

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***GALİUM APARİNE L.* BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ VE KATALAZ
ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu YAMAN

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

OCAK 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***GALİUM APARİNE L.* BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ VE KATALAZ
ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu YAMAN

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülnur ARABACI

OCAK 2023

Duygu YAMAN tarafından hazırlanan “*Galium aparine L.* Bitkisinden Peroksidaz Ve Katalaz Enzimlerinin Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 16.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Prof. Dr. Gülnur ARABACI**

 Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Prof. Dr. Meryem Nilüfer YARAŞIR**

 Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Esra ALTINTIĞ**

 Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “*GALİUM APARİNE L. BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ VE KATALAZ ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU*” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(05/01/2023).

Duygu YAMAN

Kardeşime

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında benden desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili danışman hocam Prof. Dr. Gülnur ARABACI'ya sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yanımda olup beni destekleyen ve fikirlerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan canım kardeşim Samet YAMAN'a her konuda hep yanımda hissettiğim için sonsuz teşekkür ederim.

Eğitim hayatım için yaptıkları desteklerden dolayı anne ve babama beni bu günlere getirdikleri için teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Komisyonu (Proje No: 2021-7-24-59) tarafından desteklenmiştir.

Duygu YAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Peroksidaz ve Katalaz Enzimi İle Daha Önce Yapılmış Olan Çalışmalar	1
1.2. Çalışmanın Amacı	3
2. ENZİMLER	5
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgiler	5
2.1.1. Enzim adlandırması ve sınıflandırma	5
2.1.2. Enzim spesifikliğı	6
2.1.3. Enzim aktivite birimleri	6
2.1.4. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler	6
2.1.4.1. pH	7
2.1.4.2. Zaman	7
2.1.4.3. Sıcaklık	7
2.1.4.4. İnhibitör	7
2.1.4.5. Enzim Konsantrasyonu	8
2.1.4.6. Substrat Konsantrasyonu	8
2.1.4.7. Fiziksel Faktörler	8
2.1.5. Enzim kinetiğı	8
2.1.6. Enzim inhibisyonu	9
2.2. Antioksidan Enzimler	10
2.3. Katalaz Enzimi	11
2.4. Yoğurt Otu	12
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	13
3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler	13
3.1.1. Kullanılan cihazlar	13
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	13
3.2. Peroksidaz (POD) ve Katalaz (CAT) Enzimlerinin İzolasyonu	14
3.2.1. Ham enzim ekstarktının hazırlanması	14
3.2.2. Üçlü faz ayırma tekniğı	14
3.2.3. Bradford yöntemi ile protein tayini	14
3.2.4. SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi)	14
3.3. Yoğurt Otu Bitkisinden POD ve CAT Karakterizasyonu	16
3.3.1. POD aktivite tayini	16
3.3.2. POD substrat spesifikliğı	16

3.3.3. Sıcaklığın POD enzim aktivitesine etkisi.....	16
3.3.4. pH'ın POD enzim aktivitesine etkisi.....	16
3.3.5. POD Enzim kinetiği	17
3.3.6. CAT aktivite tayini.....	17
3.3.7. CAT aktivitesine sıcaklığın etkisi	17
3.3.8. CAT aktivitesine pH'ın etkisi	18
3.3.9. CAT enzim kinetiği.....	18
3.3.10. POD VE CAT aktiviteleri üzerine çeşitli madde etkileri.....	18
3.3.10.1. İnhibitör etkisi	18
3.3.10.2. Metal etkisi	18
3.3.10.3. Solvent etkisi	19
3.3.10.4. POD ve CAT enziminin tuz toleransı	19
3.3.10.5. POD ve CAT enzimlerine iyonik şiddet etkisi.....	19
4. SONUÇLAR	21
4.1. POD ve CAT Enzimlerinin Üçlü Faz Ayırma ile Saflaştırılması.....	21
4.2. SDS-PAGE ile Enzimlerin Saflık Kontrolü	21
4.3. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	22
4.4. POD Enzimi Karakterizasyonu	22
4.4.1. POD enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi	22
4.4.2. POD enzimi aktivitesine pH etkisi	23
4.4.3. POD enzim kinetiği.....	23
4.5. CAT Enzimi Karakterizasyonu	31
4.5.1. CAT enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi	31
4.5.2. CAT enzimi aktivitesine pH etkisi	31
4.5.3. CAT enzim kinetiği.....	32
4.6. POD VE CAT aktiviteleri üzerine çeşitli madde etkileri	33
4.6.1. POD enzimine inhibitör etkisi.....	33
4.6.2. CAT enzimine inhibitör etkisi.....	35
4.7. POD ve CAT Enzimine Metal Etkisi	37
4.8. POD ve CAT Enzimlerine Solvent Etkisi	38
4.9. POD ve CAT enziminin tuz toleransı.....	40
4.10. POD ve CAT enzimlerine iyonik şiddet etkisi	41
5. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51

KISALTMALAR

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dizmutaz
CAT	: Katalaz
POD	: Peroksidaz
GSHPX	: Glutasyon Peroksidaz
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroferi
IUBMB:	:Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
H₂O₂	: Hidrojen Peroksidaz
PVP	: Polivinil Prolidin
AsA	: Askorbik Asit

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. %15'lik Ayırma jeli	15
Tablo 3.2. %5'lik yürütme jeli	15
Tablo 3.3. Yükleme tamponu	15
Tablo 3.4. Yürütme tamponu	16
Tablo 3.5. 0,1 M sitrik asit tamponunu	17
Tablo 3.6. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması.....	17
Tablo 4.1. POD substrat sepesifikliği.....	31
Tablo 4.2. CAT enzim kinetiği sonuçları	33
Tablo 4.3. İnhibisyon Sonuçları	36
Tablo 4.4. Yoğurt otu POD ve CAT enzimleri üzerine metal etkileri.....	37
Tablo 4.5. POD ve CAT enzimlerine solvent etkisi	39

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Reaksiyon hızına optimum pH'ın etkisi	7
Şekil 2.2. Michealis-Menten grafiği	9
Şekil 2.3. Yoğurt otu.....	12
Şekil 4.1. Üç Fazlı Saflaştırma sonucu POD ve CAT aktiviteleri	21
Şekil 4.2. SDS-PAGE sonucu jel görünümü	22
Şekil 4.3. Standart Rf – log MW grafiği.....	22
Şekil 4.4. POD optimum sıcaklık	23
Şekil 4.5. Optimum pH grafiği	23
Şekil 4.6. Sabit H ₂ O ₂ , farklı 4- metilkatekol konsantrasyonlarında 4-metilkatekolün doyunluk eğrisi.....	24
Şekil 4.7. Sabit H ₂ O ₂ , farklı 4- metilkatekol konsantrasyonlarında 4-metilkatekolün Lineweaver-Burk grafiği.....	24
Şekil 4.8. Sabit 4- metilkatekol, farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ doyunluk eğrisi.....	25
Şekil 4.9. Sabit 4- metilkatekol, farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ 'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	25
Şekil 4.10. Sabit H ₂ O ₂ , farklı pirogallol konsantrasyonlarında pirogallölün doyunluk eğrisi.....	25
Şekil 4.11. Sabit H ₂ O ₂ , farklı pirogallol konsantrasyonlarında pirogallölün Lineweaver-Burk grafiği.....	26
Şekil 4.12. Sabit 4- pirogallol, farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ doyunluk eğrisi.....	26
Şekil 4.13. Sabit 4- pirogallol, farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ 'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	26
Şekil 4.14. Sabit H ₂ O ₂ , farklı kafeik asit konsantrasyonlarında kafeik asit doyunluk eğrisi.....	27
Şekil 4.15. Sabit H ₂ O ₂ , farklı kafeik asit konsantrasyonlarında kafeik asitin Lineweaver-Burk grafiği.....	27
Şekil 4.16. Sabit kafeik asit farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ doyunluk eğrisi	27
Şekil 4.17. Sabit kafeik asit , farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ 'nin Lineweaver-Burk grafiği	28
Şekil 4.18. Sabit H ₂ O ₂ , farklı gallik asit konsantrasyonlarında gallik asit doyunluk eğrisi.....	28
Şekil 4.19. Sabit H ₂ O ₂ , farklı gallik asit konsantrasyonlarında gallik asitin Lineweaver-Burk grafiği.....	28
Şekil 4.20. Sabit gallik asit farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında H ₂ O ₂ doyunluk eğrisi	29
Şekil 4.21. Sabit gallik asit , farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında gallik asit'in Lineweaver-Burk grafiği,.....	29

Şekil 4.22. Sabit H_2O_2 , farklı o-fenilendiamin konsantrasyonlarında o-fenilendiamin doyunluk eğrisi.....	29
Şekil 4.23. Sabit H_2O_2 , farklı o-fenilendiamin konsantrasyonlarında o-fenilendiamin Lineweaver-Burk grafiği.....	30
Şekil 4.24. Sabit o-fenilendiamin farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 doyunluk eğrisi.....	30
Şekil 4.25. Sabit o-fenilendiamin , farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	30
Şekil 4.26. CAT optimum sıcaklık.....	31
Şekil 4.27. CAT optimum pH.....	32
Şekil 4.28. H_2O_2 'nin doyunluk eğrisi.....	32
Şekil 4.29. H_2O_2 'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	33
Şekil 4.30. POD enzimine tiyoüre etkisi.....	34
Şekil 4.31. POD enzimi tiyoüre Lineweaver-Burk grafiği.....	34
Şekil 4.32. POD enzimine sodyum azid etkisi.....	35
Şekil 4.33. POD enzimi sodyum azid Lineweaver-Burk grafiği.....	35
Şekil 4.34. CAT enzimine tiyoüre etkisi.....	36
Şekil 4.35. CAT enzimine sodyum azid etkisi.....	36
Şekil 4.36. G.aparine POD enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi.....	37
Şekil 4.37. G.aparine CAT enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi.....	38
Şekil 4.38. POD enzimi solvent etkisi grafiği.....	40
Şekil 4.39. CAT enzimi solvent etkisi grafiği.....	40
Şekil 4.40. Yoğurt otu POD ve CAT enzimleri tuz toleransı.....	41
Şekil 4.41. Yoğurt otu POD ve CAT iyonik şiddet etkisi.....	41

GALİUM APARİNE L. BİTKİSİNDEN PEROKSİDAZ VE KATALAZ ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Canlı yaşamı için gerekli olan oksijenin bazı türleri (reaktif oksijen türleri, ROS) insan sağlığı için son derece zararlı olabilmektedir. ROS çoğunlukla serbest radikaller tarafından oluşturulurlar ve moleküler oksijene kıyasla kimyasal olarak daha reaktiftirler. Serbest radikallerin yok edilememesi durumunda; hücre membranında ki proteinler ROS'lar tarafından yıkılarak hücrelerin ölümü, DNA'nın kırılarak mutasyonlara açık hale gelmesi, kanser, yaşlanma ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi olaylar gözlenebilir. ROS oluşumu ve meydana getirdikleri hasarların önlenmesi için vücut savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Bu savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri, yani kısaca antioksidanlar ismi verilmiştir. Bitki dokuları ROS'ni ortadan kaldırarak stres koşullarındaki hücreleri korumak için katalaz (CAT), peroksidaz (POD), süeroksit dismutaz (SOD) gibi çeşitli enzimler ve fenolik bileşikler içermektedir. Bu sayede serbest radikallerden etkilenmezler ve meydana getirdikleri hasarı oortadan kaldırmış olurlar. Enzimler, protein yapısında olan ve biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Peroksidaz enzimi (EC 1.11.1.7), hidrojen peroksitli ortamda flavonoidler, fenoller, , sülfonoidler, aromatik aminler ve pirogallol gibi birçok substratın oksidasyonunu katalize eden bir oksidoredüktaz grubu enzimidir. POD bitki, hayvan, bakteri ve mantarlarda bulunan, bununla birlikte bitki gelişimi için gerekli olan hücre duvarında da yer alan bir oksidoredüktaz grubu enzimidir. POD enzimleri, H₂O₂ kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu ve katalize ederler. Katalitik moleküllerin örnekleri; guaiacol, o-dianisidine, pyrogallol, azo boya türevleri, o-fenilendiamin sayılabilir. POD'un bitki savunma mekanizmaları, meyve ve sebzelerde indolasetik asit regülasyonu, hormon aktivitesi ve lignin biyosentezi gibi önemli işlevlerde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. POD, bitkisel gıdalarda bol miktarda bulunur. Bitkilerde POD çiçeklerde, gövdelerde, yapraklarda, hücre çekirdeklerinde, hücre zarlarında, ribozomlarda ve hücre duvarlarında bulunur. Katalaz enzimi ((CAT): H₂O₂ oksidoredüktaz E.C.1.11.1.6 doğada çok yaygındır. Hemen hemen tüm aerobik mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Bir katalaz enzimi, oksidoredüktaz grubu olan hidroperoksidazlar sınıfına aittir. Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit ve organik peroksitleri kullanır. Bir katalaz enzim solüsyonu, kontak lens yeniden kullanılmadan önce H₂O₂'yi ortamdan güvenilir bir şekilde uzaklaştırır. UV ışınları serbest radikallerin oluşumunu hızlandırır. Serbest radikaller ise cilde zarar verir ve cilt kalitesinin bozulmasına neden olur. Antioksidan moleküller çeşitli etkiler gösterir ve oksidasyonun neden olduğu cilt hasarını azaltır. Katalaz enzimi son zamanlarda H₂O₂ ve enzimlerden oluşan çeşitli yüz maskesi uygulamalarında ve epidermin üst katmanlarında hücresel oksidasyonu artırarak vitiligo tedavisinde kullanılmaktadır. Yoğurt otu (*Galium aparine*), Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'ya da yetişen bir tırmanma bitkisidir. *G. aparine*'nin aktif bileşenleri, alkanlar, flavonoidler, antrakinonlar, polifenolik asitler, tanenler, iridoidler ve C vitamindir. Lenf şişlikleri, bademcik iltihabı, sarılık, kanser, ateş, ve lösemi tedavisinde kullanılmıştır. Bu çalışmada Sakarya bölgesinde yetişen yoğurt out (*Galium aparine L.*) bitkisinden peroksidaz ve katalaz enzimleri saflaştırılarak her iki enzimin kinetik özellikleri ve bazı inhibitörlere karşı aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu amaçla enzim izolasyonu için pH 7,0, 0,1 M fosfat tamponu, askorbik asit, PVP ve

Triton X-100 kullanılmıştır. Bitki -20 °C'de depolanmıştır. Enzim izolasyon işlemleri +4 °C'de yapılmıştır. Yoğurt otu bitkisinin izolasyonu gerçekleştirildikten sonra üç fazlı ayırma tekniği (TPP) ile saflaştırılmış ve SDS-PAGE metodu ile enzimlerin molekül ağırlıkları tayin edilmiştir. Peroksidaz enziminin molekül ağırlığı 65 kDa, katalaz enziminin molekül ağırlığı ise 50 kDa olarak bulunmuştur. Peroksidaz enzimi aktivitesi, uygun substratlar ile 60 sn'de 420 nm'deki absorbasın ölçülmesi sonucu tayin edilmiştir. Katalaz enzimi aktivitesi ise H₂O₂ substratının 180 sn 240 nm'deki absorbans ölçümü ile tayin edilmiştir. Peroksidaz enziminin 4 metil katekol ve sabit konsantrasyondaki H₂O₂ substratı için V_{max} ile K_m değerleri sırasıyla 0,00238 EÜ/dk ve 1,47mM olarak belirlenmiştir. Katalaz enziminin V_{max} ile K_m değerleri ise 0,0007 EÜ/dk ve 6,41 mM olarak belirlenmiştir. Peroksidaz enzimi substrat spesifikliğı testi için H₂O₂'li ortamda pirogallol, o-fenilendiamin, gallik asit, kafeik asit, 4-metilkatekol substratları ile aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir ve *G.aparine* peroksidaz enziminin en ilgili substratı 1,086 mM K_m değeri ile pirogallol substratı olarak tespit edilmiştir. Optimum pH POD enzimi için 6,5, CAT enzimi için ise 8 olarak belirlenmiştir. *G. aparine*. peroksidazı ve katalazı için farklı sıcaklıklarda (0-90 °C) optimum sıcaklık tayini yapılmıştır. Peroksidaz ve katalaz için optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuştur. *G. aparine* peroksidazı ve katalazı için inhibisyon tayininde inhibitör olarak sodyum azid ve tiyoüre kullanılmıştır. Her iki inhibitöründe POD ve CAT enzimlerini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Enzim aktivitelerini yarıya düşüren inhibitör miktarını belirlemek için önce % bağıl aktiviteler hesaplanmış ve grafik yardımıyla IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Yoğurt otu peroksidazına tiyoüre inhibisyonu sonucunda IC₅₀ değeri 1,18 mM, sodyum azid inhibitörü ile ise IC₅₀ değeri 2,05 mM olarak hesaplanmıştır. *G. aparine* katalazına tiyoüre inhibisyonu sonucunda IC₅₀ değeri 0,85 mM ve sodyum azid inhibisyonu sonucunda ise IC₅₀ değeri 0,97 mM olarak belirlenmiştir. *G.aparine* peroksidazı ve katalaz enzim aktivitelerine Fe(III), Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Ba(II), Ca(II), Pb(II), Hg(II) ve Cd(II) metallerinin etkisi incelenmiştir. 0,5-1 ve 5 mM olarak 3 farklı konsantrasyonda metal çözeltileri hazırlanmış ve aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivite tayini peroksidaz için 420nm, katalaz için 240 nm'de yapılmıştır. % kalan enzim aktiviteleri hesaplanarak metallerin inhibisyon oranları belirlenmiştir. En yüksek oranda POD enzimine inhibisyon etkisi; 0,5 Mm konsantrasyonda Hg(II)'nin % 47,18 oranında, 1 mM Hg (II) de % 84,67 ve 5 mM Hg (II) de ise % 80 oranında olduğu belirlenmiştir. 0,5 Mm konsantrasyonda Pb(II) % 40, 1 Mm konsantrasyonda Cd(II) % 52 ve 5 Mm konsantrasyonda Pb(II) ise % 55 oranında ise CAT enzimini inhibe etmiştir. Ayrıca, *G. aparine* peroksidazı ve katalazına solvent etkisi test edilmiştir. Solvent olarak aseton, etanol, DMSO, t-bütanol ve DMF seçilmiştir. Bu solventlerin % 5- % 30 (v/v) oranlardaki çözeltileri POD ve CAT enzimleri ile inkübe edilmiştir ve enzim aktivite ölçümü uygun substratların varlığında peroksidaz için 420 nm, katalaz için 240 nm' de gerçekleştirilmiştir. % kalan enzim aktiviteleri hesaplanarak karşılaştırma yapılmıştır. POD enzimine solvent etkisi incelendiğinde % 30 oranında etanol ilavesin ve CAT enzimine solvent etkisi incelendiğinde ise %30 oranında DMF ilavesinin enzimin aktivitesini en fazla inhibe eden solvent olduğu belirlenmiştir. Enzimlere tuz toleransı testi için 1, 2, 3, 4, 5mM konsantrasyonlarında NaCl çözeltileri hazırlanmıştır. Belirtilen knsantrasyonlardaki tuz çözeltileri ile enzimler 2 saat inkübe edildikten sonra aktivite tayini yapılmıştır. Artan tuz konsantrasyonunda enzimin aktivitesinin düştüğü görülmüştür. *G. aparine* peroksidazının katalaza göre daha fazla tuztoleransı gösterdiği tespit edilmiştir. Peroksidaz ve katalaz enzimlerinin iyonik şiddet etkisi için 1, 2, 3, 4 ve 5 mM konsantrasyonlu NaCl çözeltileri hazırlanarak aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. *G. aparine* peroksidaz enziminin 3 mM NaCl çözeltisi ile en

yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Enzimin 1 mM tuz konsantrasyonunda ise % 42 oranında inhibe olduğu görülmüştür. Katalaz enziminin 3 mM tuz konsantrasyonunda en yüksek aktiviteye sahip olduğu fakat 5 mM konsantrasyonda aktivitesinin % 40'a düştüğü görülmüştür.

CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE AND CATALASE ENZYMES FROM THE PLANT *GALIUM APARINE L.*

SUMMARY

Some oxygen species (reactive oxygen species, ROS) essential for life can be extremely harmful to human health. ROS is mostly produced by free radicals and is chemically more reactive than molecular oxygen. In case free radicals cannot be destroyed; ROS can cause events such as the death of cells by breaking down proteins in the cell membrane, DNA fragmentation and becoming open to mutations, cancer, aging and weakening of the immune system. The body develops defense mechanisms to prevent the formation of ROS and the damage they cause. These defense systems found in all living organisms are called antioxidant defense systems, briefly antioxidants. Plant tissues also contain various antioxidant enzymes such as catalase (CAT), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and phenolic compounds to protect their cells under stress conditions by eliminating ROS. All parts of plants contain natural antioxidants in the form of carotenoids, phenols, vitamins and flavonoids. The antioxidants in plants act as peroxide scavengers, free radical scavengers and enzyme inhibitors. In this way, they are not affected by free radicals. Enzymes are biocatalysts that are in protein structure and carry out biochemical reactions.

Peroxidase enzyme ((POD) EC 1.11.1.7) is an oxidoreductase group enzyme that catalyzes the oxidation of many substrates such as flavonoids, phenols, sulfonoids, aromatic amines and pyrogallol in the presence of hydrogen peroxide. POD is an enzyme found in the cell wall of plants, animals, bacteria and fungi, and is also essential for plant growth. It has been reported that POD plays an important role in important functions such as plant defense mechanisms, regulation of indolacetic acid in fruits and vegetables, hormone activity and lignin biosynthesis. POD is abundant in plant foods. In plants, POD is found in flowers, stems, leaves, cell nuclei, cell membranes, ribosomes, and cell walls. POD enzymes catalyze the oxidation of inorganic and organic substrates and the dehydrogenation of hydroquinones, phenols, hydroquinoid amines and other aromatic compounds using H_2O_2 . Examples of catalytic molecules; guaiacol, o-dianisidine, pyrogallol, azo dye derivatives, o-phenylenediamine can be counted.

The another antioxidant enzyme catalase ((CAT), H_2O_2 oxidoreductase, E.C.1.11.1.6) is very common in nature. It has high catalytic activity in almost all aerobic microorganisms, plant and animal cells. It belongs to the class of hydroperoxidases, a catalase oxidoreductase group. Hydroperoxidases use hydrogen peroxide and organic peroxides as substrates. It catalyzes cellular hydrogen peroxide to water and oxygen. Catalase enzyme is also used in industrial applications such as textile, food, medicine, etc. For example, catalase enzyme is used in contact lens hygiene and lens disinfection with H_2O_2 solutions. A catalase enzyme solution reliably removes H_2O_2 before contact lens reuse. UV rays accelerate the formation of free radicals. Free radicals damage the skin and cause deterioration of skin quality. Antioxidant molecules exert a variety of effects and reduce skin damage caused by oxidation.

Yogurt grass (*Galium aparine*) is a climbing plant that also grows in North America, Europe and Asia. *Galium aparine* is traditionally used to coagulate milk because of its chemical composition. Therefore, it is known as “Yogurt grass” in public.

The active ingredients of *G. aparine* are alkanes, flavonoids, anthraquinones, polyphenolic acids, tannins, iridoids and vitamin C. It has been used in the treatment of lymph nodes, tonsil foci, jaundice, cancer, fever and leukemia.

In this study, peroxidase and catalase enzymes from *Galium aparine* L. (Yogurt grass) plant grown in Sakarya, Turkey were purified and their kinetic properties and activities against some inhibitors were determined. The collected plant was stored at -20 °C until extraction. Enzyme isolation procedures were performed at +4 °C. Enzymes were extracted by using 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing ascorbic acid, PVP and Triton X-100. Yogurt grass peroxidase and catalase enzymes were purified by three-phase separation technique (TPP) after isolation and molecular weights of enzymes were determined by SDS-PAGE method. The molecular weight of peroxidase enzyme was found to be 65 kDa, and the molecular weight of catalase enzyme was found to be 50 kDa. Peroxidase enzyme activity was determined by measuring absorbance at 420 nm for 60 seconds using 4-methyl catechol and H₂O₂ substrates. Catalase enzyme activity was determined by observing the absorbance decrease of the H₂O₂ substrate for 180 seconds at 240 nm. The V_{max} and K_m values of the peroxidase enzyme were determined as 0.00238 EU/min and 1.47mM, respectively. V_{max} and K_m values of catalase enzyme were determined as 0.0007 EU/min and 6.41 mM. The peroxidase enzyme substrate specificity was determined with pyrogallol, o-phenylenediamine, gallic acid, caffeic acid, 4-methylcatechol substrates in the presence of H₂O₂ and the most relevant substrate of the *G. aparine* peroxidase enzyme was determined as the pyrogallol substrate with a K_m value of 1.086 mM. Optimum pH was determined as 6.5 for POD enzyme and 8 for CAT enzyme. *G. aparine* peroxidase and optimum temperature determination was made for *G. aparine* catalase. The optimum temperature for peroxidase and catalase enzymes was found to be 30 °C. Sodium azide and thiourea were used as inhibitors in the inhibition experiment for *G. aparine* peroxidase and catalase. It was concluded that both inhibitors inhibited POD and CAT enzymes. In order to determine the amount of inhibitor that halves the enzyme activities, firstly the % relative activities of the enzymes were calculated and the IC₅₀ values were determined with the help of graphics. The IC₅₀ value calculated by the effect of the thiourea inhibitor on the peroxidase enzyme activity was calculated as 1.18 mM, and the IC₅₀ value with the sodium azide inhibitor was calculated as 2.05 mM. The IC₅₀ value was determined as 0.85 mM as a result of inhibition of the catalase enzyme by thiourea, and as 0.97 mM as a result of sodium azide inhibition. The effects of Fe(III), Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Ba(II), Ca(II), Pb(II), Hg(II) and Cd(II) metals on *G. aparine* peroxidase and catalase enzymes were also investigated. Metal solutions at 3 different concentrations, 0.5-1 and 5 mM, were prepared and their effects on the enzymes were measured. Inhibition rates of metals were determined by calculating their % residual activity of enzymes. The results showed that the peroxidase enzyme was inhibited by 47.18% at 0.5 mM concentration, 84.67 % at 1 mM concentration and 80 % at 5 mM Hg(II). It was measured that the catalase enzyme was inhibited by 40 % with Pb(II) at 0.5 mM concentration and 52 % by Cd(II) at 1 mM concentration. Additionally, the solvent effects on *G. aparine* peroxidase and catalase enzyme activities were tested. Acetone, ethanol, DMSO, t-butanol and DMF were chosen as solvents. Solutions of 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % and 30 % (v/v) of the solvents were incubated with POD and CAT

enzymes. Activity measurement was performed at 420 nm for peroxidase and at 240 nm for catalase. Comparison was made by calculating the percentage of remaining activity of each enzyme. When the solvent effect on the peroxidase enzyme was examined, it was determined that the addition of 30 % ethanol was the solvent that inhibited the enzyme activity the most. When the solvent effect on the catalase enzyme was examined, it was determined that the 30 % DMF addition was the solvent that inhibited the enzyme activity the most. In both enzymes, 30% was determined as the highest inhibitory value for all solvents. In addition to all tests, salt tolerance test was applied to the peroxidase and catalase enzymes. For this test, NaCl solutions at 1, 2, 3, 4, 5 mM concentrations were prepared. First, the enzymes were incubated separately for 2 hours with the salt solutions at the specified concentrations, then, the activity of the enzymes was determined. According to the results obtained, it was observed that the activities of the enzymes decreased with increasing salt concentration. It was determined that *G. aparine* peroxidase showed more salt tolerance than *G. aparine* catalase enzyme. For the ionic strength effect of the peroxidase and catalase enzymes, 1, 2, 3, 4 and 5 mM concentration NaCl solutions were prepared and the enzyme activity measurements were performed. It was observed that the *G. aparine* peroxidase enzyme showed the highest activity with 3 mM NaCl solution. But, the enzyme was inhibited by 42% at 1 mM salt concentration. It was observed that the catalase enzyme had the highest activity at 3mM salt concentration, but its activity decreased to 40 % at 5 mM salt concentration.

1. GİRİŞ

Canlı yaşamı için gerekli olan oksijenin bazı türleri (reaktif oksijen türleri, ROS) insan sağlığı için son derece zararlı olabilmektedir. ROS çoğunlukla serbest radikaller tarafından oluşturulurlar ve moleküler oksijene kıyasla kimyasal olarak daha reaktiftirler [1]. Serbest radikallerin yok edilememesi durumunda; hücre membranında ki proteinler ROS'lar tarafından yıkılarak hücrelerin ölümü, DNA'nın kırılarak mutasyonlara açık hale gelmesi, kanser, yaşlanma ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi olaylar gözlenebilir [2].

ROS oluşumu ve meydana getirdikleri hasarların önlenmesi için vücut savunma mekanizmaları geliştirir. Bu savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri, yani kısaca antioksidanlar denir [3]. Mekanizmalarına göre ikiye ayrılırlar. İlk grup olan birincil antioksidanlar, radikallerle reaksiyona girerek yeni radikal oluşumunu engelleyen ve daha zararlı formlara dönüşümlerini engelleyen bileşiklerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), preroksidaz (POD) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi enzimler bu grupta yer alırlar. İkincil antioksidanlar ise; C vitamini, ürik asit ve polifenoller gibi oksijen radikalini yakalayarak bu radikal zincir reaksiyonlarını kıran bileşiklerdir [4].

Bitki dokuları ROS'ni ortadan kaldırarak stres koşullarındaki hücreleri korumak için CAT, POD, SOD gibi çeşitli enzimler ve fenolik bileşikler içerirler [5]. Bitkilerin tüm kısımlarında karotenoitler, fenoller, vitaminler ve flavonoidler şeklinde doğal antioksidanlar bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan antioksidanlar peroksit parçalayıcısı, serbest radikal gidericisi ve enzim inhibitörleri olarak görev yaparlar [6]. Bu sayede serbest radikallerden etkilenmemiş olurlar.

1.1. Peroksidaz ve Katalaz Enzimi İle Daha Önce Yapılmış Olan Çalışmalar

Mitchell ve arkadaşı (1991) *Trichoplusia ni*'den CAT enzimini saflaştırmıştır. Saflaştırma yöntemi olarak kolon kromatografisini kullanmışlardır. Moleküler ağırlık 247-259 kDa aralığında tespit edilmiştir. Çalışmada enzimin kinetiği, substrat spesifikliği gibi biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir [7].

Mliki ve arkadaşı (1992) *Streptomyces cyaneus* (*Streptomyces curacoi*)'den POD enzimi saflaştırmıştır. Substrat olarak o-dianisidine kullanılmış ve Km değeri 17.8 Mm olarak hesaplanmıştır. Optimum pH değeri 5,0 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda enzimin hemoprotein yapıda olduğu belirlenmiştir [8].

Pomar ve arkadaşları(1997) affinite kromatografisi metoduyla karabiberden POD enzimini saflaştırmıştır. Enzimin jel filtrasyonu sonucu tayin edilen molekül ağırlığı 50 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin yüksek sıcaklıklara karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir [9].

Multen ve ark.(1993), *Pinus taeda* katalazını saflaştırmışlardır. Saflaştırma yöntemi olarak Superdex-200, DE-52 selüloz ve phenyl-sepharose CB-4B kullanılmıştır. Spesifik aktivite 2215 U/mg protein olarak hesaplanmıştır [10].

Vitali ve ark. (1998), yabani sinemaki bitkisinden peroksidaz enzimi saflaştırmayı başarmışlardır. Molekül ağırlığı iki farklı yolla tayin edilmiştir. SDS-PAGE ile 43 kDa, jel filtrasyon yöntemi ile ise 50 kDa olarak bulunmuştur. Yabani sinemaki POD'unun hücre duvarı odunlaşmasında görev aldığı gözlemlenmiştir [11].

Köksal (2003), karalahanadan CAT enzimini kısmi olarak saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Bazı antibiyotik ve pestisitlerin enzime etkileri test edilmiştir. Optimum pH:7,8, sıcaklık ise 25⁰C bulunmuştur. Km değeri 0,0159 M, Vmax ise 588,2 U/ml şeklinde hesaplanmıştır [12].

Deepa ve ark. (2002), palmye ağacı yağından peroksidaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma metodu olarak moleküler dışlama kromatografisi, anyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Denatüre şartlarda enzimin molekül ağırlığı 48±2 kDa olarak bulunmuştur. Pirogallol için K_m 0,84 mM, ABTS için K_m 1 mM ve Guaikol için ise 3,96 mM bulunmuştur [13].

Lokman Ö. ve ark. (2005), maydanoz bitkisinden katalazı iyon değişim ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile saflaştırmışlardır. Optimum sıcaklık 35°C ve optimum pH ise 7,0 olarak bulunmuştur [14].

Saravia ve ark. (2007) zeytin bitkisinden peroksidaz enzimi saflaştırmışlardır. Fenol ile K_m değeri 0,53 Mm olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık 34,7°C ve optimum pH ise 7,0 olarak bulunmuştur [15].

Kara (2008), Sakarya’da yetişen farklı kabak çekirdeklerinden CAT enzimi saflaştırmış kinetik özelliklerini tayin etmiştir. *Cucurbita maxima* için optimum pH ve sıcaklık 6,8 ve 25°C, *Cucurbita moschata* için ise 7,0 ve 25°C olarak bulunmuştur. *C. maxima* için K_m 17,68 mM ve V_{max} ise 81,300 U/ml hesaplanmıştır. *C. moschata* için ise K_m 20,029 ve V_{max} 58,139 U/ml hesaplanmıştır [16].

Belcarz ve ark. (2008) lahanadan peroksidaz enzimini kısmen saflaştırmışlardır. Optimum sıcaklık 40°C ve pH ise 6,0 olarak belirlenmiştir. Saflatırılan enzim 4 hafta boyunca 4°C’de depolanmış ve aktivite göstermeye devam etmiştir. En yüksek K_m değeri guaikol substratı ile 13,89 mM olarak bulunmuştur [17].

Manu ve ark. (2009) buğday kepeğinden POD ‘u saflaştırmayı başarmışlardır. Saflaştırma yöntemi olarak anyon değişimi, katyon değişimi amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanmışlardır. Molekül ağırlığı 44 kDa ve karbohidrat ağırlığı ise %13,8 şeklinde belirlenmiştir. Ortama kalsiyum katmanın enzim verimi ve aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir [18].

Seriner (2010), CAT enzimini hiyardan saflaştırmayı başarmıştır. Yöntem olarak DEAE kolon kromatografisi ve amonyumsülfat çöktürmesini tercih etmiştir. Spesifik aktivitesi 26 U/mg protein şeklinde bulunurken, kolon kromatografisinin son basamağında 393 U/mg şeklinde bulunmuştur [19].

1.2. Çalışmanın Amacı

Enzimler sağlık, gıda, tekstil gibi endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır. Enzimlerin kullanım alanlarının bu kadar fazla olması yeni enzim kaynakları arayışını da beraberinde getirmektedir. Kullanılan enzimlerin direkt olarak kaynaklarını değil, izole edilmiş hallerinin kullanılması saklama koşullarının ve spesifik etkilerinin daha iyi olması sebebiyle tercih edilir.

Peroksidaz enzimleri, sentetik boyaların renk giderimlerinde, atık suların arındırılmasında fazlaca tercih edilirler. Termal kararlılıklarının fazla olması ve aktivite ölçümlerinin kolay olması tercih edilme sebepleri arasındadır.

Katalaz enzimi saflaştırılan ilk enzimlerden biridir. Günümüzde kanser ve diyabet ile bağlantılı olması nedeniyle oldukça önemlidir. Bitkilerde büyüme ve savunmada önemli rolleri vardır. Kağıt endüstrisinde kağıdı ağartma prosesinde etkili rolü vardır. Gıdalarda soğuk sterilizasyon aşamasında ajan olarak kullanılır.

Literatüre bakıldığı zaman yoğurt otu (*Galium aparine L.*) ile yapılmış peroksidaz ve katalaz enzimi saflaştırılması çalışması olmaması, bu bitkinin çalışma materyali olarak seçilmesine sebep olmuştur.

Çalışmanın amacı, yoğurt otu (*Galium aparine L.*) bitkisinden peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin saflaştırılması, kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı inhibitörlere karşı enzim aktivitelerinin tayin edilmesidir.

2. ENZİMLER

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgiler

Katalizörler kimyasal reaksiyonları hızlandıran bileşiklerdir. Enzimler, protein yapısında olan ve biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren biyokatalizörlerdir [20]. Canlılığın oluşması ve devam etmesi için enzimlere ihtiyaç duyulur. Hücre solunumu, sindirim, kas kasılması gibi görevler metabolizma tepkimeleri sonucunda gerçekleşir ve enzimler bu tepkimelerde görev alırlar [21].

Enzimler, DNA seviyesinde düzenlenerek kontrol edilen biyokatalizörlerdir. İn vivo reaksiyonlar enzim bulunmadığı zaman hemen hemen hiç gerçekleşmez ve reaksiyonların kendiliğinden yürümezler. Bu sebeple enzimler için sadece katalizördür demek eksik bir tanım olur. Enzim molekülleri hücrelerin diğer hücrelerden farklı olan özelliklerini DNA'dan aktarmadaki en önemli araçtır [22].

Canlı organizmaların hepsinde üretilen ve katalitik RNA molekülleri dışında protein yapısında bulunan enzimler sadece in vivo ortamlarda katalizör olarak kullanılmaz. İn vitro şekilde endüstride katalizör olarak kullanılırlar [23]. Günümüzde yaklaşık olarak 5500 enzim bilinmektedir.

2.1.1. Enzim adlandırması ve sınıflandırma

Enzimlerle yapılan ilk çalışmalarda etki ettikleri substratların adlarının sonuna –az eki getirilmesi sonucu adlandırılmışlardır. Daha sonra gittikçe farklı enzimlerin bulunmasıyla sistematik bir adlandırmaya gerek duyulmuştur. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), 4 rakamdan oluşan bir enzim kodu tanımlamıştır. İlk rakam enzimin sit olduğu grubu, ikinci rakam etkide bulunduğu kimyasal yapıyı, üçüncü rakam akseptörü, son rakam ise enzimin grubundaki sıra numarasını belirler. IUBMB enzimleri altı gruba ayırmıştır [24-27].

- Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzim grubudur.
- Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferini katalizleyen gruptur.
- Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen gruptur. Hidroliz reaksiyonları su katılması ile bağların parçalanması sonucu oluşur.

- Liyazlar: Oksidasyon ve hidrolizden farklı şekilde bağların kırılarak çift bağların oluştuğu reaksiyonları katalizleyen gruptur.
- İzomerazlar: Molekülün yapısal ve geometrik değişikliklerini katalize eden enzim grubudur.
- Ligazlar: enerjisi yüksek iki bağı kopması ile meydana gelen enerjiyle iki molekülün bağlanmasını katalizleyen gruptur.

2.1.2. Enzim spesifikliği

Enzimler canlı hücrelerdeki reaksiyonların normal şartlarda gerçekleşmesi için spesifik katalizörler olarak görev yaparlar. Enzimlerin büyük bir kısmı tek substratlıdır. Sadece bir substrata karşı aktivite gösterir. Bu enzim spesifikliğinden kaynaklanır [24].

Etki spesifikliği enzimin teorik olarak oluşacak ürünlerinden sadece bir ürünü katalizlemesi olarak tanımlanır [24].

Substrat spesifikliği için öncelikle substratın enzim tarafından etkilenecek kimyasal bir bağı olmalıdır. Bir diğer şart olarak enzimin üzerinde substratın aktiflik kazanacak hale gelmesini sağlayan gruplar olmalıdır [28].

2.1.3. Enzim aktivite birimleri

Enzimler, turnover sayısı olarak belirtilen değerle katalizleme güçlerini ifade ederler. Turnover sayısı, bir mol enzimin birim zamandaki ürüne dönüşen substratın mol sayısı şeklinde ifade edilir. Karbonik anhidraz turnover sayısı en yüksek olan enzimdir [29].

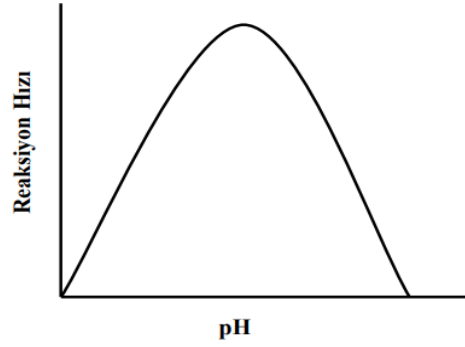
Bir enzimin miktarı, aktiviteleri baz alınarak hesaplanır ve enzim ünitesi (E.Ü) şeklinde ifade edilir. 25⁰C ve optimal şartlarda 1 dakikada 1 mikromol substratın ürüne dönüşmesini sağlayan enzim miktarına 1 enzim ünitesi denir. Enzim saflığının ölçüsü olarak kullanılan bir diğer ifade spesifik aktivitedir. 1 mg proteine karşılık gelen enzim ünitesi şeklinde ifade edilir. Katal, 1 sn'de 1 mol substrata etki gösteren enzim miktarıdır [26].

2.1.4. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesi pH, zaman, sıcaklık, inhibitör, iyonik şiddet, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu gibi faktörler sonucu değişikliğe uğrar.

2.1.4.1. pH

Farklı pH değişimlerine karşı duyarlı olan enzimler, kendileri için uygun olan optimum pH değerinde en fazla aktivitelerini gösterirler. Enzimin yapısında bulunan amino asit ve substratta bulunan iyonik kısmın değişmesi, substratın bağlanması ile birlikte reaksiyonun geręekleşmesinde etkiler. Substratın değişmesi optimum pH'ı da değiştirir. Her enzimde optimum pH aynı olmak zorunda değildir. şekil 2.1'de pH 'ın reaksiyon hızına etkisi gösterilmiştir [30].



şekil 2.1. Reaksiyon hızına optimum pH'ın etkisi

2.1.4.2. Zaman

Enzim reaksiyonlarının hızları zamanla azalır. Enzimlerin belirli bir süre sonucunda inaktive olması ve substratın tükenmesi hızı azaltan sebepler olarak gösterilebilir [31].

2.1.4.3. Sıcaklık

Sıcaklık protein yapısını denatüre ettiği için her ne kadar reaksiyon hızını arttırıcı olsa da enzimlerin etkisini azaltıcı etki gösterir. En yüksek aktivite gösteren sıcaklık optimum olarak adlandırılır. Enzim çalışmalarının büyük bir kısmı 37°C'de yapılmaktadır. Vücut sıcaklığında enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı 37°C olabileceği için bu değer kabul edilmektedir. Biyokimya Birliği'nin tavsiye ettiği çalışma sıcaklığı başlarda 25°C olmasına rağmen yüksek sıcaklığa sahip iklimlerde enzimin saklanma problemi olabileceği için bunu 30°C olarak güncellemişlerdir. Bununla birlikte hala enzimler için kesin bir çalışma sıcaklığı belirlenememiştir. Bunun nedeni enzimlerin protein yapılarındaki farklılıklardan kaynaklı olmasıdır [30].

2.1.4.4. İnhibitör

Enzim aktivitelerinin azaltılıp ve hatta yok edilmesi reaksiyonlarına inhibisyon denir. Bu reaksiyonları geręekleřtiren bileşikler ise inhibitör olarak adlandırılır. Biyolojik sistemlerin kontrolü için önmeli olan inhibisyon olayı kontrollü bir şekilde

ilerlemelidir. Zehirli bileşik ve ilaçlar inhibisyon ile etkilerinin gösterirler. Enzimatik inhibisyonlar dönüşümsüz ve dönüşümlü şeklinde olabilirler [32].

2.1.4.5. Enzim Konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi kadar yetecek oranda substrat bulunuyorsa, enzimin konsantrasyonu reaksiyon ile orantılı olarak artar. Enzim molekülü sayısı reaksiyon hızını belirler. Ne kadar fazlaysa o kadar hızlı reaksiyon gerçekleşir.

2.1.4.6. Substrat Konsantrasyonu

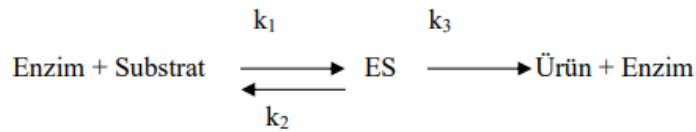
Substrat konsantrasyonu ne kadar düşükse reaksiyon hızı o kadar yavaş ilerler. Substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyonun hızı da artar. Yüksek konsantrasyonlarda reaksiyon hızının belirli bir süre arttığı ve daha sonra sabitlendiği belirtilmiştir [30].

2.1.4.7. Fiziksel Faktörler

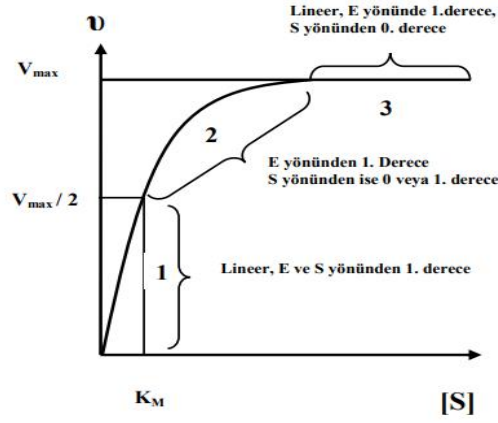
Enzimler şiddetli çalkalanma, ışınlar gibi fiziksel etkenlerden etkilenirler. Mavi ve kırmızı ışınlar bazı enzimleri aktive ederken, röntgen ışınları inhibe ederler. Protein yapısında olan enzimler çalkalanma sonucu denatüre olurlar ve yapıları bozulur [33].

2.1.5. Enzim kinetiği

1913 yılında Michaelis- Menten tarafından yapılan çalışmalar sonucunda enzim kinetiği ile ilgili ilk çalışmalar ortaya atılmıştır. Bu çalışmaya göre önce enzim ve substrat reaksiyona girerek enzim-substrat kompleksini meydana getirir ve enzim bu substratı ürüne dönüştürerek enzim ve ürün oluşturur.



Bu denklemde k_1 es kompleksinin oluşma hızını belirtir. k_2 ES'nin geri ayrışma hızını, k_3 ise ürün ve enzim oluşma hızını belirtir. Michaelis-Menten'e göre enzimin başlangıç derişimi sabit alınır ve substrat derişimine bağlı reaksiyon hızı incelenir. Oluşan eğri ile (Şekil 2.2.) Michealis-Menten denklemi bulunur [34].



Şekil 2.2. Michealis-Menten grafiği

$$V = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Yukarıda verilen Michealis-Menten denkleminde; K_m enzimin substrata ilgisinin göstergesidir. Maksimum hızın yarısını veren substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır. V_{max} ise maksimum hızdır. Enzim aktivitesini bu iki sabit belirler [35].

2.1.6. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak 2 gruptur.

Dönüşümlü inhibisyon kendi içinde 4 temel gruba ayrılır. Bu inhibisyon türünde enzim tekrar kullanılabilir. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon; K_m değeri artar ve enzimin substrata olan ilgisi azalır. İnhibitör substrattan önce enzimin aktif merkezine bağlanmış olur. Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon; substratve inhibitör farklı bölgelerden enzime bağlandığı için K_m değerinde bir değişme olmaz sadece V_{max} değerinde azalma meydana gelir. Yarı yarışmalı (un-kompetitif) inhibisyon; İnhibitör enzim substrat kompleksine bağlanır ve böylece substrat ile aktif bölge için bir yarış haline girmez. K_m ve V_{max} azalır. Karışık (mixed) inhibisyon; İnhibitör hem enzim substrat kompleksine hem de direkt enzimin aktif bölgesine bağlanarak yeni bir kompleks oluşturabilir. Bu durumda V_{max} azalırken K_m artar.

Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzimin aktif bölgesine kovalent bağ ile bağlandığı için geri dönüşümü olmayan kompleks oluşturur [36].

2.2. Antioksidan Enzimler

Antioksidanlar, ROS oluşumu ve ortaya çıkardıkları hasarların kaldırılması için vücutta gelişen savunma mekanizmalarıdır [37]. Radikalleri kendilerine bağlama, daha zayıf bir moleküle çevirme ya da ROS'lara hidrojen iyonu verme şeklinde reaksiyonlar göstererek etkileri ortadan kaldırmaya çalışırlar [38]. Biyolojik sistemlerde peroksidaz (POD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz enzimleri antioksidan özelliğe sahiptirler. Bu enzimler doğrudan ya da dolaylı yollardan etki göstererek serbest radikalleri engellerler. POD ve CAT enzimleri doğrudan etki gösteren enzimlerdendir [39].

H₂O₂ reaktif bir türdür ve hücre membranından çok rahat bir şekilde geçebilir. 50 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hayvan, bitkive bakteri kültürlerinde zararlı etkilere sahiptir. Bu sebeple hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu işlem ise CAT ve POD enzimleri ile yapılmaktadır [40-41].

2.3. Peroksidaz Enzimi

Peroksidaz enzimi ((POD) EC 1.11.1.7), hidrojen peroksitli ortamda flavonoidler, fenoller, , sülfonoidler, aromatik aminler ve pirogallol gibi birçok substratın oksidasyonunu katalize eden bir oksidoredüktaz grubu enzimidir [42-43]. POD bitki, hayvan, bakteri ve mantarlarda bulunan bununla birlikte bitki gelişimi için gerekli olan hücre duvarında fazlaca yer alan bir enzimdir [44-45].

POD enzimleri, H₂O₂ kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu ve hidrokinonların, fenollerin, hidrokinoid aminlerin ve diğer aromatik bileşiklerin dehidrojenasyonunu katalize eder. Katalitik moleküllerin örnekleri; guaiacol, o-dianisidine, pyrogallol, azo boya türevleri, o-fenilendiamin sayılabilir [44-45].

POD'un bitki savunma mekanizmaları [46], meyve ve sebzelerde indolasetik asit regülasyonu [47], hormon aktivitesi [58] ve lignin biyosentezi [42] gibi önemli işlevlerde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. POD, bitkisel gıdalarda bol miktarda bulunur [49]. Bitkilerde POD çiçeklerde, gövdelerde, yapraklarda, hücre çekirdeklerinde, hücre zarlarında, ribozomlarda ve hücre duvarlarında bulunur [50,51].

Peroksidaz substratları bazı özelliklere sahip olmalıdır. Bunlar kimyasal dayanıklılığın fazla olması, suda yüksek çözünürlükte olması ve kansorejen etkşye sahip olmaması gibi özelliklerdir [52].

2.3. Katalaz Enzimi

Katalaz enzimi (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz E.C.1.11.1.6) doğada çok yaygındır. Hemen hemen tüm aerobik mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Bir katalaz oksidoredüktaz grubu olan hidroperoksidazlar sınıfına aittir. Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit ve organik peroksitleri kullanır [53-55].

Wieland 1927'de katalazın oksidasyon mekanizmasını netleştirdi ve H_2O_2 'nin elektron donörü olduğunu keşfetti. Stern, 1936'da katalazın aktif bölgesinin aktif grup protoporfirin IX olduğunu gösterdi, ancak bir yıl sonra Summer ve Dounca, bir kristal olarak ilk sığır karaciğer katalazını (BLC) elde etmeyi başardı. 1947'de Chance, katalaz ve hidrojen peroksit arasında oluşan ilk kompleksi (bileşik I) keşfetti. Katalaz, aktif bölgesinde bir hem grubu (protoporfirin IX halkası) içerir. Çeşitli kaynaklardan gelen katalaz moleküllerinin çoğu, her iki prostetik grubu içerirken, bazı mantar ve bakteri katalazlarının her ikisi de d grubu içerir. Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalize eden ve böylece hidrojen peroksitin hücre bağlantılarına zarar vermesini önleyen koruyucu bir enzimdir.

Ağartma işleminin temel amacı istenmeyen renk safsızlıklarını pamuktan uzaklaştırmaktır. Bunu çözmek için, oksitleyici ağartıcı kullanır. En önemli oksidatif ağartma maddelerinden biri olan hidrojen peroksit, ağırlıklı olarak pamuklu ürünlerin ağartılmasında kullanılmaktadır. Pamuktaki tüm yabancı maddelerin oksidasyonu tamamlandıktan sonra H_2O_2 ortamda kalır ve kasar devam ederse liflere zarar vermeye devam eder. Kumaşın H_2O_2 ile ağartılmasından sonra ve boyamadan hemen önce, H_2O_2 'nin uzaklaştırılması için yaygın bir yöntem su ile yıkamadır. Katalaz enzimi, H_2O_2 içeren yıkama suyundaki H_2O_2 'yi parçalamak ve yıkama suyunu sisteme geri döndürmek için kullanılabilir [56].

Katalaz enzimi kontakt lens hijyeninde ve H_2O_2 solüsyonları ile lens dezenfeksiyonunda kullanılır. Bir katalaz enzim solüsyonu, kontak lens yeniden kullanılmadan önce H_2O_2 'yi ortamdan güvenilir bir şekilde uzaklaştırır [57]. UV ışınları serbest radikallerin oluşumunu hızlandırır. Serbest radikaller ise cilde zarar verir ve cilt kalitesinin bozulmasına neden olur. Antioksidan moleküller çeşitli etkiler gösterir ve oksidasyonun neden olduğu cilt hasarını azaltır. Katalaz enzimi son zamanlarda H_2O_2 ve enzimlerden oluşan çeşitli yüz maskesi uygulamalarında ve

epiderminin üst katmanlarında hücrel oksidasyonu artırarak vitiligo tedavisinde kullanılmaktadır [58, 59].

Katalaz enzimi, kağıt endüstrisinde, ağartma işleminden sonra kalan H_2O_2 'yi uzaklaştırmak için kullanılabilir ve H_2O_2 , reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve şişirici bir madde olarak kullanılır [60]. Katalaz enzimi glukoz oksidaz (GOD) ile birlikte glukonik asit üretmek ve gıdadan glukoz veya oksijeni uzaklaştırmak için kullanılabilir [61]. Meyve suları gibi çeşitli numunelerde azit içeriğinin belirlenmesi için biyosensör yapımında kullanılabilir [62].

2.4. Yoğurt Otu

Yoğurt otu (*Galium aparine*), Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'ya da yetişen bir tırmanma bitkisidir. *G. aparine* aktif bileşenleri, alkanlar, flavonoidler, antrakinonlar, polifenolik asitler, tanenler, iridoidler ve C vitamindir. *G. aparine*'nin lenf şişlikleri, bademcik iltihabı, sarılık, kanser, ateş, ve lösemi tedavisinde kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır [63].

Boyu 150 cm'ye kadar uzayabilen çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.3.). Sap kısmının üzeri sert tüylerle kaplıdır ve bu sayede diğer bitkilere tutunarak uzamaya devam eder. Yapraklardan 6-9 adeti sap kısmını sararak bir boğum oluşturur. Yapraklar koyu yeşil renkte ve tüylerle kaplıdır. Çiçekleri beyaz ve 2 mm genişliğine sahiptir. Tohumlar yaklaşık 4-6 mm civarında ve tüylüdür. Yaklaşık çimlenme sıcaklığı 7-13°C dir ve toprağın 1-5 cm kadar derinliğinde çimlenir. Toprak üstünde kalan kısım çimlenme gösteremez [64].



Şekil 2.3. Yoğurt otu

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Vortex	: Heidolp Reaxtop
Derin Dondurucu	: Uğur UD 100BK
Santrifüj Cihazı	: Nüve NF 200
pH Metre	: Lab 850 SCHOTT
Hassas Terazı	: ATX 220 SHIMADZU
Buzdolabı	: Beko
Spektrofotometre	: SHIMADZU UV-2600
Mikropipetler	: Brand Transferpette® S 200 ve 1000 µL'lik
Su Banyosu	: Nüve Nb20
Blender	: Hotmix 2155 Beko
Protein Elektroforezi	: P8DS Owl Thermo Scientific
Isıtıcı	: MSH-20A DAIHAN

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmamızda enzim kaynağı olarak yoğurt otu (*Galium aparine.*) bitkisi seçilmiş, POD ve CAT enzimlerinin izolasyonu ile kısmi saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Triton X-100, polivinil pirolidin (PVP), askorbik asit (AsA), sodyum dihidrojen fosfat disodyum hidrojen fosfat, t-bütanol, amonyum sülfat, asetik asit, etanol, SDS (sodyumdodesilsülfat), bromofenol mavisi, Coomassie Brilliant G-250 ve kullanılan diğer kimyasallar Merck ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edildi.

3.2. Peroksidaz (POD) ve Katalaz (CAT) Enzimlerinin İzolasyonu

3.2.1. Ham enzim ekstarktının hazırlanması

Enzim kaynağı olarak kullanılan yoğurt otu bitkisi Sakarya bölgesinden taze olarak toplanmış ve -20 °C’de depolanmıştır. -20 °C’de depolanan yoğurt otu 8gr tartılarak küçük parçalara ayrılmıştır. %0,01 (w/v) askorbik asit içeren 40 ml 0,1M pH: 7.0 fosfat tamponu içinde blender ile homojenleştirilme işlemi yapılmıştır. % 0,5 (w/v) PVP ve 0,5 ml Triton X-100 eklenerek 10 dk daha homojenleştirme işlemine devam edildi. 4 kat tülbent bezinden süzildükten sonra 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısmı ham enzim ekstarktı olarak kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.2. Üçlü faz ayırma tekniği

Üç fazlı ayırma yöntemi için enzim ekstarktına t-bütanol ve amonyum sülfat belirli miktarlarda eklenerek çöktürme yapılmıştır. % 30 ve % 90 oranları arasında amonyum sülfat tartılarak ham enzim ekstraktlarına eklenmiştir. Amonyum sülfat katısı eklenirken işlemin yavaş yavaş yapılmasına dikkat edilmiştir. Ham enzim ekstraktları istenilen doygunluğa getirildikten sonra 1:1 (v/v) oranında t- bütanol ilavesi yapılmıştır. Tüpler ters düz edilip tam bir karışma sağlanmıştır. 25 °C’de 1 saat inkübasyon sonrasında 4500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra karışım 3 faza ayrılmıştır. Organik faz olan üst faz (t-bütanol) pipet ile ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Ara ve alt faz ayrılarak ara fazın 1 ml pH’sı:7 0,1 M fosfat tamponunda çözülmesi sağlanmış ve aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.3. Bradford yöntemi ile protein tayini

1 mg/ml BSA standart protein olarak kullanılmış ve standart grafiği elde edilmiştir. Stok BSA çözeltisinden 20, 40, 60, 80 ve 100 µl alınarak Bradford ile 1000 µl’ye tamamlanmıştır. 10 dk’lık inkübasyondan sonra 595 nm’de absorbans ölçümü yapılmış ve konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.4. SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi)

SDS uygulaması Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de gösterildiği gibi %15’lik ayırma jeli ve % 5’lik yükleme jeli kullanılarak yapılmıştır. Ayırma ve yükleme jelleri hazırlanırken belirtilen sıraya göre temiz bir behere kimyasallar eklenir. TEMED polimerleşme sağladığı için karışıma en son eklenmelidir. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra iki cam plaka arasına yükleme yapılır. Üst kısma propanol eklenerek ayırma jelinin

polimerleşmesi beklenir. 15 dk sonra propanol bir süzgeç kağıdı yardımıyla çekilir. Hazırlanan yürütme jeli üst kısma yüklenir ve taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirilir. Taraklar numune yüklenecek kuyucukların oluşmasını sağlar. 15 dk sonra taraklar çıkartılır ve önceden hazır hale getirilmiş olan enzim numuneleri yüklenir.

Tablo 3.1. % 15'lik Ayırma jeli

Kimyasallar	Miktar
1,5 M Tris HCl (pH:8,8) Tamponu	2,6 mL
% 10 SDS	0,1 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	5 mL
Destile Su	2,2 mL
% 10 APS	0,1 mL
TEMED	10 µL

Tablo 3.2. %5'lik yürütme jeli

Kimyasallar	Miktar
1 M Tris HCl (pH:6,8) Tamponu	1,25 mL
% 10 SDS	0,05 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL
Destile Su	2,975 mL
% 10 APS	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

Enzim çözeltisinin yüklemeye önce denatüre edilmesi gerekir. Denatüre işlemi yükleme tamponu ile gerçekleştirilir (Tablo 3.3). Enzim çözeltisi 1:1,5 oranında yükleme tamponu ile karıştırılarak 15 dk 95 °C ' de inkübe edilir.

Tablo 3.3. Yükleme tamponu

Kimyasallar	Miktar
1 M Tris-Base (pH:6,8)	0,9 mL
% 10 SDS	4,5 mL
Destile Su	2,1 mL
Gliserol	3,75 mL
Bromofenol Blue	6 mg

Hazırlanan cam plakalar arasındaki jel SDS tankına yerleştirildikten sonra tanka yürütme tamponu eklenir. Yürütme tamponu Tablo 3.4'de görüldüğü gibi hazırlanır. Cam plakalar arasından tarak çıkartılır ve kuyucuklara denatüre edilmiş enzim koyulur. Karşılaştırma yapılabilmesi için bir kuyucuğa Marker konulur.

Tablo 3.4. Yürütme tamponu

Kimyasallar	Miktar
Tris-Base	9 g
Glisin	48,3 g
SDS	3 g

3.3. Yoğurt Otu Bitkisinden POD ve CAT Karakterizasyonu

3.3.1. POD aktivite tayini

POD aktivite tayini için pH 7,0 0,1 M fosfat tamponu, 25 mM H₂O₂ ve 50 mM 4-metilkatekol ve enzim ekstarktı kullanılmıştır. 60 sn 420 nm’de spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü gerçekleştirilmiş ve ölçümler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. Substrat spesifikliğı, sıcaklık, pH, enzim aktivitesi tayinlerinde de bu yöntem kullanılmıştır.

3.3.2. POD substrat spesifikliğı

Pirogallol, 4-metilkatekol, gallik asit, kafeik asit ve o-fenilendiamin substratları ile substrat spesifikliğı test edilmiştir. Hidrojen peroksit sabit tutularak değışen konsantrasyonlarda substratlar ile tayin gerçekleştirilmiştir. K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış ve substratlar arasından karşılaştırma yapılmıştır.

3.3.3. Sıcaklığın POD enzim aktivitesine etkisi

Optimum sıcaklık belirlenmesi için 5 ile 90 °C arasında değışen sıcaklıklarda enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Tayin yukarda belirtildiğı şekilde gerçekleştirilmiştir. Düşük sıcaklıklardan başlanarak enzim su banyosunda ısıtılarak istenilen sıcaklığa getirilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. pH’ın POD enzim aktivitesine etkisi

Hidrojen peroksit substratı sabit alınarak değışen konsantrasyonlarda 4-metilkatekol substratı kullanılarak pH 3,0 ve pH 9,0 arasında enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümü 420 nm’de spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması;

pH 3,0-5,5 tamponları için sitrik asit monohidrat (1.çözelti) ve sodyum sitrat (2.çözelti) kullanılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. 0,1 M sitrik asit tamponunu

pH	1. çözelti (mL)	2. çözelti (mL)
3,5	15	10
4,0	25	20
4,5	25	28
5,0	15	30
5,5	10	35

pH 6,0-7,5 tamponu için fosfat tamponundan yararlanılmıştır.

pH 8,0-9,0 tamponları için Trizma HCL (1.çözelti) ve Trizma Base (2.çözelti) çözeltileri kullanılmıştır. Tamponlar Tablo 3.6'da gösterilen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir.

Tablo 3.6. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması

pH	1. çözelti (mL)	2. çözelti (mL)
8,0	45	42
8,5	15	27
9,0	6	40

3.3.5. POD Enzim kinetiği

Enzim kinetiği 0,5 mM ve 5 mM arasında değişen substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. 5 farklı substrat ile enzim kinetiği 420 nm 60 sn'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) ile enzimin maximum hızı (V_{max}) belirlenmiştir. Micheales- Menten eşitliğinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiğinden bu değerler hesaplanmıştır.

3.3.6. CAT aktivite tayini

CAT enzim aktivitesi için 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu ve 100 mM hidrojen peroksit substratı kullanılmıştır. 180 sn 240 nm'de absorbans değişimi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçüm yapılırken kuvartz küvet kullanılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.7. CAT aktivitesine sıcaklığın etkisi

Optimum sıcaklık belirlenmesi için 5 ile 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Tayin 180 sn 240 nm'de absorbans değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Düşük sıcaklıklardan başlanarak enzim su banyosunda ısıtılarak istenilen sıcaklığa getirilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.8. CAT aktivitesine pH'nin etkisi

Hidrojen peroksit substratı kullanılarak pH 3,0 ve pH 9,0 arasında enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümü 240 nm'de spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Uygun pH tamponları Tablo 3.5 ve 3.6' verildiği gibi hazırlanmıştır.

3.3.9. CAT enzim kinetiği

H₂O₂ substratının 2,5 ve 20 mM konsantrasyon aralığında absorbanslarının 240 nm 180 sn'de azalmasının ölçülmesi ile enzim kinetiği belirlenmiştir. Micheales- Menten eşitliğinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

3.3.10. POD VE CAT aktiviteleri üzerine çeşitli madde etkileri

3.3.10.1. İnhibitör etkisi

POD ve CAT enzimlerinin aktivitelerine inhibitörlerin etkisinin incelenmesi için tiyoüre ve sodyum azid inhibitörleri seçilmiştir. Her bir enzim ve inhibitör için IC₅₀ değerleri belirlenerek inhibisyon türü tayin edilmiştir.

POD enzimine inhibitör etkisinin incelenmesi için 100 µL sabit enzim, 1 Mm hidrojen peroksit ve 3 mM 4-metilkatekol üzerine farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilavesi yapılarak aktivite ölçümü tekrarlanmıştır.

CAT enzimine inhibitör etkisinin incelenmesi için ise 20 mM hidrojen peroksit ve 100 µL ham enzim ekstraktı üzerine çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör eklenerek 240 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3.10.2. Metal etkisi

POD ve CAT enzimlerine metallerin etkisinin tayin edilmesi için farklı metallere farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Bunun için FeCl₃, CuCl₂, MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, BaCl₂, CaCl₂, PbCl₂, HgCl₂, CdCl₂ metallerinin 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlu çözeltileri hazırlanmıştır. Her metalin çözeltisi sabit oranda enzimle birlikte 1saat inkübasyona bırakılmıştır. POD enzimine etkisi için metalli enzim çözeltisi 4-metilkatekol ve H₂O₂ substratları ile 420 nm'de, CAT enzimine etkisi için ise metalli enzim çözeltisi H₂O₂ substratı ile 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. % kalan aktivite oranları ise metalsiz ve metalli aktivitelerin karşılaştırılması ile belirlenmiştir.

3.3.10.3. Solvent etkisi

DMSO, DMF, etanol, aseton ve t- bütanol çözücülerinin POD ve CAT enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. % 5 - % 30 aralığında değişen oranlarda solventler hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi tayini adımları takip edilerek belirtilen oranlarda solvent eklemesi ile aktivite tayini tekrarlanmıştır. POD enzimi için 420 nm'de 60 sn, CAT enzimi için ise 240 nm'de 180 sn absorbans değişimi gözlemlenmiş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

3.3.10.4. POD ve CAT enziminin tuz toleransı

1 ile 5 mM arasında değişen tuz çözeltisi ile POD ve CAT enzimleri 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra POD ve CAT enzimleri için ayrı ayrı spektrofotometrik olarak absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

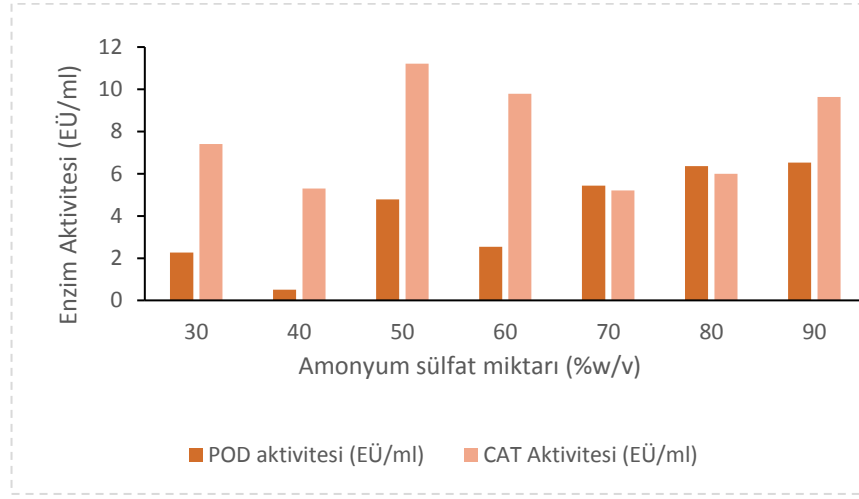
3.3.10.5. POD ve CAT enzimlerine iyonik şiddet etkisi

1 ile 5 mM arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl çözümleri ile muamele edilen POD ve CAT enzimlerine aktivite tayini yapılmıştır. POD için sabit miktarda enzim ve substrata değişen oranlarda tuz çözeltisi eklenmiş ve aktivite değişimi 420 nm'de gözlemlenmiştir. CAT için ise sabit miktarda H₂O₂ substratı ve sabit enzim üzerine değişen aralıklarda NaCl çözeltisi eklenmiş ve 240 nm'de absorbans değişimi izlenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. POD ve CAT Enzimlerinin Üçlü Faz Ayırma ile Saflaştırılması

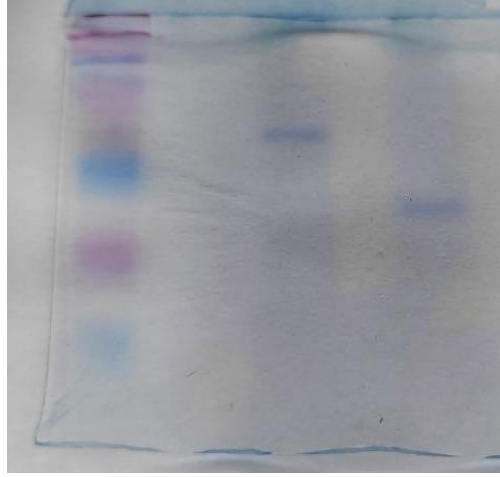
POD ve CAT enzimlerinin belirtilen amonyum sülfat doygunlukları sonucu aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. POD için en iyi aktivite sonucu %80 amonyum sülfat doygunluğunda, CAT için ise %50 doygunlukta bulunmuştur. Tüm sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Üç Fazlı Saflaştırma sonucu POD ve CAT aktiviteleri

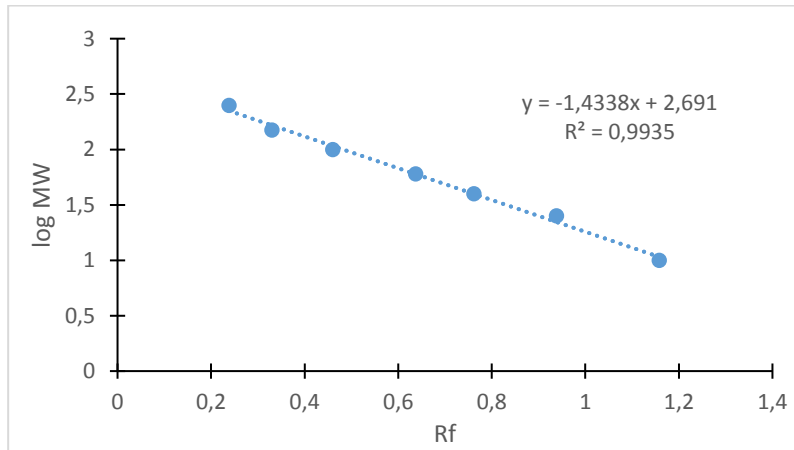
4.2. SDS-PAGE ile Enzimlerin Safılık Kontrolü

Bölüm 3.2.4.'de anlatılan SDS protokolü sonucunda POD enzimi için %80, CAT enzimi için ise %50 doygunlukta saflaştırılan enzimlerin molekül ağırlıkları tespit edilmiştir. Rf-log MW grafiği ile POD enziminin molekül ağırlığı 65 kDa, CAT enziminin ise 50 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SDS-PAGE sonucu jel görünümü

SDS-PAGE işlemi sonunda oluşan jel üzerinde Markerda bulunan proteinlerin ve enzimlerin uzaklıkları ölçülmüş ve Rf değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.3’de belirtilen Rf-log MW grafiği ile POD ve CAT enzimlerinin molekül ağırlıkları tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Standart Rf – log MW grafiği

4.3. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

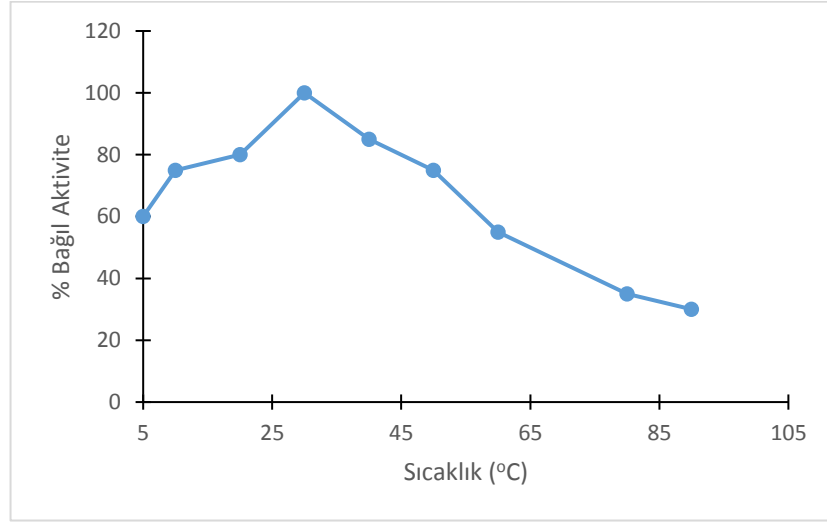
Yoğurt otu bitkisinin Bradford yöntemi sonucu protein miktarı belirlenmiştir. Yoğurt otunun 100 µl ham ekstraktında 0,146 mg/ml protein tespit edilmiştir.

4.4. POD Enzimi Karakterizasyonu

4.4.1. POD enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi

5 ile 90 °C aralığında değişen sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Substrat olarak 4-metilkatekol ve hidrojen peroksidad kullanılmıştır. Absorbans ölçümü 3

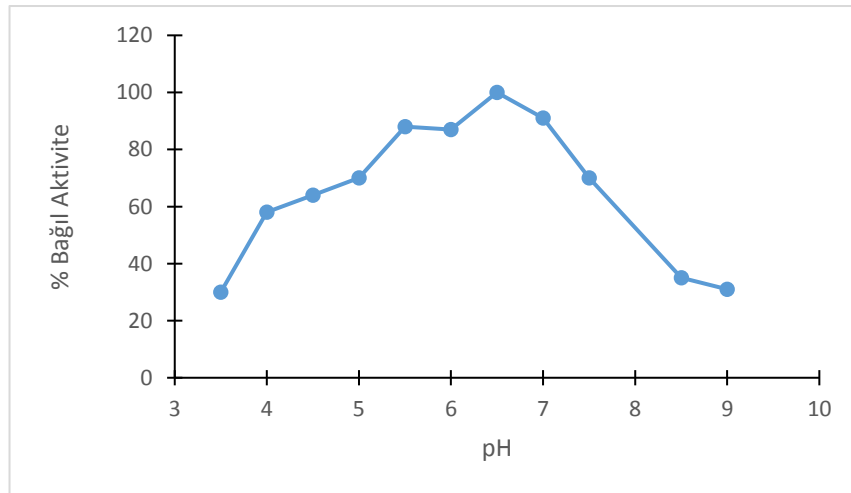
tekrarlı şekilde 60 sn 420 nm’de gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığa karşı % bağıl aktivite grafiği Şekil 4.4’ te verilmiştir. Optimum sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. POD optimum sıcaklık

4.4.2. POD enzimi aktivitesine pH etkisi

pH 3,5 ve 9 arasında değişen tampon çözeltiler ile ortam pH’ı istenilen değere getirilerek aktivite ölçümü yapılmıştır. H₂O₂ ve 4-metilkatekol substratı kullanılarak 420 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. % bağıl aktivitenin pH karşısında değişimi Şekil 4.5’te verilmiştir. Yoğurt otunun optimum pH’ı 6,5 olarak belirlenmiştir.

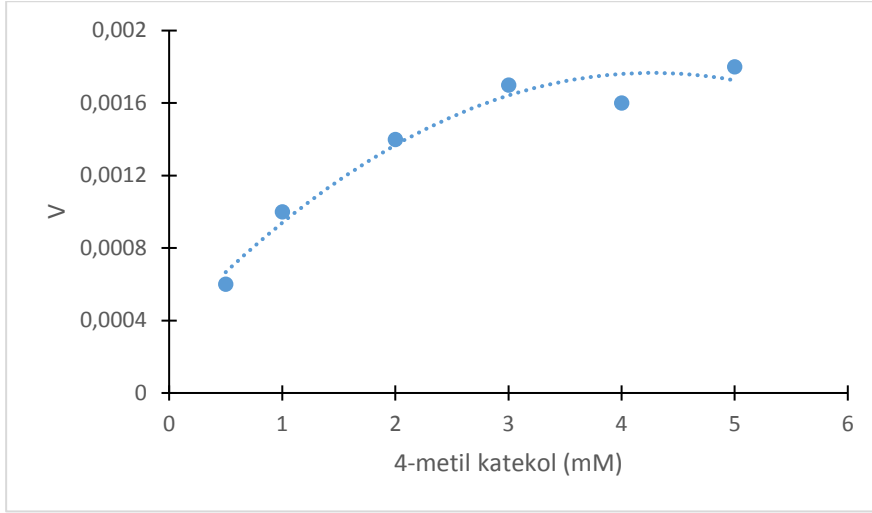


Şekil 4.5. Optimum pH grafiği

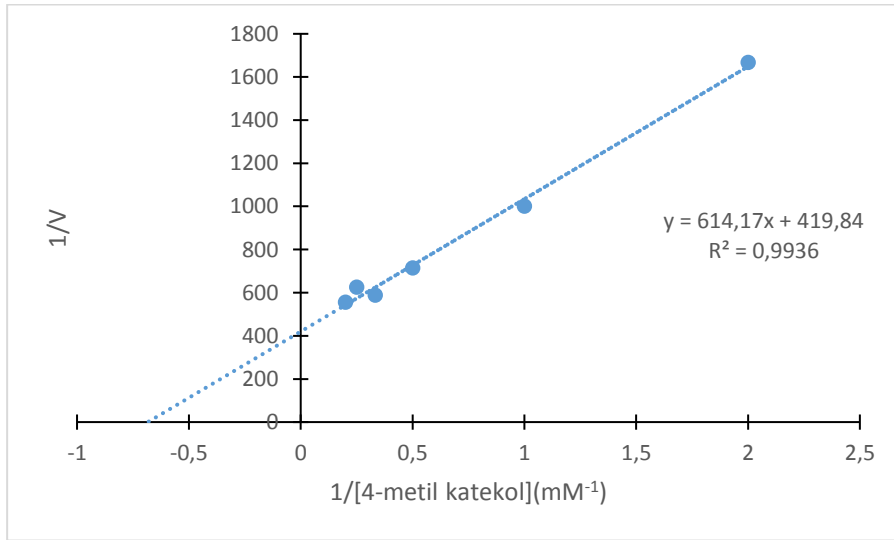
4.4.3. POD enzim kinetiği

Peroksidaz enzim kinetiği 5 farklı substrata karşı (4-metilkatekol, kafeik asit, pirogallol, gallik asit ve o-fenilendiamin) sabit hidrojen peroksit ile tayin edilmiştir.

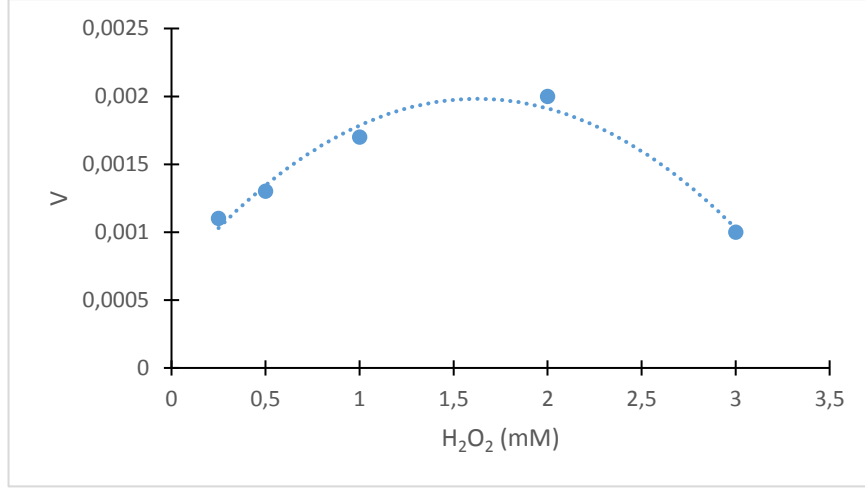
Daha sonra 5 substrat sabit tutularak değişen hidrojen peroksit konsantrasyonlarında tekrar ölçüm yapılmıştır. Ölçümlere ait grafikler Şekil 4.6-25 arasında verilmiştir. Her ölçüm için Micheales-Menten grafiği ile doğunluk eğrileri belirlenmiş ve Lineweaver-Burk garfiği ile de V_{max} ile K_m değerleri hesaplanmıştır. Substrat spesifikliği sonuçları Tablo 4.1' de gösterilmiştir.



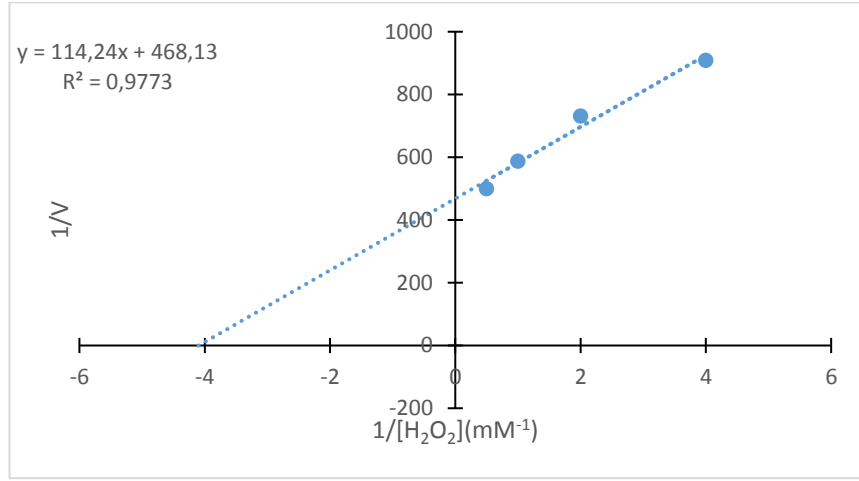
Şekil 4.6. Sabit H_2O_2 , farklı 4- metilkatekol konsantrasyonlarında 4-metilkatekolün doğunluk eğrisi



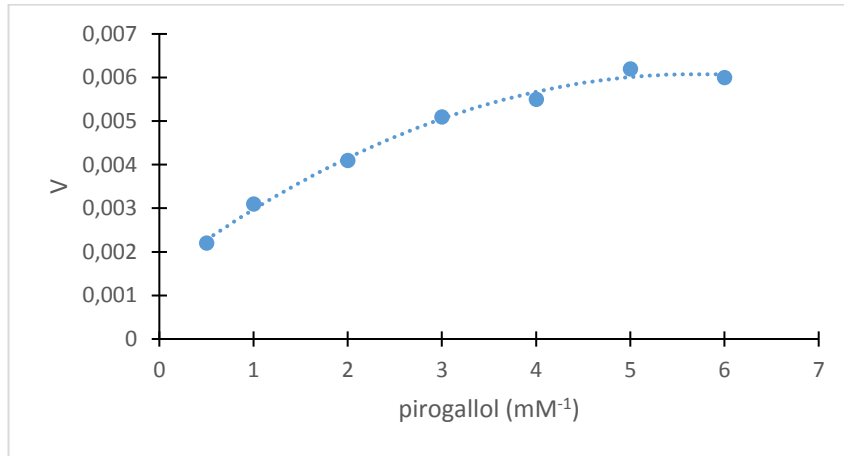
Şekil 4.7. Sabit H_2O_2 , farklı 4- metilkatekol konsantrasyonlarında 4-metilkatekolün Lineweaver-Burk grafiği



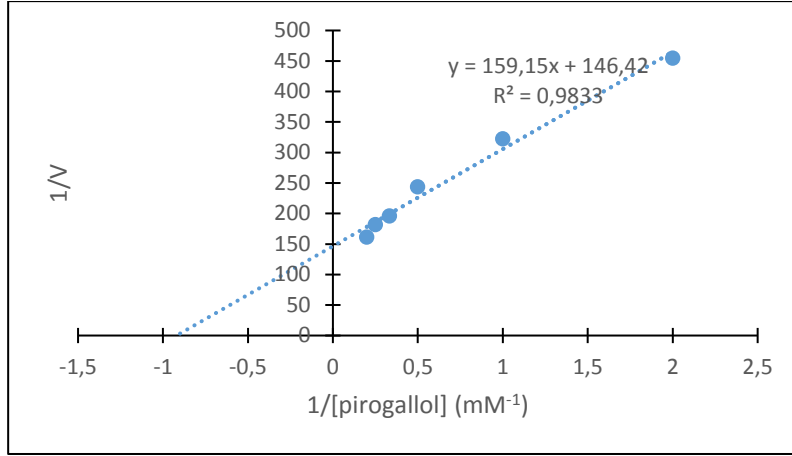
Şekil 4.8. Sabit 4- metilkatekol, farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında H₂O₂ doygunluk eğrisi



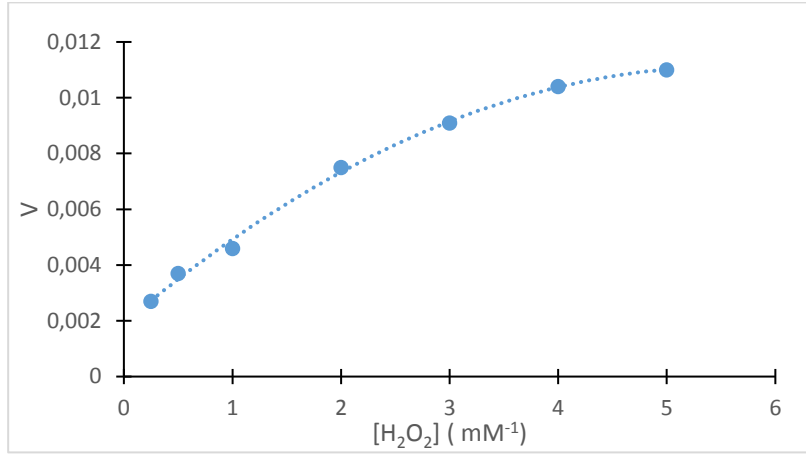
Şekil 4.9. Sabit 4- metilkatekol, farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında H₂O₂'nin Lineweaver-Burk grafiği



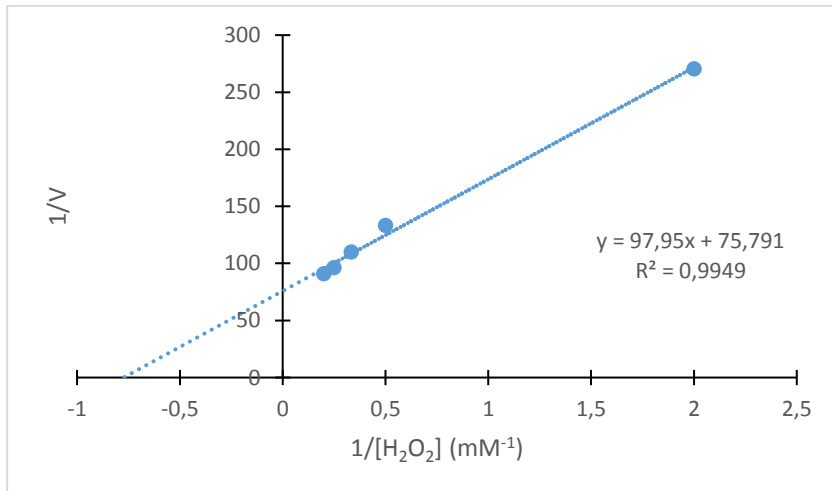
Şekil 4.10. Sabit H₂O₂, farklı pirogallol konsantrasyonlarında pirogallülün doygunluk eğrisi



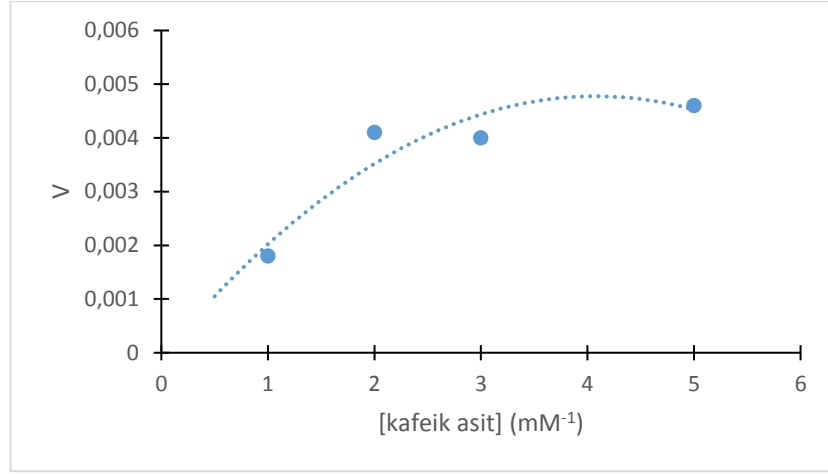
Şekil 4.11. Sabit H_2O_2 , farklı pirogallol konsantrasyonlarında pirogallolün Lineweaver-Burk grafiği



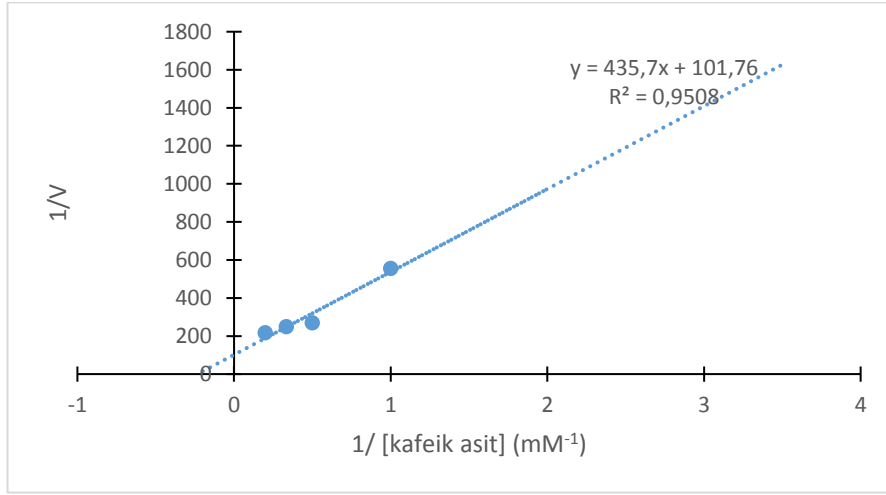
Şekil 4.12. Sabit 4- pirogallol, farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 doygunluk eğrisi



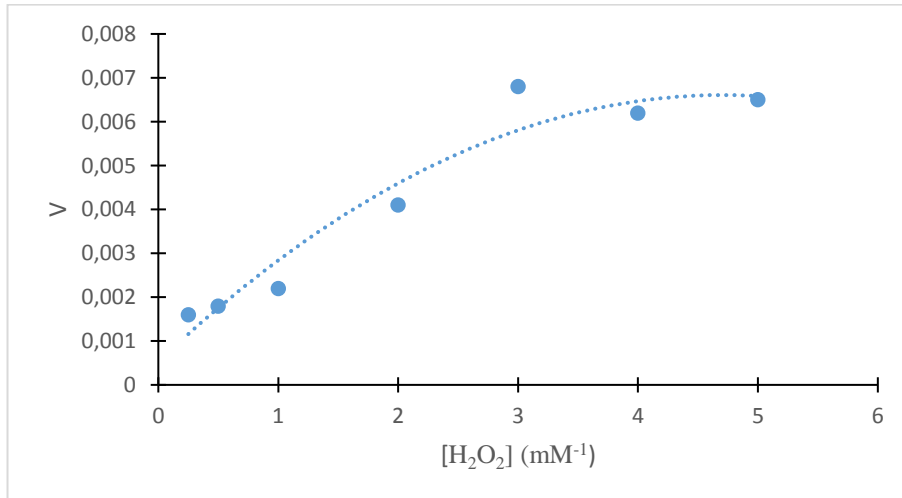
Şekil 4.13. Sabit 4- pirogallol, farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 'nin Lineweaver-Burk grafiği



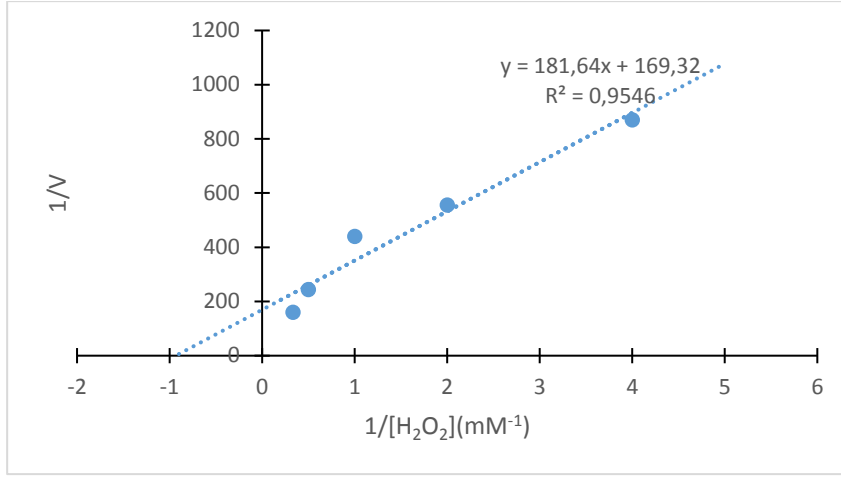
Şekil 4.14. Sabit H_2O_2 , farklı kafeik asit konsantrasyonlarında kafeik asit doygunluk eğrisi



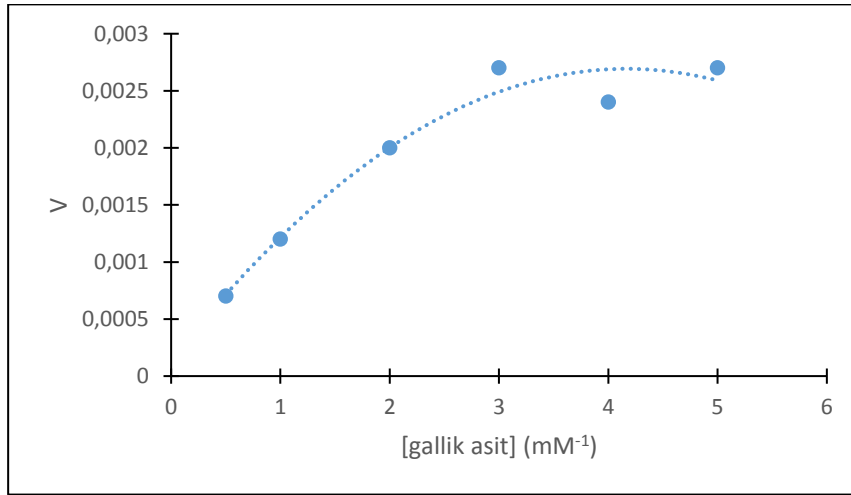
Şekil 4.15. Sabit H_2O_2 , farklı kafeik asit konsantrasyonlarında kafeik asitin Lineweaver-Burk grafiği



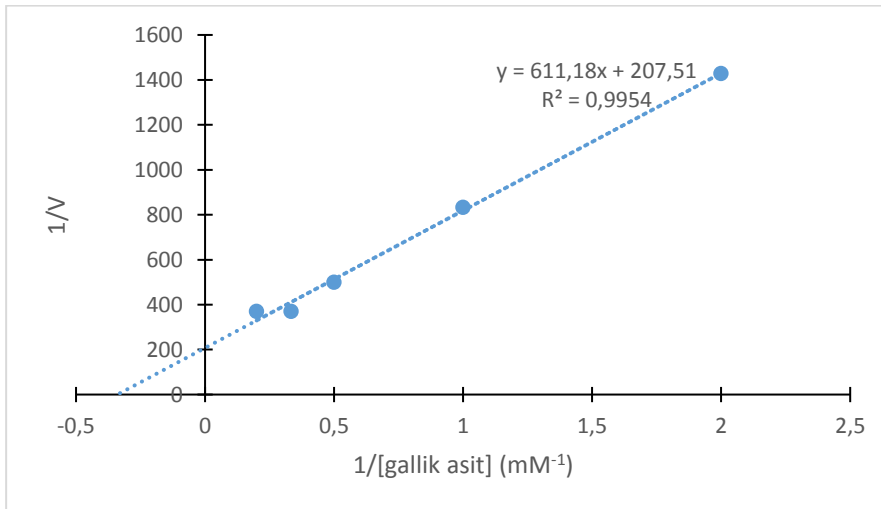
Şekil 4.16. Sabit kafeik asit farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 doygunluk eğrisi



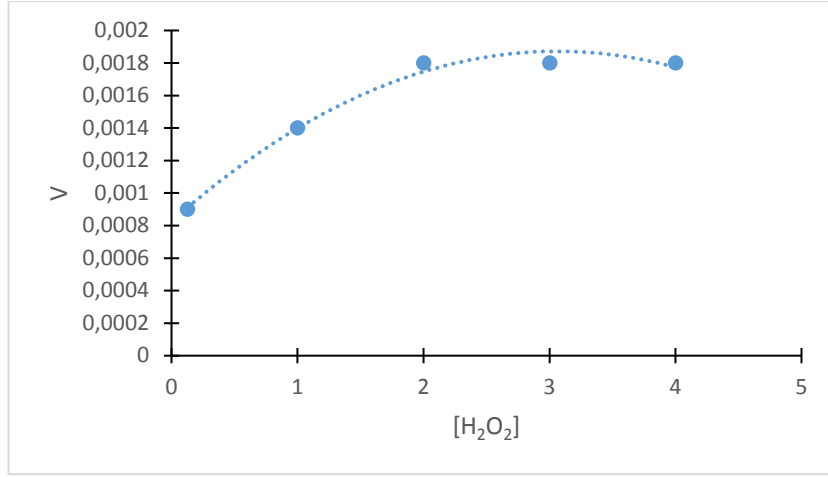
Şekil 4.17. Sabit kafeik asit , farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 'nin Lineweaver-Burk grafiği



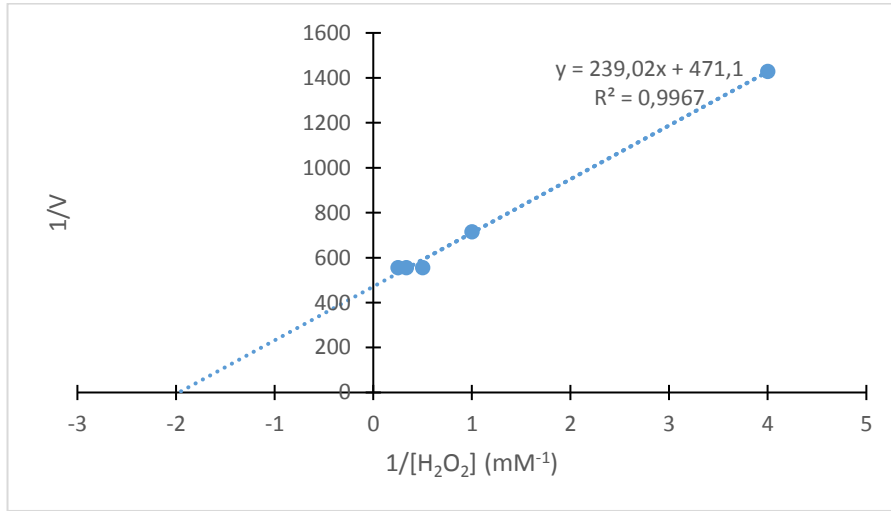
Şekil 4.18. Sabit H_2O_2 , farklı gallik asit konsantrasyonlarında gallik asit doygunluk eğrisi



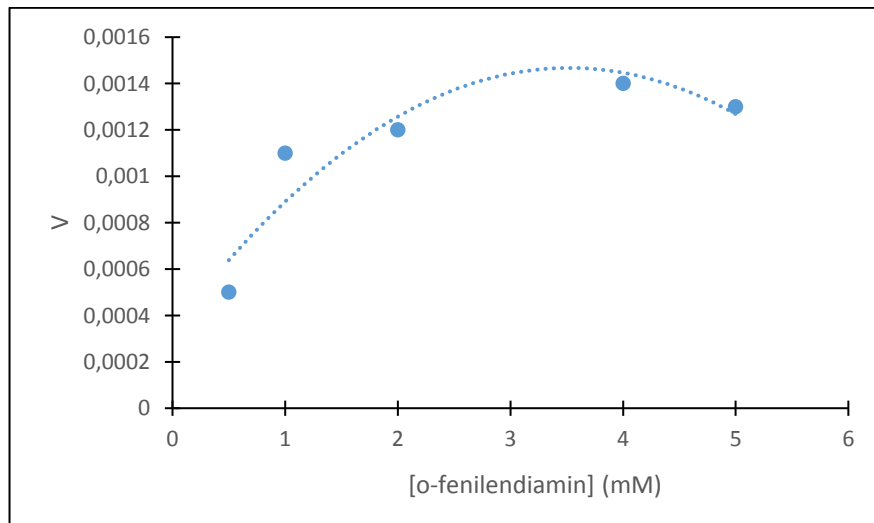
Şekil 4.19. Sabit H_2O_2 , farklı gallik asit konsantrasyonlarında gallik asitin Lineweaver-Burk grafiği



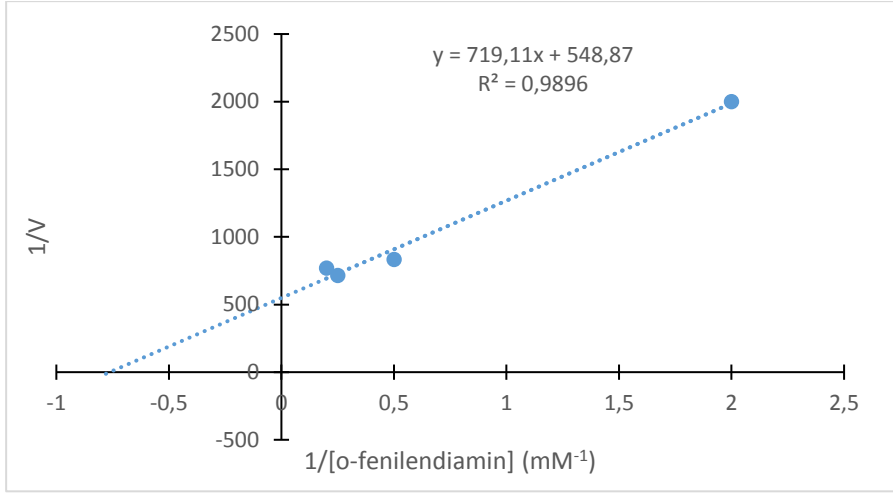
Şekil 4.20. Sabit gallik asit farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında H₂O₂ doygunluk eğrisi



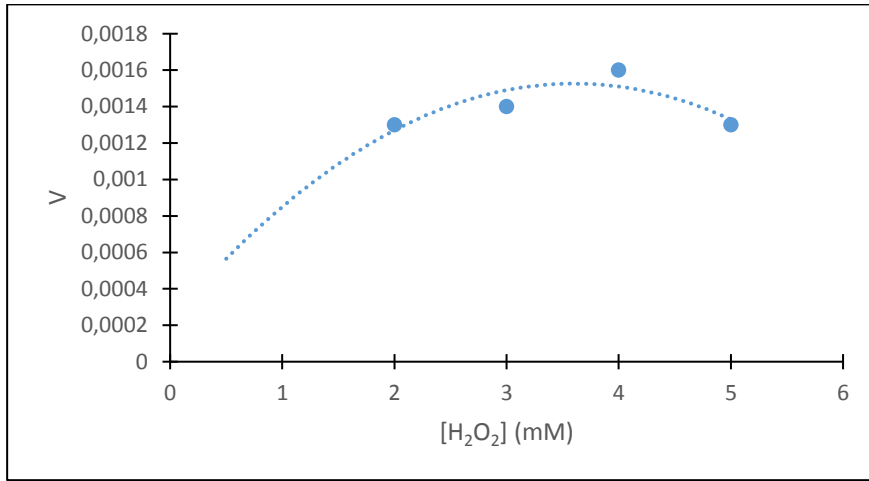
Şekil 4.21. Sabit gallik asit , farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında gallik asit'in Lineweaver-Burk grafiği,



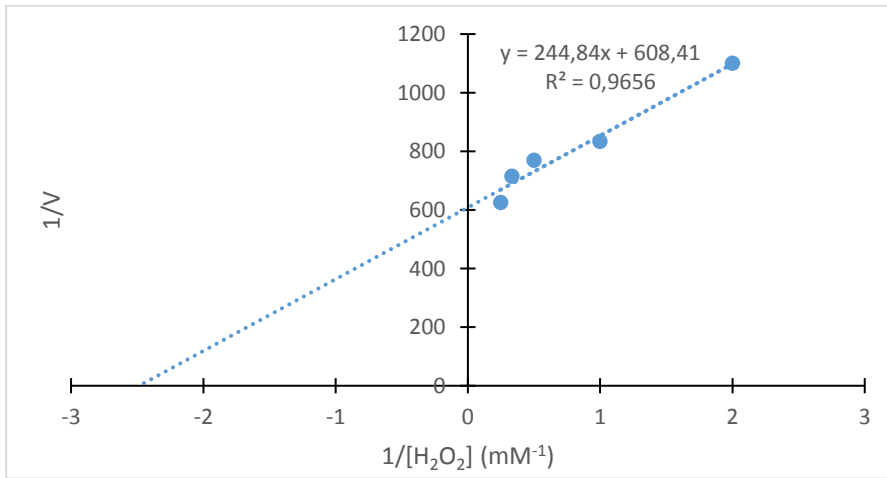
Şekil 4.22. Sabit H₂O₂, farklı o-fenilendiamin konsantrasyonlarında o-fenilendiamin doygunluk eğrisi



Şekil 4.23. Sabit H_2O_2 , farklı o-fenilendiamin konsantrasyonlarında o-fenilendiamin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.24. Sabit o-fenilendiamin farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 doygunluk eğrisi



Şekil 4.25. Sabit o-fenilendiamin farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında H_2O_2 'nin Lineweaver-Burk grafiği

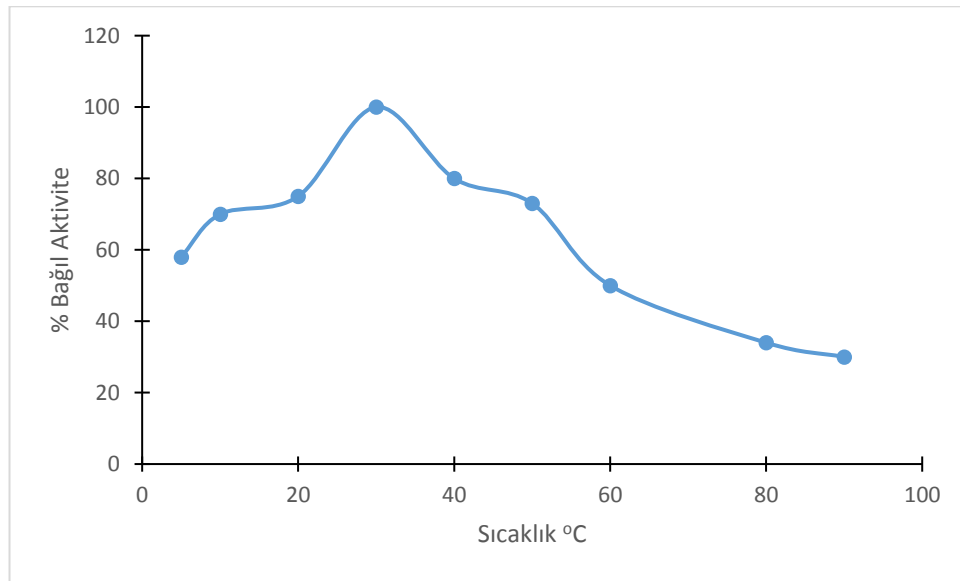
Tablo 4.1. POD substrat sepesifikliği

Substrat	K_m (mM) (sbt H_2O_2)	V_{max} (EÜ/dk) (sbt H_2O_2)	K_m (mM)	V_{max} (EÜ/dk)
4- metil katekol	1,47	0,00238	0,24	0,00213
Pirogallol	1,086	0,00682	1,30	0,013
Kafeik asit	4,29	0,00982	1,13	0,00590
Gallik asit	2,94	0,00481	0,50	0,00212
o-fenilendiamin	1,31	0,00182	0,40	0,0016

4.5. CAT Enzimi Karakterizasyonu

4.5.1. CAT enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi

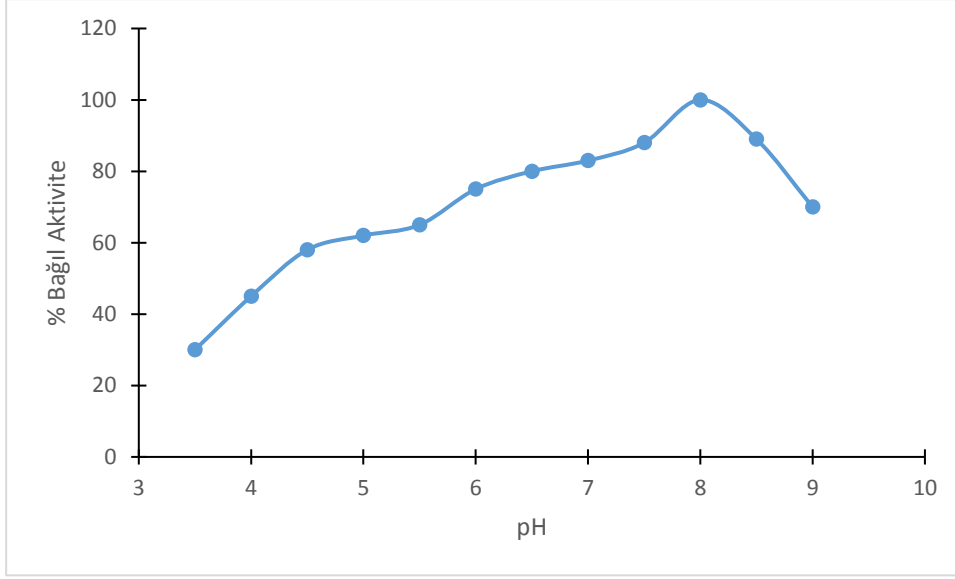
5 ile 90°C aralığında değişen sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Substrat olarak hidrojen peroksidaz kullanılmıştır. Absorbans ölçümü 3 tekrarlı şekilde 180 sn 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığa karşı % bağıl aktivite grafiği Şekil 4.26' da verilmiştir. Optimum sıcaklık 30°C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.26. CAT optimum sıcaklık

4.5.2. CAT enzimi aktivitesine pH etkisi

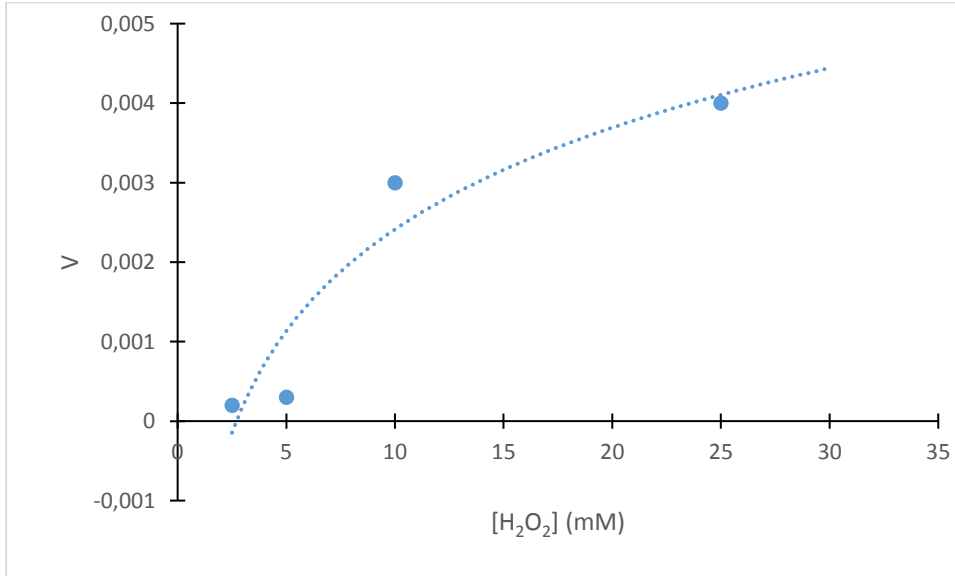
pH 3,5 ve 9 arasında değişen tampon çözeltiler ile ortam pH'ı istenilen değere getirilerek aktivite ölçümü yapılmıştır. H_2O_2 substratı kullanılarak 240 nm'de absorbans dđerleri ölçülmüştür. % bağıl aktivitenin pH karşısında değişimi Şekil 4.27'de verilmiştir. Optimum pH'ı 8 olarak belirlenmiştir.



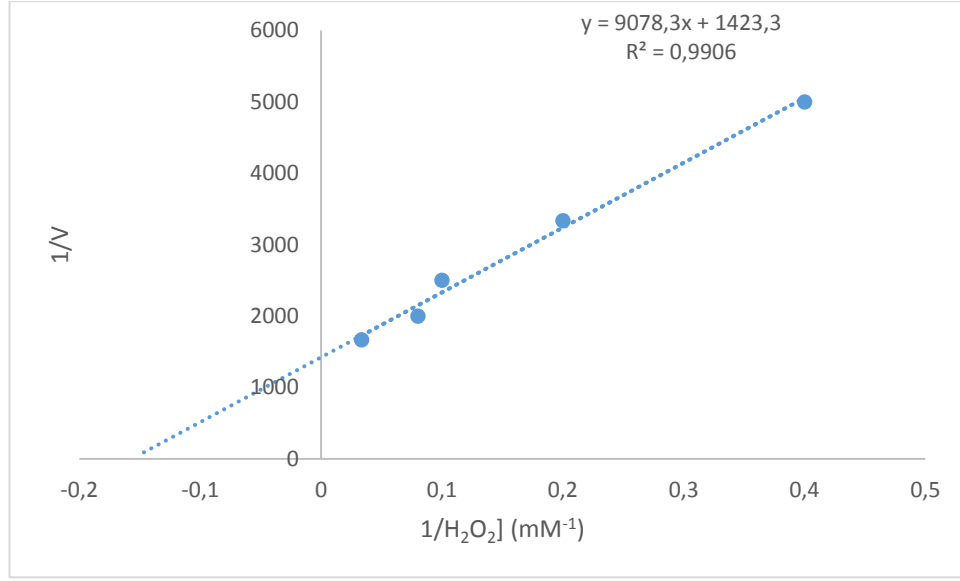
Şekil 4.27. CAT optimum pH

4.5.3. CAT enzim kinetiği

Katalaz enzim kinetiği hidrojen peroksit ile tayin edilmiştir. Kinetik testine ait grafik Şekil 4.28-29 de verilmiştir. Micheales-Menten grafiği ile doyunluk eğrisi belirlenmiş ve Lineweaver-Burk garfiği ile de V_{max} ile K_m değerleri hesaplanmıştır. Kinetik sonuçları Tablo 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.28. H₂O₂'nin doyunluk eğrisi



Şekil 4.29. H₂O₂'nin Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.2. CAT enzim kinetiği sonuçları

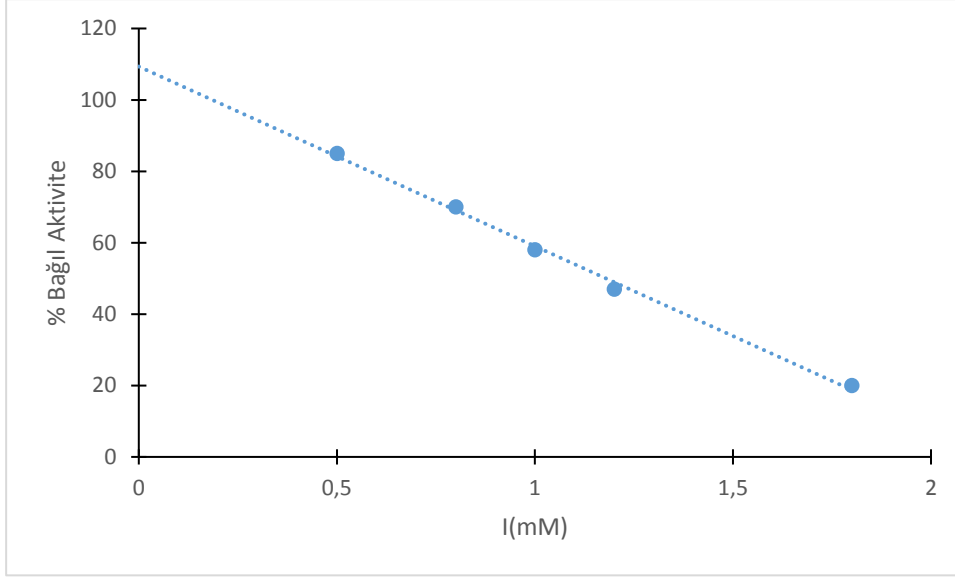
Substrat	K _m (mM)	V _{max} (EÜ/dk)
H ₂ O ₂	6,41	0,0007

4.6. POD VE CAT aktiviteleri üzerine çeşitli madde etkileri

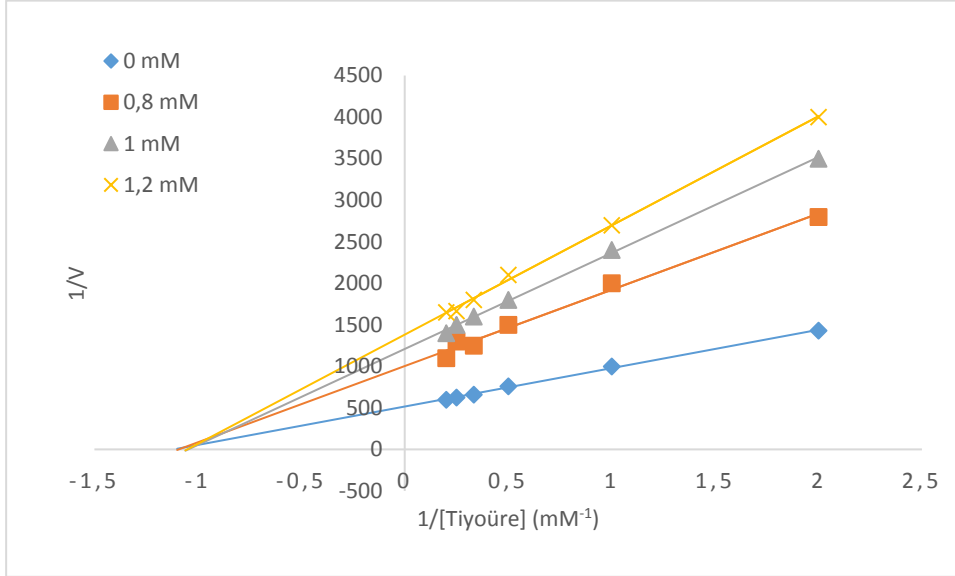
Yoğurt otu bitkisinin POD ve CAT enzimleri üzerine tiyoüre ve sodyum azid inhibitörleri ile etkileşimi incelenmiştir. Her iki inhibitör de iki enzim için inhibisyon göstermiştir. % bağıl aktivite grafikleri ile IC₅₀ değeri, Lineweaver-Burk grafiği ile ise inhibitör türleri ve K_i değerleri belirlenmiştir.

4.6.1. POD enzimine inhibitör etkisi

Tiyoüre ve sodyum azid inhibitörlerinin peroksidaz enzimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Tiyoürenin % bağıl aktivite grafiği sonucunda IC₅₀ değeri 1,18 mM (Şekil 4.30), Lineweaver-Burk grafiği ile K_i değeri ise 0,88 mM (Şekil 4.31) olarak bulunmuştur. İnhibisyon türü klasik yarışmasız olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3.).

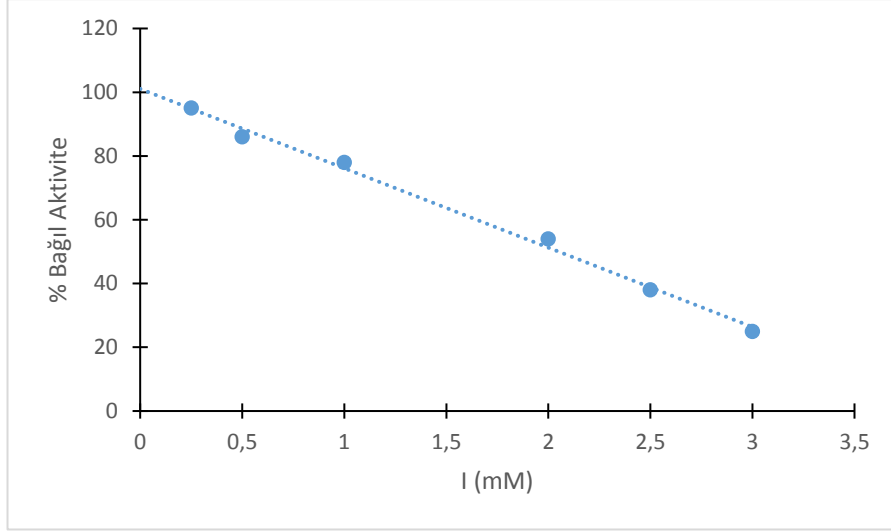


Şekil 4.30. POD enzimine tiyöüre etkisi

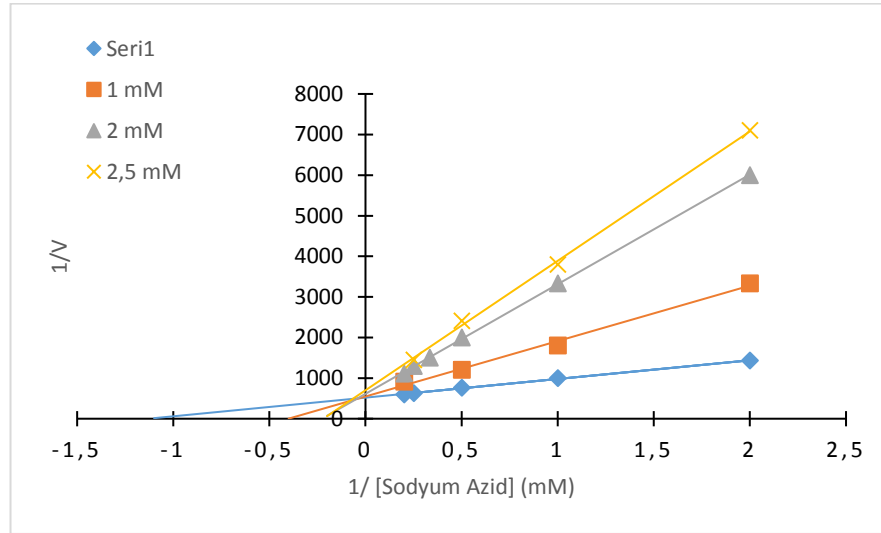


Şekil 4.31. POD enzimi tiyöüre Lineweaver-Burk grafiği

Sodyum azidin % bağıl aktivite grafiği sonucunda IC_{50} değeri 2,05 mM (Şekil 4.32), Lineweaver-Burk grafiği ile K_i değeri ise 0,70 mM (Şekil 4.33) olarak bulunmuştur. İnhibisyon türü yarışmalı olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2.).



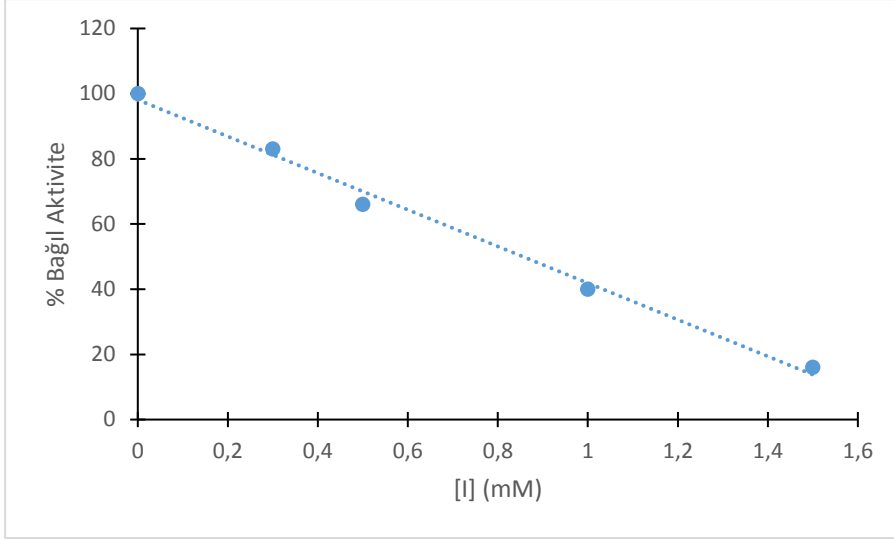
Şekil 4.32. POD enzimine sodyum azid etkisi



Şekil 4.33. POD enzimi sodyum azid Lineweaver-Burk grafiği

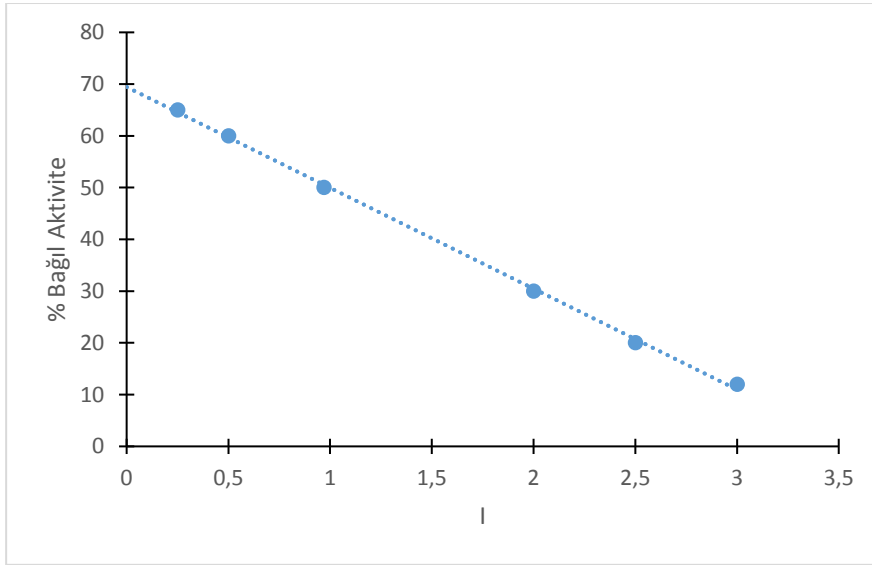
4.6.2. CAT enzimine inhibitör etkisi

Tiyüüre ve sodyum azid inhibitörlerinin katalaz enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Tiyüürenin % bağıl aktivite grafiği sonucunda IC_{50} değeri 0,85 mM (Şekil 4.34) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.34. CAT enzimine tiyoüre etkisi

Sodyum azidin % bağlı aktivite grafiği sonucunda IC_{50} değeri 0,97 mM (Şekil 4.35), olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.35. CAT enzimine sodyum azid etkisi

Tablo 4.3. İnhibisyon Sonuçları

İnhibitör	K_I	IC_{50}	İnhibisyon Türü
Tiyoüre (POD)	0,88	1,18	Yarışmasız
Sodyum Azid (POD)	0,70	2,05	Yarışmalı
Tiyoüre (CAT)	-	0,85	--
Sodyum Azid (CAT)	-	0,97	--

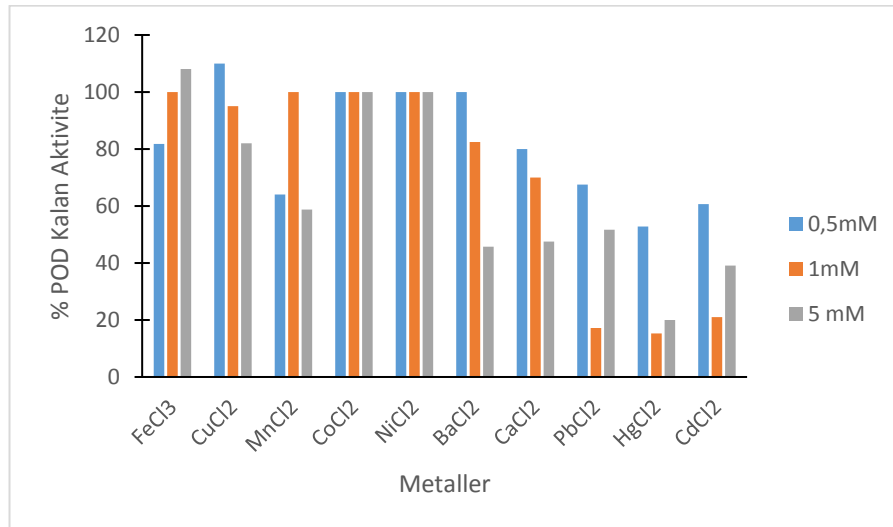
4.7. POD ve CAT Enzimine Metal Etkisi

Bölüm 3.3.10.2' de anlatıldığı gibi farklı metaller ile POD ve CAT enzimleri inkübasyona bırakılmış ve bunun sonucunda aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Fe(III), Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Ba(II), Ca(II), Pb(II), Hg(II) ve Cd(II) metalleri 0,5-1 ve 5 mM olarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış ve aktiviteleri ölçülmüştür. Peroksidaz için 420 nm, katalaz için ise 240 nm'de absorbans değişimi gözlemlenmiştir. % kalan aktiviteleri hesaplanarak Tablo 4.4 verilmiştir.

Tablo 4.4 Yoğurt otu POD ve CAT enzimleri üzerine metal etkileri

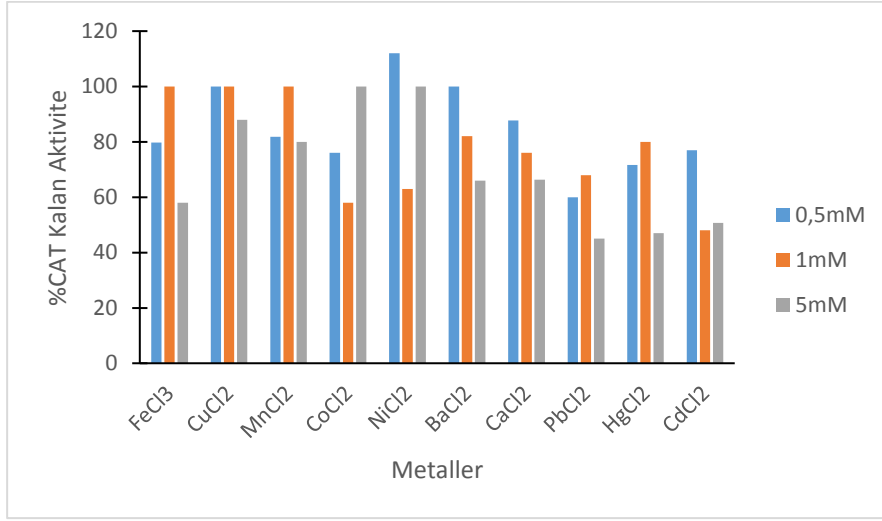
Metal	POD % kalan aktivite			CAT % kalan aktivite		
	0,5mM	1mM	5 mM	0,5mM	1mM	5mM
Kontrol	100	100	100	100	100	100
FeCl ₃	81,75	100	108	79,7	100	58
CuCl ₂	110	95	82	100	100	88
MnCl ₂	64	100	58,75	81,8	100	80
CoCl ₂	100	100	100	76	58	100
NiCl ₂	100	100	100	112	63	100
BaCl ₂	100	82,5	45,74	100	82	66
CaCl ₂	80	70	47,5	87,7	76	66,3
PbCl ₂	67,5	17,19	51,7	60	68	45
HgCl ₂	52,82	15,32	20	71,7	80	47
CdCl ₂	60,71	21	39,07	77	48	50,7

0,5 mM konsantrasyonda Hg(II) %47,18 oranında POD enzimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. 1 mM Hg (II) de %84,67 ve 5 mM Hg (II) de ise %80 inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Diğer metallerin % kalan aktiviteleri grafik şeklinde Şekil 4.36 'de verilmiştir.



Şekil 4.36. G.aparine POD enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi

0,5 mM konsantrasyonda Pb(II) % 40, 1 Mm konsantrasyonda Cd(II) %52 ve 5 mM konsantrasyonda Pb(II) ise % 55 oranında CAT enzimini inhibe etmiştir. Diğer metallerin % kalan aktivitelere ait sonuçlar Şekil 4.37' te verilmiştir.



Şekil 4.37. G.aparine CAT enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi

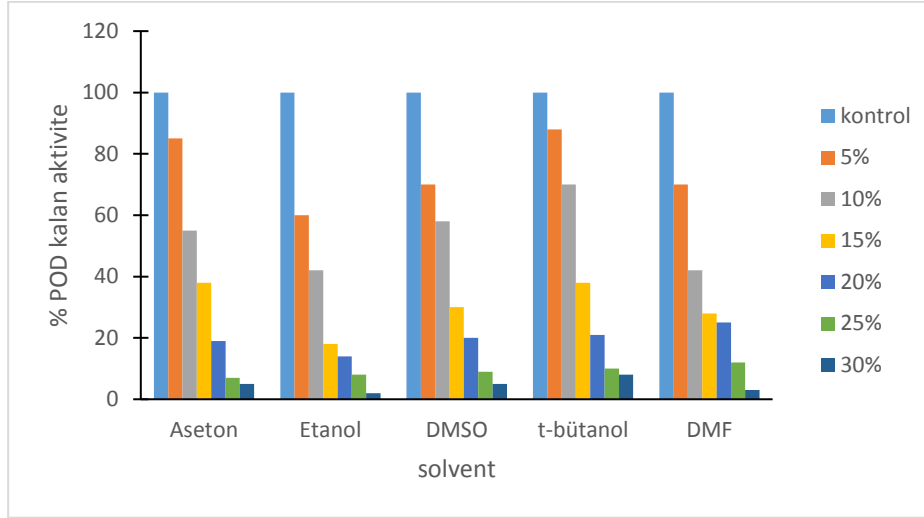
4.8. POD ve CAT Enzimlerine Solvent Etkisi

DMSO, DMF, etanol, aseton ve t- bütanol çözücülerinin POD ve CAT enzim aktivitelere etkileri incelenmiştir. %5-10-15-20-25 ve 30 (v/v) oranlarında solventler hazırlanarak enzim aktivitelere etkileri ölçülmüştür. Bölüm 3.3.10.3' de belirtilen şekilde aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5' te detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 4.5. POD ve CAT enzimlerine solvent etkisi

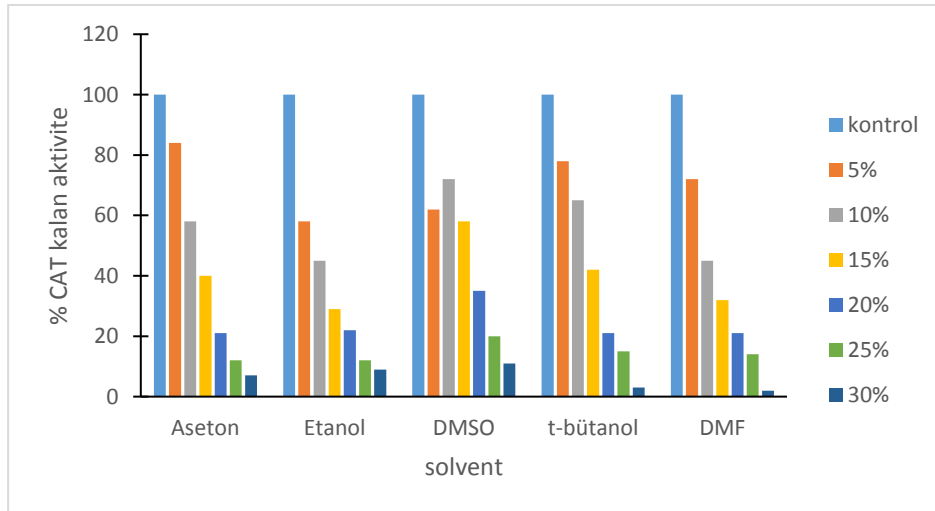
Solvent	% POD Kalan Aktivite						% CAT Kalan Aktivite					
	%5	%10	%15	%20	%25	%30	%5	%10	%15	%20	%25	%30
Kontrol	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Aseton	85	55	38	19	7	5	84	58	40	21	12	7
Etanol	60	42	18	14	8	2	58	45	29	22	12	9
DMSO	70	58	30	20	9	5	62	72	58	35	20	11
t-bütanol	88	70	38	21	10	8	78	65	42	21	14	3
DMF	70	42	28	25	12	3	72	45	32	21	14	2

POD enzimine solvent etkisi incelendiğinde %30 oranında etanol ilavesi enzimin aktivitesini en fazla inhibe eden solvent olarak belirlenmiştir. Sonuçlar grafik halinde Şekil 4.38’de verilmiştir.



Şekil 4.38. POD enzimi solvent etkisi grafiği

CAT enzimine solvent etkisi incelendiğinde %30 oranında DMF ilavesi enzimin aktivitesini en fazla inhibe eden solvent olarak belirlenmiştir. Sonuçlar grafik halinde Şekil 4.39’da verilmiştir.

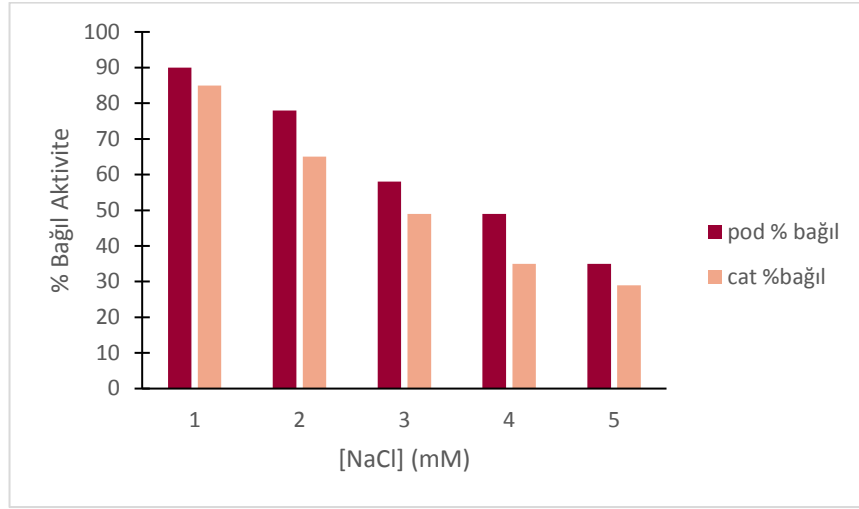


Şekil 4.39. CAT enzimi solvent etkisi grafiği

4.9. POD ve CAT enziminin tuz toleransı

1 ile 5 mM arasında değişen tuz çözeltisi ile POD ve CAT enzimleri 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra POD ve CAT enzimleri için ayrı ayrı

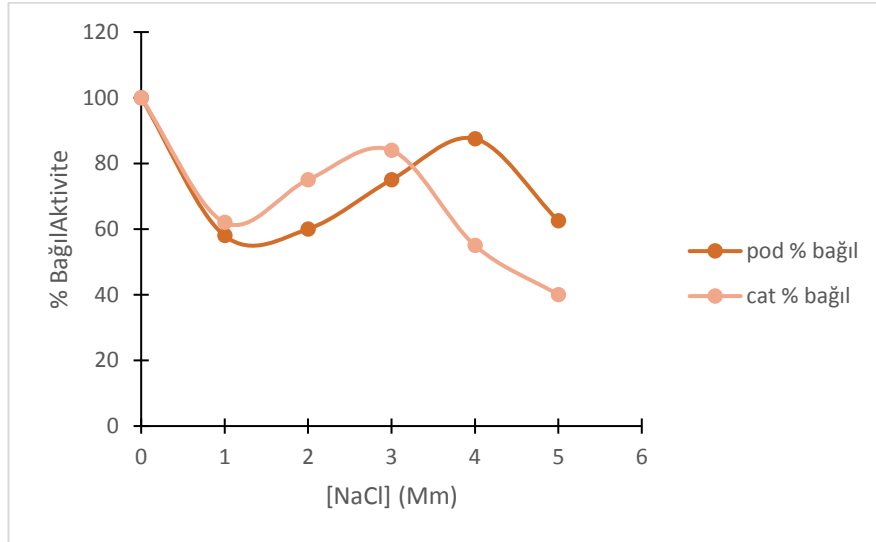
spektrofotometrik olarak absorbans ölçümleri alınmış ve % bağıl aktivite grafiği ile sonuçlar karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılmalı sonuçlar Şekil 4.40'de verilmiştir.



Şekil 4.40. Yoğurt otu POD ve CAT enzimleri tuz toleransı

4.10. POD ve CAT enzimlerine iyonik şiddet etkisi

1 ile 5 mM arasında değişen konsntrasyonlarda NaCl çözeltileri ile muamele edilen POD ve CAT enzimlerine aktivite tayini yapılmıştır. Bölüm 3.3.10.5 'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapılmış ve % bağıl aktivite grafiği ile sonuçlar Şekil. 4.41'de verilmiştir.



Şekil 4.41. Yoğurt otu POD ve CAT iyonik şiddet etkisi

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada yoğurt otu (*Galium aparine L.*) bitkisinden peroksidaz ve katalaz enzimi izole edilerek kinetik özellikleri ile çeşitli maddelere karşı etkileri incelenmiştir.

POD aktivitesi H₂O₂ ve 4- metilkatekol substratı ile 420 nm'de 60 sn'deki absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonucu belirlenmiştir. CAT aktivitesi ise 240 nm'de 180 sn'deki absorbans azalmasının spektrofotometrik olarak gözlemlenmesi sonucu ölçülmüştür.

Yoğurt otu izole edilerek ham enzim ekstraktı elde edilmiş ve işlemler +4°C'de gerçekleştirilmiştir.

POD ve CAT enzimleri üçlü faz ayırma yöntemi ile saflaştırılmıştır. POD enziminin molekül ağırlığı 65 kDa, CAT enzimi ise 50 kDa olarak tespit edilmiştir. Gülçin ve ar. (2005) kara lahana bitkisinden peroksidaz enzimi molekül ağırlığını 95 kDa [65], Köksal (2007) ise karnabahardan POD ağırlığını 45 kDa olarak bulmuştur [12]. Hirasawa ve ark (1987) ıspanaktan CAT enzimini jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırmış ve molekül ağırlığını 125 kDa olarak belirlemiştir [66].

POD enzimi için optimum pH 6,5, CAT enzimi için ise 8 olarak belirlenmiştir. Pomar ve ark. (1997) biber asidik için POD enzim optimum pH'ını 6,0-9,0 arasında bulmuşlardır [67]. Köksal (2003) karalahana bitkisinden CAT enzimi karakterizasyonu yapmış ve optimum pH'ı 7,8 olarak belirlemiştir [68].

Yoğurt otu peroksidazı ve katalazının optimum sıcaklığı için 5 °C ve 90 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite tayini yapılmıştır. Her iki enziminde optimum sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir. Belzarc ve ark (2008) [17] lahana peroksidazının optimum sıcaklığını 40°C ve Dinçer (2000) [69] ise roka katalazının optimum sıcaklığını 30°C olarak bulmuşlardır. Sonuçların literatürle uygunluk gösterdiği görülmüştür.

Yoğurt otu POD ve CAT enzimlerine inhibitör etkisi için sodyum azid ve tiyüre inhibitörleri kullanılmıştır. Her iki inhibitöründe POD ve CAT enzimlerini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Enzim aktivitelerini yarıya düşüren inhibitör miktarını

belirlemek için önce % bağıl aktiviteler hesaplanmış ve grafik yardımıyla IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3' te verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *G. aparine* POD enzim aktivitesinin 1mM konsantrasyondaki Hg(II) metalinin en yüksek inhibitör etkisi ile % 84,68 oranında *G. aparine* CAT enzim aktivitesini de % 80 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Kurşun (Pb) 1 mM konsantrasyonun *G. aparine* POD enzim aktivitesini % 82,81 oranında inhibe ederken ve *G. aparine* CAT enzim aktivitesini ise 5 mM konsantrasyonda ancak % 55 inhibe ettiği belirlenmiştir. Yine çevre ve tüm canlılar için toksik olan kadmiyum (Cd) metelide 1 mM konsantrasyonda *G. aparine* POD enzim aktivitesini % 79, *G. aparine* CAT enzim aktivitesini ise % 52 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Tüm sonuçlar Tablo4.4'te verilmiştir.

POD ve CAT enzimlerine solvent etkisi tayini için etanol, aseton, DMSO, t-bütanol ve DMF kullanılmıştır. Çözücülerin % 5 -%30 (v/v) aralığındaki konsantrasyonları ile etkileşimde bulundurulmuş enzim ekstraktlarının aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçları Tablo 4.5' te sunulmuştur.

POD ve CAT enzimlerinin tuz toleransı için enzimler 1 ile 5 mM aralığındaki konsantrasyonlu NaCl çözeltisi ile 2sa muamele edilmiş ve aktivite ölçümü yapılmıştır. Tuz konsantrasyonu arttıkça bağıl aktivitenin düştüğü görülmüştür.

İyonik şiddet tayini için enzimler 1 ile 5 mM aralığındaki konsantrasyonlu NaCl çözeltisi ile birlikte aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Peroksidaz enziminin 3 mM NaCl çözeltisi ile en yüksek aktivitesini gösterdiği görülmüştür. 1 mM konsantrasyonda ise % 42 oranında inhibe olduğu görülmüştür. Katalaz enziminin 3Mm konsantrasyonda en yüksek aktiviteye sahip olduğu ama 5 mM konsantrasyonda aktivitesinin % 40'a düştüğü görülmüştür.

G. aparine bitkisinden POD ve CAT enzimleri üç fazlı saflaştırma metodu ile başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Böylece hem peroksidaz hem de katalaz enzimi için literatüre yeni bir enzim kaynağı eklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Diplock, A. 1998. Healty lifestyles nutrition and physical activity, antioxidant nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, 59.
- [2] Dündar, Y., Aslan, R., Hekimlikte Oksidatif stress ve antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversite Yayınları, 29:95-101, 2000.
- [3] Elliot, J.G., Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages, Food Tech, 53, 2, 46-48, 1999.
- [4] Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: a Comparative Study, J. Agric. Food Chem, 50, 11, 3122-3128, 2002.
- [5] Blokhina, O., Academic Dissertation, ISSN1239-9469, ISBN 951- 45-9631-5, ISBN 951-45-9632-3, ISBN 951-45-9633,2000.
- [6] Larson, R.A., The Antioxidants of Higher Plants. Phytochemistry, 27, 969–978, 1988.
- [7] Mitchell, M.J., Ahmad, S., Pardını, R.S. 1991, Purification and Properties of Highly Active Catalase from Cabbage Loopers, Trichoplusia Ni. InsectBiochemistry, 21(6):641-646
- [8] Mlıkı, A., Zimmermann, W., Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from Streptomyces cyaneus, Applied and environmental microbiology, 916-919, 1992.
- [9] Pomar, F., Bernal, M. A., Diaz, J., Merino, F., Purification Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase, Phytochemistry, Vol. 46, No. 8, 1313-1317, 1997.
- [10] Mullen, R. T., Cifford, D. J., 1993. Purification and Characterization of Catalase from Loblolly Pine (Pinus taeda L.) Megagametophytes. Plant Physiol, 103:477-483.
- [11] Vitali, A., BottA, B., Delle Monache, G., Zappitelli, S., et al., Purification and Partial Characterization of a Peroxidase From Plant Cell Cultures of Cassia Didymobotrya And Biotransformation Studies, Biochem. J., 331, 513-519, 1998.
- [12] Köksal, E., 2003. Katalaz Enziminin Kara Lahana Bitkisinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Pestisitlerle Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 55 Sayfa
- [13] Deepa, S.S., Arumughan, C., Purification and Characterization of Soluble Peroxidase from Oil Palm (Elaeis Guineensis Jacq.) Leaf, Phytochemistry, 61, 503–511, 2002.

- [14] Lokman, Ö., Bülbül, M., Elmastaş, M., Çiftçi, M., 2007. Purification and Apiaceae) Leaves. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 37-41.
- [15] Saraiva, J. A., Nunes, C. S., Coimbra, M. A., Purification and Characterization of Olive (*Olea Europaea* L.) Peroxidase – Evidence for The Occurrence of a Pectin Binding Peroxidase, Food Chemistry, 101, 1571–1579, 2007.
- [16] Kara D., 2008. Sakarya'da Yetişen İki Farklı Kabak Çekirdeğinden (*Cucurbita Maxima* Ve *Moschata*) Katalaz Enziminin Karakterizasyonu. Sakarya Üniversitesi -Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 71 Sayfa.
- [17] Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P., Spring Cabbage Peroxidases – Potential Tool in Biocatalysis and Bioelectrocatalysis, Phytochemistry, 69, 627–636, 2008.
- [18] Manu, B.T., Prasada, RAO, U.J.S., Calcium Modulated Activity Enhancement and Thermal Stability Study of a Cationic Peroxidase Purified from Wheat Bran, Food Chemistry, 114, 66–71, 2009.
- [19] Seriner, R., 2010. Katalaz Enziminin Hıyardan (*Cucumis Sativus*) Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, 34 sayfa.
- [20] Lehninger, A.L. (2005) Principles of biochemistry, Worth publisher, Acedemic Press, New York.
- [21] Nelson, L. D., Cox, M. M. (2013). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Elçin, Y. M. (Ed.), Palme Yayıncılık, 183-233, Ankara.
- [22] Keha, E. ve Küvrevioğlu Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- [23] Jegannathan, R.K, Nielsen, H.P., 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production a literature review. Journal of Cleaner Production, 42, 228-240
- [24] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 89- 138, Erzurum, 2011.
- [25] Lehninger, A. L., Principles of Biochemistry, Worth Publisher, Acedemic Press, 587-665, New York, 1982.
- [26] Bingöl, G., Biyokimya, Güven Matbaası, 169-174, Ankara, 1983.
- [27] Tekman, Ş., ÖNER, N., Genel Kimya, I. Cilt, Fatih Yayınevi Matbaası, 335-367, İstanbul, 1986.
- [28] Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Biochemistry, 190, New York, 2005.
- [29] Çimen, Ç., Iğdır kayısısından (Şalak) Saflaştırılan Polifenol Oksidaz Enzimi Üzerine Bazı İlaç ve Kimyasalların İnhibisyonu Kinetiğinin Araştırılması (yüksek lisans tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van, 2007.
- [30] Holme, D.J., PECK, H., Analytical Biochemistry, Prentice Hall, 259- 261, England, 2005.
- [31] Turgut, H.İ., Sakarya Bölgesinde Yetişen Deve Dikeni (*Silybum marianum*) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya AnabilimDalı, Sakarya, 2009.
- [32] Yıldız, S. 2007. Enzimler. 1. Baskı, Fakülte Kitabevi Yayınları, Isparta, 15-90.

- [33] Atasungül, M., Enzimler, Güzel İstanbul Matbaası, Ankara, 1965.
- [34] Tüzün, C., Biyokimya, Palme Yayıncılık, 81, Ankara, 2005.
- [35] Özata, A., Kutlu, M. 2000. Enzimoloji Ders Notları. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları; No. 1254, Fen Fakültesi Yayınları; No. 15, Eskişehir, 1-107.
- [36] Cox, M.M., Nelson D.L. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, 3. basım, Palme Yayıncılık, ISBN: 975-8982-18-4.
- [37] Akkuş İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- [38] Kaya, E., Klorprifos Ve Deltamethrin'in Kan Ve Beyin Lipid Peroksidasyon Ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkileri (Yüksek Lisans Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Isparta, 2005.
- [39] Mavi, A., İnsan Eritrosit ve Lökositlerinden Süperoksit Dismutaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 52–53, 2005.
- [40] Gutteridge, J.M.C., Iron and Oxygen: a Biologically Damaging Mixture. Acta Paediatrica Scandinavica Suppl, 361, 78–85, 1989.
- [41] Aruoma, O.I., Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. Journal of The American Oil Chemists Society, 75, 199–212, 1998.
- [42] Adams, J.B. 1978. The inactivation and generation of peroxidase in relation to the high temperature-shorttime processing of vegetables. Journal Food Technology, 13: 281–297.
- [43] Whitaker, J.R. 1994. Catalase and peroxidase. In Principles of Enzymology for the Food Sciences, 565- 578.
- [44] Doerge, D. R., Divi, R. L., Churchwell, M. I. 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. Analytical Biochemistry, 250(1), 10-17.
- [45] Pütter, J., Becker, R. 1987. Methods of Enzymatic Analysis: Peroxide. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, 286.
- [46] Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B. 1991. The cDNA Sequence of Horseradish Peroxidase. Biochimica Et Biophysica Acta 1080, 245–250.
- [47] Agostini, E., Medina, M.I., Milrad De Forchetti, S.R., Tigier, H. 1997. Properties of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from Turnip (*Brassica Napus L.*) Roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 596-598.
- [48] Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in Peroxidase Activity and in Peroxidase Isozymes in Carrot Callus. Physiologia Plantarum 88, 167-171.
- [49] Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R. 2000. Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica Napus L. Var Esculenta D.C.*) Peroxidases, Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 1574–1579.

- [50] Banci, L. 1997. Structural Properties Of Peroxidases. *Journal Of biotechnology*, 53, 253–263.
- [51] Hamed, R. R., Maharem, T. M., Fatah, M. M. A., Ataya, F. S. 1998. Purification of Peroxidase Isoenzymes from Turnip Roots, *Phytochemistry*, 48, 1291.
- [52] Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A., Aosvignyazo, V. 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 17, 293-295.
- [53] Higashi, T., Kawamata, F., Sakamoto, T., 1974. Studies on Rat Liver Catalase. VII. Double-Labeling of Catalase by ¹⁴C-Leucine and ³H-d-Aminolevulinic Acid. *J Biochem, Tokyo*, 76: 703-708
- [54] Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 1990. *Methods Enzymology*, 186:1-85.
- [55] Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2000. Enzymology and Structure of Catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51: 51-106
- [56] Paar, A., Costa, S., Tzanov, T., Gudelj, M., Robra, K.H., CAVACOPAULO, A., GUBITZ, G.M., 2002. Thermo-alkali-Stable Catalases from Newly Isolated *Bacillus* sp. for the Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents. *Journal of Biotechnology*, 89:147-153.
- [57] İnal, Ö., Yüksel, A., 1998. *Ankara Ecz. Fak. Derg. J- Fac. Pharm. Ankara* 27 (1) 31-49, 1998
- [58] Prakash, P.A., Yogeswaran, U., Chen, S.M., 2009. Direct Electrochemistry of Catalase at Multiwalled Carbon Nanotubes-nafion in Presence of Needle Shaped DDAB for H₂O₂ Sensor. *Talanta*, 15:1414-1421.
- [59] Schallreuter, K.U., Moore J., 2002. Behrens-Williams S et al. Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with Dead Sea climatotherapy in combination with pseudocatalase (PC-KUS). *Int J Dermatol* 2002; 41: 482- 487
- [60] Wiseman, A. 1986. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.
- [61] Godjevargova, T., Dayal, R., Marinov, I., 2004. Simultaneous Covalent Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase onto Chemically Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 91:4057-4063.
- [62] SEzgintürk, M.K., Göktuğ, S., Dinçkaya, E., 2005. A Biosensor Based on Catalase for Determination of Highly Toxic Chemical Azide in Fruit Juices, *Biosensors and Bioelectronics*, 21:684–688
- [63] SA Saeed , S. Javed Pak. *J.Bot.* , 39 (2007) , s. 1435 - 1442
- [64] Uygur, F.N., Koch, W., Walter, H., 1986. Çukurova Bölgesi Buğday-Pamuk Ekim Sistemindeki Önemli Yabancı Otların Tanımı. *PLTS* 4(1). Josef Margraf, Aichtal.
- [65] Gülçin, İ. and Yıldırım A. 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17.
- [66] Hirasawa, M., Gray, K.A., Shaw, R.W., Knaff, D.B., 1987. Spectroscopic properties of spinach. *Biochim. Biophys. Acta.*, 911(1): 37–44

- [67] Pomar, F., Bernal M.A., Diaz J. and Merino F., Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313–1317, 1997.
- [68] Köksal, E., Katalaz enziminin kara lahana bitkisinden (*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

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Duygu YAMAN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat, Kimya
- **Yükseklisans** : 2023, Sakarya Üniversitesi, Kimya, Biyokimya

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Yaman D., Arabacı G. (2022, 1-2, Aralık). *Galium aparine L.* Bitkisindeki Peroksidaz ve Katalaz Enzim Aktivitelerine Bazı Metallerin Etkilerinin İncelenmesi. 2. Uluslararası Multidisipliner Doğa Bilimleri ve Mühendislik Kongresi, Ankara, Türkiye.