

Hindiba (*Cichorium intybus* L.) Bitkisinden Myrosinaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterize Edilmesi ve Kozmetik Alanında Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Nazan DEMİR^{1*}, Esen TAŞĞIN²

¹Muğla Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü / MUĞLA

²Bayburt Üniversitesi, Bayburt Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü / BAYBURT

Alınış Tarihi:18.07.2012, Kabul Tarihi:22.11.2012

Özet:Myrosinaz glukosinolatların hidrolizinden sorumlu bir enzimdir (E.C: 3.2.3.2 β -thioglucosidase, β -thioglucoside glucohydrolase olarak da bilinir). Kanserle mücadele için umut verici bileşikler olarak kabul edilen sinigrin, glukoraphenin (GRA) ve glukoraphenin (GRE) gibi ara yıkım ürünlerinden dolayı bazı alifatik glukosinolatlar oldukça ilgi çekmiş ve myrosinaz enziminin bu tümör küçültücü etkisi son yıllarda önem kazanmıştır.

Bu çalışmada, myrosinaz amonyum sülfat çöktürmesi, Q-sepharose, Konkanavalin A sepharose afinite kromatografisi ile Hindiba'dan (*Cichorium intybus*'un L.) homojen olarak saflaştırıldı. Saflaştırılan protein SDS- poliakrilamid jel elektroforezinde 35 kDa ağırlığında tek bir bant olarak gözlenmiştir. Enzim pH 8,0'de ve 70 °C' de maksimum aktivite göstermiştir. Saflaştırılmış enzim 1 yıldan fazla süreyle 4° C de sabit kalmıştır. Substrat olarak sinigrin kullanılarak, saflaştırılmış enzim için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,074 $\mu\text{mol glukoz. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Enzim askorbik asit (AA), EDTA, SDS ve β -merkaptioethanol tarafından güçlü bir şekilde aktive edilmiştir. Buna ek olarak, bazı iyonların myrosinaz enzim aktivitesi üzerine 10, 1 ve 0,1 mM'lık konsantrasyonlardaki etkileri (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+}) incelenmiş ve enzim aktivitesini önemli ölçüde etkiledikleri belirlenmiştir. Hindiba (*Cichorium intybus*'un L.)'dan elde edilen myrosinaz enziminin kozmetikte kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmada saf myrosinaz enzimi içeren krem oluşturulmuş ve karışım güneş lekesi ve benzeri cilt sorunları olan 10 gönüllü denek üzerinde 20 gün süreyle uygulanmıştır. Belirlenen gün sonunda deneklerde mevcut olan lekelerin şiddetinde kısmi azalmalar gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Cichorium intybus* L., hindiba, myrosinaz, saflaştırma, kozmetik ürünler.

Purification and Characterization of Myrosinase from Chicory (*Cichorium intybus* L.) and Examination of Usable in Treatment of Cosmetics

Abstract: The enzyme responsible for the hydrolysis of glucosinolates is known as myrosinase (E.C. number 3.2.3.2, also known as: β -thioglucosidase, β -thioglucoside glucohydrolase). Some aliphatic glucosinolates, such as sinigrin, glucoraphenin (GRA), and glucoraphenin (GRE) have attracted much attention owing to their myrosinase-mediated breakdown products which have been considered as promising compounds for fighting cancer and the tumor degrading effect of myrosinase enzyme gained importance in recent years.

In this study, myrosinase from chicory (*Cichorium intybus* L.) was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, Q-sepharose and concanavalin A sepharose affinity chromatography. The purified protein was observed as a single band with a mass of about 35 kDa on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme exhibited high activity at pH 8,0 and 70°C. The purified enzyme remained stable at 4 °C for more than 1 year. Using sinigrin as a substrate, the K_M ve V_{max} values for the purified enzyme were determined to be 0,02 ve 0,074 $\mu\text{mol glucose. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ respectively. The enzyme was strongly activated by ascorbic acid (AA), EDTA, SDS and β -merkaptioethanol. In addition, 10, 1 and 0,1 mM, some effects of ions (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+}) on the enzyme activity myrosinaz has been investigated and that they significantly affect the enzyme activity were observed. It was investigated usable of the myrosinaz enzyme obtained from Chicory (*Cichorium intybus* L.) in treatment of cosmetics In this study, the cream contains pure myrosinaz enzyme is formed and this mixture was applied over 10 volunteer administered that have the skin problems like sun spots for 20 days.The partial reductions in the severity of spots that are available were observed at the end of days specified.

Keywords: *Cichorium intybus* L., chicory, myrosinase, glucosinolates, purification, cosmetic products.

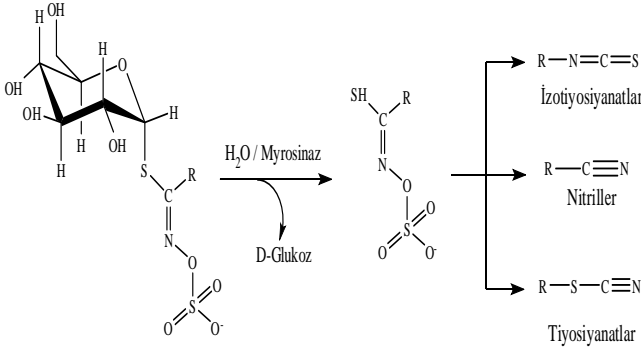
Giriş

Myrosinaz enzimi (tiyoglikozid glukohidrolaz, β -tiyoglikozidaz EC 3.2.3.2) hidrolazlar grubuna ait bir enzim olup glukozinolat moleküllerini hidrolizlemektedir. Myrosinaz enzimi glukozinolat moleküllerinin β -tiyoglikozid bağlarını kırmakta ve glukoz, sülfat ve aglikon grupları ürün olarak açığa çıkmaktadır. Aglikonların non-enzimatik reaksiyonları sonucunda

izotiyosiyanat, tiyosiyanat ve nitriller meydana gelmektedir. Bitkilerde bulunan glukoraphenin (4-metil sülfınılbutil glikosinolat)'ın myrosinaz enzimi ile hidrolizi sonucunda sulforaphane (4-metil sülfınılbutil izotiyosiyonat) ve nitril meydana gelmektedir. Sulforafanlar fitokimyasallar hücrel DNA zedelenmelerini baskılayan veya bloke eden enzimleri tetiklemekte, tümör büyüklüğünü ve östrojen benzeri

* ndemir@yahoo.com

hormonların etkinliğini azaltmaktadır (Zhang vd., 1994; Liang vd., 2005).



Bitkilerde, izotiosiyanatların bakteri ve mantarları içeren zararlı saldırılara karşı savunmada öncelikli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Li ve Kushad 2005). Bu bileşikler ayrıca tümörlerin inhibisyonunda (Smith vd., 2003) ve kalp hastalıklarının (Wu vd., 2004) önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Myrosinaz, insan ve hayvan hücre modellerinde çeşitli kanser tiplerini azaltan glukosinolat üretmektedir.

Myrosinaz, bitkilerde böcek saldırılarına karşı bir çeşit savunmadır. İzotiosiyanatlar (sulforahane, indole 3-carbinol ve allyl isothiocyanates gibi) büyüme inhibisyonuna ve apoptosise neden olan kanser hücrelerinde hücrel sinyal iletimi yolu üzerine ve biyotransformasyon enzimleri üzerine etkileri sayesinde kanserojen kimyasal metabolizmayı modifiye ederek kanser hücrelerini azaltmaktadır (Li vd., 2005). Birçok bitkide myrosinaz enziminin belirlenmesi ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır (Bjorkman ve Janson 1972; Durham ve Poulton 1989; Shikita vd., 1999, Lenman vd., 1990; Ohtsuru ve Kawatani 1979; Li ve Kushad 2004; Xian ve Moshab 2005; Pontoppidan vd., 2001). Ozon tabakasından meydana gelen inceleme nedeniyle ozon tabakasından sızan UV ışınları cilt kanseri vakalarını ve cilt sorunlarını her geçen gün artırmaktadır. (Armstrong vd., 2001; Uysal vd., 2004; Diffey 1992). Bu nedenle cilt kanserine yakalanan canlıların tedavisinde ve cilt kanserine karşı korunmak amacıyla veya karşılaşılan cilt sorunlarıyla başa çıkabilmek için myrosinaz enziminin kullanımı son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Morant vd., 2008; Dinkova-Kostova vd., 2006).

Hindiba (*Cichorium intybus'un* L.) dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye'nin pek çok bölgesinde doğal olarak yetişen ve ortaçağdan beri güvenli bir şekilde kullanılan mavi çiçekli yıllık bir bitkidir. *Cichorium Asteraceae* familyasına ait olup Avrupa ve Asya'daki ılıman ve yarı kurak bölgelerde büyük dağılım göstermiştir (Upur vd., 2009). Yüzyıllardır Kuzey Afrika'dan Güney Asya'ya kadar birçok bölgede halk ilacı olarak uygulanmıştır. Hindiba amenore dismenore, astım, kolik, sarılık, mide, kalp ve karaciğerle ilgili hastalıklarda, idrar söktürücü olarak, yorgunluk ve ağrı

giderici olarak, iştahsızlıkta ve hazımsızlıkta kullanılmıştır (Hanaa ve Mokhtar 2010; Ahmed vd., 2003).

Bu çalışmada Türkiye'nin bir çok bölgesinde halk arasında yıllardır tedavi amaçlı kullanılan ve toksik olmadığı bilinen hindiba (*Cichorium intybus'un* L.) bitkisi seçilmiş ve bu bitkiden myrosinaz enzimi saflaştırılarak tanımlanması yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Myrosinaz Enziminin Saflaştırılması

Hindiba bitkisi (*Cichorium intybus'un* L.) 2011 Temmuz ayında Türkiye'nin doğusunda yeralan Erzurum ili Palandöken dağı eteklerinden toplanarak çalışmada kullanılmaya kadar derin dondurucuda -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Bitkinin çiçekleri (25g), damıtılmış su ile yıkanmış sıvı azot içinde öğütülüp, daha sonra 50 ml damıtılmış su ile çalkalanarak bir blender içinde homojenize edilmiş ve 60 dakika boyunca 5000 x g'de santrifüjlenmiştir. Enzim saflaştırma prosedürleri için süpernatant kullanılmıştır (Eriksson vd., 2001).

Süpernatant öncelikle % 40 doymuş (NH₄)₂SO₄ ile 30 dakika süre ile 4 °C'de karıştırılmış ve çöken proteinler santrifüj (18.000g, 15 dak, 4 °C) ile ayrılmıştır. Daha sonra, süpernatant % 90 doymuş (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılarak santrifüj edilmiştir. Oluşan pelet Tris tamponu (20 mM, pH 7.5) içinde çözülerek aynı tampona karşı (4 °C'de 18 saat süreyle) diyaliz edilmiştir. Diyalizden sonra, çözünmeyen maddeler süzülerek uzaklaştırılmış ve geriye kalan, açık sarı renkli ekstrakt daha sonraki saflaştırma adımlarında kullanılmıştır. Myrosinase, anyon değişim kromatografisi (AEX) kullanılarak saflaştırılmıştır. Ekstrakt, önce su içinde su içinde çözülmüş (100 mg / ml) ve daha sonra da 5 ml alınarak Sephacryl kolonuna tatbik edilmiştir. Kolon, Tris tamponu (20 mM, pH 7,5) ile 4 ml / dakika akış hızında dengelenmiş ve sonrada kolona tutunan proteinler NaCl (0-0,15 M) gradienti kullanılarak ayrılmıştır (gradientli elüsyondaki akış hızı 0,5 ml / dakika olarak ayarlandı). Myrosinase aktivitesi içeren fraksiyonlar (4'er ml) toplanarak Konkanavalin A afinite kromatografisine tabi tutulmuşlardır. Bağlı proteinler, 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5, % 0.02 sodyum azid ile elüe edilmiştir (Xian ve Moshab 2005; Broeck vd., 2000). Protein elüsyonu 280 nm'de absorban ölçümüyle spektrofotometrik olarak izlenmiştir.

Myrosinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Myrosinaz enzim aktivitesi sinigrin'in hidrolizlenmesi metodu ile belirlenmiştir. (Nikolaeva vd., 2008). Aktivite, 227 nm'de absorbanstaki azalma oranının ölçülmesi ile tespit edilmiştir. 1,0 ml reaksiyon karışımı: 33mm potasyum fosfat tamponu, pH 6,0, 150µM sinigrin, 500µM askorbik asit ve 1 mM EDTA içermektedir. Reaksiyon 1-5µl enzim ilavesi ile başlatılmış ve 25°C az

3-5 dakika boyunca devam ettirilmiştir. Enzim aktivitesi (1 unit) dakikada 1µmol sinigrini hidrolizleyebilen enzim miktarı olarak tanımlanmış ve molar ekstinksiyon katsayısı 227 nm'de sinigrin için $\epsilon = 6780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ kullanılmıştır. Protein konsantrasyonları, bir standart kullanılarak BCA metodu ile (bicinchoninic acid) tespit edilmiştir. Spesifik aktivite Units-mg protein olarak ifade edilmiştir (Shikita vd., 1999).

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini

Saflaştırma sonrasında, enzimin saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini için Laemmli'ye göre SDS-PAGE yapılmıştır (Laemmli 1970). SDS-PAGE ve arıtma sonrası molekül kütlesi tayini enzim saflığının kontrolü için yapılmıştır. Her birisinin % 0,1 SDS içerdiği %3'lük yığıma ve %10'luk ve yürüme jelleri elde edilmiştir. 20 mg numune orta büyüklükteki jelle yüklenmiş ve elektroforez başlatılmıştır. % 50 metanol içindeki % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 10 asetik asit ve % 40 damıtılmış su kullanılarak jel 1,5 saat süre ile boyanmıştır. Daha sonra % 50 metanol, 10%, asetik asit ve % 40 saf su ile birkaç kez yıkanan jel fotoğraflanmıştır.

Enzim Aktivitesine PH'in Etkisi

Enzim aktivitesine pH'in etkisinin belirlenmesinde, 200 mM glisin-HCl tamponu (pH 2,0), (3,0-4,0) 100 mM sitrat tampon-NaOH, 100 mM asetat tamponu -NaOH (5,0-6,0), 100 mM fosfat tamponu-NaOH (7,0), 100 mM Tris-HCl tamponu (8,0) ve 100 mM borat tamponu-NaOH (9,0-10,0) kullanılmıştır. Aktivite tayini substrat olarak sinigrin kullanılarak belirlenmiştir (30 °C).

Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Myrosinase aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesinde, substrat olarak sinigrin kullanılarak 0-80 °C'ler arasında aktivite tayinleri yapılmıştır. Myrosinaz aktivitesini ölçmek için, reaksiyon karışımı her bir sıcaklıkta 0,5 saat süreyle inkübe edilmiştir. Enzim çözeltisi önce 4 saat süre ile 0-80 °C'de inkübe edilmiş ve daha sonra substrat olarak sinigrin kullanılarak 30 °C'de myrosinaz aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Farklı substrat konsantrasyonlarında (substrat olarak sinigrin kullanılmıştır) aktivite ölçümleri yapılmıştır. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver Burk eğrileri çizilmiş ve K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak bulunmuştur.

Myrosinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Bileşenlerin ve Metal İyonlarının Etkileri

Bunun için aktivite, sinigrin varlığında belirlenmiştir. Aktivite tayini için 500 µl enzim çözeltisi, 750 µL sinigrin çözeltisi, 250 µl kation çözeltisi veya diğer moleküllere ait çözeltiler ilave edilerek toplam hacim 1,5 ml'ye tamamlanmış ve 20 dakika boyunca 30 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 227 nm'de absorbans ölçümü yapılarak aktiviteler belirlenmiştir.

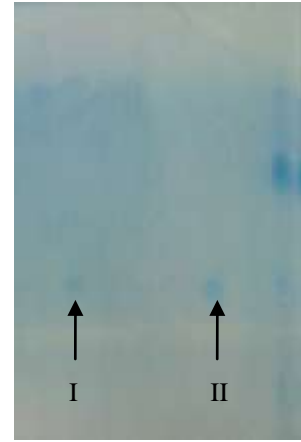
Hindiba (Cichorium intybus'un L.) bazı vitamin içeriği

Hindiba (*Cichorium intybus'un L*) içindeki α -Tokoferol, β - Karoten ve Vitamin C miktarları daha önceki yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (Amin 2001; Kleinwächter ve Selmar 2004).

Bulgular ve Tartışma

Myrosinaz enziminin Saflaştırılması ve Tanımlanması

Myrosinase enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, Sephacryl S200 anyon değişim kromatografisi ve son olarak, Konkanavalin A sepharoz afinite kromatografisi kullanılarak 49,48-kat saflaştırılmıştır (Tablo 1). Saflaştırılmış protein, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (Şekil 1) üzerinde tek bir bant ile izlenmiştir.



Şekil 1. Hindiba'dan (*Cichorium intybus L.*) elde edilen myrosinaz enzimine ait elektroforez fotoğrafı (I, II enzim).

Hindibadan (*Cichorium intybus'un L.*) saflaştırdığımız myrosinaz enzimi yaklaşık 35 kDa tek alt birim olarak ağırlığında belirlenmiştir. Hartel ve arkadaşları tarafından kolza tohumlarından (*Brassica napus*) saflaştırılan myrosinase enziminin 67 kDa ağırlığında tek bir altbirime sahip olduğu (Hartel vd., 2002), ancak yapılan diğer çalışmalarda *Brassica napus* tohumları, *Sinapis alba* tohumları, *Raphanus sativus* ve *Lepidium sativum* fidelerinin 65 ve 75 kDa'luk dimerlere sahip oldukları belirlenmiştir (Bjorkman ve Janson 1972; Durham ve

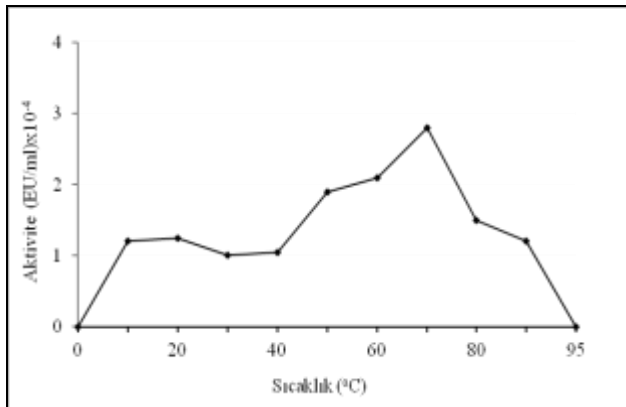
Tablo 1. Hindiba'dan (*Cichorium intybus L.*) elde edilen myrosinaz enzimine saflaştırılması

Enzim	Hacim mL	Aktivite ($\mu\text{mol glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Total Activity		Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite U/mg	Saflaştırma katsayısı
			EU	%			
Ham Ekstrakt	100	0,0115	1,15	-	1,208	0,0095	-
%40-90 (NH ₄) ₂ SO ₄	50	0,0082	0,41	33.28	0,595	0,0356	3,75
Sephacryl S200	80	0,016	1,28	38.96	0,094	0,170	4,78
Concavalin A	45	0,27	12,2	48.92	0,032	8,43	49,48

Poulton 1989; Shikita vd., 1999; Lenman vd., 1990). Aynı zamanda *Wasabi japonica* köklerinden elde edilen myrosinase enziminin (Ohtsuru ve Kawatani 1979) 45 kDa ağırlığında 12'den fazla alt-birim içerdiği ifade edilmiştir. Substrat olarak sinigrinin kullanıldığı saf myrosinaz enzimi için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,074 mM mmol min^{-1} olarak bulunmuştur.

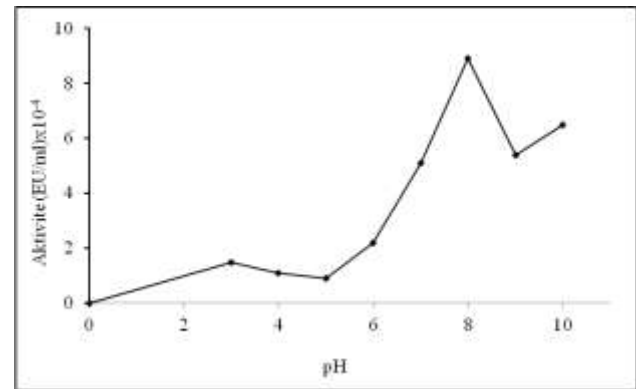
Myrosinase enzim aktivitesi üzerine sıcaklık ve PH'in etkisi

Myrosinase aktivitesi üzerindeki sıcaklığın etkisi Şekil 2'de gösterilmiştir. Hindiba'dan (*Cichorium intybus'un L.*) saflaştırılan myrosinase enziminin aktivitesi 0-90 °C sıcaklık aralığı arasında izlenmiştir. Sıcaklık 0'dan 90°C'ye kadar 10 °C'lik aralıklarla artırılarak maksimum aktivite belirlenmiş ve bu enzim için optimum sıcaklık 70 °C olarak bulunmuştur (Şekil 2).

**Şekil 2.** Hindiba'dan (*Cichorium intybus L.*) elde edilen myrosinaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Saflaştırılmış enzim 1 yıl süreyle 4 °C de sabit kalmıştır. Hindiba'dan (*Cichorium intybus'un L.*) elde edilen myrosinaz enzimi tarafından sinigrinin hidrolizinin pH = 7,0-9,0 arasında uygun olabileceği belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 1 pH'lık artışlarla 1'den 10'a kadar pH aralığı üzerinde izlenmiş ve optimum pH değeri 8 olarak bulunmuştur (Şekil 3). Bulunan optimum pH değerinin özellikle kozmetik uygulamalar için iyi bir referans olabileceği düşünülebilir.

Ayrıca bu enzimin, düşük pH derecelerinde de aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Myrosinazın yüksek optimum sıcaklığı termal stabilitesinin bir göstergesi olup, bu sonuçla da enzimin farmasötik alan için mükemmel bir seçim olabileceği sonucuna ulaşılabilir (Ohtsuru ve Kawatani 1979). Kırmızı ve beyaz lahanada yapılan bir çalışmada, bu bitkilerden saflaştırılan myrosinaz enziminin pH 8,0'de ve 60 °C'de maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Yen ve Wei, 1993).

**Şekil 3.** Hindiba'dan (*Cichorium intybus L.*) elde edilen myrosinaz enzim aktivitesi üzerine pH'in etkisi

Hindiba'nın (*Cichorium intybus'un L.*) vitamin içerikleri

Hindibada (*Cichorium intybus'un L.*) α -Tokoferol, β -karoten ve C vitamini içerikleri sırasıyla 0,65 ($\mu\text{g}/100\text{g}$), 1,94 ($\mu\text{g}/100\text{g}$), 42 (mg/100g) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Sonuçlarımız hindiba çiçeklerinin çok iyi A, C ve E vitamini kaynakları olduklarını göstermiştir.

Tablo 2. Hindiba Bitkisinin (*Cichorium intybus L.*) vitamin içerikleri

Ham ekstrakt	Vitamin içerikleri (mg/100g ürün)
α -Tokoferol	0,65($\mu\text{g}/100\text{g}$)
β - Karoten	1,94($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Vitamin C	42(mg/100g)

Myrosinase Aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve bileşenlerin etkisi

Myrosinaz enzim aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Ni^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının üç farklı konsantrasyondaki etkileri (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) araştırılmış ve bu iyonların enzim aktivitesini önemli ölçüde etkiledikleri belirlenmiştir. Ca^{2+} , sadece 1mM ile myrosinaz enzimini (Şekil 4) güçlü bir şekilde aktive etmiştir. 10 mM ve 1 mM Cu^{2+} konsantrasyonlarında myrosinaz enzim aktivitesi çok aktif olmasına rağmen, 0,1 mM konsantrasyonu aktiviteyi çok fazla değiştirmemiştir. Ni^{2+} 'nin tüm konsantrasyonlarında enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4). Askorbik asit, EDTA, SDS ve β -merkaptoethanolün myrosinase aktivitesine etkileri araştırılmış ve bu bileşenlerin önemli ölçüde enzim aktivitesini etkiledikleri belirlenmiştir (Şekil 4). Enzim, askorbik asit ile güçlü bir şekilde aktive edilmiştir. EDTA, SDS ve β -merkaptoethanol ise Hindiba'dan (*Cichorium intybus*'un L.) elde edilen myrosinase enzim aktivitesini inhibe etmişlerdir.

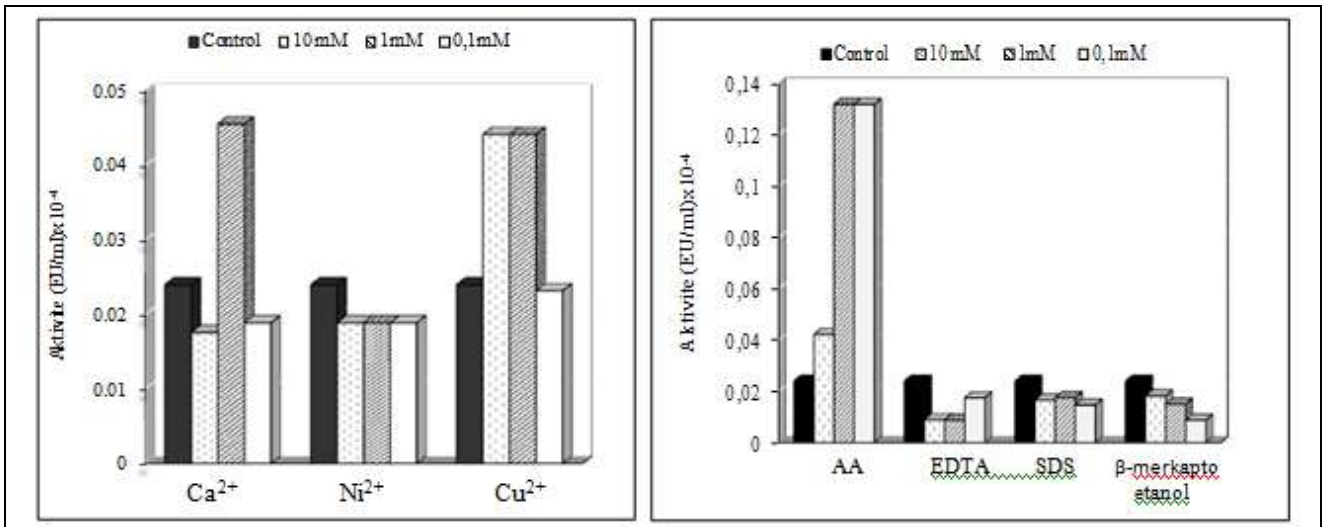
Brokoli tohumlarından elde edilen myrosinaz enzimi bazı metal iyonlarına maruz bırakılmış ve Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının enzimi inhibe ettikleri Zn^{2+} iyonunun ise aktive ettiği saptanmıştır (Liang vd., 2006). Yaptığımız çalışmada ise, Ca^{2+} , Ni^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının myrosinaz enzimine etkileri çalışılmış ve çalışma sonucunda Ca^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesini arttırdığı, diğer iyonlara göre daha toksik olduğu bilinen Ni^{2+} iyonunun ise inhibe ettiği belirlenmiştir. Brokoli ile yapılan çalışmada, askorbik asit ve EDTA'nın da myrosinaz enzim aktivitesini etkiledikleri tespit edilmiş ve bizim sonuçlarda da belirtildiği gibi, brokoli tohumlarında bulunan ve glukozinolat moleküllerini hidroliz ürünü olan sulforaphane veriminin EDTA konsantrasyonundaki artışla azaldığı gözlenmiş, askorbik asitin ise enzim aktivitesinde aktivasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Liang vd., 2006; Kleinwächter ve Selmar 2004).

Canlı hücreleri için toksik olduğu bilinen EDTA, SDS ve β -merkaptoethanol'ün (White vd., 1973; Romanelli vd., 2004) tüm konsantrasyonlarında myrosinaz enzim aktivitesinin inhibe olduğu belirlenmiştir.

Kozmetik uygulamaları

Hindiba (*Cichorium intybus*'un L.)'dan saflaştırılan myrosinaz enziminin kozmetikte kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla saf myrosinaz enzimi içeren krem, ticari krem formülasyon oranlarına uygun şekilde oluşturulmuş ve karışım %1 oranında enzim içerecek şekilde krem haline getirilmiştir. Hazırlanan krem karışımının içerikleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Güneş lekesi ve benzeri cilt sorunları olan 10 gönüllü denek seçilmiş ve bunlar üzerinde enzim içeren krem formülasyonu 20 gün süreyle uygulanmış ve bu süre sonunda deneklerde mevcut olan lekelerin şiddetinde kısmi azalmalar gözlenmiştir. Bitkilerin cilt ve deri hastalıkları üzerinde olumlu yada olumsuz bir çok etkisi vardır.

Hemen hemen dünyadaki tüm kültürler sağlık için yüzyıllar boyunca şifalı bitkilere güvenmiştir ve güvenmeye devam ediyor. Ancak özellikle kontrollü klinik çalışmalarda bitki özlerinin etkinliği konusunda çok az bilimsel veri vardır. Bunlar içinde de cilt bozukluklarının tedavisi için bu tür tıbbi bitki özlerinin kullanılması tartışmalara neden olmakla birlikte bu konuda birçok bitkinin cilt hastalıklarına olumlu yada olumsuz etkilerini belirleyen bazı çalışmalar yapılmıştır. Mantle ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada cilt üzerindeki yara ve yanıkların tedavisinde de kullanılan Aloe veranın akne, herpes ve uyuz gibi cilt enfeksiyonlarına karşı etkili olduğu, çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) yağının antifungal, antiviral, antibakteriyel aktivite gösterdiği ve ayrıca cildi (örneğin sedef) etkileyen immün / inflamatuvar bozukluklara ve cilt kanserine karşı etkin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. Hindiba'dan (*Cichorium intybus* L.) elde edilen myrosinaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve askorbik asit (AA), EDTA, SDS, β -merkaptoethanol etkisi

Bu bilgiler ışığında, hem çok iyi birer antioksidan olan hem de strese, kalp hastalıklarına ve kanserlere karşı koruyuculuğu bilinen A, C ve E vitaminlerini içermesinden ve oldukça yüksek myrosinaz enzim kaynağı olmasından dolayı hindibadan (*Cichorium intybus'un L.*) cilt kanserinin önlenmesinde, tedavisinde ve özellikle kozmetik endüstrisinde faydalanılması çok yerinde olabilir (Rasanu vd., 2005, Sheng vd., 2010).

Sonuçlarımızın *Cichorium intybus'un L.* bitkisinde, tümör küçültücü etkisi olduğu bilinen myrosinaz enziminin (Smith vd., 2003) yüksek aktivitelere var olduğunu, bazı bileşen ve metal iyonlarıyla bu enzimin aktive olduğunu ve bitkinin yüksek vitamin içeriğine sahip olduğunu göstermiş olması, saf enzimin katalizlediği reaksiyon göz önüne alındığında enzimin medikal ve kozmetik alanlarda kullanılabileceği ayrıca toksik olmayan metal iyonları ve

Tablo 3. Hindiba bitkisinden (*Cichorium intybus L.*) elde edilen myrosinaz enziminin kozmetikte uygulanabilirliği için hazırlanan krem içerikleri

İçerik	%	Kullanım amacı
Su		
Cetyl Alkol 95%	2	Kıvamlaştırıcı baz olarak
Glyceryl mono stearete	3	Emülgatör
SF 1202 (Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone)	3	Yumuşaklık sağlar
Gliserin	3	Nemlendirici ajan
TEA	0,25	PH ayarı için kullanılır
NEOLONE PE (Methylisothiazolinone, phenoxyethanol)	0,6	Koruyucu
Enzim	1	
SILSOFT SILICONE GEL (Cyclopentasiloxane, Cetearyl Dimethicone Viyl dimethicon copolymer)	1	Yumuşaklık verir

vitaminler ile de bu alanlara katkıda bulunulabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca saf enzimin /enzim içeren ekstratların cilt yüzeyindeki yaraları iyileştirebilme ve bazı kozmetik ürünlerde özellikle de ciltle ilgili harici sorunları çözümlenmede etkisinin olması beklenmektedir.

Ancak enzimin kozmetik ürünlerde kullanılabilmesi için geniş kapsamlı uygulamaların yapılması gerekli bulunmakta, bu da daha sonraki çalışmalar için öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Ahmed B., Tawfeq A. Al-H., Siddiqui A.B. 2003. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*, J. of Ethnopharmacology, 87 (2-3): 237-240.
- Amin, A.S. 2001. Colorimetric determination of tocopheryl acetate (vitamin E) in pure form and in multi-vitamin capsules, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51, 267-271.
- Armstrong B., Krickler A. 2001. The Epidemiology of UV Induced Skin Cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology, B:Biological, 63, Elsevier Science B.V, p8-18.
- Bjorkman R., Janson J.C. 1972. Studies on myrosinases I. Purification and characterization of a myrosinase from white mustard seed (*Sinapis alba*, L.), *Biochim. Biophys. Acta*, 276: 508-518.
- Broeck V.D., Ludikhuyze I., Va Loey L.R., A.M., Hendrickx M.E. 2000. Inactivation of orange pectinesterase by combined high-pressure and temperature treatments: a kinetic study, J. Agr. Food Chem., 48(5): 1960-1970.
- Diffey, B.L. 1992. Stratospheric ozone depletion and the risk of non-melanoma skin cancer in a British population. *Physics in Medicine and Biology*, 37(12), 2267-2279.
- Dinkova-Kostova AT, Jenkins SN, Fahey JW, Ye L, Wehage SL, Liby KT, Stephenson KK, Wade KL, Talalay P., 2006. Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Lett.*, 240: 243-252.

- Dinkova-Kostova AT, Jenkins SN, Fahey JW, Ye L, Wehage SL, Liby K T, Stephenson K K, Wade KL, Talalay P. Durham PL, Poulton JE. 1989. Effect of Castanospermine and Related Polyhydroxyalkaloids on Purified Myrosinase from *Lepidium sativum* Seedlings. *Plant Physiology*, 90(1):48–52.
- Eriksson S., Ek B., Xue J., Rask L., Meijer J. 2001. Identification and characterization of soluble and insoluble myrosinase isoenzymes in different organs of *Sinapis alba*, *Physiologia Plantarum*, 111(3): 353-364.
- Hanaa A. H., Mokhtar I. Y. 2010. Ameliorating effect of chicory (*Cichorium intybus L.*)-supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats, *Food and Chem. Toxicol.*, 48(8-9): 2163-2169.
- Hartel F.V., Anders B.A. 2002. Characterization of a *Brassica napus* Myrosinase Expressed and Secreted by *Pichia pastoris*, *Protein Expression Purification*, 24: 221-226.
- Kleinwächter M, Selmar D. 2004. A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases. *J Biochem Biophys Methods* 59:253-265.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature*, 227: 680-85.
- Li X., Kushad M.M. 2004. Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*), *J. Agric. Food Chem.*, 52: 6950-6955.
- Li X., Kushad M. M. 2005. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots, *Plant Physio. and Biochem.*, 43, 503–511.
- Liang H, Yuan Q, Xiao Q. 2005. Purification of sulforaphane from *Brassica oleracea* seed meal using low-pressure column chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Science*, , 828(1-2):91-96.
- Liang H., Yuan Q., Xiao Q. 2006. Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed, *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 43: 19-22.
- Lenman M., Rodin J., Josefsson L.G., Rask L. 1990. Immunological characterization of rapeseed myrosinase, *Eur. J. Biochem.*, 194: 747-753.
- Mantle D, Gok MA, Lennard TW., Adverse Drug React Toxicol Rev. 2001 Jun;20(2):89-103. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders.
- Morant, A.V. Bjarnholt, N., Kragh, M. E., Kjærgaard, C. H., Jørgensen K., Paquette, S. M., Piotrowski, M., Imberty, A., Olsen, C.E., Møller, B. L., Bak, S. 2008. The b-Glucosidases Responsible for Bioactivation of Hydroxynitrile Glucosides in *Lotus japonicus* *Plant Physiology*, July, Vol. 147, pp. 1072–1091.
- Nikolaeva L.G., Maystat T.V., Pylypchuk V.S., Volyanskı Y.L., Masyuk, L.A., Kutsyna G.A. 2008. Effect of oral immunomodulator Dzherelo in TB/HIV co-infected patients receiving anti-tuberculosis therapy under DOTS, *Int. Immunopharm.*, 8(6): 845-851.
- Ohtsuru M., Kawatani H. 1979. Studies on the myrosinase from *Wasabia japonica*: purification and some properties of Wasabi myrosinase, *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2249-2255.
- Pontoppidan B., Ekbom B., Erksso S., Meijer J. 2001. Purification and characterization of myrosinase from the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*), a brassica herbivore, *Eur. J. Biochem.*, 268: 1041-1048.
- Rasanu N., Magearu V., Matei N., Soceanu A. 2005. Determination of vitamin C in different stages of fruits growing, *Chimie, Anul XIV (serie nouă)*, I-II: 167-172.
- Sheng Z.W., Ma W.H., Jin Z.Q., Bi Y., Sun Z.G., Dou H.T., Gao J.H., Li J.Y., Han L.N. 2010. Investigation of dietary fiber, protein, vitamin E and Other nutritional compounds of banana flower of two Cultivars grown in China, *African J.of Biotech.*, 9(25): 3888-3895.
- Shikita M., Fahey J.W., Golden T. R., Holtzclaw W. D., Talalay P. 1999. An unusual case of ‘uncompetitive activation’ by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings, *Biochem. J.*, 341: 725–732.
- Smith, T.K., Mithen, R., Johnson, I.T., 2003. Effects of brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo, *Carcinogenesis*, 24(3), 491-495.

- Upur H., Amat N., Blažeković B., Talip A. 2009. Protective effect of *Cichorium glandulosum* root extract on carbon tetrachloride-induced and galactosamine-induced hepatotoxicity in mice, *Food and Cheml. Toxicol.*, 47(8): 2022-2030.
- Uysal A., Özsoy S.A, Ergül S. 2004. Öğrencilerin Cilt Kanseri Risklerinin ve Güneş Işınlarından Korunmaya Yönelik Uygulamalarının Değerlendirilmesi, *Ege Tıp Dergisi* 43(2) : 95 – 99.
- White K., Bruckner J. V., Guess W. L., Toxicological studies of 2-mercaptoethanol, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1973, 62:2, 237–241.
- Wu L., Ashraf M.H., Facci M., Wang R., Paterson P.G., Ferrie A. 2004. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system, *Natl. Acad. Sci. USA*, 101(18), 7094 -7099.
- Xian L., Moshab M.K., 2005. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots, *Plant Physiol. Biochem.*, 43: 503-511.
- Zhang, Y., Kensler, T W., Cho, C G., Posner, G H., Talalay, P. 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci*, 12;91(8):3147–3150.