

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARAHİNDİBA (*Taraxacum officinale*) BİTKİSİNDEN
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE PEROKSİDAZ
ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Belkıs DÜZCAN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Temmuz 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARAHİNDİBA (*Taraxacum officinale*)
BİTKİSİNDEN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE
PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU**


YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Belkıs DÜZCAN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA


Bu tez 29/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Gülnur
ARABACI

Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Aysel
KÜÇÜK

Üye


Yrd. Doç. Dr. Serpil
ÖZTÜRK

Üye

TEŞEKKÜR

Öğrenim hayatım boyunca maddi manevi hiçbir fedakârlığını ve desteğini esirgemeyen aileme,

Yüksek lisans döneminde çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her türlü konuda bana destek olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya,

Yüksek lisans dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım bölüm başkanımız Prof. Dr. Ali Osman AYDIN hocam'a ve sevgili hocam Araş. Gör. Semra YILMAZER'e göstermiş olduğu ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin karakterizasyonu adlı çalışmam Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (proje no: 2009 50 01 038) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER.....	3
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.1.1. Enzimlere etki eden faktörler.....	3
2.1.1.1. Sıcaklık.....	4
2.1.1.2. pH.....	4
2.1.1.3. Zaman.....	4
2.1.1.4. Substrat konsantrasyonu.....	5
2.1.1.5. Enzim konsantrasyonu.....	5
2.1.1.6. İnhibitör.....	5
2.1.2. Enzim kinetiği.....	5
2.1.3. Enzim inhibisyonu.....	8
2.1.3.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif).....	8
2.1.3.2. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif).....	9
2.1.3.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (Ankompetitif).....	10

2.1.4. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları.....	12
2.2. Serbest Radikaller.....	12
2.3. Antioksidan Enzimler.....	15
2.3.1. Süperoksit Dismutaz.....	16
2.3.1. Peroksidaz Enzimi.....	16
2.4. Karahindiba (<i>Taraxacum officinale</i>).....	18
2.4.1. Tarihçesi.....	18
2.4.2. Kimyasal özellikleri.....	18
2.4.3. Tıbbi etkileri.....	19
2.5. Kaynak Özetleri.....	20
BÖLÜM 3.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	22
3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler.....	22
3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu.....	22
3.3. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu.....	23
3.3.1. Substrat spesifikliği.....	23
3.3.2. Optimum substrat konsantrasyonu.....	23
3.3.3. pH etkisi.....	23
3.3.4. Sıcaklığın etkisi.....	25
3.3.5. Enzim kinetiği.....	25
3.3.6. İnhibitör etkisi.....	25
3.3.7. Enzim depolanma kararlılığı.....	26
3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin İzolasyonu.....	26
3.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi...	26
3.5.1. pH etkisi.....	27
3.5.2. Sıcaklığın etkisi.....	27
3.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) enziminin depolanma kararlılığı...	27
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR.....	28
4.1. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	28

4.2. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu.....	28
4.2.1. pH etkisi	28
4.2.2. Sıcaklığın etkisi.....	34
4.2.3. Enzim kinetiği	39
4.2.4. İnhibitörlerin etkisi.....	49
4.2.5. Peroksidaz (POD) Enziminin depolanma kararlılığı.....	58
4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması	59
4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin İzolasyonu.....	59
4.4.1. pH etkisi.....	59
4.4.2. Sıcaklığın etkisi.....	60
4.4.3. Enzim depolanma kararlılığı.....	61
4.4.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	61
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	63
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinil Prolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
NADPH	: Nikotinamid dinükleotid hidrojen fosfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
E.C.	: Enzim komisyonu
nm	: Nanometre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Michaelis- Menten grafiği.....	6
Şekil 2.2.	Lineweaver-Burk grafiği.....	7
Şekil 4.1.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile optimum pH grafiği.....	29
Şekil 4.2.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile optimum pH grafiği.....	30
Şekil 4.3.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin gallik asit substratı ile optimum pH grafiği.....	30
Şekil 4.4.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile optimum pH grafiği.....	31
Şekil 4.5.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı ile optimum pH grafiği.....	31
Şekil 4.6.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı ile optimum pH grafiği.....	32
Şekil 4.7.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen daimin substratı ile optimum pH grafiği.....	32
Şekil 4.8.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı ile optimum pH grafiği.....	33
Şekil 4.9.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile optimum pH grafiği.....	33
Şekil 4.10.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	34
Şekil 4.11.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	35
Şekil 4.12.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin gallik asit substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	35

Şekil 4.13.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	36
Şekil 4.14.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	36
Şekil 4.15.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	37
Şekil 4.16.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	37
Şekil 4.17.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	38
Şekil 4.18.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile optimum sıcaklık grafiği.....	38
Şekil 4.19.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	39
Şekil 4.20.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	40
Şekil 4.21.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	40
Şekil 4.22.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	41
Şekil 4.23.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği	41
Şekil 4.24.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	42

Şekil 4.25.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	42
Şekil 4.26.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	43
Şekil 4.27.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği	43
Şekil 4.28.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	44
Şekil 4.29.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği	44
Şekil 4.30.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o- fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	45
Şekil 4.31.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	45
Şekil 4.32.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	46
Şekil 4.33.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	46
Şekil 4.34.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği 1/V-1/[S] grafiği...	47
Şekil 4.35.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H ₂ O ₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği.....	47

Şekil 4.36.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	48
Şekil 4.37.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum azidin etkisi.....	49
Şekil 4.38.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine tiyoürenin etkisi.....	50
Şekil 4.39.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine askorbik asit etkisi.....	50
Şekil 4.40.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine potasyum siyanürün etkisi.....	51
Şekil 4.41.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine 2-merkapt etanolün etkisi.....	51
Şekil 4.42.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-glutasyonun etkisi.....	52
Şekil 4.43.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-sistein etkisi.....	52
Şekil 4.44.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum sülfitin etkisi.....	53
Şekil 4.45.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum azit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	54
Şekil 4.46.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden tiyoüre inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	54
Şekil 4.47.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden askorbik asit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	55
Şekil 4.48.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden 2-merkapt etanol inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	55

Şekil 4.49.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-glutasyon inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.50.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-sistein inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.51.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden potasyum siyanür inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	57
Şekil 4.52.	Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum sülfid inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	57
Şekil 4.53.	Karahindiba bitkisinden elde edilen POD enziminin depolama kararlılığı grafiği.....	59
Şekil 4.54.	Karahindiba bitkisinden elde edilen SOD enziminin optimum pH grafiği.....	60
Şekil 4.55.	Karahindiba bitkisinden elde edilen SOD enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	60
Şekil 4.56.	Karahindiba bitkisinden elde edilen SOD enziminin depolama kararlılığı grafiği.....	61

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Reaktif oksijen türleri.....	1
Tablo3.1.	0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması.....	24
Tablo 3.2.	0,1 M tris tamponunun hazırlanması.....	24
Tablo 4.1.	POD enziminin substrat spesifikliği ile ilgili toplu bulgular.....	48
Tablo 4.2.	POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I_{50} değerleri	53
Tablo 4.3.	POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve K_i değerleri.....	58
Tablo 4.4.	Farklı NBT konsantrasyonlarında belirlenen SOD aktivitesi.....	62

ÖZET

Anahtar kelimeler: Peroksidaz, süperoksit dismutaz, karahindiba, antioksidan enzimler, serbest radikaller

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

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden bir enzimdir.

Çalışmamızda peroksidaz (POD) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri, Sakarya bölgesinde yetişen karahindiba (*Silybum marianum*) bitkisinden ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrakte, peroksidaz enziminin karakterizasyonu için kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında 4-metil katekol - H₂O₂, ABTS - H₂O₂, gallik asit - H₂O₂, guaiakol - H₂O₂, kafeik asit - H₂O₂, o-dianisidin - H₂O₂, o-fenilen diamin - H₂O₂, progallol - H₂O₂, katekol - H₂O₂ substrat çiftleri kullanılarak her bir substrat için ayrı ayrı optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Her bir substrat çifti için 420 nm'de UV spektrofotometre cihazında aktivite tayinleri yapılmıştır. Enzimin optimum pH'ı 3,0 - 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığı ise 30 - 40 °C arasında değiştiği bulunmuştur. Ayrıca her bir substrat çifti için Lineveawer-Burk grafiklerinden K_m ve V_{max} değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. K_m değerleri değerlendirilerek POD substrat spesifikliği bulunmuştur. Peroksidaz enziminin substrat spesifikliği büyükten küçüğe doğru kafeik asit, ABTS, o-dianisidin, gallik asit, progallol, o-fenilen diamin, 4-metil katekol, katekol ve guaiakol sırasını takip etmiştir. Bu çalışmada sekiz adet inhibitör ile çalışılmış olup etkili olanların yarışmalı inhibitör olarak sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, 2-merkaptan etanol, L-Glutatyon ve L-Sistein, yarı yarışmalı olarak potasyum siyanür, yarışmasız olarak ise sodyum sülfid olduğu bulunmuştur. Süperoksit dismutaz enzimi için optimum pH'ının 7,6 olduğu bulunmuştur. Enzimin optimum sıcaklığının ise 20°C olduğu bulunmuştur.

CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE FROM DANDELION (*Taraxacum officinale*) PLANT

SUMMARY

Key Words: Peroxidase, superoxide dismutase, dandelion, *taraxacum officinale*, antioxidant enzymes, free radicals,

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

Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) are a class of enzymes that catalyze the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide.

In this work, dandelion (*Silybum marianum*) was used for POD and SOD characterization. POD activity was determined by measuring as indicated by an increase in absorbance at 420 nm. Enzyme activity, as a function of pH, was determined with substrate patterns (catechol, 4-methylcatechol, pyrogallol, caffeic acid, ABTS, gallic acid, guaiacol, o-dianisidine, o-phenilen diamin), in different buffer, ranging from pH 3,0 to 9,0. Enzyme activity, as a function of temperature, was determined with substrate patterns. Optimum temperature was found to change between 30 – 40°C. Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum reaction velocity (V_{max}) were determined using nine substrate patterns in nine different concentrations for the substrate specificity of POD. The substrate specificity of POD was found to be caffeic acid, ABTS, o-dianisidine, gallic acid, pyrogallol, o-phenilen diamin, 4-methylcatechol, catechol and guaiacol, respectively for the plant. Eight inhibitors were tested in the study and the effectives were found to be sodium azide, thiourea, ascorbic acid, 2-mercapto ethanol, L-Glutatyon and L-Cystein as competitive inhibitors, potassium cyanide, as uncompetitive inhibitor, sodium sulfide as noncompetitive inhibitor. In this study, superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) Activity was determined in the extract of dandelion (*taraxacum officinale*) with high antioxidant effect. After the ultracentrifugation step, superoxide dismutase spesific activity was found. Optimum pH and optimum temperature were found to 7,6 and 20°C.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Araştırmacılar insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama 10.000 serbest radikalin hücumuna uğradığını belirtmektedir. Eğer serbest radikaller yok edilmezse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler [1,2].

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri ve kısaca antioksidanlar olarak bilinen; serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerin bir sınıfıdır [3,4].

Enzimler çok yüksek katalizleme gücüne sahip protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir.

Bir canlıdaki parçalanma ve sentez reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu tanıma göre de, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem maddelerdir. Canlı dışında da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Enzim üretimi genlerin kontrolü altında gerçekleştirilmekte (bir gen-bir enzim) ve her enzimin kendine özgü sıcaklık, iyon tepkimesi (pH) ve basınç koşulları bulunmaktadır.

Bugün enzimler gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım, veterinerlik ve tekstil endüstrisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT)'dır. Ve bu endojen antioksidan enzimler serbest radikalleri zararsız hale getirirler. Böylece organizma serbest radikaller ve aktif oksijen türlerinden etkilenmez [5].

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1.Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler metabolizma reaksiyonlarının çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da özgüllüklerini korurlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması gibi fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur. Bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisiyle gerçekleşmektedir. Bu sebeple yaşam birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret olan bir sistem olarak tanımlanmıştır.

Enzimlerin ürünlerine dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna -az eki getirilerek (ürez, lipaz gibi...) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslar Arası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır.

2.1.1. Enzimlere etki eden faktörler

Enzimatik reaksiyonların hızlarını etkileyen faktörler

- Sıcaklık
- pH
- Zaman
- Substrat konsantrasyonu
- Enzim konsantrasyonu
- İnhibitör

2.1.1.1. Sıcaklık

Enzimatik reaksiyonlar üzerinde sıcaklığın hızı doğrudan arttırıcı bir etkisi vardır. *In vitro* enzim reaksiyonları çoğu zaman 37-40°C'de yapılır. Bu sıcaklıkta reaksiyon hızı oda sıcaklığındakine oranla dört defa daha fazladır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir.

2.1.1.2. pH

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asit ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH'lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktivitesi nötral ortamlarda en fazla olmaktadır.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'ı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'ı optimum sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

2.1.1.3. Zaman

Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

2.1.1.4. Substrat konsantrasyonu

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Buradan sonra enzim substratına karşı doygunluğuna ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder. Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız V_{max} ile gösterilir.

2.1.1.5. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır.

2.1.1.6. İnhibitör

İnhibitörler enzimatik reaksiyonların hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler [6].

2.1.2. Enzim Kinetiği

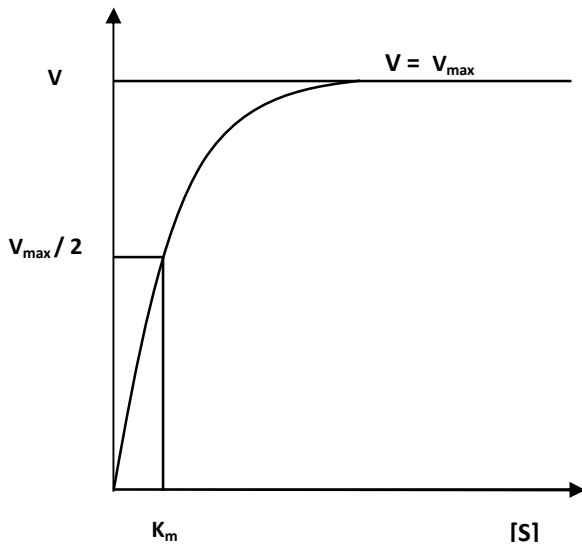
Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir ‘‘Enzim-Substrat kompleksi’’ oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür. Enzim kinetiği mekanizması şu şekilde gösterilir.



Burada ES kompleksi, E ve S’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 ulaşınca ‘‘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 2.1). Bunun ozm eşitlik 2.1’deki Michaelis-Menten bağıntısı ile de bulunur.



şekil 2.1. Michaelis- Menten grafiği

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır.

$$V = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

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

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede

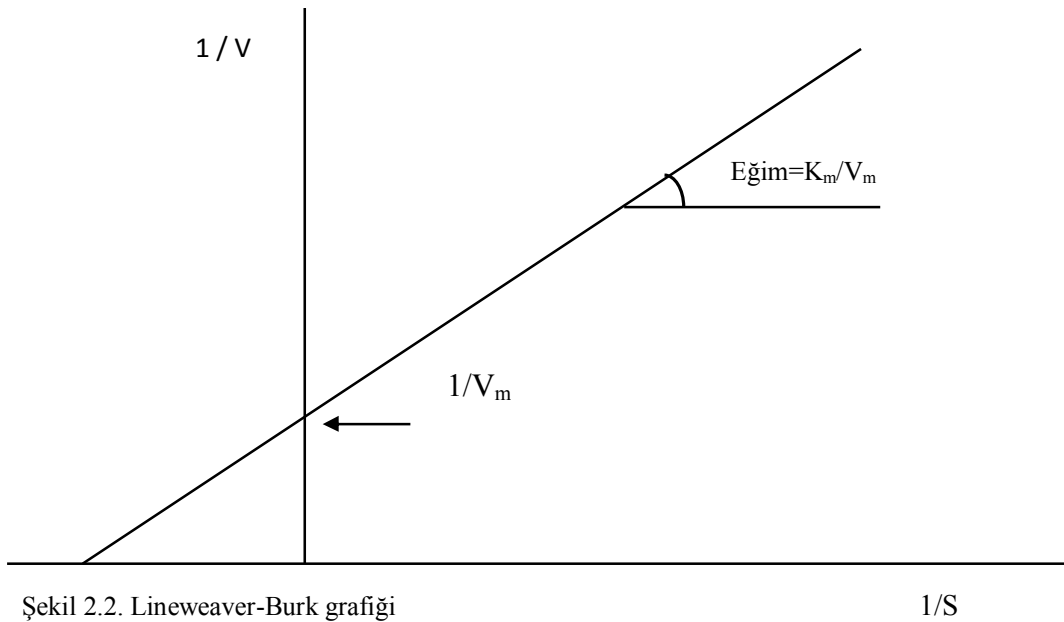
oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir. $V = V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

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

Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleme dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı eşitlik 2.2'deki Lineweaver-Burk denklemdir.

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

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



Şekil 2.2. Lineweaver-Burk grafiği

1/S

2.1.3. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin hem *in vivo*, hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılmasına veya tamamen yok edilmesine enzim inhibisyonu denir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle düşük molekül ağırlığına sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan oldukça önemlidir. İnhibisyon araştırmaları ile enzimatik reaksiyonların mekanizmaları, aktif merkezde rol oynayan fonksiyonel gruplar, aktif merkezin yapısı ve enzimin substrat spesifikliğı açıklanabilir. Ayrıca ilaçların ve toksik maddelerin etkisi de bu yolla incelenebilir.

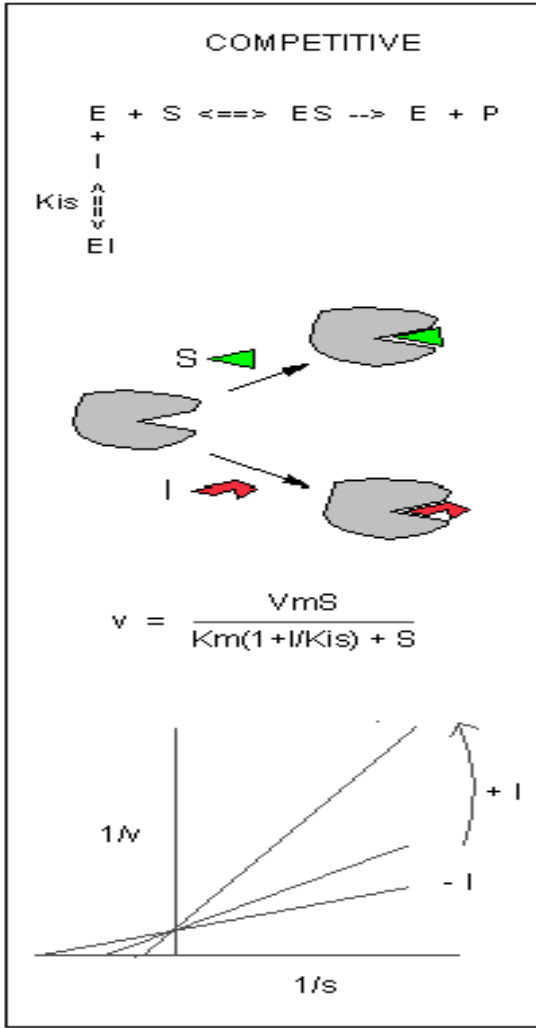
İki tip inhibisyon vardır, birincisi tersinir (geri dönüşümlü) inhibisyon, ikincisi tersinmez (geri dönüşümsüz) inhibisyonudur [7]. Tersinmez inhibisyonda, inhibitör aktif merkeze kovalent olarak bağlanarak enzimi inaktive eder. Tersinmez inhibisyonlara örnek olarak, aktif merkezlerinde serin bulunan enzimlerin diizopropilflorofosfat tarafından inaktivasyonları verilebilir. Tersinir inhibisyonda ise inhibitör enzimle veya enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanır [8]. Üç çeşit tersinir inhibisyon türü vardır.

Bunlar;

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

2.1.3.1. Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)

Bu tür inhibisyon yapı bakımından substrata benzeyen maddeler tarafından yapılır. İnhibitör aktif merkeze bağlanarak enzim-inhibitör kompleksini oluşturur. Bu kompleks ürüne dönüşmeyeceğinden inhibitör bağlanmış olan enzim molekülleri boşa harcanmış olur. Fakat substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken K_m değeri artar.

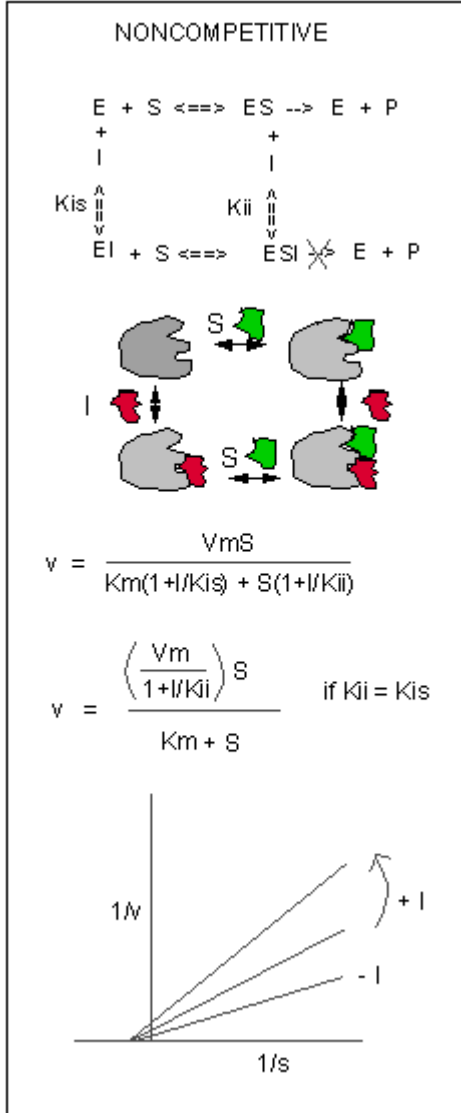


Şekil 2.3. Yarışmalı (kompetitif) enzim inhibisyonu [9].

2.1.3.2. Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)

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

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



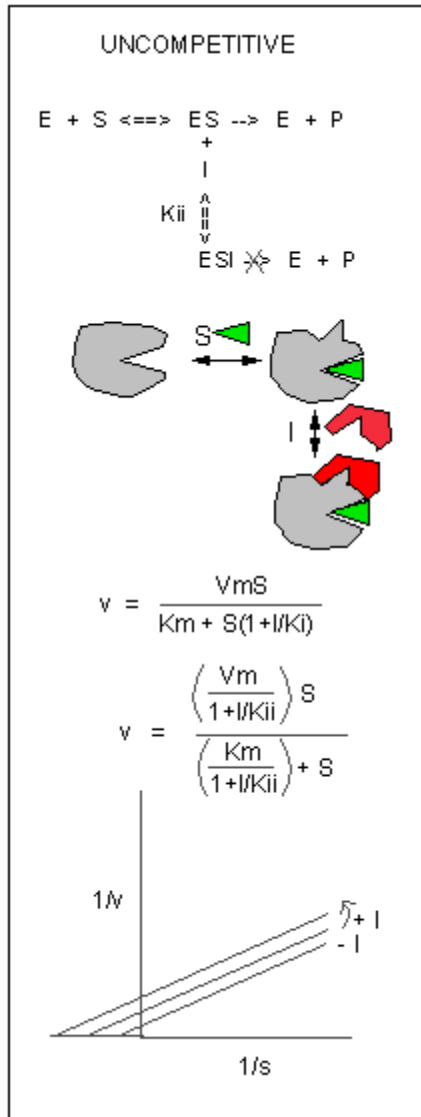
Şekil 2.4. Yarışmasız (nonkompetitif) enzim inhibisyonu [9].

2.1.3.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (ankompetitif)

Bir enzime bir ankompetitif inhibitörün bağlanması sonucu meydana gelen enzim inhibisyonudur. Ankompetitif inhibitör, nonkompetitif inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde

ankompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine reversibl bağlanarak enzimi inaktive eder.

Ankompetitif inhibitör, ES konsantrasyonunu azaltır. Ankompetitif inhibisyon sonucu hem V_{\max} hem K_m değeri değişmektedir; V_{\max} değeri azalırken K_m değeri küçülür.



Şekil 2.5. Yarı Yarışmalı (unkompetitif) enzim inhibisyonu [9].

2.1.4. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları

Birçok enzim, substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna “az” son eki ekleyerek adlandırılır.

Zamanla bu adlandırmalarda karışıklıklar söz konusu olduğundan ve yeni keşfedilen birçok enzimlerin sürekli artan sayısı nedeniyle, uluslararası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem benimsenmiştir.

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

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar

2.2. Serbest Radikaller

Yaşamın sürdürülmesinde büyük öneme sahip kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri olarak ifade edilen ara maddeler oluşur. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamı oksidan madde veya serbest radikal olarak tanımlanmaktadır.

Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir [10,11]. Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşur, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksikite ortaya çıkmaz. Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları, mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin

metabolizması, doğal uyarılarla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır [12,13].

Serbest radikal düzeyinin organizmada belirli bir denge içerisinde olması gerekir. Serbest radikal dengesi hücresel veya biyolojik kaynaklı olarak bozulabilir. Bu durumda, vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan ve antioksidan adı verilen maddeler, serbest radikalleri nötralize ederek organizmanın onlardan etkilenmemesini sağlamaktadırlar [2].

Serbest radikaller etkilediği atomun dolayısıyla o atomun bulunduğu maddenin görevini yapamamasına sebep olur. Sonuç olarak, etkilenen maddenin biyolojik önemine ve onun tamir edilip edilememesine bağlı olarak önemli veya önemsiz kalıcı veya geçici etkiler gösterir. Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir [14].

Birçok biyolojik sistemdeki önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler; oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları, nitrik oksit ve hidroksil radikalidir. Bu radikaller arasından süperoksit ve nitrik oksit enzimatik reaksiyonlarda devamlı olarak üretilen radikal türleridir. Bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

Serbest radikal türlerinin düşük seviyeleri hücre farklılaşmasında ve hücre gelişiminin durdurulmasındaki molekül içi ilettime sahip çoğu biyokimyasal süreçlerde, bağışıklıkta ve mikroorganizmalara karşı savunmada vazgeçilmezdir [14,15]. Bunun aksine reaktif oksijen türlerinin yüksek dozları ya da uzaklaştırılma yetersizliği, şiddetli metabolik bozukluklara sebep olabildiği gibi biyolojik makromoleküllere de zarar verebilen oksidatif strese yol açabilir [16,17].

Tablo 2.1 Reaktif oksijen türleri [18]

Radikaller	Formülü	Radikal olmayanlar	Formülü
Süperoksit anyon radikali	(O ₂ ⁻)	Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali	(HO [•])	Lipid hidroperoksit	(LOOH)
Peroksil radikali	(ROO [•])	Hipohalöz asid	(HOX)
Alkoksil radikali	(RO [•])	N-Halojenli aminler	(R-NH-X)
Semikinon radikali	(HQ [•])	Singlet oksijen	(¹ O ₂) ₂
Organik radikaller	(R [•])	Ozon	(O ₃)
Organik peroksit radikali	(RCOO [•])	Azot dioksit	(NO ₂)
Nitrik oksid radikali	(NO [•])	Hipokloröz asid	(HOCl)
Hemoproteine bağlı radikaller		Peroksinitrit	(ONOO ⁻)

Canlılardaki elektron akışı serbest enerjinin elde edildiği birçok basamağı takip eder ve son olarak bu akış oksidatif fosforilasyonda O₂ molekülünde durur. Çünkü indirgenme potansiyeli daha yüksek bir bileşiğin ortamda mevcudiyeti söz konusu değildir. Problemsiz işleyen bir sistemde O₂ suya kadar indirgenir [19].

Canlılarda oluşan ilk ve temel oksijen radikali süperoksit radikalidir (Süperoksit Anyonu, O₂^{-•}).



Moleküler oksijen (O₂) diradikal olarak tanımlanmıştır. Moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle O₂^{-•}'i oluşturur. İkinci elektronun indirgenmesiyle, daha sonra H₂O₂'yi oluşturacak olan peroksit radikali oluşur. Üçüncü elektron, Fe'in katalizlediği fenton reaksiyonu sonucunda, O₂^{-•} ile H₂O₂'nin reaksiyona girip OH^{-•}'i oluşturduğu sırada indirgenir.



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

hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar.

En etkili radikal hidroksil radikali olup bunun nedeni hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesidir. Diğer bir önemli radikal olan singlet oksijeninin ise yarı ömrü kısadır ve son yörüngesindeki paylaşılmamış elektronun bir üst enerji seviyesine çıkması sonucunda oluşur [19]. Reaktif bir tür olan H_2O_2 suda rahatlıkla çözünebilir ve mekanizması bilinmemesine rağmen hücre membranından su gibi kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Genellikle $50 \mu M$ ve üzeri konsantrasyonlardaki H_2O_2 , muamele süresine ve fizyolojik şartlara bağlı olmakla beraber birçok hayvan, bitki ve bakteri hücre kültürü üzerine toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple H_2O_2 'in *in vivo* olarak çok toksik olduğu ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu da katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından yapılmaktadır.

2.3. Antioksidan Enzimler

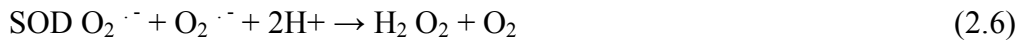
Enzimler çok yüksek katalizleme gücüne sahip protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bir canlıdaki parçalanma ve yapım (sentez) reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu tanıma göre de, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem maddelerdir. Canlı dışında da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha artırmaktadır.

Bugün enzimler gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım, veterinerlik ve tekstil endüstrisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT)'dir. Ve bu endojen antioksidan enzimler serbest radikalleri zararsız hale getirirler. Böylece organizma serbest radikaller ve aktif oksijen türlerinden etkilenmez [5].

2.3.1.Süperoksit Dismutaz

Süperoksit Dismutaz enzimi (superoxide oxido reductase, EC 1.15.1.1) oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir savunmadır. Süperoksit dismutaz'ın fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H₂O₂ ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir [21, 22, 23, 24].



Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

(a) Bakır ve Çinko içeren dismutazlar (Cu, Zn SOD) genel olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve kloroplastlarda bulunur. Tek disülfid bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerirler. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko; Co²⁺, Hg²⁺, Ca²⁺ ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başlar.

(b) Mangan içeren dismutazlar (Mn SOD) prokaryotlarda ve mitokondri matriksinde bulunur. Birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır.

(c) Demir içeren dismutazlar (Fe SOD) prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn süperoksit dismutaza benzer yapıdadır.

2.3.2. Peroksidaz Enzimi

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

Bitki peroksidaz üst familyası üç sınıfa ayrılabilir:

- 1.sınıf peroksidazlar prokaryot kaynağının hücre içi peroksidazlarıdır,
- 2.sınıf peroksidazlar mantarimsı peroksidazlardan meydana gelir,
- 3.sınıf peroksidazlar ise daha yüksek bitki peroksidazlarıdır [21].

Organizmalarda geniş bir yayılımı olan peroksidaz çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Bitkilerde bulunan peroksidaz, bayırturpu kökü, ıspanak yaprakları, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı hücrelerinden saflaştırılmaktadır [22].

Birçok yüksek bitkiler birkaç peroksidaz (Prx) izozimlerine sahiptirler. İzoelektrik noktaları üzerinde temellendirilen peroksidazlar anyonik, nötral ve katyonik olmak üzere üç alt grupta sınıflandırılırlar [21].

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

- Mantar, bitki ve bakteri peroksidazları,
- Hayvan peroksidazlarıdır [21].

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7) oksidant olarak organik hidroperoksitleri ya da hidrojen peroksitleri kullanırlar [23]. Peroksidazlar, hidrojen peroksiti kullanarak çoğu organik ve inorganik substratların bir elektron oksidasyonunu katalize etmesi heme protein enzimlere bağlıdır. Peroksidazlar hücre duvarı bileşenleri formlarına iyonik ya da kovalent olarak bağlı olup bitki hücreleri içinde mevcuttur. Bu enzimler, hücre duvar-bağı peroksidazı ile hücre uzaması, odunlaştırma prosesi ve bitki savunma mekanizmaları gibi çeşitli proseslerde bulunan yüksek bitkilerde yaygındır [24]. Bu enzimler hücre içi boşluklarda, hücre içi cisimciğinde, plazmada ve hücre duvarının içinde ve dışında bulunabilir. Bu enzimler bitki hücre bölmelerinde birkaç izoenzimin varlığı yoluyla belirtilmiş çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Peroksidazlar bitki hormon düzenlemesinde, savunma mekanizmasında, hücre uzamasının

kontrolünde, uzamanın polimerizasyonunda, hücre duvarı polisakkaritlerinin çapraz bağlantısında ve lignin biyosentezlerinde bulunmaktadır [25].

2.4.Karahindiba (*Taraxacum officinale*)

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

Karahindiba papatyagiller (*Asteraceae*) familyasından yaygın bir bitki türüdür. Çiçekleri sarı, yaprakları yeşil olsa da bitkinin adına "karahindiba" denilmiştir. Karahindiba Nisan ve Mayıs aylarında tüm tarla kıyılarında çayırılık alanlarla yol kenarlarında yetişen, çok yıllık sarı çiçekli otsu bir bitkidir [26].

Avrupa’nın bazı ülkelerinde ve Hindistan’da tarımı yapılan türleri vardır ve bunların çiçek büyüklüklerinin çapı yedi santimetreye kadar varır.

2.4.1.Tarihçesi

Mısır ve Kıpçak Türklerinin katagan, Çağatay Türklerinin saçratku olarak bildikleri bu bitki günümüze karahindiba olarak gelmiştir. Hindiba Arapça kökenli bir kelimedir. Tedavisi için kullanıldığı göz hastalığı trahomdan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Anadolu da acıgıcı, acıgüyek, güneşik ve arslanışi olarak bilinse de en yaygın olarak kullanılan adı radika’dır [26].

2.4.2. Kimyasal özellikleri

Besleyici değeri oldukça yüksek olan karahindiba, %5’e varan yüksek oranda potasyum içermesinden dolayı, en iyi doğal potasyum kaynaklarından biridir. A vitamini C vitamini ve nikotinik asit ile kalsiyum ve türlü mineraller yönünden de zengindir. Ayrıca, torexacin, retinol, levulin, inulin gibi bileşikler içerir. Bu nedenle yaprakları salatalara katılıp yenir. Kökünde yaşken doğranıp salatalara katılır. Kurutulan kökü birçok ülkede öğütülüp acı hindiba kahvesi olarak içilir.

2.4.3.Tıbbi etkileri

Karahindiba, çiğ yenildiğinde veya kurutulup çay biçiminde kullanıldığında, kan temizleyici, sindirim kolaylaştırıcı, ter ve idrar söktürücü ve canlandırıcı etkilere sahiptir.

Pankreas üzerine olumlu etkisi vardır ve böbreklerin çalışmasında aktif rol oynar. Karahindiba kanı inceltir ve kanın koyu olması halinde başarıyla kullanılabilir. Ergenlik sivilceleri ısırgan otunun ve karahindibanın kan temizleyici özellikleri sayesinde iyileştirilebilirler. Karahindiba, öncelikle böbreklerin ve karaciğerin fonksiyonlarını destekleyici bir bitkidir.

Potasyum kaybına yol açmayan bir idrar söktürücüdür. Katılgan dokuyu (bağdoku) olumlu etkileyerek, yeterli oranda kanın tüm hücrelere ulaşabilmesine yardımcı olur. Gücsüz ve bitkin kişilere güç kazandırır [26].

Karahindiba, içerdiği mineral tuzların yanı sıra, metabolizma hastalıklarına karşı çok önemli maddeleri de içerir.

Sarılık ve dalak hastalıklarında da karahindiba başarıyla kullanılabilir. Kan temizleyici etkisi sayesinde, romatizma ve gut hastalıklarında da yardımcı olabilir.

Kara Hindiba, safra kesesi ve karaciğer hastalıklarında oldukça yardımcıdır. Karaciğeri en olumlu etkileyebilen bitkilerden biridir. Taze olarak yenilen 5-6 çiçek sapı, kronik karaciğer iltihaplarında ve karaciğer yağlanmasında iyileşme sağlayabilir. Taze çiçek sapsarı karaciğer ve safrakesesinin çalışmalarını düzenler. Bu sapsarı şeker hastalığına da iyi gelebilir. Karahindiba sapsarı daha başka hastalıklarda da yardımcı olurlar. Deri kaşıntılarını, egzamaları ve temriyeleri iyileştirebilirler. Mide sıvılarını düzene sokar ve mideyi atık maddelerden temizler. Bu değerli bitki eskiden beri çok önemli bir yere sahip olmasına rağmen ne yazık ki, pek çok kişi tarafından tanınmaz ve zararlı bir ot olarak bilinir.

2.5. Kaynak Özetleri

Belcarz ve arkadaşları (2008) peroksidaz enzimini lahanadan kısmen saflaştırmış ve izole etmiştir. POD için optimum pH 6,0 bulunmuştur. POD için optimal sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur. Peroksidazlar 4 °C'de 4 hafta depolanma süresince tamamıyla aktivite göstermiştir. Kinetik çalışmalar gösterir ki, ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM) ve o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM)'e ait K_m değerleri için guaiacol (6,41 ve 13,89 mM)'den daha düşük değerlere sahiptir [24].

Vitali ve arkadaşları (1998) yabancı sinamekinden bir peroksidazı (EC 1.11.1.7) 29 günde toplanmış kültür ortamından saflaştırmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE yoluyla yaklaşık olarak 43 kDa, jel filitrasyonu ile 50 kDa olarak bulunmuştur. Peroksidaz kafeik asit, ferulik asit ve guaiakol gibi doğal fenoliklere ve alkola karşı yüksek bir spesifikle karakterize edilmiştir. Bu enzim hücre duvarının odunlaşma proseslerinde bulunduğu belirlenmiştir [25].

Fortea ve arkadaşları (2009) peroksidaz enzimini Triton X-114 kullanılarak bir masa üzümünden ekstrakte ederek spektrofotometrik metodlar yardımıyla karakterize etmişlerdir. Peroksidaz asit şokuyla etkinleştirilmiştir. Fakat anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında POD inaktifleştirilmiştir. Peroksidaz enzimi izlenen Michaelis–Menten kinetikleri yoluyla karakterize edilmiştir. Peroksidaz enzimi için K_m ve V_m değerleri ABTS için sırasıyla 0,79 mM ve 1,20 mM / dk olarak bulunmuştur. Hidrojen peroksit için bu değerler sırasıyla 0,4 mM ve 0,93 mM / dk olarak bulunmuştur. POD enzimi, 75 °C'de 5 dakika boyunca bekletildikten sonra bağıl aktivite kaybı % 90'dan büyük olduğu görülmüştür. Ayrıca POD enziminin aktivasyon enerjisi 271,9 kJ / mol olarak bulunmuştur [27].

Serrano Martinez ve arkadaşları (2008) kırmızı tatlı biberden elde ettikleri peroksidaz (POD) enzimini, % 30 ve % 80 arasında amonyum sülfat fraksiyonu ve Triton X-114 ile ayrılan fazın bir kombinasyonunu kullanarak kısmen saflaştırmıştır. H-donörü olarak ABTS kullanılarak optimum aktivite pH 4,5 olarak elde edilmiş ve görünen V_m ve K_m parametreleri hem ABTS hem de H_2O_2 için sırasıyla 0,495 ve 1,32 mM olarak bulunmuştur. Bir kaç indirgeyici etkenin etkisi çalışılmış ve askorbik asit

en aktif etken olarak belirlenmiştir. Termal inaktivasyon çalışması inaktivasyon kinetiği için bir ilki göstermiş ve Arrhenius çizimi 151 kJ / mol değerinde bir inaktivasyon enerjisine eşdeğer bir eğim ile düz bir çizgi vermiştir. Kayda değer inaktivasyon, 40 °C'den yüksek sıcaklıklarda meydana geldiği görülmüştür [28].

Manu ve arkadaşları (2009) peroksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişimi, anyon değişimi ve jel filitasyon kromatografisi yoluyla buğday öğütme endüstrisinin ürettiği buğday kepeğinden saflaştırmıştır. Glikoprotein olan bu enzimin molekül ağırlığı 44 kDa, optimum pH'ı 4,8 ve karbonhidrat içeriği % 13.8 olarak bulunmuştur. Saflaştırma süresince kalsiyumun katılımı enzim verimini ve spesifik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Kalsiyum varlığında saflaştırılmış enzim artan bir termal kararlılık göstermiştir. Kalsiyum ilavesinde triptofan floresanslığında değişim gözlenmemiştir fakat 403 nm'de heme Emilimi, heme çevresinde bir değişim gösteren bir değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Kalsiyum buğday kepeği peroksidazının heme yapısı, enzimatik aktiviteyi ve termal kararlılığı korumak için esas olduğu belirtilmiştir [29].

Jacques R.Vanfleteren, (1992) İplik kurdu (*Caenorhabditis Elegans*) dokusundan Cu, Zn-Süperoksit Dismutaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzim aktivitesi 2660 U/mg protein, moleküler ağırlığında 37,5-40 kDa aralığında olduğu saptanmıştır.

Malgorzata M. ve ark. (2005), Dondurulmuş soya fasülyesi filizlerindeki antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. 1°C ye soğutulmuş filizlerde ki CAT ve SOD aktivitelerinin 25°C dekine göre arttığı gözlenmiştir [30].

Yurdanur Bozdemir (2007), keten tohumu ekstraktında, antioksidan enzimler olan, katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivite gösterdikleri saptanmıştır. PD 10 kolon kromatografisi (Sephadex G-25M) ile yapılan çalışmalarda alınan eluatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler bir araya toplanmış; katalaz enziminin spesifik aktivitesi 17,56 U/mg protein, süperoksit dismutaz enziminin spesifik aktivitesi 4,90 U/mg protein olarak bulunmuştur [31].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler

Bu çalışmada kaynak bitki olarak kullanılan karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisi Sakarya bölgesinden toplanılmış olup bitkinin yaprak kısımları POD enziminin izolasyonu için kullanılmıştır.

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

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

3.2. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu

Dondurucuda depolanmış karahindiba bitkisinden 8 gram alınarak ince ince doğranmıştır. % 0,5 polivinil pirolidon (PVP), % 4 triton-x 100 ve 0,001 M askorbik asit içeren 40 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti blender da 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Bu karışım ham enzim ekstratı olarak adlandırılmıştır.

3.3. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu

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

3.3.1. Substrat spesifikliği

Optimum substratı belirleyebilmek amacı ile POD enziminin 10 farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, gallik asit, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin substrat olarak kullanılmıştır.

3.3.2. Optimum substrat konsantrasyonu

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

3.3.3. pH etkisi

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

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

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

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

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

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

Tablo 3.1. 0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması

PH	A (ml)	B (ml)
3,6	35	20
4,0	25	10
4,5	25	27
5,0	15	20
5,5	10	25

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

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

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

Tablo 3.2. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması

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

3.3.4. Sıcaklığın etkisi

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

3.3.5. Enzim kinetiği

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

3.3.6. İnhibitör etkisi

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

Yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin yapmış olduğu inhibisyon etkilerini tespit etmek amacıyla 3 mM'lık sabit substrat konsantrasyonunda bir aktivite tayini baz alınarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör aktiviteleri tayin edilmiş ve % olarak hesaplanarak her bir inhibitör için % Bağlı Aktivite - $[I]$ grafikleri çizilmiştir. Bu

aktivite tayinleri 4-metil katekol substratı eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen grafiklerden enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu olan I_{50} değerleri hesaplanmıştır. K_i değerlerini hesaplamak amacıyla da her bir inhibitör için ilk aşamada inhibitörsüz olmak üzere farklı konsantrasyonlarda aktivite tayinleri yapılmıştır. Buna karşılık inhibisyon aktivite tayinleri için I_{50} değerlerinden faydalanarak inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu inhibitör konsantrasyonları sabit tutularak farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda $1/V$ 'ye karşılık $1/[S]$ grafikleri çizildi. Bu grafikler yardımıyla inhibisyon türü ve K_i değerleri hesaplandı. Hesaplanan K_i değerlerinin ortalamaları alınarak da her bir inhibitör için ortalama K_i değerleri hesaplanmıştır.

3.3.7. POD enziminin depolanma kararlılığı

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

3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin İzolasyonu

Dondurucuda depolanmış karahindiba bitkisinden 1,5 gram alınarak ince ince doğranmıştır. 0,1 mM Na_2EDTA içeren 50 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 7,6) ile hazırlanan çözelti blender da 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Homojenat 15000 RPM de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı enzim analizinde kullanılmıştır.

3.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD analizi için, 0,1 mM Na_2EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu (pH:7,6), 50 mM Na_2CO_3 (pH:10,2), 12 mM L-Methionin, 75 μ M Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 100 μ l enzim ekstraktı ve 10 μ M Riboflavin 10x100 mm'lik cam tüplerde hazırlanmıştır. Reaksiyon hacmi 3 ml'dir. Reaksiyon karışımları 12000 lux ışık

şiddetinde 15 dakika bekletilerek ışıklandırılmıştır. Ölçümler plastik küvetlerde 560 nm'de yapılmıştır. 1 birim SOD aktivitesi, 560 nm'de NBT'nin %50 indirgenmesine eşit olacak şekilde aşağıdaki formül uygulanarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{ABS2} - \text{ABS1}) / (\text{ABS2}) \times 20$$

ABS2: Enzim içermeyen reaksiyonun kör absorbansı

ABS1: Enzim içeren reaksiyonun absorbansı

3.5.1. pH etkisi

SOD enzimi aktivitesi 3,5 ile 9 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar kullanarak tayin edilmiştir. Aktivite tayinlerinde spektrofotometre 560 nm'ye ayarlanarak absorbans değerleri okunarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Sıcaklığın etkisi

SOD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0, 10, 20, 30, 40°C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Aktivite tayinlerinde yine spektrofotometre 560 nm'ye ayarlanarak absorbans değerleri okunarak hesaplanmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır.

3.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) enziminin depolanma kararlılığı

Enzimin oda sıcaklığındaki depolanma kararlılığını bulabilmek için oda sıcaklığında aktivitesindeki azalma belirli zaman aralıkları ile 560 nm'de absorbanslarına bakılmıştır ve absorbansları kaydedilmiştir.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR

4.1. Peroksidaz (POD) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması

POD enzimi izolasyonu, bölüm 3.2.'de anlatıldığı gibi % 0,5 polivinil piroolidon (PVP), % 4 triton-x 100 ve 0,001 M askorbik asit içeren 40 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak yapılmıştır. Bitki kaynağı olarak karahindiba bitkisinin yaprak kısmı izole edilmiştir. İzolasyon aşamasında kullanılan PVP, karahindiba bitkisinde bulunan fenolik maddeleri bağlayarak, POD enziminin aktivite göstermesini engellemek amacıyla kullanılmıştır. Çünkü fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonlar, enzimi inhibe edebilmektedir. Askorbik asit izolasyon sırasında oluşan o-kinonları azaltmak amacı ile kullanılmıştır ve kendisi yükseltgenir. Triton-x 100 ise bitkideki hücre duvarını parçalaması amacıyla izolasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

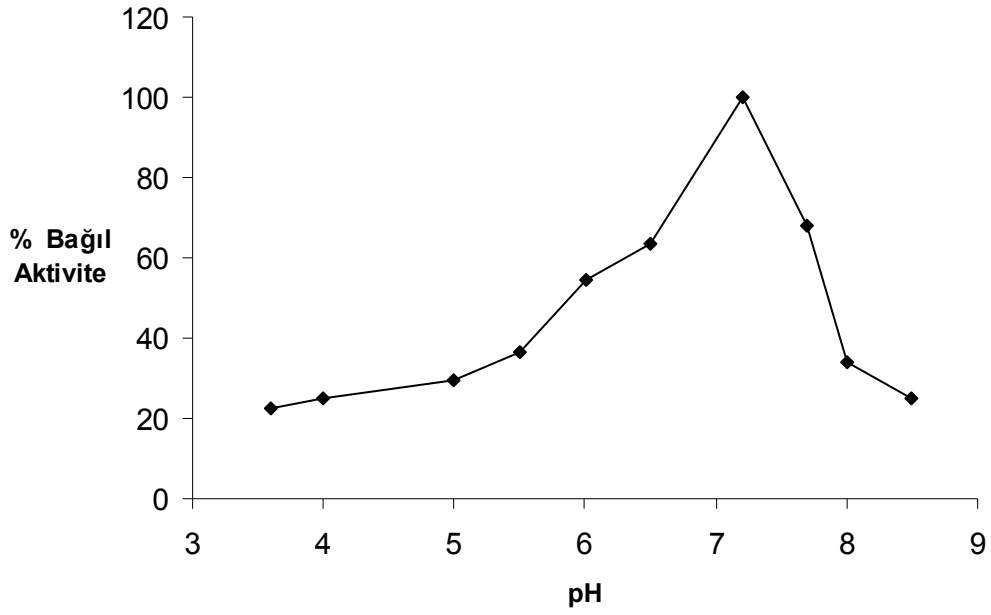
4.2. Peroksidaz (POD) Enziminin Karakterizasyonu

4.2.1. pH etkisi

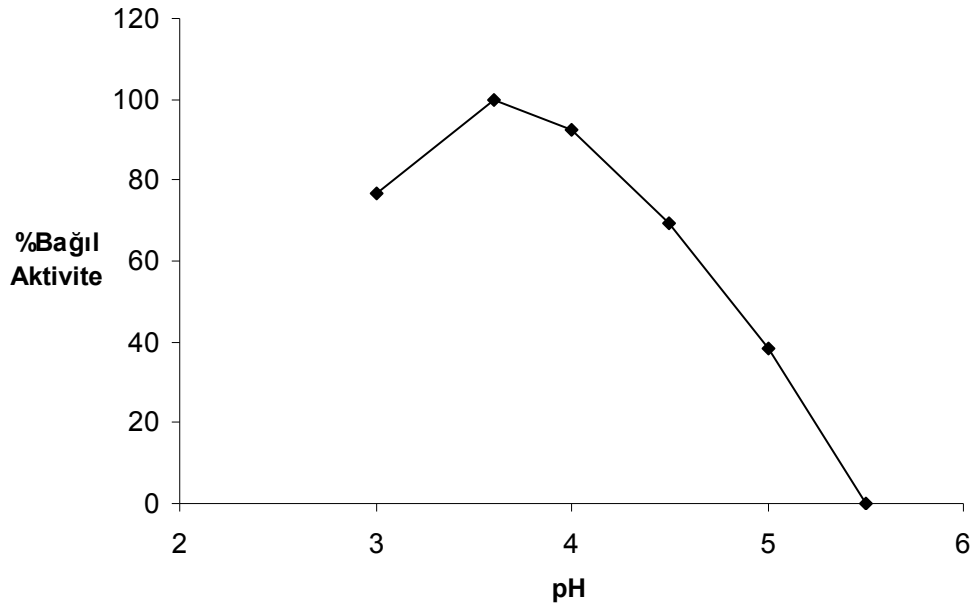
POD enzimi aktivitesi 3 ile 9,5 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile 9 farklı substrat kullanarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, guaiakol, gallik asit, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin) tayin edilmiştir. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik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

Bu çalışmada grafiklerden de görülebileceği gibi karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin her bir substrata karşı, optimum pH değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 7,2 (fosfat tamponu), ABTS için 3,6 (sitrat tamponu), guaiakol için 6,5 (fosfat tamponu), gallik asit için 6,5 (fosfat tamponu), kafeik asit için 6,5 (sitrat

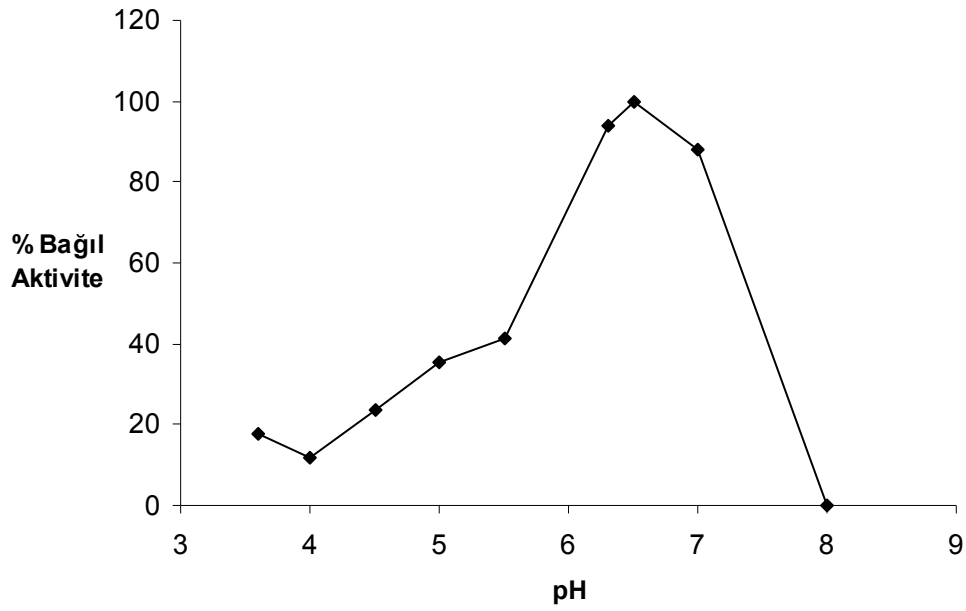
tamponu), o-dianisidin için 3,6 (sitrata tamponu), o-fenilen daimin için 5 (sitrata tamponu), progallol için 7,5 (fosfat tamponu) ve katekol için 7 (fosfat tamponu) olarak bulunmuştur.



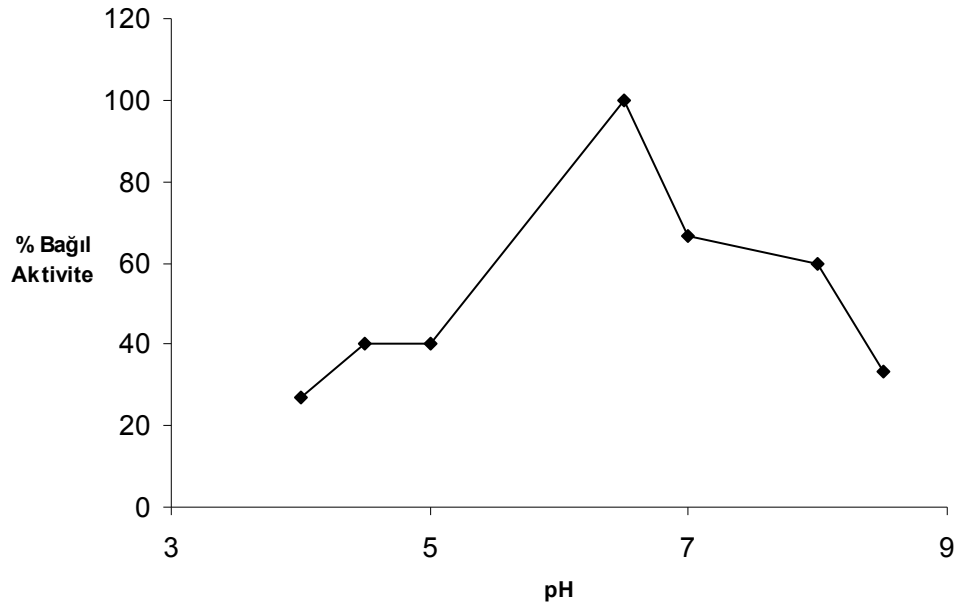
Şekil 4.1. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile optimum pH grafiği



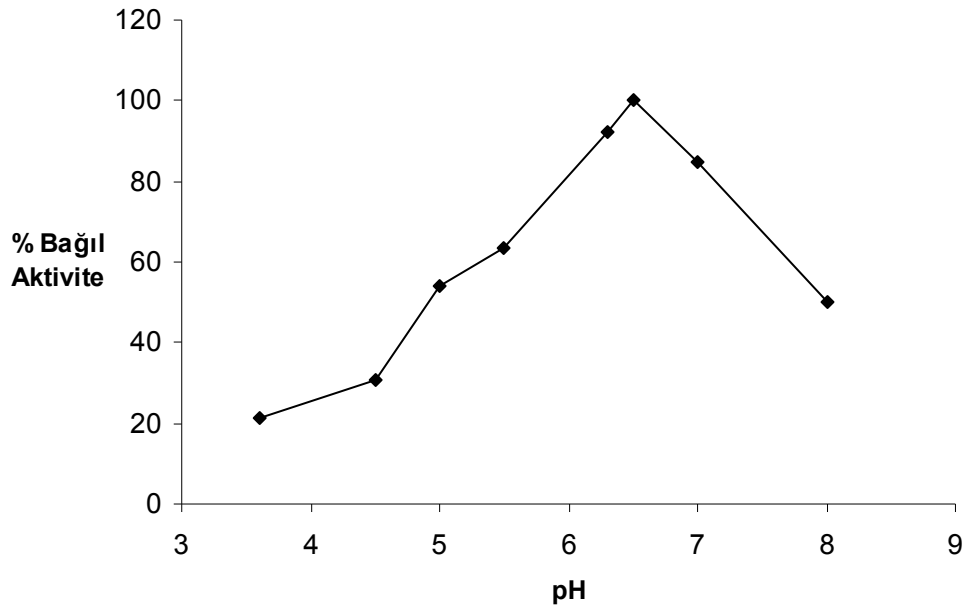
Şekil 4.2. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile optimum pH grafiği



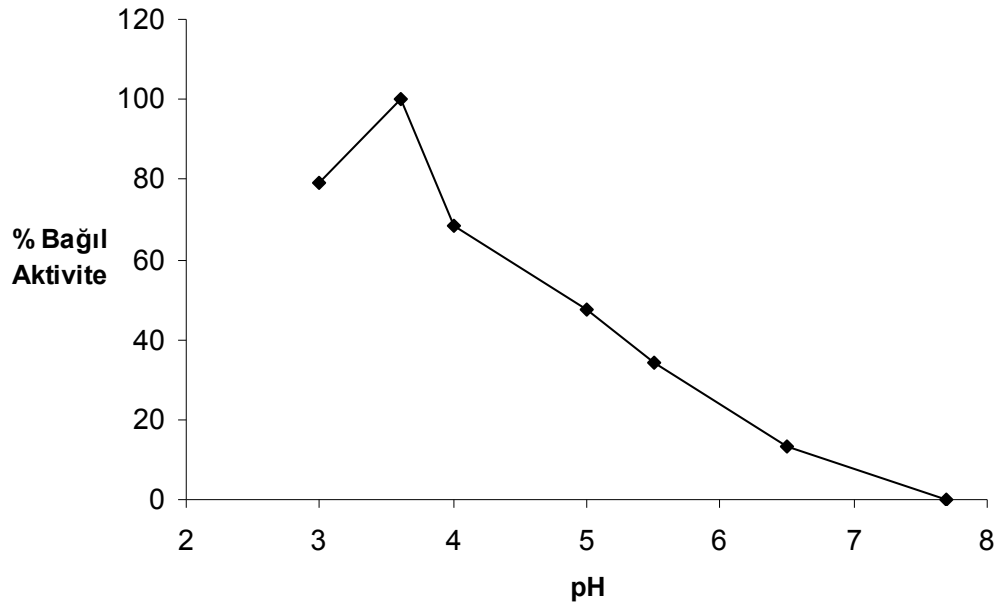
Şekil 4.3. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin gallik asit substratı ile optimum pH grafiği



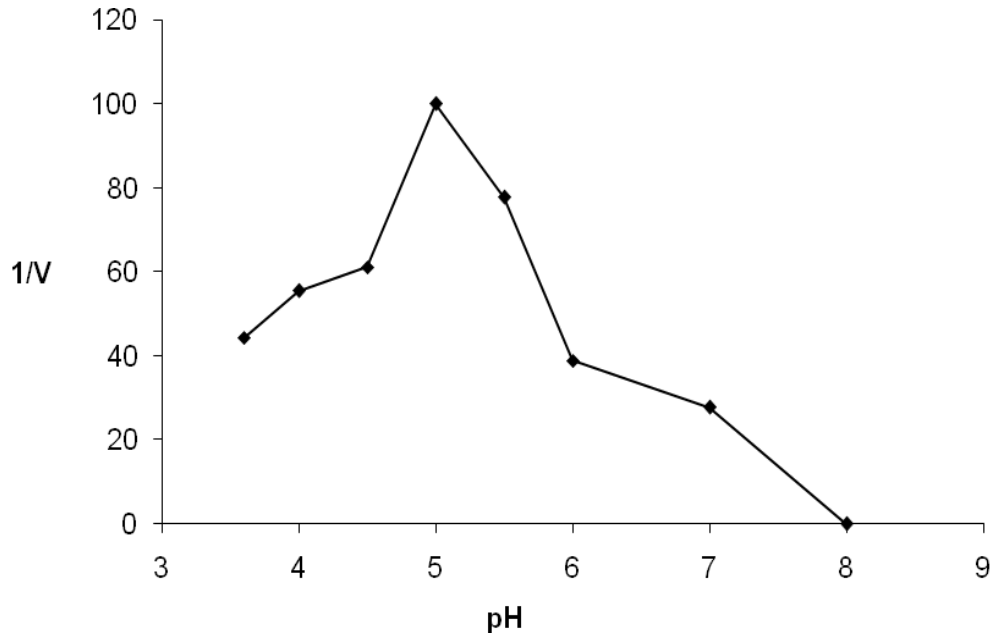
Şekil 4.4. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile optimum pH grafiği



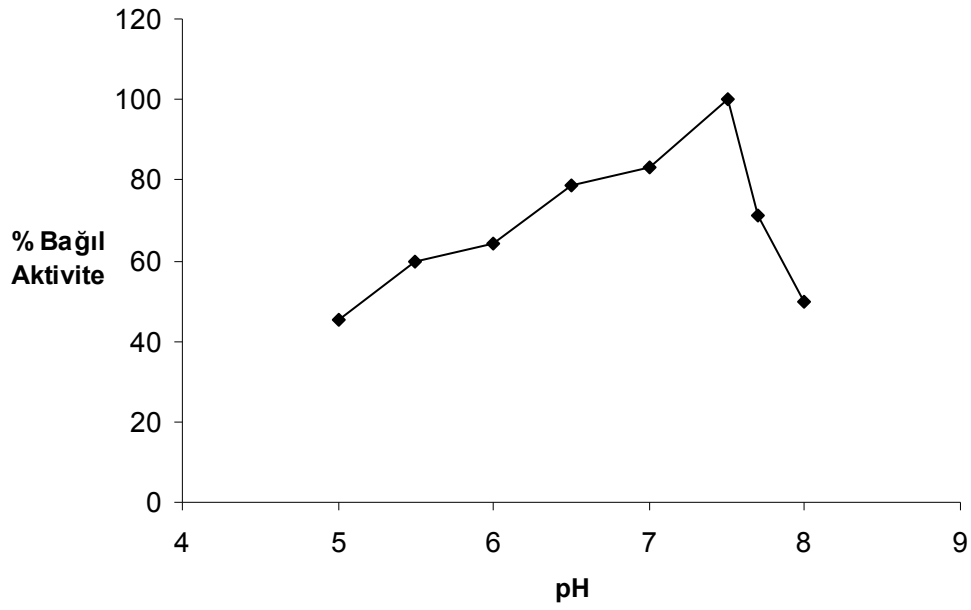
Şekil 4.5. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı ile optimum pH grafiği



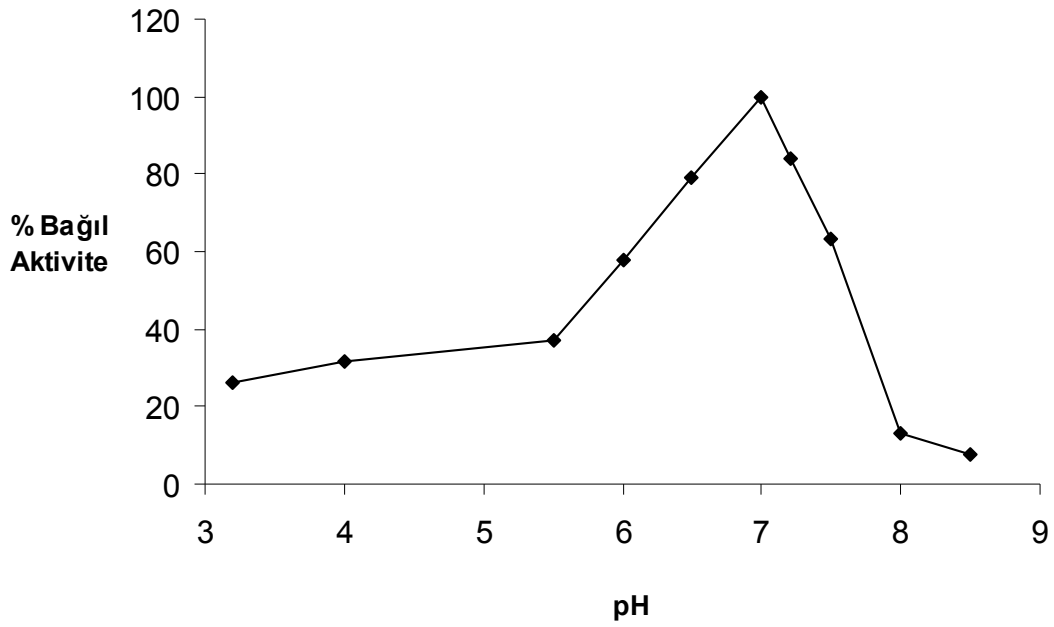
Şekil 4.6. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı ile optimum pH grafiği



Şekil 4.7. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı ile optimum pH grafiği



Şekil 4.8 Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı ile optimum pH grafiği

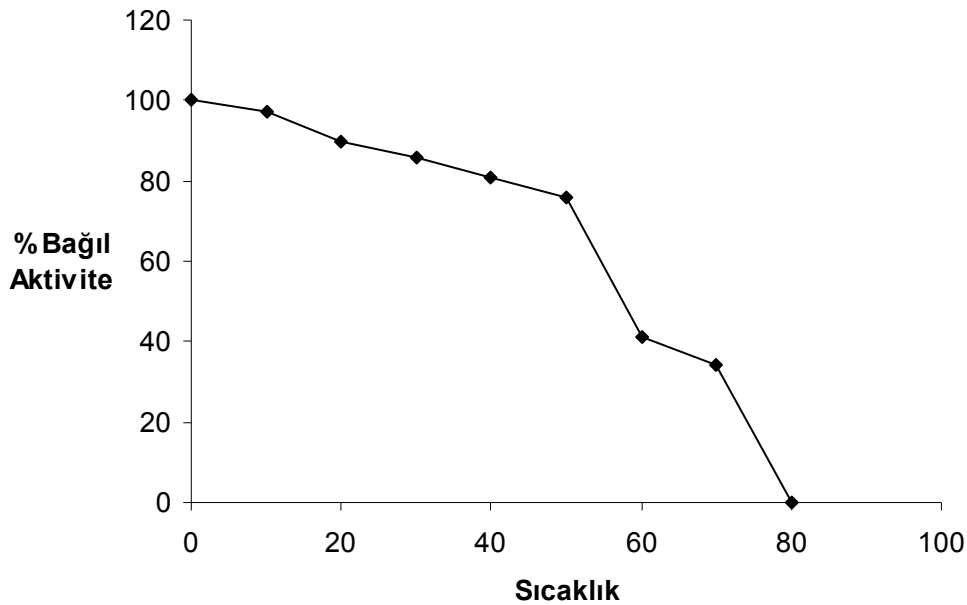


Şekil 4.9. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile optimum pH grafiği

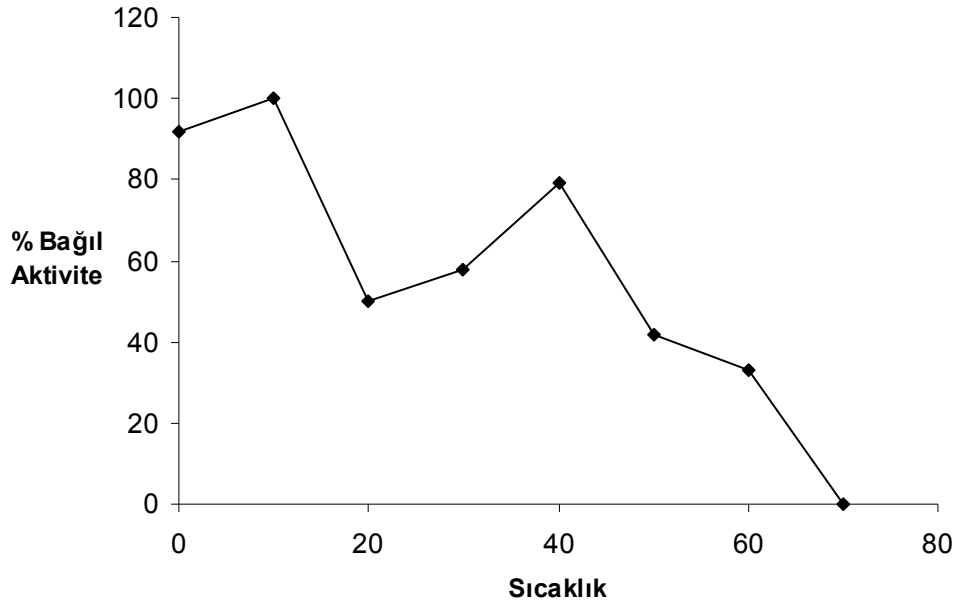
4.2.2. Sıcaklığın etkisi

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

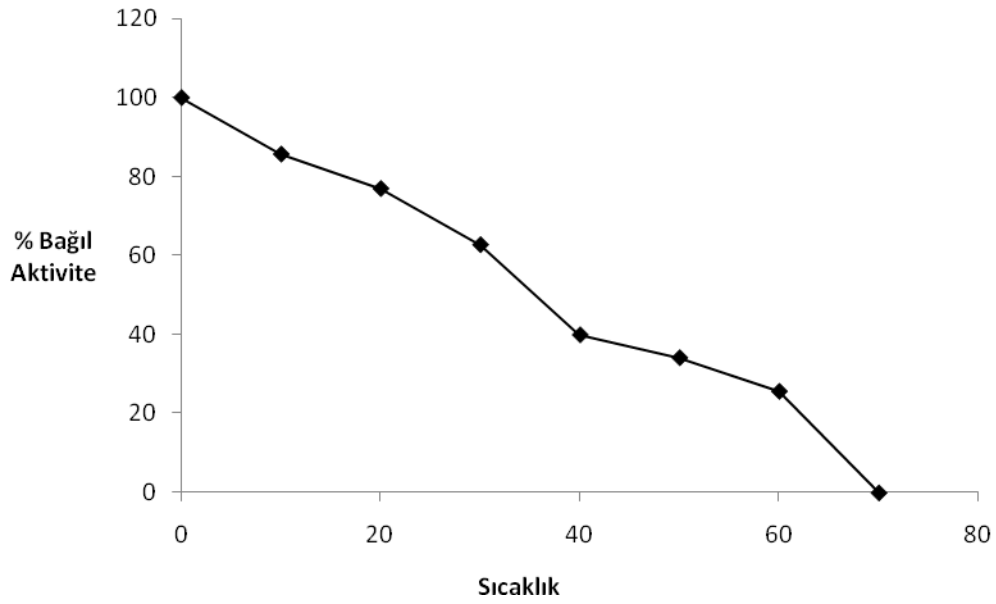
Aşağıda verilen grafikler incelendiğinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 30 – 40 °C (optimum sıcaklık) aralıklarında olduğu görülmüştür. Optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede azalma görülmektedir. Bu da enzimin sıcaklıkla kısmen inaktive olduğunu göstermektedir.



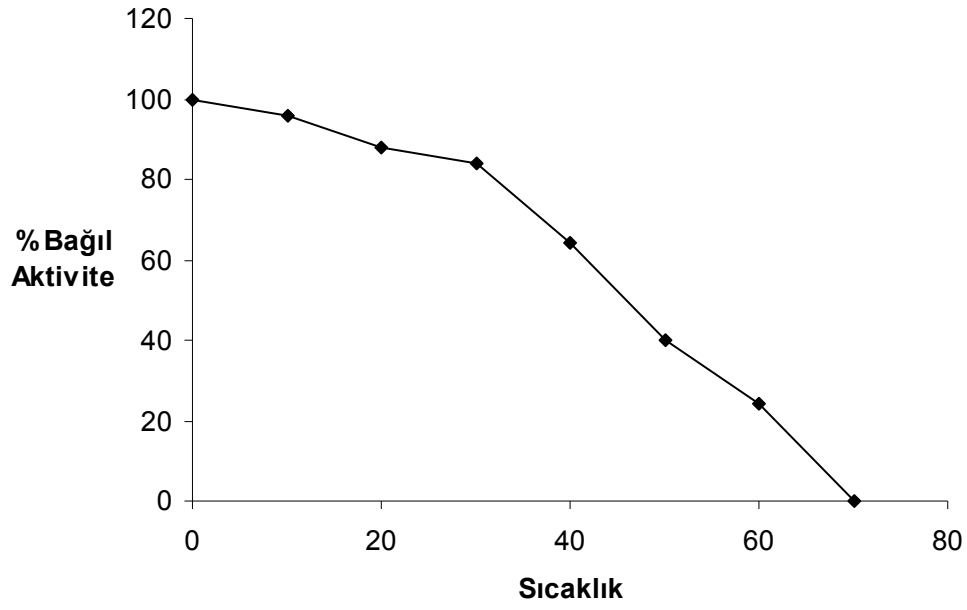
Şekil 4.10. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı ile optimum sıcaklık grafiği



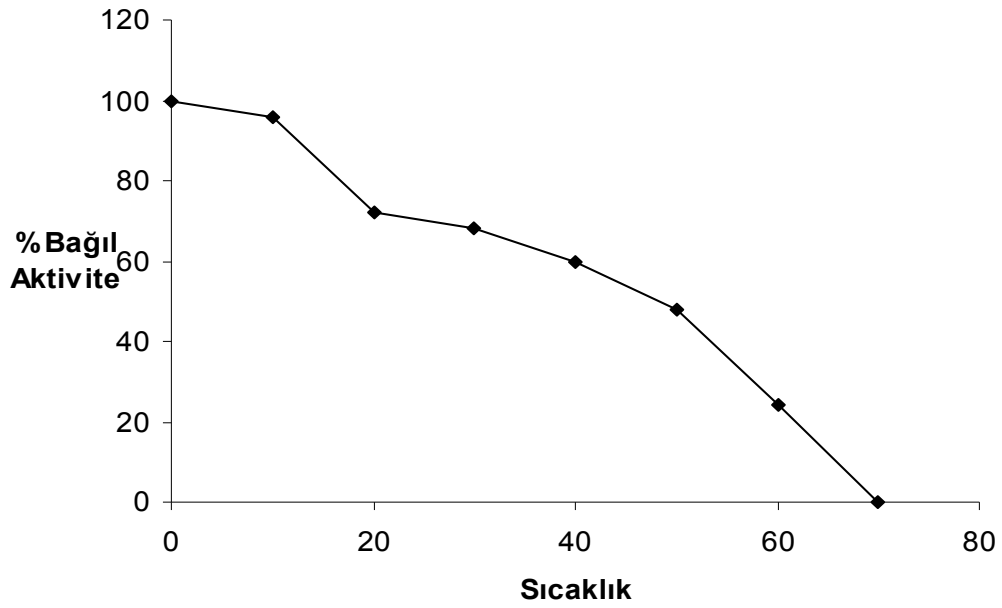
Şekil 4.11. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı ile optimum sıcaklık grafiği



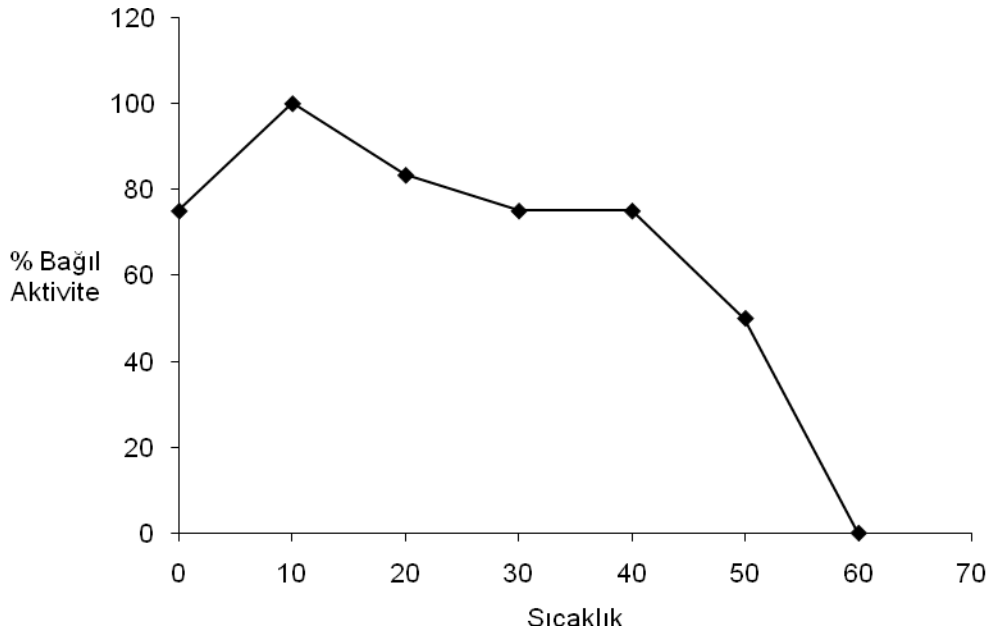
Şekil 4.12. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin gallik asit substratı ile optimum sıcaklık grafiği



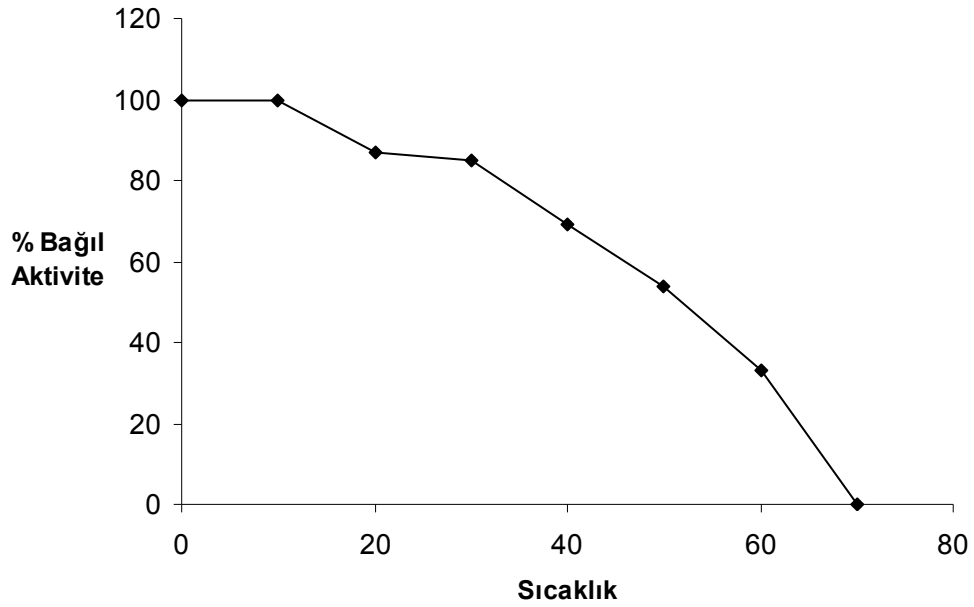
Şekil 4.13. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı ile optimum sıcaklık grafiği



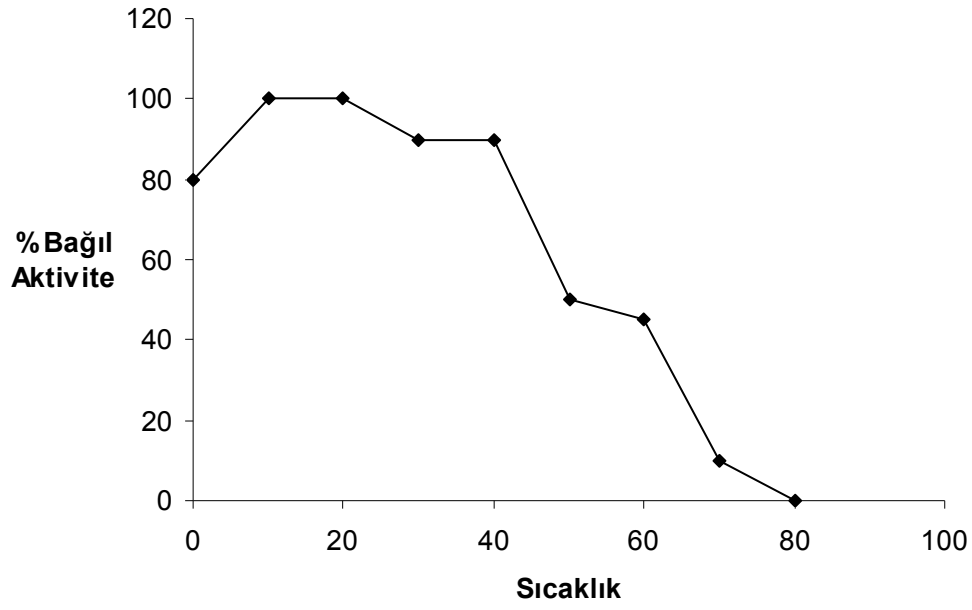
Şekil 4.14. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı ile optimum sıcaklık grafiği



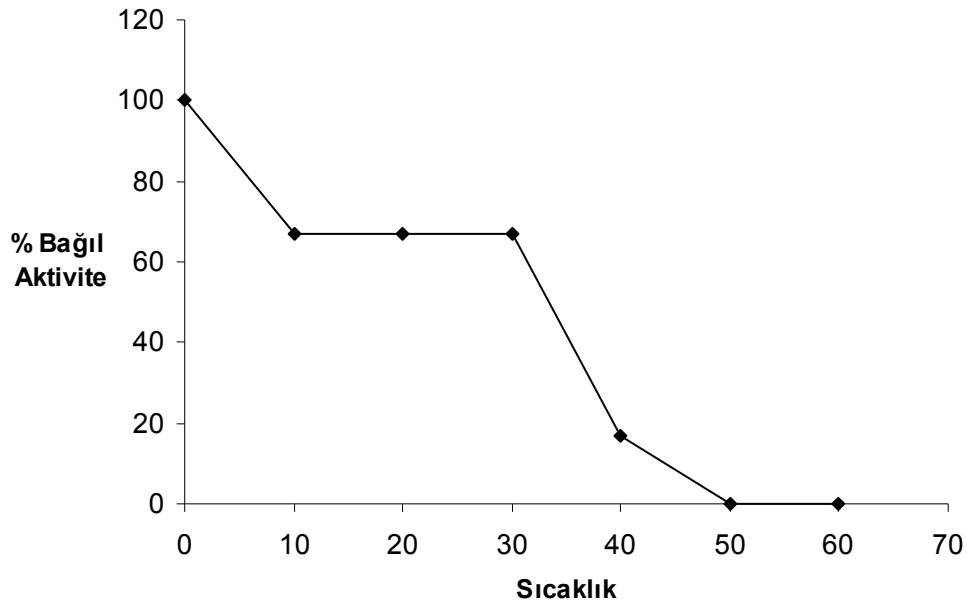
Şekil 4.15. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı ile optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.16. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-fenilen diamin substratı ile optimum sıcaklık grafiği



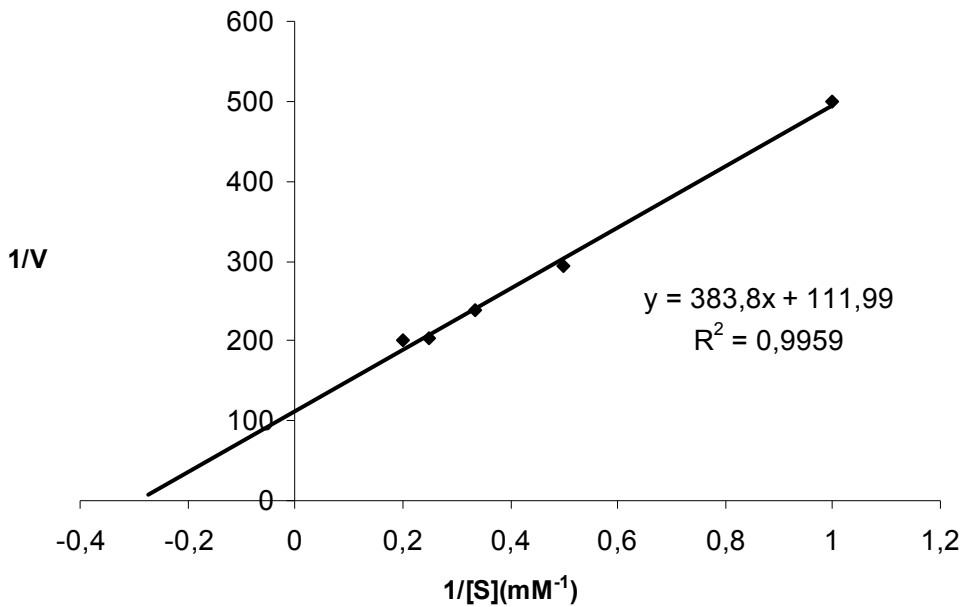
Şekil 4.17. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin progallol substratı ile optimum sıcaklık grafiği



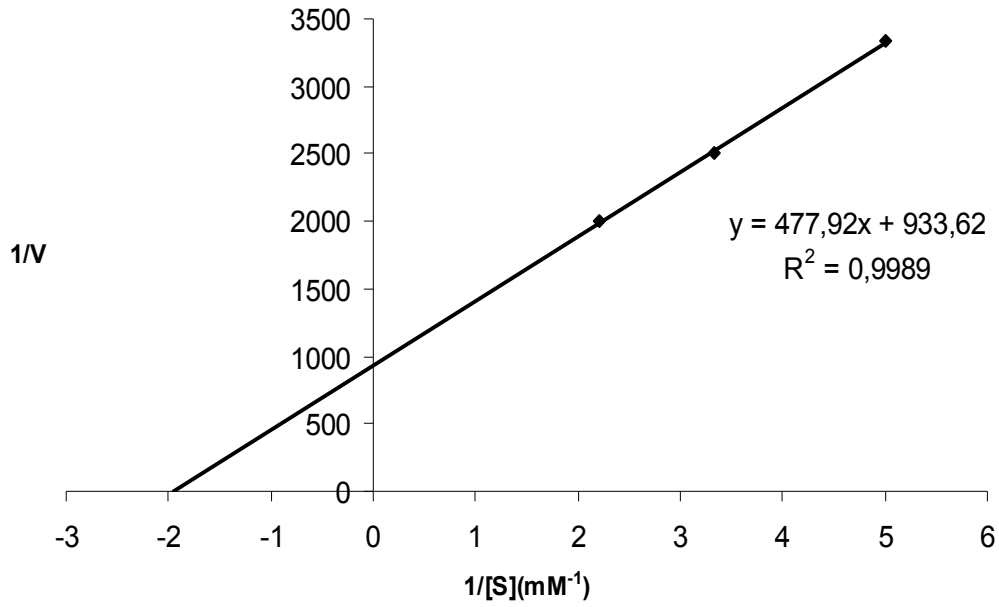
Şekil 4.18. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı ile optimum sıcaklık grafiği

4.2.3. Enzim kinetiği

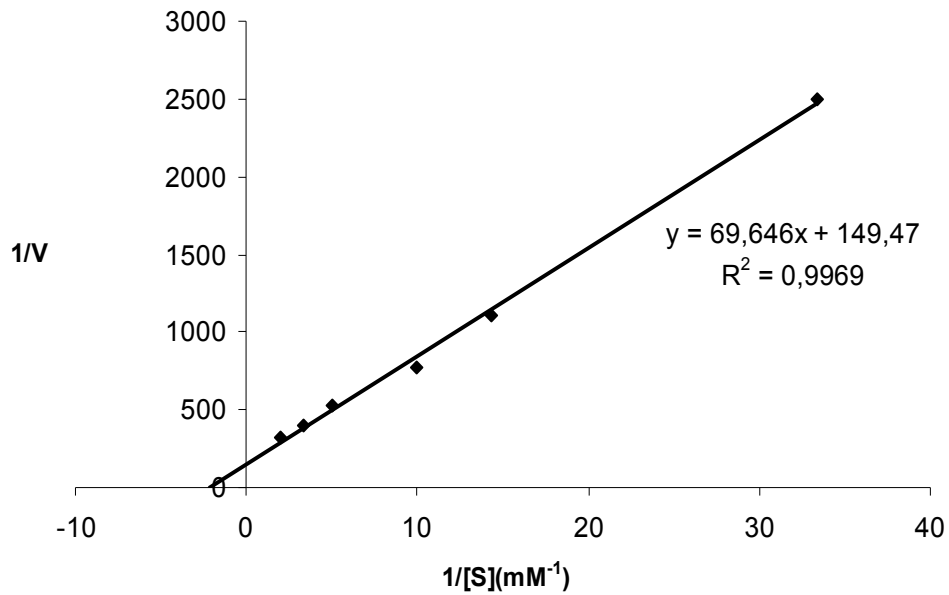
Kinetik çalışmalar 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, guaiakol, ABTS, hidrojen peroksit ve o-fenilen diamin substratları için yapılmıştır. Peroksidaz enzimi hidrojen peroksit varlığında aktivite gösteren bir enzim olup bu enzimin V_{max} ve K_m değerleri ile ilgili çalışmalar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



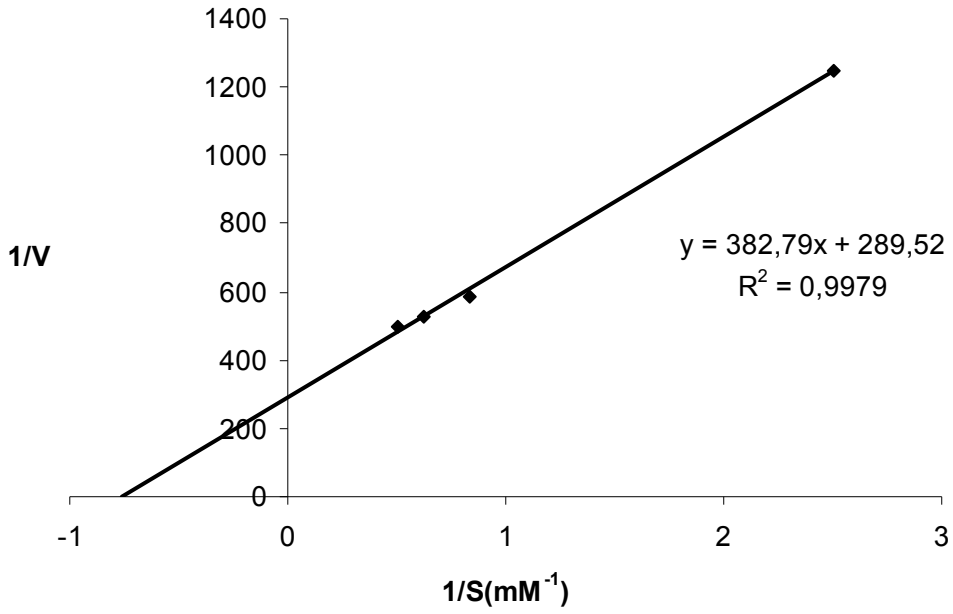
Şekil 4.19. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4-metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



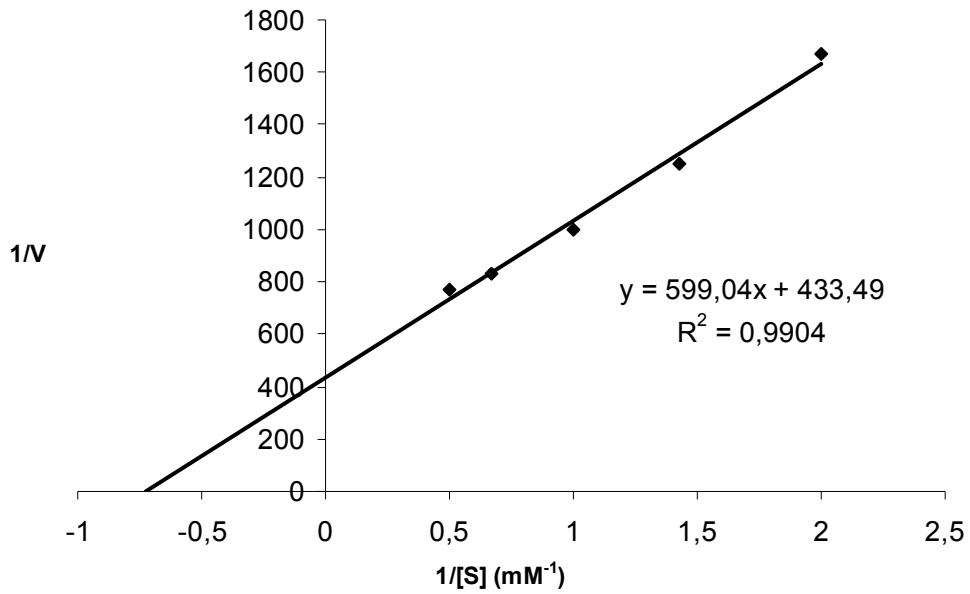
Şekil 4.20. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin 4-metil katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



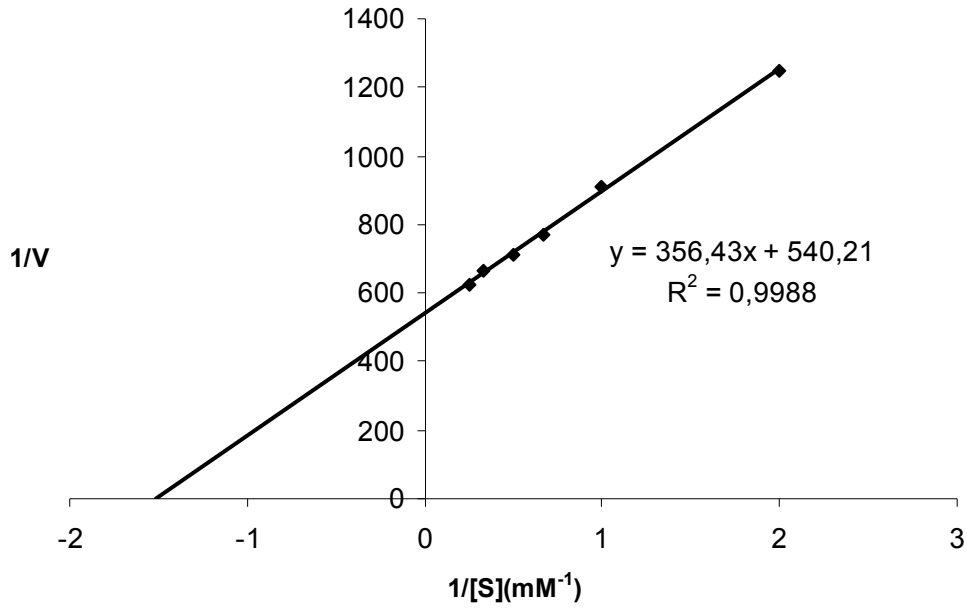
Şekil 4.21. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



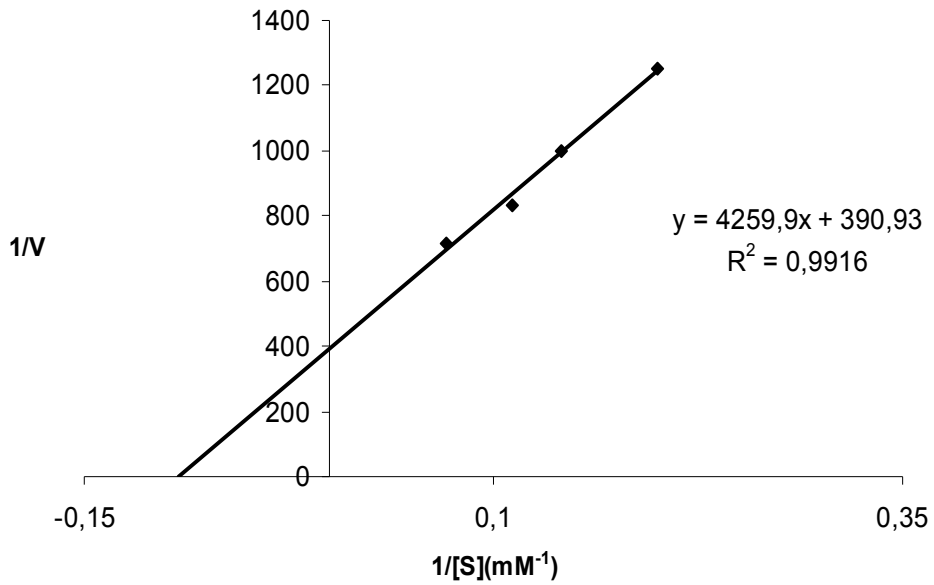
Şekil 4.22. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin ABTS substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



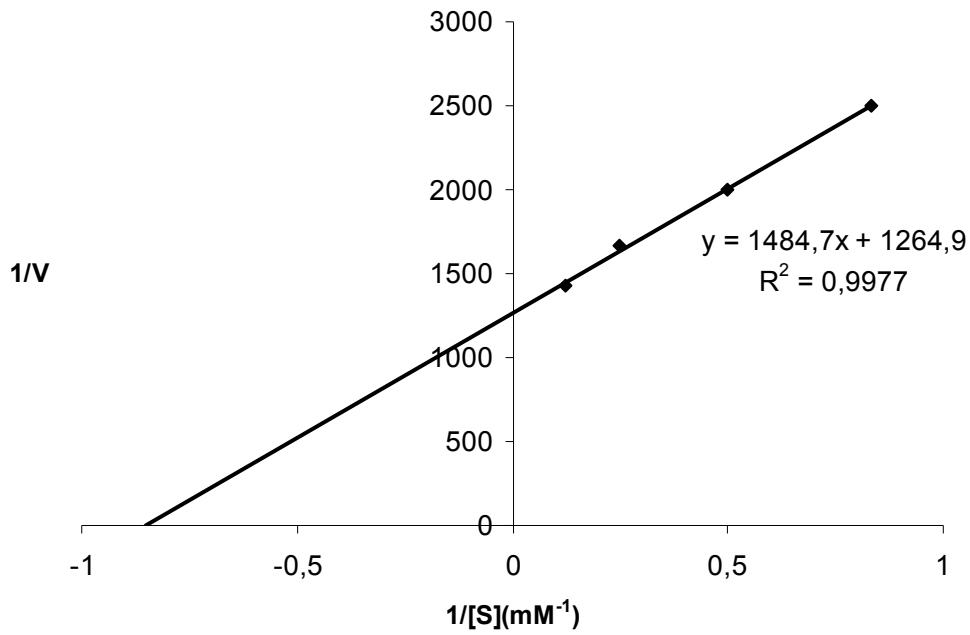
Şekil 4.23. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı gallik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



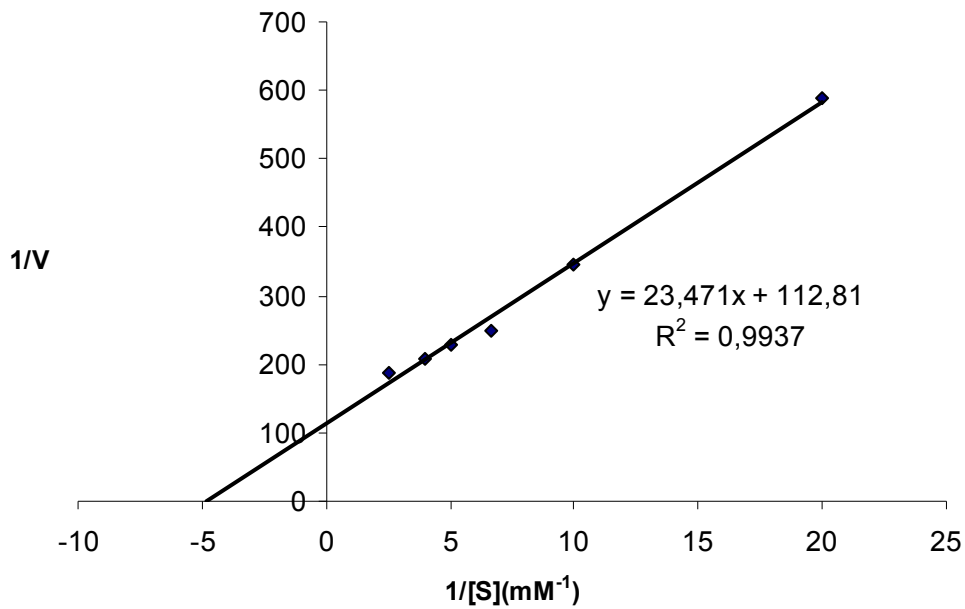
Şekil 4.24. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin gallik asit konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



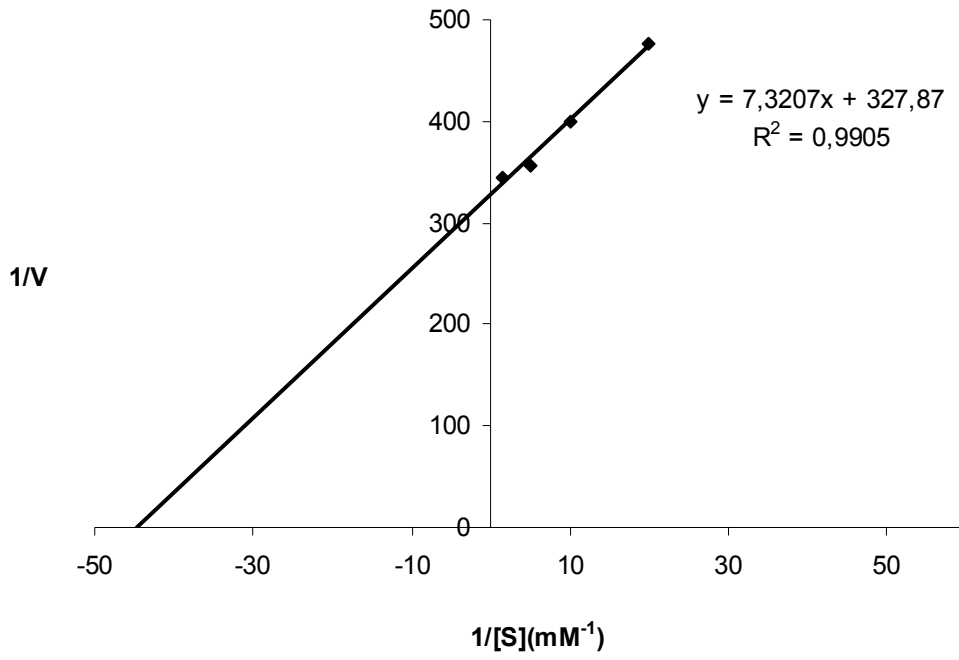
Şekil 4.25. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı guaiakol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



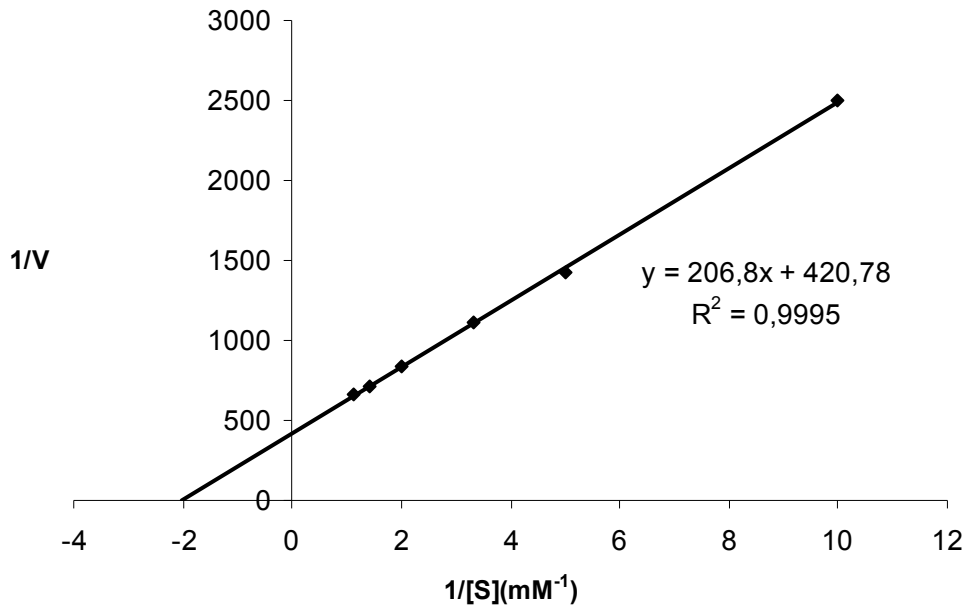
Şekil 4.26. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin guaiakol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



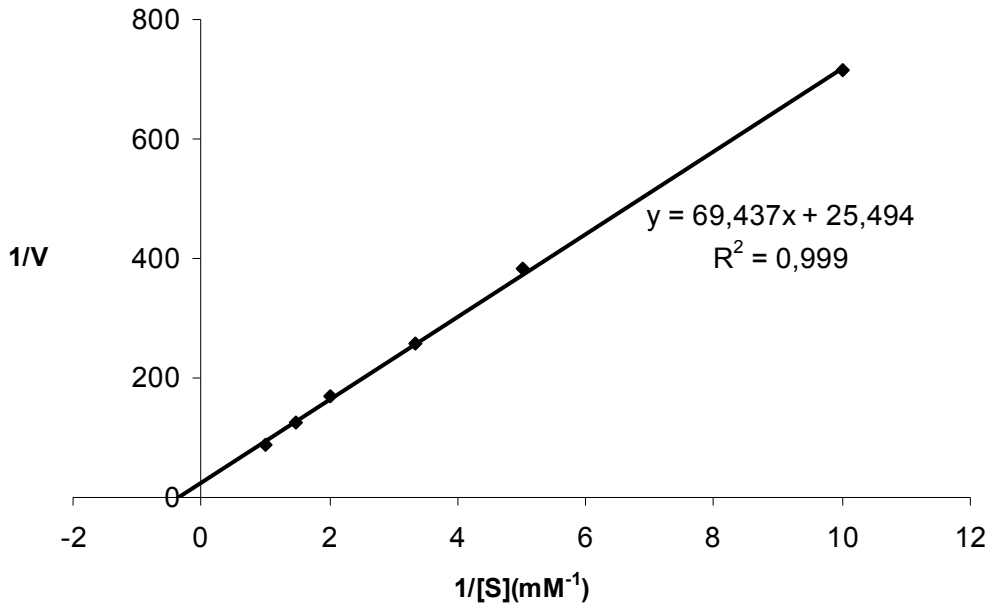
Şekil 4.27. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı kafeik asit substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



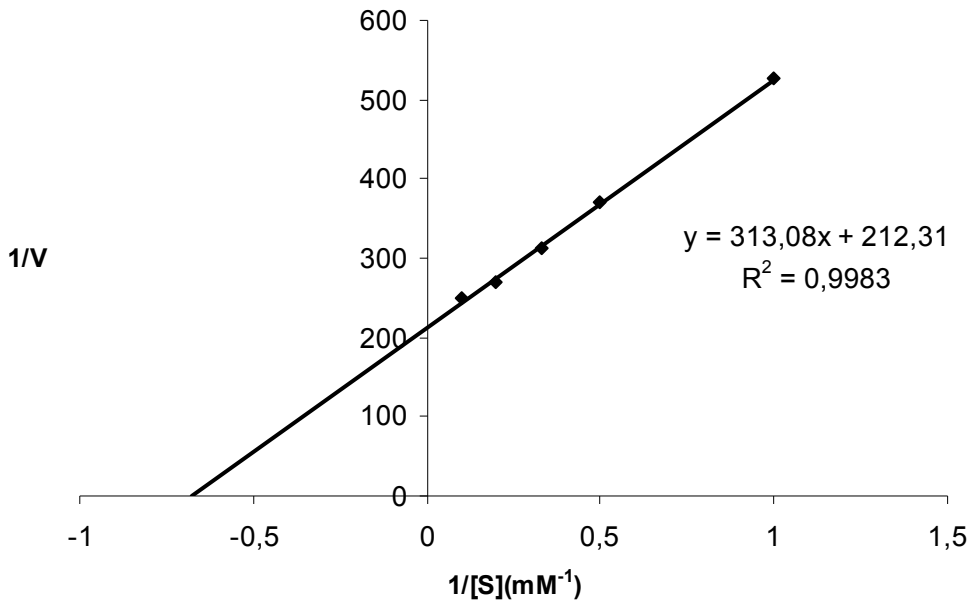
Şekil 4.28. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin kafeik asit substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



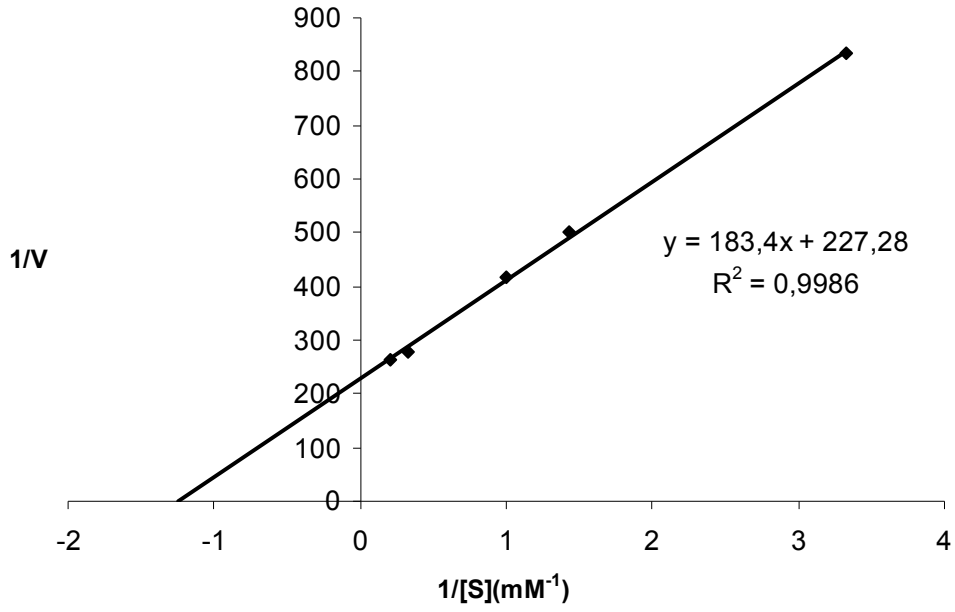
Şekil 4.29. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-dianisidin substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



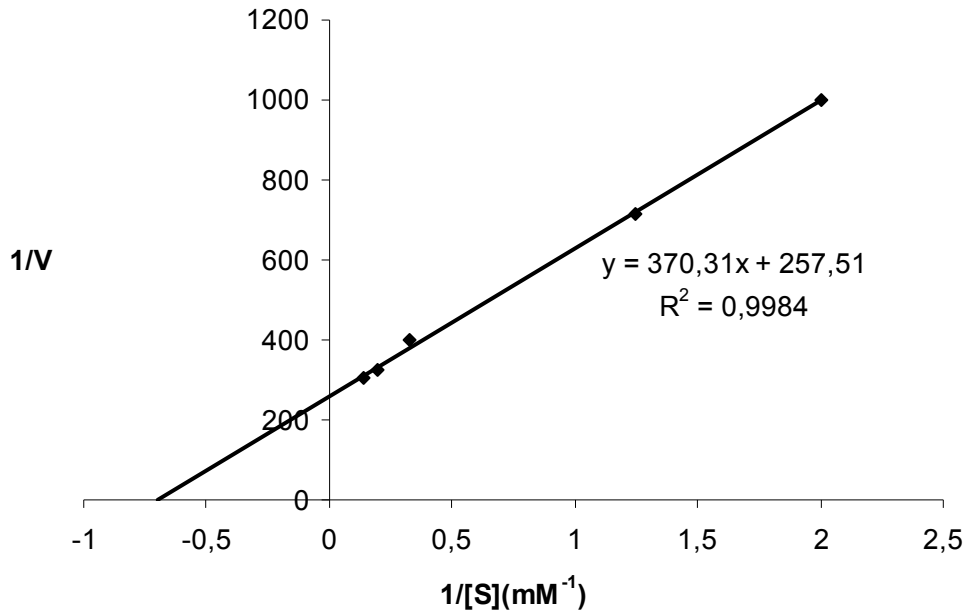
Şekil 4.30. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o-dianisidin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H₂O₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



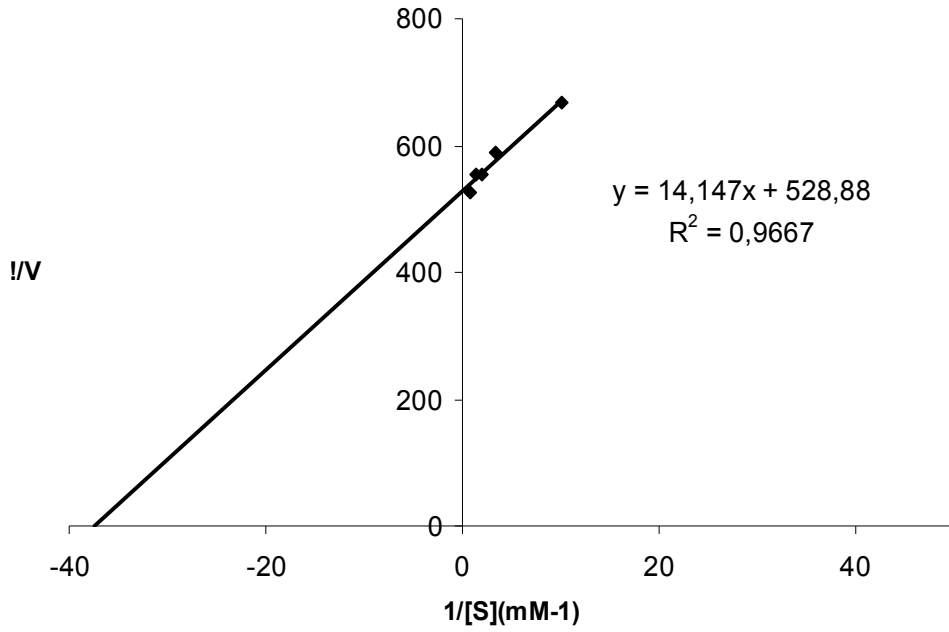
Şekil 4.31. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H₂O₂ substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı o-fenilen diamin substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği



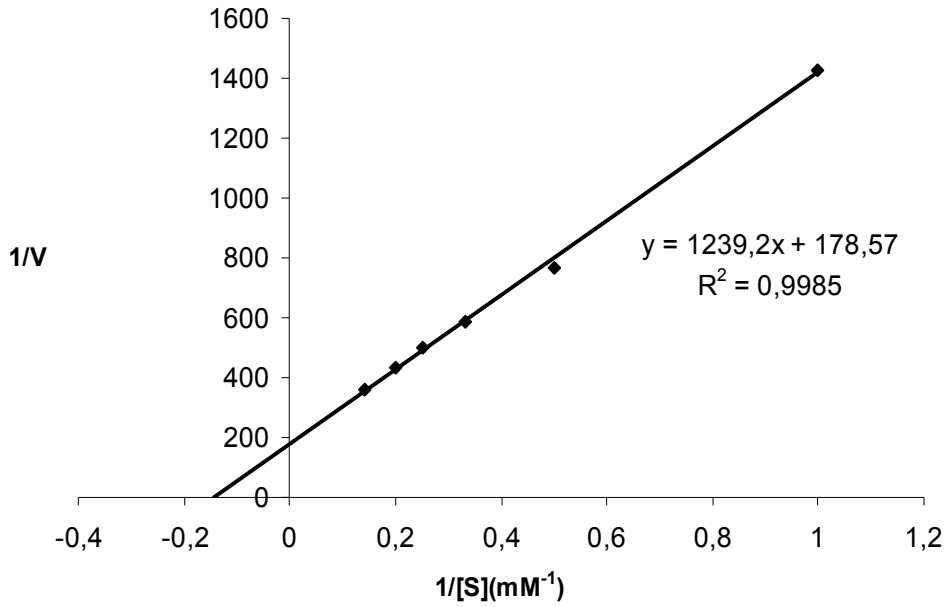
Şekil 4.32. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin o- fenilen diamin substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



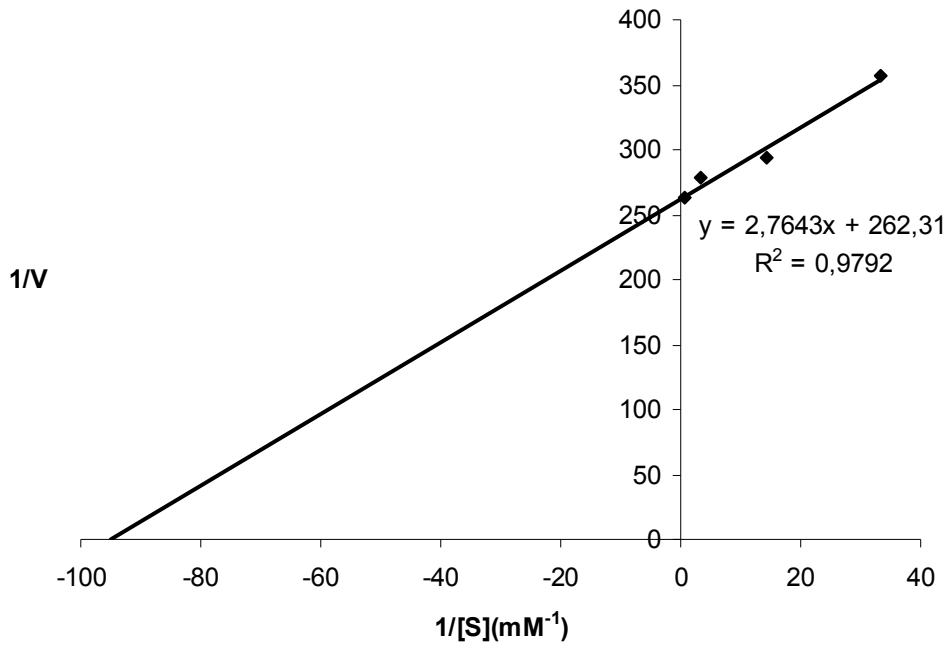
Şekil 4.33. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı progallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.34. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin progallol substrat konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H_2O_2 substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



Şekil 4.35. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin H_2O_2 substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği



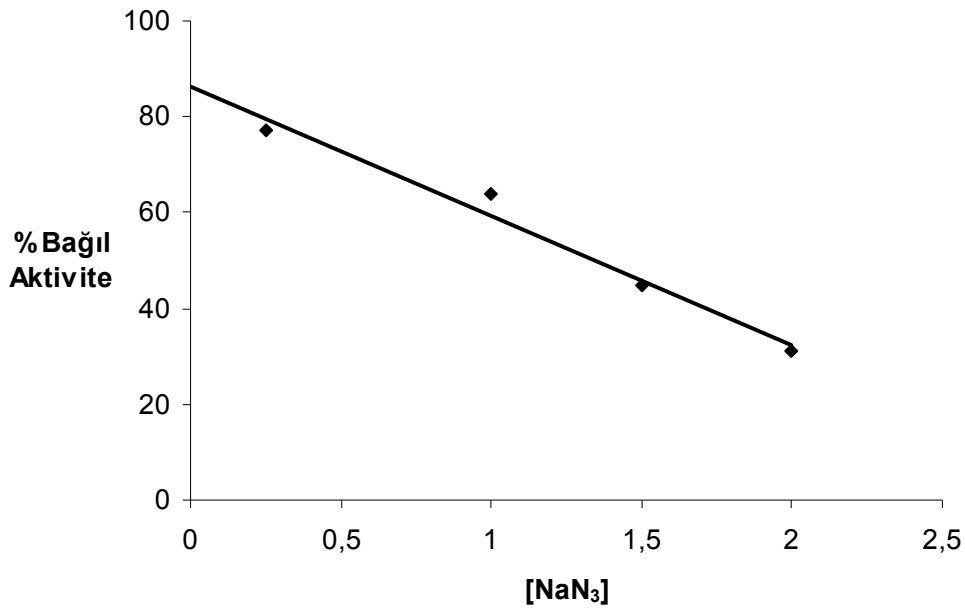
Şekil 4.36. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin katekol substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı H₂O₂ substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği

Tablo 4.1. POD enziminin substrat spesifikliğı ile ilgili toplu bulgular

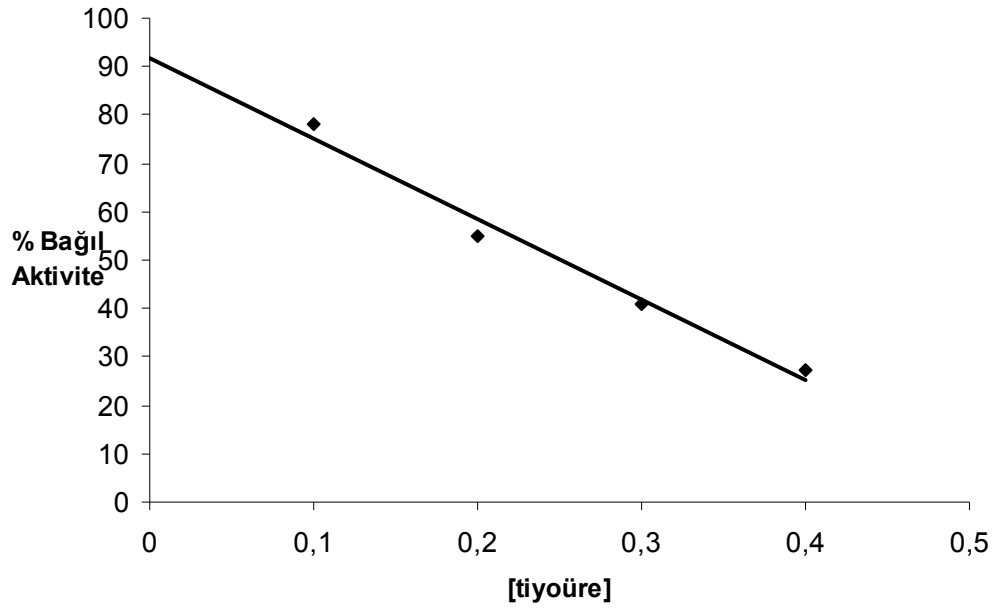
Substrat	K _m (mM)	V _{max} (EÜ/dk)	K _m (mM) (H ₂ O ₂ sbt)	V _{max} (EÜ/dk) (H ₂ O ₂ sbt)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
4-metil katekol	0,5119	0,0011	3,4271	0,0089	7,2	30
ABTS	1,3219	0,0035	0,4601	0,0067	3,6	40
Gallik asit	0,6597	0,0018	1,3819	0,0023	6,5	40
Guaiakol	1,1739	0,0008	10,8968	0,0026	6,5	40
Kafeik Asit	0,0223	0,0031	0,2358	0,0103	6,5	30
o-dianisidin	2,7238	0,0392	0,4915	0,0024	3,6	30
o-fenilen diamin	0,8069	0,0044	1,4746	0,0047	5	30
Progallol	0,0267	0,0019	1,4380	0,0039	7,5	40
Katekol	0,0105	0,0039	6,9396	0,0056	7	40

4.2.4. İnhibitörlerin etkisi

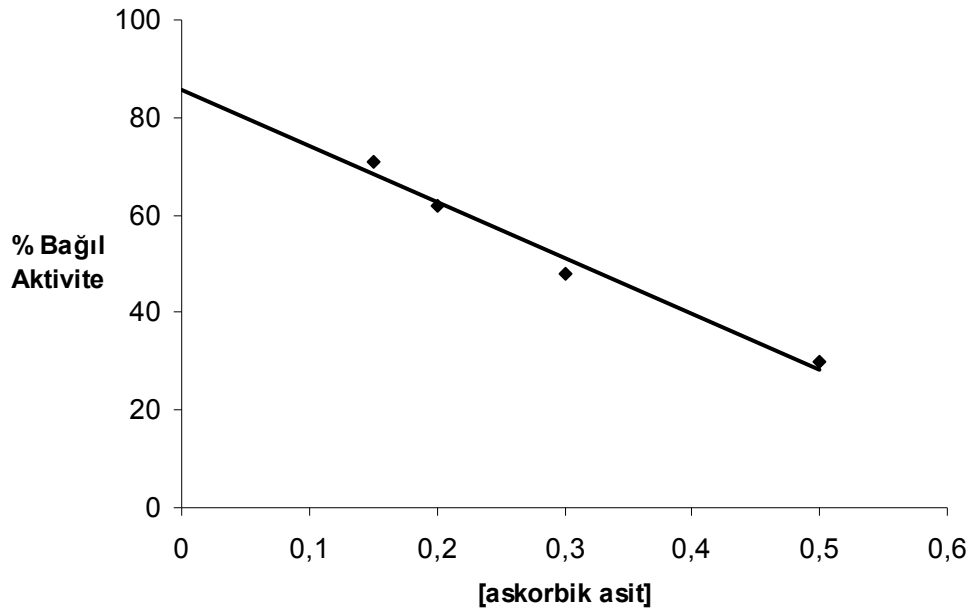
Sakarya bölgesinde yetişen karahindiba bitkisinin yaprak kısmından ekstrakte edilen POD enzimi üzerine etki eden toplam 8 farklı inhibitör bölüm 3.3.6.'da anlatıldığı gibi incelenmiştir. İncelenen inhibitörler sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, potasyum siyanür, 2-merkapto etanol, L-Glutatyon, L-Sistein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



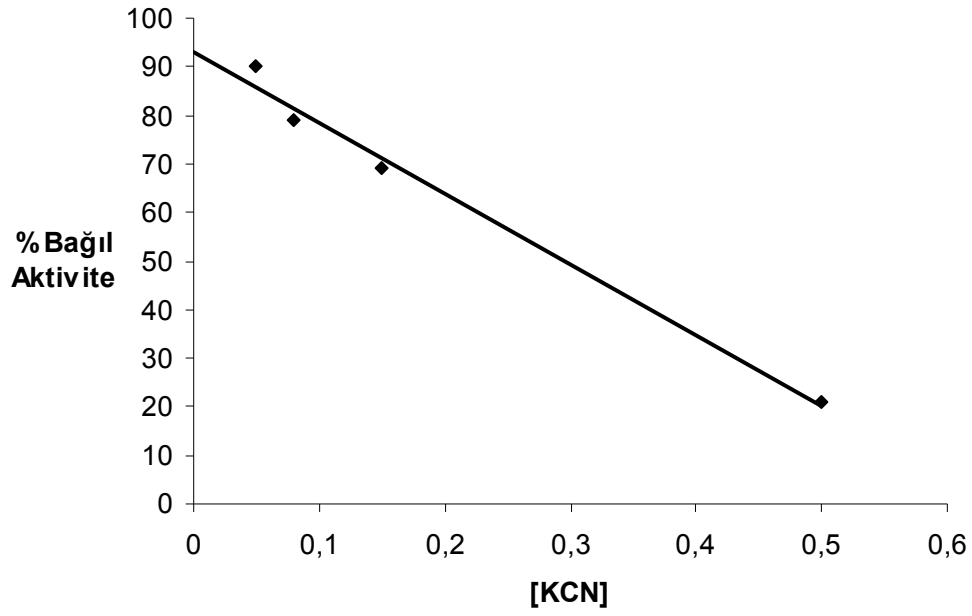
Şekil 4.37. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum azidin etkisi



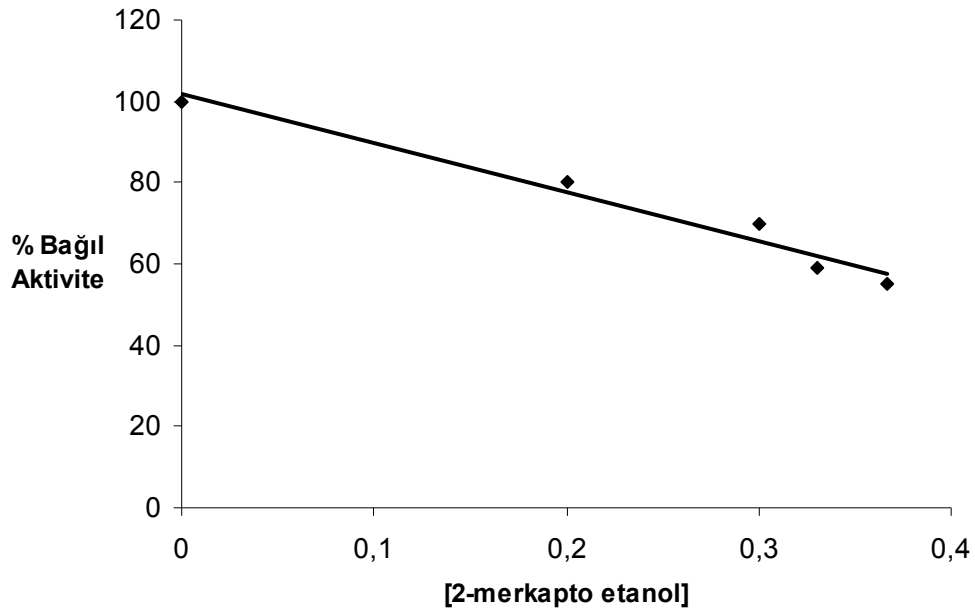
Şekil 4.38. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine tiyöürenin etkisi



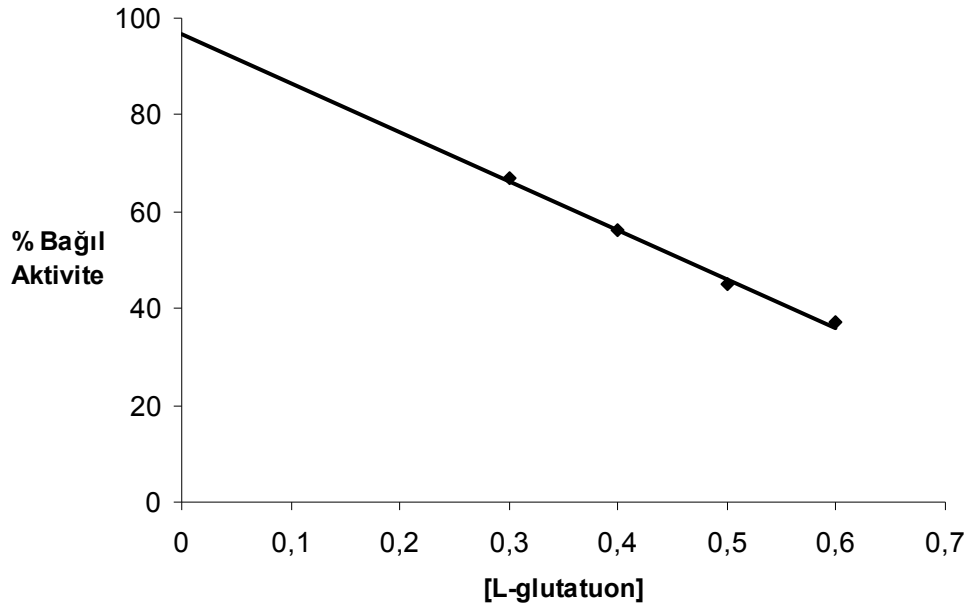
Şekil 4.39. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine askorbik asitin etkisi



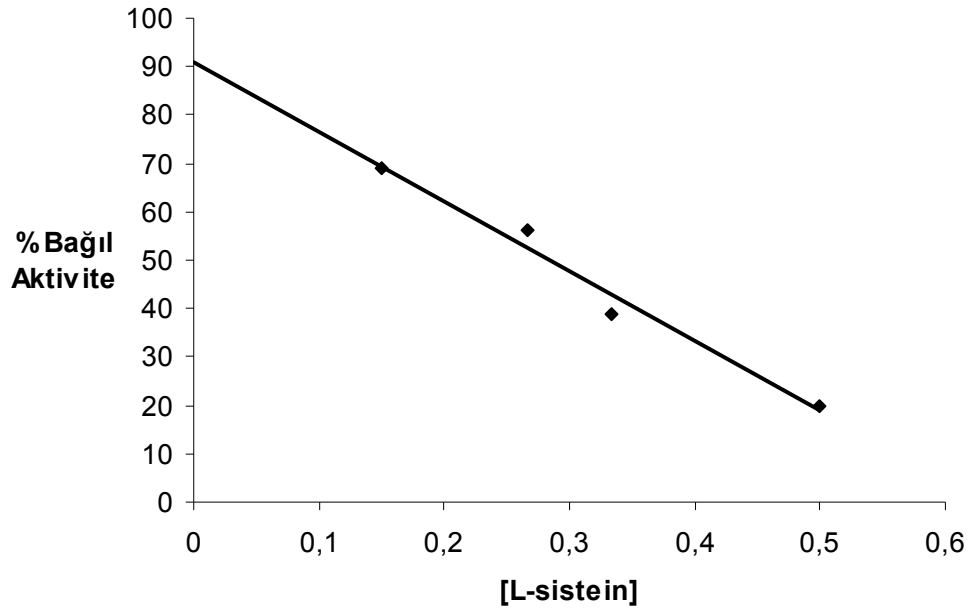
Şekil 4.40. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine potasyum siyanürün etkisi



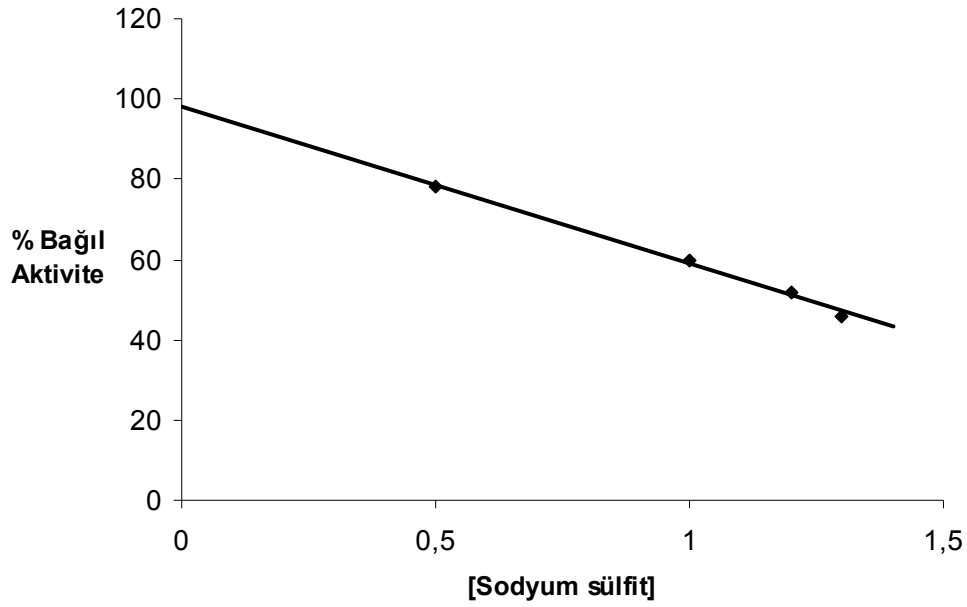
Şekil 4.41. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine 2-merkapto etanolün etkisi



Şekil 4.42. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-glutatyonun etkisi



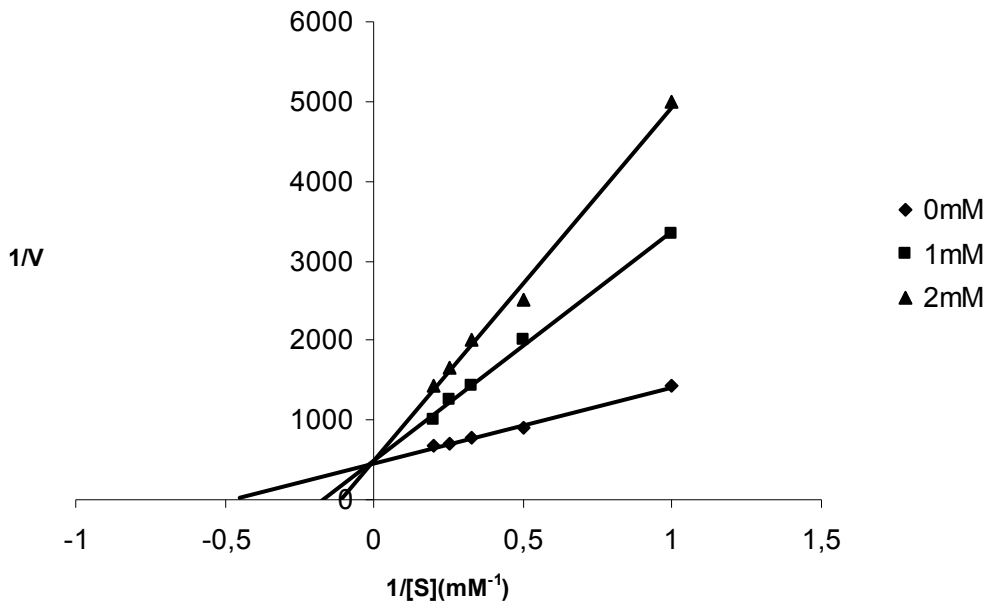
Şekil 4.43. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine L-sistein etkisi



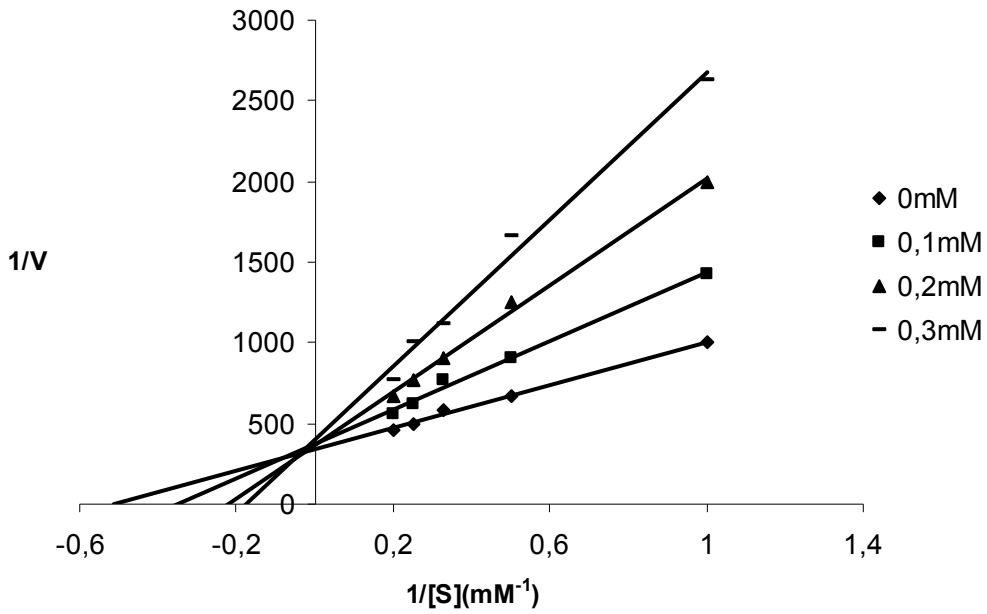
Şekil 4.44. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine sodyum sülfıtın etkisi

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

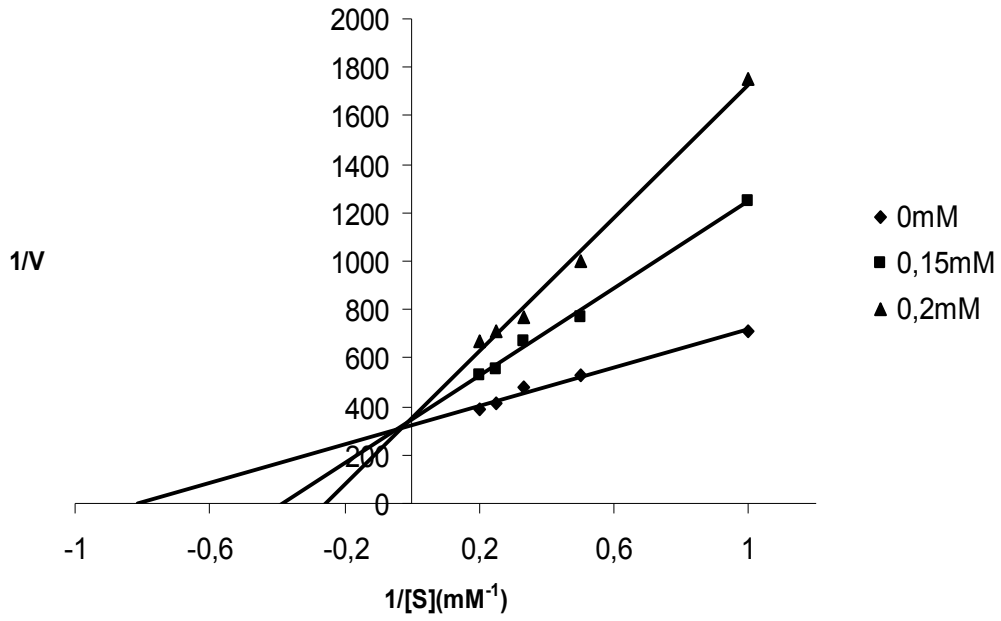
İnhibitör	I_{50}(mM)
Sodyum azit	0,254mM
Tiyoüre	0,2956mM
Askorbik asit	0,3000mM
KCN	0,2145mM
2-Merkapto etanol	0,3115mM
L-Glutatyon	0,4521mM
L-Sistein	0,2667mM
Sodyum sülfıt	1,2000mM



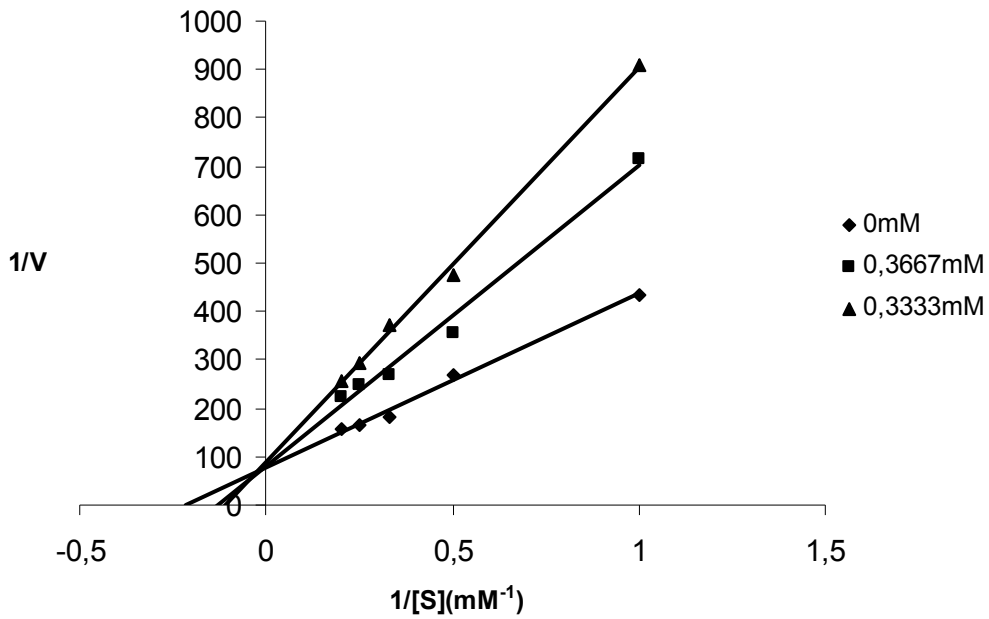
Şekil 4.45. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum azit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



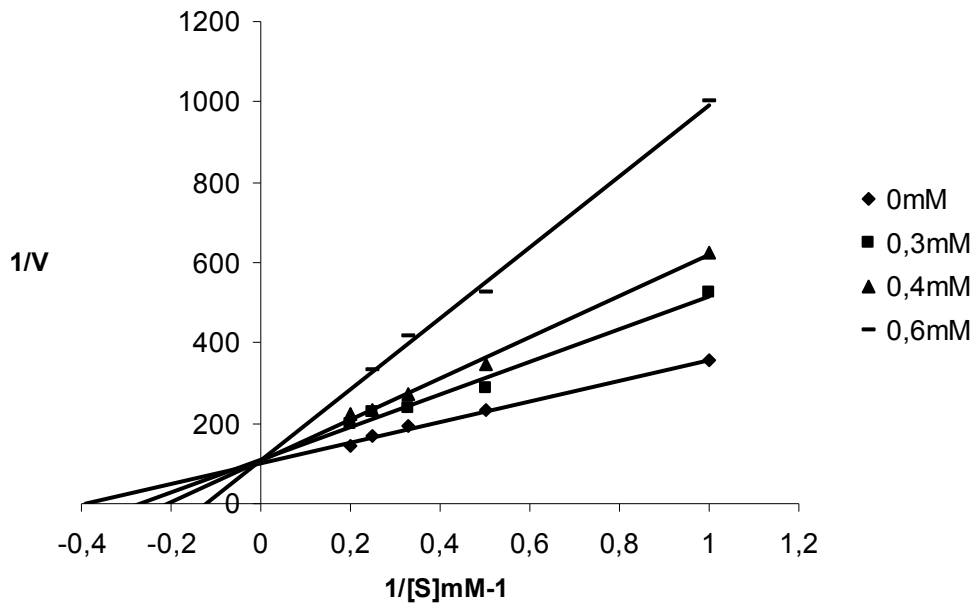
Şekil 4.46. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden tiyöüre inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



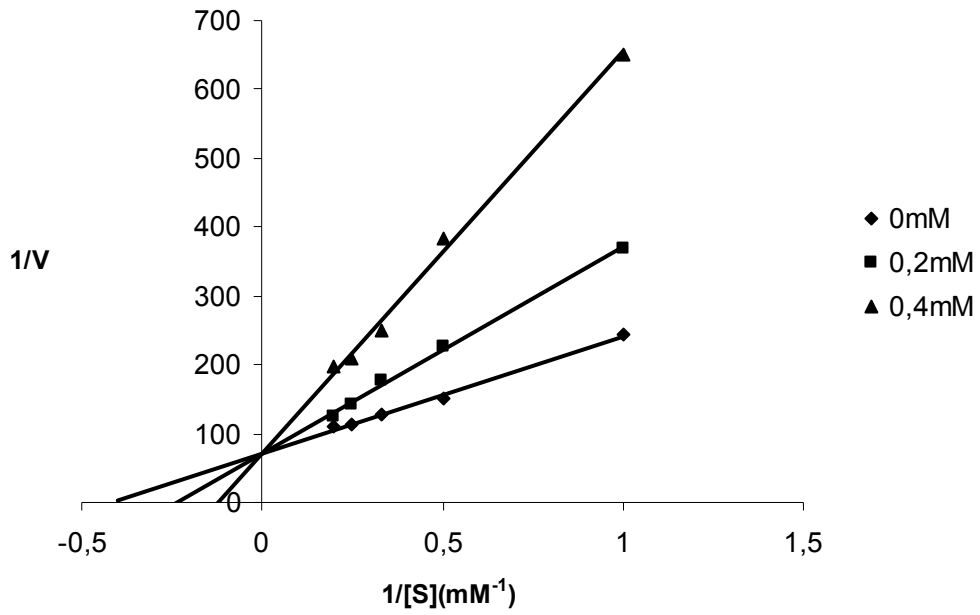
Şekil 4.47. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden askorbik asit inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



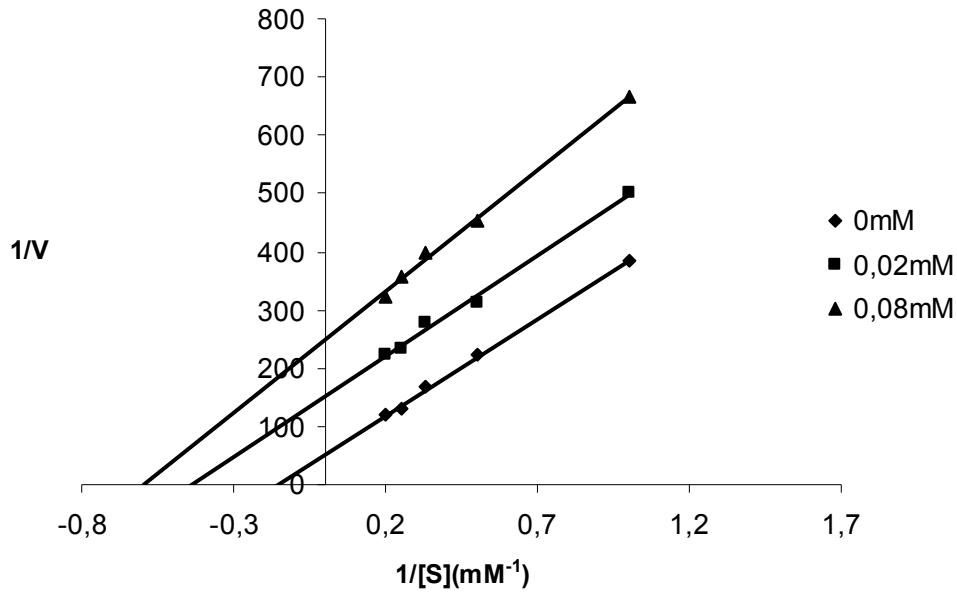
Şekil 4.48. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden 2-merkapto etanol inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



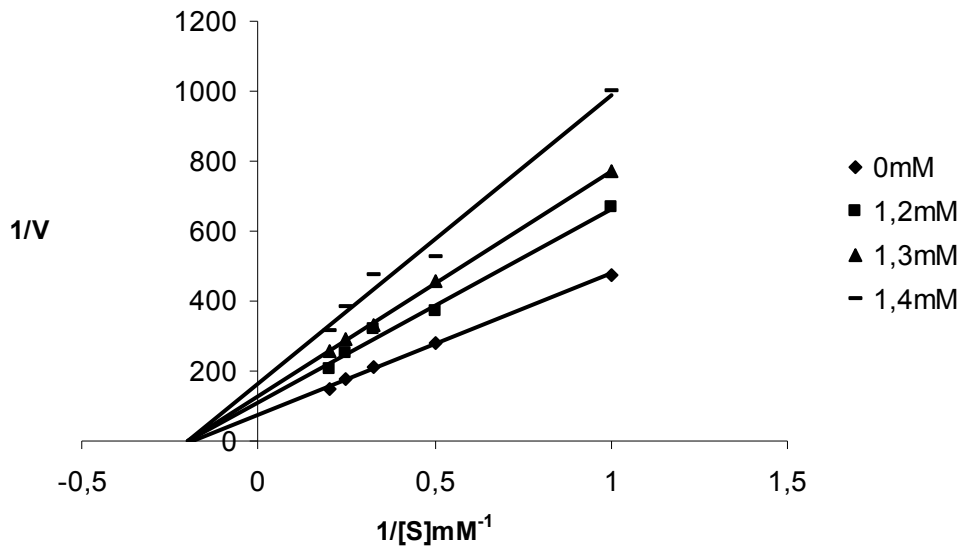
Şekil 4.49. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-glutasyon inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.50. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden L-sistein inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.51. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden potasyum siyanür inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.52. Karahindiba bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi üzerine etki eden sodyum sülfid inhibitörünün kullanılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

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

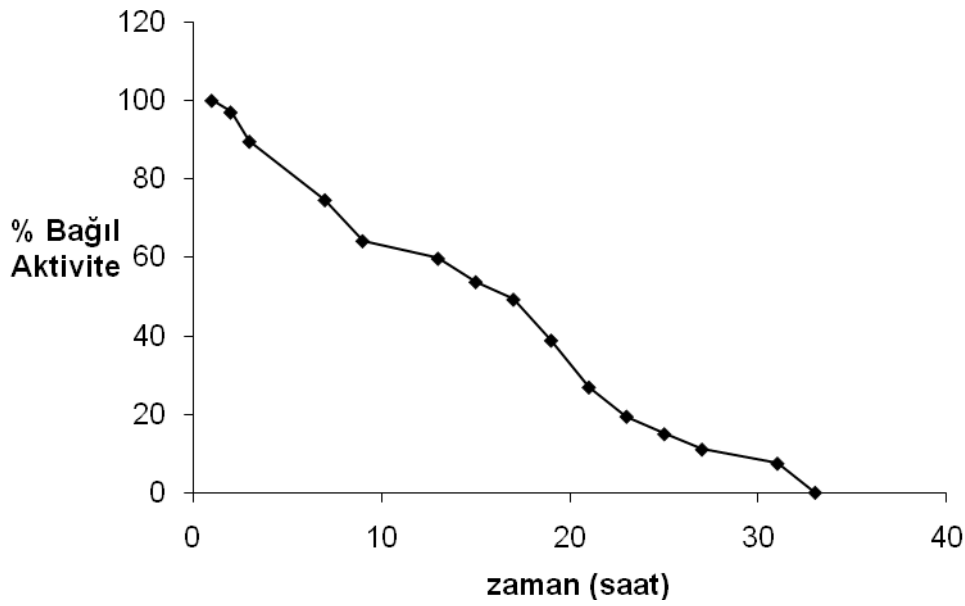
Tablo 4.3. POD enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin inhibisyon türleri ve K_i değerleri

İnhibitör	K_i(mM)
Sodyum azit	0,4293 Kompetitif
Tiyöüre	0,2200 Kompetitif
Askorbik asit	0,1431 Kompetitif
2-Merkapto etanol	0,4556 Kompetitif
L-Glutasyon	0,5121 Kompetitif
L-Sistein	0,1737 Kompetitif
Potasyum siyanür	0,0815 Ankompetitif
Sodyum sülfid	1,8000 Nonkompetitif

4.2.5. Peroksidaz (POD) Enziminin depolanma kararlılığı

Bölüm 3.3.7.'de anlatıldığı gibi enzimin oda sıcaklığında depolama süresince kararlılığını incelemek amacı ile 3 mM 4-metil katekol (pH 7,2) substratı kullanılmış; oda sıcaklığında her saat ölçümü alınmış ve enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, POD enziminin aktivitesi ilk üç saatte % 10, onuncu saatte % 40, ondokuzuncu saatte % 60, otuzikinci saatte % 94 azalarak otuzüçüncü saatin sonunda POD enzimi aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.53. Karahindiba bitkisinden elde edilen POD enziminin depolama kararlılığı grafiği

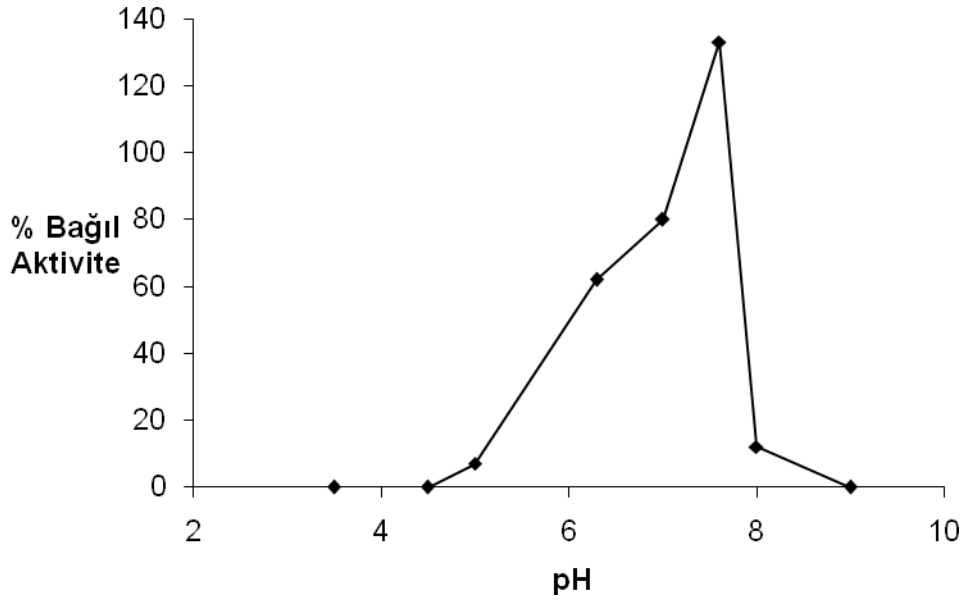
4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması

SOD enzimi izolasyonu, bölüm 3.5.'de anlatıldığı gibi karahindiba bitkisinden 1,5 gram alınarak ince ince doğranmıştır. 0,1 mM Na₂EDTA içeren 50 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 7,6) ile hazırlanan çözelti karıştırıcı da 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Homojenat 15000 RPM de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı enzim analizinde kullanılmıştır.

4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin İzolasyonu

4.4.1. pH etkisi

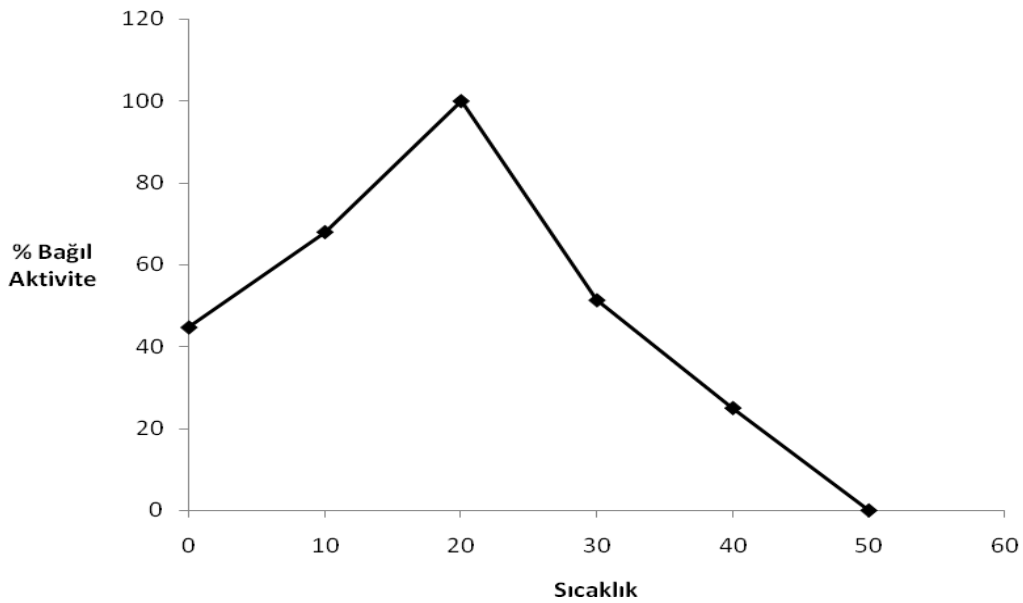
SOD enzimi aktivitesi 3,5 ile 9 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile tayin edildi. Enzim aktivite tayinleri 560 nm absorbanları izlenerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.54. Karahindiba bitkisinden elde edilen SOD enziminin optimum pH grafiği

4.4.2. Sıcaklığın etkisi

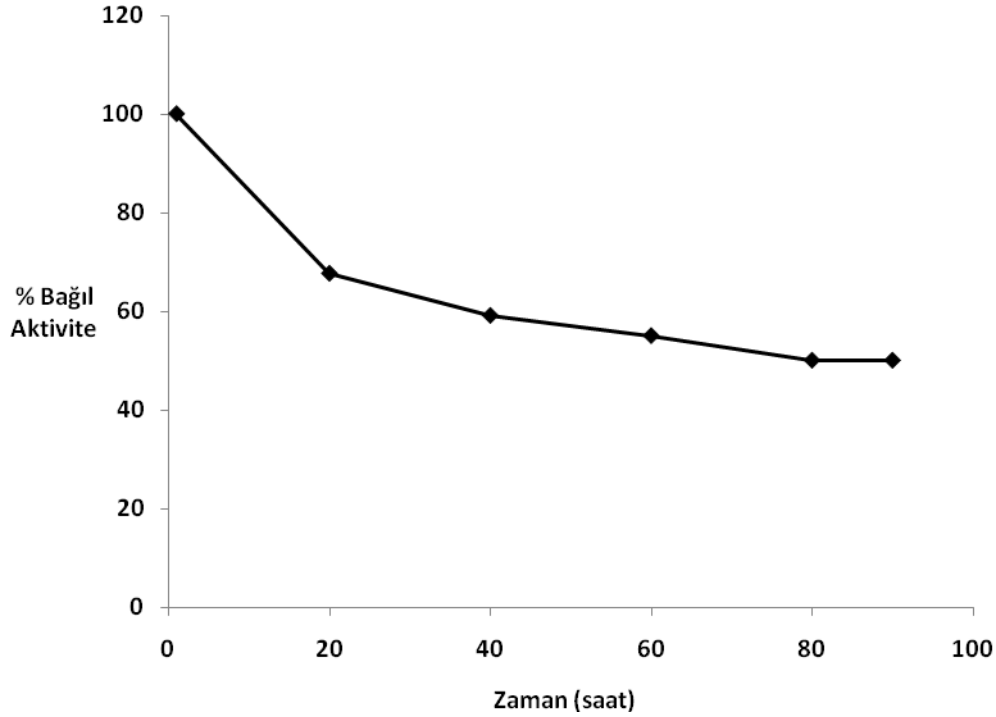
Bölüm 3.6.2.'de anlatıldığı gibi, 0, 10, 20, 30,40 °C'lerde enzim aktivitesine bakılarak SOD enziminin optimum sıcaklığını belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için sıcak su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır.



Şekil 4.55. Karahindiba bitkisinden elde edilen SOD enziminin optimum sıcaklık grafiği

4.4.3. Enzim depolanma kararlılığı

Bölüm 3.6.3.'de anlatıldığı gibi enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını incelemek amacıyla yaklaşık 20 saat arayla aktivite ölçümü alınarak enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.



Şekil 4.56. Karahindiba bitkisinden elde edilen SOD enziminin depolama kararlılığı grafiği

4.4.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi

3.6'da belirtildiği gibi farklı NBT konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanarak 560 nm'de absorbansları okunmuştur ve süperoksit dismutaz enziminin yüzde inhibisyonu hesaplanmıştır.

Tablo 4.4.Farklı NBT konsantrasyonlarında belirlenen SOD aktivitesi

NBT(μM)	SOD aktivitesi
0,0378	144,95
0,0567	35,82
0,0756	11,47

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmada karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden izole edilen peroksidaz (POD) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri incelenmiştir.

Peroksidaz (POD) enzim aktivite tayinleri H_2O_2 substratı varlığında 60 sn süresince 420 nm'de absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Peroksidaz (POD) enziminin H_2O_2 substratı varlığında aktivite tayinlerinin belirlenmesindeki temel prensip H_2O_2 'in suya indirgenmesi sonucu enzimin yükseltgenmesidir. Yükseltgenen peroksidaz enzimi de ortamdaki substratı yükseltgeyerek ortamdan harcanmadan çıkar. Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinin yaprak kısmından izole edilen peroksidaz (POD) enzimi öncelikle ekstrakte edilmiştir. Tüm ekstraksiyon işlemleri $+4^{\circ}C$ 'de sıcaklık kontrolü altında yapılmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayinleri ortama NBT ve riboflavin ilavesiyle 560 nm'de enzimli ve enzimsiz çözeltilerinin absorbanslarına bakılarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden izole edilen POD enziminin optimum pH'ını belirlemek amacı ile 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, gallik asit, guaiakol, ABTS, o-fenilen diamin ve H_2O_2 substratları varlığında optimum pH çalışması yapılmıştır.

Bu çalışmada karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden izole edilen peroksidaz (POD) tarafından bulunan optimum pH değerleri ise sırasıyla 5,0 - 7,5 - 4,0 - 7,0 - 7,5 olarak bulunmuştur. Johri ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada peroksidazların hepsi pH 3,0 - 9,0 alanı arasında kararlı olduğu bulunmuştur [32]. Fang ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada POD için optimum pH 6,0 - 8,5 arasında bulunmuştur [33]. Enzimin kararlı olduğu pH değerleri Pomar ve

arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmada 6,0 - 9,0 arasında değiştiği bulunmuştur [34]. Bulunan bu optimum pH değerleri bulmuş olduğumuz pH değerleri ile uygunluk göstermiştir.

Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden izole edilen POD enziminin optimum sıcaklığı 0 – 80 °C aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Bu çalışma 4-metil katekol, ABTS, gallik asit, guaiakol, kafeik asit, o-dianisidin, o-fenilen diamin, progallol ve katekol substratlarının varlığında yapılmıştır. Yapılan optimum sıcaklık çalışması 30 – 40 °C sıcaklıkları arasında değiştiği gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç Köksal (2007) tarafından yapılan çalışmada 25 - 50 °C arasında değiştiği gözlenmektedir. Belcarz ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada POD enzimi için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur [23]. Saraiva ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık 34,7 °C olarak bulunmuştur [35]. Bu çalışmalardan elde edilen optimum sıcaklıklar yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla uygunluk göstermiştir.

Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden izole edilen POD enzimi için on farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapılmıştır. Bu çalışmada substrat olarak 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, o-dianisidin, gallik asit, guaiakol, ABTS, o-fenilen diamin ve H₂O₂ kullanılmıştır. Elde edilen datalarla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafikleri hemen hemen tüm enzim çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Belirlenen K_m ve V_{max} değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Bu çalışmada POD enzimi üzerine etki eden sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, potasyum siyanür, 2-merkaptto etanol, L-Glutatyon, L-Sistein ve sodyum sülfid inhibitörleri incelenmiştir. Başlangıçta enzim aktivitesini % 50'ye düşüren inhibitör konsantrasyonları (I₅₀) bulunmuştur. Sonuçlar tablo 4.2.'de sunulmuştur. Bir sonraki aşamada bu I₅₀ değerlerinden faydalanarak sabit konsantrasyonlarda çalışabileceğimiz inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir. Belirlenen bu konsantrasyonlar çalışılarak her bir inhibitör için 1/V - 1/[S] grafikleri çizilmiştir.

Elde edilen grafiklerden faydalanarak da her bir inhibitör için inhibisyon türü ve K_i değerleri bulunmuştur. Sonuçlar tablo 4.3'te sunulmuştur. Yapılan bu çalışmalarda, sodyum azid, tiyoüre, askorbik asit, 2-merkapt etanol, L-Glutatyon ve L-Sistein inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyona, potasyum siyanür inhibitörü yarı yarışmalı inhibisyona ve sodyum sülfid inhibitörünün de yarışmasız bir inhibisyona neden oldukları Line-weaver Burk grafikleri ile belirlenmiştir.

Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden izole edilen süperoksit dismutaz (SOD) enziminin optimum pH'nın belirlenmesi amacı ile pH 3,5 ile 9,0 arasında sitrat tamponu (pH 3,5 – 6,0 arası), fosfat tamponu (pH 7,0) ve tris tamponu (pH 7,5 - 9,0 arası) olmak üzere 3 farklı tampon ile çalışılmıştır. 3,5 - 4,5 – 9,0 pH'larında enzimin aktivite göstermediği tespit edilmiştir. pH 7,6'nın ise optimum pH olduğu saptanmıştır.

Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin karakterizasyonu çalışmamız daha önce denenmemiş bir çalışma olup literatüre katkıda bulunulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] AKKUŞ, İ., SERBEST Radikaller ve fizyopatolojik Etkileri. Mimosa yayınları, 38(5) : 1-123, 1995.
- [2] DÜNDAR, Y., ASLAN, R., Hekimlikte Oksidatif stress ve antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversite Yayınları, 29:95-101, 2000.
- [3] AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M., Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging Proc Natl Acad Sci , 90:7915-7922, 1993.
- [4] MÜFTÜOĞLU, O., Yaşasın Hayat. Doğan Kitapçılık, İstanbul, 2003.
- [5] AROSIO, B., GAGLIANO, N., FUSARO, L.M.P., Pharmacol & Toxicol. 87: 229-233, 2000.
- [6] BAKAN, N., Kimyasal kinetik ve kataliz-Enzimler, 2007-2008.
- [7] [www.mustafaaltinisik.org.](http://www.mustafaaltinisik.org/) /Enzim, Nisan 2008.
- [8] AKIN, K.O., enzimler, tusdata, 2008.
- [9] SOHOL RS. The free radical hypothesis of aging. An appraisal of the current status. Aging, 5:3-17, 1993.
- [10] SOUTHARN, P.A., POWİ, G., Free radicals in medicine: chemical nature and biological reactions. Mayo Clin Proc, 63:381-389, 1993.
- [11] KARABULUT, B., KABAKÇI, T., Serbest radikaller. Akademi, 1:28-35, 1995.
- [12] FRIDOWİCH, I., The biology of oxygen radicals. Science, 201:875-877, 1978.

- [13] GHOSH, J., MYERS, C.E., Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci*, 95: 13182-7, 1998.
- [14] LEE, Y.J., GALOFORO, S.S., BERNS, C.M., et al. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *J Biol Chem*, 273: 5294-9, 1998.
- [15] CHOPRA, S., WALLACE, H.M., Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species, *Biochem Pharmacol*, 55: 1119-23, 1998.
- [16] WOJTASZEK, P., Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem J*, 322: 681-92, 1997.
- [17] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., 'İnsan Biyokimyası', Palme Yayıncılık, Ankara, 2002.
- [18] 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.
- [19] DÜZGÜNER, V., Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı, 2005.
- [20] 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.
- [21] SODA, I., HASEGAWA, T., SUZUKI, T., OGURA, N., Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwi fruit, *Agric. Biol. Chem.*, 55(6), 1677-1678, 1991.
- [22] MIRANDA, M.V., MAGRI, M.L., NAVARRO DEL CAN˘IZO, A.A., CASCONI, O., Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agarose, *Process Biochemistry*, 38: 537-543, 2002.

- [23] BELCARZ, A., GINALSKA, G., KOWALEWSKA, B., KULESZA, P., Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis, *Phytochemistry*, 69: 627–636, 2008.
- [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] <http://www.wikipedia.org./karahindiba>, 2010.
- [26] 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.
- [27] SERRANO-MARTINEZ, A., FORTEA, M.I., DEL AMOR, F.M., NUNEZ-DELICADO, E., Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase, *Food Chemistry*, 107: 193–199, 2008.
- [28] 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.
- [30] MALGORZATA, M., CHRISTOPH, B., KATARYZYNA, S., KRYSZYNA, M., Antioxidant Enzymes and Isoflavonoids in Chilled Soybean. *Journal of Plant Physiology*, 162(4): 403-412, 2005.
- [31] BOZDEMIR, Y., Keten tohumu (*limun Usitatissimum*) ekstraktından katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri, 2007.
- [32] 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.
- [33] FANG, L., JIAN, B., ZHANG, T., Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase, *Food Chemistry*, 109: 802-807, 2008.
- [34] POMAR, F., BERNAL, M.A., DIAZ, J., MERINO, F., Purification characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase, *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 8, pp. 1313-1317, 1997.

- [35] 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.

ÖZGEÇMİŞ

Belkıs Düzcan, 10.05.1985 tarihinde Sakarya'nın Geyve ilçesinde doğdu. İlkokula Geyve Atatürk İlkokulunda başladı ve Sakarya Ahmet Akkoç İlkokulu'ndan mezun oldu. Orta okul ve liseyi de Sakarya da okudu. 2004 yılında Afyon Kocatepe üniversitesi Kimya bölümünü kazandı ve 2008 yılında mezun oldu ardından Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2010 yılı Zonguldak Ulusal Kimya Kongresi'ne 'Çeşitli Metallerin Nane Peroksidaz Enzimi Üzerine Etkileri' posterinin sunumu ile katıldı.