

**KANTARON (*Hypericum perforatum L.*) BİTKİSİNDE
MYROSİNAZ ENZİMİNİN TANIMLANMASI VE
ENZİM ÜZERİNE BAZI KOZMETİK VE İLAÇ
ETKEN MADDELERİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Ülkü KAPLAN
Yüksek Lisans Tezi
Prof. Dr. Nazan DEMİR
2010
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KANTARON (*Hypericum perforatum L.*) BİTKİSİNDE MYROSİNAZ
ENZİMİNİN TANIMLANMASI VE ENZİM ÜZERİNE BAZI
KOZMETİK VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ülkü KAPLAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2010

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Nazan DEMİR danışmanlığında **Ülkü KAPLAN** tarafından hazırlanan bu çalışma **16 / 07 / 2010** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nazan DEMİR

İmza: 

Üye : Prof.Dr. Yaşar DEMİR

İmza: 

Üye : Yrd.Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(İmza)

Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Ömer AKBULUT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KANTARON (*Hypericum perforatum L.*) BİTKİSİNDE MYROSİNAZ ENZİMİNİN TANIMLANMASI VE ENZİM ÜZERİNE BAZI KOZMETİK VE İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ülkü KAPLAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Myrosinaz (tiyoglikozid glukohidrolaz, EC 3.2.3.1), glukozinolat moleküllerini hidrolizlemekte ve glukoz, ve aglikon grupları ürün olarak açığa çıkmaktadır. Bu çalışmada Mersin yöresinde doğal olarak yetişen ve şifalı olarak bilinen kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Enzim 3 basamakta saflaştırıldı. İlk basamakta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı, 2. basamakta Sephacryl S-200 anyon değiştirici kromatografisi kolonu kullanıldı ve 3. basamakta ise concavalin A sepharose afinite kromatografisi kullanılarak enzim saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE elektorofezi uygulandı.

Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri tespit edilerek sinigrin substratı için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

Enzim aktivitesi üzerine Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} (10mM, 1mM ve 0,1mM) kationlarının ve askorbik asit, EDTA ve SDS (10mM, 1mM ve 0,1mM) bileşiklerinin etkileri araştırıldı. Bunlara ek olarak kozmetikte kullanılan pantenol, cephalotin, betamethasone, linoleik asit ve E vitamininin (10mM, 1mM ve 0,1mM) ve cilt kanseri tedavisinde etkili olan TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ (500 ppm) moleküllerinin etkileri araştırıldı.

Sonuçlar canlıların bu zararlı UV ışınlarından hem korunması, hem de cilt kanseri oluşumundan sonra tedavi aşamasında, ilaç ve güneşin zararlı ışınlarından koruma amaçlı kozmetiklerin yapımında, myrosinaz enzimi içeren bitki ekstraktlarının veya saf enziminin çok faydalı olabileceğini gösterdi.

2010, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: Myrosinaz, Kantaron (*Hypericum perforatum L.*), Saflaştırma, Karakterizasyon, Cilt Kanseri

ABSTRACT

Master Thesis

DEFINATION OF MYROSINASE ENZYME FROM CENTAURY (*Hypericum perforatum L.*) PLANT AND ON ENZYME OF SOME COSMETICS AND DRUG ARTICLE EFFECTS INVESTIGATION

Ülkü KAPLAN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Myrosinase (β -thioglucoside glucohydrolase; EC 3.2.1.147) hydrolyzes glucosinolates to form an aglucone and D-glucose. In this study; the myrosinase enzyme was purified and characterized from centaury (*Hypericum perforatum L.*), which grows naturally in certain rural regions of Mersin. Three different step were used for purification of enzyme. First step was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation. Secand step was Sephacryl S-200 anion exchange chromatography and finally was used Concavali A affinity chromatography. SDS-polyacrilamide gel electrophoresis was applied for control of enzyme purified

K_M and V_{\max} values for sinigrin substrate were determined after setting optimal pH and temperature conditions of protease enzyme.

Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} (10 mM, 1 mM ve 0,1 mM) cations and ascorbic acid, EDTA and SDS (10 mM, 1 mM ve 0,1 mM) on enzyme activity were researched. In addition to, effects pantenol, cephalotine, betamethasone (10 mM, 1 mM ve 0,1 mM) that used in cosmetic and TA_1 , TA_2 , TA_3 , TA_4 , TA_5 , TA_6 , TA_7 , TA_8 , TA_9 and TA_{10} (500 ppm) that benefit in treatment skin cancer.

The results showed that the myrosinase enzyme can be used for benefited both protected from dangerous UV light and medical treatment of living creatures as medicine and cosmetic.

2010, 64 page

Keywords: Myrosinase, Centaury (*Hypericum perforatum L.*), Purification, Characterization, Skin cancer.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımın her safhasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her türlü desteği sağlayan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR'e

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e ve bazı etken maddeleri temin eden Eczacılık Fakültesi Dekan Yrd. Sayın Prof. Dr. İnci GÜL'e

Birlikte laboratuvarında çalıştığım grup arkadaşlarıma ve

Çalışmamın tüm safhalarında bölüm imkanlarını tarafımıza sunan Fen Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Kimya Böl. Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU'na teşekkür ederim.

Ülkü KAPLAN

2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	18
3.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	18
3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları.....	19
3.4. Yöntemler.....	23
3.4.1. Protein tayini	23
3.4.1.a. Kalitatif protein tayini	23
3.4.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini	23
3.4.2. Kantaron bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırılması.....	24
3.4.2.a. Bitki örneklerinin toplanması	24
3.4.2.b. Homojenatın hazırlanması	24
3.4.2.c. Amonyum sülfat çöktürmesi	25
3.4.2.d. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden hazırlanan homojenatın Sephacryl S-200 ve Concavalin A kolununa tatbiki ve myrosinaz enziminin elüsyonu.....	26
3.4.3. Myrosinaz enziminin aktivite tayini.....	26
3.4.4. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile myrosinaz enzimin saflığının kontrolü	26
3.5. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar	28
3.5.1. Optimum pH'nın belirlenmesi	28

3.5.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	29
3.5.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini	29
3.5.4. K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	30
3.5.5. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bazı bileşiklerin etkisinin belirlenmesi	31
3.5.6. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin araştırılması.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart eğri	35
4.2. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırılma sonuçları.....	36
4.2.1. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden myrosinaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	36
4.2.2. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden myrosinaz enziminin Sephacryl S-200 iyon değişim ve Concavalin A afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları.....	37
4.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	38
4.4. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmaların sonuçları.....	39
4.4.1. Myrosinaz enziminin optimum pH sonuçları	39
4.4.2. Myrosinaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	40
4.4.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları.....	41
4.4.4. K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması.....	43
4.4.5. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bileşiklerin etkisinin belirlenmesi sonuçları.....	44
4.4.6. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin belirlenmesi sonuçları.....	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	63

ÖZGEÇMİŞ.....	65
---------------	----

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Dak.	Dakika
E	Enzim
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EP	Enzim-ürün kompleksi
ES	Enzim-substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
E.Ü.	Enzim ünitesi
g	Gram
His	Histidin
I	İnhibitör
Nm	Nanomolar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
S	Substrat
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
TA ₁	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-fenilprop-2-en-on
TA ₂	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-p-tolilprop-2-en-on
TA ₃	1-(4-metoksifenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on
TA ₄	1-(4-klorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on
TA ₅	1-(4-bromofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on
TA ₆	1-(4-florofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on
TA ₇	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on
TA ₈	2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-on

TA₉	1-(2,4-diklorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)prop-2-en-1-on
TA₁₀	1-(furan-2-il)-3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-on

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimin yapısı	1
Şekil 1.2. Anahtar Kilit Modeli	4
Şekil 1.3. Feedback inhibisyonu	8
Şekil 1.4. Myrosinaz enziminin üç boyutlu yapısı	10
Şekil 2.1. Glikozinolatların myrosinaz enzimi katalizörlüğünde hidrolizi reaksiyonu	12
Şekil 2.2. Glikozinolatların myrosinaz enzimi katalizörlüğünde farklı pH' larda hidrolizi reaksiyonu.....	14
Şekil 2.3. Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>) bitkisi.....	16
Şekil 3.1 TA _x bileşiklerinin açık yapısı	32
Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik	35
Şekil 4.2. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin Concavalin A afinite kromatografisi ile elüsyon grafiği.....	37
Şekil 4.3. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı.....	39
Şekil 4.4. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine pH'nın etkisi	40
Şekil 4.5. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan enzimi üzerine sıcaklığının etkisi	41
Şekil 4.6. Standart proteinlerin jel filtrasyon grafiği.....	42
Şekil 4.7. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorban grafiği	42
Şekil 4.8 Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin sinigrin substratıyla elde edilen Linewear-Burk grafiği	44
Şekil 4.9 Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Cu ²⁺ 'in etkisi	45

Şekil 4.10. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} 'nin etkisi.....	45
Şekil 4.11. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'un etkisi.....	46
Şekil.4.12. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{2+} 'in etkisi.....	46
Şekil 4.13. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.....	47
Şekil 4.14. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'un etkisi.....	47
Şekil 4.15. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi.....	48
Şekil 4.16. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi.....	48
Şekil 4.17. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine Pantenol 'ün etkisi	49
Şekil 4.18. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine cephalotine'in etkisi.....	50
Şekil 4.19. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine betamethasone'nun etkisi.....	50
Şekil.4.20. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine linoleik asit'in etkisi.....	51
Şekil 4.21. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine E vitamini'nin etkisi.....	51
Şekil 4.22. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA_1 'in etkisi.....	52
Şekil 4.23. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA_2 'nin etkisi.....	52
Şekil 4.24. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA_3 'nin etkisi.....	53
Şekil 4.25. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA_4 'ün etkisi.....	53

Şekil 4.26. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA ₅ 'in etkisi.....	54
Şekil 4.27. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA ₆ 'nin etkisi.....	54
Şekil 4.28. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA ₇ 'nin etkisi.....	55
Şekil 4.29. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA ₈ 'in etkisi.....	55
Şekil 4.30. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA ₉ 'nin etkisi.....	56
Şekil 4.31. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L.</i>) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA ₁₀ 'un etkisi.....	56

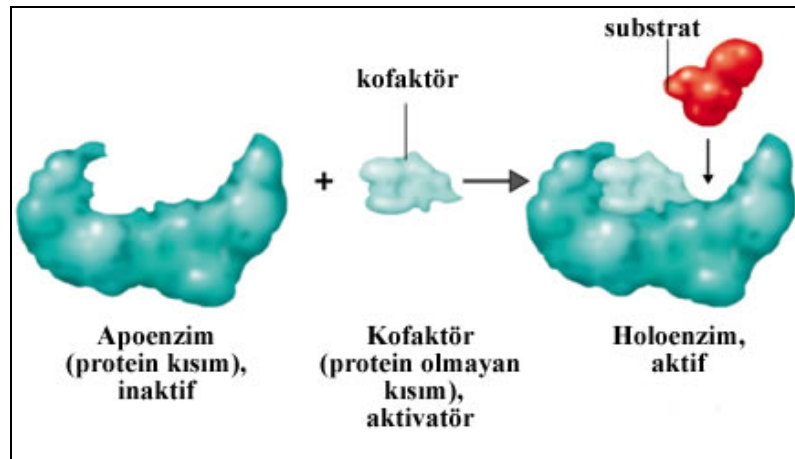
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler.....	2
Çizelge 1.2. Taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler	3
Çizelge 4.1. Kantaron (<i>Hypericum perforatum L</i>) bitkisinden elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan myrosinaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	38

1. GİRİŞ

Enzimler kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan protein yapısındaki moleküllerdir. Enzimler hücre içerisinde meydana gelen tepkimelerin hızını ve özgülüğünü kendileri değişikliğe uğramadan düzenleyebilirler. Her metabolik reaksiyon enzimler tarafından kontrol edilip hızlandırılır. Reaksiyonun başlangıç aşamasında enzimin etki ettiği madde substrat, reaksiyon sonucu açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. Enzimler yüksek sıcaklıklarda protein yapısı bozunduğu için etkilerini kaybederler (Bhat 2000).

Enzimler, molekül ağırlıkları 6000 ile 600000 arasında değişen uzun aminoasit zincirleridir. Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelendiğinden her enzimin aminoasit dizilimi kendine özgüdür. Bu nedenle her enzim farklı bir üç boyutlu yapıya sahiptir (Demirsoy 1989). Bazı enzimler sadece protein yapılarından (pepsin ve üreaz gibi) oluşmasına rağmen, enzimler genellikle yapılarında bileşim ve işlev olarak birbirinden farklı, apoenzim ve koenzim diye adlandırılan iki kısım bulundurlar (Gates 1992).



Şekil 1.1. Enzimin yapısı

Ayrıca enzim moleküllerinde aktif bölge denilen ve substratı bağlamada görev alan özel bir cep ya da yuva bulunur ve bu bölge substrata komplementer olan (üç boyutlu bir yüzey oluşturan) aminoasit yan zinciri içerir (Onat ve Emerk 1997).

Aktif bölge substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan, bağ yapım ve yıkımında görev alan rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup denir. Enzimlerin aktif bölgelerin bazı ortak özellikleri vardır. Bunlar arasında aktif bölgenin üç boyutlu olması, enzim hacmine göre çok daha küçük olması ve spesifik bir bağlanmanın söz konusu olması verilebilir (Onat ve Emerk 1997).

Kofaktör bir metal iyonu (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) olabildiği gibi, “koenzim” denilen kompleks bir organik bileşik (NAD^+ , FAD^+ , coenzim A) de olabilir. Bazen aktivite için her ikisi de gerekebilir. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir. Koenzimler ise geçici taşıyıcı olarak işlev yaparlar ve çoğunlukla diyetle küçük miktarlarda bulunan vitaminlerden türerler. Çizelge 1.2’de taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler ve transfer ettikleri gruplar verilmiştir (Lehninger *et al.* 2005; Voet and Voet 1995).

Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine “holoenzim” adı verilir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştırılan enzim aktivitesini kaybeder. Enzimin yalnız protein kısmını ihtiva eden bu yapıya apoenzim veya apoprotein adı verilir (Onat ve Emerk 1997).

Çizelge 1. 1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler

Kofaktör	Enzim
Cu^{2+}	Sitokrom oksidaz
Fe^{2+} ve Fe^{3+}	Sitokrom oksidaz, Katalaz, Peroksidaz
K^+	Piruvat kinaz
Mg^{2+}	Hekzokinaz, Glukoz 6- fosfataz, Piruvat kinaz
Mn^{2+}	Arjinaz, Ribonükleotit redüktaz
Se^{2+}	Glutasyon peroksidaz
Zn^{2+}	Karbonik anhidraz, Karboksipeptidaz

Çizelge 1. 2. Taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler

Koenzim	Transfer edilen grup	Besin öncüsü
Biyositin	CO ₂	Biyotin
Koenzim A	Açıl grupları	Pantotenik asit
FAD	Elektronlar	Riboflavin (B ₁₂ vitamini)
NAD ⁺	Hidrür iyonu (H ⁻)	Nikotik asit (Niyasin)
Pridoksal fosfat	Amino grupları	Pridoksin (Vitamin B ₆)
Tetrahidrofolat	Tek karbonlu gruplar	Folat
Lipoamit	Elektronlar ve açıl grupları	
Tiamin pirofosfat	Aldehitler	Tiamin (vitamin B ₁)

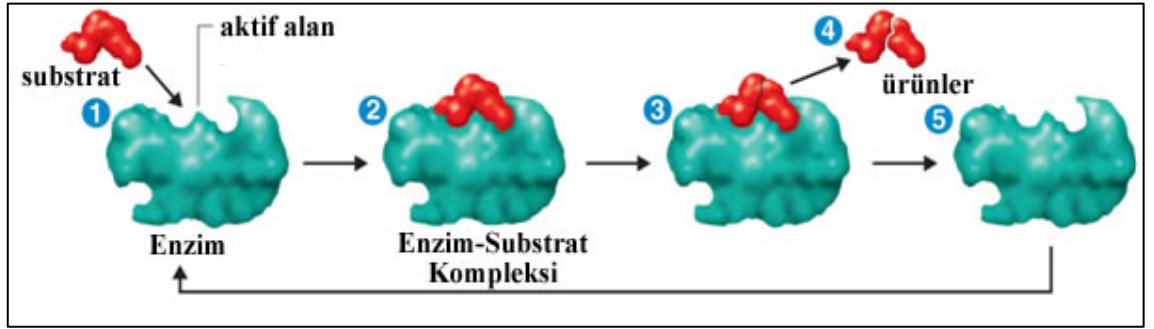
Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'sı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'yı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır (Özata ve Kutlu 2000). Enzimler ortamın asit veya baz olmasına karşı çok duyarlıdırlar. Örneğin, maya sakkarazı pH: 3'ün altında etkisini kaybederken, pepsin pH: 1,5-2,5 arasında en yüksek etkiyi gösterir. Genellikle çok az enzim pH'nın 1'e kadar düşmesine veya 11'e kadar yükselmesine dayanabilir (Keskin 1987).

Enzimli reaksiyonlar üzerine sıcaklığın etkisi iki şekilde görülür. Sıcaklık, enzimatik reaksiyonları hızlandırır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir (Özata ve Kutlu 2000). Belirli sınırlarda 0°C ile yaklaşık 50°C'ye kadar sıcaklık yükselmesi enzim etki hızını artırır, ancak sıcaklık 50-90°C olduğunda proteinler denatüre olur ve enzim etkinliğini kaybeder (Keskin 1987).

Kimyasal reaksiyonların tümünde reaksiyona katılan bileşikler ile ürünleri birbirinden ayıran bir enerji engeli bulunmaktadır. Bu şekilde, reaksiyonların kendiliğinden ve kontrolsüz gerçekleşmesi önlenmektedir. Enzimler, enerji açısından gerçekleşmelerine engel olmayan reaksiyonları, metabolik yollar oluşturacak şekilde yönlendirmektedirler. Katalizledikleri reaksiyonlar sırasında değişikliğe uğrayan enzimler reaksiyonların

bitiminde tekrar eski durumlarına geri dönmektedirler. Belirli reaksiyonların organeller içerisinde diğerlerinden etkilenmeden aynı anda gerçekleşebilmesi için pek çok enzimin hücre içindeki yerleşimi metabolik olayların özelliğine göre düzenlenmiştir (Onat ve Emerk 1997).

Enzimlerin, katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürme ve böylece dengenin yerleşmesini çabuklaştırma özelliğine sahip oldukları termodinamik olarak gözlenmiştir. Şekil 1.2’de gösterildiği gibi bir enzim-substrat kompleksi (ES) ve bundan, asıl reaksiyon sonucu daha sonra Enzim+Ürün’e parçalanacak olan enzim ve üründen ibaret bir kompleks (EP) oluşur. Böylece enzim rejenere edilmiş olur ve substratı ile tekrar reaksiyon verebilir (Lehninger 2005).



Şekil 1.2. Anahtar Kilit Modeli

Enzim katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonlarda reaksiyon hızı enzimsiz olan reaksiyona göre yaklaşık 10^8 - 10^{20} kat hızlanabilir. Katalizsiz olarak yarılanma zamanı 300 yıl olan bir reaksiyon, enzim tarafından 10^{10} kat hızlandırılırsa yarılanma zamanı sadece 1 s olur. Sonuç olarak hücredeki birçok reaksiyonun ancak enzimler sayesinde mümkün olacağı söylenebilir (Lehninger 2005).

Enzimlerin varlıklarını, etkinliklerini, hücrede buldukları yeri, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını belirlemenin en etkin yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Şu ana kadar binlerce enzimin varlığı saptanmış ve bunlara ilişkin aktivite belirleme yöntemleri geliştirilmiştir. Herhangi bir enzim için ideal bir

aktivite belirleme yolu yoktur. Çünkü bir yöntemin uygunluğu bazı faktörlere bağlıdır: Bunların başında, enzimin saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, yerleşim yeri, ölçüm yönteminin maliyeti vb. ile ilgili zorunluluklar gelir (Temizkan 2004).

Enzimler biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktar ölçümleri yerine aktivite ölçümleri yapılmaktadır.

Enzim Aktivitesi: Optimum koşullarda, birim zamanda substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzim Ünitesi (IU): 25°C'de, bir dakikada, optimum koşullarda 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

Katal: 1 saniyede 1 mol substratı katalizleyen enzim miktarıdır. Uluslararası enzim komisyonu tarafından belirlenen yeni bir birim olan katal çok büyük bir miktarı gösterir.

Spesifik Aktivite: 1 miligram protein başına düşen enzim aktivitesine denir. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır.

Turnover sayısı: Birim zamanda bir mol enzimi ürüne dönüştüren substratın mol sayısıdır (Özata ve Kutlu 2000).

Bir enzimin kataliz yeteneğini ve etkinliğini sayısal olarak ifade etmek için onun kinetiğini araştırmak gerekir. Kimyasal kinetiğin temel prensipleri enzimler içinde geçerlidir. Enzim kinetiği bir reaksiyonun hızını belirleyen etmenleri inceler. Bir enzime ait kinetik ölçütlerin belirlenmesinin, enzimin hücre içinde katalizlediği reaksiyonun hızının belirlenmesi, metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayan kontrol noktalarının saptanması, enzim aktivitesi üzerinde inhibitör veya aktivatör etkisi gösteren maddelerin

saptanması, enzimin aktif yerinde bulunan amino asitlerin R yan gruplarının belirlenmesi, enzimin kataliz mekanizmasının aydınlatılması gibi yararları vardır (Temizkan ve Arda 2004).

Enzim aktivitesine etki eden faktörler enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerdir. Enzimler, optimum pH'da ve doygunluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışırlar. Böylece sıfırıncı dereceden bir reaksiyon kinetiği oluşur. Enzimlerin *in vitro* ve *in vivo* olarak aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması veya yok edilmesi olayına "inhibisyon", bu olaya sebep olan bileşiklere de "inhibitör" denilir. İnhibitörler küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır (Telefoncu 1986). Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizmasını oluşturur. Bir çok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır. İnhibitörler enzimli reaksiyon hızlarını azaltan veya tamamen durduran genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır.

Enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur (Altan 2000). Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_M değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi birer denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve lineer karışık tip olmak üzere dört kısma ayrılır.

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör yapısal olarak substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece enzimin substrata bağlanmasını engeller. Substratın konsantrasyonu arttırılarak inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Enzimin V_{max} değeri değişmez çünkü hem enzim- substrat, hemde enzim inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğu için substrat

konsantrasyonunun artması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır ve aynı zamanda K_M değeri artar.

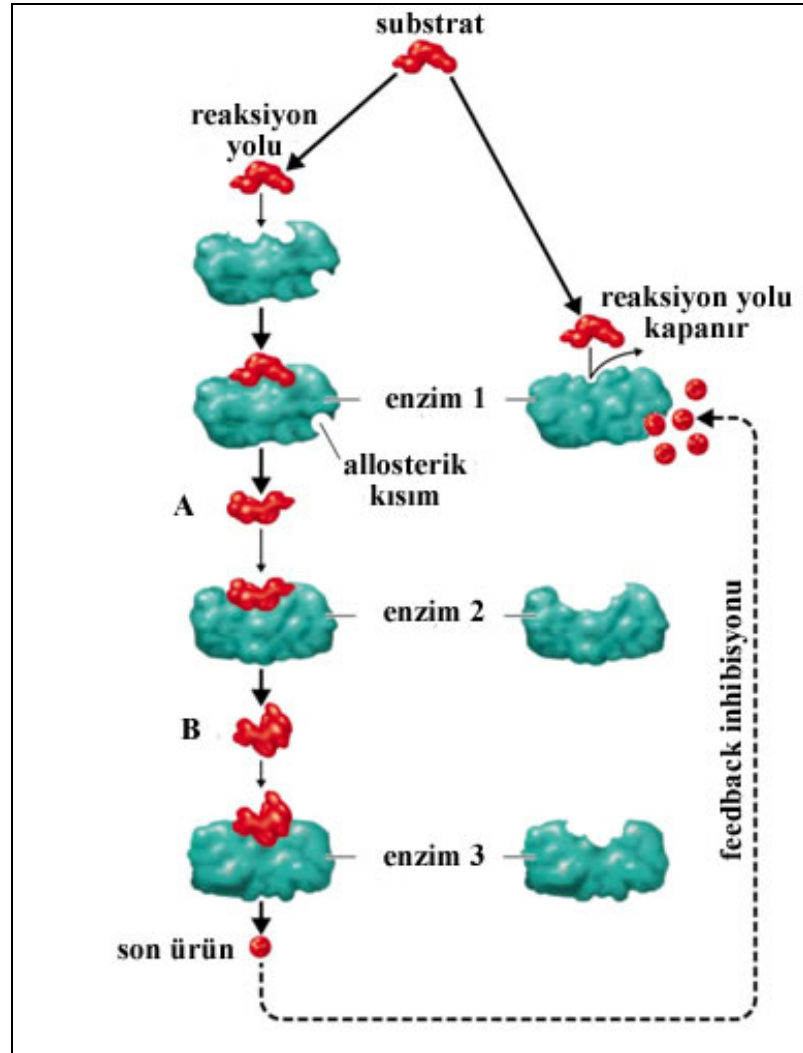
Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanma enzimin farklı bölgelerinde olduğu için burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M sabit kalır. Yarışmasız inhibisyona örnek olarak enzimlerin aktivitelerinde gerekli olan (-SH) gruplarına bazı ağır metal iyonların merkaptan oluşturacak şekilde bağlanmalarını verebiliriz (Stryer 1988).

Yarışmasız inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tür inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır (Segel 1975; Gilbert 1992).

Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil sadece (ES) kompleksine bağlanır. Ortamda enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi sürekli bulunacağından V_{max} düşer. ES kompleksi ortamdaki sürekli uzaklaşacağından enzimin K_M 'si azalır.

Diğer bir inhibisyon çeşiti ise allosterik inhibisyondur ve birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen allosterik enzim adı verilen enzimlerde gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitörler enzimin aktif merkezinden başka yere bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler (Lehninger *et al.* 2000). Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya feed-back inhibisyonu denir (Şekil 1.3).

Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörün enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde; substrat, bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde ise; enzim, substratlardan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörlerden birisi o enzimin substratı, diğerleri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği, Michaelis-Menten kinetiğinden farklılık gösterir (Stryer 1988).



Şekil 1.3. Feedback inhibisyonu

Enzimler önceleri substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek isimlendirilmiştir. Fakat bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiği için uluslararası biyokimya birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E. C.) öngörülmüştür (Yüreğir 1981).

Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir.

Enzimler 6 ana grupta sınıflandırılır.

1. Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup önceden dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar olarak anılan enzimlerdir.

2. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu gruptandır.

3. Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu gruba dahildir.

4. Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

5. İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

6. Ligazlar: Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Örneğin myrosinaz enziminin enzim kod numarası 3.2.3.1'dir. Bu sınıflandırmaya göre myrosinaz enzimi 3. grup olan hidrolazlar ana grubuna dahildir ve glikozit bağlarının parçalandığı hidroliz reaksiyonunu katalize eden bir enzimdir.



Şekil 1.3. Myrosinaz enziminin üç boyutlu yapısı

Enzimlerden sağlık alanında yararlanılması klinik enzimoloji adı verilen yeni bir saha doğmasına yol açmıştır. Klinik teşhis amacı ile kullanılan birçok analitik metotta enzimlerden yararlanılmaktadır. Aynı zamanda değişik dokular, serum, beyin, omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvılarında enzim seviyelerinin ölçülmesi ile birçok hastalık hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir (Stryer 1981; Onat ve Emerk 1997).

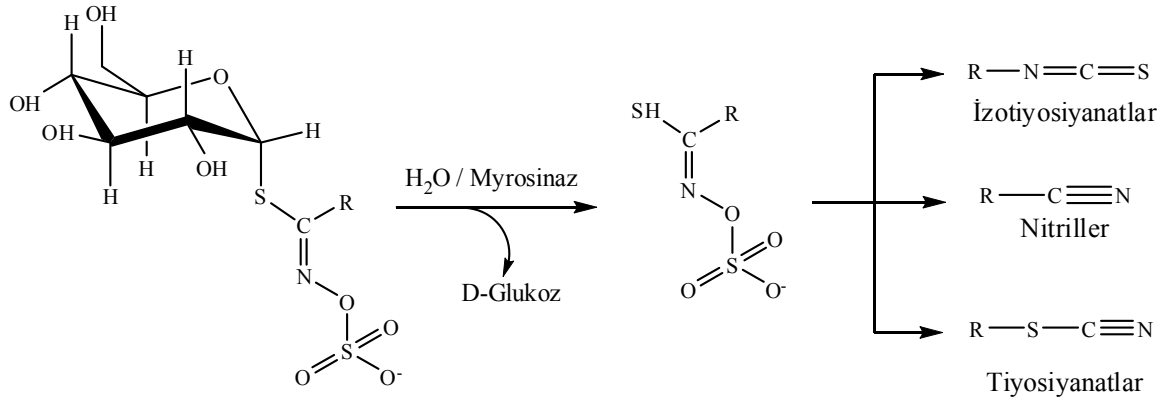
Kanser son derece öldürücü bir hastalık olup çağımızın en büyük sağlık problemlerinden biri kabul edilmektedir. Tedavisi son derece zor ve pahalı bir hastalıktır. Kanserle beslenme arasındaki ilişki ise net bir şekilde ortaya konulmuştur. Son yıllarda myrosinaz enziminin tümör oluşumunu engellemede ve DNA hasarlarının tamiratında görev yaptığının belirlenmesiyle enzimi içeren bitkilerin tüketimi (sebzeler, bazı baharatlar, vs.) son derece büyük önem kazanmıştır. Son yıllarda evre kirliliği ve ozon tabakasında oluşan incelme nedeniyle cilt kanserine yakalanan hasta sayısında da önemli ölçüde artış olmuştur. Bu önemli riskten korunmak ve cilt kanserine yakalanan hastaların tedavisinde myrosinaz enziminin bir ilaç olarak kullanılmasının cilt kanseri tedavisinde yararlı olacağı düşünölmektedir.

Bu amaçla myrosinaz enziminin, toksik olmadığı bilinen ve binlerce yıldır şifalı bir bitki olarak kullanılan kantaron bitkisinden saflaştırılması, bazı kozmetik etken maddeler ve kanser tedavisinde kullanılmak amacıyla sentezlenmiş bir dizi ilaç etken madde ile nasıl etkileştiğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Myrosinaz (tiyoglikozid glukohidrolaz, β -tiyoglikozidaz EC 3.2.3.1) enzimi hidrolazlar grubuna ait bir enzim olup glukozinolat moleküllerini hidrolizlemektedir. Sülfür içeren glikozidler olarak tanımlanan glukozinolatlar turpgillere özgü sebzelerde tespit edilmiştir.

Bu türden sebzeler hasarlandığı veya ısırıldığı zaman glukozinolatlar myrosinaz (tiyoglikozid glukohidrolaz, EC 3.2.3.1) enzimi ile reaksiyona girmektedir. Myrosinaz enzimi glukozinolat moleküllerinin β -tiyoglikozid bağlarını kırmakta ve glukoz, sülfat ve aglikon grupları ürün olarak açığa çıkmaktadır. Aglikonların non-enzimatik reaksiyonları sonucunda izotiyosiyanat, tiyosiyanat ve nitriller meydana gelmektedir (Şekil 2.1). İzotiyosiyanatlar turpgillerde lezzet ve aroma sağlamaktan sorumludurlar (Gatfield and Sand 1983; Wilkinson *et al.* 1984).



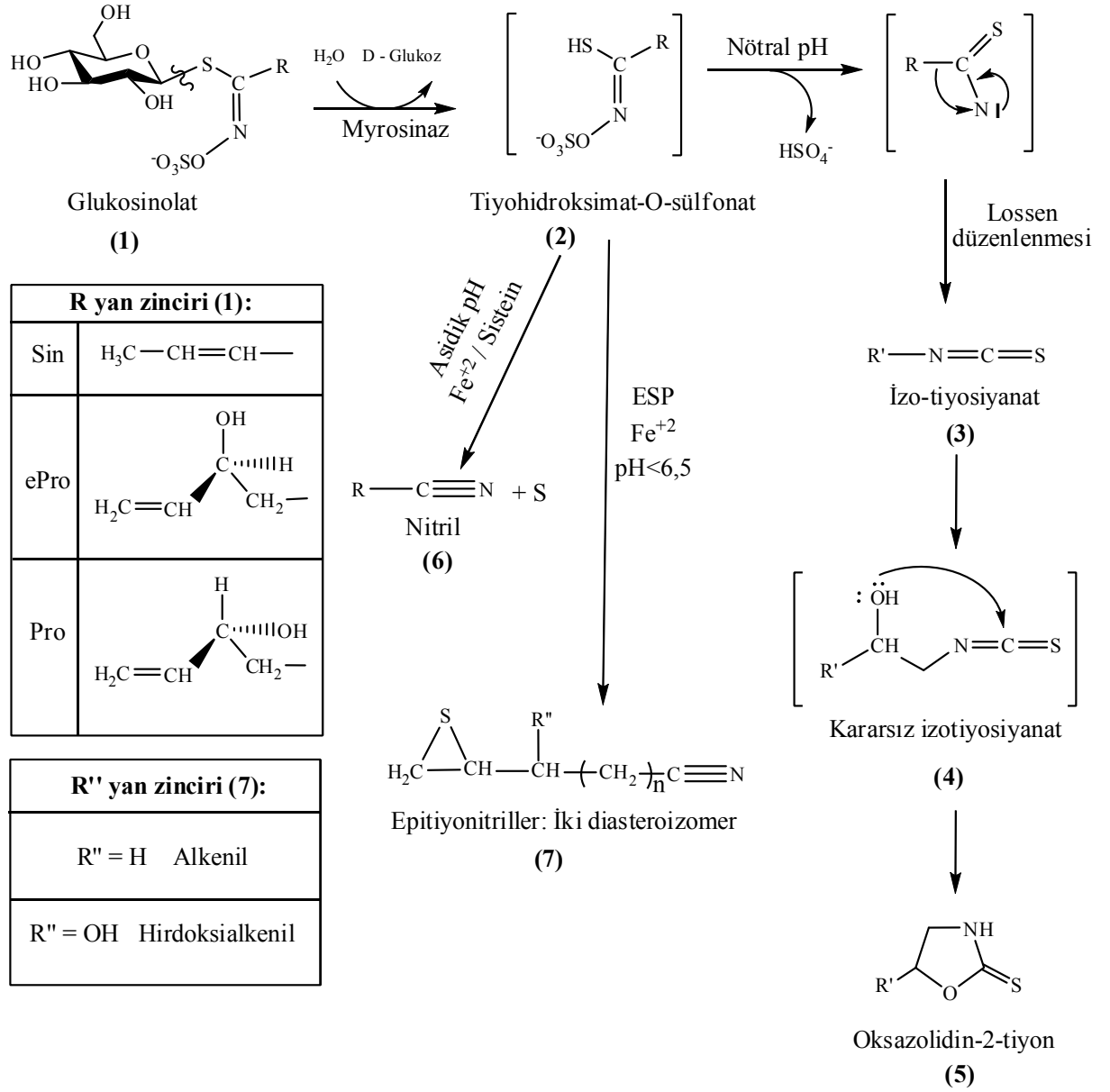
Şekil 2.1. Glikozinolatların myrosinaz enzimi katalizörlüğünde hidrolizi reaksiyonu

Bitkilerde bulunan glukoraphanin (4-metil sülfetilbutil glikosinolat)'ın myrosinaz enzimi ile hidrolizi sonucunda sulforaphane (4-metil sülfetilbutil izotiyosiyonat) ve nitril meydana gelmektedir. Sulforanlar özellikle pek çok türdeki tümör hücrelerini

küçültmekte ve tümörlü dokularla savaşmaktadır (Zhang *et al.* 1994; Talalay and Zhang 1996; Zhang and Talalay 1998; Gamet-Payraastre *et al.* 2000; Liang *et al.* 2006).

Myrosinaz, insan ve hayvan hücre modellerinde çeşitli kanser tiplerini azaltan glukosinolat üretmektedir. Myrosinaz, bitkilerde böcek saldırılarına karşı bir çeşit savunmadır. İzotiyosiyanatlar (sulforahane, indole 3-carbinol ve allyl isothiocyanates gibi) büyüme inhibisyonuna ve apoptosise neden olan kanser hücrelerinde hücre sel sinyal iletimi yolu üzerine ve biyotransformasyon enzimleri üzerine etkileri sayesinde kanserojen kimyasal metabolizmayı modifiye ederek kanser hücrelerini azaltmaktadır (Xian *et al.* 2007).

Biyoaktif bitkisel kimyasallar olan glukosinolatlar insan sağlığında önemli rol oynamaktadır. Glukosinolat içeren bütün bitkiler ayrıca myrosinaz enzimini içerirler. Bu enzim glukosinolatları aglikon ve D- glukoza hidrolizlemektedir. Kararsız aglikon kendiliğinden proteinlere, demir iyonlarının varlığına, pH'ya ve yan zincire bağlı olarak nitril, tiyosiyanat ve izotiyosiyanat gruplarına ayrılır. Nitril, tiyosiyanat ve izotiyosiyanat grupları bitkilere sadece koku ve tat vermenin yanı sıra sağlığı da iyileştirici etki gösterirler. Bu gruplar tümör oluşumunu engeller ve kalp hastalıklarının önlenmesinde önemli rol oynar (Wu *et al.* 2004).



Şekil 2.2. Glukozinolatların myrosinaz enzimi katalizörlüğünde farklı pH' larda hidroliz reaksiyonu

İzotiyosiyanatlar nötral pH'da üretilmekte iken nitriller düşük pH'da üretilirler. İndol glukozinolatlar (örneğin; 3-indolaseto nitril, 3,3-diindolmetan) (Labague *et al.* 1991) hücrel DNA zedelenmelerini baskılayan veya bloke eden enzimleri uyarmakta, tümör büyüklüğünü ve bazı hormonların etkinliğini azaltmaktadırlar. Ancak, açığa çıkan sülfatın sağlık açısından herhangi bir faydası tespit edilmemiştir (Hasler 2002). İzotiyosiyanat oluşturan tiyoglikozitler kolayca enzimatik hidrolize uğrayabilirler ve

yeni bir moleküler düzen kazanarak hardal yağlarını, glukoz ve sülfatı oluştururlar. Kemotaksonomik karakter olarak da önemli veriler sağlarlar. İzotiyosiyanatların çoğu keskin tadları ile kendilerini belli ederler ve baharat olarak kullanılırlar. Yüksek derişimlerinde tahriş edici ve göz yaşartıcı özellik kazanırlar. Zengin oldukları bitkiler halk arasında ilaç olarak kullanılmışlardır.

Normal olarak öncü tiyoglikozitler, hidrolizlerini sağlayan myrosinaz enzimi ile birlikte özelleşmiş idyoblast hücrelerinde bulunurlar ve hücre parçalanması ile serbest kalırlar. Myrosinase histokimyasal olarak belirlenebildiğinden türlerin izotiyosiyanat için taranması kolaydır.

Glikozitler glukozun R- yan zincirinde farklılık gösteren ve izotiyosiyanat oluşturan elliden fazla üyesi olan bir madde grubudur. Düz veya dallanmış alkil yan zincirleri ile çeşitli şekillerde hidrosillenmiş veya düz monoketoetil, alkil, alkenil gibi türevleri vardır. Bu türevlerin büyük bir kısmı α -amino asit ve α -keto-asit metabolizmalarında rol alır.

İridoid glikozidler, kardenolidler, terpenoidler ve siyanogenik glikozidler bitkilerin savunma sisteminde görev almaktadırlar. Glikozinolatlar myrosinaz enzimi ile beraber hareket etmektedir. Doku hasarı, mekanik hasar veya patojen saldırısı meydana geldiğinde glikozinolatlar myrosinaz enzimi katalizörlüğünde hidroliz edilmektedirler ve bu hidroliz sonucu oluşan ürünler bakterial patojen, nematodlara (iplik kurdu) ve hatta diğer bitkilere karşı da aktiftirler.



Şekil 2.3. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisi

Sarı kantaron (*Hypericum perforatum L.*) çok yıllık bir bitkidir ve üzerinde pek çok sarı çiçeği olan bir çalı türüdür. Asya'dan Amerika'ya kadar dünyanın pek çok ülkesinde doğal olarak yetişir ve ortaçağdan beri güvenle kullanılan bir bitkidir. Bitki 25-60 cm boyunda olup, çok dallıdır ve sapsarı ayrı olduğu halde bir şemsiye biçimindeki çiçekleri 5 parçalı, korolla altın sarısı renkli ve kenarları siyah renkli tüyler ile çevrilidir. Yapraklar ışığa karşı tutulduğunda, yağ guddeleri, parlak noktacıklar halinde kolaylıkla görülür. Myrosinaz enzimi tanen (*tannin*), uçucu yağlar (*carophyllene, pinene, limonene, myrcene*), flavon türevleri (*quercitrin, quercetin, rutin*), hipericin (*hypericin*), karoten (*carotene*), vitamin C ve resin içermektedir. Başta Almanya olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde bu bitki yan etkisiz bir "Doğal Antidepresan" olarak kullanılmaktadır. Depresyon önleyici olarak kullanılmasının nedeni; Sarı kantaronun içerisindeki başta hiperisin olmak üzere ve diğer bileşikler sayesinde, beyin içerisinde sinir uyarılarının iletiminde önemli seviye artışı sağlaması olduğu düşünülmektedir (Uzbay 2008; Demir *et al.* 2005).

Myrosinaz enzimi, kanserlerin önlenmesi ve tümör küçültücü olarak etki göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda, halk arasında iltihap giderici, yara iyileştirici, yatıştırıcı, antidepresan, kramp çözücü, ağrı kesici, antiseptik olarak sıklıkla kullanılan ve toksik olmadığı bilinen kantaron (*Hypericum perforatum L.*) kullanılmıştır (Li *et al.* 2005).

Bu çalışma kapsamında, glikosinolat içeriği olduğu bilinen bitkilerden olan kantaronda myrosinaz enziminin aranması, tanımlanması ve enzim üzerine bazı kozmetik ve ilaç etken maddelerinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Çalışmalarımızda kullanılan Tris (trihidroksimetilaminometan), Concavalin A, Sephacryl, Glukoz tayin kiti, SephadexG-100, standart serum albümin, N,N'-metilen bisakrikamid, Akrilamid, β -merkaptto etanol, amonyum persülfat (PER), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin), izopropil alkol, fosforik asit, SDS (sodyum dodesilsülfat), DTH (ditihoerythreitol), glisin, asetik asit, gliserin, coomassie brilliant blue G-250 ve R-250, bromtimol mavisi, sodyum klorür, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, sodyum fosfat, sodyum nitrit, askorbik asit, protein standartları, hidroklorik asit, sülfürik asit, etanol, metanol, aseton, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) Sigma firmasından sağlanmıştır.

3.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Peristaltik Pompa	:	Masterflex L/S™
pH metre	:	Selectra
Masa Santrifüjü	:	Hettich EBA 20
Derin Dondurucu	:	Il Shim
Spektrofotometre	:	Spekol 1300
Güç Kaynağı	:	Consort EV 231
Kar Makinesi	:	Angelantoni Indusrtrie
Hassas Terazı	:	Denver APX 153
Buzdolabı	:	Arçelik ve Profilo
Elektroforez Tankı	:	Max Fill
Kromatografi Kolonu	:	Sigma
Otomatik Pipetler	:	Volac, Jencons
Çalkalayıcı	:	Ika
Magnetik Karıştırıcı	:	Ika
Su Banyosu	:	Memmert

Karıştırıcı : Heidolph

3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanıldıkları yerler aşağıdaki gibidir.

1- Coomassie brilant blue G–250 renk reaktifi;

0,1 gr Coomassie brillant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2- Aktivite tayini için kullanılan çözeltiler;

20 mM Sitrat tamponu (pH: 4); 1.921gr. soydum sitrat 950 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımıyla çözeltinin pH'sı 4'e ayarlandı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı. 2 N H₂SO₄; 22,4 ml H₂SO₄'den alınıp saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3- Kullanılan substrat çözeltisi;

20 mM'lık Sinigrin; 0.019 gr sinigrin 10 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

4- Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan tampon çözeltinin hazırlanması;

0,05 M'lık Na₃PO₄ içinde 1 mM ditiyoerythritol, (pH: 7); 7,8025 gr Na₃PO₄ ve 0,1542 gr ditiyoerythritol magnetik karıştırıcı yardımı ile 950 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak 0,5 N HCl ile pH: 7'e kadar titre edildi. Son hacim 1 lt'ye tamamlandı.

5- SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

0,65 mL 1M'lık Tris HCl (pH: 6,8), 1 mL %10'luk SDS, 1mL saf gliserin ve 1 mL % 0,1 lik brom timol mavisi karıştırılarak hacimleri saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak

hazırlandı. Bu tampon kullanılmadan hemen önce 1 mL numune tamponuna 50 mikrolitre olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

6- SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu;

1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü ve üzerine %1'lik SDS'den 5 mL ilave edilerek son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

7- SDS poliakrilamid jel elektroforezi için hazırlanan boyama çözeltisi;

0,6 gram Coomassie brilant blue G-250, 6 mL fosforik asit ile magnetik karıştırıcı ile karıştırılırken bu çözeltinin üzerine 10 g TCA, 58 mL su, 15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 15 mL izopropilalkol karışımı çok yavaş bir şekilde ilave edildi.

8- Elektroforezde kullanılan renksizleştirme çözeltisi:

%7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 destile suyun karışımıyla hazırlandı.

9- Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler;

pH: 4-5 aralığında 0,1 M asetat tamponu kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1,36 g CH_3COONa , 80 mL saf suda çözüldü ve çözeltinin pH'sı, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 6-7 aralığında 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1.74 g K_2HPO_4 80 mL saf suda çözüldü ve çözeltinin pH'sı, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 8-9 aralığında 0,1 M Tris tamponu kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1,21 g tris (trihidroksi metil amino metan) 80 mL saf suda çözüldü ve oluşan çözeltinin pH'sı, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10- Amonyum Sülfat çöktürmesi için kullanılan çözeltiler;

20 mM Tris 0,15 M NaCl (pH:7); 2,42 gr Tris ve 8,76 gr NaCl 950 ml saf suda çözüldü ve pH metre yardımıyla pH'sı 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi.

11- İyon değişimi kromatografisi için kullanılan çözeltiler;

20 mM Tris 0,15 M NaCl (pH:7); 2,42 gr Tris ve 8,76 gr NaCl 950 ml saf suda çözüldü ve pH metre yardımıyla pH'sı 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi. 20 mM Tris (pH:7); 2,42 gr Tris 950 ml saf suda çözüldü ve ortamın pH'sı pH metre yardımıyla 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L'ye tamamlandı.

12- Afinite kromatografisi için kullanılan çözeltiler;

20 mM Tris 0,15 M NaCl (pH: 7); 2,42 gr Tris ve 8,76 gr NaCl 950 ml saf suda çözüldü ve pH metre yardımıyla pH: 7'ye ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde saf su eklendi.

13- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bazı bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler;

10 mM'lık $MgCl_2 \cdot 7H_2O$: 0,110 g $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

10 mM'lık $CaCl_2$: 0,055 g $CaCl_2$ saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık $Cu(NO_3)_2$: 0,093 g $Cu(NO_3)_2$ su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık $MnSO_4$: 0,075 g $MnSO_4$ saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık $ZnCl_2$: 0,066 g $ZnCl_2$ saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık Fe_2SO_4 : 1,04 g Fe_2SO_4 saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık Askorbik Asit: 0.088 g Askorbik Asit saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit): 0,073 g EDTA tartıldı ve 25 ml suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık SDS (Sodyum dodesil sülfat): 0,072 g SDS tartıldı ve 25 mL suda çözülerek hazırlandı.

Çalışmalar esnasında kullanılan yukarıdaki çözeltilerden, 1 mM'lık çözeltileri için; 10 mM'lık stok çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı. 0,1 mM'lık çözeltileri için 1 mM'lık çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

13- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine etken maddelerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler;

10 mM'lık Pantenol: 0.020 g Pantenol tartıldı ve 10 ml suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık Cephalotin: 0.041 g Cephalotin tartıldı ve 10 ml suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık Betamethason: 0.039 g Betamethason tartıldı ve 10 ml suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık Linoleik asit: 0.028 g Linoleik asit tartıldı ve 10 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık E vitamini: 0.043 g E vitamini tartıldı ve 10 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

Yukarıdaki çözeltilerden, 1 mM'lık çözeltileri için; 10 mM'lık stok çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı. 0,1 mM'lık çözeltileri için 1 mM'lık çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

500 ppm'lik TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ etken maddeleri 0.007 g tartıldı ve 14 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

3.4 Yöntemler

3.4.1. Protein tayini

3.4.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbanans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapılmakta ve fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbanansları spektrofotometre'de köre karşı okunmaktadır.

3.4.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

Bu yöntemle DEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve homojenatlardaki protein miktarı belirlenir. Bu yöntem coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbanans göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı (2 dakika) gelişmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 mikrogram arasında değişmektedir (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde Şu yöntem takip edilmektedir: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alınmakta ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandıktan sonra tüplere 5 ml renklendirme reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırılır ve 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okunur. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılır ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirilir.

3.4.2. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırılması

3.4.2.a. Bitki örneklerinin toplanması

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisi Mersin iline bağılı Çamlıyayla ilçesinden Mayıs-Haziran döneminde toplanmış ve çalışılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.4.2.b. Homojenatın hazırlanması

Dondurucuda muhafaza edilen bitkiler, ilk önce sıvı azot kullanılarak mekanik olarak parçalanmış ve daha sonra da 50 ml 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.02% sodium azid tamponu içine alındıktan sonra mikser ile homojenize edilmiştir. Manyetik karıştırıcı kullanılarak yarım saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra homojenatlar yarım saat süreyle 5000xg'de satrifüjlenerek bitkilerin posasının protein çözeltilisinden uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.4.2.c. Amonyum sülfat çöktürmesi

Salting out, proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek olan nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin bir araya gelmelerini ve çözeltilerden ayrılarak çökmelerini sağlar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilirler. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, bir tuz olan amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) kullanılır (Temizkan vd 2004).

Homojenatta %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Kullanılan Amonyum sülfatın gram miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\text{Amonyum Sülfat Miktarı(Gram)} = \frac{1,77 \times V \times (S - S_0)}{3,54 - S}$$

V: Enzimli homojenat çözeltilisinin hacmi

S_0 : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Çöktürme esnasında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş katıldı ve manyetik karıştırıcı üzerinde düşük devirde iyice çözünmesi sağlandı. Çözünen tuzlu homojenat santrifüj tüplerine konularak 3000 rpm'de 4°C 'de 30 dak santrifüjlendi. Her bir çöktürmede süpernatant ve çökelek için ayrı ayrı aktivite ölçümü yapılarak enzimin çöktüğü aralık belirlendi. Aktivite görülen çökelekten saflaştırılmaya devam edildi. Homojenatta ve saflaştırmanın bütün basamakları için aktivite ve protein tayini yapıldı.

3.4.2.d. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden hazırlanan homojenatın Sephacryl S-200 ve Concavalin A kolununa tatbiki ve myrosinaz enziminin elüsyonu

Öncelikle enzim havuzu, Sephacryl S-200, 1.5 cmx30 cm boyutunda olan kolona dolduruldu ve kolon 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, %0.02 sodium azide tamponuyla 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar dengelendi. Amonyum sülfattan elde edilen çökelek tampona alındı ve kolona yüklendi. Enzim kolondan aynı tampon ile elüe edildi. Ardından tüm tüplerde aktivite tayini yapıldı. Aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturuldu.

Daha sonra bu enzim havuzu afinite kromatografisi materyali olan Concavalin A ile 12 saat bektetildi ve 1.5 cmx30 cm boyutunda olan kolona dolduruldu. 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, %0.02 sodium azide tamponu ile elüsyon yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu. Bütün kinetik çalışmalarda son basamakta elde edilen enzim havuzu kullanıldı (Jones *et al.* 2001; Palmieri *et al.* 1986).

3.4.3. Myrosinaz enziminin aktivite tayini

Myrosinaz enzim aktivitesi sinigrinin hidrolizlenmesi metodu ile belirlendi. 540 nm'de absorbans şiddeti ölçüldü. Myrosinaz enzim aktivitesi optimal şartlarda 1 dakikada 1 nmol substratın hidrolizlenmesi için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Palmieri *et al.* 1982).

3.4.4. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra kesikli SDS-PADE elektroforezi Laemmli tarafından anlatıldığı gibi uygulanarak enziminin saflığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce saf su ile, sonra da alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara ince tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve parafilm kullanılarak jel hazırlama cihazına konularak sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımı ile döküldü. Jel içinde hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeylerinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar (yaklaşık 30 dak) beklendi. Katılaşınca üst kısmındaki %0,1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığılma jeli üst kısma kadar ilave edildi. Üzerine dikkatli bir şekilde tarak yerleştirildi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü saf su ve yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına akım geçecek şekilde yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı ve toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi ve 3 dakika sıcak su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulmuş enjektör yardımı ile yuvalara ekildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan anot (+) ve üst taraftan katot (-) bağlantıları yapıldı. Önce 100 voltta 1 saat kadar bekletildi. Daha sonra 150 voltta elektroforez bitimine kadar yürütüldü. Elektroforez tankının içerisinden su geçirilerek sistemin soğuması sağlandı.

Elektroforez bittikten sonra akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Jel özel kabına konularak renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar dolduruldu ve 1,5–2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Boyama çözeltisinden çıkarılarak jel renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirilmek sureti ile jelin zemin rengi açılarak protein bantları belirginleşinceye kadar (yaklaşık 24 saat) çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkartılarak tarayıcı yardımı ile bilgisayara aktarıldı (Laemmli 1970).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı; 15 mL Tris-HCl (pH: 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lük amonyum persülfat [(NH₄)₂S₂O₈: (PER)] ilave edildi.

Yığma jelinin hazırlanması ise şöyle yapıldı; 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8)'den 1,24 mL, %30'luk akrilamid %0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7.80 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0.20 mL ilave edildi.

3.5. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar

Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri bulundu. Enzimlerin molekül ağırlıkları ve sinigrin substratı için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine bazı kasyonların ve etken maddelerin etkisi araştırıldı.

3.5.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Optimum pH çalışması Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin substratı sinigrin ile yapıldı. Bu amaçla 20 mM sinigrin çözeltisi hazırlandı. Optimum pH'nın belirlenmesinde pH: 4-5 için asetat tamponu, pH: 6-7 için fosfat tamponu ve pH: 8-9 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. Tampon çözeltilerin pH'sı 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH kullanılarak ayarlandı. Her pH denemesi için bir numune ve bir kör olmak üzere iki tüp hazırlandı. Her bir numune tüpüne 750 µl sinigrin, 250 µl belirli pH'da ki tampon ve 500 µl enzim konuldu. Kör tüplere ise 750 µl sinigrin ve 750 µl belirli pH'da ki tampon konuldu. Bu tüpler 37°C'de su banyosunda bekletildi ve daha sonra 10 dak 100°C'de su banyosunda inkübe edildi. Her bir tüpten 250 µl alındı ve her bir tüpe glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37°C'de bekletildi ve son olarak 1'er ml 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm'de absorbansları ölçüldü. pH: 5'de uygun tampon çözeltilerinde enzimin gösterdiği hidrolaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar grafik halinde Şekil 4.1'de verildi.

3.5.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Optimum pH çalışması, kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi 0-90°C aralığında 10 °C artırılarak belirlendi.

Her sıcaklık denemesi için bir numune ve bir kör olmak üzere iki tüp hazırlandı. Her bir numune tüpüne 750 µl sinigrin, 250 µl sitrat tamponu (pH: 4), 500 µl enzim ve kör tüplere ise 750 µl sinigrin ve ise 750 µl sitrat tamponu (pH: 4) konuldu. Tüpler 40 dak 37°C'de ve 10 dak 100°C'de su banyosunda bekletildi. Her bir tüpten 250 µl alındı ve glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 37 °C'de bekletildi ve son olarak 1'er ml 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm'de absorbansları ölçüldü ve sonuçlar grafik halinde Şekil 4.2'de verildi.

3.5.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Enzim saflaştırıldıktan sonra, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi.

Bunun için önce 3,2187 gram kuru sephadex G-100 200 ml tampon çözelti içerisinde 5 saat süreyle şişirildi. Su trompu kullanılarak hava kabarcıklarından temizlendi. 1x30 cm ebatlarındaki kromatografi kolonuna bir huni yardımı ile önce tampon çözelti dolduruldu. Daha sonra jel materyali bir cam çubuk kullanılarak hava kabarcığı olmayacak şekilde kolona dolduruldu ve kolon paketlenildi. Kolon 24 saat süreyle 0.05 M Na₃PO₄/1 mM ditihio erythritol, pH: 7 tamponu ile dengelendi. Dengeleme işlemine kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi.

Dengelenmiş sephadex G-100 kolonuna konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde standart protein çözeltisi (albumin bovine 66000, carbonic anyhidrase 29000, tyripsin

inhibtör 20000, α -lactalbumin 14200 içeren çözelti) yüklendi. Daha sonra 0.05 M $\text{Na}_3\text{PO}_4/1$ mM ditiyoeritrol (pH: 7.0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu ve sonuçlar grafik halinde Şekil 4.7’de verildi. 5’er mL elüat toplandı. Peristaltik pompa vasıtasıyla akış hızı 20mL/saat olacak şekilde ayarlandı. Spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar elüsyona devam edildi.

Daha sonra molekül ağırlığı tayin edilecek olan saflaştırılmış myrosinaz enzimi kolondan geçirildi ve 0.05 M $\text{Na}_3\text{PO}_4/1$ mM ditiyoeritrol (pH: 7.0) tamponu ile elüe edildi. Elüatların 280 nm’de absorbans değerleri belirlendi ve sonuçlar grafik halinde Şekil 4. 2’de verildi.

3.5.4. K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin hız sabiti (K_M) ve maximum hızı (V_{max})’ın belirlenmesi için substrat olarak sinigrin kullanıldı. Yükselen substrat konsantrasyonuna karşı aktiviteyi bulmak için farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Bu amaçla; her bir numune tüpüne 100 μl , 300 μl , 500 μl , 650 μl ve 750 μl substrat çözeltisinden ilave edildi. Daha sonra numune tüplerine 500 μl saf enzim eklendi ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kör olarak aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı ve son hacim 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Tüpler 40 dak 37°C ’de su banyosunda bekletildi ve daha sonra 10 dak 100°C ’de su banyosunda inkübe edildi. Her bir tüpten 250 μl alındı ve her bir tüpe glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37°C ’de bekletildi ve son olarak 1’er ml 2N H_2SO_4 ilave edildi. 540 nm’de absorbansları ölçüldü.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver Burk eğrileri çizildi. K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla belirlendi.

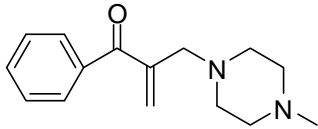
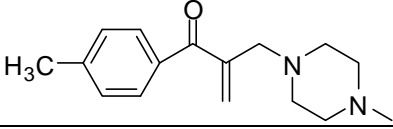
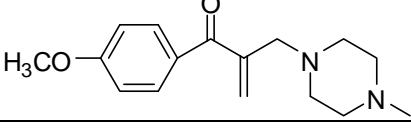
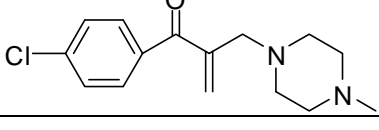
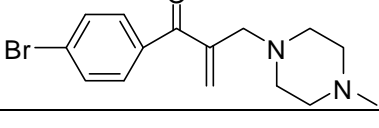
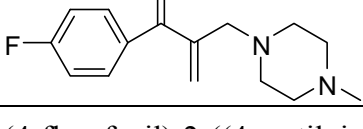
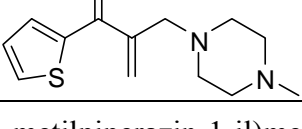
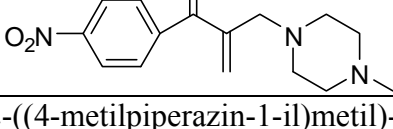
3.5.5. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bazı bileşiklerin etkisinin belirlenmesi

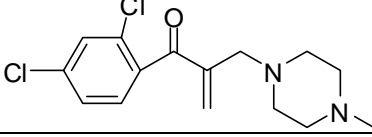
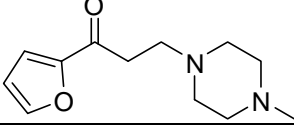
Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} katyonlarının ve askorbik asit ve SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bunun için aktivite sinigrin varlığında belirlendi. Aktivite tayini için 500 μl enzim çözeltilisi, 750 μL sinigrin çözeltilisi, 50 μl , 100 μl , 150 μl , 200 μl ve 250 μl katyon çözeltilisinin toplam hacmi 1,5 ml'ye tamamlanacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kır tüplere enzim yerine 20 mM sitrat tamponu konarak hazırlandı. Tüpler 37°C'de su banyosunda bekletildikten sonra 10 dak 100°C'de su banyosunda inkübe edildi. Her bir tüpten 250 μl alındı ve üzerine 500 μl glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37°C'de bekletildi ve son olarak 1'er ml 2N H_2SO_4 ilave edildi. 540 nm'de absorbansları ölçüldü. Diğer 1 mM ve 0,1 mM katyon çözeltileri için aynı prosedür takip edildi.

3.5.6. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin araştırılması

Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine, kozmetikte ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılan pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin 10 mM, 1 mM, 0,1 mM'de etkisi belirlendi.

Ayrıca cilt kanseri tedavisinde iyileştirici etkisi olduğu bilinen ve aşağıda açık yapıları gösterilmiş olan TA_1 , TA_2 , TA_3 , TA_4 , TA_5 , TA_6 , TA_7 , TA_8 , TA_9 ve TA_{10} molekülleri, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi'nde sentezlenmiş olup, oradan temin edilmiştir. TA_X moleküllerinin etkisi 500 ppm'de belirlendi. Bunun için aktivite, sinigrin varlığında belirlendi.

Formülü	Simgesi
	TA ₁
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-fenilprop-2-en-one	
	TA ₂
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-p-tolilprop-2-en-on	
	TA ₃
1-(4-metoksifenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on	
	TA ₄
1-(4-klorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on	
	TA ₅
1-(4-bromofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on	
	TA ₆
1-(4-florofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil))prop-2-en-on	
	TA ₇
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on	
	TA ₈
2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-on	

	TA₉
1-(2,4-diklorofenil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)prop-2-en-1-on	
	TA₁₀
1-furan-2-il)-3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-on	

Şekil 3.1. TA_x moleküllerinin açık yapıları

Pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitamini denemeleri için kullanılan prosedür şöyledir:

Her üç konsantasyonda aktivite tayini için 500 µl enzim çözeltisi, 750 µl sinigrin çözeltisi, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl ve 250 µl kation çözeltisinin toplam hacmi saf su ile 1,5 ml'ye tamamlanacak şekilde ilave edildi. Kör tüplere enzim yerine sitrat tamponu konuldu. Tüpler 40 dak 37°C'de ve 10 dak 100°C'de su banyosunda bekletildi. Her bir tüpten 250 µl alınarak üzerine 500 µL glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37°C'de bekletildi ve son olarak 1'er ml 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm'de absorbansları ölçüldü. Diğer 1 mM ve 0,1 mM kation çözeltileri için aynı prosedür takip edilmiştir.

TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ molekülleri denemeleri için kullanılan prosedür şöyledir:

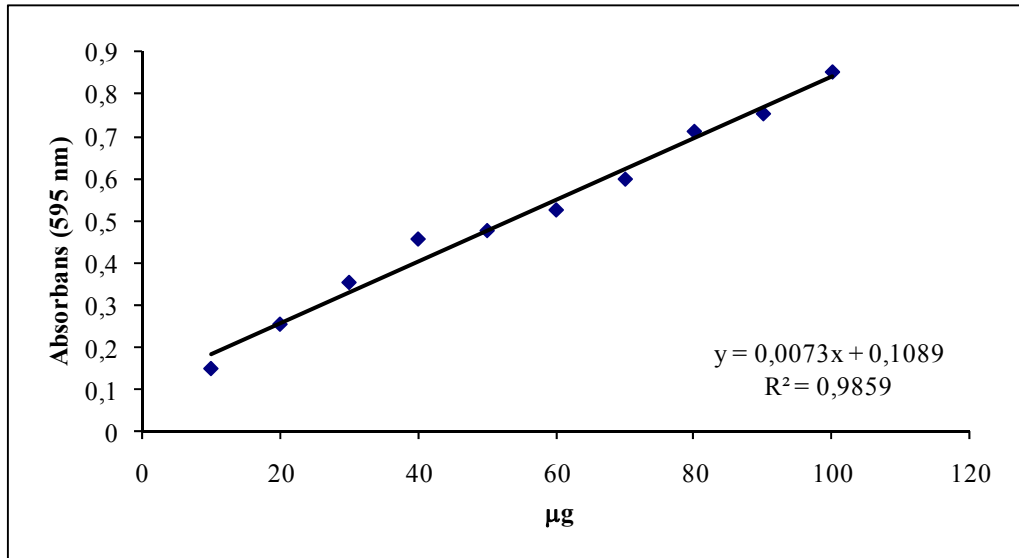
Beş ayrı deney tüpüne 500 ppm 10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl, 100 µl etken madde, 500 µl sitrat tamponu (20 Mm pH:4), 300 µl sinigrin (20 mM), 80 µl saf myrosinaz enzimi ilave edildi ve son hacim saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. Kör tüplere ise etken madde konulmadı. Tüpler 40 dak 37°C'de sonrasında 10 dak 100°C'de su banyosunda bekletildi. Her bir tüpten 250 µl alındı ve 500 µl üzerine glukoz tayin kiti ilave edildi ve

tekrar 40 dak 37°C'de bekletildi. Son olarak 1'er ml 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm'de absorbansları ölçüldü.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart eğri

Kantitatif protein tayininde coomassie brilliant blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie brilliant blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. Standart serum albumin çözeltileri ile hazırlanan homojenatlarda ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbens değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enziminin saflaştırılma sonuçları.

4.2.1. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

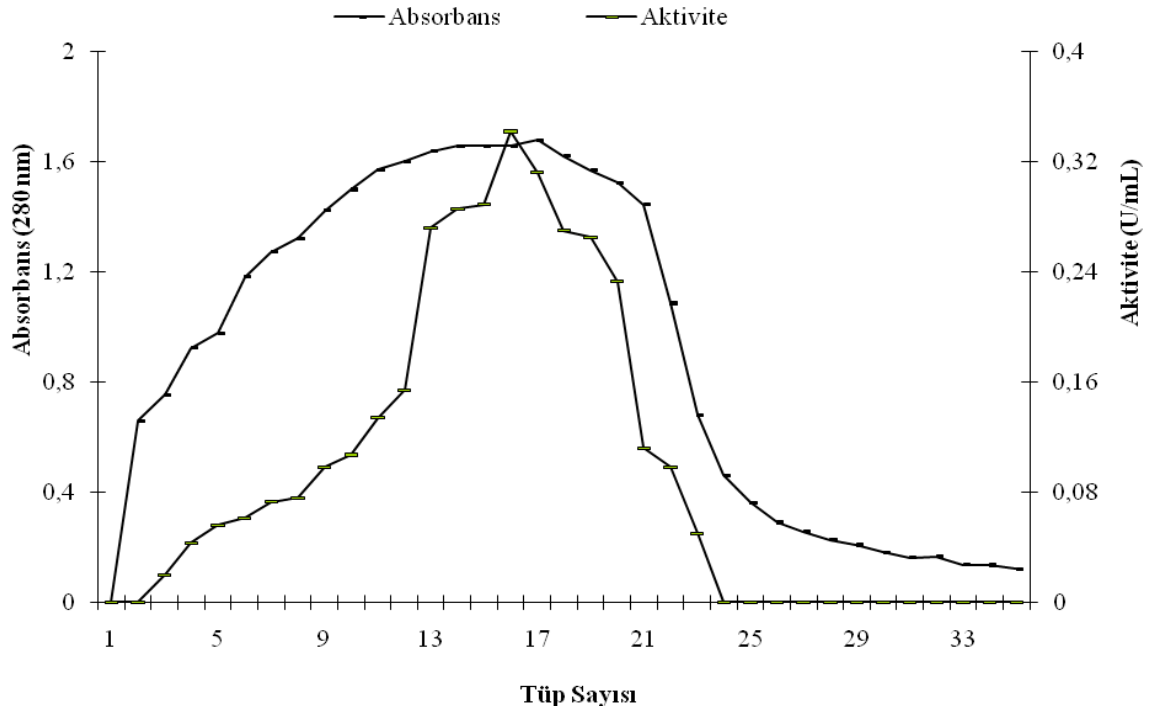
Myrosinaz enzimi kantaron bitkisinden 3 basamakta saflaştırıldı:

1. basamakta homojenatta %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. %40-%70'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çökelek 0.15 M NaCl içeren 20 mM Tris (pH: 7.5) tamponu ile çözüldü, aktivite tayini yapılmışa yüksek myrosinaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

2. basamakta, Sephacryl S200 kolonuna yüklendi. Aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturuldu.

3. basamakta ise bu enzim havuzu Concavalin A afinite kolonuna yüklendi (Jones *et al.*, 2001).

Myrosinaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar karakterizasyon için kullanıldı. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Concavalin A afinite kromatografisi kullanılarak kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin Tris HCl tamponu ile elüsyonu.

*Kolon çapı 1.5 cm ve boyu 30 cm, elüsyon hızı 20 mL/saat ve fraksiyon hacmi 5 mL.

4.2.2. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enziminin Sephacryl-S200 iyon değişim ve Concavalin A afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enzim homojenatı elde edildi. Elde edilen homojenattan ve saf enzimden 1'er mL numune alınarak myrosinaz aktivitesi ve coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre homojenatın Sephacryl S-200 iyon değişim kolonu ve Concavalin A afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterildi.

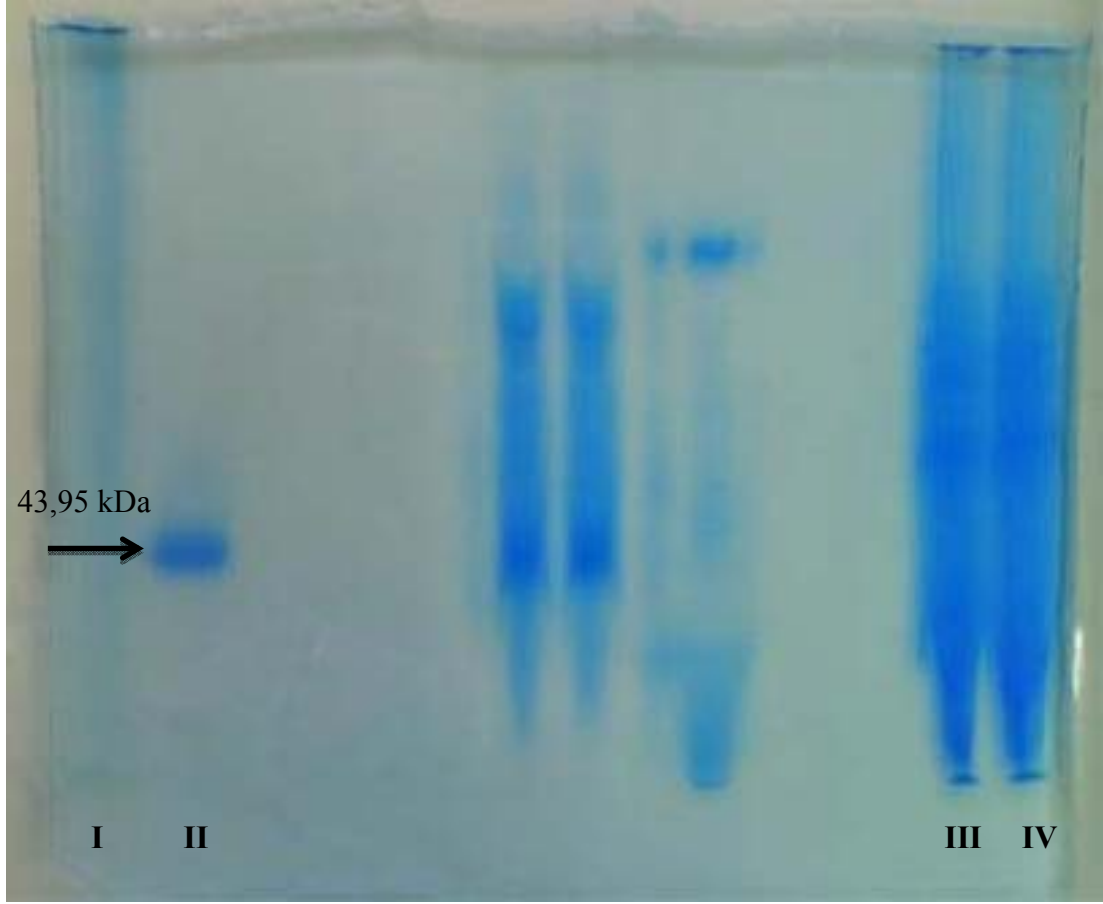
Çizelge 4.1. İyon değişimi ve Afinite kromatografisi ile, kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden elde edilen myrosinaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan myrosinaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamakları	Hacim	Aktivite	Toplam Aktivite		Protein	Spesifik Aktivite	Saflaştırma Katsayısı
	mL	EU/mL	EU	%	(mg/ml)	EU/mg	
Ham Ekstrakt	175	0,15	26.95	-	1,30	0.11	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ Çöktürmesi	65	0,13	8,97	33.28	0,59	0,23	1.95
Sephacryl S200	70	0,15	10,50	38.96	0,09	1.59	13.52
Concavalin A	45	0,29	13,18	48.92	0,03	9,16	77.63

4.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu kapari bitkisinin kapsüllerinden saflaştırılan myrosinaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 3.4.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforezine saflaştırılan myrosinaz enzimi yerleştirildi.

Myrosinaz enzimi yanı sıra standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein kullanıldı. Sonuçlar kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin 43,95 kDa ağırlığında olduğunu gösterdi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi. Şekil 4.3’de gösterildi.



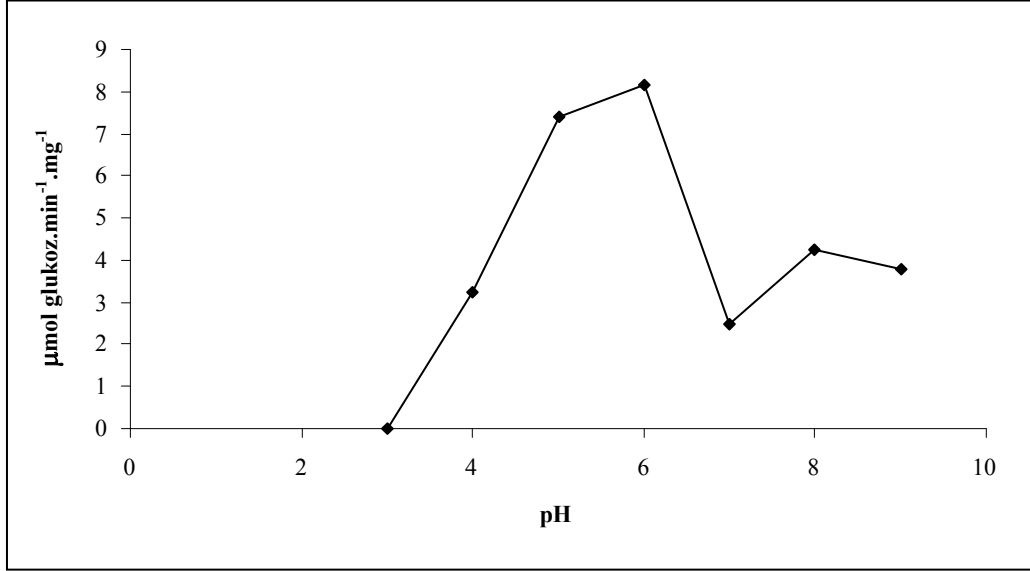
Şekil 4.3. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı
*(I homojenat, II myrosinaz, III ve IV marker)

4.4. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine kinetik çalışmaların sonuçları

4.4.1. Myrosinaz enziminin optimum pH sonuçları

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH: 4-9 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Optimum pH tayininde, pH:4-5 aralığında 0,1 M asetat, pH:6-7 aralığında 0,1 M fosfat ve pH:8-9 aralığında 0,1 M tris tamponunda myrosinaz enziminin aktivite ölçümü 3.5.1'de

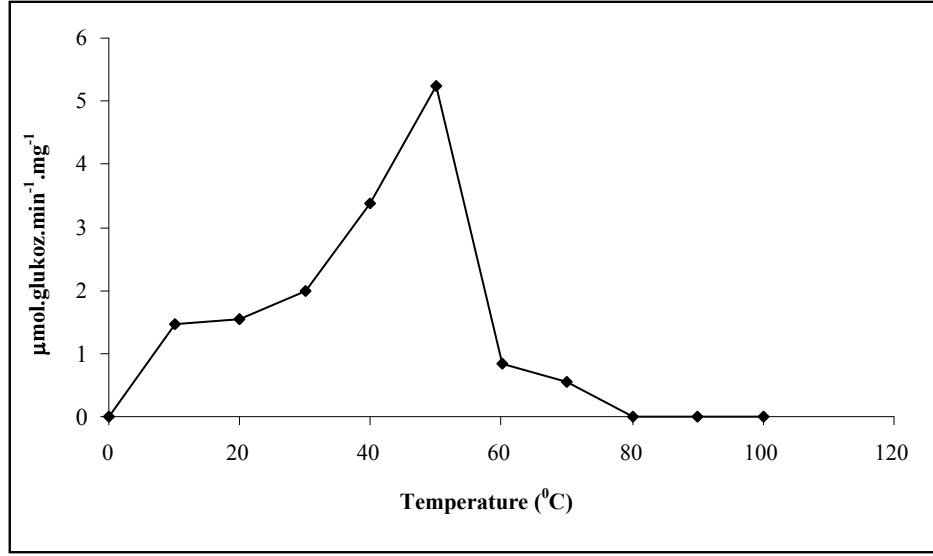
anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve Aktivite-pH grafiği çizildi ve Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.4. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine pH’nın etkisi

4.4.2. Myrosinaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0 ile 90°C aralığında sıcaklık 10’ar birim artırılarak aktivite ölçümü 3.5.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak Aktivite-Sıcaklık grafiği çizildi ve Şekil 4.5’de verildi.

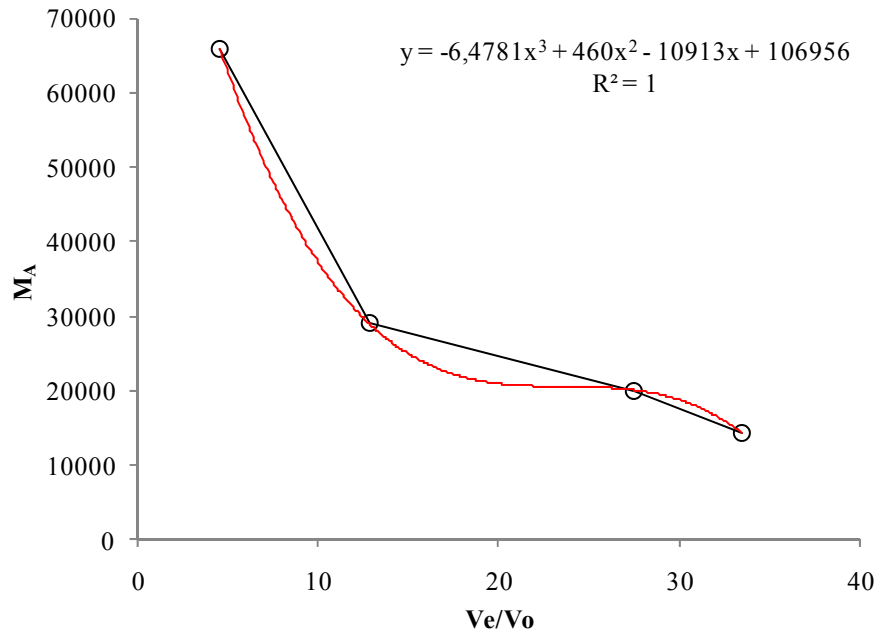


Şekil 4.5. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine sıcaklığının etkisi

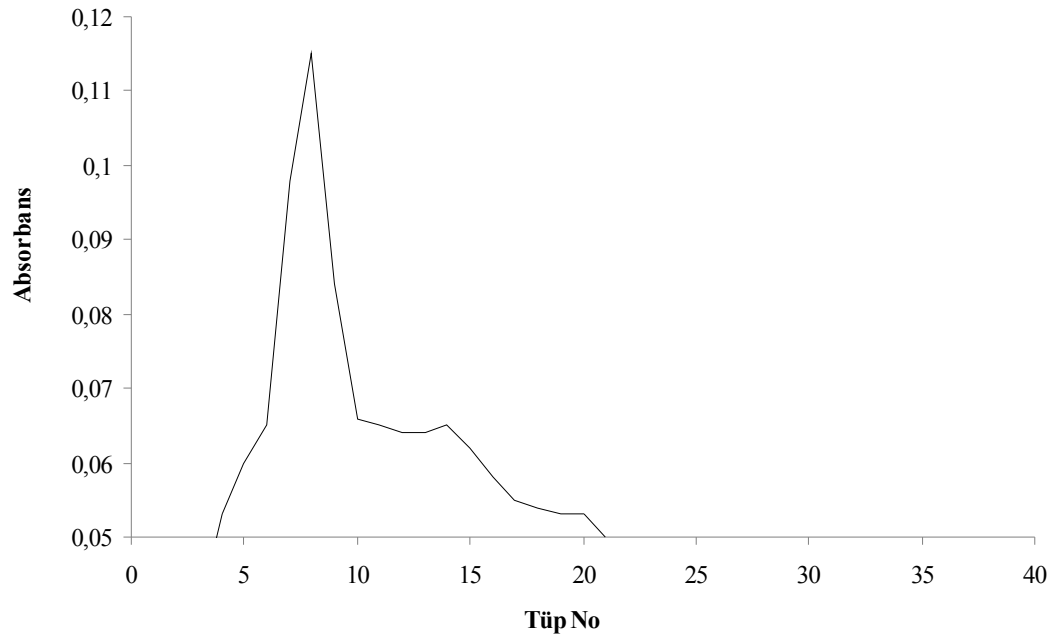
4.4.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları

Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak tayin edildi. Öncelikle dengelenmiş kolona, bovine albumin 66000, carbonic anyhydrase 29000, tyripsin inhibitör 20000, α -lactalbumin 14200 içeren standart protein çözeltileri yüklendi. 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra molekül ağırlığı tayin edilecek olan saflaştırılmış myrosinaz enzimi kolondan geçirildi ve 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi. Sonuçlar standart proteinlerle karşılaştırıldı.

Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 43,95 kDa olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbands grafiği Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Standart proteinlerin jel filtrasyon grafiği
* V_e : elüsyon hacmi, V_o : kolonun boşluk hacmi

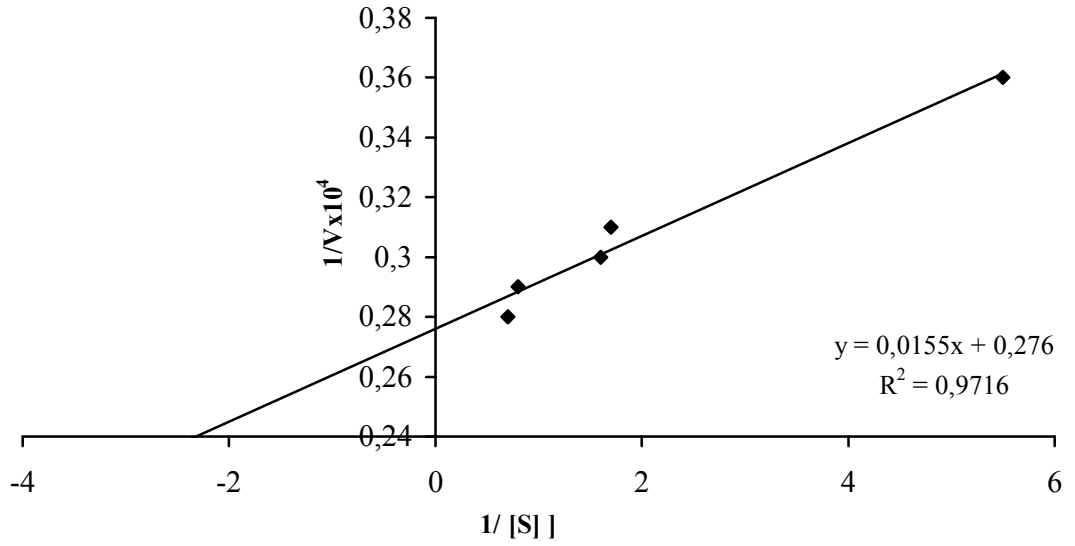


Şekil 4.7. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği.

4.4.4. K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin maksimum hızını V_{max} ve hız sabitini K_M 'yi belirlemek için substrat olarak sinigrin kullanıldı. Artan substrat konsantrasyona karşı aktiviteler belirlendi. Bu amaçla 20 mM sinigrin çözeltisinden sırasıyla her tüpe 100 μ l, 300 μ l, 500 μ l, 650 μ l ve 750 μ l ilave edildi. K r olarak aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500 μ l saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1.5 mL olacak şekilde tampon  zelti ilave edildi. K r için enzim  zeltisi yerine tampon  zelti konularak son hacim 1.5 mL tamamlandı. Tüpler 40 dak 37 C'de su banyosunda bekletildi. Daha sonra 10 dak 100 C'de su banyosunda inkübe edildi. Her bir tüpten 250 μ l alınarak ve üzerine glukoz tayin kiti ilave edildi. Glukoz tayin kiti eklendikten sonra tüpler tekrar 40 dak 37 C'de bekletildi ve son olarak 1'er ml 2N H₂SO₄ ilave edildi. 540 nm'de absorbansları  l ld .

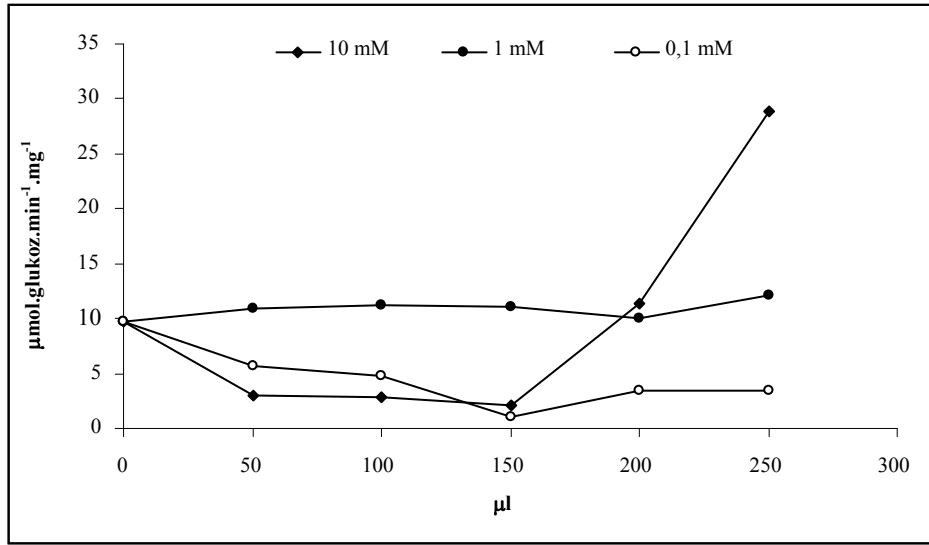
1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver Burk eğrileri çizildi. K_M ve V_{max} değerleri değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan V_{max} ve K_M değerleri ise sırasıyla V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 3,62 μ mol/L.dak ve 0,056 mM olarak belirlendi ve Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.8'de verildi.



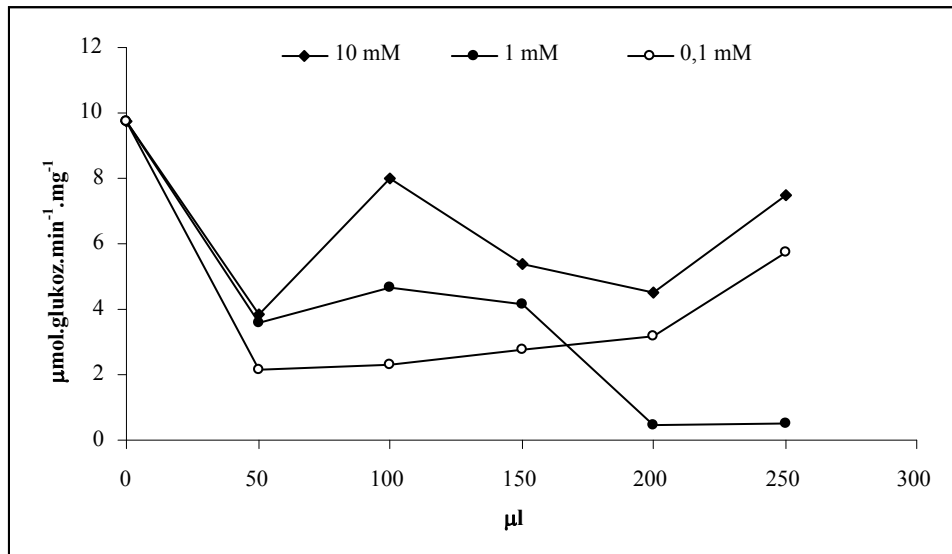
Şekil 4.8. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin sinigrin substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

4.4.5. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bileşiklerin etkisinin belirlenmesi sonuçları

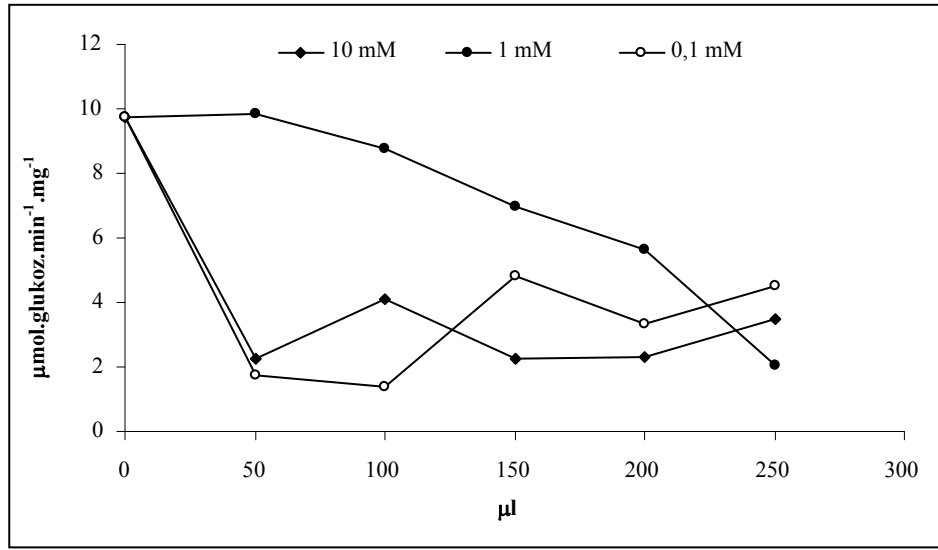
Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{+2} , Ca^{2+} katyonlarının ve 10 mM, 1 mM, 0,1 mM askorbik asit ve SDS'nin etkisi 3.5.6'de anlatıldığı gibi belirlendi. Bunun için aktivite sinigrin varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da grafik halinde verilmiştir.



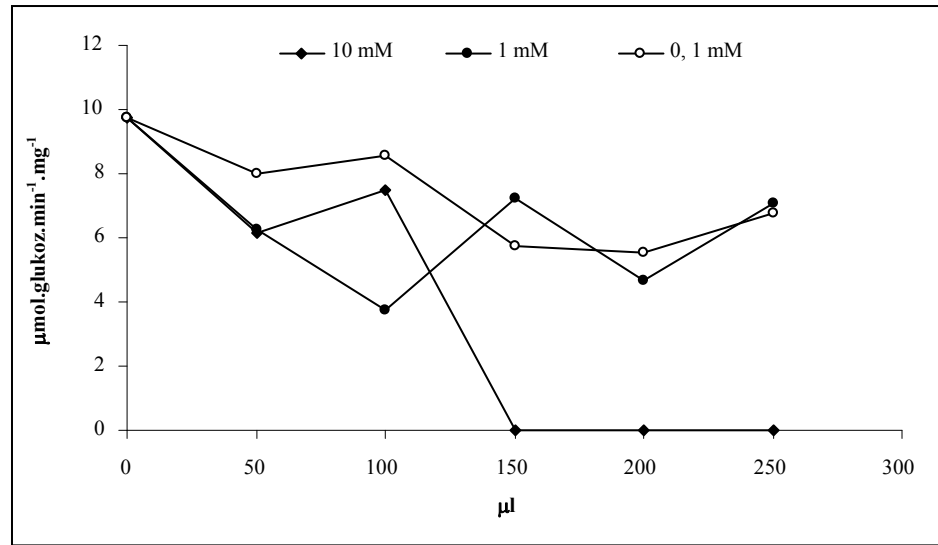
Şekil 4.9. Kantaron saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'ın etkisi



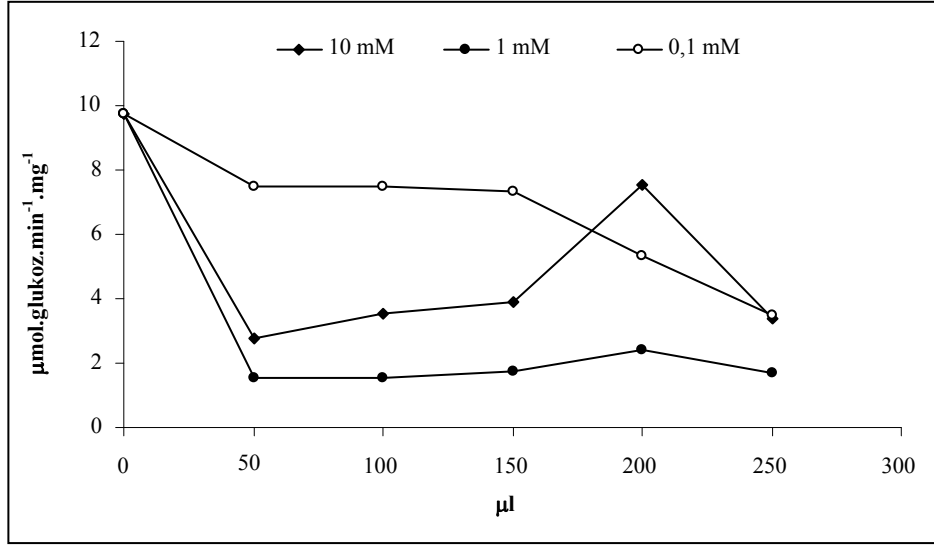
Şekil 4.10. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} 'nın etkisi



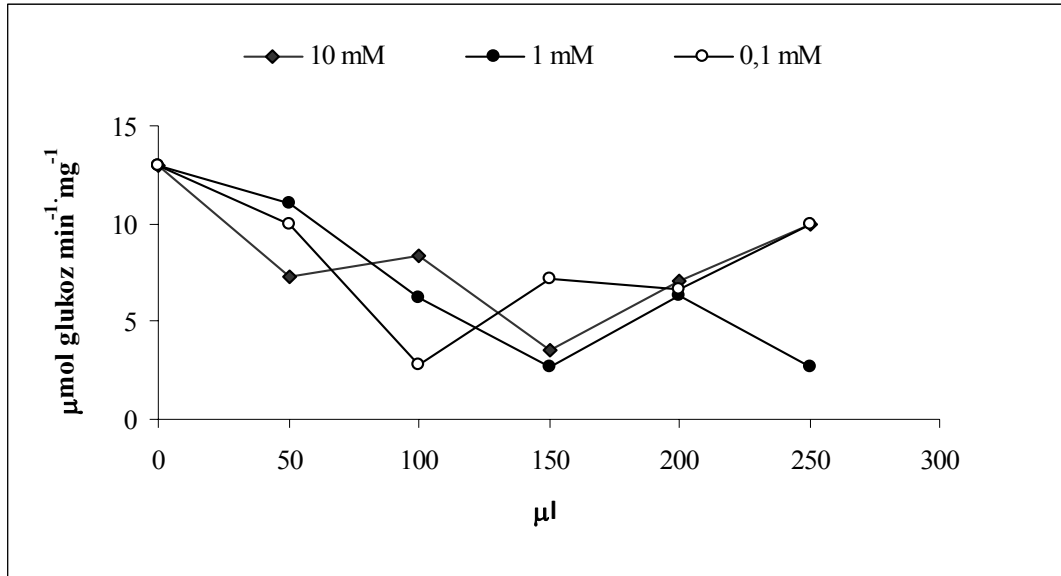
Şekil 4.11. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'un etkisi



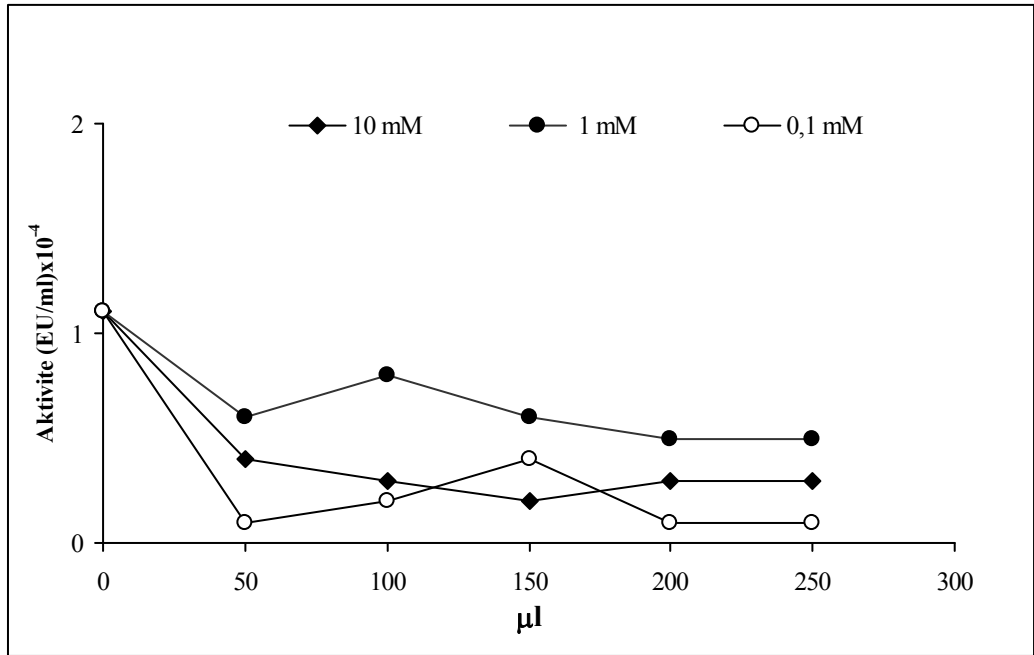
Şekil.4.12. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{2+} 'in etkisi



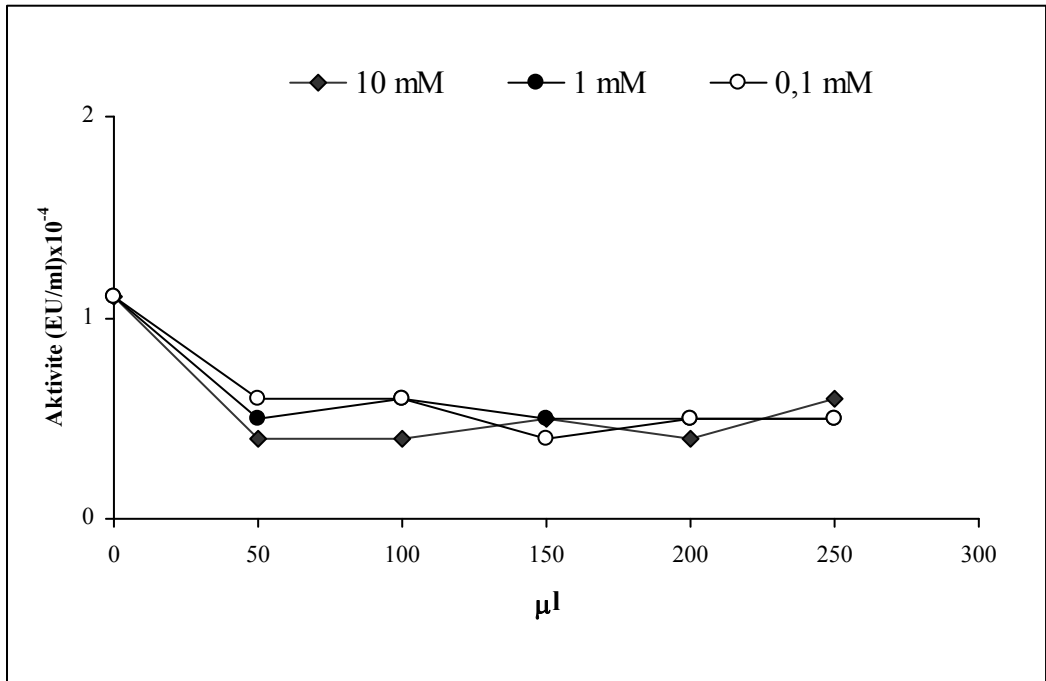
Şekil 4.13. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi



Şekil 4.14. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'un etkisi



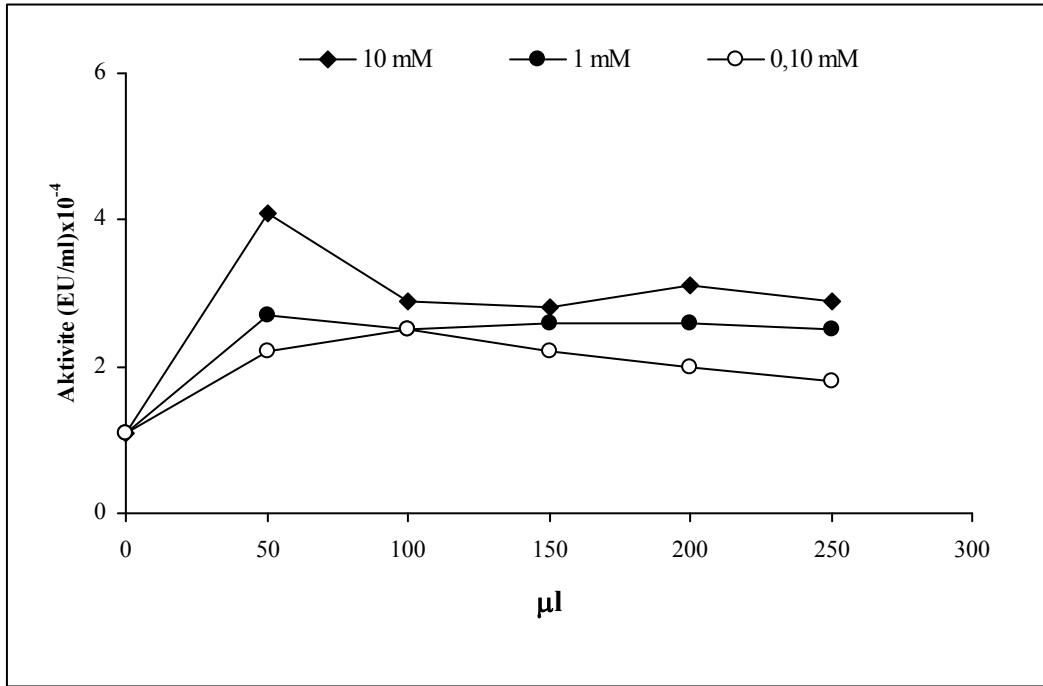
Şekil 4.15. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi



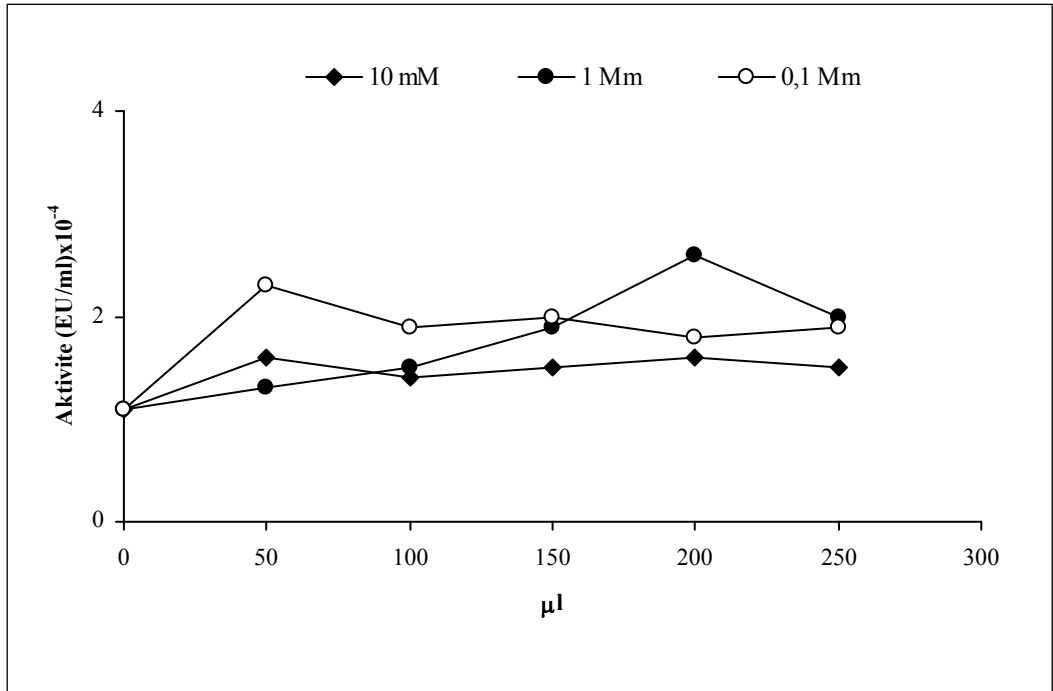
Şekil 4.16. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi

4.4.6. Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine bazı etken maddelerin etkisinin belirlenmesi sonuçları

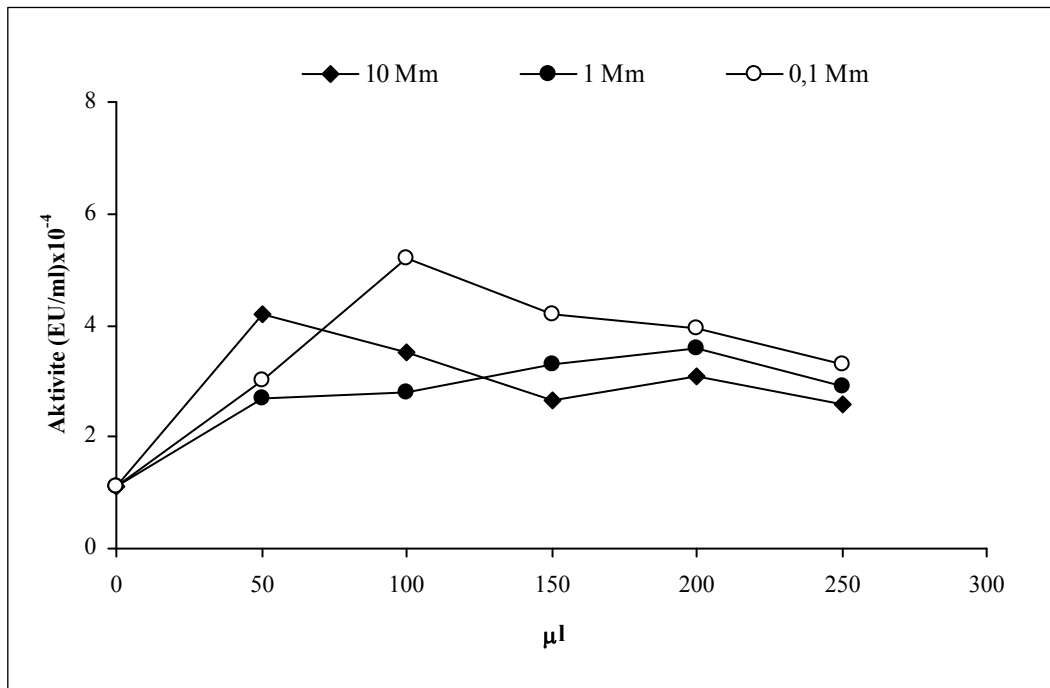
Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM'da pantenol, cephalotin, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin etkisi ve 500 ppm'de TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin etkisi 3.5.7'deki prosedür izlenerek belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve 4.30'da grafik halinde verilmiştir.



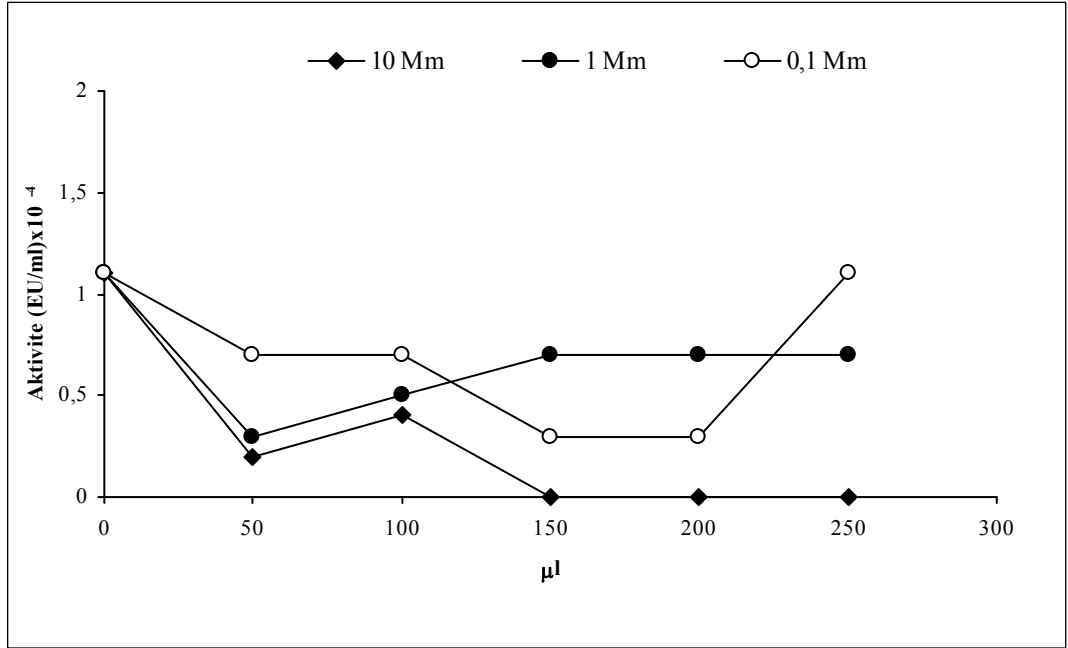
Şekil 4.17. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine Pantenol'ün etkisi



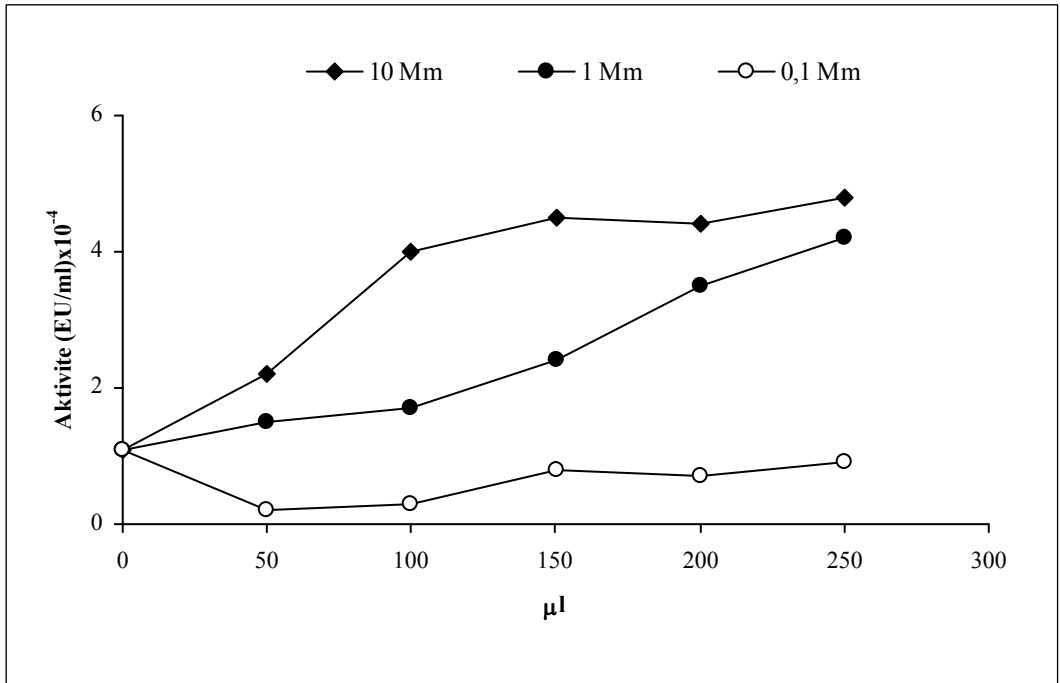
Şekil 4.18. Kantaron bitkisinden Kantarondan saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine sephalotine'in etkisi



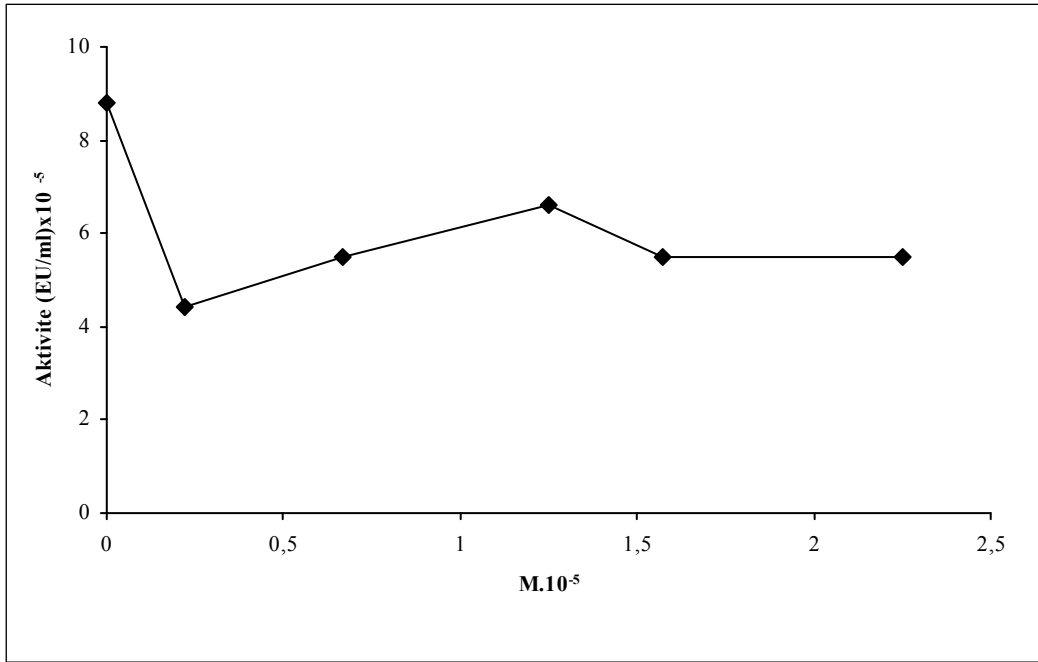
Şekil 4.19. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine betamethasone'un etkisi



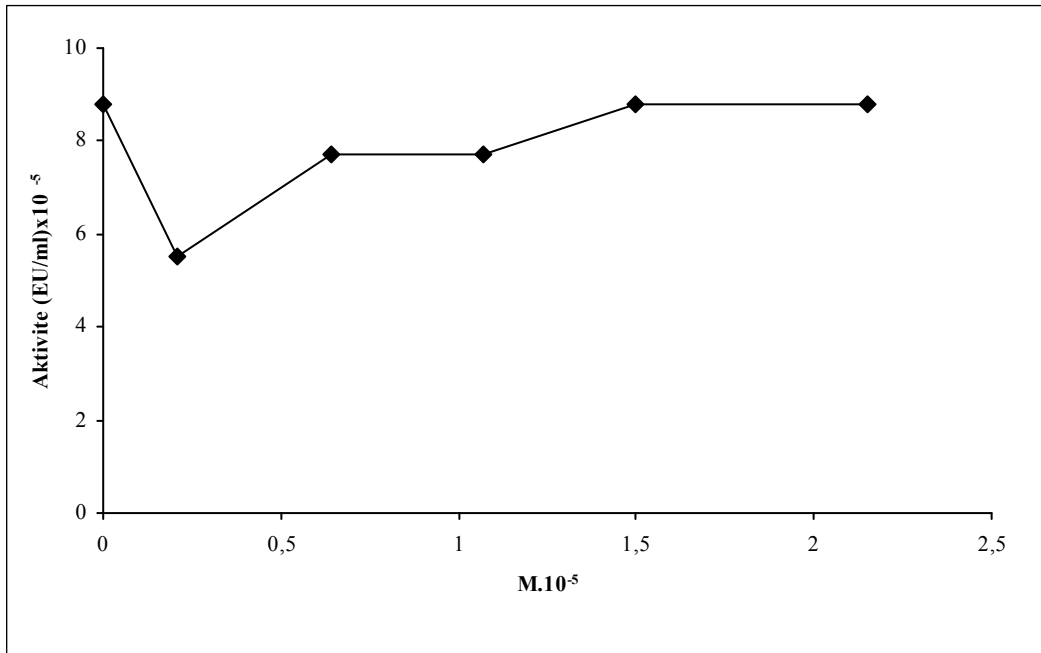
Şekil 4.20. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine linoleik asit'in etkisi



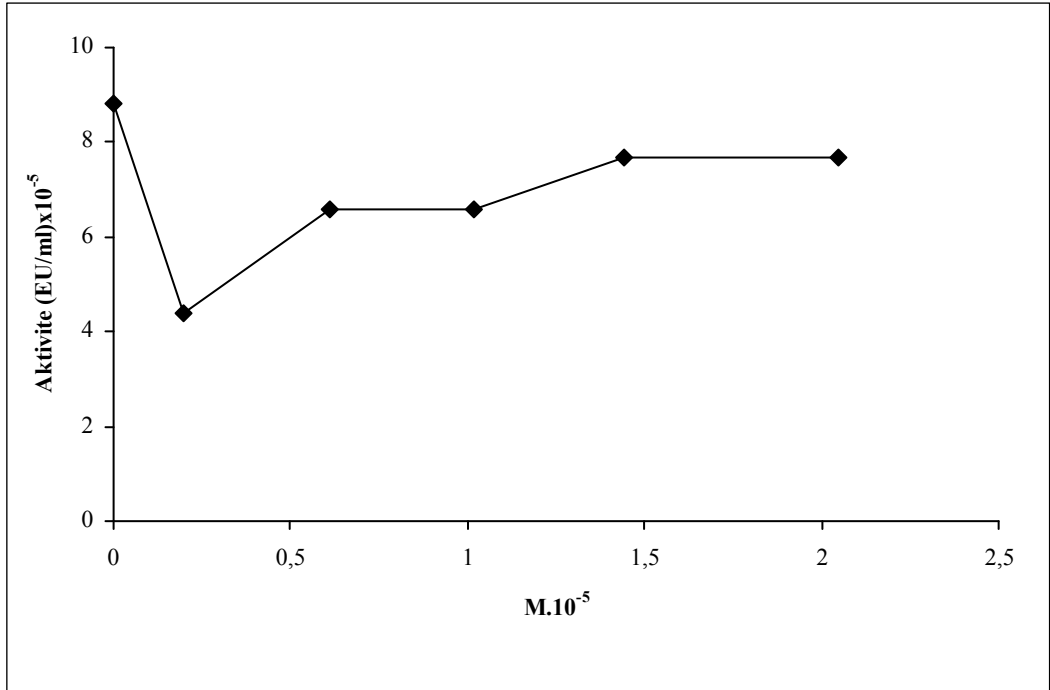
Şekil 4.21. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine E vitamini'nin etkisi



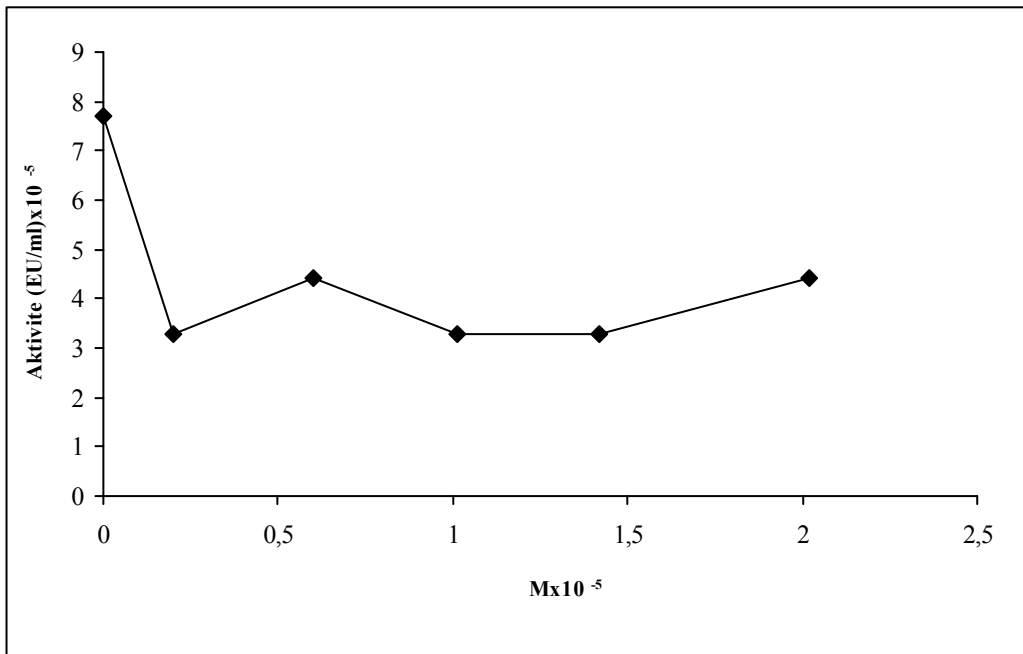
Şekil 4.22. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₁'in etkisi



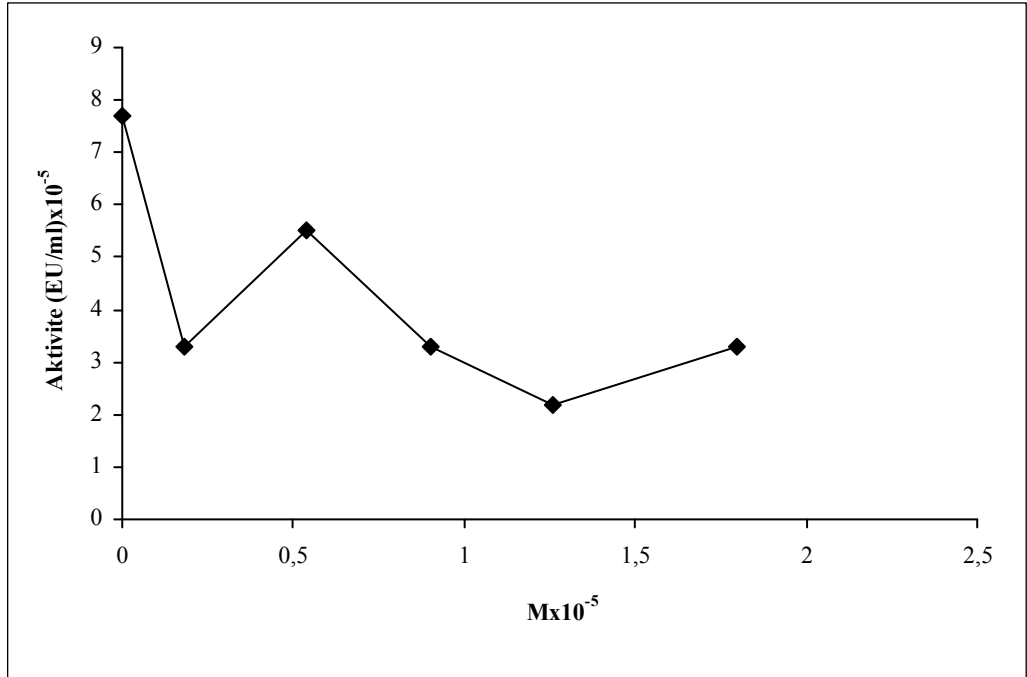
Şekil 4.23. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₂'nin etkisi



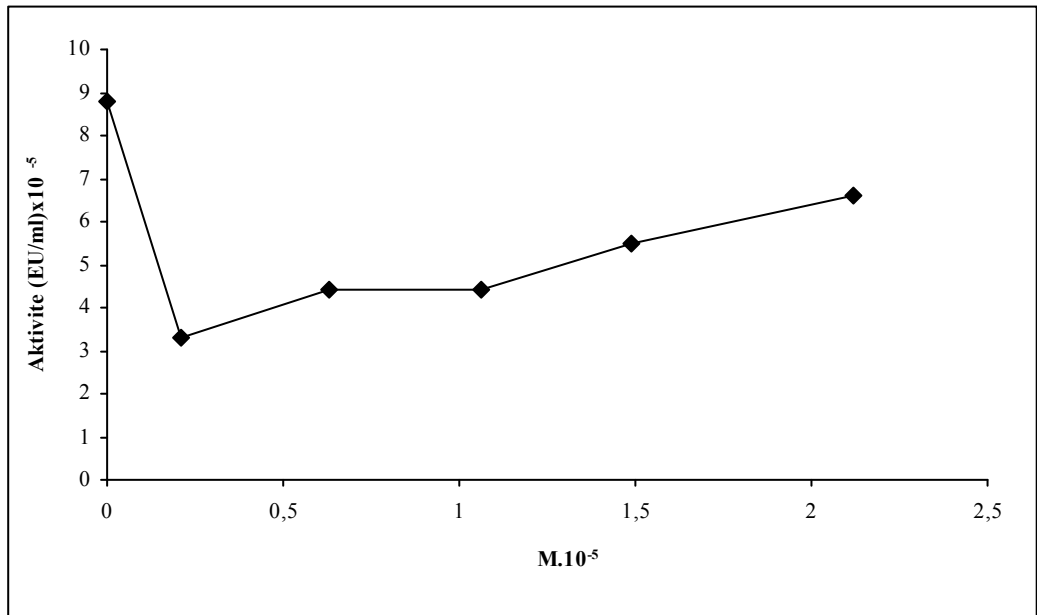
Şekil 4.24. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₃'ün etkisi



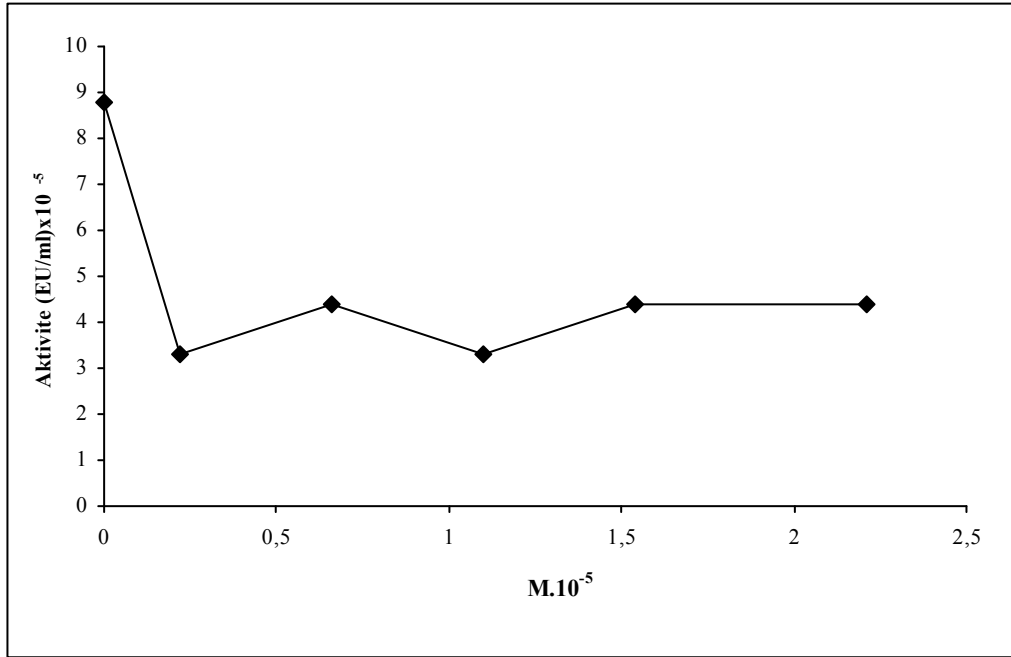
Şekil 4.25. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₄'ün etkisi



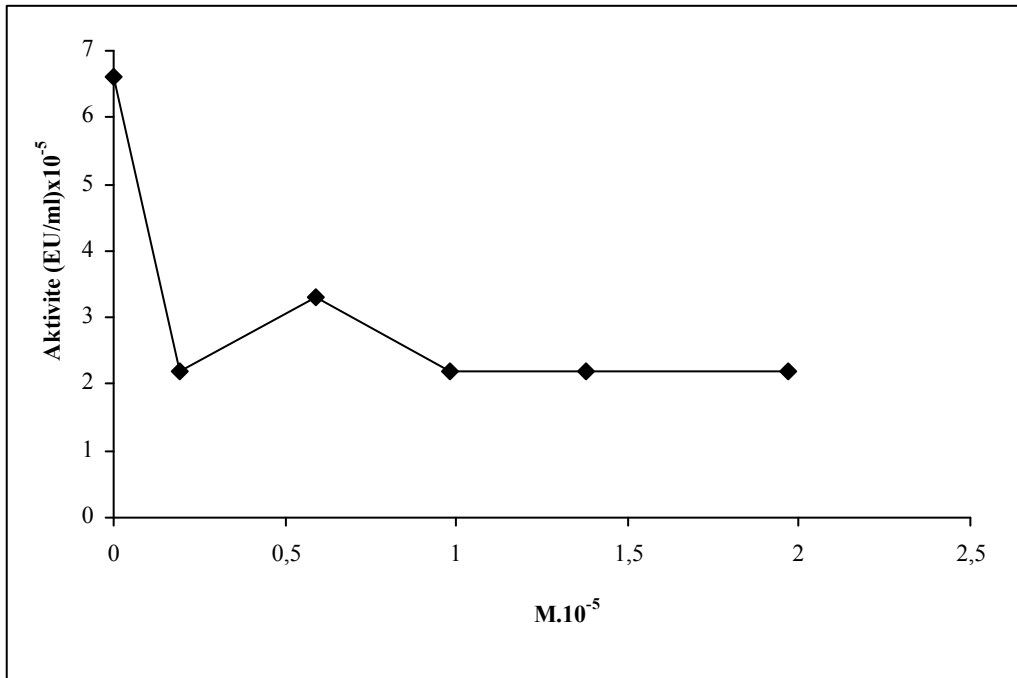
Şekil 4.26. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₅'in etkisi



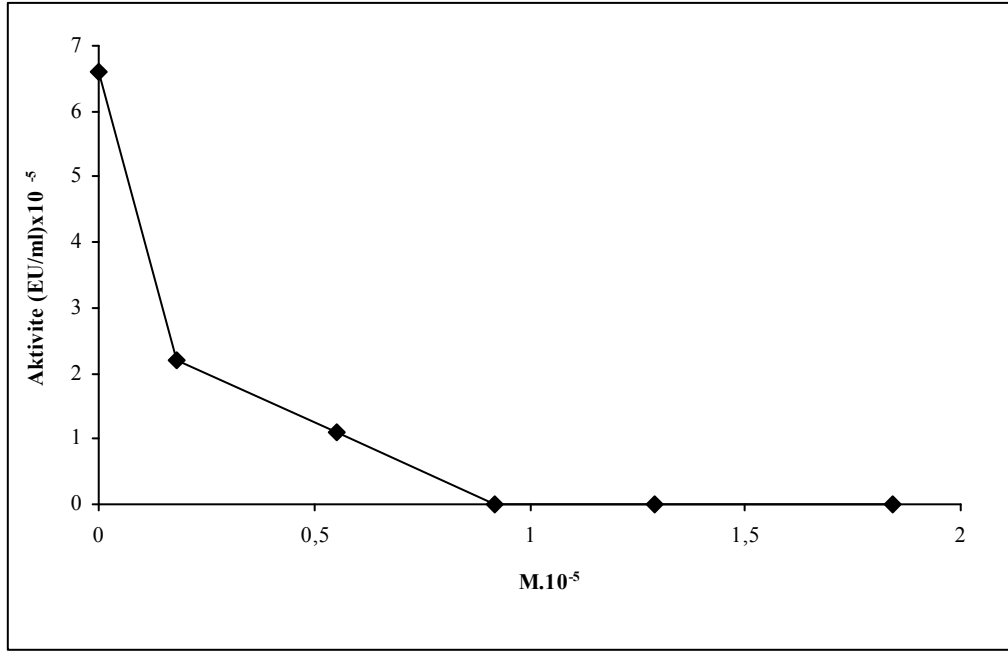
Şekil 4.27. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₆'nın etkisi



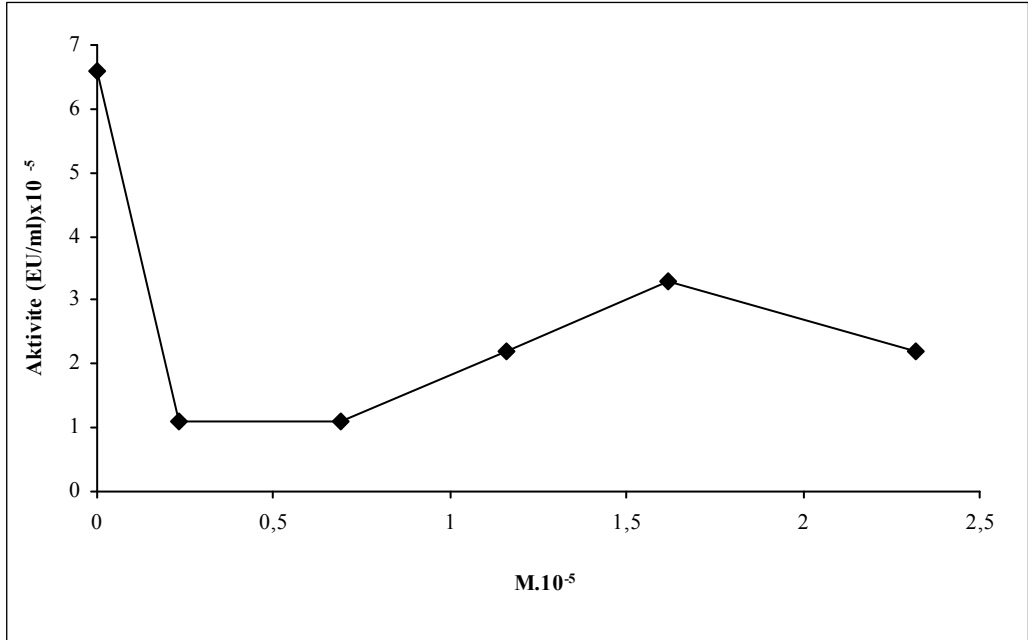
Şekil 4.28. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₇'nin etkisi



Şekil 4.29. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₈'in etkisi



Şekil 4.30. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₉'ün etkisi



Şekil 4.31. Kantaron bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzimi üzerine TA₁₀'ün etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, myrosinaz enzimi kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden 3 basamakta saflaştırıldı ve karakterizasyonu yapıldı.

Literatür araştırmaları sonucunda myrosinaz enziminin saflaştırılması için önerilen saflaştırma teknikleri denenmiş, myrosinaz enzimi saf olarak en yüksek verimle elde edildiği için bu 3 metod sırasıyla kullanılmıştır.

Birinci basamakta amonyum sülfat çöktürmesiyle kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinde bulunan myrosinaz enzimi konsantre hale getirilmiş ve bir ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. İkinci basamakta anyon değiştirici materyal kullanılmıştır ve son basamakta ise afinite kromotofrafisinden yararlanılmıştır.

1. Basamakta, homojenatta %10 ve %100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Oluşan çökelek 0.15 M NaCl içeren 20 mM Tris (pH: 7.5) tamponu ile çözülüp, aktivite tayini yapılırca yüksek myrosinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

2. Basamakta, Çökelek Sephacryl S200 kolonuna yüklenmiştir. Absorbsiyon gösteren fraksiyonlar için myrosinaz aktivitesi testleri yapılmış ve daha sonra aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturulmuştur.

3. Basamakta ise bu enzim havuzu Concavalin A afinite kolonuna yüklenmiştir. Absorbsiyon gösteren fraksiyonlar için myrosinaz aktivitesi testleri yapılmış ve daha sonra aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturulmuştur (Jones *et al.* 2001).

Kısmen saflaştırılması yapılan bitki homojenatı, Sephacryl S-200 kolonuna yüklenmiştir ve kolon 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, %0.02 sodium azide tamponuyla 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar dengelenmiştir. Amonyum sülfattan elde edilen

Çökelek tampona alınmış ve kolona yüklenmiştir. Enzim kolondan aynı tampon ile elüe edilmiştir. Ardından tüm tüplerde aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite gözlenen tüplerden enzim havuzu oluşturulmuştur.

Daha sonra bu enzim havuzu afinite kromatografisi materyali olan Concavalin A ile 12 saat bektetildikten sonra kolona doldurulmuştur. 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, %0.02 sodium azide tamponu ile elüsyon yapılmıştır. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturulmuştur. Myrosinaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar karakterizasyon için kullanılmıştır (Jones *et al.*, 2001; Palmieri *et al.*, 1986).

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden 3 basamakta saflaştırılan myrosinaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 4.2.1’de verilmiştir. Ayrıca her 3 basamak için spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma çizelgesi oluşturulmuştur. Çizelge 4.1’de enzimin 77.63 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir.

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Enzimin saf olduğu belirlenmiş ve jelin fotoğrafı çekilmiştir. Jelin fotoğrafı Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden myrosinaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlarla aktivite-pH grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4). Saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH’sının 6 olduğu ve 4-8 pH aralığında ise aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek üzere deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlarla aktivite-sıcaklık grafiği çizilmiştir (Şekil 4.5). Saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 50°C olduğu ve 30-60°C aralığında ise aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 43,95 kDa olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği ve molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında Linewear-Burk grafikleri kullanılarak V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 3,62 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0,056 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM konsantrasyonlarında Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} kationların ve askorbik asit ve SDS’nin etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’de gösterilmiştir. Myrosinaz enzimini Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Ca^{2+} kationları kısmen inhibe etmiş, Zn^{2+} ve Cu^{2+} ise fazla etkilememiştir. Askorbik Asit ve SDS myrosinaz kısmen inhibe etmiştir.

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine, kozmetik ürünlerin içeriğinde yaygın olarak kullanılan pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin 10 mM, 1 mM, 0, 1 mM konsantrasyonlarında etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 19, Şekil 4.20 ve Şekil 21’de verilmiştir. Myrosinaz enzimini linoleik asit fazla etkilemezken pantenol, cephalotine, betamethasone, ve E vitamini kısmen aktive etmiştir.

Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enzim aktivitesi üzerine kanser hastalıklarında iyileştirici özelliği olduğu bilinen TA_1 , TA_2 , TA_3 , TA_4 , TA_5 , TA_6 , TA_7 , TA_8 , TA_9 ve TA_{10} moleküllerinin 500 ppm’de etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de grafik halinde verilmiştir.

Myrosinaz enzimini TA₂ ve TA₃ fazla etkilemezken, TA₉ tamamen inhibe etmiştir. TA₁, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, ve TA₁₀ molekülleri ise fazla etkilememiştir.

Sonuç olarak;

1- Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi ve afinite kromotografisi ile myrosinaz enzimi saf olarak elde edilmiş ve karakterize edilmiştir.

2- Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum pH'sı 6 olarak bulunmuştur.

3- Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir.

4- Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 3,62 µmol/L.dak ve 0,056 mM olarak belirlenmiştir.

5- Kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin molekül ağırlığı 43,95 kDa olarak hesaplanmıştır.

6- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine Cu²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ katyonlarının ve askorbik asit ve SDS'nin etkisi araştırıldığında enzim aktivitesini Mn²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ ve Ca²⁺ katyonlarının kısmen inhibe ettiği, Zn²⁺ ve Cu²⁺ katyonlarının etkilemediği, askorbik asit ve SDS'nin kısmen inhibe ettiği gözlenmiştir.

7- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine pantenol, cephalotine, betamethasone, linoleik asit ve E vitaminin etkisi araştırıldığında enzim aktivitesini linoleik asidin etkilemediği,

pantenol, cephalotine, betamethasone, ve E vitamininin kısmen aktive ettiği gözlenmiştir.

8- Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine TA₁, TA₂, TA₃, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, TA₉ ve TA₁₀ moleküllerinin etkisi araştırıldığında enzim aktivitesini TA₂ ve TA₃'ün etkilemediği, TA₉'un inhibe ettiği, TA₁, TA₄, TA₅, TA₆, TA₇, TA₈, ve TA₁₀ moleküllerinin ise etkilemediği belirlenmiştir.

Bu çalışmada Türkiye'nin bir çok yerinde doğal olarak yetişen kantaron (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinden saflaştırılan myrosinaz enziminin tanımlanması yapılmıştır. Daha sonra myrosinaz enziminin kozmetik ürünlerinin ve kanser tedavisinde kullanılan ilaç içeriğindeki etken maddelerle geçimliliği araştırılmış, kozmosötik ve tedavi amaçlı kullanılıp kullanılmayacağı sorusuna cevap aranmıştır. Sonuçlara bakıldığında myrosinaz enziminin, optimum sıcaklık değeri ve özellikle cildin pH'sı dikkate alındığında optimum pH değeri kozmosötik amaçla kullanımı için oldukça uygun bulunmuştur. Kozmetikte yaygın olarak kullanılan etken maddelerle geçimli olduğu görülmüştür. Ayrıca kanser hastalığında iyileştici özelliği olduğu bilinen TA_X serisi ile genel olarak geçimli olduğu görülmektedir. Kantoran (*Hypericum perforatum L.*) bitkisinin toksik olmaması ve tamamen doğal olması nedeniyle sadece bitki ekstraktı olarak da kullanımı mümkündür.

KAYNAKLAR

- Altan, N., 2000. *Biyokimya*. Palme Yayıncılık, 82 s, Ankara.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18 (5): 355-458.
- Bradford, H. P., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation. of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-54.
- Demir N., Alaylı A., Demir Y., 2005, *Int. J. Agr. & Biol.*, 7 (3), 467-470.
- Demirsoy, A., 1989. *Genel Biyoloji/Genel Zooloji Cilt1*, Meteksan A.Ş., Ankara
- Gamet-Payrastra, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M., Chevolleau, S., Gase, N., Tulliez J., Gatfield, I. L., Sand, T. (1983) *Lebensm.-Wiss.-Technol.* 16, 73-75.
- Gates, B., 1992. *Catalytic Chemistry*, John Wiley&Sons Inc., New York.
- Gatfield, I. L., Sand, T. (1983) *Lebensm.-Wiss.-Technol.* 16, 73-75.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic Concepts in Biochemistry*. Mc Graw-Hill Inc, 81 p, Germany.
- Hasler,CM (2002): Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132, 3772–3781
- Gordon, D.J., Rifkind B.M., 1989. High density lipoprotein – the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*, 321, 1311-6.
- Jones A.M.E., Bridges M., Bones A.M., Cole R., Rossiter J.T., (2001) *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31: 1–5.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 91-95, 118 s, İstanbul.
- Keskin, H., 1987. *Besin Kimyası. Güray Matbaacılık Tic. Ltd.Sti*, 49, 51 s, İstanbul.
- Labague, L., Gardrat, G., Coustille, J.L., Viaud, M.C. & Rollin, P. 1991. Identification of enzymatic degradation products from synthesised glucobrassicin by gas chromatography-mass spectrometry.*J. Chromatography* 586: 166-170.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–85.
- Lehninger, A.L., 2005. *Principles of biochemistry*. New York, Worth Publishers Inc,
- Liang H., Yuan Q., Xiao Q., (2006) *J. Molec. Catal. B: Enzymatic* 43: 19–22.
- Li X., Kushad M.M., 2005, *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 503–511.
- Onat, T., Emerk, K., 1997, *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, (2. Baskı) İzmir.
- Özata, A., Kutlu, M., 2000. *Enzimoloji ders notları T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:1254, Fen Fakültesi Yayınları No:15, Eskişehir.*
- Palmieri, S., Iori, R., Leoni O., *J. Agric. Food Chem.* (1986) 34, 138-140
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company Third edition, 233-260 p, New York.
- Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A., Arda, N. 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 283, 284-292.
- Uzbyay IT., (2008) *Alcohol*. 43(1):15-24.

- Voet, D., Voet, J.G., 1995. Biochemistry (second edition). New York, p. 346-350
- Wu, L., Ashraf, M.H., Facci, M., Wang, R., Paterson, P.G., Ferrie, A. 2004. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. P. Natl. Acad. Sci. USA, 101(18): 7094-7099.
- Wilkinson, A. P.; Rhodes, M. J. C.; Fenwick, G. R. (1984) J. Sci. Food Agric. 35: 543-552.
- Xian L., Zhimou W., Hans B., Mary S., Mosbah K. (2007). Plant Science 172 1095-1102
- Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim kinetikleri. Temel Biyokimya 1.Cilt., Kemal Matbaası, , Adana, 148-167.
- Zhang, Y., Kensler, T.W., Cho, C.G., Posner, G.H., Talalay, P. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3147.
- Zhang Y., Cho C.G., Posner G.H., Talalay P., (1992) Anal Biochem., 205: 100–7.
- Zhang, Y., Talalay, P. (1998) Cancer Res. 58: 4632.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum'da doğdu. İlk öğretimi Ortaöğretimi Erzurum'da tamamladı. Üniversiteyi Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü 2007 yılında tamamladı. 2007 yılında başladığı Atatürk üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başlamıştır.