



## Kiwano (*cucumis metuliferus*) bitkisindeki peroksidaz enzimleri üzerine amino asit etkisinin incelenmesi

Zeynep Denli\*, Gülnur Arabacı

\*Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Sakarya

*08.05.2013 Geliş/Received, 05.11.2013 Kabul/Accepted*

### ÖZET

Bu çalışmada, kiwano (*Cucumis metuliferus*) bitkisinden peroksidaz ve askorbat peroksidaz enzimleri ekstrakte edilmiştir. Asidik, bazik ve nötral karakterde 8 amino asitin (L-histidin, L-glutamik asit, L-treonin, L-lisin, L-arginin, L-aspartik asit, L-prolin, L-fenilalanin) bu enzimlerin aktivitesi üzerine yaptığı etki incelenmiştir. Her bir amino asit çözeltisinden 4 farklı konsantrasyon baz alınarak enzimler üzerindeki etkileri araştırılmış ve % bağıl aktivite değerleri bulunmuştur. Sonuçlara göre, bazı amino asitler enzimlerin aktivitesini artırırken bazıları azaltmıştır. Ayrıca aynı amino asitin farklı konsantrasyonlarının da enzim aktivitesini değiştirdiği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** peroksidaz, askorbat peroksidaz, kiwano (*cucumis metuliferus*), amino asit

## Investigation of the effect of amino acids on peroxidase enzymes from kiwano (*cucumis metuliferus*)

### ABSTRACT

In the study, peroxidase and ascorbate peroxidase are extracted from kiwano (*Cucumis metuliferus*). It is searched that the effect of 8 amino acids having acidic, basic, neutral characters (L-Histidine, L-Glutamic acid, L-Threonine, L-Lysine, L-Arginine, L-Aspartic acid, L-Proline, L-Phenylalanine) on these enzymes' activity. By being based on 4 different concentrations of each amino acid solution, it is analyzed the impacts on enzymes seperately and calculated the % relative activity values of enzymes. According to the results, as some amino acids increase the activity of enzymes, others decreases. Moreover, it is seen that different concentrations of the same amino acid change enzyme activity.

**Keywords:** peroxidase, ascorbate peroxidase, kiwano (*cucumis metuliferus*), amino acid

---

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

zeynepdenli@gmail.com

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

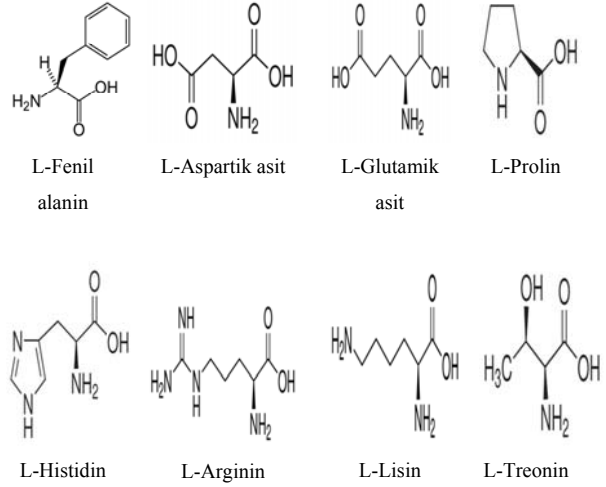
Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Tek, yani eşleşmemiş elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri” denir [1]. Serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarın önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” ya da kısaca “antioksidanlar” olarak bilinir. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önler [2]. Biyolojik sistemlerde peroksidaz ve askorbat peroksidaz antioksidan etkiye sahip başlıca enzimlerdendir. [3].

Peroksidaz (POD, E.C. 1.11.1.7), hidrojen atomlarını vermek eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır [4, 5]. Askorbat peroksidaz (APX, E.C. 1.11.1.11) substrat olarak askorbatı kullanarak  $H_2O_2$  gibi peroksitleri detoksifiye eden enzimdir [6].

POD bitkilerde hormonal faaliyet [7], savunma mekanizmaları [8], sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması [9] ve lignin biyosentezi [10] gibi hayati fonksiyonlarda rol aldığı bilinmektedir.

Amino asitler proteinlerin temel yapı birimidir. Proteinler hemen hemen bütün biyolojik proseslerde, bitkide enzim olarak çeşitli işlevlerde, moleküllerin enerji depolaması, taşınması ve sinyalleşmesinde önemli role sahiptir. Amino asit, merkez karbon atomuna bağlı amino grup, karboksil grup, bir hidrojen iyonu ve farklı yan zincirden (R grubu) meydana gelir. Bütün canlı türlerindeki proteinler temel 20 çeşit amino asitin farklı şekil ve oranlarda birleşmesiyle oluşmuştur [11]. Bu çalışmada kullanılacak bazı amino asitlerin kimyasal yapısı Şekil 1’ de verilmiştir.

Belirli miktarda amino asitlerin kullanımı ürün kalitesini ve verimini artırdığı bilinmektedir. Bitkiler nitrojen, karbon, oksijen ve hidrojenenden meydana gelen amino asitlerin hepsini sentezlemek için gereken kalıtsal kapasiteye sahip olmalarına rağmen, biyokimyasal süreç enerji tüketmekte oldukça karışıktır.



Şekil 1. Bazı amino asitlerin kimyasal yapıları (Chemical structures of some amino acids)

Amino asit kullanımı bitkinin bu süreçteki enerji tüketimini azaltmaktadır ve geri kalan enerji bitkinin önemli büyüme evreleri boyunca gelişimi daha iyi tamamlayabilmesi için ayrılabilir. Çalışmalar amino asitlerin doğrudan ya da dolaylı olarak bitkilerin fizyolojik aktivitelerinde rol aldıklarını göstermektedir [12].

Bu çalışmada kullanılan bazı amino asitlerin bitkiler üzerinde bilinen etkileri; L-prolin bitkinin polen verimliliğine yardımcı olmakta ve çoğunlukla bitkinin su dengesinde rol almaktadır. Ayrıca uygun olmayan hava koşullarında bitkinin direncini artırmak için hücre duvarında görev almaktadır. L-lisin ve L-glutamik asit polenleşmede rol alan önemli amino asitlerdendir. Bu amino asitler polenlerin çimlenmesini ve polen tüpünün uzunluğunu artırmaktadır. L-glutamik asit ve L-aspartik asit, transaminasyon boyunca diğer amino asitlere yol açmaktadır [12]. L-arginin çiçek ve meyve ile ilgili hormonların sentezlenmesine sebep olmaktadır. L-histidin ise meyvenin düzgün bir şekilde olgunlaşmasına yardımcı olmaktadır [13].

Belli miktarda amino asidin bitkinin gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilindiğine göre, farklı amino asit miktarlarının savunma sisteminde ve hormonal faaliyetlerde etkili olan POD ve APX enzimleri üzerine etkisi incelenebilir. Bu amaçla kullanılacak olan amino asit miktarına bağlı olarak, enzimler üzerinde aktivatör (enzimlerin etkisini artıran madde) ya da inhibitör (enzimlerin etkisini azaltan ya da tamamen yok eden madde) etkiye sahip olup olmadığı araştırılacaktır.

## **2. MATERYAL VE METHOD (MATERIAL AND METHOD)**

### **2.1. Materyal (Material)**

Bu çalışmada kaynak bitki olan kiwano (*Cucumis metuliferus*) Antalya bölgesinden temin edilmiş olup POD ve APX enzimlerinin izolasyonu için kullanılmıştır.

Çalışmalarımız süresince polivinil pirolidon (PVP), askorbik asit ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojenfosfatın kullanıldığı tampon çözeltiden oluşan karışım izolasyon işlemlerinde kullanılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu %30, 4-metil katekol, L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin kimyasalları spektrofotometrik olarak enzim aktivite tayininde kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar; UV-VIS spektrofotometre, santrifüj, manyetik karıştırıcı, pH metre, hassas terazi, blender, otomatik pipetler, derin dondurucu.

### **2.2. Peroksidaz Aktivite Tayini (Peroxidase activity assay)**

POD enziminin aktivitesi pH 7.2'de 0.1 M fosfat tamponu, 3 mM 4-metil katekol çözeltisi, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve sabit enzim ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında spektrofotometrik olarak 420 nm'de 1 dk süreyle absorbanstaki artış ölçülerek belirlenmiştir. Her ölçüm için toplam reaksiyon hacmi 3 mL'de sabit tutulmuş ve işlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

### **2.3. Askorbat Peroksidaz Aktivite Tayini (Ascorbate peroxidase activity assay)**

APX enziminin aktivitesi pH 6.2'de 0.05 M fosfat tamponu, 0.02 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.5 mM askorbik asit çözeltisi ve sabit enzim ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında spektrofotometrik olarak 285 nm'de 1 dk süreyle absorbanstaki azalma ölçülerek belirlenmiştir. Her ölçüm için toplam reaksiyon hacmi 3 mL'de sabit tutulmuş ve işlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

### **2.4. Peroksidaz Üzerine Amino Asit Tayini (Amino acid assay on peroxidase)**

L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asitlerinin POD üzerine etkisi incelenmiştir. Amino asit çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM ve 10 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda sabit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 3

mM 4-metil katekol substratları varlığında 420 nm'de 1 dk süreyle enzim aktivitesine etkisi spektrofotometrik olarak bakılmıştır. Yapılan işlemler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar amino asit içermeyen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak her amino asit için % aktivite değerleri hesaplanmıştır.

### **2.5. Askorbat Peroksidaz Üzerine Amino Asit Tayini (Amino acid assay on ascorbate peroxidase)**

APX enzimi üzerine amino asit etkisini incelemek için L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asitleri kullanılmıştır. Amino asit çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda sabit 0.02 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 0.5 mM askorbik asit substratları varlığında 285 nm'de 1 dk süreyle enzim aktivitesine etkisi spektrofotometrik olarak incelenmiştir. İşlemler en az üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar amino asit içermeyen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak her amino asit için % aktivite değerleri hesaplanmıştır.

## **3. BULGULAR (RESULTS)**

### **3.1. Peroksidaz Üzerine Amino Asitlerin Etkisi (The effect of amino acids on peroxidase)**

Bölüm 2.5'de anlatıldığı gibi kiwano bitkisinden ekstrakte edilen POD üzerine amino asitlerin etkisi araştırılmıştır. L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin ve L-Fenilalanin amino asitlerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır.

POD enzimi bu amino asitler ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma gözlenmiştir. Aynı amino asitin farklı konsantrasyonlarında da enzim aktivitesi üzerindeki etkinin değiştiği görülmüştür.

İncelemeler sonucunda; 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM konsantrasyonlarındaki amino asit çözeltileri varlığında gerçekleştirilen aktivite değerleri amino asit bulunmayan ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonunun aktivite değeri ile karşılaştırılmış ve % aktivite değerleri hesaplanarak Tablo 1'de sunulmuştur.

### **3.2. Askorbat Peroksidaz Üzerine Amino Asitlerin Etkisi (The effect of amino acids on ascorbate peroxidase)**

Bölüm 2.6'de anlatıldığı gibi kiwano bitkisinden ekstrakte edilen APX enzimi üzerine amino asitlerin etkisi araştırılmıştır. L-Histidin, L-Glutamik asit, L-

Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asit çözeltilerinden 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. APX bu amino asitler ile muamele edildiğinde enzim aktivitesinde artış ya da azalma olduğu gözlenmiştir.

Tablo 1. POD enzimi üzerine amino asitlerin etkisi (The effect of amino acids on POD)

Amino asit	POD % Aktivite			
	Amino asit Konsantrasyon (mM)			
	0.5 (mM)	1 (mM)	5 (mM)	10 (mM)
Kontrol	100	100	100	100
L-Histidin	107,1	107,1	112,5	116,1
L-Glutamik asit	105,4	103,6	103,6	94,6
L-Treonin	107,1	103,6	100	96,4
L-Lisin	103,6	105,3	100	100
L-Arginin	112,5	112,5	110,7	103,6
L-Aspartik asit	114,3	121,4	110,7	82,1
L-Prolin	100	92,8	80,3	69,6
L-Fenilalanin	105,3	100	92,8	89,3

Tablo 2. APX üzerine amino asitlerin etkisi (The effect of amino acids on APX)

Amino asit	APX % Aktivite			
	Amino asit Konsantrasyon (mM)			
	0.5 (mM)	1 (mM)	5 (mM)	10 (mM)
Kontrol	100	100	100	100
L-Histidin	108,3	108,3	100	91,7
L-Glutamik asit	100	100	4,16	-
L-Treonin	100	100	100	108,3
L-Lisin	116,7	116,7	108,3	100
L-Arginin	116,6	116,6	108,3	100
L-Aspartik asit	116,6	108,3	-	-
L-Prolin	100	133,3	133,3	133,3
L-Fenilalanin	116,6	116,6	108,3	100

Aynı amino asitin farklı konsantrasyonlarında da enzim aktivitesi üzerindeki etkinin değiştiği görülmüştür. İncelemeler sonucunda; 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM konsantrasyonlarındaki amino asit varlığında gerçekleştirilen aktivite değerleri amino asit bulunmayan ortamda gerçekleştirilen kontrol

reaksiyonunun aktivite değeri ile karşılaştırılmış ve % aktivite değerleri hesaplanarak Tablo 2’de sunulmuştur.

#### 4. SONUÇ (CONCLUSION)

Bazik karaktere sahip L-histidin, L-lisin ve L-arginin amino asitlerinin POD enzimi aktivitesini 1 mM konsantrasyona kadar yükseltirken, 5 mM ve üzeri konsantrasyonlarda enzim aktivitesini düşürmektedir. L-histidin diğerlerinden farklı olarak yüksek konsantrasyonlarda dahi aktivatör olarak çalışmaktadır. Asidik karaktere sahip L-aspartik asit ve L-glutamik asit POD enzimi üzerinde 0.5 mM, 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda aktivatör, 10 mM konsantrasyonda inhibitör etki göstermektedir. Her iki amino asitte düşük konsantrasyonda en yüksek aktivatör etkiye sahiptir. Nötral karaktere sahip L-treonin, L-prolin ve L-fenilalanin POD enzimi üzerinde L-prolin hariç 0.5 mM konsantrasyonda aktivatör etkiye sahipken, bu konsantrasyonun üzerinde her üç amino asitte inhibitör etkiye sahiptir. Genel olarak bütün amino asitlere bakıldığında POD aktivitesini en fazla artıran L-histidin, azaltan ise L-prolin olduğu görülmektedir.

Bazik karaktere sahip L-histidin, L-lisin ve L-arginin amino asitleri 5 mM üzerindeki konsantrasyonlarda APX enzimi üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu görülmektedir. Asidik karakterdeki L-aspartik asit ve L-glutamik asit APX enzimi üzerinde genel olarak inhibitör etkiye sahiptir. L-glutamik asit hiçbir konsantrasyonda aktivatör etki göstermezken, 0.5 ve 1 mM konsantrasyonda inhibe etmiş ve 5 mM üzerinde APX aktivitesini tamamen yok etmiştir. L-aspartik asit ise 1 mM’a kadar aktivatör etki gösterirken, 5 mM ve üzerinde APX aktivitesini tamamen yok etmiştir. Nötral karaktere sahip L-treonin, L-prolin ve L-fenilalanin APX enzimi üzerinde genel olarak aktivatör etkiye sahiptir. L-treonin APX aktivitesi üzerinde 10 mM konsantrasyon ve üzerinde, L-prolin ise 1 mM konsantrasyon ve üzerinde aktivatör etkiye sahiptir. L-fenilalanin, L-treonin ve L-prolinde farklı olarak 5 mM konsantrasyona kadar aktivatör etki gösterirken, 10 mM konsantrasyonda APX enzimi üzerinde aktivatör ya da inhibitör bir etki göstermemiştir. Genel olarak bütün amino asitlere bakıldığında; APX aktivitesini en fazla artıran L-prolin, azaltan hatta yok eden L-glutamik asit olduğu görülmektedir.

Kiwano bitkisinden elde edilen POD ve APX enzimleri üzerine bazı amino asitlerin etkisinin incelendiği bu çalışmanın sonucuna göre; her iki enzim için amino asitlerin aktivatör ya da inhibitör etkiye sahip olduğu ve bu etkinin amino asit konsantrasyonuna ve amino asitlerin asidik, bazik ve nötral karakterine göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Halliwell, B., Chirico, S., Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement and Significance, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715-725, 1993.
- [2] Kaya, E., Klorprifos Ve Deltamethrin'in Kan ve Beyin Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkileri (Yüksek Lisans Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Isparta, 2005.
- [3] Mavi, A., İnsan Eritrosit ve Lökositlerinden Süperoksit Dismutaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 52-53, 2005.
- [4] Diplock, A., Healty Lifestyles Nutrition and Physical Activity, Antioxidant Nutrients, ILSI Europe Concise Monograph Series, 59, 1998.
- [5] Nawar, W.W., Lipids in "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), Marcel Dekker, 225-319, 1996.
- [6] Raven, E.L., Peroxidase-catalyzed Oxidation of Ascorbate. Structural, Spectroscopic and Mechanistic Correlations in Ascorbate Peroxidase, *Subcell. Biochem. Subcellular Biochemistry*, 35, 317-49, 2000.
- [7] Wakamatsu, K., Takahama, U., Changes in Peroxidase Activity and in Peroxidase Isozymes in Carrot Callus. *Physiologia Plantarum* 88, 167-171, 1993.
- [8] Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., the cDNA Sequence of a Neutral Horseradish Peroxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1080, 245-250, 1991.
- [9] Agostini, E., Medina, M.I., Milrad De Forchetti, S.R., Tigier, H., Properties of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from Turnip (*Brassica Napus L.*) Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598, 1997.
- [10] Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica Napus L. Var Esculenta D.C.*) Peroxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1574-1579, 2000.
- [11] [http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/Agron317/AA\\_inhibitors.htm](http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/Agron317/AA_inhibitors.htm), July 23, 2004.
- [12] [http://mx.agrinos.com/L-amino\\_acids\\_plant\\_impact](http://mx.agrinos.com/L-amino_acids_plant_impact), April 20, 2012.
- [13] [http://www.servpro.com.my/Folio\\_intro.pdf](http://www.servpro.com.my/Folio_intro.pdf), March 19, 2012.

