ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağlar ÖZDEMİR

SUPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİMİNİN NARDAN(*PUNİCA GRANATUM L.*) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SUPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİMİNİN NARDAN(*PUNİCA GRANATUM L*) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Çağlar ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez …./…/.... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

…….....	.....	.....……..
Doç.Dr.Ramazan BİLGİN	Prof.Dr.Seyhan TÜKEL	Doç.Dr. Fatma ÇEVİK
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:.....

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2009YL33

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Punica granatum L.'den SOD(SÜPEROKSİTDİSMÜTAZ) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Çağlar ÖZDEMİR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl : 2011, Sayfa:37
Jüri : Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Doç. Dr. Fatma ÇEVİK

Bu çalışmada, *Punica granatum'*dan Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırılmasında, homojenizasyon, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kolon kromatografisi basamakları uygulanmıştır.

Santrifüj sonrası süperoksit dismutaz enziminin spesifik aktivite değeri 10U/mg protein olarak bulunurken DEAE kolon kromatografisi ile yapılan saflaştırmanın son basamağında 166 U/mg protein değerine ulaşarak 16.60 kat artış göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Punica granatum* , Süperoksit Dismutaz, Saflaştırma

ABSTRACT

MSc THESIS

PURUFICATION OF SUPEROXİDE DISMUTASE FROM *Punica granatum L*.AND ITS CHARACTERIZATION

Çağlar ÖZDEMİR

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Assoc. Prof. Ramazan BİLGİN
Year: 2011, Pages:37
Jury : Assoc. Prof. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Assoc.Prof. Dr. Fatma ÇEVİK

In this study, superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) was purified from *Punica granatum* . For this purpose *Punica granatum* homogenized, cenrtifugation step, fractioned with ammonium sulphate precipitation and applied on DEAE chromatography seperation was applied *Punica granatum* was purified 16.60 fold in *Punica granatum* samples and spesific activity of enzyme in *Punica granatum* was found as 166 U/mg respectively.

Key Words: *Punica granatum*, Superoxide Dismutase, Purification

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında gerek bilimsel konularda gerekse manevi anlamda benden yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Doç.Dr Ramazan BİLGİN' e bana her zaman gösterdiği ilgi, sabır, iyi niyet ve güler yüzü için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca sayın hocalarım, Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL ve Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e,

Yüksek Lisans çalışma laboratuvarındaki arkadaşlarım, Deniz YILDIRIM, Dilek ALAGÖZ , M.Serkan YALÇIN ve Selçuk DALKAVRIYAN'a,

Yaşamımın her aşamasında bana hep destek olup sevgi ve ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili annem Hatice ÖZDEMİR'e ,

Tanıştığımız ilk günden beri hayatımın en önemli parçası olan,benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve bana her anımda güç veren sevgili eşim Yeşim ÖZDEMİR'e ve doğacak kızıma 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. Enzimler 1
1.2. Süperoksit Dismutaz 2
1.3.Protein Saflaştırma Amacı ve Stratejisi.....3
1.4. Enzim Saflaştırmada Temel Analizler.....4
1.5. Yapılacak Analizler.....4
1.6. Protein Konsantrasyon Ölçüm Yöntemleri.....4
1.7. Nar 5
1.7.1. Morfolojik Özellikleri 5
1.7.2. Tıbbi Kullanımı ve Sağlığa Faydaları 6
1.7.3. Tıbbi Kullanımı ve Sağlığa Faydaları 8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....9
3. MATERYAL VE METOD.....13
3.1. Materyal.....13
3.1.1.Kimyasallar.....13
3.1.2.Kullanılan Cihazlar.....13
3.2. Metod.....14
3.2.1. SOD Enzimi için Homojenatın Hazırlanması.....14
3.2.2.SOD Enziminin Saflaştırılması.....14
3.2.2.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme.....14
3.2.2.2.DEAE-Selüloz Kromatografisi.....15
3.2.3. SOD Aktivitesinin Tayini.....15

3.2.4. Protein Tayini.....……..……17
3.2.5. Saflaştırılan SOD'a Sıcaklığın Etkisi.....18
3.2.6. Saflaştırılan SOD'un Depolama Kararlılığının Belirlenmesi….....18
3.2.7. Saflaştırılan SOD'un Termal Kararlılığının Belirlenmesi……...….19
3.2.8. Saflaştırılan SOD'un Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi…….....19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……...21
4.1. Bulgular……...21
4.1.1. Protein Tayini…….….21
4.1.2. Süperoksit Dismutaz'ın Saflaştırılması İle İlgili Bulgular…….….22
4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Sonrasında Elde Edilen Bulgular…….22
4.1.4. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi Sonrasında Elde Edilen Bulgular……. 22
4.1.5. Saflaştırılan SOD Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 24
4.1.6. Saflaştırılan SOD'nin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi…….....24
4.1.7. Saflaştırılan SOD'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi …….....25
4.1.8. Michaelis-Menten Katsayısı (K_m) Ve Maksimum Hızın (V_{max}) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi …….……..….26
4.2. Tartışma……...28
5.SONUÇ VE ÖNERİLER……..…..31
5.1. Sonuçlar……...31
5.2. Öneriler……....32
KAYNAKLAR……...33
ÖZGEÇMİŞ……....37

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. SOD için saflaştırma tablosu ve her bir saflaştırma basamağına ait parametreler……..……. . 28

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1.Standart protein eğrisi…….21
Şekil 4.2. DEAE-Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de öçülen aktivite değerleri……...23
Şekil 4.3. *Punica granatum'*dan saflaştırılan SOD aktivitesine sıcaklığın etkisi….24
Şekil 4.4. Depolama Kararlılığı……..25
Şekil 4.5. Termal kararlılık grafiği……26
Şekil 4.6. *Punica granatum'*dan saflaştırılan SOD için Lineweaver– Burk Grafiği…….27

SİMGELER ve KISALTMALAR

SOD : Süperoksit dismutaz
XOD : Ksantin oksidaz
N.B.T : Nitro blue tetrazolium
OD : Optik dansitite
DEAE : Diethylaminoethyl selüloz
ATP : Adenozin trifosfat
BHT : Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA : Bütillenmiş Hidroksianisol
CAT : Katalaz
PVP : Polyviniylpolypyrolodine
Prot. : Protein
RNA : Ribonükleik asit

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin büyük bir çoğunluğu protein yapısında olmasına rağmen bazı RNA moleküllerinin enzimler gibi biyokimyasal reaksiyonları katalizledikleri bilinmektedir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. 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 sonucudur ve bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple yaşam birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret olan bir sistem olarak tanımlanmıştır. Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna – az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz 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 bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısımları doğrudan doğruya proteinin polipeptid zinciridir. Bazı enzimlerin ise katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna; bazılarının protein olmayan organik bileşiğe; bazılarının da hem metal iyonuna hem de organik bileşiğe ihtiyaçları vardır. Bu iyon ve bileşiklere genel olarak kofaktör denir. (Ziyan, 1998). Organik bileşik enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve dissosiye olmuyorsa prostetik grup adını alır. Pek sıkı birleşmemiş ve dissosiye olabiliyorsa koenzim adını alır. Kofaktörlere sahip olan enzimlere de holoenzim denir. (Tekman ve Öner, 1994). Enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetlerde tutunmuş olan gevşek bağlı koenzimler diyaliz yolu ile enzimlerden uzaklaştırılabilirler.

Apoenzim, kofaktörlü bir enzimin yalnızca protein kısmına verilen addır. Enzimin etki ettiği madde veya madde karışımına ise 'substrat' denir. Yani enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürebildikleri bileşikler o enzimin substratlarıdır. (Tekman ve Öner, 1994). Koenzim veya prostetik grup enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu, yani spesifisitesini tayin eder. Apoenzim ise enzimin hangi substrata etki edeceğini, diğer bir deyişle enzimin substrat spesifisitesini tayin eder. Örneğin; koenzimi NAD^+ olan enzimler dehidrojenasyon reaksiyonlarını kataliz ederler, fakat hidrojenin hangi substrattan ayrılacağını tayin eden enzimin apoenzim kısmıdır. Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içi reaksiyonlarda hiçbir yan ürün oluşturmaksızın etkilerini gösterirler. Hücre içi reaksiyonlar enzimler sayesinde birkaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşmektedir. Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Turnover sayısı enzimlerin katalizleme güçlerini gösteren bir ifadedir. Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 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).

1.2. Süperoksit Dismutaz (Süperoksit Oksidoredüktaz, E.C:1.15.1.1, SOD)

Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) süperoksit anyon radikallerinin dismutasyonunu moleküler oksijen ve hidrojen peroksite katalize eden, molekül ağırlığı 17-85 k DA aralığında olan metalloenzimlerdir. SOD enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir defanstır. SOD'nin fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H_2O_2 ve oksijene hızlıca dismutasyonunu

katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir (Fridovich, 1973; Lavelle ve ark. 1973; Petkau ve ark. 1975; Sheng ve ark. 2004).

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

(a) Bakır ve Çinko içeren dismutazlar (Cu, Zn SOD) genel olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve kloroplastlarda bulunur. Tek disülfit bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerirler. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko; Co^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başarılır.

(b) Mangan içeren dismutazlar (Mn SOD) prokoryotlarda ve mitokondri matriksinde bulunur. Birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır.

(c) Demir içeren dismutazlar (Fe SOD) prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn süperoksit dismutaza benzer yapıdadır.

1.3. Protein Saflaştırma Amacı Ve Stratejisi

İlk kez Berzelius tarafından kullanılan ve 1840 yılında ders kitaplarına geçen “protein” adı yunanca bir numara, birinci sırada olmak anlamına gelen “proteuo” kelimesinden türetilmiştir. Proteinler bu adı haklı olarak taşımaktadır. Sayısız hayat fonksiyonu proteinlere bağlıdır ve proteinsiz bir canlı söz konusu olamaz. Her hücrenin bileşeni olan proteinlerin enzimatik kataliz, transport, depolama, mekanik destek, koordine hareket, sinir impluslarının transmisyonu, immün koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi fonksiyonları vardır. Proteinlerin saflaştırılması hem bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının aydınlatılması hem de in vitro koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması açısından büyük önem taşır (Telefoncu,1996).

1.4. 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.

1.5. 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. Herhangi 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 (Ersöz, 2010).

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.

1.6. 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.(Ersöz, 2010)

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. Nar (Punica granatum L.);

Belgelere göre İsa'dan 2500 yıl önce, Finike ve Mısırlılarca tanınan, kullanılan ve kültürü yapılan bir bitkidir. Lythraceae familyasından olan içinde küçük çekirdekler ve meyve gövdesini oluşturan yüzlerce tanecikten oluşmuş, hafif ekşi ve bazen tatlı tadı olan, ılıman iklimlerde yetişen bir meyve türüdür. Linne tarafından Punica granatum L. olarak isimlendirilmiştir. İngilizcede Pomegranate, Almancada GranatBaum, Fransızcada Grenadier, Arapçada Gulnar, Türkçe'de ise Nar Ağacı olarak adlandırılır.

1.7.1.Morfolojik Özellikleri

Vatanı Akdeniz çevresi memleketler olan nar bitkisi, Pakistan, Hindistan, Çin gibi subtropik bölgelerde yetiştirilen, 2-7 m yükseklikte haziran-temmuz aylarında kırmızı renkli çiçekler açan, iki ile beş metre boylarında ağaççıklardır. Gövdeleri gayet muntazamdır. Yapraklar karşılıklı, parlak renkli, ince-uzun şekilli, kısa saplı ve kırmızı kenarlıdır. Çiçekler kısmen sapsız, tek tek ve birkaçı bir arada bulunur. Çanak yaprakları kırmızı renkli, dökülmeyen ve etlidir. Meyveleri küre şeklinde ve portakal büyüklüğünde, önceleri yeşil, olgunlukta kırmızımsı renkte, derimsi kabuklu, çok tohumlu ve etlidir. Meyvenin yenen kısmı, etli ve bol usareli olan tohumlarıdır. Bir nar meyvesinde 600 civarında tohum bulunur. Tohumların renkleri beyazdan koyu kırmızıya doğru değişik renk tonlarına sahiptir.

Narlarda yumuşak çekirdeklilik, tohum kabuğunun(testa) derece derece daha az odunlaşması ya da çok az odunlaşması (sertleşmesi) ile oluşmaktadır. Halk

arasında bu tip narlara genellikle çekirdeksiz nar denilmektedir. Ancak bu narlarda da tam oluşmuş, gerçek tohumlar yine mevcuttur.

Nar genel olarak sıcak ve kurak iklim bölgelerinin meyveleridir. Özellikle sıcak, kurak ve uzun bir yaz peryodu, ılık ve yağışlı bir kış, nar yetiştiriciliği için uygundur. Silisli, çakıllı, killi ve ağır killi topraklarda yetişebilen nar için optimal gelişme derin, geçirgen, alkali, silisli-killi topraklarda görülür. Ayrıca çok kurak ve çok nemli toprak koşullarında yetişebilmektedir.

Ülkemizde de Güney Doğu Anadolu Bölgesinden, Doğu Karadeniz Bölgesine kadar çok soğuk yöreler dışında her bölgede nar yetişebilmektedir. Narın yetişmesi için yer seçimi de çok önemli bir konu değildir. Deniz yüzeyinden çok yüksek yerlerde de 800-900 m de yetiştiği görülmüştür. Ekonomik ömrü 25-30 yıl olan bu bitkiden aynı kökten 100 yılı aşkın bir süre yararlanılabilir.

1.7.2.Tıbbi Kullanımı ve Sağlığa Faydaları

Dıoscorıdes zamanından bu yana kullanılmakta olan nar bitkisinin, kök, gövde ve kalın dallarının kurutulmuş kabukları, ateş diyare ve gece terlemelerine karşı etkilidir. Kabuklarından elde edilen pelletierin şeritler için özel bir öldürücü etkiye sahiptir. Saf pelletierin, baş ağrısı, uyku, kusma, solunum yetmezliği ve görme bozukluğu gibi bazı yan etkilere neden olmaktadır. Buna karşılık alkaloit-tanen kompleksi halinde kullanıldığında; tanen alkaloitin absorbsiyonunu azaltarak yan etkileri ortadan kaldırmaktadır. Nar bitkisinin kabuklarında ise alkaloit yanında tanen de bulunmaktadır.

Narın kök kabukları, meyve kabukları ve çiçekleri enfüzyon (%5) halinde ishale karşı kullanılan tehlikesiz ve etkili bir ilaçtır. Çiçekler ve meyve kabukları, tropiklerde halk arasında tarçın, kişniş, biber, karanfil, afyonla kombine halde etkisinden dolayı kronik dizanteride kullanılmıştır.

Günümüzde nar kabuğu Fransa ve Batı Almanya'da bu amaçla kullanılan droglar arasında yer almaktadır.

Hindistan'da, olgun meyvelerin suyu, safranla birlikte; yeşil meyvelerin suyu ise mazı, karanfil, zencefil ile karıştırılarak balla birlikte soğuk algınlığında

kullanılır. Ülkemizde halk arasında tatlı nar suyu idrar arttırıcı midevi ve kuvvet verici; ekşi nar kabuğu ve suyu ise kabız ve midevi olarak kullanılmaktadır.

Astrenjan etkisinden dolayı nar Çin'de yanık tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlardandır.

Kurulup öğütülmüş meyve kabukları, zeytinyağı ile karıştırılarak hemoroid tedavisinde kullanılır.

Meyve kabuklarının ekstresi soğukta sıkılmış zeytinyağı ile karıştırılarak deri bronzlatıcı ajan olarak kullanılır.

Narın değişik kısımlarından hazırlanmış preparatları kanser tedavisinde kullanılmıştır.

Uzak Doğu'da meyve kabukları ve ham meyveler, kadınlar tarafından dişlerin parlaklaştırılması için kullanılmaktadır. Hindistan'da ekşi nar taneleri kurutularak "Anardana" denilen ve yemeklerde ekşilik olarak kullanılan bir ürün elde edilmektedir. Ayrıca nar suyundan elde edilen tatlandırılmış, koyulaştırılmış ürün ise "Anar-rub" adıyla bilinmektedir. Ülkemizde de nar suyu koyulaştırılarak "Nar Pekmezi" ya da "Nar Ekşisi" denilen bir ürün elde edilmektedir. Nar suyu, halk arasında tansiyon düşürücü olarak bilinir. Ateşli hastalıklarda ateş düşürücü ya da çeşitli içkilerde ferahlatıcı bir katkı maddesi olarak kullanıldığı gibi Güney Doğu illerimizde pidelere de katılmaktadır.

Çukurova bölgesinde nar suyu yumuşak buğdayla kaynatılarak küçük parçalar halinde kurutulmaktadır. Uzun süre bozulmadan kalabilen "Topalak" adı verilen ve çerez olarak yenilen bu ürünün özellikle büyüme çağındaki çocuklar için çok değerli bir besin kaynağı olduğu bildirilmektedir.

Nar suyu dondurma, jöle ve likör yapımında; nar taneleri pasta ve tatlılarda, meyve salatalarında, bazı içkilerde kokteyl malzemesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Avrupa'da nar suyundan "Grenadin" adı verilen özel bir içki de hazırlanmaktadır. (Manav,1988)

1.7.3.Endüstrideki Kullanımı

Astrenjan ve damar büzücü etkisi olan nar çiçeklerinden sanayide boyar madde olarak da yararlanılmaktadır.

Ekşi nardan Sitrik asit fabrikasyonunda ve sirke yapımında yayarlanılmakta ve ortalama 33 ton meyveden 1 ton sitrik asit elde edilebilmektedir.

Nar meyve kabuğu %28-30 oranında tanen içermesi nedeniyle dericilikte kullanılır. Nar kabuklarında bulunan bileşiklerin tanen endüstrisinde kullanılışlarıyla ilgili bir çalışmada, tanen miktarının yüksek olduğu; çok iyi kalitede ürün elde edildiği; ekstresinin deri tabaklamada ya sentetik ajanlarla kombine halde ya da doğrudan kullanılabileceği saptanmıştır.

Meyve kabuğundan ayrıca kumaş ve deri boyacılığında, mürekkep yapımında da yararlanılır. Taze ve kurutulmuş nar meyve kabuğu ile kullanılan mordana bağlı olarak yün iplikler sarı, esmer-sarı veya siyaha boyanmaktadır.

Nar tohumlarından bitkisel yağ üretilmektedir. Pamuk tohumuyla hemen hemen aynı oranda yağ içermektedir. Östrojen (17mg/kg) yönünden, bilinen en zengin bitkisel kaynaklardan biri olan nar tohumları, hayvan yemlerine besin un olarak süt verimini arttırmak amacıyla katılmaktadır. (Manav,1988)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yasuko Abe ve ark. (1987), Kurbağa ciğerinden (*Rana Catesbeiana*) Mn-Süperoksit dismutazı; elektroforetik homojenizasyon ile saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 84.000 civarında olup, herbiri birer Mn atomu içeren 4 farklı subunit içermektedir ve amino asit dizilişinin insan ve tavuk karaciğerinden elde edilen Mn-SOD ile benzer olduğu saptanmıştır.

Jacques R.Vanfleteren, (1992), İplik kurdu (*Caenorhabditis Elegans*) dokusundan Cu, Zn-Süperoksit Dismutaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzim aktivitesi 2660 U/mg protein , moleküler ağırlığıda 37,5-40 kDa aralığında saptanmıştır.

Kumagai ve ark. (1994), bakır çinko süperoksit dismutazı (Cu-Zn SOD) sığır eritrositlerinden pH kontrollü amonyum sülfat methanol ekstraksiyonu ile izole etmişlerdir. % 90 amonyum sülfat doygunluğunda parçalanmış kırmızı hücre süspansiyonun pH'ını 5,0'a ayarlamışlardır. Eşit miktardaki methanol eklenmesi ile enzim spesifik aktivitesi 2000 ünite/mg protein den daha büyük değere ulaşmıştır. DEAE-Selüloz kolon kromatografisi kullanılarak yapılan ileri saflaştırmada, oldukça saflaşmış Cu-Zn SOD, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) bir tek band göstermiştir. Bu işlemi kullanarak 1 litre sığır kanından 4728 ünite/mg protein spesifik aktivitesine sahip 14 mg saf Cu-Zn SOD elde etmişlerdir.

Zhenfei ve ark. (1996), Cu-Zn SOD'yi bakla tohumlarından saflaştırmışlardır. Enzimi 2852 ünite/mg protein spesifik aktivite elde etmişler ve enzimin KCN ve H_2O_2 tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini bulmuşlardır. Enzimin pH=5-9'da 70 ˚C'ye kadar kararlı olduğunu, molekül ağırlığının 31 kDa ve alt ünitesinin 14 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Osatomi ve ark. (2001), Cu-Zn SOD'yi Japon dil balığının pankreasından saflaştırmışlardır. Enzimi, etanol / kloroform muamelesi, aseton çöktürmesi ve QSefaroz, S- Sefaroz, Ultrajel AcA 54 kolon kromatoğrafileri kullanarak saflaştırmışlardır. İndirgeyici koşullar altında SDS-PAGE'de 17,8 kDa moleküler

ağırlıkta tek bant elde ederken, indirgeyici olmayan koşullarda eşit miktarlarda 17,8 ve 36 kDa moleküler ağırlıkta iki bant elde etmişlerdir.

Liangquan S. ve ark. (2004), Bu çalışmada, Cu, Zn-Süperoksit dismutaz (Ive III) tütün yapraklarından (Nicotiana Tobacum) Amonyum sülfat, ethanolkloroform ve aseton ve DEAE-52, Sephadex G-75 kolon kromotografisi yardımıyla saflaştırılmıştır. Cu,Zn-SOD III' ün bazı özellikleri belirlenmiştir. Cu,Zn-SOD III'ün moleküler ağırlığı 22,976 Da olarak tayin edilmiştir.

Sivaprakasam ve ark. (2004), Süperoksit dismutazı amonyum sülfat fraksiyonlaması, jel süzme ve iyon değişim kromatoğrafisi kullanarak guava'nın ham yeşil meyvelerinden % 47 geri kazanım ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin 40 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğunu ve 20 kDa'luk iki eşit alt üniteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tipik Michaelis-Menten kinetiği gözlemlemişlerdir. Nitrobenzen tetrazolium ve riboflavin substratları için Km değerlerini sırasıyla 15 ve 2,3 mM bulmuşlardır. Enzimin 40˚C'ye kadar kararlı olduğunu ve % 76 inhibisyona kadar nitroblue tetrazolium'un inhibisyonunda doğrusal artış gözlemlemişlerdir.

Zunsheng ve ark. (2005), Bir mantar türü olan *Cordyceps Militaris*'ten Cu-Zn SOD üretmişlerdir. Cu-Zn SOD'nin kültür süzüntüsünde var olduğunu ve protein oranı olarak hücrelerarası Cu-Zn SOD aktivitesinin, kültürün büyüme devresinde yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} ve Fe^{2+}'nin enzim biyosentezi üzerine etkisini araştırmışlardır. Cu-Zn SOD'yi *Cordyceps Militaris*'ten izole etmişler ve kısmen karakterize etmişlerdir. Saflaştırmayı (NH4)2SO4 çöktürmesi, DEAE-Sefaroz hızlı akan anyon değişim kromatoğrafisi, CM-650 katyon değişim kromatoğrafisi ve sefadeks G-100 jel süzme kromatoğrafisi olmak üzere 4 basamakta gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin 35070 Da moleküler ağırlığına sahip olduğunu ve her biri bir Cu, Zn elementine sahip iki eşit alt üniteden oluştuğunu belirtmişlerdir.

Nedevaa ve ark.(2009),Yeni bir ısıca kararlı Cu/Zn SOD enzimini *Kluyveromyces marxianus* mayasından saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Saflaştırmada termal işlem, diyaliz, iyon değiştirici kromotografi, jel filtrasyonu, amonyum sülfat çöktürmesi kullanmışlardır. Saflaştırdıkları enzimin molekül ağırlığının 34 kDa olan bir homodimer olduğunu göstermişlerdir.

Hong ve ark. (2010), SOD enzimini nötral pH tampon ekstraksiyonu, amonyum sülfat çöktürmesi, izoelektrik nokta çöktürmesi ve iyon değiştirici metodları kullanarak *Panax Ginseng'*den saflaştırmışlardır. SOD'u bir homodimer ve molekül ağırlığı 31,079 Da olarak bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma, St. Louis, MO, Merck firmaları tarafından sağlanmıştır. Araştırmada enzim kaynağı olarak kullanılan Nar (*Punica granatum*) örnekleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden sağlanmıştır.

3.1.1. Kimyasallar

Sığır serum albümin (BSA), amonyum sülfat, hidrojen peroksit, sodyum klorür, bakır sülfat, DEAE-selüloz, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, folin-ciocalteu çözeltisi, sodyum sitrat, Tris HCl, Polyviniylpolypyrolodine, sodyum fosfat

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV-Vis Spektrofotometre (UNICAM)
pH Metre (Hanna 8417)
Magnetik Karıştırıcı (Are)
Kromatoğrafi Kolonları
Santrifüj (Jouan MR 23i)
Kriyostat (Poly Science)
Otomatik Pipet (Eppendorf)
Elektrikli Terazi (Sartorius)

3.2. Metod

3.2.1. SOD Enzimi İçin Homojenatın Hazırlanması

Homojenat hazırlanmasında 10 g nar taneleri, 10 g nar kabuğu ve 10 g nar taneleri ve zar homojenatları ayrı ayrı öğütüldükten sonra % 0,5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7,0 olan 25 ml KH_2PO_4 tamponunda homojenize edilmiştir. En yüksek aktivite nar taneleri homojenatında elde edilmiştir.Bundan sonraki en yüksek aktivite nar tanelerinde görüldüğü için tüm çalışmalar nar tanelerinde yapılmıştır. Soğutmalı santrifüjde 12.000x*g*'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar 4^oC'de muhafaza edilmiştir. (Havir ve McHale 1987).

3.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Saflaştırılması

3.2.2.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Narda (*Punica granatum*) bulunan SOD enziminin homojenatları sırasıyla %0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme işlemi sırasında 12.000x*g*'de 20 dakika boyunca yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpernatantta aktivitelere bakılmıştır. SOD enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir. Bütün bu işlemler +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı $(NH_4)_2SO_4$ yavaş yavaş eklenmiş her defasında daha önce kalan $(NH_4)_2SO_4$'ın çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$M[(NH_4)_2SO_4] = [1,77 \times V \times (S_2 - S_1)] / (3,54-S_2)$$

M = Katı amonyum sülfat miktarı (g)

V = Çözeltinin hacmi (ml)

S_1 = l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S_2 = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilmiştir. Numune önce 1 M'lık fosfat tamponuna (pH:7,0) karşı 6 saat süreyle diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde ve buz dolabında (+4^{o}C) gerçekleştirilmiştir. Diyaliz bittikten sonra aktivite tayini belirtilen yönteme göre yapılmıştır.

3.2.2.2. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi

%20'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucu SOD aktivitesi görülen süpernatant diyaliz edildikten sonra elde DEAE-Selüloz kolonundan (0.82cmx25cm) geçirilmiştir.

2,0 g DEAE-selüloz tartılıp, 100 ml 1,5 M pH=7.8 tris baz tamponunda, +4^{o}C'de bir gece bekletilerek, dengeye getirilmiştir. Bu süre sonunda reçine saflaştırma kolonuna dolduruluş ve yine aynı tamponla dengelendikten sonra SOD içeren süpernatant kolona yüklenmiştir. DEAE-selüloz kolonu başlangıç tamponu ile yıkanarak, SOD'ın DEAE- selüloz üzerine adsorbe olması sağlanmıştır. SOD'nin kolondan alınması için 25-450 mM NaCI içeren 50 mM pH=7.8 tris baz tamponu kullanılarak elüe edilmiştir. 3 ml'lik fraksiyonlar alınarak ve SOD aktivitesi gösteren fraksiyonlar biraraya toplanmıştır (Asano ve ark, 1986).

3.2.3. SOD Aktivitesi Tayini

SOD aktivitesi, Sun ve ark. (1988) tarafından önerilen yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin($O_2 \cdot^-$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin (1), nitro blue tetrazolium (N.B.T) ile meydana getirdiği mavi renkli formazan boyasının 560 nm dalga boyunda verdiği optik dansititenin

(OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. SOD'nin bir ünitesi deneme koşulları altında N.B.T indirgenme hızının % 50 inhibisiyonudur.

$$\text{Ksantin} \xrightarrow{XOD} \text{Ürik asid} + O_2\bullet^- \quad (1)$$

$$\text{N.B.T.} + O_2\bullet^- \rightarrow \text{formazan boyası} \quad (2)$$

$$O_2\bullet^- + O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2 \quad (3)$$

Reaktif Çözeltisinin Hazırlanışı:

1. Ksantin* (0,3 mM) 9,13mg ⟶ 200 ml saf suda çözülür.
2. EDTA (0,6 mM) 22,3 mg ⟶ 100 ml saf suda çözülür.
3. N.B.T. (150 mg/L) 12,3 mg ⟶ 100 ml saf suda çözülür.
4. Na_2CO_3 (400 mM) 2,544g ⟶ 60 ml saf suda çözülür.
5. Sığır serum (1g/L) 30 mg ⟶ 30ml saf suda çözülür.

Yukarıdaki kimyasallar birleştirilerek Assay Reaktif hazırlanmıştır.

- Ksantin oksidaz (167 u/L) enziminden 18 ml alınıp , 3 ml 2 M $(NH_4)_2SO_4$ da çözülür;
- 2 M $(NH_4)_2SO_4$ 2,643 g 10 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- $CuCl_2.2H_2O$(0,8 mM) 13,6 mg 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.

*Önce birkaç damla 1N NaOH de çözülür.

	Kör	Örnek
Reaktif	2,85 ml (1425 mL)	2,85 ml (1425 mL)
Örnek	----------	0,1 ml (50 mL)
Ksantin oksidaz (XOD)	50 mL (25 mL)	50 mL (25 mL)
25°C de oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi		
CuCl2	0,1 ml (50 mL)	0,1 ml (50 mL)
Örnek	0,1 ml (50 mL)	--------

560 nm de destile suya karşı okunur

SOD için Aktivite Hesaplanması:

$$\frac{\text{Kör OD} - \text{Numune OD}}{\text{Kör OD}} \times 20 \text{ U/ml SOD}$$

- Ksantin oksidaz iyice karıştırılmalıdır.

3.2.4. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A: 20 g Na_2CO_3 ve 4g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2. Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
3. Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir).

4. Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
5. Standart protein çözeltisi: 100mL'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.
6. Standart protein eğrisini çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırası ile 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 mL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi su ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika 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.

3.2.5. Saflaştırılan SOD'a Sıcaklığın Etkisi.

Saflaştırılan SOD'a sıcaklığın etkisi 5, 10, 15, 20, 25 ˚C'de SOD aktivitelerine bakılarak belirlenmiştir.

3.2.6. Saflaştırılan SOD'nin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

SOD örnekleri 5˚C ve oda sıcaklığında

a)50 mM pH 7.8 tris baz tamponunda depolanma kararlılığının belirlenmesi amacıyla, aynı enzim homojenatı kullanılmak üzere 1, 3, 7 ve 14.gün boyunca aktivite değerleri gözlemlenmiştir.

3.2.7. Saflaştırılan SOD'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD'nin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta, 40˚C ve 50˚C'de 1, 3, 5, 8 ve 16 saat bekletildikten sonra aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.8. Saflaştırılan SOD'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

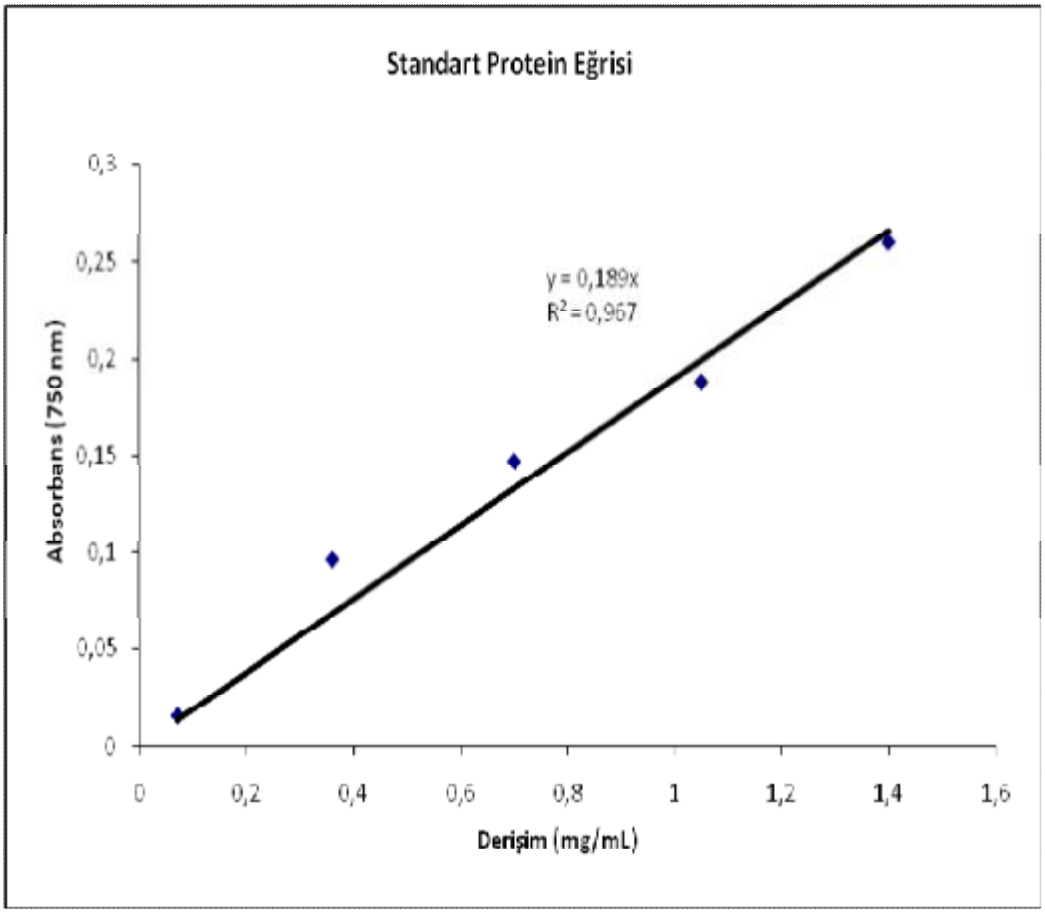
Belirlenen optimum koşullarda 0,01-0,12mM ksantin derişimleri kullanılarak SOD için Michaelis-Menten sabiti (Km), maksimum hızı (Vmax) ve katalitik etkinliği (kcat/Km)'nin hesaplanmasında Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Protein Tayini

SOD'ın saflaştırılması basamaklarında ve spesifik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla örneklerin protein miktarları Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla sığır serum albumini kullanılarak standart protein eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Standart Protein Grafiği

4.1.2. Süperoksit Dismutaz'ın Saflaştırılması İle İlgili Bulgular

10 g nar, öğütüldükten sonra % 0.5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7 olan 25 mL KH_2PO_4 tamponunda homojenize edilmiştir.

Kaba homojenat tüplere alınarak 12.000*g*'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Santrifuj sonrasında elde edilen çökelti ve supernatantlar toplanarak bir araya getirilmiştir.

Çökeltide aktivite saptanamamıştır. Üst fazdaki protein miktarı 0,69 mg/mL, katalaz enziminin spesifik aktivitesi 10 U/mg olarak bulunmuştur.

4.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Sonrasında Elde Edilen Bulgular

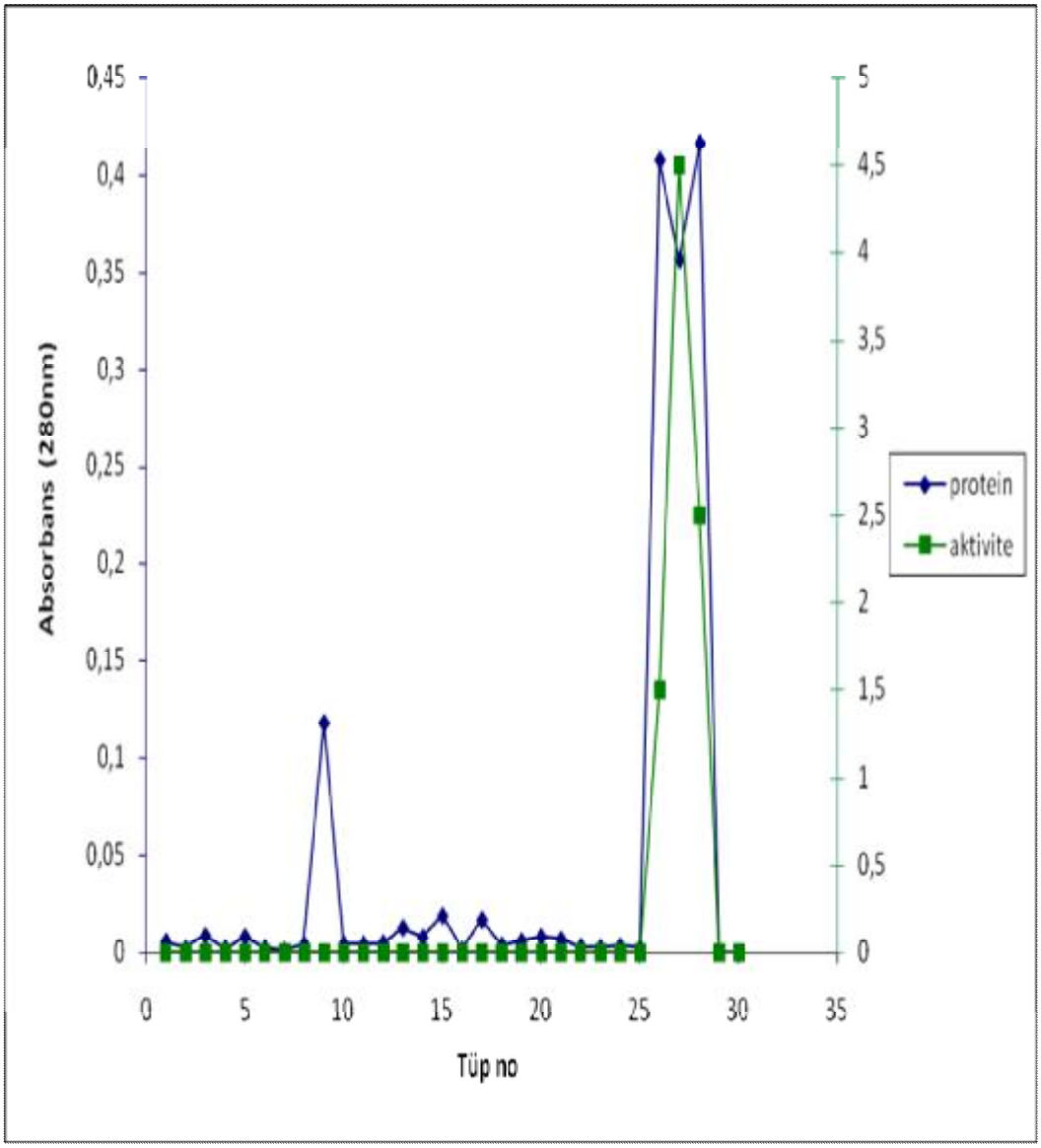
Narda(*Punica granatum)* bulunan SOD enziminin homojenatları sırasıyla 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 50-60 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme 12.000xg'de 20 dakika boyunca yapılmıştır.

Yapılan çöktürme işleminde maksimum çözeltiye %20'lik $(NH_4)_2SO_4$'da rastlanmıştır.

Elde edilen süpernatant çözeltisinden amonyum sülfatın uzaklaştırılması için diyaliz yapıldı ve diyaliz sonrasında protein miktarı 0,217 mg/mL, SOD'nin spesifik aktivite değeri de 6.50 U/mg olarak hesaplanmıştır.

4.1.4. DEAE-Selüloz Kromatoğrafisi Sonrasında Elde Edilen Bulgular

% 20'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında diyaliz edilen SOD içeren süpernatant çözeltisi DEAE-selüloz kolonuna uygulandı. 25-450 mM arasındaki NaCI çözeltileri ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'de absorbansları ölçüldü ve protein içeren elüatlarda SOD aktivitesine bakıldı. Elüatların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de ölçülen SOD aktivitesi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.2)

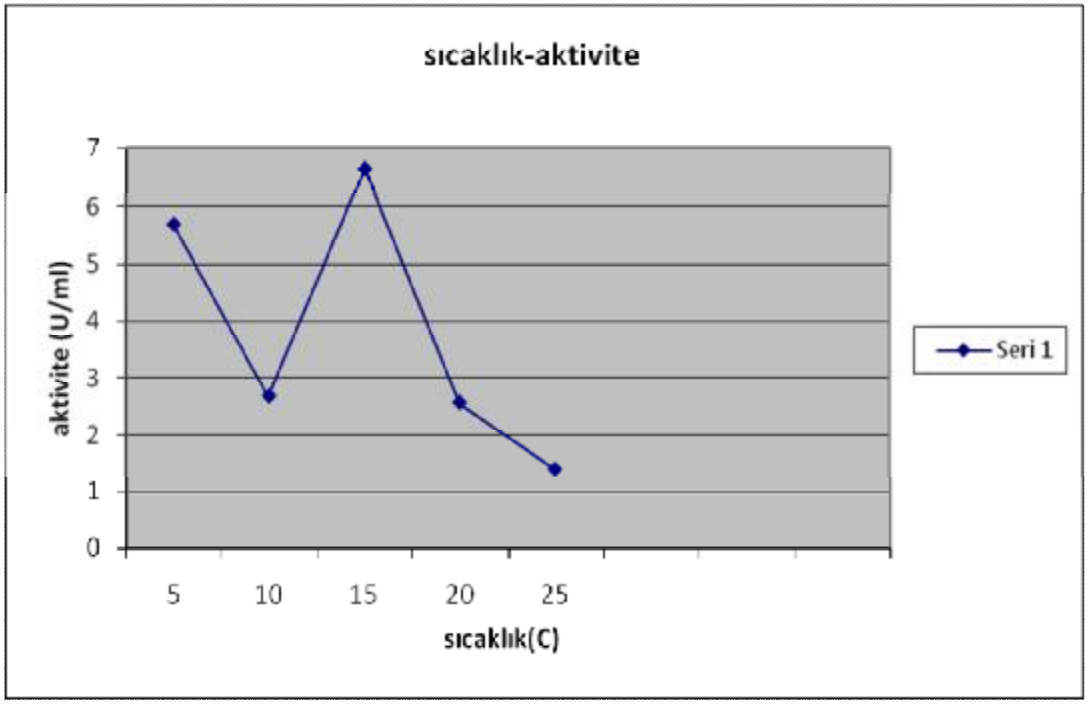


Şekil 4.2. DEAE-Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ve 560 nm'de öçülen aktivite değerleri

DEAE-selüloz kromatoğrafisi sonucu SOD aktivitesi olduğu belirlenen fraksiyonlar bir araya toplanmış ve toplam protein ve aktivite değerleri ölçülerek spesifik aktivitesi hesaplanmıştır. Buna göre spesifik aktivite 166 U/mg protein olarak belirlendi.

4.1.5. Saflaştırılan SOD Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

SOD enzimi üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 5-25 ºC arasındaki sıcaklıklarda çalışılmış ve sonuçlar şekil 4.3'te verilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 15 ºC olarak belirlenmiştir.

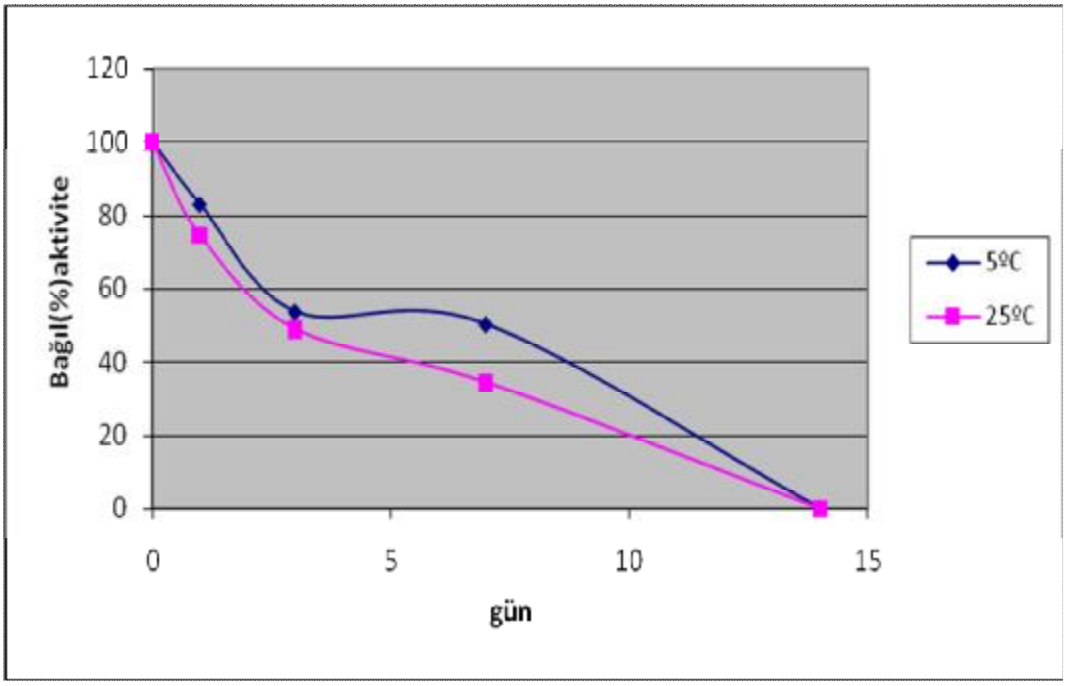


Şekil 4.3. *Punica granatum'*dan saflaştırılan SOD aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.1.6. Saflaştırılan SOD'nin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Nar ile yapılan SOD enzimi aktivite tayini çalışmalarında enzimin kararlılığını belirleyebilmek için DEAE kolonu sonrası en yüksek aktiviteyi gösteren örneklerden yararlanılmıştır.(Şekil 4.4).

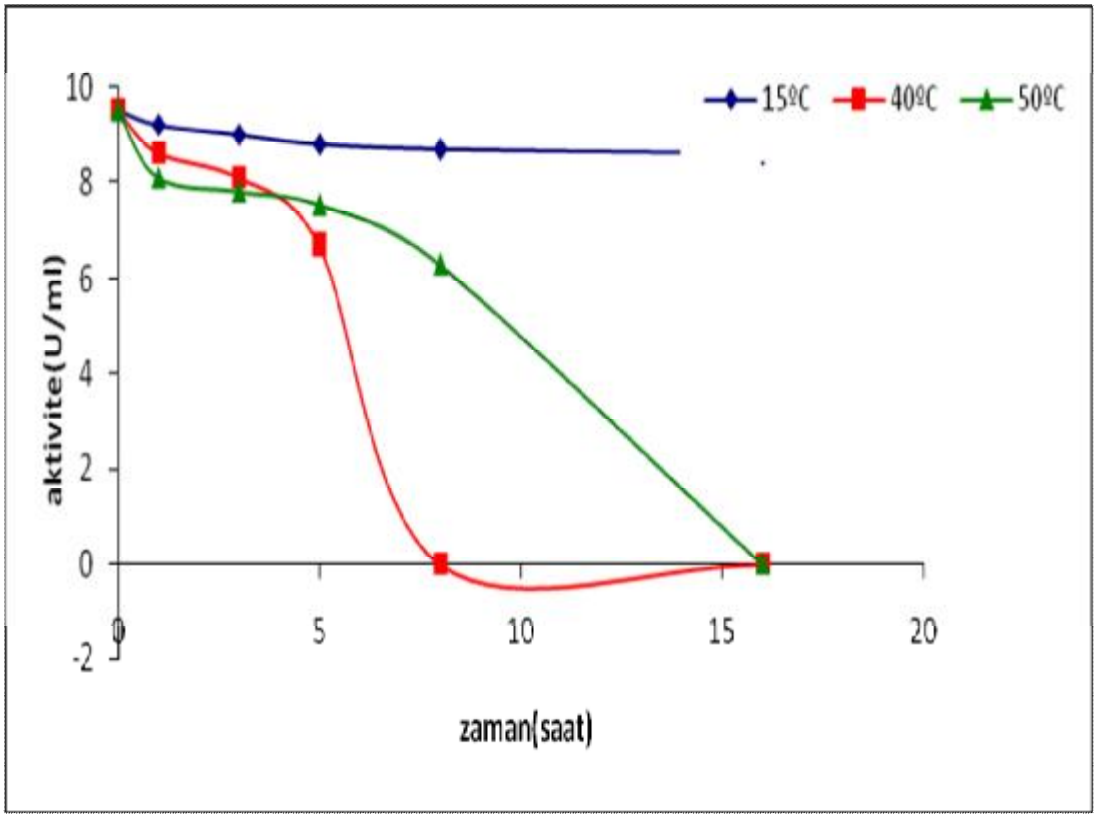
Yapılan çalışmalar sonunda 50 mM tris baz tamponunda bekletilen SOD'ın 14 gün sonunda 5˚C ve 25˚C'de başlangıç aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Depolama kararlılığı

4.1.7. Saflaştırılan SOD'nin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

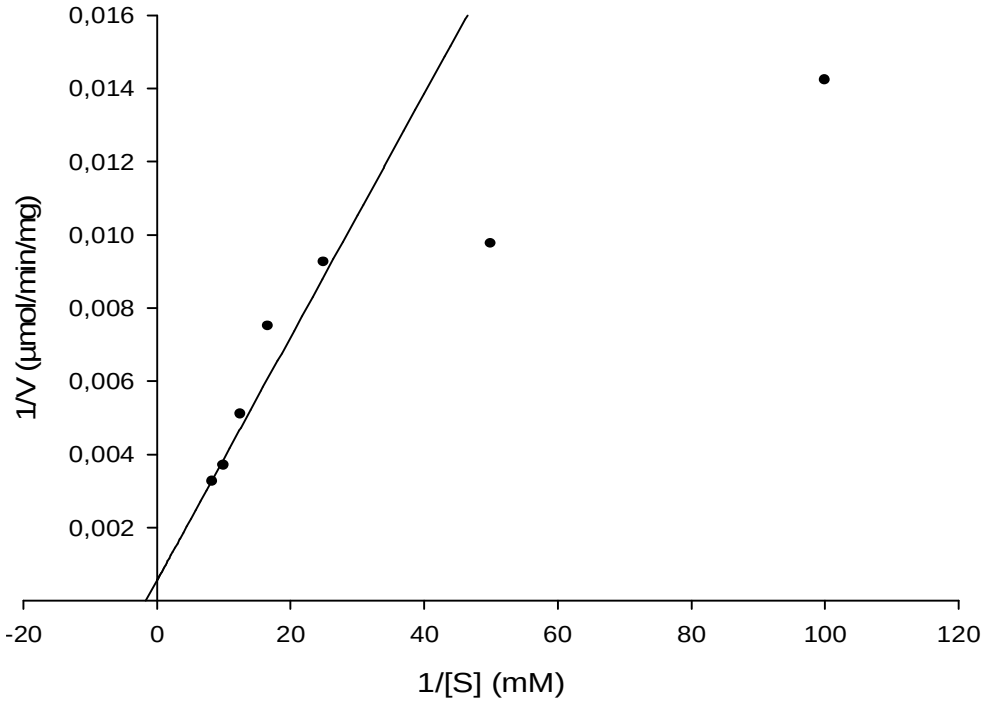
Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD'nin 15˚C'de 40˚C ve 50˚C'de 1, 3, 5,8 ve 16 saat bekletildikten sonra aktiviteleri ölçüldü. 15˚C'de 16 saat sonunda başlangıç aktivitesinin %90'sını korurken, 40˚C'de ve 50˚C'de ise başlangıç aktivitesinin %100'ünü kaybetmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Termal kararlılık grafiği

4.1.8. SOD Enzimi İçin Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanması

SOD enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanabilmesi için farklı substrat (ksantin) derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri ölçülmüştür ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver–Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.6). Bu programdan yararlanılarak hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.6 mM ve 1803.6 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. *Punica granatum'*dan saflaştırılan SOD için Lineweaver–Burk grafiği.

Narda(*Punica granatum)'*dan saflaştırılan SOD'ın her bir saflaştırma basamağına ait bulgular Çizelge 4.1.'de özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1. SOD için saflaştırma tablosu ve her bir saflaştırma basamağına ait parametreler

Aktivite tayin basamakları	V_{Tml}	$C_{protein}$ mg/ml	Toplam protein(mg)	Aktivite U/ml	Spesifk aktivite	A_T U	Saflaştırma derecesi
İLK KARIŞIM	18	0.69	12,42	6,90	10	124,2	1
%20 SÜPERNATANT	15	0,437	6,55	6	13,73	90	0,55
%20 ÇÖKELEK	3.25	1.01	3.28	2,20	2,17	7,15	----------
%20 DİYALİZ	15	0.217	3.25	6,50	29.9	97,5	1,89
DEAE-SELÜLOZ	10	0.027	0,27	4,50	166	45	16,6

4.2. Tartışma

10 g nar (*Punica granatum*), öğütüldükten sonra %0,5 PVP içeren 50 mM'lık, pH'sı 7,0 olan 25 ml KH_2PO_4 tamponunda homojenize edilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 12.000x*g*'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant ile yapılan çalışmalarda protein miktarı 0,69 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 10 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Malgorzata ve ark. (2005) tarafından yapılan araştırmada, soya fasulyesi kök ve dallarında SOD enziminin aktivite gösterdiğini saptanmıştır. Yapılan çalışmada köklerdeki SOD spesifik aktivitesini 10-15 U/mg prot., dallarında ise 15-20 U/mg prot. aralıklarında tayin etmişlerdir.

Yurdanur (2007) keten tohumından SOD enziminin saflaştırırken ultrasantrifüj sonucu elde edilen süpernatantta enzimin spesifik aktivitesini 2,05 U/mg olarak hesaplamıştır.

Elde edilen homojenatların sırasıyla %0-10 , %10-20, %20-30 ,%30-40, % 40-50 ,% 50-60 amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak SOD enziminin en yüksek aktivitesi % 20 süpernatantta gözlemlenmiştir . Daha sonra enzim homojenatı 1 saat

aralıklarla 6 saat boyunca diyaliz edilmiş ve safsızlık uzaklaştırılmıştır. $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi sonunda yapılan çalışmalarda protein miktarı 0,437 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 13,73 U/mg olarak belirlenmiştir.

Wang Zhuanhua ve ark.(1974) Tataristan kara buğdayından SOD enzimini saflaştırırken %40 ve %90'lık $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi sonrası protein miktarları ve spesifik aktiviteleri sırasıyla 600 mg, 24.7U/mg prot.ve 120mg, 65.9U/mgprot.olarak bulmuşlardır.

Nar (*punica granatum*) ile yaptığımız SOD enzimi saflaştırma çalışmasında DEAE-selüloz kolonu kullanılmıştır. DEAE-selüloz kolonundan alınan protein örnekleri 2 mL hacmindeki fraksiyonlar halinde 30 tüpe alınmıştır. Alınan eluatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren 25, 26, 27, 28, 29, 30 nolu örnekler bir araya toplanmış ve bu karışımda protein miktarı, SOD enziminin spesifik aktivitesi ölçülmüştür. Örneğin protein miktarı 0,027 mg/mL, SOD enziminin spesifik aktivitesi 166 U/mg olarak bulunmuştur. DEAE kolonunda elde edilen eluatlarda SOD enziminin spesifik aktivitesi başlangıca göre 16,60 kat artış göstermiştir.

Literatürde yapılan araştırmalarda nardan SOD enzimi saflaştırmasına ait daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sonuçlarımızı literatür bulguları ile karşılaştırmamız mümkün olmamıştır.

İmen Hadji ve ark (2007) sarımsaktan Cu,Zn SOD enzimini saflaştırma çalışmalarında, kolondan alınan elüatlardan enzimin spesifik aktivitesini başlangıca göre 82 kat saflaştırarak 4,96 U/mg prot. olarak hesaplamışlardır.

Yurdanur (2007) kolon kromatografisi ile yaptığı çalışmada kolondan alınan elüatlardan enzimin spesifik aktivitesini 4,90 U/mg prot. olarak hesaplamıştır.

Nardan (*punica granatum*) elde edilen SOD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacı ile 5-25ºC aralığında farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Çalışmamızın bu aşamasında diyaliz sonrası elde edilen en ideal substrat konsantrasyonu kullanılmıştır. Optimum sıcaklık belirlenmesi sırasında istenilen sıcaklıklar buz banyosu veya sıcak su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve optimum sıcaklık 15 ºC olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç; Vyas ve Kumar (2005), kışın yetişen çay filizlerinden mangan içeren süperoksit dismutazı saflaştırırken optimum sıcaklığı 0 ˚C olarak bulmuşlardır.

Nar (*punica granatum*) ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında DEAE-selüloz kolonundan geçen eluatlar arasında, en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler bir araya toplanmış ve bu örnekler için 25^{o}C'de yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucu SOD enzim aktivitesinde 1 gün sonunda % 16,10' luk, 3.günün sonunda %46,30'lük, 7.günün sonunda % 49,70'lik aktivite kaybına rastlanmıştır. 14.günün sonunda ise SOD enziminin aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu da Narda bulunan süperoksit dismutaz enziminin depolama kararlılığının yüksek olduğunu göstermiştir.

Saflaştırılan SOD'nin termal kararlılığının belirlenmesinde SOD enziminin . 15˚C'de 16 saat sonunda başlangıç aktivitesinin % 90'ını koruduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, Zhenfei ve ark. (1996), Cu-Zn SOD'u bakla tohumlarından saflaştırırken, SOD enziminin 70 ˚C'ye kadar kararlı olduğunu, Sivaprakasam ve ark. (2004), Süperoksit dismutazı amonyum sülfat fraksiyonlaması, jel süzme ve iyon değişim kromatoğrafisi kullanarak guava'nın ham yeşil meyvelerinden % 47 geri kazanım ile saflaştırırıken SOD aktivitesinin 40˚C'ye kadar kararlı olduğunu bulmuşlardır.

Linewear-Burk grafikleri çizilerek Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Nardan elde edilen SOD enzimleri için Km değeri 0.6 mM; Vmax değeri ise 1803.6 U/mg prot. olarak elde edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yapılan çalışmalar sonucu aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Narda SOD enzimi için narın kabuğu soyularak taneleri ayıklanıp kaba homojenat hazırlanmıştır. Narın kabuğu sert ve yoğun olduğu için homojenata dahil edilmemiştir.
2. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantla yapılan çalışma sonucu SOD enziminin spesifik aktivite değeri 10 U/mg olarak bulunmuştur.
3. Nar için amonyum sülfat ile yapılan çökeltme işlemlerinde çökeltiler incelendiğinde maksimum çökeltiye %20' lik tuz derişiminde rastlanmıştır ve spesifik aktivite değeri 13.73 U/mg olarak bulunmuştur.
4. Yapılan diyaliz işlemi sonrasında enzimin spesifik aktivite değerinin 29.9 U/mg'a çıktığı gözlemlenmiştir.
5. DEAE kolon kromatografisi ile yapılan bir sonraki saflaştırma basamağında SOD enzminin spesifik aktivitesi 166 U/mg olarak tespit edilmiş ve ilk duruma göre 16.6 kat artmıştır.
6. DEAE kolon kromatogrofisi sonucu en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler üzerinde yapılan termal kararlılık çalışması sonucu, 15˚C'de 16 saat sonunda enzim aktivitesinin % 90'ı korunurken, 40˚C ve 50˚C de enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir.
7. DEAE kolon kromatogrofisi sonucu en yüksek aktiviteyi gösteren örnekler üzerinde SOD spesifik aktivitesine başlangıç aktivitesinden itibaren 1, 3, 7 ve 14.günlerde bakılmıştır. 14.günün sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmüştür.

5.2. Öneriler

1. Enzim tayininde farklı yöntemler denenebilir, kıyaslama yapılabilir.
2. Narın kabuğunda ve suyunda da enzim saflaştırılması yapılıp karşılaştırma yapılabilir.
3. Enzimin moleküler ağırlık tayini yapılabilir.
4. Enzimin hangi kofaktörü (Fe, Zn, Cu) taşıdığı belirlenebilir.

KAYNAKLAR

ABE, Y., OKAZAKI, T., 1987, Purification and Properties of the Manganese Superoxide Dismutase from Liver of Bullfrog, Rana Catesbeiana. Achives of Biochemistry and Biophysics,253(1):241-248.

ASANO, M.M., ITO K., IKEDA H., SEKIGUCHI, S., 1986. Purification of Copper-Zinc-Superoxide Dismutase and Catalase From Human Erythrocytes by Copper-Chelate Affinity Chromatography. Journal of Chromatography A,370: 501-507.

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

BOZDEMİR, Y. ,2007. Keten Tohumu (*Linum Usitatissimum*) Ekstraktında Katalaz Ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri

ERSÖZ, H.,2010. Alkoldehidrogenaz (Adh) Enziminin Tavuk KaraciğerindenSaflaştırılması Ve Florisil Üzerine İmmobilizasyonu

FRIDOVICH, I., 1973. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase, Biochem.Soc. Trans., 1: 48

HADJI,I. ,MARZOUKI, M.N. ,FERRARO,D. ,FASANO,E. ,MAJDOUP,H.

PANİ,G. ,LİMAM,F. , 2007 Purification and Characterization From Garlic (Allium sativum L.) Antioxidant Efect On Tumoral Cell Lines 143(2):129-41

HAVIR,E. A., MCHALE, N. A., 1987. Plant Physiol,84:450-455

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

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

KUMAGAI Y., SHINYASHIKI M., SUN G.F., SHIMOJO N., SAGAI M., 1994.An Efficient Method For Purification Of Cuprozinc Superoxide-Dismutase From Bovine Erythrocytes. Experientia 50 (7): 673-676.

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

LI, H.Y, Yu, Z., CAO Y.,. WANG W. N 2010 Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase from Panax Ginseng (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.142

LIE, M., JIA, L., KEWU, L.,YAN J., WEN, L.X., XIN, L., 2004. Isolation,Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase From Royal Jelly Of The Italian Worker Bee, Apis Mellifera. Acta Entomologica Sinica 47(2): 171-177.

LOWRY O.H, ROSEBROUGH N.J, FARR A.L., RONDALL, R.J., 1951.Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193:261-275.

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

MANAV, S.1988 Nar (*Punica Granatum l.)*Meyve Kabuklarını Eczacılıkta Değerlendirme Açısından Türkiye'de Yetişen Doğal ve Kültür Nar Çeşitlerinin Karşılaştırılması)

NEDEVAA, R. ,MOSHTANSK, V. , VOELTERC, W. ,PETROVAA, V. And

KUJUMDZİEVA, A. 2009 Purification and Partial Characterization of Cu/Zn Süperoxit Dismutase from *Kluyveromyces marxianus* Journal of Chromatography B Volume 877, Issue 29, Pages 3529-3536

OSATOMI, K., MASUDA, Y., HARA, K., ISHIHARA, T., 2001. Purification, NTerminal Amino Acid Sequence And Some Properties Of Cu, Zn Superoxide Dismutase From Japanese Flounder (Paralichthys Olivaceus)Hepato-Pancreas. Comparative Biochemistry And Physiology Part B, 128: 751-760.

SIVAPRAKASAM, G., SINGH, D., DHILLON, S., MALHOTRA, S.P.,

AHLAWAT, T.R., SINGH, R., 2004. Purification And Characterization Of Superoxide Dismutase From Guava (Psidium Guajava L.). Physiology and Molecular Biology of Plants, 10(1): 59-64.

SHENG, L., ZHENG, X., TONG, H., LIU, S., DU, J., LIU, Q., 2004. Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves. Plant Science, 167 (6): 1235-1241.

SUN Y., OBERLEY L.W., LI Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin. Chem., 34: 497-500.

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

TEKMAN, S., ÖNER, N., 1994.Genel biyokimya dersleri. Fakülteler matbaası, 341-356, İstanbul,

TELEFONCU, A., 1996. Protein Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Ege Üniversitesi, İzmir, 272s.

VANFLETEREN, J.R., 1992, Cu-Zn Superoxide Dismutase from Caenorhabditis elegans: Purification, Properties and Isoforms. Comparative Biochemistryand Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 102(2):219-229.

VYAS, D., KUMAR S., 2005. Purification And Partial Characterization Of A Low Temperature Responsive Mn-SOD From Tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze). Biochemical And Biophysical Research Communications, 329:831–838.

WANG ZHUANHUA, LİN RUFA, ZHANG ZHENG, ZHOU MİNGDE , 1974.Purification and characterization of superoxide dismutase from tartary buckwheat leaves Fagopyrum 13: 31 - 34

ZHENFEI, G., YUN, L.S., MINGQI, L., 1996. Purification And Characterizationof Superoxide Dismutase From Broad Bean Seeds. Journal of Tropical and Subtropical Botany 4(3): 60-64.

ZİYAN, E., 1998. Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (*Pyrus communis*)'ndan izole edilmesi, saflastırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenemesi.Y.lisans tezi; Ankara Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya Anabilim Dalı; Ankara;

ZUNSHENG, W., ZHUOJING, H., SUXIA, L., QINSHENG, Y., 2005.Purification And Partial Characterization Of Cu, Zn Containing Superoxide Dismutase From Entomogenous Fungal *Species cordyceps militaris*. Enzyme And Microbial Technology 36: 862-869.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Osmaniye'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Osmaniye'de tamamladıktan sonra 1995 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde eğitimine başladı. 1999 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu ve Milli Eğitim Bakanlığında öğretmen olarak göreve başladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.