

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİWANO (*CUCUMIS METULIFERUS*) BİTKİSİNDE
PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep DENLİ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Mayıs 2013

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİWANO (*CUCUMIS METULIFERUS*) BİTKİSİNDE
PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep DENLİ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 04/ 06 /2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd.Doç.Dr. Gülnur ARABACI
Jüri Başkanı


Yrd.Doç.Dr. Aysel KÜÇÜK TUNCA
Üye


Yrd.Doç.Dr. Omca DEMİRKOL
Üye

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince destek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danıőman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya, yüksek lisans dönem boyunca faydalandığım değerli öğretim üyelerine ve çalıőmalarımda yol gösteren, yardımcı olan Araő. Gör. Esmâ Hande ALICI' ya teşekkür ederim.

Tez çalıőmalarım boyunca yanımda olup destekleyen çalışma arkadaőım, yüksek lisans öğrencisi Elif CERRAHOĞLU' na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana güvenen, hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Proje no: FBYLTEZ 2013-50-01-001) tarafından desteklenmiőtir.

Zeynep DENLİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xv

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1.1. Peroksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar.....	3
1.2. Askorbat Peroksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar....	9
1.3.Çalışmanın Amacı.....	11

BÖLÜM 2.

ENZİMLER.....	12
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	12
2.1.1. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları.....	13
2.1.2. Enzim kofaktörleri.....	14
2.1.3. Enzimlerin spesifikliğı.....	14
2.1.4. Enzimlerin aktif bölgeleri.....	15
2.1.5. Enzim aktivite birimleri.....	16
2.1.6. Enzim aktivitesine etki eden faktörler.....	16
2.1.6.1. Sıcaklık.....	17
2.1.6.2. pH.....	18
2.1.6.3. Enzim konsantrasyonu.....	18

2.1.6.4. Zaman.....	19
2.1.6.5. Substrat konsantrasyonu.....	19
2.1.6.6. Reaksiyon ürünleri.....	20
2.1.6.7. İyonik şiddet.....	20
2.1.6.8. Fiziksel faktörler.....	21
2.1.6.9. Aktivatör ve inhibitör etkisi.....	21
2.1.7. Enzim kinetiği.....	22
2.1.7.1. Kataliz olayı.....	22
2.1.7.2. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların kinetiği.....	23
2.2. Serbest Radikaller.....	26
2.3. Antioksidan Enzimler.....	29
2.3.1. Peroksidaz enzimi.....	30
2.3.1.1. Substratları.....	35
2.3.1.2. Doğadaki rolü ve uygulamaları.....	36
2.3.2. Askorbat peroksidaz enzimi.....	38
2.4. Kiwano (<i>Cucumis metuliferus</i>).....	40
2.4.1. Faydaları.....	41
2.4.2. Besin değeri.....	41

BÖLÜM 3.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	42
3.1. Kullanılan Materyal ve Malzemeler.....	42
3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu.....	43
3.2.1. Üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) ve diyaliz.....	43
3.2.2. Lowry yöntemi ile protein miktarının tayini.....	45
3.2.3. SDS jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	46
3.2.4. Native (doğal) jel elektroforezi (Native-PAGE).....	47
3.3. Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	48
3.3.1. POD aktivite tayini.....	48
3.3.2. Substrat spesifikliği.....	48
3.3.3. pH etkisi.....	49
3.3.4. Sıcaklığın etkisi.....	49
3.3.5. Enzim kinetiği.....	49

3.3.6. POD aktivitesi üzerine madde etkisi.....	50
3.3.6.1. İnhibitör etkisi.....	50
3.3.6.2. Metallerin etkisi.....	50
3.3.6.3. Amino asitlerin etkisi.....	51
3.3.6.4. Organik çözücü etkisi.....	51
3.3.6.5. İyonik şiddet etkisi.....	51
3.3.6.6. Enzimin tuz toleransı.....	52
3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı.....	52
3.4. Askorbat Peroksidaz Enzimin İzolasyonu.....	52
3.5. Askorbat Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	53
3.5.1. APX aktivite tayini.....	53
3.5.2. pH etkisi.....	53
3.5.3. Sıcaklık etkisi.....	53
3.5.4. Enzim kinetiği.....	54
3.5.5. APX aktivitesi üzerine madde etkisi.....	54
3.5.5.1. İnhibitör etkisi.....	54
3.5.5.2. Metal etkisi.....	55
3.5.5.3. Amino asit etkisi.....	55

BÖLÜM 4.

DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR.....	56
4.1. Peroksidazın (POD) Üçlü-faz Ayırma Tekniği (TPP) ile Saflaştırılması.....	56
4.2. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	56
4.3. Native-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	57
4.4. Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu.....	58
4.4.1. pH etkisi.....	58
4.4.2. Sıcaklık etkisi.....	62
4.4.3. Enzim kinetiği.....	67
4.4.4. İnhibitör etkisi.....	77
4.4.5. Metal etkisi.....	82
4.4.6. Amino asit etkisi.....	84
4.4.7. Organik çözücü etkisi.....	84

4.4.8. Optimum iyonik şiddet.....	85
4.4.9. Enzimin tuz toleransı.....	86
4.4.10. Depolama kararlılığı.....	87
4.5. Askorbat Peroksidaz (APX) Enziminin Karakterizasyonu.....	89
4.5.1. pH etkisi.....	89
4.5.2. Sıcaklık etkisi.....	89
4.5.3. Enzim kinetiği.....	90
4.5.4. İnhibitör etkisi.....	92
4.5.5. Metallerin etkisi.....	96
4.5.6. Amino asit etkisi.....	98
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	99
KAYNAKLAR.....	107
ÖZGEÇMİŞ.....	118

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

POD	: Peroksidaz
APX	: Askorbat peroksidaz
PVP	: Polivinil Prolidon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
E.C	: Enzim komisyonu
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
Native-PAGE	: Native (doğal) Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
mPOD	: Membran bağımlı peroksidaz
HRP	: Bayırturpu peroksidazı
sAPX	: stromatal APX
tAPX	: tilakoid membrana bağlı APX
mAPX	: peroksizom (mikroboddy) membranına bağlı APX
cAPX	: sitozolik APX
mitAPX	: mitokondri membranına bağlı APX
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
DMSO	: dimetil sülfoksit
TPP	: Üçlü-faz Ayırma Tekniği (Three Phase Partitioning)
AsA	: Askorbik asit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Enzimlerin substrat ilişkisi.....	15
Şekil 2.2.	Optimum sıcaklık.....	17
Şekil 2.3.	Optimum pH.....	18
Şekil 2.4.	Enzim Konsantrasyonu.....	19
Şekil 2.5.	Substrat konsantrasyonu.....	20
Şekil 2.6.	Bir kimyasal reaksiyonun enzim ile ve enzim olmadan halleri için enerji diyagramı.....	22
Şekil 2.7.	Michaelis-Menten grafiği.....	24
Şekil 2.8.	Lineweaver-Burk grafiği.....	25
Şekil 2.9.	Eadie-Hofstee grafiği.....	26
Şekil 2.10.	Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve aktif oksijenin oluşturduğu hasara karşılık savunma mekanizması.....	30
Şekil 2.11.	Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması.....	31
Şekil 2.12.	Heme b grubu.....	33
Şekil 2.13.	Peroksidaz enziminin katalitik reaksiyon mekanizması.....	34
Şekil 2.14.	Peroksidaz enziminin bazı substratları.....	35
Şekil 2.15.	Askorbat peroksidaz reaksiyonu.....	38
Şekil 2.16.	Kiwano (<i>Cucumis metuliferus</i>).....	40
Şekil 4.1.	SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel fotoğrafı.....	57
Şekil 4.2.	Native-PAGE sonucunda elde edilen jel fotoğrafı.....	57
Şekil 4.3.	Kiwano POD için 4-metil katekol substratının optimum pH grafiği.....	58
Şekil 4.4.	Kiwano POD için ABTS substratının optimum pH grafiği.....	59
Şekil 4.5.	Kiwano POD için guaiakol substratının optimum pH grafiği.....	59
Şekil 4.6.	Kiwano POD için kafeik asit substratının optimum pH grafiği.....	60

Şekil 4.7.	Kiwano POD için o-dianisidin substratının optimum pH grafiği...	60
Şekil 4.8.	Kiwano POD için o-fenilen diamin substratının optimum pH grafiği.....	61
Şekil 4.9.	Kiwano POD için progallol substratının optimum pH grafiği.....	61
Şekil 4.10.	Kiwano POD için katekol substratının optimum pH grafiği.....	62
Şekil 4.11.	Kiwano POD için gallik asit substratının optimum pH grafiği.....	62
Şekil 4.12.	Kiwano POD için 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	63
Şekil 4.13.	Kiwano POD için ABTS substratının optimum sıcaklık grafiği.....	63
Şekil 4.14.	Kiwano POD için guaiakol substratının optimum sıcaklık grafiği..	64
Şekil 4.15.	Kiwano POD için kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği.....	64
Şekil 4.16.	Kiwano POD için o-dianisidin substratının optimum sıcaklık grafiği.....	65
Şekil 4.17.	Kiwano POD için o-fenilen diamin substratının optimum sıcaklık grafiği.....	65
Şekil 4.18.	Kiwano POD için progallol substratının optimum sıcaklık grafiği.....	66
Şekil 4.19.	Kiwano POD için katekol substratının optimum sıcaklık grafiği...	66
Şekil 4.20.	Kiwano POD için gallik asit substratının optimum sıcaklık grafiği.....	67
Şekil 4.21.	Kiwano POD için H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	68
Şekil 4.22.	Kiwano POD için 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	68
Şekil 4.23.	Kiwano POD için H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	69
Şekil 4.24.	Kiwano POD için ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	69

Şekil 4.25. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	70
Şekil 4.26. Kiwano POD için guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	70
Şekil 4.27. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	71
Şekil 4.28. Kiwano POD için kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	71
Şekil 4.29. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	72
Şekil 4.30. Kiwano POD için o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	72
Şekil 4.31. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	73
Şekil 4.32. Kiwano POD için o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	73
Şekil 4.33. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	74
Şekil 4.34. Kiwano POD için progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	74

Şekil 4.35. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	75
Şekil 4.36. Kiwano POD için katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	75
Şekil 4.37. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı gallik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	76
Şekil 4.38. Kiwano POD için gallik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	76
Şekil 4.39. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine NaN_3 etkisi.....	78
Şekil 4.40. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine tiyoüre etkisi.....	78
Şekil 4.41. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine KCN etkisi.....	79
Şekil 4.42. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine L-Sistein etkisi.....	79
Şekil 4.43. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine EDTA etkisi.....	80
Şekil 4.44. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine SDS etkisi.....	80
Şekil 4.45. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine Triton X-100 etkisi.....	81
Şekil 4.46. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine L-Glutatyon etkisi.....	81
Şekil 4.47. Kiwano POD için NaCl optimum iyonik şiddet etkisi.....	86
Şekil 4.48. Kiwano POD için NaCl - tuz tolerans grafiği.....	86
Şekil 4.49. Kiwano bitkisinden elde edilen POD için oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi.....	87

Şekil 4.50. Kiwano bitkisinden elde edilen POD için +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi.....	87
Şekil 4.51. Kiwano bitkisinden elde edilen POD için -20 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi.....	88
Şekil 4.52. Kiwano APX için AsA - H ₂ O ₂ substratının optimum pH grafiği.....	89
Şekil 4.53. Kiwano APX için AsA - H ₂ O ₂ substratının optimum sıcaklık grafiği.....	90
Şekil 4.54. Kiwano APX enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı AsA substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	91
Şekil 4.55. Kiwano APX enziminin çift taraflı olarak H ₂ O ₂ ve askorbik asit substratlarının konsantrasyonu değiştirilerek elde edilen 1/V-1/[AsA] grafiği.....	91
Şekil 4.56. Kiwano APX enziminin çift taraflı olarak H ₂ O ₂ ve AsA substratlarının konsantrasyonu değiştirilerek çizilen şekil 4.20'den elde edilen intersept-1/[H ₂ O ₂] grafiği.....	92
Şekil 4.57. Kiwano APX enzimi üzerine NaN ₃ etkisi.....	93
Şekil 4.58. Kiwano APX enzimi üzerine KCN etkisi.....	93
Şekil 4.59. Kiwano APX enzimi üzerine 2-merkapt etanol etkisi.....	94
Şekil 4.60. Kiwano APX enzimi üzerine L-Sistein etkisi.....	94
Şekil 4.61. Kiwano APX enzimi üzerine iyodoacetamid etkisi.....	95
Şekil 4.62. Kiwano APX enzimi üzerine 2-nitrobenzoik asit etkisi.....	95

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	27
Tablo 3.1. SDS jel elektroforezi bileşenleri.....	46
Tablo 3.2. Native jel elektroforezi bileşenleri.....	47
Tablo 4.1. Kiwano (<i>Cucumis metuliferus</i>) bitkisinden elde edilen POD enziminin saflaştırılma basamakları ve saflaştırma oranı.....	56
Tablo 4.2. Kiwano POD enziminin substrat spesifikliği ile ilgili toplu bulgular.....	77
Tablo 4.3. Kiwano POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I ₅₀ değerleri..	82
Tablo 4.4. Kiwano POD enzimi üzerine metallerin etkisi.....	83
Tablo 4.5. Kiwano POD enzimi üzerine amino asitlerin etkisi.....	84
Tablo 4.6. Kiwano POD enzimi üzerine organik çözücü etkisi.....	85
Tablo 4.7. Kiwano APX enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I ₅₀ değerleri.....	96
Tablo 4.8. Kiwano APX enzimi üzerine metallerin etkisi.....	97
Tablo 4.9. Kiwano APX enzimi üzerine amino asitlerin etkisi.....	98

ÖZET

Anahtar kelimeler: Peroksidaz /askorbat peroksidaz, kiwano, *Cucumis metuliferus*, NATIVE / SDS-PAGE, üçlü-faz ayırma tekniği (TPP).

Bu çalışmada, *Cucumis metuliferus* (kiwano) bitkisinden elde edilen Peroksidaz (POD) ve Askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinin kinetik özellikleri incelenmiştir. POD üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) ve diyaliz işlemleri ile kısmen saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ve Native PAGE yöntemleriyle saflık kontrolü yapılmıştır. Ham enzim kullanılan karakterizasyon çalışmalarında 4-metil katekol, ABTS, guaiakol, kafeik asit, o-dianisidin, o-fenilen diamin, progallol, katekol, gallik asit ve H₂O₂ substratları kullanılmıştır. Her bir substrat için Michaelis-Menten sabiti (K_M) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) hesaplanmıştır. Kafeik asit en yüksek substrat spesifikliğine sahiptir. Enziminin optimum pH'sı 4,0–7,5 arasında ve optimum sıcaklığı ise 30 – 40 °C arasında bulunmuştur. Kiwano POD enzimini NaN₃, tiyüüre, KCN, L-Sistein, EDTA, SDS, Triton X-100 ve L-Glutatyon, Zn⁺², Mg⁺², Fe⁺², Pb⁺², Sn⁺² metalleri, metanol, DMSO, aseton, etanol, 1-bütanol, 2-propanol, kloroform ve etil asetat organik çözücülerini inhibe etmektedir. Pek çok POD enzimini 2- merkaptan etanol inhibe ederken kiwano POD enzimini inhibe etmemiştir. Bazı aminoasitlerin POD enzimi üzerine etkisi incelendiğinde L-histidin en yüksek aktivasyona, L-prolin en yüksek inhibisyona sebep olmuştur. POD optimum iyonik şiddeti NaCl' ün 4 mM konsantrasyonunda çıkmıştır. Yapılan POD depolama kararlılığı sonucuna göre; oda sıcaklığında dört yüz saat sonrasında enzim aktivitesi %84, +4 °C' de altmış günün sonrasında 83%, -20 °C' de yüz otuz beş gün sonrasında % 73 oranında azalmıştır.

Kiwano askorbat peroksidaz (APX) enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6,2 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Kiwano APX enzim kinetiğinden elde edilen sonuçlara göre; K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla askorbik asit için 284.80 µM, 0.0035 EÜ/dk. H₂O₂ için 64.90 µM, 0,0077 EÜ/dk. olarak bulunmuştur. Kiwano APX üzerine NaN₃, KCN, 2-merkaptan etanol, L-sistein, EDTA, iyodoasetamid, 2-nitrobenzoik asit ve L-glutatyon'nun inhibisyon etkisi incelendiğinde L-Glutatyon ve EDTA hariç hepsinin inhibisyon etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Metal iyonlarının APX aktivitesi üzerine etkisi sonucuna göre Fe⁺², Cu⁺², Ba⁺² metallerinin bazı konsantrasyonlarında aktivasyona sebep olurken, diğer metaller inhibisyona sebep olmuştur. APX enzimi üzerine amino asit etkisi çalışmasında; L-prolin en iyi aktivatör olarak, L-glutamik asit ise en etkili inhibitör olarak görev yapmaktadır.

KINETIC PROPERTIES OF SOME PEROXIDASES FROM KIWANO (*Cucumis metuliferus*)

SUMMARY

Key Words: Peroxidase/Ascorbate peroxidase, kiwano, *Cucumis metuliferus*, Native / SDS-PAGE, three phase partitioning (TPP).

In this work, it is investigated the kinetic properties of peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) obtained from *Cucumis metuliferus* (kiwano). POD was partially purified by using Three Phases Partitioning (TPP) and dialysis. The purification of POD was detected by SDS-PAGE and Native PAGE. 4-methylcatechol, ABTS, guaiacol, caffeic acid, o-dianisidine, o-phenylenediamine, pyrogallol, catechol, gallic acid and H₂O₂ substrates were used in the characterization studies of crude enzyme extract. Michaelis-Menten constant (K_M) and maximum reaction velocity (V_{max}) were calculated for each substrate. Caffeic acid has the maximum substrate specificity. POD's optimum pH and temperature were found between 4,0-7,5 and 30-40 °C, respectively. POD activity was inhibited from NaN₃, thiourea, KCN, L-cysteine, EDTA, SDS, Triton X-100 and L-glutathione, Zn⁺², Mg⁺², Fe⁺², Pb⁺², Sn⁺² metal ions, methanol, DMSO, acetone, ethanol, 1-butanol, 2-propanol, chloroform and ethyl acetate. 2-mercaptoethanol acts as an inhibitor for many PODs, but not for kiwano POD. When the effect of some amino acids on the POD was investigated, L-histidine led to maximum activation and L-Proline maximum inhibition. Optimum ionic strength of POD was found in 4 mM of NaCl. As a result of enzyme storage stability, the POD activity decreased %84 at the room temperature after 400 hours, 83% at +4 °C after 60 days and % 73 at -20 °C after 135 days.

The optimum pH and temperature that ascorbate peroxidase (APX) has maximum activity were obtained as 6,2 and 30 °C, respectively. In the results of APX kinetics, the K_M and V_{max} values were found as for ascorbic acid 284.80 μM, 0.0035 EU/min. and for H₂O₂ 64.90 μM, 0,0077 EU/min., respectively. When it is searched the inhibitory effect of NaN₃, KCN, 2-mercaptoethanol, L-cysteine, EDTA, iodoacetamide, 2-nitrobenzoic acid and L-glutathione on the APX, all of them except L-glutathione and EDTA caused to inhibition. As a result of some metal ions effect on APX activity, whereas Fe⁺², Cu⁺² and Ba⁺² metal ions lead to activation in the some concentrations of them, other metals lead to inhibition. In the study of the amino acid effect on the APX; while L-proline acts as the best activator, L-glutamic acid acts as the most effective inhibitor.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri (ROS) vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir [1]. Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu ROS normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır [2].

Serbest radikaller dış yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Oluşan radikaller çok reaktif ve kararsızdırlar. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar [3-5].

Bitkilerde serbest radikaller endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşur [6-8]. Kuraklık, düşük ve yüksek ısı değerleri, ağır metaller, UV ışık, beslenme noksanlıkları, yüksek derecede tuzlu ortam, yüksek ışık stresi ve hipoksi ise ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır [9,10]. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres; normal fonksiyon gösteren hücre ve organizmalardaki moleküllerde enzimatik olmayan oksidatif hasarın birikimi ile karakterize olmuş durumu ifade etmektedir [11].

ROS olarak da adlandırılan serbest radikaller, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve singlet oksijen (1O_2) gibi türleri içerirler.

ROS'nin etkileri uzun süreli olarak kabul edilmekte ve canlılarda hastalıklara, yaşlanmaya neden olmaktadır. ROS geçici olarak meydana geldikleri gibi enzimatik olarak da meydana gelmektedirler. ROS'nin enzimatik kaynakları hem ekstraselüler hem de intraselülerdir [13]. Büyük ROS kaynakları hücre duvarlarında bulunan peroksidazlar ve aminoksidazlar, plazma membranında bulunan NADP oksidaz, mitokondri, kloroplast, peroksizomlarda bulunan intraselüler oksidaz ve peroksidazlardır [14].

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere "antioksidan" adı verilir [15]. Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücrel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler. İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir [16].

Bitki dokuları stres koşulları altında hücreleri korumak ve ROS düzeylerini kontrol altında tutabilmek için ROS'ni ortadan kaldıran SOD, CAT, Peroksidaz (POD), Askorbat Peroksidaz (APX) vs. çeşitli enzimler ve düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidanları (Askorbat, Glutatyon, Fenolik Bileşikler, Tokoferoller vs.) içermektedirler [17].

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında mevcuttur. Bunlar karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen kuşağı, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler [18]. Sebze ve meyveler de birçok antioksidan içerirler [19]. Doğal antioksidan

bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır [20].

Bitkilerin hayvansal organizmaların diyetlerinin ve aynı zamanda antioksidanların en önemli kaynağını oluşturması nedeniyle gelecekte oksidatif stres ve antioksidatif mekanizmalar açısından daha fazla araştırma konusu olacağı ortadadır.

1.1. Peroksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Spitzer ve arkadaşları (1924) tarafından yapılan bir çalışmada peroksidaz enziminin en yaygın enzim olduğu belirtilmiştir. POD enziminin bütün yaşam organizmalarında ve bunun yanında hem bitki hem de hayvan dokularında bulunduğu değerlendirilmiştir. POD'un sahip olduğu farklı bir özelliğinde, bozulmaya dirençli olduğu vurgulanmıştır. POD'un hala doğru enzim olup olmadığı çözülmemiş bir sorun olduğu, varlığının kanıtı ise bu enzimin yalnızca etkisinden ibaret olduğu ifade edilmiştir. Bu enzimlerin etkileri, gövdelerinin kimyasal doğası çalışılarak araştırılabileceği öne sürülmüştür. Bir enzimin fonksiyonu, bir eylemin hızlanmasını sağlayan katalizör olduğu fakat hiçbir zaman son ürünler arasında görünmediği dile getirilmiştir [21].

Mliki ve arkadaşı (1992) *Streptomyces cyaneus* (*Streptomyces curacoi*)'den elde ettikleri hücre içi POD enzimini saflaştırmıştır. POD o-dianisidine karşı bir aktivite gösterdiği belirtilmiş olup, K_M değeri 17,8 mM olarak bulunmuştur. POD optimum pH değeri ise 5,0'tir. Peroksidaz enzim spektrumu sodyum ditiyonit ile indigemeden sonra yok olmuş 405 nm'de bir soğut bant göstermiştir. Bu enzimin hemoprotein yapıda olduğunu kanıtlamaktadır. Enzim aktivitesi üzerinde çeşitli inhibitörlerin etkilerinin incelenmesi sonucunda bu enzim POD aktivitesine sahip bifonksiyonel bir enzindir [22].

Pomar ve arkadaşları (1997) bir peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzimini Sephadex G-100, Q-Sepharose ve Superose 12 PC 3.2/30 kolonlarında affinite kromatografisi yoluyla takip edilen amonyum sülfat fraksiyonu ile karabiberden yaklaşık 300 kere saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzimin jel filtrasyonu ile belirlenen molekül ağırlığı 50

kDa olarak bulunmuştur. Enzimin kararlı olduğu pH'ın 6,0 - 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur. POD enziminin yüksek sıcaklıklara dirençli olduğu bulunmuştur [23].

Vitali ve arkadaşları (1998) 29 günde toplanmış kültür ortamında bulunan yabancı sinamekinden POD enzimini saflaştırmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE yoluyla yaklaşık olarak 43 kDa, jel filitrasyonu ile 50 kDa olarak bulunmuştur. POD kafeik asit, ferulik asit ve guaiakol gibi doğal fenoliklere ve alkole karşı yüksek bir spesifikle karakterize edilmiştir. Bu enzimin hücre duvarının odunlaşma sürecinde rol aldığı belirlenmiştir [24].

Rodriguez ve arkadaşları (2000) tarafından kavun meyvesinden POD enzimi anyon değişim kromatografisi yoluyla kısmen saflaştırılmıştır. POD askorbik asit (AsA) üzerinde aktivite göstermemiştir fakat yüksek oranda guaiakol'ü yükseltmiştir. Bu enzimin optimum pH'ı 5,5 olarak bulunmuştur. İndirgeyici substrat olarak ABTS kullanımıyla yapılan kinetik çalışmalar göstermiştir ki yetiştirme ortamında artan tuzluluk, hem H₂O₂ hem de indirgeyici substrat üzerindeki POD enziminin kinetik parametrelerini değiştirmemiştir [25].

Deepa ve arkadaşları (2002) palmye ağacı yağından (*Elaeis guineensis Jacq.*) elde ettikleri POD enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi ve moleküler dışlama kromatografisi yoluyla saflaştırmıştır. Elde edilen saflaştırma derecesi enzim aktivitesinin %54 verimliliği ile 429 olarak bulunmuştur. Denatüre şartlar altında saflaştırılmış enzim elektroforezi molekül ağırlığının 48±2 kDa olduğunu göstermiştir. Çok yüksek pH ve termal kararlılıklar gösteren bu enzimin optimum pH'ı 5,0 olarak bulunmuştur. Guaiakol, ABTS ve pirogallol için sırasıyla K_M değerleri 3,96 - 1 - 0,84 mM olarak bulunmuştur [26].

Onsa ve arkadaşları (2004) iki membrana bağlı mPOD-I ve mPOD-II'yi *Sagu* palmyesi (*Metroxylon sagu*)'den saflaştırmış ve izole etmişlerdir. SDS-PAGE yoluyla mPOD-I ve mPOD-II için belirlenmiş olan moleküler ağırlıkları sırasıyla 51,2 ve 43,8 kDa olarak bulunmuştur. Her iki enzimin substratlarla etkileşmesi yüksek verimlilik göstermiştir. İzoenzimler p-kumarik asit, metabisülfid ve AsA tarafından yüksek derecede inhibe edilmiştir. İnhibisyon etki şekli ve bu inhibitörler

için inhibisyon sürat sabiti (KI) değerleri belirlenmiştir. POD'ların aktiviteleri Ca^{+2} ve Fe^{+3} ile yüksek derecede geliştirilmiştir. Fakat Zn^{+2} ile bir dereceye kadar inhibe edilmiştir [27].

Ikehata ve arkadaşları (2005) *Coprinus cinereus* UAMH 4103 ve *Coprinus sp.* UAMH 10067'den mantarimsı POD enzimleri saflaştırmış ve karakterize etmişler. Saflaştırılan *Coprinus* POD molekül ağırlıkları 36 kDa olarak bulunmuştur. Bu iki *Coprinus* POD enziminin katalitik özellikleri hem ham hem de saflaştırılmış formlarında hemen hemen özdeş olmasına rağmen kararlılıklarının çok farklı olduğu bulunmuştur. *Coprinus sp.* UAMH 10067'dan elde edilen POD *C. cinereus* UAMH 4103'den elde edilenden temel şartlar altında 50 °C'de daha kararlı olarak bulunmuştur. İlk enzim, sulu fenol işlemlerinde pH 9,0'da ikincisinden daha iyi bir şekilde uygulanmıştır. *Coprinus* POD fenol giderme verimliliği evvelce çalışılmış bitki peroksidazlarıyla karşılaştırılmıştır. *Coprinus sp.* UAMH 10067'dan elde edilen POD daha geniş çalışılan pH aralığı, daha yüksek termal ve alkalın kararlılığı endüstriyel atık su uygulamaları için avantajlı olabileceği belirtilmiştir [28].

Johri ve arkadaşları (2005) sınıf III POD enziminin (EC 1.11.1.7) dört tipini *Withania somnifera* (AGB 002) köklerinde saptamıştır. Bunlardan biri diğerlerine göre kıyaslandığında bozunmama şartları altında poliakrilamid jeller üzerinde yavaş bir hareketlilik göstermiştir. WS1, WS2, WS3 ve WS4 olarak belirlenen dört POD enziminin hepsi iyon değişimi, affinite ve hidrofobik kolonlar kullanılarak FPLC yoluyla hücre serbest özütünden saflaştırılmıştır. POD'ların saflığı spektral analiz ve SDS-PAGE yoluyla tespit edilmiştir. Saflaştırılmış POD'lar 34 ve 48 kDa arasındaki molekül ağırlıklarıyla monomer glikoproteinler olduğu bulunmuştur. POD'ların hepsi pH 3,0 - 9,0 alanı arasında kararlı, son derece sıcaklığa dayanıklı ve pH 5,0'de sabit olarak aktif olduğu bulunmuştur. Ek olarak bütün POD'lar genellikle guaiakol, ABTS ve o-dianisidin gibi fenolik substratları yükseltgeyebildiği belirtilmiştir [29].

Saraiva ve arkadaşları (2007) zeytinden (*Olea Europaea L.*) elde ettikleri POD enzimini elektroforetik homojenlik için saflaştırmıştır. POD'un optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,0 - 34,7 °C olarak bulunmuştur. H_2O_2 ve fenol için K_M değerleri sırasıyla 41,0 ve 0,53 mM olarak bulunmuştur. POD enziminin açıklanması için

entalpi ve ısı kapasitesindeki aktivite ve sıcaklık profilinden çıkarılan denatürasyon sıcaklığı ve değişiklikleri sırasıyla 36,5 °C, 411,2 ve 13,6 kJ mol⁻¹ K⁻¹ olarak hesaplanmıştır. POD enzimi tarafından yükseltgenen fenol için aktivasyon enerjisi 99,1 kJ mol⁻¹ olarak bulunmuştur [30].

Rudrappa ve arkadaşları (2007) pancarın genetik olarak değiştirilmiş kök kültürleri ile üretilmiş hücre içi POD, 15 kez aktivite artışı ile sonuçlanan iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat ayrımsal damıtmasının birleşimi kullanılarak saflaştırmıştır. POD enziminin pH 5,0'te en yüksek aktivite ve kararlılık gösterdiği belirtilmiş olup 70 °C'de 20 dk süresince aktiviteyi % 70'in üstünde tuttuğu görülmüştür. Saflaştırılmış enzim, substrat olarak en yüksek tercih olarak H₂O₂'i göstermiştir. H₂O₂'in K_M değeri 0,1 olarak bulunmuştur. H⁺ donörleri arasında enzim, o-dianisidin-ABTS-guaiakol sırasına göre bir affinite gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılmış POD enziminin aktif boyama ve SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 45 kDa olarak bulunmuştur [31].

Belcarz ve arkadaşları (2008) POD lahanadan kısmen saflaştırmış ve izole etmiştir. POD için optimum pH 6,0, optimum sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur. POD 4 °C'de 4 hafta depolanma süresince tamamıyla aktivite göstermiştir. Kinetik çalışmalar göre, ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM) ve o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM)'e ait K_M değerleri guaiakol (6,41 ve 13,89 mM)'den daha düşük değerlere sahiptir [32].

Fang ve arkadaşları (2008) peroksidaz aktivitesi üzerinde yüksek basınç ve sıcaklık işlemlerinin etkilerini araştırmıştır. 200 MPa'dan 600 MPa'ya değişen basınç seviyeleri ve 10 °C'den 50 °C'e değişen sıcaklıklar 30 dk boyunca uygulanmıştır. Analizler, kivi meyve suyu içindeki ham POD ve bir model sistem içinde kısmen saflaştırılmış POD üzerinde uygulanmıştır. 400 MPa'dan daha yüksek basınçlar enzim inaktivasyonunu hızlandırmak için hafif bir sıcaklıkla (≤ 50 °C) birleştirilmiştir. İlk 15 dakikadan sonra maruz bırakma süresinin uzaması büyük bir etki göstermemiştir. Ayrıca POD için pH değeri 6,0 - 8,5 arasında bulunmuştur [33].

Serrano martinez ve arkadaşları (2008) kırmızı tatlı biberden elde ettikleri POD enzimini, % 30 ve % 80 arasında amonyum sülfat fraksiyonu ve Triton X-114 ile ayrılan fazın bir kombinasyonunu kullanarak kısmen saflaştırmıştır. H^+ donörü olarak ABTS kullanılarak optimum aktivite pH 4,5 olarak elde edilmiş ve K_M değerleri ABTS ve H_2O_2 için sırasıyla 0,495 ve 1,32 mM olarak bulunmuştur. Bir kaç indirgeyici etkenin etkisi çalışılmış ve AsA en aktif etken olarak belirlenmiştir. Termal inaktivasyon çalışması inaktivasyon kinetiği için bir ilki göstermiş ve Arrhenius çizimi 151 kJ / mol değerinde bir inaktivasyon enerjisine eşdeğer bir eğim ile düz bir çizgi vermiştir. Kaydadeğer inaktivasyonun 40 °C'den büyük sıcaklıklarda meydana geldiği görülmüştür [34].

Marqueza ve arkadaşları (2008) bir hücre duvarı peroksidazını, ultra filtrasyon ve Sephacryl S-200 üzerindeki jel filtrasyon kromatografisi ile olgun vanilya tanelerinin bir polivinilpoliprolidin (PVP) ekstraktından saflaştırmıştır. Native jel filtrasyonu yaklaşık olarak 186 kDa olan tetramer enzim formu doğrulandığında SDS–PAGE ile molekül ağırlığı 46,5 kDa olarak belirlenmiştir. Guaiakol substratı kullanılarak belirlenen K_M , optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 3,8 mM, 3,8 ve 16 °C olarak bulunmuştur. POD enziminin NaN_3 , 2-merkaptoetanol ve 1,4-ditiyotreitil ile inhibe edildiği bulunmuştur. POD 1 mM NaEDTA, SDS ve AsA varlığında azalan bir aktivite gösterdiği bulunmuştur [35].

Fortea ve arkadaşları (2009) POD enzimini Triton X-114 kullanılarak bir masa üzümünden ekstrakte ederek spektrofotometrik metodlar yardımıyla karakterize etmişlerdir. POD asit şokuyla etkinleştirilmiştir. Fakat SDS varlığında POD inaktifleştirilmiştir. POD enzimi izlenilen Michaelis–Menten kinetikleri yoluyla karakterize edilmiştir. Peroksidaz enzimi için K_M ve V_{max} değerleri ABTS için sırasıyla 0,79 mM ve 1,20 mM / dk olarak bulunmuştur. H_2O_2 için bu değerler sırasıyla 0,4 mM ve 0,93 mM / dk olarak bulunmuştur. POD, 75 °C'de 5 dakika boyunca bekletildikten sonra bağlı aktivite kaybı % 90'dan büyük olduğu görülmüştür. Ayrıca POD'un aktivasyon enerjisi 271,9 kJ / mol olarak bulunmuştur [36].

Manu ve arkadaşı (2009) POD amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişimi, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yoluyla buğday öğütme endüstrisinin ürettiği buğday kepeğinden saflaştırmıştır. Glikoprotein olan bu enzimin molekül ağırlığı 44 kDa, optimum pH'sı 4,8 ve karbonhidrat içeriği % 13.8 olarak bulunmuştur. Saflaştırma süresince kalsiyumun katılımı enzim verimini ve spesifik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Kalsiyum varlığında saflaştırılmış enzim artan bir termal kararlılık göstermiştir. Kalsiyum ilavesinde triptofan floresanslığında değişim gözlenmemiştir fakat 403 nm'de heme Emilimi, heme çevresinde değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Kalsiyumun buğday kepeği POD enziminin heme yapısını, enzimatik aktivitesini ve termal kararlılığını korumak için esas olduğu belirtilmiştir [37].

Cai ve arkadaşları (2011) önemli bir biyo-dizel kaynağı olan Barbados fıncığından elde edilen POD amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz ve iyon değişim kromatografisini kullanarak saflaştırmıştır. SDS-PAGE ile tespit edilen saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı 48 kDa civarındadır. Jel filtrasyon analizi enzimin normal şartlar altında monomer yapıda olduğunu göstermektedir. Saflaştırılmış enzim guaiakol ve o-fenilendiamin ideal substratları ile substrat spesifikliğine sahiptir. Guaiakol için POD enziminin optimum sıcaklık, pH ve K_M değerleri sırasıyla 60 °C, 5.0 and 0.17 mM'dır. Ayrıca, NaCl (2.5 M) POD aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Saflaştırılmış enzim yüksek sıcaklıkta (70 °C' de 1 saat inkübe edildikten sonra 70% kalan enzim aktivitesi), uç pH aralıklarında (pH 3-12'de 2 saat inkübe edildikten sonra 93% ve üzeri kalan enzim aktivitesi), yüksek NaCl konsantrasyonunda (1-4 M NaCl ile 2 saat inkübe edildikten sonra 88% ve üzeri kalan enzim aktivitesi) ve organik çözücü ile (çeşitli organik çözücü ile 54 saat boyunca inkübe edildikten sonra 95% ve üzeri kalan enzim aktivitesi) kararlıdır. Ayrıca, POD 20 mM H₂O₂, 8 M üre, 3 M guanidin hidroklorür ve 20 mM EDTA'ya karşı dirençlidir. Fakat peroksidaz aktivitesi NaN₃, 2-merkaptoetanol, ditiyotritol, DMSO, toluen ve demir iyonu tarafından oldukça inhibe edilmektedir. Oda sıcaklığında 14 gün ve 4 °C' de 180 gün boyunca enzim raf ömrünü korumuştur [38].

Veda P. ve arkadaşları (2012) olgunlaşmış papaya meyvesinde bulunan POD'un aktivitedeki azalmayla karakterize edildiğini bulmuştur. POD amonyum sülfat

çöktürmesi, iyon değişim ve moleküler dışlama kromatografisi basamakları uygulanarak saflaştırılmıştır. POD, 44.37 % verimle ve 68.59 spesifik aktivite ile 30.22 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış POD her biri 85 kDa iki alt ünite ve biri 70 kDa olan ~240 kDa heterotrimer olduğu bulunmuştur. Saflaştırılmış enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7.0 ve 40 °C olduğu görülmüştür. Guaiakol, o-dianisidin ve AsA substratları için K_M değerleri sırasıyla 0.8, 0.125, and 5.2 mM olarak bulunmuştur. H_2O_2 için K_M değeri 0.25 mM'dır. Salisilik asit 50 μ M konsantrasyona kadar POD enzimini aktive ederken, bu değerin üzerinde bir konsantrasyonda inhibitör olarak davrandığı bulunmuştur. Ca^{2+} ve Mg^{2+} POD'u aktive ederken NaN_3 , SDS, and Triton X-100 inhibe etmiştir [39].

POD enzimi birçok bitkiden saflaştırılmıştır. Brokoliden [40], tatlı patates yumrularından [41], ısırgan otundan [42], brüksel lahanasından [43], kara lahanadan [44], bamyadan [45], portakaldan [46], çay yapraklarından [47], havuçtan [48], yeşil bezelyeden [49], ıspanaktan [50], domatesten [51], çilekten [52], karnabahardan [53] yapılan saflaştırma çalışmaları verilebilir.

Bitkilerden saflaştırılan POD ile ilgili yapılan çalışmaların hepsinde birçok izoenzim yapıları bildirilmiştir. Çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılan bu izoenzimler için genelde farklı moleküler ağırlık, stabil sıcaklık, optimum pH, substrat spesifitesi ve fizyolojik rol tespit edilmiştir [40]. Örneğin enzimin molekül kütlesi brokoli [40] ve domateste [51] 43 kDa, hurma yaprakları [26] 48 kDa olarak tespit edilmiştir. Oldukça farklı molekül kütleleri ise çilekte [52] 65 kDa olarak bildirilmiştir. Son zamanlarda Gülçin ve Yıldırım (2005) tarafından karalahanadan (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) saflaştırılan POD enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla 95 kDa olarak bulunmuştur [44]. Yine optimum pH değerleride 4,5–6,5 aralığında değişiklik göstermekte [40] ve enzimin asidik şartlarda daha iyi fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

1.2. Askorbat Peroksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

T. Ishikawa ve arkadaşları (1996) sitosolik APX enzimini komatsuna (*Brassica rapa*) yapraklarından saflaştırmıştır. Jel filtrasyon ve SDS-PAGE kullanılarak saflaştırılan

enzim 28 kDa molekül ağırlığında olup monomer yapıdadır. Enzim pH 6.5 ve 38°C de maksimum aktivite göstermiş, pH 6.5 ve pH 7.5 arasında 35°C' de aktivitesi sabit kalmıştır. KCN ve NaN₃ tarafından enzimin inhibe edilmesi hemoprotein olduğunu göstermektedir. APX enziminin, AsA ve H₂O₂ için K_M değerleri sırasıyla 402 ± 11 µM ve 24 ± 1.5 µM' dir [54].

Ohya T. ve arkadaşları (1997) APX japon turpunun (*Ruphonus satiwis L.*) köklerinden saflaştırılmıştır. APX 28 kD molekül ağırlığı ile monomer yapıdadır ve askorbat tarafından stabilize edilmiştir. Enzim 6.0 optimum pH değerinde substrat olarak askorbatı kullanır fakat guaiakol, 3,3-diaminobenzidin, katekol veya D-izo-askorbatı kullanmaz. Saflaştırılmış APX, AsP'nin ortamda olmadığı durumda karasızdır [55].

S.De Leonadis ve arkadaşları (2000) patates yumrusundan (*Solanum tuberosum L.*) mitokondriyal APX saflaştırmıştır. Patateste bulunan enzim mitokondrinin içine yerleşmiş olarak görünür. SDS-PAGE ile tahmin edildiği kadarıyla, mAPX' in moleküler ağırlığı 31 kDa ve sitosolik enziminkine benzerdir, fakat denatüre olmayan PAGE'deki bağıl hareketliliği sitosolik APX'den farklıdır. AsP ve H₂O₂ için K_M değerleri sırasıyla 76.1 ± 23.1 ve 80.3 ± 24.9 µM ve sitosolik enziminkinden yüksektir. Mitokondriyal APX mersalil ve p-hidroksimerküribenzoat (p-HMB) gibi sülfhidril reaktiflerinin inhibe etmesine karşı duyarlıdır. Patates yumru mitokondrisi içindeki toksik oksijen türlerinin temizlenmesinde mitokondriyal AsP-APX sistemi önemli bir rol üstlenmektedir[56].

Dalton ve arkadaşları (1987) soya fasulyesi yumrularından APX enzimini saflaştırmıştır. SDS-jel elektroforez yöntemiyle 30,000 molekül ağırlığında bir hemoprotein olduğu bulunmuştur. KCN, NaN₃, CO ve C₂H₂ inhibitör olarak davranmaktadır. Guaiakol, o-dianisidin ve pirogallol gibi fizyolojik olmayan indirgeyiciler enzim için substrat olarak işlev göstermektedir. NADPH, indirgenmiş glutatyon için aktivite tespit edilmemiştir. K_M değeri AsP için 70 µM ve H₂O₂ için 3 µM olarak bulunmuştur [57].

1.3. Çalışmanın Amacı

Enzimlerin özellikleri ve katalitik potansiyeli hakkında edinilen bilgi endüstrinin enzimlerden birçok alanda faydalanmasına sebep olmuştur. Endüstride içerdikleri kaynaktan ziyade izole edilmiş olan enzimler kullanılmaktadır. İzole edilmiş olan enzimlerin daha spesifik olarak etki etmesi, potansiyellerinin daha iyi standartlaştırılabilmesi, saklama koşullarının daha kolay olması enzimlerin izole edilmesinin sebepleri arasında gösterilebilir.

Endüstrinin çeşitli alanlarında enzimler kullanılmakta ve yapılan çalışmalar yüksek verimle sonuçlanmaktadır. Bu yüzden enzimlerin farklı kaynaklardan izole edilmesi, saflaştırılması, sahip oldukları özelliklerin karakterize edilmesi ile endüstride enzimlerin kullanılabilirliği araştırılmakta ve bu çalışmaların gün geçtikçe hem değeri hem de sayısı artmaktadır.

Peroksidaz enzimleri başlıca ilaç, kimya, gıda olmak üzere birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. Endüstriyel atık sularının işlenmesi, sentetik boyalarda renk giderilmesi için peroksidaz enzimleri özellikle tercih edilmektedir. Yüksek termal kararlılığı, aktivite ölçüm kolaylığı ve bozulmaya karşı dirençli olması peroksidazların endüstrideki değerini artırmaktadır. Bu etkiler düşünüldüğünde peroksidaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalar, yeni ve daha verimli sonuçlar elde etme açısından önem arz etmektedir.

Literatürde kiwano (*Cucumis metuliferus*) ile ilgili enzim, enzim karakterizasyonu ve saflaştırma çalışmalarının yapılmamış olması materyal olarak seçilmesinde önemli bir etken olmuştur.

Bu çalışmanın amacı, Kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisinininden POD ve APX enzimlerinin izolasyonu, kısmi saflaştırılması, optimum pH, optimum sıcaklık, depolama kararlılığı, optimum iyonik şiddet, tuz toleransı, substrat spesifikliği ve çeşitli kimyasal maddelerin enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisinin incelenmesidir.

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen ayrıca yan ürün oluşumuna izin vermeyen %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir [58].

Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır; hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir demektir. Buradan, enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten, bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır [59].

Enzimler, reaksiyonları milyonlarca kez veya daha fazla (10^6 - 10^{20} kat) hızlandırır. Gerçekten biyolojik sistemlerde bazı reaksiyonlar enzimlerin olmaması durumunda sonsuz derecede yavaş ilerlemektedirler. Örneğin CO₂ nin enzim varlığında taşınması (akciğere) enzim olmadığı duruma göre 10^7 kat daha hızlıdır. Bütün reaksiyonlar termodinamik yasalar geçerli olduğu gibi biyokimyasal reaksiyonlarda da termodinamik yasalar geçerlidir [60].

Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan

genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş birçok enzimin varlığını göstermektedir [59].

2.1.1. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (ürezaz, lipaz, fosfataz, proteaz, v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C) tanımlanmıştır [59, 62, 63, 64].

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır:

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

2.1.2. Enzim kofaktörleri

Bazı enzimler katalizleme reaksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirirken bazıları da protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar. “Kofaktör” adı verilen bu gruplar bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Koenzimle birlikte enzim molekülüne “haloenzim”, kofaktörsüz olan protein kısmına ise “apoenzim” denir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliği ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir [65]. Apoenzim katalitik olarak inaktiftir. Kofaktörlü enzimlerin, bu bileşik veya metal iyonlarına karşı farklı derecelerde afiniteleri vardır. Çok defa bu kofaktörler diyalizle uzaklaştırılabilir. Fakat bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere “prostetik grup” adı verilir. Enzime gevşek olarak bağlanmış koenzimlerle enzim arasındaki etkileşimler enzim-substrat etkileşimlerine benzer. Reaksiyonlardan sonra enzimlerden ayrılarak bir başka metabolizma olayında yer alabilirler [59].

2.1.3. Enzimlerin spesifikliğı

Enzimler canlı organizmadaki tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda (vücut sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden spesifik katalizörlerdir. Enzimlerin büyük çoğunluğu yalnız tek bir substrata karşı aktivite gösterir ve bu substratı dönüşüme uğratar (substrat spesifikliğı) [61].

Enzimler ortamdaki maddelerden yalnız biri ile reaksiyon vermekle kalmaz teorik olarak oluşabilecek ürünlerden de sadece birinin oluşumunu katalizlerler (Etki spesifikliğı) [61].

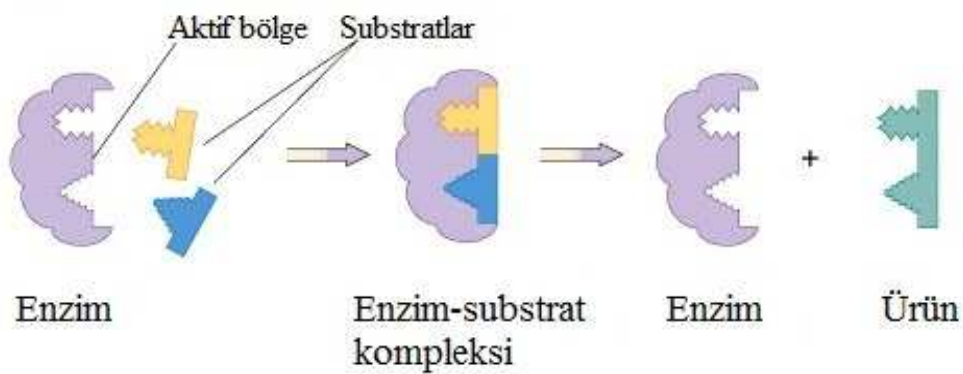
Bir enzimin substratına spesifikliğinin ortaya çıkması için iki ayrı yapısal özelliğın gerekli olduğu çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Birincisi, substrat enzim tarafından etkilenebilecek bir kimyasal bağa sahip olmalıdır. İkincisi, substrat üzerinde enzimin yapışabileceğı ve substratı katalitik bölgenin etkileyebileceğı pozisyona getirebilecek

gruplar bulunmalıdır. Bu grupların parçalanacak bağa spesifik bir geometrik ilişkisi de vardır [59].

2.1.4. Enzimlerin aktif bölgeleri

Bir enzimin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan ve bağ yapım ile yıkımda görev yapan rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup adı da verilir. Enzimlerin yapı, spesifiklik ve kataliz özellikleri farklı farklı olmasına rağmen, aktif bölgelerinin aşağıdaki ortak özelliklerini sayabiliriz:

1. Aktif bölge, enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturur.
2. Aktif bölge bir nokta, bir çizgi ve hatta bir yüzey olmayıp, üç boyutlu bir yapıdır. Enzimin lineer yapısının değişik noktalarında bulunan grupların bir araya gelerek oluşturdukları üç boyutlu karmaşık bir bölgedir.
3. Aktif bölgeler bir yarı ve girinti içinde yer alırlar. Yapısı incelenmiş olan bütün enzimlerde substrat molekülleri suyun girmediği çukur bölgelere bağlanır.
4. Spesifik bir bağlanma, atomların aktif bölgede belirli tarzda düzenlenmeleri sonucu mümkün olur. Substrat bu bölgeye tam oturabilecek şekle sahip olmalıdır ve enzim substrat arasındaki bu ilişki anahtar-kilit modeli olarak adlandırılmaktadır [59].



Şekil 2.1. Enzimlerin substrat ilişkisi

2.1.5. Enzim aktivite birimleri

Enzimlerin katalizleme güçleri “turnover sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına eşittir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim karbonik anhidraz enzimidir [66].

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25 °C’ de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür [62,63]. Bir saniyede 1 mol substratı reaksiyona sokan enzim miktarına katal denir. Uluslararası enzim komisyonu tarafından belirlenen yeni bir birim olan katal çok büyük bir miktarı gösterir.

2.1.6. Enzim aktivitesine etki eden faktörler

Enzim aktivitesine etki eden faktörler:

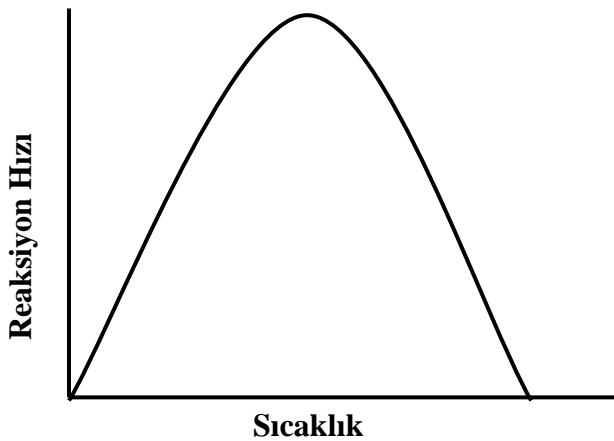
- Sıcaklık
- pH
- Enzim konsantrasyonu
- Zaman
- Substrat konsantrasyonu
- Reaksiyon ürünleri
- İyonik şiddet
- Fiziksel faktörler
- Aktivatör ve inhibitör etkisi

2.1.6.1. Sıcaklık

Sıcaklık artışı bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim kataliz reaksiyonlarında da artırıcı etki yapmaktadır. Ancak protein yapısındaki enzimlerin sıcaklık artışı denatürasyon olasılığını da artırır. Sıcaklığın etkisiyle oluşan denatürasyon, saflaştırılmış enzim çözeltilerini saflaştırılmamış enzim çözeltilerine kıyasla daha fazla etkilemektedir.

Aktivitenin maksimum olduğu sıcaklık değerine optimum sıcaklık denir. Genel olarak optimum sıcaklık grafiği şekil.2.2’de gösterildiği gibidir. Enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları pek çok zaman bilim adamları tarafından ifade edilmiştir ancak belirli bir enzimatik reaksiyon için en uygun sıcaklık, kısa zaman aralıklarında maksimum aktivite ve uzun zaman aralıklarında denatürasyondan dolayı aktivitenin düşmesi arasındaki uyum ile ilgilidir.

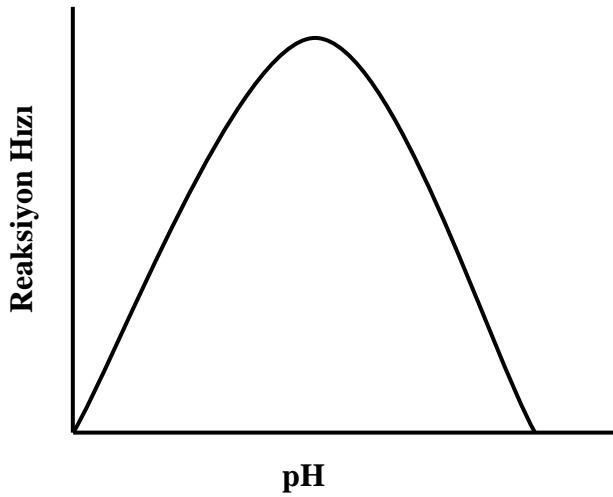
Pek çok çalışma 37°C’ de yürütülür, bunun birinci nedeni vücut sıcaklığının enzimler için optimum sıcaklığı olabileceği, ikinci nedeni ise bu sıcaklığın üzerinde enzimlerin inaktivasyon oranlarının çok fazla değişmemesi etkilidir. Uluslararası Biyokimya Birliği başlangıçta 25°C’ yi standart sıcaklık olarak tavsiye etmiş ancak sıcak iklimlerde enzimleri düşük sıcaklıkta tutmanın zor olmasından dolayı bu sıcaklığı 30°C’ ye çıkarmışlardır. Ancak hala enzimlerin aktiviteleriyle alakalı sıcaklık ile ilgili çalışmalarda belli bir standardın olmadığı görülmektedir. Bunun temel nedeni enzimlerin protein yapılarının farklı olmasından kaynaklanır [67].



Şekil 2.2. Optimum sıcaklık

2.1.6.2. pH

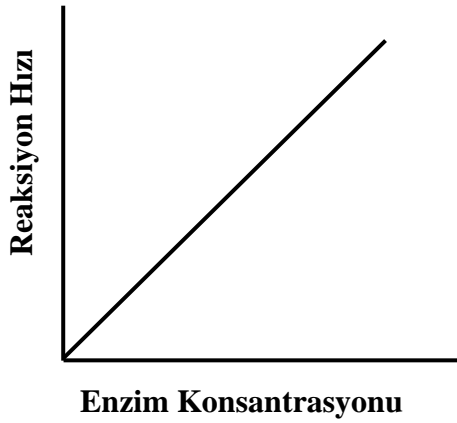
Enzimler pH değişimlerine duyarlıdır ve Şekil 2.3'te olduğu gibi kendi optimum pH aralıklarında en büyük aktivite değerini gösterirler. pH etkisi enzimlerin yapılarındaki amino asitlerin ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların değişmesinden kaynaklanır. Yklerdeki bu değişiklikler substratın bağlanması ve reaksiyonun gerçekleşme oranını değiştirir. Substrat değiştikçe enzim reaksiyonlarının optimum pH'sı farklılık gösterebilir. Ancak her enzim için aynı pH'nın optimum olma zorunluluğu olmadığı gibi, tasarlanan enzim yöntemleri ile de deneysel olarak belirlenebilir [67].



Şekil 2.3. Optimum pH

2.1.6.3. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doğun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Substratın çok bol olduğu bir ortamda optimal Şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_o), enzim konsantrasyonu $[E]$ ile doğru orantılıdır (Şekil.2.4.) [59].



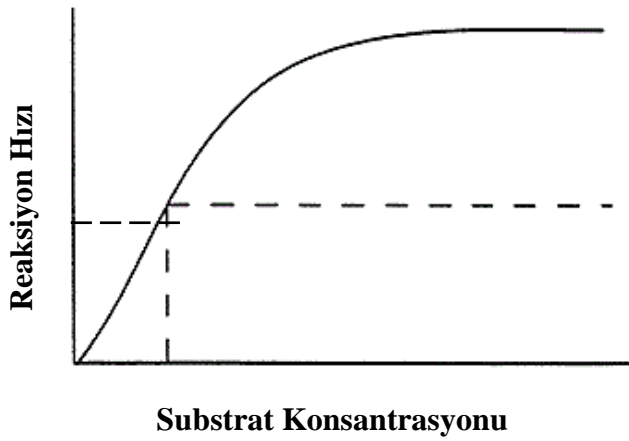
Şekil 2.4. Enzim Konsantrasyonu

2.1.6.4. Zaman

Enzimatik reaksiyonun hızı zamanla azalır. Bunun nedenleri; ürünlerin birleşerek aksi yöndeki reaksiyonu işletmeleri, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu ve substratın tükenmesi olabilir. Diğer taraftan enzimatik bir reaksiyonda yer alan bileşenlerin miktarları, zamana değişebilir [68].

2.1.6.5. Substrat konsantrasyonu

Bir enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini inceleyen deneysel çalışmaların sonuçları tutarlılık gösterir. Düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı azalırken, yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı artar. Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı belli bir süre sonra sabitlenmeye başlar ve sonunda aşağı yukarı sabit olur [67].



Şekil 2.5. Substrat konsantrasyonu

2.1.6.6. Reaksiyon ürünleri

Enzimatik reaksiyon sonucu olarak oluşan ürünlerin ortamda çoğalması reaksiyonun hızını azaltır. Enzimatik reaksiyonlar dönüşümlü bir reaksiyondur. Reaksiyon sonucu oluşan ürünler süratle ortadan kaldırıldığı takdirde reaksiyon tek tarafa doğrudur. Aksi halde ürünler ortamda toplanınca reaksiyon hızı da azalır ve hatta reaksiyon ters yöne doğru ilerleyebilir. Bu olayın bir diğer sebebi ise reaksiyon ürünlerinin yapı bakımından substrata benzemeleridir ve dolayısıyla enzimler ile substrat gibi birleşmeleri enzimleri inhibe etmektedir [59].

2.1.6.7. İyonik şiddet

Birçok enzim, aktiviteleri için metal iyonlarına gereksinim gösterirler. Metal iyonlarının katalitik fonksiyonları, çoğu kez karbonil bağındaki elektronlar veya alkollerdeki oksijen üzerinde bulunan elektron çiftleri gibi elektron çiftleriyle kompleks yaparak fonksiyonel grubu polarize etmek ve yönlendirmektir. Metaller, reaksiyona giren türlerin doğasını değiştirerek tüm reaksiyonun denge sabitini de değiştirirler [69].

Özellikle kofaktör gerektiren enzimler üzerinde metal iyonunun varlığı veya yokluğu ve konsantrasyonu oldukça etkili bir faktördür. Ayrıca aşırı ağır metal iyonu varlığı enzim yapısını bozan bir faktördür [68].

Protein yapısında olan enzimlerin üzerinde bulunan yüklü gruplar ile ortamda mevcut olan iyonlarla etkileşerek, enzimin katalizleme fonksiyonuyla ilgili rollerine tesir edebilir. Bundan dolayı, enzim aktivitesinin maksimum olduğu bir optimum iyonik şiddet söz konusudur [59].

2.1.6.8. Fiziksel faktörler

Işınlardan da enzimler ve dolayısı ile enzimatik reaksiyonun hızı üzerine tesiri vardır. Meselâ, kırmızı ve mavi ışınlar tükürük amilaz gibi bazı enzimlerin etkilerini çoğaltırlar. Ultraviyole ve Röntgen ışınları ise azaltırlar. Enzim solüsyonlarının şiddetle çalkalanması ile enzimler protein tabiatında olmaları dolayısı ile denatüre olurlar ve etkisiz hale geçerler [70].

2.1.6.9. Aktivatör ve inhibitör etkisi

Bir enzimin etkisini artıran maddelere bu enzimin aktivatörleri veya daha doğru başka bir deyişle akselatörleri denir. Bu aktivatör veya akselatörler çok defa inorganik iyonlar ve bazen de organik gruplardır.

Enzimlerin hem *in vivo* hem *in vitro* aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol oluşturduğundan, önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterir. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu

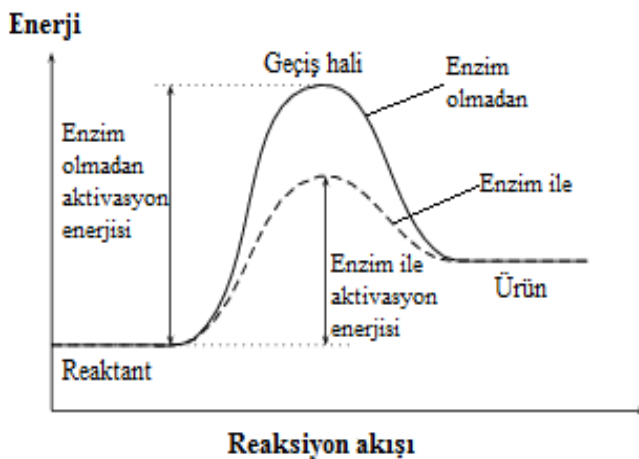
buna bir örnektir. Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonunda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir [59].

2.1.7. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur.

2.1.7.1. Kataliz olayı

A \rightarrow P reaksiyonunda, A moleküllerinden yüksek enerjili olanlar, yani aktifleşmiş durumdakiler hemen gerekli bağ oluşumu veya parçalanmasıyla ürüne (P'ye) dönüştürülür. Kısaca, reaksiyona giren maddelerin ürünlere çevrilmeleri için bir enerji engelini aşmaları gerekmektedir. Bu enerji engeline “aktifleşme enerjisi” denir ve belli sıcaklıkta 1 mol reaktantın aktifleşmiş durumu kazanmaları için gerekli enerji miktarı olarak ifade edilir. Her kimyasal reaksiyonda aktifleşme engelini üst noktasına karşılık gelen bir “geçiş hali” veya “geçiş kompleksi” adı verilen ve etkileşen moleküllerin enerjice zengin hallerini gösteren durum vardır (Şekil.2.6.).



Şekil 2.6. Bir kimyasal reaksiyonun enzim ile ve enzim olmadan halleri için enerji diyagramı

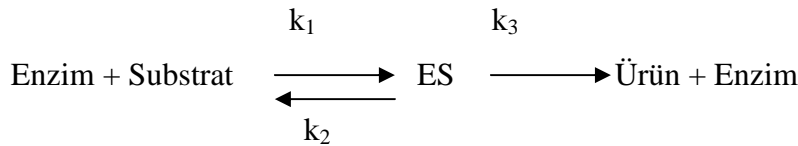
Reaksiyon hızı geçiş kompleksi konsantrasyonu ile orantılıdır. Sıcaklığın yükseltilmesi; termik hareket ve enerjiyi artıracağından geçiş kompleksi

konsantrasyonu yükselecek ve bunun sonucu olarak da reaksiyon hızlanacaktır. Katalizörlerin reaksiyon hızları üzerindeki etkileri aktivasyon enerjisini azaltmak şeklindedir. Reaktantlarla daha düşük enerjili bir geçiş kompleksi oluşturarak daha çok sayıda ürünün oluşumunu sağlarlar. Reaksiyondan sonra da katalizörlerde hiçbir değişiklik olmaz [59].

2.1.7.2. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların kinetiği

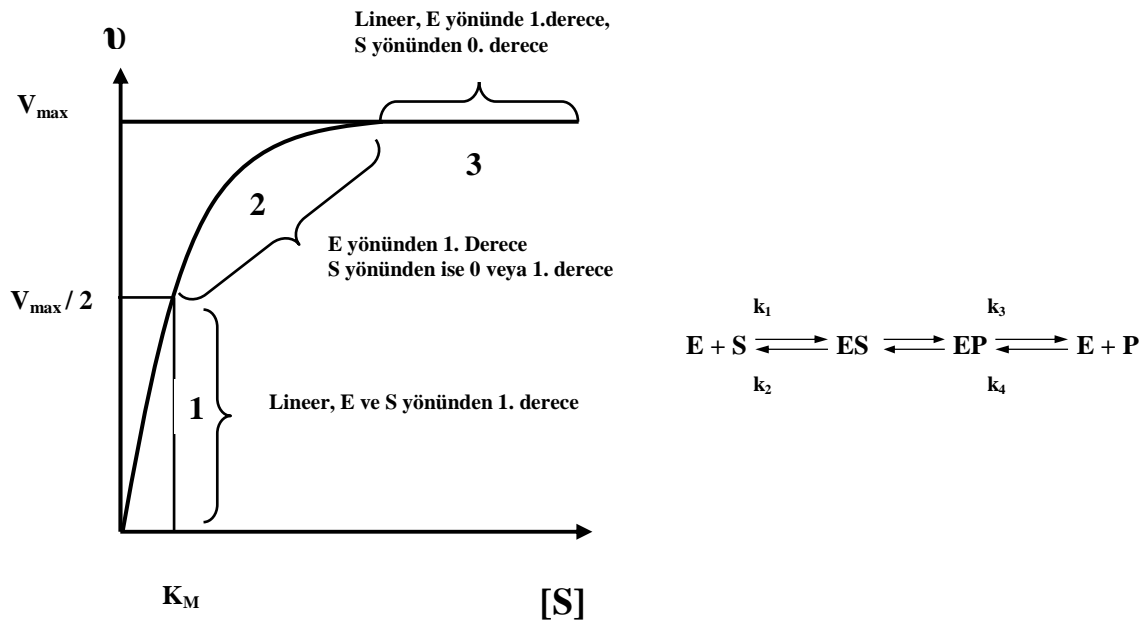
Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir ‘‘Enzim-Substrat kompleksi’’ oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

Enzim kinetiği mekanizması şu şekilde gösterilir.



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

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.7.). Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur [59].



Şekil 2.7. Michaelis-Menten grafiği

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır.

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.1)$$

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

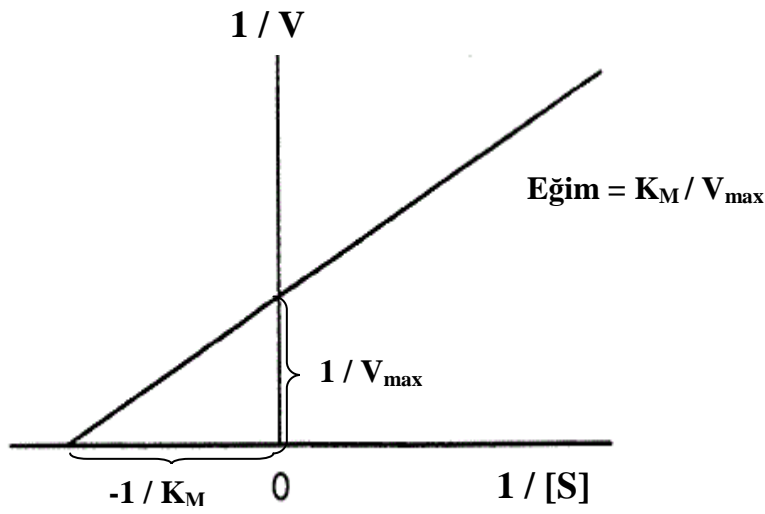
Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_M$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz ve reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_M$ 'dir.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

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru

denkleminde dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemdir [71].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.2)$$

Bu denkleme göre ordinatta $1/V$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_M/V_{\max} 'tır (Şekil 2.8.).

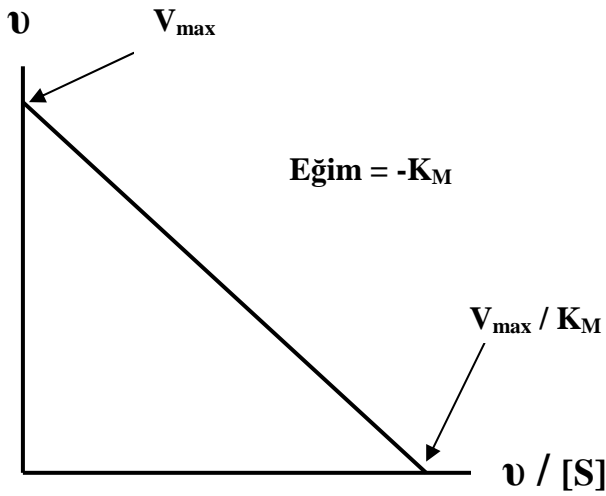


Şekil 2.8. Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk denkleminin her iki tarafının $V_{\max} \times V$ ile çarpılması ve gerekli düzenlemelerin yapılmasıyla Eadie-Hofstee denklemi elde edilir [2].

$$V = -K_M \cdot \frac{V}{[S]} + V_{\max} \quad (2.3)$$

Bu denkleme göre ordinatta V , apsiste $V/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise $-K_M$ 'dir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Eadie-Hofstee grafiği

2.2. Serbest Radikaller

Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Tek, yani eşleşmemiş elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verirler. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri” (ROS) denir [72].

Atomik ya da moleküler yapıda eşleşmemiş tek elektron içeren bu bileşikler kendi orbitallerini tamamlamak için komşu moleküllerden elektron kopararak zincir reaksiyonlarını başlatırlar [73]. Oksijen radikali serbest elektronunu eşleştirmek için başka bir molekülden elektron aldığı anda diğer molekülü kararsız hale getirir. Bu nedenle, serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilirler [72,74].

Serbest radikal türlerinin, oksijen-merkezli, karbon-merkezli (R•, RCOO•) ya da azot-merkezli (NO•, ONOO-) olmak üzere birçok türü vardır [75,76]. Serbest radikallerin birçoğu, kimyasalların bir ya da daha fazla reaktif ara ürüne metabolize olmalarıyla meydana gelirler [73].

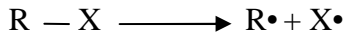
Bitkiler de yoğun ve etkili olarak oluşan serbest radikaller tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

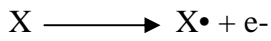
ROS			
Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojenperoksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^{\bullet}	Hipoklorikasit	$HOCl$
Peroksil	ROO^{\bullet}	Hipobromikasit	$HOBr$
Alkoksil	RO^{\bullet}	Ozon	O_3
Hidroperoksil	HOO^{\bullet}	Singlet oksijen	ΔO_2

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir [74]:

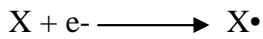
1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan homolitik bağ kırılmasıyla



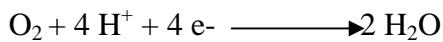
2- Bir molekülden bir elektronun ayrılmasıyla



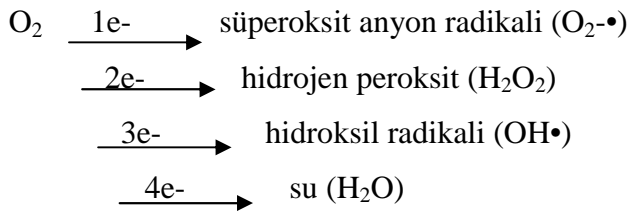
3- Bir moleküle bir elektronun katılmasıyla



Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikali üretimi artar. İnsan hücrelerine giren oksijenin %90’ından fazlası, mitokondrial sitokrom oksidaz tarafından enerji üretimi için kullanılır; iki su molekülünün oluşumu ile sonuçlanan bu işlemler süresinde, her bir oksijen molekülü 4 e⁻ ilavesiyle indirgenir.



Ancak, hücre içine alınan oksijenin tahminen %1-4'ünün kısmen indirgenmiş oksijen türlerine yani ROS'a dönüştüğü bilinmektedir [77]. Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan doğrudan moleküler oksijen değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan oksijen radikalleridir. Biyolojik sistemlerde moleküler oksijen genellikle elektron alarak aşağıdaki ara ürünleri oluşturur:



Yukarıdaki eşitliklerden de görüldüğü gibi, oksijenin suya indirgenmesi esnasında birçok serbest radikal ürünü ve oldukça reaktif türler oluşur. Birinci elektronun transferi ile süperoksit anyon radikali (O₂-•) oluşur. İkinci elektronun alınmasıyla, peroksit radikalının protonlanmış şekli olan hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur. Üçüncü elektronun alınması, oldukça toksik ve reaktif olan hidroksil radikalının (OH•) oluşumu ile sonuçlanır. Dördüncü elektronun alınması ise, bir su molekülünün (H₂O) oluşumuna yol açar [78].

H₂O₂, süperoksit anyonlarının dismutasyonu sırasında, ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonunda, mitokondriyal elektron transportunda ve nötrofillerde üretilir [72, 79]. H₂O₂, küçük ve yüksüzdür; kolaylıkla hücre membranından difüze olur ve bu nedenle üretildiğinden uzak bölgelere de yayılabilir. H₂O₂, gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen, hidroksil radikali oluşumuna yol açabildiğinden önemli bir oksidandır [80].

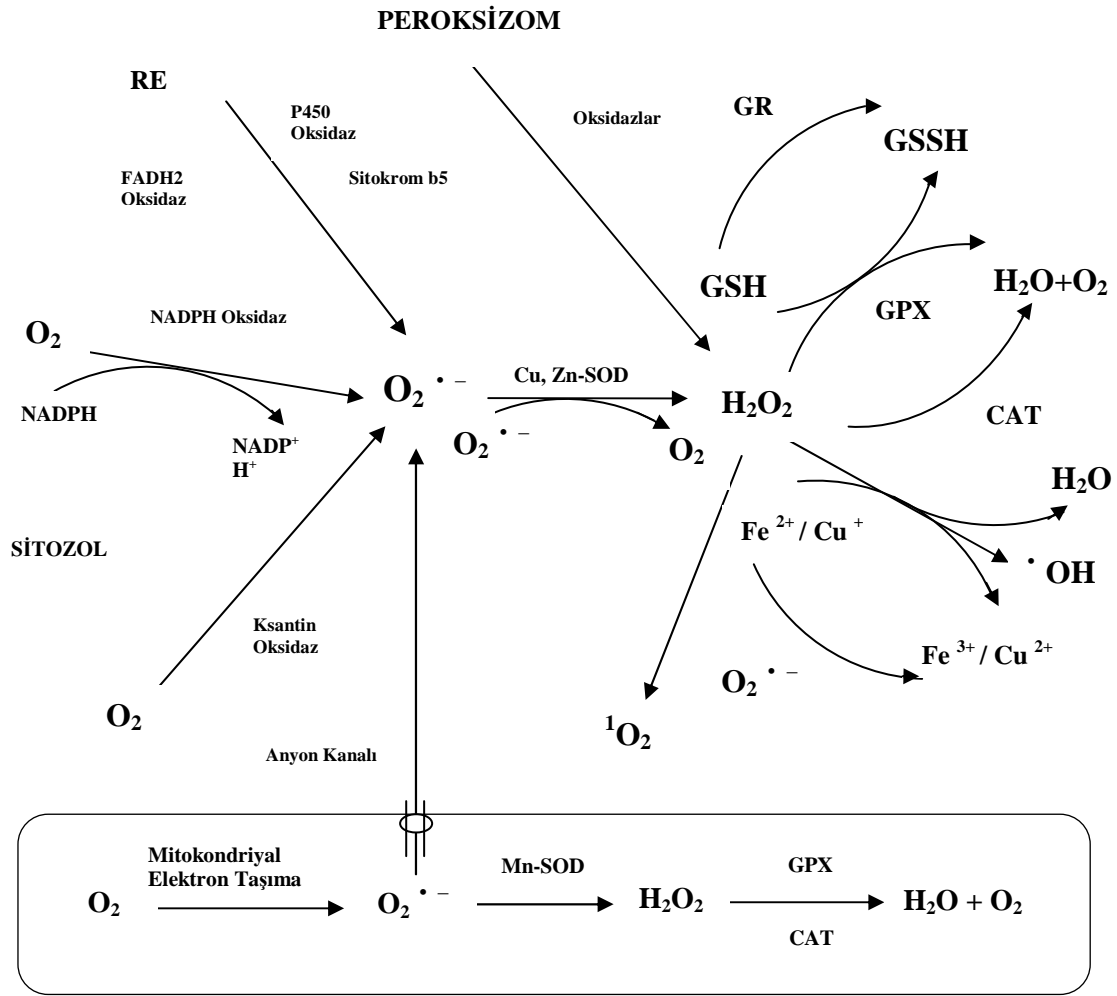
Reaktif bir tür olan H₂O₂ suda rahatlıkla çözünebilir ve mekanizması bilinmemesine rağmen hücre membranından su gibi kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Genellikle 50 µM ve üzeri konsantrasyonlardaki H₂O₂, muamele süresine ve fizyolojik şartlara bağlı olmakla beraber birçok hayvan, bitki ve bakteri hücre kültürü üzerine toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple H₂O₂'in *in vivo* olarak çok toksik olduğu ve hızlı bir

şekilde uzaklaştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu da katalaz ve POD enzimleri tarafından yapılmaktadır [81-83].

2.3. Antioksidan Enzimler

ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' ya da kısaca 'antioksidanlar' olarak bilinirler. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önlerler [78].

Biyolojik sistemlerde katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) antioksidan etkiye sahip başlıca enzimlerdendir. Vücutta görev yapan antioksidan enzimler aktivitelerini doğrudan ve dolaylı olarak gerçekleştirmelerine göre iki ayrı grupta incelenebilir. Doğrudan antioksidan aktivite gösteren enzimlerin en önemlileri arasında CAT, POD, GSHPx ve SOD sayılabilir. Dolaylı yoldan aktivite gösteren enzimlerin en önemlileri ise glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz ve kinon redüktaz enzimleridir. Bundan dolayı savunma sisteminde CAT, POD, GSHPx ve SOD gibi antioksidan enzimler büyük öneme sahiptir [84].



Şekil 2.10. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve aktif oksijenin oluşturduğu hasara karşılık savunma mekanizması [85]

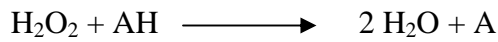
2.3.1. Peroksidaz enzimi

POD (E.C.1.11.1.7), hidrojen atomlarını vermek eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H_2O_2 bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır [86, 87].

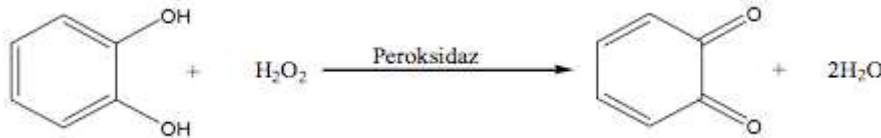
H_2O_2 miktarı peroksisomlarda, H_2O_2 'ten başka bir substrata ihtiyaç duymayan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer kompartımanlarında aktivitesini göstermek için H_2O_2 'ten başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı POD enzimleri tarafından düzenlenir [88].

POD, H_2O_2 kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrogenasyonunu da katalizler. Bu moleküller arasında guaiakol, pirogalol, o-dianisidin, o-fenilen diamin ve bazı azo boya türevleri sayılabilir [89, 90].

POD tarafından katalizlenen reaksiyonlar komplekstir ve aşağıda genel formülü verilen reaksiyonları katalizlerler [90].



POD bitki dokularında peroksit karşısında guaiakol, pirogalol, klorojenik asit ve katekol gibi birçok fenolik bileşiği yükseltgeyebilir (şekil 2.11) [91]. Enzimin geniş oranda organik bileşikleri yükseltgemesi bitkinin rengi, tadı ve besinsel değeri ile ilişkilendirilmesine sebep olmuştur. Peroksidazlar yukarıda verilen farklı aromatik bileşikler substrat olarak kullanarak metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'i etkisiz hale getirirler [92, 93].



Şekil 2.11. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması

Peroksitler doğada geniş bir yayılımda bulunurlar ve ökaryot ve prokaryot hücrelerde ifade edilirler.

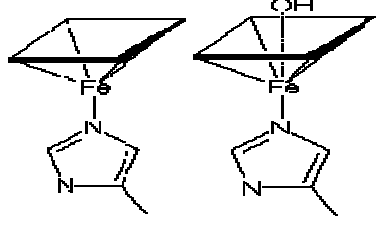
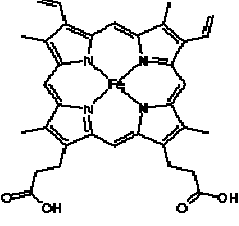
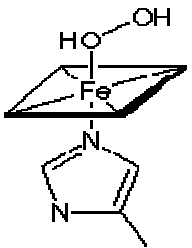
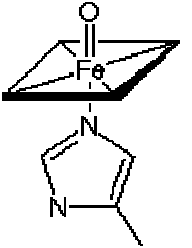
Bitki peroksidaz üst familyası üç sınıfa ayrılabilir:

- 1.sınıf peroksidazlar prokaryot kaynağının hücre içi peroksidazlarıdır,
- 2.sınıf peroksidazlar mantarimsi peroksidazlardan meydana gelir ve
- 3.sınıf peroksidazlar ise daha yüksek bitki peroksidazlarıdır [94].

Yüksek bitkiler üç ana peroksidazdan biri olan ferriprotoporfirin POD içerirler. Ferriprotoporfirin peroksidazlar bir prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX

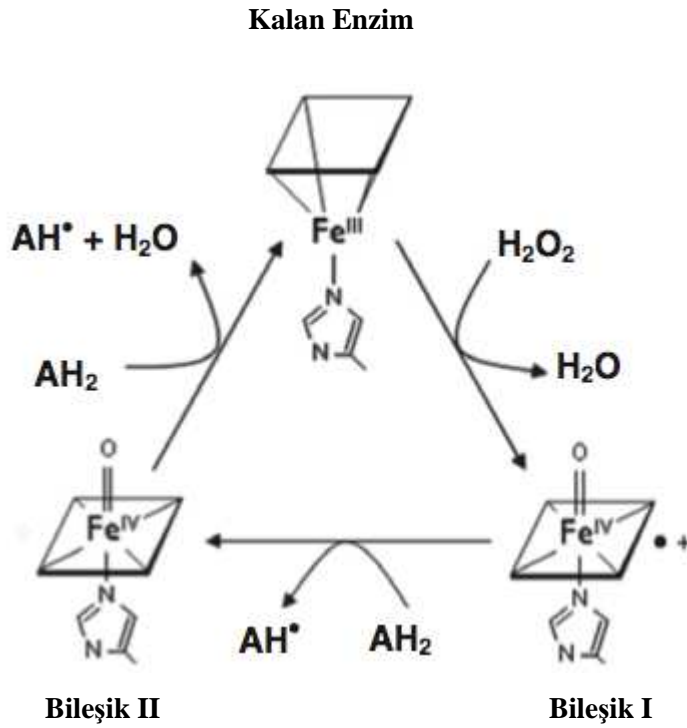
(hematin ya da hem) ihtiva ederler [86,87]. Ayrıca POD enziminin hem çözünmüş hem de membran yapısında yer alan formları da mevcuttur [95].

POD enziminin bitkilerde hormonal faaliyet [96], savunma mekanizmaları [97], sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması [98] ve lignin biyosentezi [99] gibi hayati fonksiyonlarda rol aldığı bildirilmiştir. POD sahip olduğu pek çok fonksiyondan dolayı bitkilerde genelde farklı izoenzimleri şeklinde bulunur. POD birçok bitki temelli gıdalarda mevcuttur [86]. Bitkisel kaynaklı peroksidazlar yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon, çiçek ve saplarında ve epikotillerde, nükleus, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunmaktadır [100,101].

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

Şekil 2.12. Heme b grubu

Peroksidaz bir oksidoredüktaz olup H_2O_2 ile çeşitli elektron donörlerinin oksidasyonunu katalize eder ve protestik grup olarak 'b'-tip heme taşır (Şekil 2.12) [102].

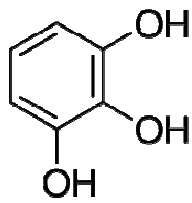


Şekil 2.13. Peroksidaz enziminin katalitik reaksiyon mekanizması

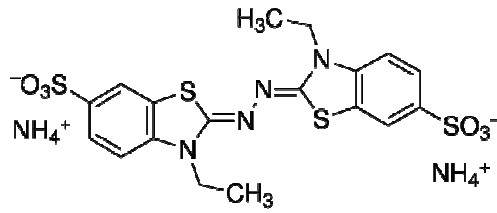
Peroksidazlar indoller, fenoller, aromatik aminler, lignin, Mn^{+2} iyonları, sitokrom c gibi diğer proteinleri içeren oksitlenebilir substratlar için farklı spesifik özellik göstermesine rağmen, üç ardışık redoks basamağına dayanan aynı katalitik reaksiyon döngüsüne sahiplerdir. Bu mekanizmada ilk olarak; enzim, hidrojen peroksitin suya indirgendiği ve enzimin oksiferril ($Fe^{IV} = O$) merkezini ve heme (porfirin π -katyon radikali) üzerine yerleşmiş organik katyon radikalini içeren Bileşik I' e oksitlendiği 2-elektron oksitlenme/indirgenme prosesinde H_2O_2 ' nin bir molekülü ile reaksiyona girer. Katyon radikali, bir substrat molekülünü oksitleyip ve oksiferril merkezi içeren Bileşik II oluşturduktan sonra 1-elektron indirgenir. Sonrasında, Bileşik II, ikinci substrat molekülünün 1-elektron oksitlenmesiyle beraber ferrik duruma tekrar indirgenir (Şekil 2.13.) [103,104].

2.3.1.1. Substratları

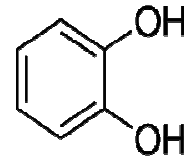
Peroksidin varlığında bitki dokularından izole edilen peroksidazlar, guiakol, pirogallol, klorojenik asit, katekin ve katekol gibi fenolik bileşiklerin geniş bir alanını oksitleyebilir (Şekil 2.14.) [91].



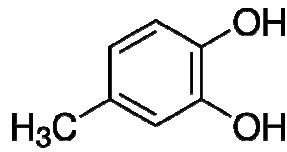
Pirogallol



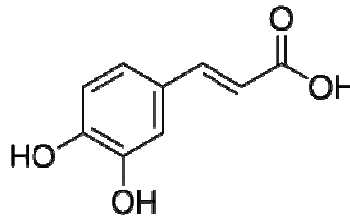
ABTS



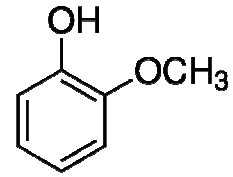
Katekol



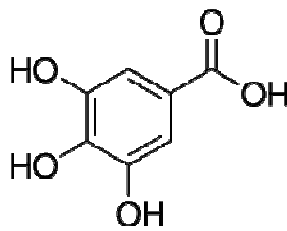
4-Metil Katekol



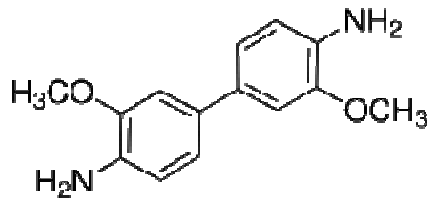
Kafeik Asit



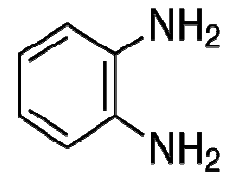
Guaiakol



Gallik Asit



o-dianisidin



o-fenilen diamin

Şekil 2.14. Peroksidaz enziminin bazı substratları

2.3.1.2. Doğadaki rolü ve uygulamaları

POD enziminin önemli fonksiyonlarından biri de çeşitli organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılmasıdır [105]. POD yüksek hassasiyetinden dolayı mikroanalitik ve klinik tanı için de önemli bir ayıraç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, ilaç, kimya ve gıda sanayinde POD için yeni uygulamalar önerilmektedir [106].

Kavramsal değerlerin yanı sıra peroksidazlar bazı pratik uygulamalara sahip olduğu bilinir. Porfirin ya da metalloporfirin içeren enzimler (heme peroksidazlar içeren) diğer biyomedikal cihazlar ve biyosensörler için yeniden kullanılabilir katalitik tabakaların oluşumu içindeki bu enzimlerin kullanımını sağlayan optik ve elektrokimyasal özellikleri açıklar. Peroksidazlar pH, DNA, çinko, bakır ve diğer metallerin belirlenmesi için floresans sensörler içinde uygulanmaktadır. Bitki peroksidazları arasında çoğu çalışılan enzimler doğal ya da rekombinan bayırturpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazları (HRP)'dır. Bunlar geniş olarak, kirletilmiş suların yeniden çözümü, organik bileşiklerin biyotransformasyonu, organik sentezleri ve H₂O₂ algılanması için biyosensörlerin oluşumu için kullanılır [107].

HRP (E.C.1.11.1.7) günümüze ait sistem kontrollerinde çok önemli bir enzimdir: bağışıklığa ait analizlerin yaklaşık % 80'i, konjuge bir enzim olarak peroksidaz ile enzim-antikör eşleniklerini kullanır [108].

Fenolik bileşikler çeşitli endüstriyel aktiviteler vasıtasıyla üretilmiş organik kirletici maddelerin başlıca sınıflarından biridir. Örneğin 2000 yılında krezoller, nitrofenoller, klorofenoller, katekol, 4,4'-izopropilidendifenol (bifenol A), 2-fenilfenol ve fenol içeren fenolik artıkların 97000 tondan daha çoğu Amerika Birleşik Devletlerinde üretilmiştir. 2000 yılında üretilen fenolik artıkların aşağı yukarı 6800 tonu hava emisyonu, yüzey suyu akıntısı, toprak düzenlemesi ve yer altı akıntısı yoluyla çevreye salınmıştır. Fenolik bileşiklerin çevresel etkileri ve zehirliliği, aromatik halka üzerinde değiştirilen grupların yerlerine, tiplerine ve sayılarına bağlı olarak değişir. Bu kimyasalların çeşitli organizmalar için zehirli olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, bifenol A ve alkil fenoller gibi bazı fenolik kirletici maddeler çok küçük

konsantrasyonlarda bile aktiviteleri bozarak potansiyel endokrine hükmeder. Bazı alkilfenoller ve klorofenoller gibi fenoller yüksek derecede tepkisizdir şöyle ki geleneksel biyolojik prosesler bu bileşenleri etkin olarak gideremeyebilir. Bu yüzden çok etkili işlem proseslerinin geliştirilmesi endüstriyel atık akıntularından ve çevreden oluşan bu fenolik kirletici maddelerin giderilmesi için istenmektedir. Yeni işlem seçenekleri arasında HRP gibi bir peroksidazı ve H_2O_2 'i kullanan bir enzimatik proses yüksek verimlilik ve seçicilik ile sulu çözeltilerden oluşan çeşitli fenolik kirletici maddeleri gidermede çok etkinlik gösterir. POD, H_2O_2 'in varlığında çeşitli fenoller ve anilinlerinin dehidrojenasyonunu katalize eder [109].

POD endüstriyel atık sularının işlenmesi için kullanılabilir. Örneğin önemli kirletici maddeler olan fenoller HRP kullanılarak enzim katalizli polimerizasyonu yoluyla ortadan kaldırılabılır. Bu yüzden fenoller, fenollerden daha az toksik olan oligomerler ve polimerlerin üretildiği reaksiyonlara katılan fenol radikallerini oksitler. Bunun yanında peroksidazlar sert reaksiyon şartlarını gidererek sert kimyasalların bir kaçınının alternatif bir seçimi olabilir. Yapıştırıcılar, bilgisayar çipleri, araba parçaları ile konserve kutuları ve davul astarları gibi çoğu üretim proseslerinde POD kullanımı hakkında bir çok araştırma vardır [110].

POD, yumru kökleri, yapraklar ve meyveler gibi geniş kaynaklardan karakterize ve izole edilebilmektedir. Bazı yaprak kaynaklarında bulunan POD arpa, pirinç, tütün gibi türlerden saflaştırılmıştır. POD enzim bağışıklık analiz kitlerinde ve laboratuvar deneylerinin klinik teşhisi için belirteçlerin önemli bir bileşeni olarak geniş bir şekilde kullanılır. POD geniş endüstriyel uygulamalara sahip olan bir enzimdir. POD atık sularda oluşan toksik fenollerin bozulmasında, sentetik boyaların renk giderilmesinde, organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunu katalize edebilir. POD diğer enzimlere nazaran deterjan formülasyonu için yeni bir alan sunmaktadır [102].

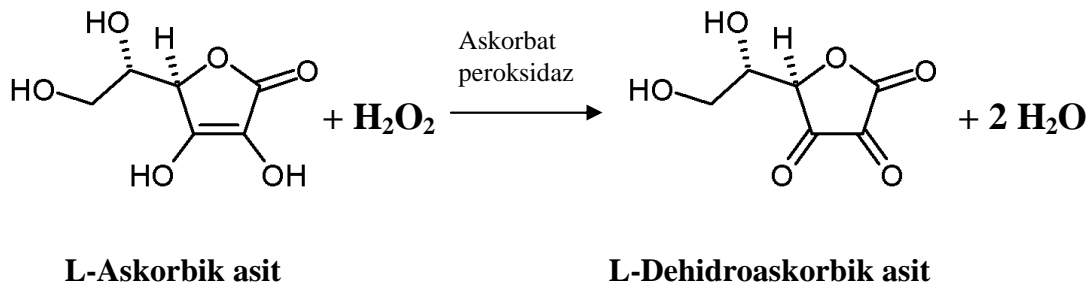
POD enziminin yüksek termal kararlılığı ve aktivite ölçümünün kolaylığından dolayı, POD artık aktifliği bitkilerin ısı prosesinin ölçülüp ölçülmediğini sıkça belirler. Peroksidazlar aynı zamanda çeşitli polimerleri sentezlemek, organik

moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonu ileletmek ve biyotedavi dolayısıyla serbest radikallere yol açan gittikçe artan çekici katalizörler olmaktadır [111].

POD (EC 1.11.1.7) bitki sistemi içinde serbest radikallerin (peroksitler) giderilmesinde çok önemli bir rol oynadığı bilinen enzimlerin bir grubunu içerir. Bu enzim laboratuvar deneyleri ve kimyasal sistem kontrollerinde önemli bir bileşik olarak bir kaç ticari uygulamalarda dahi kullanılmaktadır. POD enziminin daha geniş katalitik aktivitesinden dolayı, kimyasalların geniş bir dağılımı POD kullanılarak düzeltilebilir ve bu yüzden çeşitli aromatik bileşiklerin sentezleri, atık sulardan fenollerin ve gıdalarda bulunan peroksitlerin giderilmesi, içecekler ve endüstriyel atıklar gibi uygulamalar için kullanılabilir. Uzun yıllar bayırturpu POD enzimin ticari kaynağı olmuştur. Fakat diğer kaynaklar benzer ya da daha iyi substrat belirlilikleri ile POD sağlayabilirler. Ham kaynaklardan saflaştırma ve daha yüksek üretim maliyeti çoğu endüstriyel uygulamalarda bu çok yönlü enzimin kullanımını sınırlar. Bu yüzden enzim için bulunmuş alternatifler için sürekli olarak verilen çaba, farklı kaynakların araştırmasıyla sonuçlanmaktadır [112].

2.3.2 Askorbat peroksidaz enzimi

Askorbat peroksidaz (APX, E.C. 1.11.1.11) substrat olarak askorbati kullanarak hidrojen peroksit gibi peroksitleri detoksifiye eden enzimdir. APX askorbattan peroksite elektronların transfer edilmesini katalizler, ürün olarak dehidroaskorbat ve su oluşur (Şekil 2.15.) [113].



Şekil 2.15. Askorbat peroksidaz reaksiyonu

APX, prostetik grubu protoporfirin olan heme içeren bir enzim olup, siyanür ve azid tarafından inhibe edilir [114,115].

APX enzimi yüksek bitkilerde keşfedilmiştir. Vakuol, hücre duvarı, sitozol de bulunan guaiakol peroksidaz gibi birçok enzimden farklı olarak organellerde lokalize olmuştur. APX izoenzimleri dört farklı hücresel kompartımanda lokalize olmuştur. Kloroplastlarda stromatal APX (sAPX) ve tilakoid membrana bağlı APX (tAPX), peroksizom (mikrobody) membranına bağlı APX (mAPX) ve sitozolik APX (cAPX). Beşinci bir APX izoenzimi mitokondri membranına bağlı olarak (mitAPX) bulunmuştur [116].

Bitki hücrelerinde H_2O_2 'in detoksifikasyonunda en önemli indirgen substrat AsP'dir. APX, AsP ve H_2O_2 'i L-dehidroaskorbik asite ve suya parçalamaktadır. AsP, süperoksit anyonu, singlet oksijen ve H_2O_2 gibi ROS'ların geniş bir bölümünü yok etmekte ve zincir kırıcı olarak görev yapmaktadırlar [117].

Bitkilerde AsP hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokularda milimolar konsantrasyonlarda birikebilir. Yapraklar klorofilden daha fazla askorbat içermektedir. AsP en önemli antioksidanlardan biridir ve doğrudan hidroksil radikalleri, süperoksit ve singlet oksijen ile reaksiyona girmektedir. Fotosentezin düzenlenmesinde, ışığa karşı korumada önemli olmasının yanı sıra prostetik grup olarak metal iyonu bulunduran enzimlerin aktivitelerinin korunmasında da önemli bir role sahiptir [118].

Son yapılan çalışmalar, ozon, fazla ışın, aşırı sıcaklık, tuz ve parakuat değerleri gibi birçok çevresel strese maruz kalan yüksek bitkilerde bulunan APX izoenzimlerinin aktivitelerindeki değişikliklerin üzerinde durmaktadır [119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127].

2.4. Kiwano (*Cucumis metuliferus*)

Kiwano (*Cucumis metuliferus*), kabakgiller (*Cucurbitaceae*) familyasına ait bir bitkidir. Boynuzlu kavun, Afrika boynuzlu kavunu, kavun, jelli kavun, hedged gourd, İngiliz Domatesi, melano, kiwano veya "cherie" gibi adlarla bilinir.

Kiwano, Güney ve Orta Afrika'da doğal olarak yetişen tek yıllık tırmanıcı bir bitkidir. Çevre düzenleme, güzel görünüşü ve meyvesi için İsrail, Kenya, Yeni Zelanda ve Amerika da yetiştirilir [128].

Türkiye'ye yeni gelmiştir. Antalya, Manisa, Alanya gibi yerlerde yetiştirilmektedir. "Alanya kavunu" adıyla da tanıtımı da yapılmaktadır [129]. Meyvesinin tadı salatalık, kabak arası veyahut salatalık, muz, limon karışımı bir lezzet olarak tanımlanmaktadır [130]. Yaprakları tüylü olup ovaldir. Monoik çiçekleri vardır ve kendi kendini tozlayabilir. Boynuzlu kavun olarak bilinen kiwano oval 10 cm çapında ilginç görünümlü bir meyveye sahiptir (Şekil 2.16.). Olgunlaştığında sarımsı portakal renkli kabuk ve kabuk üzerinde mahmuzlar (çıkıntı, boynuz) vardır. Sulu, etli meyve içinde tohumlar bulunur. Tohumlar jelimsi bir madde ile sarıdır. Meyvesi çiğ ya da meyve suyu şeklinde değerlendirilir. Tohum yoluyla yetiştirilir [128]. Bu bir yıllık bitki sert soğuklara duyarlıdır. Kiwano iyi drenaja sahip verimli zengin topraklarda yetişir. Düzenli olarak sulama gerektirir [129].



Şekil 2.16. Kiwano (*Cucumis metuliferus*)

2.4.1. Faydaları

Afrika'da yetiştirilen geleneksel bir bitki olan kiwano, cildin, saçların, tırnakların, diş etlerinin, dişlerin ve kemiklerin sağlıklı kalmasını sağladığı, idrar yolları, solunum yolları enfeksiyonlarında vücudun direncini arttırdığı söylenmektedir [131].

2.4.2. Besin değeri

Bir adet orta büyüklükte kiwano tüketildiğinde 25 kcal enerji sağlar. Besin içeriği olarak; %4.8 toplam mineral, %7.8 yağ, %6.2 lif, %9.04 protein, %62.25 karbonhidrat içermektedir. Bir kg kiwano bitkisinde 161.70 mg sodyum, 180.8 mg potasyum, 0.37 mg kalsiyum, 0.16 mg magnezyum ve 0.75 mg fosfor bulunmaktadır [132].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler

Bu çalışmada kaynak bitki olarak kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisi Antalya bölgesinden temin edilmiş olup POD ve APX enzimlerinin izolasyonu için kullanılmıştır.

Çalışmalarımız süresince PVP, AsA ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojenfosfatın kullanıldığı tampon çözeltiden oluşan karışım izolasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Sitrik asit mono hidrat, sodyum sitrat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, tris amino metan hidroklorid ve trizma-base kimyasalları tampon çözelti hazırlama işlemlerinde kullanılmıştır. Enzim saflaştırma işlemlerinde amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ve t-bütanol kullanılırken, SDS-PAGE ve Native PAGE işlemlerinde N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin (TEMED), amonyum persülfat (APS), N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, bromofenol mavisi, gliserol, glisin ve Coomassie Brilliant Blue R-250 kullanılmıştır. Protein miktarının tayininde CuSO₄.5H₂O, Folin-Ciocalteu, Na₂CO₃ ve BSA (sığır serum albümini) kullanılmıştır. 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, gallik asit, guaiakol, ABTS, H₂O₂, o-fenilen diamin, substratları kullanılmıştır. NaN₃, tiyoüre, KCN, L-Sistein, EDTA, SDS, Triton X-100, iyodoacetamid, 2-nitrobenzoik asit, 2-merkapt etanol, L-Glutatyon, L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin kimyasalları enzim aktivitesi üzerine madde etkisi çalışmalarında kullanılmıştır. Kimyasallar Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar;

-Shimatzu UV-2401 Pc UV-VIS Spektrofotometre

-Nüve NF 800 R Soğutmalı Santrifüj

- Nüve NF 200 Santrifüj
- WiseStir MSH-20D Manyetik Karıştırıcı
- Özel yapım Soğutucu kabin
- HANNA pH 211 pH metre
- Thermo Scientific Owl P8DS Protein elektroforezi
- Nüve Nb20 Su banyosu
- Precisa XB 220A Hassas terazi
- Microlit VVCS-200 ve 1000 Otomatik pipetler
- Uğur UDD 100BK Derin dondurucu
- Beko Hotmix 2155 Blender

3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu

Dondurucuda depolanmış kiwano bitkisinin iç kısmında bulunan çekirdek kısımları hariç etli ve kabuk kısımlarından 10'ar gram alınarak ince ince doğranmıştır. % 0,5 PVP ve 0,0002 M AsA içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti ile blender yardımıyla 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Elde edilen homojenat 3 kat tülbetten süzölmüş ve 5.000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Ham enzim ekstratı olarak yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen süpernatant enzim karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.1. Üçlü-faz ayırma tekniğı (TPP) ve diyaliz

Enzimi saflaştırmak için TPP kullanılmıştır. TPP biyomolekülleri ayırmada, saflaştırmada kullanılan yeni bir yöntemdir. Diğer kromatografik yöntemlere kıyasla kolay, ucuz ve kısa sürede yüksek verim alınabilen bir teknik olmasından dolayı tercih edilmiştir. Yaptığımız çalışmada A. Şen ve arkadaşları tarafından geliştirilen TPP uygulamasından faydalanılmıştır [133].

Ham enzim ekstratı hızlı bir şekilde süzöldükten sonra santrifüjde 5.000 rpm' de 15 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernanta üst üste 2 kez TPP uygulanmıştır.

Birinci TPP için; ham ekstrakt % 50 (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile 25 °C' de doyunluğa getirilmiştir. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı şu formülle tespit edilmiştir.

$$g[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 1,77 \times V \times (S2 - S1) / 3,54 - S2 \quad (3.1)$$

V = Süpernatant

S1 = 1' in kesri şeklinde mevcut $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doyunluğu

S2 = 1' in kesri şeklinde istenilen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doyunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş ve az miktarlarda ilave edilerek katılmış ve her ilave sırasında daha önce katılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ların çözülmüş olmasına dikkat edilmiştir. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doyunluğa getirilen ham ekstrakta 1:1,5 oranında t-bütanol (v/v) ilave edilmiş ve 1 dk. boyunca nazikçe karıştırılmıştır. Ardından karışım 25 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. Fazların daha belirgin bir şekilde ayrılabilmesi için 4000 rpm' de 10 dk. santrifüj edilmiştir. t-bütanol içeren organik üst faz, ara (orta) faz, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren alt faz olmak üzere 3 faza ayrılmıştır. Üst faz dikkatlice pastör pipetle atılmış ve geriye kalan ara ve alt faz dikkatlice toplanmıştır. Ara faz 1 ml 0,1 mM pH 7,0 tamponuyla çözülmüştür.

Birinci TPP'den elde edilen ara ve alt faza ayrı ayrı bir kez daha TPP işlemleri uygulanmıştır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doyunluğu toplamda % 95' getirilmiş ve t-bütanol aynı şekilde 1:1,5 (v/v) oranında ilave edilmiştir.

Maksimum verimle sonuçlanacak en iyi koşulları belirlemek için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doyunluğu toplamda %55, % 65, %75, %85, %95 ve t-bütanol (v/v) oranı 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2 olacak şekilde denenmiştir.

Üst üste 2 kez TPP uygulanan enzim çözeltileri diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Enzim çözeltileri ayrı ayrı diyaliz torbasına yerleştirilmiştir. Diyaliz torbası, içinde

pH = 7,0 fosfat tamponu bulunan geniş bir behere yerleştirilerek 24 saat süreyle diyaliz edilmiş ve bu işlem sırasında tampon çözelti en az 3 - 4 defa değiştirilmiştir.

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

Diyaliz işleminden sonra enzim çözeltilerinin Lowry yöntemiyle protein miktarı ve aktivite tayini belirlenmiştir. Her bir işlem en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2. Lowry yöntemi ile protein miktarının tayini

Lowry metodu; proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks ise spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbanı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarları tespit edilir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungstik-fosfomolibdik asidi (Folin-Ciocalteu) redükleyerek mavi renk verirler. Bu metod ile, proteinler önce alkali ortamda bakır iyonu ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksini oluşturur, daha sonra ortama Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendiğinde bakır-protein kompleksi, tirozin ve triptofan kökleriyle birleşir.

Ayıraçlar:

1. Ayıraç A: % 2 Na₂CO₃ (0.1 N NaOH içinde). 2 g Na₂CO₃ tartılarak 0.1 N NaOH içinde çözünmesi sağlandı.
2. Ayıraç B1: % 1 CuSO₄. 5H₂O. 1 g CuSO₄.5H₂O tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
3. Ayıraç B2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
4. Ayıraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B1 ve B2.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi.

6. Standart Bovin Albumin Çözeltisi: 1 mg/mL bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlandı.

3.2.3. SDS jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli % 12'lik ve yükleme jeli %5'lik olacak şekilde yapılmıştır.

Tablo 3.1. SDS jel elektroforezi bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (%12)	Yükleme jeli (%5)
Yükleme jeli tamponu (1 M Tris-HCl)	---	1.25 mL
Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2.5 mL	---
% 10 SDS	0.1 mL	0,1 mL
%30 Akrilamid/ Bisakrilamid	4.0 mL	1.67 mL
Saf su	3.3 mL	6.87 mL
% 10 APS	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.01 mL

Tablo 3.1' deki gibi hazırlanan ayırma jeli temizlenen cam plaklar arasına dökülmüştür. Jel donduktan sonra plakalar arası pastör pipet kullanılarak yükleme jeli (Tablo 3.1.) ile doldurulmuştur ve üst kısmına tarak yerleştirilerek donmaya bırakılmıştır. Hazırlanan jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilip, tank yürütme tamponuyla doldurulmuştur. Standart proteinler ve örnekler 0,6-1 oranında numune tamponuyla karıştırılmış ve 95 °C' de 20 dk inkübe edilmiştir. Tarak çıkartıldıktan sonra jelde oluşan kuyucuklara denatüre edilen ham enzim özütü ve örnekler pipetle yerleştirilmiştir. Daha sonra tank kapatılıp sistem çalıştırılmıştır. Proteinler (jelde oluşan mavi renkli boya) yükleme jelinden çıkana kadar 30 mA' de, ayırma jelinin sonuna gelene kadar 45 mA' de yürütülmüştür. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartılıp boyama çözeltisiyle hafifçe çalkalanarak yaklaşık 3 saat boyanmıştır. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise, boya giderme çözeltisiyle muamele

edilmiştir. İşlem boya jelden tamamen uzaklaşana kadar boya giderme çözeltisinde birkaç saatte bir sürekli değiştirilmiş ve sonrasında protein bantlarının görünümü kaydedilmiştir.

3.2.4. Native (doğal) jel elektroforezi (Native-PAGE)

Ham enzim özütünde ve TPP ile saflaştırılmış POD enzimin varlığı, SDS'siz ortamda gerçekleştirilen native jel elektroforezi yapılarak substrat çözeltileriyle ortaya konulmuştur. Doğal elektroforez işlemi için kullanılan % 12' lik ayırma jeli ve % 5' lik yükleme jeli Tablo 3.2' deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. Native jel elektroforezi bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (%12)	Yükleme jeli (%5)
Yükleme jeli tamponu (1 M Tris-HCl)	---	1.25 mL
Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2.5 mL	---
%30 Akrilamid/ Bisakrilamid	4.0 mL	1.67 mL
Saf su	3.4 mL	6.97 mL
% 10 APS	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.01 mL

Tablo 3.2' deki gibi hazırlanan ayırma jeli temizlenen elektroforez cam plakaların arasına mikropipet yardımıyla hava kabarcığı oluşmayacak şekilde doldurulmuştur. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra Tablo 3.2' de belirtildiği gibi hazırlanan yükleme jeli ile tamamen doldurularak, tarak üst kısmına yerleştirildikten sonra donmaya bırakılmıştır. Plakalar arasındaki jel donduktan sonra tarak çıkarılarak sistem elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank native elektroforez yürütme tamponuyla doldurulmuştur. Native elektroforez yükleme boyası ile 0.75:1 oranında karıştırılan standart protein, ham enzim özütü ve örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar 30 mA' de, boya ayırma jelinin sonuna gelene kadar 45 mA' de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılmış ve jel 45 mM guaiakol, 22.5 mM H₂O₂ ve

100 mM pH 7.0 fosfat tamponuyla 20 dk boyunca hafifçe çalkalanarak muamele edilmiştir. Daha sonra protein bantlarının görüntüsü kaydedilmiştir.

3.3. Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu

POD enziminin kinetik özelliklerinin araştırılmasında substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, tuz toleransı, depolama kararlılığı ve çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapmış olduğumuz bütün çalışmalar H_2O_2 varlığında gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi, POD enziminin H_2O_2 substratı varlığında diğer bir substrata karşı aktivite göstermesidir.

3.3.1. POD aktivite tayini

Peroksidaz enziminin aktivitesi pH 7,2'de 0,1 M fosfat tamponu, 4-metil katekol çözeltisi, H_2O_2 ve ham enzim ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında, 420 nm'de 60 sn süre ile absorbanstaki artış ölçülerek belirlenmiştir. Diğer substratlar için de uygun pH değerlerinde aynı işlemler yapılmıştır. Her aktivite tayininde ölçümler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.2. Substrat spesifikliği

Substrat spesifikliği çalışması enzimin hangi substrata karşı afinitesinin daha yüksek olduğ u ve hangi substratla etkileşime geçebildiğini göstermektedir. Substrat spesifikliğini belirlemek amacı ile POD enziminin 10 farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, gallik asit, H_2O_2 ve o-fenilen diamin substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen grafiklerden her substrat için K_M ve V_{max} değeri hesaplanmış ve substratlar kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda enzim kullanılan tüm substratlara karşı aktivite göstermiştir.

3.3.3. pH etkisi

POD enzimi aktivitesi sabit H_2O_2 substratı varlığında 3,0 ile 9,5 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile 9 farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, gallik asit ve o-fenilen diamin) saptandı. pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,5 aralığında 0,1 M Tris tamponu hazırlanmıştır. Enzim aktivite ölçümleri daha önce bölüm 3.3.1' de belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.3.4. Sıcaklığın etkisi

POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C' lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışı izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, gallik asit ve o-fenilen diamin) için optimum sıcaklık çalışması yapılmıştır. Sabit 1 mM H_2O_2 varlığında her bir substrat 5 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

3.3.5. Enzim kinetiği

Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması için kinetik çalışmalarda 0,01 mM ile 20 mM arasında değişen substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Enzimin V_{max} ve K_M değerinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

3.3.6. POD aktivitesi üzerine madde etkisi

3.3.6.1. İnhibitör etkisi

POD enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisini incelemek amacıyla NaN_3 , tiyoüre, KCN, L-sistein, EDTA, SDS, Triton X-100, L-glutasyon, 2-merkapt etanol olmak üzere toplam 9 adet inhibitör kullanılmıştır. Her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek için sabit enzim, 1 mM H_2O_2 ve 3 mM'lık sabit substrat konsantrasyonunda aktivite tayini baz alınarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör aktiviteleri tayin edilmiştir. Sonra her bir inhibitör için % Bağlı Aktivite - [I] grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden enzim aktivitesini yarıya indiren substrat konsantrasyonu olan I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Aktivite tayinleri 4-metil katekol substratı varlığında gerçekleştirilmiştir. İşlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.2. Metallerin etkisi

POD enzimine metal etkisinin incelenmesi amacıyla standart koşullarda ortama çeşitli metal çözeltilerinden eklenerek aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla sabit enzim ve metal iyon çözeltileri 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 1 saat inkübe edilmiştir. Çeşitli metallerle inkübe edilen enzimin aktivitesine, 3 mM 4-metil katekol ve 1 mM H_2O_2 substrat varlığında spektrofotometrik olarak 420'nm de 60 sn boyunca bakılmıştır. Çalışmada Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Al^{+3} metallerinin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılmış ve % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. Yapılan işlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.3. Amino asitlerin etkisi

Yapılan çalışmada L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asitlerinin POD enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Amino asit çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyon baz alınarak sabit 1 mM H₂O₂ ve 3 mM 4-metil katekol substratları varlığında 420 nm' de 60 sn süresince enzim aktivitesine etkisi spektrofotometrik olarak bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar amino asit içermeyen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak her amino asit için % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. İşlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.4. Organik çözücü etkisi

POD enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla etanol, metanol, DMSO, aseton, 1-butanol, 2-propanol, kloroform, etil asetat olmak üzere toplam 8 adet organik çözücü kullanılmıştır.

Enzim 25 °C'de, sabit 150 rpm' de karıştırıcı ile 32 saat boyunca çeşitli organik çözümlerle inkübe edilmiştir. Enzim ve organik çözücü (%25, v/v) karışımından sabit miktarda alınarak 1 mM H₂O₂ ve 3 mM 4-metil katekol substratları varlığında 2.saat, 6.saat ve 32.saat sonunda spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn süresince aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar organik çözücü olmadan yapılan kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak % kalan aktivite hesaplanmıştır. Yapılan işlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.5. İyonik şiddet etkisi

POD enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için oda sıcaklığında 1- 5 mM arasında değişen NaCl çözeltilerinin enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bunu belirlemek için sabit enzim, 1 mM H₂O₂, 3 mM 4-metil katekol substratları kullanılmış ve daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki değişimi izlenmiştir. İşlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.6. Enzimin tuz toleransı

Yapılan çalışmada enzimin tuz toleransını belirlemek için oda sıcaklığında 2 saat boyunca, 1 - 5 mM arasında değişen NaCl çözeltileri ile enzim inkübe edilmiştir. Sabit enzim, 1 mM H₂O₂ ve 3 mM 4-metil katekol substratları kullanılmıştır. Önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki değişimine bakılarak enzim aktivitesi incelenmiştir. İşlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.7. Enzimin depolanma kararlılığı

POD enziminin depolanma kararlılığı çalışması -20 °C, +4 °C ve ortalama 25 °C olan oda sıcaklığı olmak üzere 3 farklı sıcaklık değerinde gerçekleştirilmiştir.

Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek için enzim aktivitesindeki azalma 1-2 saatte bir 420 nm'de 60 sn boyunca absorban değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Gün içinde birkaç değer alındıktan sonra -20 °C'de muhafaza edilmiş ve sonraki gün tekrar oda sıcaklığına getirilerek 1-2 saatte bir aynı şekilde ölçümler alınmıştır. Substrat olarak 5mM 4-metil katekol ve 1 mM H₂O₂ kullanılmıştır.

Enzimin +4 °C'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim +4 °C'de saklanarak, 1 - 2 günde bir 420 nm'de 60 sn boyunca absorban değeri ölçülerek kaydedildi. Substrat olarak 5 mM 4-metil katekol ve 1 mM H₂O₂ kullanılmıştır. -20 °C'deki kararlılığın ölçülmesi için aynı şekilde aktivite ölçülmüş fakat ölçüm sıklığı 3-4 günde bir olarak ayarlanmıştır.

3.4. Askorbat Peroksidaz Enzimin İzolasyonu

Dondurucuda depolanmış kiwano bitkisinden 10 gram alınarak ince ince doğranmıştır. % 0,5 PVP ve 0,0002 M AsA içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti blender da 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. 5,000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve 3 kat tülbent ile süzülmüştür. Bu karışım ham enzim ekstratı olarak adlandırılmıştır.

3.5. Askorbat Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu

3.5.1. APX aktivite tayini

APX enziminin aktivitesi kuartz küvette pH 6,2'de fosfat tamponu, H₂O₂, AsA çözeltisi ve ham enzim ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında, 285 nm'de 60 sn süreyle absorbanstaki azalma ölçülerek tayin edilmiştir. Her ölçüm için toplam reaksiyon hacmi 3 mL olarak sabit tutulmuştur. Zamana karşı absorban değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen grafiğin eğiminden ilk hız değerleri hesaplanmıştır ve bu işlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.2. pH etkisi

APX enzimi aktivitesine pH etkisinin incelenmesi sabit 0,02 mM H₂O₂ ve 0,5 mM AsA substratı varlığında 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar kullanılarak saptanmıştır. pH 3,0-6,0 aralığında 0,05 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,05 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,05 M Tris tamponu hazırlanmıştır. Enzim aktivite ölçümü daha önce bölüm 3.5.1' de belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.5.3. Sıcaklık etkisi

APX enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için daha önceki gibi 60 sn boyunca 285 nm'de absorbanstaki azalma izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Çalışmalar pH 6,2 fosfat tamponu, sabit 0,02 mM H₂O₂ ve 0,5 mM AsA substratı varlığında gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Enzim kinetiği

Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması için kinetik çalışmalarda 0,01 mM ile 10 mM arasında değişen H_2O_2 ve AsA'ten oluşan substrat özelteleri hazırlanmıştır. APX enzimi için H_2O_2 sabit tutularak AsA'in farklı konsantrasyonlarda optimum aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak 285 nm'de 60 sn yapılmıştır. İlk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. H_2O_2 substratının K_M ve V_{max} değerini belirlemek için 4 farklı AsA ve H_2O_2 konsantrasyonu belirlenmiştir. AsA'in her bir konsantrasyonu için farklı H_2O_2 konsantrasyonları ile enzim aktiviteleri ölçülmüştür. İlk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konulmuştur. Elde edilen değerler ile çizilen doğruların paralel olduğu ortaya çıkmıştır. Her bir paralel doğru için $y = mx + n$ denkleminde y -intersept (y -kesimi) değerleri bulunmuştur. AsA konsantrasyonunun tersine karşılık y -intersept değerleri için grafik çizilmiş ve H_2O_2 için K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Yapılan işlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.5. APX aktivitesi üzerine madde etkisi

3.5.5.1. İnhibitör etkisi

APX enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisini incelemek amacıyla NaN_3 , KCN, 2-merkapto etanol, L-sistein, EDTA, iyodoasetamid, 2-nitrobenzoik asit, L-glutatyon olmak üzere toplam 8 adet inhibitör kullanılmıştır. Kullanılan inhibitörlerin yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek için sabit enzim, 0,02 mM H_2O_2 ve 0,5 mM'lık AsA konsantrasyonunda aktivite tayini baz alınarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör aktiviteleri tayin edilmiştir. Sonra her bir inhibitör için % Bağıl Aktivite - $[I]$ grafikleri çizilmiştir ve enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu olarak ifade edilen I_{50} değerleri hesaplanmıştır. İşlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.5.2. Metal etkisi

APX enzimine metal etkisinin incelenmesi amacıyla standart koşullarda ortama çeşitli metal çözeltilerinden eklenerek aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla sabit enzim ve metal iyon çözeltileri 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda +4 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. Çeşitli metallerle inkübe edilen enzimin aktivitesine, 0,5 mM AsA ve 0,02 mM H₂O₂ substrat varlığında spektrofotometrik olarak 285 nm'de 60 sn boyunca bakılmıştır. Çalışmada Fe⁺³, Fe⁺², Cu⁺², Zn⁺², Mg⁺², Hg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Li⁺¹, Co⁺², Mn⁺², Pb⁺², Sn⁺², Na⁺¹, K⁺¹, Ni⁺², Cd⁺², Al⁺³ metallerinin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılmış ve % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. İşlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.5.3. Amino asit etkisi

APX enzimi üzerine amino asit etkisini incelemek için L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asitleri kullanılmıştır. Amino asit çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyon baz alınarak sabit 0,02 mM H₂O₂ ve 0,5 mM AsA substratları varlığında 285 nm'de 60 sn süresince enzim aktivitesine etkisi spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar amino asit içermeyen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak her amino asit için % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. İşlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR

4.1. Peroksidazın (POD) Üçlü-faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması

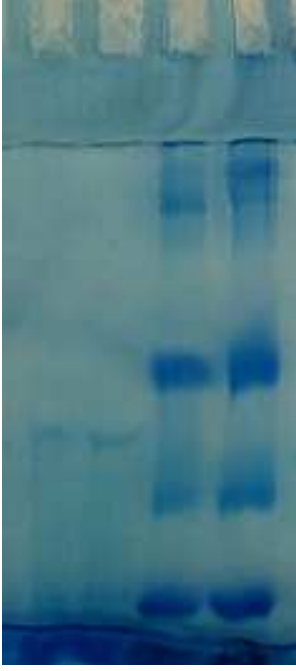
Uygulanan üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) sonrasında diyalize tabi tutulan ham ekstrakt ve örnek enzim çözeltileri için, 600 nm’ de Lowry yöntemine göre protein miktarı tayini ve 420 nm’ de spektrofotometrik olarak POD aktivitesi tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisinden elde edilen POD enziminin saflaştırılma basamakları ve saflaştırma oranı

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EU/ml.dak)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma oranı
Homojenat	444,8	1,1653	381,7198	100	1
TPP	657,2	0,8952	734,1007	147,7518	1,9231
Diyaliz	617,3	0,3619	1705,4347	138,7815	4,4678

4.2. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

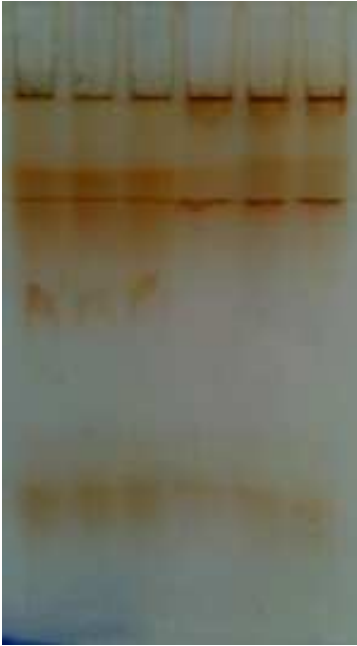
Bölüm 3.2.4’ te belirtildiği gibi gerçekleştirilen SDS jel elektroforezi sonuçlarına göre standart protein karışımındaki, ham enzim özütündeki ve örneklerdeki protein bantları Şekil 4.1’de olduğu gibi görünmektedir.



Şekil 4.1. SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel fotoğrafı

4.3. Native-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Bölüm 3.2.5' te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen Native jel elektroforezinden elde edilen ham enzim özütü ve örneklerdeki protein bantları Şekil 4.2' te olduğu gibi görünmektedir.



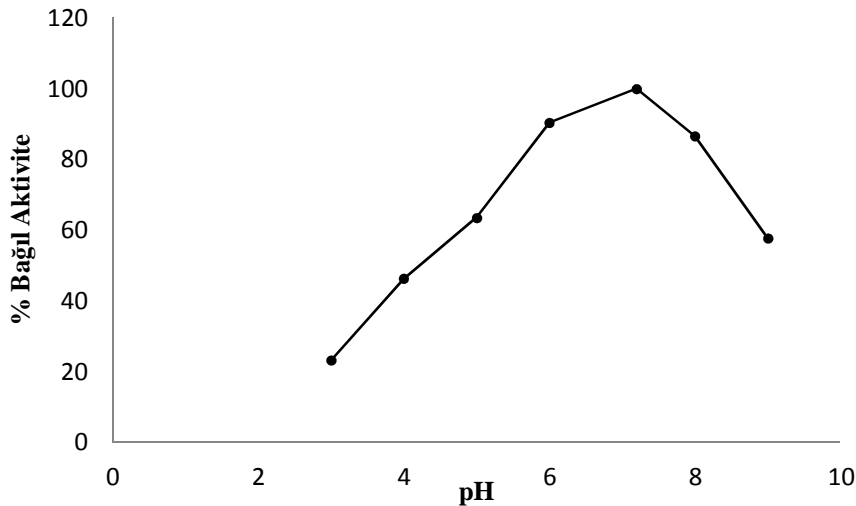
Şekil 4.2. Native-PAGE sonucunda elde edilen jel fotoğrafı

4.4. Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu

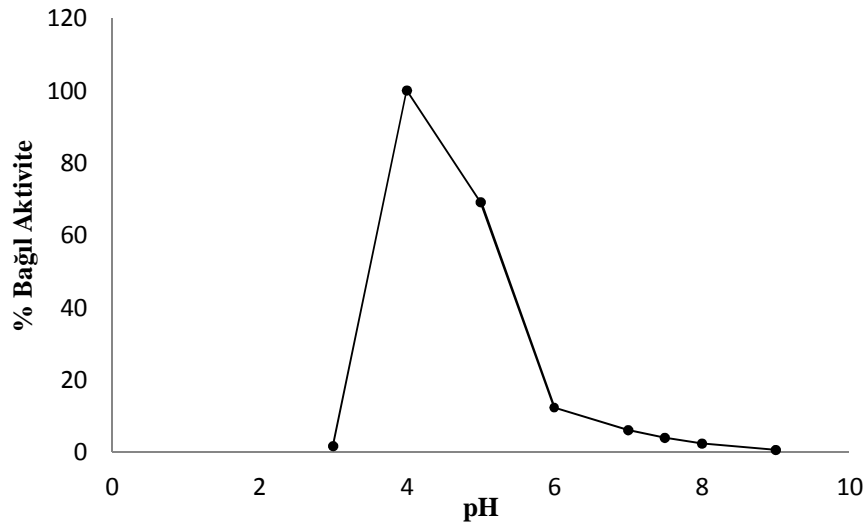
4.4.1. pH etkisi

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

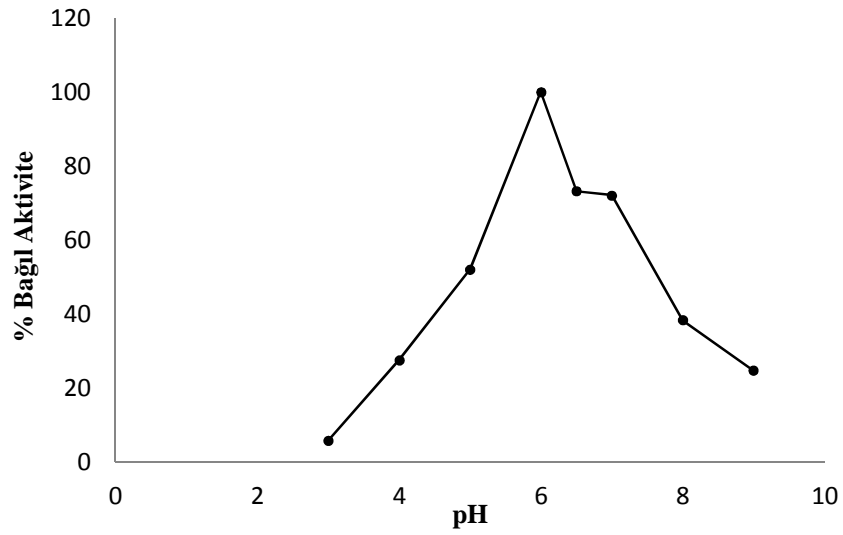
Bu çalışmada grafiklerden de görülebileceği gibi POD enziminin her substrata karşı optimum pH değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 7,2 (fosfat tamponu) (Şekil 4.3), ABTS için 4,0 (sitrat tamponu) (Şekil 4.4), guaiakol için 6,0 (sitrat tamponu) (Şekil 4.5), kafeik asit için 6,5 (sitrat tamponu) (Şekil 4.6), o-dianisidin için 4,0 (sitrat tamponu) (Şekil 4.7), o-fenilen daimin için 5,0 (sitrat tamponu) (Şekil 4.8), progallol için 7,5 (fosfat tamponu) (Şekil 4.9) , katekol için 6,0 (sitrat tamponu) (Şekil 4.10) ve gallik asit 6,0 (sitrat tamponu) (Şekil 4.11) olarak bulunmuştur.



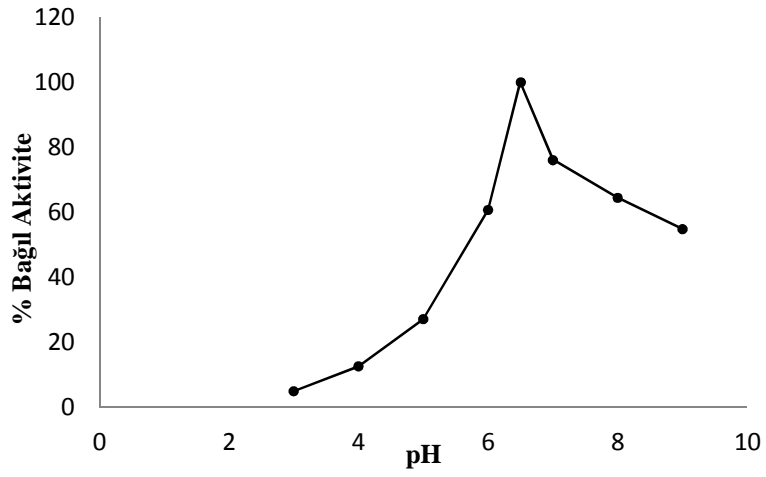
Şekil 4.3. Kiwano POD için 4-metil katekol substratının optimum pH grafiği



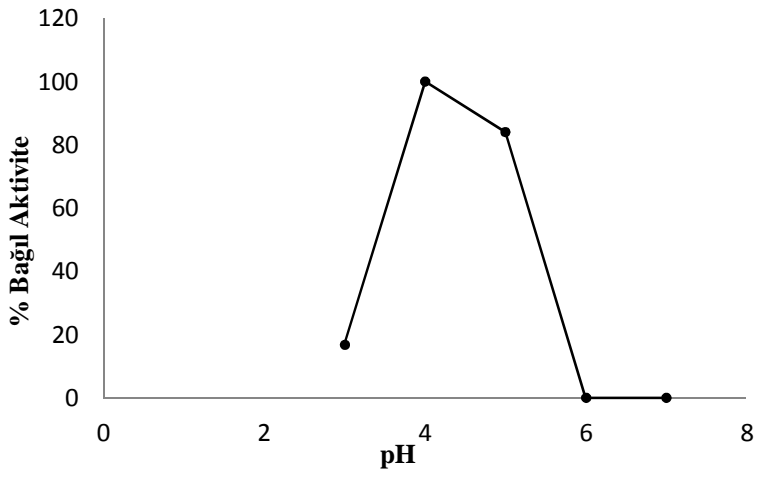
Şekil 4.4. Kiwano POD için ABTS substratının optimum pH grafiği



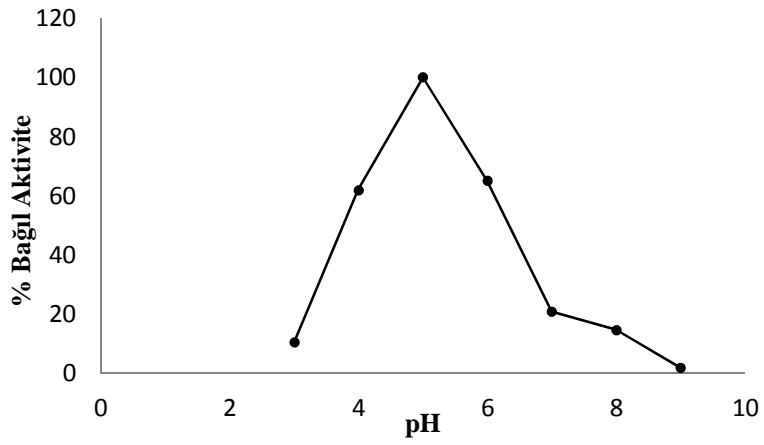
Şekil 4.5. Kiwano POD için guaiakol substratının optimum pH grafiği



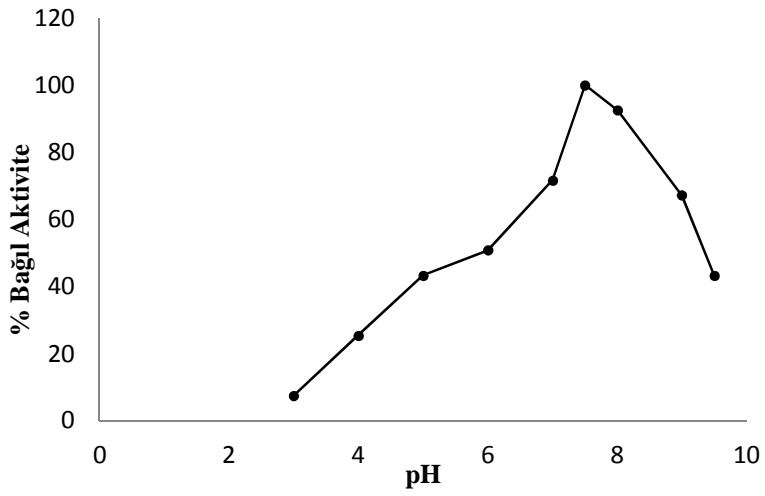
Şekil 4.6. Kiwano POD için kafeik asit substratının optimum pH grafiği



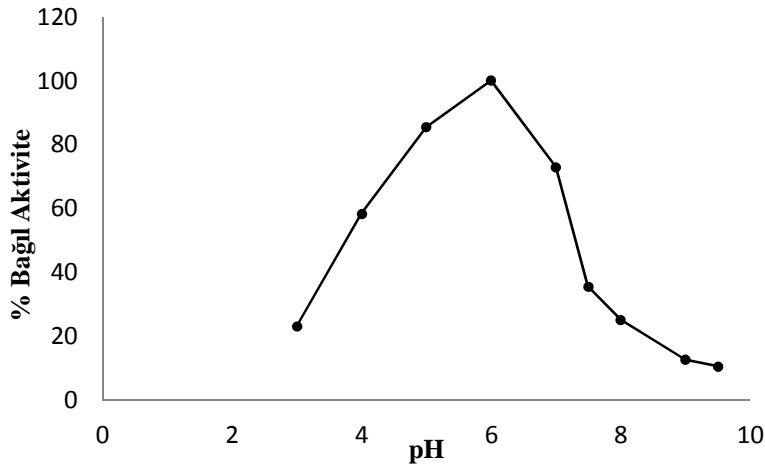
Şekil 4.7. Kiwano POD için o-dianisidin substratının optimum pH grafiği



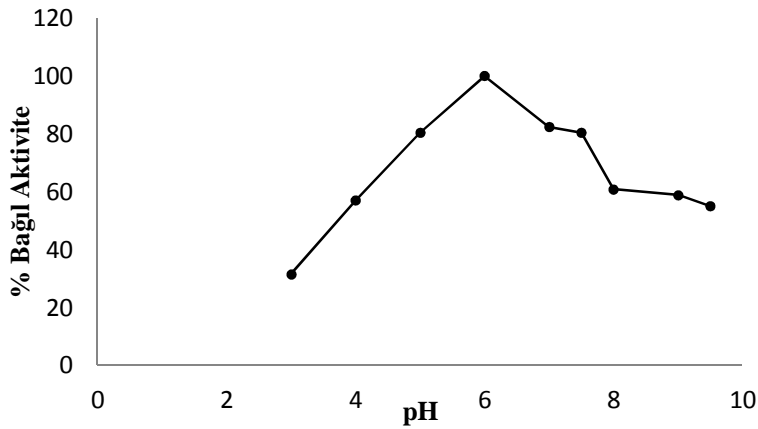
Şekil 4.8. Kiwano POD için o-fenilen diamin substratının optimum pH grafiği



Şekil 4.9. Kiwano POD için progallol substratının optimum pH grafiği



Şekil 4.10. Kiwano POD için katekol substratının optimum pH grafiği

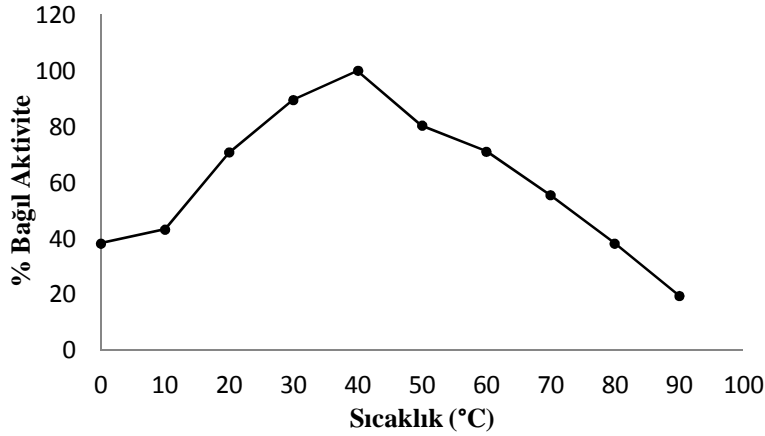


Şekil 4.11. Kiwano POD için gallik asit substratının optimum pH grafiği

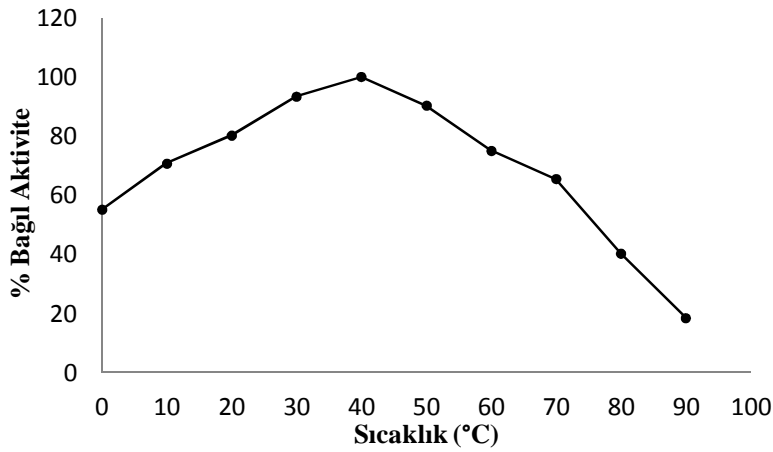
4.4.2. Sıcaklık etkisi

Bölüm 3.3.4.'de anlatıldığı gibi, 4-metil katekol, ABTS, guaiakol, gallik asit, kafeik asit, o-dianisidin, o-fenilen diamin, progallol ve katekol substratları kullanılarak POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Bu çalışmada substrat

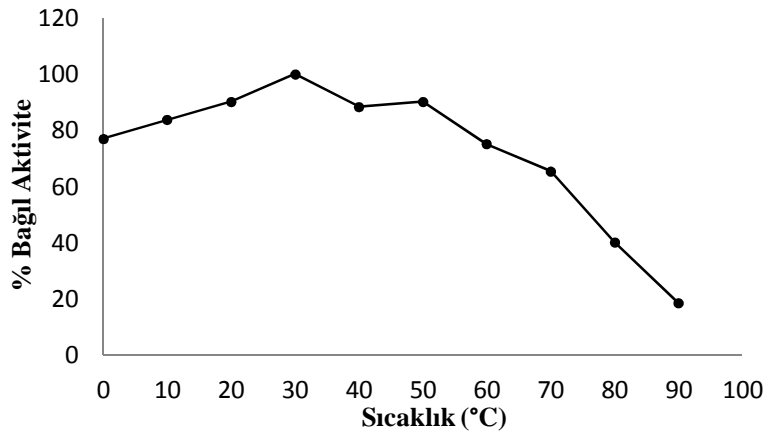
konsantrasyonu 5 mM olarak kullanılmıştır. Aşağıda verilen grafikler incelendiğinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 30 – 40 °C (optimum sıcaklık) aralıklarında olduğu görülmektedir. Optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede azalma görülmektedir. Bu da enzimin sıcaklıkla kısmen inaktif olduğunu göstermektedir.



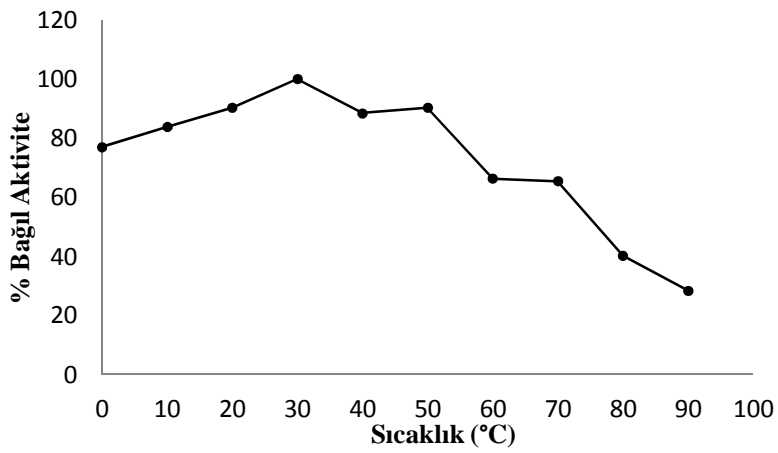
Şekil 4.12. Kiwano POD için 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



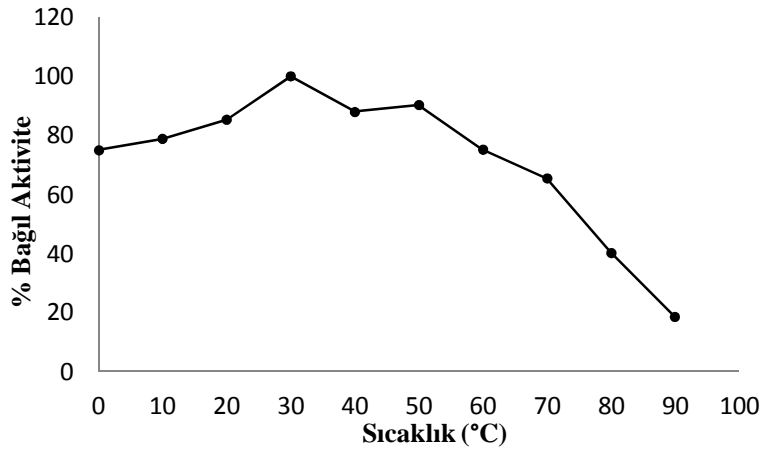
Şekil 4.13. Kiwano POD için ABTS substratının optimum sıcaklık grafiği



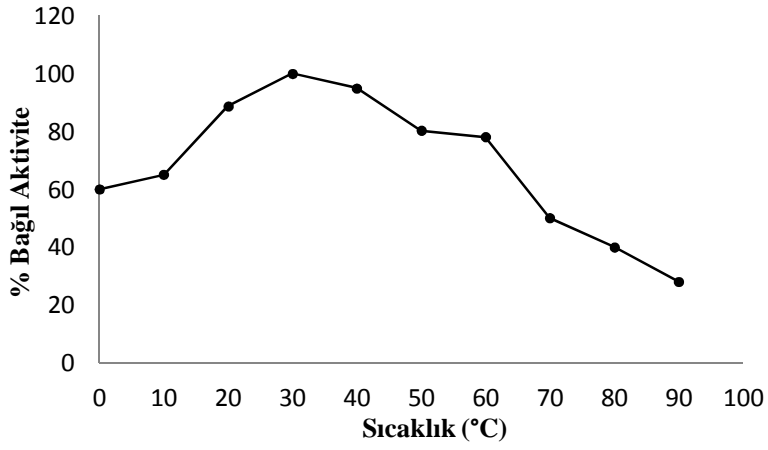
Şekil 4.14. Kiwano POD için guaiakol substratının optimum sıcaklık grafiği



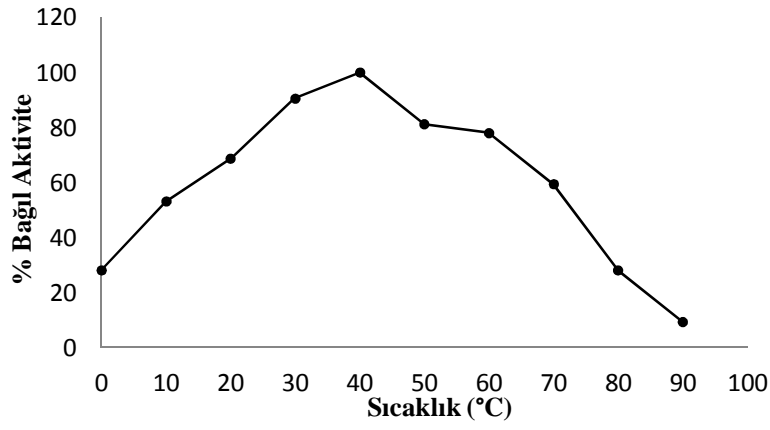
Şekil 4.15. Kiwano POD için kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği



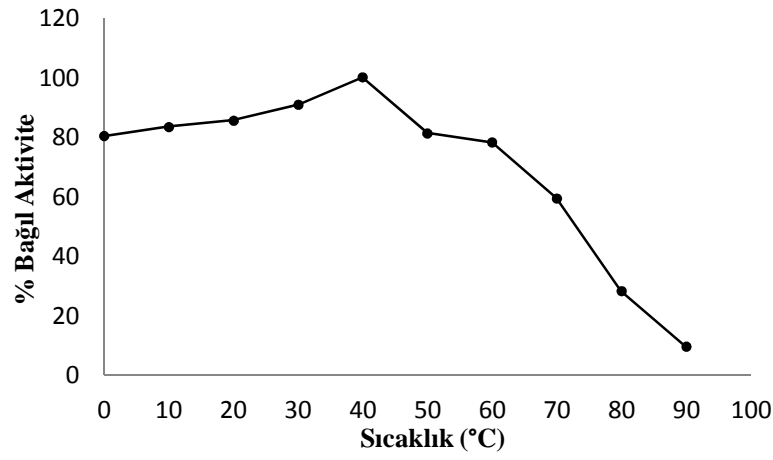
Şekil 4.16. Kiwano POD için o-dianisidin substratının optimum sıcaklık grafiği



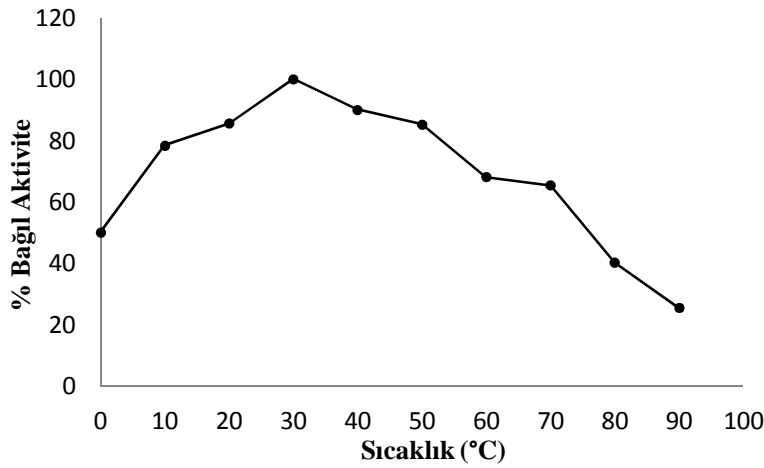
Şekil 4.17. Kiwano POD için o-fenilen diamin substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.18. Kiwano POD için progallol substratının optimum sıcaklık grafiği



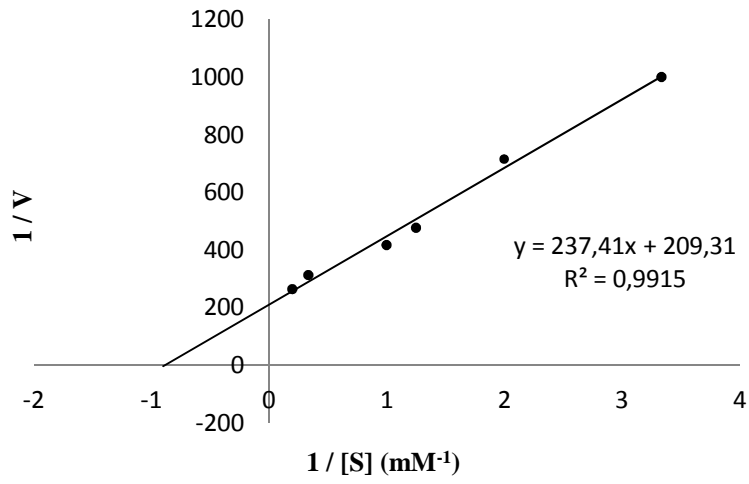
Şekil 4.19. Kiwano POD için katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



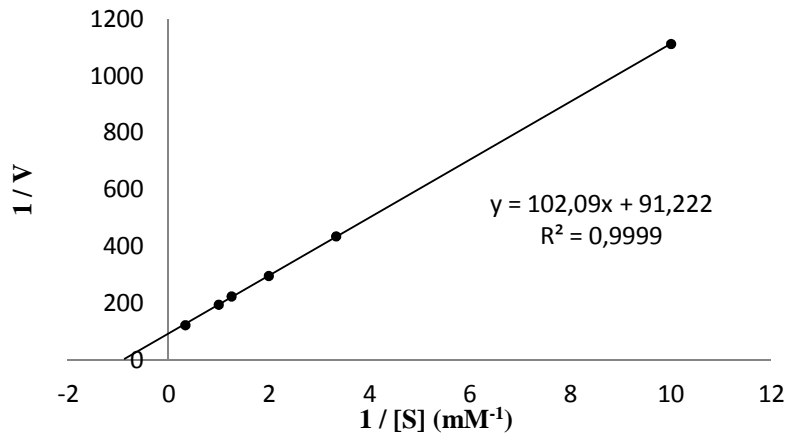
Şekil 4.20. Kiwano POD için gallik asit substratının optimum sıcaklık grafiği

4.4.3. Enzim kinetiği

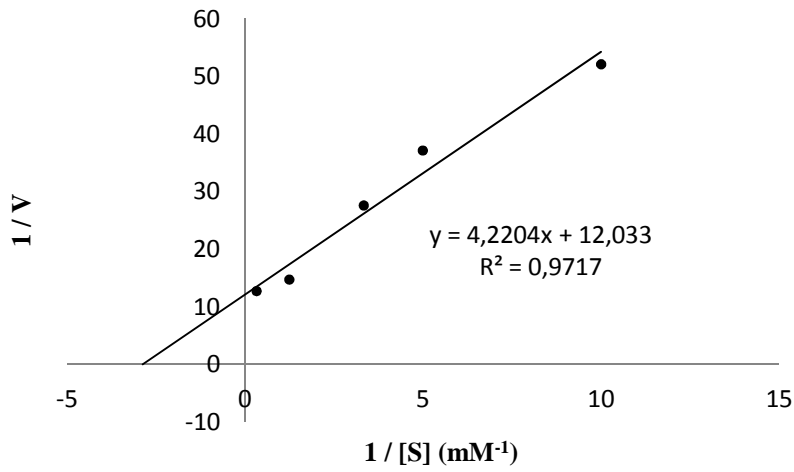
Kinetik çalışmalar 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, gallik asit, ABTS, H₂O₂ ve o-fenilen diamin substratları için yapılmıştır. POD enzimi H₂O₂ varlığında aktivite gösteren bir enzim olup bu enzimin V_{max} ve K_m değerleri ile ilgili çalışmalar H₂O₂ ve 9 farklı substrat varlığında yapılmıştır. Bunun için POD enzimi ile 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, gallik asit, ABTS ve o-fenilen diamin substratları sabit tutularak H₂O₂ için farklı konsantrasyonlarda optimum aktivite ölçümleri yapılmış olup Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Daha sonra POD enzimi ile H₂O₂ sabit tutularak 9 farklı substratın farklı konsantrasyonlarındaki optimum aktivite ölçümleri yapılmış olup Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Her bir çalışma en az üç kez tekrarlanmıştır. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.



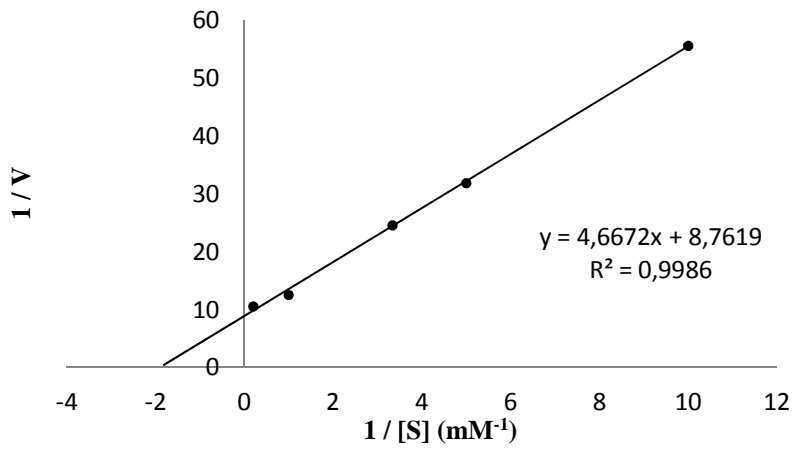
Şekil 4.21. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



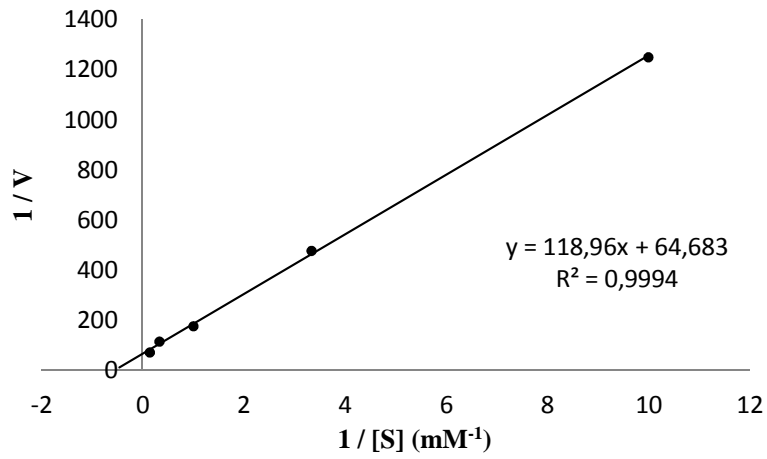
Şekil 4.22. Kiwano POD için 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



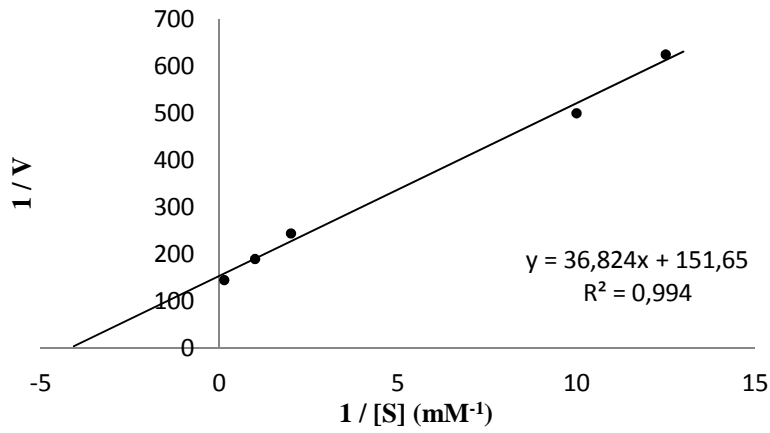
Şekil 4.23. Kiwano POD için H₂O₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



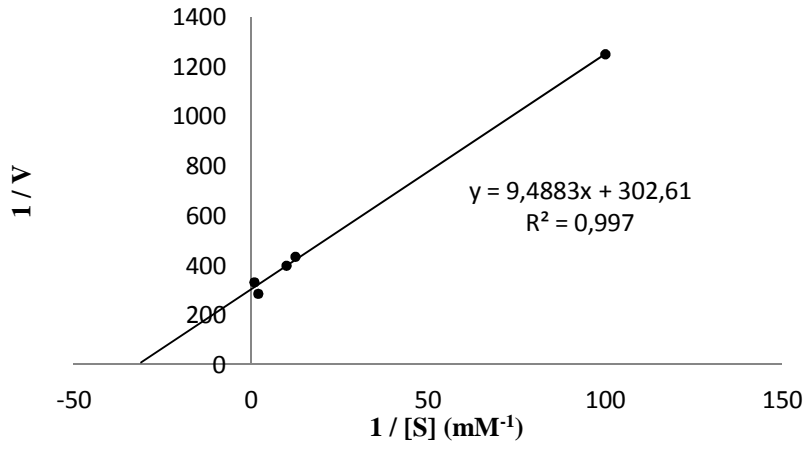
Şekil 4.24. Kiwano POD için ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H₂O₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



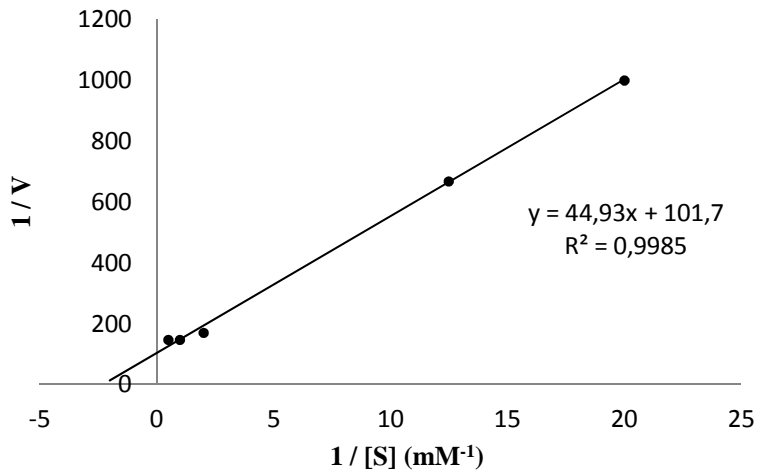
Şekil 4.25. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



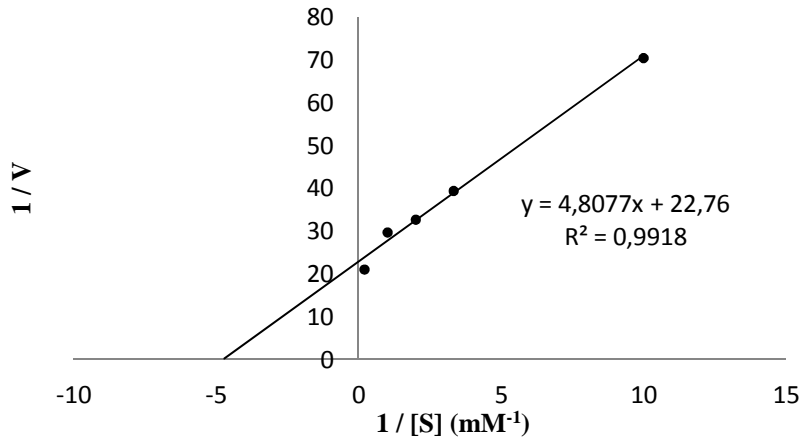
Şekil 4.26. Kiwano POD için guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



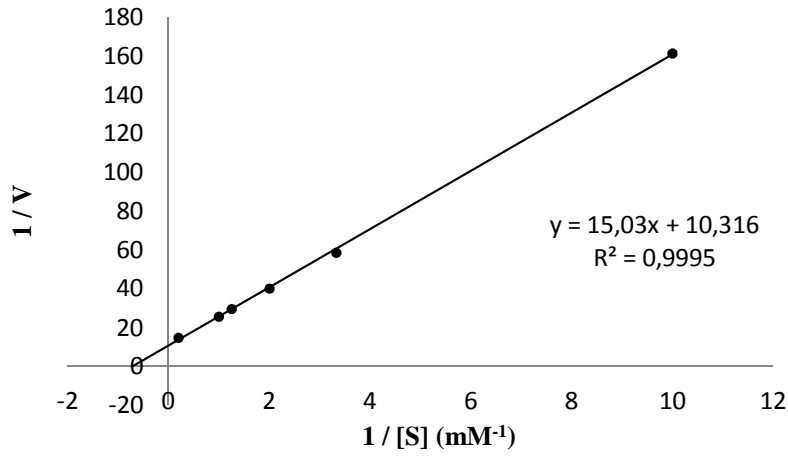
Şekil 4.27. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



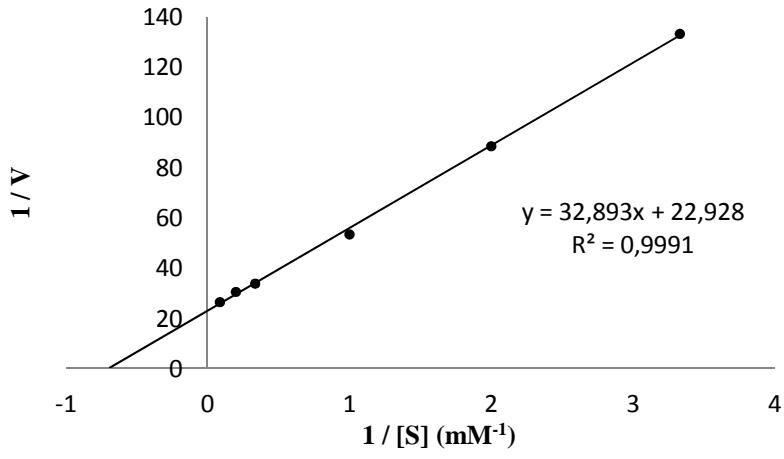
Şekil 4.28. Kiwano POD için kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



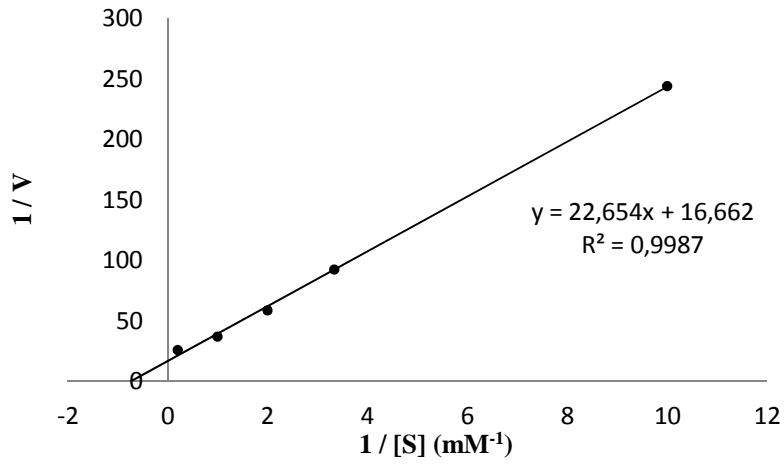
Şekil 4.29. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



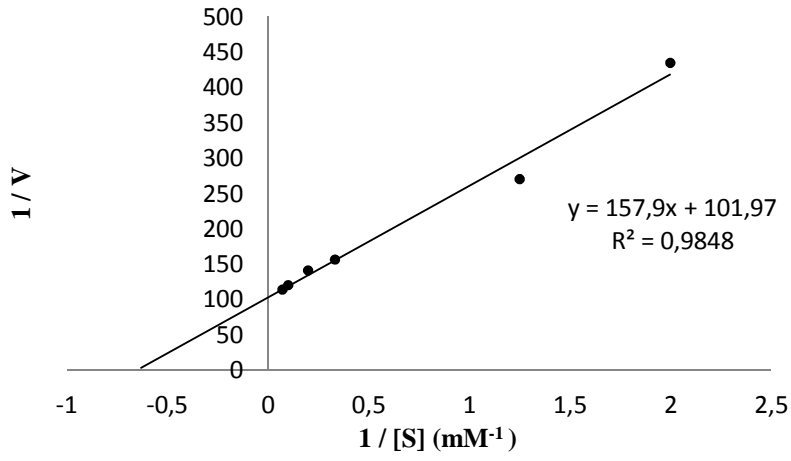
Şekil 4.30. Kiwano POD için o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



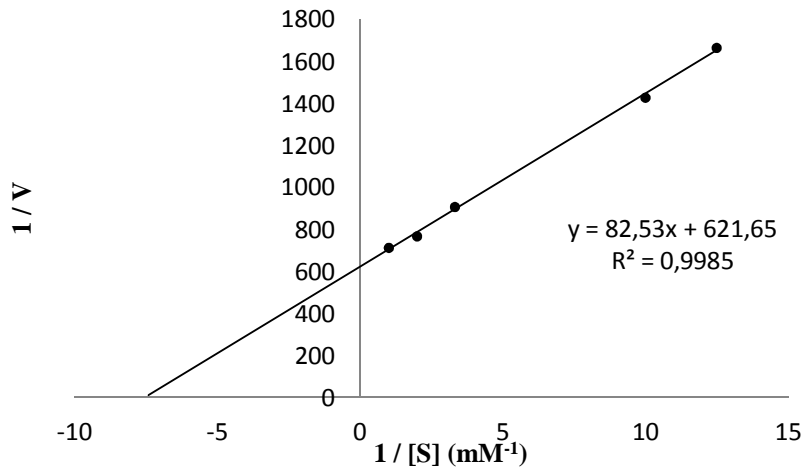
Şekil 4.31. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



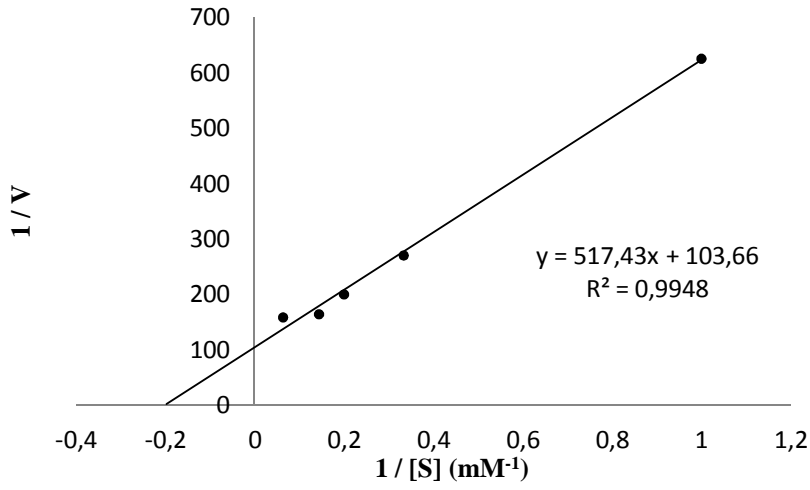
Şekil 4.32. Kiwano POD için o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



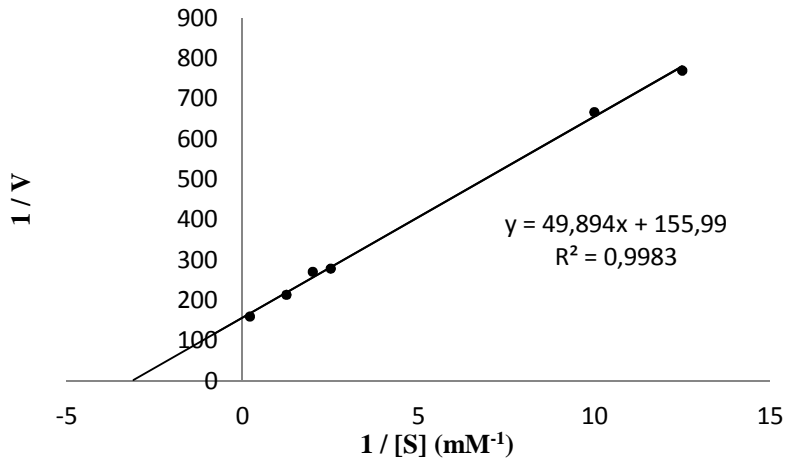
Şekil 4.33. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



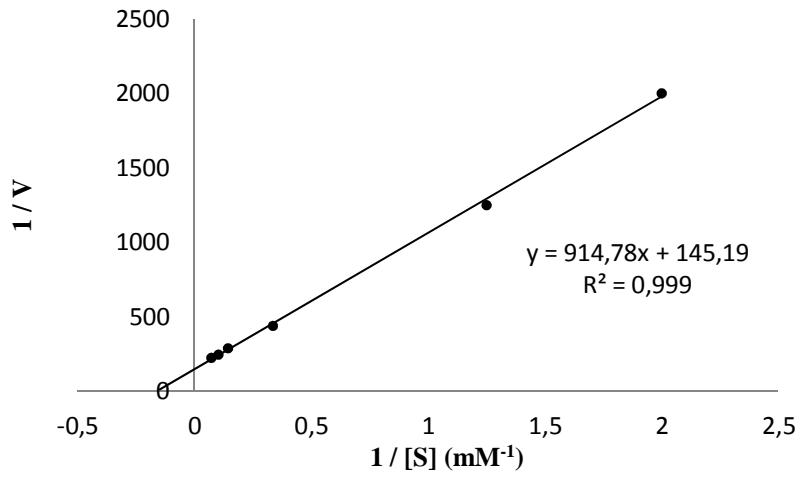
Şekil 4.34. Kiwano POD için progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



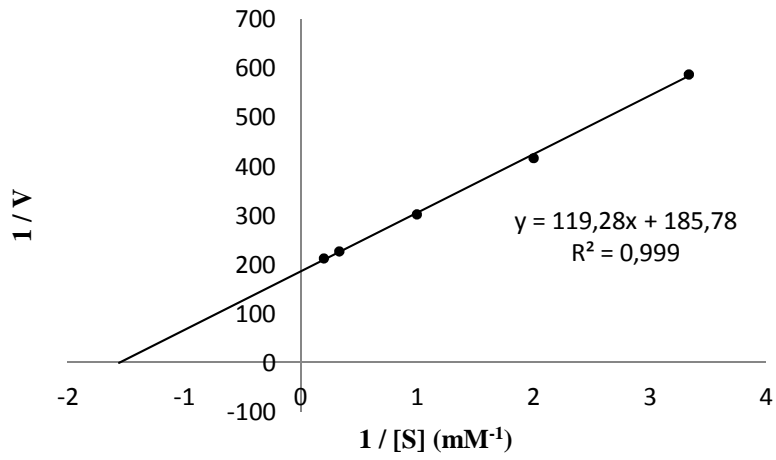
Şekil 4.35. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.36. Kiwano POD için katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.37. Kiwano POD için H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı gallik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



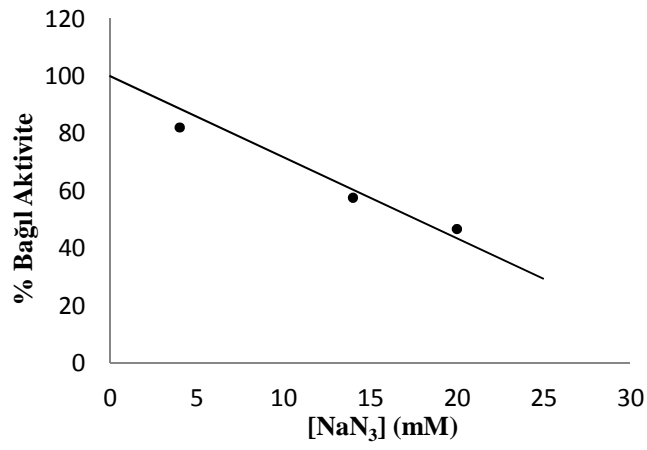
Şekil 4.38. Kiwano POD için gallik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Tablo 4.2. Kiwano POD enziminin substrat spesifikliği ile ilgili toplu bulgular

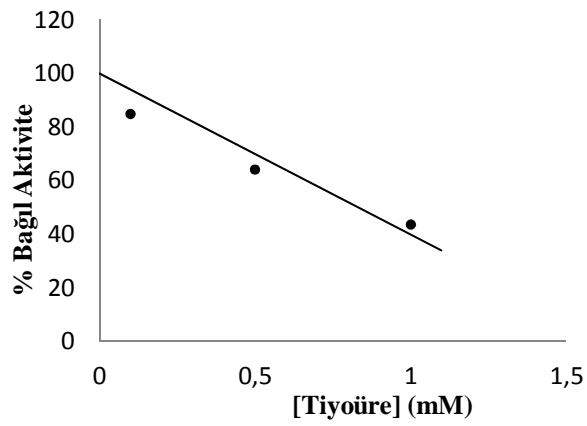
Substrat	K_m (mM) (H_2O_2 sbt)	V_{max} (EÜ/dk) (H_2O_2 sbt)	K_m (mM)	V_{max} (EÜ/dk)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
4-metil katekol	1,1343	0,0047	1,1191	0,0109	7,2	40
ABTS	0,3507	0,0831	0,5326	0,1141	4	40
Gallik Asit	6,3006	0,0068	0,6420	0,0054	6	30
Guaiakol	1,8391	0,0155	0,2428	0,0066	6	30
Kafeik Asit	0,0314	0,0033	0,4418	0,0098	6,5	30
o-dianisidin	0,2112	0,0439	1,4569	0,0969	4	30
o-fenilen diamin	1,4346	0,0436	1,3596	0,0600	5	30
Progallol	1,5485	0,0098	0,1327	0,0016	7,5	40
Katekol	4,9916	0,0096	0,3198	0,0064	6	40

4.4.4. İnhibitör etkisi

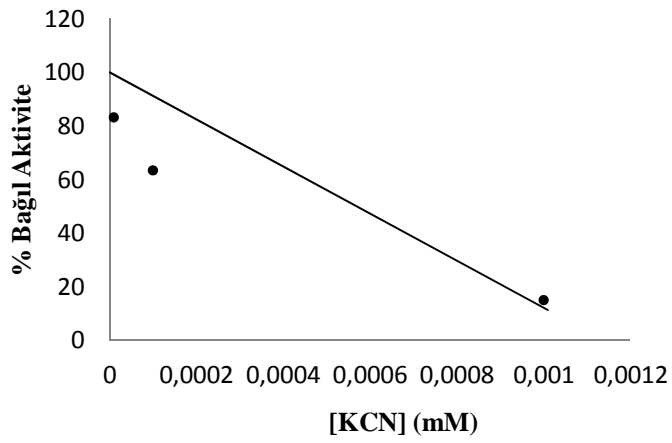
Kiwano bitkisinden ekstrakte edilen POD enzimi üzerine toplam 9 farklı maddenin inhibitör etkisi bölüm 3.3.6.1.'de anlatıldığı gibi saptanmıştır. Yapılan çalışmada NaN_3 , tiyöüre, KCN, L-Sistein, EDTA, SDS, Triton X-100 ve L-Glutasyon ve 2-merkaptto etanol olmak üzere 9 farklı maddenin inhibitör etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 2-merkaptto etanol hariç diğer maddelerin inhibitör etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. İnhibitör etkisi gösteren inhibitörler için I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen grafikler ve hesaplanan değerlerin tablosu aşağıda verilmiştir.



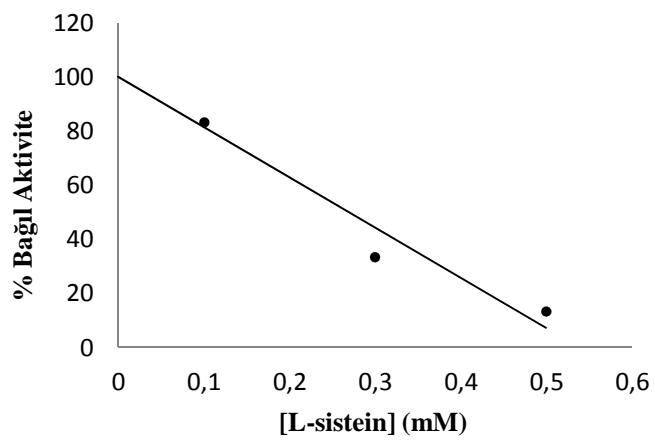
Şekil 4.39. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine NaN_3 etkisi



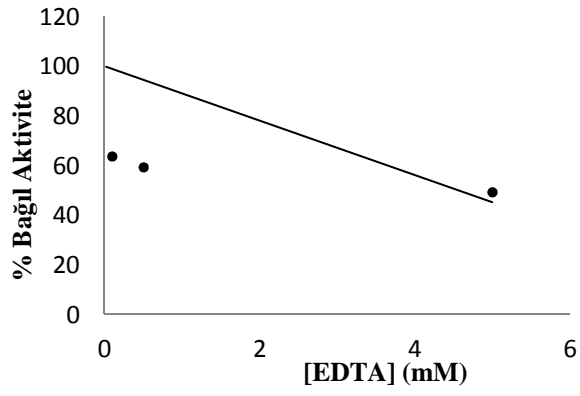
Şekil 4.40. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine tiyöüre etkisi



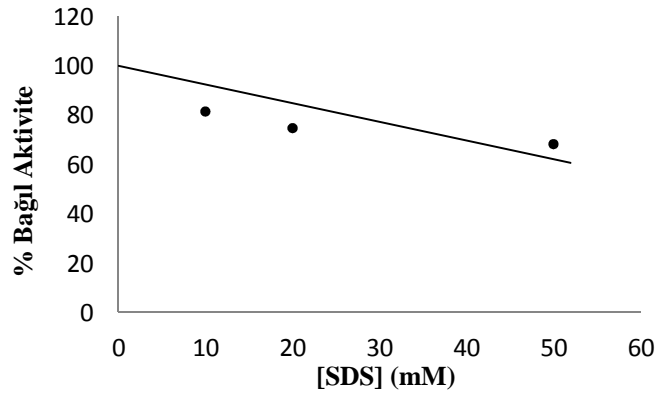
Şekil 4.41. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine KCN etkisi



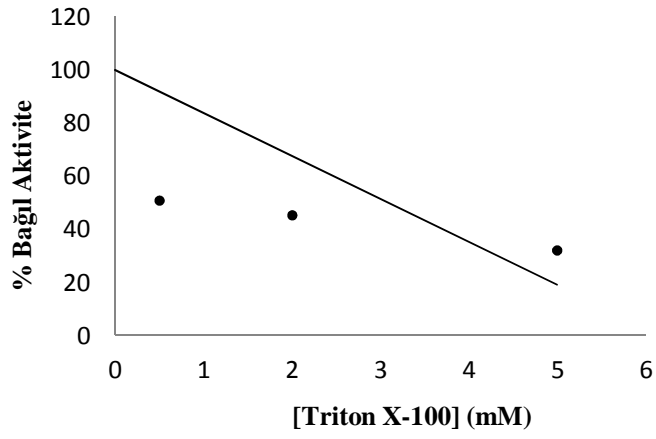
Şekil 4.42. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine L-Sistein etkisi



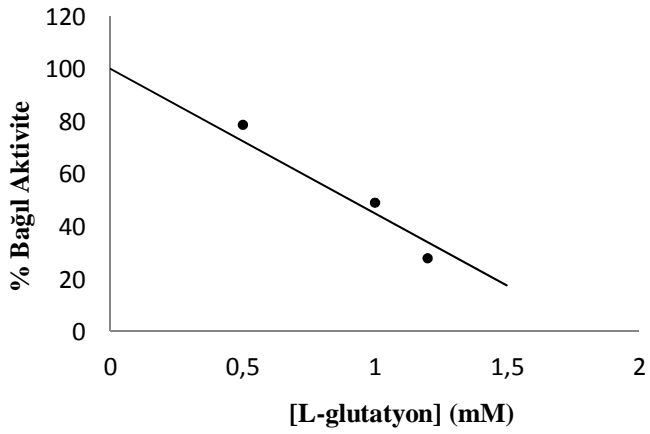
Şekil 4.43. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine EDTA etkisi



Şekil 4.44. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine SDS etkisi



Şekil 4.45. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine Triton X-100 etkisi



Şekil 4.46. Kiwano bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerine L-Glutatyon etkisi

Tablo 4.3. Kiwano POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I₅₀ değerleri

İnhibitör	Kiwano I₅₀(mM)
NaN₃	18,0787
Tiyüüre	0,8415
KCN	0,00043
L-Sistein	0,2617
EDTA	4,6738
SDS	108,1566
Triton X-100 (v/v)	0,7866
L-Glutatyon	0,9154

4.4.5. Metal etkisi

Kiwano bitkisinden ekstrakte edilen POD enzimi üzerine etki eden toplam 18 metal bölüm 3.3.6.2.'de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; Fe⁺², Fe⁺³, Cu⁺², Zn⁺², Mg⁺², Hg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Li⁺¹, Co⁺², Mn⁺², Pb⁺², Sn⁺², Na⁺¹, K⁺¹, Ni⁺², Cd⁺², Al⁺³ metal iyon çözeltilerinden 1 mM, 5 mM, 10 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir. POD enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak metaller ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir. İncelemeler sonucunda metal varlığında gerçekleştirilen aktivite değerleri metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılmış ve % kalan aktivite değerleri hesaplanarak tablo halinde sunulmuştur.

Tablo 4.4. Kiwano POD enzimi üzerine metallerin etkisi

POD % Kalan Aktivite			
Metaller	Metal Konsantrasyon (mM)		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100
Fe⁺²	116,07	10,71	10,71
Fe⁺³	132,14	119,64	103,57
Cu⁺²	121,43	101,78	101,78
Zn⁺²	125,00	87,50	-
Mg⁺²	83,93	80,36	69,64
Hg⁺²	350,00	1080,35	11776,78
Ba⁺²	116,07	112,50	100
Ca⁺²	119,64	117,86	116,07
Li⁺¹	139,28	148,21	155,36
Co⁺²	187,50	150,00	126,78
Mn⁺²	121,43	100	103,57
Pb⁺²	98,21	92,85	85,71
Sn⁺²	96,43	76,78	75,00
Na⁺¹	125,00	119,64	128,57
K⁺¹	126,78	128,57	125,00
Ni⁺²	128,57	158,93	183,93
Cd⁺²	125,00	112,50	96,43
Al⁺³	128,57	117,86	78,57

4.4.6. Amino asit etkisi

Kiwano bitkisinden ekstrakte edilen POD enzimi üzerine etki eden toplam 8 amino asit bölüm 3.3.6.3.'de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir. POD enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak amino asitler ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir. İncelemeler sonucu amino asitlerin 0.5, 1, 5, 10 mM konsantrasyonlarındaki kalan aktivite yüzdeleri hesaplanmış ve tablo halinde sunulmuştur.

Tablo 4.5. Kiwano POD enzimi üzerine amino asitlerin etkisi

POD % Kalan Aktivite				
Amino asit	Amino asit Konsantrasyon (mM)			
	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100	100
L-Histidin	107,14	107,14	112,50	116,07
L-Glutamik asit	105,36	103,57	103,57	94,64
L-Treonin	107,14	103,57	100	96,43
L-Lisin	103,57	105,35	100	100
L-Arginin	112,50	112,50	110,71	103,57
L-Aspartik asit	114,28	121,43	110,71	82,14
L-Prolin	100	92,85	80,35	69,64
L-Fenilalanin	105,35	100	92,85	89,28

4.4.7. Organik çözücü etkisi

Kiwano bitkisinden ekstrakte edilen POD enzimi üzerine toplam 8 organik çözücünün etkisi bölüm 3.3.6.4.'de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Methanol, DMSO, Aseton, Etanol, 1-butanol, 2-propanol, Kloroform ve Etilasetat çözeltilerinden toplamda %25 (v/v) olacak şekilde enzim ekstraktı ile inkübe edilerek belli zaman

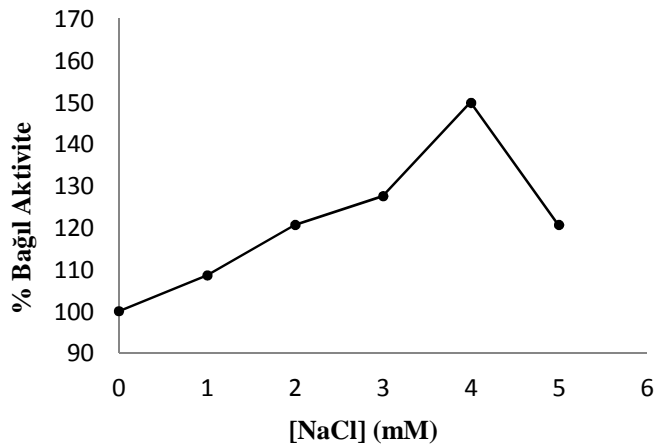
aralıklarıyla sabit konsantrasyonda 1 mM H₂O₂ ve 3 mM 4-metil katekol eklenerek enzim aktivitesine bakılmıştır. POD enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak organik çözücü ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Organik çözücü ile muamele edilen enzimin aktivitesine 2.saat, 6.saat ve 32.saat sonunda bakılmıştır ve kalan yüzde aktiviteleri hesaplanarak tablo halinde sunulmuştur.

Tablo 4.6. Kiwano POD enzimi üzerine organik çözücü etkisi

POD % Kalan Aktivite			
Organik Çözücü (%25 v/v)	2.saat	6.saat	32.saat
Kontrol	100	100	100
Methanol	27,59	27,59	24,14
DMSO	41,38	37,93	24,14
Aseton	10,34	6,89	3,45
Etanol	20,69	17,24	13,79
1-butanol	93,10	-	-
2-propanol	24,14	13,79	6,89
Kloroform	75,86	-	-
Etil asetat	10,34	-	-

4.4.8. Optimum iyonik şiddet

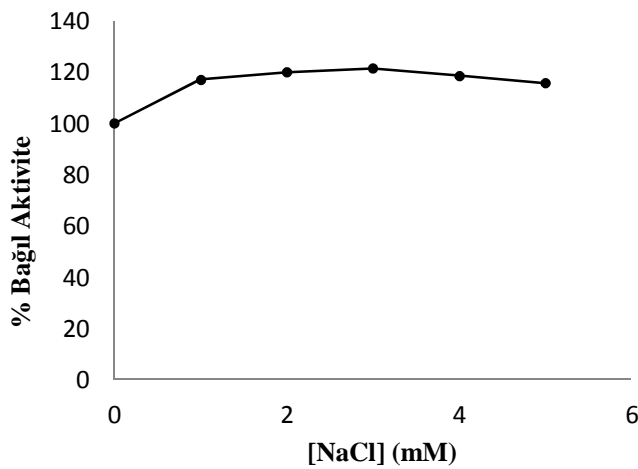
Yapılan çalışmada kiwano bitkisinden elde edilen POD enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için sabit enzim, 1 mM H₂O₂, 3 mM 4-metil katekol substratlarına oda sıcaklığında 1 mM ile 5 mM arasında değişen NaCl çözeltileri eklenmiştir. Spektrofotometrik olarak daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki değişimi izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar NaCl olmadan yapılan kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.47. Kiwano POD için NaCl optimum iyonik şiddet etkisi

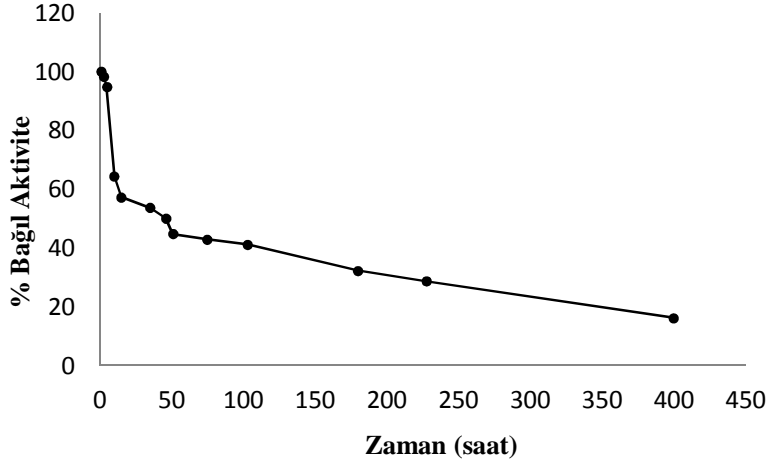
4.4.9. Enzimin tuz toleransı

POD enzimin tuz toleransını belirlemek için bölüm 3.3.6.6' da anlatıldığı gibi oda sıcaklığında 2 saat boyunca, 1 mM ile 5 mM arasında değişen NaCl çözeltileri ile enzim inkübe edilerek, 1 mM H₂O₂ ve 3 mM 4-metil katekol substratları varlığında enzim aktivitesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar NaCl olmadan yapılan kontrol reaksiyon sonucu ile karşılaştırılarak % bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

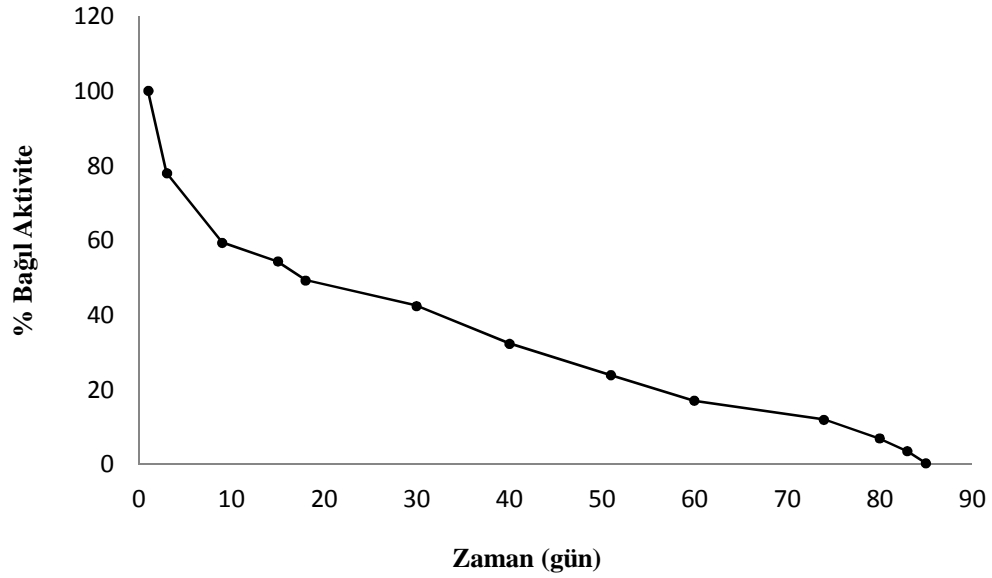


Şekil 4.48. Kiwano POD için NaCl - tuz tolerans grafiği

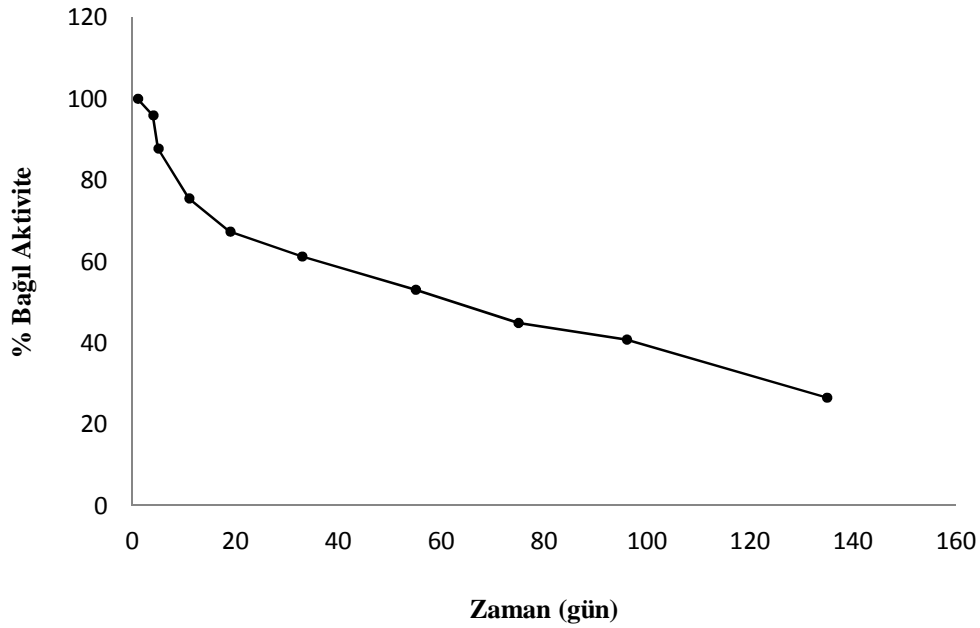
4.4.10. Enzim depolanma kararlılığı



Şekil 4.49. Kiwano bitkisinden elde edilen POD için oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.50. Kiwano bitkisinden elde edilen POD için +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.51. Kiwano bitkisinden elde edilen POD için -20 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi

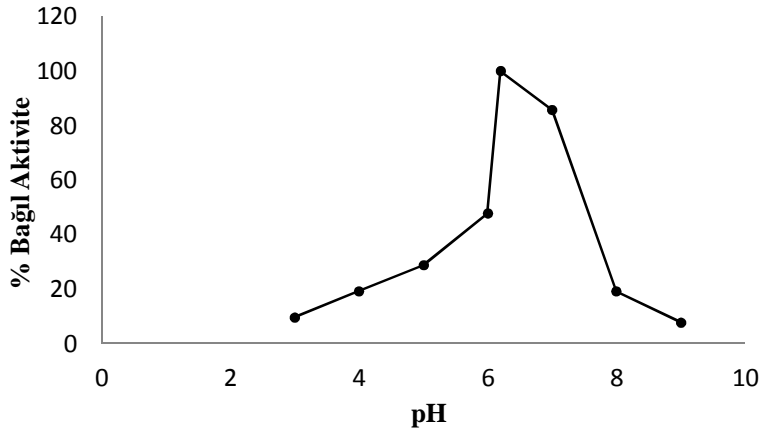
Bölüm 3.3.7.'de anlatıldığı gibi enzimin oda sıcaklığında, -20 °C'de ve +4 °C'de depolama süresince kararlılığını incelemek amacı ile 5 mM 4-metil katekol (pH 7,2) substratı kullanılmıştır. Oda sıcaklığında her saat ölçüm alınırken, -20 °C'de her 3-4 günde bir, +4 °C' de ise her 1-2 günde bir ölçüm alınmıştır. Her biri için enzimin % bağlı aktivitesi hesaplanmıştır.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, POD enziminin aktivitesi ilk on saatte % 36, kırk altı saatte % 50, yüz seksen saatte % 68, iki yüz yirmi sekiz saatte % 72 ve dört yüz saatte %84 azalmıştır. +4 °C' de ise POD enziminin aktivitesi ilk üç günde % 22, on beş günde % 46, otuz günde % 58 ve altmış günde 83% azalmıştır. -20 °C' de ise POD enziminin aktivitesi ilk on bir günde % 33, yetmiş beş günde % 55, doksan altı günde % 59, yüz otuz beş günde % 73 aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

4.5. Askorbat Peroksidaz (APX) Enziminin Karakterizasyonu

4.5.1. pH etkisi

APX enzimi aktivitesi için 3 ile 9 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar kullanılmıştır. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 285 nm absorbanstaki azalma izlenerek gerçekleştirilmiştir. Toplamda 0,02 mM H₂O₂ ve 0,5 mM AsA varlığında sabit enzim kullanılarak ölçümler alınmıştır. Aşağıda verilen grafik incelendiğinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerinin (optimum pH) 6,2 olduğu görülmektedir.

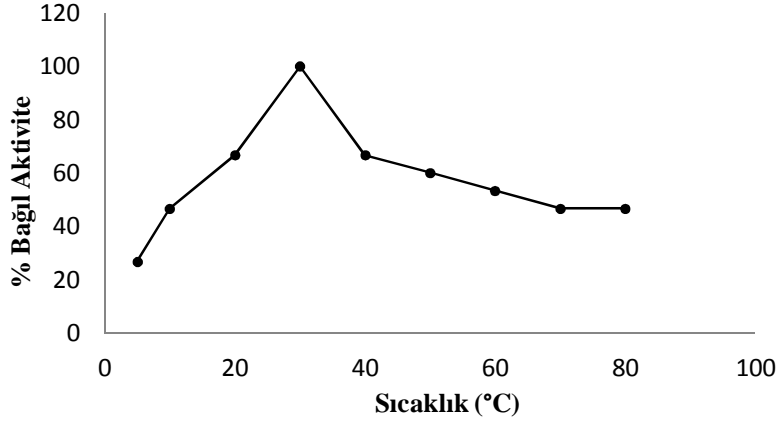


Şekil 4.52. Kiwano APX için AsA - H₂O₂ substratının optimum pH grafiği

4.5.2. Sıcaklık etkisi

Bölüm 3.5.3.'de anlatıldığı gibi, H₂O₂ ve AsA substratları kullanılarak APX enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bu çalışmada substrat konsantrasyonları H₂O₂ için 0,02 mM, AsA için 0,5 mM olarak kullanılmıştır. Aşağıda verilen grafik incelendiğinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 30 °C (optimum sıcaklık) olduğu görülmektedir. Optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda

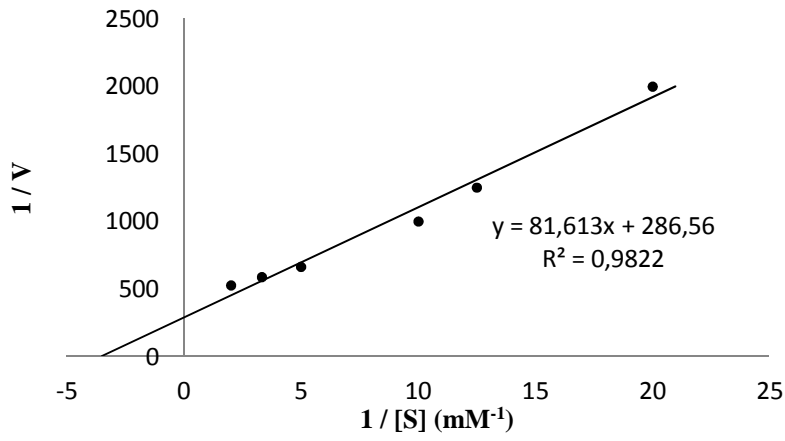
aktivitede azalma görülmektedir. Bu da enzimin sıcaklıkla kısmen inaktif olduğunu göstermektedir.



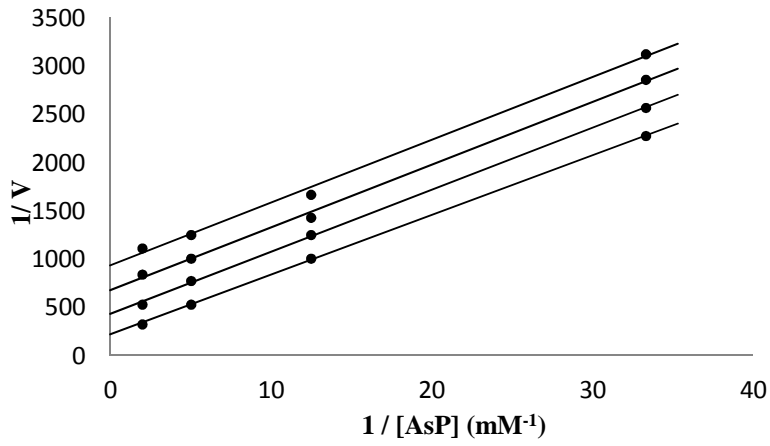
Şekil 4.53. Kiwano APX için AsP - H₂O₂ substratının optimum sıcaklık grafiği

4.5.3. Enzim kinetiği

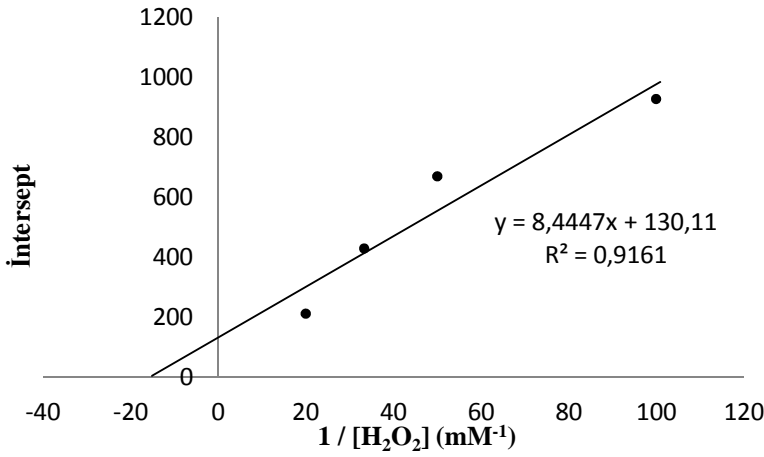
Kinetik çalışmalar Bölüm 3.5.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. AsA için 0,01 mM ile 1 mM arasında değişen konsantrasyonlar kullanılmıştır. H₂O₂ için ise 0,001 ile 1 mM arasında değişen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Tüm aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak kuartz küvette 285 nm' de 60 sn yapılmıştır. Yapılan çalışmanın sonunda elde edilen grafiklerden AsA ve H₂O₂ substratları için ayrı ayrı K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Her bir çalışma en az üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 4.54. Kiwano APX enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı AsA substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.55. Kiwano APX enziminin çift taraflı olarak H_2O_2 ve AsA substratlarının konsantrasyonu değiştirilerek elde edilen $1/V-1/[AsA]$ grafiği

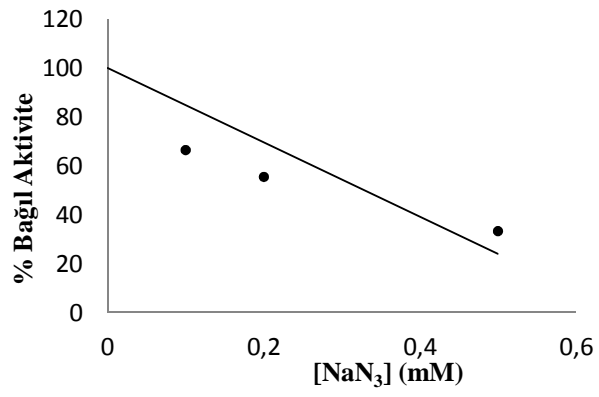


Şekil 4.56. Kiwano APX enziminin çift taraflı olarak H₂O₂ ve AsA substratlarının konsantrasyonu değiştirilerek çizilen Şekil 4.20'den elde edilen intersept-1/[H₂O₂] grafiği

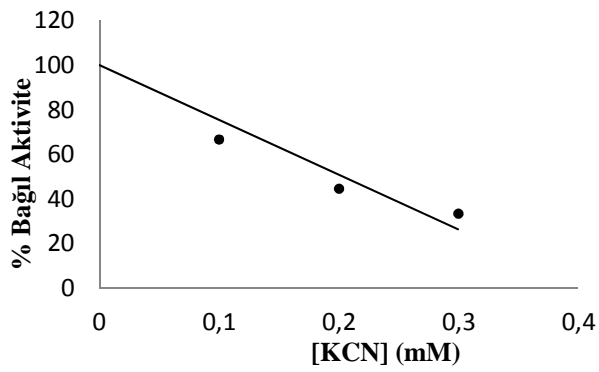
Elde edilen grafiklere göre; AsP için K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 284.80 μ M, 0.0035 EÜ/dk. H₂O₂ için K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 64.90 μ M, 0,0077 EÜ/dk. olarak bulunmuştur.

4.5.4. İnhibitör etkisi

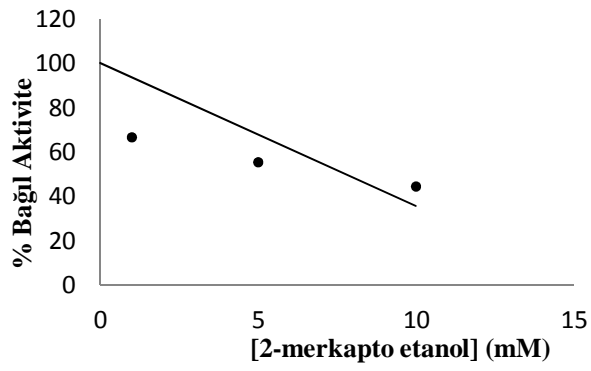
Kiwano bitkisinden elde edilen APX enzimi üzerin toplam 8 farklı maddenin inhibitör etkisi Bölüm 3.5.5.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Kullanılan maddeler; sodyum azit, potasyum siyanür, 2-merkpto etanol, L-sistein, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), iyodoacetamid, 2-nitrobenzoik asit ve L-glutasyon'dur. Kullanılan maddelerin enzim üzerine yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek için sabit enzim, 0,02 mM H₂O₂ ve 0,5 mM'lık AsA ve farklı konsantrasyonlarda inhibitör madde eklenerek enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda L-Glutasyon ve EDTA hariç diğer tüm maddelerin enzim üzerinde inhibisyon etkiye sahip olduğu bulunmuştur. İnhibitör özellik gösteren tüm maddeler için % Bağlı Aktivite – inhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizilmiştir ve enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu olarak ifade edilen I_{50} değerleri hesaplanarak tablo halinde sunulmuştur.



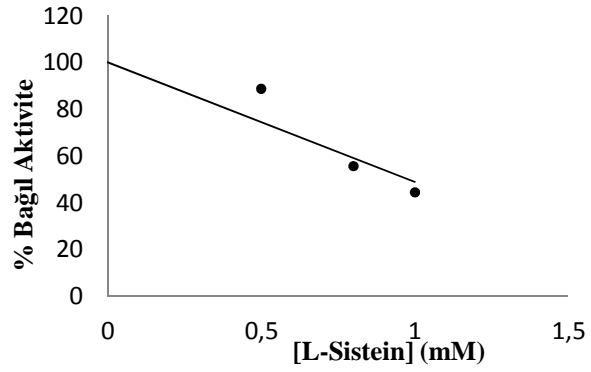
Şekil 4.57. Kiwano APX enzimi üzerine NaN₃ etkisi



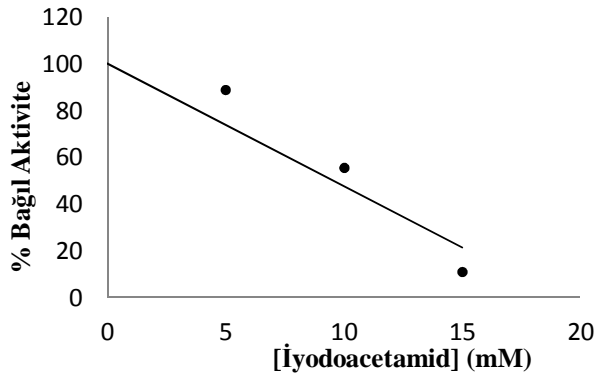
Şekil 4.58. Kiwano APX enzimi üzerine KCN etkisi



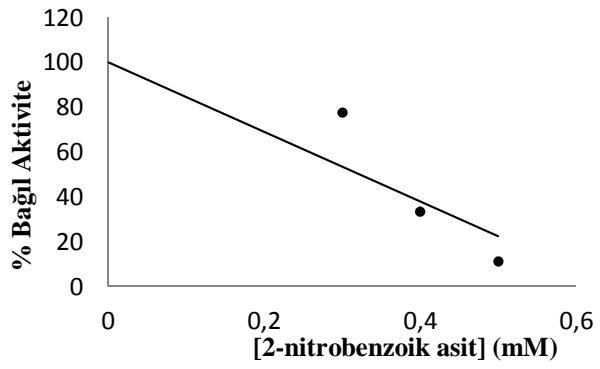
Şekil 4.59. Kiwano APX enzimi üzerine 2-merkapto etanol etkisi



Şekil 4.60. Kiwano APX enzimi üzerine L-Sistein etkisi



Şekil 4.61. Kiwano APX enzimi üzerine iyodoacetamid etkisi



Şekil 4.62. Kiwano APX enzimi üzerine 2-nitrobenzoik asit etkisi

Tablo 4.7. Kiwano APX enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I₅₀ değerleri

İnhibitör	Kiwano I₅₀(mM)
NaN₃	0,2888
KCN	0,1885
2-merkapto etanol	7,5723
L-Sistein	0,9091
İyodoacetamid	10,2317
2-nitrobenzoik asit	0,3316

4.5.5. Metallerin etkisi

Kiwano bitkisinden ekstrakte edilen APX enzimi üzerine etki eden toplam 18 metal bölüm 3.3.5.2’de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; Fe⁺², Fe⁺³, Cu⁺², Zn⁺², Mg⁺², Hg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Li⁺¹, Co⁺², Mn⁺², Pb⁺², Sn⁺², Na⁺¹, K⁺¹, Ni⁺², Cd⁺², Al⁺³ metal iyon çözeltilerinden 1, 5, 10 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir. APX enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak metaller ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir. İncelemeler sonucu aktivite 1, 5, 10 mM konsantrasyondaki kalan yüzdeleri halinde hesaplanmış ve tablo halinde sunulmuştur.

Tablo 4.8. Kiwano APX enzimi üzerine metallerin etkisi

APX % Kalan Aktivite			
Metaller	Metal Konsantrasyon (mM)		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100
Fe⁺²	55,55	-	138,88
Fe⁺³	11,11	-	77,77
Cu⁺²	677,77	11,11	-
Zn⁺²	50,00	11,11	11,11
Mg⁺²	66,66	55,55	55,55
Hg⁺²	-	6,66	6,66
Ba⁺²	88,88	111,11	133,33
Ca⁺²	44,44	55,55	66,66
Li⁺¹	100	61,11	44,44
Co⁺²	61,11	66,66	66,66
Mn⁺²	77,77	77,77	88,88
Pb⁺²	61,11	55,55	11,11
Sn⁺²	44,44	44,44	-
Na⁺¹	44,44	44,44	33,33
K⁺¹	61,11	50,00	66,66
Ni⁺²	66,66	88,88	94,44
Cd⁺²	55,55	55,55	38,88
Al⁺³	50,00	-	5,00

4.5.6. Amino asit etkisi

Kiwano bitkisinden ekstrakte edilen APX enzimi üzerine etki eden toplam 8 amino asit bölüm 3.5.5.3’de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; için L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir. APX enziminin ekstrakte edildiği kaynağa bağlı olarak amino asitler ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir. İncelemeler sonucu aktivite 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM konsantrasyondaki kalan yüzdeleri halinde hesaplanmış ve tablo halinde sunulmuştur.

Tablo 4.9. Kiwano APX enzimi üzerine amino asitlerin etkisi

APX % Kalan Aktivite				
Amino asit	Amino asit Konsantrasyon (mM)			
	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100	100
L-Histidin	108,33	108,33	100	91,66
L-Glutamik asit	100	100	4,16	-
L-Treonin	100	100	100	108,33
L-Lisin	116,66	116,66	108,33	100
L-Arginin	116,66	116,66	108,33	100
L-Aspartik asit	116,66	108,33	-	-
L-Prolin	100	133,33	133,33	133,33
L-Fenilalanin	116,66	116,66	108,33	100

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmada kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisinin çekirdek kısımları hariç etli kısmından izole edilen peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimleri incelenmiştir.

POD enzim aktivite tayinleri H_2O_2 substratı varlığında 60 sn süresince 420 nm'de absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir. POD enziminin H_2O_2 substratı varlığında aktivite tayinlerinin belirlenmesindeki temel prensip H_2O_2 'in suya indirgenmesi sonucu enzimin yükseltgenmesidir. Yükseltgenen POD enzimi de ortamdaki substratı yükseltgeyerek ortamdan harcanmadan çıkar. Kiwano POD enzimi TPP ve diyaliz işlemleri sonrasında kısmi olarak saflaştırılmıştır. TPP işlemleri oda sıcaklığında, diyaliz ise +4 °C sıcaklık kontrolünde gerçekleştirilmiştir. TPP' nin bir alt basamağı olan amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında POD enziminin en fazla % 95 doygunlukta çöktüğü, bu işlemden sonra ilave edilen t-bütanol oranı 1:1,5 olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzim homojenatı 24 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızlıklar uzaklaştırılmıştır.

Saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim homojenatlarındaki protein miktarı kantitatif olarak Lowry metodu ile tayin edilmiştir. Bu yöntemin kullanılabilmesi için öncelikle BSA standart protein çözeltisi hazırlanarak lineer bir standart grafiği ve bir doğru denklemi ($y = ax + b$) elde edilmiştir. Daha sonra konsantrasyonu bilinmeyen enzim çözeltisi Lowry methoduna göre hazırlandıktan sonra 600 nm'de absorbansı okunarak denklemde yerine konup ve protein miktarı kantitatif olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem sonucunda ham enzim için protein miktarı 1,1653 mg/ml iken POD enzimi için protein miktarı 0,3619 mg/ml olarak hesaplanmıştır. TPP ve diyaliz işlemlerinden POD enzimi 4,4678 kat saflaşmıştır. Enzim saflığı SDS-PAGE ve Native-PAGE ile kontrol edilmiştir. SDS-PAGE ve Native-PAGE ile yapılan çalışmanın sonucunda ham ekstrakt ve saflaştırılmış enzim çözeltisinde bulunan

protein bantları jelde belirgin bir şekilde görünmüştür. Her iki jel elektroforez işleminden elde edilen sonuçlar kiwano bitkisinde bulunan POD enzimi varlığını ve saflığını kanıtlamaktadır.

Optimum pH çalışmalarına göre POD pH 4,0 ile 7,5 arasında kararlıdır. Kiwano POD enziminin her substrata karşı optimum pH değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 7,2, ABTS için 4,0, guaiakol için 6,0, kafeik asit için 6,5, o-dianisidin için 4,0, o-fenilen daimin için 5,0, gallik asit 6,0, progallol için 7,5 ve katekol için 6,0 olarak bulunmuştur. Karnabahar (*Brassica oleracea L.*) POD enzimi guaiakol, progallol, ABTS, katekol ve 4-metil katekol substratları için optimum pH değerleri ise sırasıyla 5,0 - 7,5 - 4,0 - 7,0 - 7,5 olarak bulunmuştur [53], katekol substratı dışında hepsi çalışmamızla benzerlik göstermektedir. *Withania somnifera* köklerinden elde edilen peroksidazların hepsi pH 3,0 - 9,0 alanı arasında kararlı olduğu bulunmuştur [29]. Kiwi meyvesinden elde edilen POD enzimi için optimum pH 6,0 - 8,5 arasında bulunmuştur [33]. Biberden elde edilen POD enzimin kararlı olduğu pH değerlerinin 6,0 - 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur [23]. Optimum pH değerleri enzim kaynağı ve substrat çeşidine göre farklılık göstermektedir.

Optimum sıcaklık çalışmalarına göre POD optimum sıcaklık değeri 30 – 40 °C aralığında değişmektedir. 4-metil katekol, ABTS, progallol, katekol substratları için optimum sıcaklık değeri 40 °C iken, guaiakol, kafeik asit, o-dianisidin, o-fenilen daimin, gallik asit substratları için 30 °C olarak bulunmuştur. Deve diken (*Silybum marianum*) bitkisinin hem gövde kısmı hem de çiçek tablası kısmından izole edilen POD enziminin optimum sıcaklığı 30 – 40 °C aralığında değiştiği bulunmuştur [68]. Karnabahar POD enzimi için optimum sıcaklık değeri 25 - 50 °C arasında değiştiği bulunmuştur [53]. Lahana POD enzimi için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur [32]. Zeytin (*Olea Europaea L.*) POD enzimi için optimum sıcaklık 34,7 °C olarak bulunmuştur [30]. Kiwano POD enziminin yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmediği görülmüştür. Biberden elde edilen POD enziminin yüksek sıcaklıklara dirençli olduğu bulunmuştur [23]. Literatürde bulunan optimum sıcaklık çalışmaları yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir.

Kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisinden izole edilen POD enzimi için dokuz farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapılmıştır. Bu çalışmada substrat

olarak 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, o-fenilen diamin, gallik asit ve H₂O₂ kullanılmıştır. Elde edilen K_M ve V_{max} değerlerinden substrat spesifikliği belirlenmiştir. K_M değeri enzim konsantrasyonu ile değişmez ve enzimin substratına karşı gösterdiği afiniteyi gösterir. Eğer K_M değeri sayısal olarak küçük ise enzimin substratına karşı ilgisinin yüksek olduğunu anlamına gelir. Enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doyararak maksimum hız sağlar. Eğer K_M değeri sayısal olarak büyük ise enzimin substratına karşı olan ilginin düşük olduğunu anlamına gelir. Enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat konsantrasyonu gerekmektedir. Bu değerlendirmeye göre kiwano POD enziminin substrat spesifikliği büyükten küçüğe doğru sıralamak gerekirse kafeik asit, o-dianisidin, ABTS, 4-metil katekol, o-fenilen diamin, progallol, guaiakol, katekol, gallik asit sırasını takip etmiştir. Lahana POD enzim substrat spesifikliği büyükten küçüğe ABTS, o-dianisidin, guaiakol sıralamasını takip etmektedir [32]. Palmiye ağacı (*Elaeis guineensis Jacq.*) yapraklarından elde edilen POD enzim substrat spesifikliği sıralaması pirogallol, ABTS, guaiakol şeklinde olmaktadır [26]. Kırmızı pancar (*Beta Vulgaris L.*) POD enzimi substrat spesifikliği büyükten küçüğe doğru o-dianisidin, ABTS, guaiakol şeklinde bulunmuştur [31]. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlar incelenecek olursa yapmış olduğumuz kinetik çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

Kiwano POD enzimi üzerine NaN₃, tiyoüre, KCN, L-Sistein, EDTA, SDS, Triton X-100 ve L-Glutatyon ve 2-merkaptto etanol' ün etkisi incelenmiştir. 2-merkaptto etanol hariç diğerleri POD enzimi üzerine inhibitör etki göstermiştir. Yapılan çalışmada POD enzim aktivitesini % 50'ye düşüren inhibitör konsantrasyonları (I₅₀) sonucuna göre; en fazla inhibitör etkiyi gösteren KCN 0,00043 mM düzeyinde, SDS, EDTA ve NaN₃ enzim aktivitesini sırasıyla 108,2 – 4,7 – 18,1 mM düzeyinde % 50 inhibe etmektedir. Vanilya tohumu POD enzimi için NaN₃ ve 2-merkaptto etanol inhibitör etkiye sahipken EDTA ve SDS aktiviteyi azaltan etkiye sahiptir [35]. Sofralık üzüm POD enzimi için SDS inhibitör görevi görmektedir [36]. Barbados fındığı yapraklarından elde edilen POD enzimi için NaN₃ ve 2-merkaptto etanol inhibitör etkiye sahiptir [38]. Papaya meyvesi POD enzimi için NaN₃, SDS ve Triton X-100 inhibitör etki göstermektedir [39]. Çalışmamızda 2-merkaptto etanol hariç diğer

inhibitörlerin POD enzimi üzerinde literatür sonuçları ile benzer etkiye sahip olduğu görülmektedir.

POD enzim aktivitesi üzerine Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Al^{+3} metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre Zn^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} enzim üzerinde inhibisyona, Cd^{+2} , Al^{+3} 5 mM üzerinde inhibisyona ve diğer metallerin ise aktivasyona sebep oldukları görülmüştür. Metroksilon Sagu bitkisinden elde edilen POD enzimi üzerinde Ca^{+2} ve Fe^{+3} metallerinin aktivasyona, Zn^{+2} metalinin ise inhibisyona sebep olduğu görülmüştür [27]. Papaya POD enzimi üzerinde Ca^{+2} , Mg^{+2} metalleri aktivasyona sebep olmaktadır [39]. Barbados fıncığı yapraklarından elde edilen POD enzimi üzerinde Fe^{+2} metali inhibisyona, Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} 5 mM üzerinde inhibisyona neden olmaktadır[38]. Literatürde bulunan enzim üzerine metal etkisi çalışmaları yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir.

Bazik karaktere sahip L-histidin, L-lisin ve L-arginin amino asitlerinin POD enzimi üzerinde 1 mM konsantrasyona kadar yüksek aktivite gösterirken 5 mM ve üzeri konsantrasyonda enzim aktivitesini düşürmektedir. L-histidin diğerlerinden farklı olarak yüksek konsantrasyonlarda dahi aktivatör olarak çalışmaktadır. Asidik karaktere sahip L-aspartik asit ve L-glutamik asit amino asitlerinin POD enzimi üzerinde 0.5 mM, 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda aktivatör, 10 mM konsantrasyonda inhibitör etki göstermektedir. Her iki amino asitte düşük konsantrasyonda en yüksek aktivatör etkiye sahiptir. Nötral karaktere sahip L-treonin, L-prolin ve L-fenilalanin amino asitlerinin POD enzimi üzerinde L-prolin hariç 0.5 mM konsantrasyonda aktivatör etkiye sahipken 0.5 mM konsantrasyonun üzerinde her üç amino asitte inhibitör etkiye sahiptir. Genel olarak bütün amino asitlere bakıldığında POD enziminin aktivitesini en yüksek oranda artıran L-histidin iken aktivitesini en fazla azaltan L-prolin olduğu görülmektedir.

Kiwano POD enzim aktivitesi üzerine metanol, DMSO, aseton, etanol, 1-butanol, 2-propanol, kloroform ve etilasetat gibi organik çözücülerin etkisi incelenmiştir. 32 saat boyunca organik çözücüyle muamele edilen enzimin aktivitesini inhibe ettiği

görülmüştür. 1-butanol, kloroform ve etilasetat 2 saatin sonunda enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken, 32 saatin sonunda POD enzim kalan aktivitesi methanol ve DMSO için %24.14, aseton için %3.45, etanol için %13.79 ve 2-propanol için %6.89 olarak bulunmuştur. Barbados fıncığı yapraklarından elde edilen POD enzim kalan aktivitesi 54 saatin sonunda DMSO için % 0.6±0.1, methanol için % 96.5±3.8, aseton için % 97.4±3.2 olarak bulunmuştur ve etanol, 1-butanol, 2-propanol enzim aktivitesini aktive etmiştir [38]. Yapılan çalışmalar incelendiğinde DMSO dışında diğer organik çözücülerin Kiwano POD enzimi üzerinde benzer etkiye sahip değildir. Kiwano POD enziminin organik çözücülere karşı oldukça duyarlı olduğu ve aktivitesini yüksek oranda kaybettiği görülmektedir.

Optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla 1 - 5 mM arasında değişen NaCl çözeltilerinin Kiwano POD enzimi üzerine etkisine bakılmıştır. Çalışmanın sonucunda NaCl çözeltisinin 4 mM konsantrasyonunda optimum iyonik şiddet göstermektedir. Barbados fıncığı yaprağından elde edilen POD enziminin optimum iyonik şiddeti 2.5 M olarak bulunmuştur [38]. Kiwano POD enzimi literatürdeki sonuçlardan daha düşük NaCl konsantrasyonunda aktivitesini artırmıştır.

Kiwano POD enziminin tuz toleransını belirlemek için optimum iyonik şiddetin bakıldığı konsantrasyon aralığında kullanılan NaCl ile enzim oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuca göre oda sıcaklığında 2 saat boyunca NaCl ile muamele edilen enzim aktivitesindeki artışın kararlı olduğu görülmüştür. Barbados fıncığı yaprağından elde edilen POD enzimin NaCl ile 2 saat bekletildikten sonra kalan enzim aktivitesi % 88 olarak bulunmuştur [38]. Kiwano POD enzimin tuz toleransının yüksek olduğunu ve enzim aktivitesini artıran yönde etkiye sebep olduğunu görülmektedir.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, POD enziminin aktivitesi ilk on saatte % 36, kırk altı saatte % 50, yüz seksen saatte % 68, iki yüz yirmi sekiz saatte % 72 ve dört yüz saatte %84 azalmıştır. +4 °C' de ise POD enziminin aktivitesi ilk üç günde % 22, on beş günde % 46, otuz günde % 58 ve altmış günde 83% azalmıştır. -20 °C' de ise POD enziminin aktivitesi ilk on bir günde % 33, yetmiş beş günde % 55, doksan altı günde % 59, yüz otuz beş günde %

73 aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Deve dikenini (*Silybum marianum*) POD enzimi oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, aktivite ilk üç saatte % 18, yedinci saatte % 38, onuncu saatte % 80, on üçüncü saatte % 94 azalarak on beşinci saatin sonunda aktivitesini kaybetmiştir. -20 °C’ de ise enzim aktivitesi ilk beş günde % 13, on üçüncü günde % 35, yirmi ikinci günde % 62 azalarak otuz ikinci günün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir [68]. Barbados fıncığı yaprağından elde edilen POD enzimi +4 °C 180 gün boyunca aktivitesini korurken, oda sıcaklığında 14 günde %7 aktivitesini kaybetmiştir [38]. Lahana POD enzimi 4 °C’de 4 hafta depolanma süresince tamamıyla aktivite göstermiştir [32]. Literatür çalışmaları incelendiğinde Kiwano POD enziminin oda sıcaklığı ve -20 °C’ de depolama kararlılığı oldukça yüksektir. Bunun en önemli sebepleri POD enziminin bozulmaya karşı dirençli olması [21] ve Kiwano bitkisinin tropikal bir bitki olması düşünülmektedir.

Kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisinden elde edilen APX enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değeri 6,2 olarak bulunmuştur. Komatsuna (*Brassica rapa*) yapraklarından elde edilen APX enziminin optimum pH değeri 6.5’ tir [54]. Japon turpunun (*Raphanus sativus L.*) köklerinden elde edilen APX enziminin optimum pH değeri 6.0 olarak belirlenmiştir [55]. Yapılan optimum pH çalışmalarıyla Kiwano APX enziminin elde edilen sonuç uygunluk göstermektedir.

Yapılan optimum sıcaklık çalışmasına göre Kiwano APX enziminin optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak bulunmuştur. Komatsuna APX enzimi için optimum sıcaklık değeri 38 °C’ dir [54].

Kiwano APX enzim kinetiğinden elde edilen sonuçlara göre; AsP için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 284.80 μM , 0.0035 EÜ/dk. H_2O_2 için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 64.90 μM , 0,0077 EÜ/dk. olarak bulunmuştur. Komatsuna APX enzim kinetiği sonucuna göre AsP ve H_2O_2 için K_M değerleri sırasıyla $402 \pm 11 \mu M$ and $24 \pm 1.5 \mu M$ olarak belirtilmiştir [54]. Patates yumrusundan (*Solanum tuberosum L.*) elde edilen APX enzimi ile yapılan çalışma sonucunda AsP ve H_2O_2 için K_M değerleri sırasıyla 76.1 ± 23.1 ve $80.3 \pm 24.9 \mu M$ olarak bulunmuştur [56]. Kiwano

APX enziminin AsP ve H₂O₂ için bulunan K_M değerleri literatürle uygunluk göstermektedir.

Kiwano APX enzimi üzerine NaN₃, KCN, 2-merkapt etanol, L-sistein, EDTA, iyodoacetamid, 2-nitrobenzoik asit ve L-glutasyon'un etkisi incelenmiştir. L-Glutasyon ve EDTA hariç diğer tüm maddelerin enzim üzerinde inhibisyon etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada POD enzim aktivitesini % 50'ye düşüren inhibitör konsantrasyonları (I₅₀) sonucuna göre; en fazla inhibitör etkiyi gösteren KCN 0.1885 mM düzeyinde, NaN₃, 2-merkapt etanol, L-sistein, iyodoacetamid, 2-nitrobenzoik asit enzim aktivitesini sırasıyla 0.2888, 7.5723, 0.9091, 10.2317, 0.3316 mM düzeyinde % 50 inhibe etmektedir. Soya fasülyesi [57] ve Komatsuna [54] APX enzim aktivitesinin KCN ve NaN₃ tarafından inhibe edildiği bulunmuştur.

APX enzim aktivitesi üzerine Fe⁺², Fe⁺³, Cu⁺², Zn⁺², Mg⁺², Hg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Li⁺¹, Co⁺², Mn⁺², Pb⁺², Sn⁺², Na⁺¹, K⁺¹, Ni⁺², Cd⁺², Al⁺³ metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre Fe⁺² 10 mM üzerinde aktivasyona, Cu⁺² 1 mM'a kadar aktivasyona üzerinde ise inhibisyona, Ba⁺² 5mM ve üzerinde aktivasyona, diğer metallerin ise inhibisyona sebep oldukları görülmüştür. Literatürde APX enzimin üzerine metal etkisi çalışmasına rastlanmamıştır.

APX enzimi üzerinde bazik karaktere sahip L-histidin, L-lisin ve L-arginin amino asitlerinin 5 mM üzerindeki konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermektedir. Asidik karaktere sahip L-aspartik asit ve L-glutamik asit amino asitlerinin APX enzimi üzerinde genel olarak inhibitör etki göstermektedir. L-glutamik asit hiç aktivatör etki yapmazken 5 mM üzerinde APX aktivitesini tamamen yok etmektedir. L-aspartik asit ise 1 mM' a kadar aktivatör etki yaparken 5 mM ve üzerinde APX aktivitesini tamamen yok etmektedir. Nötral karaktere sahip L-treonin, L-prolin ve L-fenilalanin amino asitlerinin APX enzimi üzerinde konsantrasyona göre farklılık göstermesine rağmen genel olarak aktivatör etkiye sahiptir. L-treonin APX aktivitesi üzerinde 10 mM konsantrasyon ve üzerinde aktivatör iken, L-prolin 1 mM konsantrasyon ve üzerinde aktivatör görevi yapar. L-treonin ve L-prolinden farklı olarak L-fenilalanin 5 mM konsantrasyona kadar aktivatör etki gösterirken 10 mM konsantrasyonda APX

enzimi üzerinde aktivator ya da inhibitör bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Genel olarak bütün amino asitlere bakıldığında APX enziminin aktivitesini en yüksek oranda artıran L-prolin iken aktivitesini en fazla azaltan hatta yok eden L-glutamik asit olduğu görülmektedir.

Kiwano bitkisinden elde edilen peroksidazlar (E.C. 1.11.1.x) sınıfına dahil POD (E.C. 1.11.1.7) ve APX (E.C 1.11.1.11) enzimlerinden bazı ortak ve ayırt edici sonuçlar elde edilmiştir. Optimum pH ve sıcaklık aralıkları her iki enzim için benzer sonuçlar elde edilmiştir ve bu sonuçlar POD enzimlerinin genel özellikleriyle örtüşmektedir [23, 29, 30, 32, 33, 53, 54, 55, 68]. İnhibitör etkisi çalışmasında NaN_3 , KCN ve L-sistein her iki enzimi de inhibe ettiği görülmüştür. Fakat 2-merkaptan etanol POD için inhibitör etki göstermezken, APX enzimi için göstermiştir, EDTA için ise POD inhibitör etki gösterirken, APX göstermemiştir. Metal etkisi çalışmasında APX enzimi sadece Fe^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} metallerinin bazı konsantrasyonlarında aktivasyona ve kullanılan diğer metallerde inhibisyona sebep oldukları görülmüştür. POD enziminde ise bu metaller de dahil olmak üzere birçok metal aktivasyon etkiye sahiptir. Her iki enzimin de görevi ortak olmasına rağmen kullanılan substratların farklı olması bazı sonuçlarda farklılık göstermesine sebep olmuştur.

Kiwano bitkisinden elde edilen POD ve APX enzimlerinin karakterizasyonu ilk kez çalışılmıştır. Türkiye’de yeni yetiştirmeye başlayan Kiwano için enzim çalışmasının yapılması literatüre katkı sağlayacağı gibi yapılacak olan çalışmalara ek kaynak olarak ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] DIPLOCK, A., Healty Lifestyles Nutrition and Physical Activity, Antioxidant Nutrients, ILSI Europe Concise Monograph Series, 59, 1998.
- [2] NAWAR, W.W., Lipids in "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), 225-319, Marcel Dekker, 1996.
- [3] FLORA, S.J., Role of Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease, Cell Mol Biol, 53, 1-2, 2007.
- [4] BASKİN, S.I, SALEM, H., Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, 1-16, Washington DC, Taylor And Francis, 1997.
- [5] HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, JMC., Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed. Oxford, Clarendon Press, 188-196, 1989.
- [6] VAN, BREUSEGEM F., DAT, JF., Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death, Plant Physiol, 141, 384-390, 2006.
- [7] VERNIQUET, F., GAÏLLARD, J., NEUBURGER, M., DOUCE, R., Rapid İnactivation of Plant Aconitase by Hydrogen Peroxide, Biochem J, 276, 643-648, 1991.
- [8] VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M., INZE, D., H₂O₂ and NO: Redox Signals in Disease Resistance, Trends Plant Sci, 3, 330-334, 1998.
- [9] GEÇHEV, T, WİLLEKENS, H, VAN MONTAGU, M, et al. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress, J Plant Physiol, 160, 509-515, 2003.
- [10] LAMB, C., DİXON, RA., The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 48, 251-275, 1997.
- [11] BASKİN, SI., SALEM, H., Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, Washington DC, Taylor And Francis, 79-120, 1997.
- [12] AK, T., Curcuminin Antioksidan Ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstütüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2006.

- [13] BOLWELL, G. P., *Plant Biol.*, 2, 287, 1999.
- [14] MÍTLER, R., *Trends in Plant Science.*, 7, 9,405, 2002.
- [15] ELLIOT, J.G., *Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages*, *Food Tech*, 53, 2, 46-48, 1999.
- [16] OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODİLL, 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.
- [17] BLOKHNIINA, O., *Academic Dissertation*, ISSN1239-9469, ISBN 951-45-9631-5, ISBN 951-45-9632-3, ISBN 951-45-9633,2000.
- [18] LARSON, R.A., *The Antioxidants of Higher Plants*. *Phytochemistry*, 27, 969-978, 1988.
- [19] CAO, G., SOFIĆ, E., PRIOR, R.L., *Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431, 1996.
- [20] PRATT, D.E., HUDSON, B.J.F., *Natural Antioxidants Not Exploited Commercially In food Antioxidants*, Hudson B.J.F. Ed., Elsevier, Amsterdam, 17-192, 1990.
- [21] SPITZER, G., TAYLOR, M. C., *The Effect of Heat on the Activity of the Enzyme Peroxidase as Found in Milk*, *Journal of Dairy Science*, Vol. 7 No. 3, 234-244, 1924.
- [22] MLIKI, A., ZIMMERMANN, W., *Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from Streptomyces cyaneus*, *Applied and environmental microbiology*, 916-919, 1992.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] RODRI'GUEZ, J. N-LO'PEZ., ESPI'N, J. C., AMOR, F. D., et al., *Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (Cucumis melo L.) Cultivated under Different Salinity Conditions*, *J. Agric. Food Chem*, 48, 1537-1541, 2000.

- [26] DEEPA, S.S., ARUMUGHAN, C., Purification and Characterization of Soluble Peroxidase From Oil Palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf, *Phytochemistry*, 61, 503–511, 2002.
- [27] ONSA, G. H., SAARI, N. B., SELAMET, J., BAKAR, J., Purification and Characterization of Membrane-Bound Peroxidases from Metroxylon Sagu, *Food Chemistry*, 85, 365–376, 2004.
- [28] IKEHATA, K., BUCHANAN, I. D., PICKARD, M. A., SMITH, D. W., Purification, Characterization and Evaluation of Extracellular Peroxidase from Two Coprinus Species for Aqueous Phenol Treatment, *Bioresource Technology*, 96, 1758–1770, 2005.
- [29] JOHRI, S., JAMWAL, U., RASOOL, S., KUMAR, A., VERMA, V., QAZI, G.N., Purification and Characterization of Peroxidases from *Withania Somnifera* (Agb 002) and Their Ability to Oxidize Iaa, *Plant Science*, 169, 1014–1021, 2005.
- [30] 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.
- [31] RUDRAPPA, T., LAKSHMANAN, V., KAUNAIN, R., SINGARA, N. M., NEELWARNE, B., Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from Genetically Transformed Roots of Red Beet (*Beta Vulgaris L.*), *Food Chemistry*, 105, 1312–1320, 2007.
- [32] BELCARZ, A., GINALSKA, G., KOWALEWSKA, B., KULESZA, P., Spring Cabbage Peroxidases – Potential Tool in Biocatalysis and Bioelectrocatalysis, *Phytochemistry*, 69, 627–636, 2008.
- [33] FANG, L., JIANG, B., ZHANG, T., Effect of Combined High Pressure and Thermal Treatment on Kiwifruit Peroxidase, *Food Chemistry*, 109, 802–807, 2008.
- [34] SERRANO-MARTÍNEZ, A., FORTEA, M. I., DEL AMOR, F. M., NUÑEZ-DELICADO, E., Kinetic Characterisation and Thermal Inactivation Study Of partially Purified Red Pepper (*Capsicum Annuum L.*) Peroxidase, *Food Chemistry*, 107, 193–199, 2008.
- [35] MA'RQUEZA, O., WALISZEWSKIA, K.N., OLIARTA, R.M., PARDIOB, V. T., Purification and Characterization of Cell Wall-Bound Peroxidase from Vanilla Bean, *LWT*, 41, 1372–1379, 2008.
- [36] FORTEA, M.I., LOPEZ-MIRANDA, S., SERRANO-MARTINEZ, A., CARRENO, B J., NUNEZ-DELICADO, E., Kinetic Characterisation and Thermal Inactivation Study of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Table Grape (Crimson Seedless), *Food Chemistry*, 113, 1008–1014, 2009.

- [37] 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.
- [38] CAI, F., OUYANG, C., DUAN, P., GAO, S., XU, Y., CHEN, F., Purification and Characterization of a Novel Thermal Stable Peroxidase from *Jatropha Curcas* Leaves, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 77, 59– 66, 2011.
- [39] PANDEY, V.P., SINGH, S., SINGH, R., DWIVEDI, U.N., Purification and Characterization of Peroxidase from Papaya (*Carica papaya*) Fruit, *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 367–376, 2012.
- [40] THONGSOOK, T., BARRETT, DM., Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica Oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3206–3214, 2005.
- [41] LEON, J.C, ALPEEVA, I.S., CHUBAR, T.A., GALAEV, I. Yu., CSOREGİ, E., SAKHAROV, I. Yu., Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019, 2002.
- [42] GÜLÇİN, İ., Isırgan Otonun (*Urtica Dioica*) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi Oksidatif Enzimlerinin Karakterizasyonu ve Bazı *İn Vivo* Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, , 114, 2002.
- [43] MCLELLAN, K.M., ROBINSON, D.S., Purification and Heat Stability of Brussels Sprout Peroxidase Isoenzymes, *Food Chemistry*, 23, 305–319, 1987.
- [44] GÜLÇİN, İ., YILDIRIM, A., Purification and Characterization of Peroxidase from *Brassica Oleracea* Var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17, 2175–2183, 2005.
- [45] YEMENİCİOĞLU, A., ÖZKAN, M., CEMEROĞLU, B., Partial Purification and Thermal Characterization of Peroxidase from Okra (*Hibiscus Esculentum*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4158–4163, 1998.
- [46] CLEMENTE, E., Purification and Thermostability of İsoperoxidase from Oranges. *Phytochemistry* 49, 29-36, 1998.
- [47] KVARATSKHELİA, M., WINKEL, C., THORNELEY, R.N.F., Purification and Characterization of a Novel Class III Peroxidase Isoenzyme from Tea Leaves, *Plant Physiology*, 114, 1237-1245, 1997.

- [48] NAİR, A. R., SHOWALTER, A. M., Purification and Characterization of a Woundinducible Cell Wall Cationic Peroxidase from Carrot Roots. *Biochemistry Biophys, Research Communucation*, 226, 254, 1996.
- [49] HALPİN, B., PRESSEY, R., JEN, J., MONDY, N., Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science* 54, 644, 1989.
- [50] EL SHAMEİ, Z., The Purification and Properties of Peroxidase in Spinach. I. Isolation and Purification, In *Biotechnology and Food Industry, Proceedings of The International Symposium Held in Budapest, Hungary*, 257–265, 1987.
- [51] JEN, J.J., SEO, A., FLURKEY, W.H., Tomato Peroxidases Purification Via Hydrophobic Chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63, 1980.
- [52] CİVELLO, P. M., MARTÍNEZ, G. A., CHAVES, A. R., ANON, M. C., Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria Ananassa-Duch*)S Partial-Purification and Determination Of Some Properties. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 43, 2596–2601, 1995.
- [53] KÖKSAL, E., Karnabahar (*Brassica Oleracea L.*) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2007.
- [54] ISHİKAWA, T., TAKEDA, T., SHİGEOKA, S., Purification and Characterization of Cytosolic Ascorbate Peroxidase from Komatsuna (*Brassica Rapa*) *Plant Science* 120 , 118, 1996.
- [55] OHYA, T., MORİMURA, Y., SAJİ, H., MİHARA, T., IKAWA, T., Purification and Characterization of Ascorbate Peroxidase in Roots of Japanese Radish, *Plant Sci.* 125, 137–145, 1997.
- [56] DE LEONARDİS, S., DİPIERRO, N., DİPIERRO, S., Purification and Characterization of an Ascorbate Peroxidase from Potato Tuber Mitochondria, *Plant Physiol. Biochem.* 38, 773–779, 2000.
- [57] DALTON, D.A., HANUS, F.J., RUSSELL, S.A., EVANS, H.J., Purification, Properties and Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legume Root Nodules. *Plant Physiol.*, 83, 7899794, 1987.
- [58] NELSON, D.L., COX, M.M., Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 193, 2004.
- [59] KEHA, E. E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, 89-138, Erzurum, 2011.

- [60] TÜZÜN, C., Biyokimya, Palme Yayıncılık, 81, Ankara, 2005.
- [61] STRYER, L., BERG, J.M., TYMOCYZKO, J.L., Biochemistry, 190, New York, 2005.
- [62] LEHNINGER, A. L., Principles of Biochemistry, Worth Publisher, Acedemic Press, 587-665, New York, 1982.
- [63] BİNGÖL, G., Biyokimya, Güven Matbaası, 169-174, Ankara, 1983.
- [64] TEKMAN, Ş., ÖNER, N., Genel Kimya, I. Cilt, Fatih Yayınevi Matbaası, 335-367, İstanbul, 1986.
- [65] ZİYAN, E., Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (Pyrus Communis)'ndan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi (yüksek lisans tezi), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 1998.
- [66] ÇİMEN, 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.
- [67] HOLME, D.J., PECK, H., Analytical Biochemistry, Prentice Hall, 259-261, England, 2005.
- [68] TURGUT, H.İ., Sakarya Bölgesinde Yetişen Deve Dikeni (Silybum marianum) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, 2009.
- [69] <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>, Erişim tarihi: 10 Nisan 2013.
- [70] ATASAGUNGIL, M., Enzimler, Güzel İstanbul Matbaası, Ankara, 1965.
- [71] LİNEWEAVER, H., BURK, D., The Determination of Enzyme Dissociation Constant, J. Am. Chem. Soc., 56,658, 1934.
- [72] HALLİWELL, B., CHİRİCO, S., Lipid Peroxidation: İts Mechanism, Measurement and Significance, Am. J. Clin. Nutr., 57, 715-725, 1993.
- [73] RABİDEAU, C.L., Pesticide Mixtures Induce Immunotoxicity: Potentiation of Apoptosis and Oxidative Stres, Blacksburg, 185, Virginia, 2001.
- [74] CHEESEMAN, K H., SLATER, T F., An İntroduction to Free Radical Biochemistry, Free Radicals in Medicine, 481- 493, 1993.

- [75] KALYANARAMAN, B., MASON, R.P., TAİNER, B., ELİNG, T.E., The Free Radicalformed During the Hydroperoxide-Mediated Deactivation of Ram Seminal Vesicles is Hemoprotein-Derived, *J. Biol. Chem.*, 257, 9, 4764-4768, 1982.
- [76] WHİTEMAN, M., TRİTSCHLER, H., HALLİWELL, B. Protection Against Peroxynitritedependent Tyrosine Nitration and A1-Antiproteinase İnactivation by Oxidized and Reduced Lipoic Acid , *FEBS Letters*, 379, 74-76, 1996.
- [77] FLOYD, R A., Antioxidants, Oxidative Stress and Degenerative Neurological Disorders, *Experimental Biology and Medicine*, 222, 236-245, 1999.
- [78] 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.
- [79] CHANCE, B., SİES, H., BOVERİS, A., Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs, *Physiological Reviews*, 59, 3, 527-605, 1979.
- [80] REİTER, R.J., Oxidative Damage in The Central Nervous System: Protection by Melatonin, *Progress in Neurobiology*, 56, 359-384, 1998.
- [81] GUTTERİDGE, J.M.C., Iron and Oxygen: a Biologically Damaging Mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica Suppl*, 361, 78-85, 1989.
- [82] 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.
- [83] HALLİWELL, B., CLEMENT, M. V., LONG, L.H., Hydrogen Peroxide in The Human Body. *FEBS Letters*, 486, 10-13, 2000.
- [84] MAVİ, 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.
- [85] DÜZGÜNER, V., Deneysel Olarak Diyabet Olusturulan Tavsanlarda Çinkonun Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı, 2005.
- [86] ADAMS, J.B., Theinact İvationandre Generation of Peroxidasein Relation to Thehigh Temperature-Shorttime Processing of Vegetables. *Journal Food Technology*, 13, 281-297, 1978.

- [87] WHITAKER, J.R., Catalase and Peroxidase. in Principles of Enzymology for Thefood Sciences, Whitaker, J. R., Ed., Dekker: New York, 565-578, 1994.
- [88] SCANDALÍOS, J.G., Regulation and Properties of Plant Catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, 275–316, 1994.
- [89] PÜTTER, J., BECKER, R., Methods of Enzymathic Analysis: Peroxide. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, 286, 1987.
- [90] VAN HUYSTEE, R.B., Some Molecular Aspect of Plant Peroxidase Biosyntheticstudies. Annual Review in Plant Physiology, 38, 205, 1987.
- [91] ONSA, G.H., SAARÍ, N., SELAMAT, J., BAKAR, J., Purification and Characterization of Membrane Bound Peroxidases from Metroxylon Sagu. Food Chemistry, 85, 365–376, 2004.
- [92] ROBINSON, F.E., MAXWELL, S.R.J., THORPE, G.H.G., an Investigation of The Antioxidant Activity of Black Tea Using Enhanced Chemiluminesence, Free Radical Research, 26, 291–302, 1987.
- [93] KAMPIS, A., BARTUCZKOVACS, O., HOSCHKE, A., AOSVIGYAZO, V., Changes in Peroxidasesactivity of Broccoli During Processing and Frozen Storang, Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie, 17, 293–295, 1984.
- [94] ROMPEL, A., ALBERS, M., NASERI, J.I., GERDEMANN, C., et al., Purification, Cloning and Characterization of a Novel Peroxidase Isozyme from Sweetpotatoes (*Ipomoea Batatas*), Biochimica Et Biophysica Acta 1774, 1422–1430, 2007.
- [95] ROBINSON, D. S., Peroxidases and Catalases in Foods, in Oxidative Enzymes in Food, 1st Ed., Robinson, D. S., Eskin, N. A. M., Eds., Elsevier Applied Science: London, U.K., 1-37, 1991.
- [96] WAKAMATSU, K., TAKAHAMA, U., Changes in Peroxidase Activity and in Peroxidase Isozymes in Carrot Callus. Physiologia Plantarum 88, 167–171, 1993.
- [97] BARTONEK-ROXA, E., ERICKSSON, H., MATTIASSON, B., the cDNA Sequence of a Neutral Horseradish Peroxidase. Biochimica Et Biophysica Acta 1080, 245–250, 1991.
- [98] AGOSTINI, E., MEDINA, M.I., MILRAD DE FORCHETTI, S.R., TIGIER, H., Properties of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from Turnip (*Brassica Napus L.*) Roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 596–598, 1997.

- [99] DUARTE-VAZQUEZ, M.A., GARCIA-ALMENDAREZ, B., REGALADO, C., WHITAKER, J.R., Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica Napus* L. Var Esculenta D.C.) Peroxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1574–1579, 2000.
- [100] BANCÍ, L., Structural Properties Of Peroxidases. *Journal Of biotechnology*, 53, 253–263, 1997.
- [101] HAMED, R. R., MAHAREM, T. M., FATAH, M. M. A., ATAYA, F. S., Purification of Peroxidase Isoenzymes from Turnip Roots, *Phytochemistry*, 48, 1291, 1998.
- [102] DEEPA, S.S., ARUMUGHAN, C., Purification and Characterization of Soluble Peroxidase from Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Leaf, *Phytochemistry*, 61, 503–511, 2002.
- [103] DUNFORD, H.B., Heme Peroxidases, John Wiley, Chichester, 1999.
- [104] VEITCH, N.C., SMITH, A.T., *Adv. Inorg. Chem*, 51, 107–162, 2001.
- [105] ADAM, W., LAZARUS, M., SAHA-MOLER, C.R., WEICHOLD, O., HOCH, U., SCHERIER, P., Biotransformations with Peroxidases, *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74–108, 1999.
- [106] KWAK, S.S., KIM, S.K., PARK, I.H., LIU, J.R. , Enhancement of Peroxidase Activity by Stress-Related Chemicals in Sweet Potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568, 1996.
- [107] 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.
- [108] FRAGUAS,, L.F., BATISTA-VIERA, F., CARLSSON, J., Preparation of High-Density Concanavalin a Adsorbent and its Use for Rapid, High-Yield Purification of Peroxidase from Horseradish Roots, *Journal of Chromatography B*, 803, 237–241, 2004.
- [109] IKEHATA, K., BUCHANAN, I. D., PICKARD, M. A., SMITH, D. W., Purification, Characterization and Evaluation of Extracellular Peroxidase from Two *Coprinus* Species for Aqueous Phenol Treatment, *Bioresource Technology*, 96, 1758–1770, 2005.
- [110] <http://en.wikipedia.org/wiki/Peroxidase>, Erişim tarihi: 10 Mart 2013.

- [111] 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.
- [112] RUDRAPPA, T., LAKSHMANAN, V., KAUNAIN, R., SINGARA, N. M., NEELWARNE, B., Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from Genetically Transformed Roots of Red Beet (*Beta Vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 105, 1312–1320, 2007.
- [113] RAVEN, EL., "Peroxidase-catalyzed Oxidation of Ascorbate. Structural, Spectroscopic and Mechanistic Correlations in Ascorbate Peroxidase", *Subcell. Biochem.* Subcellular Biochemistry, 35, 317–49, 2000.
- [114] SHIGEOKA, S., NAKANO, Y., KITAOKA, S., Purification and Soma Properties of L-Ascorbic Acid-Specific Peroxidase in *Euglena Gracilis* Z. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201, 121-127, 1980.
- [115] CHEN, G-X., ASADA, K., Ascorbate Peroxidase In Tea Leaves: Occurrence Of Two Isoenzymes And The Difference In Their Enzymatic and Molecular Properties, *Plant and Cell Physiology*, 30, 987-998, 1989.
- [116] SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, V., TAKEDA, T., YABUTA, Y., YOSHIMURA, K., *Journal of Experimental Botany*, 53, 372-1305, 2002.
- [117] BEYER, R. E., *Biomembr.*, 26, 4, 349, 1994.
- [118] KOÇ, E., ÜSTÜN, A.S., Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma ve Antioksidanlar, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 24, 2008.
- [119] TANAKA, K., SUDA, Y., KONDO, N., SUGAHARA, K., O₃ Tolerance and the Ascorbate-Dependent H₂O₂ Decomposing System in Chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 26, 1425-1431, 1985.
- [120] MITTLER, M., ZILINSKAS, BA., Regulation of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase and Other Antioxidant Enzymes During The Progression of Drought Stress and Following Recovery from Drought. *the Plant Journal*, 5, 397-405, 1994.
- [121] PRASAD, TK., ANDERSON, MD., MARTIN, BA., STEWART, CR., Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide, *The Plant Cell*, 6, 65-74, 1994.
- [122] CONKLIN, PL., LAST, RL., Differential Accumulation of Antioxidant Mrnas in *Arabidopsis Thaliana* Exposed to Ozone, *Plant Physiology*, 109, 203-212, 1995.

- [123] RAO, MV., PALIYATH, G., ORMROD, DP., Ultraviolet-B- and Ozone-Induced Biochemical Changes in Antioxidant Enzymes of Arabidopsis Thaliana, *Plant Physiology*, 110, 125-136, 1996.
- [124] DAT, JF., LOPEZ-DELGADO, H., FOYER, CH., SCOTT, IM., Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase During Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings, *Plant Physiology*, 116, 1351-1357, 1998.
- [125] LOPEZ, F., VANSUYT, G., CASSE-DELBART, F., FOURCROY, P., Ascorbate Peroxidase Activity, Not the Mrna Level, is Enhanced in Salt-Stressed Raphanus Sativus Plants, *Physiologia Plantarum*, 97, 13-20, 1996.
- [126] DONAHUE, JL., OKPODU, CM., CRAMER, CL., GRABAU, EA., ALSCHER, RG., Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves. *Plant Physiology*, 113, 249-257, 1997.
- [127] YOSHIMURA, K., YABUTA, Y., ISHIKAWA, T., SHIGEOKA, S., Expression of Spinach Ascorbate Peroxidase in Isoenzymes in Response to Oxidative Stress, *Plant Physiology*, 123, 223-234, 2000.
- [128] http://tr.wikipedia.org/wiki/Cucumis_metuliferus, Erişim tarihi: 20 Nisan 2013.
- [129] <http://www.cicekansiklopedisi.com/cucumis-metuliferus-kiwano-kavunu/>, Erişim tarihi: 3 Nisan 2013.
- [130] <http://community.seattletimes.nwsourc.com/archive/?date=20060222&slug=hornedmelon22>, Erişim tarihi: 5 Nisan 2013.
- [131] http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=11879, Erişim tarihi: 8 Nisan 2013.
- [132] ALIERO, A. A, A. M. GUMI, Studies on the germination, chemical composition and antimicrobial properties of Cucumis metuliferus, *Annals of Biological Research*, 3, 4059-4064, 2012.
- [133] ŞEN A., ERYILMAZ M., BAYRAKTAR H., ÖNAL S., Purification of a-galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, *Separation and Purification Technology*, 83, 130–136, 2011.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Denli, 1985 de Sivas' ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sivas'ta tamamladı. 2004 yılında başladığı Boğaziçi Üniversitesi Lisansla Birleştirilmiş Tezsiz Yüksek Lisans Kimya Öğretmenliği programından 2010 yılında mezun oldu. 2010 – 2011 yılı arasında İstanbul'da özel bir dershanede öğretmen olarak çalıştı. 2011 yılında Sakarya Üniversitesi Biyokimya bilim dalında yüksek lisansa başladı ve 2013 yılında tamamladı.