ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağlar AKAR

KATALAZ ENZİMİNİN CEVİZDEN (*Juglans regia*) SAFLAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2015

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATALAZ ENZİMİNİN CEVİZDEN (*Juglans regia*) SAFLAŞTIRILMASI

Çağlar AKAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez ../../2015 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

…….....	……	…….....
Prof. Dr. Ramazan BİLGİN	Prof. Dr.Seyhan TÜKEL	Doç. Dr. M. Kemal SANGÜN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2013YL29

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KATALAZ ENZİMİNİN CEVİZDEN (*Juglans regia*) SAFLAŞTIRILMASI

Çağlar AKAR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl: 2015, Sayfa: 49
Jüri : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
: Doç. Dr. M. Kemal SANGÜN

Bu araştırmada, cevizden (*Juglans regia*); ilk kez katalaz (E.C.1.11.1.6) enziminin saflaştırılması, kinetik özellikleri (Km, Vmax), termal ve depolama kararlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Enzimin kısmen saflaştırılmasında; homojenizasyon, ultrasantrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve PD-10 (Sephadex G-25M) kolon kromotografisi basamakları sırasıyla uygulanmıştır. Saflaştırılan katalaz'ın optimum pH değeri 8,0 ve optimum sıcaklığı 25°C'dir. Katalaz'ın 25°C'deki termal kararlılığı 40°C'ye göre ve 4°C'deki depolama kararlılığı 25 °C göre daha yüksek bulunmuştur. Km ve Vmax kinetik parametreleri sırasıyla 10,4 mM ve 159,4 U/mg prot. bulunmuştur. Enzimin 53 kDa'luk 4 eşit alt üniteye sahip olduğu ve molekül ağırlığı 212 kDa olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ceviz, Katalaz, Saflaştırma, Karakterizasyonu, Kinetik Parametre

ABSTRACT

MSc THESIS

PURUFICATION OF CATALASE FROM THE WALNUT (*Juglans regia*)

Çağlar AKAR

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Year: 2015, Pages: 49
Jury : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
: Assoc Prof Dr. M. Kemal SANGÜN

In this study, we aimed to purify first time catalase enzyme (E.C.1.11.1.6) from walnut (*Juglans regia*), to determine kinetic parameters (K_m, V_{max}), thermal and storage stabilities of the purified catalase. In the partial purification of catalase enzyme homogenization, ultracentrifugation and PD-10 (Sephadex G-25M) column chromotography steps were used. The optimal pH value of catalase was 8.0 and its optimal temperature was 25°C . Thermal stability of catalase at 25 °C compared to 40 °C and 4 °C in storage stability was higher than 25 °C. K_m and V_{max} values were 10,4 mM and 159,4 U/mg prot. , respectively. It was determined that the enzyme had 4 equal subunits each weighting 53 kDa and had a total having molecular weight of 212 kDa.

Keywords: Walnut, Catalase, purification, characterization, kinetic parameters

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince, gerek bilimsel konularda gerekse manevi anlamda benden yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr. Ramazan BİLGİN' e bana her zaman gösterdiği ilgi, sabır, iyi niyet ve güler yüzü için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda her zaman desteklerini gördüğüm hocalarım Prof.Dr. Seyhan TÜKEL ve Prof.Dr Güzide YÜCEBİLGİÇ'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile izlemem gereken yöntem ve metodlar hakkında sürekli beni bilgilendiren ve desteğini benden esirgemeyen Doç.Dr. Deniz YILDIRIM'a Dr. Dilek ALAGÖZ'e ve Arş. Gör. Ali TOPRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım boyunca beni manevi olarak destekleyen arkadaşlarım Mustafa Kemal ÇAĞLAR , Yakup AKKOÇ ve Özge CAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana destek olan eşim Emine AKAR' a, kızım Başak'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
1. GİRİŞ 1
1.1. Protein saflaştırılması 1
1.2. Protein saflaştırmasında kullanılan temel teknikler 2
1.2.1 Hücre parçalanması / Homojenizasyon 2
1.2.2. Çöktürme 3
1.2.3. Kromatografik Yöntemler 3
1.3.Protein Tayin Yöntemleri 4
1.4. Enzimler 4
1.4.1. Katalaz Enzimi 5
1.4.2. Katalaz Enziminin Kullanım Alanları 6
1.5. Ceviz 7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
3. MATERYAL VE METOD 13
3.1. Materyal 13
3.1.1.Kimyasallar 13
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 14
3.2. Metod 15
3.2.1. Enzimin Saflaştırılması 15
3.2.1.1. Katalaz Enzimi İçin Homojenatın Hazırlanması 15
3.2.1.2. Katalaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürmesi 15
3.2.1.3. Proteinlerin PD-10 Kolonuna Uygulanması 15
3.2.2. Enzim Aktivitesini Ölçülmesi 16

3.2.2.1. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini 16
3.2.2.2. Protein Tayini 16
3.2.2.3. Optimum pH' ın belirlenmesi 17
3.2.2.4. Katalaz Enzimi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi ... 17
3.2.2.5. Katalaz Örneklerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi 18
3.2.2.6. Katalaz Örneklerinin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi 19
3.2.2.7. Katalaz Enzimini İçin Km ve Vmax Değerlerinin Bulunması İle İlgili Çalışmalar 19
3.2.2.8. Native PAGE Elektroforezi 19
3.2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 25
4.1. Bulgular 25
4.1.1. Protein Miktarı ile İlgili Bulgular 25
4.1.2. Ceviz (Juglans regia) Ekstraklarında Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular 25
4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular 26
4.1.4. PD-10 Kolon Çalışması Sonucu Elde Edilen Bulgular 26
4.1.5. Optimum pH'ye Ait Bulgular 28
4.1.6. Optimum Sıcaklık ile İlgili Bulgular 28
4.1.7. Termal Kararlılık İle İlgili Bulgular 29
4.1.8. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığına Ait Bulgular 30
4.1.9. Katalaz Enziminin Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 30
4.1.10.Katalaz Enziminin Moleküler Ağırlığının Tayini 32
4.2. Tartışma 36
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 41
5.1. Sonuçlar 41
5.2. Öneriler 42
KAYNAKLAR ..... .43
ÖZGEÇMİŞ 49

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Hücre parçalama teknikleri 2
Çizelge 3.1. % jel konsantrasyonlarına karşı eklenmesi gereken maddeler 20
Çizelge 3.2. Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler 22
Çizelge 4.1. PD-10 kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve aktivite değerleri 27
Çizelge 4.2. Standart proteinlerin göç hızlarına karşı log Molekül ağırlıkları 33
Çizelge 4.3. Standart proteinlerin göç hızlarına karşı log Molekül ağırlıkları 35
Çizelge 4.4. Katalaz enziminin kaba homojenattan başlayarak PD-10 kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler..... 36

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Standart protein eğrisi 25
Şekil 4.2. PD-10 kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve aktivite değerleri..... 27
Şekil 4.3. PD-10 kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı pH' larda ölçülen spesifik aktivite değerleri 28
Şekil 4.4. PD-10 kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı sıcaklıklarda ölçülen spesifik aktivite değerleri 29
Şekil 4.5. Katalaz enzimi için bağıl aktivitenin süreye bağlı değişimi 29
Şekil 4.6. Katalaz örneğinin bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi 30
Şekil 4.7. Katalaz için Michealis-Menten grafiği..... 31
Şekil 4.8. Katalaz için Lineweaver-Burk grafiği..... 31
Şekil 4.9. Katalaz enzimine ait SDS-PAGE elektroforez sonuçları..... 32
Şekil 4.10. SDS-PAGE jel elektroforezinde standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı yürüme hızları..... 33
Şekil 4.11. Katalaz enzimine ait Native PAGE elektroforez sonuçları..... 34
Şekil 4.12. Native PAGE jel elektroforezinde standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı yürüme hızları..... 35

KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
Prot	: Protein
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: N,N,N',N'-Tetra Metil Etilen Diamin
APS	: Amonyum persülfat
Km	: Michaelis-Menten Sabiti
Vmax	: Doygun substrat derişiminde enzimin ulaşabileceği maksimum hız.

1.GİRİŞ

1.1. Protein saflaştırılması

Proteinler çok yüksek düzeyde heterojen özellik taşıyan makro moleküllerdir. Biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Proteinler hücre ve organizmalarda canlılık için önemli olan kataliz, yapı, savunma, depo, transport gibi pek çok fonksiyonu gerçekleştirir. Canlı yaşamında proteinlerin önemli olması nedeniyle yapılarının ve biyokimyasal özelliklerinin araştırması gereklidir. Proteinler birbirlerinden farklı oldukları gibi biyolojik aktivitelerini gösterebilmeleri için pH, sıcaklık vb. faktörler dikkate alınmalıdır. Bu nedenle istenilen proteinin saf olarak izole edilmesi çok güçtür.

Her bir protein için saflaştırma süreci ilgili protein için spesifiktir. Protein saflaştırmasının temel amacı ve buna bağlı olarak saflık kriterleri değişir. Proteinin yapısı analizlenecekse yüksek saflıkta örneğe ihtiyaç vardır. Endüstriyel kullanımda ise yüksek miktarda, kararlı, düşük maliyette, saflık oranı yüksek olmayan örneklerden söz edilir. Gerçekçi bir yaklaşımla %100 saflık beklemek mümkün değildir.

Protein saflaştırılmasında ilk adım iyi bir literatür taramasıyla ilgili proteinin fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri hakkında bilgi toplamaktır. İlgili proteinin kaynakları, moleküler yapısı, hücre içindeki konumu saflaştırma sürecinin belirlenmesinde yardımcıdır.

Protein saflaştırma çok adımlı bir süreçtir ve her adımda toplam protein miktarının belirlenmesi saflaştırmanın gidişatını izlemek için gereklidir. Pratikte esas olarak biyolojik ve biyokimyasal aktivitelerin belirlenmesidir. Be nedenle hedef proteine özel analiz yöntemine ihtiyaç vardır. Eğer saflaştırılan enzimse ilave olarak aktivite tayinleri yapılır. Önemli bir faktörde saflaştırma adımının verimidir. (Scopes,1994).

1.2 Protein saflaştırmasında kullanılan temel teknikler

Saflaştırmanın hedefi ucuz ve etkili yöntemler ile yüksek saflık ve verim ile protein kazanmaktır. Saflaştırmada kullanılacak tekniklerin seçimi ve sıralaması çok önemlidir.

Protein saflaştırmada uygulanacak teknikler genel olarak aşağıdaki sırayı izler:

- Homojenizasyon
- Çöktürme
- İyon değişim kromatografisi
- Afinite kromatografisi
- Jel Geçirgenlik kromatografisi

1.2.1 Hücre parçalanması / Homojenizasyon

Genel olarak hücre parçalama teknikleri mekanik ve mekanik olmayan kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılır.

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

Çizelge 1.1 Hücre parçalama teknikleri

Mekanik olmayan/Kimyasal	Mekanik veya Fiziksel
Isı ile parçalama Dondurma- eritme Litik enzimler Alkali ile muamele Deterjanlar	Blender, öğütücü, homojenizatör Aşındırıcı ile agitasyon Sıvı ve katı ekstrüsyon(French Pres) Ultrasonikasyon

İzolasyon sırasında farklı adımlarda partiküllerin uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla ;

- Santrifüj, ultrasantrifüj
- Mikrofilitrasyon

teknikleri kullanılır.

Homojenat içinde bulunan bir bileşenin ayrılması zamana, devir sayısına, partikül büyüklüğüne ve yoğunluğuna bağlıdır.

1.2.2. Çöktürme

Saflaştırma adımı sonrası proteinlerin konsantre edilmesinde veya izolasyonunda kullanılır. Çözünürlüğü etkileyen yapı, boyut, yük, polarite gibi etmenler yöntemin prensibini oluşturur. En sık kullanılan yöntemlerden biri iyonik şiddeti artırarak çöktürmedir (Salting out). Amonyum sülfat çöktürmesi olarak bilinir. Yüksek konsantrasyonda tuz ilavesiyle çözünürlüğün azalması prensibine dayanır.

1.2.3. Kromatografik Yöntemler

Kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan birçok farklı yöntemi içinde barındıran yöntemdir. Kromatografide 2 faz vardır:

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

1.3.Protein Tayin Yöntemleri

Bir çözeltideki toplam proteinin miktarının belirlenmesi, protein veriminin ve saflığının kontrolünde oldukça önemlidir. Protein ve enzimlerle çalışılırken UV ve görünür bölge spektrometresi yaygın olarak kullanılır. Birçok protein tayin yönteminde bilinen bir proteinin kullanılmasıyla çizilen standart grafikler yardımıyla bilinmeyen örneğin miktarı bulunur.

Protein tayininde UV bölgede kuartz küvetlerle, 320 nm nin üzerinde ise cam ve kuartz küvetlerle çalışılabilir.

Proteinler 190 nm de maksimum absorbans değerleri gösterse de bu dalga boyunda kullanılan tamponlardaki iyonlar ve karboksilik asitlerde absorbans verdiği için uygun değildir. Buna karşın triptofandaki indolik gruplar ve trozindeki fenol halka sistemleri 260-280 nm de protein tayini için uygun absorbans verirler. 280 nm deki absorbans değerleri protein miktarını kabaca verir (Scopes,1994).

1.4. Enzimler

Enzimler reaksiyonları hızlandıran, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır.

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 1982;Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. 25 °C'de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).

1.4.1. Katalaz Enzimi

Katalaz enzimi (H_2O_2: H_2O_2 oxidoreductase E.C.1.11.1.6) tabiatta çok yaygın olarak bulunmaktadır. Hemen hemen tüm aerobik mikroorganizmalarda, bitki ve hayvan hücrelerinde katalitik aktivitesi yüksek konsantrasyonda mevcuttur. Katalaz oksidoredüktazların bir grubu olan hidroperoksidazlar sınıfında yer alır. Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit veya diğer organik peroksitleri kullanırlar (Higashi ve ark. 1974; Halliwel ve ark. 1990; Nicholls ve ark. 2000).

Wieland 1927'de katalazın oksidasyon mekanizmasını ortaya çıkararak H_2O_2'in elektron vericisi olduğunu belirtmiştir. Stern 1936'da katalazın aktif bölgesinde protoporfirin IX aktif grubunun bulunduğunu gösterirken 1 yıl sonra Summer ve Dounca ilk sığır karaciğeri katalazını (BLC) kristal olarak elde etmeyi başarmışlardır. 1947 yılında Chance katalaz ve hidrojen peroksit arasında oluşan birinci kompleksi (Bileşik I) keşfetmiştir. Katalaz aktif bölgesinde ***hem*** grubu (Protoporfirin IX halkası) içerir. Farklı kaynaklara ait katalaz moleküllerinin çoğu ***hem b*** prostetik grubunu içerirken, az sayıda mantar ve bakteriyel katalaz ***hem d*** grubunu içermektedir.

Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesini katalizleyen ve böylece hidrojen peroksitin hücresel bileşiklere zarar vermesini engelleyen koruyucu bir enzimdir. Katalazın reaksiyon mekanizması aşağıda kısaca verilmiştir. Reaksiyon önce bir molekül H_2O_2'in indirgendiği, ardından da ikinci bir H_2O_2 molekülünün yükseltgendiği 2 basamak üzerinden yürür.

$$H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \rightarrow H_2O + O{=}Fe^{\bullet +}(IV)\text{-}E$$

Porfirin katyon radikali (Bileşik I)

$$H_2O + O{=}Fe^{\bullet +}(IV)\text{-}E \rightarrow O_2 + H_2O + Fe(III)\text{-}E$$

1.4.2. Katalaz Enziminin Kullanım Alanları

Ağartma işleminin birinci amacı pamukta istenmeyen renkli safsızlıkları gidermektir. Ağartma işleminde oksidatif ağartma maddeleri kullanılır. Oksidatif ağartma maddelerinin en önemlilerinden biri olan hidrojen peroksit pamuklu mamüllerin ağartılmasında daha çok kullanılır. Pamuk üzerindeki bütün yabancı maddelerin oksitlenmesi bittikten sonra ortamda H_2O_2 kalır ve ağartmaya devam edilirse lifler zarar görmüş olur.

Kumaşın H_2O_2 ile ağartılmasından sonra boyama işleminden hemen önce H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntem su ile yıkamaktır. H_2O_2 içeren yıkama suyundaki H_2O_2'nin parçalanması ve yıkama suyunun tekrar sisteme kazandırılması için katalaz enziminden faydalanılabilir (Paar, 2002).

Lakkaz enzimi, açık renk boyanacak kumaşlar için yeterli bir beyazlık sağlayamadığından kumaştan iyi bir beyazlık istendiğinde peroksit ağartması ve dolayısıyla katalaz enzimi kullanımı kaçınılmaz olmaktadır (Sancar, 2012).

Katalaz enzimi, kontak lens hijyeninde, H_2O_2 solüsyonu kullanılarak lensin dezenfekte edilmesinde kullanılmaktadır. Katalaz enzimi içeren solüsyon, kontakt lensin tekrar kullanılmadan önce ortamdaki H_2O_2'in parçalanmasını sağlamaktadır (İnal, 1998).

UV ışınları serbest radikal oluşumunu hızlandırır. Serbest radikaller ise deriye zarar verir ve deri yapısında bozulmalara neden olur. Günümüzde serbest radikaller deri yaşlanmasının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. Antioksidan moleküller değişik etkiler göstererek derinin oksidasyon sonucu gördüğü zararı azaltır. Son zamanlarda katalaz enzimi, epidermisin üst tabakalarındaki hücresel oksitlenmeyi artırmak amacı ile H_2O_2 ve enzimden oluşan

ve yüze uygulanan değişik maske uygulamaları için ve vitiligo tedavisinde de kullanılmaktadır (Rieger, 1993; Schallreu , 2002).

Sıcak bölgelerde sütün sağılmasından sonra işlenmesine kadar geçen sürede veya peynir altı suyunun işlenmek üzere taşınması sırasında mikrobiyal kirleticilerin çoğalmasının engellenmesi için soğutmaya alternatif olarak Dünya Gıda ve Tarım Örgütü ve Birleşmiş Milletler Tarım Örgütünün izin verdiği miktarlardaki H_2O_2 (% 0,05-% 0,25) süte eklenmektedir. Ancak, sütün işlenmesinden hemen önce sütteki (veya peynir altı suyundaki) H_2O_2'nin toksik etkisinin önlenmesi için katalaz enzimi kullanımı önerilmektedir (Tarhan 1995, Uhlig 1998).

PET şişelerin ve plastik kapların düşük sıcaklıklarda sterilizasyonu amacıyla kullanılan H_2O_2'nin işlem sonrasında uzaklaştırılması amacıyla katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Lida ve ark., 2000).

Kağıt sanayinde kağıdın ağartılmasından sonra kalan H_2O_2'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Wiseman,1986).

Glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile birlikte glukonik asit üretiminde ve glukoz veya oksijenin gıdalardan uzaklaştırılmasında katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Godjevargova ve ark., 2004).

H_2O_2'nin miktarının belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Ertaş ve ark., 2004; Varma ve ark., 2005; Salimi ve ark., 2005; Jiang ve ark, 2008; O'Brien ve ark., 2007; Modrzejewska ve ark. 2007; Prakash ve ark., 2009).

Yaban turpu peroksidazı (HRP) ile nitrit miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Chen ve ark., 2008).

Meyve suları gibi çeşitli örneklerde azit miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde kullanılabilmektedir (Sezgintürk ve ark., 2005)

1.5. Ceviz

Juglans cinsinden olan cevizin 21 türü vardır. Bu türler içerisinde en çok *Juglans regia* türünün (adi ceviz, İran cevizi, Türk cevizi, İngiliz cevizi) ticareti ve

kültürü yapılmaktadır. Bütün dünyada meyvesi için yetiştirilen tek türdür. Bunun yanında *J. nigra L.*'de özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde kerestesi için yetiştirilmektedir (Rom ve Carlos, 1987).

Anavatanı Anadolu olarak da gösterilen ceviz (*Juglans regia L.*) Balkanlardan, Türkiye, Lübnan, Irak'ın kuzey bölgeleri, İran, Kafkas dağları, Afganistan ve Çin'e kadar olan bölgede doğal yayılım göstermektedirler. Farklı bölgelerde yetişen cevizler içinde *Juglans regia L.* büyüklüğü, tatlılığı, ince kabuğa sahip olması ve kolay kırılması nedeniyle en fazla yetiştirilen ve en fazla ticari öneme sahip olan türdür (Bakkalbaşı ve ark , 2010).

Ceviz (*Juglans regia L.*), sert kabuklu meyveler içerisinde yer almaktadır. Cevizin kabuklu meyve ağırlığı, çeşitlerin genetik yapısı ve ekolojik koşullara göre değişmekle birlikte 2 - 25 g arasında değişebilmektedir. (Koçtürk ve Gürhan, 2007).

Ceviz, besin değeri yüksek meyvesi ve mobilya endüstrisinde kullanılan ağacı itibariyle büyük önem taşır. Ceviz ağacı uzun ömürlüdür; gençlik devresindeki kuvvetli büyüme gücü ve kuvvetli kökleri dolayısıyla yamaçlarda erozyona karşı ve yol kenarı ağaçlandırmalarında da kullanılır. Kuraklığa çok dayanıklı ve diğer meyve türlerine nazaran hastalık ve zararlılara daha mukavimdir (Ölez ve Yücel, 1974).

Ceviz içerdiği yüksek besin içeriği dolayısı ile Anadolu insanı tarafından geçmiş zamanlardan günümüze kadar tüketilmiştir. Yüksek besin değerine sahip olan ceviz; yağ (% 50-80), protein (12-15), mineral bileşik (% 3), karbohidrat, vitamin ve bütün amino asitlerin kaynağı ve içerdiği düşük şeker (% 2.5-4) miktarından dolayı da iyi bir diyet meyvesidir (Mitrovic ve ark., 1997)

Van ili ve Bahçesaray ilçesinden toplanan 20 adet ceviz tipi üzerinde yapılan çalışmada yağ oranı % 62.08-70.16, protein içeriği % 12.87-18.97, nem miktarı % 2.13-3.59 ve kül miktarı % 0.84-2.12 arasında bulunmuştur (Koyuncu ve ark , 2002).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Seriner, (2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) katalaz enzimini; amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kolon kromatografisi kullanarak saflaştırmıştır. Katalaz enziminin spesifik aktivite değeri 26 U/mg protein olarak bulunmuş, DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırmanın son basamağında 393 U/mg protein olarak saptamıştır.

Kara, (2008), Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (*Cucurbita maxima* ve *Moschata*) katalaz enzimini saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Enzim için optimum pH, optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 6,8-7,0 ve 25 °C olarak bulunmuştur. *Cucurbita maxima* için K_m= 17,68 mM, V_{max} = 81,300 EÜ / mL; *Cucurbita moschata* için K_m = 20,029 mM, V_{max} = 58,139 EÜ / mL olarak belirlemiştir.

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

Demir, (2006), Aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından katalaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmıştır. Katalaz enziminin, spesifik aktivite değeri 89.68 EU/mg protein olarak bulunmuş, enzimin molekül ağırlığı, SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi ile 60,95 kDa olarak saptamıştır. Enziminin K_m değeri H_2O_2 için 7,87mM, V_{max} değeri H_2O_2 için 42,19 EU/mL olarak bulunmuştur.

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

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

Sondaş, (2005), Nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden katalaz enziminin kısmı saflaştırılması, karekterizasyonu ve bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Nane bitkisinde optimum pH 6,0 , optimum sıcaklık 40 ^{o}C , V_{max} değeri 108,69 EU/ml ve K_m değeri 1,175 mM olarak, pırasa bitkisinde optimum pH 7,5 , optimum sıcaklık 30 ^{o}C , V_{max} değeri 50 EU/ml ve Km değeri 1,172 mM olarak bulunmuştur.

Yörük ve ark., (2005), Van elmasından (G*olden delicious*) katalazı saflaştırmış ve bazı özelliklerini incelemiştir. Enzimin spesifik aktivitesini 29.43 U/mg protein olarak belirlemiştir. Optimum sıcaklığı 50^{o}C ve optimum pH 5,0 olarak bulunmuştur.

Kailash, (2004), Keten tohumundan izole edilen keten lignanı bileşiğinin hipo kolesterolemik ve antiarteriosklerozik etkisini incelemiştir. Bu çalışmada keten tohumundan izole edilen enzim homojenatında katalaz enziminin kinetik aktiviteleri incelenmiş ve katalaz enziminin davranışları rapor edilmiştir.

Köksal, (2003), Katalaz enziminin karalahana bitkisinden *(Brassica oleracea L.Var. Acephala D.C.)* saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı pestisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karalahanadan kısmi olarak saflaştırılan katalaz enziminin optimum pH 7,8 ve optimum sıcaklık 25 ^{o}C olarak bildirilmiştir. K_m ve V_{max} değerleri 0,0159 M ve 588,2 EU/ml olarak bildirilmiştir.

Dinçer, (2000), Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden katalaz enzimini saflaştırmıştır. Katalazı rokadan (*Eruca sativa*) saflaştırmak için sephadex G-25 kolon kromatografisi ve Q-sefaroz kolonu kullanmıştır. Katalazın spesifik aktivitesini 29865 U/mg , optimum pH 7,0-10,0 arasında, optimum sıcaklık 30^{o}C ve K_m değerini 62,5 mM olarak belirlemiştir.

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

Beaumont ve ark (1990), Patates kökünden (*Solanum tuberosum*) katalazı; AcA-34 ultrajel kolonu ile saflaştırmışlardır. Yapılan aktivite çalışmaları sonucu enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 EÜ/mg protein değerinde saptamışlardır. Bir diğer çalışmada ise enzimin molekül ağırlığı 224 kDa bulunmuştur. Ayrıca bu araştırmada enzim için siyanid ve azid inhibitörleri kullanmışlardır.

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

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

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma, St. Louis, MO, Merck firmaları tarafından sağlanmıştır. Araştırmada enzim kaynağı olarak kullanılan ceviz (*Juglans regia*) örneği Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

3.1.1.Kimyasallar

PVP (çözünebilir polyvinylpyrolidone)
Dithiothreitol
EDTA
PEG-4000 (polyetylen gylycol-4000)
Sephadex G-25M
Fosforik asit
Asetik asit
Borik asit
Trisodyum sitrat dihidrat
Hidrojen peroksit
Hidroklorik asit
Sodyum hidroksit,
$CuSO_4.5\ H_2O$
Folin-ciocalteu çözeltisi,
Sodyum karbonat
Sığır serum albümin (BSA)
Amonyum sülfat
Bakır klorür
Trizma base

Trizma hydrochloride
Akrilamid
Bis akrilamid
Bromofenol Mavisi
Glisin
Amonyum Persülfat
Gliserol
Metanol
Asetik Asit
TEMED
Formaldehit
$Na_2S_2O_3.5H_2O$
Gümüş nitrat
Na_2CO_3
Coomassie Brilliant Blue

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV-Vis Spektrofotometre (UNICAM)
pH Metre (Hana 8417)
Elektroforez (Bio Rad)
Magnetik Karıştırıcı (Are)
Kromatoğrafi Kolonları
Santrifüj (Jouan MR 23i)
Etüv (ES 500)
Otomatik Pipet (Eppendorf)
Elektronik Terazi

3.2. Metod

3.2.1. Enzimin Saflaştırılması

3.2.1.1. Katalaz Enzimi İçin Homojenatın Hazırlanması

Antioksidan enzimlerin ekstraksiyonunda Malgorzata M. ark. (2004) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,5 g ceviz; 0,5 g sulandırılmış PVP (çözünebilir polyvinylpyrolidone), 2 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA ve 1,25 mM PEG-4000 eklenmiş, 25 mL 50 mM pH= 7,0 Fosfat tamponu içerisinde homojenize edilmiştir. Sonrasında ultra santrifüj tüplerine alınarak 10,000xg 4 ^{o}C'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant filtre kâğıdı ile süzülmüştür.

3.2.1.2. Katalaz Enzimi İçin Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Cevizden (*Juglans regia*) elde edilen homojenatlara sırasıyla % 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı $(NH_4)_2SO_4$ yavaş yavaş eklenmiştir. Amonyum sülfat çözündükten sonra 1 saat bekletilip çöktürme işlemi 10.000x*g*'de 20 dakika boyunca yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpernatantta aktivitelere bakılmıştır. Katalaz enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir.

3.2.1.3. Proteinlerin PD-10 Kolonuna Uygulanması

Katalaz enzimini içeren 1 mL enzim ekstraktı Sephadex G-25 M jeli içeren kolona uygulanmıştır. Örneklerin kolondan alınması 25 mM pH=8,0 Tris-HCI tamponu ile yapılmıştır. Protein örnekleri 1,5 mL hacmindeki tüplerde toplanmış ve toplanan her tüp için protein miktarına, katalaz enzim aktivitelerine bakılmıştır.

3.2.2. Enzim Aktivitesini Ölçülmesi

3.2.2.1. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini

Reaktif olarak 50 mM pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde % 0.036 (w/w) hidrojen peroksit çözeltisi ve katalaz enzimi içeren ekstraktlar kullanılmıştır.

UV küvetlerinin birine 2.9 mL hidrojen peroksit çözeltisi ve 0.1 mL enzim çözeltisi, diğer küvete ise 50 mM pH=7 fosfat tamponu konulmuştur. 25˚C de absorbansı okunmuştur. Bu sıcaklıkta absorbansın 0.450'den 0,400'e düşmesi için geçen süre belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = \frac{(3.45)(df)}{(\text{zaman})(0.1)}$$

df= seyreltme faktörü.
Zaman= absorbansın 0.450'den 0,400'e düşmesi için geçen süre.
0.1= Küvete eklenen enzim çözeltisi miktarı (mL).

Aktivite değeri kullanılan enzim miktarına bölünürse spesifik aktivite bulunur.
Spesifik Aktivite = Aktivite / Protein miktarı (mg)

3.2.2.2. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry, ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri açıklanan A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.
1) Çözelti A : 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.
2) Çözelti B : 0.5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1' lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

3) Çözelti C : 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır (Kullanılacağı zaman taze hazırlanmıştır.)
4) Folin-Ciocalteu çözeltisi : Folin-Ciocalteu saf su ile 1/1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
5) Standart protein çözeltisi: 1 mL' de 1 mg sığır albümini çözeltisi hazırlanmıştır.
6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpüne sırayla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 μL standart sığır albümin konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi 1 mL' ye tamamlanmış, her tüpe 5 ml C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra her tüpe 1/1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansı köre karşı 750 nm' de okunmuştur. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. Optimum pH' ın belirlenmesi

Optimum pH çalışması için substrat olarak 50 mM pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde % 0.036 (w/w) hidrojen peroksit çözeltisi kullanılarak, pH:5,5'ten 9,0'a kadar tampon aralığında çalışılmıştır. pH 5,5 için asetat tamponu, pH:6,0 için sitrat tamponu, pH 6,5'ten 8,5'e kadar fosfat tamponu, pH:9,0 için borat tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.2.2.4. Katalaz Enzimi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Sıcaklığın katalaz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması H_2O_2 substratıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimin optimum pH'sında ve 20-50°C aralığındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır.

Aktivite ölçümleri Aebi (1974) tarafından önerilen ve Lartillot, S. ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Hidrojen peroksit için molar ekstinksiyon katsayısı 0,0396 cm^2 μmol^{-1} dir. 50 mM pH:8,0 fosfat

tamponunda hazırlanmış 10 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlanır. Kör olarak 2,5 ml tampon ve 0,5 ml 1 M HCI içeren çözelti kullanılır. Hidrojen peroksitin başlangıçtaki absorbansını (As) belirlemek için; 2,5 ml substrat ve 0,5 ml 1 M HCI içeren çözeltinin 240 nm' de absorbansı ölçülür. Proteinin neden olacağı absorbansı (At) belirlemek için; 20 µl enzim çözeltisi, 2,5 ml tampon ve 0,5 ml 1 M HCI içeren çözeltinin absorbansı ölçülür. 20 µl test edilecek enzim çözeltisi (Ar) üzerine 2,5 ml substrat çözeltisi eklenir ve 25 ^{o}C'de 2 dk. bekletilir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 ml 1 M HCI çözeltisi ilave edilir.

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbans değişimi (A):

A=(As+At)-Ar dır.

Enzim aktivitesinin IUml-1 cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{Aktivite} = \frac{A.Vt}{\varepsilon.t.Ve}$$

Vt =Toplam reaksiyon hacmi (ml)

Ve=Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (ml)

ε = H_2O_2 in molar ekstinksiyon katsayısı (0,0396 cm2 µmol-1)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

Bu çalışmada her bir örnekteki protein miktarı belirlenerek aktivite µmol H_2O_2 mg prot.$^{-1}$ dk^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemle 240 nm de ölçülmüştür.

3.2.2.5. Katalaz Enzimi Örneklerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Katalaz enzimi örneklerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıkta ve 40ºC'de 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 5, 12 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.2.6. Katalaz Enzimi Örneklerinin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Katalaz enzimi örneklerinin başlangıç aktiviteleri belirlenerek sonra 4ºC ve oda sıcaklığında ağzı kapalı tüplerde bekletilmiş ve belirli aralıklarla kalan aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.2.7. Katalaz Enzimi İçin Km ve Vmax Değerlerinin Bulunması İle İlgili Çalışmalar

Katalaz enzimi örneklerinin belirlenen optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde (5-10-15-20-30-35 mM) enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra 1/V ile 1/[S] değerleri de bulunarak H_2O_2 substratı için Lineweaver - Burk grafikleri çizilmiş ve çizilen grafikten elde edilen denklemden yararlanarak Km ve Vmax değerleri hesaplanmıştır.

3.2.2.8. Native PAGE Elektroforezi

Stok Çözeltiler Ve Tamponlar

1.Akrilamid/Bis akrilamid :
29,2 g akrilamid
0,8 g N'N'-bis-metilenakrilamid
deiyonize suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanır.

2. 1,5M Tris-HCl, pH=8,8 :
15,125 g tris baz
3,94 g tris asit
çözülüp pH=8,8'e asit yada baz ile ayarlanır, 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

3. 0,5M Tris-HCl, pH=6,8 :

0,291 g tris baz

7,502 g tris asit

çözülüp pH=6,8'e asit yada baz ile ayarlanır, 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

4. Örnek Tamponu

4,5 mL deiyonize su

1,6 mL 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8

3,2 mL gliserol

0,25 mL % 0,5(w/v) bromofenol mavisi

5. Yürütücü Tampon, pH=8,3

3,03 g Tris baz

14,4 g Glisin

çözülüp 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlanır. pH'ı asit veya baz ile ayarlanmaz. 4˚C'de saklanır.

6. %10 APS :

0,1 g amonyum persülfat 1 mL deiyonize suda çözülür. Kullanılacağı zaman hazırlanmalıdır.

Jelin Hazırlanması (10 mL):

TEMED ve % 10 APS hariç tüm ayıraçlar karıştırılarak monomer çözeltisi hazırlanır (çizelge 3.1). 15 dakika degaze edilir.

Çizelge 3.1. % jel konsantrasyonlarına karşı eklenmesi gereken maddeler.

% jel	Deiyonize su (ml)	%30 akrilamid/bis (ml)	Jel tamponu
%5	5,8	1,7	2,5
%15	2,5	5,0	2,5

*Ayırma Jeli (Alt jel) (%15) Tamponu = 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8

*Konsantrasyon Jeli (Üst Jel) Tamponu = 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8

Daha sonra 10 ml monomer çözeltisi için:
Ayırma Jeli (Alt Jel) (%15) için:
50 µL % 10 APS
5 µL TEMED
Konsantrasyon Jeli (Üst jel) (%5) için:
50 µL % 10 APS
10 µL TEMED
eklenip polimerleşmenin başlaması için hafifçe çalkalanır.

Native PAGE elektroforezi için Laemmli (1970), tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Alt jel hazırlanarak elektroforez plakaları arasına boşaltılır. 60 dakika beklenir. Polimerizasyonun hızlanması için jelin üst kısmına bütanol eklenerek hava ile teması önlenir. Jelleşme gerçekleştikten sonra jelin üstündeki bütanol alınır. Üst jel hazırlanıp, alt jelin üstüne dökülür. Elektroforez tarağı, monomer çözeltisi ile arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilir. 60 dakika polimerizasyona bırakılır. Polimerleşmeden sonra tarak jelden çıkarılır. Kuyucuklar oluşur. Elektroforez plakaları çıkarılıp, jel kasetinin içerisine yerleştirilip, tankın içine konur. Jel kasetinin içine ve dışına yürütücü tampon eklenir. Eppendrof tüplerine 10 µL (20 µg protein) protein örneği alınıp üzerine 20 µL örnek tamponu eklenir. Eppendrof tüplerinde hazırlanan örneklerden, 10 µL alınarak kuyucuklara konulur. Elektroforez cihazı, 150 V'a ayarlanıp elektroforeze başlanır. Tüm örnekler aynı çizgide toplanınca 200 V'a çıkarılır. Bromofenol mavisi jelin sonuna geldiğinde akım kesilir. Jel kasetinin içinden elektroforez plakaları çıkarılır. Cam plakalardan küçüğü çıkarılır. Jel, büyük cam plakadan ayrılarak boyama çözeltisine konur.

Boyama: Jeller Blum ve ark. (1987) tarafından bildirilen metoda göre gümüş boyama tekniği ile boyanmıştır. Çizelge 3.2.'de gümüş boyama için kullanılan çözeltiler verilmiştir.

Çizelge 3.2. Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler.

Sabitleyici ve durdurucu	% 50 metanol, % 12 asetik asit
Saklama çözeltisi	% 30 metanol. % 3 gliserin
Karbonat çözeltisi	60 g/L
Sodyum tiyosülfat çözeltisi	4 g/ 100 mL
Gümüş nitrat çözeltisi	20 g/100 mL

Sabitleyici ve durdurucu çözeltiye 25 µL formaldehit eklenerek jeller bu çözeltide 1 saat bekletilir. Etanol çözeltisi (%50) ile 3 defa yıkanır. Etanol çözeltisi (% 50) ile 3 kere 20 dakika arayla yıkanır. 50 mL su içerisine 250 µL sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) çözeltisi eklenir ve jel bu çözelti içerisinde 1 dakika bekletilir. Jel su ile yıkanır. 50 mL su içerisine 500 µL gümüş nitrat ($AgNO_3$) çözeltisi ve 37,5 µL formaldehit eklenir. Jel bu çözelti içerisinde 20 dakika bekletilir. Jel 2 defa su ile yıkanır. 50 mL karbonat çözeltisi içine 25 µL formaldehit ve 5 µL sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenir ve jeldeki protein bantları gözükünceye kadar bu karışım içerisinde bekletilir. Protein bantları gözükünce boyamayı durdurmak için jel %5 asetik asit çözeltisinde bekletilir. Jel kısa bir süre su ile yıkandıktan sonra saklama çözeltisi içerisinde saklanır.

3.2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Alt ve üst jeller hazırlanıp polimerleşmeden sonra kuyucuklar oluşturulur. Örneklerden 10 µl (20 µg protein) eppendorf tüplerine alınıp üzerine 20 µl β-merkaptoetanol, örnek tamponu eklenip, 95 ˚C'de 4 dakika ısıtılır. Elektroforez plakaları çıkarılıp, jel kasetinin içerisine yerleştirilip, tankın içine konur. Eppendrof tüplerindeki örnekler, kuyucuklara konulur. Jel kasetinin içine ve dışına yürütücü tampon eklenir. Elektroforez cihazı, 150 V'a ayarlanıp elektroforeze başlanır. Tüm örnekler aynı çizgide toplanınca 200 V'a çıkarılır. Bromofenol mavisi jelin sonuna geldiğinde akım kesilir. SDS-PAGE için elektroforez yaklaşık 35 dakika sürer. Jel kasetinin içinden elektroforez plakaları çıkarılır. Cam plakalardan küçüğü çıkarılır. Jel, büyük cam plaka ile birlikte boyama çözeltisine konur. Boyama çözeltisi

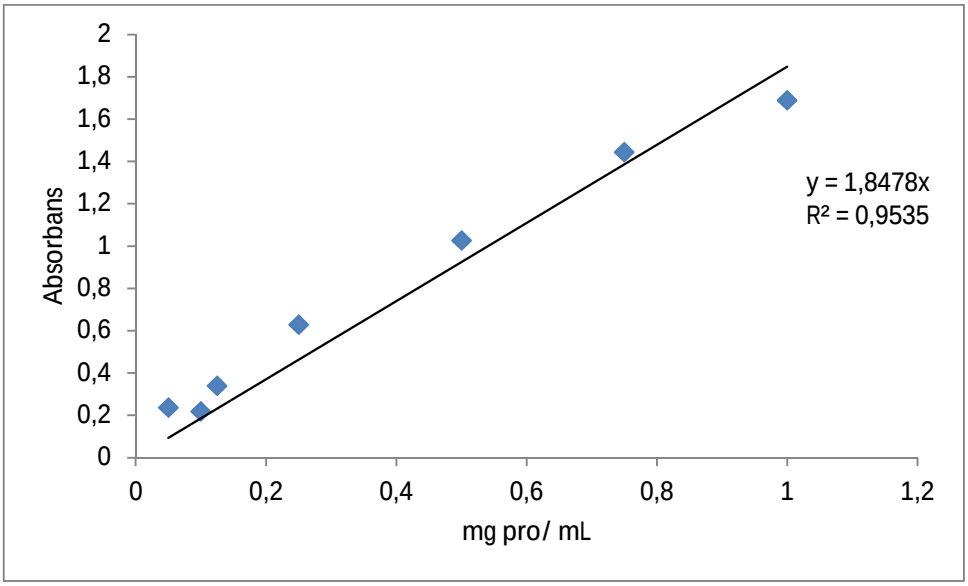
(Coomassie Blue): % 0,05 (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250'nin % 45 metanol (v/v), % 45 destile su (v/v), % 10 asetik asit (v/v) karışımından hazırlanır. Boyanan proteinler arıtma (destaining) çözeltisine alınır. Arıtma çözeltisi % 45 metanol (v/v), % 45 destile su (v/v), % 10 asetik asit (v/v) karışımından hazırlanır. Boyanın geri alınma işlemi 24 saat sürebilir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Protein Miktarı ile İlgili Bulgular

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



Şekil 4.1. Standart protein eğrisi

4.1.2. Ceviz (Juglans regia) Ekstraklarında Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

2,5 g ceviz; 0,5 g sulandırılmış PVP (çözünebilir polyvinylpyrolidone), 2mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA ve 1,25 mM PEG-4000 eklenmiş, 25 ml 50 mM pH= 7,0 Fosfat tamponu içinde homojenize edilmiştir.

Kaba homojenat ultrasantrifüj tüplerine alınarak 10,000g'de 20 dk. santrifüjlenmiştir. Ultrasantrifüj sonrasında elde edilen çökelti atılarak süpernatantlar

filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Toplanan süpernatantlardaki protein miktarı 15,47 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 6,161 U/mg prot. olarak bulunmuştur.

4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular

Cevizden (*Juglans regia*) elde edilen homojenatlara sırasıyla % 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı $(NH_4)_2SO_4$ yavaş yavaş eklenmiştir. Amonyum sülfat çözündükten sonra 1 saat bekletilip çöktürme işlemi 10.000x*g*'de 20 dakika boyunca yapılmıştır.

Yapılan çöktürme işleminde maksimum çözeltiye % 40'lık $(NH_4)_2SO_4$'da rastlanmıştır.

Çöktürme sonucu elde edilen homojenatla yapılan çalışmanın sonunda protein miktarı 2,45 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivite değeri de 45,135 U/mg prot. olarak bulunmuştur.

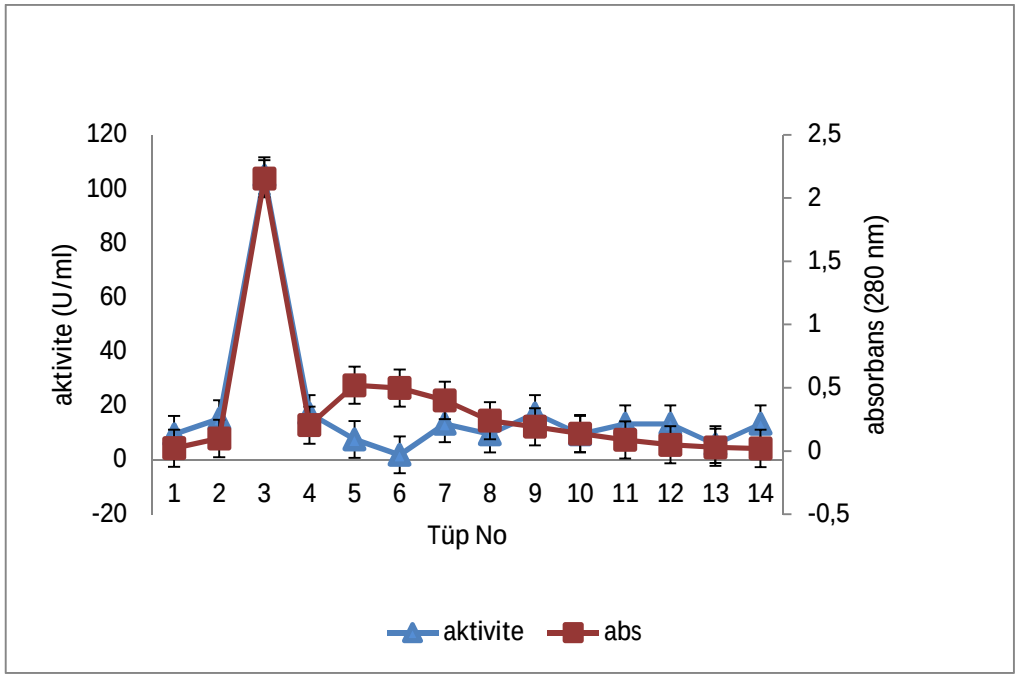
4.1.4. PD-10 Kolon Çalışması Sonucu Elde Edilen Bulgular

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra Sephadex G-25 M içeren PD-10 kolonuna, çözeltinin 1mL'si uygulanmıştır. Örneklerin kolondan alınması 25 mM pH=8,0 Tris-HCI tamponu ile yapılmıştır. PD-10 kolonun da tuzu ayrıştırılmış olan eluatlar 1,5'er mL hacminde toplanmış ve enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır.

Çalışma sonucu elde edilen veriler; çizelge 4.1.'de, şekil 4.2.'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. PD-10 kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve aktivite değerleri.

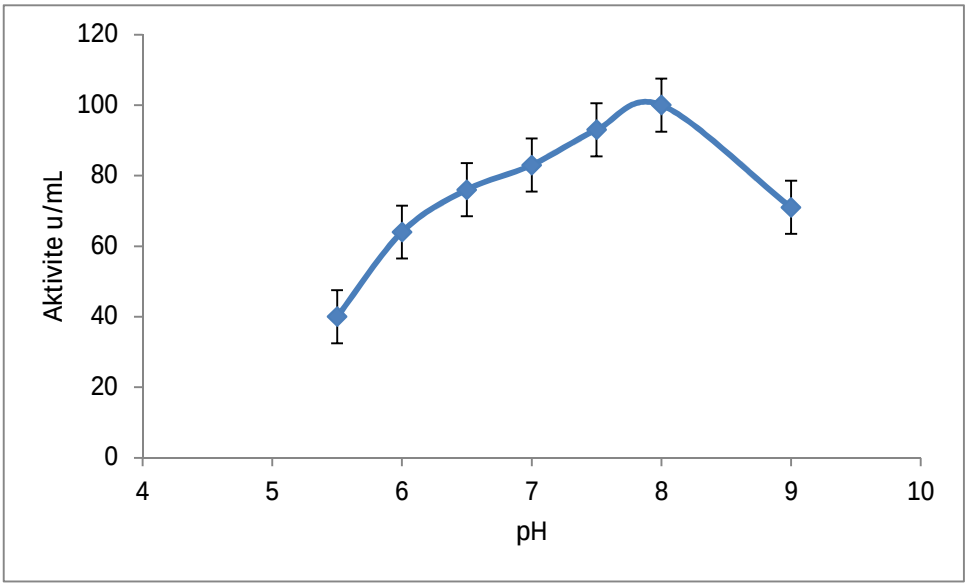
Tüp no	280 nm deki Absorbans	240 nm deki Aktivite (U/mL)
1	0,022	9,533
2	0,099	15,252
3	2,153	104,861
4	0,204	17,159
5	0,52	7,626
6	0,498	1,906
7	0,4	13,345
8	0,24	9,532
9	0,192	17,159
10	0,138	9,533
11	0,088	13,346
12	0,049	13,346
13	0,029	5,720
14	0,02	13,346



Şekil 4.2. PD-10 kolonundan alınan eluatlarda 280 nm' de okunan absorbans değerleri ve aktivite değerleri.

4.1.5. Optimum pH'ye Ait Bulgular

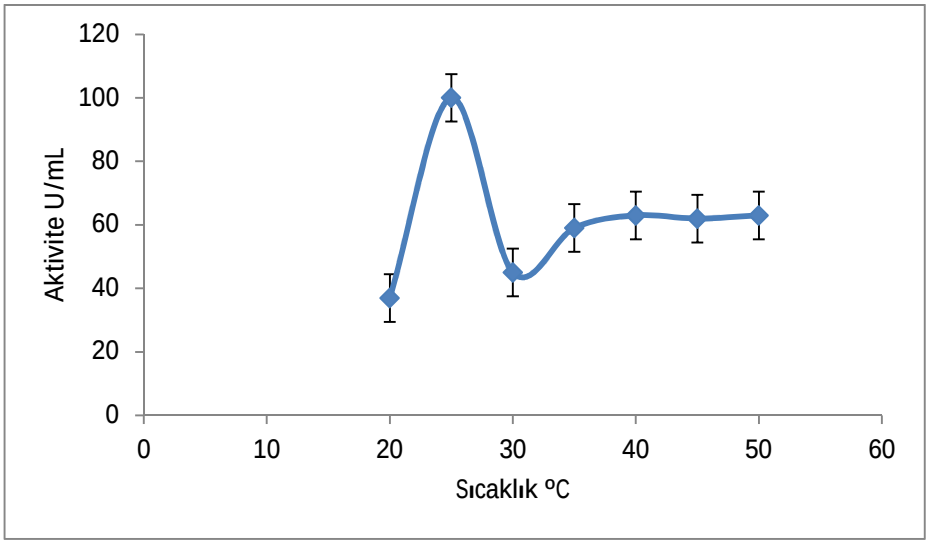
PD-10 kolonundan alınan en yüksek aktiviteyi gösteren eluat kullanılarak yapılan çalışmada katalaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için pH:5,5'ten 9,0'a kadar tampon aralığında, pH 5,5 için asetat tamponu, pH:6,0 için sitrat tamponu, pH 6,5'ten 8,5'e kadar fosfat tamponu, pH:9,0 için borat tamponu kullanılarak 25 ^{o}C de yapılan optimum pH çalışması sonucu optimum pH 8,0 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. PD-10 kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı pH' larda ölçülen spesifik aktivite değerleri.

4.1.6. Optimum Sıcaklık ile İlgili Bulgular

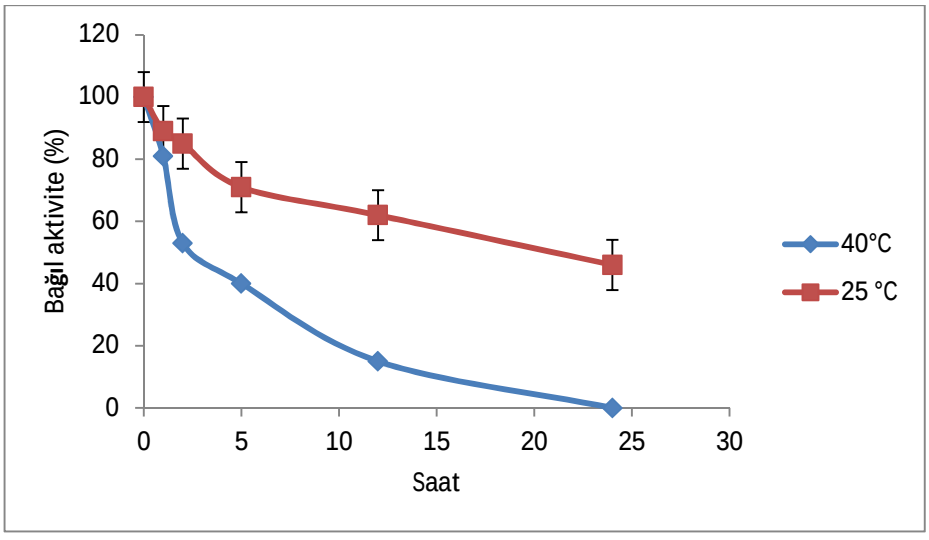
Katalaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 20-50 ºC arasındaki sıcaklıklarda çalışılmış ve optimum sıcaklık 25 ºC olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4 de verilmiştir**.**



Şekil 4.4. PD-10 kolon kromatografisi sonucu maksimum aktivite gösteren örnek için farklı sıcaklıklarda ölçülen spesifik aktivite değerleri.

4.1.7. Termal Kararlılık İle İlgili Bulgular

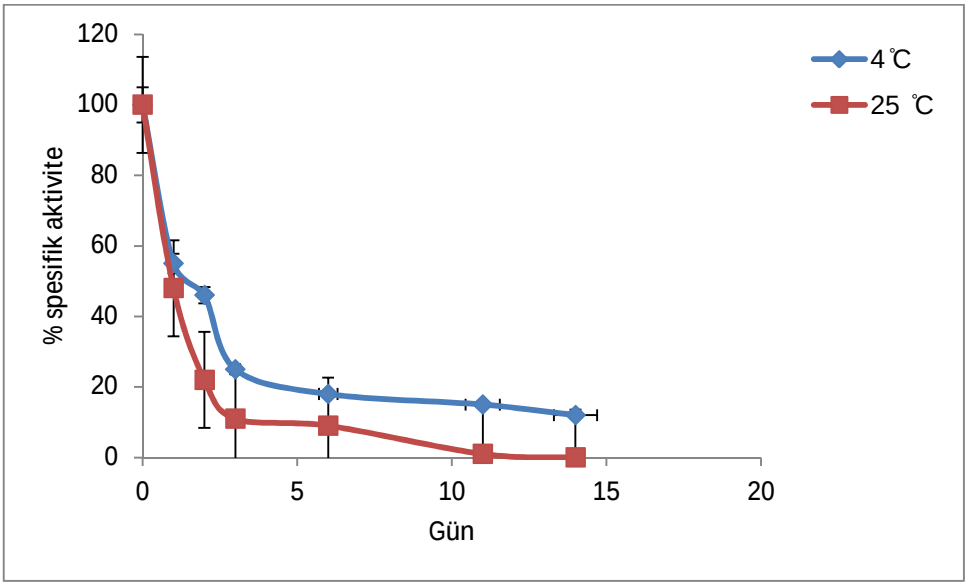
Katalaz örneği 40 °C ve 25 °C'de 1, 2, 5, 12 ve 24 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüş ve % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. 24 saat sonunda 40 °C'de aktivitesini tamamen kaybederken 25°C'de ise aktivitesinin % 46'sını koruduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.5.'de gösterilmiştir



Şekil 4.5. Katalaz enzimi için bağıl aktivitenin süreye bağlı değişimi.

4.1.8. Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığına Ait Bulgular

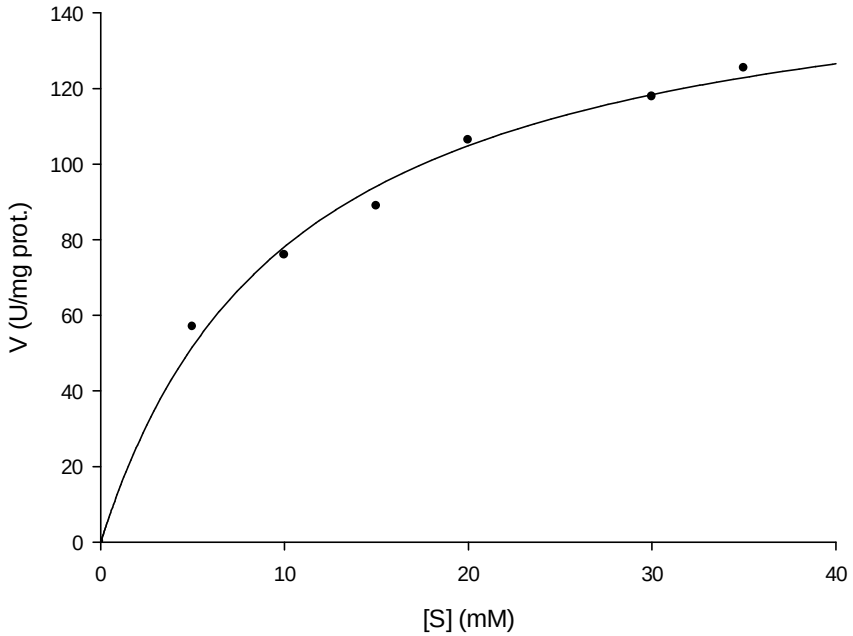
Katalaz enzimi örneği oda sıcaklığında ve 4℃'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. 25°C'de 14. gün sonunda aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenirken; 4°C'de ise 14. günün sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin %12'ni koruduğunu belirlenmiştir. Katalaz enzimi örneğinin depolama süresine bağlı aktivite değişimleri Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



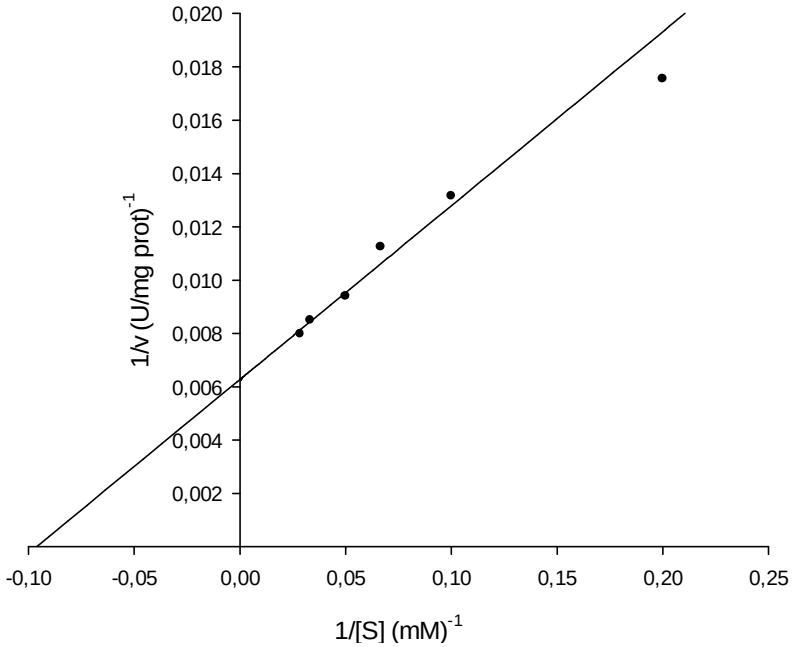
Şekil 4.6. Katalaz örneğinin bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.

4.1.9. Katalaz Enziminin Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta (8,0 ve 25℃) farklı H_2O_2 derişimleri (5-10-15-20-30-35 mM) kullanılarak ölçülen aktiviteler için Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Michealis-Menten hız grafiği (Şekil 4.7.) ve Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş (Şekil 4.8.) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 10,4 mM ve 159,4 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



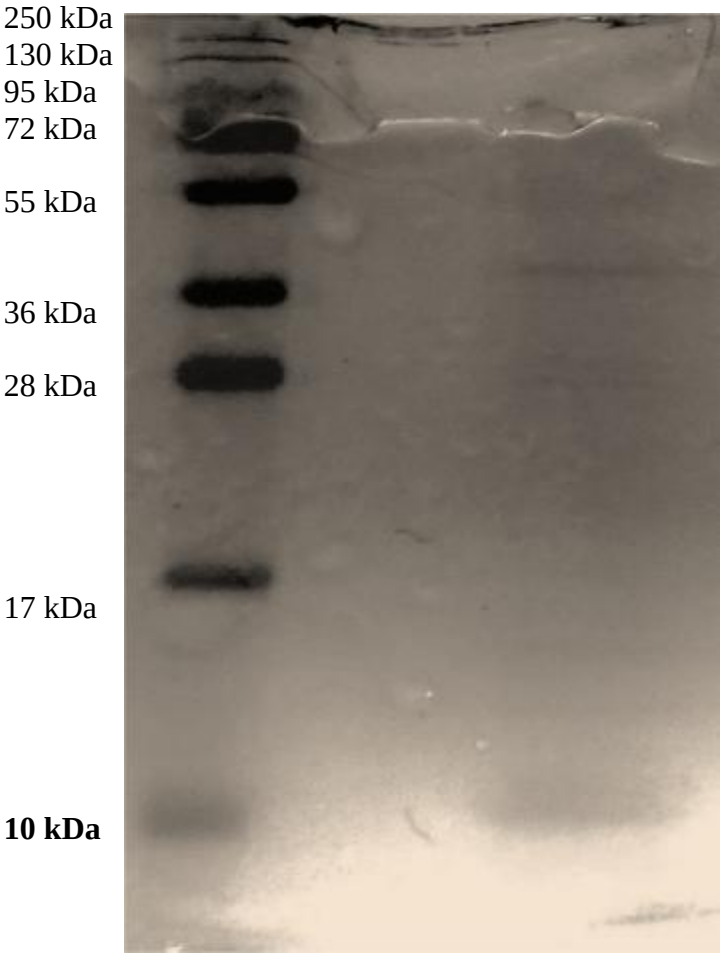
Şekil 4.7. Katalaz için Michealis-Menten grafiği.



Şekil 4.8. Katalaz için Lineweaver-Burk grafiği.

4.1.10. Katalaz Enziminin Moleküler Ağırlığının Tayini

PD-10 kolonundan geçirilerek saflaştırılmış olan katalaz enziminin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Enzimin elektroforez sonuçları şekil 4.9'da verilmiştir.

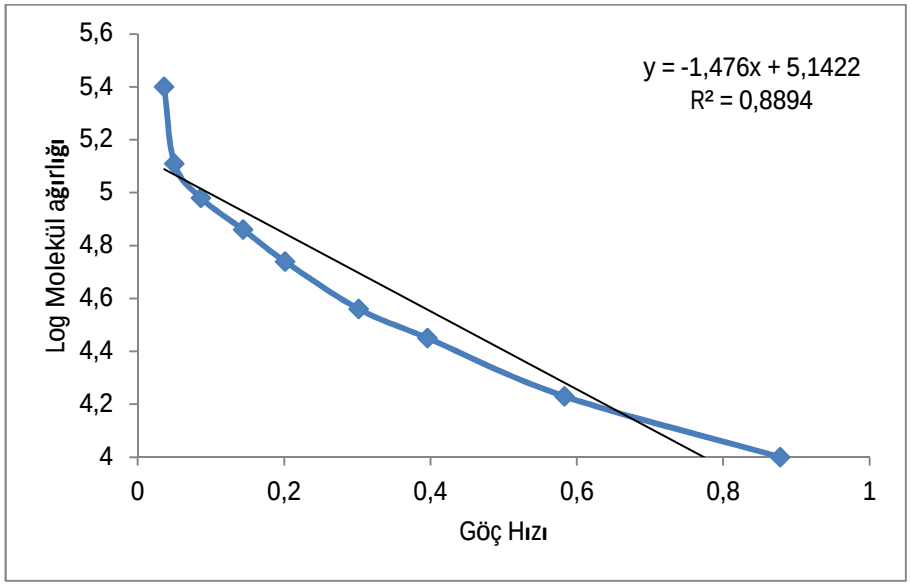


Şekil 4.9. Katalaz enzimine ait SDS-PAGE elektroforez sonuçları.

Standart proteinlerin göç hızlarına karşı log Molekül ağırlıkları çizelge 4.2'de verilmiş ve grafiğe geçirilerek şekil 4.10. elde edilmiştir.

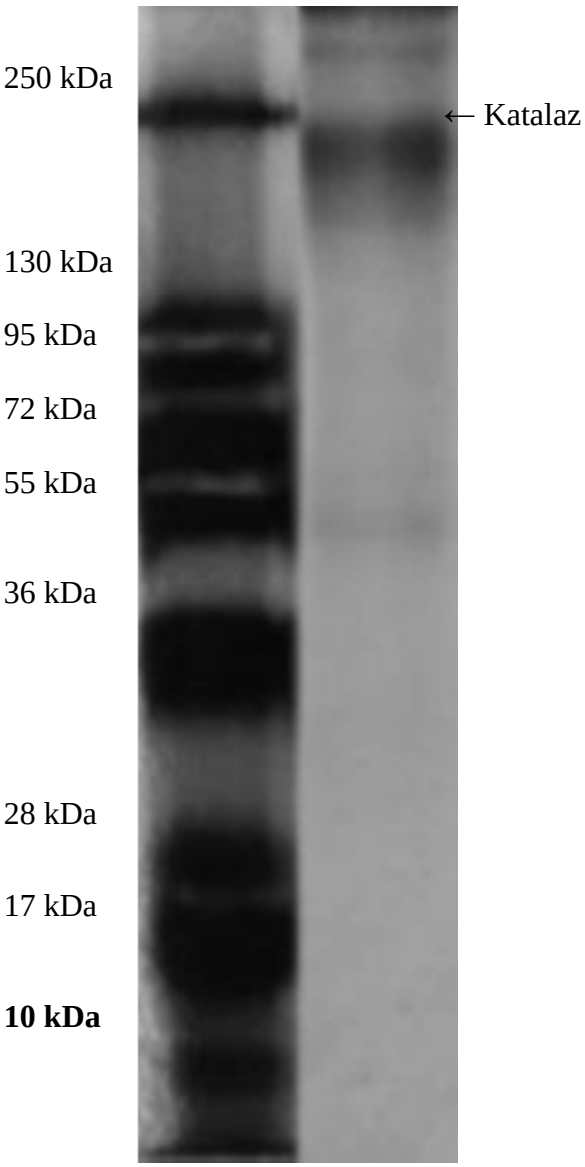
Çizelge 4.2. Standart proteinlerin göç hızlarına karşı log Molekül ağırlıkları.

	Ma	Rf	Log Ma
Standart Protein	250000	0,036	5,40
	130000	0,050	5,11
	95000	0,086	4,98
	72000	0,144	4,86
	55000	0,201	4,74
	36000	0,302	4,56
	28000	0,396	4,45
	17000	0,583	4,23
	10000	0,878	4,00



Şekil 4.10. SDS-PAGE jel elektroforezinde standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı yürüme hızları.

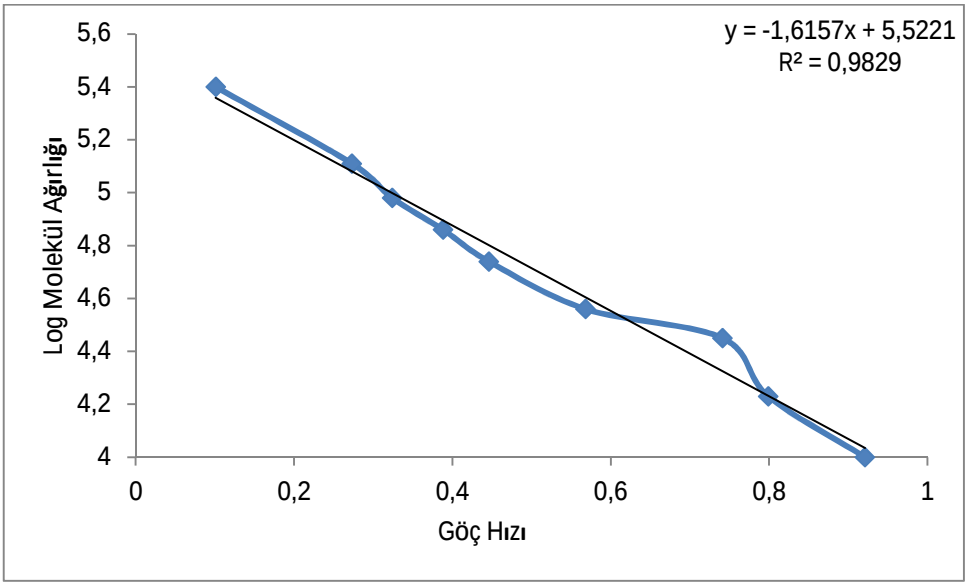
PD-10 kolonundan geçirilerek saflaştırılmış olan katalaz enziminin Native PAGE Elektroforezi yapılmıştır. Enzimin elektroforez sonuçları şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Katalaz enzimine ait Native PAGE elektroforez sonuçları.

Çizelge 4.3. Standart proteinlerin göç hızlarına karşı log Molekül ağırlıkları.

	Ma	Rf	Log Ma
Standart Protein	250000	0,101	5,40
	130000	0,273	5,11
	95000	0,324	4,98
	72000	0,388	4,86
	55000	0,446	4,74
	36000	0,568	4,56
	28000	0,741	4,45
	17000	0,799	4,23
	10000	0,921	4,00



Şekil 4.12. Native PAGE jel elektroforezinde standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı yürüme hızları.

β-merkaptoeteanol'lü ortamda Katalaz enzimi'nin göç hızı 0,281 olarak ölçülmüş, bu veriden yararlanılarak molekül ağırlığı 53 kDa olarak hesaplanmıştır.

β-merkaptoeteanol'süz ortamda Katalaz enzimi'nin göç hızı 0,122 olarak ölçülmüş, bu veriden yararlanılarak molekül ağırlığı 212 kDa olarak hesaplanmıştır.

Katalaz enziminin aktivite tayinleri için, kaba homojenattan başlayarak PD-10 kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler çizelge 4.4'de sırasıyla verilmiştir.

Çizelge 4.4. Katalaz enziminin kaba homojenattan başlayarak PD-10 kolonuna uygulanmasına kadar olan işlemler ve hesaplanan parametreler.

Saflaştırma Basamağı	V_T (ml)	Cprotein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg prot)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham katalaz ekstratı	10	15,47	154,7	95,32	953,2	6,16	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	2,5	2,45	6,125	110,58	276,45	45,14	29	7,3
Moleküler eleme kromatoğrafisi sonrası	1,5	1,05	1,575	139,18	208,77	132,55	22	21,5

Saflaştırma çalışmalarının sonuçlarının verildiği Çizelge 4.4.'de görüleceği gibi katalaz enzimi % 22 verimle 21,5 kat saflaştırılmıştır.

4.2. Tartışma

Literatürde Katalaz enziminin bazı bitkilerden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ancak cevizden (*Juglans regia*) saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada cevizde; antioksidan enzim olan katalazın aktivitesi, depolama kararlılığı, termal kararlılık, optimum pH ve optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiş, molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

Kaba homojenat 10000 g'de 20 dakika santrifüj edilip süzüldükten sonra elde edilen süpernatant ile yapılan çalışmalarda protein miktarı 15,47 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 6,16 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Elde edilen homojenatların sırasıyla % 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak katalaz enziminin % 40'da en fazla çöktüğü

belirlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sonunda yapılan çalışmalarda protein miktarı 2,45 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 45,14 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

Ceviz (*Juglans regia*) ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında Sephadex G-25 M jeli içeren kolon kullanılmıştır. PD-10 kolonundan alınan protein örnekleri 1,5 mL hacmindeki fraksiyonlar halinde 14 tüpe alınmıştır. Alınan eluatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren 3 nolu örnekteki karışımda protein miktarı, katalaz enziminin spesifik aktivitesi ölçülmüştür. Örneğin protein miktarı 1,05 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 132,55 U/mg protein olarak bulunmuştur. PD-10 kolonunda elde edilen eluatlarda katalaz enziminin spesifik aktivitesi başlangıca göre 21 kat artış göstermiştir.

Literatürde çeşitli kaynaklardan çeşitli saflaştırma metotları kullanılarak yapılan katalazın saflaştırılması ile ilgili çalışmaların sonuçları bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçlarında farklı aktiviteler rapor edilmiştir. Seriner,(2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) katalaz enziminin spesifik aktivite değerini 26 U/mg protein olarak bulumuş, DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırmanın son basamağında 393 U/mg protein olarak saptamıştır. Bozdemir, (2007), Keten tohumu (*Linum usitatissimum*) ekstraktında katalaz enziminin spesifik aktivitesi 15,94 U/mg, olarak saptamıştır. Demir, (2006) Aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından katalaz enziminin, spesifik aktivite değeri 89.68 EU/mg protein olarak bulmuştur. Öztürk ve ark (2005), Maydanozdan katalaz enzimin spesifik aktivitesi 1126 EÜ/mg, olarak saptamıştır. Beaumont ve ark (1990), Patates kökünden (*Solanum tuberosum*) katalazı; enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 EÜ/mg protein değerinde saptamışlardır.

Cevizden (*Juglans regia*) elde edilen katalaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacı ile pH 5,5 -9,0 aralığında pH'lar ile çalışılmış ve katalaz enzimi için optimum pH 8,0 olarak belirlenmiştir. Optimum pH için elde edilen bu sonuç, Dinçer, (2000), Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden saflaştırılan katalaz enzimini için optimum pH 7,0-10,0 aralığı; Köksal (2003) tarafından yapılan karalahanadan (*Brassica oleracea L. var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için pH 7,8; Öztürk ve ark (2005), Maydanozdan saflaştırılan katalaz enzimi için optimum pH 7,0;

Sondaş, (2005), Nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden kısmı saflaştırılan katalaz için, nane bitkisinde optimum pH 6,0 ; pırasa bitkisinde optimum pH 7,5; Yörük ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan van elmasından (*Golden Delicious*) saflaştırılan katalaz enzimi için pH 5,0; Kara (2008) kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) saflaştırılan katalaz için optimum pH 7,0; Seriner, (2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) saflaştırılan katalaz için optimum pH 7,0 olarak bulunan sonuçlar ile uygunluk göstermiştir.

Cevizden (*Juglans regia*) elde edilen katalaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile 20-50ºC aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesi sırasında istenilen sıcaklıklar sıcak su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık 25 ºC olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (*Eruca sativa*) kısmi saflaştırılan katalaz için 30 ºC; Köksal (2003) tarafından yapılan karalahanadan (*Brassica oleracea L. var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için 25 ºC; Yörük ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan van elmasından (*Golden Delicious)* saflaştırılan katalaz enzimi için 50 ºC; Öztürk ve ark (2005), Maydanozdan saflaştırılan katalaz enzimini için 35 ºC; Sondaş, (2005), Nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden kısmı saflaştırılan katalaz için, nane için 40 ºC, pırasa için 30 ºC; Kara (2008) kabak çekirdeğinden *(Cucurbita moschata)* saflaştırılan katalaz için 25 ºC; Seriner, (2010), Hıyardan (*Cucımus satıvus*) saflaştırılan katalaz için 30 ^{0}C ile uygunluk içerisindedir.

Ceviz (*Juglans regia*) ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında PD-10 kolonundan geçen eluatlar arasında, en yüksek aktiviteyi gösteren örnek için 4 ºC' ve 25 ºC'de yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucu katalaz enzim aktivitesinde 4 ºC'de 14 gün sonunda aktivitesinin % 12'sini koruduğu, 25 ºC'de 14 gün sonunda aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir.

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Michealis-Menten hız grafiği ve Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. Cevizden elde edilen katalaz enzimleri için Km değeri 10,4 mM; Vmax değeri ise 159,4 U/mg prot. olarak elde edilmiştir. Havir ve arkadaşları (1987) tarafından yapılan tütün yapraklarından

(Nicotina sylvestis) saflaştırılan katalaz için Km değerini 0,0057 M; Dinçer (2000) tarafından yapılan rokadan (*Erucasativa*) kısmi saflaştırılan katalaz enzimi için Km değerini 0,00625M; Köksal (2003) tarafından yapılan karalahanadan (*Brassica oleraceaL. Var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için Km değeri 0,00159 M ve Vmax 588,2 EÜ/mL; ; Sondaş, (2005), tarafından yapılan Nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.)* bitkilerinden kısmı saflaştırılan katalaz için, nane için Vmax değeri 108,69 EU/ml ve Km değeri 1,175 mM, pırasa için Vmax değeri 50 EU/ml ve Km değeri 1,172 mM; Kara (2008) tarafından yapılan kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) katalazın karakterizasyonunda elde edilen katalaz için Km değeri 0,00209 M Vmax 58,139EÜ/mL olarak rapor etmişlerdir.

Cevizden (*Juglans regia*) elde edilen katalaz enziminin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile SDS-PAGE ve Native- PAGE elektroforezi yapılmıştır. Native_PAGE elektroforezi sonucunda Katalaz enzimi'nin molekül ağırlığı 212 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE elektroforezi sonucunda Katalaz enzimi'nin molekül ağırlığı 53 kDa olarak hesaplanmış ve 4 eşit alt üniteye sahip olduğu belirlenmiştir. Hirasawa ve ark (1987), ıspanaktan (*Spinacea oleracea*) katalaz enzimini saflaştırmışlar jel filtrasyonu yardımıyla enzimin moleküler ağırlığını 125 kDa ; Beaumont ve ark (1990), patates kökünden (*Solanum tuberosum*) katalazı; AcA-34 ultrajel kolonu ile saflaştırmışlar ve alt ünitesini 56 kDa , molekül ağırlığı 224 kDa olarak hesaplamış; Eising ve Trelease (1990), ayçiçeğinde katalaz enziminin alt birimlerinin molekül ağırlıklarını 55 ve 59 kDa arasında; Mitchell ve ark (1991), lahana iliklerinden (*Trichoplusiani*) katalazı; ethanol-kloroform fraksiyonu ve standart kolon kromotografisi ile saflaştırmışlar ve moleküler ağırlığını 247-259 kDa aralığında saptamışlardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yapılan çalışmalar sonucu aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantla yapılan çalışma sonucu katalaz
2. enziminin spesifik aktivite değeri 6,16 U/mg prot. olarak bulunmuştur.
3. Ceviz için amonyum sülfat ile yapılan çökeltme işlemlerinde maksimum çökeltiye %40' lık tuz derişiminde rastlanmıştır ve spesifik aktivite değeri 45,14 U/mg prot. olarak bulunmuştur.
4. PD-10 kolon kromatografisi (Sephadex G-25M) ile yapılan saflaştırma basamağında katalaz enzminin spesifik aktivitesi 132,55 U/mg prot. olarak tespit edilmiş ve ilk duruma göre 21,5 kat artmıştır.
5. PD-10 kolon kromatografisi (Sephadex G-25M) sonucu en yüksek aktiviteyi gösteren örnek üzerinde yapılan optimum pH ve sıcaklık çalışması sonucu enzim için optimum pH' nın 8,0 ; optimum sıcaklığın 25 ^{o}C olduğu görülmüştür.
6. Cevizden (*Juglans regia*) saflaştırılan katalaz enziminin termal kararlılıkları karşılaştırıldığında; 40 °C'de 24 saat sonunda katalaz aktivitesinin tamamen kaybolduğu, 25°C'de ise aktivitesinin % 46'sını koruduğu belirlenmiştir.
7. Cevizden (*Juglans regia*) saflaştırılan katalaz enzimi farklı koşullarda depolandıklarında 4°C'de 14 gün sonunda katalaz aktivitesinin %12'sini, oda sıcaklığında 14 gün sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan katalaz enziminin K_m değeri 10,4 mM ve V_{max} 159,4 U /mg prot. olarak belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

1. Katalaz başka kaynaklardan saflaştırılabilir.
2. Katalaz çeşitli desteklere immobilize edilebilir.

KAYNAKLAR

AEBI, H., WYSS, S.R., SCHERZ, B., SKVARIL, F., 1974. Heterogeneity of Erythrocyte Catalase. II. Isolation and Characterization of Normal and Variant Erythrocyte Catalase and Their Subunits. Eur J. Biochem, 48: 137-145.

BAKKALBAŞI, E., YILMAZ, M.Ö. VE ARTIK, N., 2010. Türkiye'de yetiştirilen yerli bazı ceviz çeşitlerinin fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşenleri, Akademik Gıda, 8(1):6-12.

BEAUMONT, F., JOUVE, H. M., GAILLARD, J., PELMONT, J., 1990. Purification and Properties of a Catalase From Potato Tubers (Solanum Tuberosum). Plant Science, 72 (1):19-26.

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

BLUM, H.,BEİER, H., GROOSS, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresisw, 8:93-99.

BOZDEMİR, Y., 2007. Keten Tohumu (Linum Usitatissimum) Ekstraktında Katalaz Ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri. Çukurova Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Adana.

BROOKS, J. D., WARD, W. E., LEWIS, J. E., HILDITCH, J., NICKELL, L.,

CHEN, H., MOUSTY, C., CHEN, L., COSNIER, S., 2008. A New Approach for Nitrite Determination Based on a HRP/Catalase Biosensor. Materials Science and Engineering C, 28:726–730.

DEMİR, H., 2006. Aşotu (Coriandrum sativum) Yapraklarından Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi ,Bolu. 315-318

DİNÇER A., 2000. Roka (Eruca sativa) bitkisinden katalaz enziminin saflaştırılması. Celal Bayar Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 62 sayfa.

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

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

ERTAŞ, N., TİMUR, S., AKYILMAZ, E., DİNÇKAYA, E., 2004. Specific Determination of Hydrogen Peroxide with a Catalase Biosensor Based on Mercury Thin Film Electrodes. Turkish Journal of Chemistry, 24:95-99.

GODJEVARGOVA, T., DAYAL, R., MARINOV, I., 2004. Simultaneous Covalent Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase onto Chemically Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes. Journal of Applied Polymer Science, 91:4057-4063.

HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J. M., 1990. Methods Enzymology, 186:1-85.

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

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

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

İNAL, Ö., YÜKSEL, A., 1998. Ankara Ecz. Fak. Derg. J- Fac. Pharm. Ankara 27 (1) 31-49, 1998

JIANG, H.J., YANG, H., AKİNS, D.L., 2008. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Catalase Immobilized on a SWNT-nanocomposite Film. Journal of Electroanalytical Chemistry, 623:181–186.

KAILASH, PRASAD, 2005. Hypocholesterolemic and Antiatherosclerotic Effect of Flax Lignan Complex İsolated from Flaxseed. 179(2):269-275

KARA D., 2008. Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (Cucurbita maxima ve moschata) katalaz enziminin karakterizasyonu. Sakarya Üniversitesi -Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 71 sayfa.

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

KOÇTÜRK, B.Ö. GÜRHAN, R., 2007. Değişik ceviz çeşitlerinin farklı nem değerlerindeki bazı mekanik özelliklerinin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 13 (1): 62-68.

KOYUNCU, F., KOYUNCU, M.A., ERDAL, İ., YAVİÇ, A., 2002. Chemical composition of fruits of some walnut (Juglans regia L.) selections. Gıda 27 (4): 247-251.

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

LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

LARTILLOT, S., KEDZIORA, P., ATHIAS, A, 1988. Purification and Biosynthesis of Cottonseed (Gossypium Hirsutum L.) Catalase. The Biochemical Journal, 251: 147-155.

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

LIDA, T., MARUYAMA, D., FUKUNAGA, K., 2000. Stabilization of Entrapped Catalase Using Photo Crosslinked Resin Gel for Use in Wastewater Containing Hydrogen Peroxide. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 75:1026-1030.

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

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

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

MİTROVİC, M., STANİSAVLJEVİC, M. AND GAVRİLOVİC DANJANOVİC, J., 1997. Biochemical composition of fruits of some important walnut cultivars and selections, Acta Hort. (ISHS), 442:205-208.

MODRZEJEWSKA, B., GUWY, A.J., DINSDALE, R., HAWKES, D.L., 2007. Measurement of Hydrogen Peroxide in an Advanced Oxidation Process Using an Automated Biosensor. Water Research, 41:260 – 268.

NICHOLLS, P., FITA, I., LOEWEN, P.C., 2000. Enzymology and Structure of Catalases. Advances in Inorganic Chemistry, 51: 51-106

O'BRIEN, K.B., KILLORAN, S.J., O'NEILL, R.D., LOWRYA, J.P., 2007. Development and Characterization *in vitro* of a Catalase-based Biosensor for Hydrogen Peroxide Monitoring. Biosensors and Bioelectronics 22:2994–3000.

ÖLEZ, H. YÜCEL, A., 1974. Türkiye'de ceviz yetiştiriciliğinin sanayii-ticareti ve problemleri, Yalova Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Yalova.

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

PAAR, A., COSTA, S., TZANOV, T., GUDELJ, M., ROBRA, K.H., CAVACOPAULO, A., GUBITZ, G.M., 2002. Thermo-alkali-Stable Catalases from Newly Isolated *Bacillus sp*. for the Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents. Journal of Biotechnology, 89:147-153.

PRAKASH, P.A., YOGESWARAN, U., CHEN, S.M., 2009. Direct Electrochemistry of Catalase at Multiwalled Carbon Nanotubes-nafion in Presence of Needle Shaped DDAB for H2O2 Sensor. Talanta, 15:1414-1421.

RİEGER,M.M., 1993. Oxidative Reactions in and on Skin: Mechanism and Prevention, Cosm.Toilet., 108(Dec): 43-56

ROM, R., CARLOS, R.F., 1987. Rootstock for fruit crops, University of California, Davis, California, 415-450

SALİMİ, A., NOORBAKHSH, A., GHADERMARZ, M., 2005. Direct Electrochemistry and Electrocatalytic Activity of Catalase Incorporated onto Multiwall Carbon Nanotubes-Modified Glassy Carbon Electrode. Analytical Biochemistry 344: 16–24.

SANCAR, B., PAKSOY, N., BALCI, O., KURTOĞLU, N., 2012. Pamuklu Dokuma Kumaşların Boyamaya Hazırlık İşlemlerinde Enzim Kullanım Olanaklarının İncelenmesi ve Kombine Proses Geliştirilmesi, Tekstil ve Mühendis, 19: 86, 7-13.

SCHALLREUTER, K.U., MOORE J., 2002. Behrens-Williams S et al. Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with Dead Sea climatotherapy in combination with pseudocatalase (PC-KUS). Int J Dermatol 2002; 41: 482-487

SCOPES, R.K., 1994. Protein prufication: principles and practice. La Trobe Universty Bundoora, Victoria 3083 .

SERİNER, R., 2010. Katalaz Enziminin Hıyardan (Cucımus Satıvus) Saflaştırılması. Çukurova Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Adana.

SEZGİNTÜRK, M.K., GÖKTUĞ, S., DİNÇKAYA, E., 2005. A Biosensor Based on Catalase for Determination of Highly Toxic Chemical Azide in Fruit Juices, Biosensors and Bioelectronics, 21:684–688

SONDAŞ E., 2005. Nane (menta spicata) ve pırasa(allium porrum L.) bitkilerinden katalaz enziminin kısmı saflaştırılması, karekterizasyonu ve bazı kinetik özelliklerinin araştırılması. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi 41 sayfa.

TARHAN, L., 1995. Use of Immobilised Catalase to Remove H2O2 Used in the Sterilisation of Milk, Process Biochemistry, 30(7):623-628.

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

UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. John Wiley &Sons,Canada. p: 333.

VARMA, S., MATTIASSON, B., 2005. Amperometric Biosensor for the Detection of Hydrogen Peroxide Using Catalase Modified Electrodes in Polyacrylamide. Journal of Biotechnology, 119:172–180.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

YÖRÜK I.H., DEMİR H., EKİCİ K., SAVRAN A., 2005. Purification and properties of catalase from Van apple (Golden Delicious). , Pakistan J. Nutrition, , 4(1), : 8-10.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Adana'da doğdu. Lise öğrenimini 1997 yılında Şehit Temel Cingöz Lisesi'nde tamamladı. 1998 yılında kazandığı Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. 2008 yılında öğretmenliğe başladı. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. Halen TOKİ Sarıçam Anadolu Lisesi'nde kimya öğretmeni olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.