



**BÖRÜLCE BİTKİSİNDEN (*Vigna unguiculata*)
AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Şeyma TAŞBAŞI

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

AĞRI-2021

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Şeyma TAŞBAŞI

BÖRÜLCE BİTKİSİNDEN (*Vigna unguiculata*) AFİNİTE TEKNİĞİ
KULLANILARAK PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

AĞRI-2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BÖRÜLCE BİTKİSİNDEN (*Vigna unguiculata*) AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Şeyma TAŞBAŞI

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

Bu tez kapsamında amino benzohidrazid türevi moleküller tabanlı afinite kromatografisi tekniği kullanılarak börülce (*Vigna unguiculata*) peroksidaz enziminin ilk defa tek kademedeki saflaştırılması gerçekleştirildi ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapıldı. Sefaroz 4B-L-tirozin-4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid afinite jelinin kullanıldığı tek kromatografik adımda, %53,6 verime ve 91,6 kat saflaştırma katsayısına ulaşıldı. Elde edilen enzimin saflığını ve molekül ağırlığını belirlemek için yapılan SDS-PAGE’de 39 kDa’da tek bant gözlemlendi. Saflaştırmada ligand olarak kullanılan 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid ve 5-aminoizoftalohidrazid’in enzim ile etkileşimlerini analiz etmek için, her bir molekülün börülce POD üzerine inhibisyon etkisi incelendi ve saflaştırmada en etkili ligand olan 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid için K_i değeri $970 \pm 130 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı. Enzimin karakterizasyon çalışmaları kapsamında, enzim için optimum şartların; pH 6,0, iyonik şiddet 0,3 M ve 40 °C olduğu bulundu. Ayrıca börülce POD’nin guaiakol, H_2O_2 , 4-metilkatekol ve ABTS substratlarına olan ilgisini belirlemek amacıyla kinetik çalışmalar yapıldı ve bu substratlara ait K_M değerleri sırasıyla 7,21 mM, 17,03 mM, 7,28 mM ve 49,21 mM olarak hesaplandı.

2021, 84 sayfa

Anahtar Kelimeler: Peroksidaz, Börülce, Afinite kromatografisi, Karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM COWPEA (*Vigna Unguiculata*) USING AFFINITY TECHNIQUE AND, CHARACTERIZATION STUDY

Şeyma TAŞBAŞI

Ağrı İbrahim Çeçen University
Institute of Graduate Studies

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

In this thesis, a single step purification of cowpea (*Vigna unguiculata*) peroxidase enzyme was carried out for the first time by using amino benzohydrazide derivative molecules-based affinity chromatography technique and biochemical characterization of the purified enzyme was performed. 53,6% yield and 91,6 purification fold were achieved in a single chromatographic step using Sefaroz 4B-L-tyrosine-4-amino-3-bromo-2-methylbenzohydrazide affinity gel. A single band at 39 kDa was observed in SDS-PAGE performed to determine the purity and molecular weight of the obtained enzyme. To analyze the interactions of 4-amino-3-bromo-2-methylbenzohydrazide, 4-amino-3-bromo-5-fluorobenzohydrazide, 4-amino-3-bromo-5-chlorobenzohydrazide and 5-aminoisophthalohydrazide used as ligands in purification with the enzyme, the inhibition effect of each molecule on cowpea POD was assayed and the K_i value for 4-amino-3-bromo-2-methylbenzohydrazide, the most effective ligand in purification, was calculated as $970 \pm 130 \mu\text{M}$. Within the scope of enzyme characterization studies, optimum conditions for enzyme; It was found that the pH was 6,0, the ionic strength was 0,3 M and the temperature was 40 °C. Additionally, kinetic studies were carried out to determine the affinity of cowpea POD with guaiacol, H_2O_2 , 4-methylcatechol and ABTS substrates, and the K_M values of these substrates were calculated as 7,21 mM, 17,03 mM, 7.28 mM and 49,21 mM, respectively.

2021, 84 pages

Keywords: Peroxidase, Affinity chromatography, Cowpea, Characterization

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemedi, paylaştı, çalışmalarım boyunca gerekli olan tüm şartları sağlayarak araştırmalarımı tamamlamada her türlü desteği veren çok kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e, Sayın Nurgül ABUL'a, Sayın Serpil GERNİ'ye ve Sayın Işıl Nihan KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman ve her koşulda maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

29/06/2021

Şeyma TAŞBAŞI

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.1.2. Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler.....	1
1.1.3. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	4
1.1.4. Enzim kinetiği	5
1.1.5. Enzim inhibisyonu.....	7
1.1.5.1. Dönüşümsüz inhibisyon	8
1.1.5.2. Dönüşümlü inhibisyon	8
1.2. Peroksidazlar	10
1.2.1. Bitki Peroksidazları	13
1.3. Afinite Kromatografisi	14
1.3.1. Afinite kromatografisi çalışma prensibi	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	20
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	20
3.1.3. Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	21
3.1.3.1. Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	21
3.1.3.2. Börülce homojenatı hazırlanmasında kullanılan tampon	22
3.1.3.3. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler	22
3.1.3.4. POD Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	22
3.1.3.5. Substrat spesifikliğine yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler	23
3.1.3.6. Protein tayini çözeltisi	23

3.1.3.7. Elektroforezde kullanılan çözeltiler	23
3.1.3.8. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler	24
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Protein tayini	25
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini	25
3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	25
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	26
3.3. Börülce (<i>Vigna unguiculata</i>) Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırma	
Çalışmaları	27
3.3.1. Börülce homojenatının hazırlanması.....	27
3.3.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi.....	28
3.3.3. Aminobenzohidrazid türevlerinin sentezi	28
3.3.4. Afinite jellerinin hazırlanması.....	29
3.3.5. Homojenatların kolonlara tatbiki ve elüsyonu	30
3.3.6. SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini ve enzim saflığının belirlenmesi....	30
3.3.7. İnhibitör çalışmaları	31
3.3.7.1. Amino benzohidrazid türevlerinin börülce POD enzimi üzerine	
inhibisyon etkinliklerinin incelenmesi	31
3.3.7.2. Saflaştırılan börülce POD enziminin karakterizasyon çalışmaları.....	31
3.3.7.3. Börülce POD enzimi için optimum pH'nın belirlenmesi çalışması	32
3.3.7.4. Börülce POD enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesi	
çalışması	32
3.3.7.5. Börülce POD enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi çalışması.....	32
3.3.7.6. Börülce POD enzimi için substrat spesifikliğin belirlenmesi	
çalışmaları	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1. Ligand Moleküllerinin Sentezlenmesi.....	33
4.2. Kalitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik Hazırlanması	34
4.3. Börülce POD Enziminin Amino Benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması	
Sonuçları.....	34
4.4. SDS-PAGE Jel Elektroforezi Sonuçları	35
4.5. Aminobenzohidrazid türevlerinin IC ₅₀ ve K _i Değerlerinin Belirlenmesi.....	36

4.5.1. Saflaştırılan b�r�lce POD enzimi üzerine (a) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi	37
4.5.2. Saflaştırılan b�r�lce POD enzimi üzerine (b) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi	40
4.5.3. Saflaştırılan b�r�lce POD enzimi üzerine (c) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi	43
4.5.4. Saflaştırılan b�r�lce POD enzimi üzerine (d) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi	46
4.6. B�r�lce POD Enziminin Karakterizasyon �alışmaları	48
4.6.1. B�r�lce POD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	48
4.6.2. B�r�lce POD enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	50
4.6.3. B�r�lce POD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	51
4.7. B�r�lce POD Enziminin Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi ile İlgili �alışma Sonuçları	52
4.7.1. Guaiakol susbstratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	52
4.7.2. H_2O_2 susbstratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	53
4.7.3. 4-metilkatekol susbstratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	55
4.7.4. ABTS susbstratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları	56
5. TARTIşMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR	63
�ZGE�Mİş	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Da	Dalton
E	Enzim
EC	Enzim kodu
ES	Enzim Substrat kompleksi
I	İnhibitör
IC₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
kDa	Kilodalton
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	Peroksidaz
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
V_{max}	Maksimum hız
MA	Moleküler ağırlık
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi
EÜ	Enzim ünitesi
Tris	Trihidroksimetil aminometan
ABTS	(2Z,2'Z)-2,2'-(hidrazin-1,2-diliden)bis(3-etil-2,3-dihidrobenzo[d]tiazol-6-sulfonat)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sıcaklığın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi	2
Şekil 1.2. pH' nın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi	2
Şekil 1.3. Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerindeki etkisi.....	3
Şekil 1.4. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerindeki etkisi	3
Şekil 1.5. Michaelis-Menten grafiği	6
Şekil 1.6. Lineweaver-Burk grafiği	7
Şekil 1.7. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi	8
Şekil 1.8. Yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi	9
Şekil 1.9. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.10. Yarı yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi	10
Şekil 1.11. POD'ların genel katalitik döğüsü (Veitch 2004)	13
Şekil 3.1. Guaiakol substratının tetraguaiakole yükseltgenmesinin reaksiyon şeması (Corban <i>et al.</i> 2011).....	26
Şekil 3.2. Ligand olarak kullanılacak moleküllerin açık yapısı.....	28
Şekil 3.3. 5-aminoizoftalohidrazid sentez şeması.....	29
Şekil 4.1. 5-amino izoftalohidrazid molekülü için 400 MHz ¹ H-NMR sonuçları	33
Şekil 4.2. 5-amino izoftalohidrazid molekülü için HRMS sonuçları.....	33
Şekil 4.3. Kalitatif protein tayini için sığır serum albümin standart olarak kullanılarak oluşturulmuş grafik.....	34
Şekil 4.4. Saflaştırılan Börülce POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	36
Şekil 4.5. Börülce POD enzimi için 5 farklı (a) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği	37
Şekil 4.6. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (a) molekülü ile elde edilen 1/V, 1[S] grafiği	39
Şekil 4.7. Börülce POD enzimi için 5 farklı (b) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği	40
Şekil 4.8. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (b) molekülü ile elde edilen 1/V, 1[S] grafiği	42
Şekil 4.9. Börülce POD enzimi için 5 farklı (c) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği	43

Şekil 4.10. Börölce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (c)	
molekülü ile elde edilen $1/V$, $1/[S]$ grafiği	45
Şekil 4.11. Börölce POD enzimi için 5 farklı (d) molekülü konsantrasyonunda elde	
edilen %Aktivite grafiği	46
Şekil 4.12. Börölce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (d)	
molekülü ile elde edilen $1/V$, $1/[S]$ grafiği	48
Şekil 4.13. Börölce POD enziminin pH 4-9 aralığında Aktivite (EU/mL)- pH grafiği	
.....	50
Şekil 4.14. Börölce POD enziminin, potasyum fosfatın farklı konsantrasyonlarında	
Aktivite (EU/mL)-Konsantrasyon grafiği	51
Şekil 4.15. Börölce POD enzimi için Aktivite (EU/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği	52
Şekil 4.16. Börölce POD enziminin farklı guaiakol konsantrasyonlarındaki hızını	
gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği	53
Şekil 4.17. Börölce POD enziminin farklı H_2O_2 konsantrasyonlarındaki hızını	
gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği	54
Şekil 4.18. Börölce POD enziminin farklı 4-metilkatekol konsantrasyonlarındaki	
hızını gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği	56
Şekil 4.19. Börölce POD enziminin farklı ABTS konsantrasyonlarındaki hızını	
gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. POD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ayrıntılı kuvvet içeriği	27
Çizelge 4.1. Afinite kolonlarından elde edilen b�r�lce POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu	35
Çizelge 4.2. (a) molekülü için IC ₅₀ deney prosedürü.....	37
Çizelge 4.3. B�r�lce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (a) molekülü için K _i deney prosedürü.....	38
Çizelge 4.4. B�r�lce POD enzimi üzerine (a) molekülünün inhibisyon etkisi.....	39
Çizelge 4.5. (b) molekülü için IC ₅₀ deney prosedürü	40
Çizelge 4.6. B�r�lce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (b) molekülü için K _i deney prosedürü.....	41
Çizelge 4.7. B�r�lce POD enzimi üzerine (b) molekülünün inhibisyon etkisi	42
Çizelge 4.8. (c) molekülü için IC ₅₀ deney prosedürü.....	43
Çizelge 4.9. B�r�lce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (c) molekülü için K _i deney prosedürü.....	44
Çizelge 4.10. B�r�lce POD enzimi üzerine (c) molekülünün inhibisyon etkisi.....	45
Çizelge 4.11. 5-amino-izoftalohidrazid molekülü için IC ₅₀ deney prosedürü	46
Çizelge 4.12. B�r�lce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (d) molekülü için K _i deney prosedürü.....	47
Çizelge 4.13. B�r�lce enzimi üzerine (d) molekülünün inhibisyon etkisi	48
Çizelge 4.14. B�r�lce POD enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M sodyum asetat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	49
Çizelge 4.15. B�r�lce POD Enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	49
Çizelge 4.16. B�r�lce POD Enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	49
Çizelge 4.17. B�r�lce'den saflaştırılan POD enziminin, farklı derişimlerde KH ₂ PO ₄ kullanılarak optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi ölçüm sonuçları	50
Çizelge 4.18. B�r�lce POD enziminin değişik sıcaklıklarda aktivite ölçüm sonuçları	51

Çizelge 4.19. Börölce POD enziminin guaiakole olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü.....	53
Çizelge 4.20. Börölce POD enziminin H ₂ O ₂ 'ye olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü.....	54
Çizelge 4.21. Börölce POD enziminin 4-metilkatekole olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü.....	55
Çizelge 4.22. Börölce POD enziminin ABTS'ye olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü.....	57



1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

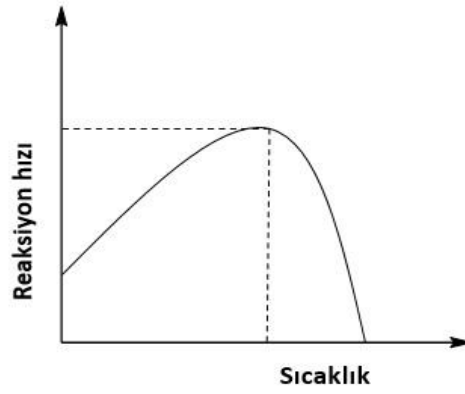
Canlılarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve reaksiyon sonunda herhangi bir yan ürün oluşmasına imkân vermeden %100 oranında ürün verimi sağlayan biyokatalizörlere enzim adı verilir. Ribozimler dışında, canlılarda gerçekleşen kimyasal dönüşümlerin tamamı protein yapısındaki enzimler tarafından gerçekleştirilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzimler canlı organizmalarda gerçekleşen reaksiyonların hızını 10^{17} kata kadar arttırabilir. Bugüne kadar 5.000 civarında enzimin çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalizlediği rapor edilmiştir. Katalizleme esnasında, kimyasal enerji korunur ve tepkime sonucunda monomerlerin birleşmesiyle polimerler ve polimerlerin parçalanmasıyla monomerler elde edilir (Lehninger 2005).

1.1.2. Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler

Enzimatik reaksiyonlar esnasında, enzim aktivitesi üzerine çeşitli faktörler etki ederek reaksiyon hızının değişmesine neden olurlar. Bu faktörler: sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, zaman, substrat konsantrasyonu, ürün konsantrasyonu, çeşitli iyonlar, fiziksel faktörler ve inhibitörler olarak sıralanabilir (Turgut 2009).

Sıcaklık

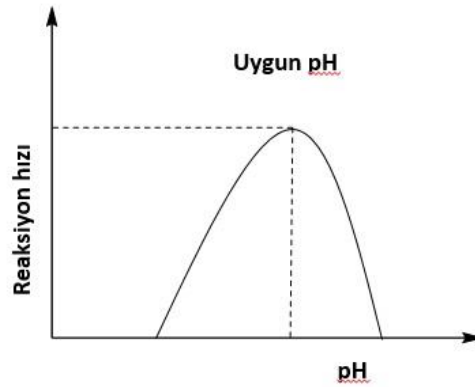
Sıcaklık enzimatik reaksiyonlar da enzim üzerine doğrudan bir etkiye sahiptir. Çoğu enzim 50-60 °C aralığında denatüre olurken bazı enzimler ise 100 °C sıcaklığa kadar aktivite gösterebilirler. Fakat enzimlerin ısıya maruz kalma süresi oldukça önemli bir etkidir. Örneğin; oda sıcaklığında birkaç saat bekletilen enzim 100 °C’de birkaç saniye bekletilen enzime göre daha fazla yıkıcı etkiye maruz kalabilir. Bu sebepten ötürü canlı dokulardan elde edilen enzimler, buzdolabı, derin dondurucu gibi soğuk yerlerde muhafaza edilir. Genelde sıcaklık artarken enzimin aktivitesi de artar. Fakat belirli bir sıcaklıktan sonra enzim denatüre olduğu için aktivite düşmeye başlar. Enzim aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklığa optimum sıcaklık denir (Turgut 2009).



Şekil 1.1. Sıcaklığın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi

pH

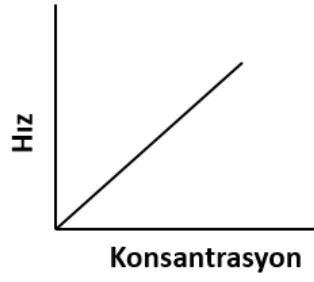
Enzim aktivitesinin değişmesinde pH önemli faktörlerden birisidir. Bütün enzimlerin aktivitelerini en iyi şekilde gösterdiği bir pH değeri bulunmaktadır ve aktiviteleri bu değerlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Buna bağlı olarak her enzimin göstermiş olduğu aktivite eğrisi de birbirinden farklıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.2. pH' nın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi

Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı enzimin substrata doymun olduğu anda, enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artar. Buna paralel olarakta ortamdaki enzim miktarı ile reaksiyon hızı doğru orantılıdır (Al-Senaidy and Ismael 2011).



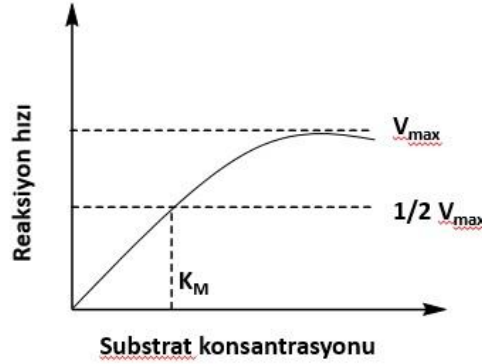
Şekil 1.3. Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerindeki etkisi

Zaman

Enzimatik reaksiyonlar devam ederken reaksiyonun hızı giderek azalış gösterir. Yani enzimatik reaksiyon hızı ile zaman birbiri ile ters orantılıdır. Bu duruma neden olabilecek faktörlere örnek olarak; kullanılan enzimin bir süre sonra denatüre olması, substratın zamanla bitmesi, reaksiyonu sınırlandıracak maddelerin oluşması gibi çeşitli etkenler verilebilir (Düzcan 2010).

Substrat konsantrasyonu

Enzimatik tepkimelerin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla ilk olarak doğrusal bir artış gösterir; ancak belirli bir zaman sonra tepkime hızı azalmaya başlar ve belirli bir V_{max} düzeyinde sabit kalır.



Şekil 1.4. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerindeki etkisi

Ürün konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonlar dönüşümlü gerçekleşir. Bu sebepten ötürü ürünler tekrar reaktantlara geri dönüşebilirler. Bu durum ise başlangıç hızını değiştirir.

Çeşitli iyonlar

Enzimin aktivite düzeyinde metal iyonlarının varlığı veya yokluğu, özellikle kofaktör gerektiren enzimler üzerinde oldukça etkili bir faktördür. Bunun yanında aşırı ağır metal iyonu enzimin yapısını bozan bir faktördür.

Fiziksel faktörler

Işık ve radyasyon enzim aktivitesini etkileyen fiziksel faktörlerin başında gelmektedir. Işığın etkisi enzimler üzerinde değişkenlik göstermektedir. Örneğin tükürükte bulunan amilaz enziminin aktivitesi kırmızı ve mavi ışıktaki artarken, UV ışığında aktivitesi azalmaktadır (Turgut 2009).

İnhibitör

Enzim katalizli reaksiyonların hızını azaltan veya tamamen durduran maddelere inhibitör denir. İnhibitörler, enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler (Voet *et al.* 2000). İnhibitörlerin farklı etki mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu mekanizmalar daha detaylı olarak enzim inhibisyonu başlığı altında açıklanmıştır.

1.1.3. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimlerin spesifik olarak etki ettiği madde substrat olarak tanımlanır ve bu substratların sonuna “az” eki getirilerek enzimlerin isimlendirilmesi yapılır (Bingöl 1977). Örnek olarak; ürenin, CO₂ ve NH₃'e parçalandığı reaksiyonu katalizleyen enzim “üreaz” olarak adlandırılırken, L-argininin üre ve L-ornitine parçalanmasını katalizleyen enzim arginaz olarak isimlendirilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komisyonu (NC-IUBMB) tarafından biyokimyasal reaksiyonları sınıflandırma şeması oluşturulmuştur. Bu şema, Enzyme Commission (E.C.) harflerinin ardından gelen dört ayrı rakamdan oluşmaktadır. İlk rakam biyokimyasal reaksiyonlarla ilgili oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar adı altında altı ana sınıftan birini, ikinci rakam enzime ait olan substrat molekülü veya kimyasal bağın yapısını,

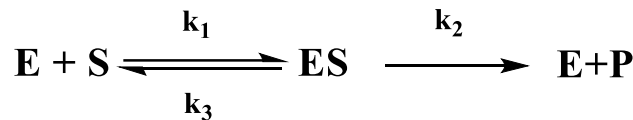
üçüncü rakam kofaktörler için alt alt grubu ve dördüncü rakam ise biyokimyasal reaksiyona ait spesifik ayrıntıları ifade etmektedir (Lee *et al.* 2007).

NC-IUBMB tarafından oluşturulan altı ana sınıf şu şekildedir.

1. **Oksidoredüktazlar:** Redoks tepkimelerini katalizleyen enzim gruplarıdır.
2. **Transferazlar:** Açıl, glikoliz, fosfat grupları gibi fonksiyonel grupların transferini katalizleme özelliğine sahip enzim gruplarıdır (Tekman ve Öner 1981).
3. **Hidrolazlar:** C-O, C-N, C-C ve fosfo anhidrit bağları gibi bağların hidrolitik olarak parçalanması reaksiyonunu katalizleyen enzim gruplarıdır.
4. **Liyazlar:** Hidrolitik veya oksidatif olmadan bir mekanizma vasıtası ile C-C, C-N, C-O gibi bağların kırılması reaksiyonlarını katalizleyen enzim gruplarıdır.
5. **İzomerazlar:** Molekül içi izomer çevrimlerini gerçekleştiren enzimlerdir. Bu izomerler geometrik, optik veya yapısal olabilir.
6. **Ligazlar (Sentazlar):** ATP veya benzer bir trifosfat grubunun parçalanması sonucu açığa çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanma reaksiyonunu katalizleyen enzim gruplarıdır (Boyce and Tipton 2001).

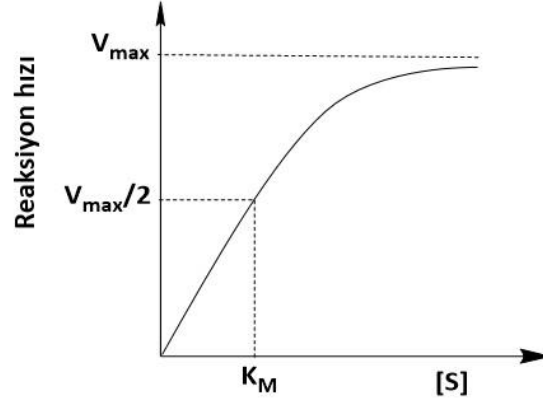
1.1.4. Enzim kinetiği

Enzim katalizli reaksiyonların hızlarının incelenmesine enzim kinetiği adı verilir (Roskoski 2015).



Bu mekanizmada serbest enzim ve substrat k_1 hızı ile ES kompleksini oluşturur. Bu kompleks k_2 hızı ile enzim ve ürün oluştururken, k_3 hızıyla ise substrat ve

serbest enzime geri ayrışır. Bu bilgiler ışığında, Michaelis-Menten kinetiğinde başlangıç enzim derişimi sabit tutulmuş, reaksiyon hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişki incelenmiş ve elde edilen aktivite verileriyle hiperbolik bir fonksiyon eğrisi ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 1.5. Michaelis-Menten grafiği

Bu grafikte V reaksiyon hızını, V_{max} maksimum hızı ve V_{max}/2 (K_M) yarı maksimum hızı temsil etmektedir. Bir enzim, substrat konsantrasyonu arttıkça sınırlayıcı bir değer olarak yaklaşılacak maksimum hızı (V_{max}) sergiler (Roskoski 2015).

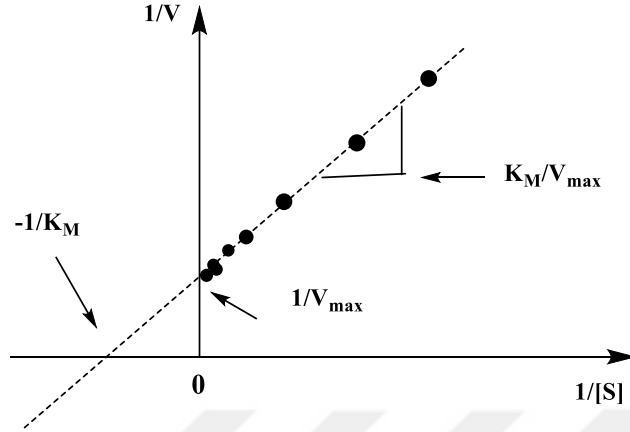
Michaelis-Menten bağlantısı:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m}$$

Bu denklem, başlangıç reaksiyon hızının (V) başlangıçtaki substrat konsantrasyonundan [S] nasıl etkilendiğini açıklamaktadır. Reaksiyon, ES konsantrasyonunun sabit kaldığını varsayımına dayanmaktadır.

Dikdörtgen şeklindeki bir hiperbolü inceleyerek bir enzim için V_{max}'ı doğru bir şekilde belirlemek zor olduğu için, K_M değerini de bu şekilde belirlemek zordur. Ayrıca bir enzimin Michaelis-Menten kinetiğini takip edip etmediğini veya enzim davranışının bundan sapıp saptığını belirlemek için doğrusal bir grafiğe ihtiyaç

duyulmuştur. Lineweaver-Burk grafiği günümüzde enzimlerin kinetik analizi için kullanılan en yaygın doğrusal grafik (Roskoski 2015).



Şekil 1.6. Lineweaver-Burk grafiği

Bu grafikler şu anda bilgisayar algoritmaları tarafından belirlenen kinetik sabitlere dayalı olarak açıklama amacı ile kullanılmaktadır (Roskoski 2015).

Kullanılan Lineweaver- Burk denklemi:

$$1/V = K_M / V_{\max} \times 1/[S] + 1/V_{\max}$$

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_{\max}$, apsiste ise $1/[S]$ değerleri ile bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise $K_M / V_{\max}$ 'dır (Lineweaver and Burk 1934).

1.1.5. Enzim inhibisyonu

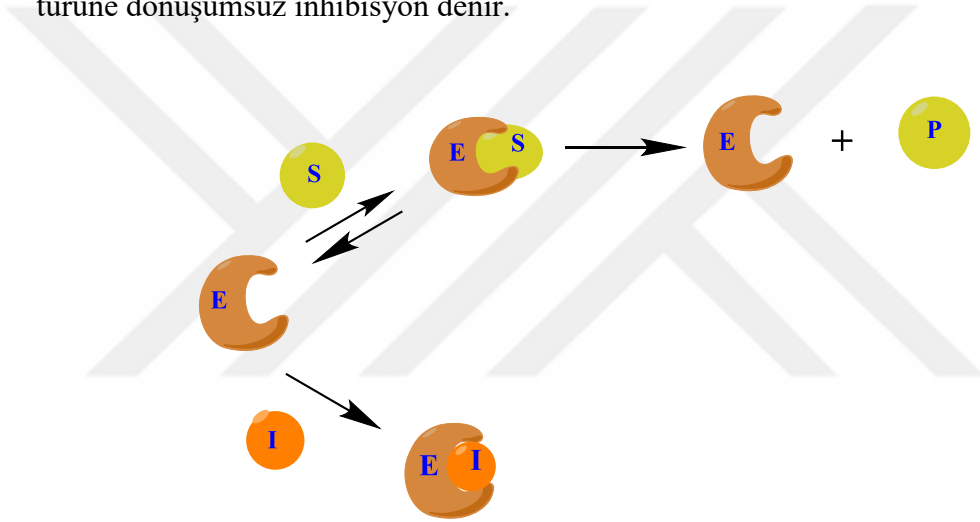
Çeşitli bileşiklerin, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda, enzim aktivitesini azaltması veya tamamen yok etmesi olayına inhibisyon adı verilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Birçok madde ile enzimler arasında bağlantı oluşur ve bağlantı sonucunda maddeler substrat görevi görürler. Ancak bazı moleküller enzimler ile bağlantı kurabildikleri halde substrat olarak davranmazlar. Bu sebepten ötürü enzimler kendilerine has katalitik görevlerini yerine getiremezler. Bu maddelere ise inhibitör adı verilmektedir (Bingöl 1977). Kimyasal reaksiyon sırasında oluşan inhibisyon, ortam kontrolü için bir mekanizma oluşturduğundan dolayı son derece önemli bir olaydır. Biyokimyacılar arasında inhibitörler, kompleks bir yapıya sahip olan

metabolik yolların açıklanmasında ve enzimlerin etkileşimde bulundukları çeşitli mekanizmaların aydınlatılmasında son derece önemli fonksiyona sahiptirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim inhibisyonu kendi arasında dönüşümlü ve dönüşümsüz inhibisyon olarak iki alt gruba ayrılmaktadır.

1.1.5.1. Dönüşümsüz inhibisyon

Kimyasal reaksiyon sırasında enzim ile inhibitör arasında kovalent bağ yada zor ayrışabilen bir kompleks oluşur ve enzim tekrar aktivite gösteremez. Bu inhibisyon türüne dönüşümsüz inhibisyon denir.



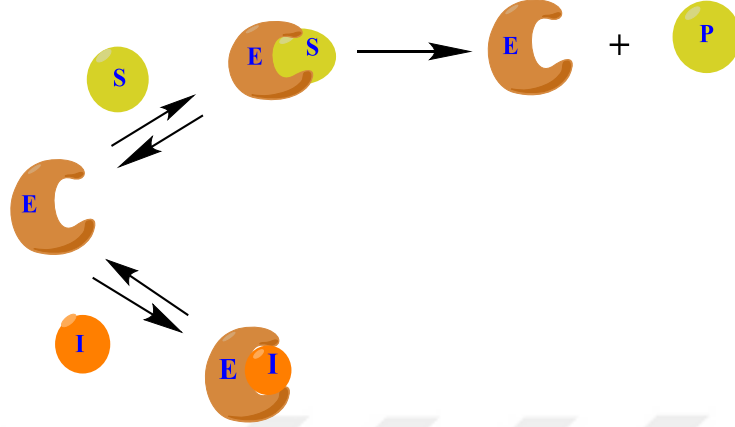
Şekil 1.7. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi

1.1.5.2. Dönüşümlü inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşimi bir denge reaksiyonu halindedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu inhibisyon çeşidinin üç değişik tipi gözlenmiştir. Bunlar; Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur (Bingöl 1977).

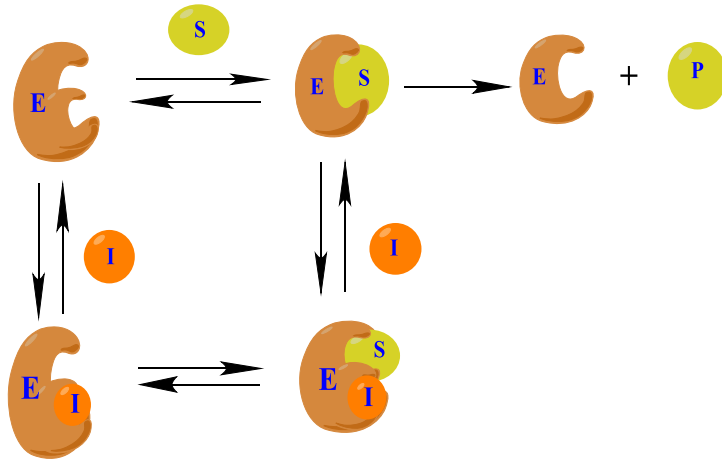
Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon türünde substrata benzer bir yapıya sahip olan inhibitör enzime ait aktif bölgeye bağlanarak enzim ile substrat arasında gerçekleşmesi beklenen bağlanmayı engeller. Ancak ortamdaki substrat

konsantrasyonu artırıldıkça inhibisyon etkisi zamanla azalır, enzime ait $V_{\max}$ değeri sabit kalırken K_M değeri artar.



Şekil 1.8. Yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi

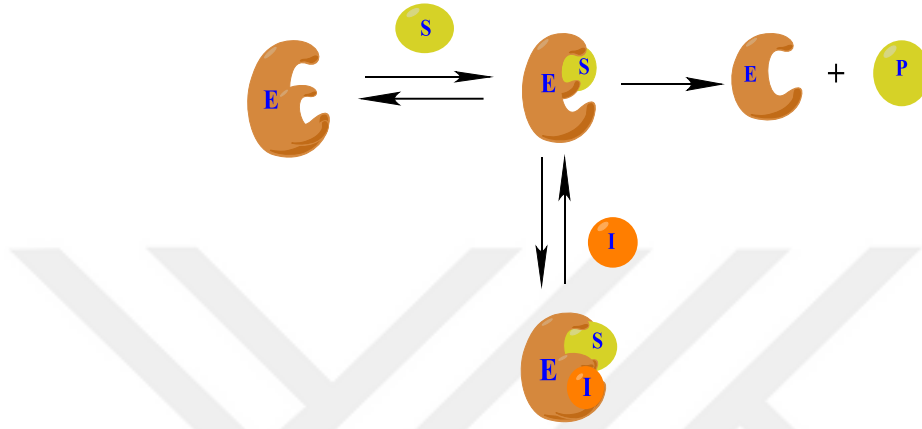
Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon çeşidinde de substrat ile inhibitör, enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Yarışmasız inhibitör, enzimin katalitik aktivitesini düşürücü etki gösterir. Ortamdaki substrat konsantrasyonu artırılarak inhibisyon etkisi ortadan kaldırılamaz, enzimin $V_{\max}$ değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır.



Şekil 1.9. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Bir diğer inhibisyon çeşidi olan yarı yarışmalı inhibisyon da ise inhibitör sadece ES kompleksine bağlanır. Unkompetitif inhibitör varlığında, konsantrasyonun yükseltilmesiyle inhibisyon artabilir. Buna göre

inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için hem K_M değeri hemde V_{max} değeri düşer. Unkompetitif inhibisyon tipi enzimatik reaksiyonlarda nadir olarak görülürken yarışmalı ve yarışmasız inhibisyonlar daha sık gözlenmektedir. Ancak bu inhibitörleri ayırmak hemen hemen imkânsızdır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.10. Yarı yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi

1.2. Peroksidazlar

Peroksidazlar (POD, E.C: 1.11.1.7) ile ilgili ilk çalışmalar 1809 yılında Saunders ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Fakat POD terimi ilk kez bir asır sonra yaban turpundan izole edilen bir enzim için kullanılmıştır (Huystee 1987).

POD'lar oksidoredüktazlar grubunda yer alan ve hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında çok çeşitli organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalize eden proteinlerdir (Banci 1997). Moleküler ağırlıkları 32 ile 45 kDa arasında değişkenlik gösterir (Rompel *et al.* 2007). Ayrıca 3 ila 9 arasında değişen pH 'larda ve 30 ila 80 °C arasında değişen sıcaklıklar da H_2O_2 'yi indirgeme yeteneğine sahiptirler (Vigneswaran *et al.* 2014).

POD enzimleri; bitkilerde hücre duvar proteinlerinin çapraz bağlanması (Fry 1986), bitki dokularında oluşan yaraların iyileşmesi ve bitkinin savunma mekanizması (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), lignin biyosentezi (Imberty *et al.* 1985), oksin katabolizması (Lagrimini *et al.* 1997) ve tuz toleransı (Amaya *et al.* 1999) gibi çeşitli

biyolojik görevleri vardır. Ayrıca eczacılıkta (Agostini *et al.* 1997), klinik biyokimya ve immünoanalizlerde (Kwak *et al.* 1996) yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

POD'lar bitkiler, hayvanlar ve bakteriler de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklarda bulunurlar. Yaban turpu (*Armoracia rusticana*), papaya (*Carica papaya*), muz (*Musa paradisiaca*), çıplak kök (*Acorus calamus*) gibi çeşitli bitki kaynaklarından POD enzimleri elde edilmiştir. Bakteriyel türlerde *Bacillus sp.* (Dawkar *et al.* 2008; Bansal and Kanwar 2013), *Pseudomonas sp.* (Kalme *et al.* 2007; Telke *et al.* 2010) ve *Escherichia coli* (Di Gennaro *et al.* 2014) suşları POD'ların saflaştırılmasında kaynak olarak kullanılmıştır. *Auricularia sp.* (Liers *et al.* 2010), *Penicillium geastrovirus*, *Umbelopsis isabellina* (Singh *et al.* 2019), *Thanatephorus sp.* (Sugano *et al.* 2006) ve *Pleurotus ostreatus* (Faraco 2007) gibi mantar türlerinde de bu enzimlere rastlanmıştır. Ayrıca *Candida tropicalis* ve *Debaryomyces polymorphus* gibi maya türlerinde POD enzimlerine sahip olduğu gözlenmiştir (Singh *et al.* 2019).

POD enzimleri kendi aralarında iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar; hem grubu ihtiva eden POD'lar ve hem grubu ihtiva etmeyen POD'lardır. PeroxiBase veritabanına göre hem grubu içeren POD grubu, POD genlerinin %80' ninden fazlasını oluşturur. Tiol peroksidaz, alkilhidroperoksidaz, NADH peroksidaz gibi hem grubu içermeyen POD ise daha küçük bir alanı oluşturur. Hem grubu POD'lar da kendi aralarında farklı iki aileye ayrılmıştır. Bunlar peroksidaz-siklooksijenaz üst ailesi (PCOXS) ve peroksidaz-katalaz üst ailesi (PCATS)' dir (Pandey *et al.* 2017).

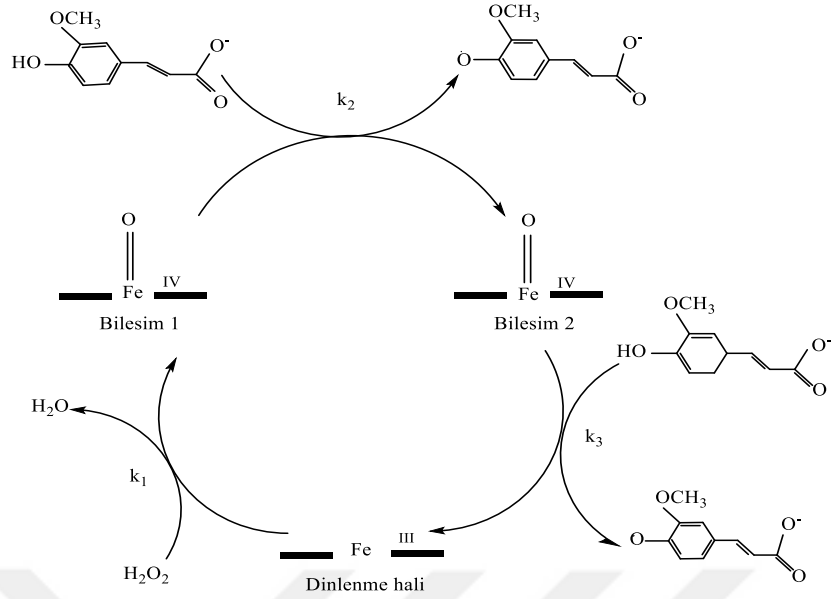
Peroksidaz-siklooksijenaz üst ailesi (PCOXS): Daha önce hayvan peroksidaz üst ailesi olarak bilinen PCOXS 'lar doğuştan gelen bağışıklık ve savunma sistemine tepki olarak işlev gösteren miyeloperoksidaz (MPO), lakto-peroksidaz (LPO) ve tiroid- peroksidaz (TPO) gibi hayvan peroksidazlarından oluşmuştur (Twala *et al.* 2020).

Peroksidaz-katalaz üst ailesi (PCATS): PCATS ailesi hayvansal olmayan hem-peroksidaz ailesidir. Bu POD ailesi kendi arasında üç sınıfa ayrılmıştır (Pandey *et al.* 2016).

1. Sınıf POD'lar: Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde bulunan POD'lar, oksidatif stresin önlenmesinde işlev gösterir. Bu POD sınıfı, sitokrom c peroksidazları (CCP; EC 1.11.1.5), katalaz peroksidazları (CP; EC 1.11.1.6) ve askorbat peroksidazları (APX; EC 1.11.1.11)'ni içerirler. CCP'ler H_2O_2 'yi suya indirger. APX'ler askorbatı indirgeyici olarak kullanarak H_2O_2 'yi parçalar. CP'ler ise bakterilerde bulunurlar ve hem katalaz hemde peroksidazın iki işlevli aktivitesine sahiptirler (Taniwan 2020).

2. Sınıf POD'lar: Sadece mantarlarda bulunan bu POD sınıfı ligninin biyolojik olarak bozunduğu reaksiyonu katalizler. Lignin peroksidazları (LİP; EC 1.11.1.14), manganez peroksidazları (MnP; EC 1.11.1.13) ve çok yönlü peroksidazlar (VP; EC 1.11.1.16) bu sınıfa dahildir. Beyaz çürük mantarlar tarafından salgılanan LİP ve MnP, lignini polimerize etme yeteneğine sahiptir. LİP'ler, çeşitli fenolik olan veya olmayan bileşikleri indirgerken, MnP'ler ise Mn (II) formdaki POD'a bağlı oksidasyonu katalize eder. VP' ler, LİP ve MnP arasında bulunan hibrit bir yapıyı paylaşır. Bu sebepten dolayı sadece Mn (II)' yi değil aynı zamanda Mn yokluğunda LİP'e benzeyen fenolik olan veya olmayan bileşikleri de oksitler (Taniwan 2020).

3. Sınıf POD'lar: Çeşitli bitkilerde bulunan ve farklı fizyolojik süreçlerde yer alan POD sınıfı, yaban turpu (HRP), soya fasulyesi (SBP), yer fıstığı (PNP) ve çeşitli bitki POD'larını içerir (Taniwan 2020).



Şekil 1.11. POD'ların genel katalitik döğüsü (Veitch 2004)

Bitkilere özgü hem POD'ların katalitik döğüsünün ilk basamağı indirgenme-yükseltgenme reaksiyonudur. Bu reaksiyonda POD enzimi ile bu enzimin ekivalenti tepkimeye girer. Reaksiyon sırasında ortamda bulunan H₂O₂ suya indirgenirken ortamda bulunan enzim ise yükseltgenmektedir. Bu tepkime sonunda bileşik I oluşur. Ardından katyon radikaline dönüşmüş olan bileşik I Fe(IV) haline dönüşmek için ortamda substrat olarak bulunan guaiakolden bir adet proton (H⁺) kopararak indirgenirken guaiakol ise radikal şekline gelir. Bu işlemin sonucunda ise bileşik II oluşur. Oluşan bu bileşik porfindir ve oksiferril bir merkezi bulunmaktadır. Son olarak oluşan bileşik II ilk haline gelmek için ortamda bulunan guaiakolden bir adet proton kopararak indirgenir ve tekrardan ilk haline dönüşür. Tüm bu reaksiyon döğüsünde ortaya çıkan radikal şeklindeki substratlar polimerleşmek için birbirleriyle sürekli etkileşim halindedirler (Veitch 2004).

1.2.1. Bitki Peroksidazları

Bitki POD'ları 32.500 ila 42.000 kDa arasında değışen moleküler ağırlığa sahiptirler. Bitki POD'ları yaklaşık %25 oranında karbonhidrat içerirler. Ayrıca yaklaşık 300 amino asit kalıntısı, iki glukozamin, iki adet kalsiyum ve iki ila altı arasında değışen glikosilasyon bölgesi içerir. İzoelektrik noktaları 3,5 ila 10 arasında

değişkenlik gösteren bu enzimler termostabil proteinler olarak kabul edilir (Vicuna 2005).

1.2.2. Peroksidazların kullanım alanları

POD'lar birçok endüstriyel ve analitik alanda kullanılır. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) testinde kullanılan konjuge antikorların hazırlanmasında kullanılan en uygun enzimlerdir. H₂O₂ üreten polienzimatik sistemlerde diğer enzimlerle birleştirilmiş olan POD enzimi, kandaki glikoz gibi birçok bileşiğin belirlenmesinde de kullanılır. POD'lar oksidatif özelliklerinden dolayı çeşitli oksidasyon tekniklerinde kullanılabileceği alanlar da bulunmaktadır (Regalado *et al.* 2004).

1.3. Afinite Kromatografisi

Kromatografi, biyokimyasal analizlerde en yaygın kullanılan ayırma yöntemlerinden birisidir (Miller 2003). İlk olarak 20. Yüzyılda Michael Tsvett kromatografi yöntemini kullanarak renkli pigmentleri birbirinden ayırmıştır.

Afinite kromatografisi ise 1968 yılında Catrecasas, Wilcheck ve Anfinsen tarafından enzimlerin izolasyonun da kullanılmıştır. Kullandıkları tekniğe de afinite kromatografisi tekniği adını vermişlerdir (Mayers and Van Oss 1998).

Geçmiş 50 yılda, biyomoleküllerin ayrıştırılmasında çeşitli geleneksel yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu durum zamanla değişerek çeşitli yeni ayırma yöntemlerini ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemlerden birisi de afinite kromatografisidir. Yöntemin temel esası proteinleri biyolojik özelliklerine dayanarak ayrılmasıdır. Farklı teknikler kullanılarak yapılan saflaştırma işlemleri birçok basamakta gerçekleşmesinin yanı sıra çok fazla zaman almaktadır. Ancak afinite kromatografi tekniği kullanılarak sürecin hem daha kısa bir sürede tamamlanmasını hem de ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyalin tek basamakta ayrılmasını sağlar. Afinite kromatografisi kendi arasında çeşitli alt dallara ayrılmıştır. Biyoafinite, lektin afinitesi, metal iyonu afinitesi alt dallarından sadece birkaçıdır. Afinite kromatografi başlığı altındaki

yöntemlerin tamamı canlı organizmalarda hayati önem taşıyan protein ve enzim gibi çeşitli moleküllerin birbirinden ayırma işleminde kullanılmaktadır (Konak vd. 2014).

Afinite kromatografisi, elde edilmek istenen biyomolekül katı matriks üzerine kovalent bağ ile bağlanmış halde bulunan liganda tutunarak karışımdan ayrılır. Bu olay hidrofobik kuvvetler, iyonik etkileşimler, London dağılma kuvveti, dipol-dipol etkileşimi ve yük-aktarım etkileşimlerinden bir veya birkaçının aynı anda oluşması ile meydana gelir. Bağlanmış olan moleküllerin ortamdan ayrışma olayı ise ortam sıcaklığındaki değişiklikler, ortamın pH'sı, yarışmacı ligandlar, iyonik güç veya ortama eklenen solventler ile gerçekleştirilir (Çelikkaya 2017).

Afinite kromatografisinin kullanım amaçları:

- Kompleks karışımlardan elde edilmek istenen bir maddeyi saflaştırmak için
- Maddelerin bozulmuş şekilleriyle doğal şekillerini birbirinden ayırmak için
- Büyük miktarlardaki madde karışımlarından küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için

1.3.1. Afinite kromatografisi çalışma prensibi

Afinite kromatografisi, saflaştırmak istenilen proteinin çözünmeyen bir destek materyali (matriks) üzerinde hareketsizleştirilmiş bağlayıcı madde (ligand) tarafından spesifik ve tersine çevrilebilir şekilde adsorbe edildiği bir tür adsorpsiyon kromatografisidir (Hatti-Kaul and Mattiasson 2003). Bu yöntem ile saflaştırma işlemi tek basamakta ve yüksek verim ile gerçekleştirilebilir (Shen 2019).

Afinite kromatografisinin çalışma prensibi: hedef proteine özgü afinitesi olan ligand, kolondaki reçineye kovalent olarak bağlanır ve kolonda hareketsizleştirir. Daha sonra hazırlanan homojenat kolondan geçirilirken ayırmak istenilen protein liganda tutunur ve protein karışımdan ayrılır. Son olarak reçineye yüksek konsantrasyonlarda serbest ligandlar (pH değişimi, farklı afiniteli diğer moleküller, tuzlar) eklenerek hedef protein reçineden ayrılır ve böylelikle saflaştırma işlemi gerçekleşmiş olur (Shen

2019). Afinite kromatografisinde saflaştırma çoğu zaman 100 ila 1000 kat arasında olmaktadır (Hatti-Kaul and Mattiasson 2003).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

POD'lar oksidoredüktazlar grubunda yer alan ve H_2O_2 varlığında çok çeşitli organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalize eden proteinlerdir (Banci 1997; Yemencioğlu *et al.* 1998). Bu enzimler mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar da dahil olmak üzere canlı organizmalarda yaygın olarak bulunurlar (Köksal and Gülçin 2008).

POD'lar bitkilerin hücre duvarlarına iyonik veya kovalent bağ ile bağlanırlar (Belcarz *et al.* 2008) ve hücre duvarının sertleşmesi, organogenezi, hücre duvarına polisakkaritlerinin çapraz bağlanması, fenol oksidasyonu, doku hasarının onarılması, tuz stresine karşı tolerans geliştirilmesi ve savunma mekanizmaları geliştirilmesi gibi çeşitli fizyolojik durumlarda görev alırlar (Somtürk 2013).

POD'lar, *in vitro* kullanımları gün geçtikçe yaygınlaşması ile birlikte immünolojik, biyoteknolojik ve endüstriyel gibi çeşitli alanlarda daha fazla tercih edilen bir enzim grubu haline gelmişlerdir. Kullanım alanlarına fenoller gibi çevresel kirleticilerin biyoremediasyonu, kâğıt endüstrisinde delignifikasyon, teşhis kiti geliştirilmesi, immünoassay testleri, organik ve polimer sentezi ve biyosensör teknolojisi geliştirilmesi örnek olarak verilebilir. Ayrıca etli gıda ürünlerinin işlenmesi, fenollerin polimerizasyon yoluyla çökeltilmesi ve endüstriyel atıkların renklerinin giderilmesi sırasında oluşan lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesinde POD'ların kullanım alanlarına eklenebilir (Pandey *et al.* 2017).

Literatürde bitkisel kaynaklarda bulunan POD enzimlerini saflaştırma çalışmalarında kullanılan afinite kromatografisinin yanında jel filtrasyon kromatografisi, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi gibi çeşitli teknikler de kullanılmıştır. Bu çalışmalara; jel filtrasyon yöntemi kullanılarak lima fasulyesinden (Wang *et al.* 2009), hidrofobik afinite kromatografi yöntemi kullanılarak domatesten (Jen *et al.* 1980), jel filtrasyon yöntemi kullanılarak maruldan (Güngör vd. 2005), hidrofobik afinite ve jel filtrasyon kromatografi yöntemi kullanılarak tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografi yöntemi kullanılarak bürüksel lahanasından

(McLellan and Robinson 1987), iyon değişim ve jel fitrasyon kromatografi yöntemi kullanılarak portakaldan (Clemente 1998) yapılan POD saflaştırmaları örnek olarak verilebilir. Ayrıca katyon değişim kromatografi yöntemi ile zeytinden (Saraiva *et al.* 2007), iyon değişim kromatografi yöntemi ile ısırgan otundan (Gülçin 2002), katyon değişim kromatografi yöntemi ile mısırdan (Mika *et al.* 2008) ve jel filtrasyon kromatografi yöntemi ile brokoliden (Köksal and Gülçin 2008) yapılan saflaştırmalarla da örnekler genişletilebilir.

Literatürde bugüne kadar yapılmış olan çeşitli saflaştırma çalışmaları sonucunda POD'lar için çok sayıda izozim yapısı keşfedilmiştir ve bu çalışmalarda izozimlere ait optimum pH, moleküler ağırlık (MA), stabil sıcaklık, substrat spesifikliği gibi kendilerine has karakteristik özellikleri ortaya çıkarılmıştır (Tıpawan and Barrett 2005). POD enzimlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak; vanilya çekirdeği POD'un 46,5 kDa (Marquez *et al.* 2008), çilek POD'un 65 kDa (Civello *et al.* 1995), hurma yaprağı POD'un 48 kDa (Deepa and Arumughan 2002), zeytin POD'un 44 kDa (Tzika *et al.* 2009), karalahana POD'un 95 kDa (Gulcin and Yıldırım 2005), domates POD'un 43 kDa (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) olduğu bulunmuştur. Optimum pH'larının ise genelde 5,0 ila 7,5 arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür (Tıpawan and Barrett 2005).

Anavatani Güney Asya, Hindistan ve Afrika olan börölce (*Vigna unguiculata*) yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılık gösteren baklagil familyasına ait önemli bir bitki çeşitidir. Ülkemizde en çok Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde görülen bu bitki en fazla Isparta, Manisa ve Muğla illerinde yetiştirilir. Bu şehirleri Denizli, İzmir, Çanakkale ve Balıkesir takip etmesinin yanı sıra Antalya ve Hatay illerinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır (Ünlü ve Padem 2004).

POD'lar ticari açıdan önemli bir enzim sınıfıdır. Bu enzimler biyoteknolojik uygulamalarda, çeşitli ihtiyaçlara geniş bir yelpazede cevap vermektedir. Türkiyede yetiştiriciliğinin fazla olmasından dolayı da börölce alternatif bir POD kaynağıdır. Tüm bunlar göz önüne alındığında, bu tez kapsamında ilk kez börölce bitkisinden (*Vigna unguiculata*) afinite kromatografisi tekniği kullanılarak POD enziminin tek

basamakta saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında, saflaştırmada kullanılabilecek çeşitli ligandların etkinliği, inhibisyon değerleriyle karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Araştırmamızda ayrıca çeşitli alanlarda kullanım potansiyeli olabilecek brlce POD enziminin biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

CNBr-Sefaroz-4B, Disodyum karbonat (%99), Sodyum hidrojen karbonat (%98), Guaiakol (%98), Hidrojen peroksit (%30), Sığır serum albümin, Sodyum asetat (%99), TEMED, Formaldehit, Glutalaldehit, Sodyum Klorür (%99), N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Etanol, Metanol, Coomassie brilliant blue G-250 / R-250, Brom timol mavisi, Gliserol, L-tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Sodyum sülfat, Potasyum dihidrojen fosfat, Sodyum dodesilsülfat, Gümüş nitrat, Sodyum perklorat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, Fosforik asit, L-Tirozin, İzopropanol, Sodyum hidroksit ve Trikloro asetik asit, Merck KGaA'dan (Darmstadt, Almanya). β -merkaptotanol, Dimetil 5-amino izopitalat (%98), Metil 4-amino 3-bromo 5-klorobenzoat (%96), Metil 4-amino 3-bromo 2-metil benzoat (%98) ve Metil 4-amino 3-bromo 5-florobenzoat (%97) Fluorochem Ltd.'den (Derbyshire, UK) ve Protein standards (Lot:26616) Thermo Fisher Scientific (MA, USA)'dan satın alındı. Börülce bitkisi (*Vigna unguiculata*) piyasadan temin edildi.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan alet ve cihazlar	
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
pH metre	Mettler Toledo Seven Compact
Hassas terazi	Denver Instrument
Derin dondurucu (-20 °C' ye kadar)	Samsung
Afinite kolonu	Sigma
Karıştırıcı (Shaker)	IKA KS 130 basic
Magnetic karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
Buz dolapları	Bosch
Güç kaynağı	1-Bio R ad Power Pac 3000
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisonswhirli-mixer

NMR	Bruker 400 MHz
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	Nüve
Kar makinesi	Scotsman AF-20 (Authomaticice machines)
Otomatik pipet	Axigen
Ultraturaks	Heidolph Silient Crucher M
Peristaltik pompa	İsmatec
Spektrofotometre	Agilent Cary 60
Rotary Evaporatör	Heidolph
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
Elektroforez tankı	Biorad (dikey)

3.1.3. Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltiler

Çalışmalar boyunca çeşitli çözeltiler kullanılmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanma şekli ve kullanım alanları aşağıda detaylı bir şekilde belirtilmiştir. Çözeltilerin hazırlanması esnasında kullanılan su aksi belirtilmediği takdirde saf sudur.

3.1.3.1. Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. NaHCO_3 tamponu (pH 10, 0,1 M) (CNBr-Sefaroz-4B ile L-tirozin reaksiyonu için): NaHCO_3 'ın 1,05 gramı 75 mL saf suda çözüldü. 2 N NaOH pH 10 oluncaya kadar ilave edildi, son hacim 100 mL' ye tamamlandı.
2. NaHCO_3 tamponu (pH 10, 0,2 M) (Ligandların Sefaroz-4B-L-tirozin kenetlendirilmesi reaksiyonu için): 2,4 g Tris-HCl 170 mL saf suda çözüldü. 3 M HCl çözeltisi ile nihai pH 10'a getirildi, sonra son hacim 200 mL'ye saf su ile tamamlandı.
3. K_2HPO_4 tamponu (pH 6,8, 25 mM) (Afinite jellerinin yıkanması ve kolona yüklenmesi için): 1,74 gr K_2HPO_4 tartıldı ve 350 mL saf suda çözüldü. 0,5 M HCl çözeltisi kullanılarak pH 6,8'e getirildi, daha sonra son hacim 400 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.

3.1.3.2. Börölce homojenatı hazırlanmasında kullanılan tampon

KH_2PO_4 tamponu (pH 7,0, 0,2 M) (Sıvı azot yardımıyla börölcenin parçalanması sonrası dokularının içine alınması için): 2,7 g KH_2PO_4 , 90 mL saf suda çözöldü ve pH 7,0 oluncaya kadar 2 M NaOH kullanılarak titre edildi, son olarak toplam hacim saf su kullanılarak 100 mL' ye tamamlandı.

3.1.3.3. Afinite kolonunda kullanılan çözelti

1. KH_2PO_4 tamponu (pH 6,8, 10 mM) (CNBr-Sefaroz-4B afinite kolonlarının dengelenmesi için): 2,72 gr KH_2PO_4 , 1,950 mL saf suda çözöldü ve 0,5 M NaOH ile pH 6,8 oluncaya kadar titre edildi, daha sonra son hacim saf su ile 2 L' ye tamamlandı.
2. KH_2PO_4 tamponu (pH 6,8, 25 mM) (afinite kolonlarına homojenatın tatbikinden sonra kolonları yıkamak için): 2,72 g KH_2PO_4 750 mL saf suda çözöldü. 0,5 M NaOH ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim saf su ile 800 mL'ye tamamlandı.
3. KH_2PO_4 tamponu (pH 6,8, 25 mM, 0,75 M NaCl içerir) (POD enziminin elüsyonu için) 8,77 g NaCl ve 0,6805 g KH_2PO_4 190 mL saf suda çözöldü. 0,5 M NaOH ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim saf suyla 200 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. POD Aktivite ölçümünde kullanılan çözelti

1. Aktivite ölçüm tamponu: 0,1 M KH_2PO_4 , 2,72 gr potasyum dihidrojen fosfat, hassas terazide tartılmış ve 80 mL saf su içerisinde çözönmüştür. Daha sonra pH 6,0 oluncaya kadar NaOH ile titre edilmiş ve son olarak hacim 200 mL' ye tamamlandı.
2. 45 mM Guaiakol çözeltisi: 1 mL'lik pipet kullanılarak 996 μL guaiakol alınmış ve son hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.
3. 22,5 mM H_2O_2 çözeltisi: H_2O_2 'den (%30'luk) 1000 μL ' lik pipet yardımıyla 456 μL alındı ve hacim 200 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.5. Substrat spesifikliğine yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M guaiakol çözeltisi: 2200 µL guaiakol alındı ve hacim 200 mL'ye tamamlandı.
2. 0,1 M H₂O₂ çözeltisi: 634 µL H₂O₂ alındı toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.
3. 0,1 M 4-metilkatekol çözeltisi: 2,48 g 4-metilkatekol tartıldı ve son hacim 0,2 L olacak şekilde hazırlandı.
4. ABTS çözeltisi: 0,1 M NaH₂PO₄'ten 3 gr ve ABTS'den 0,137 gr tartıldı ve 200 mL'ye tamamlandı. Daha sonra pH 6,0 olacak şekilde ayarlandı. (son hacim 0,25 L)

3.1.3.6. Protein tayini çözeltisi

Coomassie brilliant blue G-250 reaktif çözeltisi: 0,2 g coomassie brilliant blue G-250 100 mL etanolde (%98'lik) çözöldü, bu çözeltiye %95'lik 0,2 L fosforik asit ilave edilerek çözelti 2 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.3.7. Elektroforezde kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8): 24,2 g Tris, 190 mL saf suda çözöldü. 3 M HCl kullanılarak pH 8,8'e ayarlandı, son hacim 200 mL olacak şekilde saf su eklendi.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8): 24,2 g Tris, 190 mL saf suda çözöldü. 3 M HCl kullanılarak pH 6,8'e ayarlandı, son hacim 200 mL olacak şekilde saf su eklendi.
3. Akrilamid (%30) / Bisakrilamid (%0,8) çözeltisi: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid tartıldı. Daha sonra 69,2 g saf suda çözöldü.
4. SDS (%10): 2 g SDS 18 mL saf suda çözölerek hazırlandı.
5. Amonyum persölfat çözeltisi (%10): 2 g amonyum persölfat tartıldı ve saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 3 g ve 15 g glisin, 900 mL saf suda çözüldü ve üzerine 10 mL %10'luk SDS çözeltisi ilave edilerek toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.
7. Brom timol mavisi çözeltisi (%0,1): 0,2 g boya 10 mM 32 mL NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 200 mL'ye tamamlandı.
8. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl çözeltisinden (pH 8,8) 1 mL, %10'luk SDS'den 2 mL, %100'lük gliserinden 2 mL ve %0,1'lik brom timol mavisi çözeltisinden 2 mL alındı ve son olarak 2 mL β -merkaptoetanol eklenerek 20 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.8. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

Gümüş boyamada protein bantlarının saptanabilmesi için dört farklı çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler sırasıyla; tespit çözeltisi, redüksiyon çözeltisi, boyama çözeltisi ve yıkama çözeltisidir.

1. **Tespit çözeltisi:** 120 mL saf su, 60 mL %98'lik etanol, 20 mL asetik asit homojen bir dağılım olana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
2. **Redüksiyon çözeltisi:** 90 mL etanol, 9,6 g sodyum asetat, 0,3 g sodyum tiyosülfat, 6 mL glutalaldehit ve saf su kullanılarak hazırlandı. 160 mL su ve etanol ilk olarak karıştırıldı. Daha sonra asetik asit ile pH 6,0'a ayarlandı ve sırasıyla sodyum tiyosülfat ve glutalaldehit eklendi. Son hacim 0,3 L'ye tamamlandı.
3. **Gümüş boyama çözeltisi:** 0,2 g gümüş nitrat 200 mL saf su içerisinde çözüldü ve üzerine 60 μ L formaldehit eklenerek kullanımdan hemen önce hazırlandı.
4. **Yıkama çözeltisi:** 7,5 g Na_2CO_3 , 540 mL saf su içerisinde çözüldü ve son olarak çözeltiliye 240 μ L formaldehit eklendi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.1. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sırasında, eşit hacimde toplanan enzim içeren bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu tayin yöntemi protein yapısında bulunan aromatik amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışığı absorblamaları esasına dayanır (Segel 1968). Elde edilen elüatlarda, bulunan proteinin miktarı, numuneler kuvarz küvetlere (1 mL) konularak spektrofotometrik olarak ölçüldü, kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

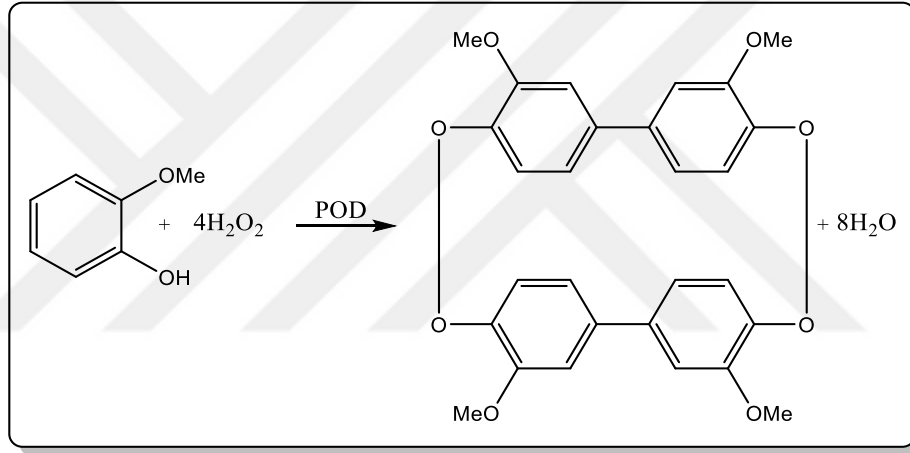
3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Homojenatta ve afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan enzim çözeltilerinde ki protein miktarları Bradford metodu kullanılarak hesaplandı. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntem, negatif yüklü boyanın, proteinlerin ihtiva ettikleri amino asitlerin üzerindeki pozitif yüke bağlanma esasına dayanır. Boya, 465 nm ve 595 nm'de maksimum absorbans veren iki formda bulunur. Proteinin boyaya bağlanması sonucunda, kırmızı formun mavi forma dönüşümü sağlanır. Bu yöntem, özellikle bozucu faktörlere karşı oldukça hassastır (1-100 µg). Reaksiyon tekrar edilebilir ve göreceli olarak hızlı gerçekleşir (iki dakikada sonuç elde edilebilir). Yukarıda bahsedilenler ışığında, protein tayininde şu prosedür izlenmiştir: 1 mg/mL sıgır albumin çözeltisinden tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl aktarıldı ve saf su kullanılarak son hacimler 0,1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 4,9 mL boya çözeltisi ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyonu takiben 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak ise, 0,1 mL ilgili tampon (homojenat veya elüsyon) ve 4,9 mL boya çözeltisi içeren karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu. Ortamdaki protein miktarını belirlemek için, saflaştırmanın her aşamasında enzim numuneleri 3 ayrı tüpe sırasıyla 100, 200 ve 300 µL alınarak, üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,8, 4,7'şer mL boya çözeltisi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonunda 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem 3 defa

tekrarlandı ve 3 ayrı ölçüm sonucunun aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

Börülce POD enziminin aktivitesi, Şişecioğlu ve arkadaşları tarafından önerilen prosedür kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu prosedüre göre, POD enzimi H_2O_2 varlığında, guaiakol substratın yükseltgenmesi reaksiyonunu katalizler ve yükseltgenme sonucunda oluşan tetraguaiakol 470 nm’de absorbans artışına neden olur. Kullanılan ölçüm metodu, bu absorbans artışının izlenmesi esasına dayanır (Şişecioğlu *et al.* 2010).



Şekil 3.1. Guaiakol substratının tetraguaiakole yükseltgenmesinin reaksiyon şeması (Corban *et al.* 2011)

Aktivite ölçümünde 3 mL hacime sahip, 1 cm kuartz küvet kullanıldı. Reaksiyon karışımına son olarak enzim çözeltisinin ilavesiyle reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika boyunca, 470 nm’de absorbans artışı spektrofotometrede 30 sn’lik döngüler halinde izlendi.

Çizelge 3.1. POD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ayrıntılı küvet içeriği

Kullanılan Çözeltiler	Kör (mL)	Numune (µL)
Aktivite tamponu	1,0	990
Guaiakol	1,0	1000
H ₂ O ₂	1,0	1000
Enzim	-	10
Toplam	3,0	3000

Peroksidaz aktivitesi aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Absorbans (A)} = \text{Ekstinksiyon katsayısı } (\epsilon, \text{ tetraguaiakol}_{\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}}, \epsilon = 26,6 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) * \text{Işık yolu (b, cm)} * \text{Konsantrasyon (c, } \mu\text{mol/mL)}$$
$$\text{EU mL}^{-1} = [(\Delta A \text{ dk}^{-1}) * T_h / (\epsilon * E_h)] * S_F$$

Burada $\Delta A \text{ dk}^{-1}$, dakika başına absorbans değişikliği, T_h , test hacmi (mL), E_h , enzim hacmi (mL) ve S_F , seyreltme faktörü.

Enzimin saflaştırılma aşamalarında, homojenat aktivitesinin ölçümünde ve kinetik testlerde substrat olarak guaiakol kullanıldığı için, 1 enzim ünitesi oda sıcaklığında 1 dakikada, 1 μmol guaiakol'ün oksidasyonunun katalizini gerçekleştiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3. Börülce (*Vigna unguiculata*) Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırma Çalışmaları

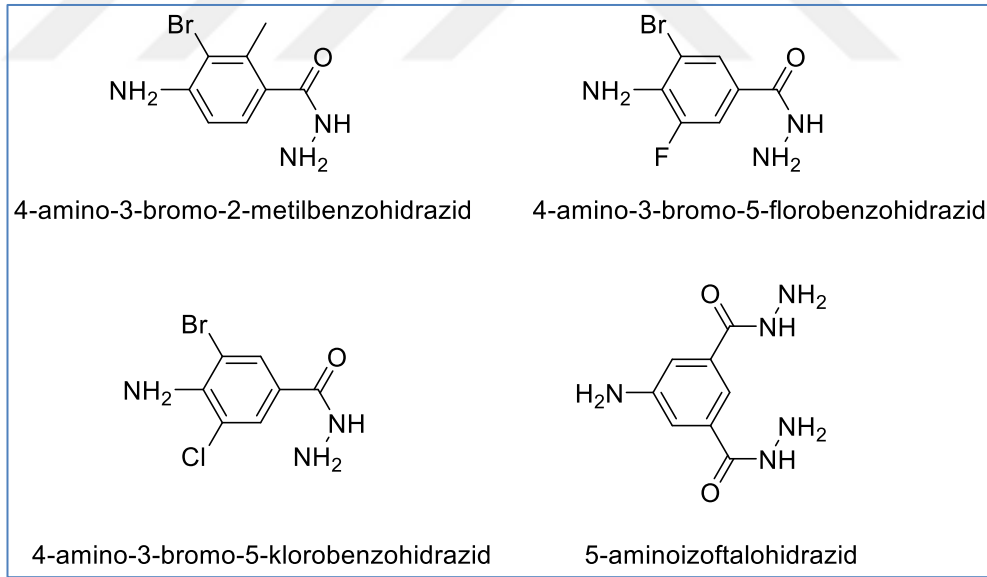
3.3.1. Börülce homojenatının hazırlanması

20 g börülce tartılarak ilk önce mekanik olarak parçalandı. Daha sonra sıvı azot yardımıyla toz haline getirildi ve önceden hazırlanmış homojenat tamponundan üzerine 80 mL ilave edilerek 3 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen kıvamlı karışım, 2.400 rpm' de ultratüraksanarak bitki hücrelerinin parçalanması ve homojenize olması sağlandı. Tam anlamıyla homojenizasyonu sağlanan karışım santrifüj tüplerine alındı ve 12.000 xg' de 40 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant çökelekten ayrıldı ve daha

sonra uygulanacak olan saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere -80 °C’de muhafaza edildi.

3.3.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi

Bitki POD'lerinin 4-aminobenzohidrazid türevi moleküller ligand olarak kullanılarak saflaştırılması, araştırmacıların büyük ilgisini çeken güncel yaklaşımlardan biridir. Bu moleküller tabanlı afinite kromatografisi ile karaturp ve şalgamdan (Oztekin *et al.* 2019), at turpundan (Almaz *et al.* 2021) ve çalı fasulyeden (Oztekin and Tasbasi 2020) POD enzimleri başarılı bir şekilde tek kademede saflaştırılmıştır. Önceki çalışmalarda elde edilen verim ve saflaştırma katsayıları dikkate alındığında, 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid ve 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid molekülleri en etkili moleküller olduğu görülmüştür ve bu çalışmada da börülce POD’nin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Ayrıca bu tez kapsamında 5-amino-izoftalohidrazid sentezlenmiş ve çift hidrazin gruplu alternatif bir ligand olarak incelenmiştir.



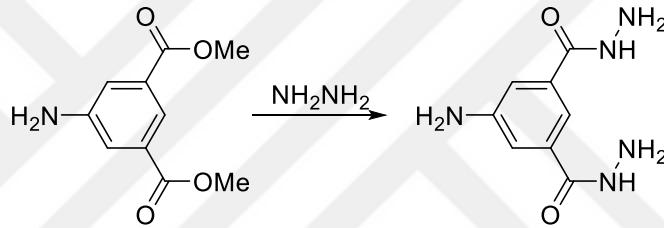
Şekil 3.2. Ligand olarak kullanılacak moleküllerin açık yapısı

3.3.3. Aminobenzohidrazid türevlerinin sentezi

4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid (**a**) 4-amino 3-bromo 5-florobenzohidrazid (**b**) ve 4-amino 3-bromo 5-klorobenzohidrazid (**c**) moleküllerinin

sentezinde, metil benzoat formları çıkış bileşikleri olarak kullanılmış ve benzohidrazid formları başarıyla sentezlenmiştir. Sentez prosedürü ve karakterizasyonları önceki çalışmalarımızda ayrıntılı olarak verilmiştir (Oztekin and Tasbasi 2020; Oztekin *et al.* 2021).

5-amino-izoftalohidrazid molekülünün sentezi için 1 gr 5-aminoisophthalate (5,6 mM) ve %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi (3 mL) 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon tamamlanincaya kadar refluks edildi. Çözücü uzaklaştırıldı ve katı pellet etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı. Oluşan beyaz kristaller süzgeç kâğıdı yardımıyla ayrıldı ve soğuk etanolle yıkandı. Molekül karakterizasyonu H^1 -NMR ve HRMS ile doğrulandı.



Şekil 3.3. 5-aminoizoftalohidrazid sentez şeması

3.3.4. Afinite jellerinin hazırlanması

2 gr CNBr-Sefaroz-4B tartıldı ve yaklaşık 200 mL saf soğuk su ile yıkandı. Daha sonra $NaHCO_3$ tamponu içerisinde aktarıldı. Aynı tamponun 100 mL'sinde 60 mg L-tirozin çözüldü ve çözelti CNBr-Sefaroz-4B ile aynı behere aktarılarak reaksiyon başlatıldı. Ardından, 2 saat süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı ve 16 saat boyunca $4\text{ }^{\circ}C$ 'de bekletildi. Bu süre sonunda hazırlanan matriks bol su ile yıkandı, böylece reaksiyona girmeyen L-tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu.

Çalışmamızda ligand olarak kullandığımız amino benzohidrazid türevi 4 molekül (4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid, 4-amino 3-bromo 5-florobenzohidrazid, 4-amino 3-bromo 5-klorobenzohidrazid ve 5-amino izoftalohidrazid)'den 40'ar μ mol alınarak $0\text{ }^{\circ}C$ 'de, yaklaşık 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 50 mg $NaNO_2$ bulunan 5 mL soğuk çözeltisi, ligand çözeltisine

eklendi. 10 dakikalık reaksiyon sonunda diazolanmış ligandlar, önceden L-tirozin bağlanmış Sefaroz-4B matriks süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 10,5'e çıkarılarak ve sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve takiben dengeleme tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan ilave edilerek 1*10 cm'lik kolonlara paketlenildi (Öztekin 2016).

3.3.5. Homojenatların kolonlara tatbiki ve elüsyonu

İlk olarak önceden hazırlanmış börülce homojenatları 24 saat boyunca dengelenmiş olan afinite kolonlarına tatbik edildi. Homojenat tatbiki yapılmış olan kolonlar yıkama çözeltisi ile 2 saat boyunca yıkanmasıyla safsızlıklar uzaklaştırıldı. Ardından kolonlara bağlı enzimler 1 M NaCl/25 mM KH₂PO₄ (pH 6,8) tamponu ile her örnek 2 mL olacak şekilde elüe edildi. Elüsyonu yapılan her bir örnekte aktivite tayini yapıldı ve protein miktarları belirlendi. Daha sonra elüatlar ayrı ayrı diyaliz edildi. Düşük aktiviteli elüatlar kinetik ölçümlerde kullanılırken yüksek aktiviteye sahip olan elüatlar SDS-PAGE' te safsızlık ve molekül ağırlığı tayini için kullanıldı.

3.3.6. SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini ve enzim saflığının belirlenmesi

Ayırma jeli hazırlanışı: 10 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 8,8 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,4 mL %10 SDS, 0,26 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 6,26 mL saf su beherde karıştırıldı. Karışımın üzerine son olarak 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) çözeltisi ilave edilerek polimerizasyon başlatıldı.

Yığılma jeli hazırlanışı: 0,82 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,06 mL %10'luk SDS, 0,06 mL %5'lik TEMED ve 4,9 mL saf su içeren karışım hazırlandı. Daha sonra, polimerizasyonu başlatmak için, %10'luk PER'den 0,15 mL karışımın üzerine ilave edildi.

Ayırma jeli cam plakalar arasına üst kısımda 0,5-0,6 cm' lik boşluk bırakacak şekilde, pastör pipeti yardımıyla dikkatlice döküldü. Dökme işlemi esnasında köpük oluşmamasına özen gösterildi. Aynı zamanda, köpük oluşumunu engellemek için,

ayırma jelini döktükten hemen sonra 2 mL izopropil alkol ilave edildi. Jelin polimerleşmesinden sonra alkol ortamdan uzaklaştırıldı. Yığma jeli içinde aynı prosedür tekrarlandı ve jel eklenir eklenmez taraklar uygun bir şekilde jele yerleştirildi, sonra jelin donması beklendi. Ardından, tarak dikkatlice çıkarıldı ve cam plakalar elektroforez cihazına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üst kısmı önce saf su ile daha sonrada yürütme tamponu ile yıkandı. Numuneler ve standart proteinler kuyucuklara yüklendi. Elektroforez tankının alt-üst kısmına yeterli miktarda yürütme tamponu eklendi ve 80 V gerilimde 30 dakika ve 130 V gerilimde 1,5 saat boyunca yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeller dikkatlice plakalardan ayrıldı ve jeller gümüş boyama yöntemi kullanılarak boyandı.

3.3.7. İnhibitör çalışmaları

3.3.7.1. Amino benzohidrazid türevlerinin börülce POD enzimi üzerine inhibisyon etkinliklerinin incelenmesi

Çalışmamızda ligand olarak kullandığımız 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid (**a**), 4-amino 3-bromo 5-florobenzohidrazid (**b**), 4-amino 3-bromo 5-klorobenzohidrazid (**c**) ve 5-aminoizoftalohidrazid'in (**d**) börülce POD üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için, her bir molekülün en az 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı ve elde edilen ortalama değerlerle % Aktivite / Konsantrasyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak IC_{50} değerleri belirlendi. K_i değerlerinin belirlenmesinde ise 3 farklı inhibitör ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite verileriyle Linewaver-Burk grafikleri çizildi ve bu grafiklerden K_i değerleri ve standart sapmalar hesaplandı.

3.3.7.2. Saflaştırılan börülce POD enziminin karakterizasyon çalışmaları

Afinite kolonlarından saflaştırılan börülce POD enziminin optimum katalitik şartlarını belirlenmesi için guaiakol substratı varlığında farklı pH, iyonik şiddet ve sıcaklıkta aktivite ölçümleri yapıldı. Enzimin farklı substratlara olan ilgisinin analizi için ise guaiakol, H_2O_2 , 4-metil katekol ve ABTS substratları ile çalışıldı. Her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.3.7.3. Börölce POD enzimi için optimum pH'nın belirlenmesi çalışması

Börölce POD enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH 4,0-5,5 aralığında 0,1 M sodyum asetat, pH 6,0-7,5 aralığında 0,1 M potasyum fosfat ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M Tris tamponları kullanıldı.

Optimum pH'nın belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen bu çalışmada substrat olarak guaiakol kullanıldı ve aktivite ölçümleri oda sıcaklığında yapıldı.

3.3.7.4. Börölce POD enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesi çalışması

Börölce POD enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 M'lık KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Guaiakol substratı kullanılarak, oda sıcaklığında, her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.3.7.5. Börölce POD enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi çalışması

Börölce POD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için su banyosu kullanıldı. İlk olarak enzimin aktivite ölçümü için hazırladığımız guaiakol / H_2O_2 substratları ve KH_2PO_4 tampon su banyosuna yerleştirildi ve ısıl dengenin tamamlanması beklendi. Ve yine aktivite ölçümleri guaiakol substratı varlığında, optimum iyonik şiddet ve pH'da, 5 ila 70 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

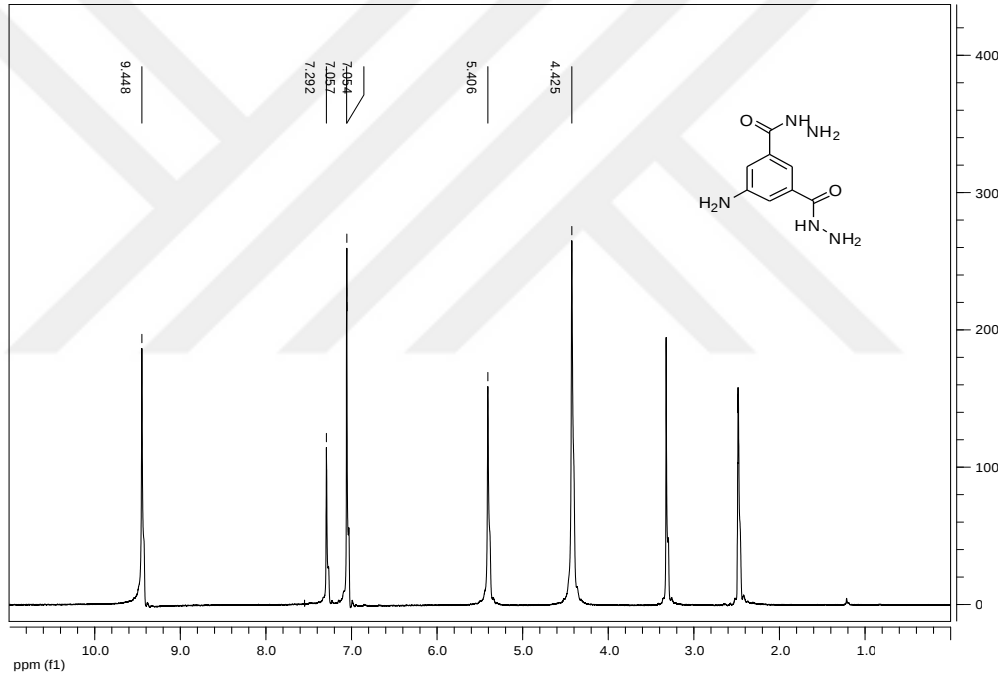
3.3.7.6. Börölce POD enzimi için substrat spesifikliğin belirlenmesi çalışmaları

Guaiakol, H_2O_2 , 4-metilkatekol ve ABTS substratları için K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, bu substratların farklı konsantrasyonlarında, börölce POD enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra elde edilen aktivite verileri kullanılarak $1/[S]$ ' ye karşı $1/V$ grafikleri çizildi. Grafiklerden elde edilen doğru denklemleri kullanılarak K_M ve $V_{\max}$ değerleri her bir substrat için ayrı ayrı hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

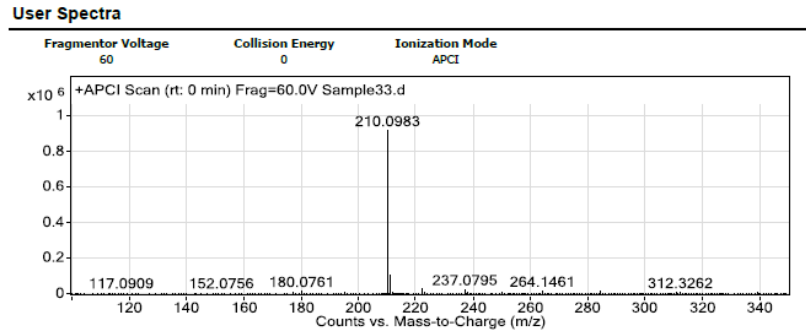
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Ligand Moleküllerinin Sentezlenmesi

Bu tez kapsamında ligand olarak kullanılan 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (a), 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (b) ve 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (c) moleküllerinin sentezi ve karakterizasyonu önceki çalışmalarımızda ayrıntılı olarak verilmiştir (Oztekin and Tasbasi 2020; Oztekin *et al.* 2021). 5-aminoizoftalohidrazid (d) molekülü ise metil esteri çıkış molekülü olarak kullanılarak bölüm 3.3.3’de anlatıldığı gibi sentezlendi ve ^1H -NMR ve QTOF-LC/MS ile karakterizasyonu yapıldı.



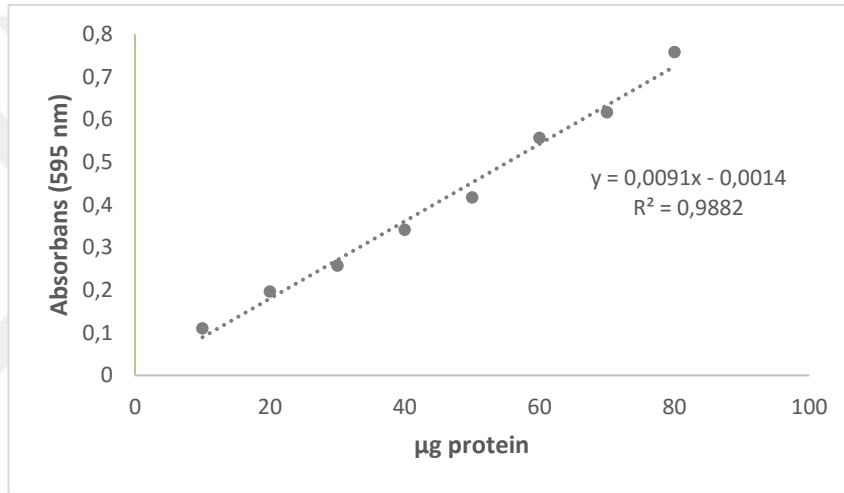
Şekil 4.1. 5-aminoizoftalohidrazid molekülü için 400 MHz ^1H -NMR sonuçları



Şekil 4.2. 5-aminoizoftalohidrazid molekülü için HRMS sonuçları

4.2. Kalitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik Hazırlanması

Ligand olarak amino benzohidrazid türevlerinin (4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (a), 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (b), 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (c) ve 5-aminoizoftalohidrazid (d)) kullanıldığı afinite jellerinden elde edilen elüatların ve hazırlanan homojenatlardaki protein miktarları, Bradford metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu metotta ilk olarak standart grafik hazırlandı. Kolonlardan elde edilen enzim çözeltilerinde, homojenatta ve SDS-PAGE'ye yüklenen protein miktarları bu yöntem kullanılarak, Şekil 4.3'teki standart grafikten faydalanılarak hesaplandı.



Şekil 4.3. Kalitatif protein tayini için sıgır serum albümin standart olarak kullanılarak oluşturulmuş grafik

4.3. Börülce POD Enziminin Amino Benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

Börülce POD enzimi saflaştırılması için Sefaroz 4-B-L-Tirozin-(4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (a), 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (b), 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (c) ve 5-aminoizoftalohidrazid (d)) kolonlarının sentezi bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi yapıldı.

Hazırlanan kolonlardan börülce POD enziminin saflaştırılmasında 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kalitatif protein tayini yapıldı. Saflaştırma kademelerinde her bir kolon için verim ve saflaştırma katsayıları ayrı ayrı hesaplandı.

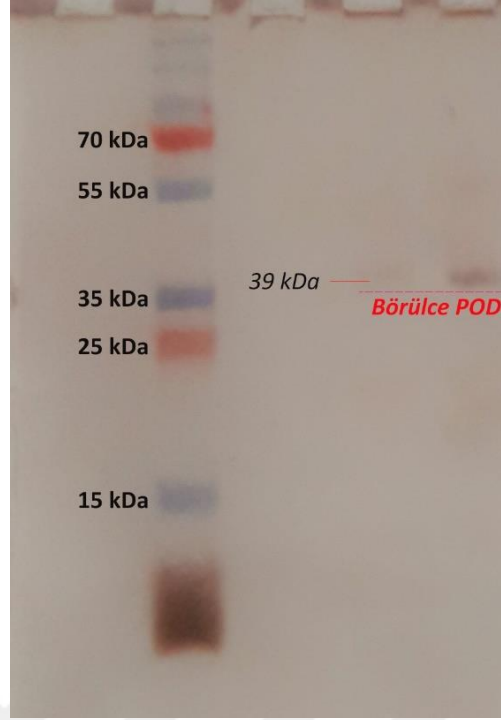
Tüm kolonlardan saflaştırılan POD enziminin saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Afinite kolonlarından elde edilen b r lce POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımları	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	S. Katsayısı
Homojenat	6	12,2	1,37	8,9	100	1
Sefaroz-4B-L-tirozin-(a)	4	9,8	0,012	816,6	53,6	91,6
Sefaroz-4B-L-tirozin-(b)	4	4,6	0,011	418,2	25,1	47
Sefaroz-4B-L-tirozin-(c)	4	6,7	0,008	837,5	36,6	94,1
Sefaroz-4B-L-tirozin-(d)	4	3,6	0,009	400	19,7	44,9

4.4. SDS-PAGE Jel Elektrofrez Sonuçları

4 farklı afinite jeli ile saflaştırılan b r lce POD enziminin saflık kontrolü ve göreceli molekül a ırlı ını tespit etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı ve 39 kDa’da tek bant gözlendi. Molekül a ırlı ını belirlemede, standart proteinler ve enzimler aynı anda kesikli SDS-PAGE elektrofrez de yürütüldü. Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı çekildi. SDS-PAGE elektrofrez görüntüsü  ekil 4.4’te gösterildi.



Şekil 4.4. Saflaştırılan Börölce POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

4.5. Aminobenzohidrazid türevlerinin IC_{50} ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

Saflaştırmada ligand olarak kullandığımız 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (**a**), 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (**b**), 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (**c**) ve 5-aminoizoftalohidrazid (**d**) moleküllerinin börölce POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri, saflaştırma performanslarıyla (saflaştırma katsayısı ve verimi) olan ilişkisinin belirlenmesi ve potansiyel yeni ligandların dizayn edilebilmesi için ayrıntılı olarak incelendi. Sabit substrat (guaiakol 45 mM) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda, herbir inhibitör için % aktivite değerleri hesaplandı. Ayrıca 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak K_i değerleri belirlendi.

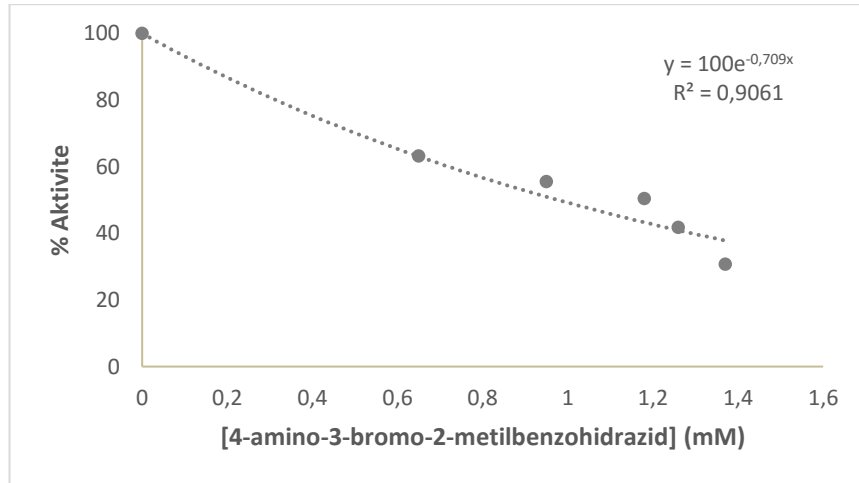
Börölce POD enzimi için IC_{50} ve K_i deney prosedürleri, 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (**a**) için Çizelge 4.2 ve 4.3'te, 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (**b**) için Çizelge 4.5 ve 4.6'da, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (**c**) için Çizelge 4.8 ve 4.9'de, 5-aminoizoftalohidrazid molekülü (**d**) için Çizelge 4.11 ve 4.12'da gösterildi.

Börölce POD enzimi için IC_{50} ve K_i grafikleri, 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (a) için Şekil 4.5 ve 4.6'da, 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (b) için Şekil 4.7 ve 4.8'de, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (c) için Şekil 4.9 ve 4.10'da, 5-aminoizoftalohidrazid (d) için Şekil 4.11 ve 4.12'de gösterildi.

4.5.1. Saflaştırılan börölce POD enzimi üzerine (a) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi

Çizelge 4.2. (a) molekülü için IC_{50} deney prosedürü

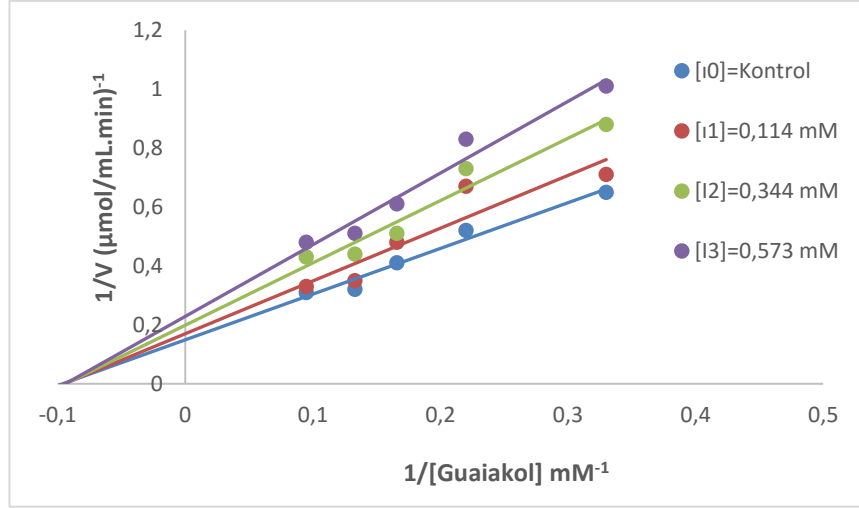
Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)							
Guaiaakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiaakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	[I] mM	%Aktivite
0,5	1,0	1,0	0,17	0,33	0,5	1,0	1,0	0,17	0,32	0,01	6,52	63,2
0,5	1,0	1,0	0,25	0,25	0,5	1,0	1,0	0,25	0,24	0,01	9,58	55,5
0,5	1,0	1,0	0,31	0,19	0,5	1,0	1,0	0,31	0,18	0,01	11,88	50,4
0,5	1,0	1,0	0,33	0,17	0,5	1,0	1,0	0,33	0,16	0,01	12,65	41,8
0,5	1,0	1,0	0,36	0,14	0,5	1,0	1,0	0,36	0,13	0,01	13,8	30,7



Şekil 4.5. Börölce POD enzimi için 5 farklı (a) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği

Çizelge 4.3. Börölce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (a) molekülü için K_i deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
İnhibitör numarası													
	Guaiaakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiaakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	1/V ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,795	0,005	0,59	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,695	0,005	0,52	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,595	0,005	0,41	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,495	0,005	0,32	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,395	0,005	0,31	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,02	0,78	0,2	1,0	1,0	0,02	0,775	0,005	0,71	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,02	0,68	0,3	1,0	1,0	0,02	0,675	0,005	0,67	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,02	0,58	0,4	1,0	1,0	0,02	0,575	0,005	0,48	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,02	0,48	0,5	1,0	1,0	0,02	0,475	0,005	0,35	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,02	0,38	0,6	1,0	1,0	0,02	0,375	0,005	0,33	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,735	0,005	0,83	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,635	0,005	0,73	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,535	0,005	0,51	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,435	0,005	0,44	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,335	0,005	0,43	0,095
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,1	0,70	0,2	1,0	1,0	0,1	0,695	0,005	1	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,1	0,60	0,3	1,0	1,0	0,1	0,595	0,005	0,83	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,1	0,50	0,4	1,0	1,0	0,1	0,495	0,005	0,61	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,1	0,40	0,5	1,0	1,0	0,1	0,395	0,005	0,51	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,1	0,30	0,6	1,0	1,0	0,1	0,295	0,005	0,48	0,095



Şekil 4.6. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (a) molekülü ile elde edilen 1/V, 1[S] grafiği

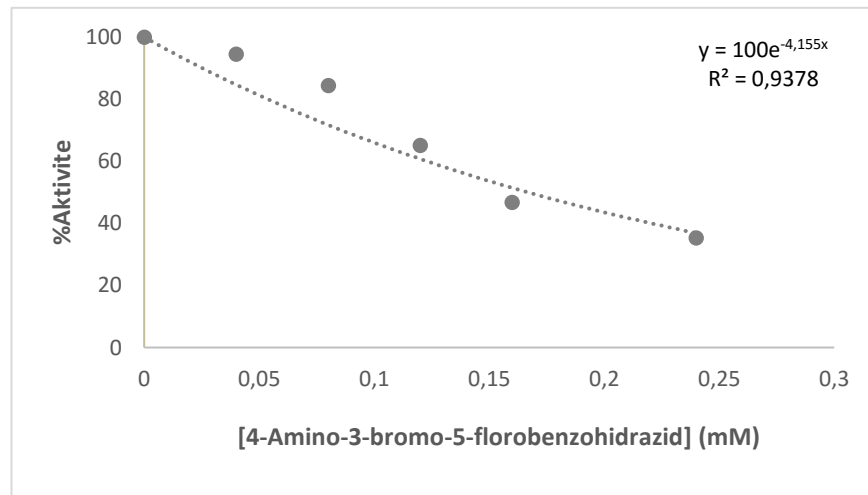
Çizelge 4.4. Börülce POD enzimi üzerine (a) molekülünün inhibisyon etkisi

IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i ± SD (μM)	İnhibisyon tipi
970	970±130	Yarışmasız

4.5.2. Saflaştırılan börülce POD enzimi üzerine (b) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi

Çizelge 4.5. (b) molekülü için IC₅₀ deney prosedürü

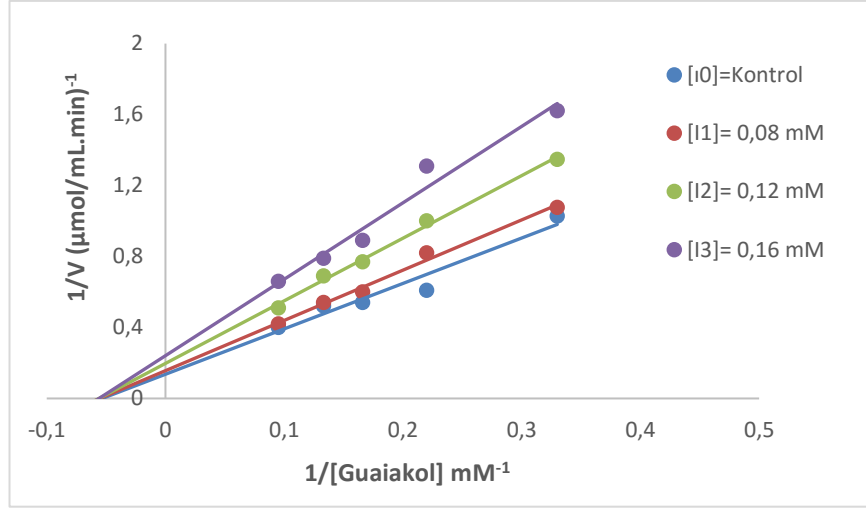
Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)							
Guaiaakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiaakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	[I] mM	%Aktivite
0,5	1,0	1,0	0,02	0,48	0,5	1,0	1,0	0,02	0,46	0,02	0,08	84,4
0,5	1,0	1,0	0,04	0,46	0,5	1,0	1,0	0,04	0,44	0,02	0,12	65,1
0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,42	0,02	0,16	46,8
0,5	1,0	1,0	0,08	0,42	0,5	1,0	1,0	0,08	0,40	0,02	0,2	43,1
0,5	1,0	1,0	0,12	0,38	0,5	1,0	1,0	0,12	0,36	0,02	0,24	35,3



Şekil 4.7. Börülce POD enzimi için 5 farklı (b) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği

Çizelge 4.6. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **(b)** molekülü için K_i deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
İnhibitör numarası	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	1/V ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
II ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,78	0,02	1,028	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,68	0,02	0,61	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,58	0,02	0,54	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,48	0,02	0,52	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,38	0,02	0,4	0,095
II ₁	0,2	1,0	1,0	0,04	0,76	0,2	1,0	1,0	0,04	0,74	0,02	1,077	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,04	0,66	0,3	1,0	1,0	0,04	0,64	0,02	0,82	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,04	0,56	0,4	1,0	1,0	0,04	0,54	0,02	0,6	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,04	0,46	0,5	1,0	1,0	0,04	0,44	0,02	0,54	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,04	0,36	0,6	1,0	1,0	0,04	0,34	0,02	0,42	0,095
II ₂	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,72	0,02	1,348	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,62	0,02	1,0	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,52	0,02	0,77	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,42	0,02	0,69	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,32	0,02	0,51	0,095
II ₃	0,2	1,0	1,0	0,08	0,72	0,2	1,0	1,0	0,08	0,70	0,02	1622	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,08	0,62	0,3	1,0	1,0	0,08	0,60	0,02	1,31	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,08	0,52	0,4	1,0	1,0	0,08	0,50	0,02	0,89	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,42	0,5	1,0	1,0	0,08	0,40	0,02	0,79	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,08	0,32	0,6	1,0	1,0	0,08	0,30	0,02	0,66	0,095



Şekil 4.8. Börölce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **(b)** molekülü ile elde edilen $1/V$, $1/[S]$ grafiği

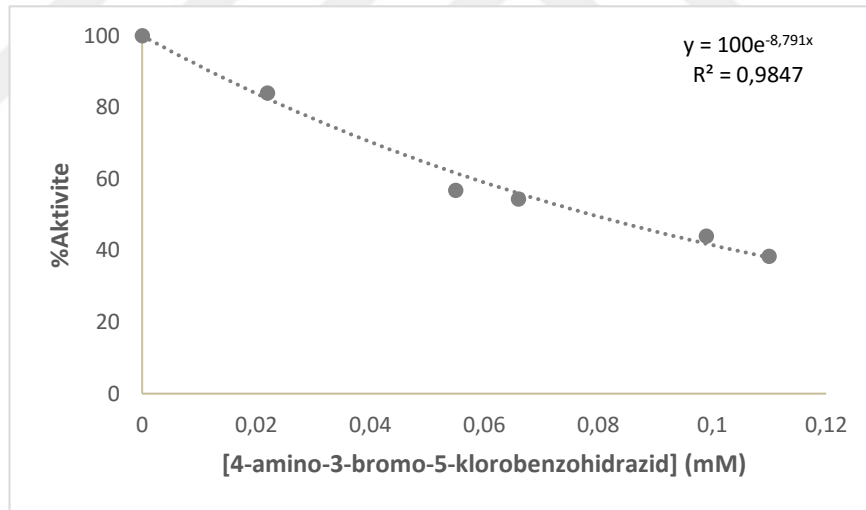
Çizelge 4.7. Börölce POD enzimi üzerine **(b)** molekülünün inhibisyon etkisi

IC_{50} (μM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (μM)	İnhibisyon tipi
166	338 ± 176	Yarışmasız

4.5.3. Saflaştırılan b r lce POD enzimi üzerine (c) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi

Çizelge 4.8. (c) molekülü için IC₅₀ deney prosedürü

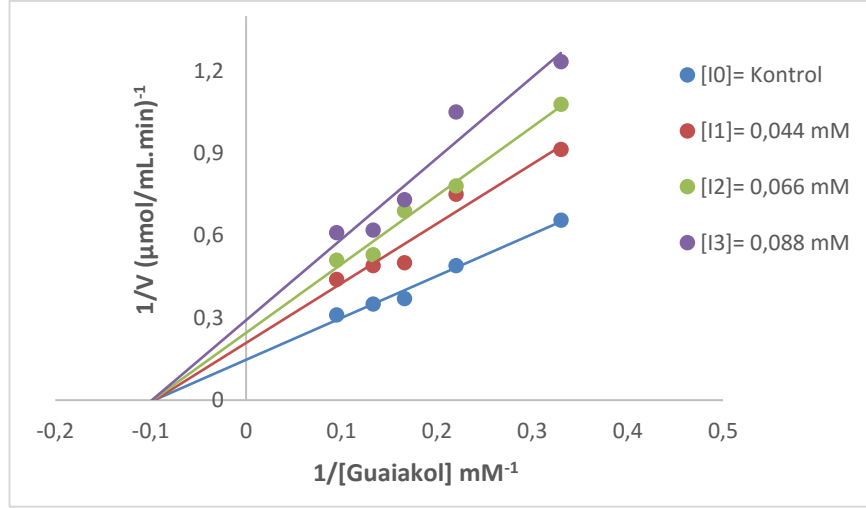
K�r Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)							
Guaia�ol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	�nhibit�r	Su	Guaia�ol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	�nhibit�r	Su	POD	[I] mM	%Aktivite
0,5	1,0	1,0	0,02	0,480	0,5	1,0	1,0	0,02	0,470	0,01	0,022	84
0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,440	0,01	0,055	56,8
0,5	1,0	1,0	0,06	0,440	0,5	1,0	1,0	0,06	0,430	0,01	0,066	54,4
0,5	1,0	1,0	0,09	0,410	0,5	1,0	1,0	0,09	0,400	0,01	0,099	44
0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,390	0,01	0,11	38,4



Şekil 4.9. B r lce POD enzimi için 5 farklı (c) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği

Çizelge 4.9. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (c) molekülü için K_i deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
İnhibitör numarası													
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	1/V ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
II ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,79	0,01	0,656	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,69	0,01	0,49	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,59	0,01	0,37	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,49	0,01	0,35	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,39	0,01	0,31	0,095
II ₁	0,2	1,0	1,0	0,04	0,76	0,2	1,0	1,0	0,04	0,75	0,01	0,914	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,04	0,66	0,3	1,0	1,0	0,04	0,65	0,01	0,75	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,04	0,56	0,4	1,0	1,0	0,04	0,55	0,01	0,5	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,04	0,46	0,5	1,0	1,0	0,04	0,45	0,01	0,49	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,04	0,36	0,6	1,0	1,0	0,04	0,35	0,01	0,44	0,095
II ₂	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,73	0,01	1,078	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,63	0,01	0,78	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,53	0,01	0,69	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,43	0,01	0,53	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,33	0,01	0,51	0,095
II ₃	0,2	1,0	1,0	0,08	0,72	0,2	1,0	1,0	0,08	0,71	0,01	1,233	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,08	0,62	0,3	1,0	1,0	0,08	0,61	0,01	1,05	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,08	0,52	0,4	1,0	1,0	0,08	0,51	0,01	0,73	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,42	0,5	1,0	1,0	0,08	0,41	0,01	0,62	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,08	0,32	0,6	1,0	1,0	0,08	0,31	0,01	0,61	0,095



Şekil 4.10. Börölce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (c) molekülü ile elde edilen $1/V$, $1/[S]$ grafiği

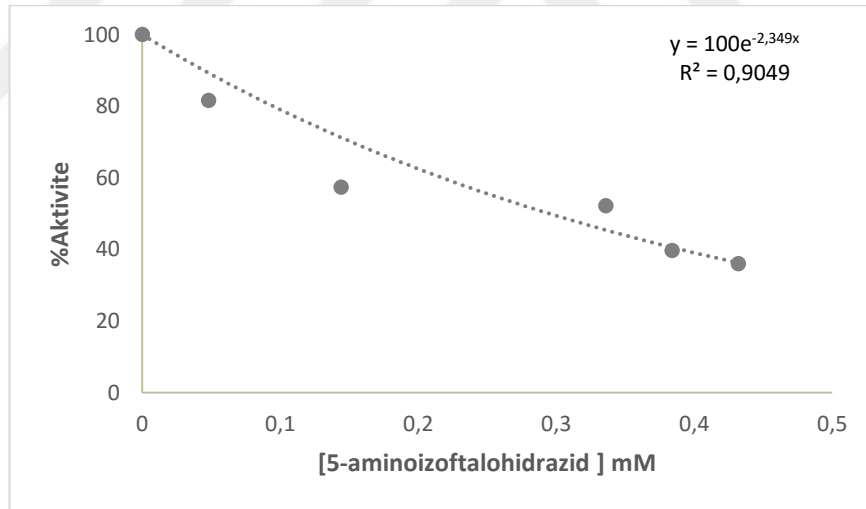
Çizelge 4.10. Börölce POD enzimi üzerine (c) molekülünün inhibisyon etkisi

IC_{50} (μM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (μM)	İnhibisyon tipi
78	$97 \pm 7,8$	Yarışmasız

4.5.4. Saflaştırılan börülce POD enzimi üzerine (d) molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi

Çizelge 4.11. (d) molekülü için IC₅₀ deney prosedürü

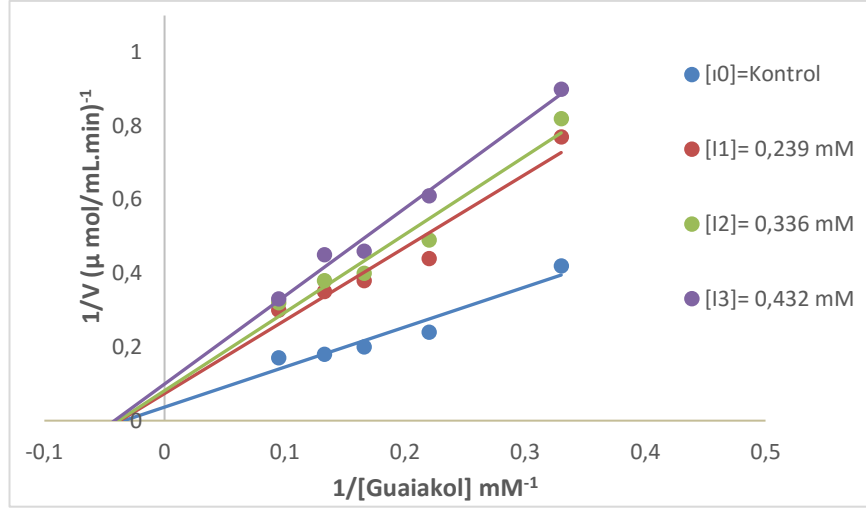
Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)							
Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	[I] mM	%Aktivite
0,5	1,0	1,0	0,01	0,490	0,5	1,0	1,0	0,01	0,48	0,01	0,048	81,61
0,5	1,0	1,0	0,03	0,470	0,5	1,0	1,0	0,03	0,46	0,01	0,144	57,35
0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,42	0,01	0,336	52,2
0,5	1,0	1,0	0,08	0,420	0,5	1,0	1,0	0,08	0,41	0,01	0,384	39,7
0,5	1,0	1,0	0,09	0,410	0,5	1,0	1,0	0,09	0,40	0,01	0,432	36,03



Şekil 4.11. Börülce POD enzimi için 5 farklı (d) molekülü konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite grafiği

Çizelge 4.12. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (d) molekülü için K_i deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
İnhibitör numarası													
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	$1/V$ ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) ⁻¹	$1/S$ mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,79	0,01	0,42	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,69	0,01	0,24	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,59	0,01	0,2	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,49	0,01	0,18	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,39	0,01	0,17	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,05	0,75	0,2	1,0	1,0	0,05	0,74	0,01	0,77	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,65	0,3	1,0	1,0	0,05	0,64	0,01	0,44	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,55	0,4	1,0	1,0	0,05	0,54	0,01	0,38	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,45	0,5	1,0	1,0	0,05	0,44	0,01	0,35	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,35	0,6	1,0	1,0	0,05	0,34	0,01	0,3	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,07	0,72	0,01	0,82	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,07	0,62	0,01	0,49	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,07	0,52	0,01	0,4	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,07	0,42	0,01	0,38	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,07	0,32	0,01	0,32	0,095
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,08	0,72	0,2	1,0	1,0	0,09	0,70	0,01	0,9	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,08	0,62	0,3	1,0	1,0	0,09	0,60	0,01	0,61	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,08	0,52	0,4	1,0	1,0	0,09	0,50	0,01	0,46	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,42	0,5	1,0	1,0	0,09	0,40	0,01	0,45	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,08	0,32	0,6	1,0	1,0	0,09	0,30	0,01	0,33	0,095



Şekil 4.12. Börülce POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak (d) molekülü ile elde edilen $1/V$, $1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.13. Börülce enzimi üzerine (d) molekülünün inhibisyon etkisi

IC_{50} (μM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (μM)	İnhibisyon tipi
295	249 ± 24	Yarışmasız

4.6. Börülce POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

4.6.1. Börülce POD enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börülce POD enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için; pH 4,0-5,5 aralığında 0,1 M sodyum asetat, pH 6,0-7,5 aralığında 0,1 M potasyum fosfat ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanıldı. Börülce POD enzimi için yapılan tüm ölçümler değerlendirildiğinde, optimum pH 6,0 olarak belirlendi. Elde edilen veriler sodyum asetat tamponu (pH 4,0-4,5) için Çizelge 4.14'de, potasyum fosfat tamponu (pH 6,0-7,5) için Çizelge 4.15'de, Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) için Çizelge 4.16'te ve pH aktivite grafiği ise Şekil 4.13'te gösterildi.

Çizelge 4.14. Börölce POD enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M sodyum asetat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

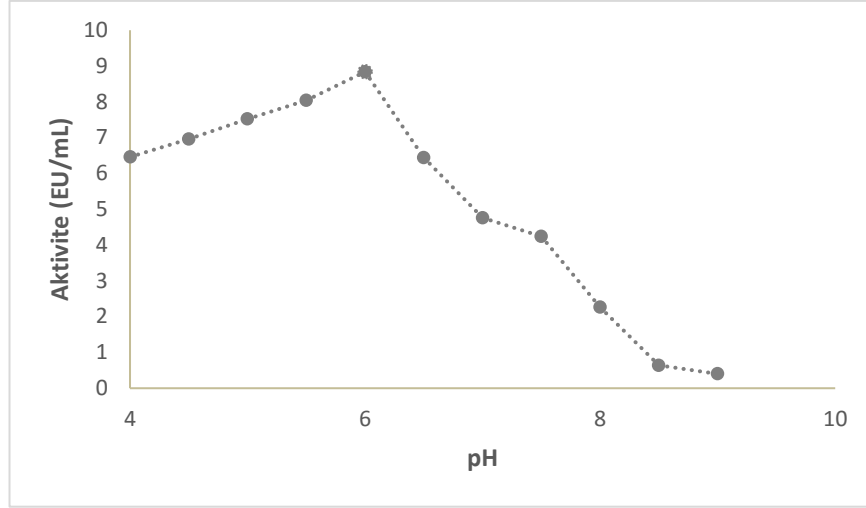
Sodyum Asetat	
pH	Aktivite (EU/mL)
4,0	6,46
4,5	6,96
5,0	7,52
5,5	8,04

Çizelge 4.15. Börölce POD Enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M potasyum fosfat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EU/mL)
6,0	8,84
6,5	6,44
7,0	4,76
7,5	4,24

Çizelge 4.16. Börölce POD Enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-HCl	
pH	Aktivite (EU/mL)
8,0	2,26
8,5	0,64
9,0	0,4



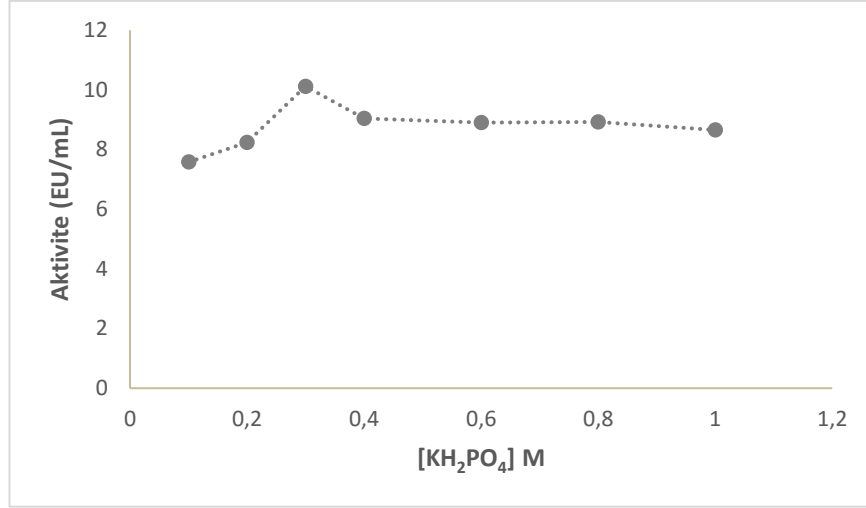
Şekil 4.13. Börülce POD enziminin pH 4-9 aralığında Aktivite (EU/mL)- pH grafiği

4.6.2. Börülce POD enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börülce bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi için 0,1 ile 1 M arası KH_2PO_4 derişimlerinde aktivite ölçümleri yapıldı ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.17 ve şekil 4.14'te gösterildi. Enzimin optimum iyonik şiddetinin 0,3 M olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.17. Börülce'den saflaştırılan POD enziminin, farklı derişimlerde KH_2PO_4 kullanılarak optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi ölçüm sonuçları

İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EU/mL)
0,1	7,58
0,2	8,24
0,3	10,12
0,4	9,04
0,6	8,9
0,8	8,92
1	8,66



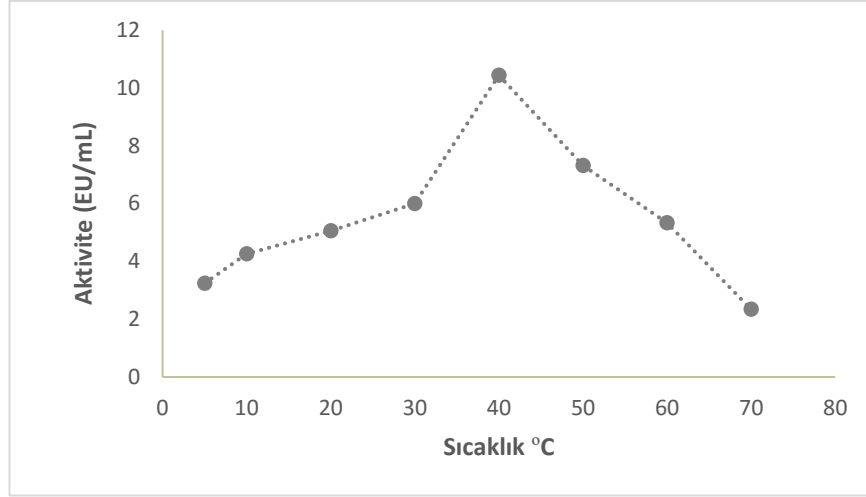
Şekil 4.14. Börülce POD enziminin, potasyum fosfatın farklı konsantrasyonlarında Aktivite (EU/mL)-Konsantrasyon grafiği

4.6.3. Börülce POD enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börülce POD enziminin optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla 5 ile 70 °C aralığında değişen sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapıldı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18 ve Şekil 4.15'te gösterildi. Çalışmada elde edilen veriler sonucunda börülce POD enzimi için optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlendi.

Çizelge 4.18. Börülce POD enziminin değişik sıcaklıklarda aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
5	3,24
10	4,26
20	5,06
30	6,0
40	10,44
50	7,32
60	5,34
70	2,34



Şekil 4.15. Börölce POD enzimi için Aktivite (EU/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği

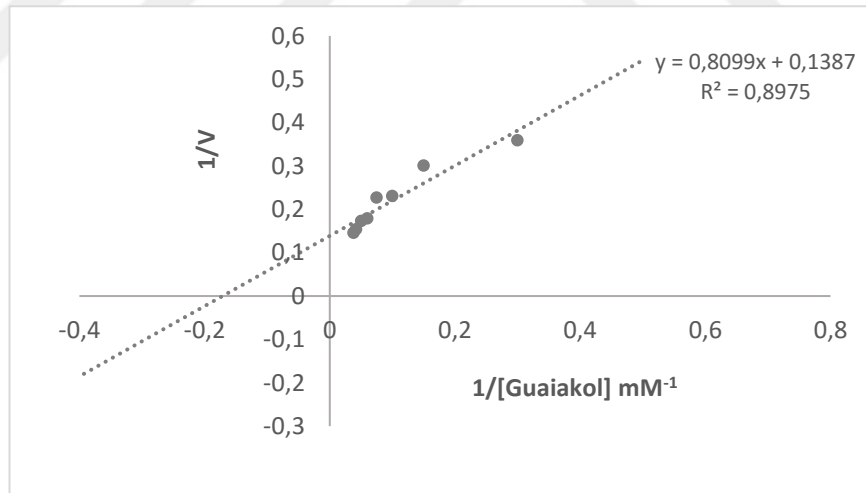
4.7. Börölce POD Enziminin Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışma Sonuçları

4.7.1. Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börölceden saflaştırılan POD enziminin guaiakol substratına ilgisini belirlemek için 10 farklı guaiakol (Çizelge 4.19) konsantrasyonunda POD enzim aktiviteleri ölçüldü. K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla $1/[Guaiakol]-1/V$ grafiği çizildi (Şekil 4.16). Elde edilen Lineweaver-Burk Grafiğinden yararlanılarak guaiakol substratı için K_M değeri 7,21 mM ve V_{max} değeri 5,83 EU/mL olarak hesaplandı.

Çizelge 4.19. Börülce POD enziminin guaiakole olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)			Numune Tüpü (mL)				
Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,99	1,0	0,90	0,01
1,0	1,0	1,0	0,2	0,99	1,0	0,80	0,01
1,0	1,0	1,0	0,3	0,99	1,0	0,70	0,01
1,0	1,0	1,0	0,4	0,99	1,0	0,60	0,01
1,0	1,0	1,0	0,5	0,99	1,0	0,50	0,01
1,0	1,0	1,0	0,6	0,99	1,0	0,40	0,01
1,0	1,0	1,0	0,7	0,99	1,0	0,30	0,01
1,0	1,0	1,0	0,8	0,99	1,0	0,20	0,01
1,0	1,0	1,0	0,9	0,99	1,0	0,10	0,01
1,0	1,0	1,0	1,0	0,99	1,0	-	0,01



Şekil 4.16. Börülce POD enziminin farklı guaiakol konsantrasyonlarındaki hızını gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği

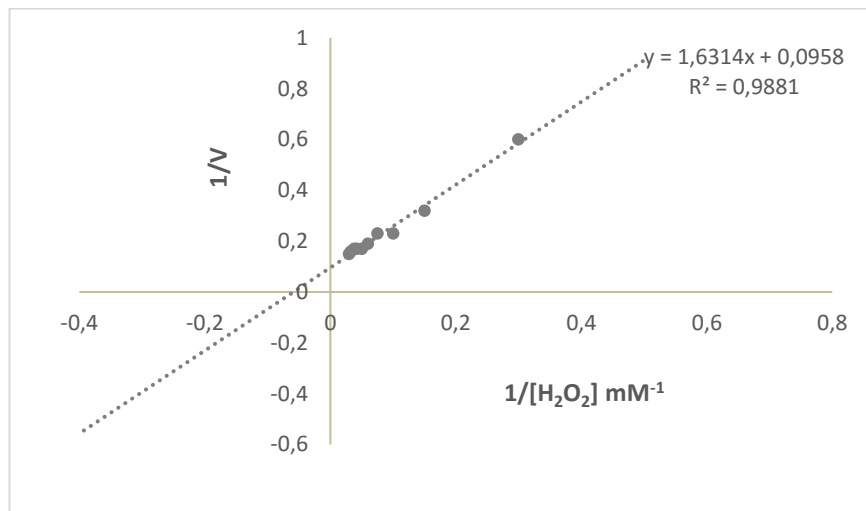
4.7.2. H₂O₂ substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börülceden saflaştırılan POD enziminin H₂O₂ substratına ilgisini belirlemek için 10 farklı H₂O₂ (Çizelge 4.20) konsantrasyonunda POD enzim aktiviteleri ölçüldü.

K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla $1/[H_2O_2]$ - $1/V$ grafiği çizildi (Şekil 4.17). Elde edilen Lineweaver-Burk Grafiğinden yararlanılarak H_2O_2 substratı için K_M değeri 17,03 mM ve V_{max} değeri 10,04 EU/mL olarak hesaplandı.

Çizelge 4.20. Börülce POD enziminin H_2O_2 'ye olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)				Numune Tüpü (mL)			
Guaiaiol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	H_2O_2	Fosfat Tamponu	Guaiaiol	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,99	1,0	0,90	0,01
1,0	1,0	1,0	0,2	0,99	1,0	0,80	0,01
1,0	1,0	1,0	0,3	0,99	1,0	0,70	0,01
1,0	1,0	1,0	0,4	0,99	1,0	0,60	0,01
1,0	1,0	1,0	0,5	0,99	1,0	0,50	0,01
1,0	1,0	1,0	0,6	0,99	1,0	0,40	0,01
1,0	1,0	1,0	0,7	0,99	1,0	0,30	0,01
1,0	1,0	1,0	0,8	0,99	1,0	0,20	0,01
1,0	1,0	1,0	0,9	0,99	1,0	0,10	0,01
1,0	1,0	1,0	1,0	0,99	1,0	-	0,01



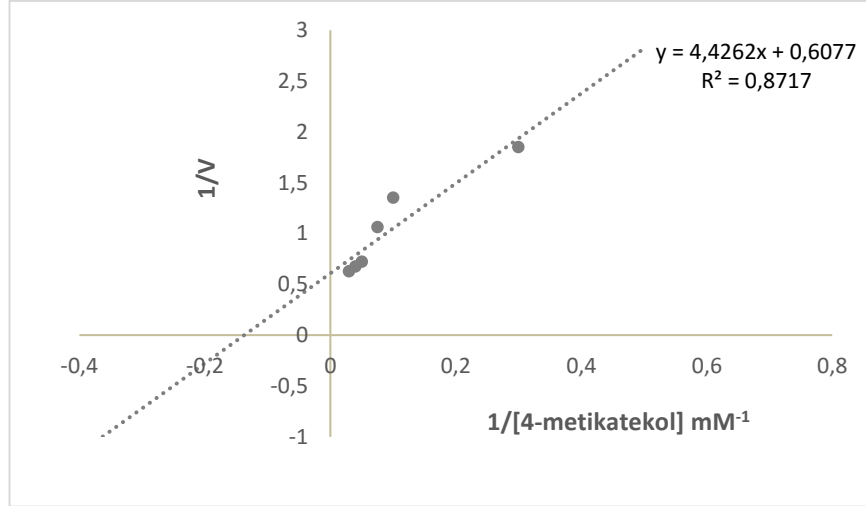
Şekil 4.17. Börülce POD enziminin farklı H_2O_2 konsantrasyonlarındaki hızını gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği

4.7.3. 4-metilkatekol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börülceden saflaştırılan POD enziminin 4-metilkatekol substratına ilgisini belirlemek için 10 farklı 4-metilkatekol (Çizelge 4.21) konsantrasyonunda POD enzim aktiviteleri ölçüldü. K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla $1/[4\text{-metilkatekol}] - 1/V$ grafiği çizildi (Şekil 4.18). Elde edilen Lineweaver-Burk Grafiğinden yararlanılarak 4-metilkatekol substratı için K_M değeri 7,28 mM ve V_{max} değeri 1,64 EU/mL olarak hesaplandı.

Çizelge 4.21. Börülce POD enziminin 4-metilkatekole olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)			Numune Tüpü (mL)				
4-metil katekol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	4-metil katekol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,98	1,0	0,90	0,02
1,0	1,0	1,0	0,2	0,98	1,0	0,80	0,02
1,0	1,0	1,0	0,3	0,98	1,0	0,70	0,02
1,0	1,0	1,0	0,4	0,98	1,0	0,60	0,02
1,0	1,0	1,0	0,5	0,98	1,0	0,50	0,02
1,0	1,0	1,0	0,6	0,98	1,0	0,40	0,02
1,0	1,0	1,0	0,7	0,98	1,0	0,30	0,02
1,0	1,0	1,0	0,8	0,98	1,0	0,20	0,02
1,0	1,0	1,0	0,9	0,98	1,0	0,10	0,02
1,0	1,0	1,0	1,0	0,98	1,0	-	0,02



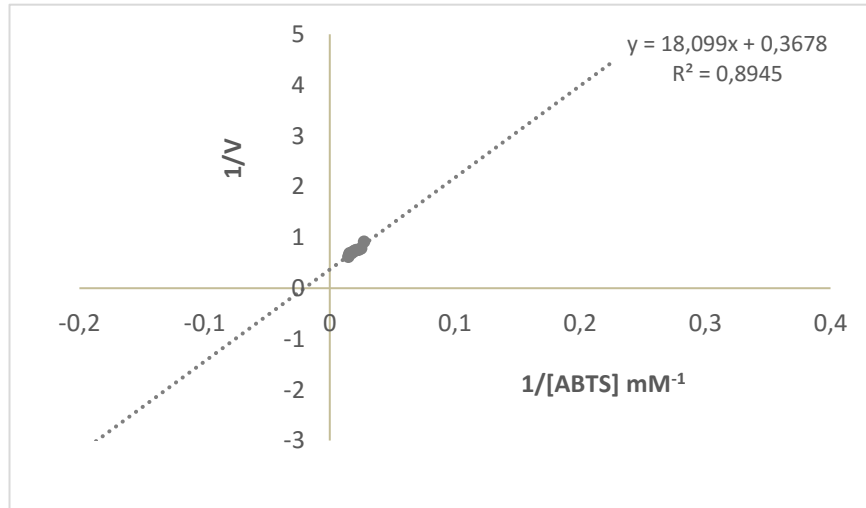
Şekil 4.18. Börölce POD enziminin farklı 4-metilkatekol konsantrasyonlarındaki hızını gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği

4.7.4. ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışma sonuçları

Börölceden saflaştırılan POD enziminin ABTS substratına ilgisini belirlemek için 10 farklı ABTS (Çizelge 4.22) konsantrasyonunda POD enzim aktiviteleri ölçüldü. K_M ve V_{max} değerlerinin belirlemesi amacıyla $1/[ABTS]-1/V$ grafiği çizildi (Şekil 4.19). Elde edilen Lineweaver-Burk Grafiğinden yararlanılarak ABTS substratı için K_M değeri 49,21 mM ve V_{max} değeri 2,72 EU/mL olarak hesaplandı.

Çizelge 4.22. Börölce POD enziminin ABTS'ye olan ilgisinin belirlenmesinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü (mL)				Numune Tüpü (mL)				
ABTS	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	ABTS	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
2,0	0,88	0,110	0,01	1,1	0,88	0,110	0,90	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,2	0,88	0,110	0,80	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,3	0,88	0,110	0,70	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,4	0,88	0,110	0,60	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,5	0,88	0,110	0,50	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,6	0,88	0,110	0,40	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,7	0,88	0,110	0,30	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,8	0,88	0,110	0,20	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	1,9	0,88	0,110	0,10	0,01
2,0	0,88	0,110	0,01	2,0	0,88	0,110	-	0,01



Şekil 4.19. Börölce POD enziminin farklı ABTS konsantrasyonlarındaki hızını gösteren $1/V$, $1/[S]$ grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

POD'lar bitkilerde, memelilerde, mantarlarda ve prokaryotlarda bulunan oksidoredüktaz sınıfına ait enzim grubudur. H_2O_2 veya organik hidroperoksitleri indirgeyerek hücresel bileşenlerin oksidasyonunu katalize ederler (Asada 1992). Çeşitli çalışmalar POD enzimlerinin bitkilerde yaralanma sonucu indüklendiğini göstermiştir (Desbiez and Boyer 1981; Espelie *et al.* 1986; Svelheim and Robertsen 1990; Kawaoka *et al.* 1994; Kato *et al.* 2000). POD'lar monoglinollerin veya aromatik monomerlerin polimerizasyonu sırasında lignin veya süberin oluşumunda rol oynarlar (Kolattukudy 1981; Whetten *et al.* 1998). Ayrıca, POD'ların NADH'dan H_2O_2 oluşumunda rol oynadıkları da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Meador *et al.* 1980; Meador and Amberg-Fisher 1982). Bunların yanı sıra POD enzimlerinin; bitkilerde hücre duvar proteinlerinin çapraz bağlanması (Fry 1986), oksin katabolizması (Lagrimini *et al.* 1997) ve tuz toleransı (Amaya *et al.* 1999) gibi çeşitli biyolojik görevlerde yer alırlar. Ayrıca eczacılıkta (Agostini *et al.* 1997), klinik biyokimyada ve immünoanalizlerde (Kwak *et al.* 1996) yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Literatürde bitkisel kaynaklarda bulunan POD enzimlerini saflaştırma çalışmalarında afinite kromatografisi, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi gibi çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bu saflaştırma çalışmalarına örnek olarak jel filtrasyon yöntemi kullanılarak lima fasulyesi (Wang *et al.* 2009), hidrofobik afinite kromatografi yöntemi kullanılarak domates (Jen *et al.* 1980), jel filtrasyon yöntemi kullanılarak marul (Güngör vd. 2005), hidrofobik afinite ve jel filtrasyon kromatografi yöntemi kullanılarak tatlı patates yumruları (Leon *et al.* 2002), jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografi yöntemi kullanılarak bürüksel lahanası (McLellan and Robinson 1987), iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografi yöntemi kullanılarak portakal (Clemente 1998) verilebilir. Ayrıca katyon değişim kromatografi yöntemi ile zeytinden (Saraiva *et al.* 2007) ve mısırdan (Mika *et al.* 2008) iyon değişim kromatografi yöntemi ile ısırgan otundan (Gülçin 2002), jel filtrasyon kromatografi yöntemi ile brokoliden (Köksal and Gülçin 2008) yapılan çalışmalarla örnekler çoğaltılabilir.

Afinite kromatografi tekniği enzim saflaştırma sürecini hem daha kısa sürede tamamlanmasını hem de ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyalin tek basamakta ayrılmasını sağladığı için çok tercih edilen bir yöntemdir (Konak vd. 2014). Afinite kromatografisinin temel prensibi saflaştırılmak istenen molekülün katı bir matrikse kovalent olarak bağlanmış olan liganda spesifik veya tersinir bir biçimde bağlanmasına dayanır (Issaq and Veenstra 2020).

Literatürde POD enzimleri afinite kromatografi yöntemi kullanılarak çalı fasulyesinden %56,2 verimle 253 kat (Oztekin and Tasbasi 2020), beyaz lahana kalluslarından %57 verimle 133 kat, kırmızılahaana kalluslarından %61 verimle 134 kat (Oztekin *et al.* 2021), HRP'den % 8,5 verimle 1151 kat (Almaz *et al.* 2021), karaturptan %31,5 verimle 677 kat (Oztekin *et al.* 2019), yine karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat (Kalın 2012), pazıdan %8,83 verimle 50,3 kat (Boldaz 2021), kırmızılahaanadan %2,9 verimle 120,6 kat (Somtürk *et al.* 2014), kırmızı pancardan %38 verimle 196,9 kat (İnal 2013) saflaştırılmıştır.

Bu tez kapsamında ise börölce POD enziminin afinite tekniği kullanılarak ilk kez saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırmada ligand olarak amino benzohidrazid türevleri (4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid (**a**), 4-amino 3-bromo 5-florobenzohidrazid (**b**), 4-amino 3-bromo 5-klorobenzohidrazid (**c**) ve 5-amino izoftalohidrazid (**d**)) kullanıldı.

Afinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılan börölce POD enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford metodu kullanılarak belirlendi.

POD enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak yapıldı.

Börölce POD enzimi afinite kromotografisinde ligand olarak 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (**a**) ile %53,6 verimle 91,6 kat, 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (**b**) ile %25,1 verimle 47 kat, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (**c**) ile %36,6 verimle 94,1 kat ve 5-aminoizoftalohidrazid (**d**) ile

%19,7 verimle 44,9 kat saflaştırıldı. Börülce POD enzim saflaştırma tablosu Çizelge 4.1’de gösterildi.

Literatürde değişik kaynaklardan POD enzimlerinin saflaştırma çalışmalarında farklı molekül ağırlığına sahip birçok izozim yapısı tespit edilmiştir. SDS-PAGE yöntemiyle POD’ların molekül ağırlıkları; zeytinde 44 kDa (Tzika *et al.* 2009), domateste 43 kDa (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), çilekte 65 kDa (Civello *et al.* 1995), at turpunda 37 kDa (Lavery *et al.* 2010), soğan köklerinde 51,2 kDa (Öztekin 2020) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmamızda ise afinite tekniği kullanarak tek kademede saflaştırdığımız börülce POD enziminin moleküler ağırlığı 39 kDa olarak hesaplandı ve SDS-PAGE Şekil 4.4’te gösterildi.

Saflaştırılan börülce POD enzimi üzerine amino benzohidrazid türevlerinin (ligandlar) inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda inhibitörlerin kuvvet içi konsantrasyonları Çizelge 4.2, 4.5, 4.8 ve 4.11’de gösterildi. Börülce POD enzimi üzerine amino benzohidrazid türevlerinin inhibisyon etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda inhibitör eklenerek aktivite değerleri hesaplandı ve elde edilen verilerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu. Börülce POD enzimi için oluşturulan grafikler Şekil 4.5, 4.7, 4.9 ve 4.11’de gösterildi ve IC₅₀ değerleri: 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (**a**) için; 970 µM, 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (**b**) için; 166 µM, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (**c**) için; 78 µM ve 5-aminoizoftalohidrazid (**d**) için; 295 µM olarak hesaplandı. Daha sonra börülce POD enziminin K_i değerlerini hesaplamak için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda ve 5 farklı guaiakol konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.6, 4.9 ve 4.12’de gösterildi. 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid (**a**), 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid (**b**), 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid (**c**) ve 5-amino izoftalohidrazid (**d**) moleküllerinin börülce POD enzimi üzerine K_i değerlerini ve inhibisyon çeşitlerini bulmak için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Lineweaver *et al.* 1934). Grafikler Şekil 4.6, 4.8, 4.10 ve 4.12’de gösterildi. Yapılan çalışma sonucu elde edilen K_i değerleri: **a** molekülü için; 970±130 µM, **b** molekülü için; 338±176 µM, **c** molekülü için; 97±7,8 µM ve **d** molekülü için ise; 249±24 µM’dır.

İnhibisyon çalışmaları sonucunda kullanılan bütün moleküllerin b r lce POD enzimini yarışmasız olarak inhibe ettiği belirlendi. Enzimin ilgisinin en fazla 97 μM K_i değeriyle 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid molekülüne olduğu ve zaten en yüksek saflaştırma katsayısına (94,1) da bu molekülün ligand olarak kullanıldığı kolonda ulaşıldı. Böylece saflaştırmak için kullandığımız amino benzohidrazid moleküllerinin (**a**, **b**, **c** ve **d**) b r lce POD enzimini saflaştırmadaki etkinlikleri ve inhibisyon etkileri ilk kez tespit edilmiş oldu.

B r lce POD enzimi başarıyla saflaştırıldıktan sonra karakterizasyon çalışmaları yapıldı.  alışmalar neticesinde b r lce POD enzimi için optimum sıcaklık, optimum pH, optimum iyonik şiddet ve farklı substratlar için K_M ve $V_{\max}$ değerleri belirlendi.

B r lce POD enziminin optimum pH değerini belirlemek için farklı pH 4,0-9,0 aralıklarında tamponlar kullanıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda ( izelge 4.14, 4.15 ve 4.16) optimum pH 6,0 olarak belirlendi ve Aktivite (EU/mL)-pH grafiği şekil 4.13'te gösterildi.

B r lce POD enzimin optimum iyonik şiddetini belirlemek için 0,1- 1 M aralığında KH_2PO_4 tamponu kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan aktivite ölçüm sonuçları ( izelge 4.17) doğrultusunda b r lce POD enzimi için optimum iyonik şiddet 0,3 M olarak belirlendi ve Aktivite (EU/mL)-Konsantrasyon grafiği şekil 4.14'te gösterildi.

Saflaştırılan b r lce POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5 ila 70 $^\circ\text{C}$ arasında değişen sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmanın aktivite değerleri  izelge 4.18'de gösterildi. Çalışma sonucunda POD enzimi için optimum sıcaklık 40 $^\circ\text{C}$ olarak belirlendi ve Aktivite (EU/mL)-Sıcaklık ($^\circ\text{C}$) grafiği şekil 4.15'te gösterildi.

B r lce POD enziminin farklı substratlara olan ilgisini belirlemek için guaiakol, H_2O_2 , 4-metilkatekol, ABTS'den oluşan substratların farklı konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı ve $1/[S]$ ve $1/V$ değerleri hesaplanarak

Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak guaiakol substratı için K_M : 7,21 mM, V_{max} : 5,83 EU/mL, H_2O_2 substratı için K_M : 17,03 mM, V_{max} : 10,04 EU/mL, 4-metilkatekol substratı için K_M : 7,28 mM, V_{max} : 1,64 EU/mL ve ABTS substratı için K_M : 49,21 mM, V_{max} : 2,72 EU/mL olarak belirlendi. Elde edilen bu veriler ışığında enzimin ABTS substratına ilgisinin göstergesi olan yüksek K_M değeri zayıf bağlanmayı ifade ederken, guaiakol substratına ait düşük K_M değeri kuvvetli bağlanmayı ifade eder. Sonuç olarak börölce POD enzimi 7,21 mM K_M değeri ile, çalışılan diğer substratlara nazaran guaiakol substratına daha fazla ilgi duyar.



KAYNAKLAR

- Agostini, E., Medina, M. I., Milrad de Forchetti, S. R., & Tigier, H. (1997). Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 596-598.
- Almaz, Z., Oztekin, A., Abul, N., Gerni, S., Erel, D., Kocak, S. M., ... & Ozdemir, H. (2021). A new approach for affinity- based purification of horseradish peroxidase. *Biotechnology and applied biochemistry*, 68(1), 102-113.
- Al-Senaidy, A. M., & Ismael, M. A. (2011). Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(3), 293-298.
- Amaya, I., Botella, M.A., de la Calle, M., Medina M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., and Valpuesta, V. (1999) *FEBS Lett.* 457: 80-84
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of biotechnology*, 53(2-3), 253-263.
- Bansal, N., & S Kanwar, S. (2013). Purification and characterization of an extracellular peroxidase of a bacterial isolate *Bacillus* sp. F31. *Current Biotechnology*, 2(2), 155-161.
- Bartonek-Roxå, E., Eriksson, H., & Mattiasson, B. (1991). The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1088(2), 245-250.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., & Kulesza, P. (2008). Spring cabbage peroxidases-potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, 69(3), 627-636.
- Bingöl, G. (1977). Vitaminler ve enzimler.
- Boldaz, B. (2021). Pazı Kökü (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Substrat Spesifikliğin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Boyce, S., & Tipton, K. F. (2001). Enzyme classification and nomenclature. *e LS*.
- Bradford. M.M. and Williams W.L. (1976). New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274-274.
- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., & Anon, M. C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(10), 2596-2601.
- Clemente, E. (1998). Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49(1), 29-36.

- Corban, G. J., Hadjikakou, S. K., Tsipis, A. C., Kubicki, M., Bakas, T., & Hadjiliadis, N. (2011). Inhibition of peroxidase-catalyzed iodination by thioamides: experimental and theoretical study of the antithyroid activity of thioamides. *New Journal of Chemistry*, 35(1), 213-224.
- Çelikkaya, B. (2017). *Protein İzolasyonu için İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Bazlı Kesikli Sistemlerin Geliştirilmesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Dawkar, V. V., Jadhav, U. U., Jadhav, S. U., & Govindwar, S. P. (2008). Biodegradation of disperse textile dye Brown 3REL by newly isolated *Bacillus* sp. VUS. *Journal of Applied microbiology*, 105(1), 14-24.
- Deepa, S. S., & Arumughan, C. (2002). Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61(5), 503-511.
- Desbiez, MO., Boyer N. (1981). Hypocotyl growth and peroxidases of *Bidens pilous*. Effect of cotyledonary prickings and lithium pretreatment. *Plant Physiology*, 41-43.
- Di Gennaro, P., Bargna, A., Bruno, F., & Sello, G. (2014). Purification of recombinant catalase-peroxidase HPI from *E. coli* and its application in enzymatic polymerization reactions. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(3), 1119-1126.
- Düzcan, B. (2010). Karahindiba (*Taraxacum officinale*) Bitkisinden Süperoksit Dismutaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.
- Espelie, KE., Franceschi VR., Kolattukudy, PE. (1986). Immunocytochemical localization and time-course appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiology* 81, 487-492.
- Faraco, V., Piscitelli, A., Sannia, G., & Giardina, P. (2007). Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 889-893.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual review of plant physiology*, 37(1), 165-186.
- Gulcin, İ., & Yildirim, A. (2005). Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. *Acephala*.
- Gülçin, İ. (2002). Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Güngör, A.A., Öztürk, S.B., Demir, Y., Demir, N. (2005). Marul (*Lactuca sativa* L.) Bitkisi köklerinden peroksidaz enziminin saflaştırılması ve enzimin bazı organik çözücülerdeki davranışları. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası.
- Hatti-Kaul, R., & Mattiasson, B. (Eds.). (2003). *Isolation and purification of proteins*. CRC Press.

- Huystee, R. V. (1987). Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual review of plant physiology*, 38(1), 205-219.
- Imberty, A., Goldberg, R., & Catesson, A. M. (1985). Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta*, 164(2), 221-226.
- Issaq, H. J., & Veenstra, T. D. (2020). Sample depletion, fractionation, and enrichment for biomarker discovery. In *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* (pp. 95-102). Academic Press.
- İnal, S. (2013). Afinite kromatografisi tekniği ile enzimin kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi. Erzurum.
- JEN, J. J., SEO, A., & FLURKEY, W. H. (1980). Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. *Journal of Food Science*, 45(1), 60-63.
- Kalın, R. (2012). Peroksidaz enziminin afinite kromatografi tekniği ile karaturp (*Raphanus sativus* L.) ve şalgamdan (*Brassica rapa* L.) saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi. Erzurum.
- Kalme, S. D., Parshetti, G. K., Jadhav, S. U., & Govindwar, S. P. (2007). Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Bioresource technology*, 98(7), 1405-1410.
- Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y., Yano, M., (2000). Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant and Cell Physiology* 41, 149-154.
- Kawaoka, A., Kawamoto, T., Ohta, H., Sekine, M., Takano, M., Shinmyo, A. (1994). Wound-induced expression of horseradish peroxidase. *Plant Cell Reports* 13, 149-154.
- Keha, E. ve Küvrevioğlu Ö.İ. (2009). Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum
- Kolattukudy, P.E. (1981). Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology* 32, 539-567.
- Konak, Ü. İ., Turhan, İ., & Certel, M. (2014). Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Akademik Gıda*, 12(2), 79-87.
- Köksal, E., & Gülçin, İ. (2008). Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds. *Protein & Peptide Letters*, 15(4), 320-326.
- Kwak, S. S., Kim, S. K., Park, I. H., & Liu, J. R. (1996). Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43(3), 565-568.
- Lagrimini, L. M., Joly, R. J., Dunlap, J. R., & Liu, T. T. Y. (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant molecular biology*, 33(5), 887-895.

- Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., ... & D'Cunha, G. B. (2010). Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8471-8476.
- Lee, B. J., Lee, H. G., Lee, J. Y., & Ryu, K. H. (2007, October). Classification of enzyme function from protein sequence based on feature representation. In *2007 IEEE 7th International Symposium on BioInformatics and BioEngineering* (pp. 741-747). IEEE.
- Lehninger, A.L. (2005). Principles of biochemistry. Worth publisher, Acedemic Press, New York.
- Leon, J. C., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I. Y., Csoregi, E., & Sakharov, I. Y. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant science*, 163(5), 1011-1019.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1869-1879.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Márquez, O., Waliszewski, K. N., Oliart, R. M., & Pardio, V. T. (2008). Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT-food science and technology*, 41(8), 1372-1379.
- Mayers, G.L., Van Oss, C.J. (1998). Affinity chromatography. *Encyclopedia of Immunology*, 47-49.
- McLellan, K. M., & Robinson, D. S. (1987). Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23(4), 305-319.
- Meadar, M., Amberg-Fisher, V. (1982). Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. I. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell Wall peroxidases. *Plant Physiology* 70, 1128-1131.
- Meadar, M., Ungemach, J., Schloss, P. (1980). The role of peroxidase isozyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation . *Planta* 147, 467-470.
- Mika, A., Buck, F., & Lühje, S. (2008). Membrane-bound class III peroxidases: identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics*, 71(4), 412-424.
- Miller, J. M. (2003). Chromatography. *digital Encyclopedia of Applied Physics*, 1055-1102.
- Oztekin, A., & Tasbasi, S. (2020). A novel peroxidase from runner bean (*Phaseolus coccineus* L.): Enhanced affinity purification, characterization, and dye decolorization activity. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13411.
- Oztekin, A., Almaz, Z., & Onlu, S. (2021). Production and purification of peroxidases from callus cultures of white and red cabbage for enzymatic decolourization of

- reactive blue 19 and acid blue 25 dyes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1-10.
- Oztekin, A., Almaz, Z., Gerni, S., Erel, D., Kocak, S. M., Sengül, M. E., & Ozdemir, H. (2019). Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. *Journal of Chromatography B*, 1114, 86-92.
- Öztekin, A. (2016). 4-Amino Benzohidrazid türevleri kullanılarak karaturp ve şalgamdan peroksidaz enziminin saflaştırılması. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Öztekin, A. (2020). Guaiakol Peroksidazın Soğan Köklerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 1163-1170.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem*, 6(1), 2161-1009.
- Pandey, V. P., Bhagat, P. K., Prajapati, R., Jaiswal, N., Singh, S., Awasthi, M., & Dwivedi, U. N. (2016). A defense associated peroxidase from lemon having dye decolorizing ability and offering resistance to heat, heavy metals and organic solvents. *Biochem Anal Biochem*, 5(291), 2161-1009.
- Regalado, C., García-Almendárez, B. E., & Duarte-Vázquez, M. A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 243-256.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J. I., Gerdemann, C., Büldt-Karentzopoulos, K., Jasper, B., & Krebs, B. (2007). Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774(11), 1422-1430.
- Roskoski, R. (2015). Michaelis-Menten kinetics. *The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1-10.
- Saraiva, J. A., Nunes, C. S., & Coimbra, M. A. (2007). Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase—Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food chemistry*, 101(4), 1571-1579.
- Segel, I.H. (1968). *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York
- Shen, C.-H. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187-214.
- Signoret, A., & Crouzet, J. (1982). Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(2), 459-464.
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial enzymes—an overview. In *Advances in Enzyme Technology* (pp. 1-40). Elsevier.

- Somtürk, B. (2013). Peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile bitkisel kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Somtürk, B., Kalın, R., & Özdemir, N. (2014). Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(7), 1815-1828.
- Sugano, Y., Matsushima, Y., & Shoda, M. (2006). Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(4), 862-871.
- Svelheim, F., Robertsen, B. (1990). Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiologia Plantarum* 78, 261-267.
- Şişecioğlu, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M. H., & Kaya, H. B. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1187-1196.
- Taniwan, S. (2020). Expression and Localization of the PabPrx86 Peroxidase from Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Tobacco (*Nicotiana benthamiana* L.).
- Tekman, Ş., Öner, N. (1981). Genel Biyokimya üçüncü baskı, Fatih Yayınevi - İstanbul, 351- 367.
- Telke, A. A., Joshi, S. M., Jadhav, S. U., Tamboli, D. P., & Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. *Biodegradation*, 21(2), 283-296.
- Turgut, H.İ. (2009). Sakarya bölgesinde yetişen deve diken (Silybum marianum) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi.
- Twala, P. P., Mitema, A., Baburam, C., & Feto, N. A. (2020). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. *AIMS microbiology*, 6(3), 330.
- Tzika, E. D., Sotiroidis, T. G., Papadimitriou, V., & Xenakis, A. (2009). Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology*, 228(3), 487-495.
- Ünlü, H., & Padem, H. (2004). Börülce (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) çeşitlerinde farklı ekim zamanlarının sulı ve kurak koşullarda verim ve kalite özelliklerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3).
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Vicuna, D. (2005). The role of peroxidases in the development of plants and their responses to abiotic stresses.

- Vigneswaran, C., Ananthasubramanian, M., & Kandhavadiu, P. (2014). *Bioprocessing of textiles*. WPI Publishing.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2000). *Fundamentals of biochemistry*.
- Wang, S. Y., Gong, Y. S., & Zhou, J. J. (2009). Chromatographic isolation and characterization of a novel peroxidase from large lima legumes. *Journal of food science*, 74(3), C193-C198.
- Whetten, RW., MacKay, JJ., Sederoff, RR.(1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 585-609.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., & Cemeroğlu, B. (1998). Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4158-4163.

