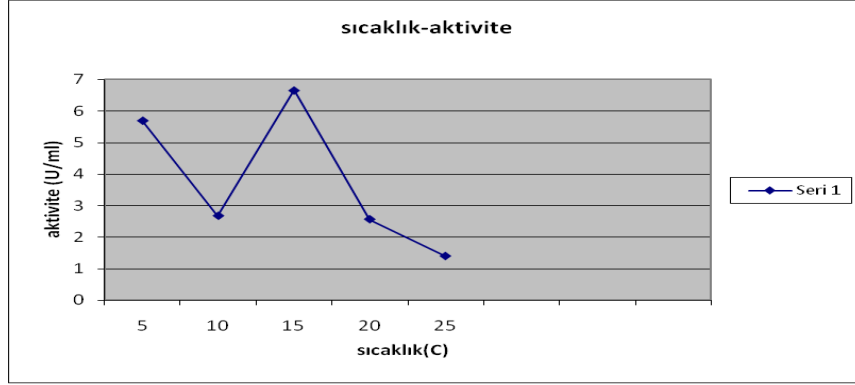
% 20'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında diyaliz edilen SOD içeren süpernatant çözeltisi DEAE-selüloz kolonuna uygulandı. 25-450 mM arasındaki NaCl çözeltileri ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'de absorbanları ölçüldü ve protein içeren elüatlarda SOD aktivitesine bakıldı. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu SOD aktivitesi olduğu belirlenen fraksiyonlar bir araya toplanmış ve toplam protein ve aktivite değerleri ölçülerek spesifik aktivitesi hesaplanmıştır. Buna göre spesifik aktivite 166 U/mg protein olarak belirlendi.

Çalışma sonucu elde edilen veriler şekil 1'de grafiksel olarak verilmiştir



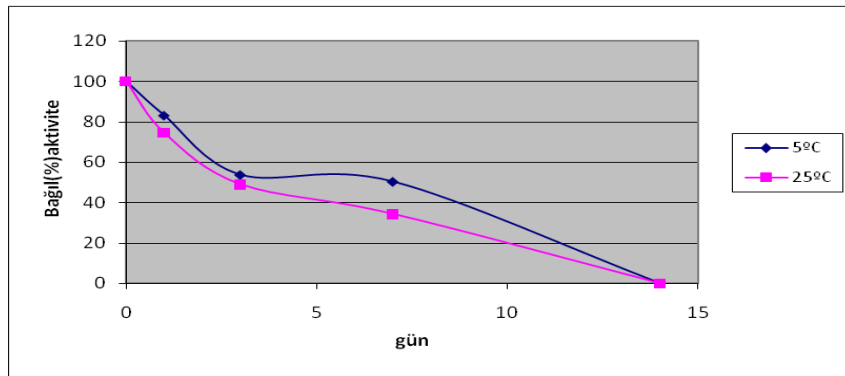
şekil 1. DEAE-Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm'deki absorbanları ve 560 nm'de ölçülen aktivite değerleri

SOD enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 5-25 °C arasındaki sıcaklıklarda çalışılmış ve sonuçlar Şekil 2’de verilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 15 °C olarak belirlenmiştir.



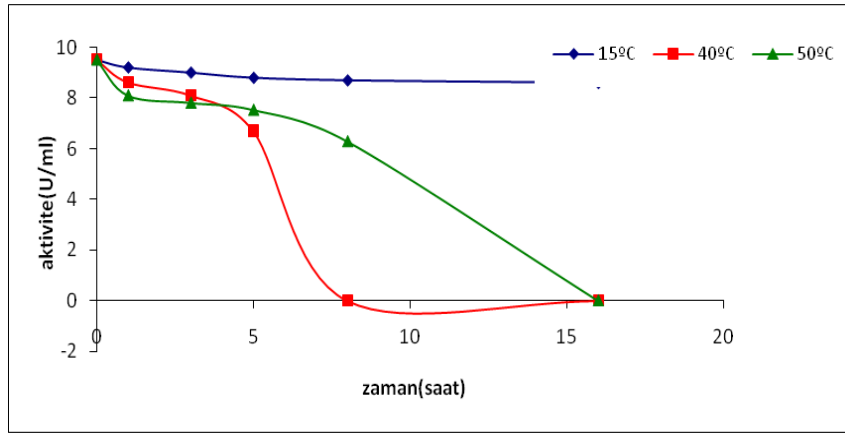
Şekil 2. *Punica granatum*'dan saflaştırılan SOD aktivitesine sıcaklığın etkisi

Nar ile yapılan SOD enzimi aktivite tayini çalışmalarında enzimin kararlılığını belirleyebilmek için DEAE kolonu sonrası en yüksek aktiviteyi gösteren örneklerden yararlanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda 50 mM tris baz tamponunda bekletilen SOD'ın 14 gün sonunda 5°C ve 25°C'de başlangıç aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür



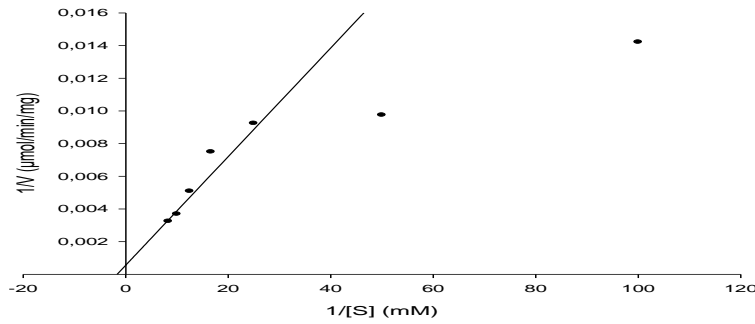
Şekil 3. Depolama kararlılığı

Safılaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD'nin 15°C'de 40°C ve 50°C'de 1, 3, 5,8 ve 16 saat beletildikten sonra aktiviteleli ölçüldü. 15°C'de 16 saat sonunda başlangıç aktivitesinin %90'sını korurken, 40°C'de ve 50°C'de ise başlangıç aktivitesinin %100'ünü kaybetmiştir.



Şekil 4. Termal kararlılık grafiği

SOD enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanabilmesi için farklı substrat (ksantin) derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri ölçülmüştür ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver–Burk grafiği çizilmiştir. Bu programdan yararlanılarak hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.6 mM ve 1803.6 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5. *Punica granatum*'dan safılaştırılan SOD için Lineweaver–Burk grafiği.

Narda( *Punica granatum*)'dan saflaştırılan SOD'ın her bir saflaştırma basamağına ait bulgular Çizelge 1.'de özet olarak verilmiştir.

Çizelge1.SOD için saflaştırma tablosu ve her bir saflaştırma basamağına ait parametreler

Aktivite tayin basamakları	V <sub>T</sub> ml	C <sub>prot</sub> ein mg/ml	Toplam protein(mg)	Aktivite U/ml	Spesifik aktivite	A <sub>T</sub> U	Saflaştırma derecesi
İLK KARIŞIM	18	0,69	12,42	6,90	10	124,2	1
%20 SÜPERNATANT	15	0,437	6,55	6	13,73	90	0,55
%20 ÇÖKELEK	3,25	1,01	3,28	2,20	2,17	7,15	----- ----
%20 DİYALİZ	15	0,217	3,25	6,50	29,9	97,5	1,89
DEAE-SELÜLOZ	10	0,027	0,27	4,50	166	45	16,6

### Tartışma

10 g nar (*Punica granatum*), öğütüldükten sonra %0,5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7,0 olan 25 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda homojenize edilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 12.000xg'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant ile yapılan çalışmalarda protein miktarı 0,69 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 10 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Malgorzata ve ark. (2005) tarafından yapılan araştırmada, soya fasulyesi kök ve dallarında SOD enziminin aktivite gösterdiğini saptanmıştır. Yapılan çalışmada köklerdeki SOD spesifik aktivitesini 10-15 U/mg prot., dallarında ise 15-20 U/mg prot. aralıklarında tayin etmişlerdir.

Yurdanur (2007) keten tohumundan SOD enziminin saflaştırırken ultrasantrifüj sonucu elde edilen süpernatantta enzimin spesifik aktivitesini 2,05 U/mg olarak hesaplamıştır.

Elde edilen homojenatların sırasıyla %0-10 , %10-20, %20-30 ,%30-40, %40-50 ,% 50-60 amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak SOD enziminin en yüksek aktivitesi % 20 süpernatantta gözlemlenmiştir . Daha sonra enzim homojenatı 1 saat aralıklarla 6 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızlık uzaklaştırılmıştır. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi sonunda yapılan çalışmalarda protein miktarı 0,437 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 13,73 U/mg olarak belirlenmiştir.

Wang Zhuanhua ve ark.(1974) Tataristan kara buğdayından SOD enzimini saflaştırırken %40 ve %90'lık  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi sonrası protein miktarları ve spesifik aktiviteleri sırasıyla 600 mg, 24.7U/mg prot.ve 120mg, 65.9U/mgprot.olarak bulmuşlardır.

Nar (*punica granatum*) ile yaptığımız SOD enzimi saflaştırma çalışmasında DEAE-selüloz kolonu kullanılmıştır. DEAE-selüloz kolonundan alınan protein örnekleri 2 mL hacmindeki fraksiyonlar halinde 30 tüpe alınmıştır. Alınan eluatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren 25, 26, 27, 28, 29, 30 nolu örnekler bir araya toplanmış ve bu karışımda protein miktarı, SOD enziminin spesifik aktivitesi ölçülmüştür. Örneğin protein miktarı 0,027 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 166 U/mg olarak bulunmuştur. DEAE kolonunda elde edilen eluatlarda SOD enziminin spesifik aktivitesi başlangıca göre 16,60 kat artış göstermiştir.

Literatürde yapılan araştırmalarda nardan SOD enzimi saflaştırmasına ait daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sonuçlarımızı literatür bulguları ile karşılaştırmamız mümkün olmamıştır.

İmen Hadji ve ark (2007) sarımsaktan Cu,Zn SOD enzimini saflaştırma çalışmalarında, kolondan alınan elüatlardan enzimin spesifik aktivitesini başlangıca göre 82 kat saflaştırarak 4,96 U/mg prot. olarak hesaplamışlardır.

Yurdanur (2007) kolon kromatografisi ile yaptığı çalışmada kolondan alınan elüatlardan enzimin spesifik aktivitesini 4,90 U/mg prot. olarak hesaplamıştır.

Nardan (*punica granatum*) elde edilen SOD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile 5-25°C aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Çalışmamızın bu aşamasında diyaliz sonrası elde edilen en ideal substrat konsantrasyonu kullanılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesi sırasında istenilen sıcaklıklar buz banyosu veya sıcak su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık 15 °C olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç; Vyas ve Kumar (2005), kışın yetişen çay filizlerinden mangan içeren süperoksit dismutazi saflaştırırken optimum sıcaklığı 0 °C olarak bulmuşlardır.

Nar (*punica granatum*) ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında DEAE-selüloz kolonundan geçen eluatlar arasında, en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler bir araya toplanmış ve bu örnekler için 25°C'de yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucu SOD enzim aktivitesinde 1 gün sonunda % 16,10' luk, 3.günün sonunda %46,30'lük, 7.günün sonunda % 49,70'lik aktivite kaybına rastlanmıştır. 14.günün sonunda ise SOD enziminin aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu da Narda bulunan süperoksit dismutaz enziminin depolama kararlılığının yüksek olduğunu göstermiştir.

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD enziminin . 15°C'de 16 saat sonunda başlangıç aktivitesinin % 90'ını koruduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, Zhenfei ve ark. (1996), Cu-Zn SOD'u bakla tohumlarından saflaştırırken, SOD enziminin 70 °C'ye kadar kararlı olduğunu, Sivaprakasam ve ark. (2004), Süperoksit dismutazi amonyum sülfat fraksiyonlaması, jel süzme ve iyon değişim kromatografisi kullanarak guava'nın ham yeşil meyvelerinden % 47



geri kazanım ile saflaştırırken SOD aktivitesinin 40°C'ye kadar kararlı olduğunu bulmuşlardır.

Linewear-Burk grafikleri çizilerek Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Nardan elde edilen SOD enzimleri için Km değeri 0.6 mM; Vmax değeri ise 1803.6 U/mg prot. olarak elde edilmiştir.

### **Kaynaklar**

- BİNGÖL, G., 1983. Biyokimya. Güven matbaası, 169-174, Ankara.
- BOZDEMİR, Y. ,2007. Keten Tohumu (*Linum Usitatissimum*) Ekstraktında Katalaz Ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri
- FRIDOVICH, I., 1973. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase, Biochem.Soc. Trans., 1: 48
- HADJI,İ. ,MARZOUKI, M.N. ,FERRARO,D. ,FASANO,E. ,MAJDOUP,H. PANİ,G. ,LİMAM,F. , 2007 Purification and Characterization From Garlic (*Allium sativum* L.) Antioxidant Effect On Tumoral Cell Lines 143(2):129-41
- HAVIR,E. A., MCHALE, N. A., 1987. Plant Physiol,84:450-455
- HAVIR, E. A., MCHALE, N. A., 1987. Purification and Characterization of an isozyme Catalase with Enhanced-Peroxidatic Activity from Leaves of *Nicotiana glauca*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 283:491-495
- KEHA, E.E.,1997. KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., Biyokimya, muhtelif kısımlar. Şafakyayınevi; 36; Erzurum
- LEHNINGER, A. L.,1982. Principles of biochemistry. Worth publisher, Academic press; 587-665; New York
- LAVELLE, F., MICHELSON, A., DIMITRIJEVIC, L., 1973. Biological Protection by Superoxide Dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 55,350
- MALGORZATA, M. , CHRISTOPH, B., KATARYZYNA, S., KRYSZYNA, M.,2005. Antioxidant Enzymes and Isoflavonoids in Chilled Soybean. Journal of Plant Physiology, 162(4): 403-412
- MANAV, S.1988 Nar (*Punica Granatum l.*)Meyve Kabuklarını Eczacılıkta Değerlendirme Açısından Türkiye'de Yetişen Doğal ve Kültür Nar Çeşitlerinin Karşılaştırılması)
- PETKAU, A., CHELACK, W., PLESKACH, S., MEEKER, B., BRADY, C., 1975. Radioprotection of Mice by Superoxide Dismutase. Biochem Biophys. Res. Commun. 65, 886
- 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.
- SIVAPRAKASAM, G., SINGH, D., DHILLON, S., MALHOTRA, S.P.,AHLAWAT, T.R., SINGH, R., 2004. Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase From Guava (*Psidium Guajava* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants, 10(1): 59-64.

- 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.
- WANG ZHUANHUA, LIN RUFA, ZHANG ZHENG, ZHOU MINGDE , 1974. Purification and characterization of superoxide dismutase from tartary buckwheat leaves *Fagopyrum* 13: 31 - 34
- 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