

T.C
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN BİBERİYE
BİTKİSİNDEN EKSTRAKSİYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra TOSUN

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

Ekim 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN BİBERİYE
BİTKİSİNDEN EKSTRAKSİYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

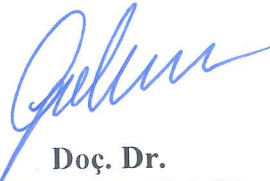
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra TOSUN

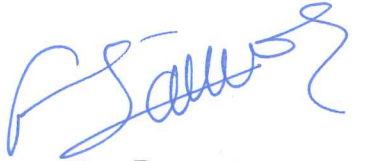
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 24.10.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


**Doç. Dr.
Gülnur ARABACI
Jüri Başkanı**


**Prof. Dr.
Meryem N. YARAŞIR
Jüri Üyesi**


**Doç. Dr.
Fatih SÖNMEZ
Jüri Üyesi**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Büşra Tosun
24.10.2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, hoşgörü ve sabırla beni destekleyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim ve çalışmamda büyük katkısı olan kıymetli hocam Sayın Arş. Gör. Esmâ Hande ALICI'ya teşekkür ederim. Aynı laboratuvarı paylaştığım ve teknik konuda fikir alışverişinde bulunup, destek gördüğüm çalışma arkadaşım Rüveyde BAŞTAN'a teşekkür ederim. Tezim de büyük emeği geçen kıymetli eniştem Sayın Habib ALPASLANOĞULLARI'na ve eğitim hayatım süresince benden desteğini, ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen ablalarım Dilek ALPASLANOĞULLARI'na ve Melek TOSUN'a minnetdarım. Maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim, ailem gibi gördüğüm kıymetlilerim Sayın Zeynep ÇELİK'e, Sayın Sonay TERCUMAN'a ve Sayın Nagehan DAĞLI'ya teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
1.1. Glutasyon Redüktaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar	1
1.2. Çalışmanın Amacı	5
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER ve GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ	7
2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	7
2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	8
2.1.2. Enzimlerin spesifikliğı	9
2.1.3. Enzimlerin kofaktörleri	9
2.1.4. Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler	10
2.1.4.1. pH etkisi	10
2.1.4.2. Sıcaklık etkisi	10
2.1.4.3. Enzim konsatrasyonunun etkisi	11
2.1.4.4. Substrat konsatrasyonunun etkisi	11
2.1.4.5. Kofaktör ve koenzim konsantrasyonlarının etkisi	11
2.1.5. Enzim aktivite birimleri	12

2.1.6. Enzim kinetiği	12
2.1.7. Enzim inhibisyonu	15
2.2. Antioksidanlar.....	18
2.3. Serbest Radikaller	19
2.4. Glutasyon	20
2.5. Glutasyon redüktaz.....	23
2.6. Biberiye.....	25
2.6.1. Faydaları	26
2.7. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi.....	27
 BÖLÜM 3.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	29
3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar.....	29
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	29
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	29
3.2. Glutasyon Redüktaz (GR) Enziminin İzolasyonu ve TPP Yöntemi..	30
3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması	30
3.2.2. Amonyum sülfat miktarının optimizasyonu	31
3.2.3. Tersiyer bütanol oranının optimizasyonu	32
3.2.4. Ortam pH'sının optimizasyonu	33
3.2.5. İnkübasyon süresinin optimizasyonu	34
3.2.6. Bradford yöntemi ile protein tayini	35
3.2.7. SDS-PAGE ile enzim saflık kontrolü.....	35
3.3. Biberiye Bitkisi Glutasyon Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları.....	37
3.3.1. GR aktivite tayini	37
3.3.2. Biberiye bitkisi GR enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik çalışmalar	38
3.3.3. Biberiye bitkisi GR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	38
3.3.4. Biberiye bitkisi GR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	38

3.3.5. Biberiye bitkisi GR enzimi için depolanma kararlılığının belirlenmesine yönelik çalışmalar	39
3.3.6. Biberiye bitkisi GR enzimi NADPH ve GSSG substratları için K_m ve V_{maks} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	39
3.3.7. Biberiye bitkisi GR enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar.....	39
3.3.8. GSH'ın GR enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi	40
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
4.1. Üçlü Faz Saflaştırma Yönteminin Optimizasyonu	40
4.1.1. Amonyum sülfat konsantrasyonunun optimize edilmesi	40
4.1.2. Tersiyer bütanol oranının optimize edilmesi	41
4.1.3. Ortam pH'sının optimize edilmesi	41
4.1.4. İnkübasyon süresinin optimize edilmesi	42
4.2. Bradford Yöntemiyle Toplam Protein Tayini.....	43
4.3. Biberiye Bitkisinden Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE İle Saflığının Kontrolü	43
4.4. GR Enziminin Karakterizasyon Çalışma Sonuçları	44
4.4.1. Biberiye bitkisi GR enziminin optimum iyonik şiddet değerinin sonuçları	44
4.4.2. Biberiye bitkisi GR enziminin optimum sıcaklık çalışma sonuçları	45
4.4.3. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum pH çalışma sonuçları....	46
4.4.4. Biberiye bitkisi GR enziminin depolanma kararlılığı çalışma sonuçları	47
4.4.5. Biberiye bitkisi GR enzimi NADPH ve GSSG substratları için K_m ve V_{maks} değerlerinin sonuçları	49
4.4.6. Biberiye bitkisi GR enzimi üzerine metal iyonlarının etkilerinin sonuçları	51

4.4.7. Biberiye bitkisi GR enziminin GSH inhibitörü için K_i sabitinin bulunmasına yönelik sonuçlar	53
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	69



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APS	: Amonyum persülfat
dk	: Dakika
EC	: Enzim komisyonu
EÜ	: Enzim ünitesi
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
I ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilodalton
K _i	: İnhibisyon sabiti
K _m	: Michaelis-Menten sabiti
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
S _F	: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)
TPP	: Three-phase partitioning
ÜFS	: Üç fazlı saflaştırma
V _E	: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi
V _{maks}	: Maksimum hız

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi
 ΔOD : Bir dakikadaki absorbens değişimi
6,22 : 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbens değeri (ekstinsiyon katsayısı)



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Enzimatik reaksiyon.....	12
Şekil 2.2. Bir enzimin katalitik etkisi	13
Şekil 2.3. Michaelis-Menten grafiği	14
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği	15
Şekil 2.5. Eadie-Hofstee grafiği	16
Şekil 2.6. Yarışmalı inhibisyon şeması	16
Şekil 2.7. Yarı yarışmalı inhibisyon reaksiyon şeması	17
Şekil 2.8. Yarışmasız inhibisyon reaksiyon şeması	17
Şekil 2.9. Radikallerin hücrede sebep oldukları hasarlar	20
Şekil 2.10. Glutatyonun yapısı.....	21
Şekil 2.11. Redükte glutatyon yapısı GSH, (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin).. Şekil 2.12. Okside glutatyonun yapısı GSSG, 2 (L- γ -glutamil-L-sisteinil- glisin).....	21 22
Şekil 2.13. Glutatyon redüktazın üç boyutlu yapısı	24
Şekil 2.14. Biberiye yaprakları	26
Şekil 2.15. ÜFS sonucu meydana gelen fazların gösterimi	27
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan biberiye bitkisi.....	30
Şekil 3.2. %50 doymunlukta amonyum sülfat miktarı.....	31
Şekil 3.3. t-bütanol eklenmiş örnek.....	32
Şekil 3.4. Farklı pH'lardaki örnekler.....	33
Şekil 3.5. Santrifüj öncesi örnek.....	34
Şekil 3.6. Santrifüj sonrası örnek.....	34
Şekil 4.1. Amonyum sülfat doymunluğuna göre ara faz GR aktivite değişimi.. Şekil 4.2. t-bütanol oranına göre ara faz GR aktivite değişimi..... Şekil 4.3. Ortam pH'sına göre ara faz GR aktivite değişimi.....	40 41 42

Şekil 4.4. İnkübasyon süresine göre ara faz GR aktivite değişimi.....	43
Şekil 4.5. GR enziminin SDS-PAGE sonucu.....	44
Şekil 4.6. SDS-PAGE sonucu çizilen Rf- log MW grafiği.....	45
Şekil 4.7. Biberiye bitkisi GR enzimi için farklı konsantrasyonlarda Tris ve KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılması sonucu iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	46
Şekil 4.8. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum sıcaklık-aktivite ölçüm grafiği.....	47
Şekil 4.9. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum pH-aktivite grafiği.....	48
Şekil 4.10. Oda sıcaklığındaki (25°C) Biberiye GR enzimi aktivite- zaman değişim grafiği.....	49
Şekil 4.11. 4°C'deki Biberiye GR enzimi aktivite- zaman değişim grafiği.....	49
Şekil 4.12. -20°C'deki Biberiye GR enzimi aktivite- zaman değişim grafiği...	50
Şekil 4.13. NADPH için doygunluk eğrisi.....	51
Şekil 4.14. NADPH substratı için Lineweaver-Burk grafiği	51
Şekil 4.15. GSSG için doygunluk eğrisi.....	52
Şekil 4.16. GSSG substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 4.17. GSH için %Aktivite-[GSH] grafiği.....	54
Şekil 4.18. Biberiye GR enzimi aktivitesi üzerine GSH'ın inhibisyon türünü gösteren grafik.....	55

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı antioksidan enzimler ve maddeler.....	19
Tablo 2.2. Serbest radikal kaynakları.....	20
Tablo 3.1. SDS jel elektroforezi bileşenleri ve miktarları gösterimi.....	36
Tablo 4.1. GR enzimi saflaştırma basamakları.....	43
Tablo 4.2. Biberiye bitkisi GR enzimi için farklı konsantrasyonlarda tris ve KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılması sonucu iyonik şiddet aktivite grafiği.....	46
Tablo 4.3. Biberiye bitkisi GR enziminin Tris/HCl tamponundaki optimum iyonik şiddet-aktivite sonuç tablosu.....	46
Tablo 4.4. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum sıcaklık-aktivite sonuç tablosu.....	47
Tablo 4.5. Biberiye bitkisi GR enzim aktivitesine metal etkisi.....	53
Tablo 4.6. GSH için I_{50} değerinin bulunmasına yönelik sonuçlar.....	54
Tablo 4.7. GSH için K_i değerlerine yönelik sonuçlar.....	55

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*), Glutatyon redüktaz, Üçlü faz saflaştırma (TPP), Karakterizasyon.

Bu çalışmada, glutatyon redüktaz enzimi (Glutatyon: NADP⁺, oksidoredüktaz, E.C. 1.8.1.7: GR) biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) bitkisinden ekstra edilerek üçlü faz saflaştırma yönteminin optimize edilmesi ile %54,80 verimle 18 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan biberiye GR enzimi molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 75 kDa tek band olarak görüntülenmiştir. Enzim karakterizasyon çalışmalarında optimum iyonik şiddet, sıcaklık, pH ve kinetik özelliği araştırılmıştır. Sonuçlar sırasıyla; 400 mM fosfat tamponu, 60°C, 7,5 ve NADPH substratı K_m değeri 0,047 mM; V_{maks} ise 0,0033 EÜ/mL bulunurken, GSSG substratı K_m değeri 0,029 mM; V_{maks} ise 0,0019 EÜ/mL şeklinde bulunmuştur. Magnezyum, cıva, kobalt, demir, nikel, kurşun, baryum, mangan, alüminyum ve kalsiyum metallerinin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu metallerden Mg²⁺, Mn²⁺ ve Al³⁺ metalleri enzim aktivitesinde artışa yol açarken, diğer çoğu metal ise inhibitör etki sergilemiştir. Depolanma kararlılığı sonucunda ise enzimin uzun vadede dayanıklı olmadığı gözlenmiştir. Buna ilaveten biberiye bitkisi GR enzimi üzerine GSH'ın inhibisyon etkisi incelenmiş ve GSH için Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K_i sabiti 38,03 mM olarak bulunmuştur.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM ROSEMARY PLANT

SUMMARY

Keywords: Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), Glutathione reductase, Triple phase purification (TPP), Characterization.

In this study, glutathione reductase enzyme (Glutathione: NADP⁺, oxidoreductase, E.C 1.8.1.7: GR) was extracted from the rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) plant and purified 18 times in 54.80% yield by optimized triple phase purification method. The purified rosemary GR enzyme molecular weight was monitored by SDS-PAGE as a single band of approximately 75 kDa. In the enzyme characterization studies, optimum ionic strength, temperature, pH, and kinetic properties were investigated by using raw extracts. Results are as follows; 400 mM phosphate buffer, 60°C, 7.5, and K_m value of NADPH was 0.047 mM; V_{max} was found to be 0.0033 EU/mL while K_m value of GSSG substrate was 0.029 mM; V_{max} was found to be 0.0019 EU/mL. The effects of magnesium, mercury, cobalt, iron, nickel, lead, barium, manganese, aluminum and calcium metals on the enzyme activity were investigated. Among these metals, Mg⁺², Mn⁺² and Al⁺³ metals increased the enzyme activity, while the most other metals exhibited inhibitory effect. As a result of storage stability, it was observed that the enzyme was unstable in the long term. In addition, the inhibitory effect of GSH on the GR enzyme from rosemary plant was investigated and the K_i value of GSH was found to be 38.03 mM with the Lineweaver-Bruk graph.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Protein yapısında bulunan spesifik biyokatalizörler olan enzimler, hücrelerde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonların ılımlı şartlarda gerçekleşmesini sağlarlar. Bunu yaparken de, çok hızlı ve canlıya herhangi bir zarar vermeden gerçekleştirirler [1].

Önemli tiyol ve tripeptid yapısındaki glutatyon, protein yapısında değildir. Prokaryot ve ökaryot hücrelerin serbest sülfhidril (-SH) bölümünün büyük çoğunluğunu oluşturur. Tripeptid ve molekül ağırlığı düşük olan glutatyon (GSH); glisin (Gly), sistein (Cys) ve glutamat (Glu) bir araya gelmesiyle oluşur. Glutatyonun bilinen iki formu mevcuttur ve genellikle bu formlarda bulunmaktadır. Bunlar; redükte (GSH) ve okside glutatyon (GSSG)'dur [2].

Redükte glutatyon iki yolla okside glutatyon yapısına dönüşmektedir. Bunlar; enzimatik olmayan ve enzimatik olan yollardır [3]. Glutatyon redüktaz, hücredeki oranı belli düzeyde olan GSH/GSSG'nin belli seviyede tutulmasını sağlayan enzimdir. Fakat NADPH reaksiyonun meydana gelmesi için elzemdir. Çünkü; NADPH'nin azalması, GR aktivitesinin ve GR'nin işleyişini olumsuz yönde etkiler [4, 5].

1.1. Glutatyon Redüktaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) eritrositleri kullanılarak yapılan saflaştırma çalışmasında, saflaştırma işlemi iki basamakta gerçekleştirilmiş olup bunlar; hemolizatin hazırlanması, bu işlemi takiben de 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemlerini kapsamaktadır. Bu doğrultuda enzim 33,75 EÜ/mg spesifik aktivite, %46,2 verim elde edilerek tek adımda sonuçta 1028 kat

saflaştırılmış, yapılan SDS-PAGE elektroforezi ile enzim alt birim ağırlığı ise yaklaşık 78,7 kDa olarak bulunmuştur. Bildircin GR enzimi karakterizasyon çalışmaları sonucunda; optimum pH, KH_2PO_4 tamponu pH 7,5, stabil pH, KH_2PO_4 tamponu pH 8,0, enziminin optimum sıcaklığı 60 °C ve optimum iyonik şiddet 400 mM KH_2PO_4 tamponu olarak bulunmuştur. NADPH substratı K_m ve V_{maks} sonuçları sırasıyla; 0,047 mM ve 1,45 EÜ/mL, diğer substrat GSSG K_m ve V_{maks} sonuçları ise 0,025 mM ve 0,092 EÜ/mL olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda bildircin GR enziminin GSSG substratına karşı afinitesinin, yüksek olduğu bulunmuştur [6].

Flavin bileşiklerinin glutatyon redüktaz aktivitesi üzerine etkisinin in vivo aynı zamanda in vitro çalışmalar ile incelendiği çalışmada; kırmızı hücrede glutatyon redüktazın (GR) artması veya azalması, birçok klinik anormallik ile bağlantılı olarak tarif edilmiştir. Hemolizatlarda ölçülen GR aktivitesinin mevcut GR aktivitesinin sadece bir kısmını temsil ettiği bulunmuştur. Çok az miktarda flavin adenin dinükleotidi (FAD) eklenmesi sonucunda, ancak flavin mononükleotidi veya riboflavin içermemesi, hemolizatların GR'sini aktive ettiği saptanmıştır. 1 μM FAD, 10 dakika içinde maksimum bir aktivasyonla sonuçlan ve FAD, GR'yi aktive ettiğinde, seyreltme veya diyaliz, enzim aktivasyonunu tersine çevirmemektedir. GR'nin FAD ile aktivasyonu, adenozin trifosfat (ATP) ve daha az bir ölçüde adenozin difosfat (ADP) ve adenozin monofosfat (AMP) tarafından inhibe edilebilir, ancak eğer adenin nükleotidlerinden önce FAD ilave edilirse, yani GR'ye FAD ilave edilmesi elektroforetik mobilitatesini değiştirmez, fakat bantların yoğunlaştırılmasını sağlar. Yapılan bu çalışmaya göre günlük 5 mg riboflavin uygulaması, sadece 2 gün içinde kırmızı hücre GR aktivitesinin belirgin bir şekilde uyarılmasını sağlamıştır ve riboflavin uygulamasının kesilmesinden sonra ise GR aktivitesi tekrar düşmeye başladığı ifade edilmiştir. Sonuç olarak da GR aktivitesinin riboflavin tarafından uyarılma derecesi, diyet riboflavin alımı ile ters orantılıdır. Normal bireylerin baz çizgisi GR aktivitesi, diyet riboflavin alımının seviyesi ile doğrudan ilişkilidir. Daha önce açıklanamayan glutatyon redüktaz varyasyonları, sağlık ve hastalıkta, riboflavin beslenmesi ve metabolizmanın durumu ışığında yeniden değerlendirilmelidir şeklinde belirtilmiştir [7].

Bir takım analjezik ve anesteziik ilaçların insan eritrosit glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada; saflaştırma yöntemi olarak 2',5'-ADP Sefaroz 4B afinite jeli ve Sefadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Sonuçta enzim % 29 verimle 2139 kat saflaştırılmıştır. Yapılan SDS-PAGE'de tek bir band gözlenmesi ile enzim saflığı doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda diklofenak sodyum, ketoprofen, lornoksikam, tenoksikam, etomidat, morfin ve propofol gibi ilaçların enzim üzerinde inhibe edici etkileri tespit edilmiştir. Özellikle bu ilaçlardan diklofenak sodyum, ketoprofen, lornoksikam, tenoksikam, etomidat ve morfin, yarışmalı bir inhibisyon sergilerken; propofol'un ise yarışmasız inhibisyon gösterdiği sonucuna varılmıştır [8].

Balıkların besinini oluşturan ve sucul bir omurgasız olan *Gammarus pulex* ile yapılan başka bir çalışmada ise; GR enzimi jel filtrasyon yöntemi kullanılarak 14 basamakta saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. GR enziminin molekül ağırlığı, yapılan SDS-PAGE ile 56-58 kDa olarak bulunmuştur [9].

Tavuk böbreği ile yapılan bir diğer çalışmada; GR enziminin saflaştırılması işleminde sırasıyla, homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi gibi saflaştırma basamakları kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda enzim; 8,595 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, ~ %57 verimle sonuçta 369 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan GR enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapılmıştır. Tek bant şeklinde elde edilen GR enziminin molekül ağırlığı ~ 92 kDa olarak bulunmuştur. Tavuk böbrek GR enziminin, diğer kaynak dokulardan saflaştırılmış GR enzimlerinden farklı olmasının sebebi olarak, diğer GR enzimleri ile izoenzim olabilir veya alt birimlerinin sayısı farklı olabilir sonucuna varılmıştır. Bazı metal iyonlarının GR enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir ve sonuç olarak Ni^{2+} , Hg^{2+} ve Ag^{+} gibi metaller, enzim üzerinde yarışmasız inhibisyon; Zn^{2+} ve Pb^{2+} gibi metaller ise yarı yarışmalı inhibisyon göstermiştir. Farklı olarak ise Al^{3+} metalinin enzim üzerinde aktivatör etki gösterdiği bulunmuştur [10].

Koyun karaciğerinden GR enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında, saflaştırma yöntemi olarak, homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, 2',5'-ADP Sefaroz-4B afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılmış ve işlem sonucunda enzim 1.477 kat saflaştırılmıştır. GR enzimi 47,27 EÜ/mg protein spesifik aktivite ve %14,1 verimle elde edilmiştir. SDS-PAGE ile yapılan saflık kontrolünde ise enzim tek bir bant sergilemiştir. GR enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmasında ise, için optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık, sırasıyla 8,0, 5,5, 60°C olarak; optimum iyonik şiddet ise 50 mM Tris-HCl tamponu olarak bulunmuş ve enzimin her iki substratı olan NADPH ve GSSG için K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0,0258, 0,0239 mM ve 0,266, 0,255 EÜ/mL olarak bulunmuş, GR enziminin en yüksek afiniteyi ise GSSG substratına karşı gösterdiği tespit edilmiştir. GR enzimi için K_i sabitleri ise sırasıyla 4,367 ve 0,4055 mM olarak çalışmada sonucunda elde edilmiştir [11].

Bazı metal iyonlarının Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) karaciğer GR enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP sefaroz 4B afinite kromatografisi kullanılmış ve işlem sonucunda ham ekstrakt için spesifik aktivite 0,15 EÜ/mg protein, saflaştırılan enzim ise 19,33 EÜ/mg spesifik aktivite ile %10,25 verimle, 128,8 kat saflaştırılmıştır. Yapılan SDS-PAGE elektroforezi ile enzimin tek bant halinde 59 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ve Al^{3+} gibi ağır metal iyonlarının saflaştırılmış bildircin karaciğer GR enzimi üzerinde yüksek inhibe edici bir aktivite gösterdiği saptanmıştır [12].

Sığır eritrosit GR enzimi saflaştırma işlemi için 4 basamak; hemolizatın hazırlanması, amonyum sülfat fraksiyonu, 2',5'-ADP sefaroz 4B afinite kromatografisi ve Sefadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi metodları kullanılmıştır. İşlem sonucunda sığır eritrosit GR enzimi % 11,39 verimle 31,250 kat saflaştırılmıştır. Saflık kontrolü için yapılan SDS-PAGE çalışmasında enzimin molekül ağırlığı 118 kDa olarak bulunurken alt birim molekül ağırlığı ise 58 kDa bulunmuş ve enzimin dimerik formda olduğu tespit edilmiştir. Ham ekstrakt için

spesifik aktivite 0,002 U/mg protein bulunurken, saflaştırılan enzim için ise 62,5 U/mg protein olarak bulunmuştur. Yapılan karakterizasyon çalışmasında, enzim için optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet ve stabil pH değerleri sırasıyla 7,3, 55°C, 435 mM ve 7,3 olarak bulunmuştur. GSSG ve NADPH substratları K_m ve V_{maks} sonuçları sırasıyla 149,7 mM, 71,4 mM ve 0,6766 U/mL, 0,9314 U/mL'dir. Sonuç olarak NADPH'ın enzime olan afinitesinin GSSG'den yüksek olduğu tespit edilmiştir [13].

Tek hücreli bir alg olan (*Chlamydomonas reinhardtii*)'den ham ekstraktın hazırlanması, ultrasantrifüjleme, DEAE-selüloz, amonyum sülfatla çöktürme, sefadex G-150, mavi-sefaroze ve ADP-sefaroze olmak üzere 7 aşamalı olarak saflaştırılan GR enziminin molekül ağırlığı 54-56 kDa'lık bir monomer olarak bulunmuştur. Enzim pH 8,2 ve 49 °C'de maksimum aktiviteye sahiptir. Saflaştırılan enzim için spesifik aktivite 373,3 U/mg protein olarak bulunurken, sonuçta enzim %28,7 verimle yaklaşık 4000 kat saflaştırılmıştır. GSSG ve NADPH substratları K_m ve V_{maks} sonuçları sırasıyla 54,1 μ M ve 10,6 μ M olarak bulunmuştur. Tiyol inhibitörleri ve her biri 1 mM konsantrasyonda olan Hg^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} gibi metaller enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Ni^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} metallerinin ise enzim aktivitesini sırasıyla %100, %75 ve %40'a kadar inhibe ettiği bulunmuştur [14].

GR enzimi ile yapılan bir başka çalışmada materyal olarak hindi karaciğeri kullanılarak saflaştırma işlemi iki basamak halinde; homojenatın hazırlanması olarak ve daha sonrada 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi tercih edilerek gerçekleştirilmiştir. Spesifik aktivitesi 606,67 EÜ/mg protein, %10,75 verimle ve saflaştırma katı 2476 olarak belirlenmiştir. Enzime ait molekül ağırlığı SDS-PAGE sonucunda 65 kDa olarak tespit edilmiştir. Karakterizasyon sonuçları ise; optimum pH 7,5, 100 mM iyonik şiddet, optimum sıcaklık 40 °C ve son olarak stabil pH 8,5 olarak bulunmuştur. NADPH ve GSSG K_m ve V_{maks} sonuçları sırasıyla; 0,170 mM, 0,03 mM ve 0,55 EÜ/mL, 0,228 EÜ/mL bulunmuştur. İnhibisyon etki için $NADP^+$ ve GSH kullanılarak, K_i sabitleri bulunmuştur. Bunlar ise; $0,37 \pm 0,055$ Mm $NADP^+$ için; $29,08 \pm 14,9$ mM ise GSH için bulunmuştur [15].

1.2. Çalışmanın Amacı

Çalışmamızın amacı, ülkemizde yaygın olarak dağılış gösteren ve antioksidan özelliği bulunan Biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) bitkisinden GR enziminin izole edilmesi, TPP metodu kullanılarak saflaştırılması, enzime ait optimum iyonik şiddet, sıcaklık, pH, depolanma kararlılığı, kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve enzim aktivitesine bazı metallerin ve GSH'ın inhibisyon etkilerinin incelenmesidir.



BÖLÜM 2. ENZİMLER ve GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ

2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzim araştırmalarının tarihine bakıldığında, biyokimya tarihinin büyük bir kısmını kapsamaktadır. 1700'lerin sonlarında etin mide salgıları tarafından sindirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, biyolojik kataliz ilk defa fark edilerek tanımlandı. 1800'lerde devam eden araştırmalar ise farklı kaynaklar tarafından nişastanın şekere dönüştürülmesi ile süregelmiştir. 1850'lerde ise Louis Pasteur, canlı maya hücrelerinin yapısından ayıramayacağını kabul ettiği fermentlerin; aynı zamanda şekerin maya tarafından alkole fermantasyonunu katalizlediği sonucuna varmıştır ve bu görüşü dirimselcilik olarak bilinir. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner yaptığı gözlem ile dirimselci düşüncüyü sona erdirmiştir. Maya özütlerinin şekeri alkole dönüştürdüğünü bulduğu bu gözlem ise, fermantasyonun hücrelerden uzaklaştırılsalar bile görevine devam eden moleküller ile gerçekleşeceğini ispatlayarak, biyokimya bilimine ışık tutmuştur. Sonuç olarak keşfedilen bu moleküllere, Frederick W. Kühne 'enzim' adını vermiştir [16].

Enzimler, biyolojik sistemlerde yer alan tepkimeleri katalizleyen çoğunlukla özelleşmiş proteinlerden oluşurlar [16]. Ayrıca farklı enerji formlarının da dönüşümüne aracılık ederler. Enzimlerin en çarpıcı özelliklerine bakıldığında ise katalitik güçleri ve özgünlükleridir [17]. Kataliz hızları diğer sentetik veya inorganik katalizörlere kıyasla oldukça yüksektir. Kataliz hızlarının bu denli yüksek oluşu, enzimleri biyokimyasal işlemlerin merkezinde tutar. Bazı katalitik RNA'ları dahil etmezsek, bilinen çoğu enzim protein yapısındadır [16]. Bununla birlikte, katalitik olarak aktif RNA moleküllerinin keşfedilmesi, proteinlerin kataliz üzerinde mutlak bir tekele sahip olmadıklarını gösterir.

Bir makromolekül sınıfı olan proteinler, geniş bir molekül aralığına spesifik olarak bağlanma kapasiteleri sebebiyle, çeşitli kimyasal reaksiyonların katalizlenmesinde oldukça etkilidirler. Moleküller arası kuvvetlerin tam repertuarını kullanarak, enzimler substratları; kimyasal bağların oluşumu ve kopması için başlangıçta optimal bir oryantasyonda bir araya getirirler. Enzimler hem katalize edilen reaksiyonda hem de substrat olarak adlandırılan reaktif seçiminde oldukça spesifiktir [17].

Biyolojik sistemlerde büyük önem arz eden enzimlerin eksikliği, bazı genetik kusurların ve hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olur. Bunun yanısıra birçok ilaç, etkisini enzimlerle etkileşerek gösterdiği için, hastalıkların teşhis edilmesinde enzimlerin aktifliklerinin ölçülmesi önemli yer tutar [16].

2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Birçok enzim, spesifik olarak etki ettikleri substrat adlarının sonlarına “-az” eki eklenerek isimlendirme yapılmıştır. Örneğin üreazın, substratı olan ürenin hidrolizini katalizlediğini rahatlıkla anlayabiliriz. Fakat zamanla yeni keşfedilen enzimlerin sayısının sürekli artış göstermesi sistematik bir isimlendirmeye ihtiyaç olduğunu göstermiştir [16]. Ardından Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC) kurulmuştur [18]. Daha sonra her bir enzime sistematik bir kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. (Enzyme Code) harflerinin ardından gelen dört rakamdan oluşmaktadır. İlk sıradaki rakam enzimin bağlı olduğu grubu göstermekte iken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu ve son olarak da dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını vermektedir. Örneğin, E.C.2.7.1.1 kod numarasındaki ilk sayı olan 2, enzimin transferaz sınıfına dahil olduğunu; 7, enzimin alt sınıfı yani bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alıcı grup olarak hidroksil grubunu kullandığını ve son rakam olan 1 ise, fosforil grubu alıcısının D-glukoz olduğunu göstermektedir. Bahsi geçen enzim ise, sistematik adıyla bilinen ATP glukoz fosfotransferaz enzimidir. Katalizledikleri reaksiyon türüne göre enzimlerin ayrıldıkları 6 ana sınıfa yakından bakacak olursak,

Bunlar:

1. Oksidoredüktazlar: Elektronların aktarımı (indirgenme-yükseltgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzim sınıfıdır.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grup transferinin gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzim sınıfıdır.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarının gerçekleştiği (bir grubun suya aktarımı) reaksiyonlarını katalizleyen enzim sınıfıdır.
4. Liyazlar: Grupların C-C, C-O ve C-N arasındaki çift bağlara katılması veya uzaklaştırılması ile çift bağ oluşumu reaksiyonlarını katalizleyen enzim sınıfıdır.
5. İzomerazlar: Molekül içi grupların aktarımı ile substratın izomerinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzim sınıfıdır.
6. Ligazlar: Bağ oluşumunun gerçekleştiği (C-C, C-S, C-O, C-N) reaksiyonları katalizleyen enzim sınıfıdır [16].

2.1.2. Enzimlerin spesifikliğı

Enzimler, genellikle tek tip kimyasal reaksiyonları veya aynı tip reaksiyonları katalize ederler. Katalizledikleri reaksiyon çeşitlerine ve ürüne çevirdikleri substratlarına karşı da son derece spesifiktirler. Substratlara karşı spesifiklikleri ise oldukça yüksektir. Enzimin substratına olan spesifikliğinin ortaya çıkması için iki ayrı yapısal özelliğinin olması gerektiği çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Bunlardan ilki, substratın enzim tarafından etkilenebilecek bir kimyasal bağa sahip olması; diğeri ise, substratın üzerinde enzimin yapışabileceği ve substratı katalitik bölgenin etkileyebileceği uygun pozisyona getirebilecek grupların bulunmasıdır [16].

2.1.3. Enzimlerin kofaktörleri

Proteinler gibi enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilirler. Bazıları kataliz görevlerini sadece protein yapılarıyla gerçekleştirebilirken bazıları ise bizim “kofaktör” diye adlandırdığımız bazı gruplara ihtiyaç duyarak gerçekleştirirler.

Enzimlere katalizlerinde yardımcı olan bu gruplar kofaktör dediğimiz bir metal iyonu olabileceği gibi, organik bir bileşik olan “koenzim” de olabilir. Enzim aktivitesine bazen her ikisine de ihtiyaç duyulabilir. Kofaktörler ısıya karşı dayanıklı iken, enzimler genelde sıcaklıkla denatüre olurlar. Yine katalitik olarak aktif enzim-kofaktör yapısına “holoenzim” adı verilmektedir. Kofaktörsüz proteine “apoprotein” denirken, enzim ise “apoenzim” olarak adlandırılır ve inaktiftir. Bunun yanısıra bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıdadır ve oldukça sıkıdır. Bu yapılar ise “prostetik-grup” olarak adlandırılır [16].

2.1.4. Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler

Bu faktörleri sıraladığımızda:

2.1.4.1. pH etkisi

Sulu ortamda meydana gelen kimyasal reaksiyonlar için ortam pH'sı oldukça önem arz etmektedir. Bilindiği üzere enzimatik reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleştiğinden, enzimler için pH önemli bir parametredir. Her enzim için kendi aktivitesinin maksimum olduğu ve çalıştığı en uygun pH değerleri bulunmaktadır. Bu değere ‘optimum pH’ denir. Optimum pH değerinin altında veya üstündeki değerlerde enzim aktivitesinde düşüş yaşanır. O yüzden pH değeri mümkün olduğu müddet aktivite tayinlerinde sabit tutulmalıdır. Sabit tutmanın en kısa yolu ise tampon sistemleri tercih etmektir. Çünkü tampon sistemleri ortamdaki herhangi bir pH değişimine izin vermeksizin, bu pH değişimine karşı direnç gösterir. Bu özelliğinden dolayı enzimatik reaksiyonlarda tampon sistemlerinin üstlendiği görev büyüktür [16, 19, 20].

2.1.4.2. Sıcaklık etkisi

Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörlerden bir diğeri ise sıcaklıktır. Ortam sıcaklığı artınca doğrusal olarak enzimatik reaksiyondaki hız da sıcaklıkla beraber artacaktır ve moleküller arasındaki çarpışma hızı da artış gösterecektir. Artan sıcaklık

beraberinde moleküllerin arasındaki çarpışmaların sayısını da arttıracaktır. Bununla birlikte enzimatik reaksiyonun hızı maksimum seviyeye ulaşır, fakat daha sonra düşmeye başlar. Enzimlerin aktivitelerini en iyi gösterdiği sıcaklığa ise optimum sıcaklık denmektedir. Enzimlerin aktivitelerinin maksimum olduğu sıcaklık değerleri bulunmaktadır. Bu sıcaklık değeri canlı organizmalarda 37- 40 °C sıcaklık aralığında iken, bazı termofilik bakterilerde ise enzimatik reaksiyonların gerçekleştiği en uygun sıcaklık değeri 60 - 70 °C kadar olabilmektedir [16, 19, 20].

2.1.4.3. Enzim konsatrasyonunun etkisi

Enzimatik reaksiyonun hızı ortamdaki yeterli miktardaki substrat ve enzim miktarı ile doğru orantılı şeklindedir. Ortamda eğer fazla substrat varsa yine aynı oranda enzim-substrat kompleksi oluşacaktır ve dolayısıyla da aynı oranda ürün oluşumu meydana gelecektir. Kısacası reaksiyon ortamındaki enzim fazla olursa, buna bağlı olarak oluşacak ürün miktarı da fazla olacaktır. Fakat enzim bir süre sonra denatürasyona uğrayarak yıkılır ve artık ortamdaki substrat miktarı arttırılsa bile enzim aktivitesini kaybetmiş olacaktır [16, 19, 20].

2.1.4.4. Substrat konsatrasyonunun etkisi

Eğer reaksiyon ortamındaki enzim konsantrasyonu sabit bir değerde tutulursa ve bununla birlikte, substrat konsantrasyonu da arttırılırsa enzimatik reaksiyonun hızı artış gösterir. Dolayısıyla da meydana gelecek ürün miktarında da artış gözlenir. Fakat bir süre sonra reaksiyonun sahip olduğu parabol eğri, enzim doygunluk noktasına ulaştığı için artık ortamdaki substrat miktarı arttırılsa da hiperbolik eğriye dönüşür ve reaksiyon hızı azalır [16,19,20].

2.1.4.5. Kofaktör ve koenzim konsantrasyonlarının etkisi

Birtakım enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için koenzim dediğimiz organik moleküllere ve kofaktör dediğimiz metal iyonlarına ihtiyaçları vardır. Bu yüzden reaksiyon ortamında tam aktivite gözlenebilmesi için her ikisinin de yeterli miktarda

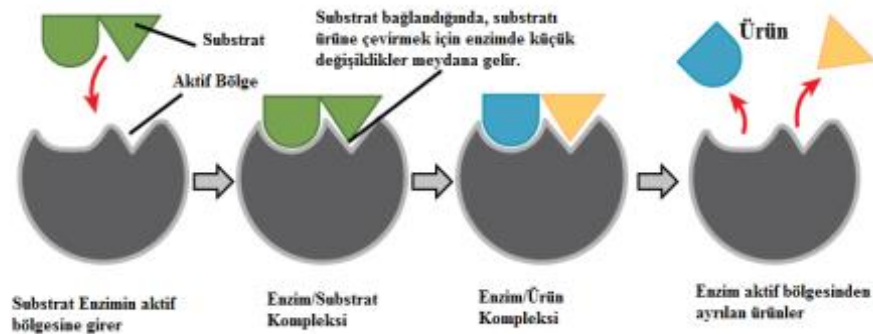
bulunması elzemdir. Çünkü bazı enzimler eğer ortamda her ikisi de mevcutsa aktivite gösterirler [19, 20].

2.1.5. Enzim aktivite birimleri

Uygun şartlarda ölçülen enzim ünitesi (U), 25 °C’de 1 dakikada 1 μ mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Enzimin saflık derecesinin göstergesi olan spesifik aktivite (U/mg protein) ise, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesidir. Dönüşüm sayısı olarak da adlandırılan molar aktivite, bir enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekül sayısı diye tanımlanırken; katal ise 1 saniyede 1 mol substratı reaksiyona sokabilen enzim miktarı olarak adlandırılmaktadır [16].

2.1.6. Enzim kinetiği

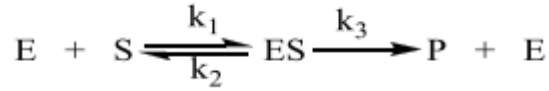
Enzim kinetiğinin asıl amacı; enzim reaksiyon hızlarının, mekanizmalarının nasıl veya hangi hızla oluştuğunu tespit etmektir. Çünkü bu hızın bilinmesi substratların ürüne dönüşümü sırasında gidişat açısından önemlidir. En basit enzim substrat ilişkisini tanımlayan Emil Fischer, 1894 yılında anahtar-kilit (Şekil 2.1.) modelini öne sürerken, 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten ise enzimlerin kinetik özelliklerini açıklayabilmek için bir teori öne sürmüşlerdir. Ve bu teori ile birçok enzimin kinetik özelliklerini açıklanması yolunda önemli bir adım atmışlardır.



Şekil 2.1. Enzimatik reaksiyon

Enzim-substrat kompleksi (ES), enzim (E), substrat (S) ile bağlanmasıyla meydana gelir. Oluşan bu ES kompleksi ise ürün (P) ve enzime (E) dönüşmektedir [21,22].

Michaelis - Menten reaksiyon denklemi:

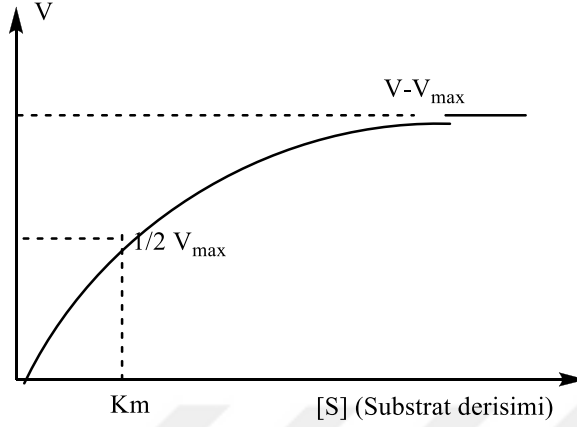


Şekil 2.2. Bir enzimin katalitik etkisi [22].

Öncelikle E ve S'dan sırayla ES kompleksi, k_1 hızı ile oluşmaktadır. ES'nin ayrışması geri reaksiyonla şekildeki k_2 hızında olurken, bu kompleksin ürün ve enzime ayrışması ise k_3 hızı sayesinde meydana gelir. Enzimle katalizlenen reaksiyonun hızı, enzimin etkisi ile zaman birimi başına ürüne dönüşen substratın veyahut oluşan ürünün miktarına göre belirlenebilir. Örneğin biyolojik bir sıvı veya dokudan alınan numunedeki enzimin miktarını belirleyebilmek için öncelikle numunedeki enzimin kataliz hızı belirlenir. Çünkü bu hız, doku örneğindeki aktif enzim miktarı ile doğru orantılı olmakla birlikte, birçok enzimin saf örnekleri bulunmadığından veyahut miktarlarını tespit etmek zor olduğundan bu enzimlerin miktarları tanımı yerine daha çok enzim aktivite ünitesi ifadeleri kullanılmaktadır [21,22].

Substrat konsantrasyonunun düşük olması, enzimatik reaksiyonun yavaş olmasına sebep olan önemli bir etkidir. Bu tarz enzimatik reaksiyonlarda ES kompleksi çok az oluştuğundan, ortamda birçok enzim molekülü serbest kalır. Dolayısıyla ürüne dönüşen miktarın çok az olmasıyla da reaksiyon hızının az olmasına sebep olur. Belirli oranlarda substrat konsantrasyonunun artışıyla enzim moleküllerinin yarısı serbest kalır ve diğer yarısı da ES kompleksini oluştururlar. Oluşan ES kompleksi maksimum hızın yarısına ($1/2 V_{maks}$) ulaşmış olur ve substrat konsantrasyonunun artırılması ile de enzim moleküllerinin tümü ES kompleksi oluşturduğu andaki reaksiyon hızı maksimum (V_{maks}) düzeydedir. Artık substrat konsantrasyonu artırılrsa dahi reaksiyon hızı artmaz, çünkü enzim doygunluk noktasına gelmiş olur. K_m

Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılırken, $1/2 V_{maks}$ ifadesi ise substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir [23].



Şekil 2.3. Michaelis-Menten grafiği [22,24].

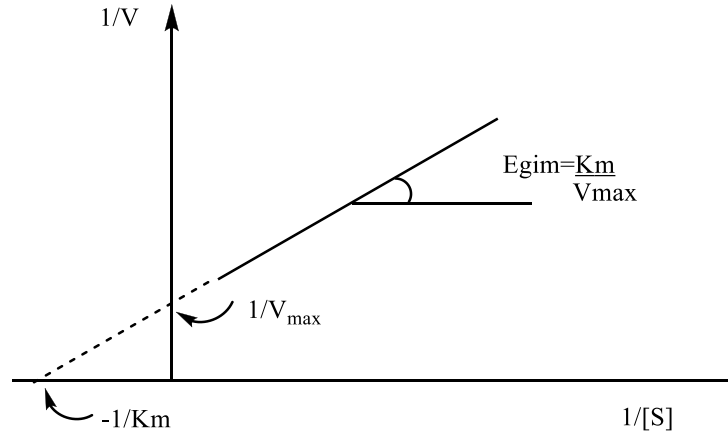
K_m değeri her enzim için ayrıdır. Hız denklemleri sayesinde enzim tarafından katalizlenen pek çok reaksiyonlar tanımlanabilir. Reaksiyon ilk hızını substrat konsantrasyonuyla ilişkilendiren Michaelis-Menten denklemi daha çok kullanılan yöntemdir (Denklem 2.1.) [24].

$$V = V_{maks} [S]/K_m + [S] \quad (2.1)$$

$$K_m = (k_2 + k_3)/k_1 \quad (2.2)$$

Denklemi ile K_m hesaplanabilir.

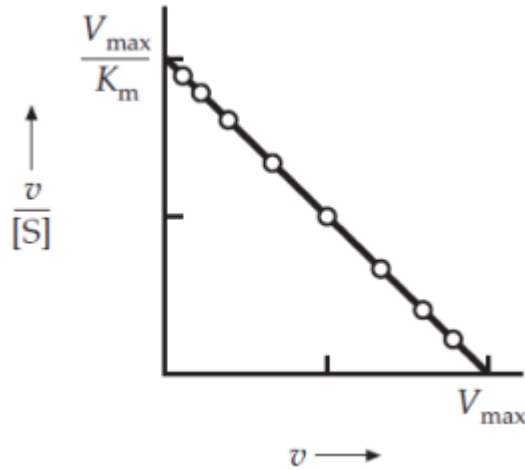
Michaelis-Menten sabiti olan K_m , substrat için enzimin ilgisinin göstergesidir. K_m değeri ne kadar düşükse, substratın enzime karşı ilgisi o kadar fazladır ve sıkı bağlanır. Tam tersi olarak ise, K_m değeri ne kadar büyükse substratın enzime bağlanması zayıf olur ve ilgisi azalır. Bu önemine binaen K_m değeri aynı fonksiyona sahip enzimleri ayırt etmek için kullanılmaktadır [23]. İlgili enzime ait V_{maks} ve K_m değerlerini hesaplamak için ise, grafiği doğrusal olan aşağıda gösterilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmaktadır.



Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği [22,25].

X-eksenini şekildeki gibi keserek uzatılan doğru, kesme noktası olarak $-1/K_m$ 'yi vermektedir. Yukarıdaki grafikten yararlanarak V_{maks} ve K_m bulunabilir. Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 2.4.) yerine Eadie-Hofstee (Şekil 2.5.) grafiği kullanılarak K_m ve V_{maks} tayin edilmektedir. Grafik denklemi;

$V = -K_m \cdot V/[S] + V_{maks}$ şeklindedir [16].



Şekil 2.5. Eadie-Hofstee grafiği [25].

2.1.7. Enzim inhibisyonu

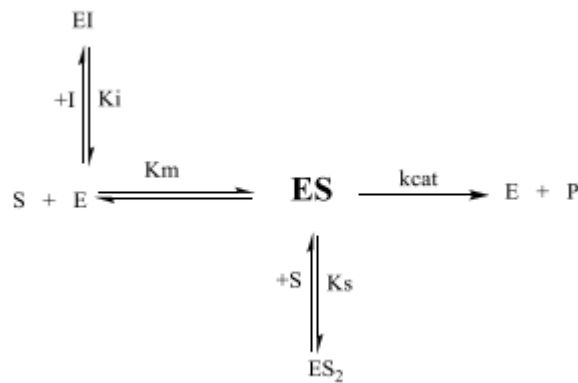
İnhibitör; enzimle katalizli reaksiyonların hızını azaltan maddelere verilen addır [26]. Birçok ilaç ve toksik ajanlar enzimleri inhibe ederken, doğal inhibitörler ise bunlara

etki ederek metabolizmayı düzenler. Enzim uygulamalarında inhibitörlerin kullanılmasıda, enzim mekanizmalarına dair önemli bilgiler sağlamıştır [21].

Baktığımızda enzim inhibisyonu, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmakla birlikte ikiye ayrılmaktadır. Enzim-inhibitör kompleksini (EI) oluşturmak üzere enzimlere kovalent bağlarla sıkı bağlanan inhibitörler “geri dönüşümsüz inhibitörler” olarak adlandırılır ve aktif bölgeyi pasif hale getirerek enzimin inhibe olmasına yol açarlar. Bu türe örnek olarak, penisilin ve aspirin gibi ilaçlar verilebilir [21,22].

Geri dönüşümsüz inhibitörlerin aksine, geri dönüşümlü inhibitörler ise enzime kovalent olmayan bağlarla bağlanarak enzim-inhibitör (EI) kompleksini oluştururlar ve rahatlıkla da enzimden ayrılırlar. Baktığımızda dönüşümlü inhibisyonun yarışmalı, yarı yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere üç türü vardır.

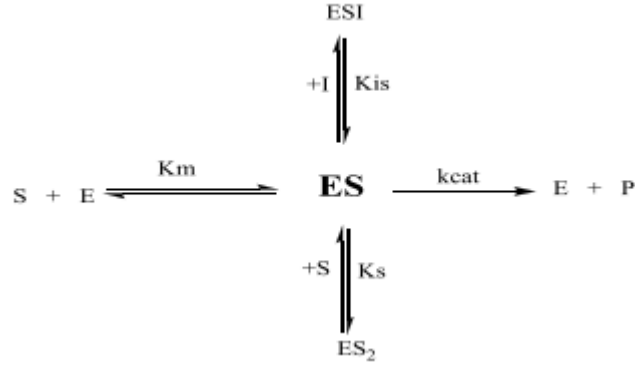
1. Yarışmalı inhibisyon: Bu tip inhibitörlerin kimyasal yapısı substrata çok benzediğinden, enzim-inhibitör (EI) kompleksi rahatlıkla oluşur ve zayıf bir bağlanma olduğu için geri dönüşümlüdür. Aktif bölge için substrat ile yarışan bu tür inhibitörler, yarışmalı ya da diğer bir deyişle rekabetçi inhibitörler olarak adlandırılırlar. Ayrıca inhibitör bağlanmasından dolayı da ürün oluşumu gerçekleşmez [26].



Şekil 2.6. Yarışmalı inhibisyon şeması [27].

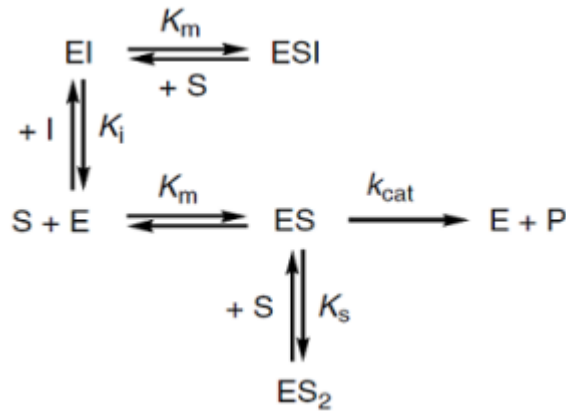
2. Yarı yarışmalı inhibisyon: Bu tür inhibitörler, serbest enzime bağlanmayıp, enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanarak inhibisyona neden olurlar. Bu inhibisyona yarı

yarışmalı inhibisyon denir. Genellikle de iki substratlı reaksiyonlarda bu tip inhibisyon görülmektedir [26].



Şekil 2.7. Yarı yarışmalı inhibisyon reaksiyon şeması [27].

3. Yarışmasız inhibisyon: Klasik yarışmasız inhibisyonda, I ve S birbirlerinden bağımsız olarak tersinir bir tarzda farklı merkezlere bağlanır. Yani S hem EI'ye hem E hem de ES'e bağlanırlar. Sonuçta meydana gelen ESI kompleksi ise katalitik olarak inaktif yapıdadır [26].



Şekil 2.8. Yarışmasız inhibisyon reaksiyon şeması [27].

Yukarıdaki reaksiyon şemasına bakıldığında $[S]$ değeri çok yükseltirse de EI ve ESI komplekslerinin meydana gelişinin önüne geçilemeyeceği görülmektedir. ES oluşumu tam anlamıyla gerçekleşemeyeceğinden, inhibitörsüz reaksiyondaki maksimum hıza ulaşılamaz. Sonuçta V_{maks} 'ı azalırken K_m değişmeden kalır [26].

2.2. Antioksidanlar

Serbest radikalleri hücre hasarına yol açmadan hemen nötralize edebilen veya deaktive edebilen herhangi bir moleküle antioksidan denir. Örneğin redoks reaksiyonları, serbest olmayan radikal üretirler. Kararsız ve yüksek oranda reaktif olan bu radikaller, hücrelere zarar verecek reaksiyon zincirini başlatırlar. Antioksidanlar ise serbest reaksiyona elektron bağışlayarak ve serbest radikal olmadan kendilerini nötralize ederek bu reaksiyonu inhibe ederler [28].

Antioksidan savunma sistemi ikiye ayrılmıştır. Bunlar:

1. Enzimatik antioksidan

Enzimatik antioksidan, vücuttaki tüm hücrelerde bulunur ve tamamı vücut tarafından üretilir. Üç ana sınıfa ayrılır. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GST)' dir.

2. Enzimatik olmayan antioksidan

Askorbik asit (C vitamini), tokoferoller ve tokotrienoller (E Vitamini) ve karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar vücut tarafından üretilemediğinden diyetle dışarıdan alınması gerekir. Fakat glutatyonu vücut, aminoasitlerden sentezleyebildiği için insan için gerekli bir besin maddesi olmayan, kısacası enzimatik olmayan bir antioksidandır [29]. Bazı antioksidan enzimler ve maddeler Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı antioksidan enzimler ve maddeler [30].

Antioksidan enzimler	Enzim yapısında olmayan antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	A Vitamini (β -Karoten)
Katalaz	C Vitamini (Askorbik asit)
Süperoksitredüktaz	E Vitamini (α -Tokoferol)
Peroksiredoksinler	Proteinler (transferin, ferritin, albumin, bilirubin)
Peroksidazlar	Hormonlar (serotonin, melatonin)
Glutasyon Redüktaz	Fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoidler)
Glutasyon S-transferaz	Lipoik asit, ürik asit, glutasyon

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller herhangi bir molekül olarak tanımlanabilir veya fragmanı bağımsız olarak var olabilir. Dış atomik yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içerdiklerinden, bu moleküller yüksek oranda reaktif ve kararsızdır. Elektron kabul ederek veya bağışlayarak diğer bitişik moleküller ile reaksiyona girerler, bu sebeple de serbest radikal; oksidan ve indirgeyici olarak davranır. Bazı serbest radikaller ise metabolizma sırasında endojen olarak üretilirler. İmmün sistem tarafından patojenlere saldırmak ve onları yok etmek için ise bazen kasıtlı olarak serbest radikaller meydana getirilir. Endüstriyel kimyasallar, çevre kirliliği ve sigara içme serbest radikallerin dışsal kaynağını oluşturmaktadır [31].

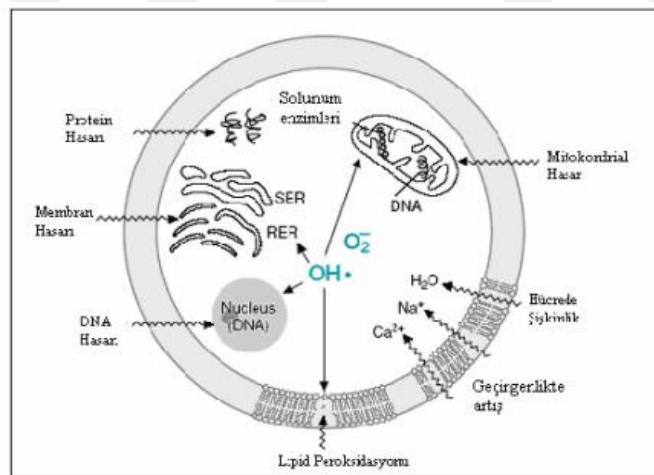
Serbest radikaller oksijen içeren, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak isimlendirilir. Bu reaktif oksijen türlerinden en yaygın olanları; süperoksit radikali ($\cdot\text{O}_2$) ve hidroksil radikalidir ($\cdot\text{OH}$). En az reaktif ROS tipi olan süperoksit, bir elektron süperoksit radikalini oluşturan bir oksijen molekülüne katıldığında oluşur ve bu radikal insan vücudunda üretilen en yaygın serbest radikal olarak bilinir. Önde gelen süperoksit radikal kaynakları fagositik hücrelerdir. Çünkü virüs ve bakteri gibi patojenlere saldıran serbest radikaller, bu hücreler tarafından oluşturulur [32]. Bu serbest radikal kaynakları Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Serbest radikal kaynakları [33].

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Araşidonik asit metabolizması	Organik solventler
Fagositik ve endotelial hücreler	Zararlı ışınlar (x-ray, UV)
Otoksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Enzimler (Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz vs.)	Pestisitler
Oksidatif reaksiyonlar	Ksenobiyotikler

Süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi organizma içindeki radikaller, hücresel, mitokondriyal, nükleer ve endoplazmik zarlarda lipit peroksidasyonunu başlatarak, hücre hasarına sebep olabilecek birçok tepkimeye sebep olurlar. Örneğin hücrenin geçirgenliğindeki artış, Ca^{2+} 'un hücreye doğru akın etmesine ve mitokondriyal hasara sebebiyet vermektedir [34].

Radikallerin hücrede sebep olduğu hasarlar aşağıdaki Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.

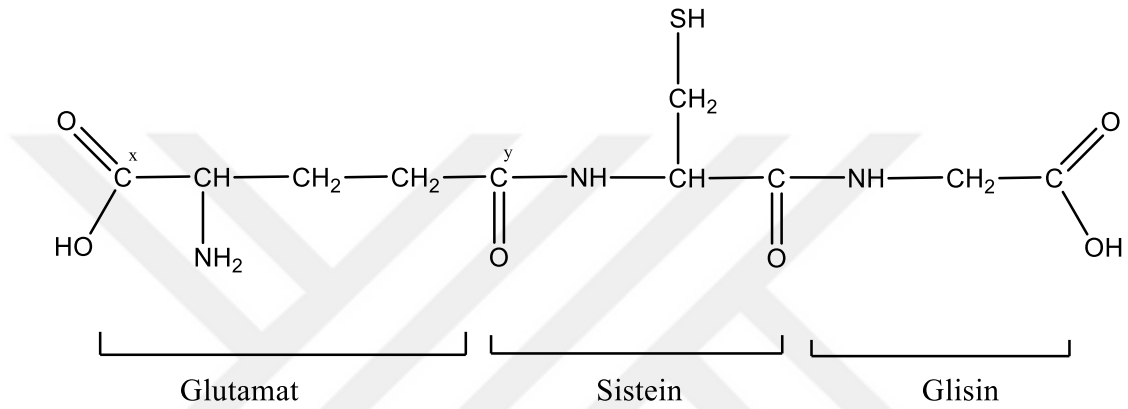


Şekil 2.9. Radikallerin hücrede sebep oldukları hasarlar [35].

2.4. Glutasyon

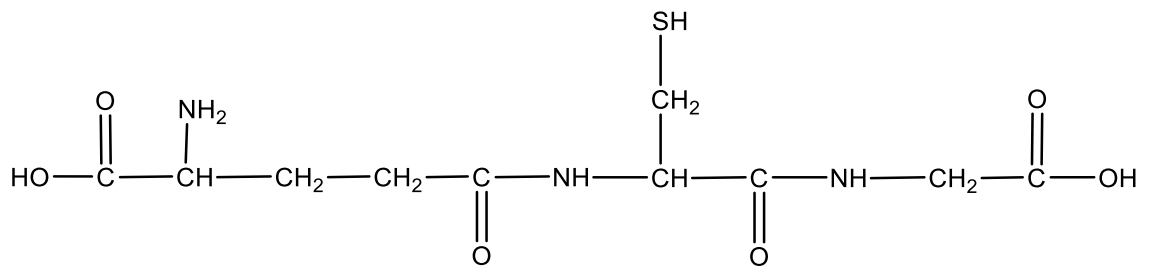
Glutasyon, hücredeki en bol tiyol prevalansıdır, sitoplazmada sentezlenir ve üç aminoasit L-glutamik, L-sistein ve glisinden meydana gelmektedir [36] (Şekil 2.10.). Tripeptid yapısında olan glutasyon, prokaryot ve ökaryot hücrelerde hücre içindeki

sülfhidril gruplarının büyük çoğunluğunu oluşturan protein yapısında olmayan önemli bir tiyoldür. Üç adet aminoasitten oluşan glutatyon (GSH) molekülünün, proteinlerin yapısında olmadığı ve diğer peptitlerden farklı şekilde birleştiği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Glutatyonun protein yapımında kullanılmamasının sebebi; bu molekülün aminoasitlerden sentezlenmesi sırasında glutamik asidin, bir peptit bağı ile sistein aminoasidine ters taraftan yani farklı taraftan bağlanmasıdır [37, 38, 39].

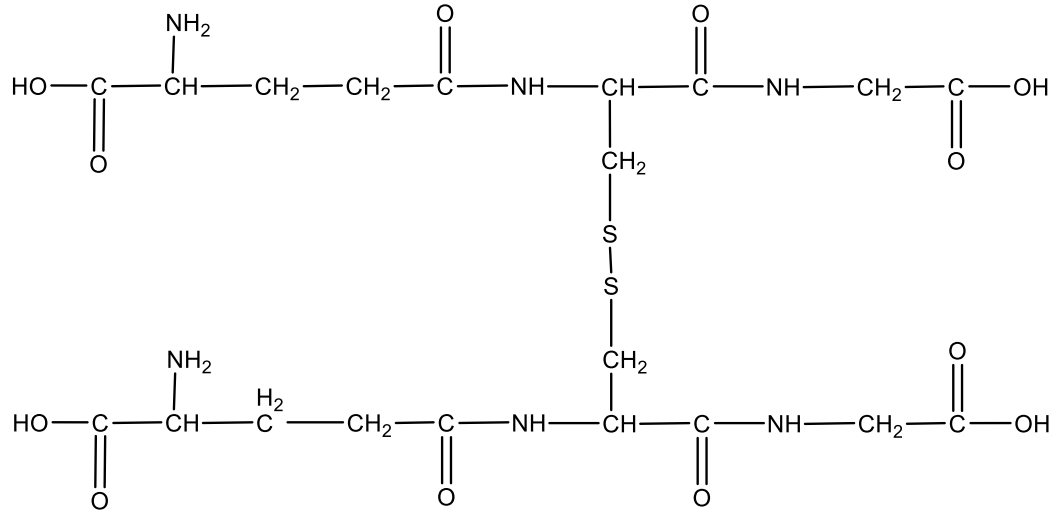


Şekil 2.10. Glutatyonun yapısı

Hücresel düzeyde birçok işlevi yerine getiren glutatyon, suda çözünür bir antioksidandır [40]. Okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunan glutatyonun yapısı aşağıda Şekil 2.11. ve Şekil 2.12’de gösterilmiştir.



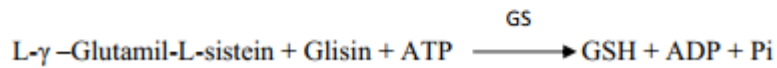
Şekil 2.11. Redükte glutatyon yapısı GSH, (L-γ-glutamyl-L-sisteinil-glisin)



Şekil 2.12. Okside glutatyonun yapısı GSSG, 2 (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)

Roy - Pailhade tarafından ilk olarak 1888 yılında maya hücresinde bulunarak “filothian” olarak adlandırılmıştır. Hopkins tarafından ise 1921’de saflaştırılarak kristallendirilmiştir ve bugünkü ismi verilmiştir [41,42].

Hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile glutatyon sentezlenir. Bu reaksiyonlar (γ-glutamil sistein sentetaz. (γ-GSS) ve glutatyon sentetaz (GS)) enzimleri tarafından katalizlenir [43, 44, 45].



İndirgenmiş glutatyan, hücrelere göre değişmekle beraber normal koşullarda 0,5 ile 10 mM düzeyinde bulunur [46, 47, 48, 49].

Enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla indirgenmiş glutatyon, okside glutatyona (GSSG) dönüşmektedir. Özellikle bu dönüşüm, peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik transhidrojenasyon sonucu meydana gelmektedir.

Glutasyon, yapısında bulundurduğu –SH grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşılık hücreyi korumaktadır. Bu özelliğinden dolayı glutasyonun düşük konsantrasyonunda birtakım metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir.

Glutasyonun görevlerinden bazıları ise şunlardır:

1. Serbest radikallerin ve zararlı oksijen ürünlerinin inaktivasyonu,
2. Spektrin ve hemoglobin gibi membran proteinleri ile çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının glutasyon tarafından korunması,
3. Ksenobiyotiklerin ve çeşitli metabolik son ürünlerin konjugasyon ile atılması,
4. DNA, protein sentezi ve aminoasit transportu,
5. Hücre içerisinde bulunması sistein deposu şeklindedir [50, 51].

2.5. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR) enzimi (E.C.1.8.1.7) ilk kez 1951’de tanımlanmıştır. GR enzimi indirgenmiş piridin nükleotidleri ve disülfür substratları arasındaki elektron transferini katalizlemektedir.



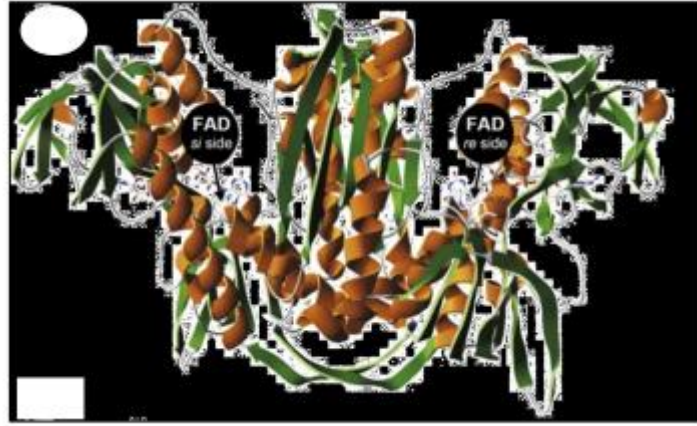
GR enziminin en büyük amacı hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumaktır. Eritrosit hücrelerinde bu oran yaklaşık olarak 500/1’dir. Oran düştüğü takdirde eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır [5]. Hücre içindeki glutasyon, indirgeme-yükseltgeme olayında önemli bir role sahiptir. Ayrıca glutasyon redüktaz enzimi, hücre içindeki –SH /–SS oranını korumayı, GSH/GSSG oranını arttırarak başarmaktadır [44].

NADP⁺ bağımlı malat dehidrogenaz (eritrositler hariç) ve pentoz fosfat yolu, GR enziminin katalizlediği bu reaksiyonda kullanılan NADPH’nın kaynağını oluşturmaktadır [52]. İndirgeyici biyosentez olaylarında yaygın bir şekilde kullanılan

NADPH, pentoz fosfat yolunun da önemli bir ürünüdür. Aynı zamanda oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında önem teşkil etmektedir [53].

İlaç ve detoksifikasyonu, hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması gibi reaksiyonlarda indirgenmiş glutatyon (GSH), önemli bir role sahiptir. Özellikle bu rolü, karaciğerde çok önemlidir. Bunun sebebi ise detoksifikasyon olayının karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından gerçekleştirilmesidir. Bahsedilen sistemin işleyişine baktığımızda, eğer oksijen molekülüne yeterli miktarda elektron aktarılmazsa süperoksit radikali (O_2^-) veya peroksit (H_2O_2) oluşumu gerçekleşir. Meydana gelen bu zararlı iyonları, zararsız hale getirecek sistem hücrede bulunmaktadır. Örneğin; süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri, hücrede oksidatif strese neden olan süperoksit radikali ve peroksitin suya dönüşmesine yol açarak hücre membranı proteinlerinin zarar görmesini önler. Adı geçen enzimlerin bu fonksiyonları askorbik asit, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve K vitamini tarafından güçlendirilir. Kullanım alanları olarak glutatyon redüktaz enzimi; beslenme, klinik kimyada karaciğer ve kanser hastalıklarının belirlenmesinde, riboflavin yetersizliğinin ve birtakım genetik eksikliklerin tespitinde kullanılır [7].

Hücrel antioksidan sisteminin çok önemli bir enzimi olan glutatyon redüktaz, glutatyon disülfidini sülfidril formuna (GSH), NADPH bağımlı bir mekanizma ile indirger. 1935 yılından itibaren birçok hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmış olan GR enziminin; yapısı, kinetik mekanizması ve moleküler özellikleri tanımlanmıştır. Prostetik grup olarak iki FAD molekülü taşıyan GR enzimi, homodimerik yapıda bir flavoproteindir (Şekil 2.12.). Sahip olduğu FAD grupları NADPH ile indirgenir. Dimerik olan enzimin mol kütlesi yaklaşık 100-120 kDa arasında değişmektedir. Enzimin stabilitesi ve ısıya dayanıklı enzim olduğu çeşitli organizmalarda incelenerek bulunmuştur [54].



Şekil 2.13. Glutatyon redüktazın üç boyutlu yapısı [55].

Enzimin farklı kaynaklardaki mol kütlesi ise 70.000-140.000 dalton arasında değişmektedir. Birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan enzimin bu birimlerine ayrı ayrı FAD'nin bağlandığı bulunmuştur. Örneğin; insan eritrosit GR enziminin yaklaşık olarak 132.000 dalton olduğu tespit edilmiştir [56].

GR enzimi, okside glutasyonu (GSSG) indirgenmiş hale (GSH) dönüştürürken, NADPH'dan gelen elektronların okside glutasyonun disülfür bağına aktarımı direkt olarak olmaz. Elektronlar önce FAD'ye aktarılır, daha sonrada alt birimdeki iki sistein arasında bulunan disülfür köprüsüne aktarılmak suretiyle okside glutatyona aktarılmış olurlar. Enzimin her bir alt birimi üç tane yapısal alan içermektedir. İlki FAD bağlayıcı alan, ikincisi NADPH bağlayıcı alan ve sonuncusu da ara yüz alanıdır. FAD ve NADP⁺ alanı birbirine benzerken, diğer dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara da benzerler. Bakıldığında okside glutasyon için bağlayıcı alanın, bir alt birimin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından oluştuğu bilinmektedir [57, 58, 59].

2.6. Biberiye

Tıbbi ve aromatik bir bitki olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), Lamiaceae familyasından olup, türkçede hasalbal gibi isimlerin yanında kuşdili ve akpüren gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (Şekil 2.13.). 50-100 cm yükseklikte olan biberiye bitkisi çok yıllık bir bitki olmasıyla birlikte yaprakları her dem yeşil, çalı

görünüşünde ve çiçekleri soluk mavi renktedir. Akdeniz ikliminin hâkim olduğu yerlerde yabani olarak yetişen biberiye, dünyada tıbbi, aromatik ve süs bitkisi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. İspanya ve Fransa gibi ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde ise yoğunlukla doğadan toplanır ve daha çok güney ve batı kıyı şeridinde yetiştirildiğinden, odun dışı orman ürünleri kategorisinde bulunmaktadır. Yıllara göre verilere bakıldığında ise, 2014 yılında 172 ton üretim; 2013 yılında ise 758 ton ihraç edildiği görülmektedir [60].



Şekil 2.14. Biberiye yaprakları [61].

2.6.1. Faydaları

Biberiye yağının başlıca bileşenlerini sıralayacak olursak;

- % 20 α -pinen,
- % 5 mirsen,
- %18 kafur,
- % 6 β -pinen % 5 borneol,
- % 20 1,8-sineol
- % 3 bornil asetat,
- % 7 kamfen,
- % 2 terpineol, limonen, linalol, karyofillen ve terpineol şeklindedir.

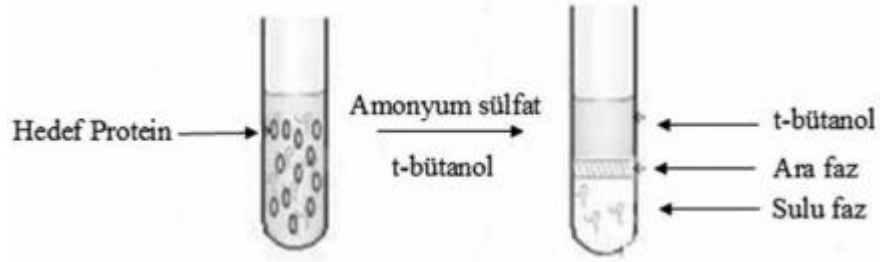
Sindirim sistemi uyarıcısı, idrar söktürücü gibi etkilerinin yanı sıra, safra artırıcı özelliğide olan biberiyenin, aynı zamanda yaraları tedavi etmek amacıyla da

kullanıldığı bilinmektedir. Biberiyeden çıkarılan esansiyel yağın ise antioksidan, antibakteriyel, insektisit ve antifungal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [62].

Biberiyenin taze ve kurutulmuş yaprakları, güçlü aromatik kokusu sebebiyle bazı gıda ürünlerinde lezzetlendirici olarak kullanılmaktadır. Biberiye yapraklarındaki uçucu yağlar, kozmetik ürün endüstrisinde banyo esansları, çeşitli kolonya, saç losyonları, dezenfektanların ve şampuanların bir bileşeni olarak kullanılır. Ayrıca biberiye yaprağı ekstraktlarının ana bileşenleri, karnozik asit ve rosmarinik asittir ve özellikle rosmarinik asitin; anti-inflamatuar, atopik dermatitin azaltılması, anti-apoptotik, antianjiyojenik, antifibrotik, nöroprotektif, antioksidan, keratinositlerin fotoproteksiyonu, kemoprotektif, antimutajenik ve Alzheimer hastalığının oluşmasının önüne geçilmesi gibi biyolojik bir takım aktivitelerin olduğu belirlenmiştir [63].

2.7. Üçlü-Faz Ayırma (TPP) Yöntemi

İlk kez Tan ve Lovrein 1972'de, çoğunlukla yüksek miktarda uçucu organik çözücü, enerji ve zaman gerektiren geleneksel ekstraksiyon ve ayırma tekniklerine umut verici olarak alternatif strateji düşünülen üç fazlı bölümlenmenin (TPP) kullanılmasını önermiştir. Bu metotta öncelikle protein içeren ham ekstrakt üzerine inorganik bir tuz (genellikle amonyum sülfat) eklenir ve daha sonra uygun bir miktarda t-bütanol eklenerek karıştırılır. Ortamdaki amonyum sülfata t-bütanol (yardımcı çözücü) eklendiğinde bu karışım proteini çözeltiden dışarı doğru iter. Eklenen t-bütanol, protein yoğunluğunu azaltmak amacıyla proteinlerin hidrofobik olan kısmına bağlanır ve sonuçta yoğun sulu tuz fazının üzerinde yüzmeye neden olur. Genellikle bir saat içinde genellikle altta su fazı ve üstte t-bütanol içeren organik faz arasında bir ara faz (yüzey) çökeltisi meydana gelir [64,65] (Şekil 2.14.).



Şekil 2.15. ÜFS sonucu meydana gelen fazların gösterimi [66]

Üçlü faz bölümlleme (TPP), basit, ölçeklenebilir, hızlı ve nispeten yeni bir biyolojik ayırma tekniği olmakla birlikte çeşitli biyomoleküllerin başlıca proteinlerinin çıkarılması için de kullanılmıştır. Yönteme bakıldığında genel olarak t-bütanol su ile tamamen karışabilir, fakat üzerine yeterli konsantrasyonda amonyum sülfat eklenmesiyle, düşük sulu faz ve bir üst t-bütanol fazına ayrılır. Daha sonra bu fazlara ek olarak mikrobiyal, bitki veya hayvan hücresi homojenatı eklenip karıştırıldığında ise organik ve sulu katmanın arasında ara faz dediğimiz proteinli katmanı içeren ek bir katman daha oluşmaktadır [67].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır:

El Blender	: Ev tipi
Vortex	: Heidolp ReaxTop
pH Metre	: SCHOTT Lab850
Analitik Terazî	: SHIMADZU ATX220
Su Banyosu	: DAIHAN WB-11
Soğutucu Kabin	: Özel yapım
Mikropipetler	: BIOHIT Proline
Buzdolabı	: BEKO/Ev tipi
Saf Su Cihazı	: Merck Millipore
Spektrofotometre	: SHIMADZU UV1700 PharmaSpec
Derin Dondurucu	: UDD 100BK Uğur
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	: DAIHAN MSH-20A
Protein Elektroforezi	: Owl P8DS Thermo Scientific

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

β -nikotinamidadenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form) (NADPH), okside glutatyon (GSSG), polivinil pirolidon (PVP), L-askorbik asit, dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojen fosfat, sitrik asit, mono hidrat, tris aminometan hidroklorid, glisin, trizma-base, triton X-100, gliserol, amonyum sülfat, sodyum

sitrat, standart serum albümin, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, etanol, metanol, t-bütanol, asetik asit, SDS (sodyumdodesilsülfat), N,N'-metilenbisakrilamid, Tris (tris (hidroksimetil) aminometan), bromfenolblue, marker, β -merkapt etanol, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue G250, , amonyum persülfat, Coomassie Brilliant Blue R250, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , CoCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , FeCl_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kimyasalları Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından sağlanmıştır.

3.2. Glutasyon Redüktaz (GR) Enziminin İzolasyonu ve TPP Yöntemi

3.2.1. Ham enzim özütünün hazırlanması



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan biberiye bitkisi

Bu çalışmamızda materyal olarak biberiye bitkisi kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Sakarya Üniversitesi Kampüs Yerleşkesi'nden taze olarak toplanan biberiye bitkisi, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depolanarak enzim kaynağı olarak kullanılmış ve yaprak kısımlarından 20 gram tartılıp alınarak, % 0,5 polivinil piroldon, % 4 Triton X-100 ve içerisinde 0,001 M askorbik asit olan 60 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltisi kullanılarak blendır yardımıyla 5 dakika parçalama işlemi yapılmıştır. Oluşan homojenat, ilk önce üç kat tül bentten daha sonra da adi süzgeç kağıdından süzölmüş ve 4500 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Tüplerde çökelti oluşumu gözlenmeyene dek santrifüjleme

işlemine devam edilmiştir. İşlem sonucunda süpernatant kısmı alınarak, ham enzim ekstraktı şeklinde karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

3.2.2. Amonyum sülfat miktarının optimizasyonu



Şekil 3.2. % 50 doygunlukta amonyum sülfat miktarı

Yukarıdaki gibi hazırlanan ham enzim ekstraktından 2 mL alınarak sırasıyla farklı amonyum sülfat doygunluklarına (%40, %50, %60, %70, %80, %85) getirilerek nazikçe vortekslenmiş ve homojen hale getirilmiştir (Şekil 3.2.). Farklı oranlarda amonyum sülfat doygunluğuna getirilen her bir örneğe 1,0:1,0 (v/v) t-bütanol eklenmiş ve birkaç kere tam karışma için ters düz edilmiştir. Elde edilen karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş, 4500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek faz ayrımı yapılmıştır. Kolayca gözlenebilen fazlardan organik çözücüyü bünyesinde barındıran üst faz kısmı ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, katı olan orta faz kısmı alt fazdan dikkatli bir şekilde ayrılarak 1 mL fosfat tamponunda (0,1 M; pH: 7) çözdürülmüştür. Daha sonra her bir faz için glutatyon redüktaz enzim aktivite tayini yapılmıştır. Böylece aktivitenin en yüksek gözleendiği amonyum sülfat miktarı belirlenerek bu sonuç ilerideki işlemlerde temel alınmıştır.

3.2.3. Tersiyer bütanol oranının optimizasyonu



Şekil 3.3. Örneğe t-bütanol ilavesi

Uygun amonyum sülfat eklenen örneklerin bulunduğu tüpler alınarak, üzerlerine sırasıyla enzim/t-bütanol (1,0:0,5 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) olacak şekilde t-bütanol eklenmiştir (Şekil 3.3.). Daha sonra farklı miktarlarda t-bütanol eklenmiş bu örnekler 1 saat boyunca oda sıcaklığında kaldıktan sonra 4500 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüjlenerak faz ayrımı yapılmıştır. Üst kısımdaki organik faz kısmı bir pipet sayesinde atıldıktan sonra, katı olan orta faz kısmı alt fazdan dikkat edilerek ayrılması sağlanarak alınıp, 1 mL fosfat tamponunda (0,1 M; pH:7) çözdürülmüştür. Daha sonra her bir faz için glutatyon redüktaz enzim aktivite tayini yapılmıştır. Aktivitenin en yüksek gözlemlendiği t-bütanol miktarı belirlenerek daha sonraki yapılacak olan işlemlerde çıkan sonuç temel alınmıştır.

3.2.4. Ortam pH'sının optimizasyonu



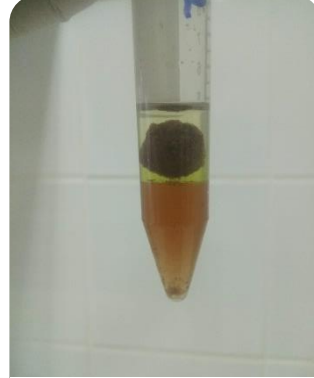
Şekil 3.4. Farklı pH'lardaki örnekler

Uygun amonyum sülfat eklenen ve optimum miktarda t-bütanol eklenen örnekler için ortam pH'ı sırasıyla (pH=3, pH=5, pH=7, pH=9) olacak şekilde değiştirilmiştir (Şekil 3.4.). Daha sonra optimum koşulları sağlayan bu örnekler, 1 saat boyunca oda sıcaklığında muhafazasından sonra 4500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek faz ayrımı yapılmıştır. Yine organik faz dediğimiz üst kısımdaki faz bir pipet yardımıyla atıldıktan sonra, katı olan orta faz kısmı alt fazdan dikkatlice alınıp 1 mL fosfat tamponunda (0,1 M; pH:7) çözündürülmüştür. Daha sonra her bir faz için glutatyon redüktaz enzim aktivite tayini yapılmıştır. Aktivitenin en yüksek olduğu ortam pH'ı belirlenerek daha sonraki yapılacak olan işlemlerde bu pH değeri temel alınmıştır.

3.2.5. İnkübasyon süresinin optimizasyonu



Şekil 3.5. Santrifüj öncesi örnek



Şekil 3.6. Santrifüj sonrası örnek

Yöntem uygulanmasında son parametre olarak; optimizasyonlar sonucunda en yüksek aktivitenin gösterildiği uygun amonyum sülfat doygunluğuna, uygun t-bütanol oranına ve optimum pH'a sahip örnekler 3 farklı (15 dk, 30 dk, 60 dk) süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5.). Her bir örnek, inkübasyon süresi bitiminde 4500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek faz ayrımı yapılmıştır (Şekil 3.6.). Üst kısımdaki organik faz atıldıktan sonra, katı olan orta faz kısmı alt fazdan ayrılarak alınıp 1 mL fosfat tamponunda (0,1 M; p H:7) çözdürülmüştür. Daha sonra her bir faz için glutatyon redüktaz enzim aktivite tayini yapılmıştır. Aktivitenin üç bekleme süre sonunda en yüksek görüldüğü inkübasyon süresi belirlenerek parametreler tamamlanmıştır.

Yöntem için kullanılan 4 farklı optimizasyon işlemlerinde aktivitelerinin en yüksek olduğu şartlar belirlenmiştir. Biberiye ham ekstraktından alınarak üzerine sırasıyla yukarıda optimum konsantrasyonu belirlenen amonyum sülfat eklenmiş ve doygunluğa getirilmiştir. Daha sonra optimize edilen t-bütanol eklenerek, yine ortam pH'ı optimum şartlara çekilmiştir. Son olarak ise örnek, yine optimize edilmiş bekleme süresinde muhafaza edilerek tüm optimum şartlar sağlanmıştır. Daha sonra bu örnek, 4500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek faz ayrımı yapılmıştır. Üst kısımdaki organik faz atıldıktan sonra, katı olan orta faz kısmı alt fazdan ayrılarak alınıp 1 mL fosfat tamponunda (0,1M; pH:7) çözdürülmüştür. Enzim

aktivitesinin optimizasyonların sağlanması sonucunda en yoğun gözlemlendiği homojenize edilmiş ara faz kısmı, protein tayininde ve molekül ağırlığı saptanmasında tercih edilmiştir.

3.2.6. Bradford yöntemi ile protein tayini

Bradford metoduyla hem ham enzim ekstraktının hem de üçlü faz yöntemiyle saflaştırma işleminden elde edilen örnekler için ihtiva ettikleri protein miktarları saptanmıştır. İlk önce standart bir protein grafiği oluşturulmuştur. Gerekli olan stok çözelti 1 mg/mL'lik BSA'dan (sığır serum albümini) hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden sırasıyla (20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL, 100 µL) alınıp hacimleri Bradford reaktifi tarafından 1 mL'ye tamamlanmak üzere standart protein çözeltilerimiz hazırlanarak bu çözeltilerin 595 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda grafik çizilmiştir. Aynı şekilde örnekler için de 595 nm'de absorbanları ölçümü yapılarak daha önce oluşturulan standart protein grafiği yardımıyla örneklerin protein miktarları bu yöntem sayesinde tayin edilmiştir.

3.2.7. SDS-PAGE ile enzim saflık kontrolü

Yapılan bu çalışmada %12'lik bir ayırma jeli ile %5'lik bir yükleme jeli kullanılarak SDS-PAGE işlemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1.). Öncelikle cam plaklar üzerinde herhangi bir leke, kirlilik olmaması için temizlenmiştir. Cam plaklar arasında bir kaçak olması ihtimaline karşın saf su ile sızdırma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra alınan temiz bir beher içerisine ayırma jelini oluşturan bileşenler sırasıyla eklenmiştir ve oluşan bu jel, plakalar arasına hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek ilk jel olarak dökülmüştür. Bu jel üzerine daha düzgün bir polimerizasyon yüzeyi sağlanması amacıyla suyla doyurulmuş bütanol ya da propanol eklenir. Jelin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 15-20 dk boyunca beklenir. Polimerleşme işlemi gerçekleştikten sonra adi süzgeç kağıdına, jel üzerine dökülen doyurulmuş bütanol veyahut propanol emdirilerek ortamdan arındırılır. Ayırma jelinin donmasından emin olunduktan sonra bu kez yükleme jeli yine ayrı bir beher içerisinde hazırlanarak donan ayırma jelinin üzerine dökülmüştür. Hiç beklemeden

de kuyucuk oluşturması amacıyla tarak jel üzerine yerleştirilmiştir ve yine polimerleşme için 15-20 dk boyunca bekletilmiştir. Donan jel daha sonra elektroforez tankına koyularak tank içerisine yürütme tamponu eklenmiştir. Standart proteinler, ham enzim ekstraktı ve rnekler (TPP yapılmış) 1'e 2 oranı olacak şekilde numune (rnek yükleme) tamponu ile karıştırılarak enzim örneklerinin denatüre olması amacıyla 95 C'de 5 dk süresince inkübasyona bırakılmıştır. Denatüre olan enzim örnekleri buz üstüne derhal koyulmuştur. Denatüre olmuş bu örnekler tarak vasıtasıyla jel üzerinde meydana gelen kuyucuklara sırasıyla yüklenmiş ve tank ortamı kapatılarak yürütme işlemine başlanmıştır. Proteinleri yürütme işlemi 20-25 mA'de yapılmıştır. Yürütme işlemi ayırma jelinin sonuna geldiğinde ise elektrik akımı kesilerek jel dikkatlice tank içerisinden çıkartılmıştır. Jel üzerinde bulunan protein moleküllerinin daha görünür hale getirilmesi amacıyla boyama işlemine geçilmiştir. Boyamadan önce protein moleküllerinin jel üzerinde sabitlenmesi amacıyla fiksatif çözelti içerisinde bir süre bekletilmiştir. Daha sonra jel 3,5-4 saat süresince boyama çözeltisi içerisinde hafifçe çalkalanmak suretiyle boyanmıştır. Protein moleküllerinin daha da görünür bir hale gelmesi için ise boya giderme işlemine geçilmiştir. Boya giderme çözeltisi sık sık değiştirilerek boyanın jelden uzaklaşması sağlanana dek bu işleme devam edilmiştir.

Tablo 3.1. SDS jel elektroforezi bileşenleri ve miktarları gösterimi [68].

Bileşenler	Ayırma Jeli (%12)	Yükleme Jeli (%5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl pH: 6,8)	---	1,25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl pH: 8,8)	2.5 mL	---
% 10 SDS	0.1 mL	0.1 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	4.0 mL	1.67 mL
Saf Su	3.3 mL	6.87 mL
% 10 APS	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.01 mL

3.3. Biberiye Bitkisi Glutasyon Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

Glutasyon redüktaz enzimi kinetik özelliklerinin bulunması kapsamında optimum iyonik şiddetin belirlenmesi, optimum sıcaklık, optimum pH, depolanma kararlılığı ve bazı metallerin enzim aktivitesine herhangi etkisinin belirlenebilmesi kapsamında çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. GR aktivite tayini



Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde iki temel esas vardır. Bunlardan birincisi, yukarıda verilen tepkimede, tepken NADPH 340 nm’de maksimum absorbans verirken, tepkimeye dahil olan GR enzimi NADPH’ın azalmasına neden olmaktadır. Spektrofotometrik olarak azalma, 340 nm’de takip edilebilmektedir [69].

Diğeri ise, aynı tepkimede ürün olan GSH’ın, 5,5’-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) tepkimesiyle oluşan bileşiğin, 412 nm’de ki absorbansının, takip edilmesi temeline dayanır. GR enzimi, zamanla GSH’ın artmasını sağlarken, GSH’da DTNB ile tepkimeye girerek absorbans artmasına neden olmaktadır [70].

Yukarıda anlatılan iki yöntemden ilki daha spesifiktir ve genellikle tercih sebebidir. Bizde çalışmamızda ilk yöntemi tercih ettik. GR aktivitesi hem FAD’li hem FAD’sız iki farklı ölçüm yapılabilmektedir. Bazen bir veya her iki farklı ölçüm alınarak sonuçlar kıyaslanmaktadır. Tez çalışmamızda ise FAD’sız ölçüm yaptık.

Aşağıdaki formül kullanılarak enzim ünitesi hesaplanmıştır (Denklem 3.1.).

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F \quad (3.1)$$

Yukarıdaki formül simgeleri açıklanmıştır;

$E\dot{U}/mL$: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbens değışimi

6,22 : 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbens değeri (ekstinsiyon katsayısı)

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.3.2. Biberiye bitkisi GR enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik çalışmalar

Biberiye bitkisi GR enziminin yüksek aktivite sağlayan optimum iyonik şiddet tespiti için Tris ve potasyum fosfat (KH_2PO_4) tamponlarının 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM ve 700 mM kullanılarak uygun substrat çözeltileri ile her bir tamponda sırasıyla aktivite ölçümleri yapılmıştır.

3.3.3. Biberiye bitkisi GR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Biberiye bitkisi GR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Düşük sıcaklıklar için buz banyosu kullanılırken, yüksek sıcaklıklarda sıcak su banyosu tercih edilmiştir.

3.3.4. Biberiye bitkisi GR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

Biberiye bitkisi GR enzimi optimum pH'sını belirlemek maksadıyla öncelikle, tampon optimizasyonu sonucunda en yüksek aktivite gösteren tampon konsantrasyonu (400mM) belirlenerek pH optimizasyonunda kullanılmıştır. pH'sı 4,5 ile 8,5 arasında değışen tamponlar kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla; pH 4,5, 5,5

sitrat tamponu, pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve son olarak da pH 7,5, 8,0 ve 8,5 değerlerinde Tris tamponu hazırlanmıştır ve her bir pH değeri için ayrı ayrı her tamponda enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

3.3.5. Biberiye bitkisi GR enzimi için depolanma kararlılığının belirlenmesine yönelik çalışmalar

GR enziminin depolanma kararlılığını görmek amacıyla yapılan çalışmada, enzimin 3 farklı (-20°C , 4°C ve oda sıcaklığı ortalama 25°C) koşullarındaki değerleri ölçülmüştür. Öncelikle enzimin oda sıcaklığındaki depolanma kararlılığı için; oda sıcaklığındaki aktivitesindeki azalma değişimi her saat başı; enzimin -20°C 'de depolanmasındaki kararlılık için enzim -20°C 'de muhafaza edilerek haftada bir ve son olarak da 4°C 'de ise ölçüm aralıkları 3-4 saatte bir olacak şekilde ayarlanarak her bir sıcaklık değerlerinde aktivite ölçümü kaydedilerek spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir ölçümde substrat olarak 2 mM GSSG ve 5 mM NADPH kullanılmıştır.

3.3.6. Biberiye bitkisi GR enzimi NADPH ve GSSG substratları için K_m ve V_{maks} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Biberiye bitkisi glutatyon redüktaz enziminin substratları olan NADPH ve GSSG için enzimin maksimum hızının (V_{maks}) ve aynı zamanda Michaelis-Menten sabitinin (K_m) değerlerini kinetik çalışmalarda belirlemek için sabit NADPH konsantrasyonunda GSSG'nin 5 farklı (0,01 mM, 0,02 mM, 0,04 mM, 0,08 mM ve 1,2 mM) konsantrasyonlarıyla substrat çözeltileri hazırlanmış ve enzim aktivite ölçümleri sırasıyla bu konsantrasyonlarda ayrı ayrı yapılmıştır. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmış ve elde edilen bu ilk hız değerleri Michaelis-Menten ($[S]$ 'a karşı V) ve Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/[S]$ 'ye karşı $1/V$) yerine konularak bu grafikten GSSG için K_m ve V_{maks} sonuçları bulunmuştur. Yine aynı şekilde GSSG'nin sabit konsantrasyonunda NADPH için 5 farklı (0,01 mM, 0,02 mM, 0,04 mM, 0,08 mM ve 1,2 mM) konsantrasyonda substrat çözeltileri hazırlanmış ve enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aynı şekilde bu kez

NADPH için Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur. NADPH'ın K_m ve V_{maks} değerleri belirlenmiştir.

3.3.7. Biberiye bitkisi GR enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar

Biberiye GR enzim aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 10 farklı metalin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler 0,5 mM, 1 mM, 5 mM son konsantrasyonları olacak şekilde seyreltilmiştir. Hazırlanan bu metaller ile birlikte enzim çözeltileri de 30 dk ve 4 °C'de bekletilmiştir. Aktivite ölçümü normal koşullarda yapılmış, sabit substrat konsantrasyonu eklenmiştir. Bu çalışmamızda bu 10 farklı metallerin (Mg^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+}) etkileri incelenmiş ve bu sonuçlar kontrol (metalsiz) reaksiyonun aktivitesi %100 kabul edilerek kıyaslanmıştır.

3.3.8. GSH'ın biberiye GR enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi

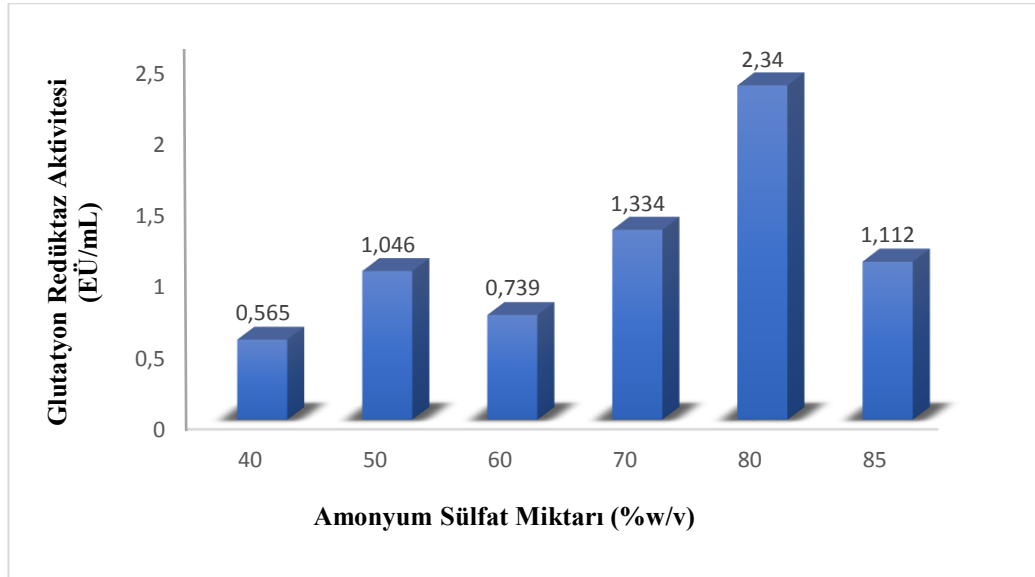
İnhibisyon etkisi gösteren GSH'ın inhibisyon türünü, K_i sabitini belirlemek amacıyla, GSH'ın sabit 3 farklı konsantrasyonunda (10 mM, 15 mM, 20 mM), GSSG'nin artan konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Çizilen bu grafik ve denkleminde yararlanılarak inhibisyon türü ve K_i sabiti hesaplandı.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Üçlü Faz Saflaştırma Yönteminin Optimizasyonu

4.1.1. Amonyum sülfat konsantrasyonunun optimize edilmesi

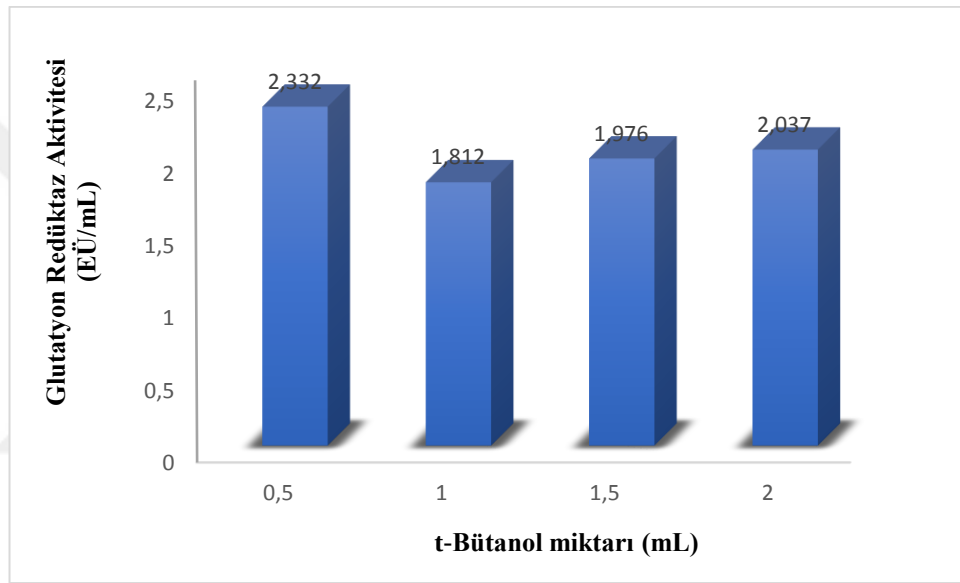
Yaptığımız çalışmada biberiye bitkisinden elde edilen ham enzim ekstraktı TPP yöntemi ile tek adımda saflaştırılmıştır. Farklı oranlarda tercih edilen amonyum sülfat konsantrasyonları (%40, %50, %60, %70, %80, %85) arasında glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin en fazla gözlemlendiği doygunluk oranı ara fazda %80 olarak belirlenmiştir. Alt fazda aktivite yok denecek kadar az olduğundan, aktivitenin en yüksek olduğu ve enzimin çoğunlukla toplandığı ara faz kısmı tercih edilmiştir. En uygun doygunluk ara faz %80 oranında bulunurken, bu orandaki GR aktivitesi ise 2,34 EÜ/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Uygun amonyum sülfat doygunluğunda ara faz GR aktivite değişimi

4.1.2. Tersiyer bütanol oranının optimize edilmesi

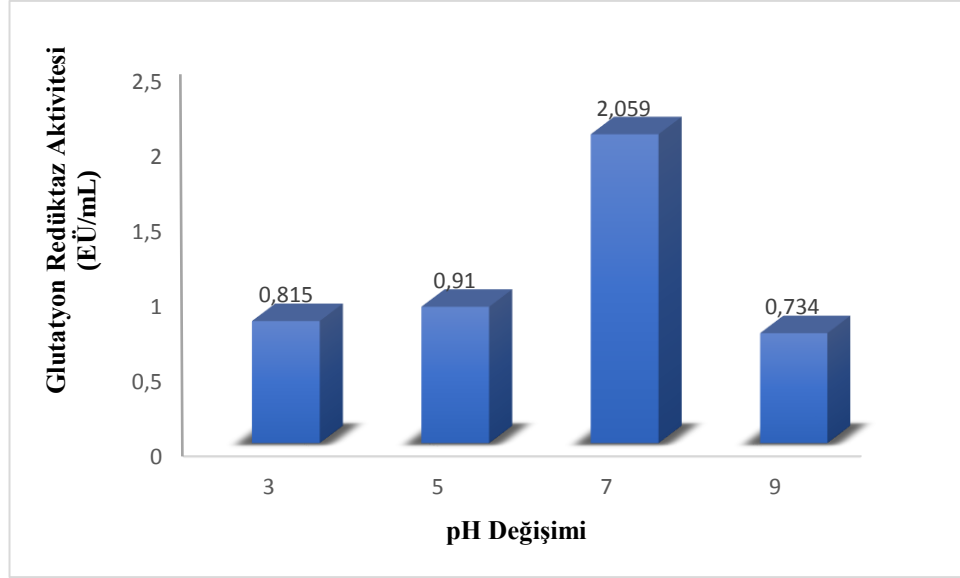
TPP yönteminin bir diğer bileşeni olan t-bütanol miktarının saflaştırmadaki etkisinin araştırılması amacıyla farklı oranlarda ham ekstrakt/t-bütanol (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) miktarları kullanılmıştır. Bu farklı oranlarda yapılan GR aktivite ölçümlerinde enzim aktivitesinin en yüksek gözleendiği oran; 1 ham ekstrakt/0,5 t-bütanol olarak belirlenmiştir. Bu orandaki GR aktivitesi ise 2,332 EÜ/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Uygun t-bütanol miktarında ara faz GR aktivite değişimi

4.1.3. Ortam pH'sının optimize edilmesi

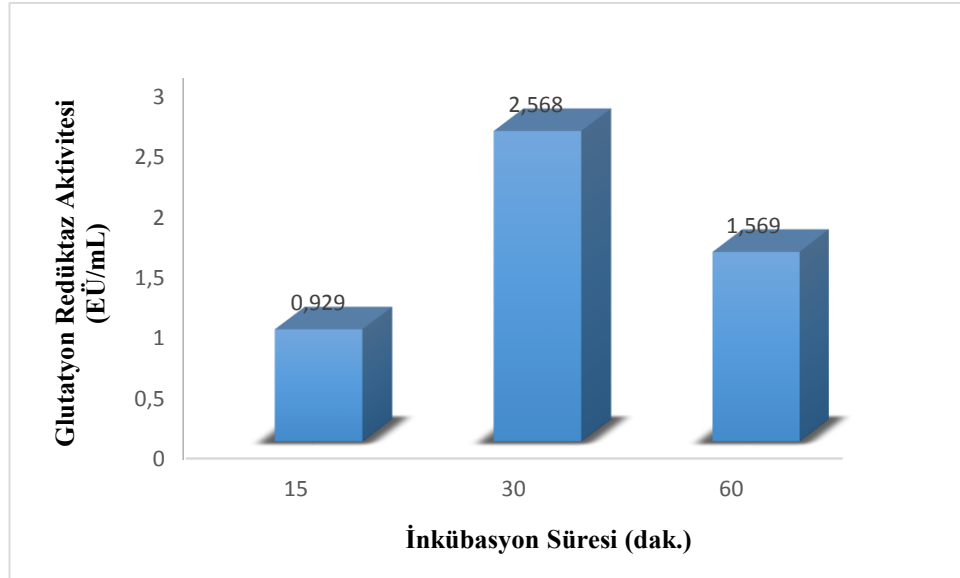
Ortam pH'sının üçlü faz saflaştırmadaki etkisinin araştırılması için denenen 4 farklı (pH=3, pH=5, pH=7, pH=9) pH değerlerinden, en iyi GR enzim aktivitesi pH=7'de gözlenmiştir. Bu pH değerindeki en yüksek aktivite ise 2,059 EÜ/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Ortam pH'sına göre ara faz GR aktivite değişimi

4.1.4. İnkübasyon süresinin optimize edilmesi

Biberiye bitkisinden GR enziminin üçlü faz saflaştırmasında denenen 3 farklı inkübasyon (15 dk, 30 dk ve 60 dk) süreleri içerisinde en iyi GR aktivitesi 30 dk bekleme süresi sonunda 2,568 EÜ/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.4). TPP yönteminde sıklıkla kullanılan 60 dk bekleme süresi sonunda aktivitede %39'luk; 15 dk bekleme süresi sonunda ise aktivitede %64'lük bir kayıp gözlenmiştir. Bu da gösteriyor ki, 60 dk süre sonunda enzim az da olsa inhibe olurken; 15 dk süre sonunda ise TPP sistemi tam olarak işleyememiştir.



Şekil 4.4. İnkübasyon süresine göre ara faz GR aktivite değişimi

4.2. Bradford Yöntemiyle Toplam Protein Tayini

Biberiye bitkisinde toplam protein miktar tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tayin sonucunda ham ekstrakt ve TPP yapılan enzimin 100 mikrolitresinde sırasıyla ham ekstrakt için 0,094 mg/mL, TPP sonucunda ise 0,0604 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Spesifik aktivite değerleri ise bulunan protein miktarları ışığında, ham ekstraktta 4,3 (EU/mg protein), TPP için ise 77 (EU/mg protein) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

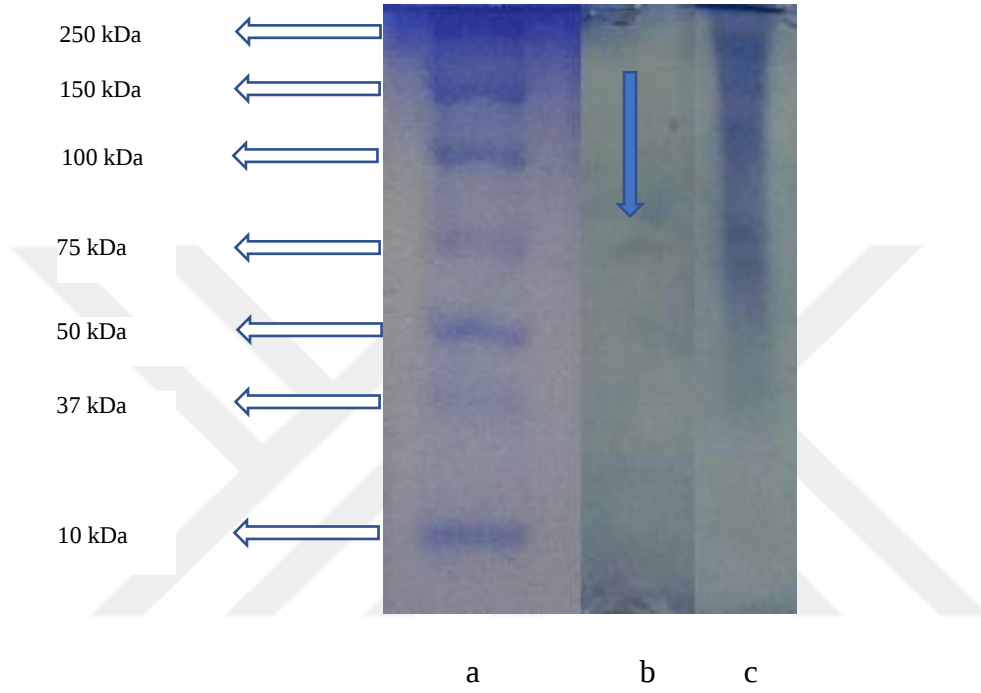
Tablo 4.1. GR enzimi saflaştırma basamakları

Numune Türü	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)
Ham Ekstrakt	0,094	4,3
Üçlü Faz Sistemi (TPP)	0,0604	77

4.3. Biberiye Bitkisinden Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE İle Saflığının Kontrolü

Biberiye bitkisi GR enziminin molekül ağırlığını belirlemek için Bölüm 3.2.7.'de anlatılan elektroforez düzeneği kurularak biberiye ham ekstraktı ve TPP yöntemine

göre saflaştırılan enzim örnekleri jeldeki kuyulara sırayla tatbik edilmiştir ve yürütme işlemi yapılmıştır. İşlem sonucunda Biberiye GR enzimi proteini, marker olarak kullanılan proteinler ile karşılaştırıldığında jelde yaklaşık 75 kDa molekül ağırlığına sahip olarak tek bant halinde görüntülenmiştir. Jelin fotoğrafı Şekil 4.5.'de verilmiştir.



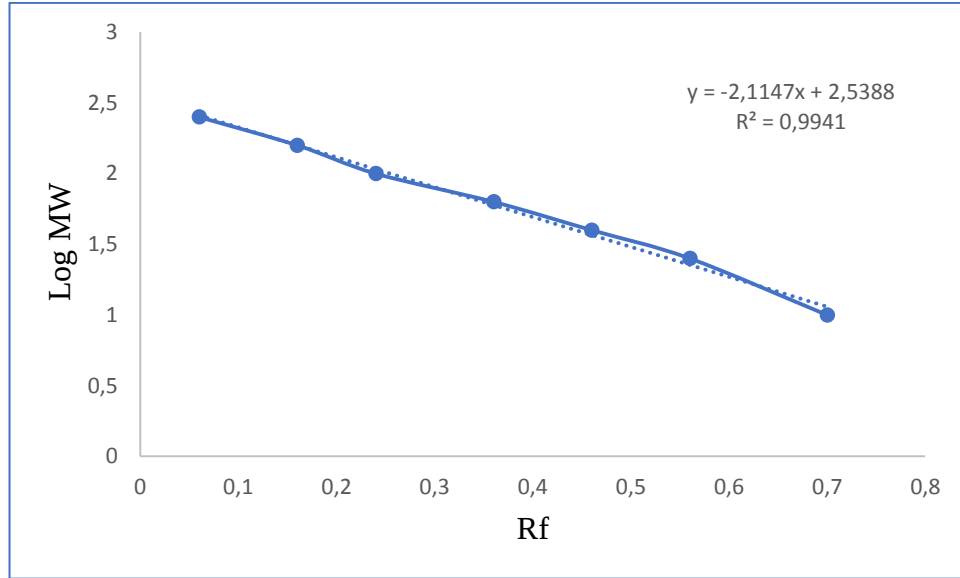
Şekil 4.5. GR enziminin SDS-PAGE sonucu

a: Marker proteinler (10-250 kDa)

b: TPP sonucunda %80 amonyum sülfat doygunluktaki ara faz

c: Ham Ekstrakt

SDS-PAGE'de jelin fotoğrafını çektikten sonra, standart proteinler ve jelde yürüyen enzim için Rf değerleri ölçülerek Rf-log MW grafiği çizilmiştir (Şekil 4.6.). Bu grafikten elde edilen eğri sayesinde GR enziminin moleküler ağırlığı belirlenmiştir.



Şekil 4.6. SDS-PAGE sonucu çizilen Rf- log MW grafiği

4.4. GR Enziminin Karakterizasyon Çalışma Sonuçları

4.4.1. Biberiye bitkisi GR enziminin optimum iyonik şiddet değerinin sonuçları

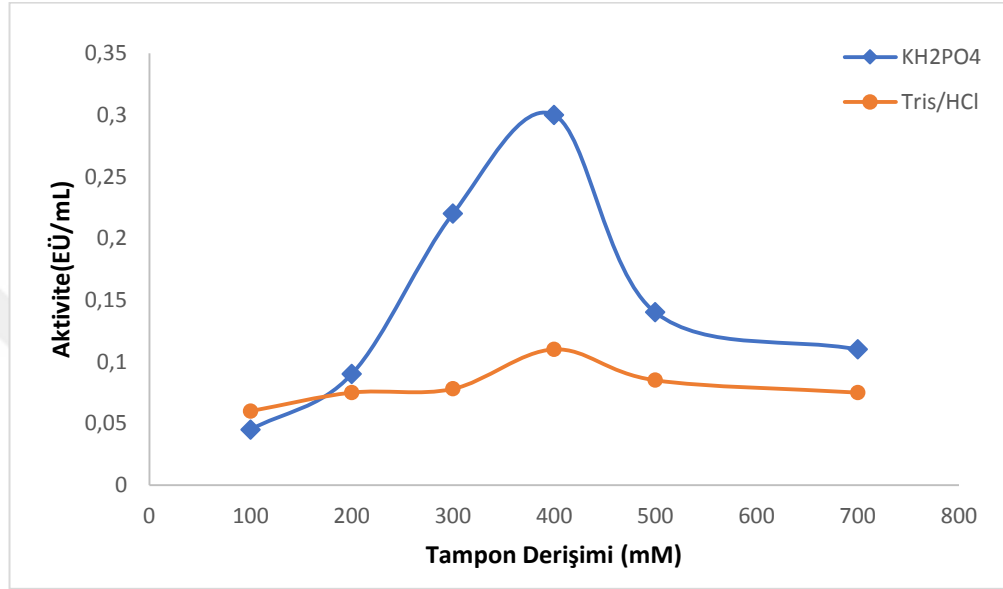
Biberiye bitkisi GR enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu optimum aktivite sağladığı iyonik şiddetini bulabilmek için 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM ve 700 mM farklı konsantrasyonlarda iki farklı tamponda (Tris ve potasyum fosfat (KH_2PO_4)) aktivite ölçümleri (Tablo 4.2.) ve (Tablo 4.3.) alınarak iyonik şiddet biberiye bitkisi GR enzimi için 400 mM fosfat (KH_2PO_4) tamponu olarak bulunmuştur (Şekil 4.6.).

Tablo 4.2. Biberiye bitkisi GR enziminin KH_2PO_4 tamponundaki optimum iyonik şiddet- aktivite sonuç tablosu

$[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (mM)	100	200	300	400	500	700
Aktivite (EÜ/mL)	0,045	0,09	0,22	0,3	0,14	0,11

Tablo 4.3. Biberiye bitkisi GR enziminin Tris/HCl tamponundaki optimum iyonik şiddet-aktivite sonuç tablosu

Tris/HCl (mM)	100	200	300	400	500	700
Aktivite (EÜ/mL)	0,06	0,075	0,078	0,11	0,085	0,075

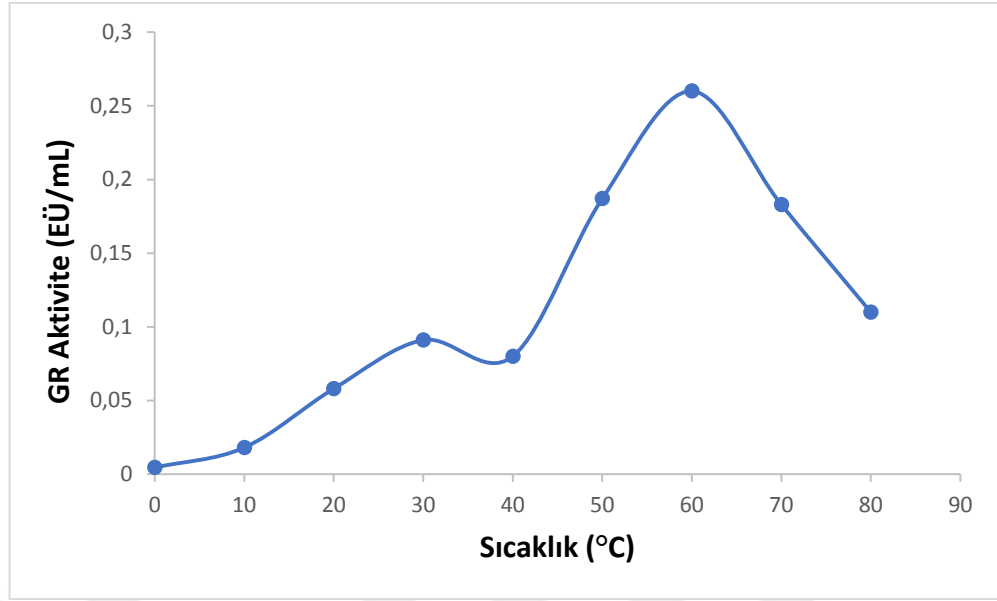
Şekil 4.7. Biberiye bitkisi GR enzimi için farklı konsantrasyonlarda Tris ve KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılması sonucu iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.4.2. Biberiye bitkisi GR enziminin optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Biberiye bitkisi GR enziminin optimum sıcaklığını tespit etmek için belirlenen 400 mM fosfat tamponu kullanılarak Bölüm 3.3.3.'de anlatıldığı üzere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde enzimin aktivitesi ölçülmüştür (Tablo 4.4.) ve çalışmamız sonucunda optimum sıcaklık biberiye bitkisi GR enzimi için 60 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.7.).

Tablo 4.4. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum sıcaklık-aktivite sonuç tablosu

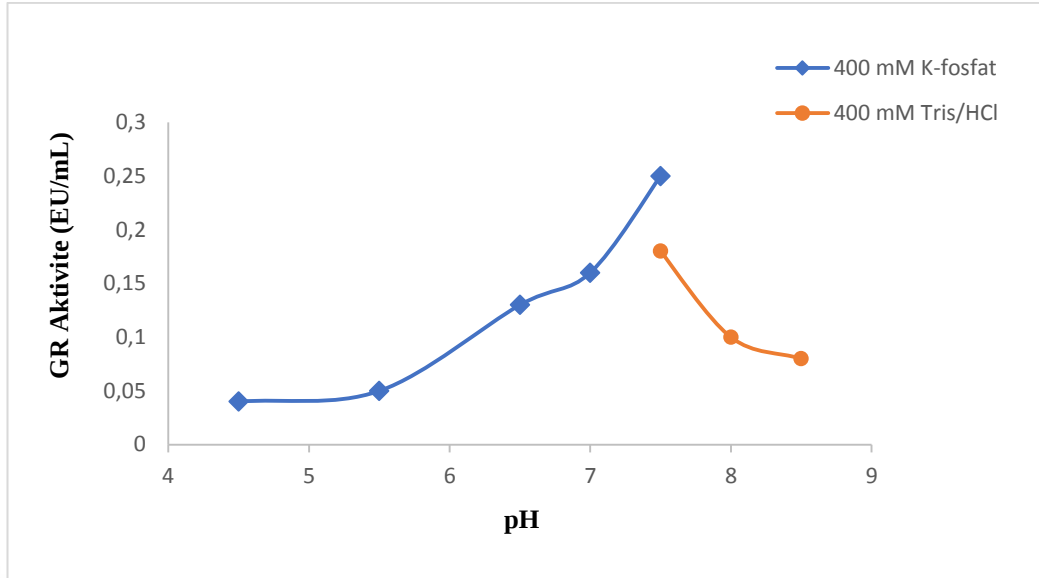
Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Aktivite (EÜ/mL)	0,0045	0,018	0,058	0,091	0,08	0,187	0,26	0,183	0,11



Şekil 4.8. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum sıcaklık-aktivite ölçüm grafiği

4.4.3. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum pH çalışma sonuçları

Biberiye bitkisi GR enziminin optimum pH'sını bulmak maksadıyla yapılan çalışmamızda öncelikle, pH'sı 4,5 ile 8,5 arasında farklılık gösteren tamponlarda hazırlanmış çözeltiler kullanılmak üzere GR aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Sonuç olarak optimum pH=7,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8.).

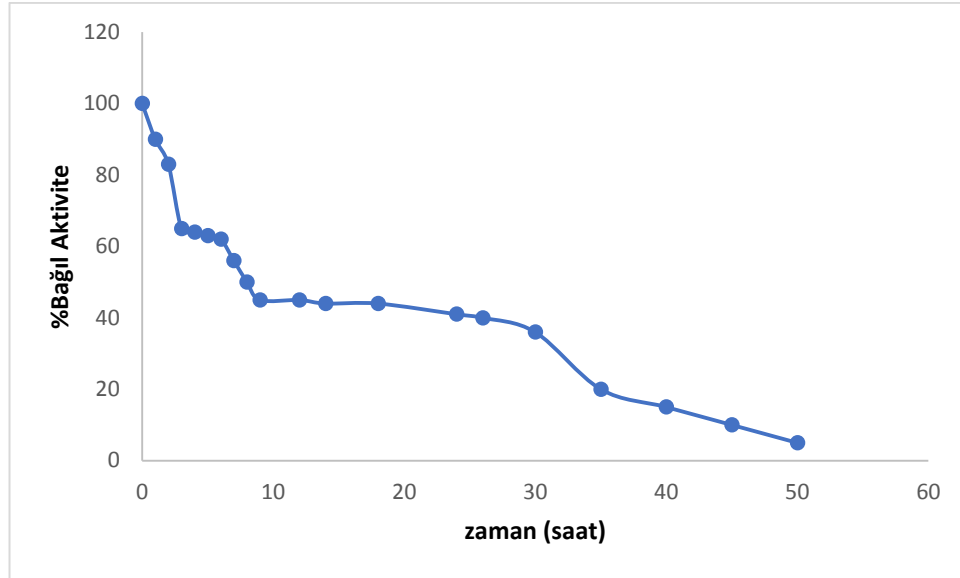


Şekil 4.9. Biberiye bitkisi GR enzimi optimum pH-aktivite grafiği

4.4.4. Biberiye bitkisi GR enziminin depolanma kararlılığı çalışma sonuçları

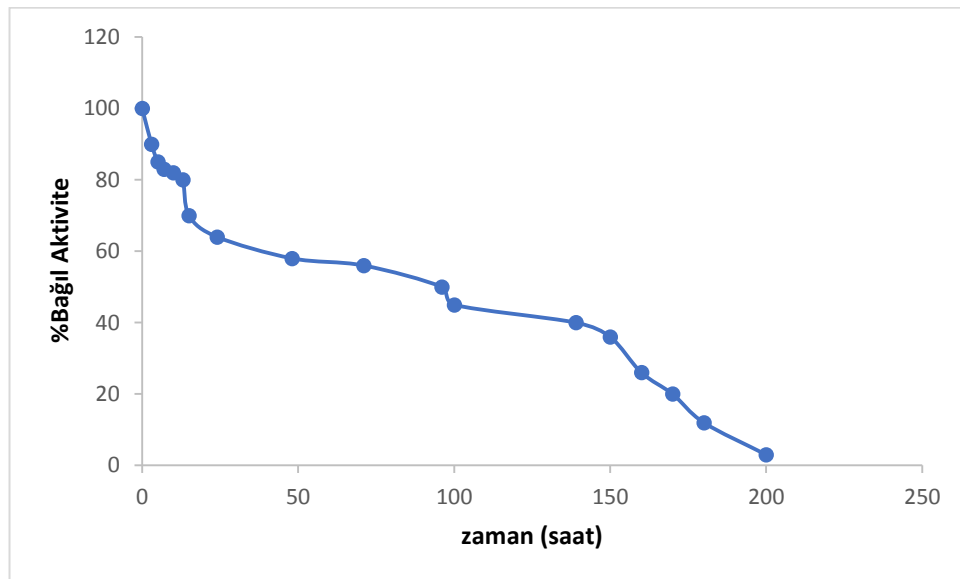
Yaptığımız çalışmamızda enzimin farklı sıcaklık şartlarında muhafaza edildiğinde sahip olduğu aktivitesindeki herhangi bir değişimi veya bu değişimin nasıl gerçekleştiğinin tespit edilmesi amacıyla, enzim 3 farklı (-20°C , 4°C ve oda sıcaklığı 25°C) koşullarında depolanmış ve bazı zaman aralıklarında her bir sıcaklık değeri için aktivite ölçümü ayrı ayrı yapılmıştır. Sırasıyla oda sıcaklığında saat başı veya birkaç saatte bir olarak ölçüm yapılmış, aynı şekilde 4°C 'de de birkaç saatte bir ölçüm yapılırken; -20°C 'de ise ölçüm sıklığı haftada bir olarak yapılmış ve ölçüm sonuçları dikkate alınarak biberiye bitkisi GR enziminin % bağıl aktivitesi bu 3 farklı sıcaklık değeri temel alınarak hesaplanmıştır.

İlk önce oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilen depolanma kararlılığında sonuç olarak GR enziminin aktivitesi ilk 9 saatte hızla azalmış ve aktivite yaklaşık olarak yarısına inmiştir. Devamında 26. saate kadar ki geçen süre zarfında aktivitede meydana gelen değişim hemen hemen sabit kalmıştır. 30. saatten sonra ise aktivitedeki düşüş tekrar hızlanmış ve 50 saatin sonuna gelindiğinde ise enzim, aktivitesinin neredeyse tamamını (%95)'ini kaybetmiştir (Şekil 4.9.).



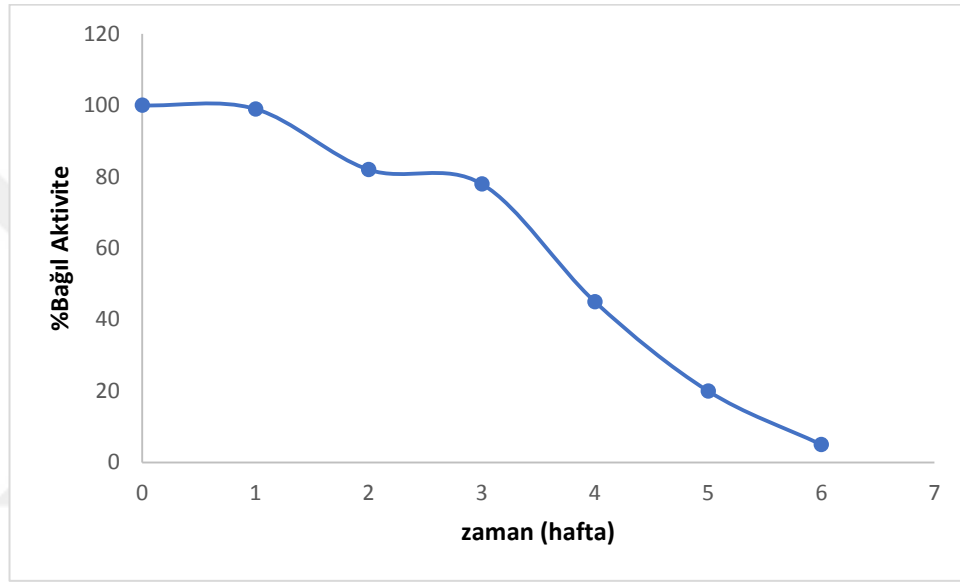
Şekil 4.10. Oda sıcaklığındaki (25°C) Biberiye GR enzimi aktivite- zaman değişim grafiği

4 °C'deki depolanma kararlılığı çalışması sonucunda, biberiye GR enziminin ilk 24 saatte oda sıcaklığındaki gibi aktivitesi hızla azalarak %64'e düşmüştür. Devamında geçen 72 saat boyunca ise aktivitede gözlenen düşüş yavaşlamış, 96 saat sonunda ise bağıl aktivite yarisına inerek %50 olmuştur. Daha sonra aktivitedeki düşüş hızla azalmıştır ve 200. saatin sonuna gelindiğinde ise enzim aktivitesinin yine büyük bir kısmı %97'sini kaybetmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.11. 4 °C'deki Biberiye GR enzimi aktivite- zaman değişim grafiği

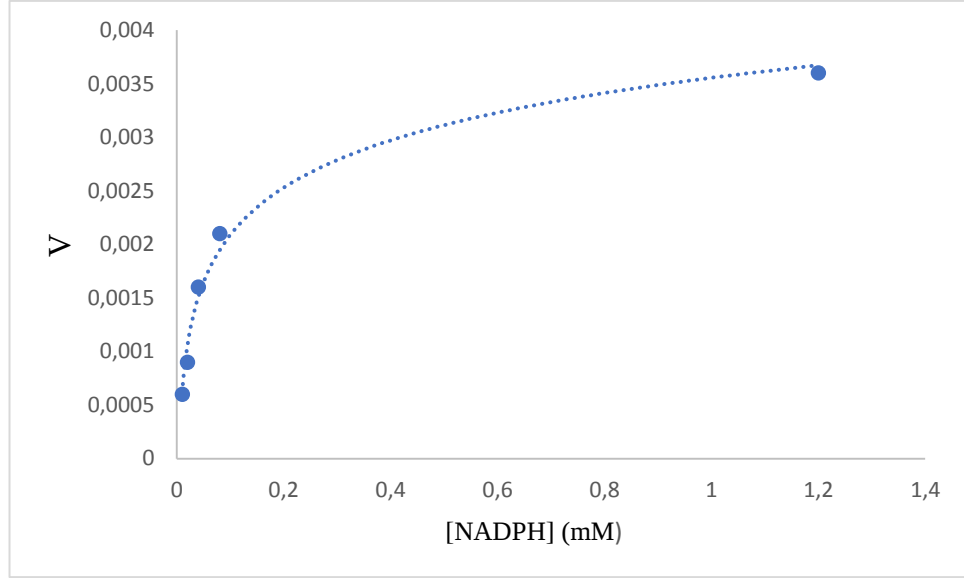
Son depolanma sıcaklığı olarak enzim -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Bakıldığında aktivitedeki azalma diğer sıcaklık değerlerine nazaran daha düzenli olarak ve düşüşünde daha yavaş meydana geldiği görülmektedir. 2 hafta sonunda aktivite %82 iken 3 hafta geçmesine rağmen yine daha az bir enzimde aktivite kaybı %78 olarak yaşanmıştır. Fakat bu süre zarfından sonra artık enzim hızla aktivite kaybetmeye başlamış ve 6. hafta sonuna gelindiğinde ise %95 oranında aktivite kaybı hızla gerçekleşmiştir (Şekil 4.11.).



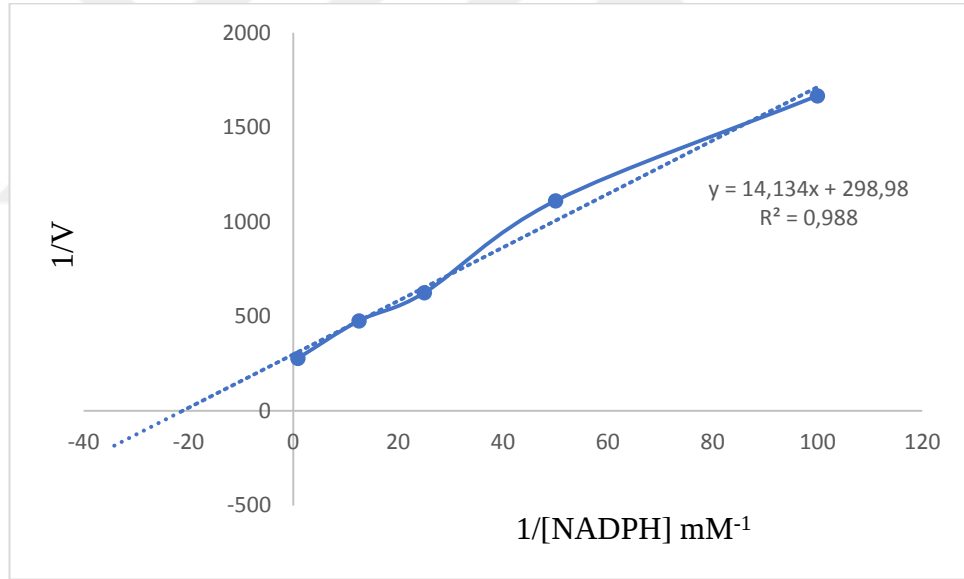
Şekil 4.12. -20°C 'deki Biberiye GR enzimi aktivite- zaman değişim grafiği

4.4.5. Biberiye bitkisi GR enzimi NADPH ve GSSG substratları İçin K_m ve V_{maks} değerlerinin sonuçları

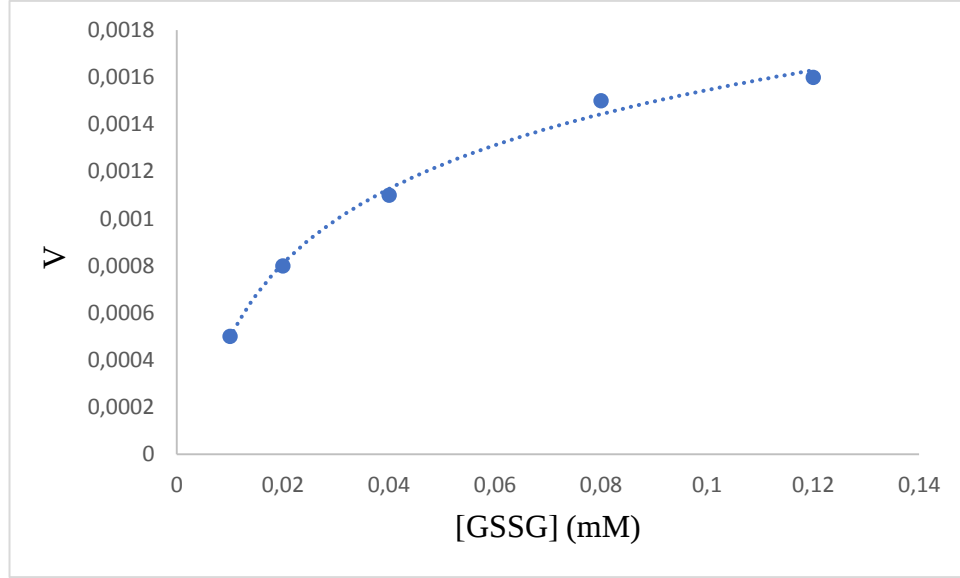
Biberiye bitkisi glutatyon redüktaz enziminin substratları olan NADPH ve GSSG için V_{maks} ve diğer bir sabit olan K_m değerlerini kinetik çalışmalarda belirlemek için Bölüm 3.3.6.'da da bahsedildiği gibi her iki substrattan biri sabit tutulup bir diğeri için aktivite ölçümleri alınarak her iki substrat için bu verilerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{maks} belirlenmiştir. Çalışmamız sonucu olarak biberiye GR enzimi substratı olan NADPH için K_m sonucu $0,047\text{ mM}$ (Şekil 4.12.); V_{maks} ise $0,0033\text{ EU/mL}$ (Şekil 4.13.) olarak bulunurken, GSSG substratı K_m değeri $0,029\text{ mM}$ (Şekil 4.14.); V_{maks} ise $0,0019\text{ EU/mL}$ şeklinde tespit edilmiştir (Şekil 4.15.).



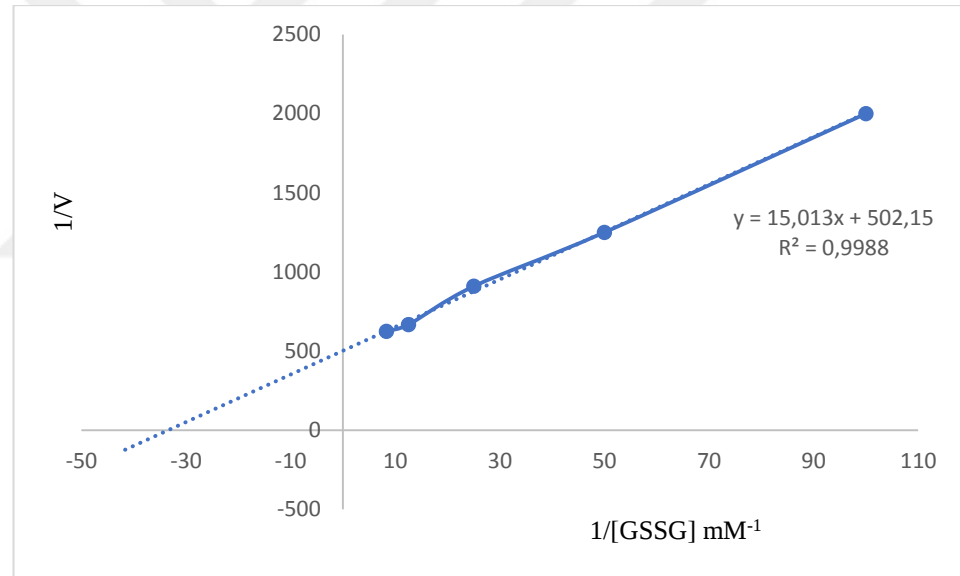
Şekil 4.13. NADPH için doygunluk eğrisi



Şekil 4.14. NADPH substratı için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.15. GSSG için doygunluk eğrisi



Şekil 4.16. GSSG substratı için Lineweaver-Burk grafiği

4.4.6. Biberiye bitkisi GR enzimi üzerine metal iyonlarının etkilerinin sonuçları

Biberiye bitkisi GR enziminin aktivitesine Bölüm 3.3.7.'de verilen 10 farklı metalin etkisi araştırılmıştır. Stok olarak hazırlanan metal çözeltilerinin 3 farklı konsantrasyonları (0,5 mM, 1 mM ve 5 mM) seyreltilerek, bu seyreltilmiş metal çözeltileri, enzim ve sabit substrat derişimi ortama konularak bulunan aktiviteden yola çıkılarak metal etkisi % kalan aktivite şeklinde tabloda verilmiştir. Tabloya

baktığımızda bazı metaller GR enzimi üzerinde aktivite artışına sebep olurken, bazı metal iyonları ise aktivite üzerinde azaltıcı yönde etki yapmıştır. Sonuçlar Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Biberiye bitkisi GR enzim aktivitesine metal etkisi

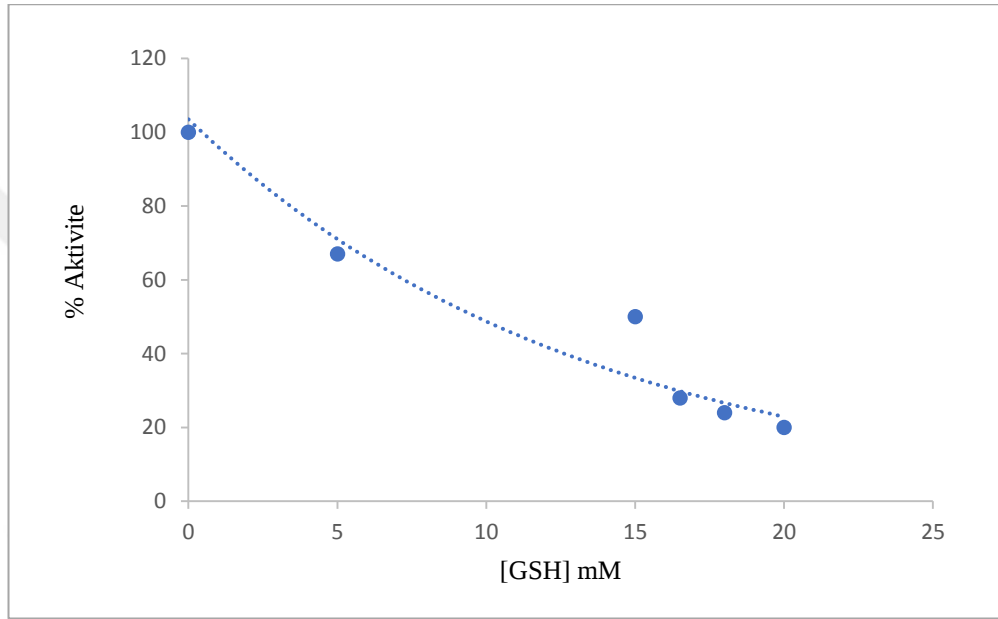
Metal	GR % Kalan Aktivite		
	Metal Son Konsantrasyonu (mM)		
	0,5 mM	1 mM	5 mM
Metalsiz	100	100	100
Mg²⁺	115	107	75
Hg²⁺	38	45	-
Co²⁺	74	-	-
Fe³⁺	120	112	45
Ni²⁺	21	-	-
Pb²⁺	20	-	-
Ba²⁺	40	86	-
Mn²⁺	84	117	75
Al³⁺	33	120	74
Ca²⁺	30	-	-

4.4.7. Biberiye bitkisi GR enziminin GSH inhibitörü için K_i sabitinin bulunmasına yönelik sonuçlar

Biberiye bitkisi glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonun, ürünlerinden biri olan GSH'ın etkilerini belirlemek amacıyla, optimal aktivite ölçüm şartlarında reaksiyon ortamına GSH'ın farklı konsantrasyonları katılarak enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlendi. İnhibisyon etkisi gösteren GSH ile gerçekleştirilen çalışmada üç sabit GSH konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler sonucunda çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden ve denkleminde yararlanılarak, inhibisyon türü ve K_i sabiti hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda ise GSH için I₅₀ değeri 11,93, K_i sabiti 38,03 mM bulunurken, inhibisyon türü ise yarışmasız olarak bulundu. Sonuçlar Tablo 4.6.- 4.7. ve Şekil 4.17.- 4.18.'de verilmiştir.

Tablo 4.6. GSH için I_{50} değerinin bulunmasına yönelik sonuçlar

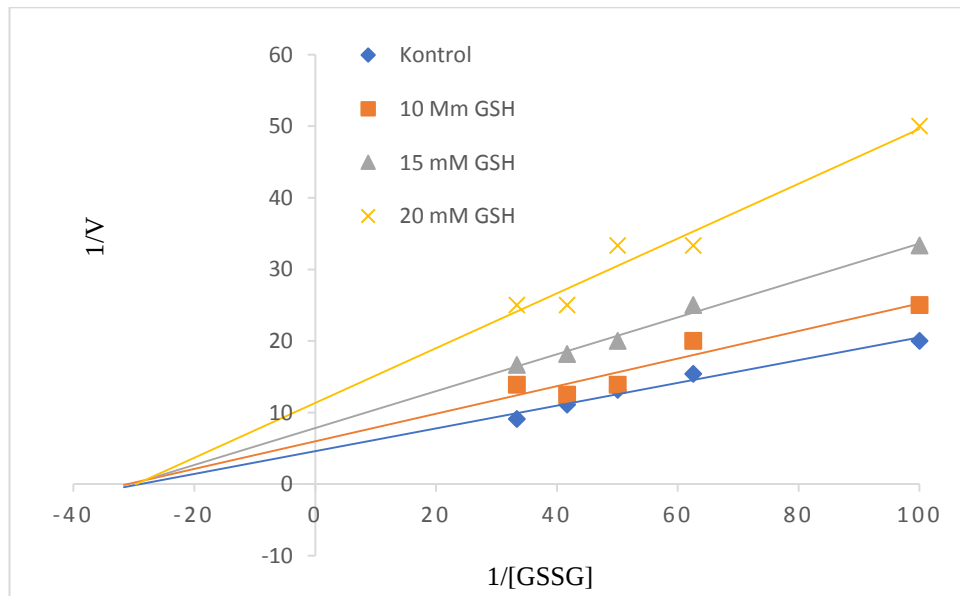
GSH Derişimi (mM)	5	15	16,5	18	20
Aktivite (EÜ/mL)	0,06	0,045	0,026	0,022	0,018



Şekil 4.17. GSH için %Aktivite-[GSH] grafiği

Tablo 4.7. GSH için K_i değerlerine yönelik sonuçlar

[GSH] mM	[GSSG] mM	Aktivite (EÜ/mL)
Kontrol	0,030	0,11
	0,024	0,09
	0,020	0,076
	0,016	0,065
	0,010	0,05
10 mM	0,030	0,072
	0,024	0,08
	0,020	0,072
	0,016	0,05
	0,010	0,04
15 mM	0,030	0,06
	0,024	0,055
	0,020	0,05
	0,016	0,04
	0,010	0,03
20 mM	0,030	0,04
	0,024	0,04
	0,020	0,03
	0,016	0,03
	0,010	0,02



Şekil 4.18. Biberiye GR enzimi aktivitesi üzerine GSH'ın inhibisyon türünü gösteren grafik

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) bitkisinin yaprak kısımları materyal olarak kullanılmış ve ham GR enzim ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen bu ham ekstrakt üçlü faz saflaştırma (TPP) metodu kullanılarak tek basamakta saflaştırma işlemi yapılmıştır. Yöntemde enzimin yüksek oranda aktivite gösterdiği kısım ara faz olarak tespit edilmiştir ve tüm deneysel çalışmamızda bu faz kullanılmıştır. Ara faz için uygun olan ve enzimin de yüksek aktivite sergilediği amonyum sülfat miktarı optimize edilerek biberiye GR enzimi için ara faz %80 oranında amonyum sülfat doygunluk bulunmuştur. Yine t-bütanolün en uygun oranının belirlenmesi çalışmasında optimizasyon sonucu 1,0 ham ekstrakt/ 0,5 t-bütanol miktarları olacak şekilde tespit edilmiştir. Bir diğer optimizasyon kısmında enzim ara fazın uygun pH ortamı belirlenerek bu değer 7,0 olarak bulunmuştur. Yöntemde son optimize edilen parametre ise genellikle çok fazla üzerinde durulmayan inkübasyon süresidir. Çalışmamızda 30 dk inkübeden sonra en yüksek aktivite gözlenmiştir. Bu da gösteriyor ki, yöntem için bekleme süresi çok hassas ve önemli bir parametredir.

Literatüre bakıldığında PPO enzimini [71] ve Kat ve arkadaşlarının [72] aynı yöntemi tercih ederek invertaz enzimini saflaştırma yaptıklarını ve sonuçta enzime ait aktivitenin ara fazda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. TPP yöntemi kullanarak biberiye GR enzimi saflaştırmasındaki sonuçlarımız yapılan bu çalışmalar ile kıyaslandığında benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda TPP sonucunda biberiye GR enzimi 18 kat saflaştırılarak, %54,80 verim elde edilmiştir. Kat ve arkadaşlarının [72] TPP saflaştırma metodu sonucunda ise verim %20,28 iken saflaştırma katı 10,48'dir. Literatürde enzim destekli Üç Fazlı Bölümleme kullanarak keten tohumundan [73] yağ çıkarma (*Linum usitatissimum L.*) çalışmasında ise %71,68 oranında bir verim elde edilmiştir. TPP metodunun farklı bir türevi olan ultrason

destekli üç fazlı ayırma işlemi ile patates kabuğundan (*Solanum tuberosum*) [74] PPO eldesinde TPP yöntem optimize sonucunda %40 amonyum sülfat, 1:1 t-bütanol oranı ve 40 dk süre ile %70 geri kazanım sağlandığı belirtilirken ultrason destekli TPP ile ise bu geri kazanım %98,3 şeklinde artış göstermiştir. Yine TPP kullanılarak tatlı su istiridye türü *Corbicula fluminea*'dan [75] polisakkaritlerin verimli ekstraksiyonu ve ayrılması için bu metod kullanılmış ve yüksek saflık (% 86,5) elde edilmiştir.

Daha sonra biberiye GR enzimi protein miktarı ham ekstraktta 100 mikrolitrede 0,094 mg/mL protein, TPP sonucunda ise 0,0604 mg/mL olarak belirlenmiştir. Biberiye GR enzimi spesifik aktivite ise biberiye ham ekstraktında 4,3 EÜ/mg protein bulunurken, saflaştırma sonucunda 77 EÜ/mg protein spesifik aktivite şeklinde belirlenmiştir. Japon bıldırcın eritrositleri [6] kullanılarak yapılan bir çalışmada GR enzimine ait spesifik aktivite 33,75 EÜ mg/ml olarak bulunmuş; yine hindi karaciğeri [15] kullanılarak saflaştırılan GR enzimi için 606,67 EÜ/mg protein spesifik aktivite olduğu bulunmuştur. Çıkan bu Bradford sonuçları ile çalışma sonucumuz kıyaslandığında aralık bir değer olduğu görülmüştür.

Saflaştırma işleminden sonra biberiye GR enziminin SDS-PAGE ile enzim saflığı kontrol edilmiştir. Jele tatbik edilen biberiye ham ekstraktı ve saflaştırma işlemi yapılmış örneklerin yürüme mesafeleri yine aynı jelde yürüyen marker proteinler temel alınarak karşılaştırma yapılmış ve tek band halinde gözlenen biberiye GR enziminin bakıldığında molekül ağırlığı yaklaşık 75 kDa tek band olarak çalışmamızda bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda ise; hindi karaciğeri [15] 65 kDa, sığır eritrositinde [13] GR enzimin molekül ağırlığı 118 kDa olarak bulunurken, alt birim molekül ağırlığı ise 58 kDa bulunmuş ve enzimin dimerik formda olduğu belirtilmiştir. Yine başka çalışmada soya tohumu GR [76] molekül ağırlığı alt birimi 75 kDa olarak bildirilmiş ve çalışmamız ile bu sonuç paraleldir.

Biberiye bitkisi GR enziminin iyonik şiddetinin en yüksek olduğu aralık 400 mM fosfat (KH_2PO_4) tamponu olduğu bulunmuştur. Literatürde soya tohumu [76] için 300 Mm Tris tamponu, sığır eritrositlerinde [13] 435 mM fosfat tamponu, hindi

karaciğeri [15] için 100 mM fosfat tamponu şeklinde belirlenirken, koyun karaciğeri [11] için ise 50 mM Tris şeklinde bulunmuştur.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında yapılan biberiye bitkisi GR enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında farklı kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma işlemlerinde GR enzimi için optimum sıcaklık sonuçları; Tek hücreli bir alg olan (*Chlamydomonas reinhardtii*)’de [14] maksimum aktivite 49°C, hindi karaciğerinde [15] 40°C, sığır eritrositlerinde [13] yapılan başka çalışmada 55°C, koyun karaciğerinde [11] optimum sıcaklık 60°C şeklinde bulunurken, Japon bildirici eritrositleri [6] GR içinde 60°C, Arap deve karaciğerinden [77] (*Camelus dromedarius*) klonlanan mitokondriyal glutatyon redüktaz geni (Gsr) için ise 35°C olarak optimum sıcaklık değeri şeklinde bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda bulunan optimum sıcaklık değeri diğer çalışmalarla benzerlik halindedir.

Enzim için optimum pH çalışmamız sonucunda ise yüksek aktivite ile çalıştığı optimum pH biberiye GR enzimi için 7,5 olarak belirlenmiştir. Literatürde soya tohumu GR [76] için pH 8,5, koyun karaciğeri [11] için pH 8,0, Van Gölü (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) [78] balığında yapılan çalışma da GR optimum pH 8,0, hindi karaciğeri [15] 7,5 ve Tek hücreli bir alg olan (*Chlamydomonas reinhardtii*)’de [14] ise pH 8,2 olarak tespit edilmiştir.

GR enziminin farklı sıcaklık koşulları altında muhafaza edildiğinde değişen aktivitesinin belirlenebilmesi için depolanma kararlılığı çalışmamız sonucunda ilk sıcaklık olan oda sıcaklığında bekletilen enzim aktivitesinde ilk 9 saatte hızla azalma gerçekleşmiş ve bağıl aktivite yaklaşık yarısına inmiştir. Geçen 50 saatin sonunda ise enzim için %5 gibi düşük bir aktivite değeri mevcuttur. Oda sıcaklığında bu denli aktivitedeki düşüş enzimin oldukça hassas olduğunu göstermektedir. Diğer bir yandan ikinci depolanma sıcaklığımız olan +4 °C’deki bağıl aktivite, ilk 24 saatten sonra hızla %64’e düşmüştür ve 200 saat sonunda ise enzimin sahip olduğu bağıl aktivitesi %3 gibi düşük bir değer olduğu tespit edilmiştir. Son olarak -20°C’deki enzim bağıl aktivite değerlerine bakıldığında diğer iki sıcaklık değerine nazaran daha

düzenli bir azalma görülmüştür. İki haftanın sonunda bağıl aktivite %50'ye kadar düşmüştür. Altı hafta bitiminde ise bağıl aktivitenin çoğu kaybedilmiş ve sadece %5 gibi bir kısım ölçülmüştür. Literatür incelemelerinde GR enzimi için depolanma kararlılığı çalışmasına rastlanmamıştır. Çalışmamızdan da anlaşılabileceği üzere enzimin sıcaklık koşullarına bağlı olarak hassas olması bu parametrenin sıklıkla çalışılmama sebebi olabileceği düşünülmektedir.

Biberiye bitkisi glutatyon redüktaz enziminin substratları olan NADPH ve GSSG için V_{maks} ve K_m değerleri kinetik çalışmalarla belirlenmiştir. Sonuçta NADPH için K_m 0,047 mM; V_{maks} ise 0,0033 EÜ/ml bulunurken, GSSG substratı K_m sonucu 0,029 mM; V_{maks} ise 0,0019 EÜ/mL şeklinde tespit edilmiştir. Bu iki substrat içerisinde sonuçlara göre GR enziminin en fazla GSSG substratına ilgisinin olduğu anlaşılmaktadır. Literatüre bakıldığında; Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) [6] eritrositlerinde yapılan çalışmada NADPH substratı için K_m ve V_{maks} sonuçları sırasıyla; 0,047 mM ve 1,45 EÜ/mL, GSSG substratı K_m ve V_{maks} sonuçları ise, 0,025 mM ve 0,092 EÜ/mL olarak; Koyun karaciğerinden GR enzimi [11] için NADPH ve GSSG K_m ve V_{maks} sonuçları sırasıyla; 0,0258, 0,0239 mM ve 0,266, 0,255 EÜ/mL olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan metallerin GR enzim aktivite üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda bazı metal iyonlarının aktiviteyi artırıcı ve azaltıcı yönde işlemleri derişimlerine bağlıdır. Tablo 4.2.'ye bakıldığında ortamdaki metal düzeyi 0,5 Mm iken, metalsiz ortamla kıyaslandığında Mg^{2+} ve Fe^{3+} metalleri enzim aktivitesinde artışa sebep olurken, Mn^{2+} ise enzim aktivitesi üzerinde ~%15 kadar bir kayıp sergilemiştir. Pb^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} gibi ağır metaller ise inhibisyon etki göstermişlerdir. Artan metal konsantrasyonunda ise Ba^{2+} 'de yaklaşık %14 gibi bir aktivite kaybı gözlense de Mn^{2+} ve Al^{3+} metalleri enzim aktivatörüdür ve enzim bu metal konsantrasyonunda dayanıklıdır.

Literatür incelendiğinde Al^{3+} metalinin tavuk böbreği GR [10] enzimi üzerinde aktivatör etkisinin olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada Ni^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} ve Pb^{2+} gibi metallerin inhibisyon etkilerinin olması çalışma sonuçlarımızı

desteklemektedir. Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) karaciğerinde [6] yapılan bir başka çalışmanın sonucunda ise, Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ve Al^{3+} gibi ağır metal iyonlarının yüksek oranda inhibe etkileri tespit edilmiştir. Soya tohumu GR [76] enzimi üzerinde ise Mn^{2+} ve Mg^{2+} gibi metallerin diğer metallere oranla çok daha düşük inhibisyonu gözlenmiştir.

GR enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünlerinden biri olan GSH'nın, enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla Bölüm 4.4.7'de anlatıldığı gibi aktivite ölçümleri yapılarak, K_i değerini belirlemek için Şekil 4.18'deki grafik çizilmiştir. Çizilen bu grafikten K_i değeri ve inhibisyon türü belirlendi ve sonuç olarak GSH'nın K_i sabiti 38,03 mM bulunurken, inhibisyon türü ise yarışmasız olarak bulunmuştur. Hindi karaciğeri [15] kullanılarak yapılan çalışmada ise GR enziminin ürünü GSH'nın inhibisyonu incelenmiş ve sonuç olarak GSH'nın K_i sabiti $29,08 \pm 14,9$ mM, inhibisyon türü ise yarışmasız olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak glutatyon redüktaz enzimi ilk kez Biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) bitkisinden TPP yöntemi kullanılarak, yöntem parametreleri daha kısa zamanda ve yüksek verim eldesi için optimize edilerek saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yöntem parametreleri optimize edilme maksadı ise; hem yöntemin geliştirilip yüksek verim elde etmek hem de GR enzimi için ileride yapılacak bu tarz çalışmalara fayda sağlayıp literatüre katkılı olacağı düşünülmüştür. Biberiye bitkisi ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan tıbbi, aromatik ve antioksidan gibi özelliklere sahip olduğundan GR enzim kaynağı şeklinde literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Radzicka, A., Wolfenden, R., A proficient enzyme. *Science*, 267(5194), 90-93, 1995.
- [2] Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Tuteja, N., Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212, 2013.
- [3] Taşer, P., Çiftci, M., Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(5), 546-553, 2012.
- [4] Çiftci, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., Gündoğdu, M., Özmen, I., Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological research*, 41(1), 107-111, 2000.
- [5] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 2000.
- [6] Temel, Y., Bozkuş, T., Çiftci, M., Glutatyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3), 143-150, 2017.
- [7] Beutler, E., Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. *The Journal of clinical investigation*, 48(10), 1957-1966, 1969.
- [8] Senturk, M., Kufrevioglu, O. I., Ciftci, M., Effects of some analgesic anaesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24(2), 420-424, 2009.
- [9] Poyraz, İ., Kutlu, M., Aydoğan, G., Purification and biochemical characterization of glutathione reductase enzyme in *Gainmarus pulex*. *Afyon Kocatepe University Journal of Science*, 7(1), 2007.
- [10] Karagözoğlu, Y., Çiftci, M., Bazı metal iyonlarının tavuk böbreğinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine in vitro etkilerinin araştırılması. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 6(1), 24-30, 2017.

- [11] Ulusu, G., Erat, M., Çiftçi, M., Şakiroğlu, H., Bakan, E., Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29(5), 1109-1117, 2005.
- [12] Temel, Y., Taher, S. S. M., Hamza, M. A., Shafeeq, I. H., Koçyiğit, Ü. M., Çiftçi, M., Investigation of the Inhibition Effects of Some Metal Ions on Glutathione Reductase Enzyme From Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Liver. Cumhuriyet Science Journal, 39(3), 679-687, 2018.
- [13] Erat, M., Sakiroglu, H., Ciftci, M., Purification and characterization of glutathione reductase from bovine erythrocytes. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 33(4), 283-300, 2003.
- [14] Takeda, T., Ishikawa, T., Shigeoka, S., Hirayama, O., Mitsunaga, T., Purification and characterization of glutathione reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Microbiology, 139(9), 2233-2238, 1993.
- [15] Taşer, P., Çiftci, M., Glutasyon redüktaz enziminin hindi karaciğerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [16] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M., Çeviri Editörü: Nedret Kılıç, Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayınevi, 2005.
- [17] Stryer., L., Biochemistry (Fourth Edition), Standford University, Ninth printing, 2000.
- [18] Tüzün., C., Biyokimya, Palme Yayınları, 124-125, Ankara, 1997.
- [19] Kutlu, M., Özata, A., Enzimoloji Ders Notları. 1. Baskı, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 15, 2000.
- [20] Wilson, K., Walker, J., Principles and Techniques Biochemsitry and Molecular Biology, 7th edition, Cambridge University Press, 2010.
- [21] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biochemistry. 5th Ed., W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2002.
- [22] Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D., Scrimgeour, K. G., Principles of Biochemistry. 2nd Ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA, 1996.
- [23] Eisenthal, R., Danson, M. J., Enzyme Assays. 1st Ed., Oxford University Press, New York, USA, 1992.
- [24] Whitford, D., Proteins: Structure and Function. 1st Ed., John Wiley Sons Ltd., West Sussex, England, 2005.

- [25] Metzler, D. E., Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. Elsevier Academic Press, 459, USA, 2001.
- [26] Telefoncu, A., Enzimoloji (enzimlerin endüstriyel uygulamaları). Ege Üniversitesi Basımevi, 249-307, İzmir, 1997.
- [27] Kuzmic, P., Cregar, L., Millis, S. Z., Goldman, M., Mixed- type noncompetitive inhibition of anthrax lethal factor protease by aminoglycosides. The FEBS journal, 273(13), 3054-3062, 2006.
- [28] Patekar, D., Kheur, S., Bagul, N., Kulkarni, M., Mahalle, A., Ingle, Y., Dhas, V., Antioxidant defence system. Oral and Maxillofacial Pathology Journal, 4(1), 2013.
- [29] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry and cell biology, 39(1), 44-84, 2007.
- [30] Bursal, E., Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Fen bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 2009.
- [31] Kabel, A. M., Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. World Journal of Nutrition and Health, 2(3), 35-38, 2014.
- [32] Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews, 82(1), 47-95, 2002.
- [33] Aksoy, Y., Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 22(4), 442-448, 2002.
- [34] Word, R. J., Peters, T. J., Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. Clinical chemistry. 3th Ed. Mosby Year Book, Inc, 765-777, 1996.
- [35] Antmen, Ş. E., Beta talasemide oksidatif stres. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2005.
- [36] Appenzeller-Herzog, C., Glutathione-and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. J Cell Sci, 124(6), 847-855, 2011.
- [37] Kuchel, P. W., Ralston, G. B., Theory and Problems of Biochemistry. New York: Schaum's Outline Series, 1988.
- [38] McKee, T., McKee, J. R., Biochemistry: the molecular basis of life (Vol. 3). New York: McGraw-Hill, 2003.

- [39] Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., Food Chemistry. 3rd revised Edition. Springer., 2004.
- [40] Lushchak, V. I., Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. Journal of amino acids, 2012.
- [41] Zubay, G., Chapter 5: Lipids. Biochemistry Second Edition, Macmillan Publishing Company, 154-175, 1988.
- [42] Aan, L., Koyun beyni glutasyon redktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 1990.
- [43] Richman, P. G., Meister, A., Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. Journal of Biological Chemistry, 250(4), 1422-1426, 1975.
- [44] Toribio, F., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Lopez-Barea, J., Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 684(1-2), 77-97, 1996.
- [45] Misra, I., Griffith, O. W., Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. Protein expression and purification, 13(2), 268-276, 1998.
- [46] Kondo, T., Dale, G. L., Beutler, E., Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(11), 6359-6362, 1980.
- [47] Arrick, B. A., Nathan, C. F., Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. Cancer research, 44(10), 4224-4232, 1984.
- [48] Shohet, S. B., Beutler, E., Glutathione metabolism of the erythrocyte. Williams Hematologie. The Erythrocyte, Part Four, 1986.
- [49] Cooper, A. J., Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. The molecular and genetic basis of neurological disease, 1245-1245, 1997.
- [50] Demir, E., Diabetlerde eritrosit glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz aktivitelerinin glikolize hemoglobin ve lipid peroksidasyonu ile değişimlerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum, 1994.
- [51] Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., Steegers, E. A., Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, 82(2), 171-184, 1999.

- [52] Harvey, R. A., Champe, P. C., Ferrier, D. R., Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, 2007.
- [53] Levy, H. R., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase" Adv. Enzymol, 48, 97-192, 1979.
- [54] Tandoğan, B., Ulusu, N. N., Kinetic mechanism and moleküler properties of glutathione reductase. Fabad J. Pharm. Sci., 31, 230-237, 2006.
- [55] Deponte, M., Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830(5), 3217-3266, 2013.
- [56] Douglas, K. T., Mechanism of action of glutathione- dependent enzymes. Advances in enzymology and related areas of molecular biology, 59, 103-167, 1987.
- [57] Krauth-Siegel, R. L., Arscott, L. D., Schönleben-Janass, A., Schirmer, R. H., Williams, C. H., Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. Biochemistry, 37(40), 13968-13977, 1998.
- [58] Patel, M. P., Marcinkeviciene, J., Blanchard, J. S., Enterococcus faecalis glutathione reductase: purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. FEMS microbiology letters, 166(1), 155-163, 1998.
- [59] Iribarne, F., Paulino, M., Tapia, O., Hydride-transfer transition structure as a possible unifying redox step for describing the branched mechanism of glutathione reductase. Molecular-electronic antecedents. Theoretical Chemistry Accounts, 103(6), 451-462, 2000.
- [60] Başkaya, Ş., Ayanoğlu, F., Bahadır, N. P., Biberiye (Rosmarinus officinalis L.) bitkisinin uçucu yağ oranı, uçucu yağ bileşenleri ve antioksidan içeriğinde morfojenetik ve ontogenetik varyabilite. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(1), 12-20, 2016.
- [61] <https://www.bitkiler.com.tr/biberiye-bitkisi/>, Erişim Tarihi: 08. Nisan 2019.
- [62] Uçar, E., Köse Odabaş, E., Özyiğit Y., Turgut K., Bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(2), 118-124, 2015.
- [63] Bulduk, İ., Gökce, S., Yüzey Yanıt Metodolojisi ile Biberiye Yapraklarından Rosmarinik Asit Ekstraksiyonunun Optimizasyonu, Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5(2), 441-454, 2017.

- [64] Dennison, C., Lovrien, R., Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein expression and purification*, 11(2), 149-161, 1997.
- [65] Pike, R. N., Dennison, C., Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t- butanol mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 33(2), 221-228, 1989.
- [66] Duman, Y., Üçlü Faz Ayrımı (ÜFA) ile geleneksel enzim saflaştırma tekniğinin karşılaştırılması; ÜFA ile saflaştırılan β -Galaktosidazın termodinamik özellikleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(3), 107-117.
- [67] Chougale, J. A., Singhal, R. S., Baik, O. D., Recovery of astaxanthin from *Paracoccus* NBRC 101723 using ultrasound-assisted three phase partitioning (UA-TPP). *Separation Science and Technology*, 49(6), 811-818, 2014.
- [68] Özel, A., *Boletus erythropus* mantarından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve sentetik kimyada katalitik etkinliğinin incelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2008.
- [69] Carlberg, I., Mannervik, B., Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2', 5'-ADP-Sepharose 4B. *Analytical biochemistry*, 116(2), 531-536, 1981.
- [70] Smith, I. K., Vierheller, T. L., Thorne, C. A., Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*, 175(2), 408-413, 1988.
- [71] Çesko, C., *Paulownia tomentosa*'dan polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve çeşitli bitki özütleri ile inhibisyonu. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Sakarya, 2018.
- [72] Keskin, S. Y., Kat, B., İnvertaz enziminin üçlü faz sistemi ile saflaştırılması ve termal kararlılığının incelenmesi. *Sakarya Üniversitesi, Bilim Dergisi*, 17(2), 291-294, 2013.
- [73] Tan, Z. J., Yang, Z. Z., Yi, Y. J., Wang, H. Y., Zhou, W. L., Li, F. F., Wang, C. Y., Extraction of oil from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) using enzyme-assisted three-phase partitioning. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(8), 1325-1335, 2016.
- [74] Niphadkar, S. S., Rathod, V. K., Ultrasound- assisted three- phase partitioning of polyphenol oxidase from potato peel (*Solanum tuberosum*). *Biotechnology progress*, 31(5), 1340-1347, 2015.

- [75] Yan, J., Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Shao, N., Three-phase partitioning for efficient extraction and separation of polysaccharides from *Corbicula fluminea*. *Carbohydrate polymers*, 163, 10-19, 2017.
- [76] Bilir, G., Soya bitkisinden (*Glycine maks* L.) glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması ve bazı ağır metallerin inhibisyon kinetiğinin incelenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Samsun, 2017.
- [77] Alharbi, M., Alsenaidy, A. M., Aldaihan, S., Ahmed, A., Gene cloning and expression analysis of mitochondrial glutathione reductase from Arabian camel (*Camelus dromedarius*) liver in *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(5), 656-666, 2017.
- [78] Altun, M., Van Gölü balığından (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaç ve kimyasal maddelerin etkilerinin araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Van, 2018.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra TOSUN 1995 yılında Sakarya’da doğdu. İlkokul ve Ortaokul öğrenimini Fevzi Çakmak İlköğretim Okulu’nda; lise öğrenimi Adapazarı Atatürk Lisesi’nde tamamladı. 2013 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nü kazandı. 2015 yılında aynı üniversitenin Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde çift anadal yaptı. 2017 yılında her iki bölümden mezun oldu ve o yıl içerisinde Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir.