

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAKARYA BÖLGESİNDE YETİŞEN DEVE DİKENİ
(*Silybum marianum*) BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Halil İbrahim TURGUT

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur Arabacı

Eylül 2009

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

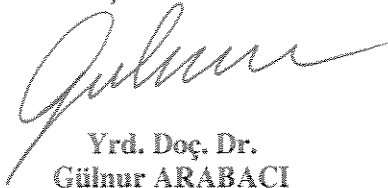
**SAKARYA BÖLGESİNDE YETİŞEN DEVE DİKENİ
(*Silybum marianum*) BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

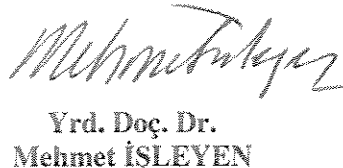
YÜKSEK LİSANS TEZİ


Kimyager Halil İbrahim TURGUT

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 16 / 09 /2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirligi ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr.
Gülnur ARABACI
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr.
Mehmet İŞLEYEN
Üye


Yrd. Doç. Dr.
Esra ALTINTIĞ
Üye

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince her türlü konuda bana destek olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım tüm öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine göstermiş oldukları ilgilerinden dolayı teşekkür ederim. Tezimin deneysel çalışmalarına büyük katkısı olan doktora öğrencisi Ayşe USLUOĞLU'na, teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve hep destekçim olan aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Bu yüksek lisans tezi Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ÖZET.....	xvii
SUMMARY.....	xviii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	8
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER.....	15
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	15
2.1.1. Enzimlere etki eden faktörler.....	18
2.1.1.1. Sıcaklık.....	19
2.1.1.2. pH.....	19
2.1.1.3. Enzim konsantrasyonu.....	20
2.1.1.4. Zaman.....	21
2.1.1.5. Substrat konsantrasyonu.....	21
2.1.1.6. Ürün konsantrasyonu.....	22
2.1.1.7. Çeşitli iyonlar.....	22
2.1.1.8. Fiziksel faktörler.....	22
2.1.1.9. İnhibitör.....	22
2.1.2. Enzim kinetiği.....	22

2.1.3. Enzim inhibisyonu.....	25
2.1.3.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif).....	25
2.1.3.2. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif).....	27
2.1.3.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (Ankompetitif).....	28
2.1.4. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları.....	29
2.2. Peroksidaz Enzimi.....	30
2.2.1. Peroksidaz enziminin uygulamaları.....	35
2.3. Deve Dikeni.....	37
2.3.1. Tarihçesi.....	38
2.3.2. Morfolojik özellikleri.....	38
2.3.3. Kimyasal özellikleri.....	38
2.3.4. Tıbbi etkileri.....	39

BÖLÜM 3.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	41
3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler.....	41
3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu.....	41
3.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	42
3.2.2. Jel filtrasyon kromatografisi.....	43
3.3. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu.....	43
3.3.1. Substrat spesifikliğı.....	44
3.3.2. Optimum substrat konsantrasyonu.....	44
3.3.3. pH etkisi	44
3.3.4. Sıcaklığın etkisi	45
3.3.5. Enzim kinetiğı.....	46
3.3.6. İnhibitör etkisi.....	46
3.3.7. Metallerin etkisi.....	47
3.3.8. Enzim depolanma kararlılığı.....	47
3.3.9. Kolon çalışması.....	47
3.3.10. Bradford metodu.....	48
3.3.10.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini.....	48

BÖLÜM 4.

DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR.....	50
4.1. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	50
4.2. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu.....	50
4.2.1. pH etkisi	50
4.2.2. Sıcaklığın etkisi.....	59
4.2.3. Enzim kinetiği	67
4.2.4. İnhibitörlerin etkisi.....	84
4.2.5. Metallerin etkisi.....	99
4.2.6. Enzim depolanma kararlılığı.....	100
4.2.7. Kolon çalışması.....	101
4.2.8. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini.....	102

BÖLÜM 5.

SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	103
KAYNAKLAR.....	108
ÖZGEÇMİŞ.....	114

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

POD	: Peroksidaz
mPOD	: Membran bağımlı peroksidaz
PVP	: Polivinil Piroldon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
NADPH	: Nikotinamid dinükleotid hidrojen fosfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
GSH	: Glutasyon
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
E.C.	: Enzim komisyonu
HRP	: Bayırturpu peroksidazı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve aktif oksijenin oluşturduğu hasara karşılık savunma mekanizması.....	6
Şekil 2.1.	Optimum sıcaklık	20
Şekil 2.2.	Optimum pH.....	21
Şekil 2.3.	Enzim Konsantrasyonu	21
Şekil 2.4.	Substrat konsantrasyonu	22
Şekil 2.5.	Michaelis- Menten grafiği	24
Şekil 2.6.	Lineweaver-Burk grafiği	25
Şekil 2.7.	Kompetitif enzim inhibisyonu	27
Şekil 2.8.	Kompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği.....	27
Şekil 2.9.	Nonkompetitif enzim inhibisyonu	28
Şekil 2.10.	Nonkompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği..	29
Şekil 2.11.	Ankompetitif enzim inhibisyonu	30
Şekil 2.12.	Ankompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği...	30
Şekil 2.13.	Heme b grubu	34
Şekil 2.14.	Peroksidaz enziminin reaksiyon mekanizması.....	35
Şekil 3.1.	Bradford yönteminin standart grafiği.....	48
Şekil 4.2.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için 4-metil katekol substratının optimum pH grafiği	51
Şekil 4.3.	Deve dikeninin gövde kısmı için ABTS substratının optimum pH grafiği.....	52
Şekil 4.4.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için ABTS substratının optimum pH grafiği.....	52
Şekil 4.5.	Deve dikeninin gövde kısmı için guaiakol substratının optimum pH grafiği.....	53

Şekil 4.6.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için guaiakol substratının optimum pH grafiği.....	53
Şekil 4.7.	Deve dikeninin gövde kısmı için kafeik asit substratının optimum pH grafiği	54
Şekil 4.8.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için kafeik asit substratının optimum pH grafiği.....	54
Şekil 4.9.	Deve dikeninin gövde kısmı için o-dianisidin substratının optimum pH grafiği	55
Şekil 4.10.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-dianisidin substratının optimum pH grafiği	55
Şekil 4.11.	Deve dikeninin gövde kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum pH grafiği	56
Şekil 4.12.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum pH grafiği	56
Şekil 4.13.	Deve dikeninin gövde kısmı için progallol substratının optimum pH grafiği	57
Şekil 4.14.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için progallol substratının optimum pH grafiği	57
Şekil 4.15.	Deve dikeninin gövde kısmı için katekol substratının optimum pH grafiği.....	58
Şekil 4.16.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için katekol substratının optimum pH grafiği.....	58
Şekil 4.17.	Deve dikeninin gövde kısmı için 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği	59
Şekil 4.18.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	60
Şekil 4.19.	Deve dikeninin gövde kısmı için ABTS substratının optimum sıcaklık grafiği	60
Şekil 4.20.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için ABTS substratının optimum sıcaklık grafiği.....	61
Şekil 4.21.	Deve dikeninin gövde kısmı için guaiakol substratının optimum sıcaklık grafiği	61

Şekil 4.22.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için guaiakol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	62
Şekil 4.23.	Deve dikeninin gövde kısmı için kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği	62
Şekil 4.24.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği.....	63
Şekil 4.25.	Deve dikeninin gövde kısmı için o-dianisidin substratının optimum sıcaklık grafiği	63
Şekil 4.26.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-dianisidin substratının optimum sıcaklık grafiği.....	64
Şekil 4.27.	Deve dikeninin gövde kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum sıcaklık grafiği	64
Şekil 4.28.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum sıcaklık grafiği.....	65
Şekil 4.29.	Deve dikeninin gövde kısmı için progallol substratının optimum sıcaklık grafiği	65
Şekil 4.30.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için progallol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	66
Şekil 4.31.	Deve dikeninin gövde kısmı için katekol substratının optimum sıcaklık grafiği	66
Şekil 4.32.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için katekol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	67
Şekil 4.33.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	68
Şekil 4.34.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	68

Şekil 4.35.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	69
Şekil 4.36.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	69
Şekil 4.37.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	70
Şekil 4.38.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	70
Şekil 4.39.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği..	71
Şekil 4.40.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği..	71
Şekil 4.41.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	72
Şekil 4.42.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	72

Şekil 4.43.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	73
Şekil 4.44.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	73
Şekil 4.45.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	74
Şekil 4.46.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	74
Şekil 4.47.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	75
Şekil 4.48.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	75
Şekil 4.49.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	76
Şekil 4.50.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	76

Şekil 4.51.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	77
Şekil 4.52.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	77
Şekil 4.53.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	78
Şekil 4.54.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	78
Şekil 4.55.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	79
Şekil 4.56.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	79
Şekil 4.57.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	80
Şekil 4.58.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	80

Şekil 4.59.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	81
Şekil 4.60.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	81
Şekil 4.61.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	82
Şekil 4.62.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	82
Şekil 4.63	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	83
Şekil 4.64.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	83
Şekil 4.65.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum azidin etkisi.....	85
Şekil 4.66.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine tiyoürenin etkisi.....	85
Şekil 4.67.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine askorbik asitin etkisi.....	86
Şekil 4.68.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine potasyum siyanürün etkisi.....	86

Şekil 4.69.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine 2-merkaptan etanolün etkisi.....	87
Şekil 4.70.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-Glutatyonun etkisi.....	87
Şekil 4.71.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-Sisteinin etkisi.....	88
Şekil 4.72.	Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum sülfidin etkisi.....	88
Şekil 4.73.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum azit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	89
Şekil 4.74.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum azit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	90
Şekil 4.75.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden tiyöre inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	90
Şekil 4.76.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden tiyöre inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	91
Şekil 4.77.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden askorbik asit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	91
Şekil 4.78.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden askorbik asit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	92
Şekil 4.79.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden 2-merkaptan etanol inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	92
Şekil 4.80.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden 2-merkaptan etanol inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	93

Şekil 4.81.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Glutasyon inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	93
Şekil 4.82.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Glutasyon inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	94
Şekil 4.83.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Sistein inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	94
Şekil 4.84.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Sistein inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	95
Şekil 4.85.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden potasyum siyanür inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	95
Şekil 4.86.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden potasyum siyanür inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	96
Şekil 4.87.	Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum sülfid inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	96
Şekil 4.88.	Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum sülfid inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	97
Şekil 4.89.	Deve dikeninden elde edilen peroksidaz enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi.....	100
Şekil 4.90.	Deve dikeninden elde edilen peroksidaz enziminin -20 °C'deki aktivitesinin zamanla değişim.....	100
Şekil 4.91.	Deve dikeninden elde edilen peroksidaz enzimi için kolon elüat aktivite grafiği	101
Şekil 4.92.	BSA standart grafiği	102

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Reaktif oksijen türleri.....	2
Tablo 2.1.	Bazı enzimlerin turnover sayıları	19
Tablo 3.1.	0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması.....	46
Tablo 3.2.	0,1 M tris tamponunun hazırlanması.....	46
Tablo 4.1.	POD enziminin substrat spesifikliği ile ilgili toplu bulgular.....	84
Tablo 4.2.	POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I_{50} değerleri	89
Tablo 4.3.	POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve K_i değerleri.....	98
Tablo 4.4.	POD enzimi üzerine ağır metallerin etkisi.....	99

ÖZET

Anahtar kelimeler: Peroksidaz, deve dikenini, *Silybum marianum*, antioksidan enzimler, serbest radikaller, antioksidant savunma

Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), akseptör olarak rol yapan hidrojen peroksitin ve hidrojen atomlarının donörü olarak rol yapan başka bir bileşimin de bulunduğu bir reaksiyonu katalize eden bir oksidoredüktazdır.

Bu çalışmada peroksidaz enzimi (POD), Sakarya bölgesinde yetişen deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinin hem gövde hem de çiçek tablası kısmından ekstrakte edilmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile kısmen saflaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakte, peroksidaz enziminin karakterizasyonu için kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında 4-metil katekol - H₂O₂, ABTS - H₂O₂, guaiakol - H₂O₂, kafeik asit - H₂O₂, o-dianisidin - H₂O₂, o-fenilen diamini - H₂O₂, progallol - H₂O₂, katekol - H₂O₂ substrat çiftleri kullanılarak her bir substrat için ayrı ayrı optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Her bir substrat çifti için 420 nm'de UV spektrofotometre cihazında aktivite tayinleri yapılmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı ve optimum pH bu sekiz substrat çifti kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'ı 3,0 – 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığı ise 30 – 40 °C arasında değiştiği bulunmuştur. Ayrıca her bir substrat çifti için Lineveaver-Burk grafiklerinden K_m ve V_{max} değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. K_m değerleri değerlendirilerek POD substrat spesifikliğı bulunmuştur. Peroksidaz enziminin substrat spesifikliğı gövde kısmı için büyükten küçüğe doğru o-fenilen daimin, progallol, o-dianisidin, kafeik asit, ABTS 4-metil katekol, katekol ve guaiakol sırasını takip ederken çiçek tablası kısmı için ise o-dianisidin, kafeik asit, progallol, ABTS, o-fenilen daimin, katekol, 4-metil katekol ve guaiakol sırasını takip etmiştir. Bu çalışmada sekiz adet inhibitör ile çalışılmış olup etkili olanların yarışmalı inhibitör olarak sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, 2-merkaptan etanol, L-Glutatyon ve L-Sistein, yarı yarışmalı olarak potasyum siyanür, yarışmasız olarak ise sodyum sülfid olduğu bulunmuştur. Bunun yanında çalışmalarımızda peroksidaz enzimi aktivitesi üzerine etki eden Fe⁺³, Cu⁺², Zn⁺², Mg⁺², Hg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Li⁺¹, Co⁺², Mn⁺², Pb⁺², Sn⁺², Na⁺¹, K⁺¹, Ni⁺² ve Cd⁺² metalleri incelenmiştir. Peroksidaz enzimi üzerine etki eden metallerden sadece Cu⁺², Sn⁺² ve K⁺¹'in enzim üzerinde inhibisyona diğer metallerin ise aktivasyona sebep oldukları görülmüştür.

CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM MILK THISTLE (*Silybum marianum*) PLANT

SUMMARY

Key Words: Peroxidase, Milk thistle, *Silybum marianum*, antioxidant enzymes, free radicals, antioxidant defence

Peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) is an oxidoreductase that catalyses a reaction in which hydrogen peroxide acts as the acceptor and another compound acts as the donor of hydrogen atoms.

In this work, Milk thistle (*Silybum marianum*) was used for POD characterization. Milk thistles were harvested fresh from the region of Sakarya, in Turkey. This extract purified partly through $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, dialysis, gel filtration. POD activity was determined by measuring as indicated by an increase in absorbance at 420 nm. Enzyme activity, as a function of pH, was determined with substrate patterns (catechol - H_2O_2 , 4-methylcatechol - H_2O_2 , pyrogallol - H_2O_2 , caffeic acid - H_2O_2 , ABTS - H_2O_2 , guaiacol - H_2O_2 , o-dianisidine - H_2O_2 , o-phenilen diamin - H_2O_2), in different buffer, ranging from pH 3,0 to 9,0. Enzyme activity, as a function of temperature, was determined with substrate patterns. Optimum temperature was found to change between 30 – 40 °C. Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum reaction velocity (V_{\max}) were determined using eight substrate patterns (catechol - H_2O_2 , 4-methylcatechol - H_2O_2 , pyrogallol - H_2O_2 , caffeic acid - H_2O_2 , ABTS - H_2O_2 , guaiacol - H_2O_2 , o-dianisidine - H_2O_2 , o-phenilen diamin - H_2O_2) in six different concentrations for the substrate specificity of POD. The substrate specificity of POD was found to be o-phenilen diamin, pyrogallol, o-dianisidine, caffeic acid, ABTS, 4-methylcatechol, catechol and guaiacol, respectively for the plant body. The substrate specificity of POD was found to be o-dianisidine, caffeic acid, pyrogallol, ABTS, o-phenilen diamin, catechol, 4-methylcatechol and guaiacol, respectively for the flower tray. Eight inhibitors were tested in the study and the effectives were found to be sodium azide, thiourea, ascorbic acid, 2-mercapto ethanol, L-Glutatyon and L-Cystein as competitive inhibitors, potassium cyanide, as uncompetitive inhibitor, sodium sulfide as noncompetitive inhibitor. The enzyme activity was also tested against some metals. Fe^{+3} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Na^{+1} , Ni^{+2} and Cd^{+2} ions act as enzyme activator however Cu^{+2} , Sn^{+2} and K^{+1} ions act as enzyme inhibitors.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Oksidasyon canlı organizmalar için çok önemli bir prosestir. Oksijen ise hem yaşamın ve hem de ölümün molekülü olarak bilinmektedir. Oksijen insanların hayatlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir moleküldür. Oksijen anaeroplara için öldürücü ya da gelişimi durdurucu etkiye sahiptir. *Bacteroides fragilis* gibi bazı anaeroplara düşük oksijen konsantrasyonunda yaşayabilirlerken *Clostridia* gibi türler ancak oksijenin hiç olmadığı ortamlarda yaşayabilirler. Oksijenin anaeroplara üzerine zararlı etkisi, anaeroplara önemli hücre bileşenlerinin oksijen ile oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Oksijenin eksik indirgenmesi ayrıca reaktif oksijen türlerinin de (ROT) oluşmasına sebep olmaktadır. Hücreye zarar veren bu reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Oksijenin bu yükseltgeyici özelliğinden anaeroplara yanısıra aeroplara da zarar görmekteyizler [1].

Antioksidan savunma sistemlerine sahip olan aerobik organizmalar, aerobik solunum ve substrat oksidasyonu sonucu olarak ürettiği reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu engellemektedir (Şekil 1). Hidroksil radikallerini ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyonlarını ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) içeren reaktif oksijen türlerinin küçük miktarları, hem iç hemde dış uyarıcılara karşılık olarak aerobik organizmalarda sürekli olarak üretilmektedir [2, 3]. Reaktif oksijen türlerinin düşük seviyeleri hücre farklılaşmasında ve hücre gelişiminin durdurulmasındaki molekül içi iletme sahip çoğu biyokimyasal proseslerde, bağışıklıkta ve mikroorganizmalara karşı savunmada vazgeçilmezdir [4-7]. Bunun aksine reaktif oksijen türlerinin yüksek dozları ya da uzaklaştırılma yetersizliği, şiddetli metabolik bozukluklara sebep olabileceği gibi biyolojik makromoleküllerde zarar verebilen oksidatif strese yol açabilir [8, 9].

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri

Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksi	OH^{\bullet}	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksi	ROO^{\bullet}	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksi	RO^{\bullet}	Ozon	O_3
Hidroperoksi	HOO^{\bullet}	Singlet oksijen	${}^1\Delta_g {}^1O_2$

Canlılardaki elektron akışı serbest enerjinin elde edildiği birçok basamağı takip eder ve son olarak bu akış oksidatif fosforilasyonda O_2 molekülünde durur. Çünkü indirgenme potansiyeli daha yüksek bir bileşiğin ortamda mevcudiyeti söz konusu değildir. Problemsiz işleyen bir sistemde O_2 suya kadar indirgenir [1].



Moleküler oksijen (O_2) diradikal olarak tanımlanmıştır. Bu özelliği, sıvı oksijenin manyetik kutuplarındaki çekimi ile ilgilidir. Buna bağlı olarak, oksijenin suya indirgenebilmesi için elektron taşıma zincirinin 4 elektrona ihtiyacı vardır. Moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle $O_2^{\bullet -}$ 'i oluşur. İkinci elektronun indirgenmesiyle, daha sonra H_2O_2 'yi oluşturacak olan peroksit radikali oluşur. Üçüncü elektron, Fe'in katalizlediği fenton reaksiyonu sonucunda, $O_2^{\bullet -}$ ile H_2O_2 'nin reaksiyona girip OH^{\bullet} 'i oluşturduğu sırada indirgenir.



Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir ya da birden fazla paylaşılmamış elektron içeren reaktif moleküllerdir. Elektronların bu dizilimi kararsız olduğundan radikaller

hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan en etkili serbest radikaller ROT'lerdir. Organizmalardaki en aktif ROT üreticileri fagositoz hücreleridir. Çeşitli metabolik yangılarla uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek hidroksil radikali (OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve superoksit (O_2^-) gibi ROT'ları oluştururlar. Diğer ROT kaynakları; yine oksijenin katıldığı mitokondriyal elektron taşıma zinciri, doymamış yağ asitlerinin ve kateşolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır.

Serbest radikaller, mitokondriyal solunum, fagositlerin aktivasyonu ve bazı enzimlerin (nikotinamid dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH) oksidaz ve ksantin oksidaz gibi) ve/veya Fe ve Cu gibi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşurlar. Oluşan bu serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri (ROT), lökositlerin yabancı maddeleri yok etmeleri sırasında, biyolojik olarak aktif olan önemli aracı moleküllerdir ve yangı ile ilgili temel bileşiklerin oluşmasında da rol oynarlar. Bununla beraber aşırı üretilmeleri halinde toksiktirler ve hücrelerdeki lipitleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyerek peroksidasyona ve modifikasyonlara neden olabilirler. Bu prooksidanların, özellikle ROT'lerin birikmesine "oksidatif stres" denir. Son yıllarda oksidatif stresin, başta diyabet olmak üzere koroner kalp rahatsızlıkları, kanser, katarakt gibi daha birçok hastalığın patogenezinin neden olduğu saptanmıştır.

En etkili radikal hidroksil radikali olup bunun nedeni hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesidir. Diğer bir önemli radikal olan singlet oksijeninin ise yarı ömrü kısadır ve son yörüngesindeki paylaşılmamış elektronun bir üst enerji seviyesine çıkması sonucunda oluşur [10]. Reaktif bir tür olan H_2O_2 suda rahatlıkla çözünebilen ve mekanizması bilinmemesine rağmen hücre membranından su gibi kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Genellikle $50 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlardaki H_2O_2 , muamele süresine ve fizyolojik şartlara bağlı olmakla beraber birçok hayvan, bitki ve bakteri hücre kültürü üzerine toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple H_2O_2 'in *in vivo* olarak çok toksik olduğu ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu da katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından yapılmaktadır.

Hidrojen peroksitteki O-O bağı, nispeten zayıf olduğu için kolaylıkla parçalanabilir. Bu bağı homolitik parçalanmasından aktivitesi çok yüksek olan OH[•] radikali oluşur.



Bu homolitik parçalanma demir tarafından da gerçekleştirilebilmektedir.



Benzer şekilde bu reaksiyon Cu⁺ varlığında da meydana gelmektedir.



Bu reaksiyon sırasında oluşan OH[•], yeni radikallerin oluşumunda ve böylece de DNA hasarında önemli bir rol oynamaktadır [1].

Organizmada oksidatif stres oluşturan değişik oksidanlara karşı daha önce bahsedildiği gibi antioksidan savunma sistemi vardır. Bu antioksidan savunma sistemi; serbest radikallerin aşırı üretilmesini engelleyerek, oluşan serbest radikallerin etkisini azaltarak veya oluşan oksidatif hasarı ya azaltarak ya da onararak etkisini gösterir. Bu sistemler, SOD, CAT ve GPX gibi endojen antioksidan enzimleri, GSH¹, seruloplazmin ve transferrin gibi metal bağlayıcı proteinleri, Zn ve Cu gibi antioksidan özellikteki bazı elementleri ve A, C, E gibi antioksidan vitaminleri içermektedir.

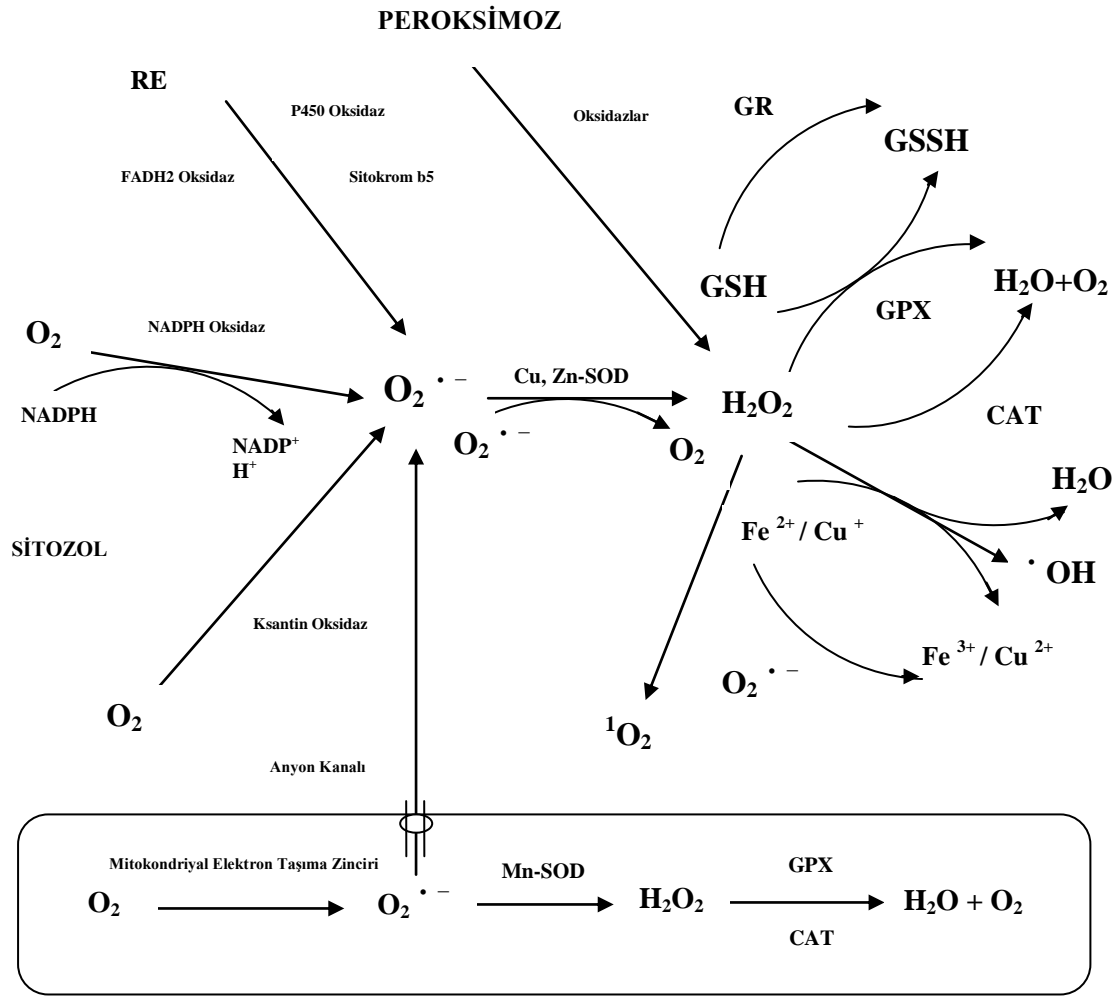
Oksidanların özellikle ROT'lerin aşırı birikmesiyle oluşan oksidatif stres; membran lipitlerindeki doymamış yağlardaki bağları koparıp membran viskozitesini ve geçirgenliği artırır, ayrıca membran seçiciliğini de değiştirir. ROT'lerin oluşumunun başlangıcında yer alan O₂⁻, proteinleri bölümlere ayırarak enzim aktivasyonlarında bozulmaya ve iyon transferinde aksaklıklara neden olurken, ayrıca demir iyonu ile reaksiyona girip proteolizis oluşturur. DNA'da ise; sakkarit halkalarında kopmalar sonucu mutasyonlar, bazlardaki modifikasyonlara bağlı translasyon hataları, zincir kırılmaları ile proteosentezde inhibisyonlara neden olur. Böylece hücre ölüme gider.

Serbest radikaller; vücutta ayrıca yangı, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenezis, mutajenezis, infeksiyöz hastalıklar, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları, göz hastalıkları ve ürolojik hastalıklar gibi hastalıklara da neden olabilir [10].

Plazma ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerde (LDL) doğal olarak oluşan antioksidanlar, doğabilecek oksidasyonlardan hücreleri korur [11, 12]. Lipit peroksidasyonunun engellenmesi aerobik organizmalarda temel bir prosestir. Çünkü lipit peroksidasyon ürünleri DNA bozukluğuna sebep olabilir ve direkt olarak glutamat taşıyıcıları ve Na^+ / K^+ ATPaz'lar gibi proteinleri inhibe edebilirler [2, 11, 13, 12]. Lipit peroksidasyonunun artması ve antioksidan savunmasının azalması, hücre içinde kendiliğinden nükleofilik merkezli reaksiyonları oluşabilen epoksitleri meydana getirir. Bu sebepten dolayı epoksitler DNA, RNA ve proteinlere kovalent olarak bağlanabilirler [5, 14]. Böyle bir reaksiyon epoksitlerin özelliğine bağlı olarak toksik maddelerin oluşmasına, alerjiye, genlerle ilgili mutasyonlara ve kansere sebep olabilir [15].

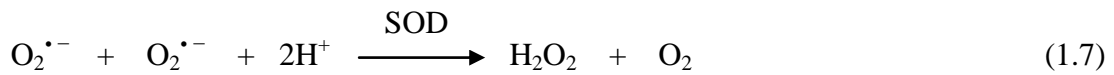
Lipit peroksidasyonu tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri metodu yoluyla değerlendirilebilir. Bu metod oksidatif stresin sebep olduğu lipit bozulmalarının son ürünü olan malondialdehit için analiz edilmiş oksidatif stresi değerlendirir [16, 17]. Organizmaların hayatta kalması için temel olan antioksidanların hem molekül içi seviyeleri hem de aktiviteleri arasında bir denge vardır [18, 19].

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır. Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır. Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPX'tir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen α -tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir. Hücre dışı savunma sistemi ise; metallothionein gibi serbest radikal yok edicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur [10].



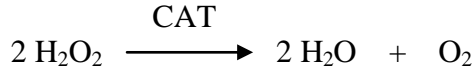
Şekil 1.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve aktif oksijenin oluşturduğu hasara karşılık savunma mekanizması [10]

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), son derece reaktif olan süperoksit anyonunun dismutasyonunu, O_2 ve daha az reaktif olan H_2O_2 'e kataliz eden bir antioksidan enzimdir. Peroksit, CAT veya GPX reaksiyonuyla yok edilebilir [20, 21].



SOD, ardışık oksidasyon ve dikkat çekecek derecede yüksek reaksiyon oranları ile Ping Pong tipi mekanizma içindeki aktif bölgede geçiş metal iyonunun indirgenmesi yoluyla $O_2^{\bullet -}$ 'i yok eder [22].

CAT enzimi ise, hepatositlerin mitokondrisinde ve eritrositlerin sitoplazmasında bulunurken, diğer hücrelerin peroksizomlarında yer alır [10]. Katalaz (EC 1.11.1.6) yaklaşık 240 kDa moleküler ağırlığa sahip tetramerik bir enzimdir [23]. CAT enzimi, H_2O_2 ile çok etkili bir reaksiyon vermesi sonucu moleküler oksijen ve su formuna döner.



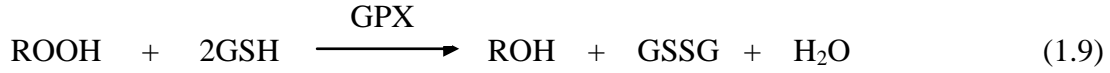
Hayvanlarda hidrojen peroksit'in zehir etkisi GPX ve CAT tarafından giderilir. Katalaz, hayvanlar içinde üretilmiş hidrojen peroksit'ten hücreleri korur. CAT normal şartlar altında bazı hücre tipleri için gerekli olmamasına rağmen hücrelerin uyarlamalı bir tepkimesinde oksidatif strese dayanmanın eldesinde önemli bir rol oynamaktadır [24].

GPX, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur. H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller ve membran lipitlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPX, ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyumu yapısında bulundurur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir.

GSH ise önemli bir intraselüler antioksidandır. Okside edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda, indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir. Ayrıca GPX'in kofaktörü olarak da görev yapar [10].

GPX enzimi GSH'ı kullanarak hidroperoksitlerin indirgenmesini kataliz eder o suretle memeli hayvan hücreleri oksidatif zarara karşı korunur. Aslında glutatyon

metabolizması oksidatif savunma mekanizmasının en temel esaslarından biridir [15, 14, 25, 26].



GPX enzimi, CAT enzimi ile H_2O_2 ve substratı parçalamasına rağmen oksidatif stresin düşük seviyelerine karşı savunmanın büyük bir kaynağı olan lipit ve diğer organik hidroperoksitler ile etkili bir reaksiyon verebilir.

Antioksidan enzimlerinin fizyolojik aktiviteden az miktar sapmaları hücrelerin direnci üzerinde anormal bir etkiye sebep olabilir [27, 28].

Spesifik metal-bağlayıcı proteinler, H_2O_2 ve OH^- oluşumunda etkili olan metalleri bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlerler. Bunlara örnek verecek olursak; transferrin plazmadaki serbest demiri bağlayarak, ferroksidaz aktivitesi olan seruloplazmin ise, iki değerlikli demir iyonlarını daha az reaktif olan üç değerlikli demir iyonlarına dönüştürerek serbest radikal oluşumunu dolayısıyla lipit peroksidasyonunu önler. Albumin ise, antioksidan etkisini yapısındaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını sıkıca bağlayıp, OH^- oluşumunu engelleyerek yapar [10].

Bu çalışmanın amacı, Sakarya bölgesinde yetişen deve diken bitkisinin hasat dönemi toplanıp uygun pH lardaki tamponlarla enzim ekstraksiyonunun yapılması ve uygun tuz konsantrasyonları ile enzim çöktürülüp uygun substratlarla Michaelis - Menten kinetiği ile POD enzimini karakterize etmektir. Bunun yanında Peroksidaz enzimi için karakteristik olan inhibitörlerin enzim üzerine etkisini kinetik olarak UV-Vis spektroskopisi kullanılarak incelemektir. Böylece POD enzimi hem substratlarla hem de inhibitörlerle karakterize edilecektir.

1.2. Kaynak Özetleri

Enginarın işlenmiş gıda endstrisinde geniş bir kullanım alanı vardır. Enginar yaprakları, polifenil oksidaz ve peroksidaz enzimleri gibi önemli bileşenleri ekstrakte

etmek için kullanılmakta olup bu enzimleri geniş bir yayılımında içermektedir. Peroksidazlar (POD) hücre duvarı biyosentezi, hasara karşı tepki, hastalık, direnç ve yara onarımı ile ilişkilendirilmiş enzimlerin geniş bir grubunun üyesidir. Cardinali ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada peroksidazlar karakterize edilmiştir. POD formları SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve substrat olarak o-dianisidin kullanılarak peroksidaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Peroksidazlar, üç farklı molekül ağırlık bölgesi göstermiştir; 100 kD, 60 kD ve 35 kD. Peroksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, jel filitasyonu, affinite kromatografisi ve AE-HPLC ile kısmen saflaştırılmıştır. POD enzimi için yapılan SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 60 kD olarak bulunmuştur [29].

Belcarz ve arkadaşları (2008) peroksidaz enzimini lahanadan kısmen saflaştırmış ve izole etmiştir. POD için optimum pH 6,0 bulunmuştur. POD için optimal sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur. Peroksidazlar 4 °C'de 4 hafta depolanma süresince tamamıyla aktivite göstermiştir. Kinetik çalışmalar gösterir ki, ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM) ve o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM)'e ait K_m değerleri için guaiacol (6,41 ve 13,89 mM)'den daha düşük değerlere sahiptir [30].

Vitali ve arkadaşları (1998) yabancı sinamekinden bir peroksidazı (EC 1.11.1.7) 29 günde toplanmış kültür ortamından saflaştırmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE yoluyla yaklaşık olarak 43 kDa, jel filitasyonu ile 50 kDa olarak bulunmuştur. Peroksidaz kafeik asit, ferulik asit ve guaiakol gibi doğal fenoliklere ve alkola karşı yüksek bir spesifikle karakterize edilmiştir. Bu enzim hücre duvarının odunlaşma proseslerinde bulunduğu belirlenmiştir [31].

Fang ve arkadaşları (2008) peroksidaz aktivitesi üzerinde yüksek basınç ve sıcaklık işlemlerinin etkilerini araştırmıştır. 200 MPa'dan 600 MPa'ya değişen basınç seviyeleri ve 10 °C'den 50 °C'e değişen sıcaklıklar 30 dk boyunca uygulanmıştır. Analizler, kivi meyve suyu içindeki ham peroksidaz ve bir model sistem içinde kısmen saflaştırılmış peroksidaz üzerinde uygulanmıştır. 400 MPa'dan daha yüksek basınçlar enzim inaktivasyonunu hızlandırmak için hafif bir sıcaklıkla (≤ 50 °C) birleştirilmiştir. İlk 15 dakikadan sonra maruz bırakma süresinin uzaması büyük bir etki göstermemiştir. Ayrıca POD için pH değeri 6,0 - 8,5 arasında bulunmuştur [32].

Mdluli (2005) marul mahsülünden elde ettiği peroksidaz enzimini, sefadeks G 100 jel filtrasyonu, DEAE - iyon değişimi ve Triton X114 içindeki faz ayrımı, sıcaklığın bir kombinasyonu yoluyla kısmen saflaştırmıştır. Enzim kinetik parametreleri, molekül ağırlığı, pH aktivitesi ve kararlılığı, termal kararlılık, reaksiyon oran ilişkisi ve enzim konsantrasyonu için karakterize edilmiştir. Peroksidazın molekül ağırlığı 71 kDa olarak bulunmuştur. Peroksidaz, K_m değeri 1,77 mM olan hidrojen peroksit ve ABTS ile pH 4,0'te maksimum aktivite göstermiştir [33].

Rodriguez ve arkadaşları (2000) tarafından kavun meyvesinden peroksidaz enzimi kısmen saflaştırmıştır. Başlıca kavun peroksidazı anyon-değişim kromatografisi yoluyla saflaştırılmıştır. Bu peroksidaz askorbik asit üzerinde aktivite göstermemiştir fakat yüksek oranda guaiakol'ü yükseltmiştir. Bu enzimin optimum pH'ı 5,5 olarak bulunmuştur. İndirgeyici substrat olarak ABTS kullanımıyla yapılan kinetik çalışmalar göstermiştir ki yetiştirme ortamında artan tuzluluk, hem hidrojen peroksit hem de indirgeyici substrat üzerindeki kavun peroksidazının kinetik parametrelerini değiştirmemiştir [34].

Onsa ve arkadaşları (2004) iki membran bağı peroksidazı mPOD-I ve mPOD-II'yi *Metroxylon sagu*'dan saflaştırmış ve izole etmişlerdir. SDS-PAGE yoluyla mPOD-I ve mPOD-II için belirlenmiş olan moleküler ağırlıkları sırasıyla 51,2 ve 43,8 kDa olarak bulunmuştur. Her iki enzimin substratlarla etkileşmesi yüksek verimlilik göstermiştir. İzoenzimler p-kumarik asit, metabisülfid ve askorbik asit tarafından yüksek derecede inhibe edilmiştir. İnhibisyon etki şekli ve bu inhibitörler için inhibisyon sürat sabiti (K_i) değerleri belirlenmiştir. Peroksidazların aktiviteleri Ca^{+2} ve Fe^{+3} ile yüksek derecede geliştirilmiştir. Fakat Zn^{+2} ile bir dereceye kadar inhibe edilmiştir [35].

Spitzer ve arkadaşları (1924) tarafından yapılan bir çalışmada peroksidaz enziminin en yaygın enzim olduğu belirtilmiştir. Peroksidaz enziminin bütün yaşam organizmalarında ve bunun yanında hem bitki hem de hayvan dokularında bulunduğu değinilmiştir. Peroksidazın sahip olduğu farklı bir özelliğinde, bozulmaya dirençli olduğu vurgulanmıştır. Peroksidazın hala doğru enzim olup olmadığı çözülememiş bir sorun olduğu, varlığının kanıtı ise bu enzimin yalnızca

etkisinden ibaret olduğu ifade edilmiştir. Bu enzimlerin etkileri, gövdelerinin kimyasal doğası çalışılarak araştırılabileceği öne sürülmüştür. Bir enzimin fonksiyonu, bir eylemin hızlanmasını sağlayan katalizör olduğu fakat hiçbir zaman son ürünler arasında görünmediği dile getirilmiştir [36].

Deepa ve arkadaşları (2002) hurma yaprağı yağından elde ettikleri peroksidaz (POD) enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi ve moleküler dışlama kromatografisi yoluyla saflaştırmıştır. Elde edilen saflaştırma derecesi enzim aktivitesinin % 54 verimliliği ile 429 olarak bulunmuştur. Denatüre şartlar altında saflaştırılmış enzim elektroforezi Mr'nin 48 ± 2 kDa olduğunu göstermiştir. Çok yüksek pH ve termal kararlılıklar gösteren bu enzimin optimum pH'ı 5,0 olarak bulunmuştur. Guaiakol, ABTS ve pirogallol için sırasıyla K_m değerleri 3,96 - 1 - 0,84 mM olarak bulunmuştur [37].

Pomar ve arkadaşları (1997) bir peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzimini Sephadex G-100, Q-Sepharose ve Superose 12 PC 3.2/30 kolonlarında kromatografi yoluyla takip edilen amonyum sülfat fraksiyonu ile karabiberin meyva örtüsünden yaklaşık 300 kere saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzimin jel filtrasyonu ile belirlenen molekül ağırlığı (Mr) 50 k olarak bulunmuştur. Enzimin kararlı olduğu pH'ın 6,0 - 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur. Peroksidaz enziminin yüksek sıcaklıklara dirençli olduğu bulunmuştur [38].

Fortea ve arkadaşları (2009) peroksidaz enzimini Triton X-114 kullanılarak bir masa üzümünden ekstrakte ederek spektrofotometrik metodlar yardımıyla karakterize etmişlerdir. Peroksidaz asit şokuyla etkinleştirilmiştir. Fakat anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında POD inaktifleştirilmiştir. Peroksidaz enzimi izlenen Michaelis–Menten kinetikleri yoluyla karakterize edilmiştir. Peroksidaz enzimi için K_m ve V_m değerleri ABTS için sırasıyla 0,79 mM ve 1,20 mM / dk olarak bulunmuştur. Hidrojen peroksit için bu değerler sırasıyla 0,4 mM ve 0,93 mM / dk olarak bulunmuştur. POD enzimi, 75 °C'de 5 dakika boyunca bekletildikten sonra bağıl aktivite kaybı % 90'dan büyük olduğu görülmüştür. Ayrıca POD enziminin aktivasyon enerjisi 271,9 kJ / mol olarak bulunmuştur [39].

Saraiva ve arkadaşları (2007) zeytinden elde ettikleri peroksidaz enzimini elektroforetik homojenlik için saflaştırmıştır. Peroksidaz enziminin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,0 - 34,7 °C olarak bulunmuştur. Hidrojen peroksit ve fenol için K_m değerleri sırasıyla 41,0 ve 0,53 mM olarak bulunmuştur. POD enziminin açıklanması için entalpi ve ısı kapasitesindeki aktivite ve sıcaklık profilinden çıkarılan denatürasyon sıcaklığı ve değişiklikleri sırasıyla 36,5 °C, 411,2 ve 13,6 kJ mol⁻¹ K⁻¹ olarak hesaplanmıştır. POD enzimi tarafından yükseltgenen fenol için aktivasyon enerjisi 99,1 kJ mol⁻¹ olarak bulunmuştur [40].

Rudrappa ve arkadaşları (2007) pancarın genetik olarak değiştirilmiş kök kültürleri ile üretilmiş hücre içi peroksidazını (POD), 15 kez aktivite artışı ile sonuçlanan iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat ayrımsal damıtmasının birleşimi kullanılarak saflaştırmıştır. Peroksidaz enziminin pH 5,0'te en yüksek aktivite ve kararlılık gösterdiği belirtilmiş olup 70 °C'de 20 dk süresince aktiviteyi % 70'in üstünde tuttuğu görülmüştür. Saflaştırılmış enzim, substrat olarak en yüksek tercih olarak hidrojen peroksiti göstermiştir. Hidrojen peroksitin K_m değeri 0,1 olarak bulunmuştur. H[•] donörleri arasında enzim, o-dianisidin - ABTS - guaiakol sırasına göre bir affinite gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılmış POD enziminin aktif boyama ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül ağırlığı 45 kDa olarak bulunmuştur [41].

Serrano martinez ve arkadaşları (2008) kırmızı tatlı biberden elde ettikleri peroksidaz (POD) enzimini, % 30 ve % 80 arasında amonyum sülfat fraksiyonu ve Triton X-114 ile ayrılan fazın bir kombinasyonunu kullanarak kısmen saflaştırmıştır. H-donörü olarak ABTS kullanılarak optimum aktivite pH 4,5 olarak elde edilmiş ve görünen V_m ve K_m parametreleri hem ABTS hem de H₂O₂ için sırasıyla 0,495 ve 1,32 mM olarak bulunmuştur. Bir kaç indirgeyici etkenin etkisi çalışılmış ve askorbik asit en aktif etken olarak belirlenmiştir. Termal inaktivasyon çalışması inaktivasyon kinetiği için bir ilki göstermiş ve Arrhenius çizimi 151 kJ / mol değerinde bir inaktivasyon enerjisine eşdeğer bir eğim ile düz bir çizgi vermiştir. Kaydadeğer inaktivasyon, 40 °C'den büyük sıcaklıklarda meydana geldiği görülmüştür [42].

Mliki ve arkadaşı (1992) *Streptomyces cyaneus*'den elde ettikleri bir hücre içi peroksidazını homojenlik için saflaştırmıştır. POD enzimi o-dianisidine karşı bir aktivite gösterdiği belirtilmiş olup substratın K_m değeri 17,8 mM olarak bulunmuştur. Peroksidaz enziminin optimum pH değeri ise 5,0 olarak bulunmuştur. Peroksidaz enzim spektrumu sodyum ditiyonit ile indigemeden sonra yok olmuş 405 nm'de bir soret bant göstermiştir. Bu göstermiştir ki enzim bir hemoproteindir. Enzim aktivitesi üzerinde çeşitli inhibitörlerin test edilen etkileri göstermiştir ki bu enzim peroksidaz aktivitesine sahip bir bifonksiyonel enzimdir [43].

Ikehata ve arkadaşları (2005) *Coprinus cinereus* UAMH 4103 ve *Coprinus sp.* UAMH 10067'den mantarimsı peroksidazları saflaştırmış ve karakterize etmişler. Saflaştırılan *Coprinus* peroksidazlarının molekül ağırlıkları 36 kDa olarak bulunmuştur. Bu iki *Coprinus* peroksidazının katalitik özellikleri hem ham hem de saflaştırılmış formlarında hemen hemen özdeş olmasına rağmen kararlılıklarının çok farklı olduğu bulunmuştur. *Coprinus sp.* UAMH 10067'dan elde edilen peroksidaz *C. cinereus* UAMH 4103'den elde edilenden temel şartlar altında 50 °C'de daha kararlı olarak bulunmuştur. İlk enzim, sulu fenol işlemlerinde pH 9,0'da ikincisinden daha iyi bir şekilde uygulanmıştır. *Coprinus* peroksidazının fenol giderme verimliliği evvelce çalışılmış bitki peroksidazlarıyla karşılaştırılmıştır. *Coprinus sp.* UAMH 10067'dan elde edilen peroksidazın daha geniş çalışılan pH aralığı, daha yüksek termal ve alkalın kararlılığı endüstriyel atık su uygulamaları için avantajlı olabileceği belirtilmiştir [44].

Marqueza ve arkadaşları (2008) bir hücre duvarı peroksidazını, ultra filtrasyon ve Sephacryl S-200 üzerindeki jel filtrasyon kromatografisi ile olgun vanilya tanelerinin bir polivinilpoliprolidin ekstraktından saflaştırmıştır. Native jel filtrasyonu yaklaşık olarak 186 kDa olan tetramer enzim formu doğrulandığında SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 46,5 kDa olarak belirlenmiştir. Guaiakol substratı kullanılarak belirlenen K_m , optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 3,8 mmol / L, 3,8 ve 16 °C olarak bulunmuştur. POD enzimi sodyum azid, β -merkaptotanol ve 1,4-ditiyotreitil ile inhibe edildiği bulunmuştur. POD enzimi, 1 mmol / L NaEDTA, sodyum dodesil sülfat ve askorbik asit varlığında azalan bir aktivite gösterdiği bulunmuştur [45].

Manu ve arkadaşı (2009) peroksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişimi, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yoluyla buğday öğütme endüstrisinin ürettiği buğday kepeğinden saflaştırmıştır. Glikoprotein olan bu enzimin molekül ağırlığı 44 kDa, optimum pH'ı 4,8 ve karbonhidrat içeriği % 13.8 olarak bulunmuştur. Saflaştırma süresince kalsiyumun katılımı enzim verimini ve spesifik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Kalsiyum varlığında saflaştırılmış enzim artan bir termal kararlılık göstermiştir. Kalsiyum ilavesinde triptofan floresanslığında değişim gözlenmemiştir fakat 403 nm'de heme Emilimi, heme çevresinde bir değişim gösteren bir değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Kalsiyum buğday kepeği peroksidazının heme yapısı, enzimatik aktiviteyi ve termal kararlılığı korumak için esas olduğu belirtilmiştir [46].

Johri ve arkadaşları (2005) sınıf III peroksidazlarının (EC 1.11.1.7) dört tipini *Withania somnifera* (AGB 002) köklerinde saptamıştır. Bunlardan biri diğerlerine göre kıyaslandığında bozunmama şartları altında poliakrilamid jeller üzerinde yavaş bir hareketlilik göstermiştir. WS1, WS2, WS3 ve WS4 olarak belirlenen dört peroksidazın hepsi iyon değişimi, affinite ve hidrofobik kolonlar kullanılarak FPLC yoluyla hücre serbest özütünden saflaştırılmıştır. Peroksidazların saflığı spektral analiz ve SDS-PAGE yoluyla tespit edilmiştir. Saflaştırılmış peroksidazlar 34 ve 48 kDa arasındaki molekül ağırlıklarıyla monomer glikoproteinler olduğu bulunmuştur. Peroksidazların hepsi pH 3,0 - 9,0 alanı arasında kararlı, son derece sıcaklığa dayanıklı ve pH 5,0'de sabit olarak aktif olduğu bulunmuştur. Ek olarak bütün peroksidazlar genellikle guaiakol, ABTS ve o-dianisidin gibi fenolik substratları yükseltgeyebildiği belirtilmiştir [47].

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler doğal olarak yalnızca canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Solunumun, büyümenin, kas kasılmasının, sinirdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlanmasının, deaminasyonun, sindirim gibi birçok sistemlerin temelini oluştururlar. Canlı hücrelerde tepkimeler kural olarak 0 - 50 °C; çoğunlukla da 20 – 42 °C arasında meydana gelir. Bu sıcaklıkta tepkimelerin oluşması biyokatalizör denen enzim ya da fermentlerle olur. Bu, aktivasyon enerjisinin düşürülmesi ile olur. Başlangıçta "Enzim" terimi, sindirim kanalında olduğu gibi bir çözelti ya da sıvı içerisinde etki ettiği durumlara (Kühn 1878) karşın hücreye bağlı olduğu durumlarda "Ferment = Maya" terimi kullanılmıştır. Buchner (1897), fermentlerin de hücre dışında etki ettiğini bulunca iki terim arasındaki farklılık ortadan kalkmış oldu. Her iki terim arasında bugün herhangi bir fark olmamakla beraber, bakteri, mantar ve diğer hücreli enzimatik işlevler, mayalanma ve etki maddeleri de ferment olarak kullanılacaktır [48].

Yalıtılan enzimlerin tümü protein yapısındadır ya da protein kısmı bulundurlar. Enzimler bu esasa göre basit enzimler ve bileşik enzimler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Basit enzimler sadece proteinden meydana gelen enzimlerdir. Yapısında sadece amino asitler bulunan veya proteinik özellikleriyle fonksiyon gören enzimlerdir. Bunlara en iyi örnek sindirim enzimleri (pepsin, tripsin, kimotripsin, elastaz gibi enzimler) ve üreyi parçalayan üreaz enzimidir. Reaksiyon, direk olarak protein kısmı tarafından yürütülür.

Bileşik enzimler iki kısımdan meydana gelir:

Protein + Vitaminler

Protein + Mineral maddeler veya metal iyonları

Bu enzimlerin protein kısmına apoenzim, vitamin kısmına koenzim veya prostetik grup denir. Metal iyonları ve mineral maddeler gibi kısımlarına da enzim aktivatörleri denir. Bileşik enzimler ayrı ayrı görev yapamazlar. Çünkü enzimin etki ettiği maddeyi protein kısmı belirler. Koenzim reaksiyonu gerçekleştirir. Enzimlerin yapılarına göre sınıflamasından görüldüğü gibi büyük bir çoğunluğunun ikinci bir faktöre (kofaktör) ihtiyacı vardır. İkinci bir faktöre ihtiyacı olan enzimin iki kısmı vardır; protein olan kısım; apoenzim ve metal veya organik bileşik olan kısım; kofaktör (ikinci faktör). Bu iki kısmın bir araya gelmesiyle aktif enzim de denilen holoenzim ortaya [49].

Enzimlerin katalitik etkinliği kimyasal katalizörlerinkinden binlerce kat daha çoktur. Birçok enzimlerde katalitik etkinlik sabit olmayıp değişkendir. Bu yüzden metabolizmanın ortam koşullarına uyumluluğu sağlanır. Enzimlerin optimum etkinlikleri ortam koşullarının (pH, iyon şiddeti, sıcaklık, basınç vs.) dar sınırları içerisinde olup bu sınırların dışına çıktığında enzim etkinliği hızla düşer, dahası yaşam sona erer. Örneğin insan kanının pH'ı $7,3 \pm 0,2$ olup pH 6,0 veya pH 8,0'de enzim etkinlikleri yüzlerce kat değişir.

Enzimlerden etkilenen yapılara substrat denir. Enzimlerin girdikleri reaksiyonlarda yan ürün meydana gelmez, yani substratın tamamı ürüne dönüştürülür. Oysa kimyasal reaksiyonlarda az veya çok her zaman yan ürün meydana gelir. Hücre içerisinde milyonda bir gibi düşük bir oranda bile yan ürün oluşsa zamanla birikeceğinden dolayı toksik etki gösterecektir. Bu toksik etki canlının biyolojik yapısına zarar verir.

Enzimler oldukça spesifiklerdir. Her substrat veya substrat grubunun özel bir enzimi söz konusudur. Hücre içinde çok sayıda reaksiyon meydana geldiği için buna çok sayıda enzim karşılık gelir. Oysa çok sayıda kimyasal reaksiyonun oldukça az katalizörü

vardır. Enzimler substratlara göre binlerce kat daha büyük moleküllerdir. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000 üzerine kadar değişen moleküler ağırlığa sahiptirler. Bu husus kimyasal katalizörlerde tamamen tersinedir. Enzimler çok büyük bir moleküller olmakla birlikte asıl reaksiyonu yürüten yeri oldukça küçük bir bölgedir. Bu bölge, substratın bağlanma yerine bağlanarak reaksiyon meydana gelir. Aktif merkez ve bağlanma yerinin durumu anahtarın kilide uymasına benzer bir olaydır [50].

Substratın enzime bağlanması iki şekilde olur;

- Anahtar kilit modeli

Substratlar enzimlerde aktif bölge denilen özel bölgeye bağlanır. Ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Bu modelde enzimin aktif merkezi substrata birebir benzer.

- İndüklenmiş uyum modeli

Enzim aktif bölgesi substrat bağlanmasına uygun ise de, bağlanma sırasında da, hem enzim konformasyonu, hem de substratın şekli biraz değişikliğe uğrayarak aktif kompleksi oluşturur. Bu modelde indüksiyonla oluşmuş uygunluk (induced fit) modeli denir [49].

Enzimler, reaksiyonları milyonlarca kez veya daha fazla (10^6 - 10^{20} kat) hızlandırırlar. Gerçekten biyolojik sistemlerde bazı reaksiyonlar enzimlerin olmaması durumunda sonsuz derecede yavaş ilerlemektedirler. Örneğin CO_2 nin enzim varlığında taşınması (akciğere) enzim olmadığı duruma göre 10^7 kat daha hızlıdır. Bütün reaksiyonlar termodinamik yasalar geçerli olduğu gibi biyokimyasal reaksiyonlarda da termodinamik yasalar geçerlidir [50].

Birim zamanda 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Birimi; Substrat sayısı / mol enzim-birim zaman (sn, dk).

$$k_{cat} = V_{max} / E_T \quad (2.1)$$

Tablo 2.1. Bazı enzimlerin turnover sayıları

Enzim	Turnover sayısı / sn
Katalaz	$5 \cdot 10^6$
Amilaz	$1,9 \cdot 10^4$
Laktat Dehidrogenaz	1000

Bazı enzimler tepkimelerde yan ürün olarak vücutta H_2O_2 meydana getirdiğinden ve bu da vücut için zehirli olduğundan, katalaz enzimi onları sürekli parçalayarak hücreleri korur. Katalaz enziminin parçaladığı H_2O_2 'i demir atomu yalnız başına ancak 300 senede parçalayabilir. Bunun yanında mol başına aktivasyon enerjisi için 18.000 kalori vermek gerekir. Kolloidal platin bu aktivasyon enerjisini 11.700 kal./mol'a, katalaz enzimi de 5500 kal./mol'a düşürür. Bazı enzimler çok özgüldür; yalnız bir substrata etki eder. Örneğin, üreaz yalnız üreye etki ederek onu amonyak ve CO_2 'de parçalar. Hâlbuki bazıları çeşitli substratlara etki eder; dolayısıyla daha az özgüldürler, örneğin peroksidaz başta hidrojen peroksit olmak üzere birçok bileşiğe etki eder. Bazı enzimler yalnız bazı bağlar için özgüldür [48].

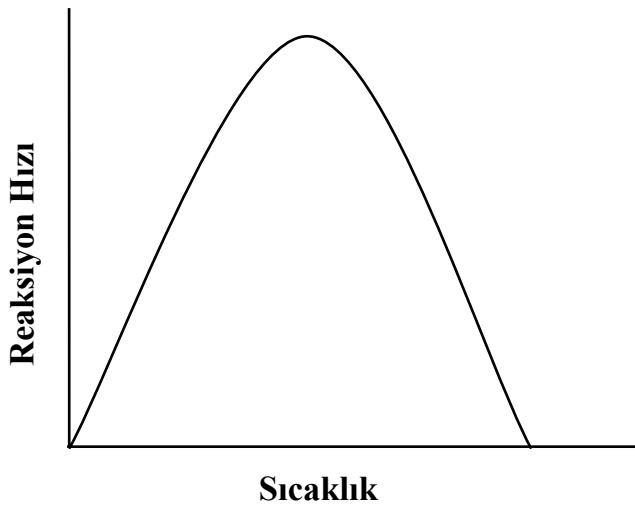
2.1.1. Enzimlere etki eden faktörler

Enzimatik reaksiyonların hızını değiştiren faktörler

- Sıcaklık
- pH
- Enzim konsantrasyonu
- Zaman
- Substrat konsantrasyonu
- Ürün konsantrasyonu
- Çeşitli iyonlar
- Fiziksel faktörler
- İnhibitör

2.1.1.1. Sıcaklık

Enzimatik reaksiyon hızı üzerinde sıcaklığın doğrudan bir etkisi vardır. Bazı enzimler 100 °C sıcaklığa kadar oldukça yüksek ısıya birkaç dakika dayanabildikleri halde enzimlerin çoğu 50 – 60 °C gibi sıcaklıklarda denatüre olurlar. Ancak ısıya maruz kalma süresi çok önemlidir; örneğin oda sıcaklığında birkaç saatlik süre 100 °C’de birkaç saniyelik süreden daha yıkıcı etki yapar. Bu nedenle canlı dokulardan ekstrakte edilen enzimler, soğuk oda, buzdolabı, derin dondurucu gibi yerlerde saklanırlar. Sıcaklık artışı belirli bir yere kadar aktiviteyi artırır. Daha sonra aktivitede düşüş başlar. Aktivitenin maksimum olduğu sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Enzimlerin en büyük kısmı için optimal sıcaklık, ilgili enzimin bulunduğu hücre ortamının sıcaklığında veya onun biraz üzerinde olmak üzere 40 – 60 °C’dir. Doğal sıcak su kaynaklarında çoğalmak üzere adapte olan mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, suyun kaynama noktasına yakın optimal sıcaklık gösterirler. Yüksek sıcaklıktaki aktivite kaybı enzim proteininin denatürasyonundan dolayıdır.

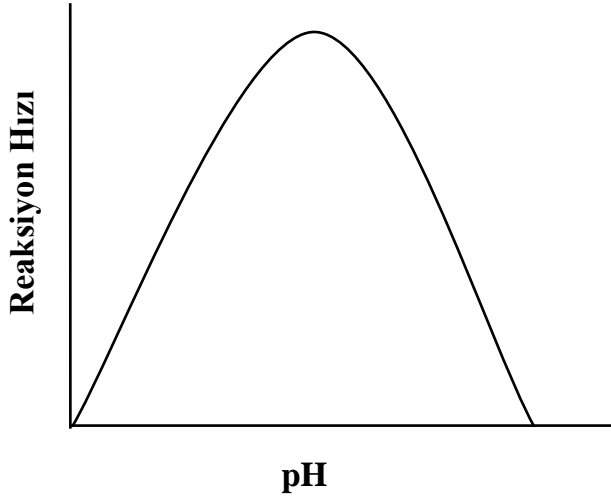


Şekil 2.1. Optimum sıcaklık

2.1.1.2. pH

Enzimatik reaksiyonların hızı farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH’a o enzimin optimum pH’ı denir. Optimum pH’ın her iki yanındaki pH değerlerinde aktivite kaybı söz

konusudur. Bunun nedenleri, pH değişimine bağlı olarak enzimin ya da substratın taşıdığı yüklü grupların tabiatının değişimi ve enzim denatürasyonu'dur.



Şekil 2.2. Optimum pH

2.1.1.3. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doğgun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekölü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Substratın çok bol olduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_o), enzim konsantrasyonu $[E]$ ile doğru orantılıdır.



Şekil 2.3. Enzim Konsantrasyonu

2.1.1.4. Zaman

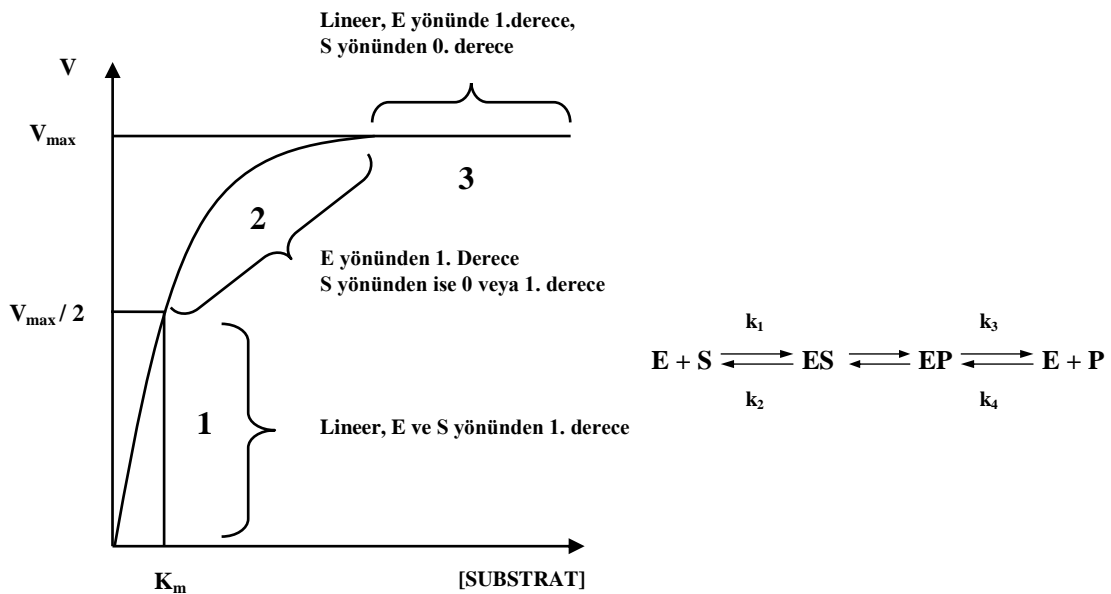
Enzimatik reaksiyonun hızı zamanla azalır. Bunun nedenleri;

- Ürünlerin birleşerek aksi yöndeki reaksiyonu işletmeleri
- Enzimin zamanla inaktive olması
- Reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu
- Substratın tükenmesi olabilir.

Diğer taraftan enzimatik bir reaksiyonda yer alan bileşenlerin miktarları, zamanla değişebilir.

2.1.1.5. Substrat konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir V_{max} düzeyinde sabit kalır.



Şekil 2.4. Substrat konsantrasyonu

2.1.1.6. Ürün konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonlar dönüşümlü olduğu için zamanla ürünlerin birleşerek reaktantlara dönüşümü söz konusu olacaktır. Bu da başlangıç hızını değiştirecektir.

2.1.1.7. Çeşitli iyonlar

Özellikle kofaktör gerektiren enzimler üzerinde metal iyonunun varlığı veya yokluğu ve konsantrasyonu oldukça etkili bir faktördür. Ayrıca aşırı ağır metal iyonu varlığı enzim yapısını bozucu bir faktördür.

2.1.1.8. Fiziksel faktörler

Fiziksel faktörlerin başında ışık ve radyasyon gelmektedir. Işığın enzimler üzerindeki etkisi değişiklik gösterir. Örneğin kırmızı ve mavi ışık tükürük amilazının aktivitesini artırırken UV ışınları azaltmaktadır.

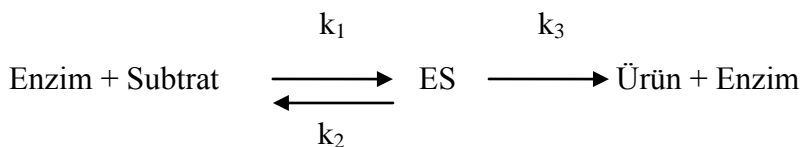
2.1.1.9. İnhibitör

İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler [49].

2.1.2. Enzim kinetiği

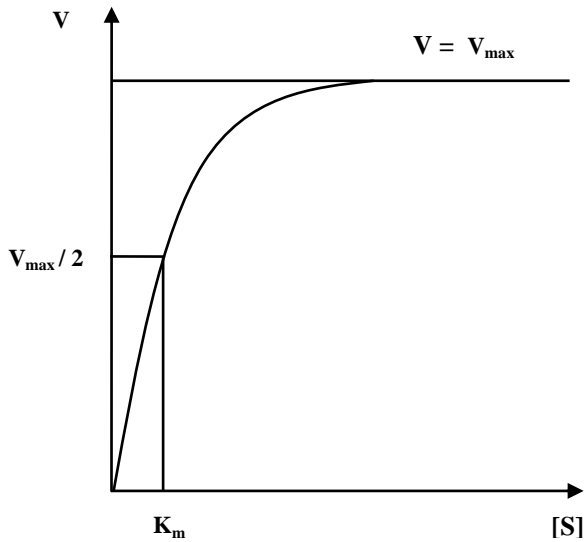
Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir ‘‘Enzim-Substrat kompleksi’’ oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

Enzim kinetiği mekanizması şu şekilde gösterilir.



Burada ES kompleksi, E ve S'dan k_1 hızı ile oluşur. ES'nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca ‘‘Kararlı Durum İlkesine’’ göre ES'nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani derişimi değişmez.

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.5.). Bunun çözümü eşitlik 2.2'deki Michaelis-Menten bağıntısı ile de bulunur.



Şekil 2.5. Michaelis- Menten grafiği

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Burada V_{max} ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max} / 2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

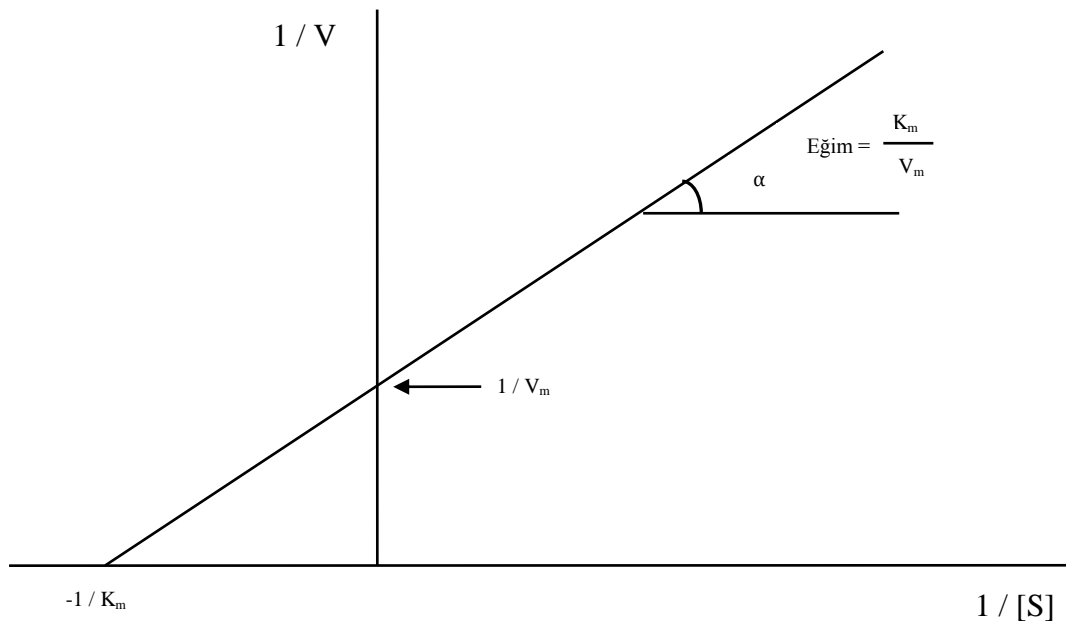
Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir. $V = V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir.

Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleme dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı eşitlik 2.3'deki Lineweaver-Burk denklemdir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.3)$$

Bu denkleme göre ordinatta $1 / V_{max}$, apsiste $1 / [S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m / V_{max} 'dir (Şekil 2.6.) [51].



Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği

2.1.3. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibisyonu, enzimatik bir tepkimenin hızının inhibitör adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulmasıdır. Bazı hastalıkların nedeni, bir enzimin işlevini yerine getirmemesi olabilir; herhangi bir etken bir enzimi inhibe ederek enzimin katalize ettiği kimyasal olayı bozabilir veya bir farmakolojik ajan, bir hastalığı enzim inhibisyonu üzerinden tedavi edebilir. Bazı ilaçlar ve bir kısım kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkilerine engel olurlar ki enzimlerin etkilerini önleyen maddelere enzim inhibitörleri denir. Enzim inhibitörleri ile enzim inhibisyonu reversibel (tersinir) veya irreversibel (tersinmez) olabilir [55].

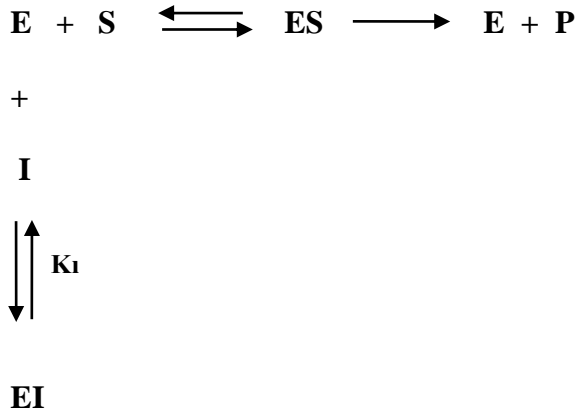
Eğer inhibisyon geri dönüşümlü ise inhibitör enzime nonkovalent olarak bağlanmıştır ve enzim inhibitör kompleksi seyreltilirse inhibisyon geri döner. Eğer seyreltmeye rağmen oluşan inhibisyon geri dönmüyorsa o zaman geri dönüşümsüz (irreversibel) inhibisyondan bahsedilir [52].

Geri dönüşümlü inhibisyon türü vardır. Bunlar;

- Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)

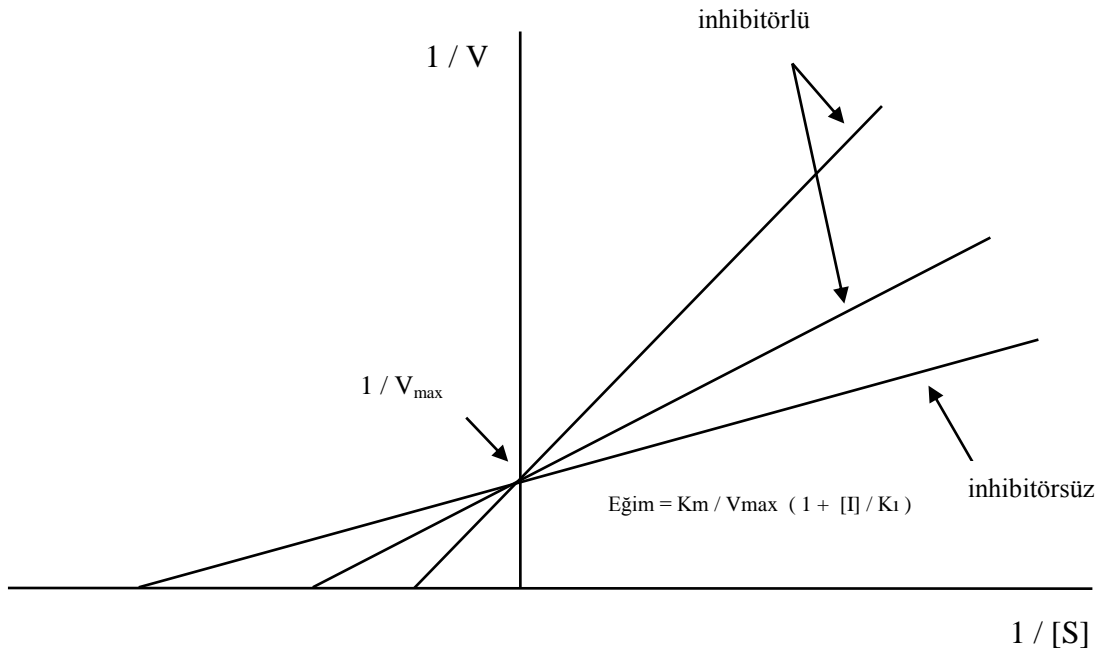
2.1.3.1. Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)

Yarışmalı enzim inhibisyonudur; reversibl enzim inhibisyonunun yaygın bir tipidir. Kompetitif enzim inhibisyonunda, bir kompetitif inhibitör, enzimin aktif yeri için substrat ile yarışır. Enzimin aktif yerine inhibitör bağlanınca reaksiyon gerçekleşmez; inhibitör aktif yeri işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır; K_m değeri büyür. Kompetitif inhibitör, sıklıkla yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi, enzime reversibl bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir; EI kompleksi oluşturmak üzere enzim ile reversibl olarak birleşir:



Şekil 2.7. Kompetitif enzim inhibisyonu

Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör enzime reversibl olarak bağlandığından yarışma, basit olarak daha fazla substrat ekleyerek substrat lehine çevrilebilir. Yeterli substrat varsa bir kompetitif inhibitörün enzime bağlanma olasılığı çok azdır. Bu durumda reaksiyon az çok normal bir V_{\max} değeri gösterir; fakat kompetitif inhibitörün varlığında, yarı maksimal hızın gözlemlendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan K_m değeri artar. K_m değeri üzerine belirgin etki ve V_{\max} değeri üzerine etkinin az veya yok oluşu, kompetitif enzim inhibisyonunun karakteristiğidir.

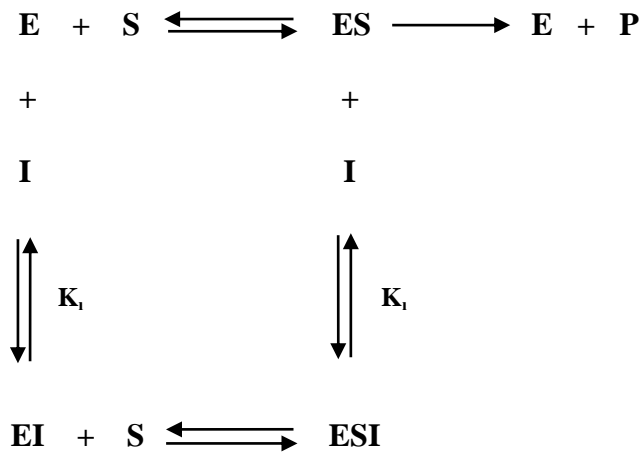


Şekil 2.8. Kompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

Kompetitif inhibitör, Lineweaver-Burk grafiğinin eğimini artırır. Kompetitif inhibisyon, metanol için hastaları tedavi etmek için yararlı olarak kullanılır. Metanol, alkol dehidrojenaz enziminin etkisi vasıtasıyla formaldehite dönüştürülür; oluşan formaldehit, birçok dokuyu harap eder ki gözler özellikle duyarlı olduğundan sıklıkla körlüğe neden olur. Etanol, alkol dehidrojenaz için bir substrat olarak metanol ile etkili bir şekilde yarışır. Metanol ile zehirlenmede tedavi, etanolün hastaya intravenöz infüzyonudur. İntravenöz verilen etanol, formaldehit oluşumunu yeterince yavaşlatarak fazla metanolün zararsız bir şekilde idrarla atılımını sağlar.

2.1.3.2. Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)

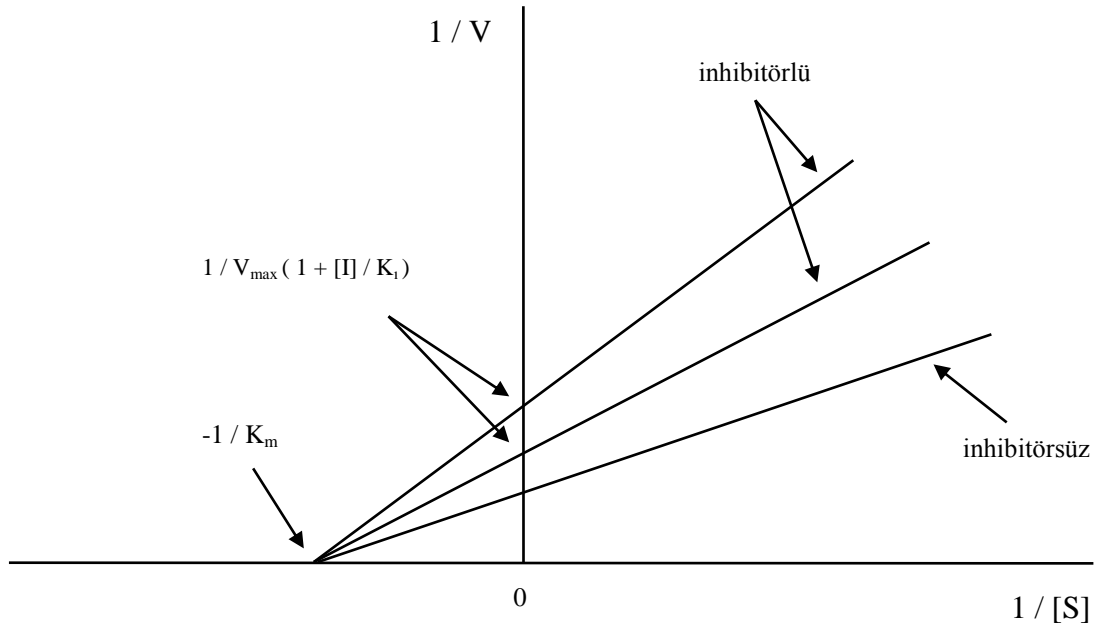
Yarışmalı olmayan enzim inhibisyonudur. Nonkompetitif enzim inhibisyonunda, nonkompetitif inhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır; enzime nonkompetitif inhibitörün bağlanması substrat bağlanmasını bloke etmez, substrat bağlanması da nonkompetitif inhibitörün bağlanmasını bloke etmez. Nonkompetitif inhibitör, kimyasal yapı yönünden substrata benzemez; serbest enzime veya ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine reversibl bağlanarak enzimi inaktive eder:



Şekil 2.9. Nonkompetitif enzim inhibisyonu

ESI kompleksi ürün vermek üzere ES kompleksinden daha yavaş parçalandığı için tepkimenin hızı yavaşlamaktadır. Bu tür inhibisyon ile, tepkimenin V_{\max} değeri

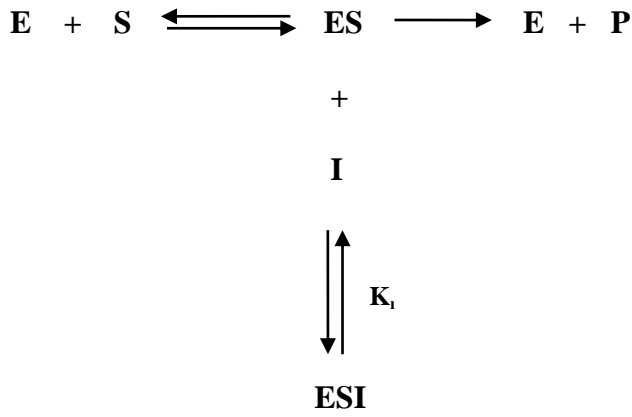
azaldığı halde K_m değeri değişmez. Nonkompetitif inhibitör, aktif enzimin konsantrasyonunu ve dolayısıyla V_{max} değerini belirgin olarak azaltır; yarı maksimal hızın gözlemlendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan K_m değeri üzerine etkisi sıklıkla çok azdır veya yoktur:



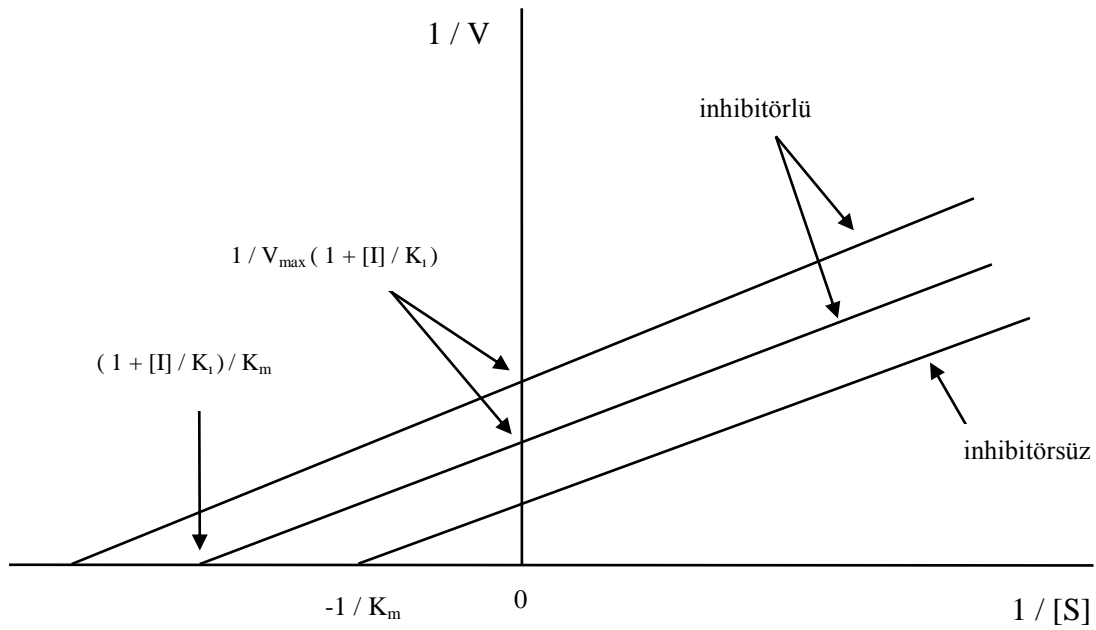
Şekil 2.10. Nonkompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

2.1.3.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (ankompetitif)

Bir enzime bir ankompetitif inhibitörün bağlanması sonucu meydana gelen enzim inhibisyonudur. Ankompetitif inhibitör, nonkompetitif inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde ankompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine reversibl bağlanarak enzimi inaktive eder. Ankompetitif inhibitör, ES konsantrasyonunu azaltır. Ankompetitif inhibisyon sonucu hem V_{max} hem K_m değeri değişmektedir; V_{max} değeri azalırken K_m değeri küçülür.



Şekil 2.11. Ankompetitif enzim inhibisyonu



Şekil 2.12. Ankompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

2.1.4. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları

Birçok enzim, substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna “az” son eki ekleyerek adlandırılır. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırılmalarıdır. Üreaz, ürenin hidrolizini katalize eden; DNA polimeraz ise DNA'nın sentezini katalize eden enzimdir. Pepsin, tripsin, amigdalın,

pityalin, zimaz gibi, substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan, genel bir tanıma uymayan enzim isimleri de kullanılmıştır. Karışık isimlendirmelerin sonucu olarak bazen aynı enzim için iki veya daha fazla ad kullanılmıştır; bazen de iki farklı enzim için aynı ad kullanılmıştır. Böyle belirsiz anlamlılıklar ve yeni olarak keşfedilen enzimlerin sürekli artan sayısı nedeniyle, uluslararası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem benimsenmiştir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır:

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme (elektron transferi) reaksiyonlarını katalize ederler.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalize ederler.
3. Hidrolazlar: Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler.
4. Liyazlar: C-C, C-O ve belli C-N bağlarının yıkımını katalize ederler.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri (izomerik şekil oluşumu reaksiyonları) katalize ederler.
6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların hidrolizi ile birlikte yürüyen karbon ve O, S, N arası bağ oluşumunu katalizlerler [55].

2.2. Peroksidaz Enzimi

Peroksidaz (EC 1.11.1.7) 32 ve 45 kDa arasında bir molekül ağırlığına sahip bir monomerik heme içeren enzimdir. Peroksidazlar bir elektron akseptörü olarak peroksiti kullanır ve çok sayıda donör bileşikleri yükseltger. Peroksitler doğada geniş bir yayılımda bulunurlar ve ökaryot ve prokaryot hücrelerde ifade edilirler.

Bitki peroksidaz üst familyası üç sınıfa ayrılabilir:

- 1.sınıf peroksidazlar prokaryot kaynağının hücre içi peroksidazlarıdır,
- 2.sınıf peroksidazlar mantarimsı peroksidazlardan meydana gelir ve
- 3.sınıf peroksidazlar ise daha yüksek bitki peroksidazlarıdır [56].

Organizmalarda geniş bir yayılımı olan peroksidaz çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Bitkilerde bulunan peroksidaz, bayırturpu kökü, ıspanak yaprakları, tomates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı hücrelerinden saflaştırılmaktadır [57].

Belirlenen ilk 3.sınıf peroksidaz yapısı yerfıstığı peroksidazıdır. Bayırturpu peroksidazı (HRP)'nin kristal yapısı 1997 de kaydedilmiştir. Arpa tane peroksidazı ve soya peroksidazı sırasıyla 1998 ve 2001 de kaydedilmiştir.

Çoğu yüksek bitkiler birkaç peroksidaz (Prx) izozimlerine sahiptirler. Bunlar genellikle üç alt grupta sınıflandırılırlar: izoelektrik noktaları üzerinde temellendirilen anyonik, nötral ve katyonik peroksidazlardır [56]

Bitkilerde bulunan peroksidaz (EC1.11.1.7) enzimi bir demir içeren enzim olup prostetik grup olarak ferriprotoporfirin III içerir. Bu enzim membran bağımlı formlarında (mPOD) ya da çözünür halde bulunmaktadır. Kırmızıturptan elde edilen iki mPOD izoenziminin moleküler ağırlığı 44 ve 45 kDa olup çilekten elde edilenlerin moleküler ağırlığı ise 58,1 ve 65,5 kDa olarak bulunmuştur. Bitki peroksidazları peroksit için belirli ihtiyaçlara sahip olup bunlar peroksit çöpçüleri olarak düşünülebilir. Peroksidin varlığında bitki dokularından izole edilen peroksidazlar, guiakol, pirogallol, klorojenik asit, katekin ve katekol gibi fenolik bileşiklerin geniş bir alanını oksitleyebilir [35].

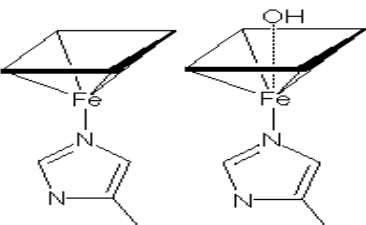
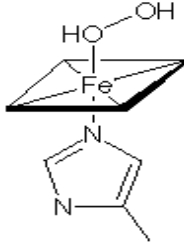
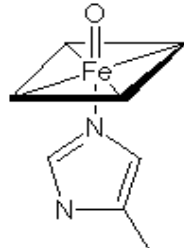
HRP, hidrojen peroksit ile substratların geniş bir çeşitliliğinin oksidasyonunu katalize eder. HRP izozim C (HRPC), 308 amino asit artığı, molekül başına 2 kalsiyum iyonu ve bir demirli heme prostetik grup içermesiyle molekül ağırlığı 34,520 Da olmaktadır [58]. Yüksek bitki peroksidazının en çok çalışılan örneği bayırturpu peroksidazıdır (HRP). HRP yükseltgen madde olarak peroksiti kullanarak

fenolik bileşiklerin oksidatif eşleşmesini katalize eder. Reaksiyon üç basamaklı çevrimsel bir reaksiyondur. Bu reaksiyonda enzim ilk olarak peroksit tarafından oksitlenir sonra indirgeyici substratlar (tipik olarak bir küçük fenol türevi) tarafından elektron transferi adımlarında indirgenir. Oksitlenmiş fenolik radikaller, radikalın kimyasal karakterine, çevreye ve kullanılan peroksidaz izozimine bağlı olarak son ürün ile polimerleştirilir. Doğal HRP'nin optik spektrumu bileşik I ve bileşik II'yi enzimatik reaksiyon halkasında üç adımda karakterize eder.

Peroksidazlar başlıca bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur. Birbirini izleyen benzerliğin temelinde heme peroksidazlar iki üstfamilya içinde sınıflandırılabilir. Bunlar;

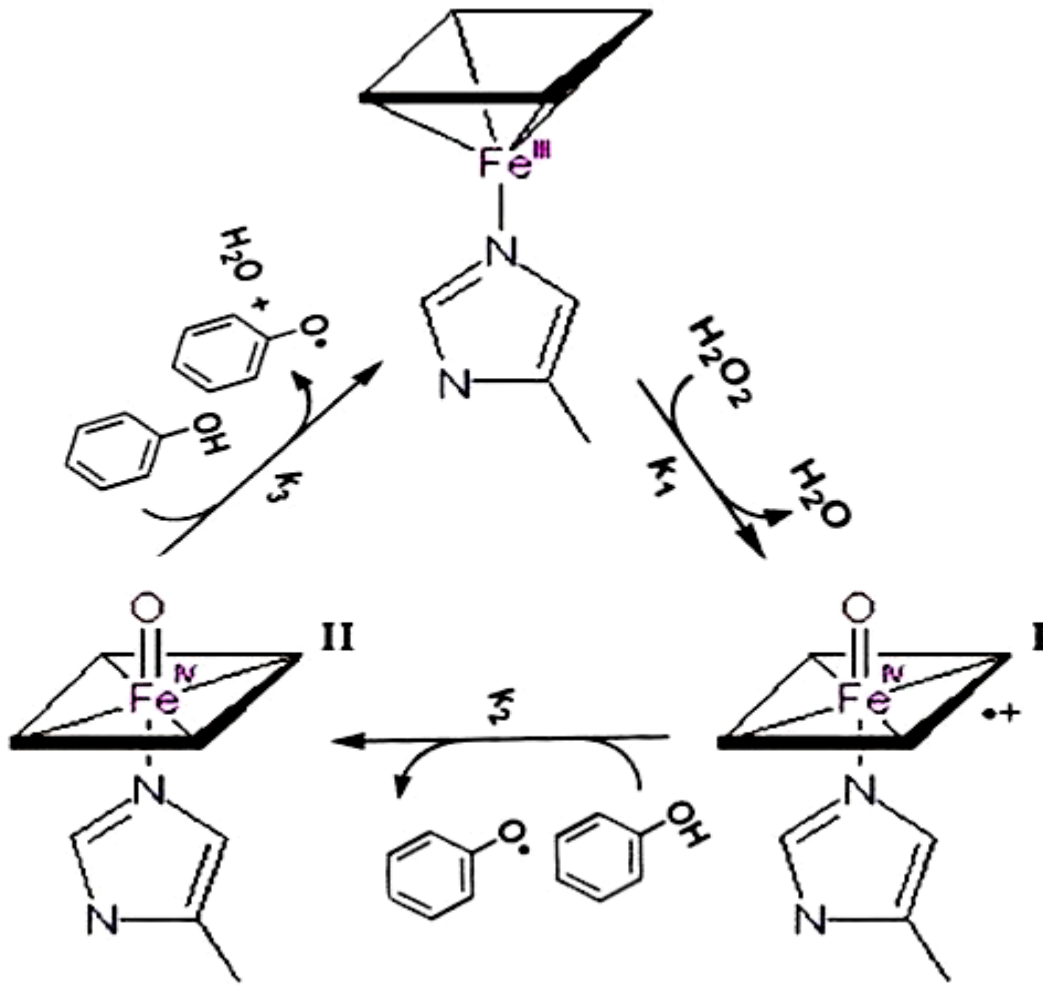
- Mantar, bitki ve bakteri peroksidazları
- Hayvan peroksidazlarıdır [56].

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7) oksidant olarak organik hidroperoksitleri ya da hidrojen peroksitleri kullanırlar [59]. Peroksidazlar, hidrojen peroksiti kullanarak çoğu organik ve inorganik substratların bir elektron oksidasyonunu katalize etmesi heme protein enzimlere bağlıdır. Peroksidazlar hücre duvarı bileşenleri formlarına iyonik ya da kovalent olarak bağlı olup bitki hücreleri içinde mevcuttur. Bu enzimler, hücre duvar-bağı peroksidazı ile hücre uzaması, odunlaştırma prosesi ve bitki savunma mekanizmaları gibi çeşitli proseslerde bulunan yüksek bitkilerde yaygındır [30]. Bu enzimler hücre içi boşluklarda, hücre içi cisimciğinde, plazmada ve hücre duvarının içinde ve dışında bulunabilir. Bu enzimler bitki hücre bölmelerinde birkaç izoenzimin varlığı yoluyla belirtilmiş çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Peroksidazlar bitki hormon düzenlemesinde, savunma mekanizmasında, hücre uzamasının kontrolünde, uzamanın polimerizasyonunda, hücre duvarı polisakkaritlerinin çapraz bağlantısında ve lignin biyosentezlerinde bulunmaktadır [31].

Heme tipi	Heme demir koordinasyonu	Eksensel demir ligandı (s)	Uygun demir oksidasyonu ve spin durumları
	 <p>Beşlikoordinat / altılı koordinat</p>	N_{His}^{ϵ} ; H_2O, OH^{-}	$Fe^{II} (S=2)$; $Fe^{III} (S=5/2)$
	 <p>Altılı koordinat</p>	N_{His}^{ϵ} ; $H_2O,$ H_2O_2, O_2	$Fe^{II} (S=0)$; $Fe^{III} (S=1/2)$
Heme b	 <p>Altılı koordinat</p>	N_{His}^{ϵ} ; $O (O \cdot)$	$Fe^{IV} (S=1)$

Şekil 2.13. Heme b grubu

Peroksidaz bir oksidoredüktaz olup H_2O_2 ile çeşitli elektron donörlerinin oksidasyonunu katalize eder ve prostetik grup olarak 'b'-tip heme taşır [37].



Şekil 2.14. Peroksidaz enziminin reaksiyon mekanizması

Bu mekanizmada enzim, Fe^{IV} içeren bir porfirin katyon radikali olan bileşik I'i oluşturmak için peroksitin bir ekivalenti ile reaksiyon verir. Bu iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu olup bu reaksiyondaki hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. Bir oksitleme ekivalenti ortadaki oksiferrili ($Fe^{IV}=O$) vererek demir üzerine yerleşir. Bileşik I sonra bir substrat radikali vermek için organik bir substratı yükseltger. Bileşik I, bileşik II ürünü vererek ikinci bir reaksiyona maruz kalır. Bileşik II normal(dianyonik) bir porfirin ligand için düzenlenmiş oksiferril bir merkez içerir. Sonuç olarak bileşik II bir diğer substratla etkileşerek doğal haline geri indirgenir [60].

2.2.1. Peroksidaz enziminin uygulamaları

Kavramsal değerlerin yanı sıra peroksidazlar bazı pratik uygulamalara sahip olduğu bilinir. Porfirin ya da metalloporfirin içeren enzimler(heme peroksidazlar içeren) diğer biyomedikal cihazlar ve biyosensörler için yeniden kullanılabilir katalitik tabakaların oluşumu içindeki bu enzimlerin kullanımını sağlayan optik ve elektrokimyasal özellikleri açıklar. Peroksidazlar pH, DNA, çinko, bakır ve diğer metallerin belirlenmesi için floresans sensörler içinde uygulandı. Bitki peroksidazları arasında çoğu çalışılan enzimler doğal ya da rekombinan bayırturpu peroksidazları (HRP)'dır. Bunlar geniş olarak, kirletilmiş suların yeniden çözümü, organik bileşiklerin biyotransformasyonu, organik sentezleri ve H₂O₂ algılanması için biyosensörlerin oluşumu için kullanılır [30].

Bayırturpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazı (HRP, E.C.1.11.1.7) günümüze ait sistem kontrollerinde çok önemli bir enzimdir: bağışıklığa ait analizlerin yaklaşık % 80'i, konjuge bir enzim olarak peroksidaz ile enzim-antikor eşleniklerini kullanır [61].

Bayırturpu peroksidazı çoğu farklı bağışıklığa ait kimyada serumda bulunan antikor özelliğine sahip proteinler için bir marka gibi geniş olarak kullanılır. HRP birkaç farklı metod yoluyla antikorlara konjuge edilebilir. HRP antikorlar için en çok istenen markadır. Çünkü o çok küçük ve üç popüler enzim markalarının en kararlısıdır (HRP, alkalın fosfat ve β -galaktozidaz) [54].

Peroksidazlar fenollü reçine sentezleri için katalizör olarak, gıda prosesi süresince şekillenen reaktif oksijen türleri için indikatör olarak ticari alanlarda kullanılır. Peroksidazlar bitki krallığında geniş olarak bulunmasına rağmen şu an ticari olarak elde edilebilir peroksidazın büyük kaynağı HRP' dir [62].

Fenolik bileşikler çeşitli endüstriyel aktiviteler vasıtasıyla üretilmiş organik kirletici maddelerin başlıca sınıflarından biridir. Örneğin 2000 yılında krezoller, nitrofenoller, klorofenoller, katekol, 4,4'-izopropilidendifenol(bifenol A), 2-fenilfenol ve fenol içeren fenolik artıkların 97000 tondan daha çoğu Amerika Birleşik Devletlerinde

üretimiştir. 2000 yılında üretilen fenolik artıkların aşığı yukarı 6800 tonu hava emisyonu, yüzey suyu akıntısı, toprak düzenlemesi ve yer altı akıntısı yoluyla çevreye salınmıştır. Fenolik bileşiklerin çevresel etkileri ve zehirliliğı, aromatik halka üzerinde değıştirilen grupların yerlerine, tiplerine ve sayılarına bağılı olarak değışir. Bu kimyasallar insanların içerdığı çeşitli organizmalar için zehirli olduğı düşünölmektedir. Ek olarak, bifenol A ve alkil fenoller gibi bazı fenolik kirletici maddeler çok küçük konsantrasyonlarda bile aktiviteleri bozarak potansiyel endokrine hükmeder. Bazı alkilfenoller ve klorofenoller gibi fenoller yüksek derecede tepkisizdir şöyleki geleneksel biyolojik prosesler bu bileşenleri etkin olarak gideremeyebilir. Bu yüzden çok etkili işlem proseslerinin geliştirilmesi endüstriyel atık akıntılarında ve çevreden oluşun bu fenolik kirletici maddelerin giderilmesi için istenmektedir. Yeni işlem seçenekleri arasında bayırturpu peroksidazı gibi bir peroksidaz ve hidrojen peroksiti kullanan bir enzimatik proses yüksek verimlilik ve seçicilik ile sulu çözeltilerden oluşun çeşitli fenolik kirletici maddeleri gidermede çok etkinlik gösterir. Peroksidaz hidrojen peroksitin varlığında çeşitli fenolleri ve anilinlerinin dehidrojenasyonunu katalize eder [44].

Peroksidaz endüstriyel atık sularının işlenmesi için kullanılabilir. Örneğın önemli kirletici maddeler olan fenoller bayır turpu peroksidazı kullanılarak enzim katalizli polimerizasyonu yoluyla ortadan kaldırılabilir. Bu yüzden fenoller, fenollerden daha az toksik olan oligomerler ve polimerlerin üretildiğı reaksiyonlara katılan fenol radikallerini oksitler.

Bunun yanında peroksidazlar sert reaksiyon şartlarını gidererek sert kimyasalların bir kaçınının alternatif bir seçimi olabilir. Yapıştırıcılar, bilgisayar çipleri, araba parçaları ile konserve kutuları ve davul astarları gibi çoğı üretim proseslerinde peroksidazın kullanımı hakkında bir çok araştırma vardır [63].

POD, yumru kökleri, yapraklar ve meyveler gibi geniş kaynaklardan karakterize ve izole edilebilmektedir. Bazı yaprak kaynaklarında bulunan POD arpa, pirinç, tütün gibi türlerden saflaştırılmıştır. POD enzim bağışıklık analiz kitlerinde ve laboratuvar deneylerinin klinik teşhisi için belirteçlerin önemli bir bileşeni olarak geniş bir şekilde kullanılır. POD geniş endüstriyel uygulamalara sahip olan bir enzimdir. POD

atik sularda oluşan toksik fenollerin bozulmasında, sentetik boyaların renk giderilmesinde, organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunu katalize edebilir ve şimdi POD diğerlerine nazaran deterjan formulasyonunun yeni bir alanını sunmaktadır [37].

POD'nin yüksek termal kararlılığı ve aktivite ölçümünün kolaylığından dolayı, peroksidaz artık aktifliği bitkilerin ısı prosesinin ölçülüp ölçülmediğini sıkça belirler. Peroksidazlar aynı zamanda çeşitli polimerleri sentezlemek, organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonu ilerletmek ve biyotedavi dolayısıyla serbest radikallere yol açan gittikçe artan çekici katalizörler oluyor [40]

Peroksidaz (EC 1.11.1.7) bitki sistemi içinde serbest radikallerin (peroksitler) giderilmesinde çok önemli bir rol oynadığı bilinen enzimlerin bir grubunu içerir. Bu enzim laboratuvar deneyleri ve kimyasal sistem kontrollerinde önemli bir bileşik olarak bir kaç ticari uygulamalarda dahi kullanılmaktadır. POD'nin daha geniş katalitik aktivitesinden dolayı, kimyasalların geniş bir dağılımı POD kullanılarak düzeltilebilir ve bu yüzden çeşitli aromatik bileşiklerin sentezleri, atık sulardan fenollerin ve gıdalarda bulunan peroksitlerin giderilmesi, içecekler ve endüstriyel atıklar gibi uygulamalar için kullanılabilir. Uzun yıllar bayırturpu sadece POD'nin ticari kaynağı olmaktadır. Fakat, diğer kaynaklar dahi benzer ya da daha iyi substrat belirlilikleri ile peroksidazları sağlayabilir. Ham kaynaklardan saflaştırma ve daha yüksek üretim maliyeti çoğu endüstriyel uygulamalarda bu çok yönlü enzimin kullanımını sınırlar. Bu yüzden enzim için bulunmuş alternatifler için sürekli olarak verilen çaba, farklı kaynakların araştırmasıyla sonuçlanmaktadır [41].

2.3. Deve Dikeni (*Silybum marianum*)

Dünya üzerindeki bitkilerin yaklaşık 20.000 türü tıbbi amaçla kullanılır. Türkiye'de yetişen 8500 türden sadece 500 kadarı tedavide kullanılıyor.

Deve dikeni (*Silybum marianum*), bileşikgiller (Asteraceae) familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Deve kengeli, meryemana dikeni, sütlü kengel olarak da bilinir. Deve dikeni, yol kenarlarında yetişir. Boyu 30-100 cm arasında değişir.

Başçıkları, dikenli ve açık yeşil renkli yapraklar ile mor renkli küçük çiçeklerden oluşur.

2.3.1. Tarihçesi

Meryemana dikenli tohumları yaklaşık olarak 2000 yıldır karaciğer hastalıkları ile ilgili olarak kullanılan bir bitkidir ve bu bitki ile ilgili araştırmalar yaklaşık 30 yıl önce 1958'de başladı. 10 yılın sonunda ise Münih üniversitesinden H.Wagner başkanlığındaki bir araştırma grubu silymarin olarak bilinen bir bileşiği tohumlarından ayırmayı başardılar.

2.3.2. Morfolojik özellikleri

Bitki 1 – 1,5 m yüksekliğinde gövdesi köşeli seyrek tüylü 1 - 2 yıllık otsu bir bitkidir. Çiçekleri; baş şeklinde olup bir arada toplu görünümündedir. Meyveleri ise 7 mm kadar uzunlukta esmer renkli uç kısımlarında 15 mm kadar uzunlukta düşücü ve beyaz renkli bir tüy demeti bulunur. Rozet yapraklar kalsiyum karbonat birikmesinden dolayı beyaz renklidir. Tohumu ise; koyu renkli oval farklı yüzeylerden oluşmuştur ve 6 mm uzunluğundadır.

2.3.3. Kimyasal özellikleri

Bu bitkinin bileşiminde karaciğeri koruyucu etken maddeler ve kendine has diğer maddeler bulunmaktadır. Bunlar; flavonolignandan meydana gelen silymarin, taxifolin, quarcetrin, albumin, müsilaj, sabit yağ ve acı maddelerdir.

Meryemana Dikenli ekstreleri % 70 – 80 silymarin içermesinden dolayı antioksidan etki göstererek karaciğerin serbest radikallerinin zararlarından korur. Aynı zamanda karaciğer hormonlarının ilaçların ve kimyasalların detoksifikasyonundan sorumludur.

Tohumları; % 25 – 30 sabit yağ, nişasta, tanen, silymarinler ki bunlar: silybin, silydianin ve silychristin içermektedir. Silymarin bileşiklerinin karaciğer hücrelerinde ribozomal RNA moleküllerini stimüle ederek protein sentezini arttırdığı

sanılmaktadır. Aynı preparatlar mantar zehirlenmelerinde amonitin ve pholloidin alkaloidlerinin karaciğerde zehir etkisini önleyici olarak da kullanılmaktadır.

Meryemana Dikeni bitkisinde bu maddeler yanında, tyramin, flavonid, histamin, reçine, âmine, albümin, agmatin maddeleri de bulunmaktadır.

2.3.4. Tıbbi etkileri

Bu bitki üzerinde yapılan klinik araştırmalar ve deneyler sonucu içerisindeki kimyasal maddelerin vücudumuzun ikinci büyük organı olan karaciğer hastalık ve problemlerinde tedavi olarak ve de karaciğeri kuvvetlendirici amaçlı kullanabileceğini açıkça ortaya koymuştur.

Önceleri sadece Almanya'da daha sonra ise Avrupa'nın birçok ülkesinde araştırmalar sonucu görülmüştür ki kronik hepatiti yani karaciğer iltihabı dahil, aşırı alkol ve bazı ilaçların neden olduğu kolonjit (safra yolu iltihabı) ve sirozda da bu bitkide bulunan maddelerin oldukça etkili olduğu saptanmıştır.

Karaciğer vücudumuzun kimyasal fabrikası gibi çalışarak sağlığımızın sürdürülmesinde önemli rol oynar. Yağların yakımı ve parçalanması için gerekli safraı üretir. Kanımızdaki nikotin, alkol ve karbonmonoksit gibi zehirleri zararsız hale getirir. Karaciğer aynı zamanda A, D, E ve K vitaminlerin de depolandığı yerdir. Meryemana Dikeni tüm karaciğer fonksiyonlarını destekler ve yeni karaciğer hücrelerinin oluşmasında yardımcı olur. Bu bitkinin içeriğindeki silibin maddesi aynı zamanda kuvvetli bir antioksidan olup sigara, alkol ve kirli hava ile alınmış olan zehirli maddeleri oksidatif zarar sonucu üretilen serbest radikalleri etkisiz hale getirir.

Silymarin aynı zamanda iyi bir kan temizleyici olup psoniasiz yani; sedef hastalığı içinde faydalıdır. Karaciğerin temel görevlerinde olan infiltrasyon (filtre etme) özelliğinden dolayı sedef hastalığı ile ilişkisi vardır.

Silymarin karaciğer hormonlarının, ilaçların ve kimyasallarının süzülüp

temizlenmesinden sorumlu glutathione maddesinin oranı % 35'in üzerine çıkmaktadır. Silymarin karaciğere zarar veren leukotrieneler için kuvvetli bir engelleyici olduğu gibi karaciğere karşı koruyucu etkisi birçok deneysel ve klinik çalışmalarla ispatlanmıştır. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda silymarinin siroz, kronik hepatit, karaciğerin yağ infiltrasyonu, hamilelikte safra akımının kesilmesi, cholangitis yani; safra kanalları iltihabı ve pericolangitis (safra kanalları çevresindeki doku ve oluşumlarının iltihabı) gibi birçok karaciğer hastalığı üzerinde pozitif etkisi olduğu da gösterilmiştir.

Ayrıca silymarin maddesi karaciğer zehirlenmelerinde özellikle amonitha phalloides ile olan mantar zehirlenmelerinde çok etkilidir. Etken bileşik silymarin karaciğerin hücre çekirdeğinde polimeraz A'nın aktivitesini stimüle eder ve karaciğer rejenerasyonu (yenileme) kabiliyetini artırır. Bu bitki droğunun antihepatitoksik etkisi yanında kologog etkisi de vardır. Bunların yanında antidepresan (sakinleştirici) etkiside görülmektedir [53].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler

Bu çalışmada kaynak bitki olarak kullanılan deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisi Sakarya bölgesinden toplanılmış olup POD enziminin izolasyonu için kullanılmıştır.

Çalışmalarımız süresince polivinil piroolidon (PVP), triton-x 100, askorbik asit ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojenfosfatın kullanıldığı tampon çözeltiden oluşan karışım izolasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Sitrik asit mono hidrat, sodyum sitrat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, tris amino metan hidroklorid ve trizma-base kimyasalları tampon çözelti hazırlama işlemlerinde kullanılmıştır. 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin substratları kinetik çalışmalarında kullanılmıştır.

Çalışmada alet ve cihaz olarak Shimadzu UV-2401 PC UV-VIS recording spectrophotometer marka UV, derin dondurucu, pH metre, otomatik pipetler, hassas terazi, blender, manyetik karıştırıcı ve santrifüj kullanılmıştır.

3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu

Dondurucuda depolanmış deve dikenini bitkisinin gövde ve çiçek tablası tohumlarından 8'er gram alınarak ince ince doğranmıştır. % 0,5 polivinil piroolidon (PVP), % 4 triton-x 100 ve 0,001 M askorbik asit içeren 56 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti blender da 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Bu karışım ham enzim ekstratı olarak adlandırılmıştır.

3.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Ham enzim ekstraktı hızlı bir şekilde süzöldükten sonra santrifüjde 5.000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant, amonyum sülfat kullanılarak % 60 doygunluğa getirilmiştir. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı şu formülle tespit edildi.

$$g[(NH_4)_2SO_4] = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3,54 - S_2$$

V = Süpernatant

S1 = 1' in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2 = 1' in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı $(NH_4)_2SO_4$ yavaş yavaş ve az miktarlarda ilave edilerek katıldı. Her ilave sırasında daha önce katılan $(NH_4)_2SO_4$ 'ların çözülmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdü. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra % 60 doygunluğa getirilen süspansiyon hızlı bir şekilde ince bir tülbentten süzölerek 5.000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Her santifirüj işleminden sonra enzim varlığına bradford çözeltisi ile bakılmıştır. Tüm bu işlemler +4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. Diyaliz torbası, içinde pH = 7,0 fosfat tamponu bulunan geniş bir behere yerleştirilerek 24 saat süreyle diyaliz edildi. Bu işlem sırasında tampon çözelti en az 3 - 4 defa değiştirilmiştir.

Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek veya konsantre etmek için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdaki uzaklaştırmakta kullanılır.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işleminden sonra elde edilen enzim çözeltisi kısmen saflaştırılmıştır. Kısmen saflaştırılmış olan POD enzimi bir sonraki adım olan jel filtrasyon kromatografisi işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.2. Jel filtrasyon kromatografisi

Proteinlerin molekül büyüklüklerinin farklı olması dolayısıyla yapılan bir ayırma yöntemidir. Moleküller, dolgu maddesi (jel) ve çözücü sistemi arasında dağılır. Kolona verilen büyük moleküller, jel taneciklerinin boyutundan çok büyük ise kolonu önce terk eder. Küçük moleküller ise jel tanecikleri içine girerek orada alıkonurlar. Kolonun üzerine sürekli çözücü verilerek jel taneciklerinde bulunan küçük moleküller elue edilirler. Orta boyuttaki moleküller ise jel taneciklerine tamamen girememektedir. Bu nedenle moleküller kolondan büyüklüklerine bağlı olarak elue edilmektedir [64].

1,5 gram Sefadex G-100, 50 ml 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0) 4 gün bekletilerek jel oluşması sağlanmıştır. 1 cm çapında ve 50 cm boyundaki kuru bir kolonun dibine cam pamuğu yerleştirilip üzerine tampon çözelti ilave edilmiştir.

Sefadex G-100 bir huni yardımı ile kolona verildikten sonra musluk açılarak jelin kolona homojen olarak yerleşmesi sağlanmıştır. Kolonun üzerinden tampon çözeltisi geçirilerek akış hızı ayarlanmıştır. Kolon tampon içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra enzim numunesi 15 ml halinde kolona uygulanır. 1,5 ml'lik kısımlar halinde epindof tüplerde toplanmıştır. Proteinin varlığına bradford çözeltisi ile bakılmıştır. Epindof tüplerde toplanan enzim daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda depolanmıştır.

3.3. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu

Yapmış olduğumuz bütün çalışmalar hidrojen peroksit varlığında gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi, peroksidaz enziminin hidrojen peroksit substratı varlığında diğer bir substrata karşı aktivite göstermesidir.

3.3.1. Substrat spesifikliği

Optimum substratı belirleyebilmek amacı ile POD enziminin 9 farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin substrat olarak kullanılmıştır.

3.3.2. Optimum substrat konsantrasyonu

En yüksek aktiviteyi bulabilmek için kullanılan substratların 0.05 mM ile 50 mM arasında değişen konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak en fazla aktivite gösterdikleri konsantrasyon belirlenmiştir.

3.3.3. pH etkisi

POD enzimi aktivitesi 3,0 ile 9,5 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile 9 farklı substrat kullanarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen daimin) tayin edildi.

Bunların enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

pH 3,0 ile 9,5 arasındaki çeşitli tampon çözeltiler aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanılmıştır.

pH'ları 3,0 – 6,0 arasındaki tamponları hazırlamak için;

5,26 gram sitrik asit monohidrat saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti A çözeltisidir. 7,353 gram sodyum sitrat saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti B çözeltisidir.

A ve B çözeltilerinin aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırılması ile istenilen pH'larda tamponlar hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. 0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması

PH	A (ml)	B (ml)
3,2	45	8
4,0	25	10
4,7	15	15
5,0	15	20
5,5	10	25

pH'ları 7,5 - 9,5 arasındaki tamponları hazırlamak için;

3 gram tris amino metan hidroklorid saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti A çözeltisidir. 3 gram trizma-base saf su ile 150 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti B çözeltisidir.

A ve B çözeltilerinin aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırılması ile istenilen pH'larda tamponlar hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması

PH	A(ml)	B(ml)
8,0	30	30
8,5	6	25
9,0	5	45

3.3.4. Sıcaklığın etkisi

POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışı izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Bu çalışmada substrat olarak 4-metil katekol, ABTS, guaiakol, kafeik asit, o-dianisidin,

o-fenilen diamin, progallol ve katekol kullanılmıştır. Her bir substrat 10 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

3.3.5. Enzim kinetiği

Enzimin maksimum hızının (V_{max}) ve Mizhaelis-Menten sabitinin (K_m) bulunması için kinetik çalışmalarda 0,05 mM ile 50 mM arasında değişen substrat çözeltileri, stok olarak hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra spektrofotomerik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

3.3.6. İnhibitör etkisi

POD enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisini incelemek için sodyum azide, tiyoüre, askorbik asit, potasyum siyanür, 2-merkapt etanol, L-glutasyon, L-sistein ve sodyum sülfid olmak üzere toplam 8 adet inhibitör kullanılmıştır. Her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan I_{50} değerlerinden faydalanarak yapılmış olan inhibisyon çalışmaları doğrultusunda ne tür inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında her inhibisyon türüne karşılık K_i değerleri hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek amacıyla 3 mM'lık sabit substrat konsantrasyonunda bir aktivite tayini baz alınarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör aktiviteleri tayin edildi ve % olarak hesaplanarak her bir inhibitör için % Bağlı Aktivite - $[I]$ grafikleri çizildi. Bu aktivite tayinleri 4-metil katekol substratı eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen grafiklerden enzim aktivitesini yarıya indiren substrat konsantrasyonu olan I_{50} değerleri hesaplandı. K_i değerlerini hesaplamak amacıyla da her bir inhibitör için ilk aşamada inhibitörsüz olmak üzere farklı konsantrasyonlarda aktivite tayinleri yapıldı. Buna karşılık inhibisyon aktivite tayinleri için I_{50} değerlerinden faydalanarak inhibitör konsantrasyonları belirlendi. Bu inhibitör konsantrasyonları sabit tutularak farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen veriler

doğrultusunda $1/V$ 'ye karşılık $1/[S]$ grafikleri çizildi. Bu grafikler yardımıyla inhibisyon türü ve K_i değerleri hesaplandı. Hesaplanan K_i değerlerinin ortalamaları alınarak da her bir inhibitör için ortalama K_i değerleri hesaplandı.

3.3.7. Metallerin etkisi

POD enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak ağır metaller ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir.

Ağır metallerin etkisini incelenmesi amacıyla sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} metal iyon çözeltilerinden 3 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir.

3.3.8. Enzim depolanma kararlılığı

Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek amacıyla ilk önce oda sıcaklığında aktivitesindeki azalma saat başı 420 nm'deki 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Burada substrat olarak 3mM 4-metil katekol ve 1 mM H_2O_2 kullanılmıştır.

Enzimin $-20\text{ }^{\circ}C$ 'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim $-20\text{ }^{\circ}C$ 'de saklanarak 3 - 4 günde bir 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedildi. Yine substrat olarak 3 mM 4-metil katekol ve 1 mM H_2O_2 kullanılmıştır.

3.3.9. Kolon çalışması

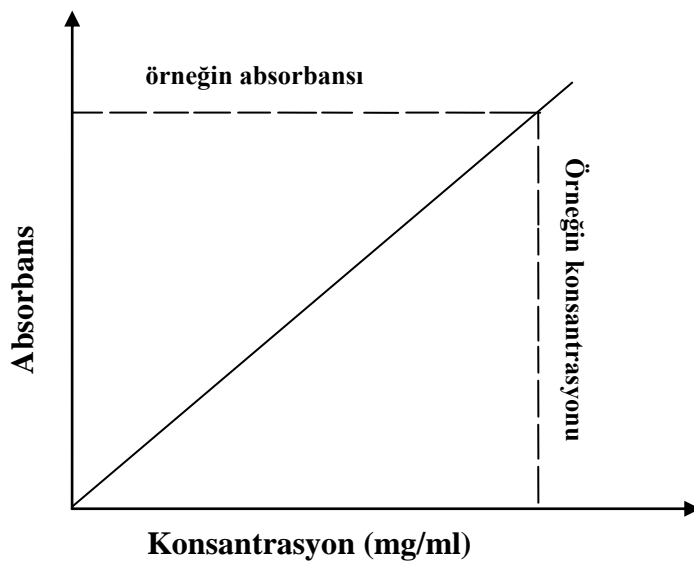
Daha önce jel filtrasyon kromatografisi işlemi sonrasında kısmen saflaştırılmış olan POD enzimi 12 epindof tüpde toplanmış olup $-20\text{ }^{\circ}C$ 'de derin dondurucuda depolanmıştır. Bu 12 epindof tüp içerisindeki kısmen saflaştırılmış POD enziminin aktivitesi, 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Bu çalışmada substrat olarak 3 mM 4-metil katekol ve 1 mM H_2O_2 kullanılmıştır.

3.3.10. Bradford metodu

Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5 - 100 µg/ml); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorbanı verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanı vermesidir [64].

3.3.10.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini

Bradford yöntemi Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanı verir. Bu deneyde standart protein çözeltileri, sığır serum albumini (BSA) kullanılarak hazırlanmış ve standart grafikleri çizilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford yönteminin standart grafiği

Bu amaçla bizim çalışmamızda standart protein grafiğinin elde edilmesi için 1 mg/ml serum albumin miktarı olacak şekilde 250 ml serum albumin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl alınmıştır. Hacim 1 ml Bradford ile tamamlanmıştır. 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart protein grafiği elde edilen sonuçlara göre çizilmiştir. Jel filtrasyon ve diyaliz işlemleri sonucu elde edilen kısmen saf enzim 595 nm'de absorbansı ölçülerek standart protein grafiği ile protein miktarı tayin edilmiştir.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR

4.1. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması

POD enzimi izolasyonu, bölüm 3.2.'de anlatıldığı gibi % 0,5 polivinil piroolidon (PVP), % 4 triton-x 100 ve 0,001 M askorbik asit içeren 56 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak yapılmıştır. Bitki kaynağı olarak deve dikeninin hem gövde kısmı hem de çiçek tablası kısmı izole edilmiştir. İzolasyon aşamasında kullanılan PVP, deve dikeninde bulunan fenolik maddeleri bağlayarak, POD enziminin aktivite göstermesini engellemek amacıyla kullanılmıştır. Çünkü fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonlar, enzimi inhibe edebilmektedir. Askorbik asit izolasyon sırasında oluşan o-kinonları azaltmak amacı ile kullanılmıştır ve kendisi yükseltgenir. Triton-x 100 ise bitkideki hücre duvarını parçalaması amacıyla izolasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

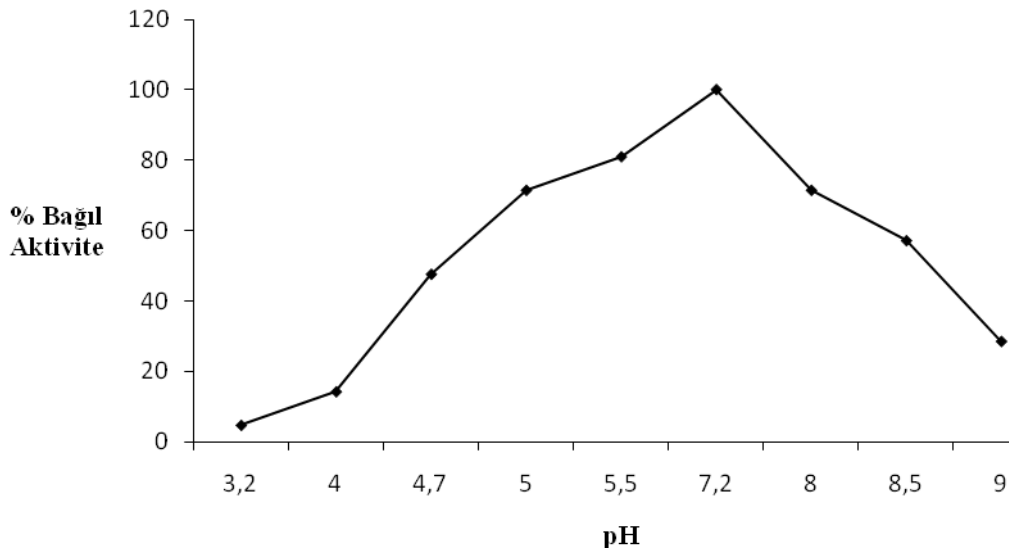
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi sonrasında kısmen saflaştırılmış olarak elde edilen enzim, jel filtrasyon kromatografisi metoduyla çözeltideki istenmeyen moleküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra epindof tüplere aktarılan enzim -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

4.2. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu

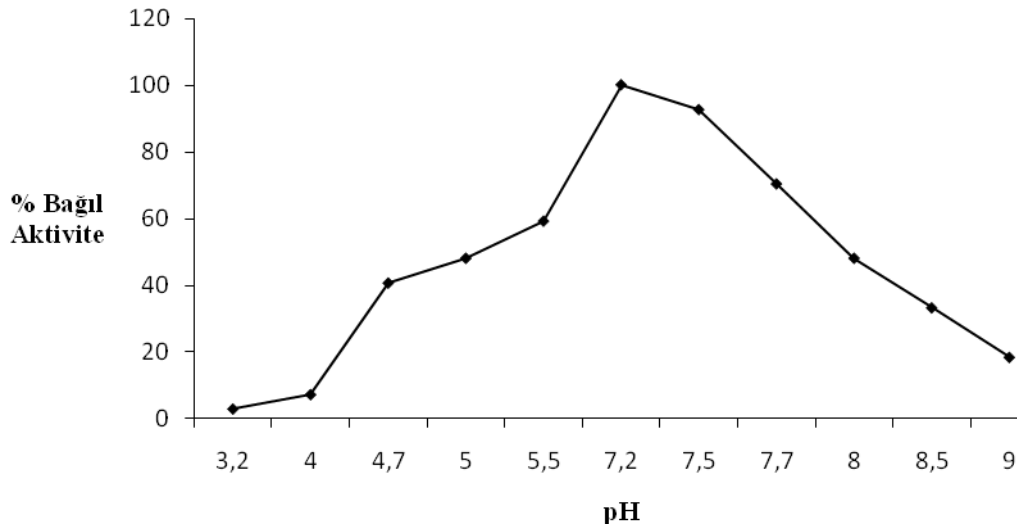
4.2.1. pH etkisi

POD enzimi aktivitesi 3 ile 9,5 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile 9 farklı substrat kullanarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin) tayin edildi. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

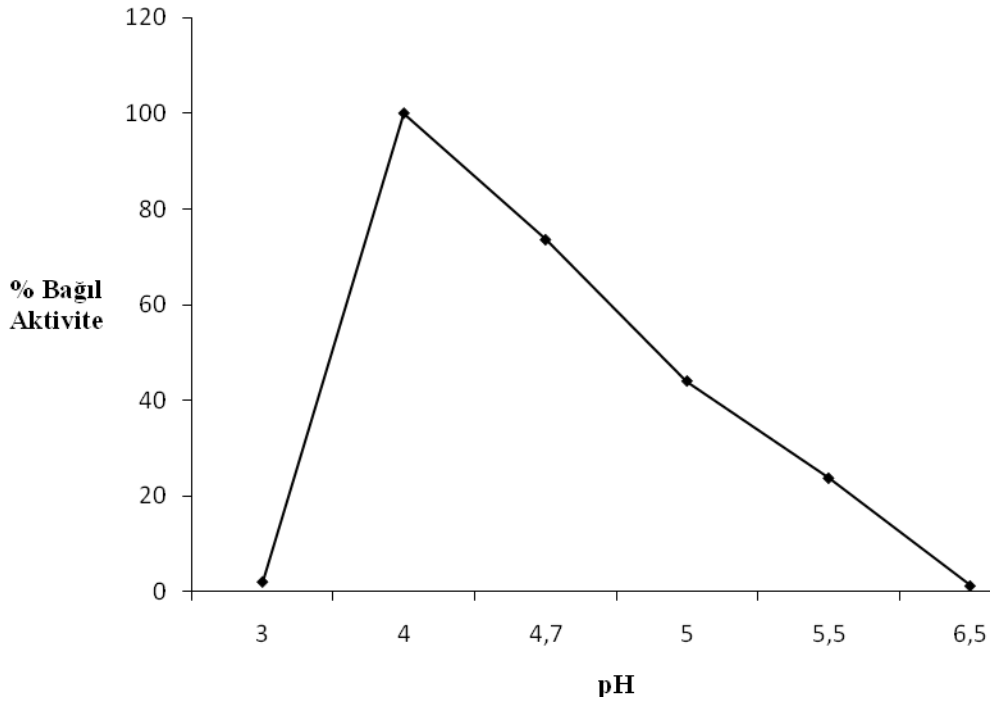
Bu çalışmada grafiklerden de görülebileceği gibi peroksidaz enziminin her substrata karşı, bitkinin hem gövde kısmı için hem de çiçek tablası kısmı için optimum pH değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 7,2 - 7,2 (fosfat tamponu), ABTS için 4 - 4 (sitrat tamponu), guaiakol için 6,5 - 6,5 (fosfat tamponu), kafeik asit için 5,5 - 5,5 (sitrat tamponu), o-dianisidin için 5,4 - 5,4 (sitrat tamponu), o-fenilen daimin için 5,5 - 5,5 (sitrat tamponu), progallol için 8,5 - 7,6 (fosfat tamponu) ve katekol için 7,2 - 7,2 (fosfat tamponu) olarak bulundu.



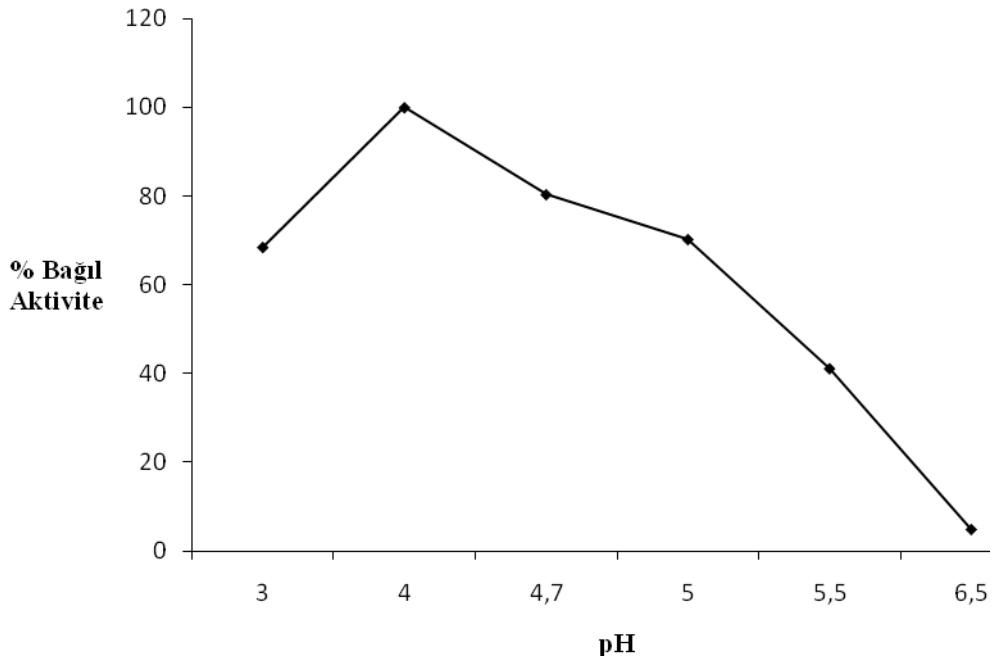
Şekil 4.1. Deve dikeninin gövde kısmı için 4-metil katekol substratının optimum pH grafiği



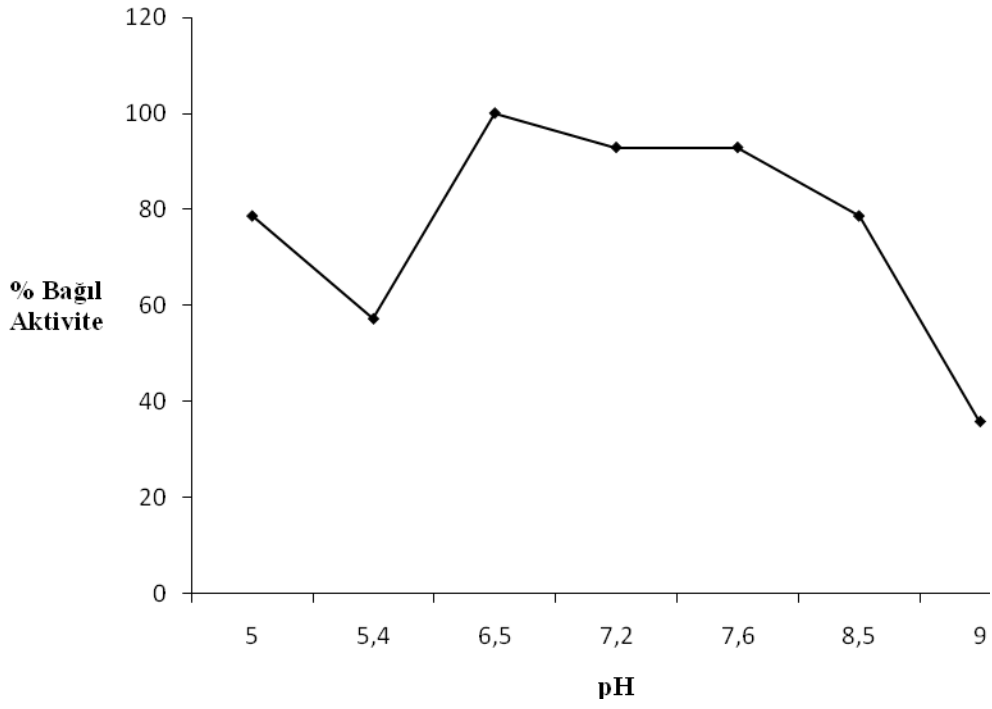
Şekil 4.2. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için 4-metil katekol substratının optimum pH grafiği



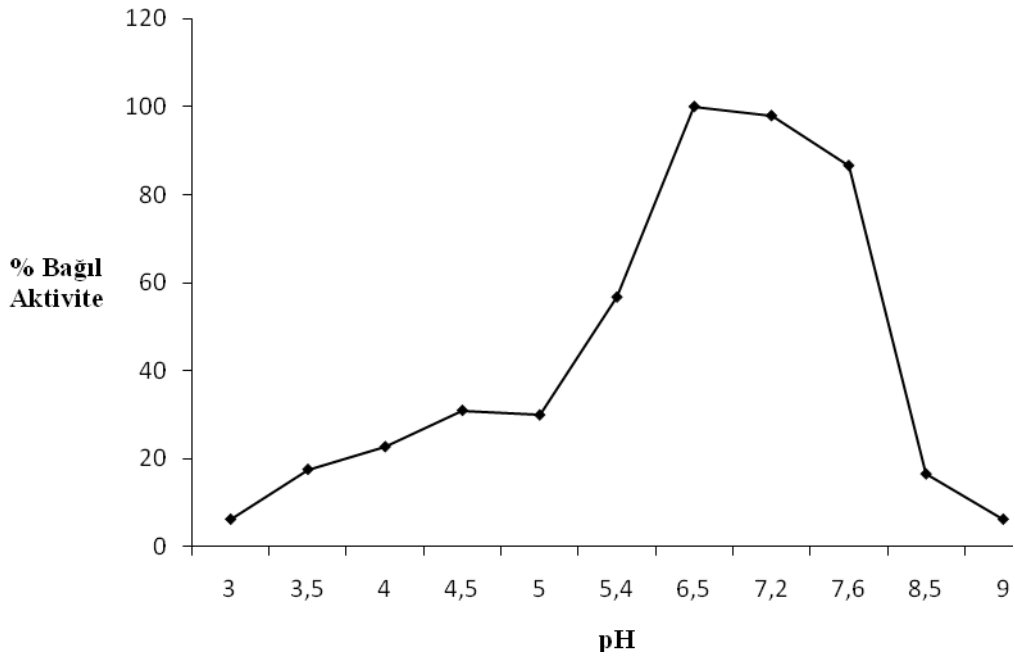
Şekil 4.3. Deve dikeninin gövde kısmı için ABTS substratının optimum pH grafiği



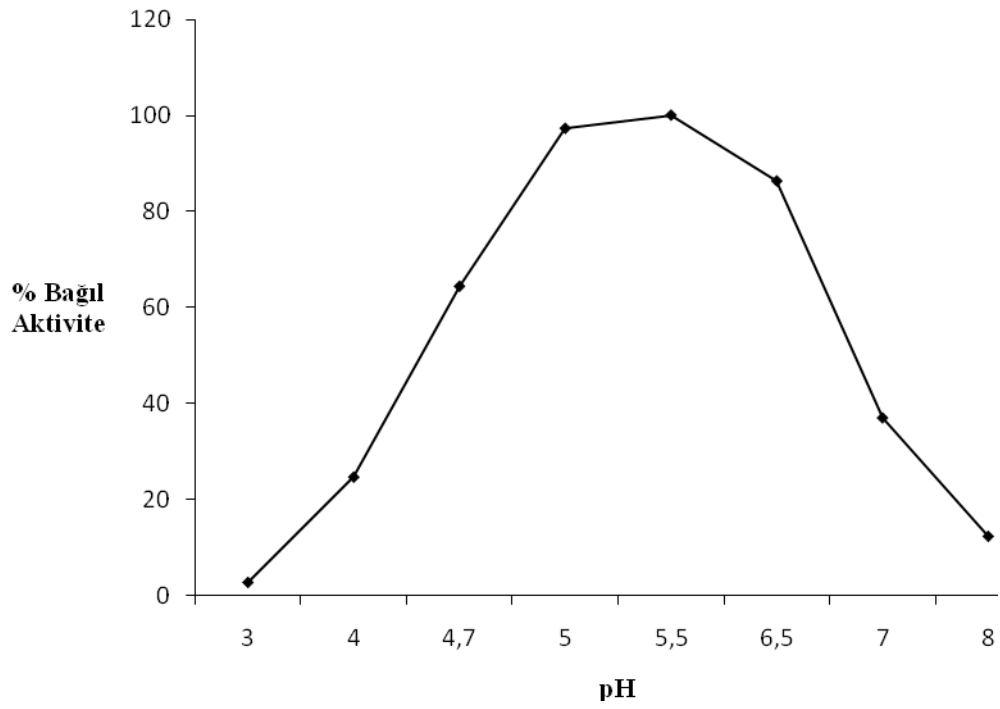
Şekil 4.4. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için ABTS substratının optimum pH grafiği



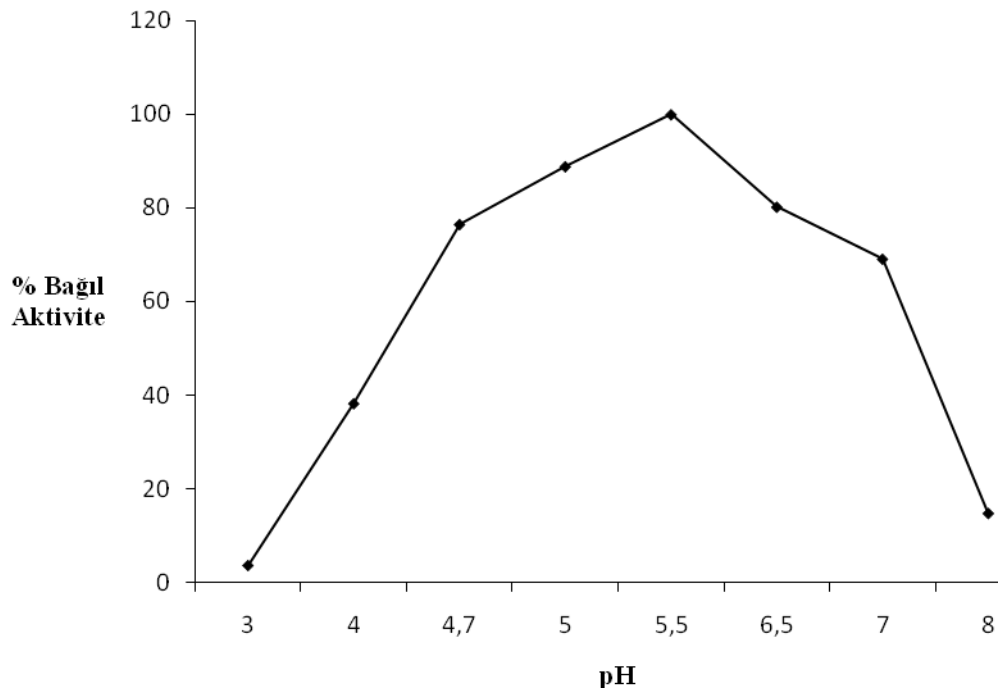
Şekil 4.5. Deve dikeninin gövde kısmı için guaiakol substratının optimum pH grafiği



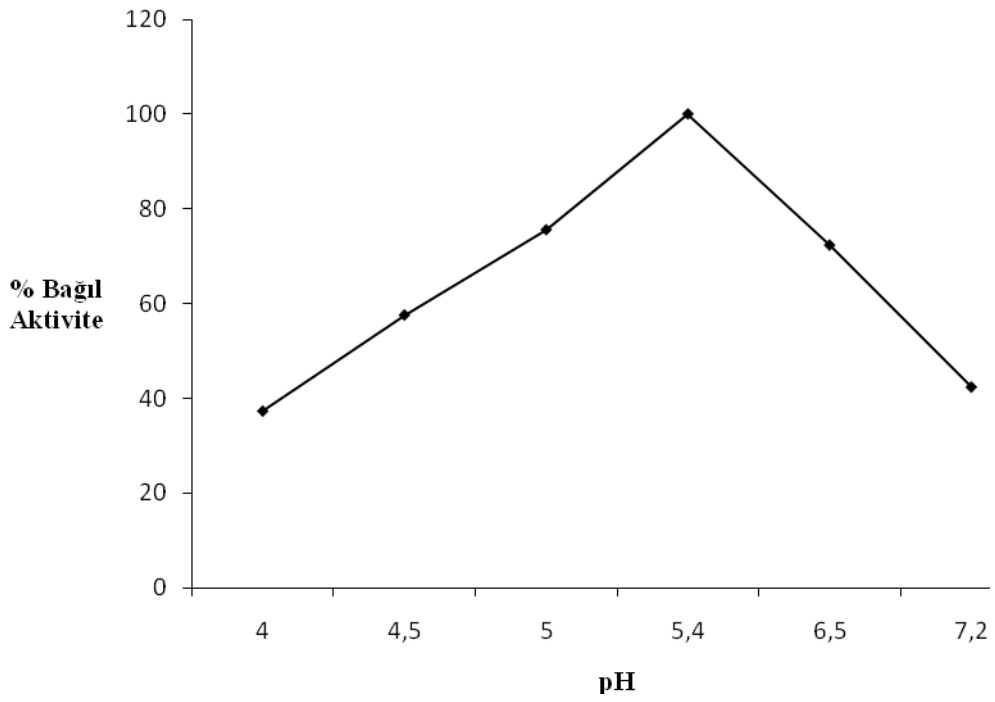
Şekil 4.6. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için guaiakol substratının optimum pH grafiği



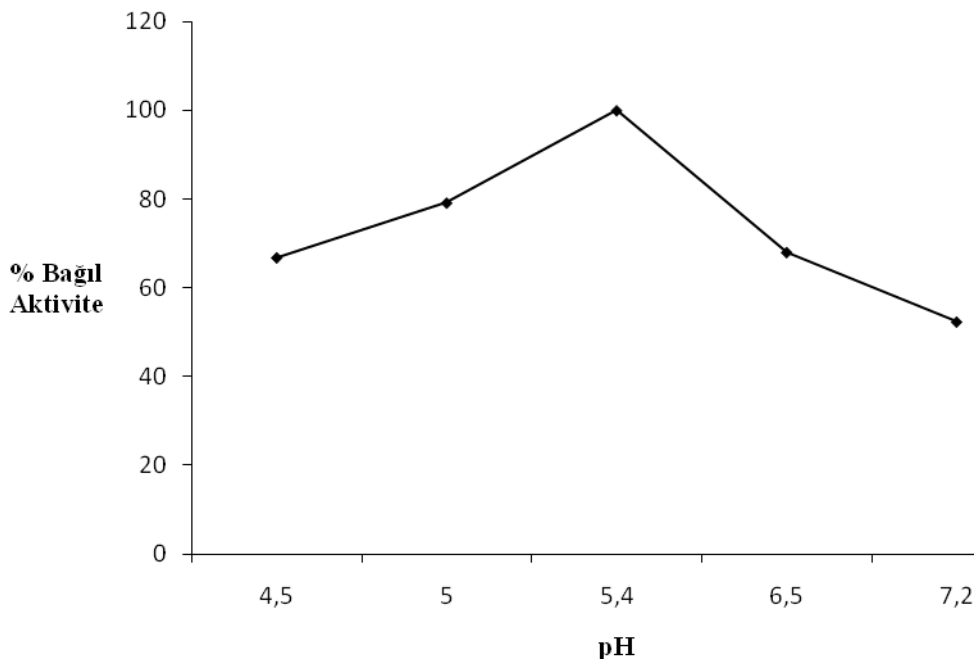
Şekil 4.7. Deve dikeninin gövde kısmı için kafeik asit substratının optimum pH grafiği



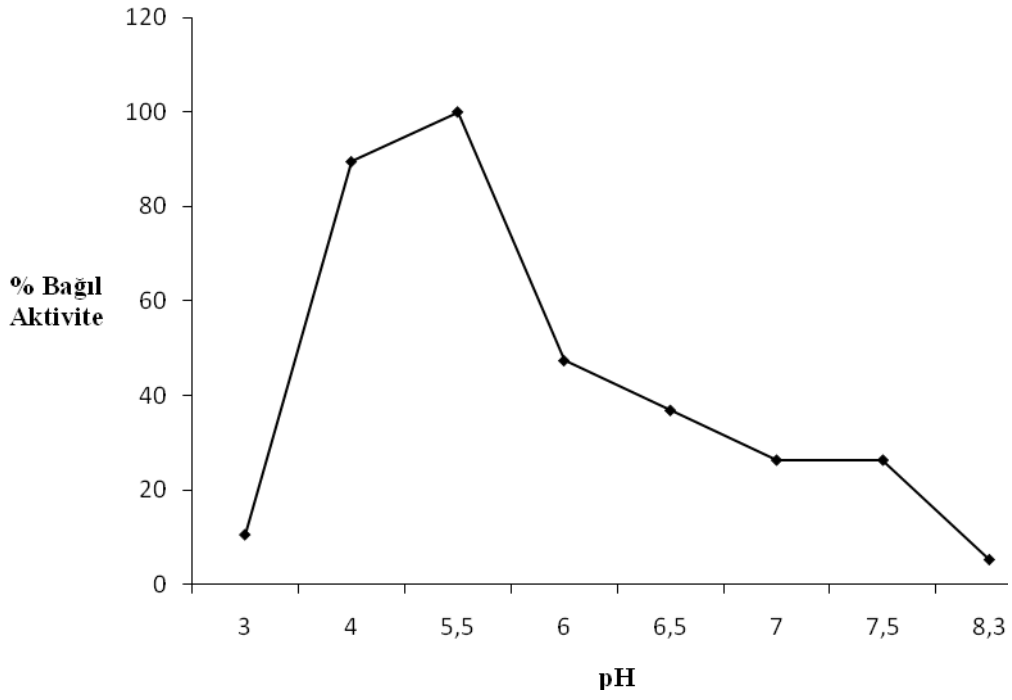
Şekil 4.8. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için kafeik asit substratının optimum pH grafiği



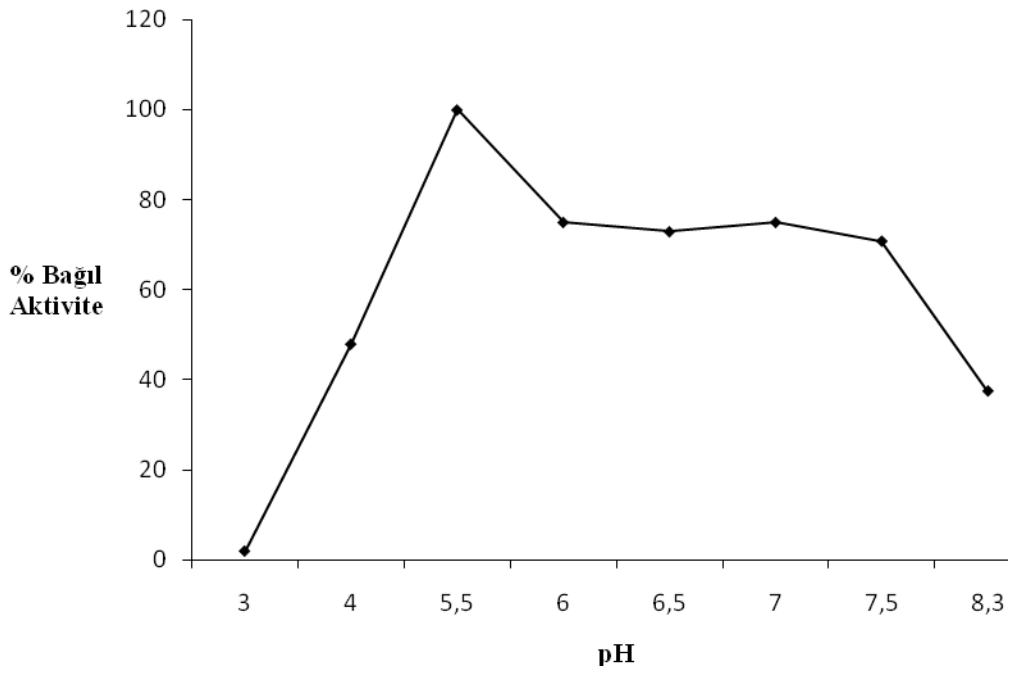
Şekil 4.9. Deve dikeninin gövde kısmı için o-dianisidin substratının optimum pH grafiği



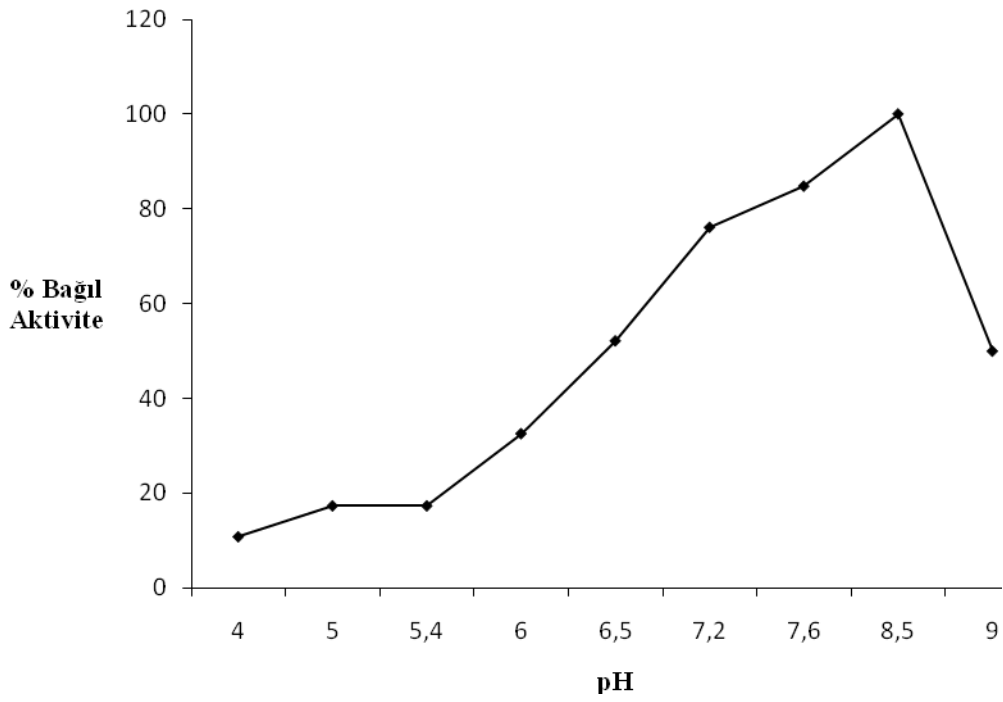
Şekil 4.10. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-dianisidin substratının optimum pH grafiği



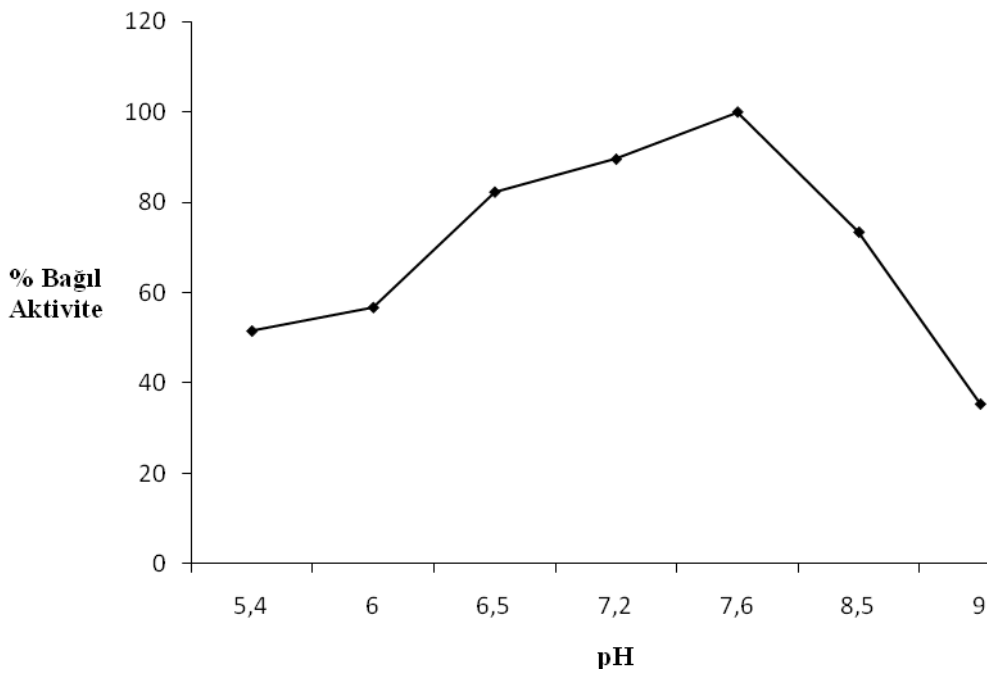
Şekil 4.11. Deve dikeninin gövde kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum pH grafiği



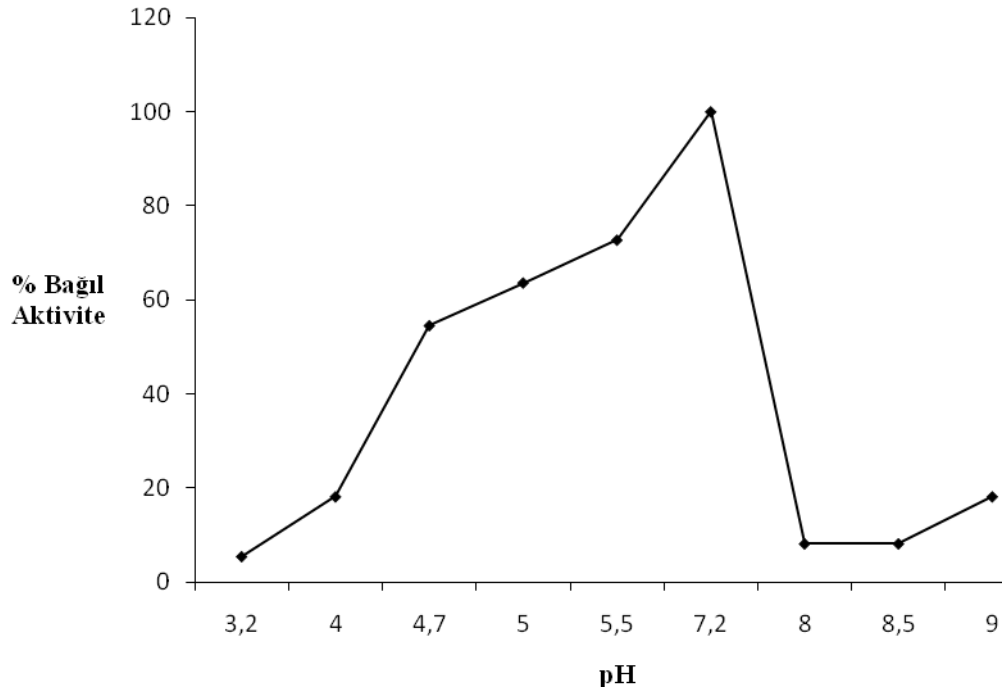
Şekil 4.12. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum pH grafiği



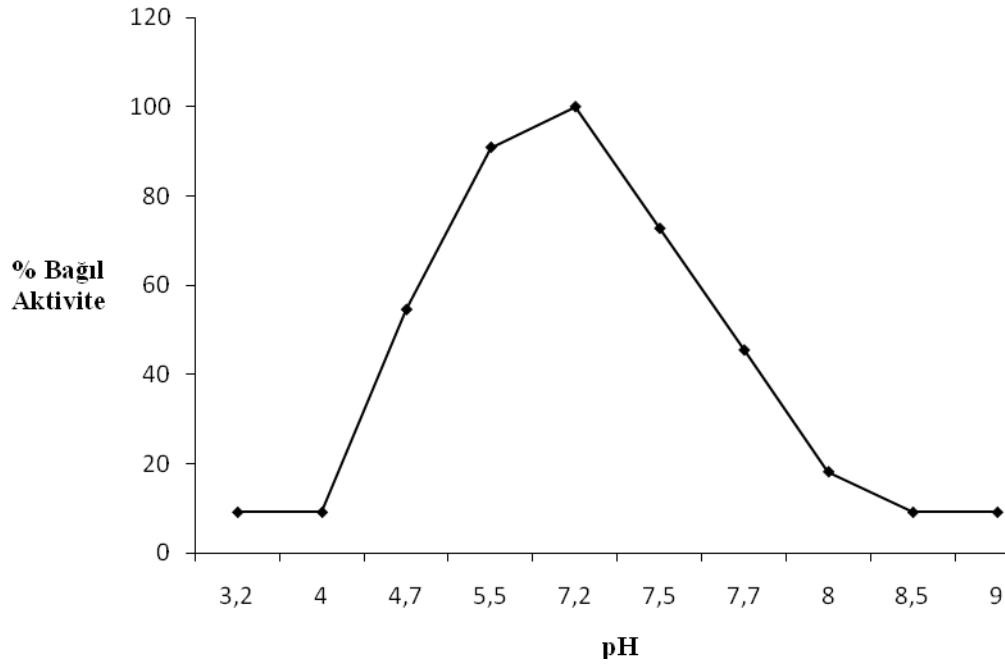
Şekil 4.13. Deve dikeninin gövde kısmı için progallol substratının optimum pH grafiği



Şekil 4.14. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için progallol substratının optimum pH grafiği



Şekil 4.15. Deve dikeninin gövde kısmı için katekol substratının optimum pH grafiği

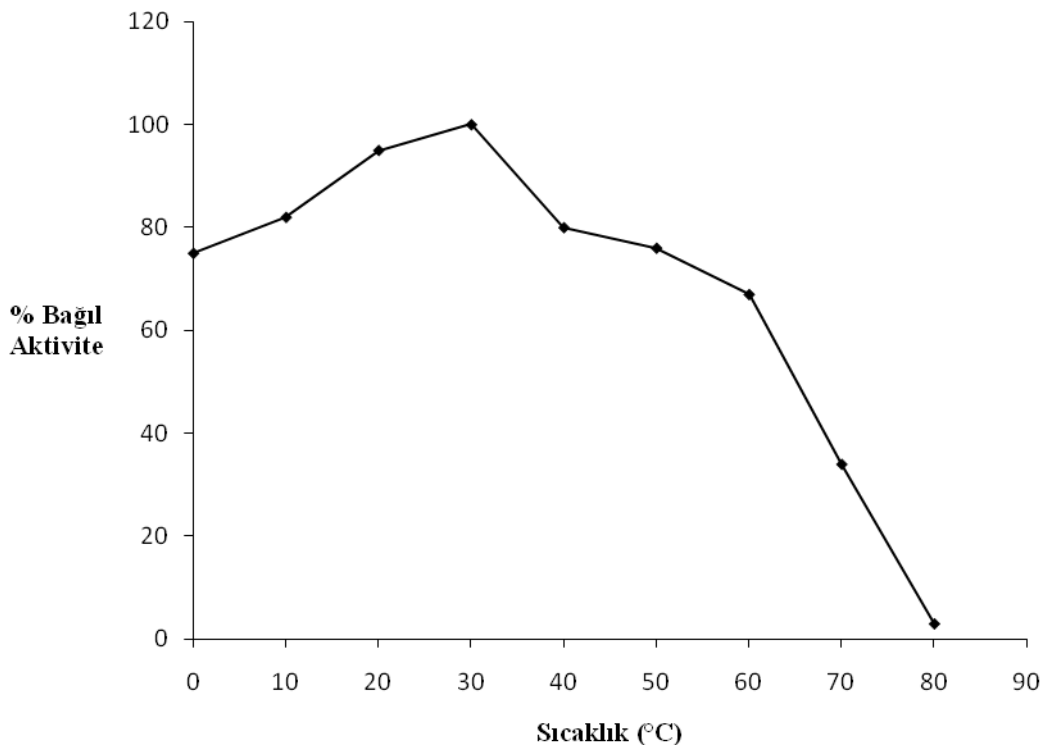


Şekil 4.16. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için katekol substratının optimum pH grafiği

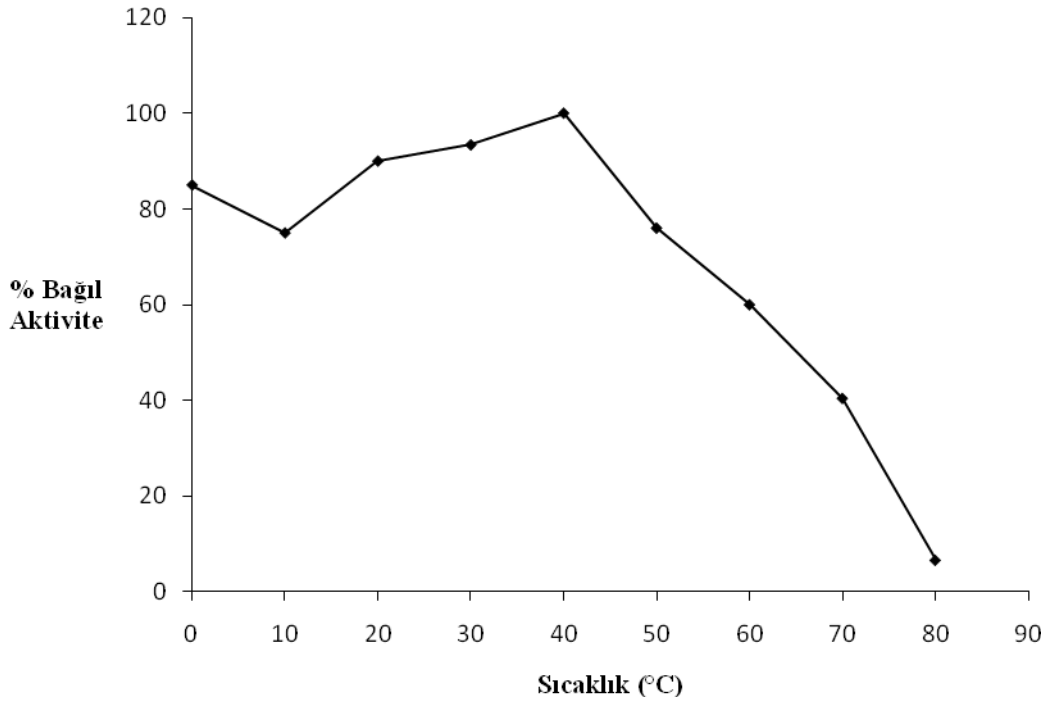
4.2.2. Sıcaklığın etkisi

Bölüm 3.3.4.'de anlatıldığı gibi, 4-metil katekol, ABTS, guaiakol, kafeik asit, o-dianisidin, o-fenilen daimin, progallol ve katekol substratları kullanılarak POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Bu çalışmada substrat konsantrasyonu 10 mM olarak kullanılmıştır.

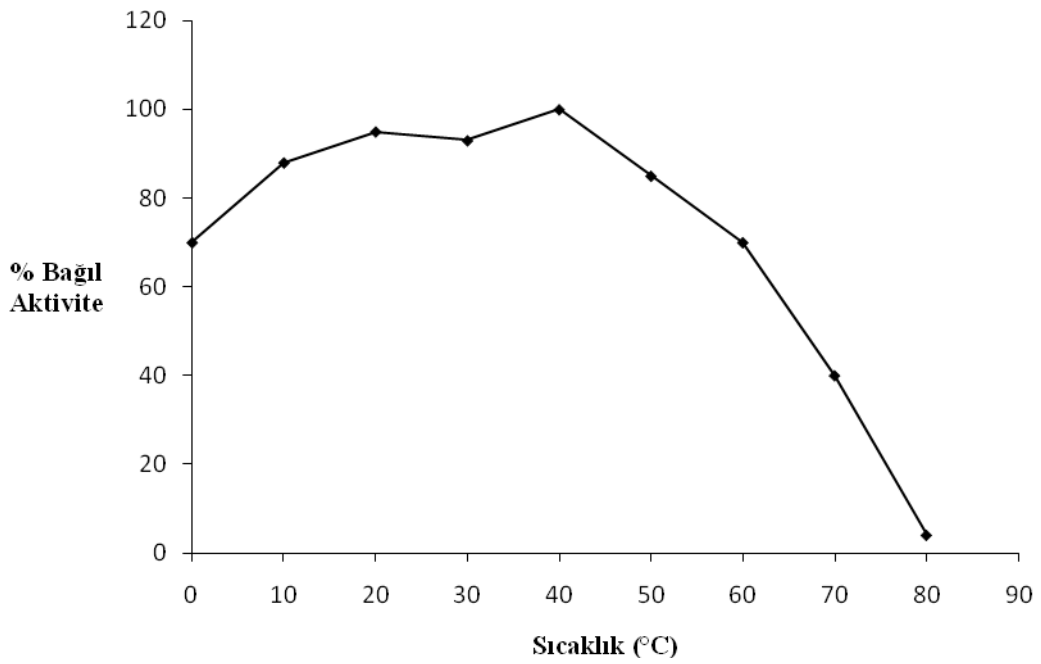
Aşağıda verilen grafikler incelendiğinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın gövde kısmı ve çiçek tablası kısmı için 30 – 40 °C (optimum sıcaklık) aralıklarında olduğu görülmektedir. Optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede azalma görülmektedir. Bu da enzimin sıcaklıkla kısmen inaktive olduğunu göstermektedir.



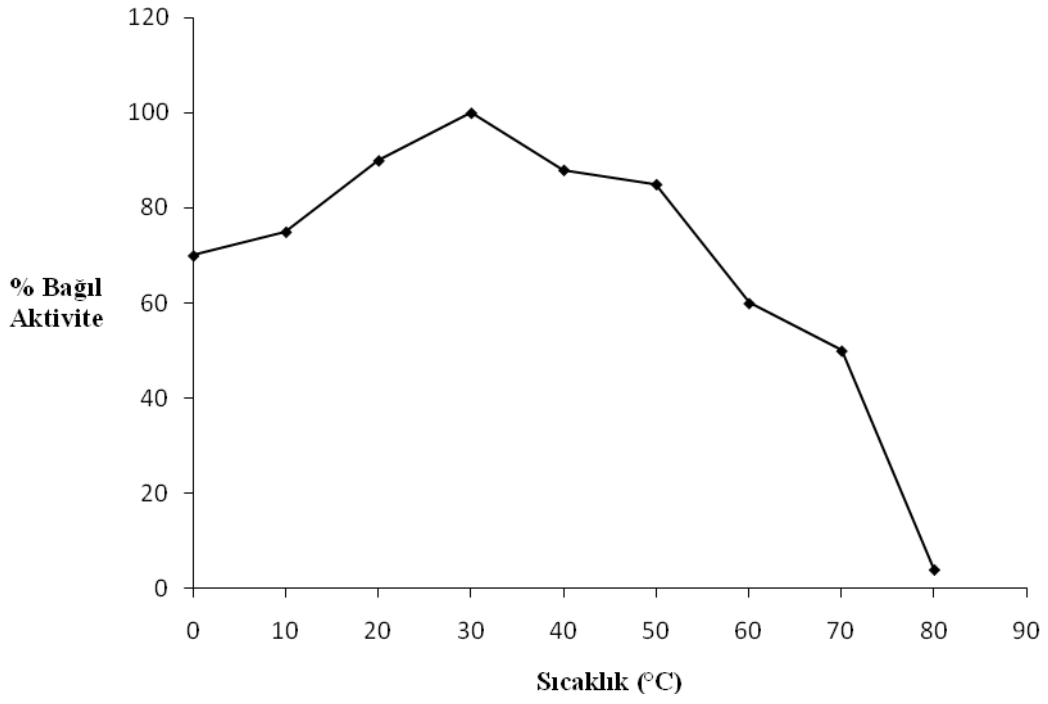
Şekil 4.17. Deve dikeninin gövde kısmı için 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



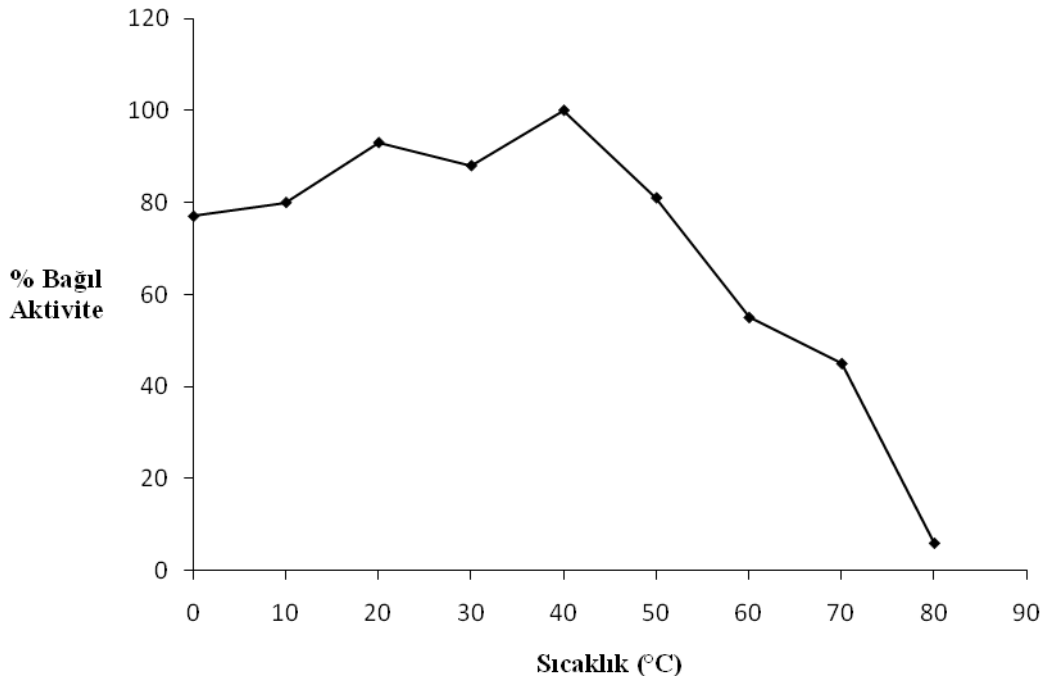
Şekil 4.18. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



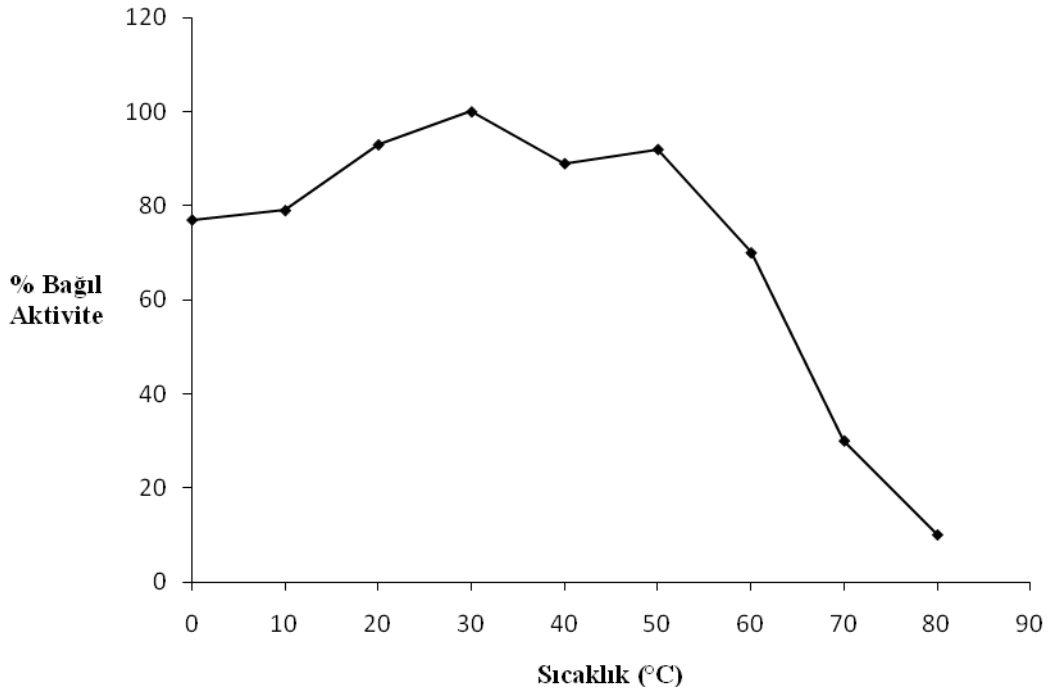
Şekil 4.19. Deve dikeninin gövde kısmı için ABTS substratının optimum sıcaklık grafiği



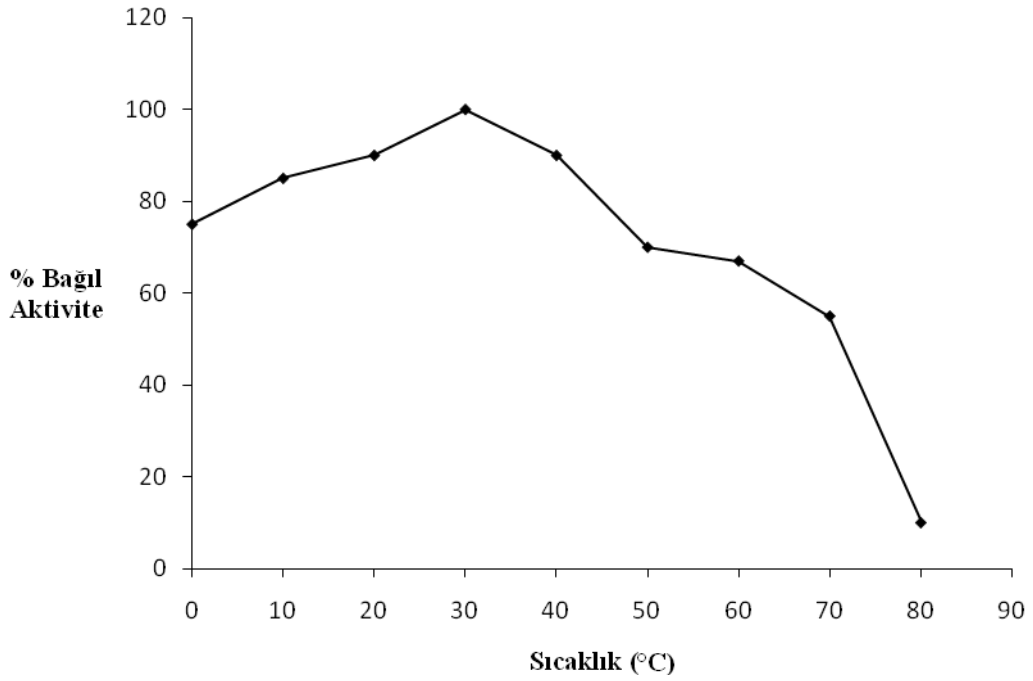
Şekil 4.20. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için ABTS substratının optimum sıcaklık grafiği



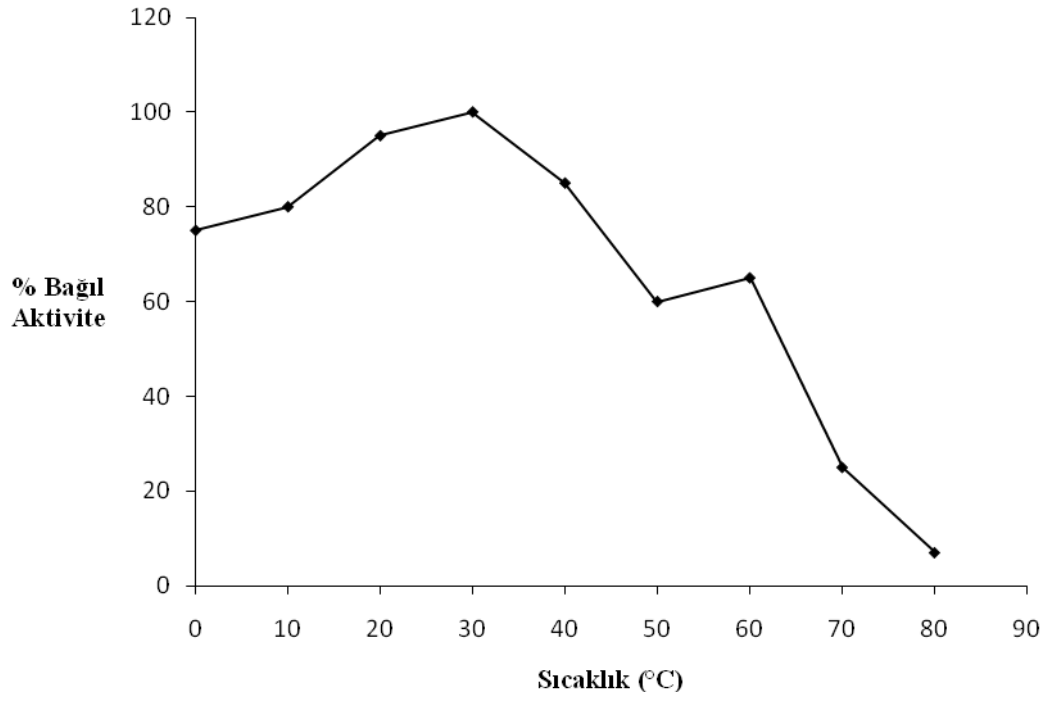
Şekil 4.21. Deve dikeninin gövde kısmı için guaiakol substratının optimum sıcaklık grafiği



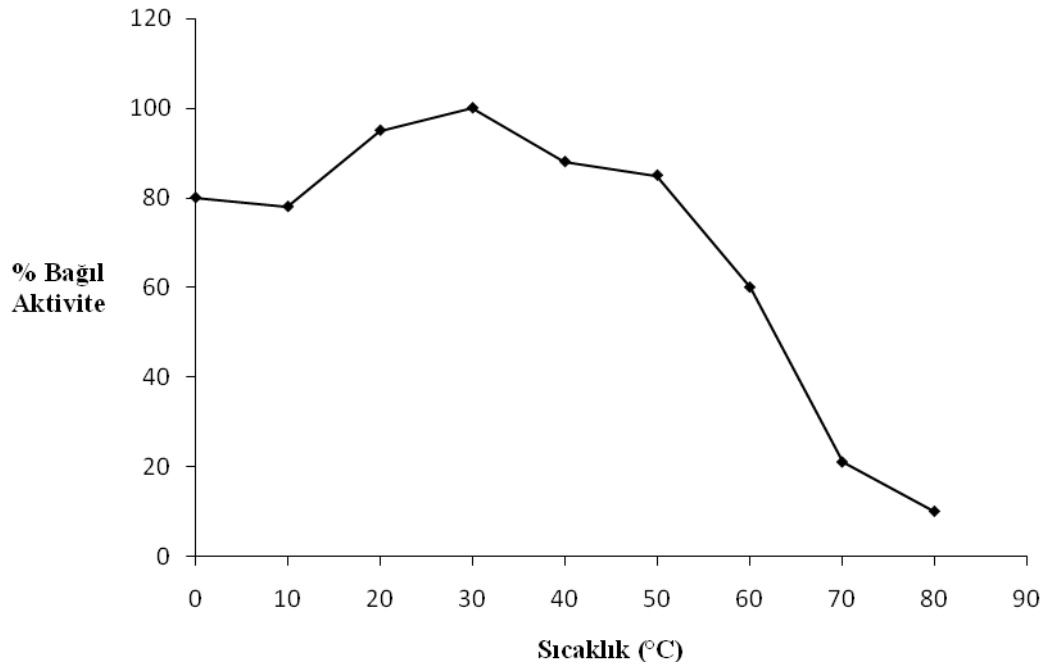
Şekil 4.22. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için guaiakol substratının optimum sıcaklık grafiği



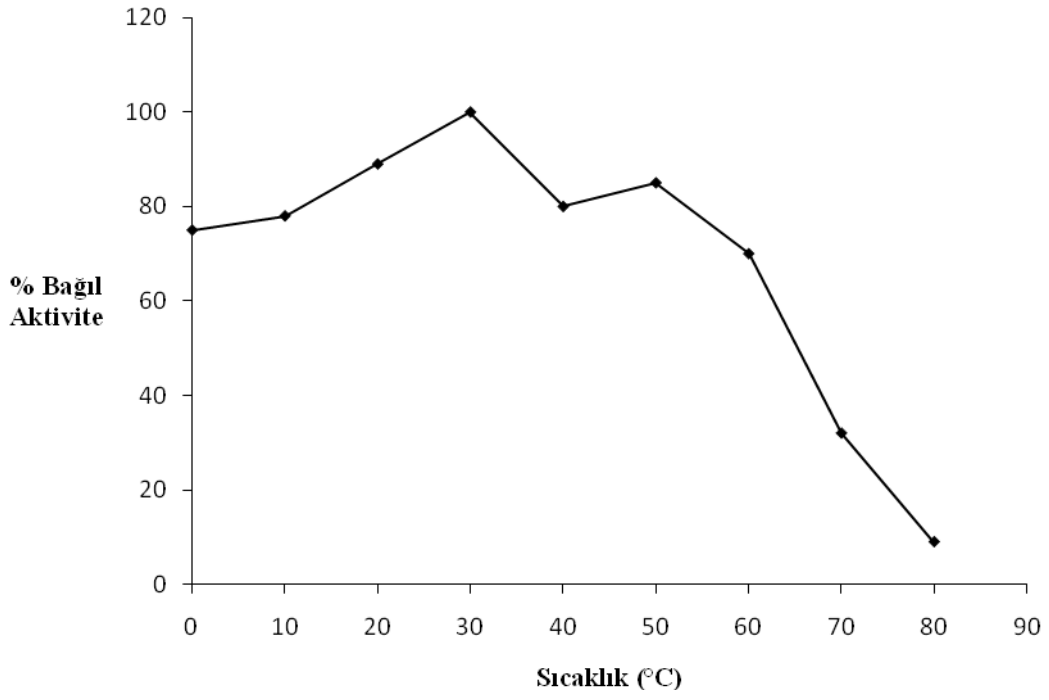
Şekil 4.23. Deve dikeninin gövde kısmı için kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği



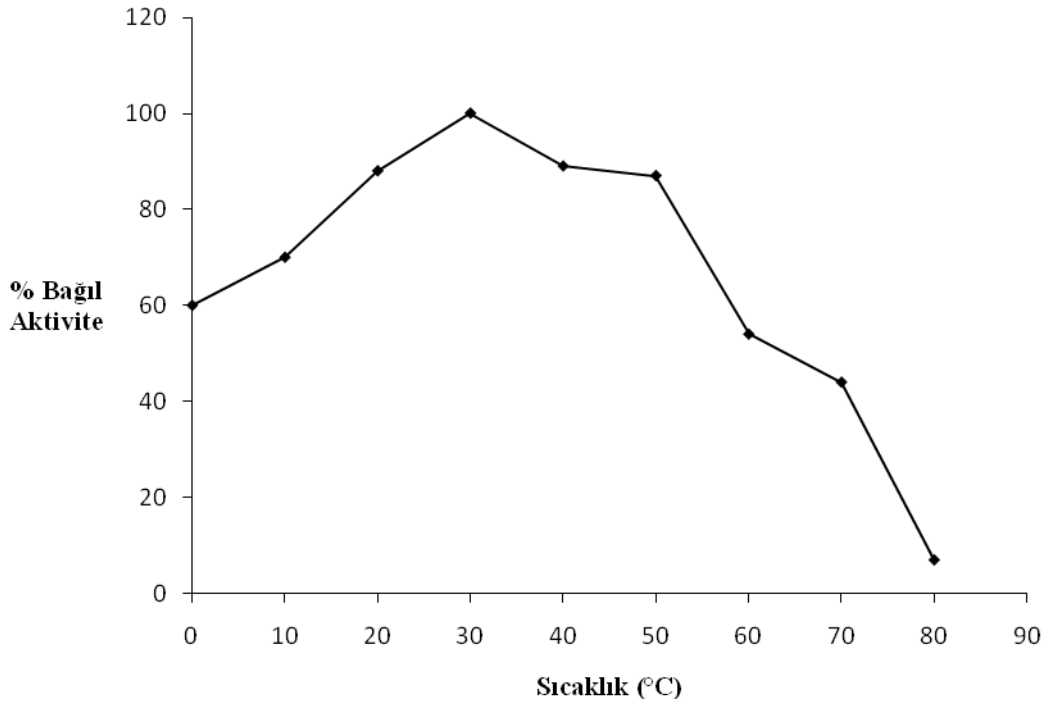
Şekil 4.24. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği



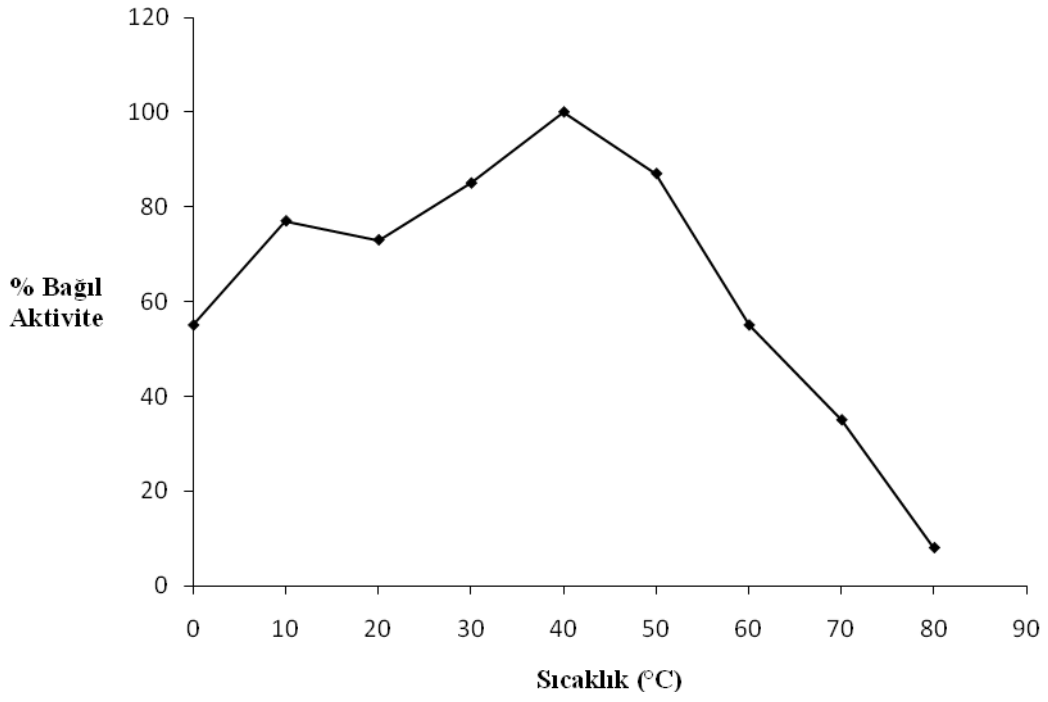
Şekil 4.25. Deve dikeninin gövde kısmı için o-dianisidin substratının optimum sıcaklık grafiği



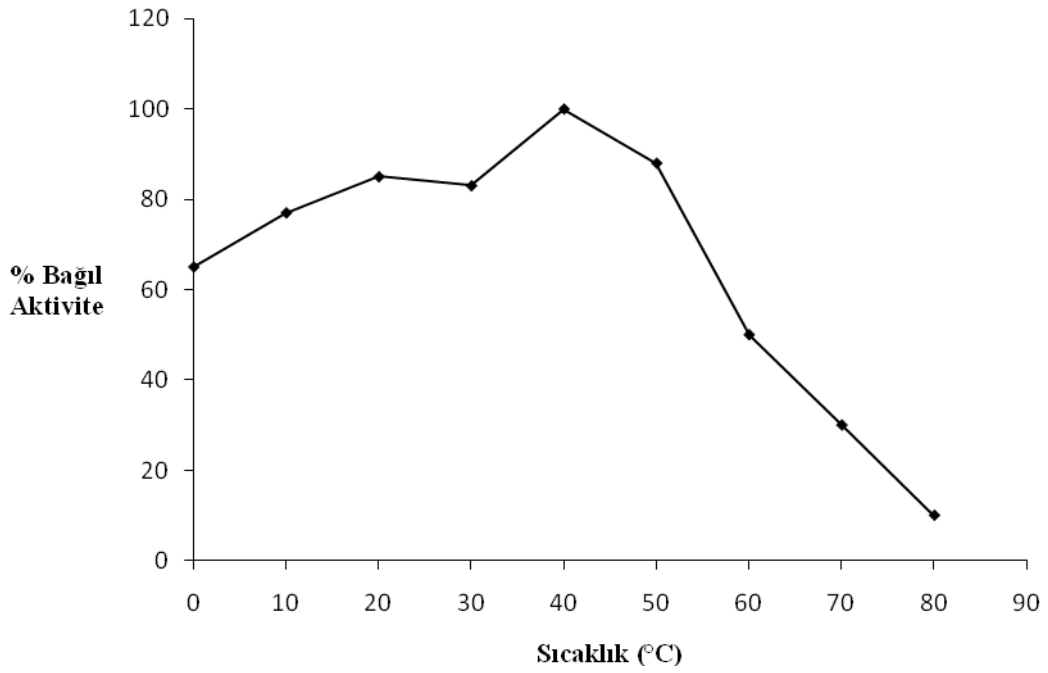
Şekil 4.26. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-dianisidin substratının optimum sıcaklık grafiği



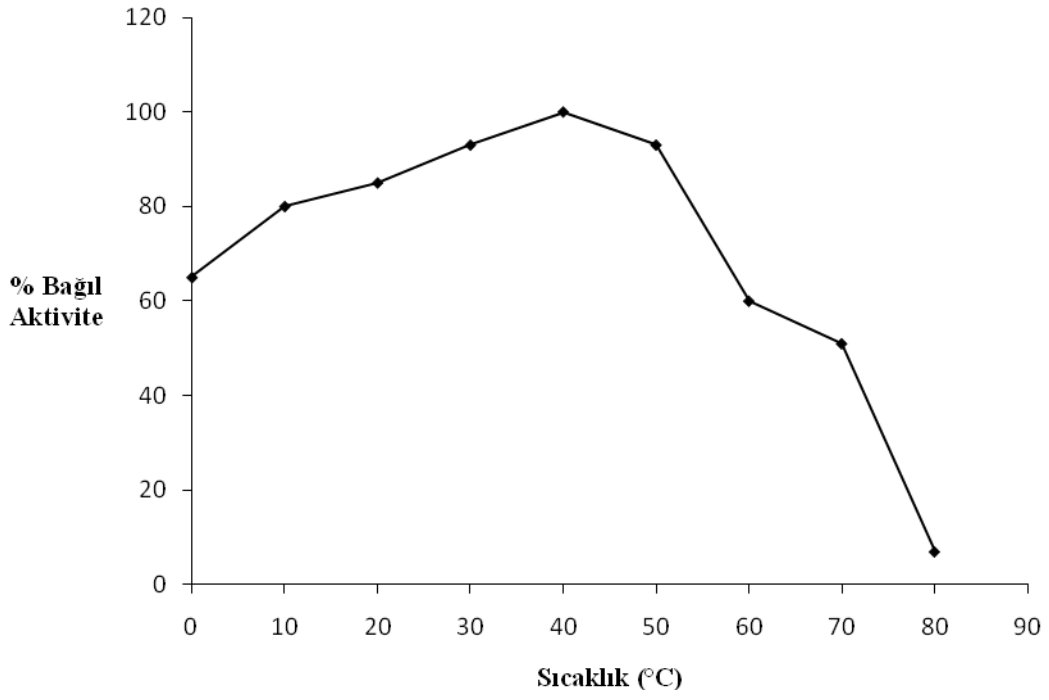
Şekil 4.27. Deve dikeninin gövde kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum sıcaklık grafiği



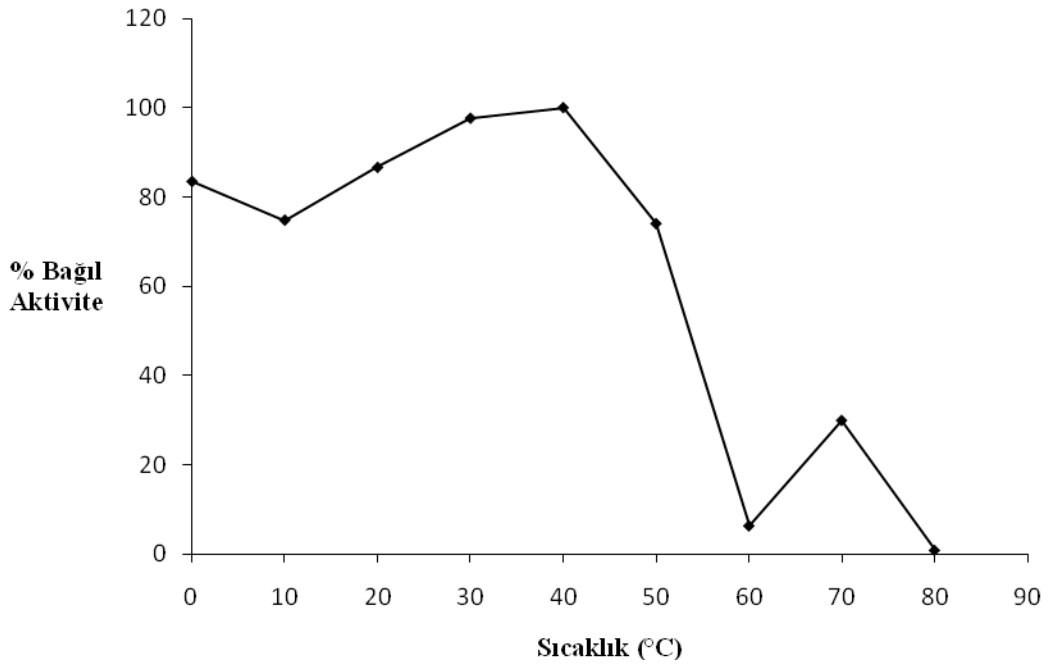
Şekil 4.28. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için o-fenilen diamin substratının optimum sıcaklık grafiği



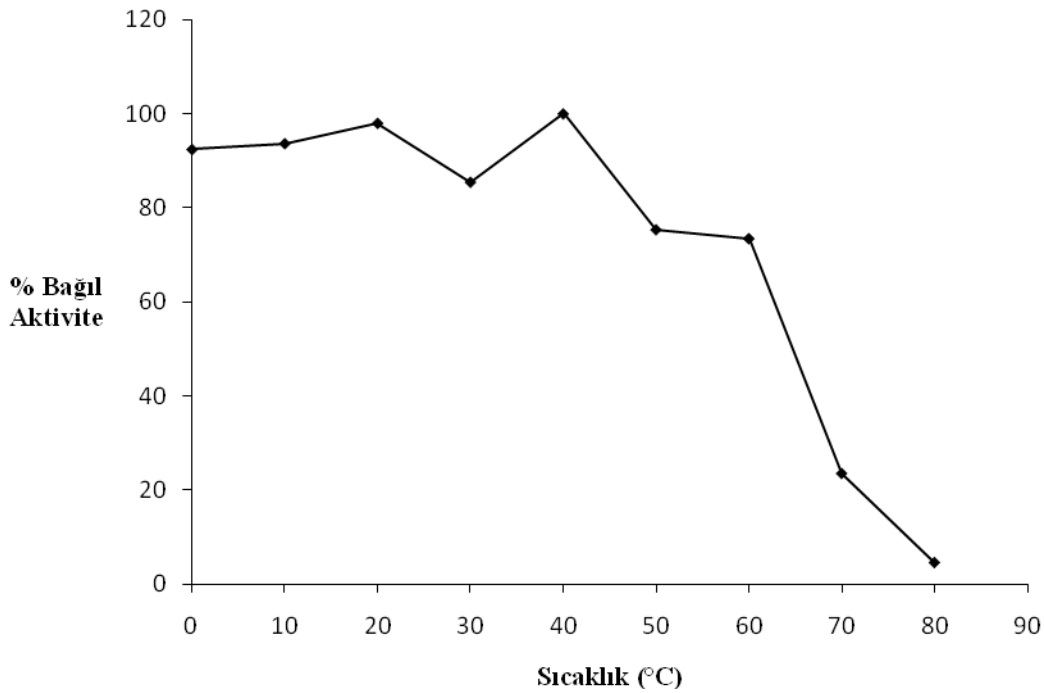
Şekil 4.29. Deve dikeninin gövde kısmı için progallol substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.30. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için progallol substratının optimum sıcaklık grafiği



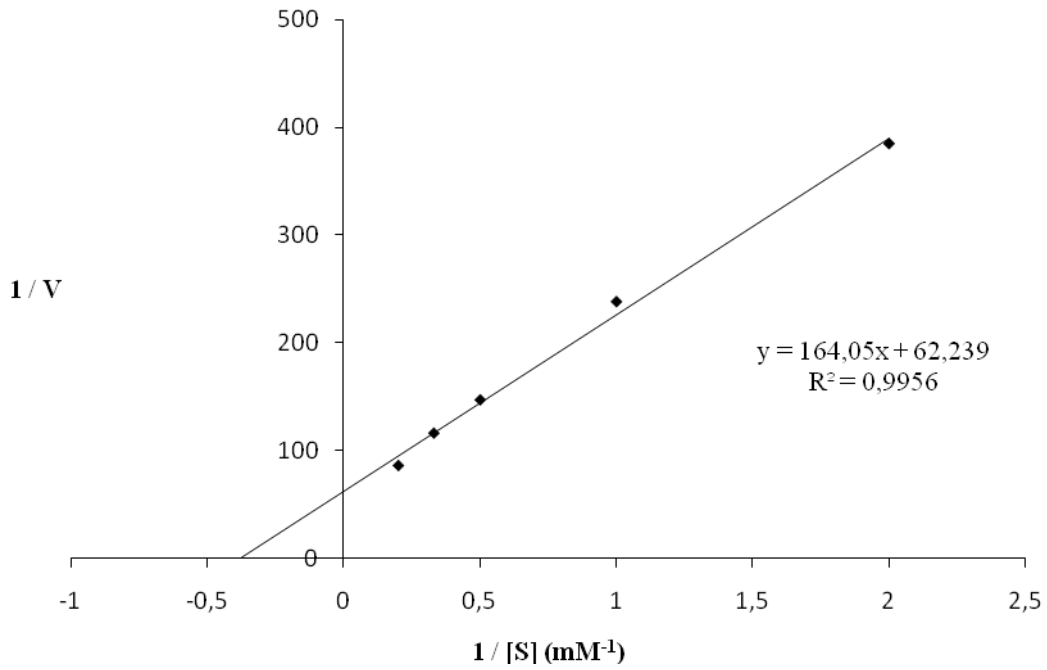
Şekil 4.31. Deve dikeninin gövde kısmı için catekol substratının optimum sıcaklık grafiği



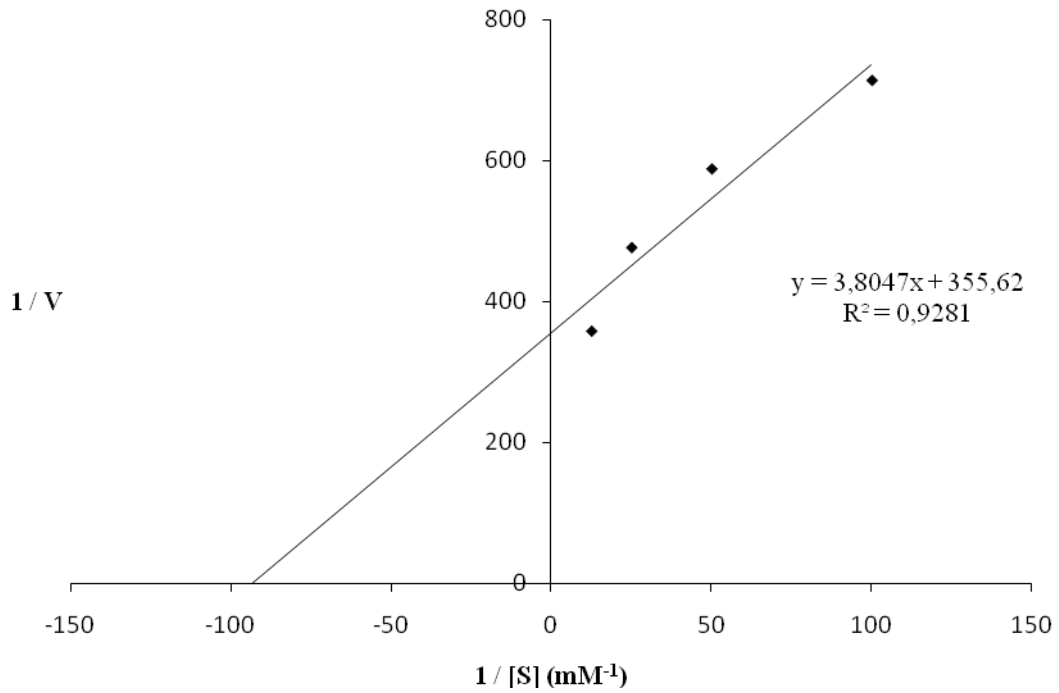
Şekil 4.32. Deve dikeninin çiçek tablası kısmı için katekol substratının optimum sıcaklık grafiği

4.2.3. Enzim kinetiği

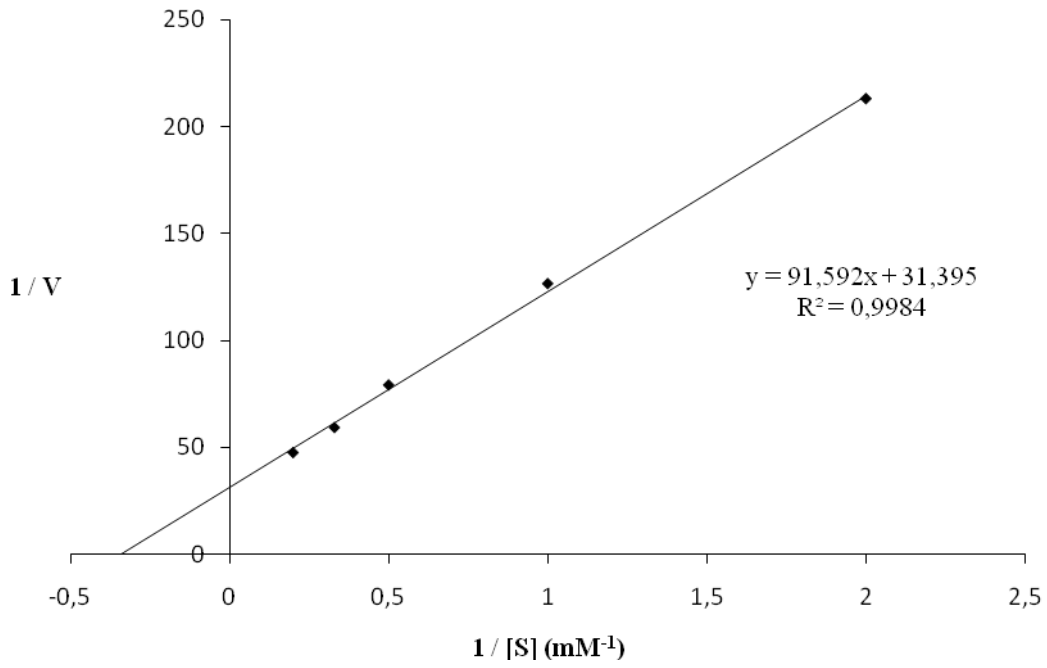
Kinetik çalışmalar 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin substratları için yapılmıştır. Peroksidaz enzimi hidrojen peroksit varlığında aktivite gösteren bir enzim olup bu enzimin V_{max} ve K_m değerleri ile ilgili çalışmalar hidrojen peroksit ve 8 farklı substrat varlığında yapılmıştır. Bunun için peroksidaz enzimi ile 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS ve o-fenilen diamin substratları sabit tutularak hidrojen peroksit için farklı konsantrasyonlarda optimum aktivite ölçümleri yapılmış olup Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Daha sonra peroksidaz enzimi ile hidrojen peroksit sabit tutularak 8 farklı substratın farklı konsantrasyonlarındaki optimum aktivite ölçümleri yapılmış olup Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Her bir çalışma en az üç kez tekrarlanmıştır. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.



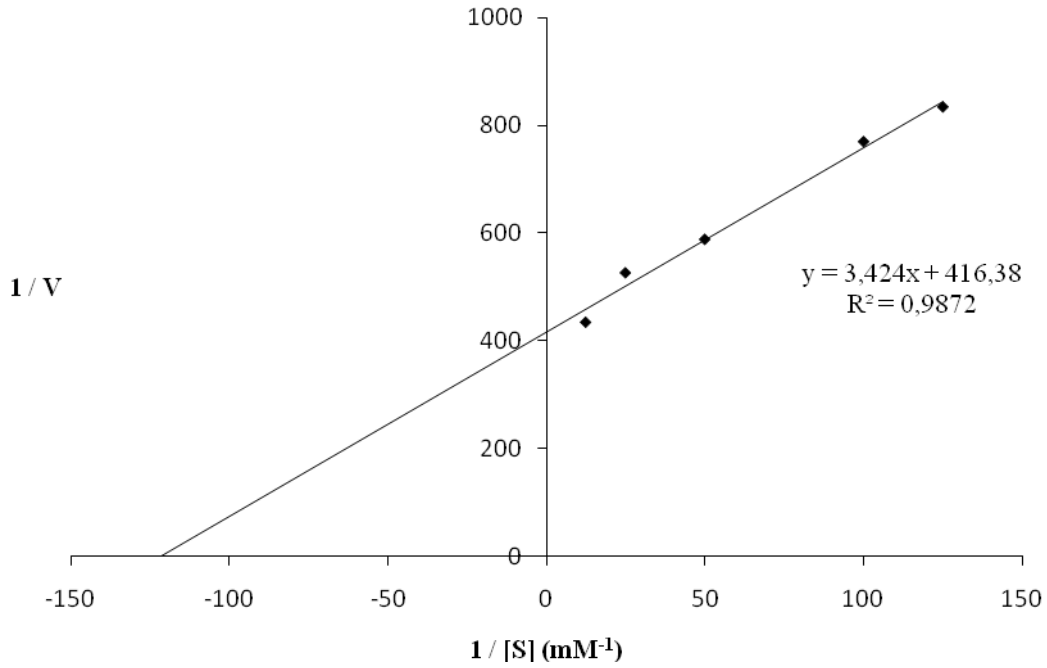
Şekil 4.33. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



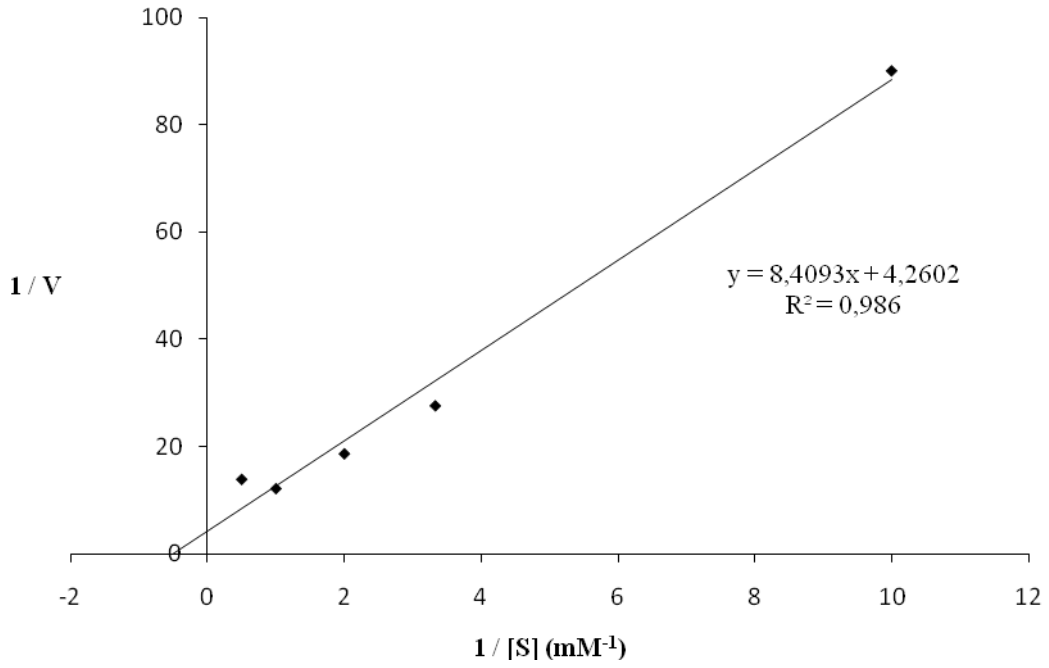
Şekil 4.34. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



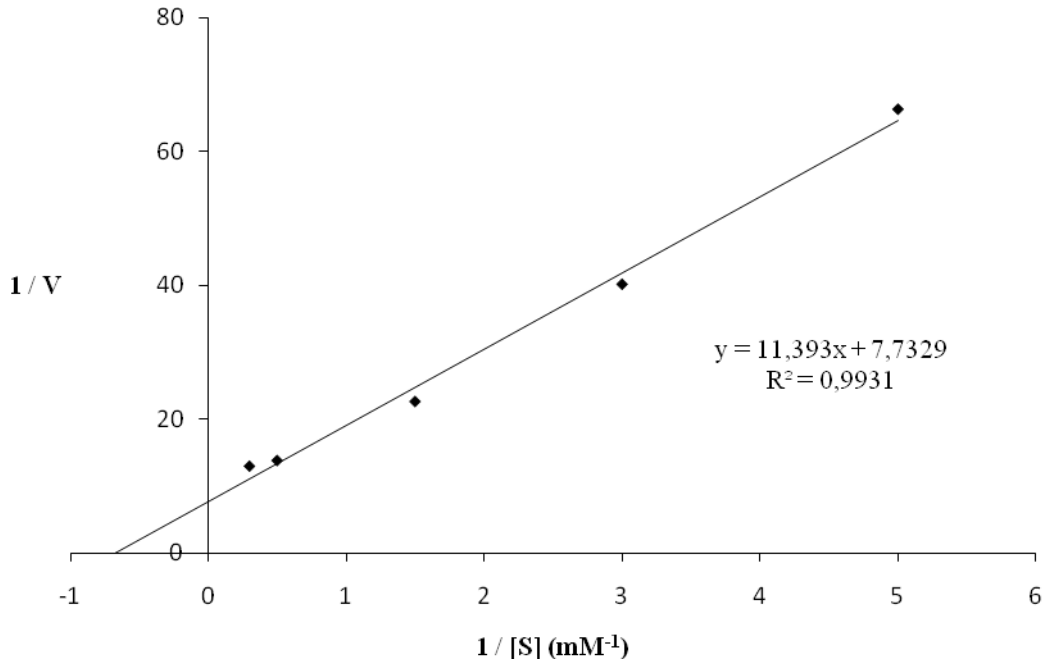
Şekil 4.35. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



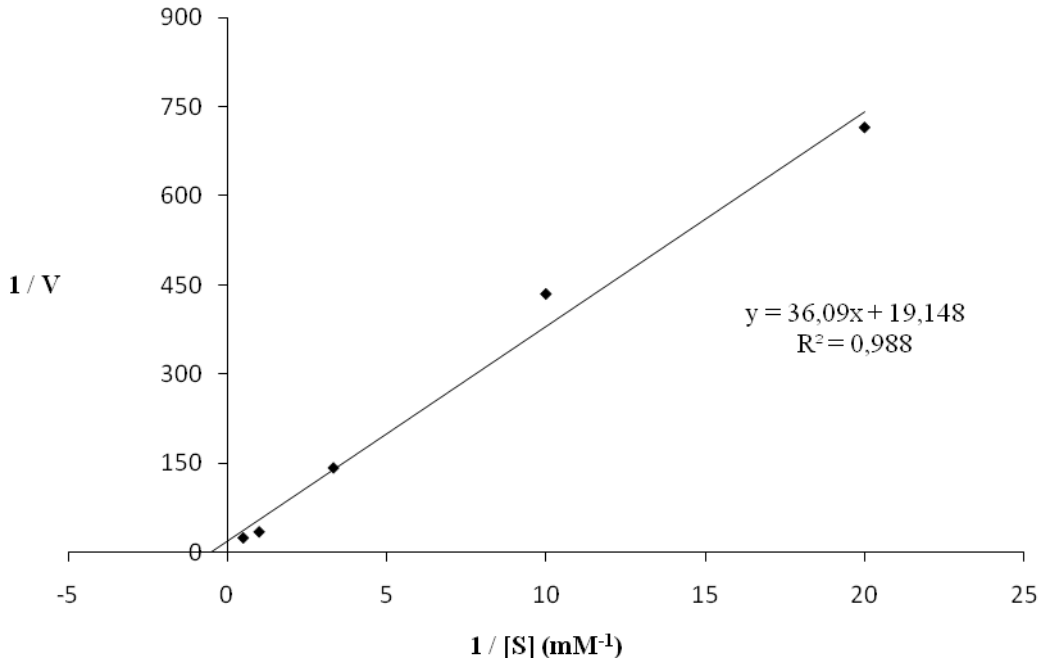
Şekil 4.36. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



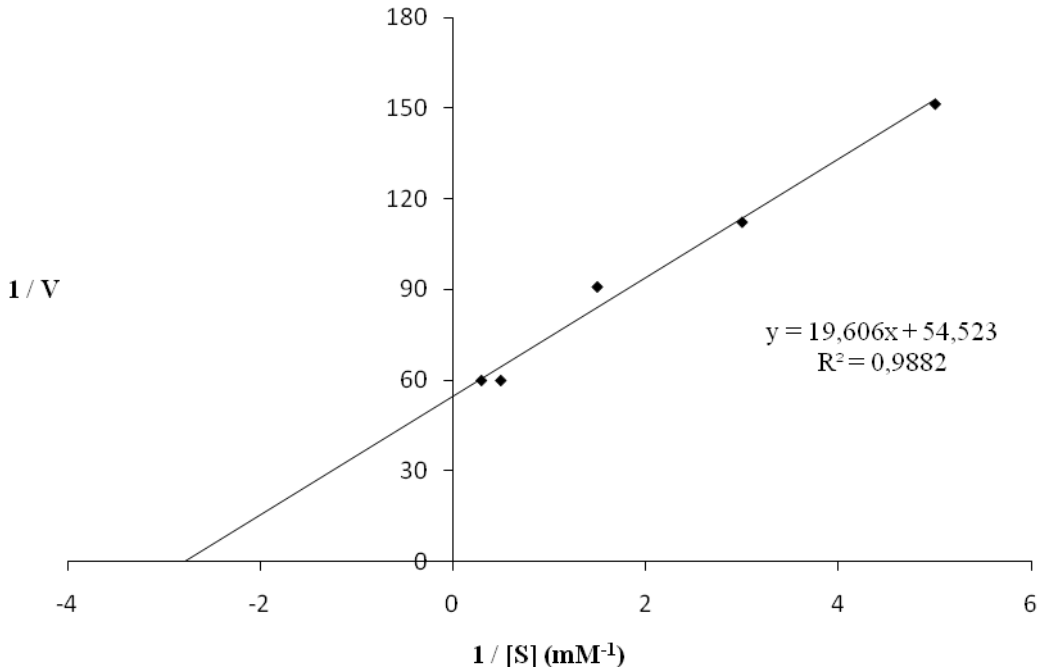
Şekil 4.37. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



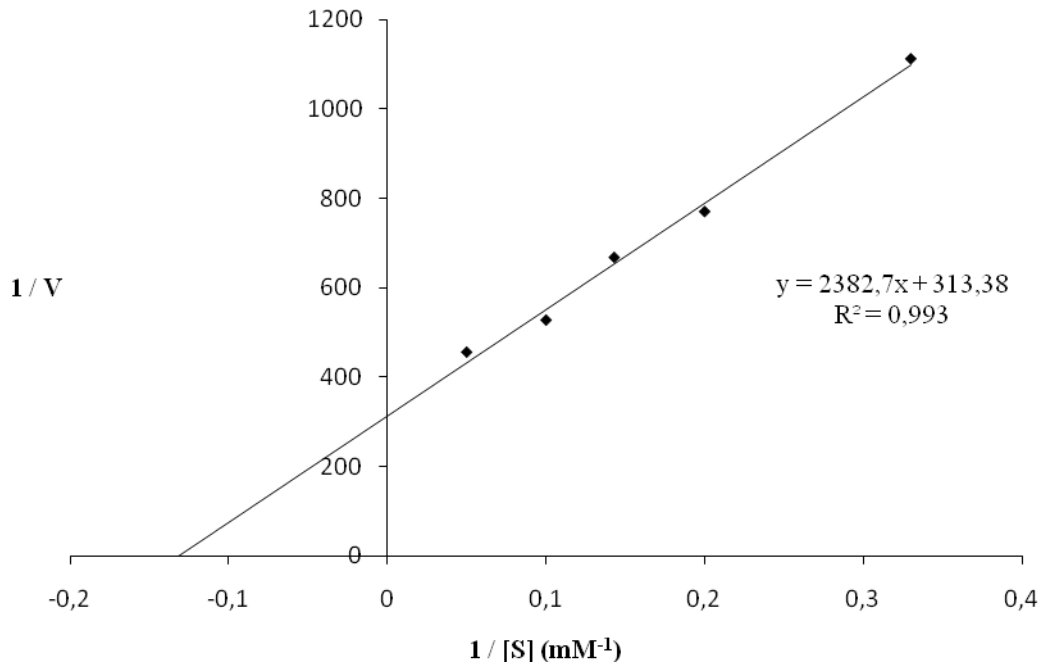
Şekil 4.38. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



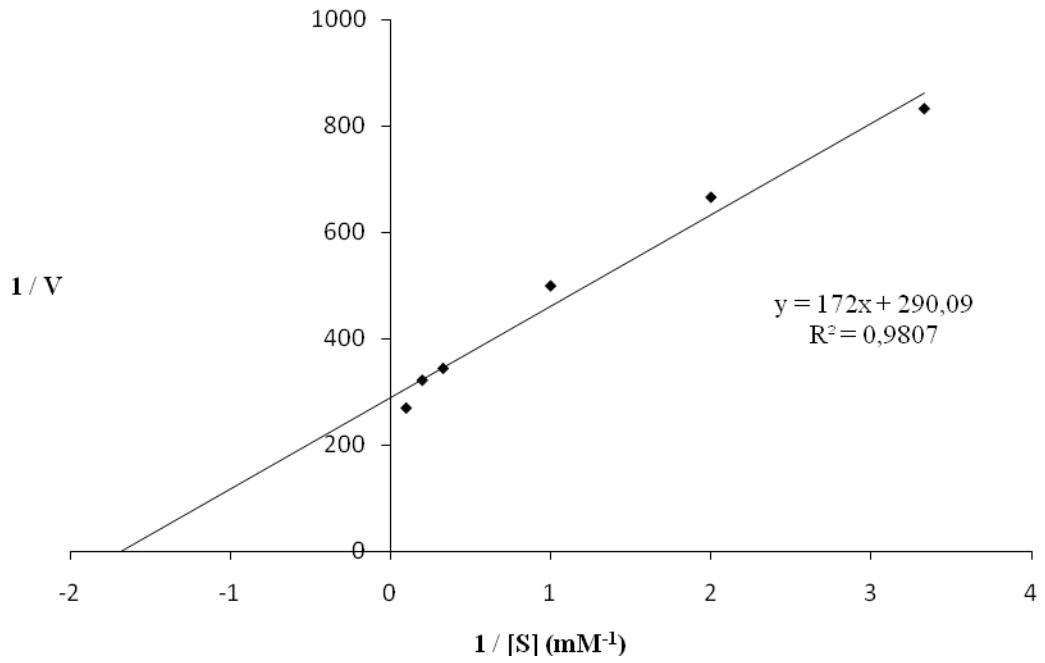
Şekil 4.39. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



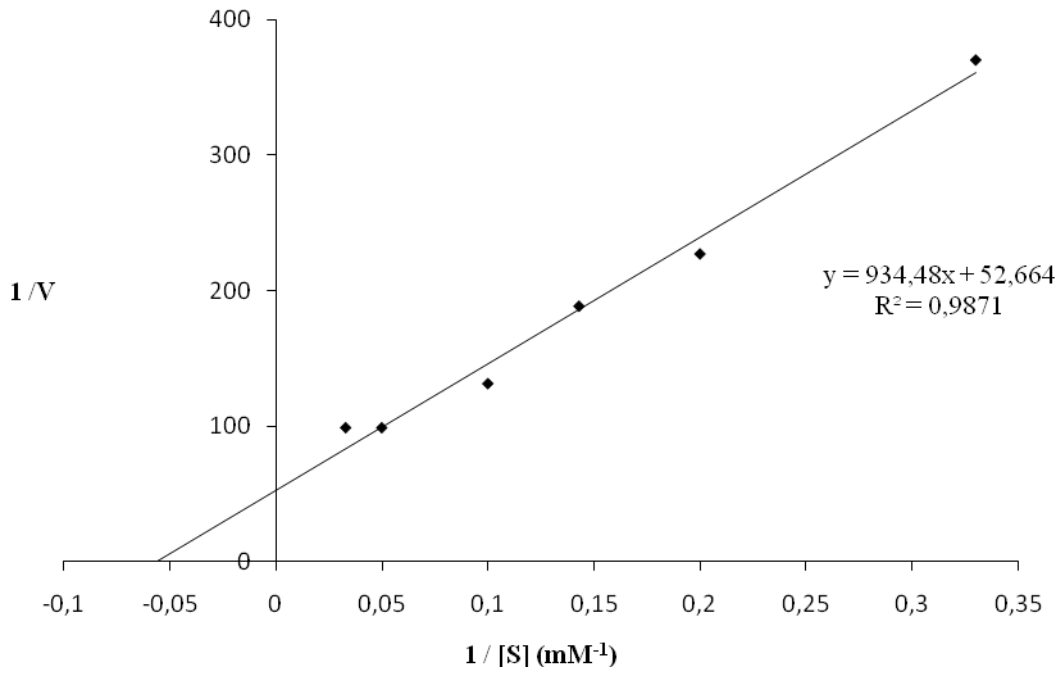
Şekil 4.40. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



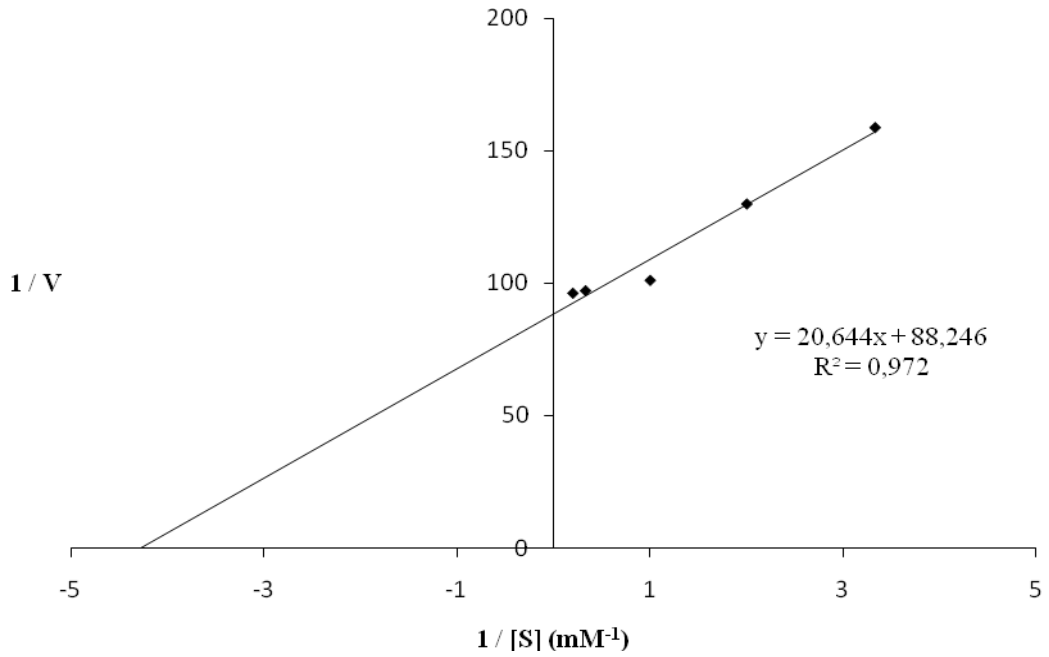
Şekil 4.41. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



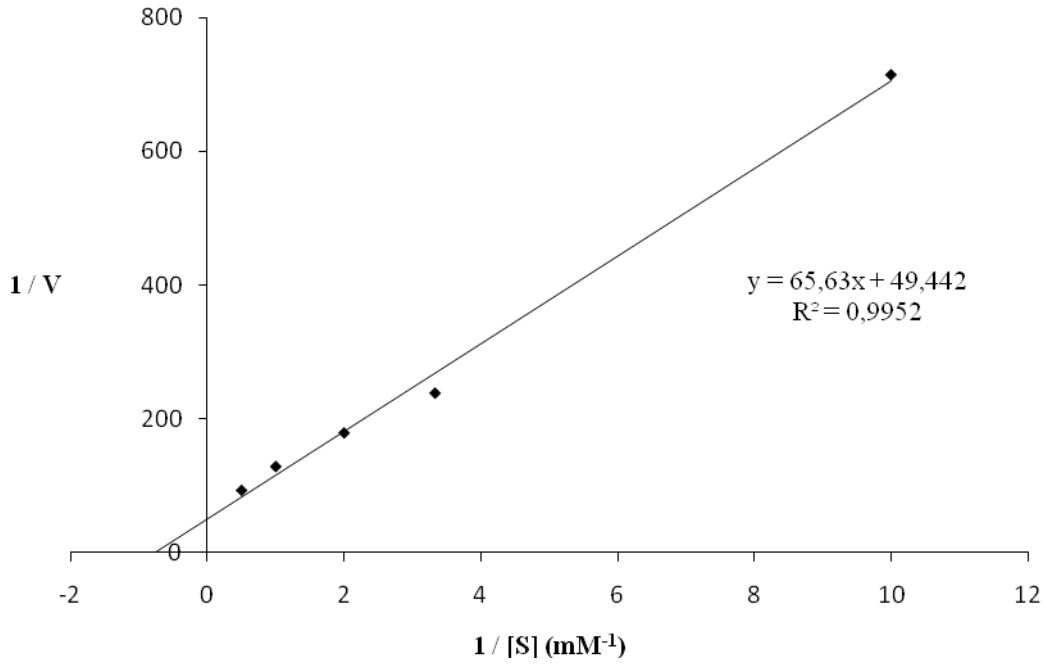
Şekil 4.42. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



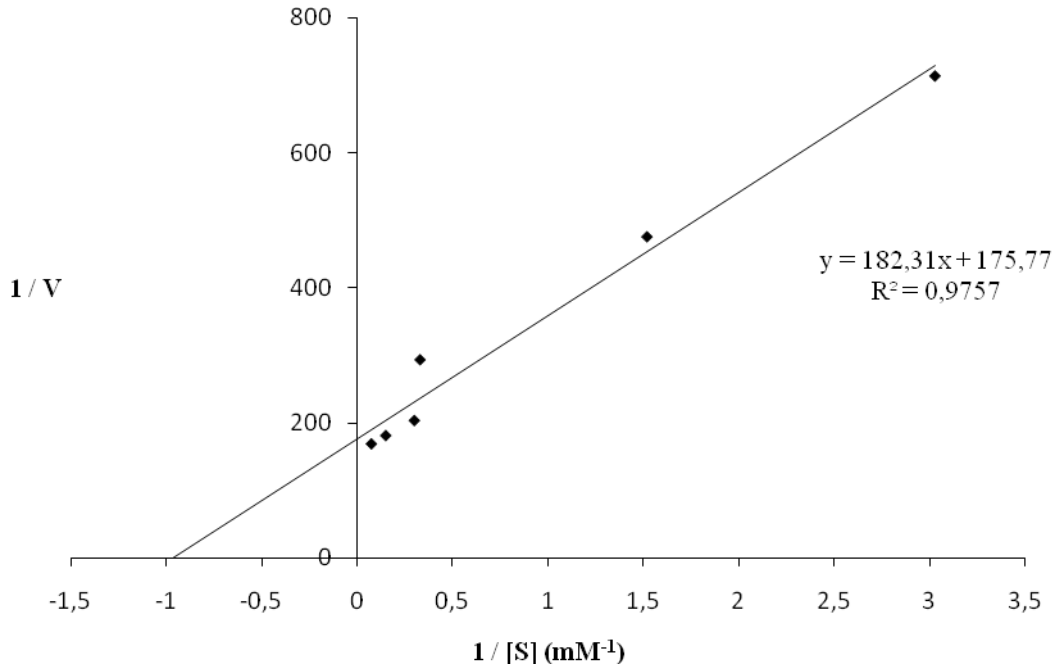
Şekil 4.43. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



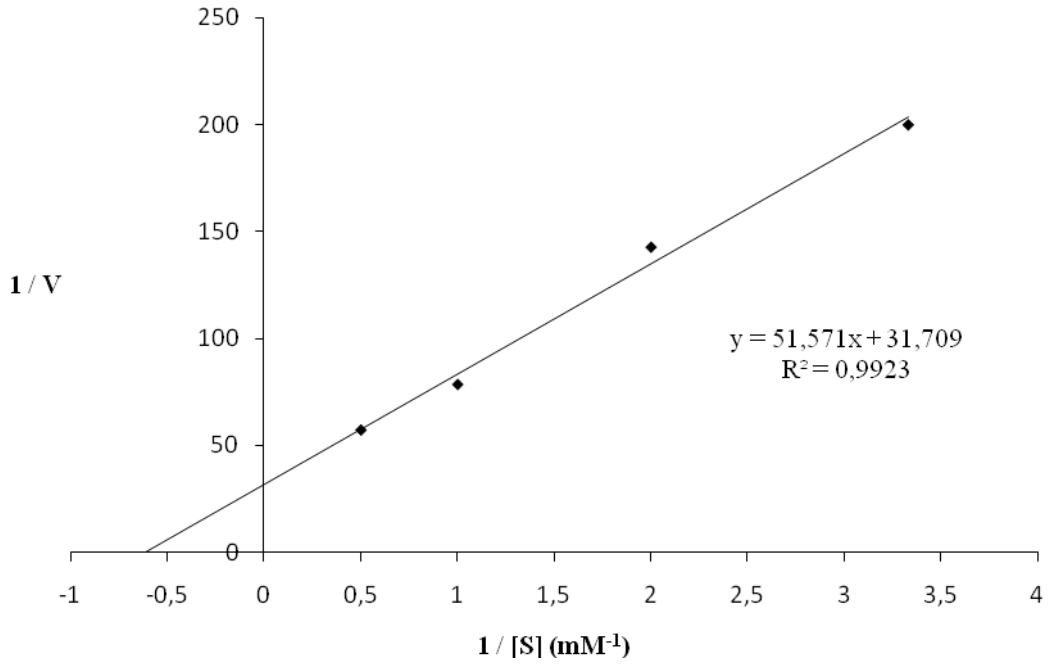
Şekil 4.44. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



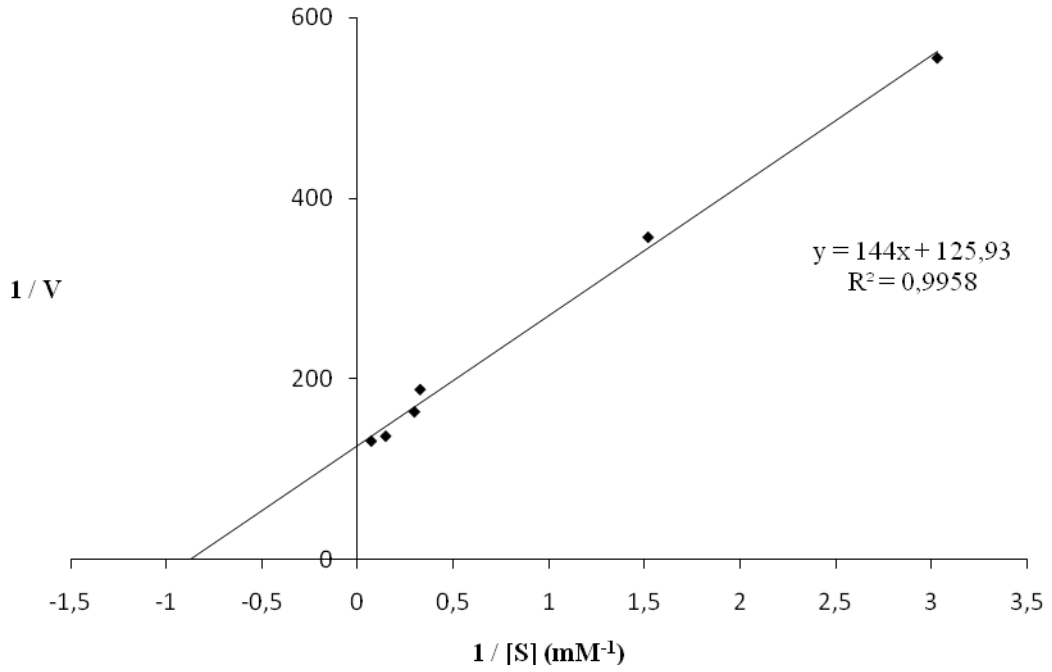
Şekil 4.45. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



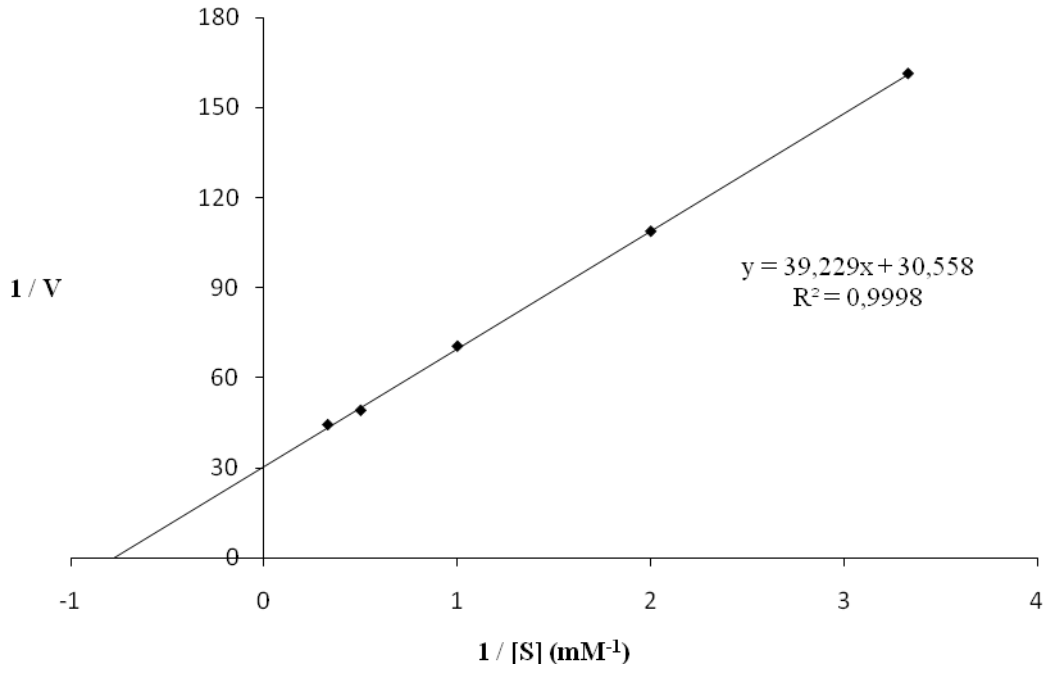
Şekil 4.46. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



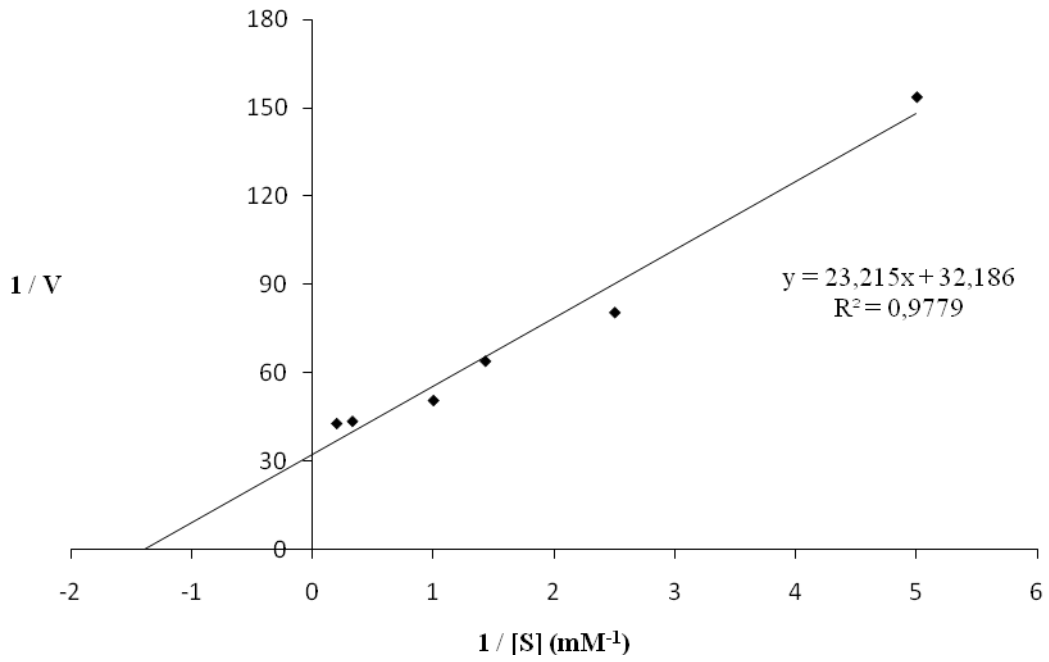
Şekil 4.47. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



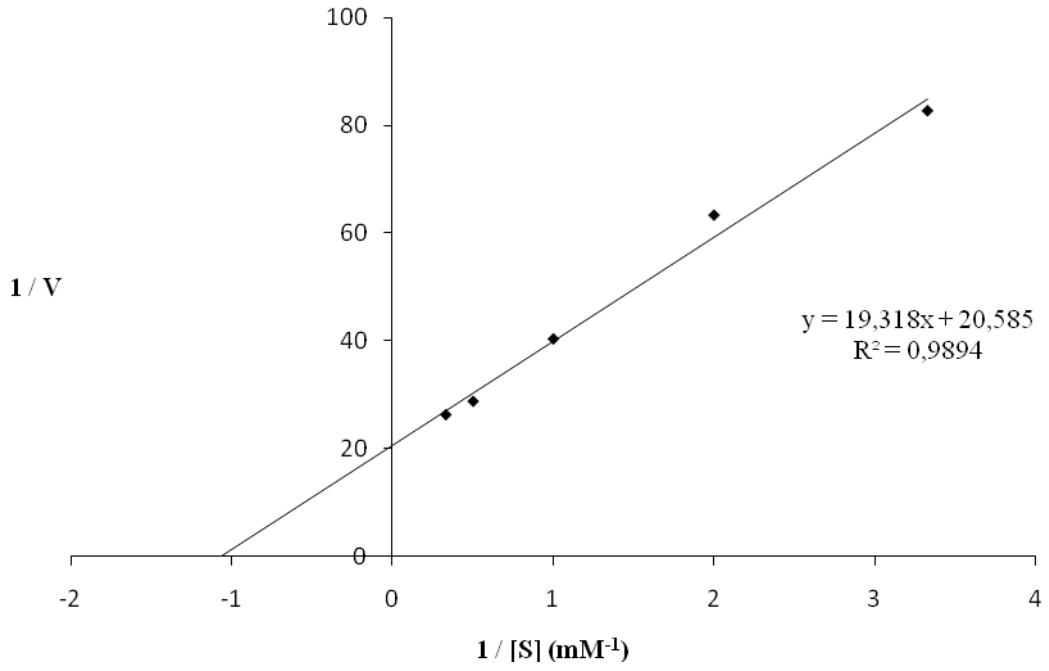
Şekil 4.48. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



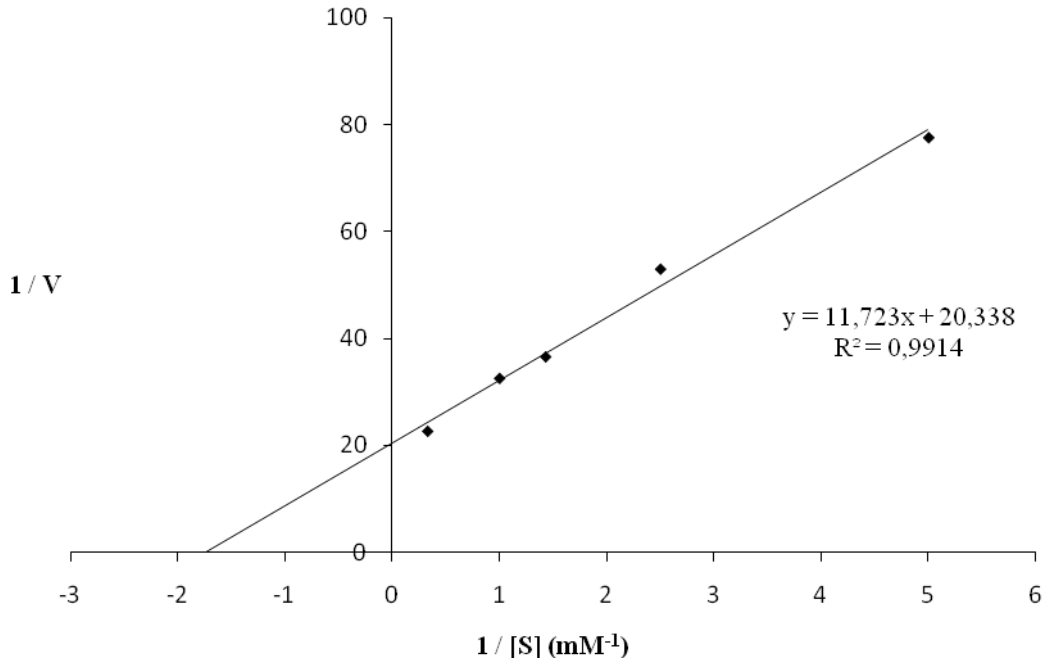
Şekil 4.49. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o -dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



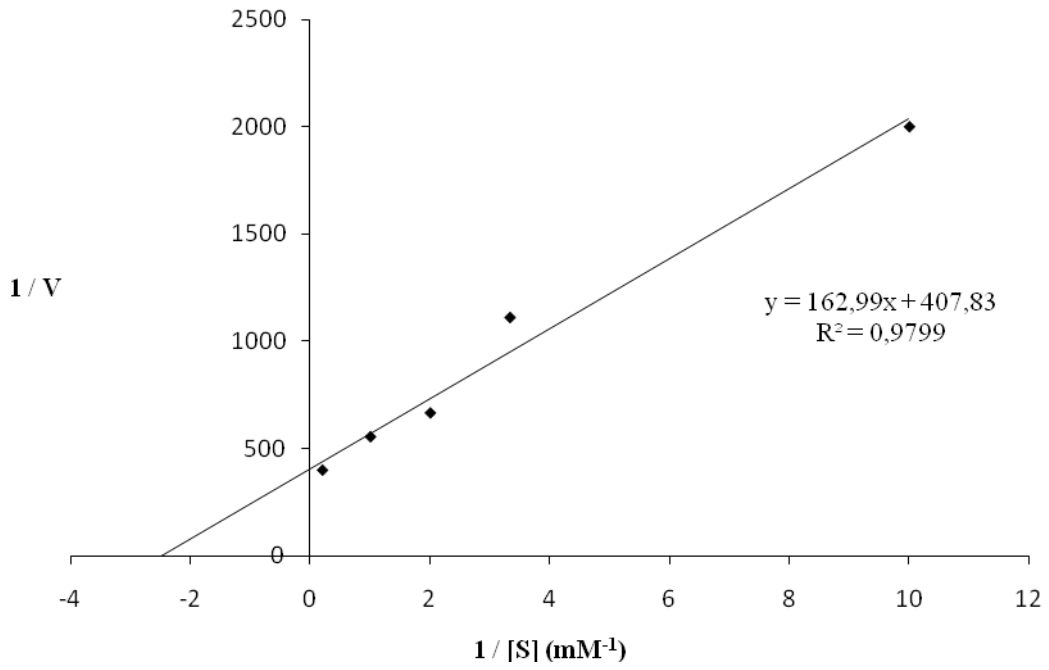
Şekil 4.50. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o -dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



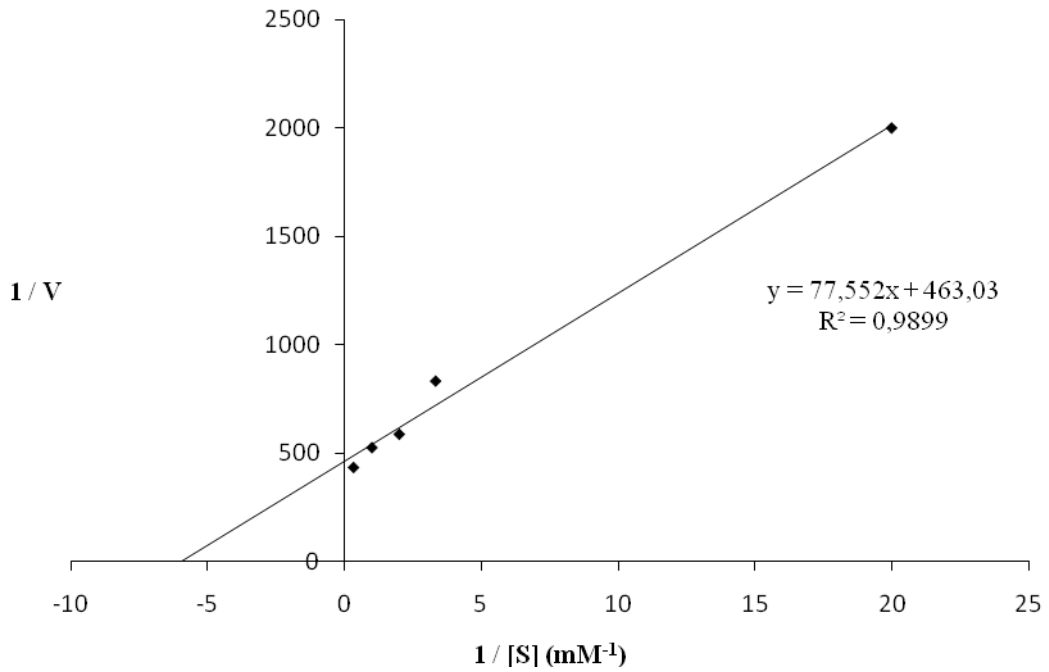
Şekil 4.51. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



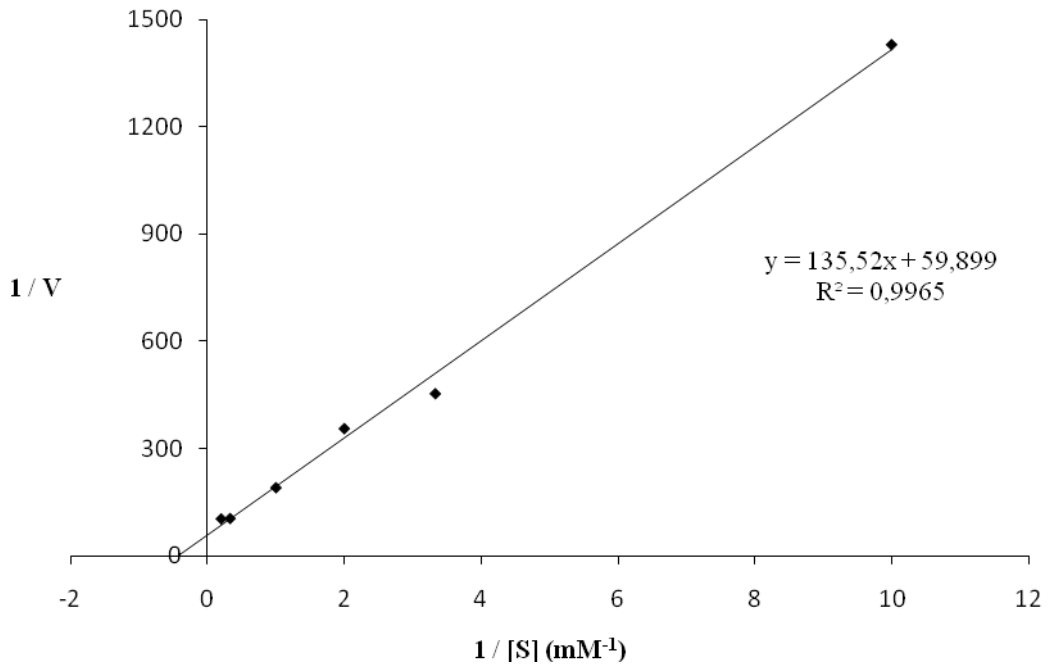
Şekil 4.52. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



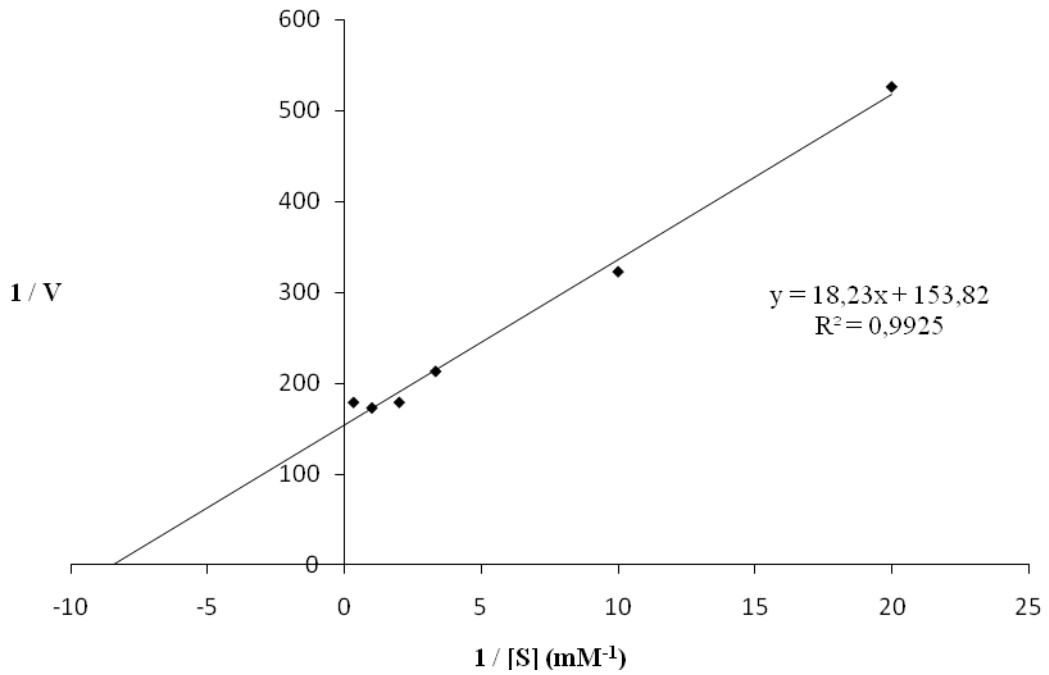
Şekil 4.53. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



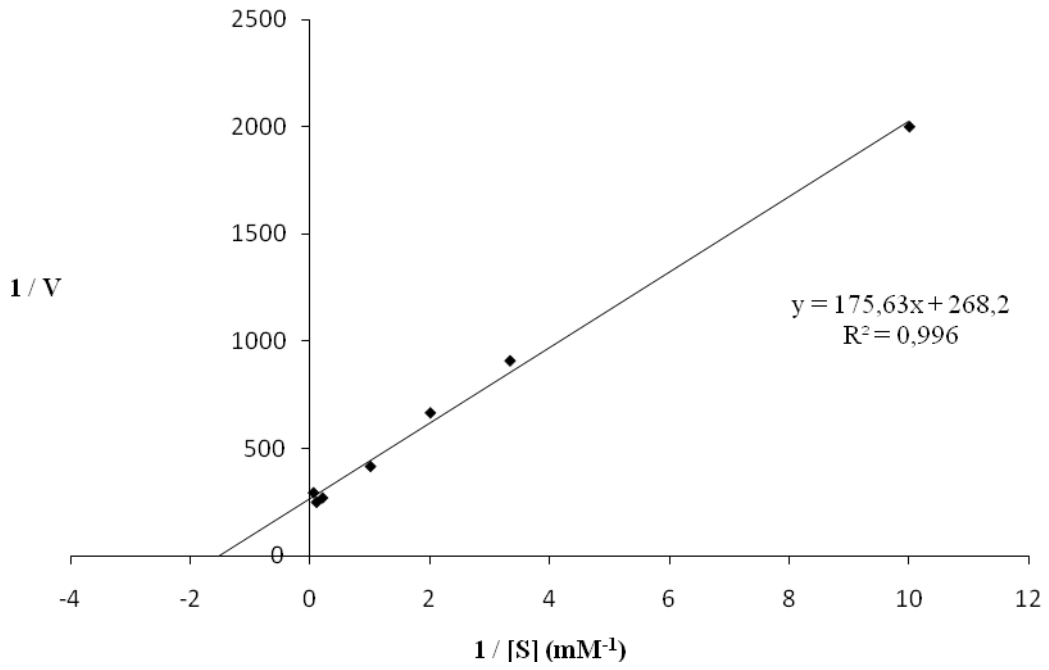
Şekil 4.54. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



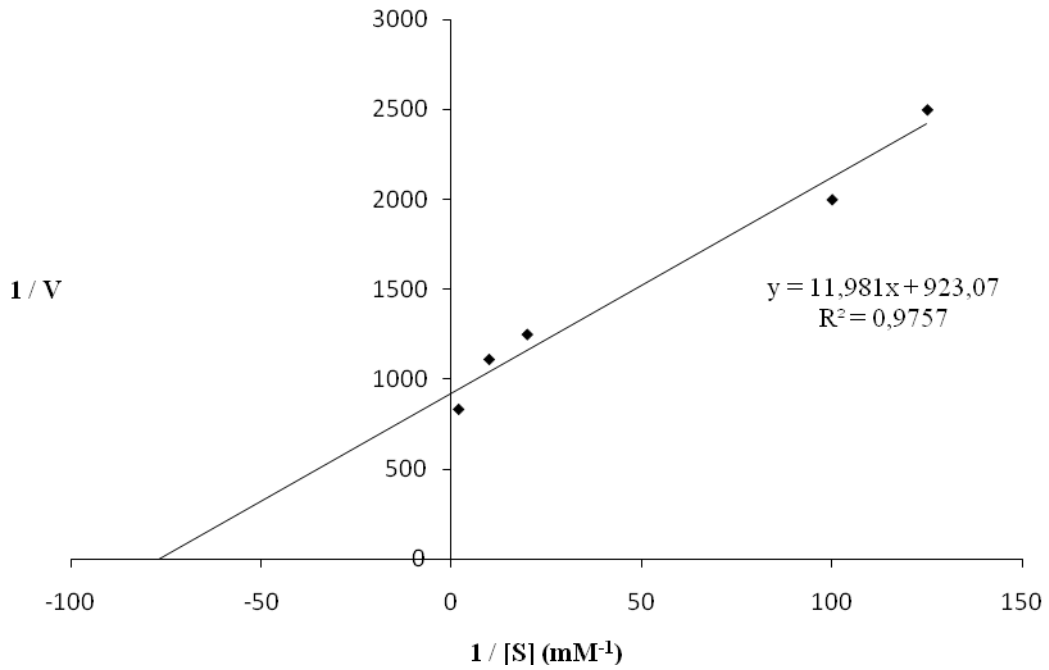
Şekil 4.55. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



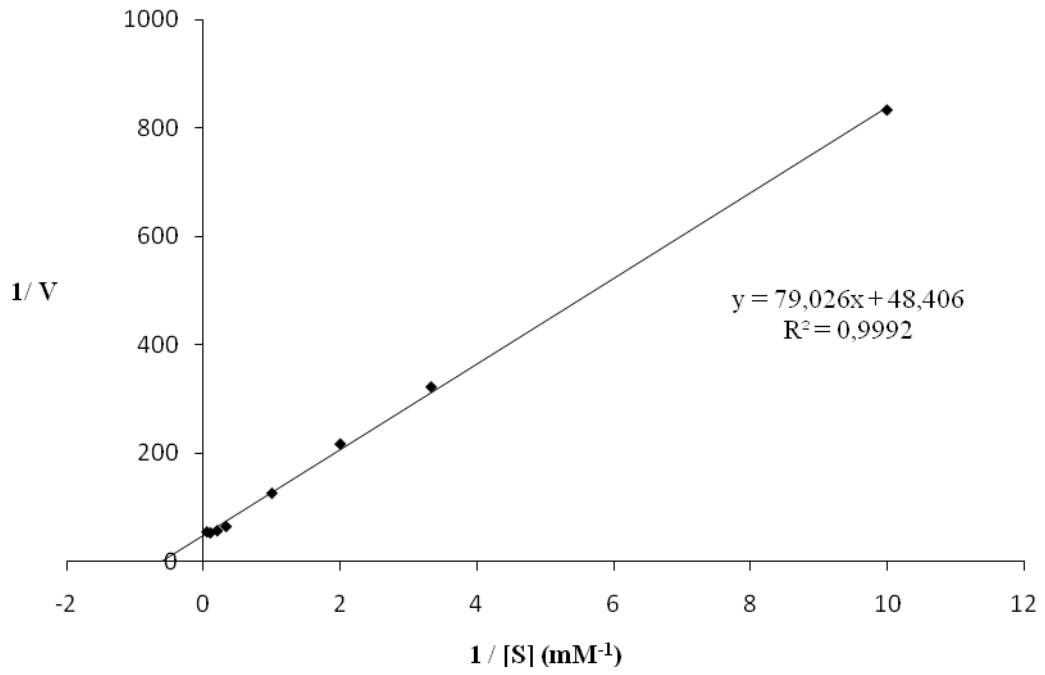
Şekil 4.56. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



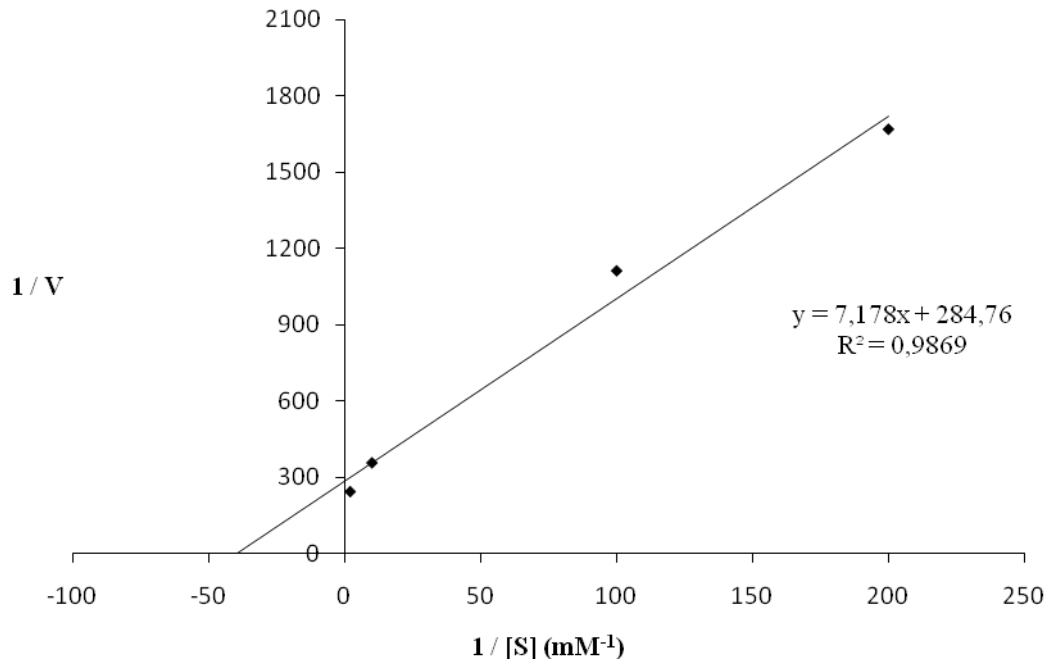
Şekil 4.57. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



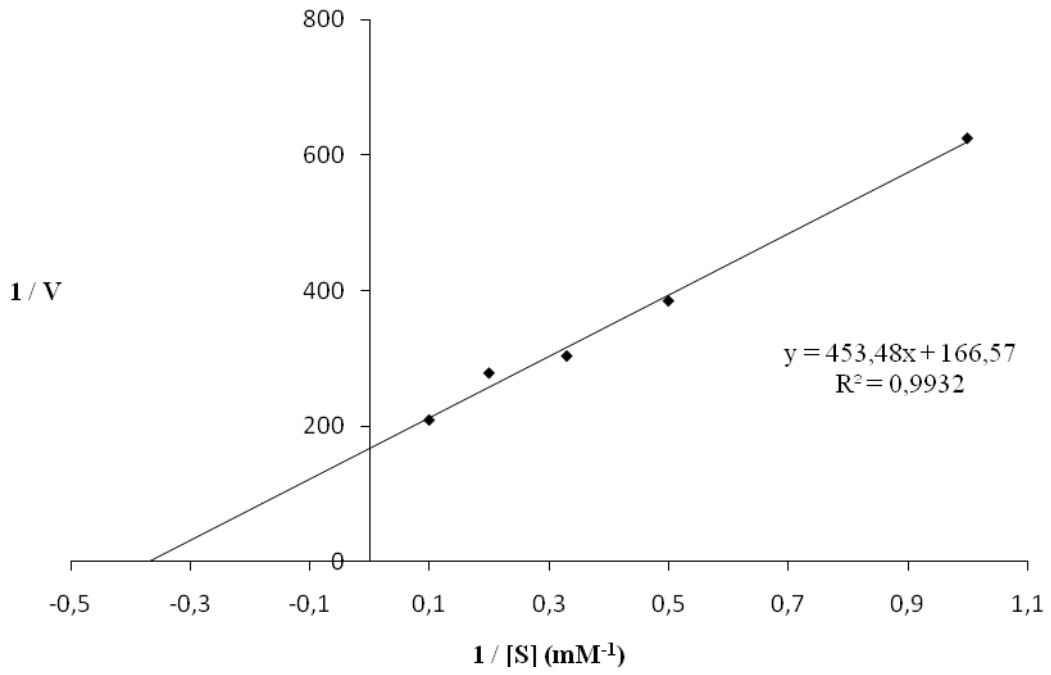
Şekil 4.58. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



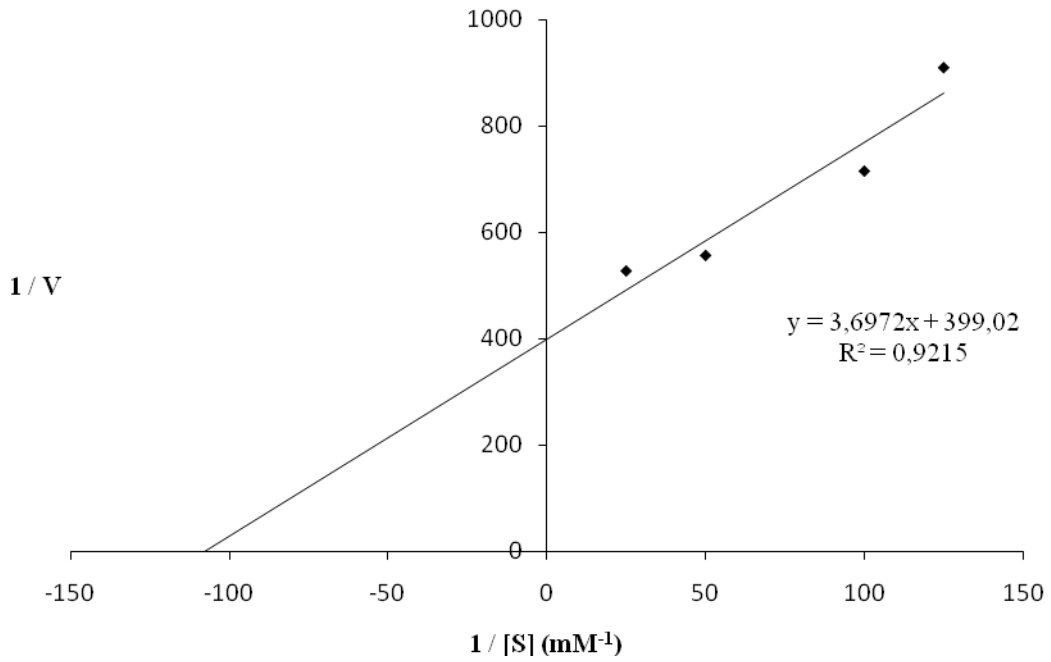
Şekil 4.59. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



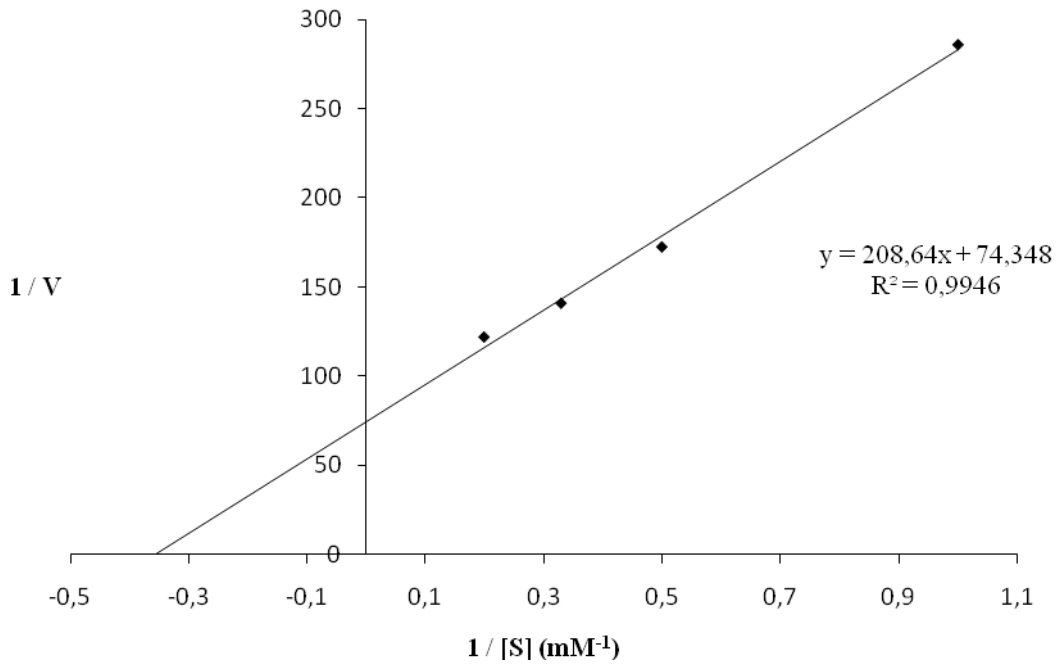
Şekil 4.60. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



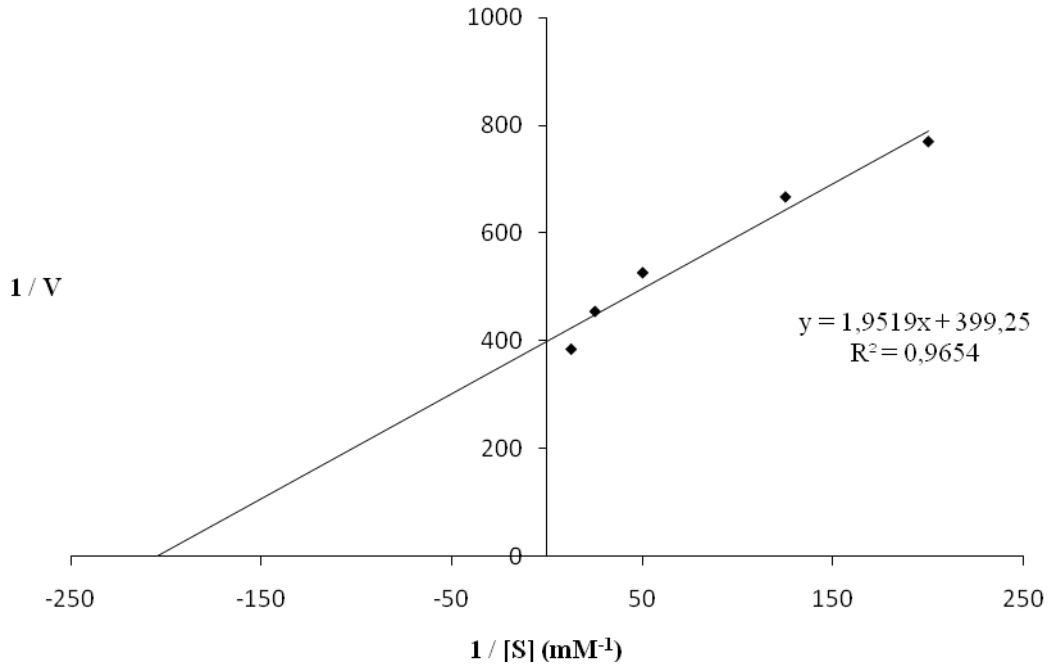
Şekil 4.61. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.62. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.63. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



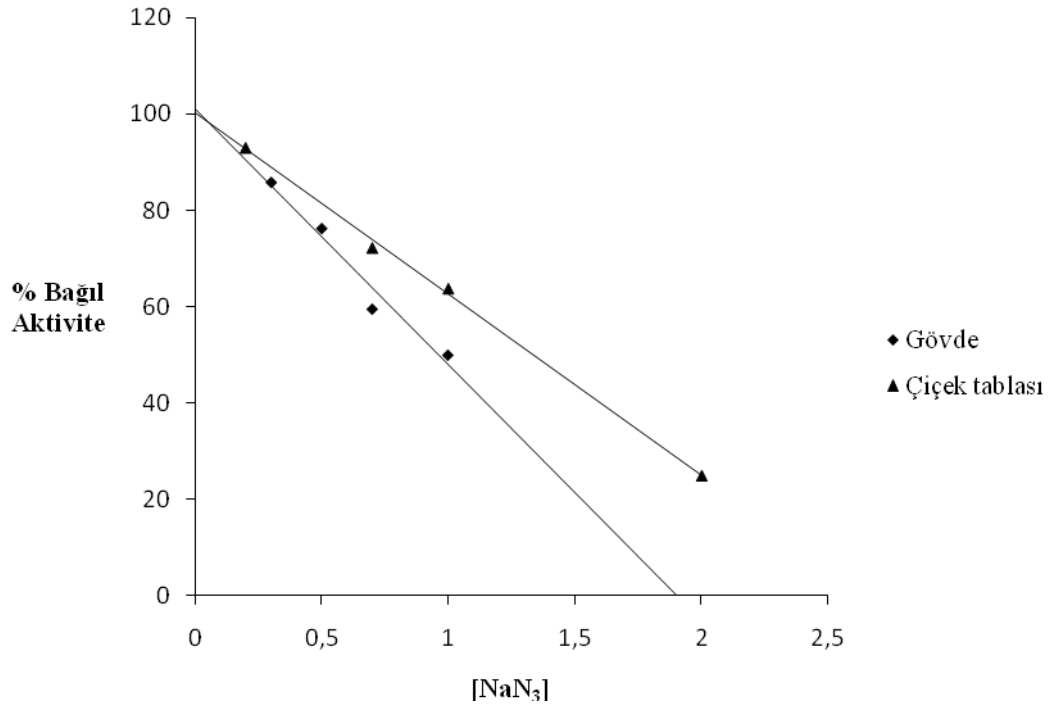
Şekil 4.64. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Tablo 4.1. POD enziminin substrat spesifikliği ile ilgili toplu bulgular

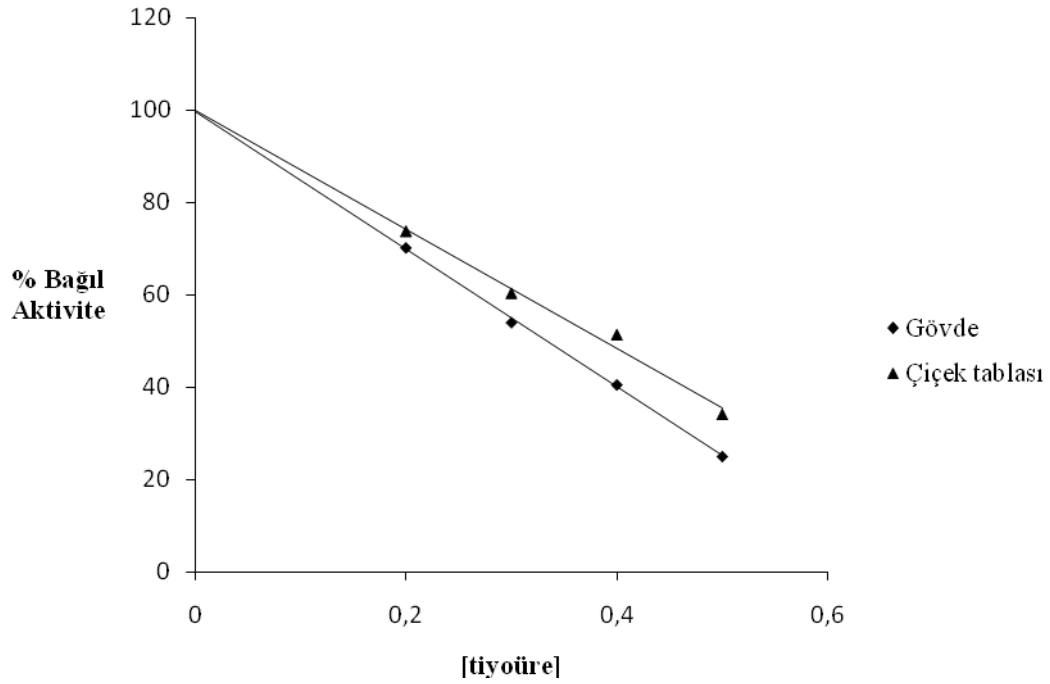
Substrat	Bitki Kaynağı	Optimum pH	K_m (mM)	V_{max} (EÜ/mL)	Optimum Sıcaklık(°C)
4-metil katekol	Gövde	7,2	2,6358	0,0161	30
	Çiçek tablası	7,2	2,9174	0,0319	40
ABTS	Gövde	4	1,9739	0,2347	40
	Çiçek tablası	4	1,8848	0,0522	30
Guaiakol	Gövde	6,5	7,6032	0,0032	40
	Çiçek tablası	6,5	17,7442	0,0189	30
Kafeik Asit	Gövde	5,5	1,3274	0,0202	30
	Çiçek tablası	5,5	1,6264	0,0315	30
o-dianisidin	Gövde	5,4	1,2838	0,0327	30
	Çiçek tablası	5,4	0,9385	0,0486	30
o-fenilen diamin	Gövde	5,5	0,3997	0,0025	30
	Çiçek tablası	5,5	2,2625	0,0167	40
Progallol	Gövde	8,5	0,6548	0,0037	40
	Çiçek tablası	7,6	1,6326	0,0207	40
Katekol	Gövde	7,2	2,7225	0,0060	40
	Çiçek tablası	7,2	2,8063	0,0135	40

4.2.4. İnhibitörlerin etkisi

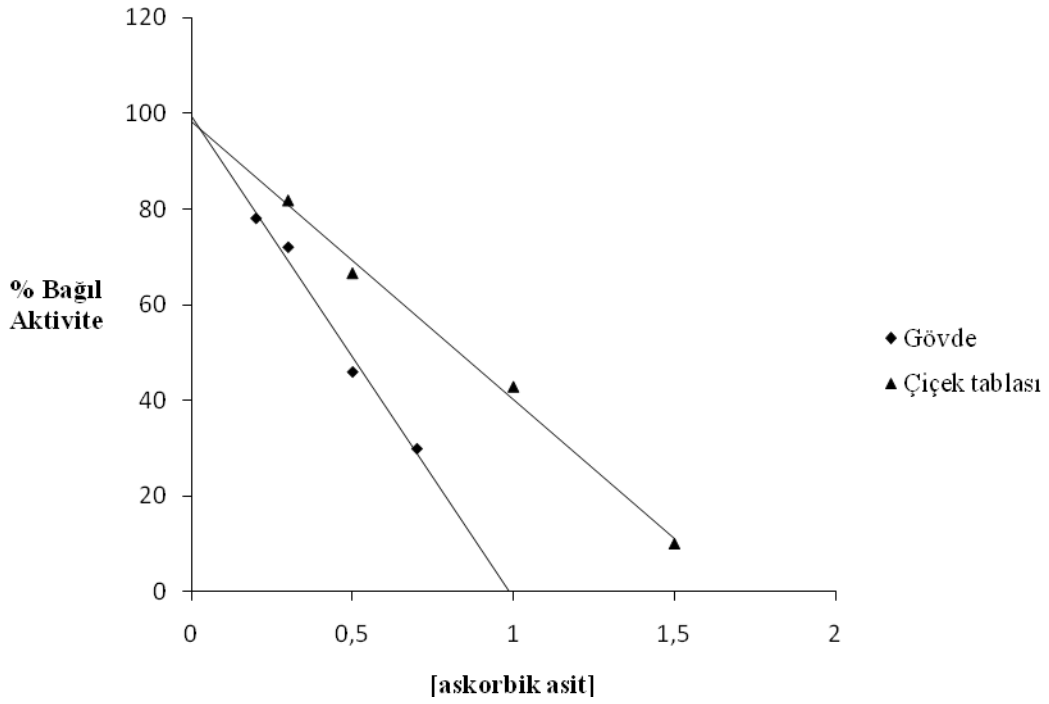
Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından ekstrakte edilen POD enzimi üzerine etki eden toplam 8 farklı inhibitör bölüm 3.3.6.'da anlatıldığı gibi incelenmiştir. İncelenen inhibitörler sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, potasyum siyanür, 2-merkapt etanol, L-Glutasyon, L-Sistein ve sodyum sülfid inhibitörleridir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen grafiklerden her bir inhibitör için I_{50} ve K_i değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen grafikler ve hesaplanan değerlerin tabloları aşağıda verilmiştir.



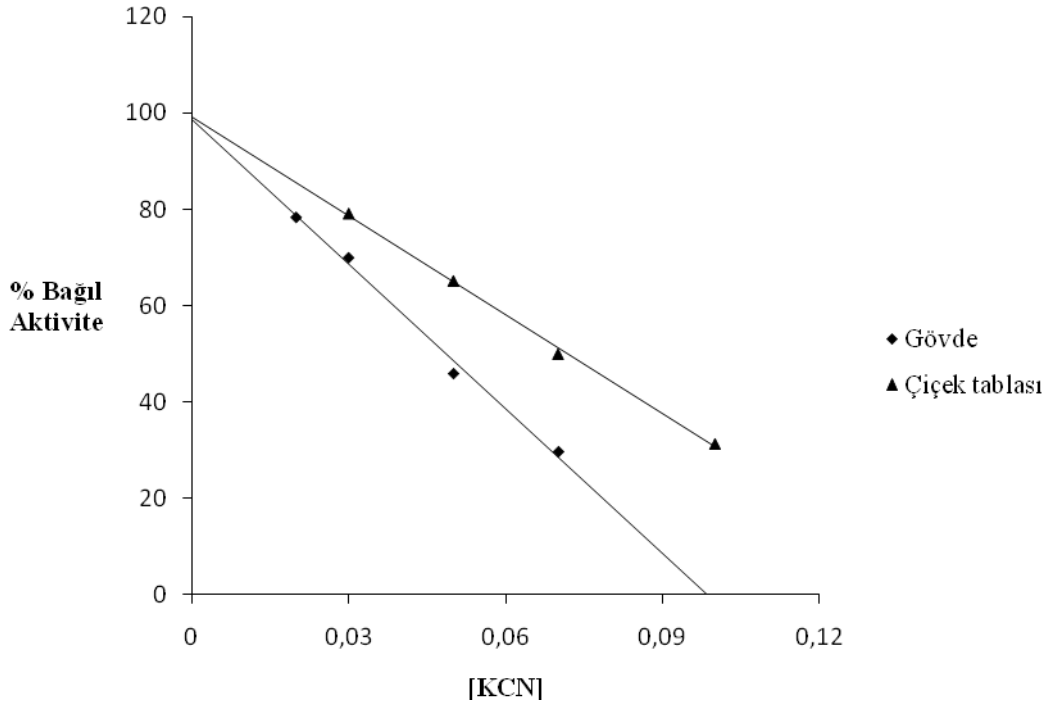
Şekil 4.65. Devede dikeni gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum azidin etkisi



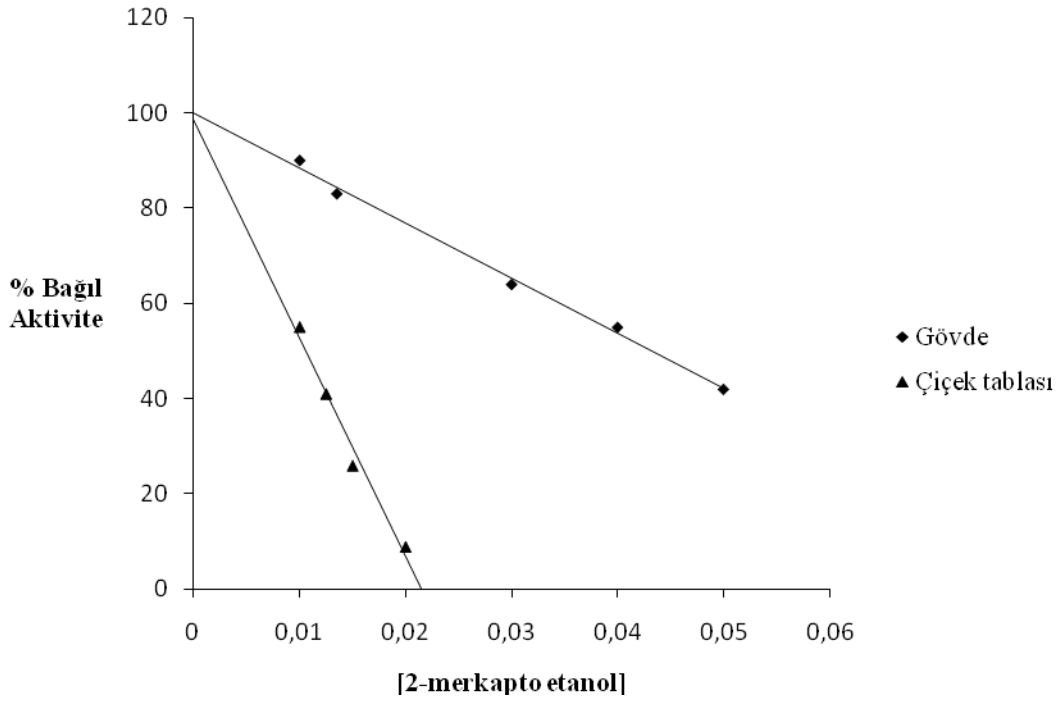
Şekil 4.66. Devede dikeni gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine tiyoürenin etkisi



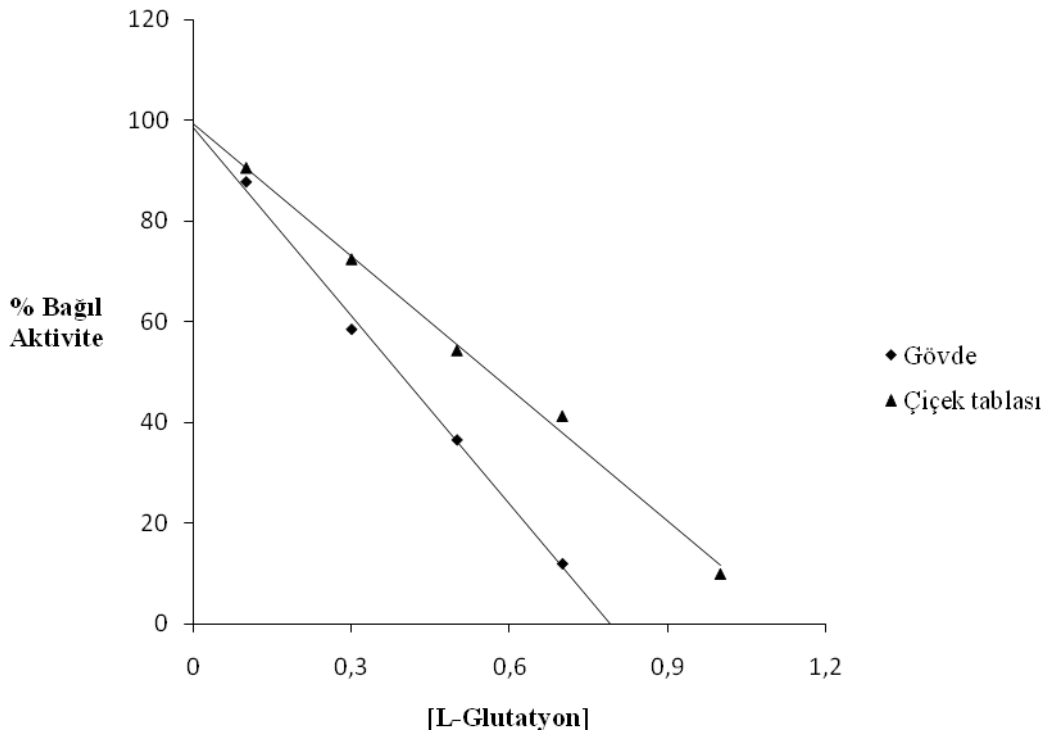
Şekil 4.67. Devede dikeni gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine askorbik asitin etkisi



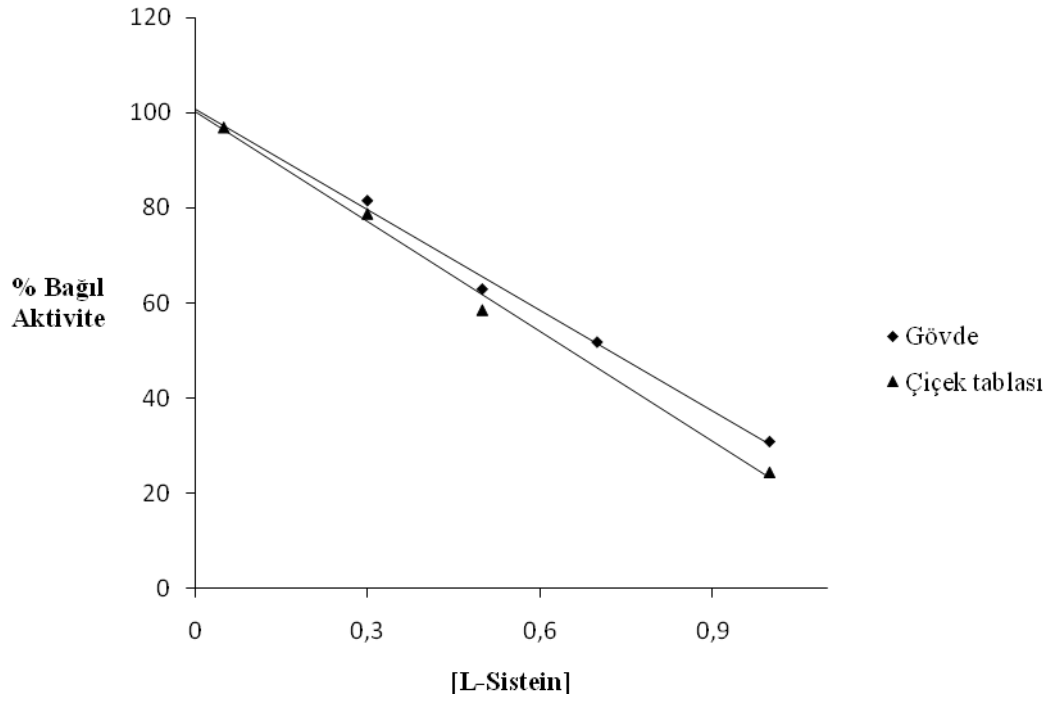
Şekil 4.68. Devede dikeni gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine potasyum siyanürün etkisi



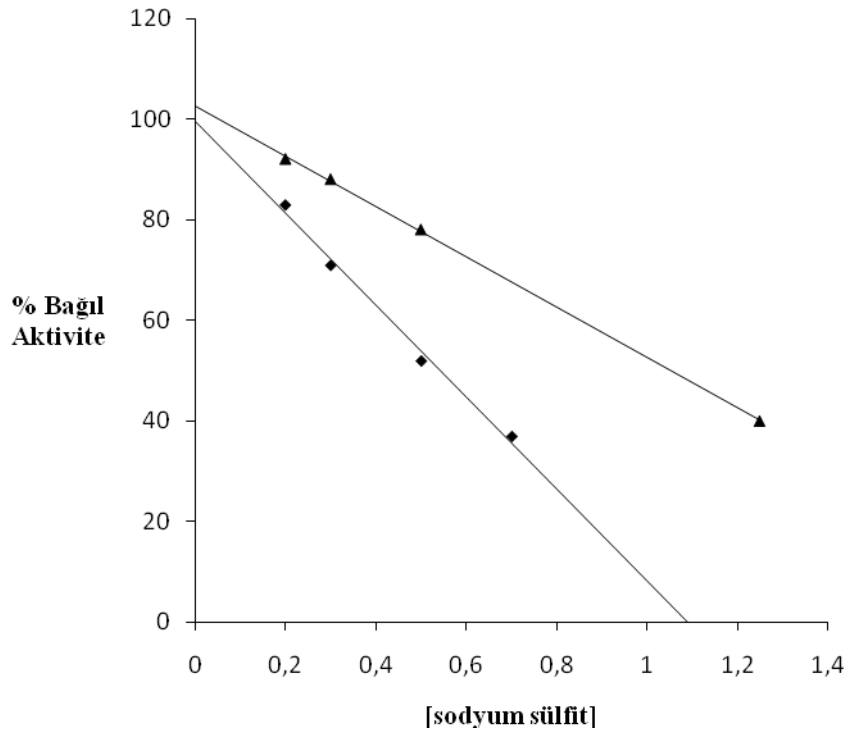
Şekil 4.69. Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine 2-merkapto etanolün etkisi



Şekil 4.70. Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-Glutatyonun etkisi



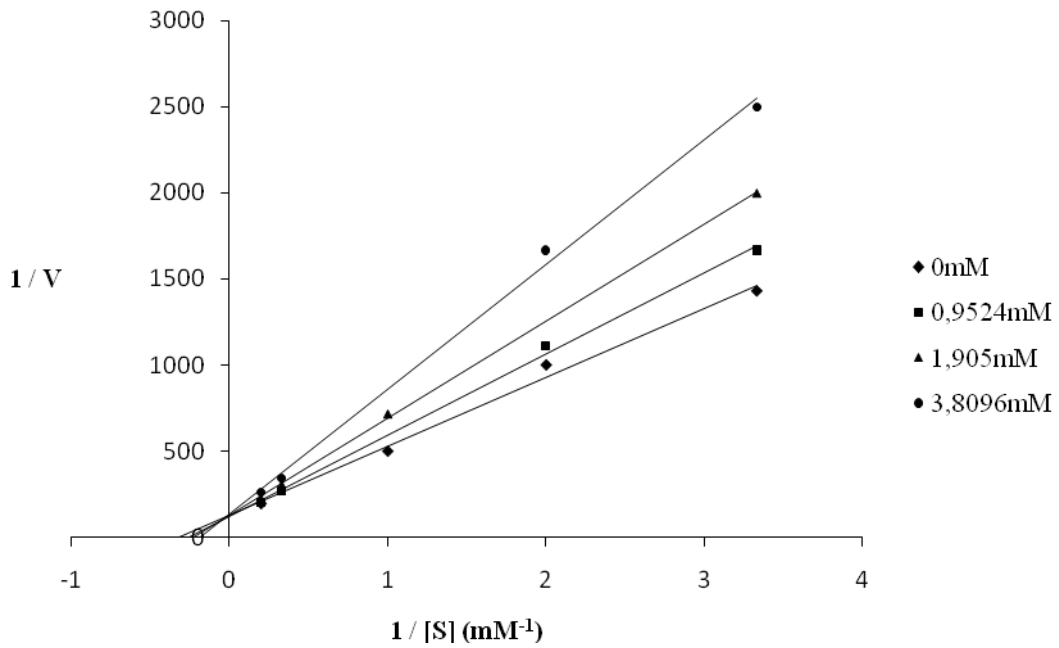
Şekil 4.71. Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-Sisteinin etkisi



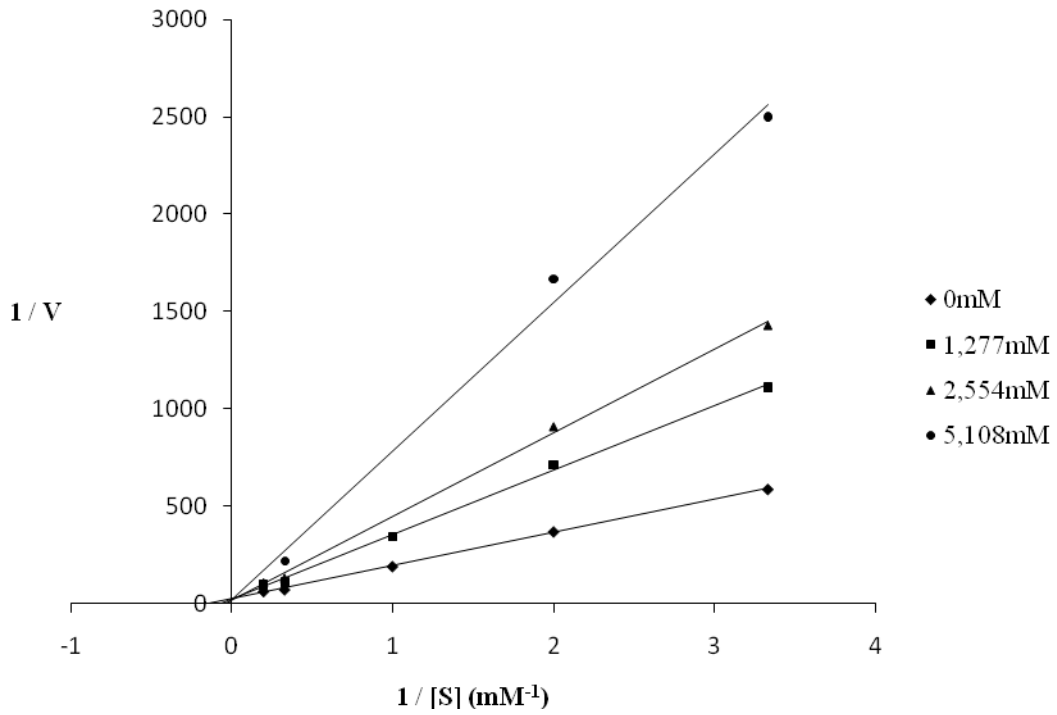
Şekil 4.72. Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum sülfite etkisi

Tablo 4.2. POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I_{50} değerleri

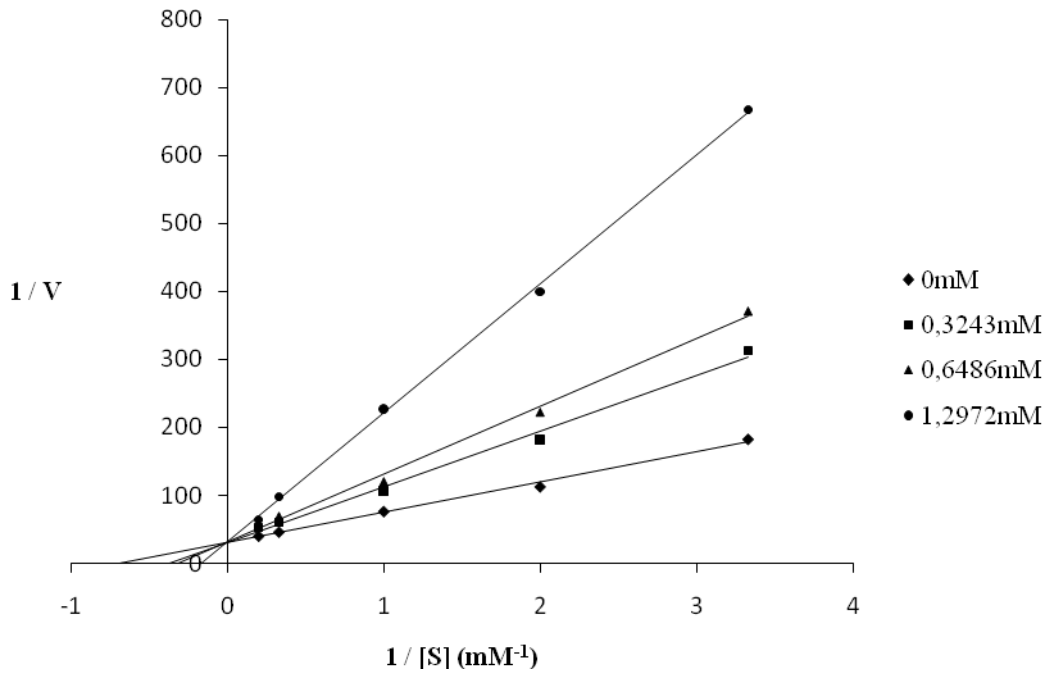
İnhibitör	Bitki Kaynağı	
	Gövde I_{50} (mM)	Çiçek tablası I_{50} (mM)
Sodyum azit	0,9524mM	1,2770mM
Tiyoüre	0,3243mM	0,3874mM
Askorbik asit	0,4688mM	0,8570mM
KCN	0,0459mM	0,0700mM
2-Merkapto etanol	0,0440mM	0,0102mM
L-Glutatyon	0,3659mM	0,5793mM
L-Sistein	0,7259mM	0,5851mM
Sodyum sülfid	0,5219mM	0,8949mM



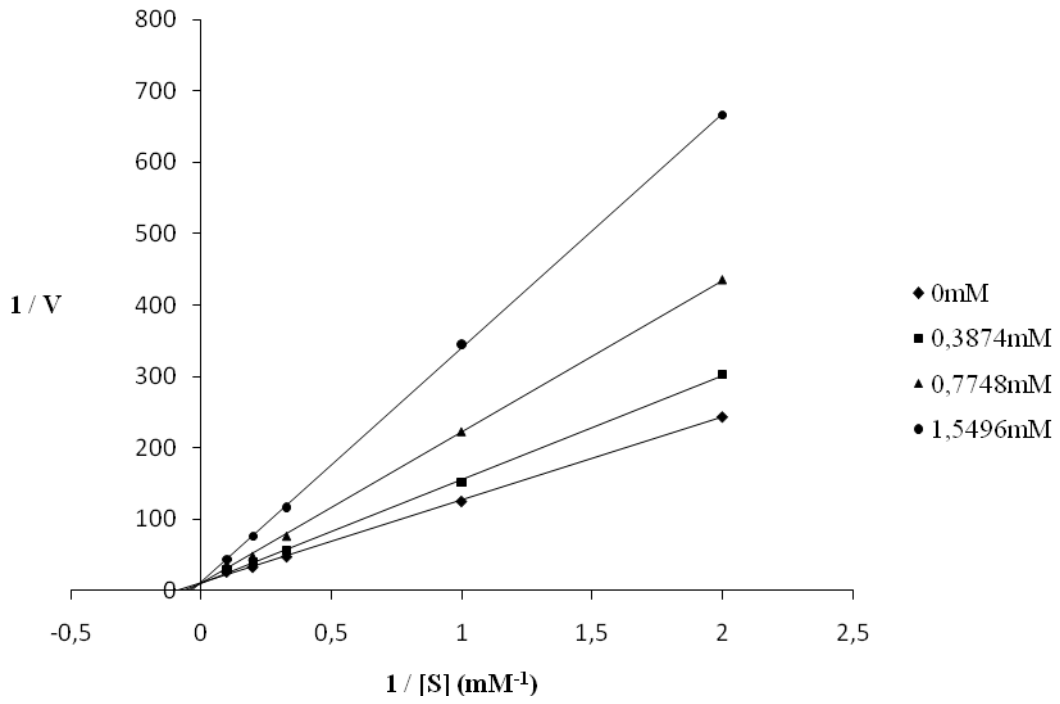
Şekil 4.73. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum azit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



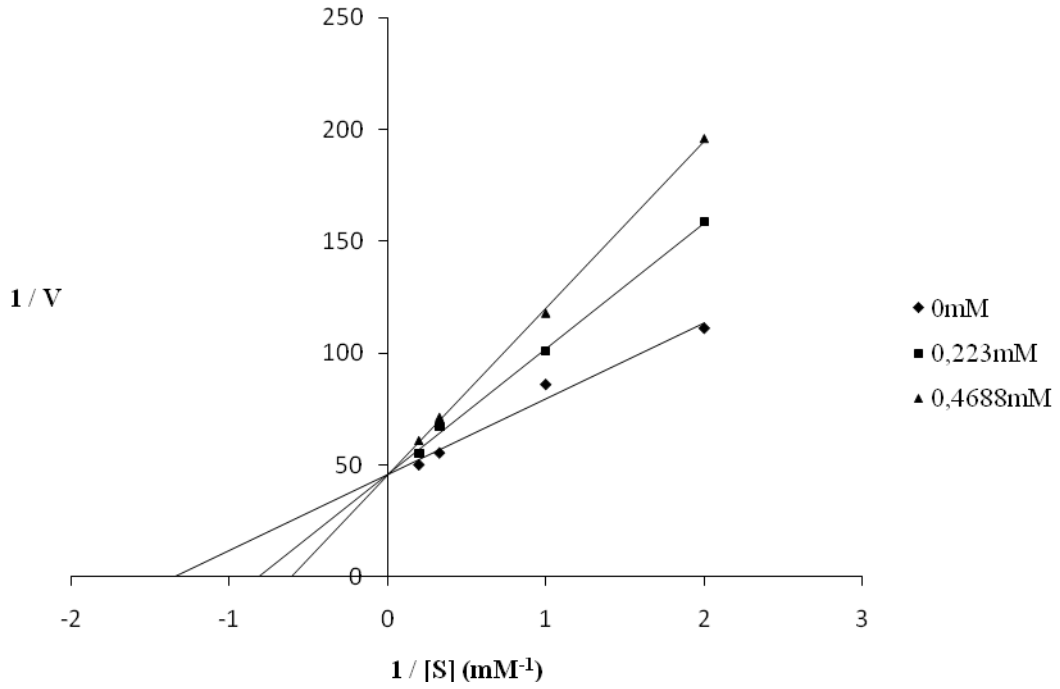
Şekil 4.74. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum azit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



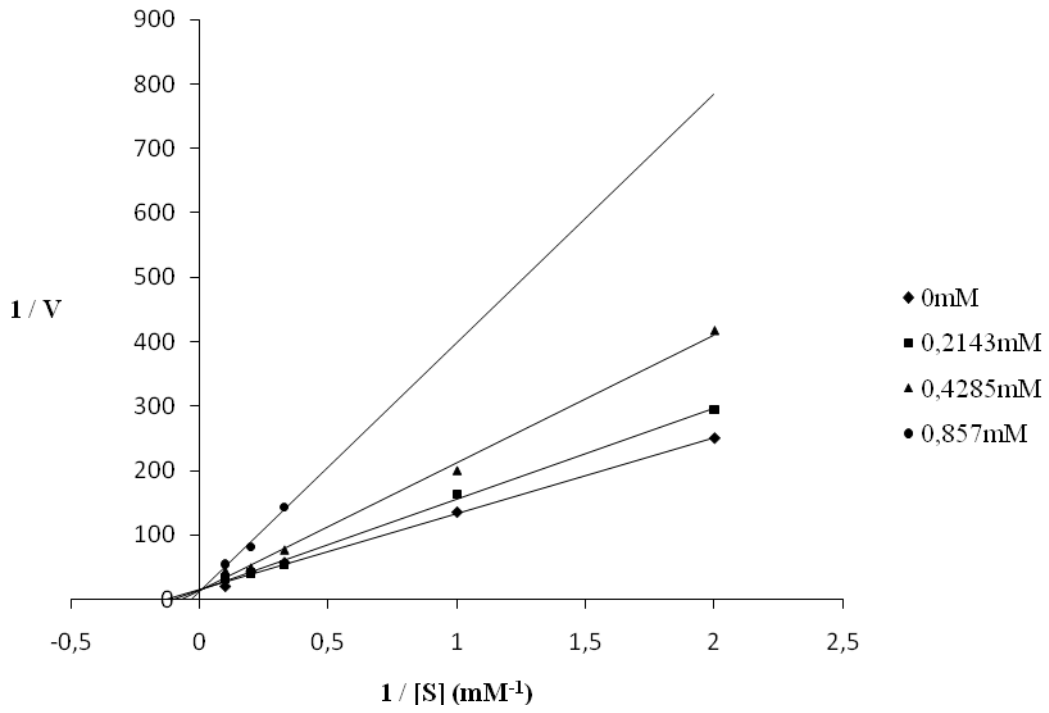
Şekil 4.75. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden tiyöre inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



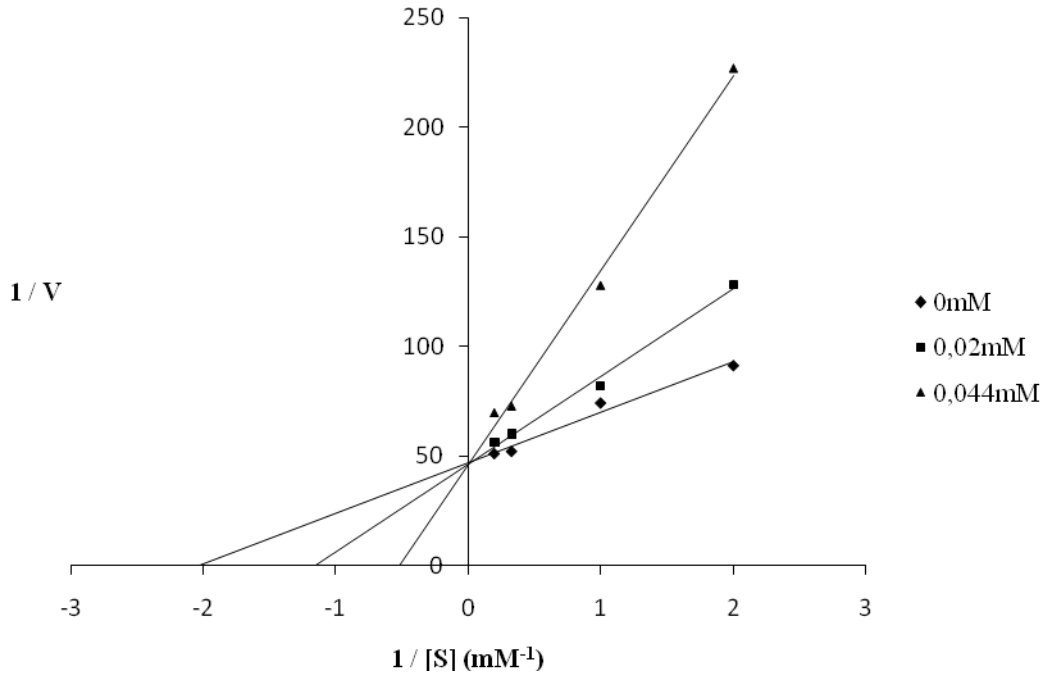
Şekil 4.76. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden tiyoüre inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



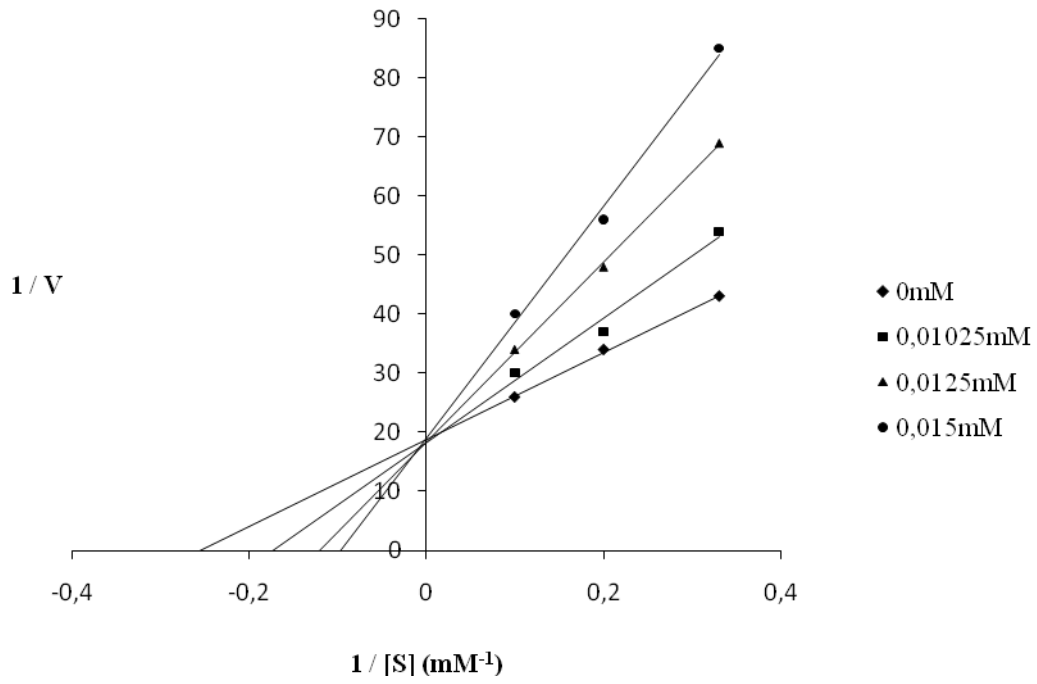
Şekil 4.77. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden askorbik asit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



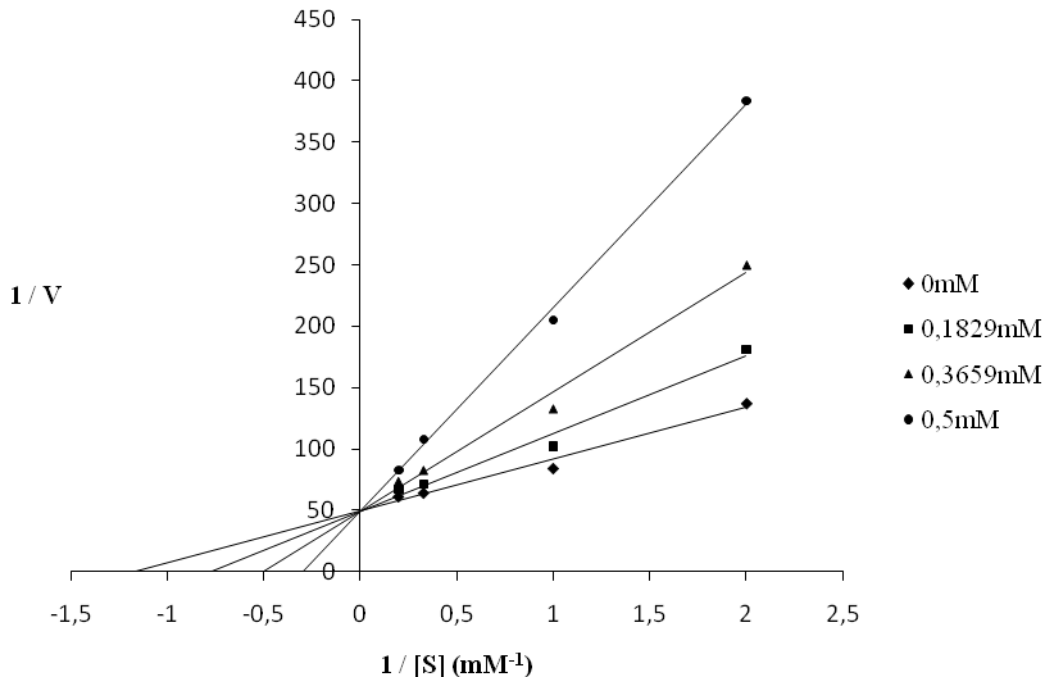
Şekil 4.78. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden askorbik asit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



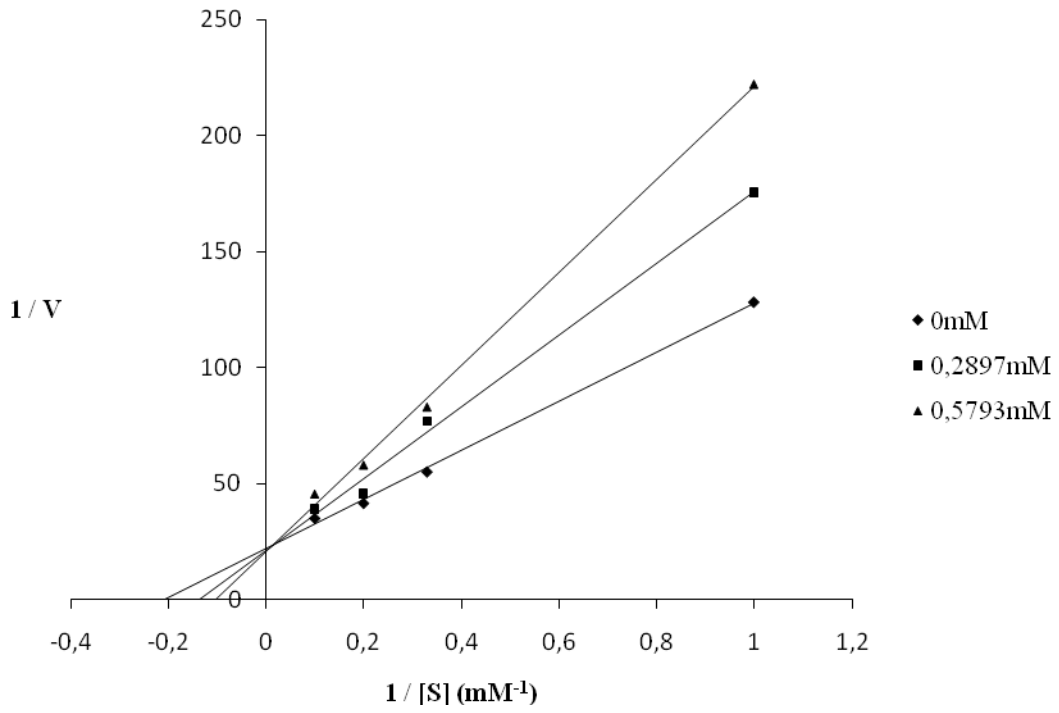
Şekil 4.79. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden 2-merkaptan etanol inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



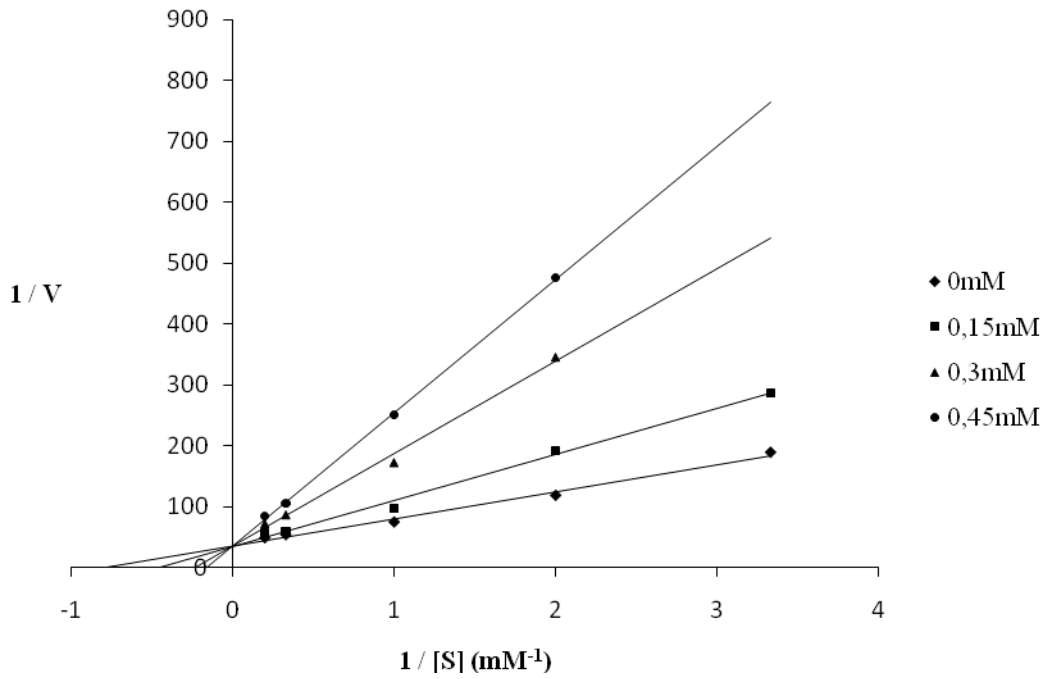
Şekil 4.80. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden 2-merkaptan etanol inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



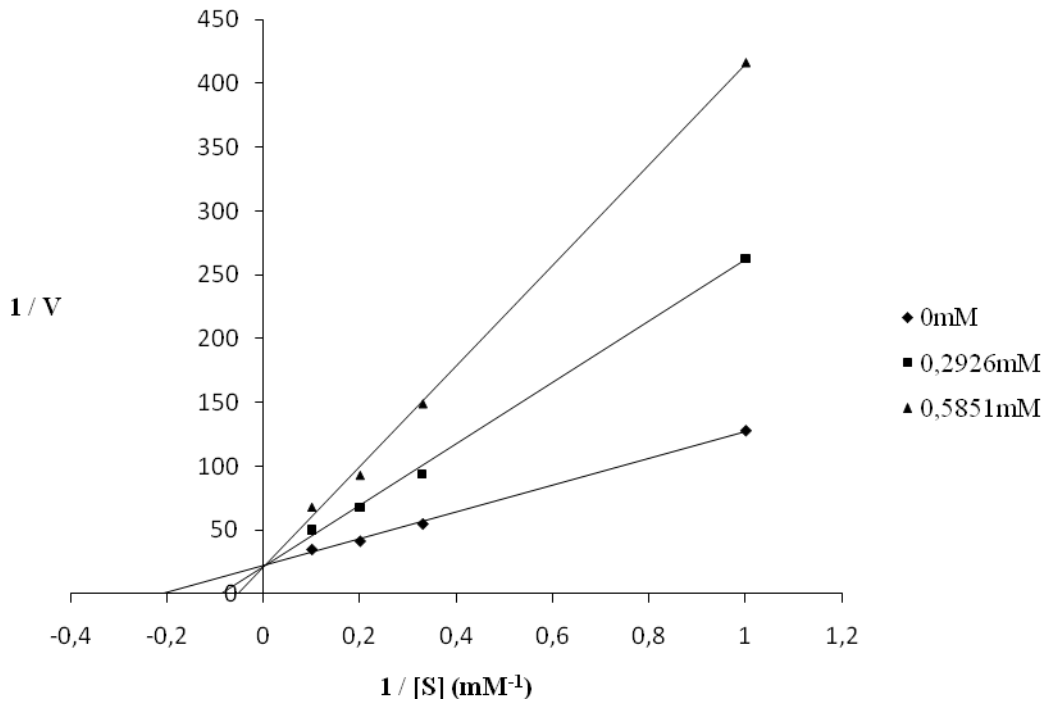
Şekil 4.81. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Glutatyon inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



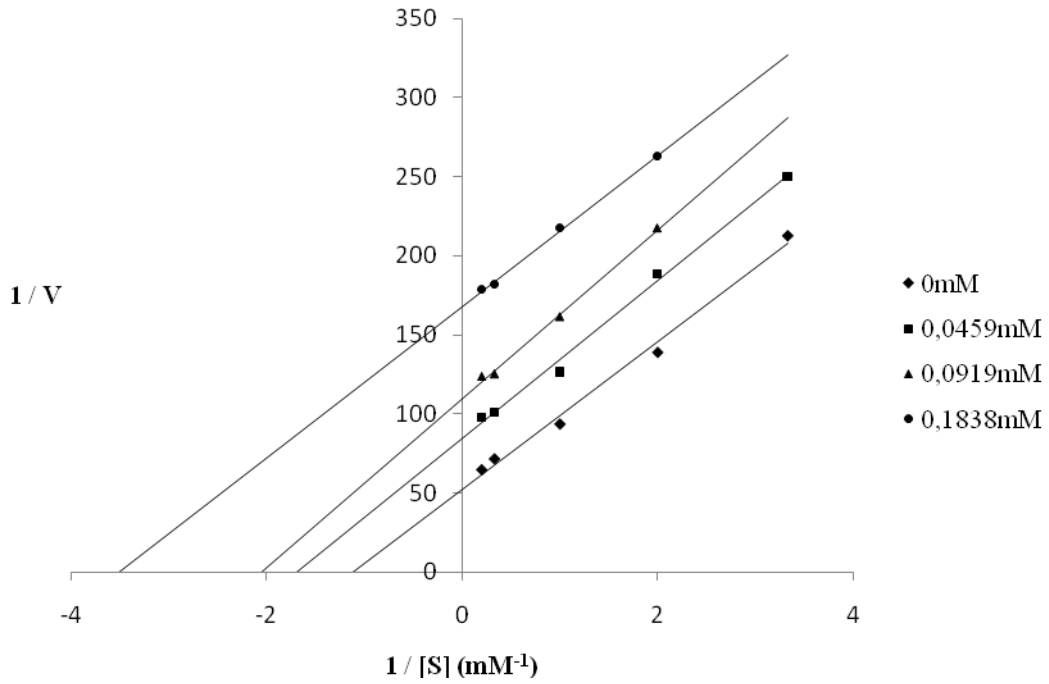
Şekil 4.82. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Glutatyon inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



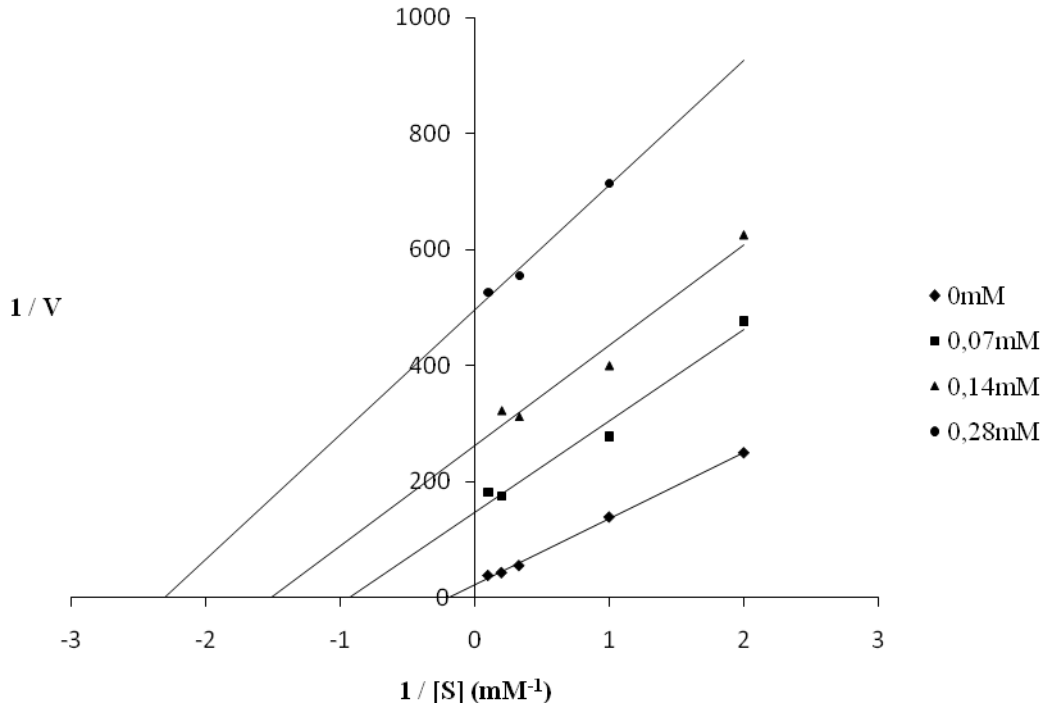
Şekil 4.83. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Sistein inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



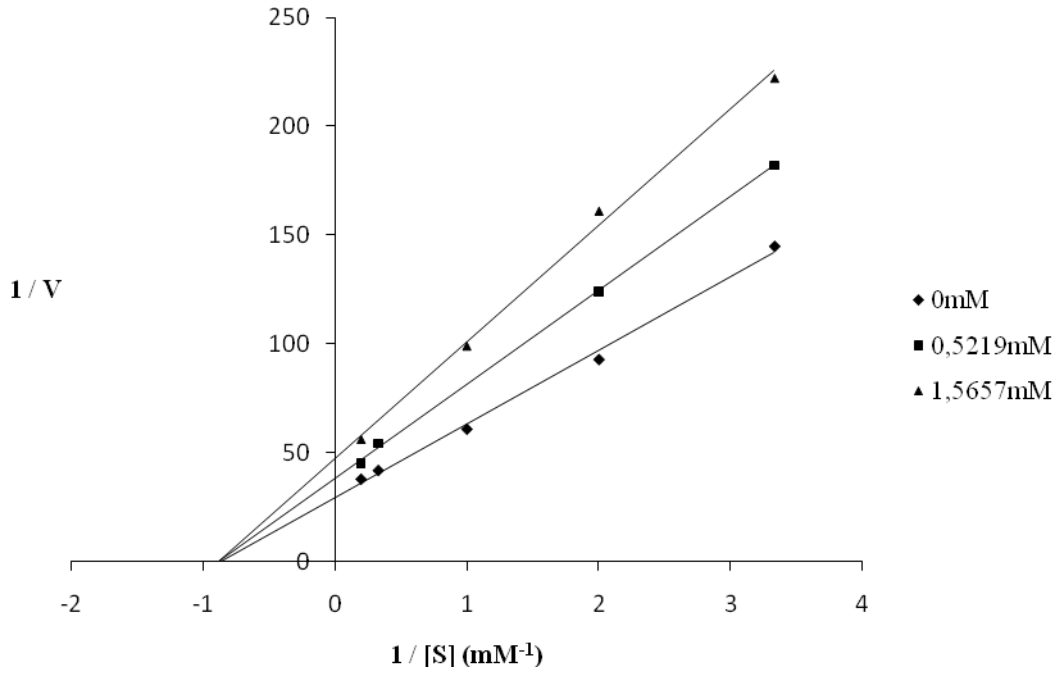
Şekil 4.84. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-Sistein inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



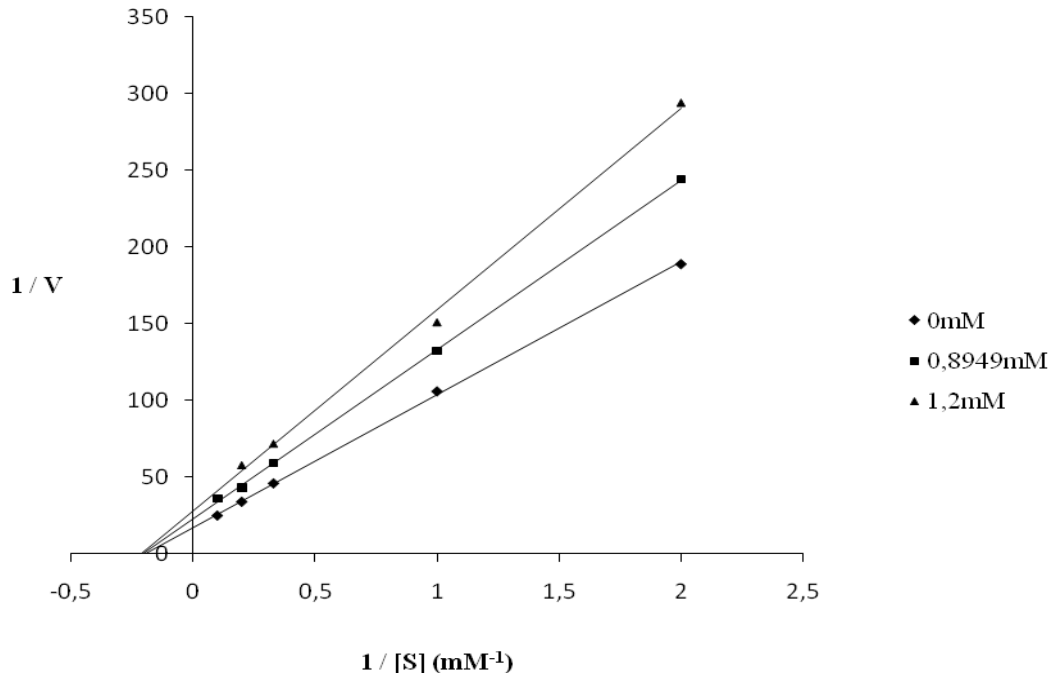
Şekil 4.85. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden potasyum siyanür inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.86. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden potasyum siyanür inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.87. Deve dikeninin gövde kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum sülfid inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.88. Deve dikeninin çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum sülfid inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan bu çalışmalarda, sodyum azid, tiyüre, askorbik asit, 2-merkapt etanol, L-Glutasyon ve L-Sistein inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyona, potasyum siyanür inhibitörünün yarı yarışmalı inhibisyona, sodyum sülfid inhibitörünün ise yarışmasız bir inhibisyona neden oldukları Line-weaver Burk grafikleri ile belirlenmiştir.

Tablo 4.3. POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve K_i değerleri

İnhibitör	Bitki Kaynağı	
	Gövde	Çiçek tablası
Sodyum azit	$K_i = 4,6210$ Kompetitif	$K_i = 0,8949$ Kompetitif
Tiyöüre	$K_i = 0,4188$ Kompetitif	$K_i = 1,1152$ Kompetitif
Askorbik asit	$K_i = 0,3682$ Kompetitif	$K_i = 0,5343$ Kompetitif
2-Merkapto etanol	$K_i = 0,0208$ Kompetitif	$K_i = 0,0136$ Kompetitif
L-Glutatyon	$K_i = 0,2689$ Kompetitif	$K_i = 0,5654$ Kompetitif
L-Sistein	$K_i = 0,1491$ Kompetitif	$K_i = 0,2056$ Kompetitif
Potasyum siyanür (KCN)	$K_i = 0,0944$ Ankompetitif	$K_i = 0,0212$ Ankompetitif
Sodyum sülfid	$K_i = 2,1973$ Nonkompetitif	$K_i = 2,4019$ Nonkompetitif

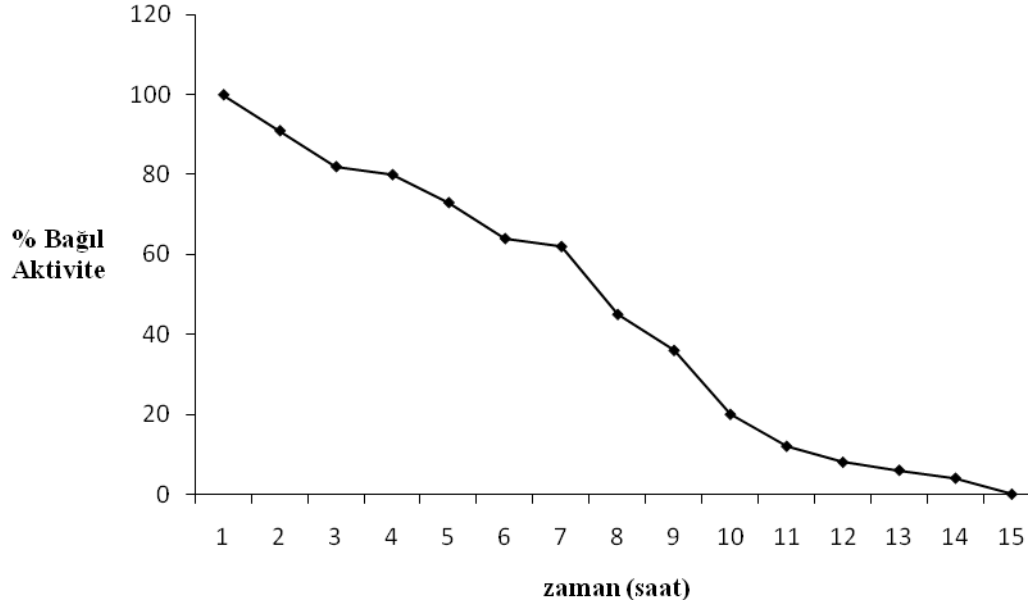
4.2.5. Metallerin etkisi

Deve dikeninin gövde ve çiçek tablası kısmından ekstrakte edilen POD enzimi üzerine etki eden toplam 16 metal bölüm 3.3.7.'de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} metal iyon çözeltilerinden 3 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir. POD enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak ağır metaller ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir. İncelemeler sonucu aktivite 3 mM konsantrasyondaki yüzdeleri halinde hesaplanmış ve tablo halinde sunulmuştur.

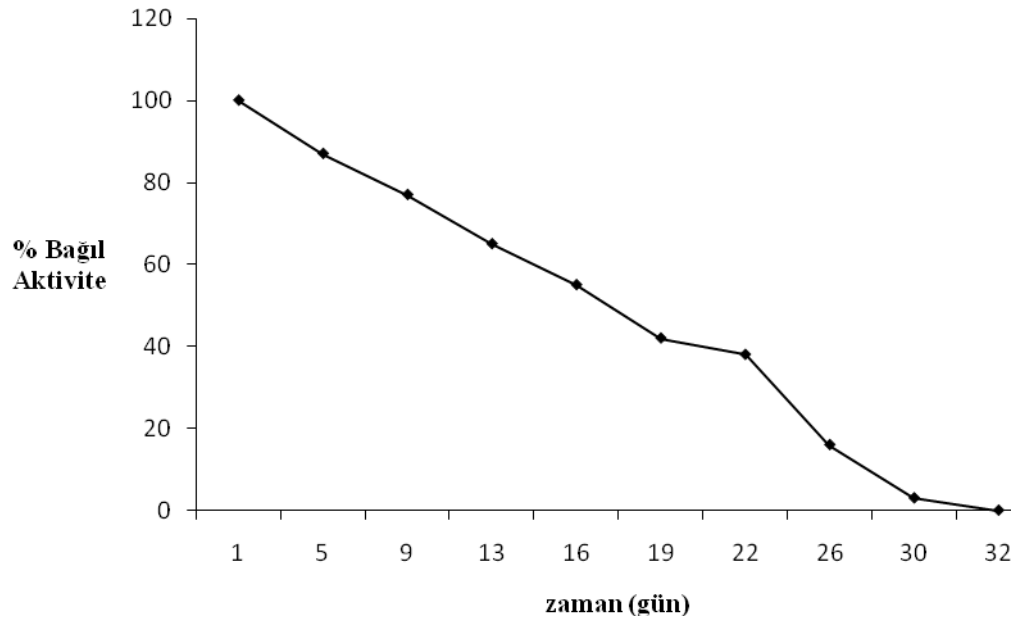
Tablo 4.4. POD enzimi üzerine ağır metallerin etkisi

Metaller	% Aktivasyon	% İnhibisyon
Fe^{+3}	14,5	-
Cu^{+2}	-	30
Zn^{+2}	40	-
Mg^{+2}	4	-
Hg^{+2}	6	-
Ba^{+2}	18,5	-
Ca^{+2}	7	-
Li^{+1}	11	-
Co^{+2}	8	-
Mn^{+2}	9	-
Pb^{+2}	6,5	-
Sn^{+2}	-	99
Na^{+1}	26	-
K^{+1}	-	11
Ni^{+2}	3	-
Cd^{+2}	8	-

4.2.6. Enzim depolanma kararlılığı



Şekil 4.89. Deve dikeninden elde edilen peroksidaz enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi



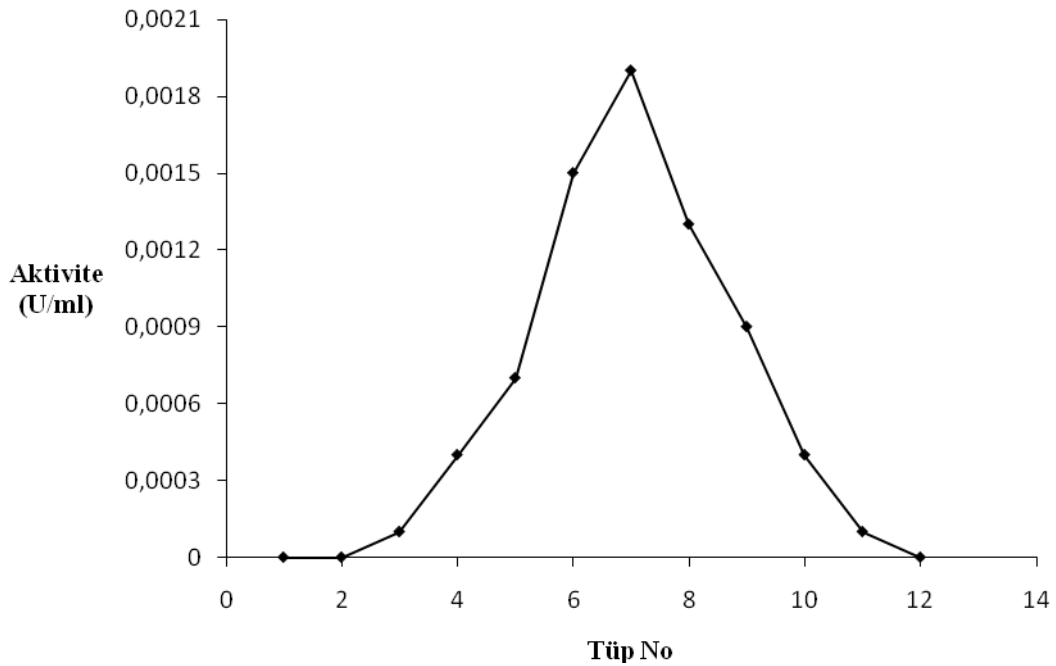
Şekil 4.90. Deve dikeninden elde edilen peroksidaz enziminin -20 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi

Bölüm 3.3.8.'de anlatıldığı gibi enzimin oda sıcaklığında ve -20 °C'de depolama süresince kararlılığını incelemek amacı ile 3 mM 4-metil katekol (pH 7,2) substratı kullanılmış; oda sıcaklığında her saat ölçüm alınırken, -20 °C'de her 3-4 günde bir ölçüm alınmış ve enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, POD enziminin aktivitesi ilk üç saatte % 18, yedinci saatte % 38, onuncu saatte % 80, on üçüncü saatte % 94 azalarak on beşinci saatin sonunda POD enzimi aktivitesini kaybetmiştir. -20°C'de ise POD enziminin aktivitesi ilk beş günde % 13, on üçüncü günde % 35, yirmi ikinci günde % 62 azalarak otuz ikinci günün sonunda POD enziminin aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

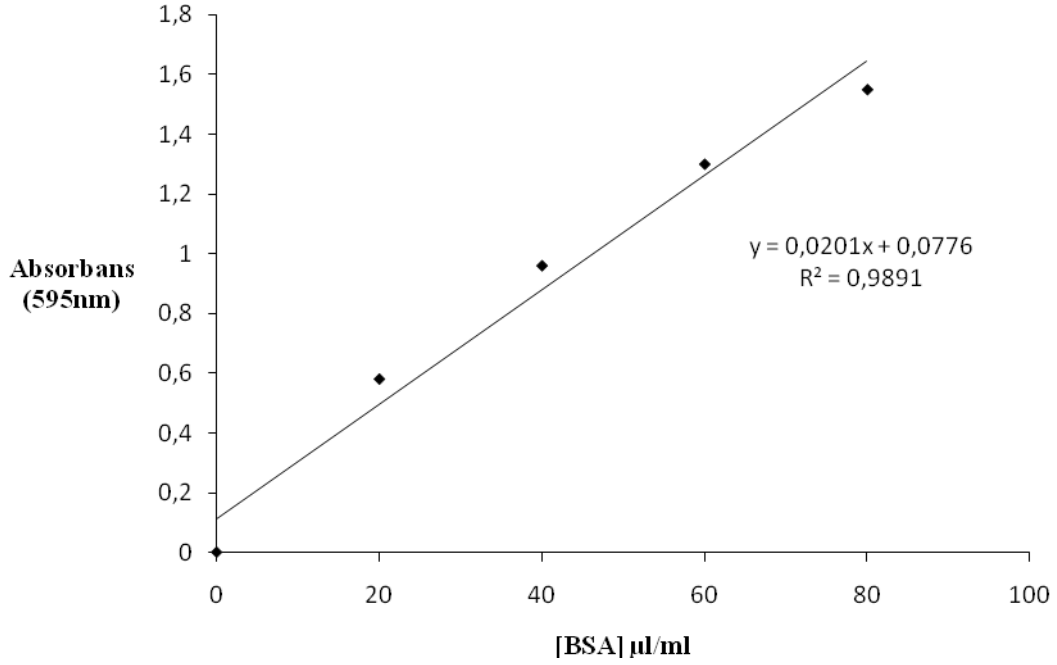
4.2.7. Kolon çalışması

Bölüm 3.3.9'da anlatıldığı gibi 12 epindof tüp içerisindeki kısmen saflaştırılmış POD enziminin aktivitesi, 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar grafik halinde aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.91. Deve dikeninden elde edilen peroksidaz enzimi için kolon elüat aktivite grafiği

4.2.8. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayini



Şekil 4.92. BSA standart grafiği

Bu standart protein grafiğinde elde edilen $y = ax + b$ ($y = 0,0201x + 0,0776$) denkleminde yararlanarak elimizde bulunan protein miktarı hesaplandı. Bunun için deve dikeninden elde edilen enzim homojenatları Bradford çözeltisiyle muamele edildikten sonra 595 nm'de gözlenen absorbans değerleri denkleme yerine konuldu ve deve dikenini peroksidazı için 14,2985 µl/ml protein olduğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmada deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinin hem gövde kısmından hem de çiçek tablası kısmından izole edilen peroksidaz (POD) enzimi incelenmiştir. Bütün enzim aktivite tayinleri H_2O_2 substratı varlığında 60 sn süresince 420 nm'de absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Peroksidaz (POD) enziminin H_2O_2 substratı varlığında aktivite tayinlerinin belirlenmesindeki temel prensip H_2O_2 'in suya indirgenmesi sonucu enzimin yükseltgenmesidir. Yükseltgenen peroksidaz enzimi de ortamdaki substratı yükseltgeyerek ortamdan harcanmadan çıkar. Deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinin hem gövde kısmından hem de çiçek tablası kısmından izole edilen peroksidaz (POD) enzimi öncelikle kısmi olarak saflaştırılmıştır ve saflaştırma sırasında üç basamak kullanılmıştır. Bunlar: homojenat hazırlanması, % 60 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizdir. Tüm saflaştırma işlemleri +4 °C'de sıcaklık kontrolü altında yapılmıştır.

Elde edilen homojenatların amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında peroksidaz enziminin en fazla % 60 doyumlukta çöktüğü belirlenmiştir. Daha sonra enzim homojenatı 24 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızlıklar uzaklaştırılmıştır.

Bu çalışmada, deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden izole edilen POD enziminin optimum pH'ını belirlemek amacı ile 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, o-fenilen diamin ve H_2O_2 substratları varlığında optimum pH çalışması yapılmıştır. Deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinin hem gövde kısmından hem de çiçek tablası kısmından izole edilen POD enziminin optimum pH'ının belirlenmesi amacı ile pH 3,0 ile 9,5 arasında sitrat tamponu (pH 3,0 – 6,0 arası), fosfat tamponu (pH 7,0) ve tris tamponu (pH 7,5 - 9,5 arası) olmak üzere 3 farklı tampon ile çalışılmıştır. Çalışılan optimum pH değerleri Tablo.4.1.'de bitkinin hem gövde kısmı için hem de çiçek tablası kısmı için verilmiştir. Bu çalışmada bulmuş olduğumuz optimum pH'lar Köksal (2007)

tarafından yapılan karnabahar (*Brassica oleracea L.*) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasındaki 5 farklı (guaiakol, progallol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol) substratın optimum pH'ları, guaiakol substratının optimum pH'ı dışında hepsi ile benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda guaiakol, progallol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol substratlarının optimum pH'ları sırasıyla 6,5 - 8,5 - 4,0 - 7,2 - 7,2 gövde kısmı için ve 6,5 - 7,6 - 4,0 - 7,2 - 7,2 çiçek tablası kısmı için bulunmuş değerlerdir. Köksal (2007) tarafından bulunan optimum pH değerleri ise sırasıyla 5,0 - 7,5 - 4,0 - 7,0 - 7,5 olarak bulunmuştur. Johri ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada peroksidazların hepsi pH 3,0 - 9,0 alanı arasında kararlı olduğu bulunmuştur. [47]. Fang ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada POD için optimum pH 6,0 - 8,5 arasında bulunmuştur [32]. Enzimin kararlı olduğu pH değerleri Pomar ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmada 6,0 - 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur [38]. Bulunan bu optimum pH değerleri bulmuş olduğumuz pH değerleri ile uygunluk göstermiştir.

Deve dikeni (*Silybum marianum*) bitkisinin hem gövde kısmı hem de çiçek tablası kısmından izole edilen peroksidaz enziminin optimum sıcaklığı 0 – 80 °C aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Bu çalışma 4-metil katekol, ABTS, guaiakol, kafeik asit, o-dianisidin, o-fenilen diamin, progallol ve katekol substratlarının varlığında hem gövde kısmı hem de çiçek tablası kısmı için yapılmıştır. Yapılan optimum sıcaklık çalışması her iki kısım için de 30 – 40 °C sıcaklıkları arasında değiştiği gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç Köksal (2007) tarafından yapılan çalışmada 25 - 50 °C arasında değiştiği gözlenmektedir. Belcarz ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada POD enzimi için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur [30]. Saraiva ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık 34,7 °C olarak bulunmuştur [40]. Bu çalışmalardan elde edilen optimum sıcaklıklar yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla uygunluk göstermiştir.

Deve dikeni (*Silybum marianum*) bitkisinden izole edilen POD enzimi için altı farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapılmıştır. Bu çalışmada substrat olarak 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, o-fenilen diamin ve H₂O₂ kullanılmıştır. Elde edilen datalarla Lineweaver-Burk

grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafikleri hemen hemen tüm enzim çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Belirlenen K_m ve V_{max} değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

K_m değeri enzim konsantrasyonu ile değişmez ve enzimin substratına karşı gösterdiği afiniteyi gösterir. Eğer K_m değeri sayısal olarak küçük ise enzimin substratına karşı ilgisinin yüksek olduğunu gösterir. Enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doyararak maksimum hız sağlar. Eğer K_m değeri sayısal olarak büyük ise enzimin substratına karşı olan ilginin düşük olduğunu gösterir. Enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat konsantrasyonu gerekmektedir. Bu değerlendirmeye göre peroksidaz enziminin substrat spesifikliğı büyükten küçüğe doğru sıralamak gerekirse gövde kısmı için bu sıralama o-fenilen diamin, progallol, o-dianisidin, kafeik asit, ABTS, 4-metil katekol, katekol, guaiakol sırasını takip ederken çiçek tablası kısmı için ise o-dianisidin, kafeik asit, progallol, ABTS, o-fenilen diamin, katekol, 4-metil katekol, guaiakol sırasını takip etmiştir. Köksal (2007) tarafından bulunan sonuçlar ise ABTS, pirogallol, katekol, 4-metil katekol, guaiakol sıralamasını bize vermektedir. Bu sıralama pirogallol substratı dışında, yapmış olduğumuz çalışmaların verileri ile uygunluk göstermiştir. Belcarz ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada substrat spesifikliğı büyükten küçüğe ABTS, o-dianisidin, guaiakol sıralamasını takip etmektedir [30]. Deepa ve arkadaşı (2002) tarafından yapılan çalışmada substrat spesifikliğı sıralaması pirogallol, ABTS, guaiakol şeklinde olmaktadır [37]. Rudrappa ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada ise o-dianisidin, ABTS, guaiakol sıralamasını görmekteyiz [41]. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlar incelenecek olursa yapmış olduğumuz kinetik çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

Bu çalışmada POD enzimi üzerine etki eden sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, potasyum siyanür, 2-merkaptto etanol, L-Glutatyon, L-Sistein ve sodyum sülfid inhibitörleri incelenmiştir. Başlangıçta enzim aktivitesini % 50'ye düşüren inhibitör konsantrasyonları (I_{50}) bulunmuştur. Sonuçlar tablo 4.2.'de sunulmuştur. Bir sonraki aşamada bu I_{50} değerlerinden faydalanarak sabit konsantrasyonlarda çalışabileceğimiz inhibitör konsantrasyonları belirlendi. Belirlenen bu konsantrasyonlar çalışılarak her bir inhibitör için $1/V - 1/[S]$ grafikleri çizilmiştir.

Elde edilen grafiklerden faydalanarak da her bir inhibitör için inhibisyon türü ve K_i değerleri bulunmuştur. Sonuçlar tablo 4.3'te sunulmuştur. Yapılan bu çalışmalarda, sodyum azid, tiyüre, askorbik asit, 2-merkapt etanol, L-Glutatyon ve L-Sistein inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyona, potasyum siyanür inhibitörü yarı yarışmalı inhibisyona ve sodyum sülfid inhibitörünün de yarışmasız bir inhibisyona neden oldukları Line-weaver Burk grafikleri ile belirlenmiştir. Bunun yanında çalışmalarımızda peroksidaz enzimi aktivitesi üzerine etki eden Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} ve Cd^{+2} metalleri de incelenmiştir. Bu çalışmada Cu^{+2} , Sn^{+2} ve K^{+1} 'in enzim üzerinde inhibisyona, diğer metallerin ise aktivasyona sebep oldukları görülmüştür. İncelemeler sonucu metallerin 3 mM konsantrasyonundaki % aktivasyon - inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.4'te sunulmuştur. Onsa ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada Ca^{+2} ve Fe^{+3} metallerinin aktivasyona, Zn^{+2} metalinin ise inhibisyona sebep olduğu görülmüştür [35]. Bulunan bu sonuçlar incelemiş olduğumuz benzer metallerle aynı sonuçları vermiştir.

Bu çalışmada peroksidaz enzimin oda sıcaklığındaki depolanma kararlılığını bulabilmek amacıyla aktivitedeki azalma saat başı 420 nm'deki 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Peroksidaz enziminin -20 °C'de depolanma kararlılığını görmek amacıyla enzim -20 °C'de saklanarak 3 - 4 günde bir 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedildi.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, POD enziminin aktivitesi ilk üç saatte % 18, yedinci saatte % 38, onuncu saatte % 80, on üçüncü saatte % 94 azalarak on beşinci saatin sonunda POD enzimi aktivitesini kaybetmiştir. -20 °C'de ise POD enziminin aktivitesi ilk beş günde % 13, on üçüncü günde % 35, yirmi ikinci günde % 62 azalarak otuz ikinci günün sonunda POD enziminin aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim homojenatlarındaki protein miktarı kantitatif olarak Bradford yöntemi ile tayin edildi. Bu yöntemin kullanılabilmesi için öncelikle BSA standart protein çözeltisi hazırlanarak lineer bir standart grafiği ve bir doğru denklemi ($y = ax + b$) elde edilir. Daha sonra konsantrasyonu bilinmeyen

enzim çözeltisi bradford çözeltisiyle muamele edildikten 10 dk sonra 595 nm'de absorbansı okunarak denklemde yerine konulur ve protein miktarı kantitatif olarak hesaplanır. Bu yöntem sonucu peroksidaz enzimi için protein miktarı 14,2985 µl/ml olarak hesaplanmıştır.

Sakarya'da yetişen deve dikenin hem gövde hem de çiçek tablası kısmından elde edilen peroksidaz enziminin karakterizasyonu ilk kez çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağı ve yapılacak olan çalışmalara ek bir kaynak olarak ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] KÖKSAL, E., Karnabahar (*Brassica oleracea L.*) Peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora tezi, Atatürk üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2007.
- [2] HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVIK, B., WILLIAMSON, G., Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2, *Biochem Soc Trans*, 25: S559, 1997.
- [3] MILLS, EM., TAKEDA, K., YU, ZX., et al. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells, *J Biol Chem*, 273:22165-8, 1998.
- [4] GHOSH, J., MYERS, CE., Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci*, 95: 13182-7, 1998.
- [5] YIN, GY., YIN, YF., HE, XF., Effect of zhuchun pill on immunity and endocrine function of elderly with kidney-yang deficiency, *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 15: 601-3, 1995.
- [6] BAE, YS., KANG, SW., SEO, MS., et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 272: 217-21, 1997.
- [7] LEE, YJ., GALOFORO, SS., BERNS, CM., et al. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *J Biol Chem*, 273: 5294-9, 1998.
- [8] CHOPRA, S., WALLACE, HM., Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species, *Biochem Pharmacol*, 55: 1119-23, 1998.
- [9] WOJTASZEK, P., Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem J*, 322: 681-92, 1997.
- [10] DÜZGÜNER, V., Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı, 2005.

- [11] DA SILVA, EL., PISKULA, MK., YAMAMOTO, N., MOON, JH., TERAOKA, J., Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma, *FEBS Lett*, 430: 405-8, 1998.
- [12] PATTERSON, RA., LEAKE, DS., Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH, *FEBS Lett*, 434: 317-21, 1998.
- [13] ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JUNG, G., The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radic Biol Med*, 13: 341-90, 1992.
- [14] RIKANS, LE., HORNBROOK, KR., Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging, *Biochim Biophys Acta*, 1362: 116-27, 1997.
- [15] OESCH, F., Metabolism of carcinogens, possibilities for modulation, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 55: 15-33, 1984.
- [16] KOWALTOWSKI, AJ., CASTILHO, RF., GRIJALBA, MT., BECHARA, EJ., VERCESI, AE., Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation, *J Biol Chem*, 271: 2929-34, 1996.
- [17] SCOTT, MD., EATON, JW., KUYPERS, FA., CHIU, DT., LUBIN, BH., Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense, *Blood*, 74: 2542-9, 1989.
- [18] ALERYANI, S., MILO, E., ROSE, Y., KOSTKA, P., Superoxide-mediated decomposition of biological S-nitrosothiols, *J Biol Chem*, 273: 6041-5, 1998.
- [19] SOHAL, RS., AGARWAL, A., AGARWAL, S., ORR, WC., Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*, *J Biol Chem*, 270: 15671-4, 1995.
- [20] FRIDOVICH, I., Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu Rev Biochem*, 64: 97-112, 1995.
- [21] TEIXEIRA, HD., SCHUMACHER, RI., MENEGHINI, R., Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase, *Proc Natl Acad Sci*, 95: 7872-5, 1998.
- [22] MEIER, B., SCHERK, C., SCHMIDT, M., PARAK, F., pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*, *Biochem J*, 331: 403-7, 1998.

- [23] AEBI, HE., Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. In: Bergmeyer H, Ed. Methods of enzymatic analysis, vol. III. Pp. 273–82. Deerfield Beach, FL: Verlag Chemie, 1980.
- [24] TURRENS, JF., CRAPO, JD., FREEMAN, BA., Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase, *J Clin Invest*, 73: 87–95, 1984.
- [25] GRAZIOLI, V., SCHIAVO, R., CASARI, E., et al., Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage, *FEBS Lett*, 431: 149–53, 1998.
- [26] SIGALOV, AB., STERN, LJ., Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I, *FEBS Lett*, 433: 196–200, 1998.
- [27] AMSTAD, P., MORET, R., CERUTTI, P., Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress, *J Biol Chem*, 269: 1606–9, 1994.
- [28] LIMOLI, CL., HARTMANN, A., SHEPHARD, L., et al., Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity, *Cancer Res*, 58: 3712–8, 1998.
- [29] CARDINALI, A., DI VENERE, D., SERGIO, L., LINSALATA, V., Characterization and partial purification of peroxidase from artichoke leaves, IV International Congress on Artichoke.
- [30] BELCARZ, A., GINALSKA, G., KOWALEWSKA, B., KULESZA, P., Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis, *Phytochemistry*, 69: 627–636, 2008.
- [31] VITALI, A., BOTTA, B., DELLE MONACHE, G., ZAPPITELLI, S., et al., Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies, *Biochem. J.*, 331, 513–519, 1998.
- [32] FANG, L., JIANG, B., ZHANG, T., Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase, *Food Chemistry*, 109: 802–807, 2008.
- [33] MDLULI, K., Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*), *Food Chemistry*, 92: 311–323, 2005.
- [34] RODRIGUEZ, J. N-LOPEZ, ESPIÑ, J. C., AMOR, F. D., et al., Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivated under Different Salinity Conditions, *J. Agric. Food Chem*, 48, 1537–1541, 2000.

- [35] ONSA, G. H., SAARI, N. B., SELAMET, J., BAKAR, J., Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from Metroxylon sagu, *Food Chemistry*, 85 :365–376, 2004.
- [36] SPITZER, G., TAYLOR, M. C., The Effect of Heat on the Activity of the Enzyme Peroxidase as Found in Milk, *Journal of Dairy Science*, Vol. 7 No. 3 234-244, 1924.
- [37] DEEPA, S.S., ARUMUGHAN, C., Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf, *Phytochemistry*, 61:503–511, 2002.
- [38] POMAR, F., BERNAL, M. A., DIAZ, J., MERINO, F., Purification characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase, *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 8, pp. 1313-1317, 1997.
- [39] FORTEA, M.I., LOPEZ-MIRANDA, S., SERRANO-MARTINEZ, A., CARRENO, b J., NUNEZ-DELICADO, E., Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless), *Food Chemistry*, 113 :1008–1014, 2009.
- [40] SARAIVA, J. A., NUNES, C. S., COIMBRA, M. A., Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase, *Food Chemistry*, 101: 1571–1579, 2007.
- [41] RUDRAPPA, T., LAKSHMANAN, V, KAUNAIN, R., SINGARA, N. M., NEELWARNE, B., Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 105 :1312–1320, 2007.
- [42] SERRANO-MARTI'NEZ, A., FORTEA, M. I., DEL AMOR, F. M., NU'NEZ-DELICADO, E., Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase, *Food Chemistry*, 107: 193–199, 2008.
- [43] MLIKI, A., ZIMMERMANN, W., Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from *Streptomyces cyaneus*, *Applied and environmental microbiology*, p. 916-919, 1992.
- [44] IKEHATA, K., BUCHANAN, I. D., PICKARD, M. A., SMITH, D. W., Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment, *Bioresource Technology*, 96 :1758–1770, 2005.
- [45] MA'RQUEZA, O., WALISZEWSKIA, K.N., OLIARTA, R.M., PARDIOB, V. T., Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean, *LWT*, 41 :1372–1379, 2008.

- [46] MANU, B.T., PRASADA RAO, U.J.S., Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran, *Food Chemistry*, 114 : 66–71, 2009.
- [47] JOHRI, S., JAMWAL, U., RASOOL, S., KUMAR, A., VERMA, V., QAZI, G.N., Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA, *Plant Science*, 169 : 1014–1021, 2005.
- [48] <http://www.biyokimyaci.net./Enzim>, Şubat 2008.
- [49] BAKAN, N., Kimyasal kinetik ve kataliz-Enzimler, 2007-2008.
- [50] TÜZÜN, C., *Biyokimya*, Palme yayıncılık, 81, Ankara, 2005.
- [51] GÜNGÖR, K., Çağla badem (*Prunus dulcis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Sakarya üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Kimya ana bilim dalı, 2008.
- [52] AKIN, K.O., enzimler, tusdata, 2008.
- [53] <http://www.ziraatci.com.tr./Devedikeni>, Mayıs 2008.
- [54] <http://www.sigma.com.tr./Peroksidaz>, Mart 2008.
- [55] www.mustafaaltinisik.org./Enzim, Nisan 2008.
- [56] ROMPEL, A., ALBERS, M., NASERI, J.I., GERDEMANN, C., et al., Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*), *Biochimica et Biophysica Acta* 1774:1422–1430, 2007.
- [57] SODA, I., HASEGAWA, T., SUZUKI, T., OGURA, N., Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwi fruit, *Agric. Biol. Chem.*, 55(6), 1677-1678, 1991.
- [58] LOUSTAU, M.N., ROMERO, L.V., LEVIN, G. J., et al., Expression and purification of horseradish peroxidase in insect larvae, *Process Biochemistry*, 43: 103–107, 2008.
- [59] MIRANDA, M.V., MAGRI, M.L., NAVARRO DEL CAN˘ IZO, A.A., CASCONO, O., Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agarose, *Process Biochemistry* , 38: 537-543, 2002.
- [60] metallo.scripps.edu/promise/PEROXIDASES.html, Nisan 2008.

- [61] FRAGUAS, L.F., BATISTA-VIERA, F., CARLSSON, J., Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *Journal of Chromatography B*, 803 :237–241, 2004.
- [62] LO'PEZ-MOLINAA, D., HEERINGB, H.A., SMULEVICHB, G., 'TUDELAA, J., Purification and haracterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. P urification and haracterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94 :243–254, 2003.
- [63] <http://www.wikipedia.org./Peroksidaz>, Ocak 2008.
- [64] http://www.yunus.hacettepe.edu.tr/~umut/lab_pdf/408.pdf, Mayıs 2008

ÖZGEÇMİŞ

Halil İbrahim TURGUT, 07.07.1985' de Trabzon' da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bursa' da tamamladı. 2002 yılında Nilüfer Fatih Lisesinden mezun oldu. Üniversite son sınıfta sınıf temsilcisi ve bölüm temsilcisi olarak görev yaptı. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Müzik Topluluğuna üye oldu. 2006 yılında Konya Büyükşehir Belediyesi Meslek Edindirme Kurslarında gitar kursuna katılarak kurs bitirme belgesi almaya hak kazandı. 2006 yılında Kaizer Eğitim Danışmanlık tarafından düzenlenen ISO 9001:2000 kalite yönetimi sistemi ve ISO 22000 gıda güvenliği yönetim sistemi temel eğitimini başarıyla tamamladı ve katılım sertifikası aldı. 2007 yılında düzenlenen 1. Uluslararası Türkiye-Pakistan Kimya Günleri (Konya) adlı bir kongreye dinleyici olarak katıldı ve katılımcı olarak sertifika aldı. 2003 yılında başladığı Selçuk Üniversitesi Kimya bölümünü 2007 yılında bitirdi. 2007 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2008 yılında kısa bir süre olarak sorumlu teknik yönetici olarak bir üretim yerinde görev yaptı.