ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oya SARI

BEZELYE (PISUM SATIVUM)'DEN LİPOKSİJENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEZELYE (PISUM SATIVUM)'DEN LİPOKSİJENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Oya SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez …./…./2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....……	İmza.....…….	İmza……..
Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN	Prof. Dr. Seyhan TÜKEL	Yrd.Doç.Dr.Tülay ALTUN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF. 2004.YL.23

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEZELYE (PISUM SATIVUM)'DEN LİPOKSİJENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Oya SARI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİMDALI

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl:2006, Sayfa:35
Jüri : Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
Yrd. Doç.Dr.Tülay ALTUN

Lipoksijenaz (EC 1.13.11.12) 1,5-Z, Z-pentadien grubu içeren doymamış yağ asitlerine moleküler oksijeni spesifik olarak bağlayıp cis, trans-kojuge dien hidroperoksitlerinin oluşumunu katalizleyen pek çok endüstriyel alanda uygulaması olan bir enzimdir.

Çalışmada Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden sağlanan bezelyeden lipoksijenaz enzimi saflaştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, homojenizasyon, ultrasantrifüjleme, % amonyum sülfat çöktürmesi, moleküler eleme kromatografisi sırasıyla uygulanmıştır. Bu işlemler sonucunda Bezelye liposijenazı kaba homojenata göre 71,55 kez saflaştırılma ve enzimin spesifik aktivitesi 475.81 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Lipoksijenaz, Bezelye, Moleküler Eleme Kromatografisi

ABSTRACT

MSc THESIS

PURIFICATION OF LIPOXYGENASE ENZYM FROM PEA

Oya SARI

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

Supervisor :Assist. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Year:2006, Pages:35
Jury :Assist. Prof. Dr.Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
Assist. Prof. Dr. Tülay ALTUN

Lipoxygenases (EC 1.13.11.12) catalyse the dioxygenation of fatty acids which contain one or more 1(Z),5(Z)-pentadien systems, yielding chiral (E,Z) conjugated hydroperoxy fatty acids.

In this study lipoxygenase has been purified from pea seeds encoded by Field Crops Department of Ç.Ü Agricultural Faculty. For this purpose pea seeds homogenized, ultracentrifuged, fractioned with ammonium sulphate precipitation and applied on moleculer gel chromatography separation was applied lipoxygenase was purified 71.55 U/mg fold in pea samples and specific activity of enzyme in pea was found as 475.81 U/mg prot,respectively.

Key Words: Lipoxygenase, Pea, Moleculer gel chromatography

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez aşaması boyunca yapıcı öneri ve eleştirileri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e,

Laboratuvar çalışmalarım süresince gösterdikleri anlayıştan dolayı Kimya Bölüm'ü hocalarına, Biyokimya Anabilim Dalı hocalarından Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL ve Doç.Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e,

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen ve bilgilerini benimle paylaşan sayın, Arş.Gör. Özlem ALPTEKİN, Arş.Gör. Özlem ÖZCAN, Arş.Gör. Gül ÖZYILMAZ ve Deniz YILDIRIM'a,

Özellikle tez yazım aşamasında bana yardımcı olan Tülin GEDİK ve İhsan AVŞAR'a

Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ailem; Fatma SARI, Ali SARI, Onur SARI'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……I
ABSTRACT……....II
TEŞEKKÜR……..……..III
İÇİNDEKİLER……..……..IV
ÇİZELGELER DİZİNİ……VI
ŞEKİLLER DİZİNİ……VII
SİMGE ve KISALTMALAR……VIII
1.GİRİŞ……..……...1
1.1.Enzim Saflaştırmada Temel Analizler……..……..1
1.2.Enzimatik Analizin Temel İlkeleri……..……....1
1.3.Yapılacak Analizler……..……...2
1.4.Birimler ve Spesifik Aktivite……..….3
1.5.Enzim Aktivitesinin Hesaplanması……..……3
1.6.Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri……..……4
1.7.Amonyum Sülfat ile Çöktürme……..……..4
1.8.Lipoksijenazlar……..……...5
1.8.1.Biyokimyasal ve Moleküler Özellikler…….....6
1.8.2.Reaksiyon Mekanizması……...……7
1.8.3.Lipoksijenazın Kullanım Alanları……..……...8
1.9.Biyomoleküllerin Ayrılması ve Saflaştırılması……..……..9
1.10.Protein Ayrılması……..10
1.11.Protein Tayinleri……...10
1.12.Çözünürlüğe Dayanan Ayarlar……11
1.13.Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar……11
1.13.1.Diyaliz……11
1.13.2.Ultrasantrifüj……..12
1.13.3.Kromotografi……..12
1.13.3.1.İyon Değişim Kromotografisi……12
1.13.3.2.Moleküler Eleme Kromotografisi……...14

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……..……..15
3.MATERYAL ve METOD...…….…….17
3.1.Materyal…….....…….……..17
3.2.Metod……..…..…..17
3.2.1.Örneklerin Homojenizasyonu……..…....…..17
3.2.2.Örneklerin Ultra santrifüj Edilmesi…….....……17
3.2.3.Amonyum Sülfat ile Çöktürme……....17
3.2.4.Sefaroz 6B Kolonunun Hazırlanması……..18
3.2.5.Proteinlerin Sefaroz 6B Kolonuna Uygulanması……..…...……18
3.2.6.Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi……..…...…...18
3.2.7.Protein Tayini…….……..19
4.BULGULAR TARTIŞMA……...…….……20
4.1.Bulgular……...……...……..20
4.1.1.Bezelye Örneklerinin Homojenize Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular……..…….……20
4.1.2.Bezelye Örneklerinin Ultrasantrifüj Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde edilen Bulgular……...……...21
4.1.3.Bezelye Örneklerinin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesiyle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular……..….....22
4.1.4. $(NH_4)_2SO_4$ İle Çöktürme Sonucu En Yüksek Spesifik Aktiviteye Sahip % 30 luk Çökelti Fraksiyonlarının Sefaroz 6B Jel Kromotografisine Uygulanması ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular……...……..…….……26
4.2.Tartışma……..28
5.SONUÇLAR…….……31
KAYNAKLAR…….……....32
ÖZGEÇMİŞ…….……35

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Lipoksijenazın üç izoenziminin özellikleri…….7

Çizelge 4.1. Bezelye homojenatlarında enzim aktivitesini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi……..21

Çizelge 4.2. Bezelye homojenatlarının ultrasantrifüjlenmesi ve takiben supernatantta enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi……....22

Çizelge 4.3. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökelti ve çözeltide kalan protein miktarı……. 23

Çizelge 4.4. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri…….24

Çizelge 4.5. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri…….25

Çizelge 4.6. Bezelye örneği için Sefaroz 6B kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunana absorbans değerleri ve 234 nm'de ölçülen aktivite değerleri(3 ml)…….27

Çizelge 4.7. Bezelye örneğinin kaba homojenattan başlayarak Sefaroz 6B kolonunu uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler……...28

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Bezelye homojenatlarında enzim aktivitesini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi……..……..20

Şekil 4.2. Bezelye homojenatlarının ultrasantrifüjlenmesi ve takiben supernatantta enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi……....21

Şekil 4.3. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökelti ve çözeltide kalan protein miktarı……...……. 23

Şekil 4.4. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri…….24

Şekil 4.5. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri…….25

Şekil 4.6. Bezelye örneği için Sefaroz 6B kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunana absorbans değerleri ve 234 nm'de ölçülen aktivite değerleri(3 ml)…….26

SİMGELER VE KISALTMALAR

LOX **:** Bezelye lipoksijenazı

13-HPOD : 13- hidroperoksi-cis-9-trans-11-oktadekadienoik

Prot **:** Protein

1. GİRİŞ

1.1. Enzim Saflaştırmada Temel Analizler

Enzimler, biyolojik katalizör olmaları nedeni ile yaşamı mümkün kılan biyomoleküllerdir. Enzimlerin varlıklarını, etkinliklerini, lokalizasyonlarını, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını, vs…. belirlemenin en etkili yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Herhangi bir enzim için belirli bir aktivite belirleme yolu yoktur. Çünkü, bir yöntemin uygunluğu bazı faktörlere bağlıdır. Bunların başında enzimin saflığı, enzimin fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer gelmektedir.

Enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği reaksiyonda kullanılan substratın kullanım hızı tayin edilerek ölçülür. Bir çok enzim için değişik tayin yöntemleri mevcuttur. Seçilecek tayin yöntemi, kullanılacak cihaz ve kimyasalların uygunluğuna bağlıdır.

1.2. Enzimatik Analizin Temel İlkeleri

Enzim aktivitesi belirlemenin temeli, belirli bir zaman aralığında enzimin kataliz etkinliği sonucu oluşan değişimi saptamaktır. Bu açıdan enzim aktivitesinin belirlenmesi esas olarak kinetik bir ölçümdür. Bu ölçümde zamana göre değişen parametre, kataliz sonucu reaksiyon ortamındaki ürünün oluşum veya substratın kullanım hızıdır.

Substrat tükenmesi reaksiyon hızının düşmesinde başlıca etmendir. Çünkü, substrat azaldıkça enzim substratı ile doygunluğu yani saturasyonu azalacak ve reaksiyon hızı da düşecektir. Substrat derişimi sıfır olunca reaksiyon tamamen duracaktır. Reaksiyon hızının düşmesine neden olan esas etmen substrat tükenmesi ise, ortama substrat ilave edilmesi, reaksiyon hızının azalmasını geciktirecektir.

Bazı enzimlerin aktivite ölçümlerinin ilk anlarında, yani henüz lineer bir eğri oluşmadan değişik bazı eğriler oluşmaktadır. Bunun çeşitli nedenleri olabilmektedir. Bunlara yetersiz ısı kontrolü, özütteki iri partiküllerin çökmesi, başlangıçtaki yüksek substrat derişimi (substrat inhibisyonu), izoenzimlerin varlığı şeklinde sıralabilir.

Enzim aktivite ölçümlerinde güvenilir sonuçlar elde etmenin en önemli koşullarından biri, çok sağlıklı blank (kör) ve kontrol ölçümleri yapmaktır. Normal koşullarda tam olmayan bir reaksiyon karışımına enzim eklendiğinde hızda bir değişiklik beklenmemektedir. Fakat bazı koşullarda bu tip yanıltıcı reaksiyon hızları ölçmek mümkün olabilmektedir.

Homojenat veya hücresiz organel solüsyonu şeklindeki ham doku homojenatları enzim kaynağı olarak kullanıldığında ve enzim aktivitesi spektrofotometre gibi optik bir yöntemle ölçülmek istendiğinde bazı sorunlar çıkabilmektedir. Bu tip preparatlarda çeşitli boyda partiküller mevcuttur ve bunlar absorbans da değişmelere neden olmaktadır. Bunun önlenmesi için denenecek bir yol bu partikülleri çözünür hale getirmek için deterjan kullanılmasıdır. Fakat kullanılacak bu deterjanın da enzimin aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı mutlaka test edilmelidir.

Bazen bir enzimin aktivitesi için gereken reaksiyon bileşenleri bir arada karıştırıldığında çökelmeler oluşabilmektedir. Bu durum, optik yöntemlerle ölçüm yapıldığında sorun yaratabilmektedir. Örneğin, magnezyum ve kalsiyum iyonları bazı enzimlerin aktiviteleri için gerekli olduklarından reaksiyon karışımına katılmaktadırlar fakat aynı karışımda kuvvetli bir fosfat tamponu kullanıldığında kalsiyum veya magnezyum fosfat fazlalığından çökelti oluşacaktır. Aynı durum, yeni oluşan reaksiyon ürünlerinden birinin çözünürlüğü düşük bir madde olması koşulunda da meydana gelebilmektedir. Bunun için reaksiyonun tamamlanmasının ardından küvetlerde herhangi bir bulanıklığın olup olmadığı kontrol edilmelidir.

Kör ölçümlerde karşılaşılan ve ilgilendiğimiz enzime özel olmayan yanıltıcı ölçümün bir nedenini de reaksiyon karışımına katılan maddelerden birinin safsızlığı oluşturmaktadır. Bu safsızlığın nedeni ise, enzim kaynağı olarak kullandığımız preparat ve substrat olarak kullandığımız maddelerin ultra saf kalitede olmaması da oluşturabilmektedir. (Erarslan ve ark., 2000).

1.3. Yapılacak Analizler

Her saflaştırma basamağından sonra ilgilenilen proteinle ilgili analizler, onun saflık derecesi ve saflaştırma işleminin veriminin bilinmesi gerekir. Bunu

belirlemenin en önemli yolu her aşamada proteinlerin aktivitelerini ölçmektir. Her hangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yöntemi yoktur; ama, ideal protein analiz yöntemi mümkün olduğunca hızlı, basit ve özgün olmalıdır. Hızlı analizler saflaştırma basamakları arasındaki bekleme sürelerini ve dolayısıyla enzimin aktivite kaybetme olasılığını en aza indirecektir.

Protein miktar tayinleri, her saflaştırma basamağının verimi ve ilgilenilen proteinin spesifik aktivitesi ile ilgili bilgiler ve sonuçlar bir araya getirilerek gerekli bilgi bütünlüğü sağlanmış olur (Erarslan ve ark., 2000).

Spesifik aktivite =ilgilenilen protein (mg ya da Ünite)/total protein (mg),

Saflaştırma derecesi =ikinci basamağın spesifik aktivitesi/birinci basamağın spesifik aktivitesi,

Böylece her basamağın verimliliği ve saflık derecesi belirlenir.

1.4. Birimler ve Spesifik Aktivite

Bir enzimin aktivitesini çeşitli şekilde ifade etmek mümkündür. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilir. Fakat elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim ifadesi geliştirilmiştir. Bu bazen uluslar arası ünite (IU) veya enzim ünitesi (U) olarak ifade edilmektedir. Bir ünite enzim bir dakikada bir μmol ürünün oluşumu veya 1 μmol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır. Bir enzimin spesifik aktivitesi ise 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır (Telefoncu,1997).

1.5. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Absorbansın (A), zamana bağlı değişimi (dA/dt), molar ekstinksiyon katsayısına (ε) bölünürse absorbans değişimi izlenen maddenin derişimdeki değişim hızı saptanmış olur. Molar ekstinsiyon katsayısının değeri absorbansı veren maddenin değişimi ve absorbansı arasındaki sabit oranın ifadesidir (Telefoncu,1996).

$\varepsilon = A/C$ $cm^2\ mol^{-1}$ ile formülize edilir.

A= absorbans, C= maddenin derişimini ifade eder ($cm^2\ mol^{-1}$)

Enzim ünitesi (U)=(Vf(ml) x(seyreltme faktörü)/ (ε) (cm^2/mol^{-1})x(Vs)xd)

Vf= toplam hacim (ml)

Vs= eklenen enzim hacmi (ml)

d= ışık yolu

dA/dt= dakikada gözlenen absorbans farkı

spesifik aktivite=U/protein(mg/ml)

1.6. Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri

Saflaştırmanın her basamağında protein miktarının bilinmesi faydalıdır. Eğer saflaştırma basamaklarında protein derişimini bilmek kritik bir önem taşıyorsa istenmeyen proteinlerin uzaklaştırıldığının bilinmesi gerekiyorsa, her bir fraksiyonun ve daha sonraki son ürünün spesifik aktivitesinin bilinmesi gerekiyorsa saflaştırmanın ne ölçüde yapıldığı bilinecekse, protein miktarının belirlenmesi gerekir.

Protein tayinin de aşağıdaki yöntemler kullanılabilir:

1. Biuret-alkalen-bakır yöntemi
2. Lowry-Folin-Ciocalteau
3. 280 nm'de Uv absorbsiyon (aromatik bağlar) veya 205-220 nm (peptid bağları) yöntemi
4. Boya bağlama yöntemi

1.7. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Hidrofilik ve hidrofobik grupların protein molekülünün yüzeyindeki dağılımı onun çeşitli çözgenlerdeki çözünürlüğünü tayin eder. Kulanılan çözgenler genellikle sulu çözgenlerdir. İyon şiddeti, pH, karışabilir organik çözgenlerin inert polimerlerin ilavesi veya bu derşimlerin sıcaklık farklılıkları ile birlikte gerçekleştirilmesi yoluyla proteinlerin çözünürlüğünü etkileyerek çöktürme, böylece proteinin izolasyon ve saflaştırılma yapılması mümkündür.

Nötral pH'da fizyolojik iyon şiddeti genellikle 0.15-2 M civarındadır ve enzimlerin çoğu hücre sıvılarında çözünür proteinler olarak bulunur. Çözeltiler çözen ile çözünen arasındaki polar etkileşimler, mevcut tuzlarla iyonik etkileşimler

ve belirli bir dereceye varmış aynı yüklü moleküller veya küçük agregatlar arası eletrotatik itme kuvvetleri sonucu gerçekleşir. Yüksek yüzey hidrofobluğuna sahip proteinler iyon şiddetinin fizyolojik değerden sıfıra doğru düşürülmesiyle ivme kuvvetlerinin yetersizliği sonucu çökerler.

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan tekniklerden biri, yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürmedir. Tuz iyonları solvatasyona büyük ilgileri nedeniyle hidrofob gruplar etrafındaki düzenli su moleküllerini uzaklaştırırlar. Böylece bu grupların birbiri ile etkileşimi artar ve agregatlaşma gerçekleşir. Tuz çöktürmesinde çoğu kez ΔH pozitiftir. Bu nedenle yüksek sıcaklıkta daha iyi çöktürme sağlanır. Yöntemin başarısı, sınırlı bir tuz konsantrasyonu bölgesinde çökelmenin sağlanmasıdır.

Çöktürmede kullanılan tuzların etkinliği anyonun yükü ile ilgilidir ve en çok sülfat fosfat, sitrat tuzları kullanılır. Katyonun cinsi daha az etkili ise de bir değerlikli katyonların kullanılması tercih edilir. Etkinlik sırası NH_4>K+>Na+ dır. En çok kullanılan tuz amonyun sülfattır. 0-30 ^{0}C aralığında çözünürlüğü çok az değişir, doygunluk derişimi 4M dır ve doygun çözeltisinin yoğunluğu (1,235 g/cm^3) aynı çözeltideki protein agregatlarının yoğunluğundan (1,29 g/cm^3) küçük olduğundan santrifüjle ayırmaya imkan verir. Amonyum sülfat ile fraksiyonlamanın bir avantajı, proteinleri stabilize etmesidir. 2-3 M amonyum sülfat içeren bir protein çözeltisi veya kristalleri yıllarca dayanır. Yüksek tuz konsantrasyonları proteolizi ve bakteriyel etkileri de engeller. Bu yüzden ticari depolama maddesi olarak kullanlılır.

1.8. Lipoksijenazlar

Lipoksijenazlar (Lox; EC 1.13.11.) iki veya daha fazla doymamış bağ içeren yağ asitlerine oksijen katarak onları yağ asidi hidroperoksitlerine dönüştüren hem yapısında olmayan demir taşıyıcı dioksijenazlardır.

İlk kez 1928 yılında Bohn ve Haas tarafından karotenlerin oksidatif yıkımını gerçekleştirdiklerinden dolayı '' karoten oksidaz '' olarak tanımlanmıştır. Bundan 4 yıl sonra Andre ve Hou soya fasülyesinde bazı doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu katalizleyen ve lipoksidaz (linoleat oksijen oksidoredüktaz EC: 1.13.11.12.) diye adlandırdıkları enzimin varlığını rapor etmişlerdir. Ancak daha

sonra Sumner ve ark. her iki enzimin aynı enzim olduklarını bildirmişlerdir. 1947 yılında Theorell ve ark. enzimi kristal formda elde ederek karekterizasyonunu belirlemişlerdir. Lipoksijenaz ilk kristalize enzimlerden bir tanesidir ve literatürlerde hiçbir kofaktörü ve prostetik grup içermediği belirtilmiştir. Daha sonra bu görüşün yanlışlığı ortaya çıkmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar bitkisel kaynaklı lipoksijenaz üzerine cis,cis- 1,4-pentadien sistemine sahip yağ asitlerine moleküler oksijen katarak onları doymamış yağ asidi hidroperoksi türevlerine dönüştüren ve hem yapısına sahip olmayıp aktif merkezinde demir bulunduran dioksijenazlar olduğu ortaya çıkmıştır.(Whitaker, 1972)

1.8.1. Biyokimyasal ve Moleküler Özellikleri

Lipoksijenaz aktivitesi 60'dan fazla gelişmiş bitkide, memelilerde, ökoryatik alglerde, fungilerde, siyano bakterilerde ve prokaryotlarda tanımlanmıştır.

Tüm lipoksijenazların katalizlediği genel reaksiyon cis,cis-1,4 pentadien sistemine moleküler oksijeni eklemektir. Teorik olarak oksijen pentadien sisteminin sonuna eklenir. Oluşan hidroperoksi ürünü cis,trans konjuge çift bağı içerir. Linoleik asit substrat olarak kullanılırsa oluşacak iki olası ürün 9- ve 13-hidroperoksi cis,transoktadekadienoik asittir.

Lipoksijenaz aktivitesi, genel olarak enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan konjuge çift bağların 234 nm'de verdiği absorbsiyon ölçülerek veya oksijen elektrodu kullanılarak ölçülür. Çok sayıda doymamış yağ asidi taşıyan moleküller substrat olarak kullanılmasına rağmen, linoleik asit deneysel çalışmalarda en fazla kullanılan moleküldür.

Axelrod ve arkadaşlarının (1972) yaptığı çalışmada enzimin üç izoenzimi olduğu bulunmuştur (Çizelge 1.1.). Lipoksijenaz enzimi, optimum pH, substrat özgünlüğü, ürün oluşumu ve kararlılık bakımından LOX-1, LOX-2, LOX-3, olarak adlandırılan üç izomere sahiptir. Her üç izoenzimde, tek bir polipeptid biriminden oluşmuş ve molekül ağırlığı 96000 civarında olan bir proteindir. Üç izoenzim izoelektrik noktaları bakımından birbirinden farklıdır. LOX-1, LOX-2, LOX-3 'ün izoelektrik noktaları sırasıyla 5.68, 6.25, ve 6.15 'tir. Bu yük farklılıkları LOX-1'in anyon değiştirici kromotografi ile kolayca ayrılmasını sağlar. LOX-2

ve LOX-3 'ün ayrılması daha zordur. Bu iki izoenzimin ayrılmasında HPLC ve kromotografik odaklama kullanılır.

Çizelge 1.1 Lipoksijenazın üç izoenziminin özellikleri.

	Lipoksijenaz -1	Lipoksijenaz - 2	Lipoksijenaz - 3
Moleküler Ağırlık	96 kDa	96 kDa	96 kDa
İzoelektrik Nokta	5.68	6.25	6.15
Optimum pH	9.0	6.5	7.0
Reaktivite	Serbest yağ asiti Yağ asiti sülfat steri	Serbest yağ asiti Nötral yağ asiti	Serbest yağ asiti Nötral yağ asiti
Ürün	13 - HPOD	9-ve13- HPOD	9-ve13- HPOD

Lipoksijenaz enzim aktivitelerinin birbirinden farklı olduğu bilinmektedir. LOX-1'in en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH 9.0, LOX-2 için 6.5, LOX-3 için ise pH 7.0 olduğu bilinmektedir. Lipoksijenaz-1, yağ asitlerinin sülfat esterlerine karşı aktivite gösterirken esterleşmiş yağ asitlerine karşı aktivite göstermediği saptanmıştır. Lipoksijenaz-2 ve-3, pH:7' nin altında nötral ve serbest yağ asitlerine karşı yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir.

Lipoksijenazın özellikle çok çeşitli bitki tohumlarında var olduğu bilinmektedir. Bezelyeleri kapsayan çeşitli tohumlarda, fasulyelerde, yer fıstığında, turpta ve patateste bulunmaktadır.

Enzimlerin, bazı yağlı tohumlar, tahıl taneleri ve bitki tohumlarında meydana geldiği bilinmektedir. İzoenzimler büyük ölçüde bezelyeler ve soya fasulyelerden saflaştırılmakta ve izole edilmektedirler. Depolanan sebzelerdeki enzimlerin aktivitesini minimize etmek için dondurulmadan veya kurutulmadan önce haşlama işlemi uygulanmaktadır. Bezelyelerde, lipoksijenazın aktivitesi merkezde en yüksek, deride en düşük olarak bulunmaktadır.(Whitaker 1972)

1.8.2. Reaksiyon Mekanizması

Genel olarak LOX katalizli reaksiyonlar birbirini izleyen üç basamakta gerçekleşir. Reaksiyon stereo ve konuma spesifiktir.

Hidrojen alınımı

İlk basamak pentadienil radikali oluşturmak üzere bis allilik metilenden hidrojen alınımıdır. Doğal olarak bulunan çoğu polidoymamış yağ asitleri bis allilik metilen içeriğinden hidrojen alınımı için iki durum vardır. Lipoksijenazlar poliunsatüre yağ asitlerinden hidrojeni uzaklaştırmak için bis alilik metilenden birini seçer ve seçim sonucu ya pro-S ya da pro-R hidrojeni seçilir.

Radikalin tekrar düzenlenmesi

İkinci adımda pentadienil radikali tekrar düzenlenir. Tüm reaksiyonun pozisyonel spesifikliği hidrojen uzaklaştırmanın regiospesifikliğine ve radikal düzenlenmesinin yönüne bağlıdır.

Moleküler oksijenin eklenmesi ve hidroperoksi türevinin oluşturulması

Teorik olarak oksijen pentadien sisteminin sonuna eklenir. Bu durum lipoksijenaz spesifikliğine bağlı olarak S veya R konfigürasyonuna sahip yeni kiral merkez oluşturur. İncelenen tüm lipoksijenazlar için hidrojen alınımı ve oksijen eklenmesi çift bağ düzleminin karşı yüzeyinde oluşur.

1.8.3. Lipoksijenazın kullanım alanları

Sebze enzimlerinin ısı inaktivasyonu ve sebzelerdeki aroma bileşenlerinin biyosentezleri sırasında yapılan çalışmalarda, hemoproteinlerden bağımsız bezelyelerden saflaştırılan lipoksijenaza yaygın bir gereksinim duyulmaktadır.

Lipoksijenaz enzimi iki sebepten dolayı ekmek yapımında oldukça yaygın kullanılır.

Birincisi; lipoksijenaz karetenoidleri oksitleyerek ekmek içinin daha beyaz olmasını sağladığı için tercih edilen bir beyazlatıcıdır.

İkincisi; hamuru iyileştirici yönde etki edip, hamurun yoğrulma toleransını arttırır.

Ayrıca lipoksijenaz enzimi; H_2O_2 'li ortamda fenton reaksiyonu yolu ile fenol ve fenol türevi bileşiklerin oksitlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır.

1.9. Biyomoleküllerin Ayrılması ve Saflaştırılması

Biyomoleküllerin bulundukları canlı kaynaklardan izole edilerek saflaştırılması son derece güç ve emek isteyen bir iştir. Çünkü, ayrıştırılmak istenen her maddenin yanında, benzer ya da farklı özellikte olabilen yüzlerce başka bileşik vardır. Mol kütleleri ve konsantrasyonları farklılıklar gösteren bu bileşiklerin içinden bir tanesini ayırmak, birçok duyarlı ve özel metodun bir arada kullanılmasını gerektirir.

Biyokimyasal ayırmalarda karşılaşılan en önemli zorluklardan biri de, pek çok biyomolekülün dayanıksız olması; ayırma ve saflaştırma sırasında yapısal değişikliğe uğramasıdır. Örneğin, nükleik asitler çok ince uzun moleküller olduğundan karıştırma, pipetleme gibi işlemler sırasında kolaylıkla kırılabilirler. pH' ın fizyolojik değerler dışına çıkması, sıcaklık ve bir çok kimyasal madde ise nükleik asitlerin denatüre olmasına sebep olur. Aynı etkenler başta enzim proteinleri olmak üzere diğer bazı biyomoleküllerin de, doğal yapısının bozulmasına sebep olurlar.

Biyomoleküller organik çözücüde çözünmediğinden, ayırmalar genellikle sulu fazda yapılır. Hormonlar ve enzimler gibi miktarı çok az, yapısı çok kompleks olan bileşiklerin saflaştırılması ve kantitatif tayinleri, radyoizotopların da kullanıldığı özel enzimolojik teknikler kullanılmasını gerektirir.

Bir maddenin saflaştırılmasında yapılacak ilk işlem; maddeyi bulunduğu ortamdan uygun bir çözücüye almaktır. İlgi duyulan maddenin bulunduğu fraksiyon seçilerek, o fraksiyon üzerinde ayırma ve saflaştırma işlemi başlatılır.

Ayırma işlemlerinde belirli prensiplere dayanan metotlar kullanılır. Bu metotlar aşağıdaki gibi sınıflandırılır;

1. Ultrasantrifüj
2. Kromotografi
3. Ekstraksiyon
4. Elektoforez
5. Diyaliz

1.10. Protein Ayrılması

Proteinler hem hücre dışında, hem de hücrenin farklı kompartımanlarında bulunan çok heterojik bir bileşik sınıfıdır. Saflaştırma için ; protein, bulunduğu hücre fraksiyonundan çözeltiye alınır.

Stoplazmik proteinler için hücre zarı lizisle açılır. Bu amaçla hipotonik çözeltiye konan hücreler, hücre içine çözücü girmesi sonucu şişer ve zar parçalanır. Bitki ve bakteri hücrelerinde, hücre duvarı olduğundan, hücre duvarının enzimatik olarak veya organik çözücülerle muamele edilerek parçalanması gerekir.

Protein bir organelde bulunuyorsa, bu organel fraksiyonunun parçalanmış hücre homojenatından ultrasantrifüjle ayrılması gerekir. Daha sonra; proteinler organelden konsantre tuz çözeltisi ile ekstrakte edilir. Bu işlemler sırasında, proteinin doğal yapısının bozulmaması için pH ve sıcaklık uygun şekilde ayarlanır.

1.11. Protein Tayinleri

Saflaştırma sırasında, bu işlemin ne oranda başarıldığını izlemek için, protein miktarının hassas ve spesifik olarak belirlenmesi gerekir. Protein bir enzim ise, substrat veya ürün miktarı uygun bir yöntemle tayin edilerek, buradan enzim aktifliğine geçilir. Ürünün kolaylıkla belirlenemediği durumlarda eşlenme reaksiyonlarına baş vurularak ürünün daha kolay ölçülebilen ikinci bir ürüne çevrilmesi sağlanır.

Proteinlerin izole edilmesinde onların çeşitli özelliklerinden yararlanılır. Bu özellikler:

1. Çözünürlük farkları
2. Büyüklük farkları
3. Elektriksel yük
4. Polarlık
5. Işık absorpsiyonu
6. Diğer özellikler

1.12. Çözünürlüğe Dayanan Ayırmalar

Proteinlerin çözünürlüğü çözücünün polarlığı, pH'ı, sıcaklığa ve çözeltinin iyon şiddetine bağlıdır. Çözeltide bulunan çözünmüş tuzlar, proteinlerin çözünürlüğünü etkiler.

Düşük iyon şiddetlerinde proteinin çözünürlüğü tuz konsantrayonu ile genellikle artar. Tuz, proteinin yükünü perdeleyerek çökmesine engel olur. İyon şiddeti arttıkça proteinlerin çözünürlüğü azalır. Çünkü, tuz hidratize olacağından, proteinin çözünürlüğü için gereken çözücü miktarı azalır. Proteinlerin çözünürlükleri çözeltinin pH'ı ile değişir. İzoelektrik noktada çözünürlük minimumdur. Çünkü, bu pH'da proteinler net bir yük taşımadıkları için, hem polarlığın azalmasına bağlı olarak çözünürlük azalır; hem de komşu moleküller arasında yüke bağlı itmeler ortadan kalkacağından moleküller bir araya gelir ve çökme başlar. Bu pH 'ın altında ve üstünde ise proteinlerin çözünürlüğü artar.

Proteinlerin amino asit bileşimleri farklı olduğundan her proteinin izoelektrik pH'ı farklıdır. Bundan yararlanarak çözeltinin pH'ı çöktürülmek istenen proteinin izoelektrik noktasına ayarlanır. Böylece, diğer proteinlerin çözeltide kalması ve ayrılmak istenen proteinin çökmesi sağlanır. Sıcaklık, çözünürlüğü etkilediği için iyi bir çöktürme ancak uygun sıcaklık seçimiyle başarılabilir.

1.13. Büyüklük Farkına Dayanan Ayırmalar

1.13.1. Diyaliz

Büyüklük farkına dayanan en basit ayırma yöntemidir. Amaç, proteini ortamda bulunan iyon ve küçük moleküllerden ayırmaktır. Yarı geçirgen diyaliz zarları genellikle selüloz asetattan yapılmıştır ve gözenekleri 1-20 nm çapındadır. Diyaliz keseleri eşit büyüklükte bir gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal safsızlıklarını gidermek için bir ön işlemden geçirilmektedir. Çöktürmeyle ayrılan bir protein çökme sırasında ortamdaki iyonları absoplar. Bunları uzaklaştırmak için bir diyaliz torbasına konan protein çözeltisi, uygun bir tampon içerisine daldırılır. Ozmatik basınç farkından dolayı küçük molekül ve iyonlar dıştaki tampon çözeltiye

geçerler. Tamponun zaman zaman yenilenmesi ile proteinin küçük molekül ve iyonlardan kurtarılması mümkün olur.

1.13.2. Ultrasantrifüj

Makromoleküllerin çökmesi için santrifüjlemek sureti ile merkezkaç kuvvetinden yararlanılarak çöktürme yapılabilir. Bir çözeltideki bir taneciğin çökme hızı,

a) Uygulanan merkezkaç kuvvetinin büyüklüğüne,

b) Taneciğin büyüklüğü, şekli ve yoğunluğuna,

c) Çözücünün yoğunluk ve vizkositesine,

bağlıdır.

1.13.3. Kromotografi

Kromotografi; ayrılacak maddelerin uygun bir hareketli faz yardımıyla, sabit bir fazdan geçirilmesi sırasında, hareket hızlarının farklı olmasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Ayrılacak maddelerin sabit fazla etkileşme tipine, hareketli fazın gaz veya sıvı olmasına ve deney tekniğine göre; kromotografi çeşitli adlar altında uygulanan bir metottur.

Biyokimyada kolon kromotografisi çok kullanılır. Kolon ayrılacak maddelerin tutulmasını sağlayacak bir dolgu maddesiyle doldurulur. Uygun bir çözücüde çözülmüş olan maddeler kolondan geçirilir. Bu sırada dolgu maddesiyle etkileşmenin zayıf ya da kuvvetli olmasına bağlı olarak ayrılacak maddeler kolondan farklı hızlarla geçerler. Kolonda farklı noktalara sürüklenmiş olan maddeler uygun çözücülerle (tamponlarla) kolondan alınırlar. Kolondan tampon çözeltilerle alınan maddeler fraksiyonlar halinde ayrı tüplere toplanır ve böylece ayırma işlemi gerçekleşmiş olur.

1.13.3.1. İyon Değişim Kromotografisi

Proteinlerin asit-baz özelliklerine dayanılarak yapılan ayırma metodu iyon değişim kromotografisidir. İyon değiştirici iki kısımdan oluşur :

1. İçinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesi,

2. Hareketli karşı iyonlar. Karşı iyonlar tersinir olup aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirebilirler.

İyon değiştirici dolgu maddesi eğer artı yüklü gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar eksi yüklü olup bu tür iyon değiştiriciler eksi yüklü iyonları değiştirdiklerinden anyon değiştiriciler adını alırlar. Dietilaminoetil selüloz (DEAE- selüloz), pH:7.0 'da pozitif yüklü grupları ihtiva eder ve bu yüzden bir anyon değiştiricidir.

Eğer dolgu maddesi eksi yüklü gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar artı yüklü olup, bu tür iyon değiştiriciler artı yüklü iyonları değiştirdiklerinden katyon değiştirici adını alırlar. Karboksimetil selüloz (CM-selüloz) nötral pH'da negatif yüklü gruplar ihtiva eder ve bir katyon değiştiricidir

Dolgu maddesi alüminyum silikatlar, sentetik reçineler, polisakkaridler olabilir. Dolgu maddesinin özellikleri iyon değiştiricilerin mekanik kararlılılığını, akış özelliğini, bozulabilen biyolojik maddelere karşı davranışını ve kısmen de kapasitesini belirler.

Protein karışımlarının DEAE-selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırasıyla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azalır. Çünkü, pH'ın düşmesiyle birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar. Eluatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır.

1.13.3.2. Moleküler Eleme Kromotografisi

Moleküler eleme kromotografisnin temel prensibi kürecik şeklinde olan poröz matriksin çözücü ile çevrelenmiş olarak bir kolona doldurulması ve üzerinden örneklerin geçirilmesi esasına dayanır. Matrikse uygulanacak örnek içerisindeki molekül boyutları durgun fazdaki matriksi gözeneklerinden daha küçük ve daha büyüktür. Matriksin gözenek büyüklüğünden daha küçük olan moleküler, matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca daha yavaş hareket ederler. Gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise matriks tarafından dışarı bırakılırlar, dolayısıyla kolonu öncelikle terk ederler. Ara büyüklükteki moleküller, matriks gözenekleri içine girebilir ancak kolon içinde küçük moleküllerinkinden daha kısa süre kalırlar. Böylelikle moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre elue olurlar.

Moleküler eleme yüksek ve düşük iyon konsantrayonunda, üre varlığında, 37 C^0 de soğuk odada ve deneyin gerekli olduğu ortam şartlarında gerçekleştirilebilir.

Moleküler eleme için kullanılan reçineler:

a. Sephadex

b. Sepharose

c. Sephacryl

Moleküler eleme için kullanılan reçine tipleri:

A. Sephadex	G-Tipleri vardır
B. Sephacryl	S-200, 30, 400, 500, 1000
C. Sepharose	2B, 4B, 6B
D. Sepharose-CL	2B, 4B, 6B

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Grossman ve ark. (1972), bu çalışmada lipoksijenazı, soya fasülyesinden affinite kromotografisiyle saflaştırmışlardır. Ayırma işlemi, ham ekstratın doğrudan linoleik aminoetil agaroz kolonundan geçirilmesiyle yapılmıştır. Aktivite ölçümü pologrefik olarak oksijen absorbsiyonu incelenerek ve spektrofotometrik olarak oluşan konjuge çift bağlar incelenerek yapılmıştır.

Arens, ve ark. (1973), bezelyeden lipoksijenaz izoenzimlerini amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değiştirici kromotografi kullanarak saflaştırmışlardır. Jel filtrasyon sonucu enzimin moleküler ağırlığı 78 kDa bulunmuştur.

Yabuuchi ve Amaha (1975), yaptıkları çalışmada filizlenmiş ve filizlenmemiş arpadan lipoksijenaz saflaştırılarak aktivitesi tayin edilmiştir. Filizlenmemiş arpadan lipoksijenaz amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyonu ile izole edilmiştir. Saflaştırılan enzimin kendi ürünü tarafından inhibe edildiği 1mM siyanür, EDTA, Hg (II), Cu (II) tarafından inhibe edilmediği gösterilmiştir.

Zamora ve ark. (1986), domatesten lipoksijenazı amonyum sülfat ile çöktürme ve hidrofobik kromotografiyle saflaştırma, disk jel elektroforezi ile karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan enzimin optimum pH'ı 6,8 olarak bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı , 96 kDa , pI değeri ise; 6.3 olarak bulunmuştur.

Sanz ve ark. (1992), lipoksijenaz izoenzimlerini, nohuttan amonyum sülfat ile çöktürme, jel filtrasyonu , anyon değiştirici kromotografi ve hidrofobik kromotografi kullanılarak izole etmişlerdir. İzoenzimlerin optumum pH değerleri sırasıyla 6.0 ve 5.5 linoleik asit için Km değerleri 192 ve 51 mM olarak bulunmuştur.

Cojocoru ve ark. (1993), thermoactinomyces vulgaris'den lipoksijenazın affinite kromotografisi kullanılarak saflaştırılması ve oluşan reaksiyon ürünlerinin karekterizasyonu yapılmıştır.

Roy ve ark. (1996), soya fasülyesi lipoksijenazının askorbik asitli ortamda oksidasyon etkisini çalışmışlardır. Askorbik asidin oksitlenmesinin linoleik asit, askorbik asit ve enzimin konsantrasyonuna bağlı olduğunu görmüşlerdir.

Manuela Perez-Gilabert ve ark (1998), domates lipoksijenazının saflaştırılması, ürün karekterizasyonu ve kinetik özelliklerini incelemişlerdir.

Briante ve ark (2000), lipoksijenaz, durum buğdayından saflaştırılmıştır. Ham eksrakta göre 895 kez saflaştırılan enzimin monomerik bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur. Linoleik asit substrat olarak kullanıldığında enzimin optimum aktivitesini PH; 6.8 de gösterdiği gözlenmiştir. Linoleik asit için optimum sıcaklık 40 ^{0}C olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 234 nm'de artan absorbans değerleri izlenerek yapılmıştır.

Lopez –Nicolas Manuela ve ark (2001), patlıcandan saflaştırdıkları lipoksijenazın kinetik özelliklerini belirlenmişlerdir. Ürün analizi HPLC ve GC/MS ile pH=7'de yapılmış ve bu pH 'da ürünün 9-hidroperoksi izomerleri olduğu gösterilmiştir.

D.Yıldırım (2003), lipoksijenaz soya fasulyesinden saflaştırmıştır. Saflaştırma; homojenizasyon, ultrasantifüjleme, amonyum sülfatla çöktürme, hidrofobik etkileşim kromotografisiyle yapılmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analtik saflıkta olup Sigma St. Louis, MO firmasından sağlanmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılan bezelye örnekleri ise Ç.Ü. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümün'den temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan kimyasallar; Linoleik asit, polivinil prolidon, sodyum hidroksit, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, amonyum sülfat, metil alkol, folin ciocalteau çözeltisi, sığır serum albumini, sodyum klorür ve bezelyedir.

Araç ve gereçler; UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA 8417), Magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, analitik terazi, otomatik pipet, girdap karıştırıcı ve cam kolonlardır.

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin Homojenizasyonu

Homojenat hazırlanmasında Jose Manuel Lopez-Nicolas ve ark.(2001), diğer aşamalarda ise Dorothee Arens ve ark.(1973) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. 50 gr bezelye alınarak homojenizasyon tamponu içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Homojenizasyon için 500 ml 50 mM fosfat tamponu (pH: 6.5, 4 ^{0}C), %1 (w/v) polivinil prolidon dan oluşan çözelti kullanılmıştır. Bezelyeler 3 dakika boyunca blender ile homojenize edilmiştir.

3.2.2. Örneklerin Ultra Santrifüj Edilmesi

Örnekler 1.5 mL hacimdeki Eppendrof tüplerine alınarak 13000 g'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş, santrifüj sonucu supernatant ayrılarak bir araya getirilmiştir.

3.2.3. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Enzim ekstraktları beher içine alınarak 4 ^{o}C'a soğutulmuş, uygun % satürasyon için gerekli amonyum sülfat miktarı hesaplanmış, ve tartılmış, yumrular ezilerek toz haline getirilmiştir. Amonyum sülfat yavaşça enzim çözeltisine katılarak ilave

edilmiştir. Daha sonra karıştırmaya 4 ^{o}C 'de 1 saat kadar devam edilmiştir. Çözelti 3000 g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelti uygun tampon içinde çözülmüş, çözünmeyen materyal 3000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek ayrılmıştır. Sonra supernatanta ilave edilecek daha yüksek % satürasyon için yeniden amonyum sülfat tartılmış ve çöktürme işlemi yukarıda belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır.

3.2.4.Sefaroz 6B Kolonunun Hazırlanması

10 mL sefaroz 6B jeli, 20 mL pH:7.5 0.05 M Tris-HCl tamponu içerisine ilave edilmiştir. Kolon (1.7x10 cm) jel ile doldurulup, 25 mL pH:7.5 0.05 M Tris-HCl tamponu ile dengeye getirilmiştir.

3.2.5 Proteinlerin Sefaroz 6B Kolonuna Uygulanması

Lipoksijenaz içeren 3 mL enzim ekstraktı kolona uygulanmıştır. Örneklerin kolondan alınması pH:7.5 da, 0.05 M Tris-HCl tamponu ile yapılmıştır, protein örnekleri 3 mL hacminde tüplere toplanmıştır. Toplanan örnekte protein derişimi ve lipoksijenaz enzim aktivitesi ölçülmüştür .

3.2.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Lipoksijenaz aktivitesi ölçümünde Axelrod ve ark (1972) ve Baracat ve ark (2001) tarafından önerilen yöntemler kullanılmıştır. Enzim aktivitesi linoleik asitin enzim ile etkileşmesi sonucu oluşan konjuge çift bağların 234 nm de artan absorbansı 5 dakika boyunca izlenerek ölçülmüştür. Yöntemde 5 mL metil alkol içerisinde derişimi 0.04 mM olacak şekilde linoleik asit ana substrat çözeltisi hazırlanmıştır. 3 ml 5 mM fosfat tamponu (pH:6.5) içerisine 90 µl substrat çözeltisi eklenip 20 ^{o}C de 5 dakika bekletilmiş, bu çözelti içerisine 30 µl enzim çözeltisi ilave edilerek 234 nm de artan absorbans 3 dakika boyunca kaydedilmiştir. Kör olarak 3 ml 50 mM fosfat tamponu (pH:6.5) kullanılmıştır.

Enzim aktivitesinin IU/mL cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Akt= A.Vt /ε.t.Ve

Vt:toplam reaksiyon hacmi

Ve:kullanılan enzim çözeltisinin hacmi(ml)

E:molar ekstinsiyon katsayısı (25000 M -1 cm -1)

t:reaksiyon zamanı (0.5 dk)

3.2.7. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry, O.H ve ark. tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A :Bu çözelti 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

2. Çözelti B :0.5 g $CuSO_4.5H_2O$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamalanarak hazırlanmıştır.

3. Çözelti C.50 ml A çözeltisi ile 1 ml B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

4. Folin-Ciocalteau çözeltisi saf su ile 1/2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5. Standart protein çözeltisi:100 ml'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde % 0.9' luk NaCl çözeltisiile hazırlanmıştır.

6. Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,0, 50,0 100,0 , 125,0 , 250.0, 500.0, 750.0, 1000.0 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisinden ilave edilmiştir.10 dak oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1/2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dak oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

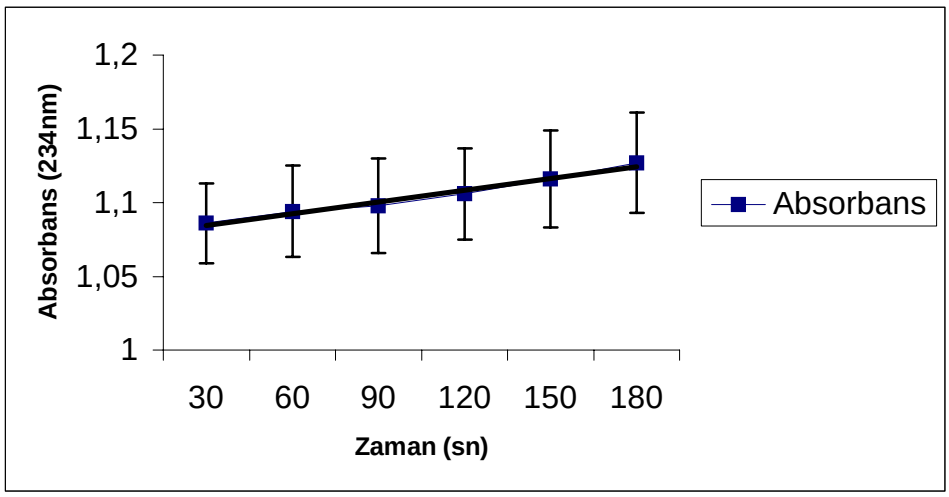
4.1. Bulgular

4.1.1. Bezelye Örneklerinin Homojenize Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Blender'de homojenize edilen bezelye örnekleri 13000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu çökelti atılarak supernatantlar bir araya getirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.1'de verilmiştir, şematik olarak da Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

50 gr bezelye alınarak bezelye hacminin 10 katı hacmindeki homojenizasyon tamponu içerisinde 1 saat bekletilmiştir.

Homojenizasyon tamponu olarak kullanılan çözelti 500 ml 50 mM fosfat tamponu (pH: 6.5 , 4 ^{0}C), %1 (w/v) polivinil prolidon içermektedir. Tampon içinde bekletilen bezelyeler 3 dakika boyunca blender ile homojenize edilmiştir.



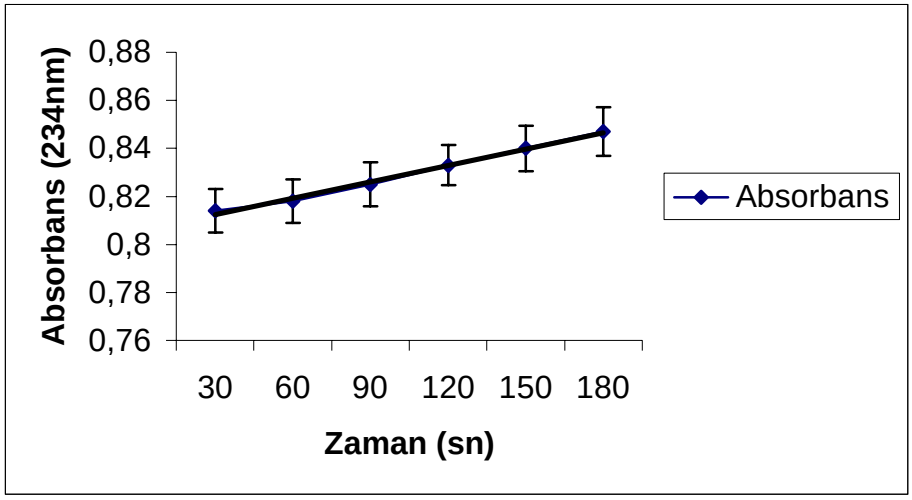
Şekil 4.1. Bezelye homojenatlarında enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi

Çizelge 4.1. Bezelye homojenatlarında enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Zaman (sn)	Absorbans (234 nm)
	Örneklerin Ortalaması
30	1.086
60	1.094
90	1.098
120	1.106
150	1.116
180	1.127

4.1.2. Bezelye Örneklerinin Ultrasantrifüj Edilmesi ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Blender'de homojenize edilen bezelye örnekleri 13000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu çökelti atılarak supernatantlar bir araya getirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.2'de verilmiştir, şematik olarak da Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



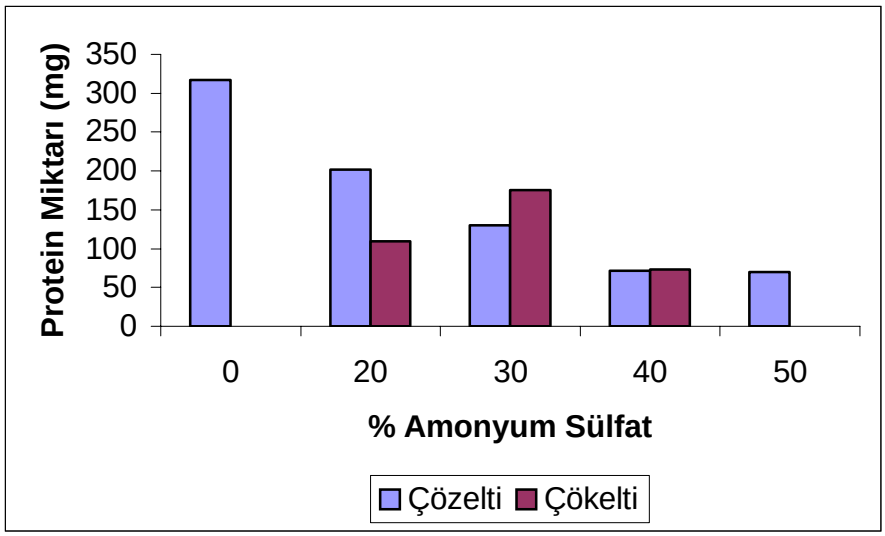
Şekil 4.2. Bezelye homojenatlarının ultrasantrifüjlenmesi ve takiben supernatantta enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Çizelge 4.2. Bezelye homojenatlarının ultrasantrifüjlenmesi ve takiben supernatantta enzim aktiviteini gösteren absorbans değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Zaman (sn)	**Absorbans (234 nm)**
	Örneklerin Ortalaması
30	0.814
60	0.818
90	0.825
120	0.833
150	0.840
180	0.847

4.1.3. Bezelye Örneklerinin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesiyle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Amonyum sülfat ile çöktürmede ultrasantrifüj sonucu elde edilen supernatant bir beher içine alınarak 4 ^{0}C ye soğutulmuştur. İstenilen % $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu için gerekli amonyum sülfat yavaşça enzim ekstraktına karıştırılarak ilave edilmiştir. Çözelti 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılmış ve çökelti pH=7.5 Tris-HCl tamponu içinde çözülmüştür. Daha sonra supernatant ilave edilerek daha yüksek % $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu için yeniden amonyum sülfat tartılmış ve çöktürme işlemi yukarıda belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır. Yapılan çöktürme işleminde % 20, % 30, % 40, % 50 Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimi bezelye için çökelti ve çözeltide kalan protein miktarı Şekil 4.3'de verilmiş, şematik olarak da Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

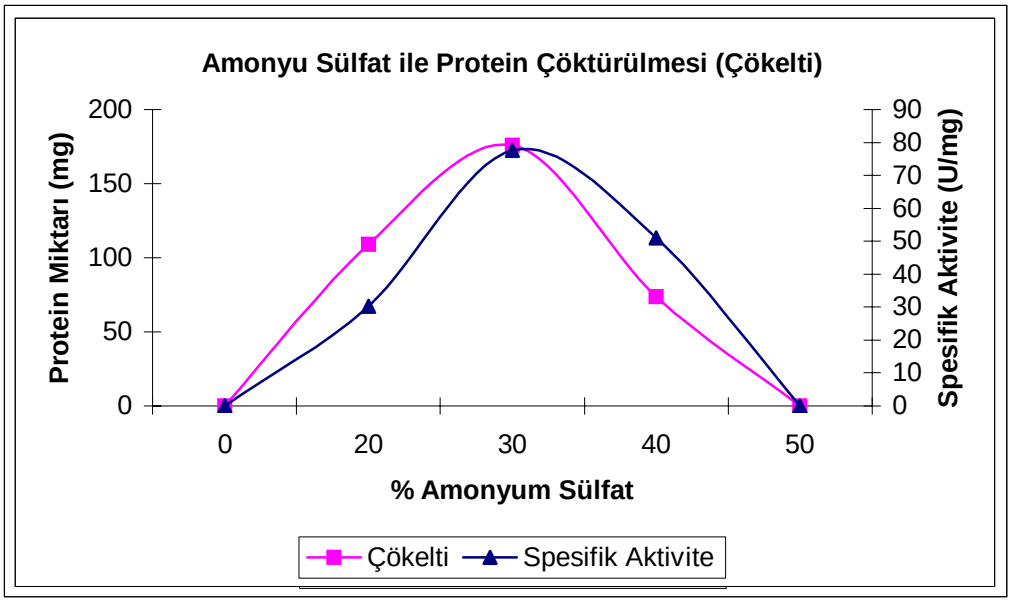


Şekil 4.3. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökelti ve çözeltide kalan protein miktarı.

Çizelge 4.3. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökelti ve çözeltide kalan protein miktarı.

% $(NH_4)_2SO_4$	Çökelti (mg protein)	Çözelti (mg protein)
0	0	317.10
20	109.20	201.60
30	175.75	130.20
40	73.50	71.40
50	0	69.93

Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 4.4'de verilmiş, şematik olarak da Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

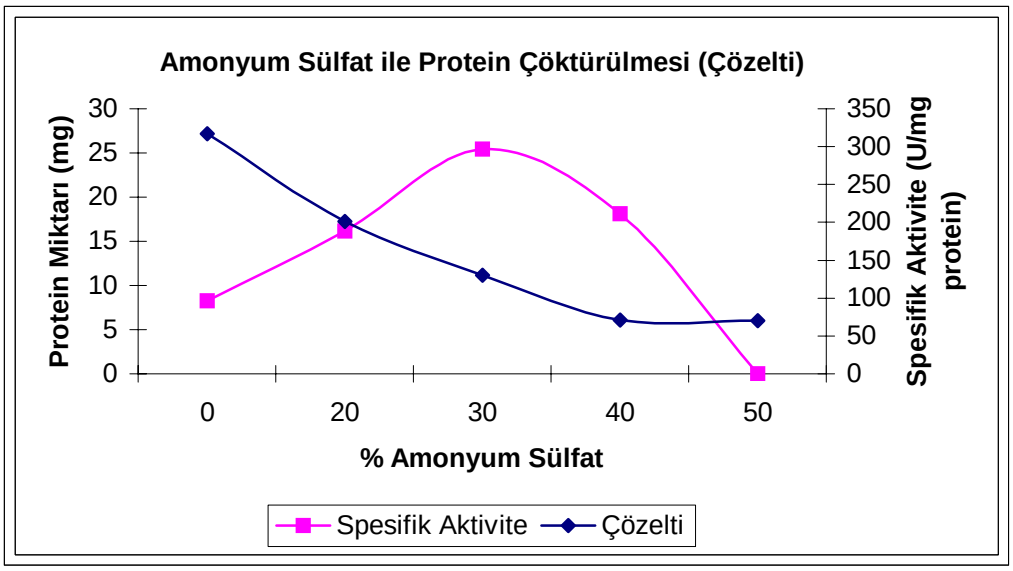


Şekil 4.4. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri.

Çizelge 4.4. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çökeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri.

% $(NH_4)_2SO_4$	**Çökelti (mg protein)**	**Spesifik Aktivite (U/mg protein)**
0	0	0
20	109.20	30.25
30	175.75	77.66
40	73.50	50.94
50	-	-

Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Şekil 4.5'de verilmiş, şematik olarak da Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.



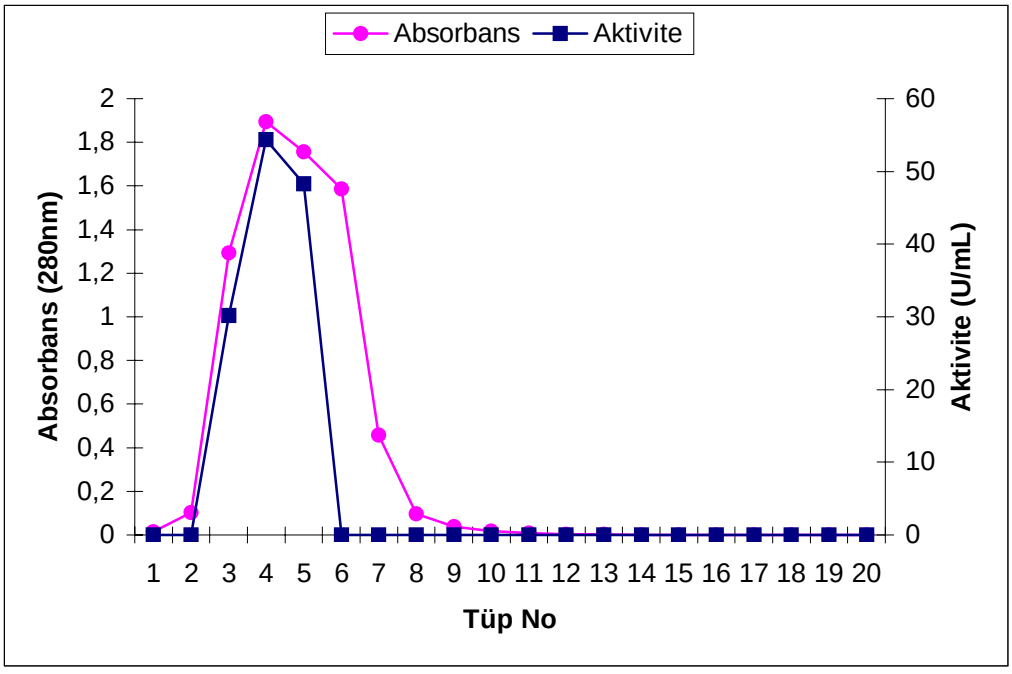
Şekil 4.5. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri.

Çizelge 4.5. Bezelye örneği için amonyum sülfat ile çöktürme sonucu % amonyum sülfat derişimine bağlı olarak çözeltinin sahip olduğu protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri.

% $(NH_4)_2SO_4$	**Çözelti (mg protein)**	**Spesifik aktivite (U/mg protein)**
0	317.10	8.26
20	201.60	16.13
30	130.20	25.47
40	71.40	18.14
50	69.93	-

4.1.4. $(NH_4)_2SO_4$ İle Çöktürme Sonucu En Yüksek Spesifik Aktiviteye Sahip % 30 luk Çökelti Fraksiyonlarının Sefaroz 6B jel Kromotografisine Uygulanması ile Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu en fazla spesifik aktiviteye sahip olan % 30 luk fraksiyonları pH=7.5 (4 ^{0}C) Tris-HCl tamponunda çözülmüş ve bu çözeltiden 3 ml alınmış ve 1.2x19 cm çapındaki sefaroz 6B kolonuna uygulanmıştır. Kolon daha önce Tris-HCl(pH=7.5 4 ^{o}C) tamponu ile dengeye getirilmiştir. Örneklerin kolondan alınması 4 ^{o}C ye kadar soğutulmuş pH=7.5 Tris-HCl tamponuyla yapılmıştır. Kolondan alınan eluatlar 3'er ml hacimde toplanmıştır. Bezelye için protein içeriklerini saptamak amacıyla 280 nm'de okunan absorbans değerleri sırasıyla Şekil 4.6'da şematik gösterimi sırasıyla Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Bezelye örneği için Sefaroz 6B kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunana absorbans değerlari ve 234 nm'de ölçülen aktivite değerleri (3 ml).

Bezelyenin kaba homojenattan başlayarak Sefaroz 6B kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Bezelye örneği için Sefaroz 6B kolonundan alınan eluatlarda 280 nm'de okunana absorbans değerleri ve 234 nm'de ölçülen aktivite değerleri (3 ml).

Tüp No	**280 nm deki Absorbans Değerleri**	**234 nm de Ölçülen Aktivite Değerleri**
1	0.016	0.000
2	0.102	0.000
3	1.294	30.2
4	1.894	54.4
5	1.756	48.3
6	1.587	0.000
7	0.458	0.000
8	0.097	0.000
9	0.038	0.000
10	0.018	0.000
11	0.008	0.000
12	0.002	0.000
13	0.002	0.000
14	0.000	0.000
15	0.00	0.000
16	0.00	0.000
17	0.00	0.000
18	0.00	0.000
19	0.00	0.000
20	0.00	0.000

Çizelge 4.7. Bezelye örneğinin kaba homojenattan başlayarak Sefaroz 6B kolonunu uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler.

Saflaştırma Basamağı	Vt (ml)	C Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/ml)	At (U) (VtxU/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı
Kaba Homojenat	560	14.09	7892.3	93.77	52511.2	6.65	1.00
Ultra Santrifüj	510	10.39	5299.5	70.47	35939.9	6.78	1.02
%30 $(NH_4)_2SO_4$ ile Çöktürme	210	0.837	175.75	65.00	13650.0	77.67	11.68
Sefaroz 6B Kromatografisi	3	0.124	0.373	59.00	177.00	475.81	71.55

4.2. Tartışma

Bu çalışmada lipoksijenaz enzimi bezelyeden Arens ve ark (1973)' nin önerdikleri metod esas alınarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sırasıyla; bezelyenin homojenizasyonu, ultrasantrifüj, %30 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve sefaroz 6B kromotografisi kullanılarak saflaştırılmış ve aktivite tayinleri yapılmıştır.

Çalışma için bezelye seçilmesinin amacı pek çok sebze ve meyvede bulunan lipoksijenazın daha önceden bezelyeden sınırlı sayıda saflaştırılmış olması bu anlamda literatürde sınırlı sayıda çalışma olması ve lipoksijenazın kullanım alanlarının sınırlı sayıda olup günlük hayatta önemli üretimlerde kullanılmasıdır.

Lipoksijenaz saflaştırma çalışmasında örneğin ilk homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 6.65 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Arens ve ark (1973)' nin bezelyeyle yaptıkları çalışmada örneğin ilk homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 2.6 U/mg protein olarak rapor edilmiştir.

Eriksson ve ark (1969)'nın bezelyeyle yaptıkları çalışmada örneğin ilk homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 2.4 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Elde edilen ilk homojenat 15 dakika 13000 g'de santrifüj edilmiş elde edilen supernatant da yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 6.78 U/mg protein olarak bulunmuş, örnek 1.02 kez saflaştırılmıştır.

Elde edilen supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda çökeltide yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 77.66 U/mg protein olarak bulunmuş örnek 11.68 kez saflaştırılmıştır.

Arens ve ark (1973)' nin bezelye ile yaptıkları çalışmada supernatant da yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değerini 6.2 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Eriksson ve ark (1969)'nın bezelye ile yaptıkları çalışmada supernatant da yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 2.6 U/mg protein olarak bulmuşlardır.

Bezelye için farklı amonyum sülfatla yapılan çöktürme işleminde 20, 30, 40, 50, 60 % derşiminde amonyum sülfat kullanılmış sonuç olarak en yüksek spesifik aktiviteye sahip olan çökelti derişimi % 30'luk amonyum sülfat olarak bulunmuş ve diğer basamaklarda bu % derişime sahip örnekler kullanılmıştır.

Arens ve ark (1973)' nin bezelyeyle yaptıkları çalışmada supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda çökeltide yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 11.7 U/mg protein olrak bulunmuştur.

Eriksson ve ark (1969)'nın bezelyeyle yaptıkları çalışmada supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda çökeltide yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik aktivite değeri 2.6 U/mg protein olrak bulunmuştur.

Eriksson ve ark (1969)'nın bezelye için farklı amonyum sülfatla yapılan çöktürme işleminde en fazla spesifik aktiviteye sahip olan çökelti derişimi %25'lik amonyum sülfat olarak bulunmuştur.

Bezelyeyle yaptıkları çalışmada supernatanta uygulanan amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucunda en yüksek spesifik aktivite gösteren %30'luk çökelti pH=7.5'lik Tris-HCl tamponunda çözülerek Sefaroz 6B kolonuna uygulanmıştır. Kolondan alınan eluatlarda yapılan lipoksijenaz enzim aktivite tayininde spesifik

aktivite değeri 475.81 U/mg protein olarak bulunmuş örnek 71.55 kez saflaştırılmıştır

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Bezelye lipoksijenazı için kaba homojenatta elde edilen spesifik aktivite değeri 6.65 U/mg protein olarak bulunmuştur.

2. Ultrasantrifüj sonucu elde edilen supernatantla yapılan çalışma sonucu lipoksijenaz enziminin spesifik aktivite değeri 6.78 U/mg olarak bulunmuş, örnek 1.02 kez saflaştırılmıştır.

3. Bezelye için amonyum sülfat ile yapılan çökeltme işlemlerinde çökeltiler incelendiğinde en yüksek aktivite değeri gösteren çökeltiye % 30'luk çökeltide rastlanmıştır.ve spesifik aktivitesi 77.66 U/mg protein olarak bulunmuş, örnek 11.68 kez saflaştırılmıştır.

4. Sefaroz 6B kromotografisi ile yapılan bir sonraki saflaştırma basamağında lipoksijenaz enziminin spesifik aktivitesi 475.81 U/mg protein olarak bulunmuş, örnek 71.55 kez saflaştırılmıştır.

5. Yapılan saflaştırma işleminde, amonyum sülfatla çöktürme aşamasında protein miktarında ve enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Homojenizasyon aşamasında fenil metil sulfonil florür eklenmesiyle bu kayıp en aza indirilebilir.

KAYNAKLAR

ARENS, D., SEILMEIER, W., WEBER, F., KLOOS, G., GROSCH, W., 1973. Purification and properties of a carotene co-oxidizing lipoxygenase from peas. Biochim. Biophys. Acta 327:295-305

BARONE, R., BRIANTE, R., D'AURIA, S., FEBBRAIO, F., VACCARO, C., GUIDICE, L.D., BORELLI, G.M., FONZO, N.D., NUCII, R., 1990. Purification and Characterization of Lipoxygenase Enzyme from Durum Wheat Semolina.Journal of Agricultural Food Chemistry, 47:1924-1931.

CARMONA F.G.GILABERT M.P., 2002. Chromatographic analysis of lipoxygenase products. Anaytica Chimica Acta 465:319-335.

CATHERINE N.S.P. SUURMEIJER, MANUELA PEREZ-GILABERT, HARRY T.W.M. VAN DER HIJDEN, GERRIT A. VELDINK, JOANNES F.G.VLIEGENTHART, 1998. Purification, Product Characterization and Kinetic Properties of Soluble Tomato Lipoxygenase. Plant Physıol.Bıochem., 36(9):657-663**.**

CHRISTOPER, J., PISTORIUS, E., AXELROD, B., 1970. Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase. Biochim. Biophys. Acta 198:12-19.

DELICADO, E.N., SOJO, M.M., FERRER, A.S., CARMONA, F.G., 1999. Hydroperoxidase activity of Lipoxygenase in the Presence of cyclodextrins. Archives of Biochemistry and Biophysics, 367:274-280.

DODERER, A., KOKKELINK, I., VAN DER VEEN, S., VALK, B.E., SCHRAM, A.W., DOUMA, A.C., 1992. Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. Biochim. Biophys. Acta 1120:97-104.

GALLIARD, T., PHILLPS, D.R., 1971. Lipoxygenase from potato tubers. Partial purification and propetries of an enzyme that specificakky oxygenates the 9-position of linoleic acid. Biochem. J. 124:431-438.

GILABERT, M.P., BRU, R., FERRRER, A.S., CARMONA, F.G., 1998. Hydroperoxidase Activity of Soybean Lipoxygenase in Reverse Micelles. Journal of Biotechnology, 60:137-140.

GRECHKIN, A., 1998. Recent develoments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Pro Lipid Res. 37(5):317-52.

IVANOV, I.V., ROMANOV, S.G., GROZA, N.V., NIGAM, S., KHUN, H., KIM, I.S., DROSCH, W., 1979. Partial purification of a lipoxtgenase from apples. J. Agric. Food Chem. 27:243-246.

JOSE MANUEL LOPEZ-NICOLAS, MANUELA PEREZ-GILABERT, AND FRANCISCO GARCIA-CARMONA 2001. Eggplant Lipoxygenase (Solanum Melongena): Product Characterization and Effect of Physicochemical Properties of Linoleic Acid on the Enzymatic Activity.J.Agric. Food Chem., 49:433-438.

KERMASHA, S., DIOUM, N., BISAKOWSKI, B., VEGA, M., 2002. Biocatalysis by immobilized lipoxygenase in a ternary micellar system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 19-20:305-317

KNAPP, M.J., SEEBECK, P., KLINMAN, J.P, 2001. Steric Control of Oxygenation Regiochemistry in Soybean Lipoxygenase-1. Journal of American Chemical Society, 2001:2931-2932

KULKARNI, A.P., 2001. Lipoxygenase-a Versitale Biocatalyst for Biotransformation of Endobiotics and Xenobiotics. Cellular and Molecular Life Science, 58:1805-1825.

LEHNERT, N., SOLOMON, E.I., 2003. Density- Functional İnvestigation on the Mechanism of H-atom Abstraction by Lipoxygenase. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 8:194-305

NELSON, M.J., AND SEITZ, S.P., 1994. The structure and function of lipoxygenase. Curr. Opin. Struct. Biol. 4:878-884

RIOUX, N., CASTONGUAY, A., 1998. Inhibitors of Lipoxygenase: a New Class of Cancer Chemopreventive. Carcinogenesis, 19(8):1393-1400

ROY, P., KULKARNI, A.P., 1996. Oxidation of Ascorbic Acid by Lipoxygenase: Effect of Selected Chemicals. Food Chmical Toxicology, 34:563-570

SADIK, C.D., SIES, H., SCHEWE, T., 2003. Inhibition of 15- Lipoxygenase by flavonoids: Structure-activity Realitions and Mode of Action. Biochemical Pharmacology, 7459:1-9

SANDERS, T.J., PATTE, H.F., SINGLETON, J.E., 1975. Lipoxygenase isozymes of peanut. Lipids 10:681-685

SHIBATA, D., AXELROD B., 1995. Plant lipoxygenase. J Lipid Mediat Cell Signal. 12:213-28

TELEFONCU, A.,1996. Protein Saflaştırma Ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir-Türkiye, 272s.

VAN AARLE, P.G.M., DE BARSE, M.M.J., VELDINK, G.A., VLIEGENHART, J.F.G., 1991. Purification of a lipoxygenase from ungerminated barley. Characterization and product formation. FEBS Lett. 280:159-162.

WHITAKER, J.R., 1972, Principles of Enzymology for The Food Sciences, Fennema O., R., Wisconsin, Newyork and Basel, 1-639s.

ÖZGEÇMİŞ

1978'de Adana'da doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Adana'da tamamladım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde eğitimime başladım. 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümünde yüksek lisansa başladım.