

Aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması

Hülya Demir

Atatürk Üniv., Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Erzurum
hdemir@atauni.edu.tr

Özet

Katalaz (Hidrojen Peroksit: Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.6), aşotu yapraklarından saflaştırıldı ve bazı kinetik özellikleri incelendi. Katalaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi takiben iyon değişim kromatografisi ile %10,67 verimle, 89.68 EU/mg protein spesifik aktiviteye sahip olarak 64.06 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül ağırlığı, SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi ile 60,95 kDa olarak bulundu. Beutler'in spektrofotometrik metoduna göre yapılan kinetik analizler sonucu, katalaz enziminin K_m değeri H_2O_2 için 7,87mM, V_{max} değeri H_2O_2 için 42,19 EU/mL olarak bulundu.

Anahtar kelimeler: Katalaz, saflaştırma, karakterizasyon, aşotu (*Coriandrium Sativum*)

Giriş

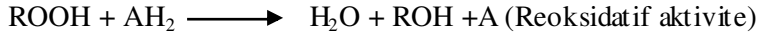
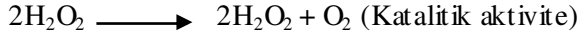
Aşotu ülkemizde kişniş, aşotu, kuzbere gibi isimlerle bilinen ve umbelliferae familyasına ait bir baharat bitkisidir. Aşotunun yeşil herbaları sebze ve baharat olarak kullanılmasının yanı sıra asıl kullanılan meyveleridir. Meyveler direk baharat olarak kullanıldığı gibi meyvelerden çıkarılan uçucu yağ gıda, içki ve parfümeri sanayiinde de kullanılmaktadır. Doğal olarak sadece umbelliferea familyası türlerinin sabit yağında bulunan petroselinik asit aşotunda %60-70 arasındadır. Petroselinik asit, antimikrobial etkilerinden dolayı parfümeri ve gıda sanayiinde geniş kullanım alanına sahiptir (1).

Katalaz ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.6), hidrojen peoksidin suya dönüştürülmesini tek yönlü olarak gerçekleştirir ve prostetik grup olarak hem grubu içerir. Bitkilerin yaprak, kotiledon ve köklerindeki peroksizom ve glioksizomların da lokalize olmuştur. Yüksek turnover sayısına ($4 \times 10^7 S^{-1}$) sahiptir (2).

Antioksidantlar, oksidasyonu başlangıç veya gelişme basamağında önleyen ve/veya geciktiren maddelerdir. Biyolojik sistemlerde antioksidant aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için önemli temel bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsiyonejik, antiaging gibi birçok biyolojik fonksiyonlar bu antioksidantlardan kaynaklanır (3).

Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu

Antioksidant enzimler ve serbest radikal koruyucuları ROS (Reaktive Oxygen Species) un zararlı etkilerine karşı koruyucu bir mekanizma sağlar. Antioksidant enzimlerin bir çoğu süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, glutasyon peroksidaz (GPx) ve glikoz 6-fosfat dehidrogenaz ROS'a karşı koruyucu olduğu bulunmuştur. Bunlar bitkilerde yaygın olarak bulunur. Katalaz canlılarda aşağıdaki reaksiyonları katalizler (4):



Bitkisel kaynaklardan elde edilen katalazlar, hem grubu içeren ve alt ünite başına 54-59kDa arasında molekül ağırlığına sahip dört alt ünitelerden oluşur. Kabakta 55kDa, mercimekte 54 kDa, salatalıkta 54,5kDa ve pamukta 55kDa'dır (5). Katalazın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, H_2O_2 ve ROOH gibi bir peroksidi gidererek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir. Çünkü H_2O_2 , singlet oksijen ve hidroksil radikalinin potansiyel kaynağıdır (6).

Çalışmada aşotu yapraklarından katalaz saflaştırıldı ve saf enzimin kinetik davranışları incelendi.

Materyal ve Yöntem

Materyal

DEAE-Sephadex A50, H_2O_2 , protein tayininde kullanılan reaktif, elektroforez için kimyasallar Sigmadan sağlanmıştır.

Enzim Ekstraksiyonu ve Saflaştırma: Aşotu yaprakları sıvı azot içerisinde dondurulup öğütüldükten sonra üzerine 5 mM dithiothreitol içeren 0,125M Tris-HCl (pH 7.3) den 125 ml ilave edildi. 20000xg de 20 dakika santrifüj edildi. Homojenatta %20-50 aralıklarında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yapıldı. Çöktürme işlemi 24000xg de 30 dak. santrifüj edildi. Çöktürme sonucunda elde edilen çökelti 0,125 M Tris-HCl (pH 7.3) de çözüldü ve sonra 4 °C de aynı tamponda diyaliz edildi. Daha sonra enzim ekstraktı DEAE-Sephadex A50 iyon değişim kolonuna yüklendi. Eliütatlar 3ml lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'de absorbansı ve aktivitesi ölçüldü.

Katalaz Enziminin Aktivite Tayini: Aktivite tayininde spektrofotometrik metot kullanıldı (7). Bu metodun esası, aktivite ölçüm ortamında bulunan katalazın H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesine dayanır.

Katalazın Karakterizasyonu: Enzimin iyonik şiddet etkisi 40mM konsantrasyonda iki tampon çözeltide (0.0625-1.0 M potasyum fosfat; 0.0625-1.0 M Tris-HCl), pH'nın etkisi 0.125 M T-HCl de pH 7.0-9.0 da çalışıldı. Katalaz aktivitesine farklı sıcaklıkların etkisi 10-70 °C, pH 7.3 belirlendi. Enzimin molekül ağırlığı Andrew metoduna göre yapıldı. Standart grafik için kolondan önce Blue Dextrane 2000, Horse heart cytochrome C (12, 400), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (29,000), bovine serum albumin (66,000), yeast alcohol dehydrogenase (150,000), ve sweet potato β -amylase (200, 000) proteinleri teker teker geçirildi (8). Daha sonra molekül ağırlığı tespit edilecek enzim çözeltisi geçirildi.

SDS Poliakril Amid Jel Elektrofrez: Enzim saflaştırılmasından sonra sodium dodesilsülfat (SDS-PAGE) poliakrilamid jel elektrofrez Laemmlı tarafından anlatıldığı gibi yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

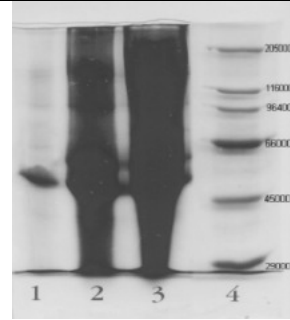
Kinetik Çalışmalar: Katalaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar, 40 mM'lık H_2O_2 substratı ile yapıldı. Enzimin konsantrasyonu sabit tutularak, H_2O_2 için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum pH'da ve 25 °C'de aktivite ölçümleri yapıldı. Lineweaver-Burk grafikleri belirlendi.

Bulgular ve Tartışma

Aşotunun saflaştırma prosesi Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Saflaştırma prosesi sonucunda enzim %10,67 verimle, 89.68 EU/mg protein spesifik aktiviteye sahip olarak 64.06 kat saflaştırıldı. SDS-poliakrilamid jel elektrofrez Şekil 1 de verilmiştir. Buna göre molekül ağırlığı 60,95kDa olarak bulunmuştur.

Enzimin optimum pH sı 7.3, en yüksek aktiviteyi 30 °C de sağlamıştır. Kinetik çalışmalar sonucunda H_2O_2 için K_m ve V_{max} değerleri 7.87mM ve 42.19 EU/ml olarak bulunmuştur



Şekil 1 Aşotu (*Coriandrium sativum*) yapraklarından katalaz SDS-PAGE bantı. (Numara 1: Saf katalaz enzimi; Numara 2: Amonyum sülfat çöktürmesi; Numara 3: Homojenat; Numara 4: Standart proteinler).

Katalaz, metabolizmanın çeşitli basamaklarında oluşan H_2O_2 'in su ve oksijene dönüşümünü katalizleyerek, H_2O_2 'nin zararlı etkisi ve Fenton reaksiyonu sonucu çok reaktif OH radikaline dönüşümü engellenmiş olur. Yapılan

Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu

incelemelerde yapraklarda H₂O₂'nin 10µM kadar artması fotosentezin yarı yarıya azalmasına sebep olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 1. Aşotu (*Coriandrium sativum*) yapraklarından katalazın saflaştırma prosesi

Purification Step	Activity (EU/ml)	Total Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (EU)	Specific Activity (EU/mg)	Yield (%)	Purification Factor
Homogenate	53.52	70	38.19	2673.3	3746.4	1,4	100	1
Ammonium Sulfate Precipitation 20-50%	341,12	10	31,96	319,6	3411,2	13,8	91,05	9,86
DEAE-Sephadex A50 ion exchange chromatography	40	10	0,446	4,46	400	89,68	10,67	64,06

Kaynaklar

1. Baytop, T., 1994. *Türkiye Bitki Adları Sözlüğü*. Türk Dil Kurumu Yayınları, 508 s, Ankara.
2. Bergmeyer, J. And Grabl, M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. 190-302, Germany
3. Cook, N. C., Saman, S., 1996, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.
4. Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M., 1995, Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am.J.Clin. Nutr.*, 61, 549-554.
5. Kunce, C. M., Trelease, R.N., Turley, R. B., 1988. Purification and biosynthesis of cottonseed catalase. *Biochemical Journal*, 251, 147-155.
6. Huang, A.H.C., Trelease, R.N., Moore, T.S. 1983, *Plant Peroxisomes*, Academic Press, New York.
7. Havir, E.A. and Mchale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84, 450-455.
8. Beutler, E. 1971. *Red cell metabolism manual of biochemical methods academic Press*: London.
9. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head. *Bac.* 227, 680-683.