ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ramazan SERİNER

KATALAZ ENZİMİNİN HIYARDAN (CUCIMUS SATIVUS) SAFLAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATALAZ ENZİMİNİN HIYARDAN (CUCIMUS SATIVUS) SAFLAŞTIRILMASI

Ramazan SERİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez …./…/.... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

……	……	……
Doç.Dr.Ramazan BİLGİN	Prof.Dr.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr. Nuray GÜZELER
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:.....

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2009YL33

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KATALAZ ENZİMİNİN HIYARDAN (*CUCIMUS SATIVUS*) SAFLAŞTIRILMASI

Ramazan SERİNER

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl : 2010, Sayfa:34
Jüri : Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Prof. Dr. Nuray GÜZELER

Bu çalışmada, hıyardan (*Cucumis Sativus*) katalaz (E.C.1.11.1.6) enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırılmasında, homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kolon kromatografisi basamakları uygulanmıştır. Santrifüj sonrası katalaz enziminin spesifik aktivite değeri 26 U/mg protein olarak bulunurken DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırmanın son basamağında 393 U/mg protein değerine ulaşarak 14,72 kat artış göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Salatalık,Katalaz,Saflaştırma

ABSTRACT

MSc THESIS

CATALASE FROM THE CUCUMBER(*CUCIMUS SATIVUS*) PURUFICATION

Ramazan SERİNER

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Assoc. Prof. Ramazan BİLGİN
Year: 2010, Pages: 34
Jury : Assoc. Prof. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Prof. Dr. Nuray GÜZELER

In this study, catalase (E.C.1.11.1.6) purified from cucumber (Cucimus Sativus) For this purpose cucumber homogenized, cenrtifugation step, fractioned with ammonium sulphate precipitation and applied on ionexchange chromatography seperation was applied cucumber was purified 14,72 fold in cucumber samples and spesific activity of enzyme in cucumber was found as 393 U/mg respectively.

Key Words: Cucumber,Catalase,Purification

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince, gerek bilimsel konularda gerekse manevi anlamda benden yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç.Dr Ramazan BİLGİN' e bana her zaman gösterdiği ilgi, sabır, iyi niyet ve güler yüzü için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda her zaman desteklerini gördüğüm hocalarım Prof.Dr. Seyhan TÜKEL ve Doç.Dr Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkür ederim.

Laboratuvara adım attığım ilk andan itibaren bana karşı hep yardım sever ve çok sabırlı olan hocalarım Arş. Gör. Özlem ALPTEKİN' e, Deniz YILDIRIM' a çok teşekkür ederim.

Yaşamımın her aşamasında bana hep destek olup sevgi ve ilgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili babam Şükrü SERİNER ve sevgili annem Fatma SERİNER'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tanıştığımız ilk günden beri hayatımın en önemli parçası olarak, varlığını her an hissettiren ve bana müthiş bir güç veren nişanlım Özlem ALTUNTAŞ' a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... .I
ABSTRACT..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER..... IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....VII
ŞEKİLLER DİZİNİ..... VII
SİMGELER VE KISALTMALAR..... IX
1. GİRİŞ..... 1
1.1. Enzimler 1
1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler..... 2
1.2.1. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi..... 2
1.2.2. Substrat konsantrasyonunun Etkisi..... 2
1.2.3. Sıcaklığın Etkisi..... 3
1.2.4. pH Etkisi..... 3
1.2.5. Zamanın Etkisi..... 3
1.2.6. Reaksiyon Ürünlerinin Etkisi..... 4
1.3. Enzimlerinin Saflaştırılması..... 4
1.3.1. Hücre parçalanması..... 4
1.3.2. Süzme..... 6
1.3.3. Santrifüj İle Ayırma..... 6
1.3.4. Organik Çözücülerler Çöktürme.....6
1.3.5. Kromotografi..... 6
1.4. Katalaz Enzimi..... 7
1.4.1. Katalazın Kullanım Alanları..... 9
1.4.1.1. Süt Endüstrisinde Kullanımı 9
1.4.1.2. Oksidazlarla Birlikte Kullanımı 9
1.4.1.3. Endüstride Kullanımı 10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 11

3. MATERYAL VE METOD..... 13
3.1. Materyal..... 13
3.2. Metod..... 13
3.2.1. Katalaz Saflaştırma..... 13
3.2.1.1. Katalaz Enzimi İçin Homojenat Hazırlanması..... 13
3.2.1.2. Katalaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ... 14
3.2.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi 15
3.2.2.1. Sigma Yöntemine Göre Aktivite tayini 15
3.2.2.2. Optimum pH' nın belirlenmesi..... 15
3.2.2.3. Katalaz Enzimi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 16
3.2.2.4. Enzimin Depolama Kararlılığı..... 16
3.2.2.5. Protein Tayini..... 16
3.2.2.6. Katalaz enzimini için Km ve Vm değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar 17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 19
4.1. Bulgular..... 19
4.1.1. Protein Miktarı İle İlgili..... 19
4.1.2. Hıyar (Cucimus Sativus) Homojenatlarından Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular..... 19
4.1.3.Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular..... 20
4.1.4. DEAE-selülöz Kromatogrofisi 20
4.1.5. Optimum pH'ye Ait Bulgular 22
4.1.6. Optimum Sıcaklık İle İlgili Bulgular.....23
4.1.7. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığına Ait Bulgular 24
4.1.8. Katalaz Enzimi için Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanması 25
4.2. Tartışma..... 26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……. 29
5.1. Sonuçlar..... 29

5.2. Öneriler 29
KAYNAKLAR 31
ÖZGEÇMİŞ 35

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Hücre parçalama teknikleri 5
Çizelge 4.1. DEAE-selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunan absorbans değerleriveSigma yöntemi ilebelirlenen aktivite değerleri . 21
Çizelge 4.2. DEAE- selüloz kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı zamanlarda ölçülen spesifik aktivite değerleri…..…. 24
Çizelge 4.3. Katalaz enzimi için ultra santrifüjden başlayarak DEAE kolon uygulamasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler 25

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Katalaz enziminin hem b ve hem d grupları..... 7
Şekil 4.1. Standart protein eğrisi..... 19
Şekil 4.2. DEAE-selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve Sigma yöntemi ile belirlenen aktivite de.....22
Şekil 4.3. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı pH larda ölçülen spesifik aktivite değerler.....23
Şekil 4.4. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı sıcaklıklarda ölçülen spesifik aktivite 23
Şekil 4.5. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı zamanlarda ölçülen spesifik aktivite değer..... 24
Şekil 4.6. DEAE -selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için Km ve Vmax Değerleri 25

SİMGELER ve KISALTMALAR

CAT : Katalaz

Prot : Protein

SOD : Süperoksit dismutaz

GOD : Glukozoksidaz

DEAE : Diethylaminoethyl selüloz

1.GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple yaşam birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret olan bir sistem olarak tanımlanmıştır. Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısımları doğrudan doğruya proteinin polipeptid zinciridir. Bazı enzimlerin ise katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna; bazılarının protein olmayan organik bileşiğe; bazılarının da hem metal iyonuna hem de organik bileşiğe ihtiyaçları vardır. Bu iyon ve bileşiklere genel olarak kofaktör denir. (Ziyan, 1998). Organik bileşik enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve dissosiye olmuyorsa prostetik grup adını alır. Pek sıkı birleşmemiş ve dissosiye olabiliyorsa koenzim adını alır. Kofaktörlere sahip olan enzimlere de holoenzim denir. (Tekman ve Öner, 1994). Enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetlerde tutunmuş olan gevşek bağlı koenzimler diyaliz yolu ile enzimlerden uzaklaştırılabilirler.

Apoenzim, kofaktörlü bir enzimin yalnızca protein kısmına verilen addır. Enzimin etki ettiği madde veya madde karışımına ise ‘substrat’ denir. Yani

enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürebildikleri bileşikler o enzimin substratlarıdır. (Tekman ve Öner, 1994). Koenzim veya prostetik grup enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu, yani spesifisitesini tayin eder. Apoenzim ise enzimin hangi substrata etki edeceğini, diğer bir deyişle enzimin substrat spesifisitesini tayin eder. Örneğin; koenzimi NAD^+ olan enzimler dehidrojenasyon reaksiyonlarını kataliz ederler, fakat hidrojenin hangi substrattan ayrılacağını tayin eden enzimin apoenzim kısmıdır. Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içi reaksiyonlarda hiçbir yan ürün oluşturmaksızın etkilerini gösterirler. Hücre içi reaksiyonlar enzimler sayesinde birkaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşmektedir. Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Turnover sayısı enzimlerin katalizleme güçlerini gösteren bir ifadedir. Katalaz enzimi için turnover sayısı = 4×10^7 s^{-1}'dir. Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25 °C'de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).

1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler şunlardır:

1.2.1. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

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

1.2.2. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

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

1.2.3. Sıcaklığın Etkisi

Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklık ile artar. Sıcaklığın her 10°C artması ile reaksiyon hızı ortalama iki kat artar. İn vitro enzim reaksiyonları çoğu zaman 37 – 40°C'de yapılır. Bu sıcaklıkta reaksiyon hızı oda sıcaklığındakine oranla dört kat daha fazladır. Fakat belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra, enzimler denatüre olurlar ve etkilerini kaybederler. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir.

1.2.4. pH Etkisi

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

1.2.5. Zamanın Etkisi

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

1.2.6. Reaksiyon ürünlerinin etkisi

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

1.3. Enzimlerin saflaştırılması

Enzimlerin kullanım alanları her geçen gün artmakta olup ekonomik ve etkin tekniklerle üretilmesini daha da önemli kılmıştır. Enzimlerin aminoasitlerden kimyasal sentezleri uygulamada çok sınırlı olup ekonomik değildir. Ticari olarak satılan enzimler biyolojik kaynaklardan izole edilmektedir.

Biyoteknoloji alanındaki gelişimler enzimlerin kullanım alanlarını arttırmış ve yeni uygulama alanlarının da ortaya çıkması ile enzimlerin saf olarak elde edilmesi büyük önem kazanmıştır.

Enzimler bitkisel, hayvansal, mikrobiyal ve özel durumlarda da insan (kan) kaynaklı olabilirler.

1.3.1. Hücre parçalanması

Fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılır

Hücre tipine göre farklılaşan parçalama teknikleri Çizelge 1.1 de özetlenmiştir.(Eraslan ve ark , 2000)

Çizelge 1.1 Hücre parçalama teknikleri

Ilımlı Teknikler	**Hücre Tipi**	**Nasıl Etkilendiği**
Hücre Parçalama	Eritrositler	Hücre membranının osmotik basınç farkı ile parçalanması
Enzimlerle	Bakterilerin lizozim ile muamelesi	Hücre duvarı yıkımı. Osmotik basınç farkı ile membran parçalanması
Kimyasal çözünürleştirme/Otoliz	Mayaların toluen ekstraksiyonu	Hücre duvar membranların kimyasal olarak otoliziyle litik enzimlerin çıkışı
Ezici homojenizatör	Karaciğer dokusu	Sıkıştırma ile ezilerek hücre membranının yırtılması
Kıyıcı homojenizatör	Kas dokusu	Kıyma kuvvetleri ile hücre parçalanması
Normal Teknikler	**Hücre Tipi**	**Nasıl Etkilendiği**
Bıçaklı homojenizatör	Kas dokusu hayvansal ve bitkisel dokuların çoğu	Doğrama ve kıyma işlemleri ile hücre parçalanması
Kum, alümina gibi aşındırıcılarla öğütme	Bitkisel dokular ve bakteriler	Hücre duvarlarının sürtünme kuvvetleri ile yırtılması
Kuvvetli Teknikler	**Hücre Tipi**	**Nasıl Etkilendiği**
Fransız presi	Bitkisel dokular ve bakteriler	Yüksek basınçla küçük deliklerden geçirme kuvvetiyle ile hücre parçalama
Ultrasound	Hücre süspansiyonları	Yüksek basınçlı ses dalgaları ile parçalama
Bilyalı değirmen	Hücre süspansiyonları	Cam bilyaların hızlı titreşimleri ile parçalama
Malton-Gauling homojenizatör	Hücre süspansiyonları	Fransız presinin büyük boyutlu şekli

1.3.2. Süzme

Çökeleği ortamdan uzaklaştırmak için süzgeç kağıdı kullanılır

1.3.3. Santrifüj ile ayırma

Santrifüj ile ayırmada optimum ayırma tamamen berrak bir üst faz ve paketlenmiş bir şekilde partiküllerin elde edilmesi ile sağlanır. Yüksek tuz kullanarak çöktürme, izoelektrik çöktürme, organik çözücüler ile çöktürme işlemlerinden sonra santrifüj işlemi için yaklaşık 15000*g* / 10 dakika ya da 5000*g* / 30 dakika optimum değerlerdir.

1.3.4. Organik çözücülerle çöktürme

Proteinlerin çoğu, aseton ve etanol gibi suda karışan organik çözücülerin varlığında çöktürülebilir. Çözeltiye organik çözücülerin ilavesi, çözeltinin dielektrik sabitini ve dolayısıyla çözme yeteğini azaltacaktır. Dielektirik sabitindeki düşme, zıt yüklü yüzey alanlarının birbirini daha güçlü çekmesine neden olur. Çözücünün pH' sı proteinin pI değerine yakınsa çökelme daha az çözücü varlığında kolaylıkla meydana gelecektir. Denatürasyonu engellemek için çözücülerle çöktürme işlemi 0˚C' de veya altındaki sıcaklıklarda yapılmalıdır.

Çöktürme amacıyla kullanılan en yaygın kullanılan organik çözücüler aseton ve etanoldür.

1.3.5. Kromatografi

Kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan birçok farklı yöntemi içinde barındıran yöntemdir.

Kromatografide 2 faz vardır :

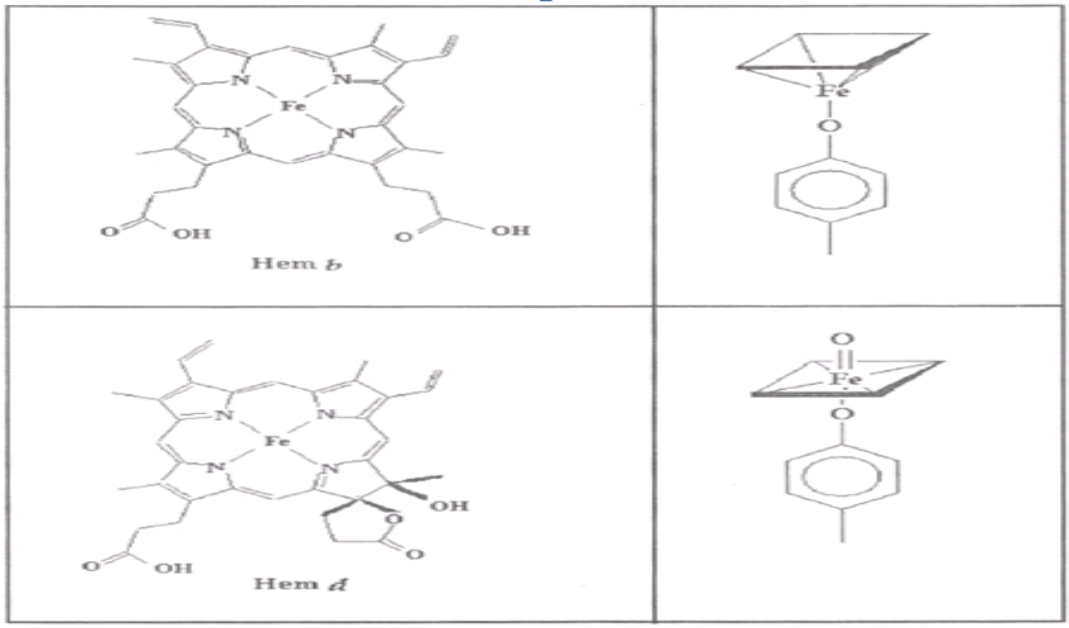
1- Mobil faz (Hareketli faz)
2- Stasyoner faz (Durgun faz)

1.4. Katalaz enzimi

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

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

CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, hidrojen peroksitin ve ROOH gibi bir peroksidi giderek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Çünkü hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikalinin potansiyel kaynağıdır (Huang ve ark, 1983).



Şekil 1.1 Katalaz enziminin hem b hem d grupları

Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesini katalizleyen ve böylece hidrojen peroksitin hücresel bileşiklere zarar vermesini engelleyen koruyucu bir enzimdir. Hidrojen peroksit, katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalinin öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur.

CAT, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak kullanmaktadır (Lanir ve Schejter, 1975; Jones ve Masters 1976; Nicholls ve ark 2000; Robertson, 2004).

Birçok in vivo ortamlarda peroksidaz aktivitesi olarak CAT tercih edilmektedir. CAT kanda, kemik iliğinde, mukoz membranlarda, böbrek ve karaciğer de bulunur. Temel fonksiyonu oksidazlar tarafından ortaya çıkan hidrojen peroksiti ortadan kaldırmaktır.

Birinci adımda katalazın hem demiri H_20_2 ile etkileşerek oksijence zengin demir peroksit oluşturur.

$$\text{CAT-Fe-OH} + H_2O_2 \longrightarrow \text{CAT - Fe – OOH} + H_2O$$

Bileşik I olarak adlandırılan demir peroksit ara ürünü, katalaz heminin spektrofotometrik özelliklerini değiştirdiği için in vitro ve invivo kosullarda tayin edilebilir. Katalazın kinetik özelliklerinden dolayı in vivo koşullarda bileşik - I olarak H_20_2 konsantrasyonlarının indikatörü olarak kullanılır. Hidrojen peroksidin düsük konsantrasyonlarında bileşik-I hidrojen donörü tarafından (örneğin etanol) peroksidatik olarak indirgenebilir.

$$\text{CAT-Fe-OOH} + C_2H_5OH \longrightarrow \text{CAT-Fe-OH} + H_20 + CH_3CHO$$

H_20_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında bilesik - I ikinci H_20_2 ile reaksiyona girerek su ve moleküler oksijen olusturur.

$$\text{CAT-Fe-OOH} + H_2O_2 \longrightarrow \text{CAT-Fe-OH} + H_2O + O_2$$

Yukarıda da anlatıldığı gibi katalitik reaksiyonda iki basamak yer alır:

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

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

1.4.1. Katalazın kullanım alanları

Katalaz, H_2O_2 ‘ i parçalayan bir enzim olduğundan, H_2O_2 ‘ in kullanıldığı ve aşırısının ortamdan uzaklaştırılmasının gerekli olduğu tüm proseslerde kullanılabilir. Ancak enzimin bu proses koşullarında aktivite gösterebilmesi gereklidir.

1.4.1.1. Süt Endüstrisinde Kullanımı

Süt endüstrisinde H_2O_2 koruyucu madde olarak kullanılır. Sütte doğal olarak bulunan ve antibakteriyel enzim olan laktoperoksidaz, aktivite gösterebilmek için H_2O_2’e ihtiyaç duymaktadır. Ancak işlenmeden önce sütte aşırı H_2O_2’nin uzaklaştırılması gerekir. Bu da serbest veya immobilize CAT kullanımı ile olur. H_2O_2 süte derişimi %0,002 olacak şekilde ilave edilir. 30˚C’de 20 dk. muamele edildikten sonra 1000 L süte 20 ünite olacak şekilde eklenir. Böylece H_2O_2’in fazlası parçalanırken , süt enzimleri ve yararlı bakteriler korunur.

1.4.1.2.Oksidazlarla Birlikte Kullanımı

Oksidazların yer aldığı sistemlerde açığa çıkan H_2O_2 uzaklaştırılmak istendiğinde bu enzimler yanında CAT enzimi de kullanılır. Gıdaların konserve yapımı ve paketlenmesinde, yumurta, şarap gibi bazı gıdaların

desakkarifikasyonunda ve glukonik asit üretiminde kullanılan GOD yanında ortamda CAT da bulunmalıdır.

1.4.1.3. Endüstride Kullanımı

H_2O_2 reçine ve plastik üretiminde oksidasyon ve köpükleştirme amacı ile kullanılır. Sterilizasyon amaçlı kullanılabilir. H_2O_2 ‘ in aşırısı CAT ile muamaele edilerek parçalanabilir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yurdanur, (2007), Keten tohumu (*Linum usitatissimum*) ekstraktında katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini incelemiş, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 15,94 U/mg, süperoksit dismutaz enziminin spesifik aktivitesi 2,05 U/mg olarak saptamıştır.

Lokman Ö. ve ark (2005), maydanozdan katalaz enzimini; Amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sephadex A-50 jelinin kullanıldığı iyon değisim kromotografisi ile saflastırmıslardır. Enzimin spesifik aktivitesi 1126 EÜ/mg, optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklık ise 35 °C saptanmıştır.

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

Kailash , (2004), keten tohumundan izole edilen keten lignanı bileşiğinin hipo kolesterolemik ve antiarteriosklerozik etkisini incelemistir. Bu çalısmada keten tohumundan izole edilen enzim homojenatında katalaz enziminin kinetik aktiviteleri incelenmis ve katalaz enziminin davranışları rapor edilmiştir.

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

Mitchell ve ark (1991), lahana iliklerinden (*Trichoplusiani*) katalazı; ethanol-kloroform fraksiyonu ve standart kolon kromotogrofisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi 2,2x105 unite, moleküler ağırlığı 247-259 kDa aralığında saptanmıştır. Enzimin biyokimyasal özellikleri (substrat spesifikliğinin önemi, kinetiği, tersinmez inhibitör olan 3-1,2,4-triazole(AT)ün mekanizmayı inaktive etmesi) saptamıştır.

Beaumont ve ark (1990), patates kökünden (*Solanum tuberosum*) katalazı; AcA-34 ultrajel kolonu ile saflastırmışlardır. Yapılan aktivite çalısmaları sonucu enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 EÜ/mg protein değerinde saptamışlardır.

Bir diğer çalışmada ise enzimin molekül ağırlığı 224 kDa bulunmuştur. Ayrıca bu araştırmada enzim için siyanid ve azid inhibitörleri kullanmışlardır.

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

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

Pazıdan *(Beta vulgaris var cicla)*, roka (Eruca *sativa)* bitkisinden, ısırgan otundan *(Urticadioica)*, ıspanaktan (*S.oleracea cv. gladiatör)*, keten tohumundan (*Linum usitatissimum)*, tatlı su çipurasından *(Tilapia)*, karnabahardan (*Brassica oleracea L.)* ve daha birçok bitki, tohum ve meyveden karakterizasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Gülçin, 2002; Öztürk, L., 2002)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Aldrich firması tarafından sağlanmıştır. Araştırmada enzim kaynağı olarak kullanılan hıyar (*Cucumis sativus*) örnekleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden sağlanmıştır.

Kimyasallar; sığır serum albümin (BSA), amonyum sülfat, hidrojen peroksit, sodyum klorür, bakır sülfat, DEAE-selüloz, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, folin-ciocalteu çözeltisi, sodyum sitrat, Tris HCl, Polyviniylpolypyrolodine, sodyum fosfat

Araç ve gereçler, UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı, analitik terazi , otomatik pipet, santrifüj

3.2. Metod

3.2.1. Katalaz Saflaştırma

3.2.1.1. Katalaz Enzimi İçin Homojenatın Hazırlanması

Homojenat hazırlanmasında -83°C'de dondurularak saklanan 10 g hıyar (*Cucimus sativus*), öğütüldükten sonra %0,5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7,0 olan 25 ml KH_2PO_4 tamponunda homojenize edilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 12.000x*g*'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. (Havir ve McHale 1987).

3.2.1.2. Katalaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Hıyarda (*Cucimus sativus*) bulunan katalaz enzimin homojenatları arasıyla %0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme işlemi sırasında 12.000x*g*'de 20 dakika boyunca yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpernatantta aktivitelere bakılmıştır. Katalaz enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir. Bütün bu işlemler +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı $(NH_4)_2SO_4$ yavaş yavaş eklenmiş her defasında daha önce kalan $(NH_4)_2SO_4$'ın çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

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

M = Katı amonyum sülfat miktarı (g)

V = Çözeltinin hacmi (ml)

S_1 = l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S_2 = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilmiştir. Numune önce 1 M'lık fosfat tamponuna (pH:7,0) karşı 6 saat süreyle diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde ve buz dolabında (+4°C) gerçekleştirilmiştir. Diyaliz bittikten sonra aktivite tayin metotlarında anlatıldığı şekilde aktiviteye bakılmıştır.

3.2.2. Enzim Aktivitesini Ölçülmesi

3.2.2.1. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini

Reaktif olarak 50mM pH=7,0 (4˚C) fosfat tamponu hazırlanmış 20mM H_2O_2 çözeltisi ve katalaz enzimi içeren ekstraktlar kullanılmıştır.

UV küvetlerinin birine 2.9 mL H_2O_2 , diğer küvete ise 50mM pH=7 fosfat tamponu konulmuştur. 25˚C de absorbansı okunmuştur. Bu sıcaklıkta absorbansın 0.450'den 0,400'e düşmesi için geçen süre belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = \frac{3.45}{\text{Zaman (dk)}}$$

Aktivite değeri kullanılan enzim miktarına bölünürse spesifik aktivite bulunur

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Protein miktarı (mg)}}$$

3.2.2.2. Optimum pH' nın belirlenmesi

Optimum pH çalışması için substrat olarak 40 mM'lık H_2O_2 çözeltisi kullanılarak, pH:5,0'ten 8,0'e kadar fosfat tampon aralığında çalışılmıştır. pH 7,3'den 8,9'a kadar Tris/HCl tamponu kullanılmıştır. Ayrıca yine aynı aralıkta 0,1 M'lık Tris/maleat tamponunda da optimum pH çalışması yapılmıştır. Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar çizelge halinde gösterilip, grafikleri çizilmiştir.

3.2.2.3. Katalaz Enzimi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Sıcaklığın katalaz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması H_2O_2 substratıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimin optimum pH'sında ve 0-80°C aralığındaki sıcaklıklarda

çalışılmıştır. İstenilen sıcaklıklar, oda sıcaklığının altında buz banyosunda, oda sıcaklığının üstünde ise ısıtıcılı ve sirkülatörlü su banyosu kullanılarak ayarlanmıştır. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktarılarak, 3 dakika boyunca aktivite ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar şekil 4.4'de grafik halinde verilmiştir.

3.2.2.4. Enzimin Depolama Kararlığı

Optimum pH ve optimum sıcaklıklarda hazırlanan hıyar homojenatı uygun substrat konsantrasyonunda 240 nm'de spektrofotometrik yöntem ile 3 dakika boyunca aktivite ölçümü yapılmıştır. Katalaz enziminin depolanma kararlılığının belirlenmesi amacıyla, aynı enzim homojenatı kullanılmak üzere 12 saat arayla 5 gün boyunca aktivite değerleri gözlemlenmiştir.

3.2.2.5. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry, ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri açıklanan A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A : 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

2) Çözelti B : 0.5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1' lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

3) Çözelti C : 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır (Kullanılacağı zaman taze hazırlanmıştır.)

4) Folin-Ciocalteu çözeltisi : Folin-Ciocalteu saf su ile 1/2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5) Standart protein çözeltisi : 1 mL' de 0.2 mg sığır albümini olacak şekilde % 0.9' luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.

6) Standart proein eğrisinin çizimi : 7 adet deney tüpü alınarak sırayla 0.0 ; 62.5 ; 187.5 ; 250 ; 375 ; 500 µL olacak şekilde standart sığır albümin konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 500 mL' ye tamamlanmış, her tüpe 2.5 ml C çözelltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra her tüpe 1/2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.25 mL eklenmiştir. 30

dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansı köre karşı 750 nm' de okunmuştur. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.6. Katalaz enzimini için Km ve Vm değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

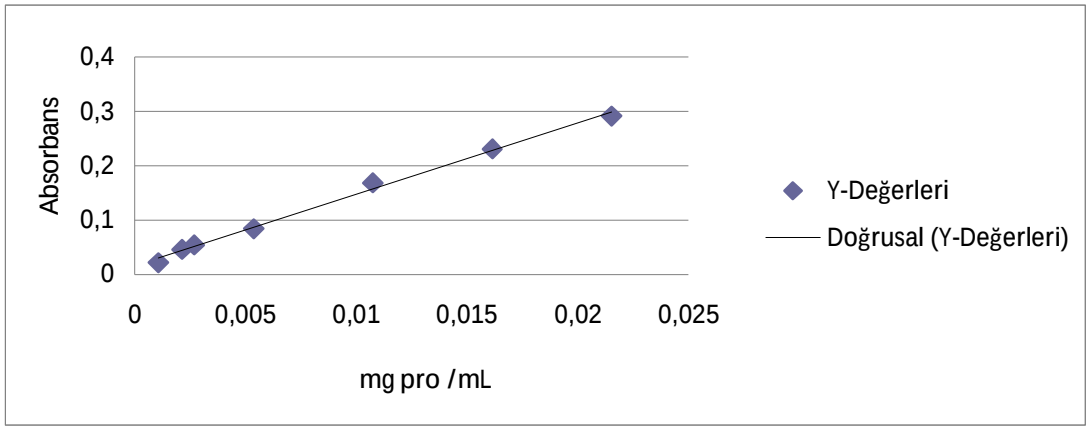
Km ve Vmax değerleri 40 mM'lık stok H_2O_2 substrat çözeltisi kullanılarak çalışılmıştır. Bu stok çözeltiden, değişik hacimler alınarak 3 mL'lik kuartz kuvet içerisinde 40-30-27-25-22-20-17-15-12-10-7-5-2,5 mM H_2O_2 olacak şekilde enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. 240 nm'de ölçülen bu değerler reaksiyon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

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Protein Miktarı ile İlgili Bulgular

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmak üzere protein tayini yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla sığır serum albumini kullanılarak standart protein eğrisi çizilmiştir.



Şekil 4.1. Standart Protein Eğrisi

4.1.2. Hıyar (*Cucimus sativus*) Homojenatlarında Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

10 g hıyar (*Cucimus sativus*), öğütüldükten sonra % 0.5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7 olan 25 mL KH_2PO_4 tamponunda homojenize edilmiştir.

Kaba homojenat tüplere alınarak 12.000*g*'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Santrifuj sonrasında elde edilen çökelti ve supernatantlar toplanarak bir araya getirilmiştir.

Çökeltide aktivite saptanamamıştır. Üst fazdaki protein miktarı 3,99 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 26,56 U/mg olarak bulunmuştur.

4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Çalışmalarında Elde Edilen Bulgular

Hıyarda (*Cucimus sativus*) bulunan katalaz enzimin homojenatları sırasıyla 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme 12.000xg'de 20 dakika boyunca yapılmıştır.

Yapılan çöktürme işleminde maksimum çözeltiye %70'lik $(NH_4)_2SO_4$'da rastlanmıştır.

Çöktürme sonucu elde edilen homojenatla yapılan çalışmanın sonunda protein miktarı 3,19 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivite değeri de 46,51 U/mg olarak bulunmuştur.

Çöktürme işleminden sonra yapılan diyaliz işleminde ise protein miktarı 1,43 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivite değeri de 71,32 U/mg olarak bulunmuştur.

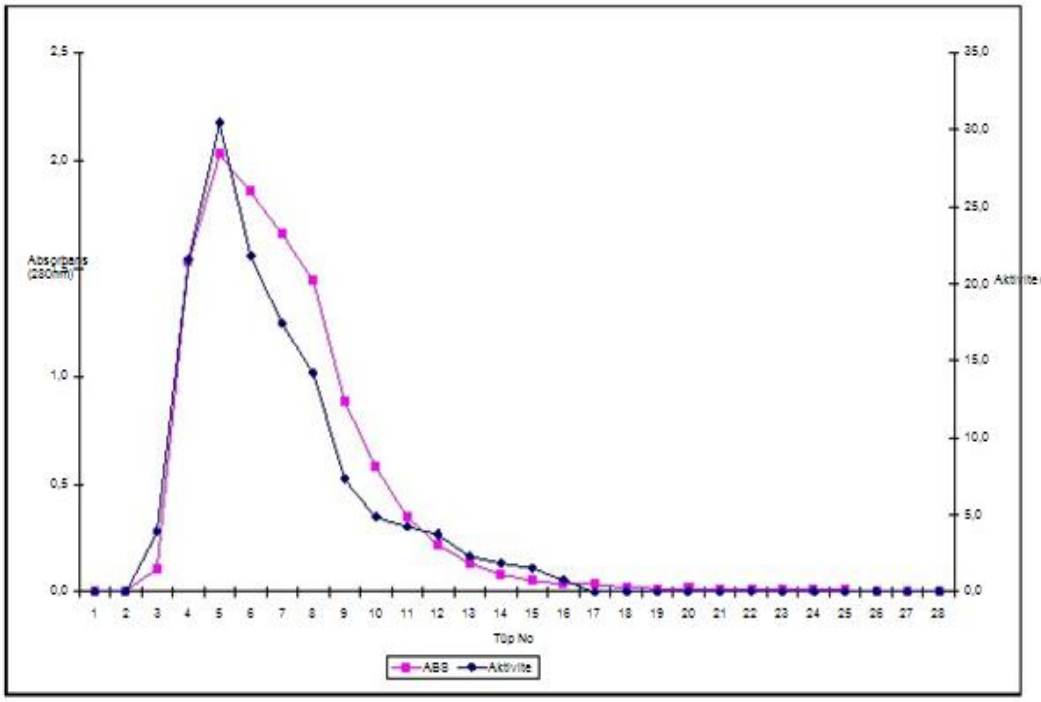
4.1.4. DEAE-selüloz Kromatografisi

Amonyum Sülfat çöktürmesi sonucu oluşan çökelti fraksiyonları pH 7,0 (4 ^{o}C) fosfat tamponu içerisinde çözülmüştür. Daha sonra bu çözeltinin 4 mL'si kolona uygulanmıştır. Örneklerin kolondan alınması, derişimi 0,01-0,2 M derişim aralığında NaCl ile yapılmıştır. Kolondan alınan eluatlar 3'er mL'lik olacak şekilde toplanmıştır.

Çalışma sonucu elde edilen veriler çizelge 4.1' de belirtilmiş Şekil 4.2 de grafiksel olarak verilmiştir

Çizelge 4.1. DEAE-selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve Sigma yöntemi ile belirlenen aktivite değerleri

Tüp no	280 nm deki Absorbans	240 nm de Aktivite
1	0,003	0,000
2	0,007	0,000
3	0,109	3,928
4	1,534	21,565
5	2,032	30,503
6	1,858	21,847
7	1,662	17,457
8	1,448	14,249
9	0,005	7,342
10	0,581	4,952
11	0,350	4,236
12	0,220	3,730
13	0,134	2,310
14	0,002	1,074
15	0,051	1,542
16	0,036	0,774
17	0,034	0,000
18	0,020	0,000
19	0,016	0,000
20	0,015	0,000
21	0,010	0,000
22	0,009	0,000
23	0,009	0,000
24	0,008	0,000
25	0,003	0,000
26	0,001	0,000
27	0,001	0,000

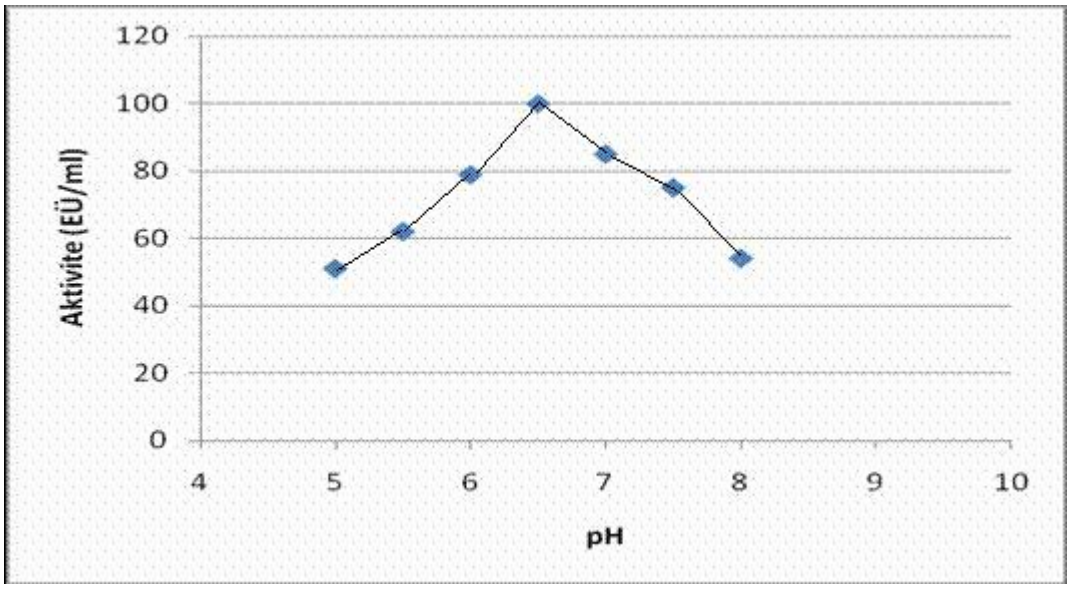


Şekil 4.2. DEAE-selüloz kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve Sigma yöntemi ile belirlenen aktivite değerleri

Kolon uygulaması sonucu elde edilen ve en yüksek aktiviteyi gösteren eluatlar toplanıp aktivite ve protein miktarlarına bakıldığında protein miktarı 0,479 mg/ml, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 393 U/ml olarak bulunmuştur.

4.1.5. Optimum pH'ye Ait Bulgular

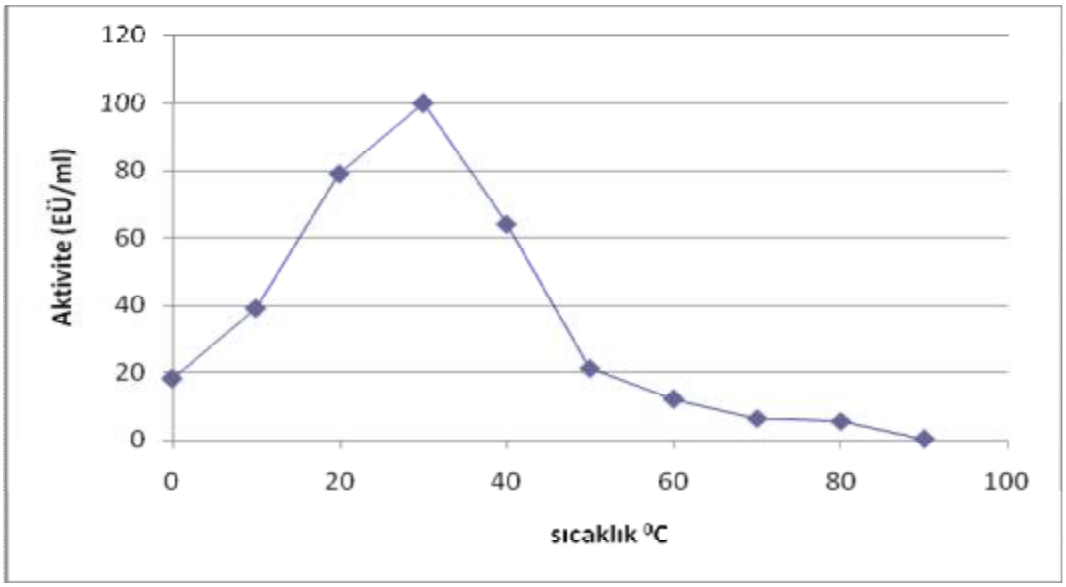
DEAE kolonundan elde edilen en yüksek aktivite gösteren eluatlar kullanılarak yapılan çalışmada katalazın maksimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH değerlerine sahip tamponların (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) 50 mM fosfat tamponuyla 25 ^{o}C de yapılan optimum pH çalışması sonucu elde edilen sonuçlar çizelde 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı pH larda ölçülen spesifik aktivite değerleri

4.1.6.Optimum Sıcaklık ile İlgili Bulgular

Katalaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 0-90 ºC arasındaki sıcaklıklarda çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4.4 de verilmiştir**.**



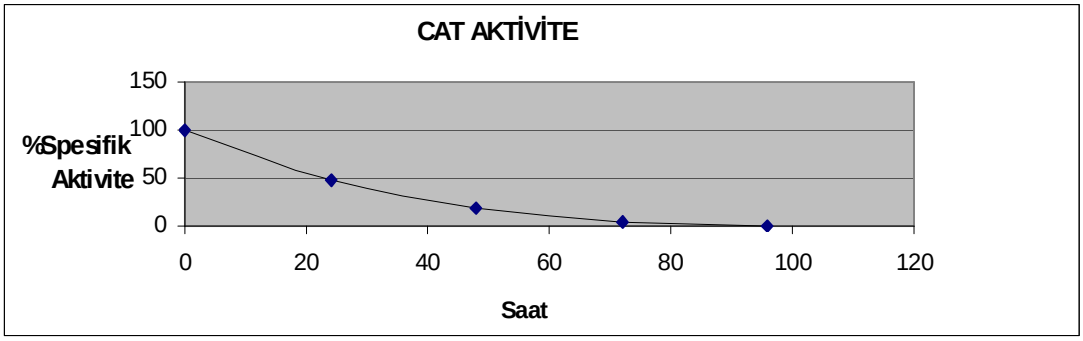
Şekil 4.4 DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri

4.1.7. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığınına Ait Bulgular

Hıyar (*Cucimus sativus*) ile yapılan katalaz enzimi aktivite tayini çalışmalarında enzimlerin kararlılığını belirleyebilmek için DEAE kolonu sonrası en yüksek aktiviteyi gösteren örneklerden yararlanılmıştır. 4 ^{o}C de yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.3 de verilmiştir.

Çizelge 4.2. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı zamanlarda ölçülen spesifik aktivite değerleri

	CAT AKTİVİTESİ
SÜRE	% SPESİFİK AKTİVİTE
İLK GÜN	100,00
24 Saat sonunda	48,30
48 Saat sonunda	19,30
72 Saat sonunda	5,10
96 saat sonunda	0,09

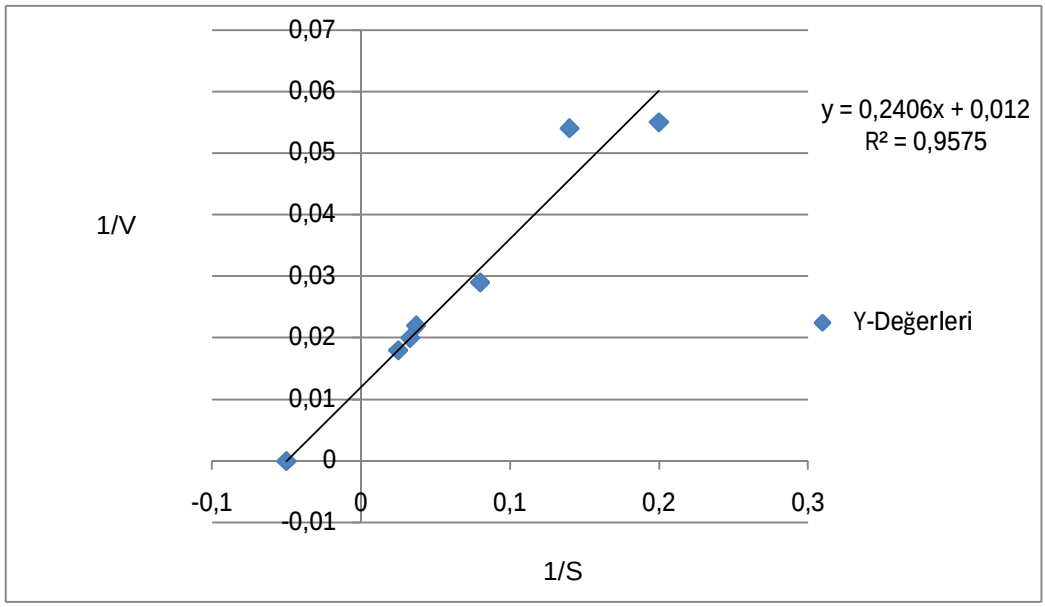


Şekil 4.5 DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı zamanlarda ölçülen spesifik aktivite değerleri

4.1.8 Katalaz Enzimi İçin Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanması

Katalaz enziminin Km ve Vmax değerleri ile ilgili çalışmalar, 40 mM H_2O_2 peroksit çözeltisi ile yapılmıştır. Katalaz enzimi konsantrasyonu sabit tutularak,

hidrojen peroksit için 6 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılmış ve aynı işlemler üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi Lineweaver–Burk grafikleri çizilmiş ve bu grafikten elde edilen doğru denkleminden yararlanarak Km ve Vmax değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.6 DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için Km ve Vmax Grafiği

Çizelge 4.3 Katalaz enzimi için ultra santrifüjden başlayarak DEAE kolonu uygulamasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler

Aktivite tayin basamakları	V_{Tml}	$C_{protein}$ mg/ml	Toplam Proteinmg	Aktivite U/ml	A_T U	Spesifik Aktivite	Saflaştırma Oranı
Santrifüj	11,2	3,99	61,04	144,75	1621,5	26,56	1,00
$(NH_4)_2SO_4$	5,6	3,19	15,68	130,22	87,808	46,51	1,75
Diyaliz	4,6	1,43	7,59	117,6	34,91	71,32	1,53
DEAE-selüloz	4,25	0,479	6,16	8,671	36,85	393	14,72

4.2. Tartışma

Bu çalışmada hıyarda ; antioksidan enzim olan katalazın aktivitesi, depolama kararlılığı, optimum pH ve optimum sıcaklık, Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir.

Kaba homojenat 12000 g'de 20 dakika santrifüj edilip süzüldükten sonra elde edilen süpernatant ile yapılan çalışmalarda protein miktarı 3,99 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 26,56 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Elde edilen homojenatların sırasıyla %0-10 , %10-20, %20-30 ,%30-40, % 40-50 ,% 50-60 amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak katalaz enziminin % 70'de en fazla çöktüğü belirlenmiştir. Daha sonra enzim homojenatı 12 saat aralıklarla 24 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızk uzaklaştırılmıştır. $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi sonunda yapılan çalışmalarda protein miktarı 3,19 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 46,51 U/mg olarak belirlenmiştir.

Hıyar (*Cucimus sativus*) ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında DEAE-selüloz kolonu kullanılmıştır. DEAE-selüloz kolonundan alınan protein örnekleri 1 mL hacmindeki fraksiyonlar halinde 30 tüpe alınmıştır. Alınan eluatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren 4,5,6,7,8 nolu örnekler biraraya toplanmış ve bu karışımda protein miktarı, katalaz enziminin spesifik aktivitesi ölçülmüştür. Örneğin protein miktarı 0,479 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 393 U/mg olarak bulunmuştur. DEAE kolonunda elde edilen eluatlarda katalaz enziminin spesifik aktivitesi başlangıca göre 14,72 kat artış göstermiştir.

Hıyardan (*Cucimus sativus*) elde edilen katalaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacı ile pH 5,0-8,0 aralığında pH'lar ile çalışılmıştır. pH 5,0-8,0 arasında 0,2 M'lık fosfat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Hidrojen peroksit substrat olarak kullanılarak 240 nm'de aktivite ölçümleri yapılmış ve katalaz enzimi için optimum pH 6,5 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, Gülçin (2002) tarafından yapılan ısırgandan (*Urtica dioica*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için pH 7,0 ve Köksal (2003) tarafından yapılan kara lahanadan (*Brassica oleracea L. var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için pH 7,8; I.H. Yörük ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan van elmasından (*Golden Delicious*) saflaştırılan katalaz enzimi için pH 5; Kara (2008) kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*)

katalazın karakterizasyonunda elde edilen katalaz için bulunan pH 7,0 olarak bulunan sonuçlar ile uygunluk göstermiştir.

Hıyardan (*Cucimus sativus*) elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile 0-90ºC aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Çalışmamızın bu aşamasında diyaliz sonrası elde edilen en ideal substrat konsantrasyonu ve optimum pH kullanılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesi sırasında istenilen sıcaklıklar buz banyosu veya sıcak su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık 30 ºC olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, Gülçin (2002) tarafından yapılan ısırgandan (*Urtica dioica*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için 20 ºC; Köksal (2003) tarafından yapılan kara lahanadan (*Brassica oleracea L. var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için 20 ºC; Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (Eruca sativa) kısmi saflaştırılan katalaz için 30 ºC; I.H. Yörük ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan van elmasından (*Golden Delicious)* saflaştırılan katalaz enzimi için 50 ^{0}C; Kara (2008) kabak çekirdeğinden *(Cucurbita moschata)* katalazın karakterizasyonunda elde edilen katalaz için bulunan 25 ^{0}C katalaz enzimleri ile uygunluk içerisindedir.

Hıyar (*Cucimus Sativus*) ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında DEAE-selüloz kolonundan geçen eluatlar arasında, en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler biraraya toplanmış ve bu örnekler için 4 ^{o}C' de yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucu katalaz enzim aktivitesinde 24 saat sonunda % 51,70' lik, 48 saat sonunda % 81,70' lik ve 72 saat sonunda % 94,90' lık aktivite kaybına rastlanmıştır. 96 saat sonunda ise katalaz enziminin aktivitesinin nerdeyse tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu da katalazın depolanma kararlılığının düşük olduğunu göstermektedir.

Linewear-Burk grafikleri çizilerek Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Hıyardan elde edilen katalaz enzimleri için Km değeri 0,01796 M; Vmax değeri ise 76,92 EÜ/mL olarak elde edilmiştir. Gülçin (2002) tarafından yapılan ısırgandan(*Urtica dioica*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için Km değeri 0,00217 M ve Vmax567,73 EÜ/mL; Köksal (2003) tarafından yapılan kara lahanadan (Brassica oleraceaL. Var. Acephala) kısmi saflaştırılan katalaz için Km değeri 0,00159 M ve Vmax 588,2 EÜ/mL; Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (*Eruca*

sativa) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için Km değerini 0,00625M; Havir ve arkadaşları *(Nicotina sylvestis)* katalazı için Km değerini 0,0057 M, Kendall ve arkadaşları arpa yapraklan için yarı maksimum aktivite değerini 0,0018 M olarak rapor etmişlerdir. Kara (2008) kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) katalazın karakterizasyonunda elde edilen katalaz için bulunan Km değeri 0,00209 M Vmax 58,139EÜ/mL olarak rapor etmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yapılan çalışmalar sonucu aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Hıyarın katalazı için kaba homojenat çok yoğun olduğu için aktiviteye bakılmamıştır.
2. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantla yapılan çalışma sonucu katalaz enziminin spesifik aktivite değeri 26.56 U/mg olarak bulunmuştur.
3. Hıyar için amonyum sülfat ile yapılan çökeltme işlemlerinde çökeltiler incelendiğinde maksimum çökeltiye %75' lik tuz derişiminde rastlanmıştır ve spesifik aktivite değeri 46.51 U/mg olarak bulunmuştur.
4. Yapılan diyaliz işlemi sonrasında enzimin spesifik aktivite değerinin 71.32 U/mg'a çıktığı gözlemlenmiştir.
5. DEAE kolon kromatografisi ile yapılan bir sonraki saflaştırma basamağında katalaz enzminin spesifik aktivitesi 393 U/mg olarak tespit edilmiş ve ilk duruma göre 14.72 kat artmıştır.
6. DEAE kolon kromatogrofisi sonucu en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler üzerinde yapılan optimum pH çalışması sonucu enzim için optimum pH' nın 6,5 olduğu görülmüştür
7. DEAE kolon kromatogrofisi sonucu en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler üzerinde katalaz spesifik aktivitesine her 24 saatte bir bakılmış ve 96 saat sonra aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmüştür.

5.2. Öneriler

1. Enzim tayininde farklı yöntemler denenebilir, kıyaslama yapılabilir.
2. Hıyarın kabuğunun dışında iç kısmında da enzim saflaştırılması yapılıp karşılaştırma yapılabilir.
3. Enzimin moleküler ağırlık tayini yapılabilir.

KAYNAKLAR

BİNGÖL, G., Biyokimya. Güven matbaası, 169-174, Ankara, 1983.

BINDER, A., 1977. J. Biol. Chem., 253, 3094-3100

CHU, H., LEEDER, J., GILBERT, S., 1975. Immobilized Catalase Reactor for use in Peroxide Sterilization of Dairy Products. J Food Sci., 40, 641

DİNÇER, A., Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden katalaz enziminin saflaştırılması, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 53, 2000

EISING, R, TRELEASE, R.N. NI, W., Biogenesis of catalase in glioxysomes and leaf-type, peroxisomes of sunflower cotyledons. Archives of Biochemistry and Biophysics; 278: 258-264, 1990.

ERARSLAN, S.; KAZAN, D. ; ÖZTÜRK, D. (2000) Enzimlerin Saflaştırılmasında Temel Yöntemler, III. Uygulamalı Eğitim Kursu Notları

GÜLÇİN, İ., Isırgan otunun (Urtica dioica) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114; 2002

HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J. M., 1990. Methods Enzymology, 186:185.

HAVIR,E. A., MCHALE, N. A., 1987. Plant Physiol,84:450-455

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A., 1987. Purification and Characterization of an isozyme Catalase with Enhanced-Peroxidatic Activity from Leaves of Nicotiana Sylvestris. Archivesof Biochemistry and Biophysics, 283:491-495.

HIGASHI, T., KAWAMATA, F.,SAKAMATO, T., Studies on Rat Liver Catalase. VII. Double-Labeling of Catalase by 14C-Leucine and 3H-d- Aminolevulinic Acid. J Biochem, Tokyo, 76: 703-708, 1974.

HIRASAWA, M., GRAY, K.A., SHAW, R.W., KNAFF, D.B., 1987. Spectroscopic properties of spinach. Biochim. Biophys. Acta., 911(1): 37–44

HUANG A.H.C.,TRELEASE, R.N., MOORE, T.S., Plant peroxisomes, Acedemic press, 213, New York, 1983.

JONES, G.L., MASTERS, C.J., On the comparative characteristics of mammalian catalases. Biochemistry and molecular biology; 55(4): 511-518;1976.

KAILASH, PRASAD, 2004. Hypocholesterolemic and Antiatherosclerotic Effect of

Flax Lignan Complex İsolated from Flaxseed. 179(2):269-275

KARA, D., Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (Cucurbita maxima ve moschata) katalaz enziminin karakterizasyonu. Y.Lisans Tezi; Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Kimya Anabilim Dalı,71,2008 Sakarya

KEHA, E.E., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., Biyokimya, muhtelif kısımlar. Şafak yayınevi ; 36; Erzurum; 1997

KENDALL, A.C., KEYS, A.J. , TUMER, J.C., LEA, J.P., MiFLiN, B. J., The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (Hordeum vulgare L) Planta 159 (6) :505- 511, 1983

KÖKSAL, E., Katalaz enziminin kara lahana bitkisinden (Brassica oleracea L. Var. Acephala D.C.) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazıpeptisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin incelenmesi. Y. lisans tezi; Atatürk Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsi; Kimya Ana Bilim Dalı ;55; 2003.

KREMER, M., 1970. Peroxidatic Activity of Catalase. Biochim Biophys Act. 198, 199

KUNCE, C.M. TRELEASE, R.N., TURLEY, R.B., Heterogenity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. Plant Physiol. 81 (4): 1134-1139; 1986.

LANIR, A., SCHEJTER,A., On the Sixth Coordination Position of Beef Liver Catalase. FEBS Lett. 15, 55 (1): 254–256, 1975

LARDINOIS, O., Reactions of Bovine Liver Catalase with Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide. Free Radic Res 22 (3) : 251-74; 1995.

LEHNINGER, A. L., Principles of biochemistry. Worth publisher, Acedemic pres; 587-665; New York;1982

LOKMAN, Ö ve ark. Katalaz Enziminin Maydanoz (*Petroselinum hortense*) Bitkisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu XIX.Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, 2005

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, Farr AL et al. : Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:261.

MALGORZATA, M., CHRISTOPH, B., KATARYZYNA, S., KRYSTYNA, M., 2005. Antioxidant Enzymes and Isoflavonoids in Chilled Soybean. Journal of Plant Physiology, 162(4): 403-412

MITCHELL, M.J., AHMAD, S., PARDINI, R.S. 1991, Purification and Properties of Highly Active Catalase from Cabbage Loopers, Trichoplusia Ni. InsectBiochemistry, 21(6):641-646

ÖZTÜRK, L., BÜLBÜL, M., ELMASTAŞ, M., ÇİFTÇİ, M., 2005. Katalaz Enziminin Maydonoz (Petroselinum Horsente) Bitkisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası.

ÖZTÜRK , L., Normal şartlarda büyütülen ıspanak (S. oleracea cv. Gladiatör) bitkisinden etafon ve poliamin uygulamalarının oksidatif enzimler üzerine in vivo ve in vitro etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi; Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsi, Kimya Ana Bilim Dalı, 125, 2002

ROBERTSON, D. E., Catalases. U.S.P. No: 20040005655, 2004

SWITALA, J., LOEWEN, P.C., 2002. Diversity of Properties Among Catalases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 401(2): 145-154.

TEKMAN, S., ÖNER, N., Genel kimya, I. cilt, Fatih yayınevi matbaası; 335-367, İstanbul,1986

TEKMAN, S., ÖNER, N., Genel biyokimya dersleri. Fakülteler matbaası, 341-356, İstanbul,1994

YÖRÜK, I. H., SAVRAN, A. ve K. EKİCİ, “Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase from Van Apple (Golden Delicious)”, Asian Journal of Chemistry, 18, 475-480 (2006).

YURDANUR, B, Keten tohumu (Linum Usitatissimum) ekstraktında katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri. Y. lisans tezi, Çukurova Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Anabilim Dalı, 57, Adana, 2007.

ZİYAN, E., Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (Pyrus Communis)’ndan izole edilmesi, saflastırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenemesi. Y.lisans tezi; Ankara Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Anabilim Dalı; Ankara; 1998.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde eğitimine başladı. 2006 yılında mezun olduktan sonra 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.