

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAKARYA'DA YETİŞEN İKİ FARKLI KABAK
ÇEKİRDEĞİNDEN (*Cucurbita maxima* ve *moschata*)
KATALAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Dilek KARA

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Mayıs 2008

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


SAKARYA'DA YETİŞEN İKİ FARKLI KABAK
ÇEKİRDEĞİNDEN (*Cucurbita maxima* ve *moschata*)
KATALAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ


Kimyager Dilek KARA

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 27 / 05 /2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Gülnur
ARABACI
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Esra
ALTINTIĞ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Mehmet
İŞLEYEN
Üye

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana her türlü olanağı sağlayan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya, çalışmalarım esnasında her türlü olanağı sağlayan Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali Osman AYDIN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyleirim sırasında gösterdikleri anlayış ve yardımlarından dolayı kimya bölümü araştırma görevlilerine, tüm bölüm çalışanlarına ve ekip arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmam boyunca her türlü labratuvar aletleri ve kimyasallarını bizimle paylaşan Doç. Dr. Mehmet KANDAZ, Yrd. Doç. Dr. Esra ALTINTIĞ, Murat TUNA ve Doç. Dr. Salih Zeki YILDIZ' a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

DİLEK KARA

MAYIS 2008

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.....	
GİRİŞ.....	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	4
BÖLÜM 2.....	
ENZİMLER.....	7
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	7
2.2. Enzimlere Etki Eden Faktörler.....	9
2.2.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi.....	9
2.2.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi.....	9
2.2.3. Sıcaklığın etkisi.....	10
2.2.4. pH etkisi.....	11
2.2.5. Zamanın etkisi.....	11
2.2.6. Reaksiyon ürünlerinin etkisi.....	11
2.3. Enzim İnhibisyonu.....	11
2.3.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif inhibisyon).....	12
2.3.2. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif inhibisyon).....	14
2.3.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (Ankompetitif inhibisyon).....	15

2.4. Katalaz (CAT) Enzimi.....	17
2.5. Kabak Çekirdekleri (<i>Cucurbita maxima</i> ve <i>Cucurbita moschata</i>) Hakkında Genel Bilgi.....	20
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.	22
3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler.....	22
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	22
3.1.3. Kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması.....	23
3.1.3.1. 0,1 M Sitrata tamponunun hazırlanması.....	23
3.1.3.2 0,2 M Fosfat tamponunun hazırlanması.....	23
3.1.3.3 0,05 M Tris tamponunun hazırlanması	24
3.2. Katalaz Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	25
3.2.1. Katalaz enzimi için homojenat hazırlanması.....	25
3.2.2. Katalaz enzimi için aktivite tayini.....	25
3.2.3. Katalaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	28
3.2.4. Katalaz enzimi için optimum pH çalışması.....	30
3.2.5. Katalaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	30
3.2.6. Katalaz enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar.....	30
3.2.7. Katalaz enziminin depolanma kararlılığının belirlenmesi.....	31
3.2.8. Katalaz enziminin bozunma hızının belirlenmesi.....	31
3.2.9. Katalaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi , I_{50} değerleri ve K_I sabitlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar.....	31
3.3. Katalaz Enzimi İçin Saflaştırma Teknikleri.....	32
3.3.1. Jel filtrasyon kromatografisi	32
3.3.2. Elektroforez yöntemi ile katalazın molekül ağırlık tayini.....	33
3.3.2.1. Jelin hazırlanışı.....	34
3.3.2.2. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı.....	35
3.3.2.3. Jelin boyanması.....	35
3.3.2.4. Commasie brillant mavisi ile boyama.....	35

3.3.2.5. SDS-PAGE için gerekli çözeltiler	35
3.3.3. Bradford testi ile protein tayini.....	39
BÖLÜM 4.....	
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
4.1. Katalaz Enziminin Karakterizasyonu.....	41
4.1.1. Enzim homojenatı.....	41
4.1.2. Kabak çekirdeklerinin aktivite ölçümleri.....	41
4.1.3. Katalaz enziminin % 30 amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz sonucu saflaştırma sonuçları.....	43
4.1.4. Katalaz enzimi üzerine pH etkisi.....	43
4.1.5. Katalaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	44
4.1.6. Katalaz enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması...	45
4.1.7. Katalaz enziminin depolanma stabilizitesinin belirlenmesi...	47
4.1.8. Katalaz enziminin oda sıcaklığındaki bozunma hızı.....	48
4.1.9. Katalaz enzimi için inhibitörlerin etkisinin incelenmesi.....	49
4.1.10. Katalaz enziminin K_I değerinin hesaplanması.....	54
4.2. Katalaz Enzimi İçin Saflaştırma Metotları.....	59
4.2.1. Katalaz enzimi için jel kolon kromatografisi sonuçları.....	59
4.2.2. Katalaz enzimi için elektroforez sonuçları ve moleül ağırlığı	60
4.2.3. Bradford yöntemi ile protein tayini sonuçları.....	61
	62
BÖLÜM 5.....	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

a.a	: Amino Asit
APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Serum Albümin
CAT	: Katalaz
E.C	: Enzim Kod Numarası
[E]	: Enzim Konsantrasyonu
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EÜ	: Enzim Ünitesi
GOD	: Glukozoksidaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
[I]	: İnhibitör Konsantrasyonu
LPO	: Lipit Peroksidasyon
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
Prot.	: Protein
PVP	: Polivinil Prolidin
POD	: Peroksidaz
PFO	: Polifenil Oksidaz
[S]	: Substrat Konsantrasyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS Poliakrilamid Jel Elektroforez
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TEMED	: Tetra Etil Metilen Diamin
UV	: Ultraviyolelet
V	: Enzimatik Reaksiyon Hızı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	[E] - reaksiyon hızı grafiği	9
Şekil 2.2.	[S] – reaksiyon hızı grafiği.....	10
Şekil 2.3.	Sıcaklık – reaksiyon hızı grafiği.....	10
Şekil 2.4	Kompetitif (yarışmalı) enzim inhibisyonu.....	13
Şekil 2.5.	Kompetitif (yarışmalı) enzim inhibisyonu için Linewear-Burk grafiği.....	13
Şekil 2.6.	Nonkompetitif (yarışmasız) enzim inhibisyonu.....	14
Şekil 2.7.	Nonkompetitif (yarışmasız) enzim inhibisyonu için Linewear-Burk grafiği.....	15
Şekil 2.8.	Ankompetitif(yarı yarışmalı) enzim inhibisyonu	16
Şekil 2.9.	Ankompetitif (yarı yarışmalı) enzim inhibisyonu için Linewear-Burk grafiği.....	16
Şekil 2.10.	Katalaz enziminin hem b ve hem d grupları.....	18
Şekil 2.11.	Katalazın etki mekanizması.....	19
Şekil 2.12.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) ve kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>).....	20
Şekil 2.13.	Bal kabağı çekirdeğinin (<i>Cucurbita maxima</i>) içeriği.....	21
Şekil 3.1.	Reaksiyon hızı – [S] (Michaelis- Menten) grafiği.....	26
Şekil 3.2.	1/V – 1/ [S] (Lineweaver-Burk grafiği) grafiği.....	27
Şekil 3.3.	Bradfort yöntemi.....	40
Şekil 4.1.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) için 1/V -1/[S] grafiği..	41
Şekil 4.2.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) için 1/V – 1/[S] grafiği...	42
Şekil 4.3.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) için pH grafiği.....	43
Şekil 4.4.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) için pH grafiği.....	44
Şekil 4.5.	Kabak çekirdeğine (<i>Cucurbita moschata</i>) sıcaklığın etkisi.....	44
Şekil 4.6.	Bal Kabağı çekirdeğine (<i>Cucurbita maxima</i>) sıcaklığın etkisi.....	45

Şekil 4.7.	Bal Kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) için $1/V - 1/[S]$ grafiği	46
Şekil 4.8.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) için $1/V - 1/[S]$ grafiği....	46
Şekil 4.9	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı için depolanma kararlılığı.....	47
Şekil 4.10.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) katalazı için depolanma kararlılığı.....	48
Şekil 4.11.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) katalazı için bozunma hızı.....	48
Şekil 4.12.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) için bozunma hızı.....	49
Şekil 4.13.	Katalaz enzimi üzerine tiyoürenin etkisi.....	50
Şekil 4.14.	Katalaz Enzimi üzerine sodyum azitin etkisi.....	50
Şekil 4.15.	Katalaz enzimi üzerine EDTA'nın etkisi.....	51
Şekil 4.16.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) üzerine a.a etkisi.....	51
Şekil 4.17	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) Üzerine a.a etkisi.....	52
Şekil 4.18.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine KCN etkisi ve K_I değeri.....	54
Şekil 4.19.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) katalazı üzerine KCN etkisi ve K_I değeri	55
Şekil 4.20	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) katalazı üzerine tiyoüre etkisi ve K_I değeri	55
Şekil 4.21.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine tiyoüre etkisi ve K_I değeri.....	56
Şekil 4.22.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) katalazı üzerine sodyum azitin etkisi ve K_I değeri	56
Şekil 4.23.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine sodyum azitin etkisi ve K_I değeri.....	57
Şekil 4.24.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) katalazı üzerine $FeCl_3$ etkisi ve K_I değeri	57
Şekil 4.25.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine $FeCl_3$ etkisi ve K_I değeri.....	58
Şekil 4.26.	SDS-PAGE jeli.....	60
Şekil 4.27	BSA standart grafiği.....	61

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Hücre içi antioksidanlar	3
Tablo 1.2.	Membran antioksidanlar	3
Tablo 3.1.	0,1 M Sitrat tamponu çözeltilerinin hazırlanması.....	23
Tablo 3.2.	0,2 M Sodyum fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması.....	24
Tablo 3.3.	0,05 M Tris tamponunun hazırlanması.....	24
Tablo 3.4.	% 10'luk Ayırma jelinin içeriği.....	38
Tablo 3.5.	% 5'lik Yoğunlaştırma jelinin içeriği.....	38
Tablo 3.6.	Standart eğrinin çizimi için gerekli olan numune miktarları.....	39
Tablo 4.1.	Katalaz enzimi için % 30 amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve saflaştırma sonuçları.....	43
Tablo 4.2.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) için K_m ve V_{max} değerleri.....	45
Tablo 4.3.	Kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) için K_m ve V_{max} değerleri.....	47
Tablo 4.4.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) ve kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine bazı bileşiklerin etkisi ve I_{50} değerleri.....	52
Tablo 4.5.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) ve kabak çekirdeği (<i>Cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine metallerin etkisi.....	53
Tablo 4.6.	Bal kabağı çekirdeği (<i>Cucurbita maxima</i>) ve kabak çekirdeği (<i>cucurbita moschata</i>) katalazı üzerine bazı bileşiklerin etkisi ve K_I değerleri.....	58
Tablo 4.7.	Katalaz enzimi için bağıl aktivite değerleri.....	59

ÖZET

Anahtar kelimeler: Kabak çekirdeği, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, antioksidant enzimler, katalaz, antioksidan sistemler, hidrojen peroksit

Katalaz (Hidrojen Peroksit Oksiredüktaz, E.C: 1.11.1.6), hidrojen peroksitin suya dönüşmesini sağlar ve prostetik grup olarak hem grubu içerir. Ayrıca katalaz omurgalı ve omurgasız hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda mevcut olup yüksek bir turnover sayısına ($4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) sahiptir. Katalaz önemli bir antioksidan savunma sistemi bileşeni olup, hidrojen peroksitin suya dekompozisyonunu katalizler.

Bu çalışmada katalaz enzimi Sakarya’da yetiştirilen iki farklı kabak çekirdeğinden (*Cucurbita maxima* ve *Cucurbita moschata*) saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir. Öncelikle enzim homojenatı uygun tampon çözeltileri kullanılarak elde edilmiş ve ardından amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulanmıştır.

Diyalizden elde edilen protein sephadex G-100 kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE elektroforez uygulanmıştır. Kabak çekirdeklerinden elde edilen katalaz enzimleri için hidrojen peroksit substratı kullanılarak 240 nm’de UV-Vis spektrofotometre cihazında absorbans azalmasının takibi ile K_m ve V_{max} değerleri elde edilmiştir. *Cucurbita maxima* için $K_m = 17,68 \text{ mM}$, $V_{max} = 81,300 \text{ EÜ / mL}$; *Cucurbita moschata* için $K_m = 20,029 \text{ mM}$, $V_{max} = 58,139 \text{ EÜ / mL}$ olarak hesaplanmıştır. Enzim için optimum pH, optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 6,8-7,0 ve 25 °C olarak bulunmuştur. Enzimlerin molekül ağırlıkları elektroforez kullanılarak hesaplanmıştır. Her iki kabak çekirdeği katalazı için 60 kDa ile 8 kDa arasında üç bant gözlemlenmiştir. Ayrıca siyanür ve azid gibi hem inhibitörlerinin enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiş ve inhibitörlerin K_I değerleri hesaplanmıştır. Her iki çekirdek içinde azit $KI = 0,66 \pm 0,04$; siyanür $KI = 2,42 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır.

CAHARACTERIZATION OF CATALASE FROM TWO DIFFERENT CUCURBITA SEEDS (*Cucurbita maxima* and *moschata*) GROWN IN SAKARYA

SUMMARY

Key words: Catalase, antioxidant activity, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, hydrogen peroxide , antioxidant system.

Catalase (Hydrogen Peroxide Oxidoreductase, E.C: 1.11.1.6), converts hydrogen peroxide to water and contains heme as prosthetic groups. In addition, catalase exist, in vertebrates, in vertebrates animals, plants and microorganisms with a high turnover number ($4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$). Catalase is a major primary antioxidant defense component that primarily works to catalase the decomposition of Hydrogen Peroxide to water.

In this study, catalase was purified from cucurbita seeds (*Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*) and some kinetic properties were studied. The purification was performed at three steps: Preparation of homogenate , ammonium sulphate fractionation and after dialysis, the enzymes were applied to G-100 sephadex column chromatography system. SDS - PAGE electrophoresis was applied for the determination of the enzymes molecular weights. They were found in three bands from 60 to 8 kDa in the electrophoresis for both seeds. Optimum pH, optimum temperature of the enzymes were found to be 6,8 – 7,0 and 25 °C. K_m and V_{max} values were calculated. *Cucurbita maxima* $K_m=17,68 \text{ mM}$ $V_{max}=81,300 \text{ EÜ/mL}$; *Cucurbita moschata* $K_m=20,029 \text{ mM}$, $V_{max}=58,139 \text{ EÜ/mL}$. In addition to that, Heme catalase inhibitors, such as azide and cyanide, inhibited the enzyme activity markedly and K_I values were calculated. For *Cucurbita maxima* and *moschata* azide $K_I = 0,66 \pm 0,04$; cyanide $K_I = 2,42 \pm 0,01$.

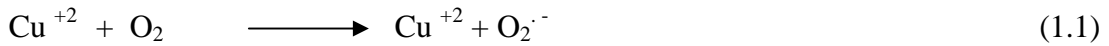
BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlı sistemlerde meydana gelen bütün fizyolojik olaylar; enzim, hormon ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgenme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Canlı sistemlerde bulunan redoks dengesindeki herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve dolayısıyla dokuların fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur ve bu durum zamanla ölümle sonuçlanabilir. Farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenleyen ve dokularda doğal bir şekilde bulunan antioksidant bileşikler, uzun ömürlü determinantların potansiyel bir sınıfı olarak değerlendirilmektedir. Antioksidant bileşiklerde veya antioksidant telafi (kompensatör) sistemlerinde bulunan bazı komponentlerin endojen sentezindeki herhangi bir yetersizlik, farklı hastalıkları meydana getirebilir. Hücrelerde çok sayıda koruma ve savunma mekanizmaları bulunur. Organizmaların kendilerini oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı korumaları için bu savunma mekanizmaları gereklidir. Bu bakımdan biyolojik sistemlerde antioksidan savunma mekanizmasının araştırılması ile ilgili çalışmalar son zamanlarda büyük bir önem kazanmıştır. Günümüzde en çok araştırılan biyolojik proseslerden biri olan yaşlanma dahil, birçok hastalığın oksidatif hasardan kaynaklandığı ispatlanmıştır (Hurst ve ark.1997; Jornot ve ark.1998; Mills ve ark.1998).

Serbest radikaller hücre içi reaksiyonlara zarar veren ve toksik etki gösteren bileşenlerdir. Genellikle saldırı hedefleri somatik hücreler veya bağışıklık sistemidir. Dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerdikleri için, bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküller ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerler (Hurst ve ark.1997; Jornot ve ark.1998; Mills ve ark.1998).

Serbest radikaller hem normal metabolizmanın hem de toksik maddelerin etkileri sonucu yan ürün olarak oluşabilirler (Cross, 1987). Örneğin radyasyon, sigara dumanı, ekzoz gazları, deodorantlar, kimyasal maddeler, insektisit ve peptisit olarak bilinen böcek öldürücüler serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır (Hurst ve

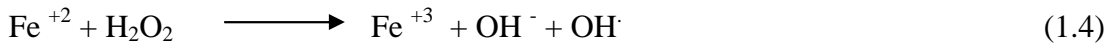
ark.1997; Jornot ve ark.1998; Mills ve ark.1998). Özellikle oksijen kökenli radikaller insan hayatında çok ciddi sıkıntılar teşkil etmektedir. Canlılarda oluşan ilk ve oksijen kökenli olan temel radikal süperoksit radikalidir. Süperoksit radikali; çok iyi indirgen ve zayıf yükseltgen özellik göstermektedir. Hücresel reaksiyonlar sonucu mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda hızlı bir şekilde oluşmaktadır. Ayrıca indirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu sonucu da süperoksit radikalleri oluşabilmektedir.



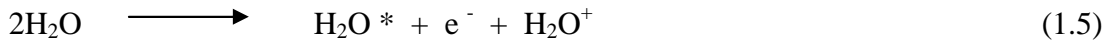
Yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikalik özellik taşımayan fakat canlı metabolizması için oldukça zararlı olan bir diğer madde de hidrojen peroksit'tir.



Hidrojen peroksit; demir, bakır gibi iyonların varlığında hidroksil radikali oluşumuna sebep olduğu için oksitleyici özellik taşımakta olduğu bilinmektedir.



Canlı metabolizması için son derece tehlikeli olan ve uyarılmış su molekülünün hemolitik yıkımı ile oluşan hidroksil radikali son derece reaktif bir radikaldir.



Ya da diğer bir deyişle hidrojen peroksitin iki elektron indirgenmesi ile su oluşur, tek elektron indirgenmesi ile ise hidroksil radikali oluşur (Hurst ve ark.1997; Jornot ve ark.1998; Mills ve ark.1998).

Serbest radikaller hücre zarında bulunan proteinleri parçalayarak hücre yapısına zarar veren; hücre çoğalmasını ve büyümesini sağlayan nükleik asit'e (DNA'ya) etki edip

yapısını bozan bileşikler oldukları için nötralize edilmeleri gerekmektedir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek veya oluşan radikallerin hücreye zarar vermesini önlemek amacı ile vücutta birçok savunma sistemi (mekanizması) gelişmiştir. Antioksidan türlerine karşı vücutta oluşan bu savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri denilir (Ames ve ark. 1993; Müftüoğlu, 2003). Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar.

Endojen kaynaklı antioksidanlar

Enzimler: katalaz, dismutaz, glutatyon peroksidaz

Enzim olmayanlar: albumin, E vitamini, B-karoten vb...

Eksojen kaynaklı antioksidanlar: ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan 2000).

Tablo.1.1. Hücre içi antioksidanlar (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan 2000)

Superoksit Dismutaz (Cu, Zn, Mn)	Süperoksit radikalının katalitik olarak uzaklaştırılması
Katalaz	H ₂ O ₂ 'nin uzaklaştırılmasında
Glutatyon Peroksidaz	H ₂ O ₂ 'nin ve lipit hidroperoksitlerinin uzaklaştırılması

Tablo.1.2.Membran antioksidanlar (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan 2000).

Vitamin E	Yağda erir, zincir kırıcı antioksidandır. Plazmadaki lipoprotein lipitlerini de korur.
B-Karoten	Yağda erir, radikal temizleyicisidir. Singlet oksijeni ortadan kaldırır.
Koenzim-Q	Temel rolü enerji metabolizmasındadır. Redükte durumda antioksidan olarak görev yapabilir.

En önemli antioksidan enzimler:

1. Süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e dönüştüren süperoksit dismutaz
2. Organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
3. Hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT) dır (Arosio ve ark. 2000).

Bu çalışmanın amacı, Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (*Cucurbita maxima* ve *Cucurbita moschata*) katalaz enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesidir. Bu amaçla önce CAT enzimi, Sakarya'da yetişen kabak çekirdeklerinden elde edilmiş; daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi yöntemiyle çöktürülen CAT enzimi, diyaliz edilerek kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin kinetik özellikleri, optimum pH ve optimum sıcaklığı, termal kararlılığı, inhibisyon çalışmaları diyaliz sonucu elde edilen enzim ekstraktı ile yapılmıştır.

Daha sonraki saflaştırma aşamaları ise jel filtrasyon kromatografisi ve poliakrilamid jel elektroforezi sodyum dodesil sülfat (SDS-PAGE) ile yapılmıştır. Elde edilen bulgular her iki farklı kabak çekirdekleri için karşılaştırılmış ve sonuçlar tablolar ve şekiller halinde sunulmuştur.

Çalışmalarımız süresince bitkilerin yetiştirme ortamından, hava koşullarından ve toprak içeriklerinden etkilenileceği düşünülerek, tüm analizler süresince tek seferde alınan kabak çekirdekleri kullanılmıştır. Kabak çekirdekleri - 20 °C derin dondurucuda saklanmış ve ihtiyaç duyuldukça az miktarlarda enzim homojenatları hazırlanarak ölçümler yapılmıştır.

1.2. Kaynak Özetleri

Lokman Ö. ve ark. (2005), Maydonazdan katalaz enzimini; Amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sephadex A-50 jelinin kullanıldığı iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi 1126 EÜ/mg, optimum pH, stabil pH değerleri 7 ve optimum sıcaklık ise 35 °C saptanmıştır.

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

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

Liangquan S. ve ark. (2004), Bu çalışmada, Cu, Zn-Süperoksit dismutaz (I ve III) tütün yapraklarından (*Nicotiana Tobacum*) Amonyum sülfat, etanol-kloroform ve aseton ve DEAE - 52, Sephadex G - 75 kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılmıştır. Cu, Zn - SOD III' ün bazı özellikleri belirlenmiştir. Katalazın moleküler ağırlığı 22,976 kDa olarak tayin edilmiştir.

Jacques R.Vanfleteren, (1992), İplik kurdu (*Caenorhabditis Elegans*) dokusundan Cu, Zn-Süperoksit Dismutaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzim aktivitesi 2660 U/mg protein, moleküler ağırlığıda 37, 5 - 40 kDa aralığında saptanmıştır. Mitchell ve ark. (1991), Lahana iliklerinden (*Trichoplusiani*) katalazı; ethanol-kloroform fraksiyonu ve standart kolon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi $2,2 \times 10^5$ Unit, moleküler ağırlığı 247 – 259 kDa aralığında saptanmıştır.

Beaumont ve ark. (1990), Patates kökünden (*Solanum Tuberosum*) katalazı; AcA-34 ultrajel kolonu ile saflaştırmışlardır. Yapılan aktivite çalışmaları sonucu enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 EÜ/mg protein değerinde saptamışlardır. Bir diğer çalışmada ise enzimin moleküler ağırlığını 224 kDa bulunmuştur. Ayrıca bu araştırmada enzim için siyanid ve azid inhibitörleri kullanmışlardır.

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

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

Köksal, E., (2003) Katalaz enziminin kara lahanadan (*Brassica oleracea L. Var. Acephala D.C.*) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı peptisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Kara lahanadan kısmi olarak saflaştırılan katalaz enziminin kinetik özelliklerini rapor etmişlerdir.

Yücebilgiç, G., (2007) Keten tohumu (*Linum Usitatissimum*) ekstraktında katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini incelemiş, enzimlerin tüm kinetik özelliklerini rapor etmişlerdir.

Pazıdan (*Beta vulgaris var. cicla*), roka (*Eruca Sativa*) bitkisinden, ısırgan otundan (*Urtica dioica*), ıspanaktan (*S.oleracea cv. Gladiatör*), keten tohumundan (*LinumUsitatissimum*), tatlı su çipurasından (*Tilapia*), karnabahardan (*Brassica oleracea L.*) ve daha birçok bitki, tohum ve meyveden karakterizasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Gülçin, İ., 2002; Öztürk, L., 2002; Yücebilgiç, G., 2007).

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1 Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple yaşam birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret olan bir sistem olarak tanımlanmıştır. Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna – az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısımları doğrudan doğruya proteinin polipeptid zinciridir. Bazı enzimlerin ise katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna; bazılarının protein olmayan organik bileşiğe; bazılarının da hem metal iyonuna hem de organik bileşiğe ihtiyaçları vardır. Bu iyon ve bileşiklere genel olarak kofaktör denilir (Ziyan, 1998). Organik bileşik enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve dissosie olmuyorsa prostetik grup adını alır. Pek sıkı birleşmemiş ve dissosie olabiliyorsa koenzim adını alır. Kofaktörlere sahip olan enzimlere de holoenzim denilmektedir (Tekman, Ş., Öner, N., 1994). Enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetlerde

tutunmuş olan gevşek bağlı koenzimler diyaliz yolu ile enzimlerden uzaklaştırılabilirler.

Apoenzim, kofaktörlü bir enzimin yalnızca protein kısmına verilen addır. Enzimin etki ettiği madde veya madde karışımına ise ‘‘substrat’’ denir.Yani enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürebildikleri bileşikler o enzimin substratlarıdır (Tekman, Ş., Öner, N., 1994).

Koenzim veya prostetik grup enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu, yani spesifisitesini tayin eder. Apoenzim ise enzimin hangi substrata etki edeceğini, diğer bir deyişle enzimin substrat spesifisitesini tayin eder. Örneğin; koenzimi NAD^+ olan enzimler dehidrojenasyon reaksiyonlarını kataliz ederler, fakat hidrojenin hangi substrattan ayrılacağını tayin eden enzimin apoenzim kısmıdır.

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içi reaksiyonlarda hiçbir yan ürün oluşturmaksızın etkilerini gösterirler. Hücre içi reaksiyonlar enzimler sayesinde birkaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşmektedir.

Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Turnover sayısı enzimlerin katalizleme güçlerini gösteren bir ifadedir. Katalaz enzimi için turnover sayısı = $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ dir (Yücebilgiç, G., 2007).

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25°C de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir.

Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).

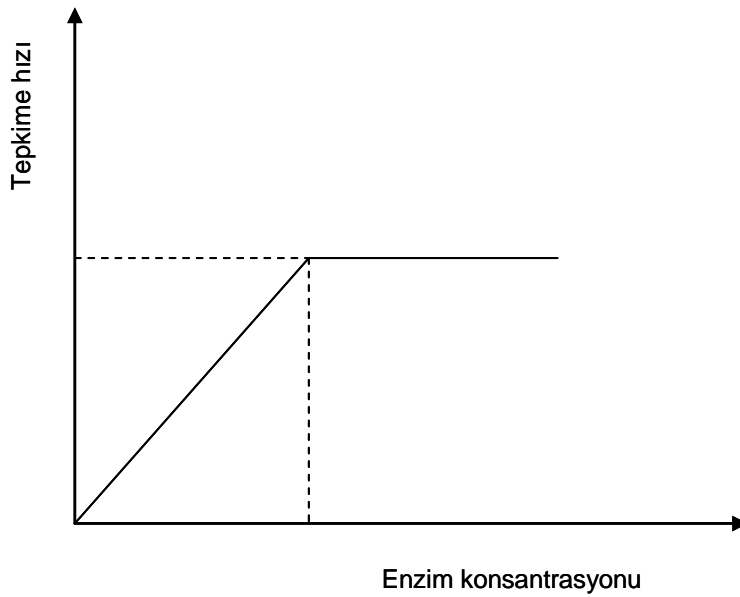
2.2. Enzimlere Etki Eden Faktörler

Enzim reaksiyonlarının hızı üzerine :

enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortam pH'sının, zamanın reaksiyon ürünlerinin, ışık ve de fiziksel etkenlerin etkisi vardır.

2.2.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi

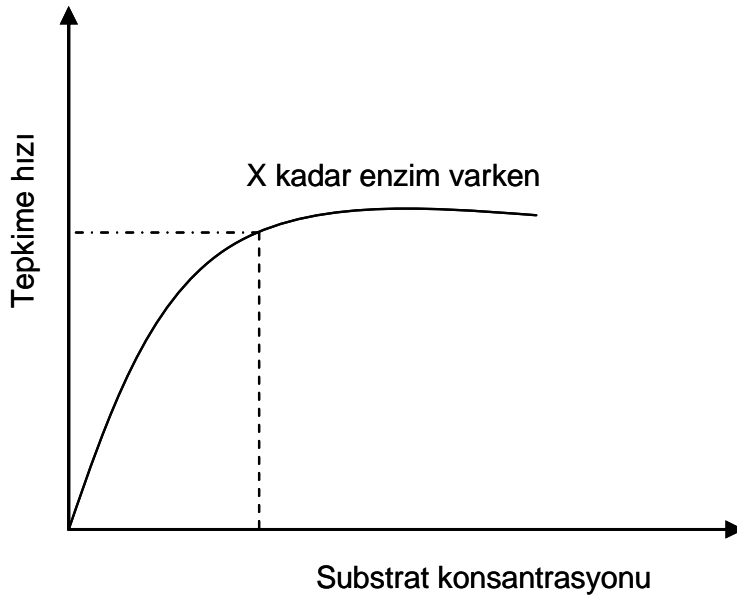
Enzim reaksiyonunu hızı, genel olarak, enzim konsantrasyonu ile orantılıdır. Substrat konsantrasyonu sabit tutulup enzim konsantrasyonu arttırılırsa substratın tamamı enzim-substrat kompleksi oluşturana kadar reaksiyon hızı artar. Substrat tükendiği anda enzim reaksiyonu sabitlenir.



Şekil 2.1. [E] - Reaksiyon hızı grafiği

2.2.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi

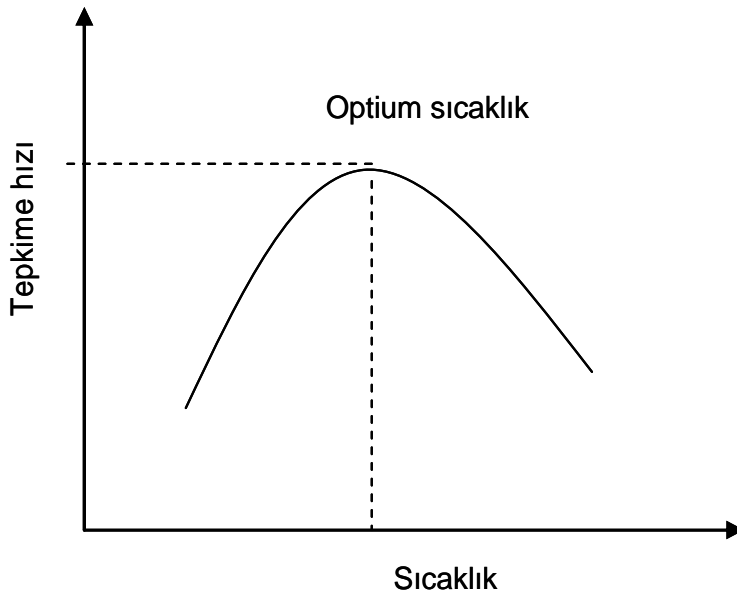
Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Bundan sonra substrat konsantrasyonunun artması ile artık reaksiyon hızı değişmez.



Şekil 2.2. [S] - reaksiyon hızı grafiği

2.2.3. Sıcaklığın etkisi

Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklık ile artar. Sıcaklığın her 10 °C artması ile reaksiyon hızı ortalama iki kat artar. İn vitro enzim reaksiyonları çoğu zaman 37 - 40 °C 'de yapılır. Bu sıcaklıkta reaksiyon hızı oda sıcaklığındakine oranla dört kat daha fazladır.



Şekil 2.3. Sıcaklık - reaksiyon hızı grafiği

Fakat belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra, enzimler denatüre olurlar ve etkilerini kaybederler. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir.

2.2.4. pH etkisi

Enzimin reaksiyon hızı ortamın pH'sına bağlıdır. Belirli bir pH alanında enzimin etkisi en fazladır. Bu pH'ya enzimin optimum pH'sı denir. Optimum pH'nın aşağısında ya da yukarısında reaksiyon hızı daha azdır. Belirli bir pH'dan sonra da enzim tamamen etkisiz kalır.

2.2.5. Zamanın etkisi

Yapılan araştırmalar enzimlerin optimum sıcaklıklarının ve optimum pH'larının zamana bağlı olduğunu göstermektedir.

2.2.6. Reaksiyon ürünlerinin etkisi

In vitro enzim reaksiyonu devam ettikçe reaksiyon ürünleri enzimi inhibe ettikleri için enzim reaksiyonunun hızı azalır. Bu inhibisyona sebep, reaksiyon ürünlerinin molekül yapısı bakımından substratı andırmaları ve enzime substrattan daha fazla bağlanmalarıdır. Reaksiyon ürünü, enzim proteini ile substratın birleştiği yerin dışında bir yerde birleşebilirler. Allosterik yere bağlanan madde, enzimin etkili bölgesinde biçimsel bir değişiklik gösterebilir. Bunun sonucu olarak, enzim proteininin şeklinin bozulması dolayısıyla enzimin substrat ile birleşmesi substratın yapısına, konsantrasyonuna veya diğer faktörlere bağlı olarak inhibisyona neden olur. Bu etkiye de allosterik etki denir.

2.3. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin hem in vivo, hem de in vitro aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılmasına veya tamamen yok edilmesine enzim inhibisyonu denir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle düşük molekül

ağırlığına sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan oldukça önemlidir. İnhibisyon araştırmaları ile enzimatik reaksiyonların mekanizmaları, aktif merkezde rol oynayan fonksiyonel gruplar, aktif merkezin yapısı ve enzimin substrat spesifikliği açıklanabilir. Ayrıca ilaçların ve toksik maddelerin etkisi de bu yolla incelenebilir.

İki tip inhibisyon vardır, birincisi tersinir (geri dönüşlü) inhibisyon, ikincisi tersinmez (geri dönüşsüz) inhibisyonudur. Tersinmez inhibisyon'da, inhibitör aktif merkeze kovalent olarak bağlanarak enzimi inaktive eder. Tersinmez (geri dönüşsüz) inhibisyonlara örnek olarak, aktif merkezlerinde serin bulunan enzimlerin di-izopropilflorofosfat tarafından inaktivasyonları verilebilir. Tersinir inhibisyonda ise inhibitör enzim ile veya enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanır. Üç çeşit tersinir inhibisyon türü vardır (Robyt and White 1990). Bunlar;

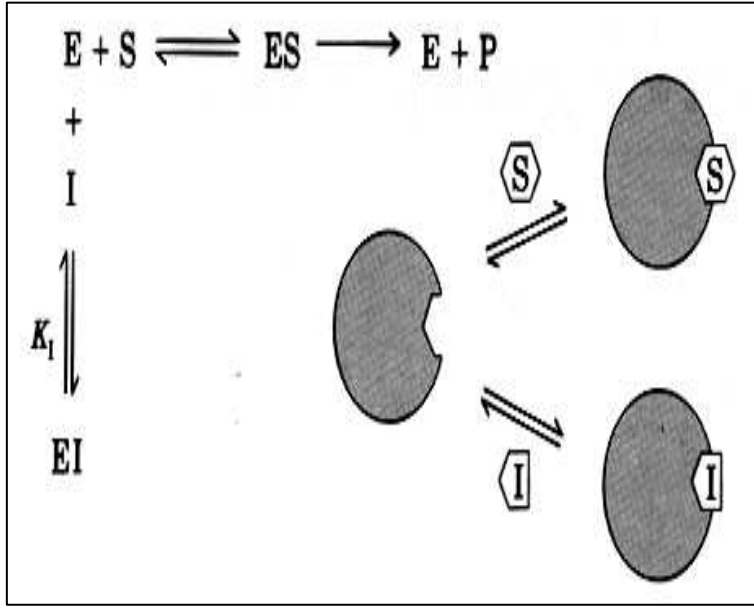
Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif İnhibisyon)

Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif İnhibisyon)

Yarı Yarışmalı inhibisyon (Ankompetitif İnhibisyon)

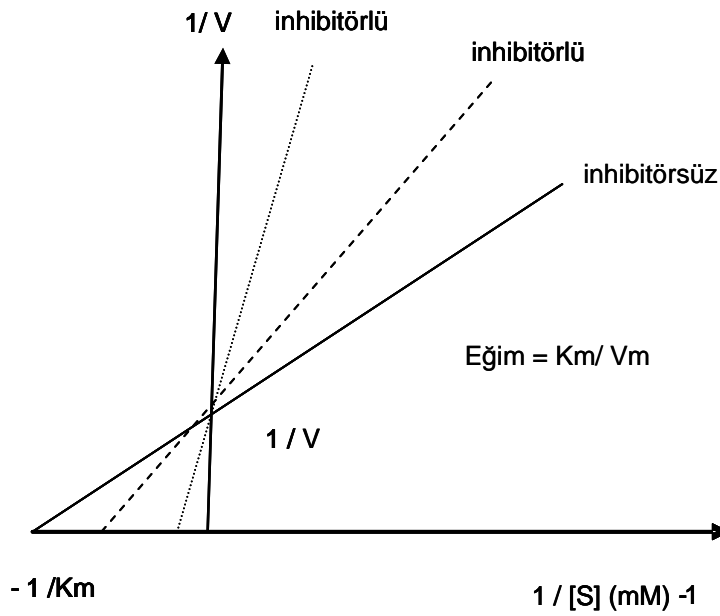
2.3.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif inhibisyon)

Bu tür inhibisyon, yapı bakımından substrata benzeyen maddeler tarafından yapılır. İnhibitör aktif merkeze bağlanarak enzim-inhibitör kompleksini oluşturur. Bu kompleks ürüne dönüşmeyeceğinden inhibitör bağlanmış olan enzim molekülleri boşa harcanmış olur. Fakat substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_m değeri artar. Kompetitif inhibitör varlığında reaksiyon şeması aşağıda verilmektedir (Ziyan,1998). Yarışmalı enzim inhibisyonu; tersinir enzim inhibisyonunun yaygın bir tipidir. Kompetitif inhibitör, sıklıkla yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi, enzime tersinir bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir ve EI kompleksi oluşturmak üzere enzim ile tersinir olarak birleşir.



Şekil 2.4. Kompetitif enzim inhibisyonu

Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör enzime tersinir olarak bağlandığından yarışma, basit olarak daha fazla substrat ekleyerek substrat lehine çevrilebilir. Yeterli substrat varsa bir kompetitif inhibitörün enzime bağlanma olasılığı çok azdır.



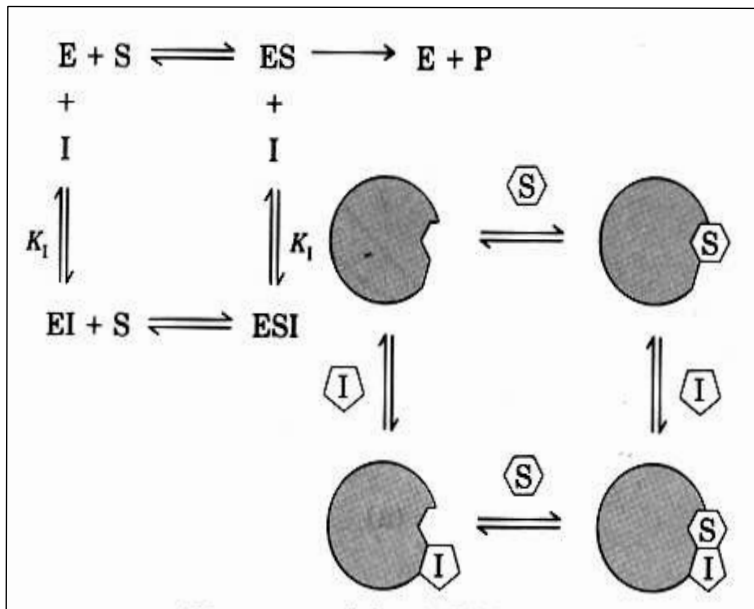
Şekil 2.5. Kompetitif enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Fakat kompetitif inhibitörün varlığında, yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan K_m değeri artar. K_m değeri üzerine belirgin etki ve V_{max} değeri üzerine etkinin az veya çok oluşu, kompetitif enzim inhibisyonunun karakteristiğidir (Lineweaverand Burk, 1934). Kompetitif inhibitör, Lineweaver-Burk grafiğinin eğimini artırır. Kompetitif inhibisyon, metanol içen 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.

2.3.2. Yarışmasız (Nonkompetitif) enzim inhibisyonu

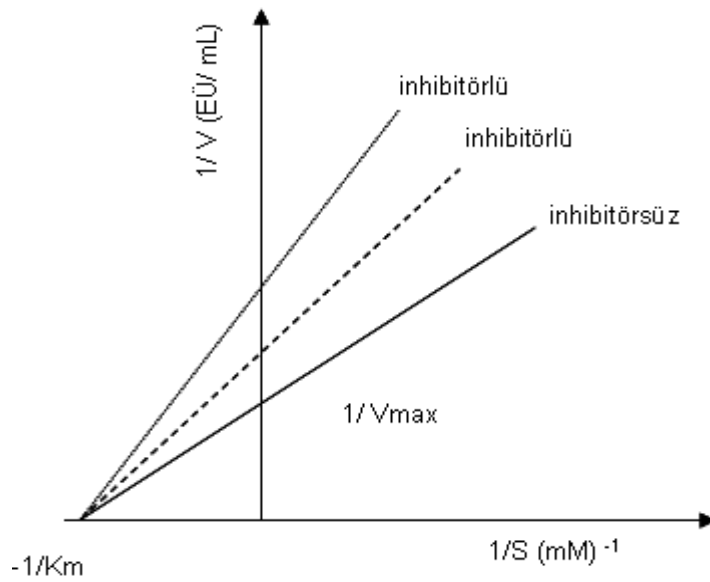
Yarışmalı olmayan enzim inhibisyonudur. Nonkompetitif enzim inhibisyonunda, nonkompetitif inhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanır.



Şekil 2.6. Nonkompetitif (yarışmasız) enzim inhibisyonu

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

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 tersinir bağlanarak enzimi inaktive eder. 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.

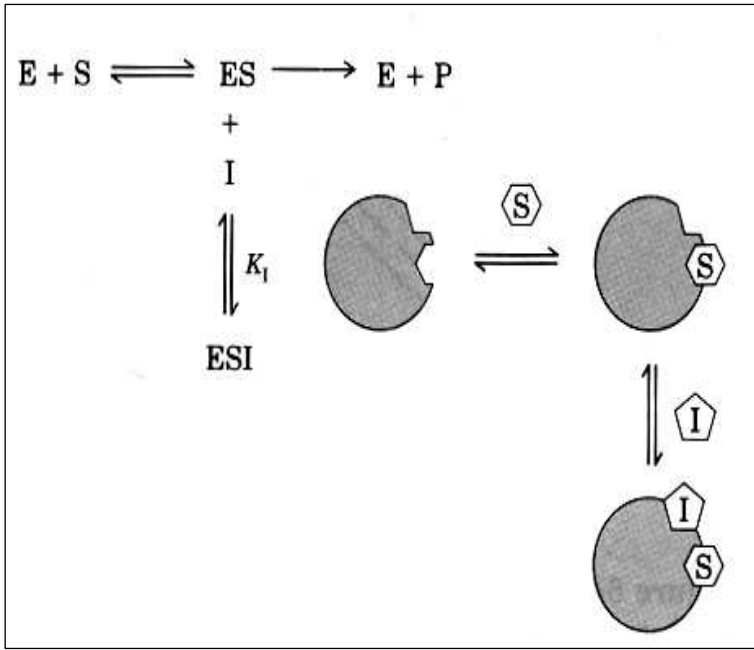


Şekil 2.7. Nonkompetitif (yarışmasız) enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk grafiği

2.3.3. Yarı yarışmalı (Ankompetitif) enzim inhibisyonu

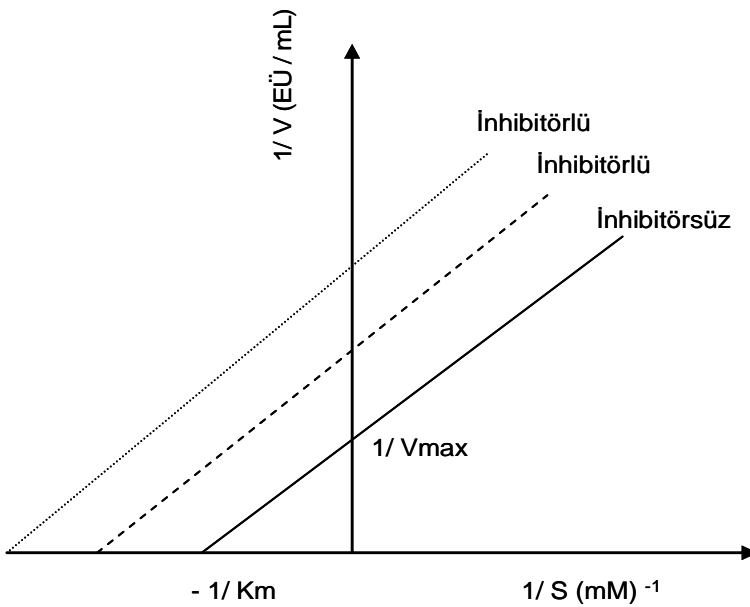
Ankompetitif inhibitör, nonkompetitif inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanır.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right)$$



Şekil 2.8. Ankompetitif (yarı yarışmalı) enzim inhibisyonu

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 tersinir bağlanarak enzimi inaktive eder Ankompetitif inhibitör, ES konsantrasyonunu azaltır.



Şekil 2.9. Ankompetitif (yarı yarışmalı) enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk grafiği

Ankompetitif inhibisyon sonucu hem V_{max} hem K_m değeri değişmektedir; V_{max} değeri azalırken K_m değeri küçülür.

2.4. Katalaz Enzimi

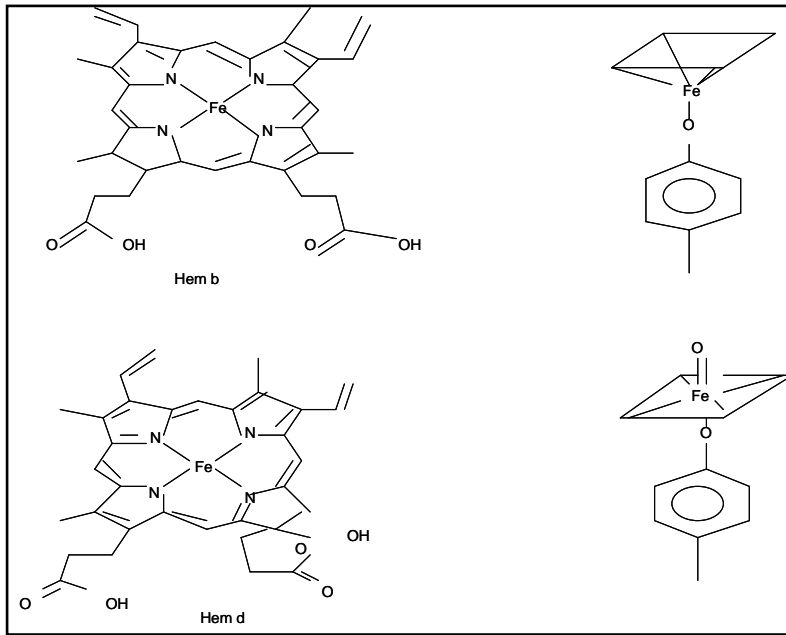
Katalaz enzimi (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase E.C.1.11.1.6) Katalaz (CAT) , doğada özellikle bitkilerde bolca bulunan katalaz enzimi H_2O_2 'yi indirgeyen veya parçalayan, periksizomların ise yapısal bir bileşeni olan oksidaz enzimlerinden biridir (Higashi ve ark. 1974; Halliwel ve ark. 1990; Nicholls ve ark. 2000).

Aerobik mikroorganizmaların tamamında, bitkilerde, omurgalı ve omurgasız canlılarda bulunan bu enzim $4 \times 10^7 s^{-1}$ gibi yüksek bir tunuver sayısına sahiptir.

Bitkisel kaynaklarda bulunan katalaz enzimi dört hem içeren alt birimlerden oluşur ve alt birimlerin molekül ağırlıkları sırası ile 54 ve 59 kDa arasındadır (Eising and Trelease 1990). Örneğin kabakta 55 kDa, mercimekte 54 kDa, salatalıkta 54,5 kDa ve pamukta 55 kDa'dır (Kunce and Trelease 1986).

CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, hidrojen peroksitin ve ROOH gibi bir peroksidi giderek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2001). Çünkü hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikalinin potansiyel kaynağıdır (Huang et al. 1983).

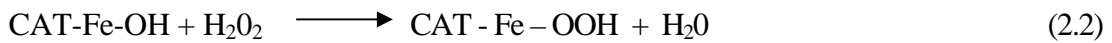
Katalaz enzimi; reaktif oksijen türlerinden olan ve hücresele zarara neden olduğu bilinen ve toksik etkisi olan hidrojen peroksitin suya dönüştürülmesini tek yönlü olarak katalizler. CAT enzimi, substrat olarak kullandığı hidrojen peroksitten, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak faydalanmaktadır (Lanir ve Schejter 1975; Jones ve Masters 1976; Nicholls ve ark. 2000; Robertson, 2004). Birçok dokuda oksidaz ve CAT aktivitesi beraber çalışır.



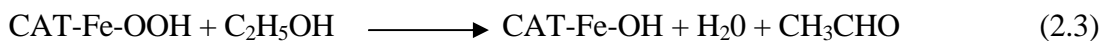
Şekil 2.10. Katalaz enziminin hem b ve hem d gruplar



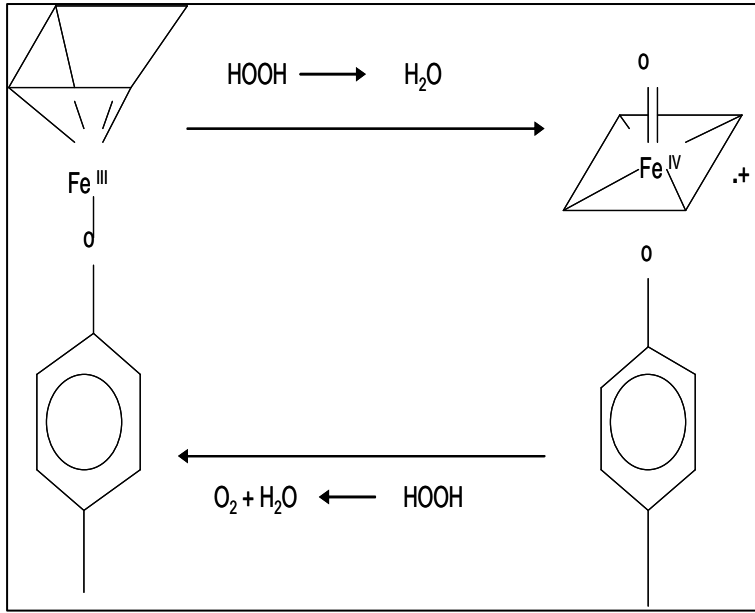
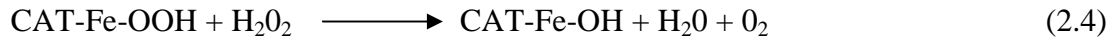
Birinci adımda katalazın hem demiri H_2O_2 ile etkileşerek oksijence zengin demir peroksit oluşturur.



Bileşik I olarak adlandırılan demir peroksit ara ürünü, katalaz heminin spektrofotometrik özelliklerini değiştirdiği için invitro ve invivo koşullarda tayin edilebilir. Katalazın kinetik özelliklerinden dolayı invivo koşullarda bileşik - I olarak H_2O_2 konsantrasyonlarının indikatörü olarak kullanılır. Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonlarında bileşik-I hidrojen donörü tarafından (örneğin etanol) peroksitatik olarak indirgenebilir.



H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında bileşik - I ikinci H_2O_2 ile reaksiyona girerek su ve moleküler oksijen oluşturur.



Şekil 2.11. Katalazın etki mekanizması

Yukarıda da anlatıldığı ve şekilde de görüldüğü gibi katalitik reaksiyonda iki basamak yer alır:

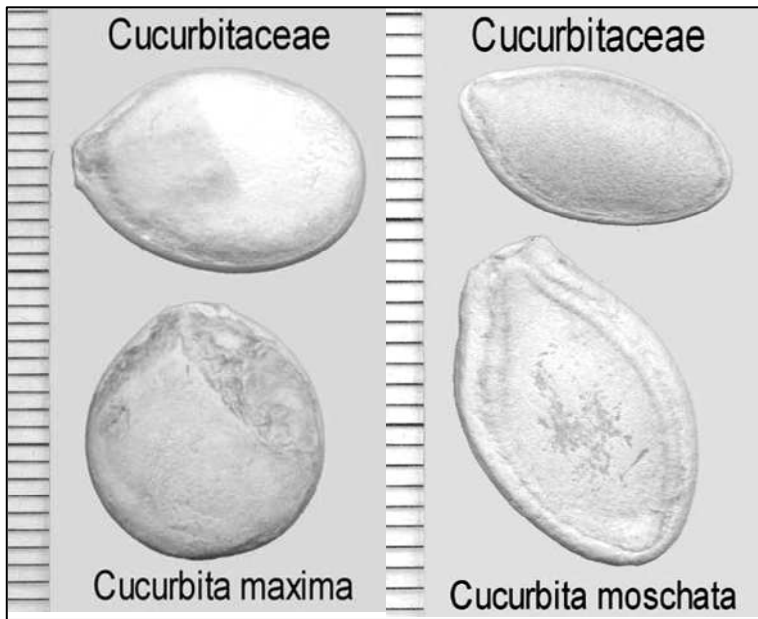
İlk basamakta katalazın Ferrik (Fe^{3+}) içeren hali (Porfirin Katyon Radikali) oluştururken peroksit molekülü ile tepkime verir ve burada peroksit molekülü indirgenir.

Sonrasında ikinci basamakta başka bir hidrojen peroksit molekülü yükseltgenerek bileşik doğal halini alır. Bu reaksiyonlarda hidrojen peroksit hem elektron alıcısı hem de vericisi olarak görev yapar (Kremer, 1970; Lardinois, 1995; Switala ve Loewen 2002).



2.5. Kabak Çekirdeği

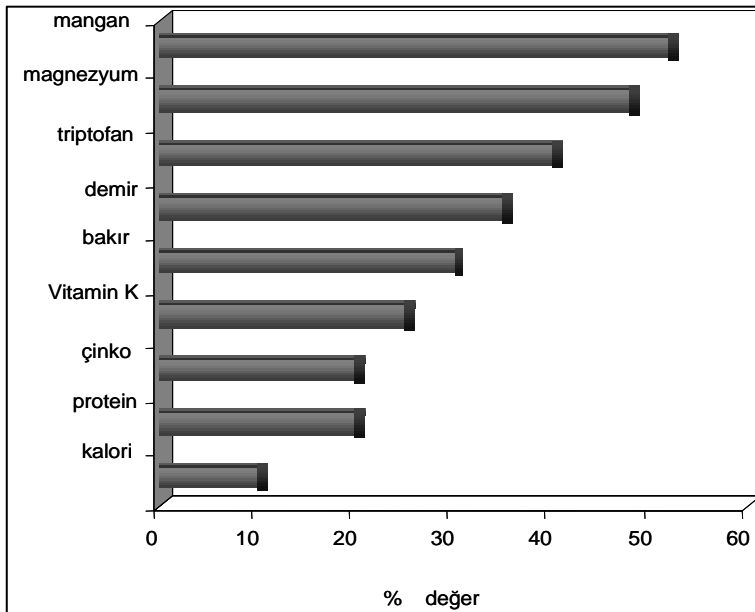
Kabaklar, salatalık, karpuz, acur ve kavunla birlikte kabakgiller (*Cucurbitaceae* familyası) familyası oluştururlar. Sakız kabağı, helvacı kabağı, balkabağı gibi çeşitleri bulunur. Kabaklar bir yandan meyve gurubuna girer, bir yandan da sebze gurubuna. Bal kabağı yemek yapıldığı zaman sebze olarak, kabak tatlısı yapıldığı zaman da meyve olarak nitelendirilir.



Şekil 2.12. Kullanılan kabak çekirdeği türleri ve görünüşleri

Kabak çekirdeği, proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler bakımından özellikle de insan vücudunda yapılmayan esansiyel (fenilalanin, triptofan, metionin, gibi) aminoasitler açısından çok zengindir. Kabak çekirdeği içerisinde yüksek oranda bulunan K vitamini kanın pıhtılaşması için gerekli olan protrombinin yapımında görevlidir. Ayrıca kemiklerin sağlıklı olması ve kırıkların iyileşmesi için gerekli bir vitamindir. B grubu vitaminlerinden olan folik asit (B9), DNA yapımında ve hücre yenilenmesinde görev alan çok önemli bir vitamindir. Eksikliğinde kansızlık (megaloblastik), hamilelik sırasında ise fetusta çok ciddi problemlere neden olur. Kabak çekirdeği çok önemli folik asit kaynağıdır Kabak çekirdeğinde önemli miktarda bulunan potasyum sinir sistemi ve kasların duyarlılığında spesifik etkiye sahiptir. Potasyum ayrıca intrasellüler basınçtan sorumludur, sinir ve kasların

duyarlılığında spesifik etkiye sahiptir ve sodyumla birlikte hücrelerin asit-baz dengesini gerçekleştirmektedir. Kabak çekirdeği özellikle, prostat büyümesinden kaynaklanan idrar zorluğuna karşı kullanılmaktadır. Kabak çekirdeği yapısında, vücut içerisinde testesteronun, kendisinin çok daha güçlü bir formu olan dehidrotestesteron hormonuna dönüşmesini engelleyen kimyasal bir maddeyi bulundurmaktadır. Bu bileşiğin miktarı türe ve çeşide bağı olarak % 0,5 ile % 2 arasında değişmektedir. Dehidretestesteron olmaksızın vücudun testesteron hücrelerini artırması zorlaşmakta, dolayısıyla prostat büyümesi bu sayede engellenmiş olmaktadır. Kabak çekirdeğinde yüksek miktarda bulunan magnezyum, kas ve sinir fonksiyonlarının yürütülmesi, kemiklerin güçlendirilmesi, kalp ritminin düzeninin sağlanmasında önemli bir görev üstlenmektedir. Kemik ve dişlerin yapısında kalsiyum ve fosforla birlikte bulunur. Birçok enzimin çalışması için gerekli bir mineraldir. Kan basıncının düzenlenmesine yardımcıdır. Fitosteroller (Phytosteroller) , kolestrole çok benzeyen kimyasal yapıya sahip, bitkilerde bulunan bileşiklerdir.



Şekil 2.13. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) içeriği

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler

Bu çalışmada Sakarya bölgesinde yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (*Cucurbita maxima* ve *Cucurbita moschata*) elde edilen Katalaz enzimi (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase E.C.1.11.1.6) kullanılmıştır.

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımız boyunca hidrojen peroksit, amonyum sülfat, sodyum hidroksit, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , sitrik asit, hidroklorik asit, Tris – HCl, EDTA, sodyum azid, triton – X100, KCN, tiyoüre, PVP, diyaliz torbaları, sephadex kolonu, L - sistein, triptofan, L - tirozin, tiyoüre, sodyum azid, demir (III) klorür, potasyum siyanür, bakır sülfat, çinko sülfat, civa sülfat, kalsiyum klorür, lityum klorür, magnezyum klorür, kobalt, trizma baz, serum albümin, bradford çözeltisi, comessie blue, HCl, sodyum dedosil sülfat, TEMED, amonyum persülfat, 2 - merkaptoetanol, metanol, izopropil alkol, amonyum sülfat kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

UV spektrofotometre (SHIMADZU UV - 2401Pe), soğutmalı santrifüj (nüfe NF 800R), derin dondurucu, pH metre (HANNA instrument pH 211) , otomatik pipetler (Mikrolit), hassas terazi (OHAUS analytical standart), Mağnetik karıştırıcı, Kronometre, Blender, Elektroforez cihazı (büyük boy elektroforez E-C 250 - 90 Apporation Comparison) .

3.1.3. Kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması

Araştırmada kullanılan tampon çözeltilerinin hazırlanmaları aşağıdaki gibi yapılmıştır.

3.1.3.1. 0,1 M sitrat tamponunun hazırlanması

0,1 M Sitrat tamponu, pH 4,2 ve 4,4'deki çözeltilerin hazırlanması için kullanılmıştır.

10,51 gram sitrik asit saf su ile 500 mL'ye tamamlanır (A çözeltisi). 14,705 gram sodyum sitrat saf su ile 500 mL'ye tamamlanır (B çözeltisi). A ve B çözeltileri Tablo.3.1'de belirtilen miktarlarda karıştırılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve istenilen pH'ta tampon çözeltiler elde edilmiştir.

Tablo.3.1. 0,1 M Sitrat tamponu hazırlanması

pH	A (mL)	B (mL)
4,2	35	15
4,4	28	22

3.1.3.2 0,2 M fosfat tamponunun hazırlanması

pH'ları 5,7 - 7,2 arasındaki çözeltileri hazırlamak için kullanılmıştır. 24 gram (0,2 mol) NaH_2PO_4 saf suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır (A çözeltisi) 28,4 gram (0,2 mol) Na_2HPO_4 suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır (B çözeltisi) A ve B çözeltilerinin Tablo 3.2'de verilen miktarlarda karıştırılması ile istenilen pH'larda tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

Tablo.3.2. 0,2 M fosfat tamponunun hazırlanması

pH	A (mL)	B (mL)
5,7	467,5	6,5
6,4	367,5	132,5
6,7	282,5	217,5
7,0	195	305
7,2	140	360

3.1.3.3 0.05 M tris tamponunun hazırlanması

pH'ları 7,4 - 9,0 arasındaki çözeltileri hazırlamak için kullanılmıştır. 0,05 M Tris tamponu, Trizma-HCl ve Trizma-Baz'dan Tablo.3.3'de verilen miktarlarda alınıp saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tablo.3.3. 0,05 M Tris tamponunun hazırlanması

pH	A(g)	B (g)
7,4	3,303	0,485
7,8	2,66	0,985
8,0	2,22	1,325
8,5	1,105	2,18
9,0	0,038	2,735

3.2. Katalaz Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

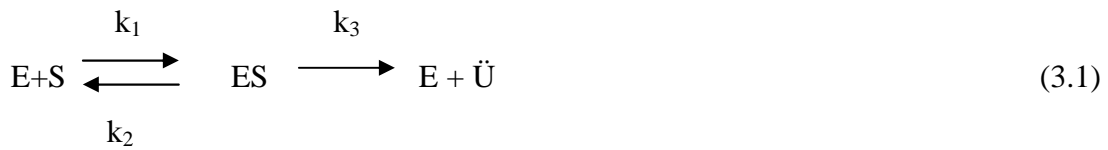
3.2.1. Katalaz enzimi için homojenatın hazırlanması

Homojenat hazırlanmasında -20 °C'de dondurularak saklanan 5 gram bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) ve diğer kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) % 0,5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7,0 olan 25 mL fosfat tamponunda blender da öğütülerek homojenize edilmiştir. Homojenat çift kat süzgeç kağıdından süzümüştür. Soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

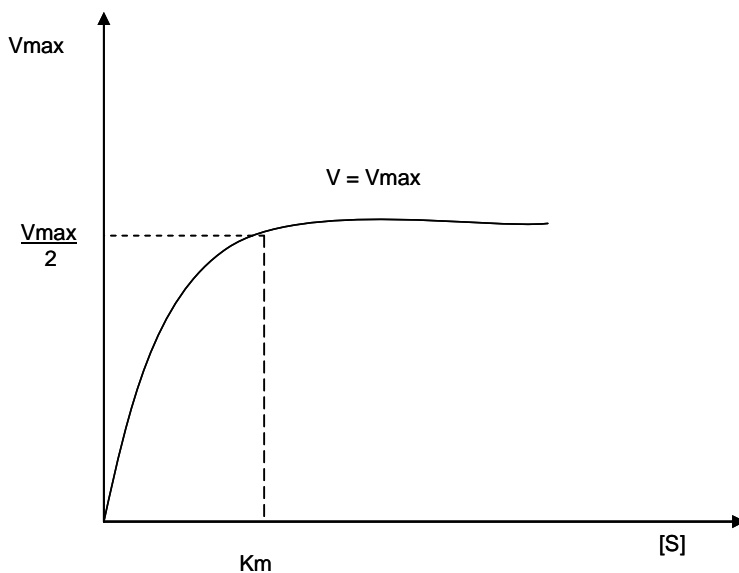
3.2.2. Katalaz enziminin aktivite tayini

Katalaz enziminin aktivite tayininde spektrofotometrik metot kullanılmıştır. Havir ve McHale'nin (1987), Lück'e (1963) dayandırdığı prosedüre göre yapılmıştır. Absorbans ölçümleri 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metodun esası; aktivite ölçüm ortamında bulunan katalazın, ortamda bulunan hidrojen peroksit ile etkileşimi sonucu meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesine dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için 40-35-30-27-25-22-20-17-15-12-10-7-5 ve 2,5 mM lık hidrojen peroksit miktarları hesaplanmış ve aktivite ölçümü için UV- Vis spektrofotometre cihazı ve 3 mL'lik kuartz küvetler kullanılmıştır. 3 mL'lik kuartz küvete 1,475 mL fosfat tamponu (pH 7,0) ve 1,5 mL substrat 40 mM'lık H₂O₂ çözeltisi ilave edildikten sonra inkübasyon ortamına 50 µL enzim homojenatı ilave edilmiştir. Küvet içindeki numune karıştırılmış ve fosfat tamponu (pH 7,0) ve substrat ihtiva eden köre karşı 240 nm'deki absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ortamdaki H₂O₂'nin H₂O ve O₂'ye dönüşümünü sağlarken meydana gelen azalma enzimin aktivitesini göstermektedir. 180 saniye boyunca 240 nm'de meydana gelen absorbans azalışı köre karşı kaydedilmiş, aynı işlemler 2,5-40 mM'lık hidrojen peroksit içerecek şekilde hazırlanan küvetler için de yapılmıştır. Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan, dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçların grafiklerinin eğimleri hesaplanarak çizilen [S] - V grafiğinden 1/[S] - 1/V grafiğine geçilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar EÜ/mL olarak verilmiştir. Aktivite ölçüm yöntemi, bütün kinetik

çalışmalarda benzer şekilde yapılmıştır. Ölçümlerde lineer absorbands azalması olan aralıktan, dakika başına absorbands azalması hesaplanmıştır. Işık yolu (b): 10 mm , ekstinksiyon katsayısı: $0,0394 \text{ mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-2}$ alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 240 nm'de 180 saniyede hidrojen peroksitin harcanmasını sağlayan enzim miktarı belirlenmiş, formül pratik olarak; $E\ddot{U} = (180 \times A / 0,0394 \times \text{enzim miktarı})$ şeklinde düzenlenmiştir.

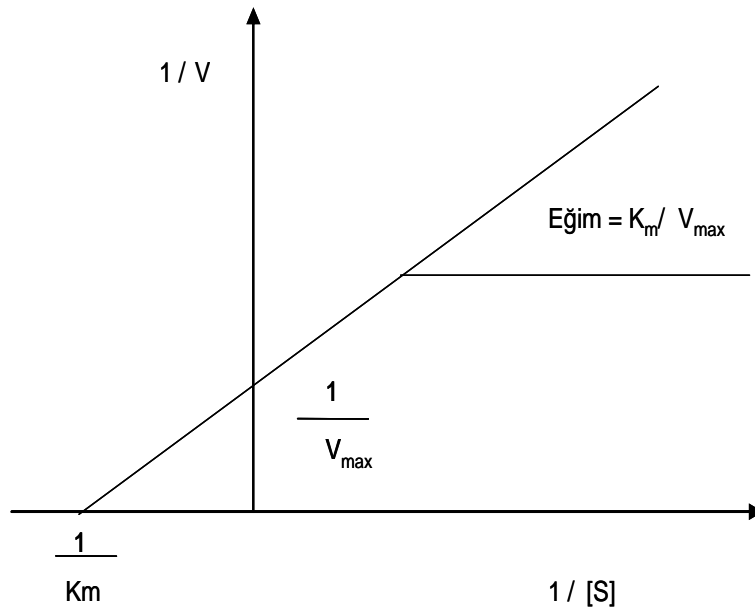


Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir enzim-substrat kompleksi oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür. Burada ES kompleksi, E ve S'dan k_1 hızı ile oluşur; ES'nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla tekrar substrat oluşumu şeklinde yürüyebilir. Ancak asıl reaksiyon k_3 reaksiyon hızı ile ilerleyen ürün oluşumu reaksiyonudur. Reaksiyon kararlı duruma ulaşınca (steady-state) ES'nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani sıcaklık aynı kaldığı sürece konsantrasyonda değişme olmaz.



şekil 3.1. Reaksiyon hızı- [S] (Michaelis- Menten) grafiği

Enzim reaksiyonları ile ilgili ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir eğri elde edilir. V_{max} , hiperbolün 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 sabitlerdir. Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşüktür ($[S] \ll K_m$) ve substrat derişimi arttıkça hız 1. dereceden enzim kinetiğine göre artmaktadır. İkinci bölgede ise substrat konsantrasyonu ve hız arasındaki reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir ve substrat konsantrasyonu artsa da artık hızda bir değişme olmaz, sıfırıncı dereceden bir enzim kinetiği gözlenir ($V = V_{max}$) 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.



Şekil 3.2. $1/V - 1/[S]$ (Lineweaver-Burk grafiği)

3.2.3. Katalaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Protein moleküllerinin dışında onları çevreleyen ve çözünür halde kalmalarını sağlayan su molekülleri vardır. Yüksek su konsantrasyonlarında, proteini çevreleyen su molekülleri, tuzdaki Na^+ ve Cl^- iyonları tarafından çekilir ve bu sayede proteinler çöker. Her proteinin çökmesi için gerekli olan tuz konsantrasyonları farklıdır. Dolayısıyla farklı tuz konsantrasyonlarında farklı proteinler çöker.

Yaptığımız çalışmada kabak çekirdeklerinde bulunan katalaz enziminin homojenatları sırasıyla % 0-10, % 10-20, % 20-30, % 30-40, % 40-50, aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme işlemleri için hazırlanan enzim homojenatları 14.000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Her santrifüj sonrası amonyum çöktürmeleri yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpematantta enzim aktivitesine bakılmış ve katalaz enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir. Tüm bu işlemler + 4 °C 'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş ilave edilmiş ve her defasında daha önce kalan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ün çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarları şu formüle göre hesaplanmıştır.

$$M[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = [1,77 \times V \times (S_2 - S_1)] / [(3,54 - S_2)]$$

M= katı amonyum sülfat miktarı (g)

V= çözeltinin hacmi (mL)

S_1 = 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doyumluğu

S_2 = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doyumluğu

Ham enzim ekstraktı hızlı bir şekilde süzgeç kağıdından süzildikten sonra, süzüntü soğutmalı ultra santrifüjde 4 °C de 14.000 rpm de 25 dk süresince santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpematant, doyum amonyum sülfat çözeltisi kullanılarak % 30 doyumluğa getirilmiş ve 4 °C de 14.000 rpm de 25 dk süresince santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra çökelek uygun miktarda pH 7,0 tamponunda çözülerek diyaliz torbalarına doldurulmuştur. Biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir. Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin

boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları genellikle molekül ağırlığı 10.000'den daha fazla olan makromoleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır.

Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Dengeye ise çalışılan hacme bağlı olarak, genellikle 4 - 6 saatte ulaşılır. Dengeye ulaşıldıktan sonra, eğer dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Böylece, istenilen ayırım tamamlanıncaya kadar diyaliz 1 - 2 gün sürdürülebilir (Temizkan ve Arda 2004).

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (selüloz, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. 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 ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilmiştir. Numune önce 0,2 M'lık fosfat tamponuna (pH 7,0) karşı 6 saat süreyle diyaliz edilmiş ve diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde ve buz dolabında (+ 4 °C) gerçekleştirilmiştir. 0,2 M fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılarak diyaliz işlemi başlatılmıştır. Belli bir dengeye geldikten sonra tampon çözeltisi değiştirilmiştir. Bu işlem 3 defa tampon çözelti değiştirilerek 12 saat boyunca sürdürülmüştür.

Diyaliz bittikten sonra UV-Vis spektrofotometre ile 240 nm'de uygun substrat konsantrasyonlarında ve 50 µL diyaliz çözeltisi kullanılarak aktivite tayini Bölüm 3.3.2 'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Amonyum sülfat ve diyaliz işleminden sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış olan bu enzimin bir kısmı daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C de saklanmıştır. Bir kısmı ise saflaştırmanın bir diğer basamağı olan kolon kromatografisinde kullanılmıştır.

3.2.4. Katalaz enzimi için optimum pH çalışması

Optimum pH çalışması için substrat konsantrasyonu-eğim (hız) grafiğinden elde edilen verilerle çizilen $1/[S] - 1/V$ grafiğinden elde edilen K_m değeri yani en uygun substrat konsantrasyonu bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) için ve kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) için belirlenmiş ve bu substrat konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan çözeltilerin UV – spektrofotometre ile pH 3,0 - 9,0 aralığında çalışılmıştır. pH 3,0 - 5,0 arası için 0,1 M'lık sitrat, pH 5,0 - 8,0 arası için 0,2 M'lık fosfat ve pH 8,0 - 9,0 için ise 0,1 M'lık Tris/HCl tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve sonuçlar tablo ve şekiller halinde gösterilmiştir.

3.2.5. Katalaz enzimi üzerindeki sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla, optimum pH'da uygun substrat konsantrasyonunda ve 0 - 80 °C aralığındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır İstenilen sıcaklıklar, oda sıcaklığının altında buz banyosunda, oda sıcaklığının üstünde ise ısıtıcı su banyosu kullanılarak ayarlanmıştır. Çalışmalar esnasında mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktararak, 3 dakika boyunca aktivite ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar grafik halinde verilmiştir. Tespit edilen aktivitenin en yüksek olduğu değerler ise tablolar halinde verilmiştir.

3.2.6. Katalaz enzimi için K_m ve V_m değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

K_m ve V_{max} değerleri 40 mM'lık stok H_2O_2 substrat çözeltisi kullanılarak çalışılmıştır. Bu stok çözeltilerden, değişik hacimler alınarak 3 mL'lik kuartz kuvet içerisinde 40-30-27-25-22-20-17-15-12-10-7-5-2,5 mM H_2O_2 olacak şekilde enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. 240 nm'de ölçülen bu değerler reaksiyon hızı (EÜ/mL) olarak belirlenmiştir. Daha sonra $1/V$ ile $1/[S]$ değerleri de bulunarak H_2O_2 substratı için Lineweaver - Burk grafikleri çizilmiş ve çizilen grafikten elde edilen denklemden yararlanarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanılmıştır.

3.2.7. Katalaz enziminin depolanma kararlılığının belirlenmesi

Optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri ayarlanarak hazırlanan kabak çekirdeği homojenatı uygun substrat konsantrasyonunda 240 nm'de spektrofotometrik yöntem ile 3 dakika boyunca aktivite ölçümü yapılmıştır. Katalaz enziminin depolanma kararlılığının belirlenmesi amacıyla, aynı enzim homojenatı kullanılmak üzere 12 saat arayla 5 gün boyunca aktivite değerleri gözlemlenmiştir. Sonuçlar tablolar halinde sunulmuş ve şekiller üzerinde de gösterilmiştir.

3.2.8. Katalaz enziminin bozunma hızının belirlenmesi

Optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri ayarlanarak hazırlanan kabak çekirdeği homojenatı uygun substrat konsantrasyonunda 240 nm'de spektrofotometri yöntemi ile 3 dakika boyunca aktivite ölçümü yapılmıştır. Katalaz enziminin bozunma hızının belirlenmesi amacıyla, aynı enzim homojenatı kullanılmak üzere 1 saat arayla aktivite değerleri gözlemlenmiştir. Sonuçlar tablolar halinde sunulmuş ve şekiller üzerinde de gösterilmiştir.

3.2.9. Katalaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi, I_{50} değerleri ve K_I sabitlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

Katalaz enzimi ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmını oluşturan inhibisyon etkilerinin incelenmesi amacıyla L - sistein, L - tirozin, triptofan, tiyüre, sodyum azid, demir (III) klorür, potasyum siyanür, EDTA, çinko sülfat, civa sülfat, kalsiyum klorür , lityum klorür, magnezyum klorür, kobalt (III) klorür gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır. Bu inhibitörlerin 0,1 mM gibi düşük konsantrasyonlarda bile kuvvetli inhibisyon gösterdikleri gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin inhibisyon etkilerini tespit etmek amacıyla 15 mM'lık sabit substrat konsantrasyonunda ve en az beş farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteler belirlenmiştir. Her bir inhibitör için bu değerlerden kullanılarak % bağıl aktivite - [I] grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden çıkarılan üstel fonksiyonlu denklemler yardımıyla enzim aktivitesini yarıya indiren substrat konsantrasyonu olan I_{50} değerleri hesaplanmıştır. K_I değerlerini tespit etmek amacıyla önce her bir inhibitör için inhibitörsüz beş değişik substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılmış ve daha

sonra % bağıl aktivite - [I] grafiklerinden faydalanılarak % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonuna yakın üç farklı inhibitör konsantrasyonunda, substratın farklı konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Tiyüre, sodyum azit, demir (III) klorür, potasyum siyanür ve civa sülfat inhibitörlerinin sabit inhibitör konsantrasyonlarında $1/V$ ile $1/[S]$ değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler yardımıyla inhibisyon türü belirlenerek K_I değerleri hesaplanmıştır. Aynı işlemler üçer kez tekrarlanmış, üç farklı K_I değerlerinin ortalaması ve her bir inhibitör için ortalama K_I hesaplanmıştır. K_I ölçümleri esnasında daha önceden belirlenen enzim için en iyi substrat konsantrasyonu, optimum pH ve optimum sıcaklık koşulları ayarlanarak 240 nm'de UV-Vis spektrofotometresi ile aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen I_{50} ve K_I değerleri tablolar halinde sonuçlar kısmında sunulmuştur.

3.3. Katalaz Enzimin Saflaştırma İşlemleri

3.3.1 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 (Temizkan ve Arda 2004). Küçük moleküller ise jel tanecikleri içine girerek orada alıkonurlar. Kolonun üzerine sürekli çözücü verilerek jel taneciklerinde bulunan küçük moleküller uzaklaştırılmıştır. 1,5 gram Sefadeks G-100, 50 mL 0,2 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 çözeltisi ilave edilmiş ve Sefadeks G-100 bir huni yardımı ile kolona verildikten sonra musluk açılarak jelin kolona homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Kolonun içerisinden tampon çözeltisi geçirilerek akış hızı ayarlanmıştır. Tampon kolon içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra enzim numunesi kolona uygulanmıştır. 18 dakika sonra ilk numune tüplere alınmaya başlanmıştır. Jel Filtrasyon Kromatografisinde proteinler, molekül büyüklüğüne göre ayrılırlar. Kolon, jel boncuklar sephadex (çapraz bağlanmış dekstran) polisakkarid veya poliakrilamid jel ile doldurulur (katı matriks).

3.3.2. Elektroferez yöntemi ile katalazın molekül ağırlık tayini

Bu çalışmada uygulanan poliakrilamid jel elektroferez (PAGE) yöntemi ikiye ayrılmaktadır. Birincisi native-poliakrilamid jel elektroferez (native-PAGE), ikincisi sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroferez (SDS-PAGE)'dir. Native-PAGE yönteminde proteinler jel boyunca denature olmadan (üç boyutlu formda) yüklerine ve molekül ağırlıklarına göre ilerlerler. SDS-PAGE yönteminde ise proteinler denature edilerek üç boyutlu yapılarından primer yapıya dönüştürülür. Daha sonra PAGE uygulanır. SDS-PAGE'de proteinler jelde molekül ağırlıklarına göre koşarlar (Laemmli,1970). Poliakrilamid jeller, akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilenbisakrilamidin polimerizasyonu ile hazırlanır. Kimyasal polimerizasyon başlatıcı-katalizör sistemi (amonyum persülfat - TEMED) tarafından kontrol edilir. Proteinlerin ayrılması için kullanılan standart bir jel genelde % 7,5 poliakrilamid içerir. Jelin ayrıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı akrilamid ve bisakrilamidin konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin analizi yapılabilir; yüksek konsantrasyonlarda ise, daha küçük porların oluşumu düşük molekül ağırlıklı olanların analizine izin verir.

Native jel elektroferezinde (N-PAGE) : Kullanılan tamponlar, deterjan ve denatüre edici maddeleri içermediğinden, prosedür doğal koşullarda gerçekleşir. Bu yöntem, protein içeren karışımların ayrılmasında, bir protein ya da protein kompleksinin aktivitesi veya yapısı ile ilgili elektroforetik çalışmalarda, proteinin saflığının kontrolünde ve oligomerik proteinlerin ayrılmasında kullanılır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroferezi (SDS - PAGE) : polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjan olduğu için moleküllere negatif bir yük kazandırmaktadır. SDS - PAGE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine olanak vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana kuyucuklara uygulanır ve elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sonrasında

jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilir.

Bu çalışmada SDS - PAGE tekniği uygulanmıştır. SDS-PAGE, Laemmli tekniğine göre yapılmıştır. Kabak çekirdeklerindeki katalazın saflığının ve moleküler ağırlığının saptanması SDS – PAGE kullanılarak yapılmıştır (Laemmli,1970). Katalazın görüntülenmesi için PAGE ve SDS–PAGE kullanılarak (Wanderley et al., 2004) yapılmıştır. SDS - PAGE, PAGE elektroforezi, Bölüm 3.3.2.1. 'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.3.2.1. Jelin hazırlanışı

Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapılmıştır. Elektroforez camları % 70'lik etanol ile iyice temizlendikten sonra cam levhalar arasına sızıntı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra hava kabarcığı kalmayacak şekilde degaze edilmiş % 10'luk ayırma jeli, TEMED ve amonyum persülfat karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.4.'deki gibi hazırlanan jeller enjektör kullanılarak elektroforez camları arasına dökülmüştür. Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70'lik etanol ile kapatılmış ve jelin polimerleşmesi için yarım saat beklenmiştir. Süre sonunda jel üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaşça alınmıştır.

Ayırma jelinin üzerine, Tablo 3.5.'deki gibi hazırlanan % 5'lik yoğunlaştırma jeli dökülmüş ve tarak yoğunlaştırma jeline hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek jelin polimerleşmesi sağlanmıştır.

3.3.2.2. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı

Jele uygulanacak örnekler ve standart, yürütme tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatılarak numuneler denatüre edilmiştir. Bu arada jel distile su ile yıkanarak, polimerleşmeyen jel kalıntılarını uzaklaştırılmış ve yoğunlaştırma jelindeki kuyucukların yarısına kadar elektrot

tamponu koyulmuştur. Daha sonra kuyucuklara uygun seyreltmeleri yapılan örnekler yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirilerek kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektrot tamponu eklenmiştir. Güç kaynağı 250 V 90 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.3. Jelin boyanması

Cam plakalar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrılmış ve ayırma jeli protein boyaması yapılmak üzere boyama çözeltisi içresine bırakılmıştır. Boyama çözeltisi Bölüm 3.3.2.5. 'deki commasie-blue G-250 'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

3.3.2.4. Commasie brillant mavisi ile boyama

Cam plaklar arasından çıkarılan jel, Commasie Brillant mavisi çözeltisine alınarak bir saat bekletilmiş ve daha sonra jel boya çözeltisinden çıkartılmıştır. Jeldeki boyanın giderimi için iki ayrı yıkama çözeltisi kullanılmıştır. Birinci yıkama çözeltisinde 1 saat ve ikinci yıkama çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Daha sonra % 10'luk gliserol çözeltisinde bir saat bekletildikten sonra jellerin fotoğrafı çekilmiş ve sonuçlar Şekil 4.26.'da sunulmuştur.

3.3.2.5. SDS-PAGE için gerekli çözeltiler :

% 30'luk akrilamid / N,N'- metilenbisakrilamid stok çözeltisi;

29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilenbisakrilamid 100 mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve oda sıcaklığında 1 ay saklanabilmektedir.

Ayırma tamponu (separating tamponu) ;

34,344 g Tris-baz az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. 0,8 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra hazırlanan Tris-baz üzerine eklenmiş ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında kullanılıncaya kadar saklanabilmektedir.

Yoğunlaştırma tamponu (Stacking tamponu) ;

1,515 g Tris-baz az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra konsantre HCl kullanılarak pH'sı 6,8'e ayarlanmıştır. 0,1 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra hazırlanan Tris-baz üzerine eklenmiş ve distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında 1 ay süre ile saklanabilmektedir.

% 10'luk Amonyum persülfat ;

0,1 g Amonyum persülfat 1 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmalıdır.

1 M Trizma baz ;

12,114 g Tris - baz az miktarda distile su içinde çözülmüştür. Konsantre HCl kullanılarak pH 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

% 2'lik Brom fenol mavisi;

0,1 g brom fenol mavisi 5 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

% 10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS) ;

5 g SDS 50 mL distile su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak çözülmüştür.

Yükleme tamponu;

1 M Tris - bazdan (pH 6,8) 12,5 mL, % 10'luk SDS'den 40 mL, gliserolden 20 mL, % 2'lik brom fenol mavisinden 2 mL ve % 5'lik 2-merkaptoetanolden 5 mL alınarak karıştırılmıştır. (Hazırlanan tampon koyu mavi renkte değil ise, renk oluşana kadar NaOH ilave edilir). Distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklanabilir.

2-merkaptoetanol'ün etkisi zamanla kaybolduğundan gerektiği zaman hazırlanan tampona aynı oranda ilave edilir.

Tris-Glisin elektrot tamponu (Yürütme tamponu) ;

3 g Tris-baz ve 14,4 g glisin az miktarda distile su içerisinde çözülmüştür ve konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8,5'e ayarlanmıştır. 1 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözümlenerek Tris-glisin çözeltisine ilave edilmiştir. Distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'da saklanabilmektedir. Tampon 2 - 3 kez kullanıldıktan sonra yenilenmelidir.

Commasie blue G-250 çözeltisi;

0,125 g commasie blue tartıldıktan sonra bir miktar distile su içerisinde çözülmüştür. Üzerine 200 mL metanol ve 35 mL asetik asit ilave edilerek distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Jel bu çözeltide bir gece bekletilmiştir.

1. yıkama çözeltisi;

Metanol; asetik asit; distile su (400; 70; 530 mL) oranlarında karıştırılır.

2. yıkama çözeltisi ;

Metanol; asetik asit; distile su (50; 70; 880 mL) oranlarında karıştırılmıştır. Son olarak jel % 10'luk gliserol çözeltisine aktarılmış ve jelin bu çözelti içinde normal boyutuna ulaşmış, hem daha iyi temizlenmesi, hem de kırılabilirliği azaltılması için bir gece bekletilmiştir.

Eğer yıkama çözeltisinde renk kaybolmuyorsa metanol, asetik asit ve distile su (400, 70, 530 mL oranlarında) karıştırılmalı ve 30 dakika daha bu çözeltide jel bekletilmelidir.

Tablo.3.4. % 10'luk ayırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme [Tek jel için (mL)]	Mini elektroforez (mL)	Büyük elektroforez (mL)
Distile su	2,550	11,475
Ayırma tamponu (pH 8,8)	1,660	7,500
% 30'luk akrilamid/bis acrilamid	2.200	9,900
Vakum altında degaze işlemi	10 dk	10 dk
TEMED	0,006	0,027
% 10'luk amonyum persülfat	0,043	0,195

Tablo.3.5. % 5'lik yoğunlaştırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme [Tek jel için (mL)]	Mini elektroforez	Büyük elektroforez
Distile su	0,965	5,80
Yoğunlaştırma tamponu (pH 8,8)	0,416	2,50
%30'luk akrilamid/bis acrilamid	0,278	1,67
Vakum altında degaze işlemi	10 dk	10 dk
TEMED	0,0017	0,10
% 10'luk amonyum persülfat	0,017	0,01

3.3.3. Bradford testi ile protein tayini

Uygun koşullar altında proteinlerin asidik ve bazik grupları organik boyaların disosiyasyon grupları ile etkileşerek renkli çökelekler oluştururlar. Bu bağlanma özelliğinden kantitatif analiz için yararlanılır. Bu boyalardan Orange G bağlanmaya karşı duyarsızken diğerleri örneğin Amido Black 10 B gibi boyalar başka dezavantajlara sahiptir.

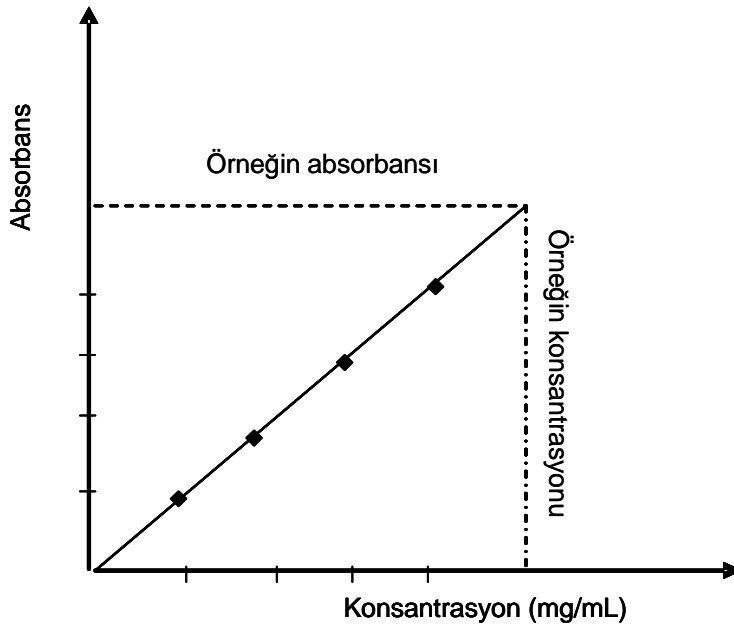
Bu yaklaşım Coomassie Brilliant Blue G-250 boya yöntemi olan Bradford'un (Bradford, M.M., 1976) geliştirilmesi ile popüler hale gelmiştir. Boyanın proteine bağlanması ile boyanın maksimum absorpsiyon değeri 465 nm ' den (kırmızı formu) 595 nm'ye (mavi formu) kayar. Bu boya stok solüsyon olarak ya fosforik asitle veya perklorik asit ile hazırlanır. Metot boyanın örneğe eklenmesi ile hızlı bir şekilde ve tek adımda yürür. 595 nm' de absorbans ölçülür. Bu deneyde standart protein çözeltileri, sığır serum albumini (BSA) kullanılarak hazırlanmış ve standart grafikleri çizilmiştir (Temizkan ve Arda 2004).

Stok Standart Protein Çözeltisi (BSA) ; 100 mg sığır serum albumin BSA, 100 mL 0,05 M fosfat tamponunda (pH 7,0) hazırlanmıştır. Kör tüpü (1 numaralı tüp) hariç bütün tüplere tabloda verilen miktarlarda (μL) BSA (Standart Serum Albumin) ilave edilmiştir. Bütün tüplere verilen miktarlarda Bradford çözeltisi ilave edilmiş ve oluşan rengin sabitlenmesi için 10 dakika beklenmiştir.

Tablo.3.6. Standart eğrinin çizimi için gerekli olan numune miktarları

Bileşikler Tüp No	1	2	3	4	5
1 mg/ml BSA (μL)	-	20	40	60	80
Bradford çözeltisi (μL)	1000	980	960	940	920
Toplam hacim (μL)	1000	1000	1000	1000	1000

595 nm'ye ayarlı spektrofotometrede 1 numaralı kör tüpüne karşı 2, 3, 4, 5.tüplerin absorbansları okunmuş ve kaydedilmiştir. 1, 2, 3, 4 ve 5. ve tüpler için okunulan absorbans değerleri ile standart grafiği çizilmiştir. Aynı işlemler BSA standartı yerine kabak çekirdeği enzimleri konulmak üzere tekrar yapılmış ve yukarıda elde edilen standart grafiği üzerinde karşılık geldikleri noktalar bulunarak kantitatif protein tayini yapılmıştır. Sonuçları $\mu\text{L} / \text{mL}$ cinsinden sunulmuştur.



Şekil 3.3. Bradford yönteminin standart grafiği

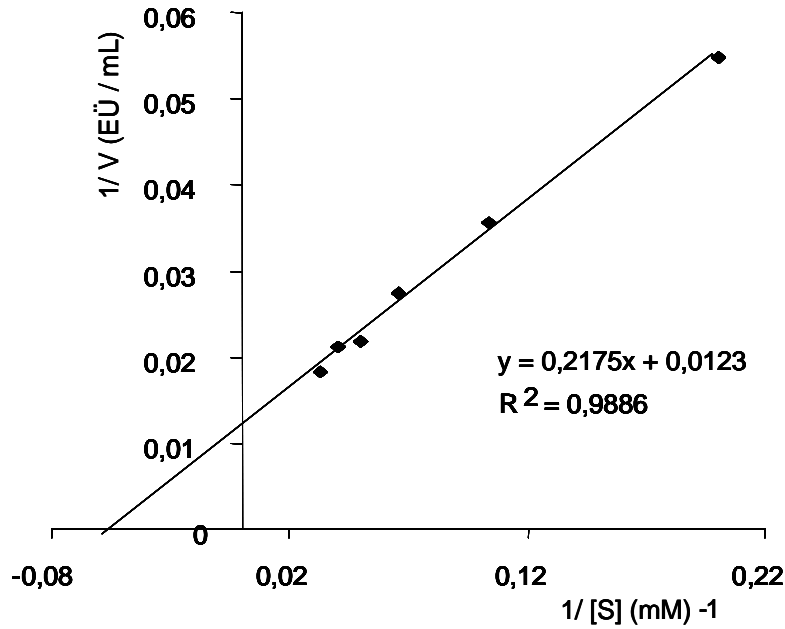
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Katalaz Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

4.1.1. Enzim homojenatı

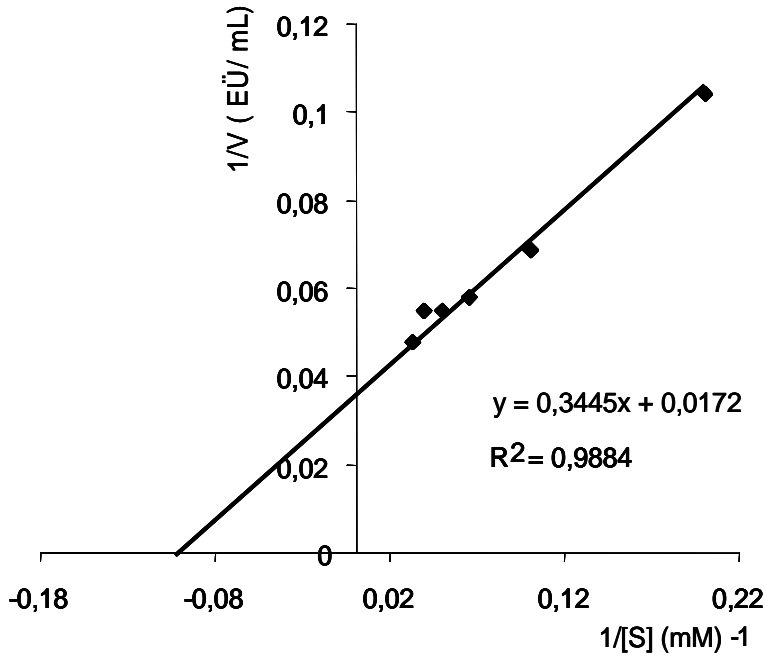
0,5 g PVP içeren tampon içerisinde blendırda öğütülen kabak çekirdekleri süzgeç kağıdından süzildükten sonra santrifüj edilmiş ve elde edilen süpertantların çok yoğun ve süt rengi bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden aynı şartlarda enzim birkaç kez daha santrifüj edilmiştir.

4.1.2. Kabak çekirdeklerinin aktivite ölçümleri



Şekil 4.1. Bal kabağı çekireği (*Cucurbita maxima*) için 1/V – 1/[S] grafiği

Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) için 2,5 mM - 30 mM arasında değişen H_2O_2 konsantrasyonları kullanılarak 240 nm'de 50 μ L enzim homojenatı kullanılarak aktivite ölçümü yapılmış ve aynı işlem üç kez tekrarlandıktan sonra çizilen $1/[S] - 1/V$ grafiği Şekil 4.1. de sunulmuştur. Bu grafiklerden $V_{max}=81,300$ EÜ/mL ve $K_m = 17,68$ mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) için $1/V - 1/[S]$ grafiği

Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) için 2,5 mM - 30 mM arasında değişen H_2O_2 konsantrasyonları kullanılarak 240 nm'de 50 μ L enzim homojenatı ile yapılan çalışmada öncelikle $[S] - V$ grafiği çizilmiş oradan elde edilen datalardan yararlanılarak çizilen $1/[S] - 1/V$ grafiği Şekil 4.2.de sunulmuştur. Bu grafikten $V_{max} = 58,139$ EÜ /mL ve $K_m = 20,029$ mM olarak hesaplanmıştır.

4.1.3. Katalaz enziminin %30 amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz sonucu saflaştırma sonuçları

Her iki kabak çekirdeğinden de ekstrakte edilen katalaz enziminin daha sonraki saflaştırma işlemleri olan % 30'luk amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz

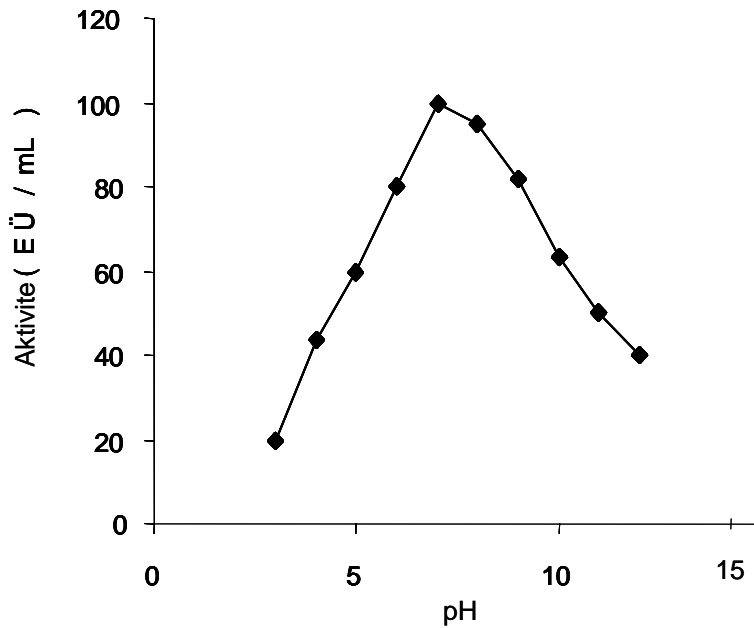
işlemleri Bölüm 3.2.3.'deki gibi yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.1.'de sunulmuştur. Buna göre enzimin diyaliz işleminden sonra da aktif olduğu görülmüştür.

Tablo.4.1. Katalaz için %30 amonyum çöktürme-diyaliz ve saflaştırma işlemleri sonrası aktivite

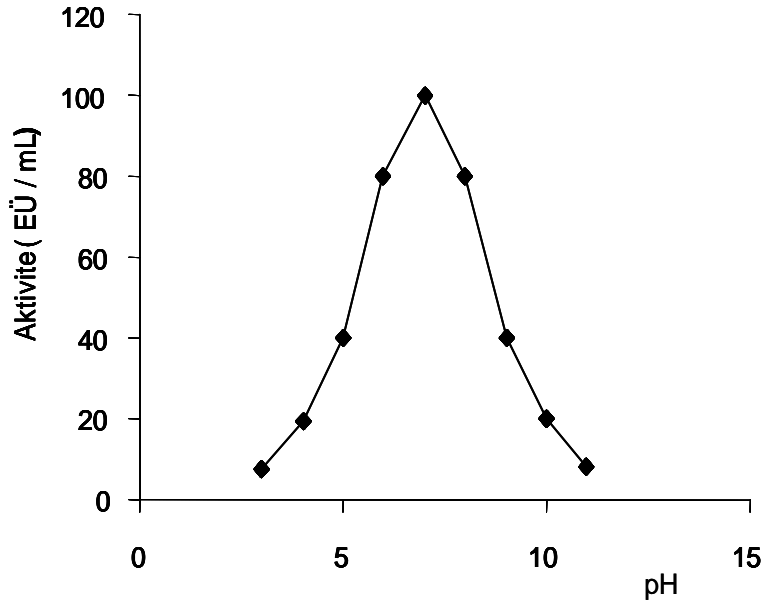
Saflaştırma basamakları	Bağlı aktivite(240 nm)	
	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Cucurbita moschata</i>
Homojenat	0,0356	0,0273
%30 Amonyum sülfat	0,0877	0,0362
Diyaliz	0,0180	0,0183

4.1.4.Katalaz enzimi üzerine pH etkisi

Kabak çekirdeklerinde bulunan katalaz enzimi üzerinde pH etkisi incelenmek üzere 3,0 – 9,0 arasındaki pH'larda tamponlar ile çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.de verilmiştir. Her iki çekirdek için de aynı işlemler üç kez tekrarlanmış ve şekillerden de görüldüğü gibi *Cucurbita maxima* için optimum pH 6,8 iken, *Cucurbita moschata* için optimum pH 7,0 olarak tespit edilmiştir.



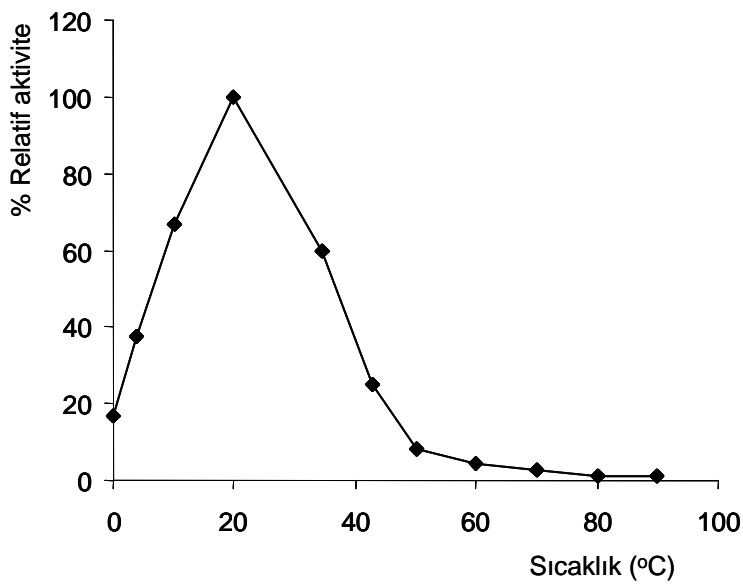
Şekil 4.3.Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) için pH grafiği



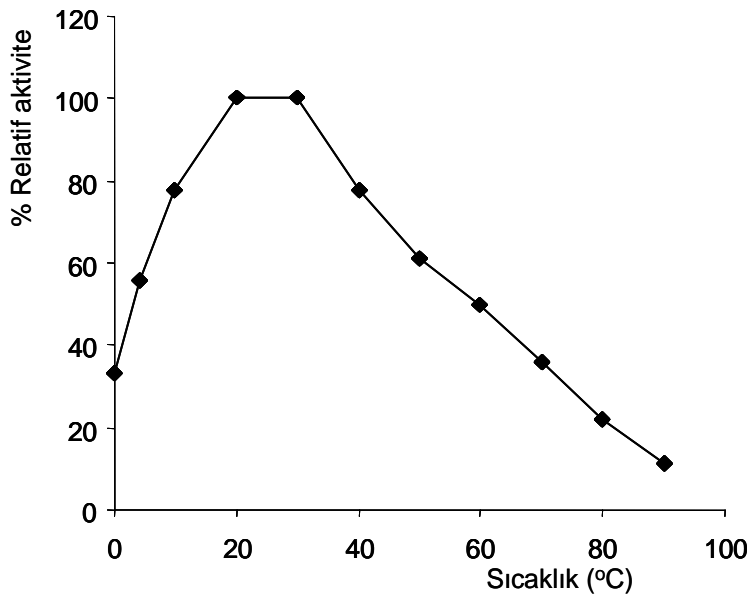
Şekil 4.4 Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) için pH grafiği

4.1.5. Katalaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi

Katalaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 0-90 °C arasındaki sıcaklıklarda çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4.5. ve Şekil 4.6. 'da verilmiştir. Aynı işlemler üç kez tekrarlanmış ve *Cucurbita moschata* için optimum sıcaklık 20 °C iken *Cucurbita maxima* için 30 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) üzerine sıcaklığın etkisi



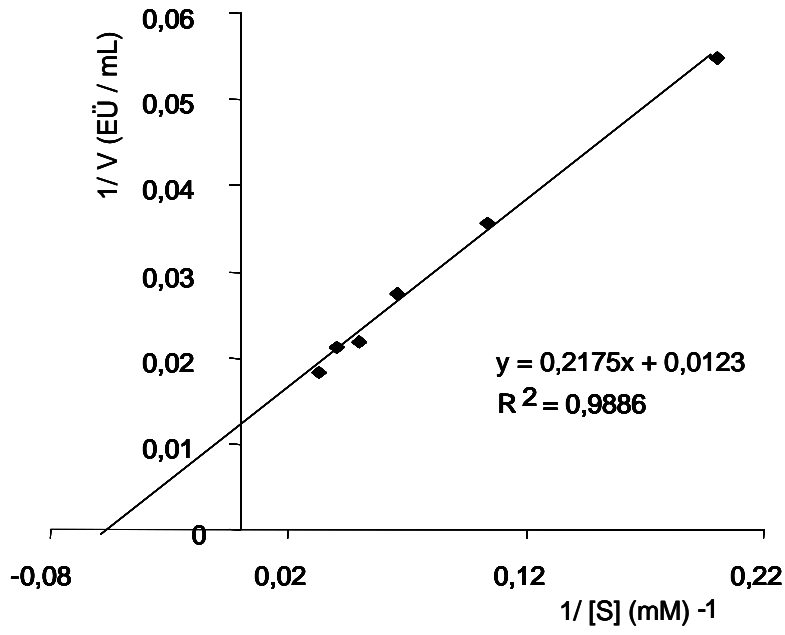
Şekil 4.6 Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) üzerine sıcaklığın etkisi

4.1.6. Katalaz enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

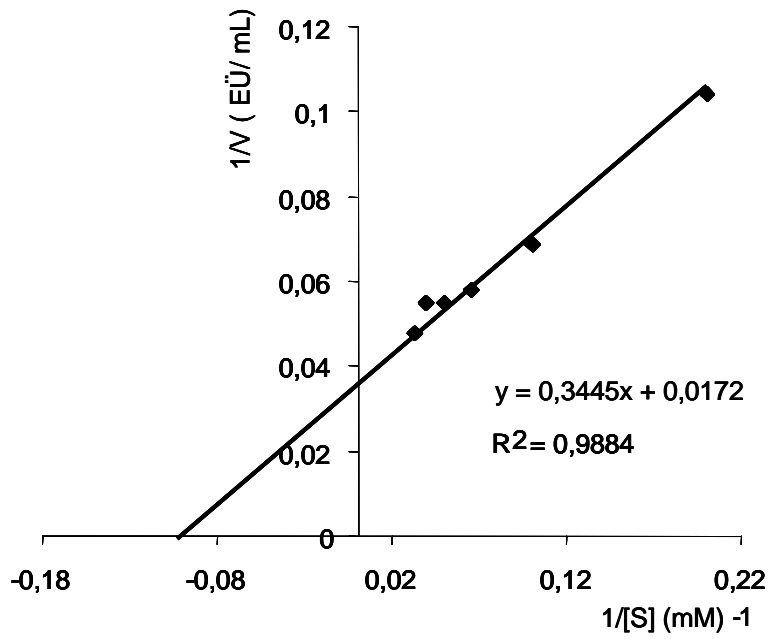
Katalaz enzimin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar, 40 mM stok hidrojen peroksit çözeltisi ile yapılmıştır. Katalaz enzimi konsantrasyonu sabit tutularak, hidrojen peroksit için 6 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılmış ve aynı işlemler üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 4.7. ve Şekil.4.8.'de görüldüğü gibi Lineweaver–Burk grafikleri çizilmiş ve bu grafikten elde edilen doğru denkleminden yararlanarak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuş ve sonuçlar Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo.4.2. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) için K_m ve V_{max} değerleri

Substrat	Optimum pH	Optimum T(°C)	K_m (M)	V_{max} (EÜ/mL)
H ₂ O ₂	7,0	25	0,01768 ± 0,028	81,300 ± 0,016



Şekil 4.7. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) için $1/V - 1/[S]$



Şekil 4.8. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) için $1/V - 1/[S]$ grafiği

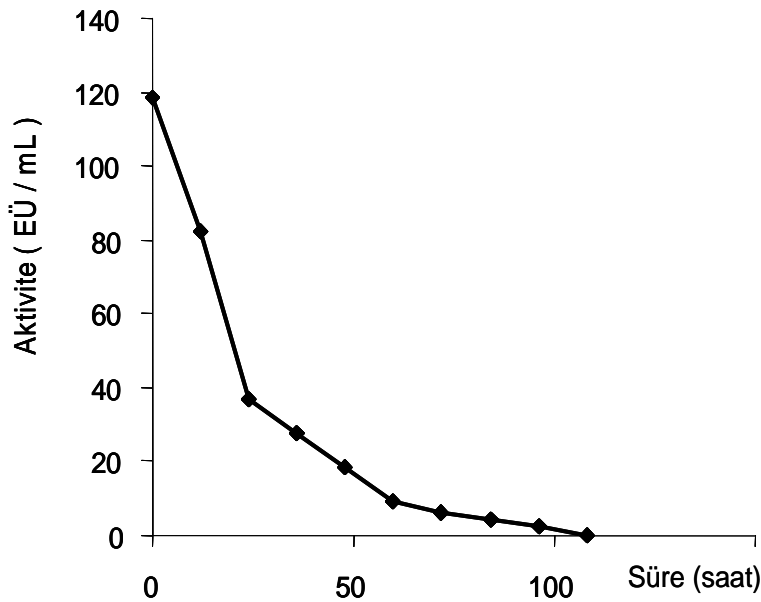
Tablo.4.3. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) için K_m ve V_{max} değerleri

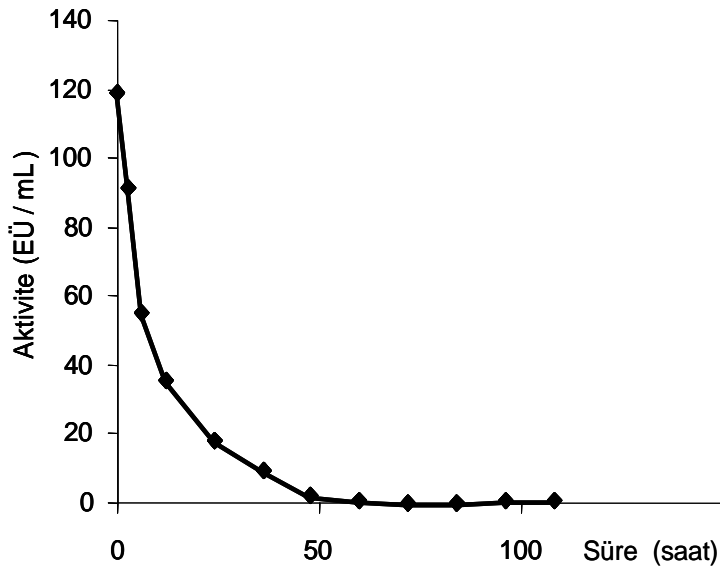
Substrat	Optimum pH	OptimumT(°C)	K_m (M)	V_{max} (EÜ/mL)
H ₂ O ₂	7,0	25	0,02009 ± 0,022	58,139 ± 0,011

Bu sonuçlara göre K_m ve V_{max} değerleri her iki kabak çekirdeği için birbirine yakın olarak ve sırasıyla *Cucurbita maxima* için $K_m = 0,017$ M ve $V_{max} = 81,30,02$ M; *Cucurbita moschata* için $K_m = 0,020$ M ve $V_{max} = 58,1$ EÜ/mL olarak bulunmuştur

4.1.7 Katalaz enziminin depolanma kararlılığının belirlenmesi

Kabak çekirdeklerinde (*Cucurbita moschata* ve *maxima*) bulunan katalaz enzimi için bir hafta boyunca 12 saat aralıklarla uygun ortam ve koşullar sağlanarak aktivite ölçümleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9. 'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre katalaz enzimi 4-5 gün sonunda aktivitelerini yitirdikleri gözlenmiştir.

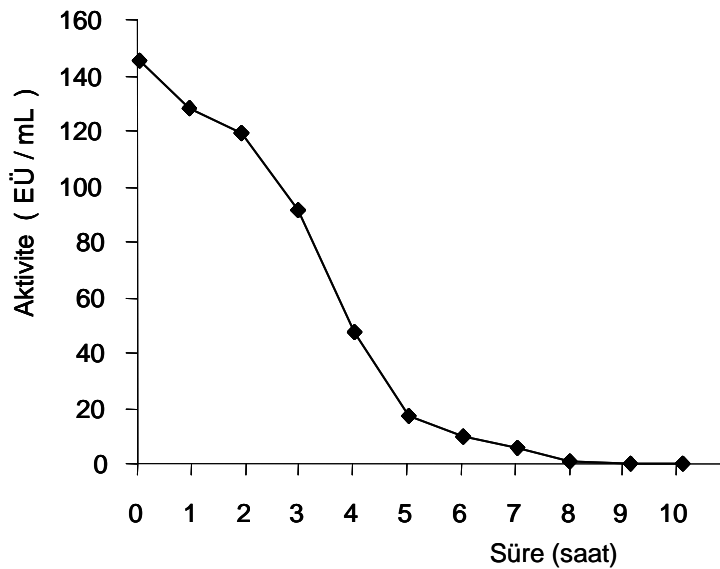
Şekil 4.9. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı için depolanma kararlılığı



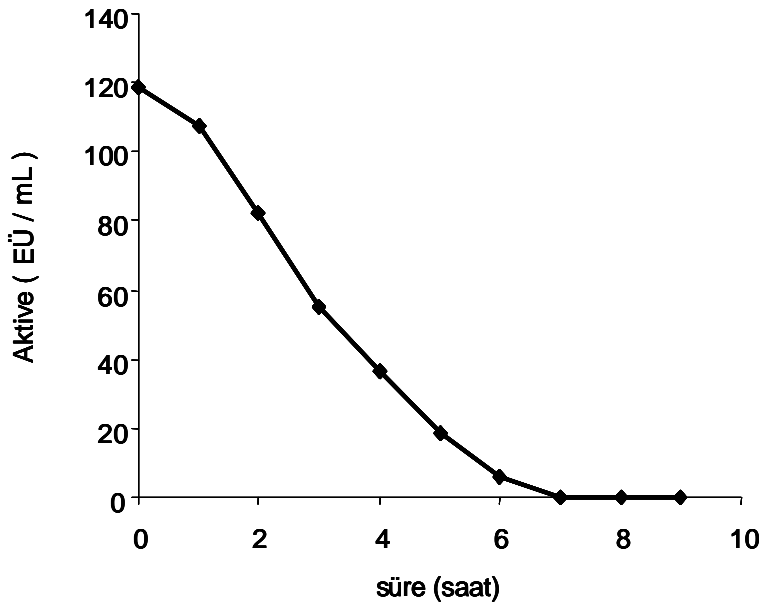
Şekil 4.10. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı için depolanma kararlılığı

4.1.8. Katalaz enziminin oda sıcaklığındaki bozunma hızı

Her iki kabak çekirdeği katalazı için oda sıcaklığında, optimum pH da 15 mM substrat çözeltisi kullanılarak birer saat aralıklarla 10 saat boyunca 240 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 4.11. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı için bozunma hızı

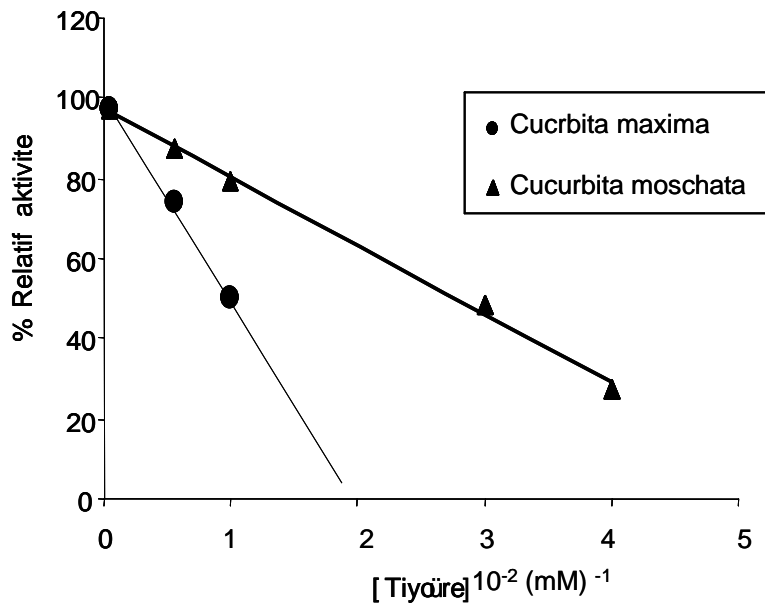


Şekil 4.12. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı için bozunma hızı

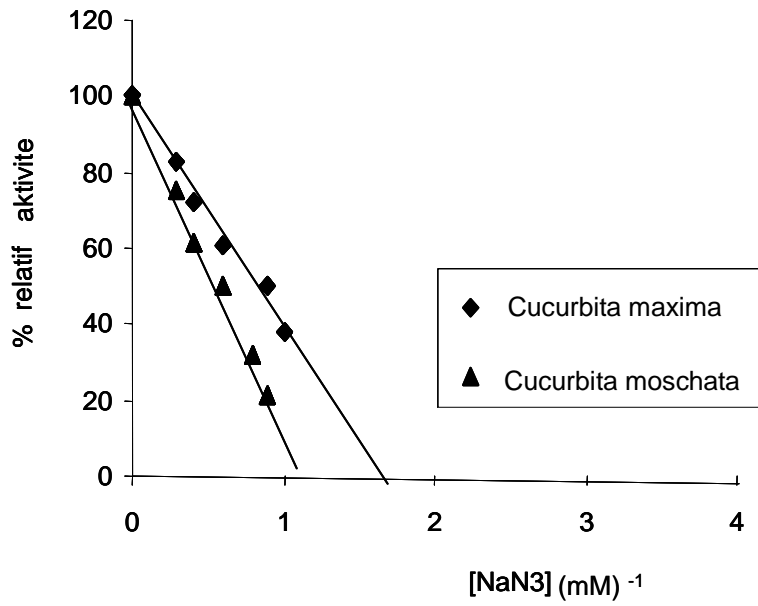
Cucurbita maxima ve *Cucurbita moschata* çekirdeklerinden elde edilen katalaz enziminin kararlılığının 5-6 saat sonra minimuma indiği gözlenmiştir.

4.1.9. Katalaz enzimi için inhibitörlerin etkisinin incelenmesi

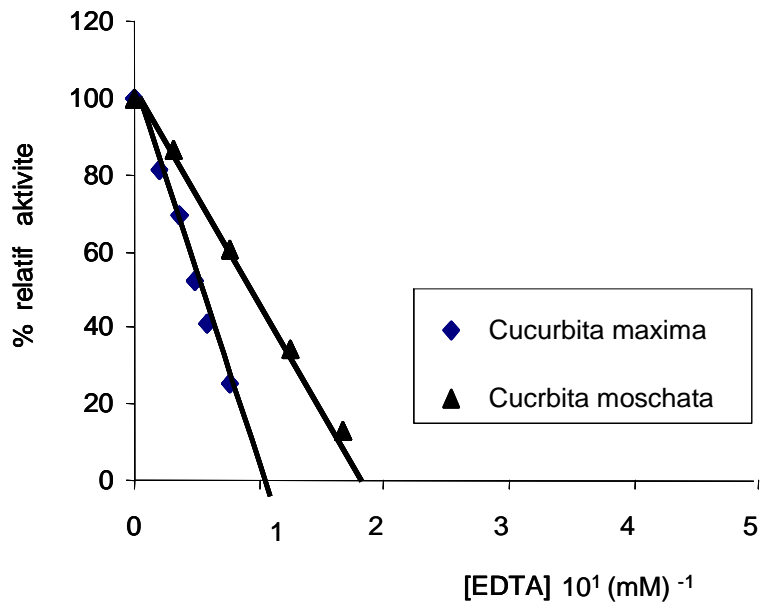
Katalaz üzerine amino asitlerin, tiyoüre, sodyum azit, EDTA'nın etkileri incelenmiş, I_{50} değerleri hesaplanmış ve sonuçlar grafikler halinde sunulmuştur. Elde edilen grafiklerden yararlanarak başlangıçtaki bağıl aktiviteyi % 50 azaltan inhibitör konsantrasyonları bulunmuş ve I_{50} (mM) değerleri toplu halde her iki kabak çekirdeği içinde Tablo 4.4.'de verilmiştir.



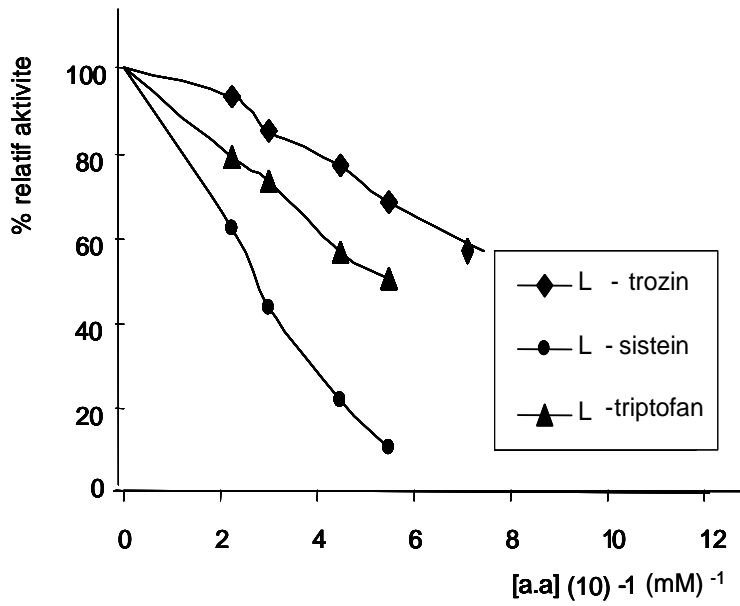
Şekil 4.13. katalaz enzimi üzerine tiyüürenin etkisi



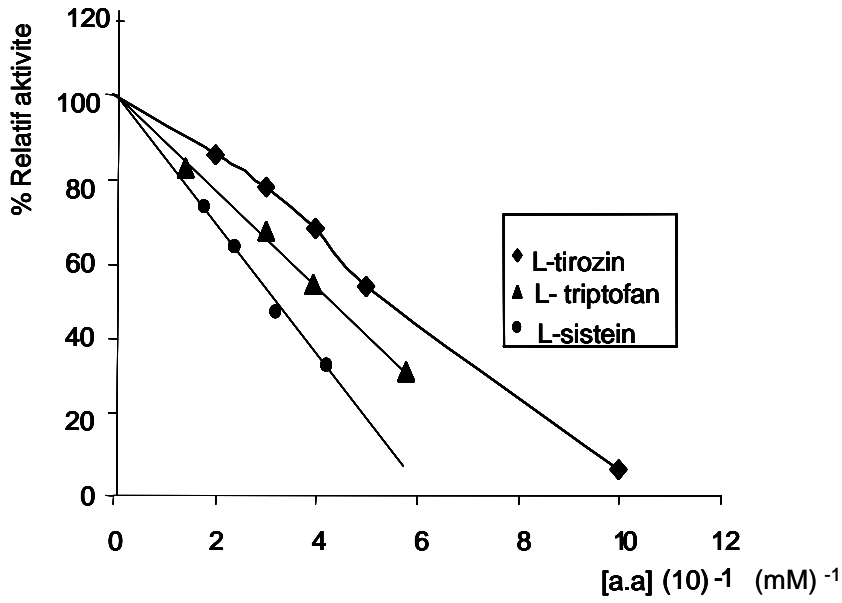
Şekil 4.14. Katalaz enzimi üzerine sodyum azitin etkisi



Şekil 4.15. Katalaz enzimi üzerine EDTA'nın etkisi



Şekil 4.16. Bal kabağı çekirdeği (Cucurbita maxima) katalazı üzerine amino asitlerin etkisi



Şekil 4.17.Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı üzerine amino asitlerin etkisi

Tablo 4.4. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) ve kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) üzerine inhibitörlerin etkisi ve I₅₀ değerleri

Inhibitör	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Cucurbita moschata</i>
	I ₅₀ (mM)	I ₅₀ (mM)
EDTA	3,00	5,00
Sodyum azit	0,90	0,60
Tiyoüre	0,01	0,30
L-sistein	0,40	0,90
Tirozin	0,50	0,30
L-Triptofan	0,40	0,30
Sodyum klorür	5,00	5,00
Civa	0,02	0,02

Tablo 4.4.'den de görüldüğü gibi I₅₀ değeri yani başlangıç substrat konsantrasyonunu % 50 azaltan inhibitör miktarları sekiz ayrı madde için hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre I₅₀ değeri en küçük olan madde katalaz enzimi üzerinde en fazla inhibisyona sebep olmuştur. Dolayısıyla elde edilen verilere göre *Cucurbita maxima* katalazı için

tiyoürenin, *Cucurbita moschata* katalazı için ise civanın en fazla inhibisyona sebep olduğu gözlemlenmiştir.

Kabak çekirdeklerindeki katalaz için I_{50} değerleri hesaplandıktan sonra katalaz enzimi üzerine metallerin (demir (III) klorür, potasyum siyanür, EDTA, çinko sülfat, civa sülfat, kalsiyum klorür, lityum klorür, magnezyum klorür, kobalt klorürün) etkisi incelenmiştir.

Tablo 4.5. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) ve kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı üzerine metallerin etkisi

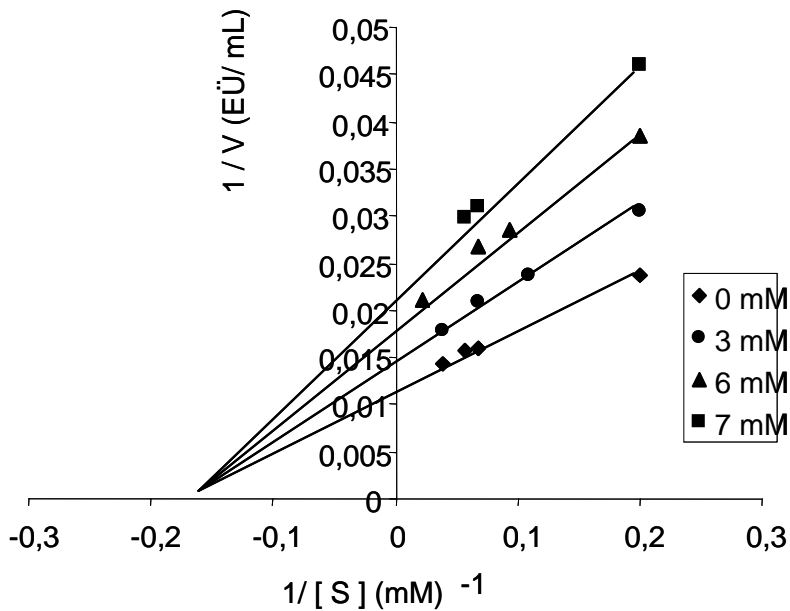
Metaller(5 mM)	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Cucurbita moschata</i>
Siyanür	% 75 İnhibisyon	% 80 İnhibisyon
Demir	% 25 İnhibisyon	% 25 İnhibisyon
Mangan	% 36 İnhibisyon	% 38 İnhibisyon
Çinko	% 7,5 İnhibisyon	% 5 İnhibisyon
Civa	% 42 İnhibisyon	% 37 İnhibisyon
Bakır	% 2,5 Aktivasyon	% 2,5 Aktivasyon
Magnezyum	% 25 Aktivasyon	% 25 Aktivasyon
Lityum	% 25 Aktivasyon	% 15 Aktivasyon
Kalsiyum	% 60 Aktivasyon	% 57,5 Aktivasyon
Kobalt	% 50 Aktivasyon	% 45 Aktivasyon

Öncelikle metal çözeltileri için stoklar hazırlanmış ve daha sonra farklı metal konsantrasyonlarının enzim üzerindeki etkileri incelenmiştir.

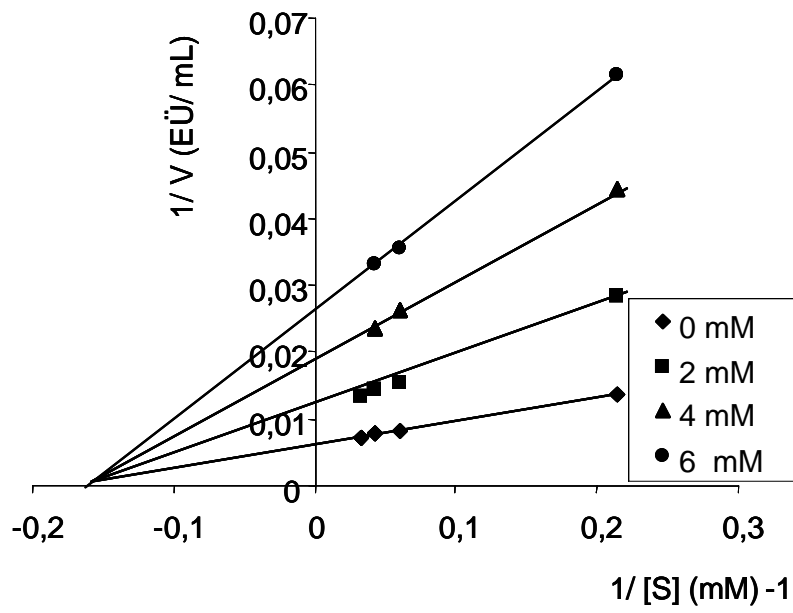
Elde edilen bu verilere göre 5 mM metal konsantrasyonunda kabak çekirdeklerindeki katalaz enzimi üzerinde metal iyonlarının farklı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Tablo 4.5.'de de görüldüğü üzere kabak çekirdeği katalazına demir, siyanür, mangan, çinko ve cıvanın farklı oranlarda inhibisyon etki gösterirken, magnezyum, lityum ve kobaltın ise farklı oranlarda aktivasyon etkisi gösterdiği gözlenmiştir. Özellikle siyanürün enzimi en fazla inhibe ettiği, kalsiyumunda en fazla aktive ettiği belirlenmiştir.

4.1.10. Katalaz enzimi inhibitörlerinin K_I değerlerinin hesaplanması

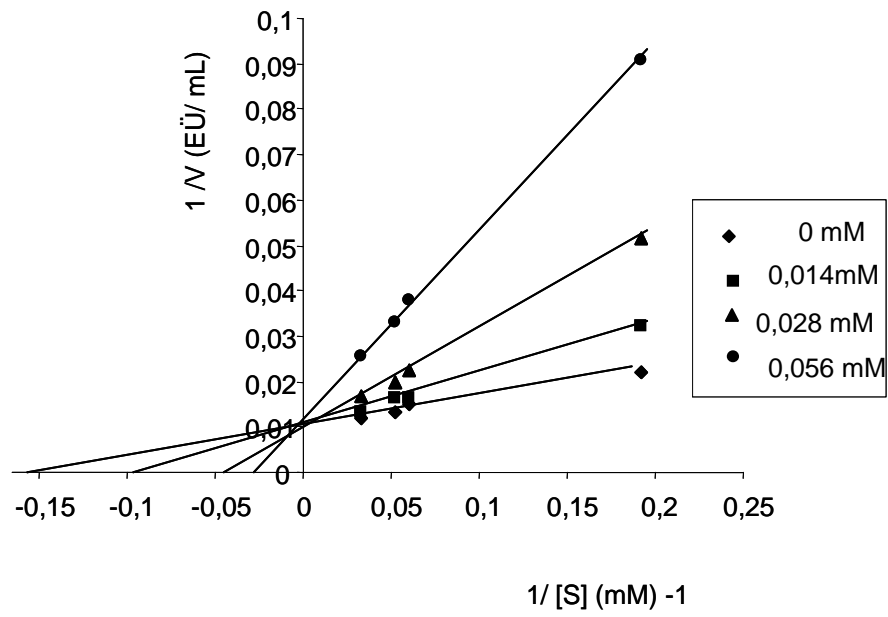
Katalaz enzimi için spesifik olan inhibitörlerin her iki kabak çekirdeği için kinetik çalışmaları yapılmış ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitörlerin etki türleri ve K_I değerleri hesaplanmış ve Tablo 4.6.'da sunulmuştur.



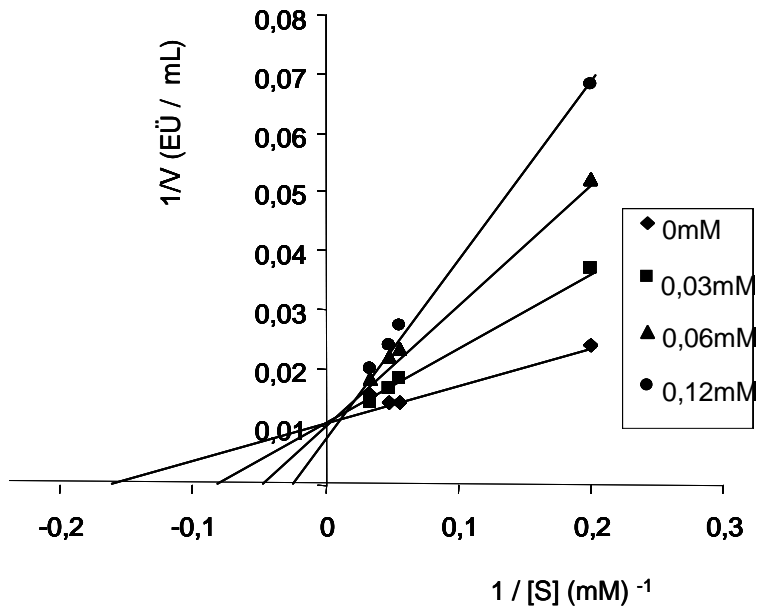
Şekil 4.18. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı üzerine KCN etkisi ve K_I değeri



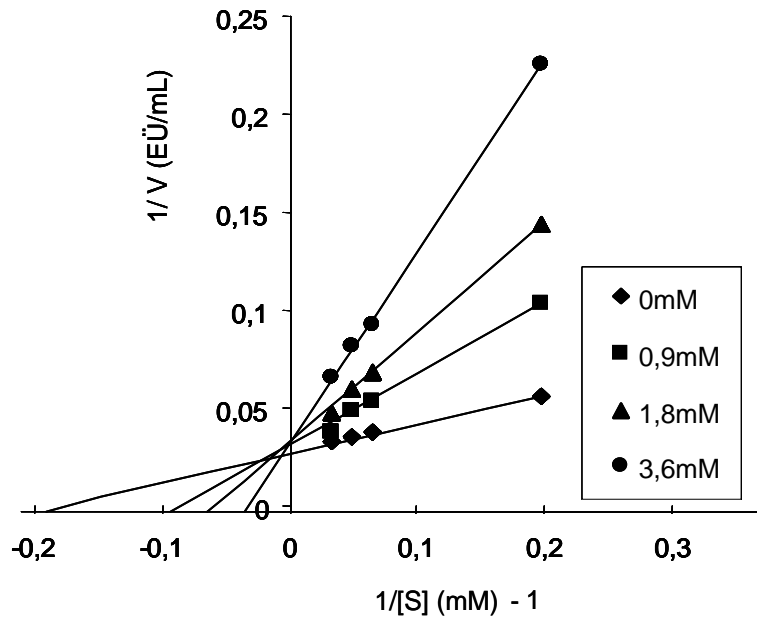
Şekil 4.19. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı üzerine KCN etkisi ve K_I değeri



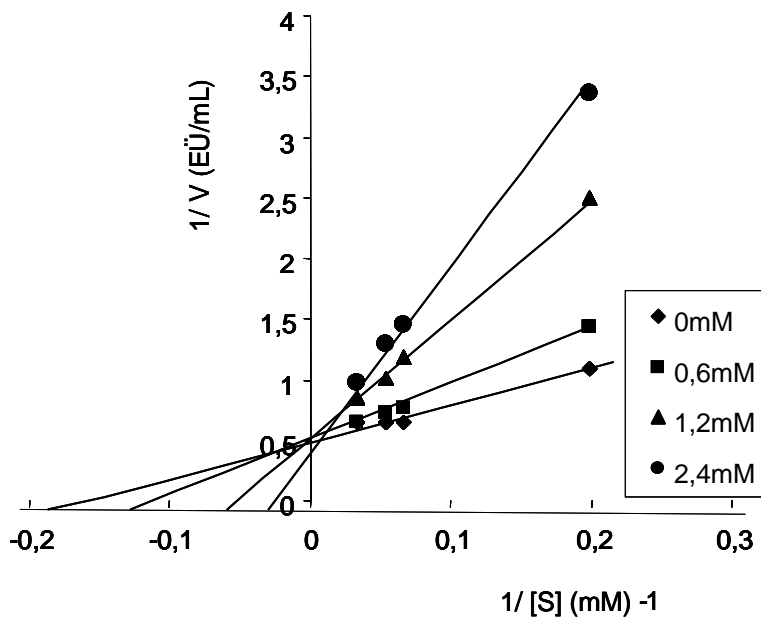
Şekil 4.20. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı üzerine tiyüüre etkisi ve K_I değeri



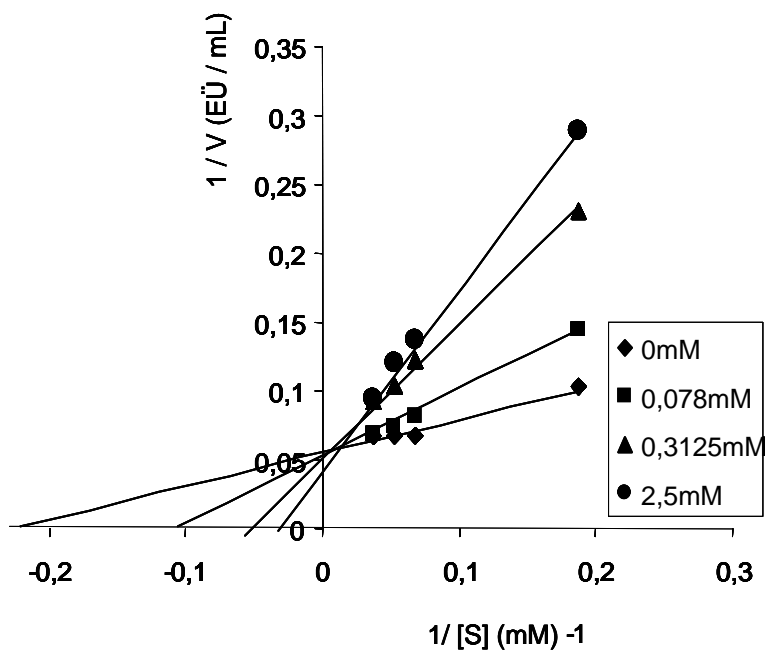
Şekil 4.21. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı üzerine tiyürenin etkisi ve K_I değeri



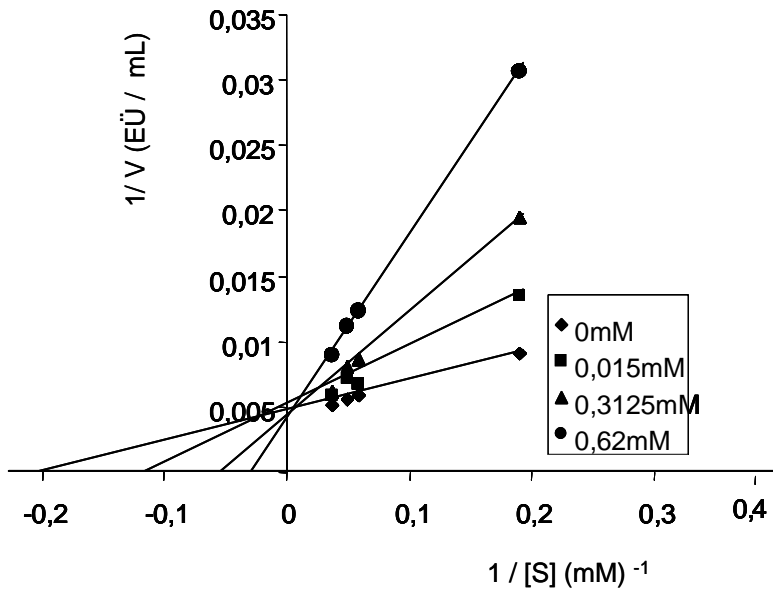
Şekil 4.22. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazına sodyum azitin etkisi ve K_I değeri



Şekil 4.23. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı üzerine sodyum azitin etkisi ve K_I değeri



Şekil 4.24. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı üzerine $FeCl_3$ etkisi ve K_I değeri



Şekil 4.25. Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı üzerine FeCl_3 etkisi ve K_I değeri

Tablo 4.6. Bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) ve kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazları üzerine bazı bileşiklerin etkisi ve K_I değerleri

İnhibitör	<i>Cucurbita maxima</i> K_I (M)	<i>Cucurbita moschata</i> K_I (M)
Demir	$6,32 \times 10^{-5} \pm 0,038$ Yarışmalı	$6,32 \times 10^{-5} \pm 0,035$ Yarışmalı
Azit	$6,60 \times 10^{-4} \pm 0,041$ Yarışmalı	$6,60 \times 10^{-4} \pm 0,04$ Yarışmalı
Tiyöüre	$9,34 \times 10^{-6} \pm 0,033$ Yarışmalı	$4,44 \times 10^{-5} \pm 0,032$ Yarışmalı
Siyanür	$2,42 \times 10^{-3} \pm 0,011$ Yarışmasız	$2,171 \times 10^{-3} \pm 0,031$ Yarışmasız
Civa	$2,26 \times 10^{-5} \pm 0,019$ Yarışmasız	$2,43 \times 10^{-5} \pm 0,014$ Yarışmasız

Tablodaki verilere göre demir, azit ve tiyöürenin her iki kabak çekirdeği için de yarışmalı inhibitörler ve K_I değerlerinin yaklaşık 6 M olduğu gözlenmiştir. Buna karşın siyanür ve civanın ise her iki kabak çekirdeği için yarışmasız inhibitörler olduğu ve K_I değerlerinin yaklaşık 2 M olduğu hesaplanmıştır.

4.2. Katalaz enzimi için saflaştırma metotları sonuçları

Her iki kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimi uygun tampon çözeltiler kullanılarak ekstrakte edilmiş ve Bölüm 3.3.'de anlatıldığı gibi saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.2.1.'de sunulmuştur.

4.2.1. Katalaz enzimi için jel kolon kromatografisi sonuçları

Enzimleri saflaştırmada kullanılan en yaygın yöntemlerden biri de jel kolon kromatografisidir.

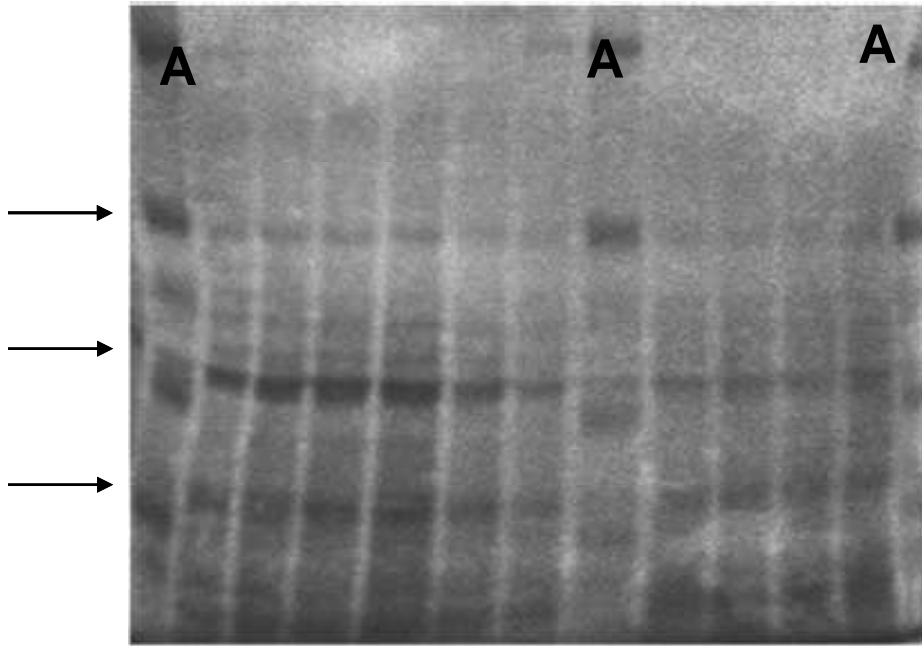
Bu çalışmada her iki kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimi Tablo 4.7.'deki işlemlere maruz tutularak bağıl aktiviteleri hidrojen peroksit substratı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.7. Katalaz enzimi için bağıl aktivite değerleri

Saflaştırma basamakları	Bağıl aktivite(240 nm)	
	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Cucurbita moschata</i>
Homojenat	0,0356	0,0273
%30 Amonyum sülfat	0,0877	0,0362
Diyaliz	0,0180	0,0183
Kolon kromatografisi	0,02996	0,0382

Yapılan ölçümler sonucu kabak çekirdeklerinden elde edilen katalaz eziminlerinin jel kolon kromatografisinden sonraki aktiviteleri Tablo 4.7.'de verilmiştir.

4.2.2. Katalaz enzimi için elektroforez sonuçları ve molekül ağırlığı tayini

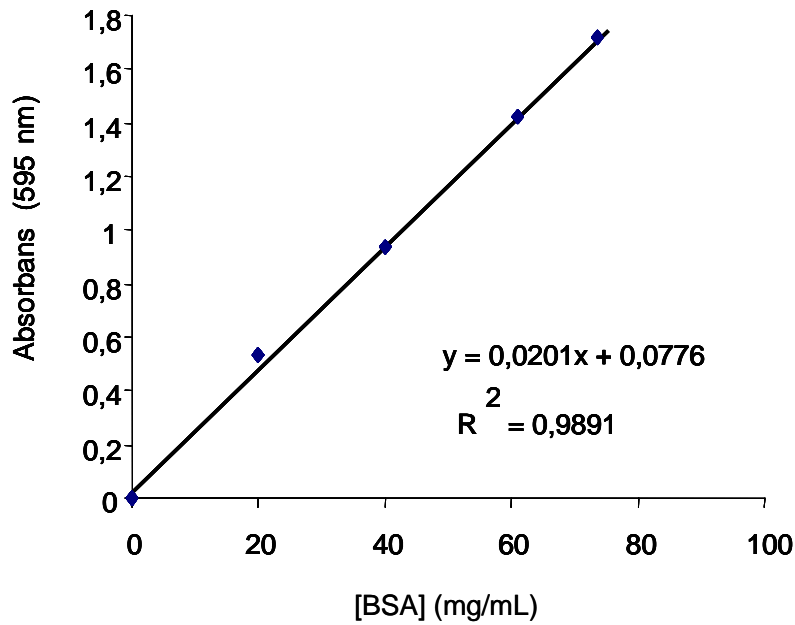


Şekil 4.26. SDS-PAGE jeli (A = marker)

Kabak çekideklerinden (*Cucurbita maxima* ve *Cucurbita moschata*) elde edilen katalaz enziminin büyük elektroforez cihazı ile saflaştırılması sonucu yukarıdaki Şekil 4.21.'de gözlenen jel elde edilmiştir.

Buna göre marker'a denk gelen protein miktarı her iki kabak çekirdeği için de belirlenmiştir. Kabak çekirdeklerinden elde edilen katalaz enzimleri için jel üzerinde 60 ile 8 kDa arasında değişen üç bant gözlenmiştir. Bunlardan en belirginini 45 kDa dolaylarında olduğu gözlemlenmiştir.

4.2.3. Bradford yöntemi ile protein tayini sonuçları



Şekil 4.27. BSA standart grafiği

Bu standart protein grafiğinde elde edilen $y=ax+b$ ($y=0,0201+0,0776$) denkleminde yararlanarak elimizde bulunan protein miktarı hesaplanılmıştır.

Bunun için kabak çekirdeklerinden (*Cucurbita maxima ve moschata*) elde edilen enzim homojenatları Bradford çözeltileri ile muamele edildikten sonra 595 nm'de gözlenen absorbans değerleri denkleme yerine konulmuştur.

Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı için 16,3125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ve bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı için 19,4166 $\mu\text{L}/\text{mL}$ protein olduğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Sakarya'da yetişen iki farklı türde kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimi saflaştırılarak, karakterize edilip çeşitli kinetik özellikleri incelenmiştir. Katalaz enziminin aktivite tayini 25 °C'de spektrofotometrede Havir ve Michale'nin (1987) Luck'e dayandırdığı metoda göre yapılmıştır. Aktivitelerin belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik yöntemin esası hidrojen peroksitin katalaz varlığında su ve oksijene dönüşümüne dayanmaktadır.

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti suya dönüştürürken açığa bir mol oksijen çıkmaktadır. Yapılan bu çalışmada hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümü katalaz enzimi yardımı ile katalizlenirken meydana gelen absorbans azalması 240 nm'de ölçülerek aktivite tayin yapılmıştır. İki farklı tür kabak çekirdeğinden katalaz enzimi öncelikle kısmi olarak saflaştırılmış ve saflaştırma sırasında üç basamak kullanılmıştır. Bunlar : homojenat hazırlanması, % 30 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizdir. Tüm saflaştırma işlemleri yapılırken +4 °C'de buz banyosu kullanılarak sıcaklık kontrol altında tutulmuştur.

Elde edilen homojenatların sırasıyla % 0-10 , % 10-20, % 20-30 ,% 30-40, % 40-50 , % 50-60 amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak katalaz enziminin % 20-40 arasında en fazla çöktüğü belirlenmiştir. Daha sonra enzim homojenatı 12 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızıklar uzaklaştırılmıştır.

İki farklı tür kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimi için yedi farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen datalarla $1/V - 1/[S]$ Linewear-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Linewear-Burk grafikleri hemen hemen tüm enzim çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. İki farklı kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimleri için *Cucurbita maxima* katalazı için K_m değeri 0,01768 M; V_{max} değeri ise 81,300 EÜ/mL olarak elde

edilmiştir. *Cucurbita moschat* katalazı için ise K_m değeri 0,020029 M; V_{max} değeri ise 58,139 EÜ/mL olarak elde edilmiştir. Gülçin (2002) tarafından yapılan ısırgandan (*Urtica dioica*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için K_m değeri 0,00217 M ve V_{max} 567,73 EÜ/mL; Köksal (2003) tarafından yapılan kara lahanadan (*Brassica oleracea L. Var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için K_m değeri 0,00159 M ve V_{max} 588,2 EÜ/mL; Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (*Eruca sativa*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için K_m değerini 0,00625M; Havir ve arkadaşları (*Nicotina Sylvestis*) katalazı için K_m değerini 0,0057 M, Kendall ve arkadaşları arpa yaprakları için yarı maksimum aktivite değerini 0,0018 M olarak rapor etmişlerdir .

İki farklı tür kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacı ile pH 3,0-9,0 aralığında pH'lar ile çalışılmıştır. pH 5,0-8,0 arasındakiler 0,2 M'lık fosfat tamponu; pH 7,3-9,0 arasındakiler ise 0,2 M'lık Tris/HCl tamponları kullanılarak hazırlanmıştır. Hidrojen peroksit substratı kullanılarak 240 nm'de aktivite ölçümleri yapılmış ve iki farklı kabak çekirdeğindeki katalaz enzimi için optimum pH 6,8 ve 7,0 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, Gülçin (2002) tarafından yapılan ısırgandan (*Urtica dioica*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için pH 7,0 ve Köksal (2003) tarafından yapılan kara lahanadan (*Brassica oleracea L. Var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için pH 7,8 olarak bulunan sonuçlar ile uygunluk göstermiştir.

İki farklı tür kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile 0-80°C aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Çalışmamızın bu aşaması gerçekleştirilirken diyaliz sonrası elde edilen en ideal substrat konsantrasyonu ve optimum pH kullanılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesi sırasında istenilen sıcaklıklar buz banyosu veya sıcak su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık 25 °C olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, Gülçin (2002) tarafından yapılan ısırgandan (*Urtica dioica*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için T 20 °C; Köksal (2003) tarafından yapılan kara lahanadan (*Brassica oleracea L. Var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için T 20 °C; Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (*Eruca sativa*) kısmi saflaştırılan katalaz için T 30 °C olarak bulunan katalaz enzimleri ile uygunluk içerisindedir.

Kabak çekirdeklerinden elde edilen katalaz enzimi üzerine L-sistein, L-tirozin, triptofan, tiyoüre, sodyum azid, EDTA ve civanın etkisi incelenmiş ve başlangıçtaki enzim aktivitesini % 50'ye düşüren inhibitör konsantrasyonları Tablo.4.4.'de sunulmuştur. Ayrıca kabak çekirdeklerinden elde edilen katalaz enzimi üzerine metallerin etkisi incelenmiş ve demir, siyanür, bakır, mangan, çinkonun enzimi inhibe ettiği; kobalt, kalsiyum, magnezyum ve lityumun ise enzimi aktive ettiği gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo.4.5.'de sunulmuştur.

İki farklı tür kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimi için demir, sodium azit, tiyoüre, siyanür ve civanın inhibisyon türünü ve K_I değerlerini belirlemek amacı ile bir dizi çalışma yapılmış ve her bir bileşik için Linewear-Burk grafikleri çizilerek K_I değerleri hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo.4.6.'da sunulmuştur. Elde edilen veriler neticesinde demir, azit ve tiyoürenin her iki kabak çekirdeği için de yarışmalı inhibitörler ve K_I değerlerinin yaklaşık 6 M olduğu gözlenmiştir. Buna karşın siyanür ve civanın ise her iki kabak çekirdeği için yarışmasız inhibitörler olduğu ve K_I değerlerinin yaklaşık 2 M olduğu hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadın (*Eruca sativa*) kısmi saflaştırılan katalaz için elde edilen sonuçlar ile uygunluk göstermektedir.

Saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim homojenatlarındaki protein miktarları kantitatif olarak Bradford yöntemi (Bradford 1976) ile tayin edilmiştir. Bu çalışmada diyaliz sonrası elde edilen enzimdeki protein miktarının tespiti için bu yöntem kullanılmış ve bal kabağı çekirdeği (*Cucurbita maxima*) katalazı için protein miktarı 19,4166 $\mu\text{L} / \text{mL}$ ve kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) katalazı için protein miktarı 16,3125 $\mu\text{L} / \text{mL}$ olarak tespit edilmiştir.

İki farklı kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimlerinin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile SDS-PAGE elektroforezi uygulanmıştır. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana kuyucuklara uygulanır ve elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sonrasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilir. Yapılan bu çalışmada SDS-PAGE sonucu elde edilen jelden kabak çekirdeklerindeki katalaz enziminin molekül ağırlıkları belirlendi. Her

iki kabak çekirdeği katalazı için jel üzerinde 60 ile 8 kDa arasında değişen üç bant gözlemlendi. Bu bantlardan en belirgin olanı 45 kDa civarında teşekkül etmiştir. Bitkisel kaynaklarda bulunan katalaz enzimi dört hem içeren alt birimlerden oluşur ve alt birimlerin moleköl ağırlıkları sırası ile 54 ve 59 kDa arasında değiştii bilinmektedir (Eising and Trelease 1990). Örneğin kabakta 55 kDa, mercimekte 54 kDa, salatalıkta 54,5 kDa ve pamukta 55 kDa (Kunce and Trelease 1986) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada katalaz enzimi Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Enzim homojenatı üzerinde yapılan kinetik çalışmalar ve adından SDS—PAGE ile moleköl ağırlığı sonuçları ve Bradford yöntemi ile elde edilen protein miktarı sonuçları kabak çekirdeklerinde katalaz enziminin bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca yapılan bu çalışma ile iki farklı kabak çekirdeğinde bulunan katalaz enzimlerinin aynı yapısal özelliklere sahip olmasına ve aynı reaksiyonları katalizlemelerine rağmen farklı organizmalar ve farklı yetiştirme koşullarından dolayı kinetik özelliklerinde çok az farklılıklar gözlemlendiği deneysel sonuçlarda rapor edilmiştir.

Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden elde edilen katalaz enzimi ve karakterizasyonu ilk kez çalışılmıştır. Böylece elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağı ve bundan sonra bu alanda yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] AKKUŞ, İ., Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 38(5); Mimoza yayınları; 1-123; 1995
- [2] AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M., Oxidants, Antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci; 90: 7915-7922, 1993.
- [3] ANDERSON, L.A., DAWSON, J.H., EXAFS spectroscopy of hemecontaining oxygenases and peroxidases. Structure and Bonding. 64: 1-40, 1991.
- [4] BİNGÖL, G., Biyokimya. Güven matbaası, 169-174, Ankara, 1983.
- [5] BRADFORD, M.M., A rapid and a sensitive method for the quantitative of microgram protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.72:248-254, 1976.
- [6] CHAVAN et al. Removal of tannins and improvement of in vitro protein digestibility of sorghum seeds by soaking in alkali. J.Food Sci. 44 (5) :1319-1321, 1975.
- [7] HAVERKAMP, V., HESSEL, V., LÖWE, H., MENGES, G., WARNIER MJF., REBROV, EV., de Croon MHJM, SCHOUTEN, JC., LIAUW, M., Hydrodynamics and mixer-induced bubble formation in microbubble columns with single and multiple channels. Chem. Eng. Technol.; 29(9):1015–1026. 2006
- [8] GÜNTHER, A., KHAN, SA., THALMANN, M., TRACHSEL, F., JENSEN, KF., Transport and reaction in microscale segmented gas-liquid flow. Lab Chip; 4:278–286. 2004
- [9] DİNÇKURT, İ.S., Katalaz enziminin Tilapia (tatlı su çipurası) karaciğerinden saflaştırılması. Y. lisans tezi; Çukurova Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Ana Bilim Dalı; 65, 2003.
- [10] DÜNDAR, Y., ASLAN, R., Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları; 73:95-101, Afyon, 2000.
- [11] EISING, R, TRELEASE, R.N. NI, W., Biogenesis of catalase in glioxysomes and leaf-type, peroxisomes of sunflower cotyledons. Archives

of Biochemistry and Biophysics; 278: 258-264, 1990.

- [12] EISING , R., GERHART, B., Activity and hematin content of a catalase from a greening sunflower cotyledons. *Phytochemistry*, 25 (1) :27-31, 1986.
- [13] ELMASTAŞ, M., TÜRKEKUL, İ., ÖZTÜRK, L., GÜLÇİN, İ., İŞILDAK Ö., ABOUL-ENEIN, H. Y., The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 9(6); 443–448; 2006.
- [14] ELMASTAŞ, M., GÜLÇİN, İ., ÖZTÜRK, L., GÖKÇE, İ., Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17 (1) , 137–148 ; 2005.
- [15] FOO, L.Y., PORTER, L. J., The structure of tannins of some edible fruits. *Journal science food agricultural*; 32 (7) , 711–716, 1981.
- [16] GÜLÇİN, İ., Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114; 2002.
- [17] GÜLÇİN, İ., MSHVİLDADZE, V., GEPDİREMEN, A., ELİAS, R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: a-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Medica*, 70(6), 561–563; 2004a.
- [18] GÜLÇİN, İ., OKTAY, M., KİREÇÇİ, E., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, 83 : 371–382; 2003.
- [19] GÜLÇİN, İ., YILDIRIM, A., Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. Acephala. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4), 2175-2183.27; 2005.
- [20] GÜLÇİN İ., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., OKTAY, M., BÜYÜKOKUROĞLU, M.E., Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90 (2-3), 205–215; 2004c.
- [21] GÜLÇİN, İ., ELİAS, R., GEPDİREMEN, A., BOYER, L., KÖKSAL, E., A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *African Journal of Biotechnology*; 6 (4) ; 410–418; 2007c.
- [22] HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., *Methods enzymology*, 186:1-45, 1990.

- [23] HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., Free radicals in biology and medicine. Clarendon press, 543, Oxford, 1989.
- [24] HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease:An overview. Methods in Enzymology, 186:1–85; 1990.
- [25] HAVIR, EVELYN A.; MCHALE, NEIL A., Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. Plant Physiol.; 84(2):450–455. 1987
- [26] HAVİR, E.A., MCHALE, N.A., Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from *Nicotina sylvestris*. Arch. Biochem. Biophys. 283:491-495. 1990.
- [27] HAVİR, E. A., ZELITCH, I., BRİSSON, F. L., Manipulation of catalase levels produces altered photosynthesis in transgenic tobacco plants. Plant physiol, 116(1): 259–269; 1996.
- [28] HIGASHI, T., KAWAMATA, F., SAKAMATO, T., Studies on Rat Liver Catalase. VII. Double-Labeling of Catalase by ¹⁴C-Leucine and ³H-d-Aminolevulinic Acid. J Biochem, Tokyo, 76: 703-708, 1974.
- [29] HUANG A.H.C., TRELEASE, R.N., MOORE, T.S., Plant peroxisomes, Academic press, 213, New York, 1983.
- [30] HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVI B., WILLIAMSON, G., Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. Biochem. Soc. Trans., 25, S559, 1997
- [31] JONES, G.L., MASTERS, C.J., On the comparative characteristics of mammalian catalases. Biochemistry and molecular biology; 55(4): 511-518; 1976.
- [32] JORNOT, L., PETERSEN, H., JUNOD, A.F., Biochem J, 335: 85-94
- [33] KEHA, E.E., KÜFREYOĞLU, Ö.İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 241, İstanbul, 2001.
- [34] KEHA, E.E., KÜFREYOĞLU, Ö.İ., Biyokimya, muhtelif kısımlar. Şafak yayınevi; 36; Erzurum; 1997.
- [35] KENDALL, A.C., KEYS, A.J., TUMER, J.C., LEA, J.P., MİFLİN, B.J., The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare L*) Planta 159 (6) :505- 511, 1983.
- [36] KESKİN, H. Besin Kimyası, İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İstanbul, 113, 1987.

- [37] KÖKSAL, E., Katalaz enziminin kara lahanadan (*Brassica oleracea* L. Var. *Acephala* D.C.) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı peptisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin incelenmesi. Y. lisans tezi; Atatürk Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Ana Bilim Dalı ;55; 2003.
- [38] KREMER, M., Peroxidatic activity of catalase. *Biochim biophys act.* 198; 1970.
- [39] KUNCE, C.M. TRELEASE, R.N., TURLEY, R.B., Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol.* 81 (4): 1134-1139; 1986.
- [40] LAEMMLI U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (5259) : 680-685, 1970.
- [41] LANIR, A., SCHEJTER, A., On the Sixth Coordination Position of Beef Liver Catalase. *FEBS Lett.* 15, 55 (1): 254–256, 1975.
- [42] LARDINOIS, O., Reactions of Bovine Liver Catalase with Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide. *Free Radic Res* 22 (3) : 251-74; 1995.
- [43] LEHNINGER, A. L., Principles of biochemistry. Worth publisher, Academic press; 587-665; New York; 1982.
- [44] LUCKE, H., Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeijer, H. K., ed.), Academic, NT, pp. 885–894. 1963
- [45] MILLS ,E.M., TAKEDA, K., YU, Z.X., *Biol chem*, 273: 22165-8, 1998.
- [46] MÜFTÜOĞLU, O., Yaşasın hayat. Doğan kitapçılık; 113, İstanbul, 2003.
- [47] NICHOLLS, P., FITA, I., LOEWEN, P.C., Enzymology and Structure of Catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51 (2-5) : 51-106 ; 2001.
- [48] NAMIKI, M., Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29 (4) : 273-300; 1990.
- [49] OKTAY, M., YILDIRIM, A., BİLALOĞLU, V., GÜLÇİN, İ., Antioxidant activity of different parts of ısgın (*Rheum ribes* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19 (4) : 3047-3055; 2007.
- [50] ÖZTÜRK , L., Normal şartlarda büyütülen ıspanak (*S. oleracea* cv. *Gladiator*) bitkisinden etafon ve poliamin uygulamalarının oksidatif enzimler üzerine in vivo ve in vitro etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi; Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, 125, 2002.

- [51] ROBERTSON, D. E., Catalases. U.S.P. No: 20040005655, 2004.
- [52] SORENSEN, B. K., HOJRUP P.; OSTERGARD E; JORGENSEN, C. S; ENGHILID, J., RYDER, L. R., HOUENG, G., Silver staining of proteins on electroblotting membranes and intensification of silver staining of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis". *Anal Biochem* 304 (1): 33-41; 2002.
- [53] SWITALA, J., LOEWEN, P.C., Diversity of properties among catalases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 401(2): 145-154, 2002.
- [54] TEKMAN, Ş., ÖNER, N., Genel kimya, I. cilt, Fatih yayınevi matbaası; 335-367, İstanbul,1986.
- [55] TEKMAN, Ş., ÖNER, N., Genel biyokimya dersleri. Fakülteler matbaası, 341-356, İstanbul,1994.
- [56] TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel tıp kitap evleri; 210; 2004.
- [57] YÜCEBİLGİÇ, G., Keten tohumu (*Linum Usitatissimum*) ekstraktında katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri. Y. lisans tezi, Çukurova Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Anabilim Dalı, 57, Adana, 2007.
- [58] ZİYAN, E., Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (*Pyrus Communis*)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin İncelenmesi. Y.lisans tezi; Ankara Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Anabilim Dalı; Ankara; 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Dilek KARA, 03.03.1984 de Balıkesir' de doğdu. İlk ve ortaokul eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2002 yılında Aydın Adnan Menderes Anadolu Lisesinden mezun oldu. 2002 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Kimya bölümünü 2006 yılında bitirdi. Lisans eğitimi süresince birçok kongre ve seminerde konuşmacı olarak rol aldı. Aynı zamanda Gazi Üniversitesi Kimya Kulübünün kurulmasında ve etkinliklerinde aktif rol aldı. XIX. Kuşadası Ulusal Kimya Kongresine (2005) bitirme ödevi posterini ile katıldı. Ankara Kimya Mühendisleri Odasının düzenlediği sertifikalı birçok programa katıldı. Üniversite hayatı boyunca toplum gönüllüleri vakfında, dershanelerde ve Milli Eğitim Müdürlüğüne bağlı okullarda öğretmenlik yaptı.