

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

KATALAZ ENZİMİNİN *THYMUS NUMMULARİUS*' DEN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS

Esma TOPRAK

OCAK - 2024
GÜMÜŞHANE



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

KATALAZ ENZİMİNİN *THYMUS NUMMULARİUS*' DEN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE ENZYME
FROM *THYMUS NUMMULARİUS*

YÜKSEK LİSANS

Esma TOPRAK

OCAK - 2024
GÜMÜŞHANE



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

KATALAZ ENZİMİNİN *THYMUS NUMMULARİUS*' DEN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE ENZYME
FROM *THYMUS NUMMULARİUS*

YÜKSEK LİSANS

Esma TOPRAK

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nuri GÜLEŞCİ

OCAK - 2024
GÜMÜŞHANE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlamış olduğum “**Katalaz Enziminin *Thymus nummularius*’den Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğum intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

25/01/2024

Esma TOPRAK

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenen ve çalışmalarımın yürütölüp sonuçlandırılması sırasında her zaman yanımda olup fikirleriyle beni heyecanlandıran, bilimsel bakış açımı şekillendirip düşünme yeteneğimi boyutlandıran ve bilimsel kimliğiyle bende hayranlık uyandıran danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nuri GÜLEŞCİ'ye minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez konumun şekillenmesi ve verilerimin yorumlanması konusunda yardımcı olan, kimyasallar konusunda her türlü imkanı bana sağlayan, engin tecrübe ve desteklerini esirgemeyen Çukurova Üniversitesi; Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ramazan BİLGİN ve Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca kimyasal temininde ve elektroforez çalışmalarında yardımcı olan Ege Üniversitesi'nde görevli Arş. Gör. Sefer Özer BABAT'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman beni destekleyip yanımda olan kıymetli eşim Öğr. Gör. Mesut TOPRAK'a ve canım kızım Ayşe Mina TOPRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esma TOPRAK
Gümüşhane-2024

ÖZET

Geçmişten günümüze hastalıkların doğal tedavisinde kullanılan bitkiler, içerdikleri biyoaktif fenolik bileşenler sayesinde geleneksel tıbbın yanı sıra ilaç endüstrisinin de odak noktası olmuştur. Katalaz enzimi, biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde antioksidan özelliğinden dolayı zarar verici bir yapıya sahip olan yükseltgen hidrojen peroksidi (H_2O_2) ortamdan uzaklaştırarak hücreyi korur. Bu çalışmada; katalaz enzimi *Thymus nummularius* (Yayla Kekiği) bitkisinden saflaştırılarak, kinetik özellikleri (K_m , V_{max}), termal ve depolama kararlılıkları araştırılmış, optimum sıcaklığı, optimum pH'ı belirlenmiş ve SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Ham katalaz ekstraktında toplam protein miktarı 6.150 mg/mL, toplam spesifik aktivite değeri 161.50 U/mg protein olduğu tespit edilmiştir. Amonyum sülfat kullanılarak oluşturulan çöktürmede en yüksek aktivite %70'lik tuz derişiminde görülmüştür. Protein tayini sonucunda bulunan toplam protein miktarı 2.350 mg/mL, toplam spesifik aktivite değeri 236.73 U/mg proteindir. PD-10 kolon kromatografisinden sonra protein tayini yapılmış ve toplam protein miktarı 0.156 mg/mL, toplam spesifik aktivite değeri 1260.96 U/mg prot. olduğu görülmüştür. Bu işlem sonunda CAT enzimi 7.81 kat saflaştırılmıştır. Enzimin optimum pH ve sıcaklık çalışmaları sonucunda; optimum pH 8.0; optimum sıcaklık 25 °C olarak tespit edilmiştir. Termal kararlılıkları mukayese edildiğinde; 40 °C'de 24 saat bitiminde enzim aktivitesinin %18.99'unu muhafaza ederken, 25 °C'de ise enzim aktivitesinin %40.51'ini muhafaza ettiği tespit edilmiştir. Depolama kararlılığı için 4 °C'de çalışılmış ve 15 gün sonunda katalaz enzim aktivitesinin %5.96'sını muhafaza ettiği belirlenmiştir. K_m değerinin 38.151 mM ve V_{max} değerinin 303.03 U/mg protein olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE elektroforez işleminden sonra enzimin molekül ağırlığı 42 ile 52 kDa aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzim, Katalaz, Karakterizasyon, Saflaştırma, *Thymus nummularius*

SUMMARY

Plants used in the natural treatment of diseases from the past to the present have become the focus of the pharmaceutical industry as well as traditional medicine thanks to the bioactive phenolic components they contain. Due to its antioxidant characteristics in biological and metabolic systems, the catalase enzyme is crucial in the removal of harmful and oxidizing hydrogen peroxide (H_2O_2) from cells. In this study; catalase enzyme was purified from *Thymus nummularius* (Thyme) plant, kinetic properties (K_m , V_{max}), thermal and storage stability were investigated, optimum temperature, optimum pH was determined and molecular weight was determined by SDS-PAGE electrophoresis. The total amount of protein in the raw catalase extract was found to be 6.150 mg/mL, the total specific activity value was found to be 161.50 U/mg protein. Maximum activity was found in precipitation with ammonium sulfate at a salt concentration of 70%. As a result of protein determination, the total amount of protein was found to be 2.350 mg/mL and the total specific activity value was found to be 236.73 U/mg protein. Protein determination was performed after PD-10 column chromatography and the total protein amount was found to be 0.156 mg/mL, the total specific activity value was 1260.96 U/mg protein. At the end of this process, the CAT enzyme was purified 7.81 times. As a result of optimum pH and temperature studies of the enzyme; optimum pH 8.0; the optimum temperature was determined to be 25°C. When their thermal stability was compared, it was determined that they maintained 18.99% of enzyme activity at the end of 24 hours at 40 °C and 40.51% of enzyme activity at 25 °C. The storage stability was examined at 4 °C and it was found that it retained 5.96% of the catalase enzyme activity at the end of 15 days. K_m value was determined as 38.151 mM and the V_{max} was determined as 303.03 U/mg protein. As a result of SDS-PAGE electrophoresis, the molecular weight of the enzyme was found to be between 42 and 52 kDa.

Keywords: Enzyme, Catalase, Characterization, Purification, *Thymus nummularius*

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLOLAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1.GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş ve Enzimlerle İlgili Genel Bilgi	1
1.2. Enzimlerin Yapısı.....	2
1.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	4
1.3.1. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	4
1.3.2. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	5
1.3.3. Sıcaklığın Etkisi	5
1.3.4. pH Etkisi	6
1.3.5. Zamanın Etkisi	6
1.3.6. Reaksiyon Ürünlerinin Etkisi	6
1.4. Katalaz Enzimi	7
1.4.1. Katalaz Enziminin Yapısı	8
1.4.2. Katalaz Enziminin Kullanım Alanları.....	9
1.4.3. Katalazın Reaksiyon Mekanizması	10
1.4.4. Katalaz ve Antioksidanlar	10
1.5. Protein Saflaştırma Yöntemleri.....	11
1.5.1. Hücre Parçalanması.....	11
1.5.2. Tuzla Çöktürme.....	12
1.5.3. Kromatografik Yöntemler	12
1.5.3.1. Boyut Ayırma Kromatografisi	12
1.5.3.2. İyon Değişim Kromatografisi	13
1.5.4. Elektroforez.....	15
1.6. <i>Thymus nummularius</i>	16

1.7. Katalaz Enziminin Saflaştırıldığı Kaynaklara İlişkin Literatür Bilgisi	16
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	21
2.1. Materyal ve Metot	22
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	22
2.1.2. Örneklerin Homojenizasyonu	22
2.1.3. Molar Ekstinksiyon Katsayısı Tayini	22
2.1.4. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini	22
2.1.5. Proteint Tayini	23
2.1.6. Katalaz Enzimi İçin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürmesi	24
2.1.7. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürmesi Sonrası Dializ Uygulaması	24
2.1.8. Proteinlerin PD-10 Kolonuna (Sephadex G-25M İçeren) Uygulanması	24
2.1.9. pH'ın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi	24
2.1.10. Sıcaklığın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi	25
2.1.11. Katalaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi	25
2.1.12. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi	25
2.1.13. Katalaz Enziminin $V_{\max}$ ve K_m Değerlerinin Bulunması	26
2.1.14. Katalaz Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	26
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
3.1. Enzim Homojenizasyonundan Elde Edilen Bulgular	27
3.2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürmesi Sonunda Elde Edilen Bulgular	27
3.3. Dializ Kesesi Uygulaması Sonucu Elde Edilen Bulgular	27
3.4. Kolon Uygulaması Sonunda Elde Edilen Bulgular	28
3.5. Molar Ekstinksiyon Katsayısı Tayini Sonunda Elde Edilen Bulgular	29
3.6. pH'ın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi İle İlgili Bulgular	31
3.7. Sıcaklığın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi İle İlgili Bulgular	31
3.8. Termal Kararlılık İle İlgili Bulgular	32
3.9. Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular	33
3.10. Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular	33
3.11. Katalaz Enziminin Molekül Ağırlığı İle İlgili Bulgular	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
KAYNAKÇA	38
ÖZGEÇMİŞ	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. İyon değiştirici kromatografide kullanılan bazı tamponlar.....	14
Tablo 2. Kolon sonrası numunelerin 280 nm’deki absorbens ve aktivite değerleri	28
Tablo 3. <i>T. nummularius</i> katalazı için saflaştırma sonuçları	28
Tablo 4. H ₂ O ₂ ’nin farklı derişimlerde ve 240 nm’de ölçölen absorbens değerleri	29
Tablo 5. Standart protein grafiği için elde edilen bulgular	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzim substrat ilişkisi.....	3
Şekil 2. Aktif bir enzimin yapısı	3
Şekil 3. Enzim konsantrasyonuna bağlı reaksiyon hızı grafiği	5
Şekil 4. Substrat konsantrasyonuna bağlı reaksiyon hızı grafiği	5
Şekil 5. Sıcaklık – reaksiyon hızı grafiği	6
Şekil 6. Katalazda hem'in 3 boyutlu gösterilişi.....	8
Şekil 7. <i>E.coli</i> katalazının 3 boyutlu yapısı	9
Şekil 8. Katalazın reaksiyon mekanizması	10
Şekil 9. Sephadex G 25M içeren kolondan alınan numunelerin 280 nm'deki absorbans ve aktivite değerleri	29
Şekil 10. H ₂ O ₂ 'nin 240 nm'deki standart grafiği	30
Şekil 11. Standart protein eğrisi grafiği	30
Şekil 12. Farklı pH'larda ölçülen bağıl aktivite değerleri.....	31
Şekil 13. Farklı sıcaklıklarda ölçülen bağıl aktivite değerleri.....	32
Şekil 14. Bağıl aktivitenin süre ile değişimi	32
Şekil 15. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı zamanlarda ölçülen spesifik aktivite değerleri.....	33
Şekil 16. Lineweaver-Burk grafiği.....	34
Şekil 17. SDS-PAGE görüntüsü	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

akb	: Atomik Kütle Birimi
BSA	: Sığır Serum Albumini
BLC	: Sığır Karaciğer Katalazı
CAT	: Katalaz
°C	: Santigrad Derece
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DEAE	: Dietilaminoetil selüloz
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
K_m	: V_{max} 'ın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Mili molar
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
nm	: Nanometre
μ L	: Mikrolitre
%	: Yüzde
prot.	: Protein
pI	: İzoelektrik Nokta
PVP	: Poli Vinil Prolidon
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS-PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
V_{max}	: Enzimin Ulaşabileceği Maksimum Hız

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş ve Enzimlerle İlgili Genel Bilgi

Enzimler gelişmiş, birlikte hareket edebilen proteinlerden oluşmuş moleküllerdir. Canlılık, hücre içinde art arda meydana gelen biyokimyasal tepkimeler sonunda hücrenin ihtiyacı olan büyük moleküllerin meydana gelmesiyle ya da büyük moleküllerin parçalanarak daha küçük moleküller oluşturulmasıyla devam eder. Enzimlerin mol kütlesi 10^4 ile 10^6 akb aralığında farklılık gösteren büyük moleküllerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Kalaycıoğlu vd., 2000; Pamuk, 2000; Nelson ve Cox, 2005; Seçgin, 2013).

Canlı hücrelerde büyük moleküllerin parçalanması ile meydana çıkan enerji hücrenin enerji gereksinimini karşılar. Hücrelerde meydana gelen bu yıkım ve yapım olaylarında enzimler görev alır. Makro moleküller yıkımında ya da mikro moleküllerin yapım süreci olan biyokimyasal tepkime aşamalarında substrata kimyasal bir grup eklenmektedir. Bu kimyasal gruplar; bir metilen (CH_3), bir amin (NH_2), bir hidroksit (OH), bir hidrojen (H), keto (CO), aldehit (OC-H), bir karbondioksit (CO_2) grubu olabilir. Makro moleküller, tepkimenin her aşamasında bu kimyasal gruplar tarafından oluşturulurlar. Enzimler doğal yöntemlerle yalnız canlı hücreler tarafından sentezlenirler (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Kalaycıoğlu vd., 2000; Nelson ve Cox, 2005; Seçgin, 2013).

Enzimler hücre içinde aktivite gösterdikleri gibi hücre dışında da aktivite gösterirler. Enzimler canlı hücrede meydana gelen tüm reaksiyonların düzenli bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan tepkimelerde aktivite hızını olumlu açıdan artıran özel biyokimyasal katalizörlerdir. Tepkimelerde enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin daha hızlı gerçekleşmesini sağladıklarından dolayı enzimsiz bir tepkimeden 10^3 - 10^{17} defa daha hızlı reaksiyonu tamamlarlar (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Kalaycıoğlu vd., 2000; Nelson ve Cox, 2005). Enzimler, özelleştirilmiş büyük yapılardır. Enzimlerin belirli konformasyon ve üç boyutlu yapılarının oluşumunda proteini oluşturan amino asitlerin dizilişi çok önemlidir. Enzimlerin özelleşmiş yapıya sahip olmaları enzimin etkinliği ve meydana gelen metabolik olayların denetimi açısından önemlidir. Enzimlerle reaksiyona girerek biçim değişikliğine uğrayan maddeye substrat denir. Bazı enzimler tek bir substratla reaksiyona girebilirken bazı

enzimler ise birden fazla substratla reaksiyona girebilirler (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Nelson ve Cox, 2005; Seçgin, 2013).

Enzimlerin isimlendirilmeleri, enzimin reaksiyona girdiği substrat isminin sonuna –az eklenerek oluşturulmuştur (Üreaz, lipaz, fosfataz vb.). Bu kurala uygun olmayan enzimler farklı şekilde (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Nelson ve Cox, 2005; Seçgin, 2013). Ancak bu isimlendirme sistemi düzensizliklere neden olduğundan belirli bir standardizasyon oluşturularak günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) belirli bir isimlendirme sistemi oluşturmuştur. Oluşturulan isimlendirme sisteminde enzimler etki ettikleri tepkimeye göre 6 ana grup altında toplandı. “Bunlar;

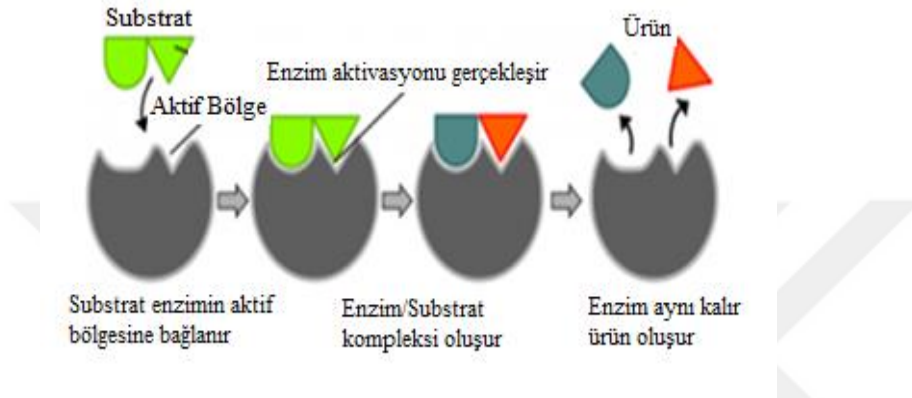
1. Oksidoredüktazlar: Redüksiyon tepkimelerini katalizler.
2. Transferazlar: İki sustrat arasında hidrojen hariç diğer grupların geçişini katalizler.
3. Hidrolazlar: 1 mol H₂O molekülünün dahil olmasıyla kimyasal bağın kırılmasını katalizler.
4. Liyazlar: Substrattan grupların ayrılmasını hidrolizden değişik bir mekanizma ile oluşturarak, çift bağların meydana gelmesini katalizler.
5. İzomerazlar: Geometrik, pozisyon ve optik izomerlerinin birbirine dönüşümlerini katalizler.
6. Ligazlar: Yüksek enerjili bileşenlerdeki fosfat bağlarının kopması sonucunda meydana gelen enerji ile iki bileşiğin birbirine bağlanmasını katalizler” (Gökalp vd., 2002).

Enzimin tanımı aralarına nokta konularak 4 rakamdan oluşan bir kod numarası ile (E.C.) (Enzyme Code) yapılmıştır (Nelson ve Cox, 2005; Tekman ve Öner, 1986; Bingöl, 1983; Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Bu kod numarasındaki ilk rakam enzimin ana grubunu, ikinci rakam substrat veya alt grubu, üçüncü rakam spesifik substrat veya kofaktörü gösteren subalt grubu ve dördüncü rakamda enzimin seri numarasını belirtir (Yıldız, 2013).

1.2. Enzimlerin Yapısı

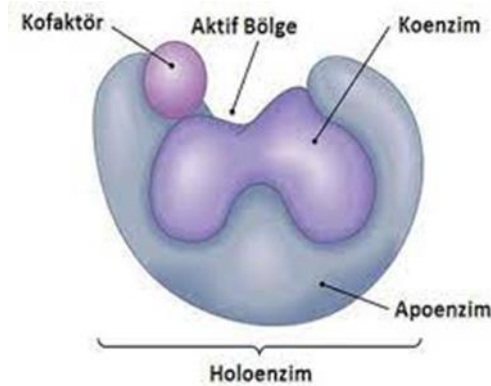
Enzimler proteinlerden oluşurlar. Enzimin yapısını oluşturan proteinlerin içeriğindeki amino asitlerin dizilişi sayısı ve moleküller yapılarındaki farklılıklar enzimin substratına özgü olmasını sağlar. Enzimlerin bir kısmı yalnızca proteinden meydana gelirken, bazıları ise proteinle birlikte organik veya inorganik yapılardan oluşur. Enzimin yalnızca proteinden meydana gelen bölümüne “apoenzim”, protein

olmayan bölümüne ise “kofaktör” adı verilir (Keha ve Küfrelioğlu, 1997; Kalaycioğlu vd., 2000; Nelson ve Cox, 2005). Apoenzim, enzimin reaksiyona gireceği substratı belirleyen kısmıdır. Enzime spesiflik kazandırır. Enzimler tepkime sırasında şekilsel değişikliklere uğrasalarda tepkime sonunda kendi özgün hallerini koruyarak tepkimeyi sonlandırırlar ve ürün meydana getiriler (Şekil 1). Enzimler proteinlerden oluştuğu için fiziksel ve kimyasal etkilerden dolayı denatürasyona uğrayabilirler (Kalaycioğlu vd., 2006).



Şekil 1. Enzim substrat ilişkisi (Ako ve Mathews, 1996).

Enzimde belirli amino asitlerin bir araya gelmesiyle oluşan özel bir bölüm mevcuttur. Reaksiyonların gerçekleşebilmesi için enzimi katalizleme özelliğine sahip bu özel bölge “aktif bölge” olarak adlandırılır. Enzim substratı ile koenzimin bağlandığı kısım aktif bölgedir (Ames vd., 1993). Enzimin aktif bölgesi asimetrik bir cepten oluşan girinti ve çıkıntı biçiminde oyuk görüntüsündedir (Şekil 2). Aktif bölgenin şekli, enzimin substrata tam bir uyum halinde bağlanmasını sağlar (Yenson, 1984).



Şekil 2. Aktif bir enzimin yapısı (Ako ve Mathews, 1996).

Aktif bölgenin substrata kusursuz şekilde bağlanmasında yapısal uygunluğun yanını sıra aktif bölgenin polarlık ve elektiriksel yükü de bağlanmaya kolaylık sağlamaktadır. Enzimlerin katalitik aktivitesini düzenlemek için çeşitli yollar vardır. Canlı organizmalarda bir enzimatik etkinliğin her zaman aynı hızda oluşması organizmaya ihtiyacı olan esnekliği sağlar (Yenson, 1984; Özata ve Kutlu, 2000).

Enzim hücrelerde belirli miktarda bulunmaz ve hücrelerin ihtiyaç durumuna göre enzim sentezlenir ya da sentezine son verilir. Enzimler katıldıkları reaksiyonlarda dengeyi değiştirmez yalnızca, dengeye daha hızlı ulaşmasını sağlar. Tepkime hızının yükselmesi, kimyasal katalizörlere benzer şekilde, mekanizmanın değişmesi neticesiyle aktivasyon enerjisinin azalmasından dolayı meydana gelir (Yenson, 1984).

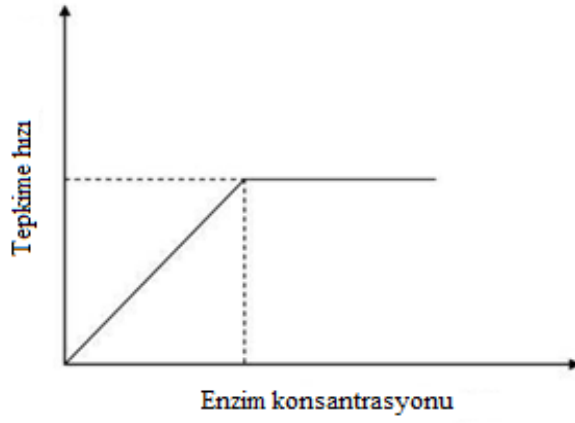
1.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler ortamda bulunan substrat ile tepkimeye girerek substratı ürüne dönüştürürler. Enzimin aktivitesi, tepkime ortamında meydana gelen substrat derişimindeki azlamadan ya da ürün derişimdeki artmadan anlaşılır. Enzim ünitesi; optimal koşullarda 1 dakikada 25 °C sıcaklıkta, 1 mikromol substratın, ürüne çevrilmesini sağlayan enzim miktarıdır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzim aktivite miktarı enzim ünitesi ile saptanır. Enzimlerin katıldığı tepkimelerde reaksiyon hızına etki eden faktörler; “sıcaklık, enzim konsantrasyonu, ışık, zaman, substrat konsantrasyonu, ortamın pH’ı ve diğer fiziksel faktörlerdir”(Seçgin, 2013).

1.3.1. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

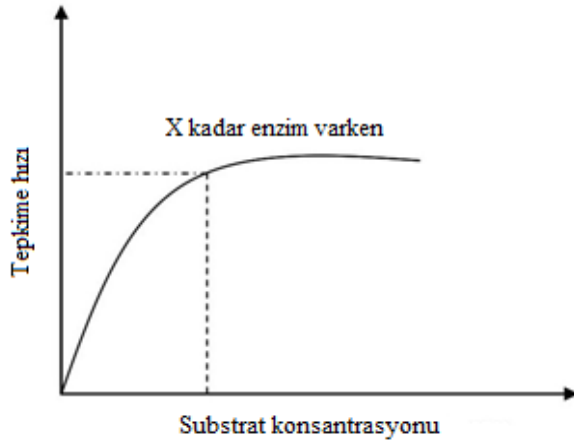
Enzim reaksiyon hızı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantı gösterir. Yani substrat konsantrasyonun sabit olduğu bir reaksiyon ortamında enzim miktarı ne kadar çok olursa reaksiyon hızı da o kadar yüksek olur. Reaksiyon ortamında substrat miktarı bittiğinde enzim reaksiyon hızı sabitlenir (Şekil 3) (Kara, 2008).



Şekil 3. Enzim konsantrasyonuna bağlı reaksiyon hızı grafiği (Kara, 2008).

1.3.2. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

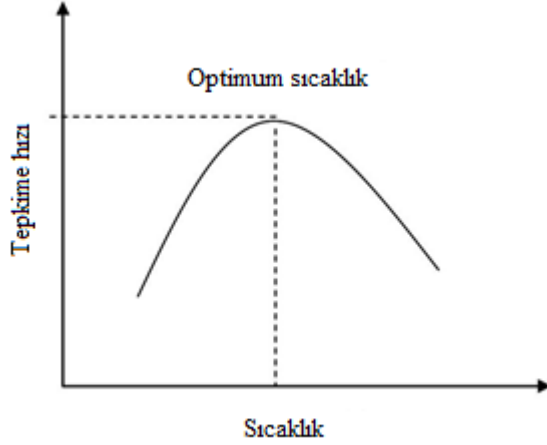
Enzim konsantrasyonun sabit olduğu reaksiyonda, enzimin reaksiyon hızı belirli bir yere kadar substrat konsantrasyonuyla aynı yönde ilerler. Enzimin substratla doygunluğa eriştiği noktada reaksiyon hızı farklılaşma göstermeden ilerler (Şekil 4) (Nelson ve Cox, 2005; Güngör, 2008).



Şekil 4. Substrat konsantrasyonuna bağlı reaksiyon hızı grafiği (Kara, 2008).

1.3.3. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık enzimin reaksiyon hızını artıran bir etmendir. Sıcaklık 10 °C artırıldığında buna bağlı olarak reaksiyon hızı yaklaşık iki kat yükselir. Enzimlerin yapay koşullardaki reaksiyonu genellikle oda sıcaklığından dört kat daha fazladır. Enzimler için belirli bir sıcaklığın üstüne çıkıldığında enzimler denatüre olur ve etkinliklerini kaybederler. Her enzimin birim zamanda etkinliğinin en yüksek olduğu bir sıcaklığı vardır. Bu sıcaklık o enzim için optimum sıcaklıktır (Şekil 5) (Kara, 2008).



Şekil 5. Sıcaklık – reaksiyon hızı grafiği (Kara, 2008).

1.3.4. pH Etkisi

Enzimlerin aktivite gösterdikleri pH aralıkları farklıdır. Kimi enzim yüksek pH'lı ortamlarda etkinlik gösterirken kimi enzim ise düşük pH'lı ortamda etkinlik gösterir. Enzimlerin geneli pH'ı nötr ortamlarda yüksek etkinlik gösterir. Enzimin en etkin olduğu pH o enzim için optimum pH olarak kabul edilir. Enzimin çalışmasına en uygun pH değerinin altında ve üzerindeki pH'larda enzim reaksiyon hızı daha düşük olur. Belirli bir pH'ın altında enzim aktivasyon göstermez (Nelson ve Cox, 2005; Güngör, 2008).

1.3.5. Zamanın Etkisi

Yapılan çalışmalarda, optimum sıcaklıkların ve optimum pH'ların zamanla orantılı olduğu anlaşılmıştır (Nelson ve Cox, 2005).

1.3.6. Reaksiyon Ürünlerinin Etkisi

In vitro ortamda meydana gelen enzim tepkimelerinde zamanla içerisinde oluşan tepkime ürünleri enzimi inhibe ederler. Bu durumda enzim reaksiyon hızını olumsuz etkiler. Tepkime ürünlerinin yapısı substratı andırdığından dolayı enzim substrattan daha fazla tepkime ürününe bağlanır bu da reaksiyonda enzimin inhibe olmasına neden olur (Güngör, 2008; Kara, 2008).

Enzimin substrat ile birleştiği aktif bölge dışında bir yerde tepkime ürünü enzim ile birleşebilir. Enzimin farklı bir yerine bağlanan madde, enzimin etkinlik gösteren bölümünde şekilsel değişikliğe neden olur. Enzimin şeklinin bozulmasından dolayı

enzim ile substratın bağlanması; substratın biçimine, yoğunluğuna ve diğer etkenlerle bağlı olarak inhibisyona yol açar. Bu etki “allosterik etki” olarak tanımlanır (Nelson ve Cox, 2005; Kara, 2008).

1.4. Katalaz Enzimi

Bilim insanlarının en fazla üzerinde çalışma yaptığı enzimler katalazlardır. Araştırmacı Loew 1901 yılında ilk defa “Katalaz” terimini hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayan enzim olarak literatür de tanımladı. Zaman içerisinde birçok biyolog ve biyokimyacı enzim üzerinde çalışma yaptı. Birçok araştırmacının katalaz enzimi üzerine çalışmaya başlamasının sebebi, enzimin substratının ucuz, kolay erişilebilir olması ve enzim aktivite tayinin kolay yapılmasındandır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Katalaz (CAT) canlılarda meydana gelen tepkimeler sonunda oluşan aktif hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya parçalayan enzimdir. Katalaz; oksidoredüktaz sınıfta yer alan bir enzimdir. Aktif yapılar arasında bulunan peroksitler, süperoksitler vb. reaktifler canlı hücre için çok önemlidir. Bazı yaşamsal reaksiyonların yan ürünü olan bu aktif yapıları ajanlar hücrenin ve hücre zarının yapısında bozulmalara yol açarak hücreye büyük zararlar verebilirler (Tayefi-Nasrabadi, 2008).

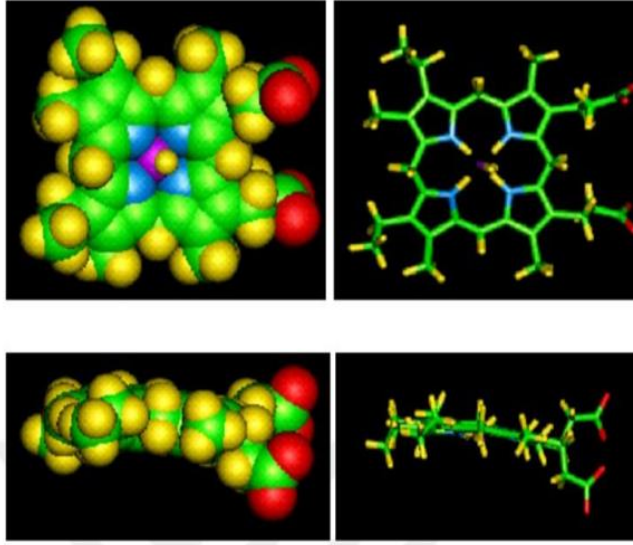
Antioksidan etkiye sahip olan katalaz enzimi toksik olan hidrojen peroksidi hücreden uzaklaştırmada etkin bir role sahiptir. Katalaz enzimi dokuları H_2O_2 ve indirgenmiş oksijen türevlerinin vereceği zararlara karşı muhafaza eder (Aydemir ve Kuru, 2003). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda ise insan ve hayvanda görülen kanser, diyabet, diğer hastalıklarla olan ilgisi ve yaşlanma üzerindeki etkisinden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Katalaz enziminin günümüze kadar pek çok değişik kaynaktan saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Katalaz enziminin saflaştırılması için prokaryotik ve ökaryotik canlılardan bitkilere kadar pek çok kaynak kullanılmaktadır. Katalaz enziminin tütün, safran, ıspanak, ayçiçeği, buğday, kozalak gibi birçok bitkide çoklu formda olduğu belirlenmiştir (Tayefi-Nasrabadi, 2008).

Katalaz enziminin molekül ağırlığı 240 kDa civarındadır. Katalaz enzimi dört polipeptit zincirinin oluşturduğu bir tetramer olup her bir tetramer bir prostetik hem grubu ihtiva eden bir yapıya sahiptir (Çimen, 2005; Ahıskalı, 2017).

Katalaz enziminin katalitik verimi (k_{cat}/K_m) $4.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ şeklinde olup çok etkilidir. Enzimler içerisinde en çok dönüşüm kat sayılarına sahip olan enzimlerden biridir. Hızının yüksek olması H_2O_2 'nin detoksifikasyon da ne kadar kapasitesi olduğunu gösterir (Sivrikaya, 2007). Katalaz enzimi kloroformlar, tetramerler,

sitokromlar, legumlar ve hemoglobinler’de azot ile başlayan enzimler gibi dört porfirin grup içerir (Şekil 6).

Bu özel, polipeptit olmayan bölüm, protein grubuna sıkıca bağlı bazı proteinlerin biyolojik olarak çalışması için gereklidir. İçerisinde bir protoporfirin halkası ve demir atomu bulunur. Protoporfirin halkası dört pirol halkasından oluşur ve her biri birbirine metenil köprüleriyle bağlanmıştır. Demir, ferro (Fe^{+2}) veya ferrik (Fe^{+3}) olarak bilinen iki farklı halde bulunabilir (Ahıskalı, 2017).

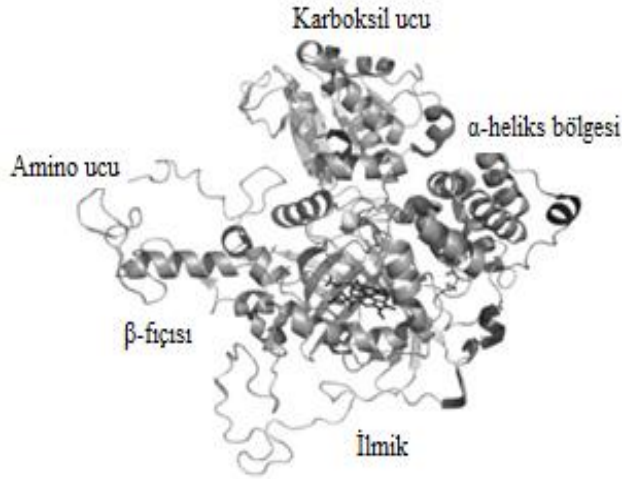


Şekil 6. Katalazda hem’in 3 boyutlu gösterilişi (Ahıskalı, 2017).

1.4.1. Katalaz Enziminin Yapısı

Katalaz enzimi bilim insanları tarafından saflaştırılması yapılan ve kristalize edilen ilk enzimlerdendir (Tayefi-Nasrabadi, 2008). Enzimin alt birimleri amino ucu, sekiz tane anti-paralel dizilmiş β ipliklerinin meydana getirdiği, karboksil ucu, uzun ilmik kısmı, β -fıçısı ve α -heliks bölgesi olarak beş farklı bölgeden meydana gelir. Her katalaz da amino uç kısmı farklı uzunluklara sahiptir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Amino ucu monomerler arası etkileşimin fazla olduğu bir bölge olup enzimin moleküler stabilitisinden mesuldur. Katalaz enziminin kendine özgü yapılarını β -fıçısı kısmı belirler. Proteinlerde bulunan β -fıçısı uzun ilmik yapı ile α -heliks bölgesini birbirine bağlamaktadır (Şekil 7). Katalaz enzimindeki karboksil uç kısımları uzunluk açısından farklılık gösterir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).



Şekil 7. *E.coli* katalazının 3 boyutlu yapısı (Ahıskalı, 2017).

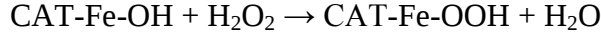
1.4.2. Katalaz Enziminin Kullanım Alanları

Canlılar üzerinde gözlenen hidrojen peroksitin (H_2O_2) etkileri, katalaza olan ilgiyi artırmış ve birçok araştırmacının katalaz üzerine çalışmasını sağlamıştır. Geniş kullanım alanına sahip olan katalaz enzimi, farmasötik sanayinde, gıda sanayinde, kağıt sanayinde, tekstil sanayinde ve çevresel kirlenme araştırmaları ile lens suyu temizliği gibi pek çok yerde kullanılmaktadır (Paar vd., 2001; Sancar vd., 2012).

Örneğin; kumaşın H_2O_2 ile ağartılma işleminin sonrasında H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırmak için ilk önce su ile yıkama işlemi yapılır. Su ile yıkama işleminin hemen ardından boyama işlemi yapılır. Yıkama işleminde suya H_2O_2 geçişi olur. Yıkama suyunun H_2O_2 'den arındırılarak tekrar sisteme kazandırılması için suya geçen H_2O_2 'yi parçalamak üzere katalaz enzimi kullanılır (Paar vd., 2001; Sancar vd., 2012). Ayrıca kağıt sanayinde ağartma işleminden sonra ortamki H_2O_2 'nin uzaklaştırılması, reçine, çam sakızı ve plastik imalatında köpükletmeyi ve oksitlemeyi sağlamak amacıyla yararlanılan H_2O_2 'nin uzaklaştırılması için katalaz enzimi kullanılmaktadır (Wiseman, 1986). Diğer taraftan katalaz enzimi glukoz barındırmayan diyetetik içeceklerin yapımında glukoz ve oksidaz enzimi ile birlikte kullanılır. Gıdalarda meydana gelen kararmayı önlemek için fırın ürünlerinin yapımı esnasında, diğer enzimler ile beraber H_2O_2 kullanılıp yeterli oksijen oluşturularak glukozun okside edilip ortamdan uzaklaştırılması için katalaz enzimi kullanılır (Yüzügül ve Ögel, 2013).

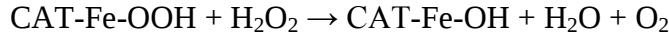
1.4.3. Katalazın Reaksiyon Mekanizması

Katalaz enzimi indirgeyici ve yükseltgeyici için peroksitten yararlanır. Katalazın reaksiyon basamakları iki aşamadan meydana gelir. Katalazda bulunan hem grubu demir elementi ile birleşerek I bileşimini meydana getirir (Alptekin, 2009).

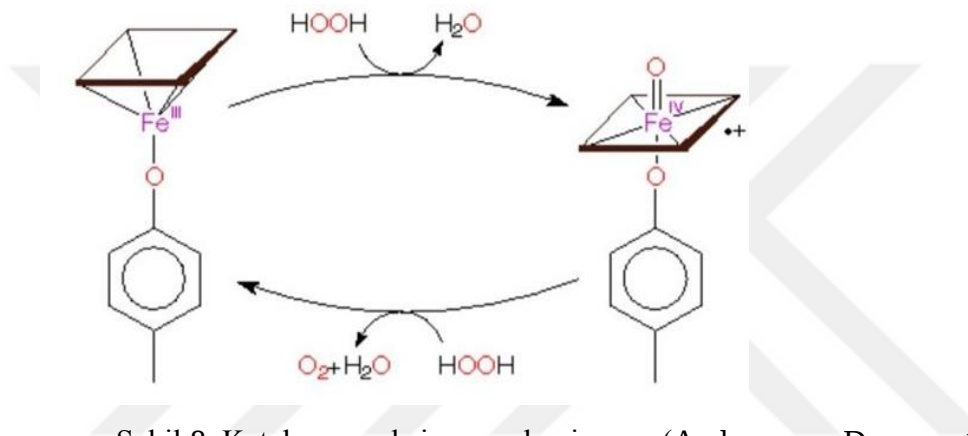


Bileşik I

Reaksiyon alanında yeteri kadar H_2O_2 bulunuyor ise bileşik II reaksiyonu oluşarak H_2O_2 , su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayrılır (Kavakçıoğlu, 2012).



Bileşik II



Şekil 8. Katalazın reaksiyon mekanizması (Anderson ve Dawson, 1991).

1.4.4. Katalaz ve Antioksidanlar

Enzimler canlılığın meydana gelmesinde ve sürdürülmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Enzimlerin hücre dışında da etkin olması enzimlerin kullanımını çok değerli hale getirmiştir. Her enzimin farklı sıcaklık, pH ve basınç gibi özel şartları vardır. Enzimler günümüzde gıda, kimya, sağlık, tekstil, dericilik ve boya gibi çok sayıda alanda kullanılmaktadır. Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki ana grupta toplanırlar. Endojen kaynaklı antioksidanlar: enzim olanlar; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx); enzim olmayanlar; albumin, E vitamini ve β -karotenlerdir. Eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak ksantin oksidaz inhibitörleri, Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NADPH) oksidaz inhibitörleri başta yer alırlar. Bu endojen yapıdaki antioksidan enzimler serbest radikalleri etkisiz kılarlar. Böylece organizma aktif oksijen ve serbest radikallerden zarar görmez (Dündar ve Aslan, 2000; Arosio vd., 2000; Akkuş, 1995).

1.5. Protein Saflaştırma Yöntemleri

Saflaştırma, her bir protein için özeldir. Farklı amaçlarda yapılan protein saflaştırmasında protein saflık ölçütleri de değişiklik gösterir. Proteinin yapısı üzerine bir analiz çalışması yapılıyor ise yüksek saflıkta bir numune gereklidir. Sanayi üretiminde enzimlere fazla miktarda ihtiyaç duyulduğu için kararlı, ucuz, saflık derecesi düşük enzimler tercih edilir. Protein saflaştırma işlemi sonunda enzimi tamamen saf hale getirmek pek mümkün değildir (Akar, 2015).

Proteinin saflaştırılması çok basamaklı bir işlemdir. Saflaştırmanın ilerleyişini gözlemlemek için her basamakta toplam protein miktarının tespit edilmesi önemlidir. Esas olan biyolojik ve biyokimyasal etkinliklerinin tespit edilmesidir. Bundan dolayı amaçlanan proteine özgü analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Saflaştırılmada kullanılan örnek enzim ise aktivite tayini yapılır. Saflaştırma aşamalarındaki önemli bir etkende; verimdir. Saflaştırma işlemi her ne kadar proteine özgü olsa da esas yöntem değişmemektedir. Bu işlemin aşamaları hücrenin parçalanması, tuzla çöktürme, kromatografik yöntemlerdir (Scopes, 1994).

1.5.1. Hücre Parçalanması

Hücre parçalanması mekanik (fiziksel) ve mekanik olmayan (kimyasal) iki yöntemden oluşur.

Mekanik/Fiziksel

- Aşındırıcı ile agitasyon
- Blender, öğütücü, homojenizatör
- Sıvı ve katı ekstrüzyon (French Pres)
- Ultrasonikasyon

Mekanik olmayan/Kimyasal

- Alkali ile muamele
- Deterjanlar
- Dondurma-eritme
- Isı ile parçalama
- Litik enzimler

Ayrıştırma işleminin tamamlanmasıyla meydana gelen partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması gereklidir (Erarslan, 2000).

1.5.2. Tuzla Çöktürme

Saflaştırma işleminden sonra proteinlerin derişik hale getirilmesinde ya da proteinlerin izolasyonun da kullanılır. Çöktürme işleminde çözünürlüğün sağlanmasında boyut, yük, polarite ve yapı önemli faktörlerdir. İyonik şiddeti yükselterek çöktürme en çok tercih edilen yöntemdir (salting out). Amonyum sülfat çöktürmesi olarak adlandırılır. Tuzla çöktürme işlemi; yoğun derişimde tuz eklenerek çözünürlüğün azaltılması ilkesini temel alır (Akar, 2015).

1.5.3. Kromatografik Yöntemler

İşlem sonununda ortaya çıkan protein çözeltisinden, belirli proteine erişmek için farklı kromatografi çeşitleri tatbik edilmektedir. Kromatografik yöntemlerin temel prensibi durgun ve hareketli hallerde ayrıştırma işleminin yapılmasına dayanır. Örnek boyutlarına göre yapılan ayırma kromatografisinde moleküllerin ebatlarına göre hazırlanan deliklerin çapraz bağı polimerlerden moleküllerin geçiş hızları gereğince ayırma işleminin yapılmasıdır (Güngör, 2015).

1.5.3.1. Boyut Ayırma Kromatografisi

Büyükliklerine göre yapılan ayırma yönteminde proteinlerin ebatları temel alınarak yapılan ayrıştırma yöntemidir. Bu yöntemden, bir yahut birden çok bileşenin ayrıştırılmasında, bir bileşiğin molekül ağırlığının tespitinde, tuzla çöktürme yapıldıktan sonra numunenin tuzdan ayrıştırılmasında (desalting), protein içerisinde bulunmayan kontaminantlardan ve protein agregatlarından uzaklaştırmak amacıyla yararlanılır (Konak vd., 2014). Numune içerisinde; dekstran, poliakrilamid jel ya da agaroz gibi çözünmeyen hidrat polimerlerden meydana gelen, içerisinde dolgu maddesi bulunan gözenekli kolondan geçirilir (Berg, 2002).

Kolonun içeriği farklı doğal reçinelerden biçimlendirileceği gibi yapay maddelerden de biçimlendirilebilir. Boyut ayırma kromatografisinden tabi reçinelerin veya yapay sentetiğin jelleşmesi, içerikte bulunan maddelerin birlikte oluşturdukları çapraz bağlar ile meydana gelir (Güngör, 2015).

Yöntemin uygulanmasında Sephadex, Sepharoz ve Bio-Gel gibi hazır delikli 0.1 mm çapındaki kolonlar çoğunlukla tercih edilir. Bu yöntemin ilkesi ufak ebattaki proteinlerin bu gözeneklere girerken daha iri olanların gözeneklerden geçerek kısa sürede toplanmasına dayanır (Berg, 2002).

Ayırma işlemini etkileyen faktörler, numune hacmi, partikül boyutu, numune hacminin kolon hacmine oranı, numunenin ve tampon çözeltinin viskozitesi ile

numunenin akış hızıdır (Konak vd., 2014). Yöntemin prensibine göre ebatları büyük olan proteinler önce, arkasından daha küçük yapıya sahip proteinler ve en sonda en ufak yapılı proteinler toplanır (Berg, 2002).

1.5.3.2. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişimine göre yapılan bu ayırma yöntemi bir adsorbsiyon kromatografisidir. Ayırıştırılacak maddenin yükü ile karşıt yükte olan sabit faz arasında tersinir elektrostatik etkilere bağlıdır. Belirtilen etkileşimleri gerçekleştirmek için ilk olarak kolondaki dolgu maddesinin pH ve iyonik kuvvet yönünden dengelenmesini sağlamak için tampon çözelti kullanılarak birkaç kez yıkanmalıdır. Bu işlemlerden sonra numunler kolona uygulanır. Numuneler, çoğunlukla değişik proteinler içeren karışımlardır (Berg, 2002; Nelson ve Cox, 2005).

Tamponun iyonik şiddeti aşamalı şekilde yükseltilerek, farklı güçlerde tutunan proteinler sırası ile kolondan geçirilir. Bu şekilde proteinler birbirinden ayrılırlar. Kolondan düzenli şekilde yapılan toplama işlemi tamamlandıktan sonra toplanan farklı fraksiyonlardaki proteinlerin absorbans veya floresans değerleri tespit edilir. Bu işlem sonunda ilgili proteinin hangi eluatta bulunduğu anlaşılır (Nelson ve Cox, 2005; Konak vd., 2014).

Protein elue işlemi için iyonik şiddetin arttırılmasıyla protein toplanmasından farklı birkaç yöntem daha vardır. Bunlar tuz derişim oranı arttırılan ya da pH değeri değiştirilen tamponla elue işlemidir. Protein elue işlemlerinden daha iyi kontrol edildiği için iyonik şiddet tercih edilir. Yapılan işlemde iyonik kuvvetin 1.0 olması çoğunlukla birçok proteini elue etmeye yeterlidir (Nelson ve Cox, 2005; Güngör, 2015).

İyon değişim kromatografisi ile protein ayrılma işlemleri yük türüyle (katyonik veya anyonik) ve yük gücüyle ilişkilidir. Protein ve iyon değiştiricilerin birbirleri ile olan ilişkisini etkileyen faktörler; net yüke, iyonik güce ve proteinin yüzeyindeki yük dağılımına bağlıdır. Bu sebeple bu işlemlerde mobil fazların pH'nın kritik önemi vardır (Konak vd., 2014).

Tampon çözeltisinin pH'ı belirlenirken dikkat edilmesi gereken hususlar; iyon değiştiricinin etkinlik aralığı ve proteine olumsuz etkilemeyecek bir pH aralığının belirlenmesidir. Proteinin bağlanaması bilmesi amacıyla olması gereken pH değeri, proteinin izoelektrik noktasının yarı uzaklığında, daha uygun olanı ise bir birim uzağında olmasıdır. İsoelektrik noktasından (pI) daha yüksek ya da daha düşük değerdeki pH'lar lazım olandan daha güçlü bağlanmayı indüklediğinden sebeple

tutulma süresinin uzamasına ve bozunmaya yol açmaktadır (Dalkavriyan, 2011; Nelson ve Cox, 2005).

pH'ın yükselmesi anyon değişim kromatografisinde ayrılan bazik olan proteinlerin alıkonma kabiliyetini yükseltirken, katyon derişimine göre yapılan ayırma işleminde ayrılan asidik proteinin alıkonma kabiliyetini azaltmaktadır. Tablo 1'de gösterilenler iyon değişim kromatografisin de yararlanılan tamponlardır (Konak vd., 2014).

Tablo 1. İyon değıştirci kromatografide kullanılan bazı tamponlar (Güngör, 2015).

Tampon Tuzu	pH Aralığı	Tampon Tuzu	pH Aralığı
Amonyak	8.2–10.2	Sodyum asetat	4.2–5.4
Amonyum asetat	8.6–9.8	Sodyum borat	8.0–9.8
Amonyum fosfat	2.2–6.5	Sodyum dihidrojen fosfat	2.0–6.0/8.0–12
Sitrik asit	2.0–6.0	Sodyum format	3.0–4.4
Disodyum hidrojen sitrat	2.6–6.5	Sodyum perklorat	8.0–9.8
Potasyum dihidrojen fosfat	2.0–8.0/9.0–13	Sodyum nitrat	8.0–10.0
Potasyum hidrojen fitalat	2.2–6.5	Trietanolamin	6.7–8.7

Başlangıç tamponu proteinlerin bağlandığı pH'taki tampondur. Bu tamponun pH aralığı hem proteinlerin bağlanabileceği bir değer olmalı hemde proteinlerin ayrılmalarının gerçekleşmesi içinde yakın bir pH'a sahip olmalıdır. Böyle olmadığı takdirde proteinleri kolondan ayırmak zorlaşır ve ayırmak için ihtiyaç duyulan iyonik şiddet çok yüksek olur. Zayıf iyon değıştirciler, katyon değıştircilerde pH 9'un üzerinde yüklerini kaybederlerken, anyon değıştircilerde ise pH 6'nın altında yükleri azalmaya başlarlar. Kuvvetli iyon değıştirciler bir tek düşük iyonizasyonlu maddelerin ayırımını yapmak üzere uygulanır (Nelson ve Cox, 2005; Dalkavriyan, 2011).

İyon değıştirci kromatografide mobil safha çoğunlukla reçine, dekstran yahut selüloz benzeri polimerlerden meydana gelir. İyon değışim kromatografisinde mobil safhadaki örnek ve tampondaki yüklü moleküller durağan safhada kolon dolgu maddesi bulunan zıt yüklü moleküllerle etkileşim gösterirler ve bu safhada tutunurlar. İyon değışim kromatografisinde kullanılan matriksler; anyon değıştirciler ve katyon değıştirciler olarak iki şekilde gruplandırılır. Katyon değışim kromatografisinde kullanılan reçinelerde; negatif yüke sahip gruplar bulunduğundan dolayı pI değerinin altında bulunan pH'da proteinler pozitif yüklü olduğundan bu yöntem pozitif yüke sahip proteinleri bağlamak için kullanılır. Anyon değışim kromatografisinde reçinelerin üzerleri pozitif yüklü olduğundan dolayı pI değerinden fazla pH'da negatif yüklü

olduğundan anyon değişim kromatografisinde negatif yüke sahip proteinleri bağlamada yararlanılmaktadır (Nelson ve Cox, 2005; Konak vd., 2014).

Proteinlerde tepkimeye giren gruplar karboksil, amino yahut tersiyer amino gruplardır. Bundan dolayı anyon değiştiriciler proteinlerin protonlanmış amino gruplarını iterken protonsuz karboksil gruplarını tutarlar. Proteinler iki yöne iyonize olabilen amfoterik moleküllerdir. Bu yüzden hem anyon değiştiricilerine hem de katyon değiştiricilerine bağlanırlar. Genellikle ayrılması istenen proteinlerin izoelektrik noktası bilinmediğinden dolayı proteinlerin birbirlerinden ayrılmasında hangi tip iyon değiştirici kullanılacağıının tespiti ancak denemeler yapılarak bulunabilir (Nelson ve Cox, 2005; Konak vd., 2014).

İyon değiştirici kromatografide, yük esaslı saflaştırma yapıldığıdan iyon değiştirici kolonun içerisindeki dolgu maddesi yükü sabit olması gereklidir. Aksi durumda proteinlerin hepsi bir geleceğinden dolayı yük esaslı bir ayırma yapılamaz. Bağlanma gücü protein izoelektrik noktasına ve toplam yüke bağlıdır. Bu sebeple aynı izoelektrik noktası olan proteinler denge izoelektrik odaklama metodu ile ayrıştırılamazken iyon değişim kromatografisi yöntemi kullanılarak ayrıştırılabilir (Nelson ve Cox, 2005; Güngör, 2015).

1.5.4. Elektroforez

Elektroforez proteinlerin birbirinden ayrılması ve tanımlanması için önemli bir yöntemdir ama doğrudan bir saflaştırma basamağı değildir. İyon değiştirici kromatografide olduğı gibi elektroforezde de proteinlerin net yüklerinden yararlanarak ayrıştırma işlemi yapılır. Yöntemin ilkesi net yüklü proteinlerin çoğunlukla poliakrilamid jel üstünde elektrik akımı desteğıyle yürütülmesidir. Bu metod çok fazla miktardaki proteinler üzerinde kullanılmaz. Elektroforetik yöntemler proteinlerin yapı ve işlevlerine zıt yönde etki yapar (Nelson ve Cox, 2005).

Elektroforezin sağladığı yarar proteinlerin ayrıştırılmasını sağlarken görüntülenebilmesinde imkan vermesidir. Bu yöntemle numune içerisinde kaç farklı protein olduğı ayrı ayrı görülebilir ve özgün proteinin saflık derecesinde tahmin edilebilir. Elektroforezin çoğunlukla kullanım amacı proteinin saflık derecesinin ve molekül ağırlığının tespit edilmesi içindir (Nelson ve Cox, 2005). Elektroforez yöntemlerinden çoğunlukla tercih edileni SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) eklenerek yapılan elektroforezdir. Bu elektroforez yönteminde kullanılan SDS etkisi ile proteinin iç yükü muhafaza olur ve net negatif yük miktarı artar. Bu durum, her proteinin yük kütle oranının benzer olmasını sağlar. SDS kullanılarak yapılan elektroforez yöntemi ile

proteinler yalnız kütleleri esas alınarak ayrıştırılabilir. SDS proteinlerin alt birimine etki gösterir. Bu alt birimlerin elektroforezde gözlemi yapılabilir (Nelson ve Cox, 2005).

1.6. *Thymus nummularius*

Tüm dünyada ve ülkemizde birçok türü olan *Thymus nummularius* (Yayla Kekiği) bitkisinin yaygın bir kullanım alanı vardır. *T. nummularius* bitkisinin yapısında bulunan thymol ve karvakrol aktif maddelerden dolayı bitkinin tıbbi alanında önemli bir kullanım alanı vardır. Thymol ve karvakrol maddeleri antioksidan ve antimikrobiyal özelliktedir. *T. nummularius* bitkisinin yapısında bulunan ursolik ve rosmarinik asit gibi çok önemli maddelerden dolayı *T. nummularius* yağı antibiyotiğe dirençli hastane bakterilerine karşı etkili olduğu farklı çalışmalarda ortaya koyulmuştur. *Origanum onites* türü kekikten çıkarılan yağda bakteri yok edici özelliğe sahip %67 düzeyinde karvakrol %8.96 düzeyinde p-Cymene bulunduğu tespit edilmiştir (Avcı vd., 2006; Hashim ve Gamil, 1988; Mohsin vd., 1989; Monira vd., 2012).

2010 yılında 'International Journal of Phytotherapy'da çıkan çalışmada yer alan *T. nummularius*'deki karvakrol maddesinin metastaz uğramış meme kanseri hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü başlattığı tespit edilmiştir. Kekik üzerine sürdürülen pek çok araştırmada *T. nummularius*'den elde edilen yağların, kanserli hücrelerin yok edilmesinde etkili olduğu, dismenore ağrıları, mide krampları, şeker hastalığı, mide ağrısı, üst solunum yolu enfeksiyonları, bronşit, kolesterol düşürücü, baş ağrısı, boğaz ağrısı, larenjit, boğmaca gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanılabileceği görülmüştür (Avcı vd., 2006; Hashim ve Gamil, 1988; Mohsin vd., 1989; Monira vd., 2012).

1.7. Katalaz Enziminin Saflaştırıldığı Kaynaklara İlişkin Literatür Bilgisi

İspanak bitkisinden (*Spinacea oleracea*) yapılan katalaz enzimi saflaştırma işleminde elde edilen katalazın spektroskopik niteliklerine bakılmıştır. Araştırmalar sonunda enzimin spesifik aktivitesi yaklaşık 25,000 EU/mg protein olarak tespit edilmiştir (Hirasawa vd., 1987).

Nicotiano sylvestris'den (Tütün yaprağı) yapılan katalaz enzimi saflaştırmasında; Sephadex G-25 kolonu kullanılmıştır. Bu çalışmada K_m değerleri (düşük peroksidatik aktivitesi CAT-I) CAT-I 0.057 M ve (yüksek peroksidatik aktivitesi CAT-III) CAT-III 0.054 M olarak tespit edilmiştir (Havir ve Mchale, 1987).

Katalaz enziminin *Solanum tuberosum*'un (patates kökü) saflaştırılmasında; AcA-34 ultrajel kolonu kullanılmıştır. Yürütülen araştırmalar sonunda enzimin spesifik

aktivitesi yaklaşık 3000 U/mg protein olarak tespit edilmiştir. Enzimin molekül ağırlığı başka bir araştırmada 224 kDa olarak tespit edilmiştir. İlâveten bu çalışmada enzim inhibisyonu için azid ve siyanid inhibitörlerinden yararlanılmıştır (Beaumont vd., 1990).

Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden yapılan katalaz enzimini saflaştırmasında Q-sefaroze kolonu ve sephadex G-25 kolon kromatografisi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Uygulama sonunda katalazın enziminin spesifik aktivitesi 29.865 U/mg, optimum pH'nın 7.0-10.0 aralığında, ideal sıcaklığının 30 °C ve K_m değerinin 62.5 mM olduğu tespit edilmiştir (Dinçer, 2000).

Dikarboksimid fungusit olan iprodione'nin farklı derişimlerdeki çözeltilerini gökkuşığı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss*) tatbik ettiklerini, balık karaciğerinde iprodione'nin 0.3 ve 0.4 mM derişimlerinde MDA ürününün ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerinde bir artış olduğunu, GSH içeriğinin ve CAT enzimi aktivitesinin seviyelerinin düştüğünü bildirmişlerdir (Radice vd., 2001).

Tatlı su balıklarına *in vitro* şartlarda bir doz deltamethrin 0.75 mg/L ile muamele edilmiş 48 saat bekledikten sonra böbrek ve karaciğerlerinde biyokimyasal değişkenlerine bakılmıştır. Araştırmada görülmüştür ki böbrek ve karaciğerde bulunan katalaz enziminin aktivitesinde ciddi bir düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir (Sayeed vd., 2003).

Karalahana bitkisinden katalaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmış, ayrıca bazı pestisitler ile antibiyotiklerin katalaz enzime olan etkileri incelenmiştir. Karalahanadan yapılan kısmi saflaştırma işleminde katalazın ideal pH'ı 7.8 ve sıcaklığının ise 25 °C olduğu tespit edilmiştir. V_{max} ve K_m değerlerinin ise sırasıyla 588.2 EU/mL ve 0.0159 M olduğu belirlenmiştir (Köksal, 2003).

Dondurulmuş soya fasulyesinin filizlerinde antioksidan enzim aktiviteleri araştırılmıştır. 1 °C'ye soğutulan filizlerdeki SOD ve CAT enziminin etkinliğinin 25 °C derecedeki değerlerle mukayese edildiğinde; enzimlerin etkinliklerinin arttığını gözlemlemişlerdir (Malgorzata vd., 2005).

Tip 2 diabetik hastasından alınan numunelerde malondialdehit (MDA), glutatyon peroksidaz (GPx), likopen, serum açlık kan glukoz, antioksidan vitaminler (A, E ve C), trigliserit, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol seviyeleri, total kolesterol, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ile eritrositte HbA_{1c} etkiliklerine bakılmıştır. Yapılan tedavinin ardından kan glukoz seviyesinin azalmasıyla birlikte MDA, trigliserit ve HbA_{1c} seviyesinde kayda değer düşme olurken; SOD, CAT, vitamin E ve vitamin A seviyelerinde kayda değer bir yükseliş olduğu görülmüştür (Halifeoğlu vd., 2005).

Pırasa (*Allium porrum* L.) ve nane (*Menta spicata*) bitkilerinde yapılan katalazın kısmi saflaştırılma işleminde, karakterizasyonuna ve kinetik özelliklerine bakılmıştır. *Menta spicata* bitkisinde elde edilen katalazın optimum pH'ı 6.0; optimum sıcaklığı 40 °C, V_{max} değeri 108.69 EU/mL ve K_m değeri 1.175 mM olduğu tespit edilmiştir. *Allium porrum* L. bitkisinde ise optimum sıcaklık 30 °C, pH 7.5, K_m 1.172 mM ve V_{max} 50 EU/mL olduğu tespit edilmiştir (Sondaş, 2005).

Alpha cypermethrin'i dimetilsülfoksitte çözmüşler ve 1/10 LD50 (14.5 mg/kg) miktar 60 gün düzenli olarak farelere uygulanmıştır. Araştırma sonunda kontrol grubuyla kıyaslandığında karaciğer süperoksit dismutaz ve katalaz etkinliklerinde azalma olduğu belirlenmiştir (Manna vd., 2006).

Van elması (*Golden delicious*) kullanılarak yapılan katalaz saflaştırma işleminde bazı niteliklere bakılmıştır. Enzim spesifik aktivitesi 29.43 U/mg prot.; ideal sıcaklığı 50 °C ve ideal pH 5.0 olduğu tespit edilmiştir (Yörük vd., 2006).

Coriandrum sativum bitkisinin yapraklarından yapılan katalaz saflaştırma işleminde iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürme yöntemlerinden yararlanılmıştır. Spesifik aktivite değeri katalazın 89.68 EU/mg protein olduğu görülmüş, SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak enzimin molekül ağırlığının 60.95 kDa olduğu raporlanmıştır. Enziminin H_2O_2 için K_m değeri 7.87 mM, V_{max} değeri 42.19 EU/mL olduğu görülmüştür (Demir, 2006).

Keten tohumundan (*Linum usitatissimum*) hazırlanan özütte CAT ve SOD enzimlerinin etkinliğine bakılmış, katalazın spesifik aktivite değeri 15.94 U/mg ve (SOD) süperoksit dismutazın spesifik aktivite değerinin 2.05 U/mg olduğu tespit edilmiştir (Bozdemir, 2007).

Maydanoz (*Petroselinum hortense*) bitkisinden yapılan katalaz saflaştırma işleminde; DEAE-Sephadex A-50 jelinin kullanıldığı iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılmıştır. Enzim spesifik aktivite değeri 1126 EÜ/mg, optimum sıcaklık 35 °C ve pH 7.0 olarak bulunmuştur (Öztürk vd., 2007).

Sakarya'da yetiştirilen farklı türden iki kabak çekirdeği (*Cucurbita maxima* ve *Cucurbita moschata*) kullanılarak yapılan katalaz saflaştırılmasında enzimin kinetik özelliklerine bakılmıştır. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.8 ile 7.0 ve sıcaklığı 25 °C olduğu bildirilmiştir. *Cucurbita moschata* için V_{max} 58.139 EU/mL, K_m 20.029 mM ve *Cucurbita maxima* için V_{max} 81.300 EU/mL, K_m 17.68 mM olduğunu raporlamıştır (Kara, 2008).

Hıyardan (*Cucumis sativus*) yapılan katalaz enzimi saflaştırılmasında DEAE-selüloz kolon kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürme yöntemlerinden

yararlanılmıştır. Katalazın spesifik aktivite değeri 26 U/mg protein olduğu tespit edilmiştir. DEAE-selüloz kolon kromatografisi yönteminin bitme aşamasında spesifik aktivite 393 U/mg protein olarak bulmuştur (Seriner, 2010).

Fesleğen bitkisinin deltamethrine karşı yaptığı koruyucu etkiyi incelemek üzere bir grup memeli deltamethrine etkisine bırakıldıktan sonra böbrek dokularında oluşan histopatolojik farklılaşmalara bakılmıştır. Araştırma sonunda deltamethrine etkisinde bırakılan memeli canlıların böbrek dokusunda malondialdehit (MDA) derişiminde ciddi yükselme, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) etkinliğinde ise düşüş tespit edilmiştir (Sakr ve Al-Amoudi, 2012).

Karidesler üzerinde yapılan bir çalışmada; karidesler deltamethrine etkisinde bırakıldıktan sonra antioksidan enzim değışkenleri incelenmiştir. 39 ng/L kadar deltamethrine tabi tutulan karideslerin sindirim bezlerinde bulunan katalaz enziminin etkinliğinin düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Oliveira vd., 2012).

Kerevizden (*Apium graveolens*) yapılan katalaz saflaştırma ve karakterizasyonu işleminden sonra katalazın molekül ağırlığı 237 kDa olarak 58 kDa ağırlığında 4 eşit alt birimden meydana geldiği tespit edilmiştir. Kerevizden elde edilen katalazın optimum sıcaklığı 30 °C ve pH'ı 7.5 olarak belirlenmiştir. Katalazın depolama kararlılığı ölçmek üzere farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gliserol çözeltisinde enzim bekletilmiş en yüksek kararlılığı %20 gliserol çözeltisinde gösterdiği tespit edilmiştir. Termal kararlılığının 25 °C sıcaklıkta en aktif olduğu belirlenmiştir. V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 87 U/mg protein ve 27.5 mM olduğu tespit edilmiştir (Güngör, 2015).

Cevizden (*Juglans regia*) yapılan katalaz saflaştırma ve karakterizasyon işleminde; sıra ile homojenizasyon, ultrasantrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve PD-10 (Sephadex G-25M) kolon kromatografisi aşamaları kullanılmıştır. Saflaştırma sonunda elde edilen katalazın optimum sıcaklık değerinin 25 °C ve optimum pH değerinin 8.0 olduğu belirlenmiştir. Ceviz katalazının 25 °C'deki termal kararlılığının 40 °C'deki sıcaklığa kıyasla daha yüksek olduğu ve depolama kararlılığının da 4 °C'deki değerinin 25 °C'deki sıcaklığa kıyasla daha fazla olduğunu bildirmiştir. V_{max} ve K_m değerlerinin ise 159.4 U/mg protein ve 10.4 mM olduğu tespit edilmiştir. Katalaz enzimi 53 kDa'luk dört eşit ünitden oluştuğu ve molekül ağırlık değerinin 212 kDa olduğu tespit edilmiştir (Akar, 2015).

Bigin vd., tarafından yapılan çalışmada antioksidan enzim aktivitelerinin yaşa bağlı değışimini araştırmışlar ve yaşlanmada CAT-SOD aktiviteleri ile GSH-MDA düzeylerinin farklılık gösterdiğini, bu nedenle yaşlanmanın patofizyolojik

değişikliklerinde lipid peroksidasyonunun rol oynayabileceğini değerlendirmişlerdir (Bilgin vd., 2020).

Viral hepatit C'li hastalarda SOD, GPx ve CAT aktiviteleri araştırılmış ve yapılan araştırma sonucunda SOD enzimi aktivitesi seviyesinde azalma olduğu, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin seviyelerinde ise artış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca viral hepatitli karaciğer hasarının mekanizmasında, oksidatif stresin etkisinin olabileceğini değerlendirmişlerdir (Yalçın vd., 2020).

Nardan (*Punica granatum* L.) yapılan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi saflaştırılmasında DEAE-selüloz kolon kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleri kullanılmıştır. SOD enzimi 16.60 kat saflaştırılmış ve enzimin spesifik aktivitesini 166 U/mg olarak tespit etmişlerdir (Özdemir vd., 2021).



2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal ve Metot

Bu araştırmada kekik bitkisinin *Thymus nummularius* (Yaban kekiği) türü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (Germany), Tekkim ve İsolab firmalarından temin edilmiş olup analitik saflıktadır. Çalışma sürecinin tüm aşamalarında distile/deiyonize su kullanılmıştır.

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Bu araştırmada kullanılan kimyasallar ile deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar aşağıda verilmiştir.

- i. Dithiothreitol (DTT) ($C_4H_{10}O_2S_2$) (Sigma- aldrich)
- ii. Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) (Tekkim)
- iii. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Tekkim)
- iv. D-(+) Glukoz monohidrat ($C_6H_{12}O_6$) (İsolab)
- v. Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- vi. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (Merck)
- vii. Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck)
- viii. Sığır serum albumini (BSA)
- ix. Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- x. Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma- aldrich)
- xi. Folin-ciocalteu reaktifi (Merck)
- xii. PEG-4000 (polietilen glicol-4000) (Merck)
- xiii. EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) (Sigma- aldrich)
- xiv. Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- xv. PVP (çözünebilir polivinilpirolidon) (Sigma- aldrich)
- xvi. Sephadex G-25M (Sigma- aldrich)
- xvii. Bakır (II) sülfat pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) (Sigma- aldrich)
- xviii. Sodyum Potasyum Tartarat ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (Sigma- aldrich)
- xix. Trizma hidroklorit (Tris HCl, Tris hydrochloride) ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) (Sigma- aldrich)
- xx. Trizma base (Tris (Hidroksimetil) Aminometan) ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma- aldrich)

- xxi. Asetik asit (CH_3COOH) (Sigma- aldrich)
- xxii. Sodyum asetat (CH_3COONa) (Sigma- aldrich)
- xxiii. Borik asit (H_3BO_3) (Sigma- aldrich)
- xxiv. Kromotografi Kolonu, Filitreli (200 mm-Çap.10 mm) (İsolab)
- xxv. Dializ kesesi (Sigma- aldrich)
- xxvi. Soğutmalı santrifüj cihazı (Awel MF 48-R)
- xxvii. pH metre (Hanna pH-2221)
- xxviii. UV-Vis spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 25)
- xxix. Hassas Terazı (Ohaus)

2.1.2. Örneklerin Homojenizasyonu

T. nummularius'den homojenat hazırlamak için Malgorzata vd., (2005) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 10 g *T. nummularius*, 0.1 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, 1.25 mM PEG-4000 ve 0.25 g seyreltilmiş PVP eklenerek, 25 mL, pH'ı 7.0 olan 50 mM fosfat tamponun da karıştırılmıştır. Ardından santrifüj tüpleri içerisine koyularak 12,000 rpm'de 0 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve meydana gelen süpernatant filtre kağıdan süzülerek ham homojenat elde edilmiştir.

2.1.3. Molar Ekstinksiyon Katsayısı Tayini

Katalaz enziminin aktivitesini belirlemek için H_2O_2 'nin molar ekstinksiyon katsayısı kullanılmıştır. Bunun için H_2O_2 'nin belirli konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 240 nm'deki absorbans değerleri okunmuş ve belirlenen değerlerin grafik eğiminden molar ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır (Seriner, 2010).

2.1.4. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini

Katalaz etkinliği Aebi vd., (1974) tarafından önerilen, Lartillot vd., (1988) tarafından geliştirilen metota göre uygulanmıştır. Molar ekstinksiyon katsayısı H_2O_2 için $0.0382 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ bulunmuştur. Substrat olarak pH 7.0 olan 50 mM fosfat tamponu içinde 10 mM H_2O_2 çözeltisinden ve katalaz enzimi ihtiva eden özütler kullanılmıştır.

Kör için 2.5 mL tampon ile 0.5 mL 1 M HCl ihtiva eden çözelti kullanılmıştır. (Seriner, 2010). 20 μL çalışılacak enzim çözeltisi içerisine 2.5 mL substrat çözeltisi ilave edilmiş ve 2 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 0.5 mL 1 M HCl çözeltisi eklenmiş ve 240 nm'de absorbansı (Ar) ölçülmüştür.

H₂O₂'nin başlangıç absorbansını (A_s) tespit etmek üzere; 2.5 mL substrat, 0.5 mL 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Proteinin yol açacağı absorbansı (A_t) tespit etmek için; 2.5 mL tampon, 20 µL enzim çözeltisi ve 0.5 mL 1 M HCl'den oluşan çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Enzimatik etkinin sebep olduğu absorbans farklılaşması (A), aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$A = (A_s + A_t) - A_r$$

Enzim aktivitesinin IU mL⁻¹ cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite} = \frac{A \cdot V_t}{\epsilon \cdot t \cdot V_e}$$

V_t = Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_e = Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

ε = H₂O₂'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0.0382 cm² µmol⁻¹)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

Bu çalışmada her bir örnekteki protein miktarı belirlenerek aktivite µmol H₂O₂ mg prot.⁻¹ dk⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Enzimin aktivitesi spektrofotometrik yöntemi kullanılarak 240 nm absorbansda ölçülmüştür. (Havir ve Mchale, 1987).

2.1.5. Protein Tayini

Protein tespiti için Lowry vd., (1951) önerdiği metot kullanılmıştır. İçerikleri aşağıda açıklanan A, B ve C olmak üzere üç çözelti hazırlanmıştır.

1) Çözelti A: 4 g NaOH, 20 g Na₂CO₃ saf suda çözülerek hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

2) Çözelti B: %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde 0.5 g CuSO₄.5H₂O çözülerek hacmi aynı çözelti kullanılarak 100 mL'ye tamamlanmıştır.

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

4) Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu'nun hazır stok çözeltisi ve distile su kullanılarak 1/2 oranında sulandırılarak hazırlanmıştır.

5) Standart protein çözeltisi: 1 mg sığır albümini, 1 mL çözeltide hazırlanmıştır.

6) Standart protein eğrisinin çizimi: Sekiz adet cam tüp alınarak sıra ile 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 µL standart sığır albümin çözeltisi koyulmuştur. Daha sonra

her tüpün hacmi 1 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanış ve üzerine 5 mL C çözeltisi eklenmiştir. 10 dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş ve tüplere 0.5 mL, 1/1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra 30 dakika oda ısısında bekletilmiş ve tüplerdeki çözelti köre karşı 750 nm absorbandsda ölçülmüştür. Belirlenen değerlerin konstrasyona karşı grafiği çizilmiştir. Numunelerin protein muhtevaları standart protein eğrisine göre analiz edilmiştir.

2.1.6. Katalaz Enzimi İçin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürmesi

T. nummularius'den elde edilen süpernatantlara sıra ile %10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 aralıklarında amonyum sülfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ çöktürmesi yapılmıştır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi esnasında süpernatanta, katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ağır ağır eklenmiştir. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ün çözelti içerisinde çözünmesinin ardından 1 saat boyunca bekletildi ve 12,000 rpm'de 0 °C'de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Tüm aşamalarda çökelek ve süpernatantların aktivitelerine bakılmıştır. Katalaz enziminin etkin çalıştığı aralıklar belirlenmiştir.

2.1.7. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürmesi Sonrası Dializ Uygulaması

Elde edilen homojenatlardan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ı ayırmak için dializ kesesine (Sigma D-9527) {genişliği 43 mm (1.71), çapı 27 mm (1.11)} homojenatlar konulmuştur. Soğuk ortamda, 0.01 M pH 7.0 sodyum fosfat tamponu ve çözelti kısa aralıklarla karıştırılarak değiştirilmek suretiyle, çözelti içerisindeki sülfat iyonu bitinceye kadar dializ işlemi uygulanmıştır. Dializ aşamasından sonra çözeltide, dializ kesesi işleminde oluşan çökeleği ayırmak için, 0 °C sıcaklıkta 12,000 rpm'de, 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Üst kısımda oluşan berrak çözelti alınarak %70'lik amonyum sülfat kesiti olarak adlandırılmıştır.

2.1.8. Proteinlerin PD-10 Kolonuna (Sephadex G-25M İçeren) Uygulanması

İçerisinde CAT enzimi bulunan 1.5 mL ekstrakt Sephadex G-25M jeli içeren kolondan geçirilmiştir. Numunelerin kolon içerisinden geçirilmesi pH'ı 8.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak yapılmıştır. Örnek protein 1.5 mL boyutlu tüplere alınmış ve protein miktarı ile enzim aktiviteleri tespit edilmiştir.

2.1.9. pH'ın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi

CAT enziminin optimum pH'nın belirlenmesinde pH 5.0 ile pH 9.5 aralığında hazırlanan tampon çözeltiler kullanılmıştır.

pH 5.5 değerinde kullanılmak üzere asetat tamponu, pH 6.0 değerinde kullanılmak üzere sitrat tamponu, pH 6.5 ile pH 8.5 aralığındaki değerlerde kullanılmak üzere fosfat tamponu, pH 9.5’de kullanılmak üzere borat tamponundan yararlanılmıştır. Hazırlanan pH’lardaki tampon çözeltiler için enzimin etkinliği spektrofotometrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir.

2.1.10. Sıcaklığın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi

CAT enzimi üzerinde sıcaklığın etkisi araştırılırken H₂O₂ substrat olarak kullanılmıştır. Enziminin yüksek etkinlik gösterdiği pH’da ve 20 ile 60 °C sıcaklık aralığında araştırma yapılmıştır. Aktivite ölçümü Aebi vd., (1974) tarafından ortaya koyulan, Lartillot vd., (1988) tarafından ilerletilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. H₂O₂ için hesaplanan molar ekstinksiyon katsayısı değeri 0.0382 cm² µmol⁻¹ dir. pH’ı 8.0 olan, 50 mM fosfat tamponu kullanılmıştır.

Ölçümlerde kör yerine 2.5 mL tamponla birlikte 0.5 mL, 1 M HCl’den oluşan çözelti kullanılmıştır. H₂O₂’nin ilk baştaki absorbansını (A_s) tespit etmek üzere; 0,5 mL, 1 M HCl ve 2.5 mL substrat ihtiva eden çözeltinin 240 nm’deki absorbansı tespit edilmiştir. Proteinden kaynaklanan absorbansı (A_t) tespit etmek için; 20 µL enzim çözeltisi, 2.5 mL tampon ve 0.5 mL 1 M HCl’den oluşan çözeltinin absorbansı ölçölmüştür. 20 µL çalışma için kullanılacak enzim çözeltisi (A_r) içerisine 2.5 mL substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra 25 °C sıcaklıkta 2 dakika bekletilmiştir. Tepkimeyi durdurmak üzere çözeltinin içerisine 0.5 mL, 1 M HCl çözeltisi eklenmiştir.

Çalışmada tüm örnekler için protein miktarı tespit edilerek aktivite µmol H₂O₂ mg dk⁻¹ prot.⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Katalaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik yöntem kullanılarak 240 nm absorbansda ölçölmüştür.

2.1.11. Katalaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

CAT enzimi içeren numunelerinin etkinliğinin en yüksek olduğu sıcaklıkta, 25 ve 40 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve sonra düzenli şekilde (başlama, 1, 3, 5, 12 ve 24 saat) etkinlikleri tespit edilmiştir.

2.1.12. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

CAT enzimi içeren numunelerinin ilk aktiviteleri tespit edilmiş ve sonra 4 °C’de ve oda ısısında kapalı tüplerde bekletilip düzenli aralıklarla aktivitelerine bakılmıştır.

2.1.13. Katalaz Enzimin $V_{\max}$ ve K_m Değerlerinin Bulunması

CAT enzimi içeren numunelerin tespit edilen optimum şartlarda ve değişik H_2O_2 derişimlerindeki (5-10-15-20-25-30-35-40 mM) aktiviteleri belirlenmiştir. Sonrasında $1/V$ ile $1/[S]$ değerleri de belirlenerek H_2O_2 substratı için Lineweaver–Burk grafiğı çizilmiş ve çizilen grafik sonucunda oluşan denklemden faydalanarak $V_{\max}$ ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

2.1.14. Katalaz Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Hizmet alımı yöntemiyle ODTÜ, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-GE merkezinde saflaştırılan CAT enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE elektroforezi yöntemiyle belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Enzim Homojenizasyonundan Elde Edilen Bulgular

10 g *T. nummularius*, 0.25 g seyreltilmiş PVP, 2 mM Dithiothreitol, 0.1 mM EDTA ve 1.25 mM PEG-4000 eklenerek, pH 7.0 25 mL 50 mM fosfat tamponu homojen şekilde karıştırılmıştır. Ardından tüplere koyularak 0 °C’de 12,000 rpm’de 20 dakika boyunca santrifüj yapılmış ve meydana gelen süpernatant filtre kağıdı yardımıyla süzülerek ham homojenat elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantın aktivitesine bakılmış ve süpernatantta toplam protein miktarı 6.150 mg/mL ve toplam spesifik aktivite 161.50 U/mg prot. olarak tespit edilmiştir.

3.2. (NH₄)₂SO₄ Çöktürmesi Sonunda Elde Edilen Bulgular

T. nummularius’den oluşturulan katalaz enzim homojenatlarında %10-90’lık (NH₄)₂SO₄ kullanılarak çöktürme işlemi yapılır. Her seferinde (NH₄)₂SO₄ ağır ağır ilave edilerek tümü çözündürülmüştür. Bir müddet kararlığa erişmesi için soğuk ortamda bekletilmiştir.

Numuneler 12,000 rpm’de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Meydana gelen tüm süpernatantların aktivitelerine bakılmış ve protein tayinleride yapılmıştır. Tuzla çöktürme işlemi yapıldıktan sonra en yüksek enzim aktivitesi %70’lik (NH₄)₂SO₄’de görülmüştür. Protein tayini sonucunda; toplam proteinin 2.350 mg/mL bulunmuştur. Toplam spesifik aktivitenin 236.73 U/mg prot. olduğu tespit edilmiştir.

3.3. Dializ Kesesi Uygulaması Sonucu Elde Edilen Bulgular

Elde edilen %70’lik (NH₄)₂SO₄’lu örneklerden (NH₄)₂SO₄’ü arındırmak için dializ kesesi içerisine (Sigma D-9527 {genişliği 43 mm (1,711), çapı 27 mm (1,111)}) konulmuştur. Soğutucuda pH 7.0, 0.01 M sodyum fosfat tamponu kullanılan çözelti kısa aralıklar ile değiştirilmiş ve karıştırılmak suretiyle, çözeltideki sülfat iyonu bitine dek dializ işlemi sürdürülmüştür. Dializ işlemi bitiminde çözelti içerisinden, oluşan çökeleği uzaklaştırmak için 0 °C sıcaklıkta 12,000 rpm’de, 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Üst yüzeydeki saydam çözelti alınmış ve %70’lik amonyum sülfat kesiti şeklinde adlandırılmıştır.

3.4. Kolon Uygulaması Sonunda Elde Edilen Bulgular

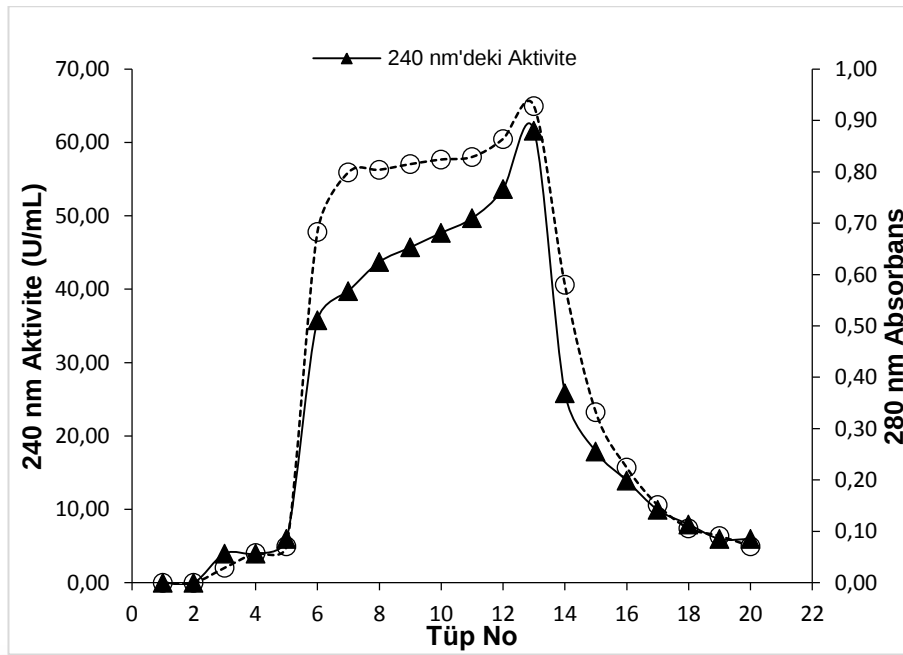
Sephadex G-25M içeren PD-10 kolonundan amonyum sülfat çöktürmesini bitiminde, 1mL çözelti geçirilmiştir. Numunenin kolon çıkışı toplanmasında pH 8.0, 50 mM Tris-HCl tamponundan yararlanılmıştır. PD-10 kolonundan geçirilerek tuzunu ayırtırdığımız eluatları 1.5'er mL hacimler halinde toplayarak enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Uygulama sonrasında toplanan veriler Tablo 2'de gösterilmiştir. Aktivitesi en yüksek olan 8 adet tüpteki (6-7-8-9-10-11-12-13) eluatlar birleştirilerek diğer aşamalarda kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

Tablo 2. Kolon sonrası numunelerin 280 nm'deki absorbans ve aktivite değerleri.

Tüp No	280 nm'deki Absorbans Değerleri	240 nm'deki Aktivite (U/mL)
1	0.000	0.000
2	0.000	0.000
3	0.029	3.974
4	0.058	3.974
5	0.071	5.961
6	0.683	35.763
7	0.799	39.737
8	0.804	43.710
9	0.815	45.697
10	0.824	47.684
11	0.829	49.671
12	0.864	53.645
13	0.928	61.592
14	0.580	25.829
15	0.332	17.882
16	0.224	13.908
17	0.151	9.934
18	0.106	7.947
19	0.091	5.961
20	0.071	5.961

Tablo 3. *T.nummularius* katalazı için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamağı	V _T	C _{protein} (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham katalaz ekstratı	25	0.246	6.150	39.73	993.25	161.50	100	1
%70 Amonyum sülfat çöktürmesi	10	0.235	2.350	55.63	556.32	236.73	56.01	1.47
PD-10 Kolonu sonrası	3	0.052	0.156	65.57	196.71	1260.96	19.80	7.81



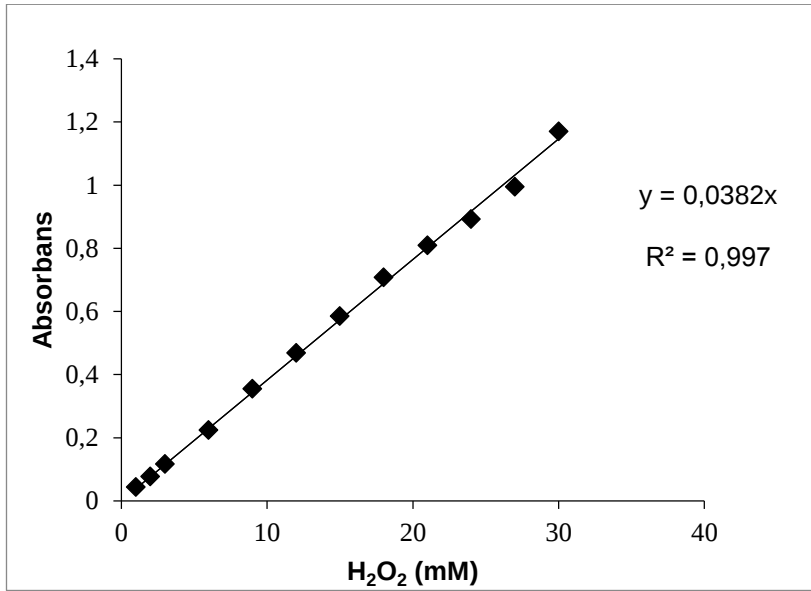
Şekil 9. Sephadex G 25M içeren kolondan alınan numunelerin 280 nm'deki absorbans ve aktivite değerleri.

3.5. Molar Ekstinksiyon Katsayısı Tayini Sonunda Elde Edilen Bulgular

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde H_2O_2 'nin molar ekstinksiyon katsayısı kullanılmıştır. Bunun için H_2O_2 kullanılarak farklı derişimlerde çözeltiler oluşturularak 240 nm'de absorbansları belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiş ve şematik olarak Şekil 10'da belirtilmiştir. Dolayısıyla 240 nm'de H_2O_2 için molar ekstinksiyon katsayısının değeri $0.0382 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. H_2O_2 'in farklı derişimlerde ve 240 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

H_2O_2 (mM)	Absorbans
1	0.044
2	0.078
3	0.117
6	0.225
9	0.355
12	0.469
15	0.585
18	0.708
21	0.81
24	0.893
27	0.995
30	1.17

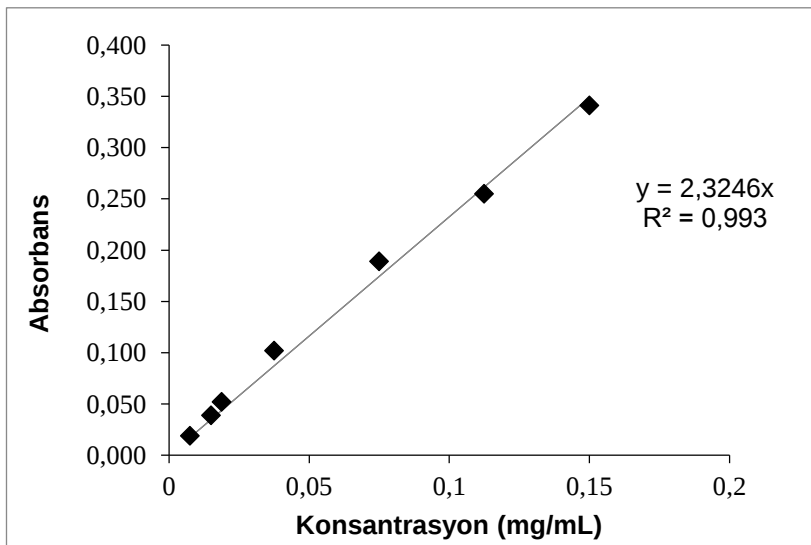


Şekil 10. H₂O₂'nin 240 nm'deki standart grafiği.

Enzimin aktivitesini hesaplamak için; CAT enziminin miktarını belirlemede protein tayini kullanılmıştır. Elde edilen verilerin yorumlanabilmesi için standart olarak sığır serum albumininden yararlanılarak standart protein eğrisi oluşturulmuştur. Bulunan veriler Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Standart protein grafiği için elde edilen bulgular.

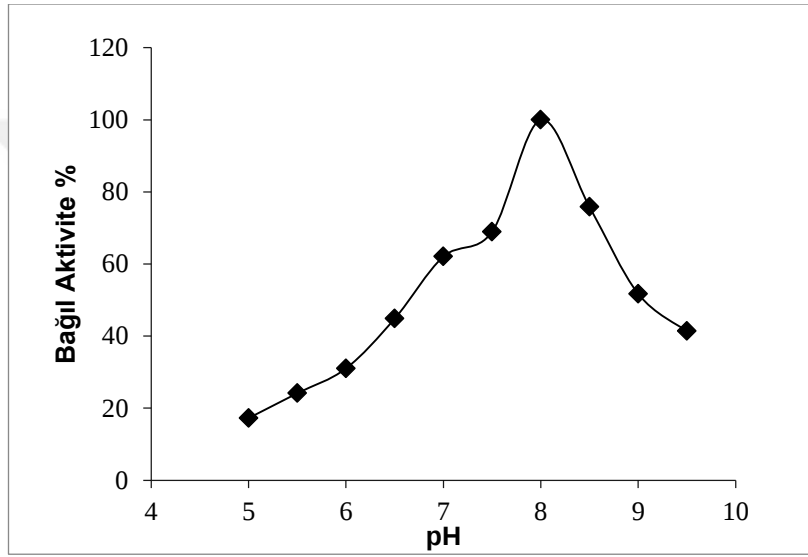
Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans
0.0075	0.019
0.015	0.039
0.01875	0.052
0.0375	0.102
0.075	0.189
0.1125	0.255
0.15	0.341



Şekil 11. Standart protein eğrisi grafiği.

3.6. pH'ın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi İle İlgili Bulgular

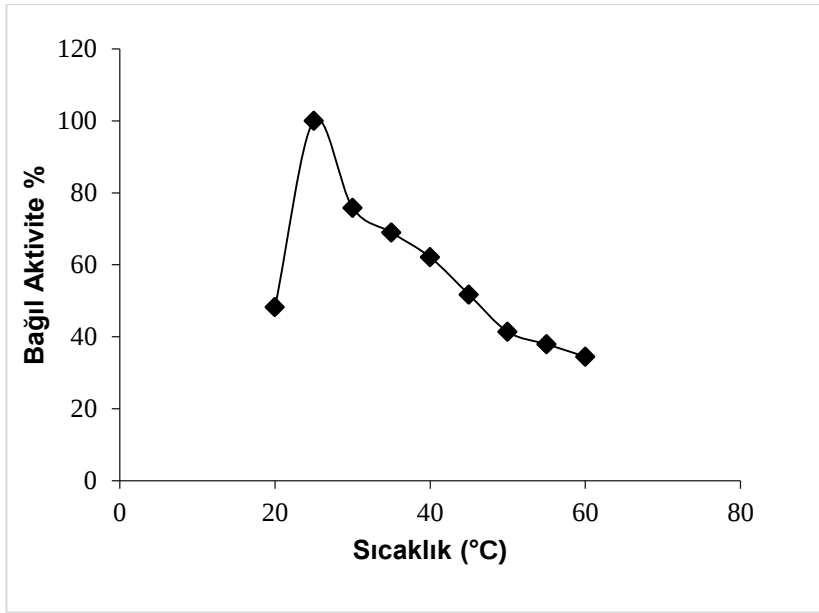
Kolon işleminden sonra elde edilen numunelerde maksimum aktiviteye sahip eluatlardan yararlanılarak yapılan denemede katalaz enziminin etkinliğinin maksimum olduğu pH'ı tespit etmek üzere; pH 5.0 ile 9.5 aralıklarında değişen tampon çözeltiler ile denemeler yapılmıştır. pH 5.5 kullanılması amacıyla asetat tamponundan, pH 6.0 kullanılması amacıyla sitrat tamponundan, pH 6.5'ten 8.5'e olan aralıkta kullanılması amacıyla fosfat tamponundan, pH 9.5 kullanılması amacıyla borat tamponundan yararlanılarak 25 °C sıcaklığında gerçekleştirilen pH belirleme çalışması sonunda en ideal pH 8.0 olduğu tespit edilmiştir. Bulunan veriler Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Farklı pH'larda ölçülen bağıl aktivite değerleri.

3.7. Sıcaklığın Katalaz Enzimi Üzerine Etkisi İle İlgili Bulgular

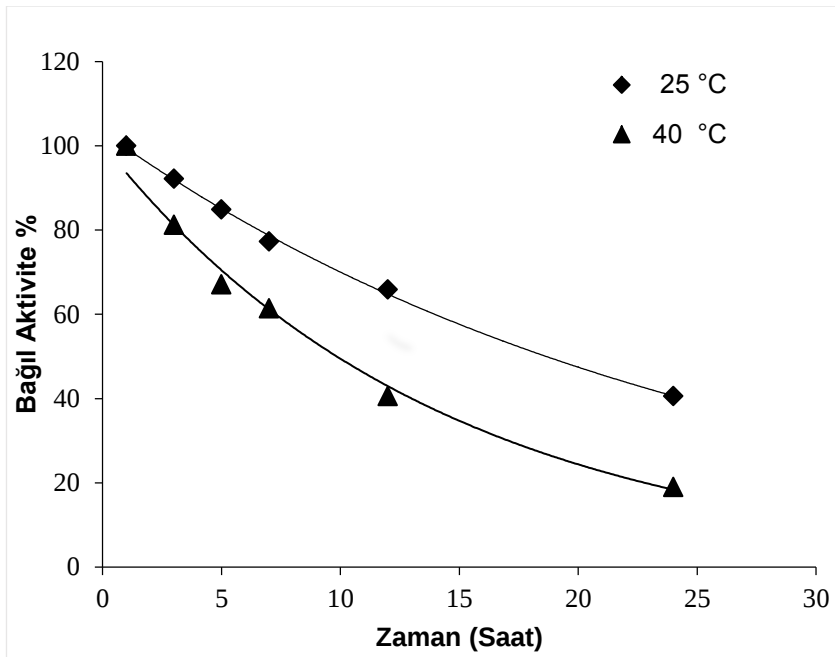
Sıcaklığın *T. nummularius* katalazı üzerine olan etkisini gözlemlemek için 20 ile 60 °C aralığındaki en uygun şartlarda sıcaklıkla ilgili denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalar üzerine *T. nummularius* katalazı için tespit edilen ideal sıcaklık değeri 25 °C'dır. Farklı aralıklarda yapılan çalışmalarda 20 °C sıcaklıkta enzim %48 etkinlik göstermişken 60 °C sıcaklıkta enzim yalnızca %34 etkinlik göstermiştir. Çalışmalar sonucunda toplanan veriler Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. Farklı sıcaklıklarda ölçülen bağıl aktivite değerleri.

3.8. Termal Kararlılık İle İlgili Bulgular

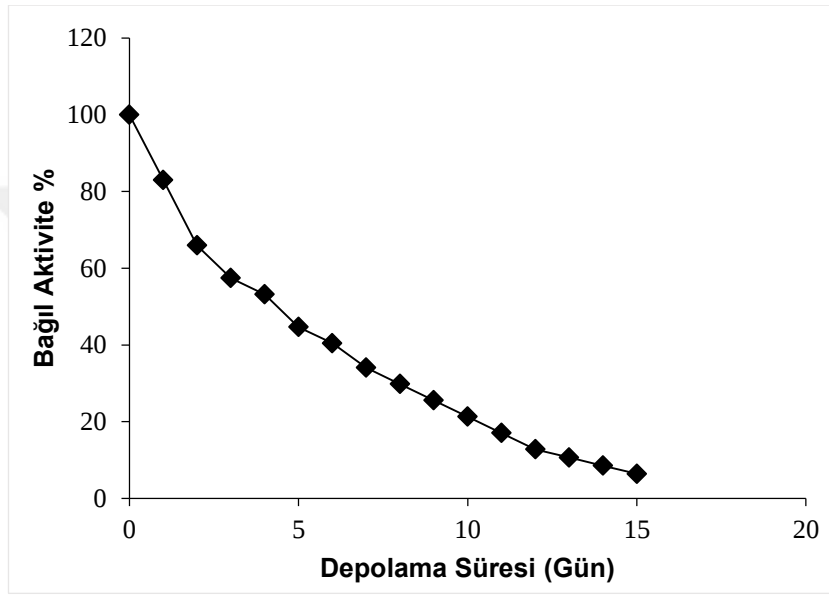
T. nummularius'den elde edilen katalaz enzimi 25 ve 40 °C sıcaklıklarında, 1, 2, 5, 12 ve 24 saat bekletilip enzimin aktivitelere bakılmış % bağıl aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimin aktivitesi 24 saatin sonunda 40 °C sıcaklıkta aktivitesinin %19'nu korurken 25 °C sıcaklıkta aktivitesinin %40'ını koruduğu görülmüştür. Bulunan veriler Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. Bağıl aktivitenin süre ile değişimi.

3.9. Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular

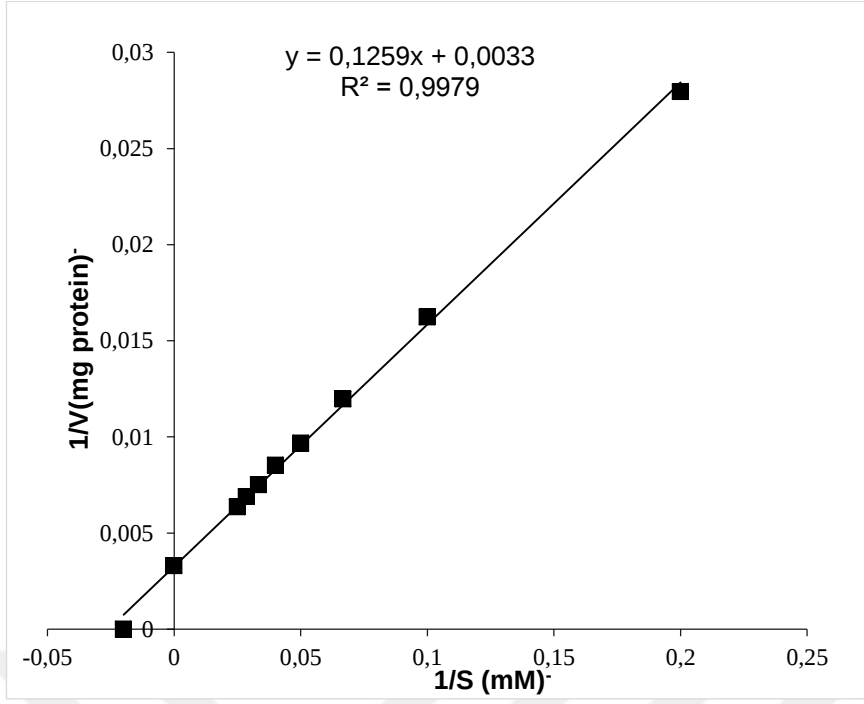
T. nummularius'den elde edilen katalaz enzimlerinin aktivite tayininde enzimlerin kararlılığını tespit edebilmek için PD-10 kolonu uygulaması ardından yapılan işlemler için maksimum aktiviteye sahip örnekler kullanılmıştır. 15. günün sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin %6'sını koruduğu belirlenmiştir. 4 °C sıcaklıkta yapılan çalışmalar sonrasında bulunan sonuçlar Şekil 15'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 15. DEAE-selüloz kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı zamanlarda ölçülen spesifik aktivite değerleri.

3.10. Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Enzimin çalışması için en iyi pH ve en iyi sıcaklık kullanılarak (8.0 ve 25 °C) değişik H_2O_2 derişimlerinde (5-10-15-20-30-35-40 mM) belirlenen aktiviteler için Lineweaver-Burk grafiğı çizilmiş (Şekil 16) ve kinetik değişkenleri saptanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri 38.151 mM ve 303.03 U/mg prot. olarak tespit edilmiştir.



Şekil 16. Lineweaver-Burk grafiği.

3.11. Katalaz Enziminin Molekül Ağırlığı İle İlgili Bulgular

T. nummularius'den elde edilen katalaz enziminin SDS-PAGE işlemi sonucunda yaklaşık değerinin 42 ile 52 kDa arasında olduğu görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. SDS-PAGE görüntüsü.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan enzim saflaştırmak için, farklı metotlar kullanılmaktadır. Kullanılan metotlara göre de saflaştırma oranları da farklılık göstermektedir. Çalışmamız kapsamında *Thymus nummularius*'den (Yayla Kekiği) elde edilen katalaz enzimi 7.81 kat saflaştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda ise, maydanozdan (*Petroselinum hortense*) saflaştırılan katalaz enzimi 5.83 kat (Öztürk vd., 2007); hıyardan (*Cucumis sativus*) 14.72 kat (Seriner, 2010); aşotu bitkisinin yapraklarından (*Coriandrum sativum*) 64.06 kat (Demir, 2006); fındık mantarından (*Lactarius pyragalus*) 29.44 kat olarak katalaz enziminin saflaştırıldığı bildirilmiştir (Ahıskalı, 2017).

Çalışmamızda *Thymus nummularius*'den saflaştırılan CAT enziminin toplam spesifik aktivitesi 1260.96 U/mg prot. olarak tespit edilmiştir. Literatürlerde spesifik aktivite değerleri için yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; çeşitli aktivite değerleri bulunmuştur. Keten tohumundan (*Linum usitatissimum*) saflaştırılarak elde edilen katalaz enzimi için spesifik aktivite değerinin 15.94 U/mg olarak rapor etmiştir (Bozdemir, 2007). Aşotu (*Coriandrum sativum*) bitkisinin yapraklarından yapılan saflaştırma işlemi sonunda elde edilen katalazın, spesifik aktivite değerinin 89.68 EU/mg protein olduğu tespit edilmiştir (Demir, 2006). Fındık mantarından (*Lactarius pyragalus*) yapılan saflaştırmada katalazın spesifik aktivite değerinin 1696 U/mg protein olduğu tespit edilmiştir (Ahıskalı, 2017).

Çalışmamızda *Thymus nummularius*'den saflaştırılarak elde edilen CAT enziminin optimum pH'ının 8.0 olduğu tespit edilmiştir. Literatürlerde optimum pH için yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden yapılan saflaştırma işleminde katalazın optimum pH'ı 7.0-10.0 aralığında (Dinçer, 2000); Karalahanadan (*Brassica oleracea L. var. Acephala*) yapılan saflaştırma işleminde ise katalazın pH'ı 7.8 (Köksal, 2003); Maydanoz (*Petroselinum hortense*) bitkisi kullanılarak yapılan saflaştırmada katalazın pH'ı 7.0 (Öztürk vd., 2007); Pırasa (*Allium porrum* L.) ve Nane (*Menta spicata*) bitkileri kullanılarak yapılan saflaştırmalarda ise katalazın pH değeri sırasıyla 7.5 ve 6.0 (Sondaş, 2005); Van elmasından (*Golden delicious*) yapılan saflaştırmada katalazın pH 5.0 (Yörük vd., 2006); Kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) yapılan saflaştırmada katalazın pH 7.0 (Kara, 2008); Fındık mantarından (*Lactarius pyragalus*) yapılan saflaştırmada katalaz enziminin etkinliğinin pH 8.0 olduğu tespit edilmiştir (Ahıskalı, 2017).

Çalışmamızda *Thymus nummularius*'den saflaştırılan CAT enziminin optimum sıcaklığının 25 °C olduğu belirlenmiştir. Literatürlerde optimum sıcaklık için yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; Cevizden (*Juglans regia*) saflaştırılan katalaz enziminin optimum sıcaklığının 25 °C (Akar, 2015); rokadan (*Eruca sativa*) yapılan kısmi saflaştırmadan elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığının 30 °C (Dinçer, 2000); karalahanadan (*Brassica oleracea L. var. acephala*) yapılan saflaştırmadan elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığı 25 °C (Köksal, 2003); Van elmasından (*Golden delicious*) yapılan saflaştırmada elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığı 50 °C (Yörük vd., 2006); maydanozdan (*Petroselinum hortense*) yapılan saflaştırmada elde edilen katalaz enziminin sıcaklığının ise 35 °C olduğu tespit edilmiştir (Öztürk vd., 2007).

CAT enzimi için tespit edilen en uygun pH ve en uygun sıcaklık için Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik değişkenler belirlenmiştir. *Thymus nummularius*'den yapılan saflaştırma işlemi ile sonucunda erişilen CAT enzimi için K_m değerinin 38.151 mM ve V_{max} değerinin ise 303.03 U/mg prot. olduğu belirlenmiştir. Literatürlerde kinetik parametreler için yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; Fındık mantarından (*Lactarius pyragalus*) yapılan saflaştırmada katalaz enzimi için K_m değeri 0.310 mM; V_{max} değeri ise 62.112 U/mg olduğu görülmüştür (Ahıskalı, 2017). Pırasa (*Allium porrum L.*) ve Nane (*Menta spicata*) bitkileri kullanılarak yapılan saflaştırmada nane bulunan katalaz için, V_{max} değeri olarak 108.69 EU/mL ve K_m değeri olarak 1.175 Mm tespit edilmiştir. Pırasa'da bulunan katalaz için V_{max} değeri 50 EU/mL ve K_m değeri 1.172 olduğu tespit edilmiştir (Sondaş, 2005). Kabak çekirdeği (*Cucurbita moschata*) kullanılarak yapılan saflaştırmada elde edilen katalazın K_m değeri 0.00209 M, V_{max} değeri ise 58.139 EU/mL şeklinde raporlanmıştır (Kara, 2008).

Çalışmamızda *Thymus nummularius*'den CAT enzimi ilk defa saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri araştırılmıştır. Elde etmiş olduğumuz sonuçları özetlersek;

Ham CAT ekstraktından santrifüj sonucu elde edilen süpernatant üzerinde yapılan protein tayininde toplam protein miktarı 6.150 mg/mL, toplam spesifik aktivite değeri 161.50 U/mg prot. olduğu tespit edilmiştir. $(NH_4)_2SO_4$ kullanılarak yapılan çöktürme işlemlerinde en yüksek aktiviteye %70'lik tuz derişiminde sağladığı görülmüştür. Yapılan protein tayinin sonunda toplam protein miktarı 2.350 mg/mL, toplam spesifik aktivite değeri 236.73 U/mg prot. olduğu tespit edilmiştir.

PD-10 kolon kromatografisi (Sephadex G-25M içeren) yöntemi kullanılarak yapılan saflaştırmada toplanan örnekler birleştirilmiş ve protein tayini yapılarak toplam protein miktarı 0.156 mg/mL, toplam spesifik aktivite değeri 1260.96 U/mg prot.

olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde CAT enzimi 7.81 kat saflaştırılmıştır. Çalışmada optimum sıcaklık ve pH belirlemesi sonucunda enzimin optimum pH değerinin 8.0; optimum sıcaklık değerinin 25 °C olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırma sonrası katalaz enziminin termal kararlılıkları mukayese edildiğinde; 40 °C sıcaklıkta 24 saat bitiminde katalaz aktivitesinin %18.99'unu muhafaza ettiği belirlenirken, 25 °C'de ise enzim aktivitesinin %40.51'ini muhafaza ettiği tespit edilmiştir. Saflaştırılan katalaz enziminin depolama kararlılığına 4 °C'de bakılmış ve 15 gün sonunda enzimin aktivitesini %5.96'sını muhafaza ettiği görülmüştür. CAT enziminin saflaştırma işlemi sonunda kinetik parametrelerinden K_m değerinin 38.151 mM olduğu ve V_{max} değerinin ise 303.03 U/mg prot. olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE elektroforezi işlemi neticesinde saflaştırılan CAT enzimin molekül ağırlığının 42 ile 52 kDa arasında olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak kardiyovasküler, inflamatuvar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde serbest radikaller önemli bir rol oynar. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek doku hasarını azaltır. Hücrelerin temel savunma sistemleri, oksidatif hasarın neden olduğu hastalıklara karşı savaşmak için GPx, SOD ve CAT enzimleri tarafından oluşturulmuştur. Bu yüzden CAT enzimi tıbbi ve biyoteknolojik açıdan önem arz etmektedir.

ÖNERİLER

Biyoteknolojideki gelişmelerle ile kimya alanındaki gelişmeler birleştirilerek çalışma daha hızlı ve kullanışlı proseslerle yapılabilir.

Katalaz enzimi başka kaynaklardan da saflaştırılabilir.

Katalaz enziminin daha verimli ve ucuz kullanılabilmesi için farklı opsiyonlar üzerine araştırma yapılabilir.

Tıp, tarım ve endüstriyel alanlarda geniş uygulamaları olan katalaz enziminin tekrar kullanılabilmesi için çeşitli desteklere immobilizasyonu araştırılabilir.

KAYNAKÇA

- Aebi, H., Wyss, S. R., Scherz, B. ve Skvaril, F. (1974). Heterogeneity of Erythrocyte Catalase II. Isolation and Characterization of Normal and Variant Erythrocyte Catalase and Their Subunits. *Eur J Biochem*, 48(1), 137-145.
- Anderson, L. A. ve Dawson, J. H. (1991). EXAFS Spectroscopy of Hemecontaining Oxygenases and Peroxidases. *Structure and Bonding*, 64: 1-40.
- Ahıskalı, A. (2017). *Giresun Yöresinde Yetişen Fındık Mantarından (Lactarius pyragalus) Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilimdalı, Giresun.*
- Akar, Ç. (2015). *Katalaz Enziminin Ceviz'den (Juglans regia) Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilimdalı, Adana.*
- Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, 38(5), 1-123.
- Ako, H. ve Mathews, C. K. (1996). *Study Guide for Biochemistry*, 2nd Ed., Benjamin/Cummings series in the life sciences and chemistry, Benjamin/Cummings Publishing Company. 422 p.
- Alptekin, Ö. (2009). *Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. ve Hagen, T. M. (1993). Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915-7922.
- Arosio, B., Gagliano, N. ve Fusaro, L. M. P. (2000). Aloe-Emodin Quinone Pretreatment Reduces Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride. *Pharmacol and Toxicol*, 87, 229-233.
- Avcı, G., Esra Küpeli, E., Eryavuz, A., Yeşilada, E. ve Küçükkkurt, I. (2006). Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 418-423.

- Aydemir, T. ve Kuru, K. (2003). Purification and Partial Characterization of Catalase from Chicken Erythrocytes and the Effect of Various Inhibitors on Enzyme Activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(1), 85-97.
- Beaumont, F., Jouve, H. M., Gaillard, J. ve Pelmont, J. (1990). Purification and Properties of a Catalase from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Science*, 72(1), 19-26.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. ve Stryer, L. (2002). *Biochemistry*, W H Freeman, New York.
- Bingöl, G. (1983). *Biyokimya*, Güven Matbaası, 169-174, Ankara.
- Bilgin, R., Kurt, N., Güleşci, N. ve Yücebilgiç, G. (2020). Age-related changes in antioxidant enzyme activities. *Ann Clin Nutr.*, 3(1), 1016.
- Bozdemir, Y. (2007). *Keten Tohumu (Linum usitatissimum) Ekstraktında Katalaz ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Çimen, Ç., Öter Ç., Demir H. ve Savran, A. (2005). Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. *Van YYÜ, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 15-20.
- Dalkavriyan, S. (2011). *Spirulina platensis'ten Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Demir, H. (2006). Aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 315-318.
- Diñçer, A. (2000). *Roka (Eruca sativa) Bitkisinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.*
- Dündar, Y. ve Aslan, R. (2000). *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 73, 95-101.
- Erarslan, A. (2000). *Enzim Kinetiği Notları*, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli.
- Gökalp, Y. H., Nas, S. ve Certel, M. (2002). *Biyokimya-1, Temel yapıları ve kavramları*, 3. baskı, Denizli.
- Güngör, K. (2008). *Çağla Badem (Prunus dulcis) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.*

- Güngör, Ö. (2015). *Katalaz Enziminin Kerevizden (Apium graveolens) Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Halifeoğlu, I., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H. ve Telo, S. (2005). Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3), 117-122.
- Hashim, S. ve Gamil, M. (1988). Plants and Herbs Between the Iraqi Folk Medicine and Scientific Research. *Dar Revolution of Press and Publication*, 44-51.
- Havir, E. A. ve Mchale, N. A. (1987). Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol*, 84, 450-455.
- Hirasawa, M., Gray, K. A., Shaw, R. W. ve Knaff, D. B. (1987). Spectroscopic properties of spinach catalase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 911(1), 37-44.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B. ve Nizamlioğlu, M. (2000). *Biyokimya*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, A. M. (2006). *Biyokimya*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Kara, D. (2008). *Sakarya'da Yetiştirilen İki Farklı Kabak Çekirdeğinden (Cucurbita maxima ve moschata) Katalaz Enziminin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.*
- Kavakçıoğlu, B. (2012). *Isolation, Purification and Characterization of Catalase from Phanerochaete chrysosporium. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilimdalı, İzmir.*
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (1997). *Biyokimya*, Şafak Yayınevi; 36; Erzurum.
- Konak, Ü. İ., Turhan, İ. ve Certel, M. (2014). Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Akademik Gıda*, 79-87.
- Köksal, E. (2003). *Katalaz Enziminin Kara Lahana (Brassica oleracea L. var. Acephala D.C.) Bitkisinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Pestisitlerle Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.*
- Lartillot, S., Kedziora, P. ve Athias, A. (1988). Purification and Biosynthesis of Cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.) Catalase. *The Biochemical Journal*, 251, 147-155.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randal, R. J. (1951). Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193-261.
- Malgorzata, M., Christoph, B., Kataryzyna, S. ve Krystyna, M. (2005). Antioxidant Enzymes and Isoflavonoids in Chilled Soybean. *Journal of Plant Physiology*, 162(4), 403-412.
- Manna, S., Bhattacharyya, D., Mandal, T. K. ve Das, S. (2006). Sub-Chronic Toxicity Study of Alfa-Cypermethrin in Rats. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 5(2), 163-166.
- Mohsin, A., Shah, A. H., Al-Yahya, M. A., Tariq, M., Tanira M. O. M. ve Ageel, A. M. (1989). Analgesic, Antipyretic Activity and Phytochemical Screening of Some Plants Used in Traditional Arab System of Medicine. *Fitoterapia*, 60(2), 174-177.
- Monira, A., El, K. A. ve Naima, Z. (2012). Evaluation of Protective and Antioxidant Activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) Extract on Paracetamol-Induced Toxicity in Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(7), 467-474.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed., (Nedret, K. Çev. Ed.), Palme Yayıncılık, Ankara.
- Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Amadeu, M. V. M. S. ve Gravato, C. (2012). Acute Effect of Deltamethrin on Swimming Velocity and Biomarkers of the Common Prawn *Palaemon Serratus*. *Aquatic Toxicology*, 124-125, 209-216.
- Özata, A. ve Kutlu, M. (2000). *Enzimoloji Ders Notları*, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
- Özdemir, C., Güleşci, N. ve Bilgin, R. (2021). Purification and Characterization of Superoxide Dismutase Enzyme from (*Punica granatum* L.). *Asian Journal of Research in Biochemistry*, 9(3), 30-35.
- Öztürk, L., Bülbül, M., Elmastaş, M. ve Çiftci, M. (2007). Purification and Some Kinetic Properties of Catalase from Parsley (*Petroselinum hortense* Hoffm., Apiaceae) Leaves. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37(3), 229-238.
- Pamuk, F. (2000). *Biyokimya*, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Paar, A., Costa, S. A., Tzanov, T., Gudely, M., Gübitz, G. M. ve Cavaco-Paulo, A. (2001). Immobilization of Catalase from *Bacillus* SF on Alumina for The Treatment of Textile Bleaching Effluents. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 815-819.
- Radice, S., Ferraris M., Marabini L., Grande, S. ve Chiesara, E. (2001). Effect of Iprodione, a Dicarboximide Fungicide, on Primary Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 54, 51-58.

- Sakr, S. ve Al-Amoudi W. M. (2012). Effect of Leave Extract of *Ocimum basilicum* on Deltamethrin Induced Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Albino Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(5), 22-27.
- Sancar, B., Paksoy, N., Balcı, O. ve Kurtoğlu, N. (2012). Pamuklu Dokuma Kumaşların Boyamaya Hazırlık İşlemlerinde Enzim Kullanım Olanaklarının İncelenmesi ve Kombine Proses Geliştirilmesi. *Tekstil ve Mühendis*, 19(86), 7-13.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. ve Raisuddin, S. (2003). Oxidative Stress Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Freshwater Fish. *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 295-301.
- Scopes, R. K. (1994). *Protein Purification: Principles and Practice*, La Trobe University Bundoora, Victoria, 3083.
- Seçgin, Ö. (2013). *Maya Hücreleri ve İnvertaz Enziminin Poli(Etilenoksit) Elektronlarda Tutuklanması. Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.*
- Seriner, R. (2010). *Katalaz Enziminin Hıyardan (Cucumis sativus) Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana.*
- Sivrikaya, A. (2007). *Katalaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Peroksinitrit Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.*
- Sondaş, E. (2005). *Nane (Menta spicata) ve Pırasa (Allium porrum L.) Bitkilerinden Katalaz Enziminin Kısmı Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat.*
- Tayefi-Nasrabadi, H. (2008). Some Biochemical Properties of Catalase From Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*), *Journal of Biological Sciences*, 8(3), 649-653.
- Tekman, Ş. ve Öner, N. (1986). *Genel Kimya*, 1. Cilt, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul.
- Wiseman, A. (1986). *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Edit., John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Yalçın, M. S., Güleşçi, N., Bilgin, R. ve Koltas, I. S. (2020). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in patients with viral hepatitis C. *Integr Mol Med*, 7, 1-3.

- Yenson, M. (1984). *İnsan Biyokimyası*, İstanbul Üniversitesi, Tıp Anabilim Dalı, Kırklareli.
- Yıldız, G. (2013). *Tükürük Kalıntılarından Dermal Swablama Yöntemiyle Amilaz Tayini. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Ana Bilim Dalı, İstanbul.*
- Yörük, I. H., Savran, A. ve Ekici, K. (2006). Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase from Van Apple (*Golden delicious*). *Asian Journal of Chemistry*, 18, 475-480.
- Yüzügüllü, Y. ve Ögel, Z. B. (2013). Çift Aktiviteli Katalaz-Fenol Oksidazının ve Diğer Katalazların Gıda Sanayisindeki Önemi. *Gıda*, 38(2), 111-118.



ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. Gazi Üniversitesi, Kırşehir Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2010 yılında mezun oldu. 2011-2021 yılları arasında devlet dairesinde görev yaptı. 2020 yılında Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2021 yılından itibaren ise Gümüşhane Üniversitesinde görev yapmaya başladı ve halen görevine devam ediyor.

