



**KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BENZOHİDRAZİDLERLE
İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

Serpil GERNİ

**Yüksek lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR**

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
BENZOHİDRAZİDLERLE İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Serpil GERNİ

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her Hakkı Saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
BENZOHİDRAZİDLERLE İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Serpil GERNİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile** kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **28.12**/2017 tarih ve **.51...../..32....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1001 projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:215Z386

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BENZOHİDRAZİDLERLE İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Serpil GERNİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada karaturp peroksidaz enziminin (POD), inhibitörleri olan 3-Amino benzohidrazid ve türevi moleküller kullanılarak tek basamakta saflaştırılması hedeflendi. Bu amaçla, literatürde bulunan bitki POD saflaştırma çalışmalarına katkı sağlamak için 3-amino benzohidrazid ve onun türevleri olan 5-amino 2-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-amino 2-metil benzohidrazid molekülleri sentezlendi ve POD enziminin saflaştırılmasında kullanıldı. Türev moleküllerin metilbenzoat formlarından hidrazin sentezleri yapılarak, karaturp POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline bağlanarak elde edilen afinite jelleri ile tek kademede karaturp POD enzimi saflaştırılması gerçekleştirildi. 3-Amino benzohidrazid molekülü kullanıldığında karaturp POD enzimi, %11,9 verimle 246,6 kat, 5-amino 2-metil benzohidrazid ile %43 verimle 733,5 kat, 3-amino 5-metil benzohidrazid ile %6,09 verimle 221,2 kat, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ile %14,6 verimle 249,6 kat ve 3-amino 2-metil benzohidrazid ile %21,4 172,5 kat saflaştırma yapıldı. Bu kolonlardan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Karaturp POD enziminin molekül ağırlığı için 43-47 kDa'da tek bant gözlemlendi. Tüm kolonların saflaştırma sonuçları karşılaştırıldı ve en iyi kolon materyali olan Sepharose-4B-L-Tirozin-5-amino-2-metil benzohidrazid kolonu için kolon tutma kapasitesi, karaturp POD enzimi için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde çalışıldı. Karaturp POD enzimi için optimum şartlar: pH 7,0, sıcaklık 15°C, iyonik şiddet ise 0,4 M olarak belirlendi.

2017, 74 sayfa

Anahtar Kelimeler: Peroksidaz, Afinitite kromatografisi, Karaturp, Enzim Saflaştırma, 3-Amino benzohidrazid türevleri

ABSTRACT

MS. Thesis

PURIFICATION OF BLACK RUDISH PEROXIDASE (POD) ENZYME AND INVESTIGATION OF INHIBITION KINETIC WITH BENZOHYDRAZIDES

Serpil GERNİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this study, it was aimed to establish a purification procedure in one step for black rudish Peroxidase (POD) enzymes by using 3-amino benzohydrazide and its derivatives. which are the inhibitors of the POD enzymes. In this aim, in order to contribute to the purification studies in the literature of plant peroxidase enzymes, 3-amino benzohydrazide and its derivatives which are 5-amino 2-methyl benzohydrazide, 3-amino 5-methyl benzohydrazide, 3-amino 4-nitro benzohydrazide and 3-amino 2-methyl benzohydrazide molecules were synthesized and firstly used at the study of purification of POD enzyme. The inhibition effects on POD enzyme were investigated by making hydrazine synthesis from the methyl benzoate forms of the 3-amino benzohydrazide derivative molecules. The purification of the single-stranded black rudish Peroxidase (POD) enzyme with affinity gels obtained by binding Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material of molecules which have alternating inhibition effect was performed. The black rudish POD enzyme is purified using 3-amino benzohydrazide molecule with a yield of 11.9%, 246.6 fold, using 5-amino 2-methyl benzohydrazide molecule with a yield of 43%, 733.5 fold, using 3-amino 5-methyl benzohydrazide with a yield of 6.09%, 221.2 fold, using 3-amino 4-nitro benzohydrazide with a yield 14.6 fold 249.6 fold, using 3-amino 4-nitro benzohydrazide with a yield of 14.6%, 249.6 fold and using 3-amino 2-methyl benzohydrazide molecule with a yield of 21.4%, 172.5 fold. The molecular weight and enzyme purity of the POD enzymes purified from all the column materials were controlled by SDS-PAGE. Single band were observed at 43-47 kDa for the black rudish peroxidase enzyme. The purification results of all the column material were compared and the column holding capacity for Sepharose-4B-L-Tyrosine-5-amino-2-methyl benzohydrazide showing the result of being the best column, for POD were studied different pH, temperature and ionic strengths. Optimum parameter for radish POD were determined as 7.0 for pH, 15°C for temperature, 0.4 M for ionic intensity.

2017, 74 pages

Keywords: Peroxidase, affinity chromatography, black rudish, purification, 3-Amino benzohydrazide and its derivatives

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN'e ve laboratuvar çalışma arkadaşlarım uzman Songül BAYRAK'a, Sayın Yeliz DEMİR'e, Sayın Hatice Esra ASLAN'a,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmamı 215Z386 nolu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Serpil GERNİ

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimatik Reaksiyonun Hızını Etkileyen Faktörler.....	3
1.2. Serbest Radikaller.....	6
1.3. Antioksidan Enzimler.....	7
1.4. Peroksidazlar	8
1.5. Afinite Kromatografisi	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
2.1. Çalışmanın Amacı	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	20
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	21
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	22
3.2. Yöntemler.....	26
3.2.1. Protein tayini	26
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	26
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	26
3.2.2. Karaturp Peroksidaz aktivitesi tayini	27
3.3. Karaturp Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	28
3.3.1. Ligand seçimi	28
3.3.2. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....	29
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	30

3.3.3.a. 3-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	30
3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	30
3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	31
3.3.4.b. 3-Aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi.....	31
3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi	32
3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	33
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi	33
3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması	34
3.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	35
3.5.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	35
3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. Karaturp Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	36
4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	36
4.2. Karaturp Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	37
4.2.1. Karaturp POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	37
4.2.2. Karaturp POD enziminin 3-Amino Benzohidrazid Kolonu ile saflaştırma sonuçları	38
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	38
4.3. Kullanılan İnhibitörün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları.....	39
4.4. 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi	42
4.5. Sentezlenen 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	46
4.5.1. 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	47
4.5.2. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	49
4.5.3. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	51

4.5.4. 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	53
4.6. Karaturp Peroksidaz Enzimi Üzerine SDS-PAGE ve Kinetik Çalışma Sonuçları.....	57
4.6.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	57
4.7. 5-Amino 2-metil Benzohidrazid Molekülü Kullanılarak Hazırlanan Afinite Kolonunun Karaturp POD Enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	57
4.7.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları.....	58
4.7.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	58
4.7.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EI	: Enzim inhibitör kompleksi
ES	: Enzim substrat kompleksi
ESI	: Enzim inhibitör substrat kompleksi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
IC ₅₀	: Enzimin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
ROS	: Reaktif oksijen türü
POD	: Peroksidaz
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Substrat molekülünü bağlayan aktif bölgeye sahip bir enzimin şematik olarak gösterilmesi	2
Şekil 1.2. Lineweaver-burk grafiği	5
Şekil 1.3. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme reaksiyonu	10
Şekil 1.4. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması	10
Şekil 1.5. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü	11
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme mekanizması.....	27
Şekil 3.2. Karaturp Peroksidaz inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller.....	29
Şekil 3.3. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması.....	29
Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılma reaksiyonu.....	31
Şekil 3.5. 3-Amino benzohidrazid ve türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu.....	32
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	36
Şekil 4.2. 3-Amino benzohidrazid kolonundan Karaturp POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	37
Şekil 4.3. 3-Amino benzohidrazid (1) kolonundan saflaştırılan Karaturp enziminin SDS- PAGE fotoğrafı.....	39
Şekil 4.4. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	40
Şekil 4.5. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	41
Şekil 4.6. 5-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu	43

Şekil 4.7. 3-Amino 5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu	44
Şekil 4.8. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu	45
Şekil 4.9. 3-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu	46
Şekil 4.10. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 5-Amino 2-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	47
Şekil 4.11. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	48
Şekil 4.12. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	49
Şekil 4.13. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	50
Şekil 4.14. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	51
Şekil 4.15. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	52
Şekil 4.16. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 2-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	53
Şekil 4.17. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	54
Şekil 4.18. (1) 3-Amino 5-metil benzohidrazid, (2) 5-Amino 2-metil benzohidrazid, (3) 3-Amino 4-nitro benzohidrazid, (4) 3-amino 2-metil benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	57
Şekil 4.19. Sepharose-4B-5-Amino 2-metil benzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği	58
Şekil 4.20. Sepharose-4B-5-Amino 2-metil benzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği	59
Şekil 4.21. Sepharose-4B-5-Amino 2-metil benzohidrazid jelinin iyonik şiddet $[M]$ -kapasite grafiği.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması	9
Çizelge 4.1. Karaturp enziminin 3-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	38
Çizelge 4.2. 3-Amino benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	40
Çizelge 4.3. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü...	41
Çizelge 4.4. Karaturp enzimi üzerine 3-Amino benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	42
Çizelge 4.5. 3-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları.....	42
Çizelge 4.6. 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	47
Çizelge 4.7. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	48
Çizelge 4.8. Karaturp enzimini üzerine 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	49
Çizelge 4.9. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	49
Çizelge 4.10. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	50
Çizelge 4.11. Karaturp enzimini üzerine 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	51

Çizelge 4.12. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	51
Çizelge 4.13. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	52
Çizelge 4.14. Karaturp enzimini üzerine 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	53
Çizelge 4.15. 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	53
Çizelge 4.16. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	54
Çizelge 4.17. Karaturp enzimini üzerine 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	55
Çizelge 4.18. Karaturp enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları	55
Çizelge 4.19. Afinite kolonlarından elde edilen Karaturp enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu	56

1. GİRİŞ

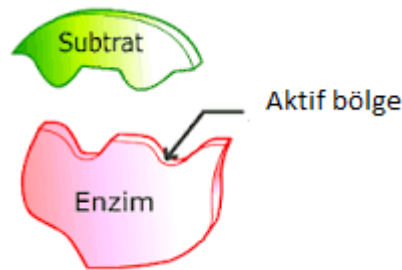
Biyokimyasal araştırmaların büyük çoğunluğunu enzim çalışmaları oluşturmaktadır. Bu alandaki en büyük gelişmelerden biri 1926 yılında J.B.Summer'in üreaz enzimini “JackBean” bitkisinden elde edip kristallendirmesi ve protein yapısında olduğunu keşfetmesidir. Günümüze kadar 2000 enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Her canlının, hayatını devam ettirmesi için dışarıdan aldığı besinleri kendi yapısına uygun biyolojik moleküllere seçici ve etkili bir şekilde dönüştürmesi gerekmektedir. Canlı organizmalarda, bu dönüşümün meydana geldiği kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler, proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2004).

Enzimler olağanüstü katalitik aktiviteye sahip moleküllerdir. Substratları karşısında oldukça spesifik davranıp karşısındaki molekülün sadece bir bölgesini etkilemektedir. Bu etkilenen yerden bir veya birden fazla atomu ya da fonksiyonel grubu almaktadır. Enzimler, bugün hücreden çıkmış ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Ekmek, bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadır. Bugün enzimlerin kimya endüstrisinde, ęıda prosesinde, ziraatte pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik koşularda sentez edilmektedirler. Aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Enzim yapısında bulunan amino asitlerin özel dizilişi, enzimin belirli bir konformasyon ve tersiyer yapıyı kazanmasında en önemli rolü oynamaktadır. Enzimler sadece biyolojik aktivitesi için değil bunun yanı sıra metabolik olayların kontrolünü sağlamak için de gereklidir (Gözükara 2001).

Enzimlerle katalize edilen, tepkimeye katılan kimyasal moleküllere “substrat” adı verilir. Enzimler son derece spesifikler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyon gruba sahip olan substrat serisine karşı etkinlik göstermektedirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle etkileşen çok spesifik enzimler de bulunmaktadır (Tüzün 1997). Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir alan bulunmaktadır. Bu alan substratla üç boyutlu bir yüzey oluşturabilen aminoasit yan zincirlerine sahiptir. Aktif bölge substratı bağlayarak enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir.

Daha sonra enzim-substrat kompleksi, enzim ve ürüne dönüştürülür (Harvey and Champe 2007). Her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın molekül sayısı “turnover sayısı” olarak adlandırılmaktadır (Harvey and Champe 2007). Katalaz enzimi $40.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile en yüksek turnover sayısı olan enzim iken, karbonik anhidraz enzimi $10.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile en yüksek ikinci turnover sayısına sahip enzimdir (Bülbül 2003; Söyüt 2006). Enzimler bir veya birden fazla substratı etkilerken aktivite gösterebilmek için bazı hallerde “kofaktör” adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşikte olabilir. Kofaktöre sahip enzimlere “holoenzim” denilmektedir. Kofaktörler enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetlerde tutunmuş olup diyaliz yoluyla enzimlerden uzaklaştırılabilirler. Kofaktörü kendinden uzaklaşmış enzim aktivitesini kaybeder. Enzimin proteinden oluşan kısmına “apoenzim” denilmektedir (Gözükara 1997).



Şekil 1.1. Substrat molekülünü bağlayan aktif bölgeye sahip bir enzimin şematik olarak gösterilmesi

Bir reaksiyonun gerçekleşebilmesi için reaksiyona giren maddelerin gerekli enerji engelini (aktivasyon enerjisi) aşacak enerjiye sahip olmaları gerekir. Aktivasyon enerjisi düşükse reaksiyon çok hızlı yürür. Bilindiği gibi katalizörler aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandırırlar. Enzimler de dâhil bütün katalizörler reaksiyona maddelerle bir geçiş hali oluşturup serbest enerji değişimini azaltarak etkilerler. Aktivasyon enerjisinin yarısına düşürülmesi bile reaksiyon hızını çok arttırır. Örneğin; hidrojen peroksitin katalizörsüz parçalanması için aktivasyon enerjisi 76 kJ/mol iken katalaz enzimi bu enerjiyi 30 kJ/mol seviyesine düşürür.

1.1. Enzimatik Reaksiyonun Hızını Etkileyen Faktörler

Bir enzimatik reaksiyonun hızını birden fazla etkileyen faktör vardır ve bazıları şunlardır:

- Enzim konsantrasyonu,
- Substrat konsantrasyonu,
- pH,
- Isı veya sıcaklık,
- Zaman,
- Işık ve diğer fiziksel faktörler,
- İyonların doğası ve konsantrasyonu,
- Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler,
- Reaksiyon ürünleri.

Enzim kinetiği için 1913 yılında Lenor Michaelis ve Maude Menten tarafından geliştirilen model Michaelis-Menten modeli olarak bilinir ve bugün hala birçok açıdan tatmin edici sonuçlar vermektedir (Telefoncu 2007). Enzimlerin kinetik özellikleri Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilir. Bazı araştırmacılar 1902 yılında Enzim-Substrat ile Enzim-Substrat kompleksi arasında bir dengenin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Michalies-Menten bu tanımı daha fazla genişleterek bugün kendi adlarıyla anılan sabite ve eşitliğe ulaşmışlardır (Boyer 1970; Colowick and

Kaplan 1987). Bu denklemdeki K_M sabiti enzimin substrata ilgisini ifade ederken, V_{max} enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim Ünitesi", 25°C'de ve optimal şartlarda 1 μ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılr (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

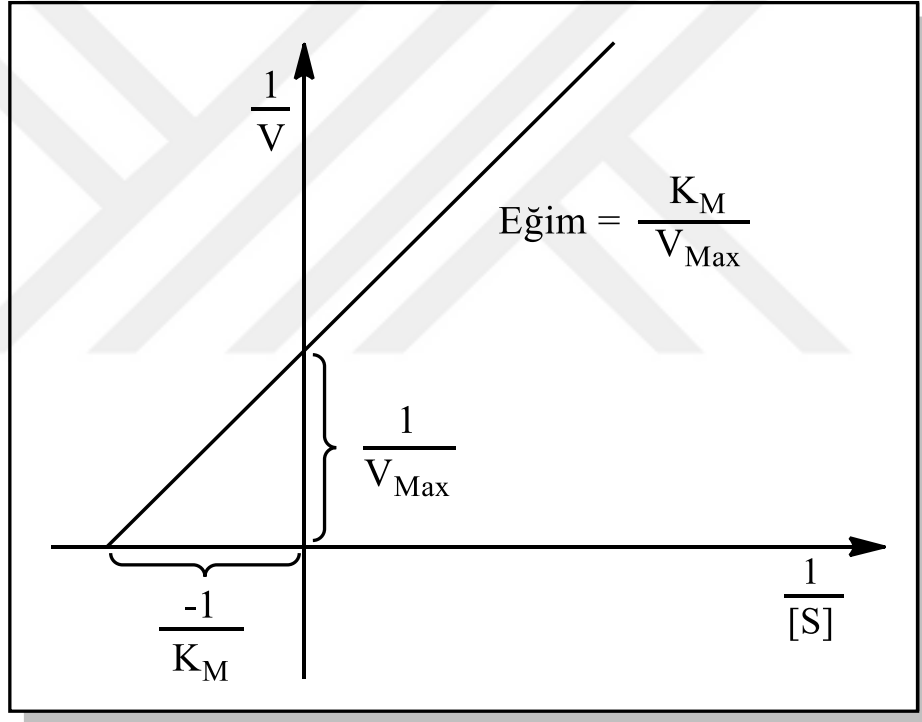
$$V=V_{max}[S]/K_m+[S]$$

İnhibisyon, dönüşümsüz ya da dönüşümlü olmak üzere iki şekilde incelenir. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana getirir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Dönüşümlü inhibisyonda enzim-inhibitör etkileşmeleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmakta yarışrlar. İnhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda K_M değeri artar V_{max} değişmez. Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır.

Bu inhibisyonda V_{max} düşerken K_M değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda V_{max} ve K_M azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Michaelis-Menten kinetiğinden farklı olarak karşımıza çıkan allosterik enzim kinetiği; sigmoidal grafikler göstermektedirler. İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için iki temel yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en çok kullanılan Lineweaver–Burk eğrisi (Şekil 1.2); $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilerek kesim noktalarından değerlendirmeler yapılarak elde edilir. Bir diğer yöntem olan Dixon grafiği; en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V$ -[I] grafiği çizilerek kesim noktalarından hesaplanarak elde edilir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Gilbert 1992; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.2. Lineweaver-burk grafiği

1.2. Serbest Radikaller

Yaşamın sürdürülmesinde büyük öneme sahip kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri olarak ifade edilen ara maddeler oluşur. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamı oksidan madde veya serbest radikal olarak tanımlanmaktadır.

Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlıkları düşük, oldukça reaktif moleküllerdir (Abdollahi *et al.* 2003). Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşur, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksiste ortaya çıkmaz. Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyaranla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır (Fridowich 1978; Ghosh and Myers 1998). Serbest radikal düzeyinin organizmada belirli bir denge içerisinde olması gerekir. Serbest radikal dengesi hücresel veya biyolojik kaynaklı olarak bozulabilir. Bu durumda, vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan ve antioksidan adı verilen maddeler, serbest radikalleri nötralize ederek organizmanın onlardan etkilenmemesini sağlamaktadırlar (Dündar ve Aslan 2000). Serbest radikaller etkilediği atomun dolayısıyla o atomun bulunduğu maddenin görevini yapamamasına sebep olur. Sonuç olarak, etkilenen maddenin biyolojik önemine ve onun tamir edilip edilememesine bağlı olarak önemli veya önemsiz kalıcı veya geçici etkiler gösterir. Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (Lee *et al.* 1998).

Reaktif oksijen türleri solunum ve bağışıklık sistemine bağlı bazı hücrelerde olduğu gibi vücudun oksijeni normal kullanımı esnasında da sürekli üretilir. ROS süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot-}$) gibi serbest radikalleri; singlet oksijen ($^1O_2$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) gibi serbest radikal olmayan türleri içerir (Gülçin 2010). Canlı

metabolizmasında bu reaktif oksijen türleri farklı şekillerde meydana gelmektedir. Normal aerobik solunum, polimorfonükler lökositleri, makrofajları ve peroksizomları stimüle eder. Peroksizomlar hücre tarafından üretilen çoğu ROS türünün en önemli endojen kaynağıdır. ROS'un ekzojen kaynakları ise sigara dumanı, radyasyon, çevre kirliliği, organik çözücüler, UV ışınları ve pestisitlerdir (Ak and Gülçin 2008).

ROS'un kontrolsüz üretimi ve dengesiz antioksidan mekanizması birçok hastalık belirtilerinin yanı sıra erken yaşlanmayla da sonuçlanmaktadır (Gülçin 2008). ROS'un fizyolojik konsantrasyonları hücrenin normal fonksiyonları için gerekli olabilir. Serbest radikaller nükleik asitler, lipitler, proteinler, karbohidratlar ve doymamış yağ asitleri gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilir (Gülçin 2010). Sonuç olarak ROS'un sıtma, yaşa bağlı bağışıklık sistemi hastalığı, kalp hastalıkları, felç, ateroskleroz, diyabet ve kanser gibi 100'den fazla hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (Gülçin 2012).

1.3. Antioksidan Enzimler

Enzimler çok yüksek katalizleme gücüne sahip protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bir canlıdaki parçalanma ve yapım (sentez) reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu tanıma göre de, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem maddelerdir. Canlı dışında da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Bugün enzimler gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım, veterinerlik ve tekstil endüstrisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT)'dır. Bu endojen antioksidan enzimler serbest radikalleri zararsız hale getirirler. Böylece organizma serbest radikaller ve aktif oksijen türlerinden etkilenmez (Arosio *et al.* 2000).

1.4. Peroksidazlar

Oksidoredüktaz sınıfına ait olan peroksidaz enzimi; yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen bir enzim grubudur. Bu enzim Uluslar Arası Biyoteknoloji Derneği (International Union of Biotechnology-IUB) tarafından da EC 1.11.1.7 formunda kodlanmıştır. Peroksidazlar, oksijenli solunum oluşturan canlı organizmaların hücrelerinde bulunan H_2O_2 moleküler oksijen ve suya çevirerek hücreyi bu molekülün oksidatif etkisinden korurlar (Şişecioğlu *et al.* 2010). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan peroksidaz genleri, bitkilerde çok sayıda bulunur. POD enzimleri hem grubu içeren metal proteinlerdir (Pandey *et al.* 2012). Peroksidazların yüksek sıcaklıktaki stabilliği ve aktivitelerinin basit kromojenik reaksiyonlarla kolayca ölçülmesinden dolayı protein yapısı, enzim reaksiyonları ve enzim fonksiyonu çalışmalarında model bir enzim olarak kullanılmaktadır (Hiraga *et al.* 2001).

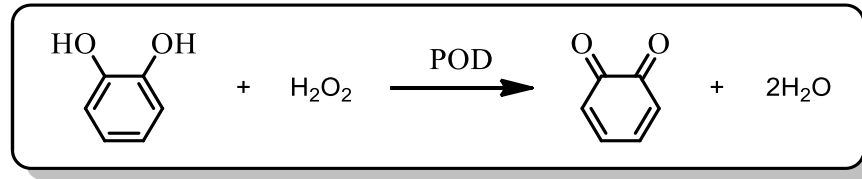
Peroksidazlar tarafından kataliz edilen reaksiyonun genel formülü aşağıda verilmiştir (VanHuystee 1987).



Çizelge 1.1. Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması (Hiraga *et al.* 2001)

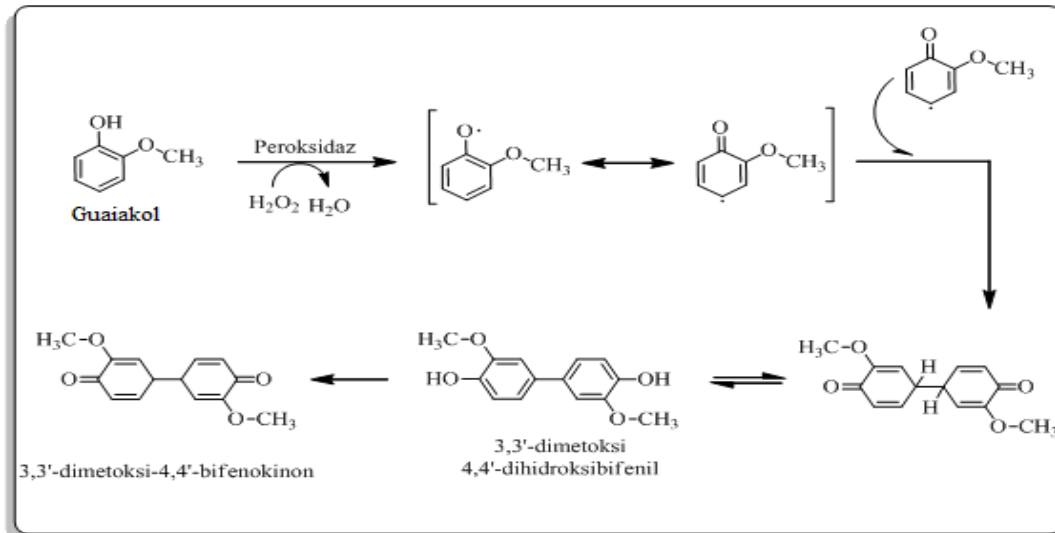
Süper Aile	Enzim	Kaynak	Moleküler Kütle (kDa)
Hayvan Peroksidazları	Eosinophil Peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	78-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutasyon Peroksiaz	Hayvan, Bitki	6-22, 75-112
	Prostaglantin endoperoksit Sentaz	Hayvan	115-140
Katalaz	Katalaz	Hayvan, Bitki Mantar, Maya	140-530
Bitki Peroksidazları (Sınıf I)	Sitokrom c Peroksidaz	Maya, Bakteri	32-63
	Katalaz Peroksidaz	Bakteri Mantar	150-240
Bitki Peroksidazları (Sınıf II)	Askorbat Peroksidaz	Bitki	30-58
Bitki Peroksidazları (Sınıf III)	Manganaz Peroksidaz	Mantar	43-49
	Ligninaz	Mantar	40-43
	Peroksidaz (POD)	Bitki	28-60

Metabolizma sırasında oluşan, oksitleyici özelliği olan H_2O_2 'nin ortamdan hızlı bir şekilde uzaklaştırılması işlevi hücrede antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984). Aromatik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılırken metabolizmada meydana gelen hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürürler (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987). Bu reaksiyonlara katekolün oksidasyonunu örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.3. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme reaksiyonu

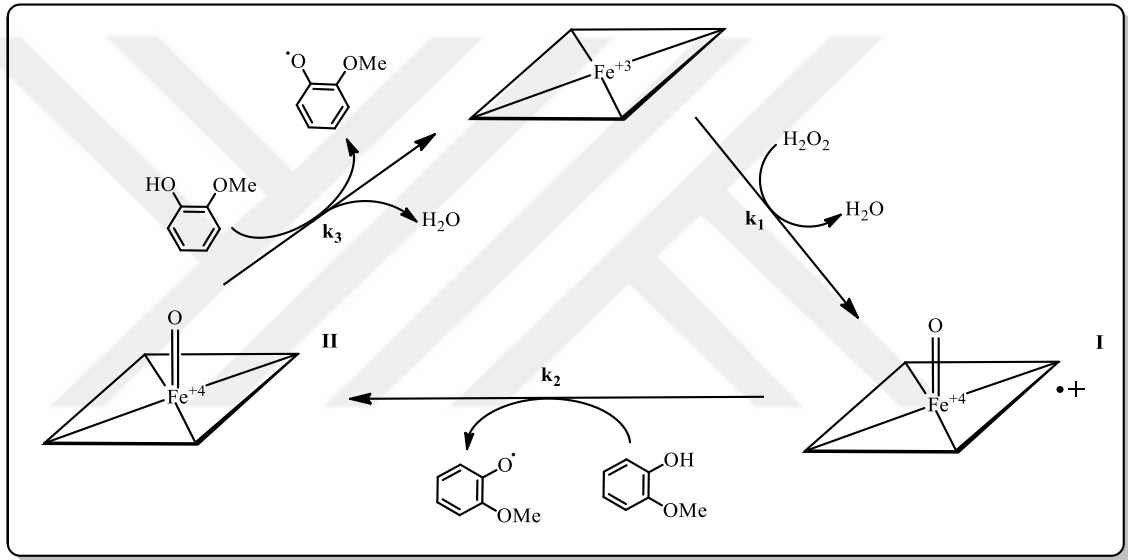
Peroksidazlar, H_2O_2 molekülü kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu katalizlerken, hidrokinonlar, fenoller, hidrokinonid aminler gibi fenolik ve fenolik olmayan çok miktarda molekülün dehidrogenasyonunu da katalizlerler. Ayrıca bu bileşikler arasında 2-toluidin, 2-kresol, pirogallol, guaiakol, 4,4'-diamino difenilen amin, lökomalaşit yeşili, propiyonil promozin, o-tolidin, benzidin, di-o-anisidin ve bazı azo-boya çeşitleri bilinmektedir (Forteza *et al.* 2011; Fodil *et al.* 2012). Peroksidazın bulunduğu şartlarda substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgenme mekanizması yapılan çalışmalar sonucunda açığa kavuşturulmuş ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgendiği tespit edilmiştir (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.4. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması

Guaiakolün substrat olarak kullanımı, ilk kez 1809'da biyomateriyallerde yapılan renk reaksiyonuyla gerçekleşmiştir. Bayır turpundan saflaştırılan enzimle peroksidaz teriminin kullanılması bundan 100 yıl sonra gerçekleşmiştir (Van Huystee 1987).

Peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması, hidrojen peroksitin indirgendiği ve guaiakol substratının yükseltgendiği reaksiyonlar ile üç basamakta gerçekleşir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Yukarıda belirtilen mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi, Fe(IV) içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I'i oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Bu bir redoks reaksiyonudur. Bu reaksiyonda H_2O_2 suya indirgenirken enzim ise yükseltgenmektedir. İkinci adımda bileşik I ortamdaki guaiakol substratından bir proton alarak Fe(IV) haline indirgenirken, substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür. Bunun sonucunda oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan tekrar bir proton alıp indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimer hale dönüşürler (Veitch 2004).

Peroksidazların önemli rol oynadığı hayvanlar, mikroorganizmalar ve bitkilerde peroksidaz aktivitesi tespit edilmiştir. Hidrojen peroksiti ya da diğer peroksitleri kullanarak çeşitli substratların oksidasyonunu katalize eder. Peroksidazlar hücre içi boşluklarda, plazmada, hücre içi cisimciğinde ve hücre duvarının içinde veya dışında bulunabilir. Hücre içinde bulunan enzim hücre duvarı bileşenlerine iyonik ya da kovalent olarak bağlanır (Belcarz *et al.* 2008). Peroksidazların substrat ilgisi, spesifik aktivite, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimi vardır (Fric 1976). Bazı izozimler yapısal olarak ifade edilirken bazıları bitki yapısı ve gelişiminde önemli yer tutar. Bu enzimler bitki hücre bölmelerinde izoenzimlerin varlığı ile belirtilmiş çeşitli fonksiyonlara sahiptirler (Vitali *et al.* 1998).

Peroksidazlar, bitkilerin gelişimi ve strese karşı olan cevabı, bitkilerin büyümesindeki hormonal düzenlenme, hücre duvarı metabolizması, oksidasyon defansında hücrelerin cevabı gibi birçok hücresel süreçte rol oynamaktadır (Jouili *et al.* 2011). Ayrıca, peroksidazlar biyotik ve abiyotik stresleri gösteren bir biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler çimlenmeden yaşlanmaya kadar birçok fizyolojik olayda rol oynar (Morohashi 2002). Fenolik bileşik oksidasyonu (Fry 2004), hücre uzaması (Liszkay *et al.* 2004), reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin metabolizması (Almagro *et al.* 2009), fitohormon metabolizması (Cosio and Dunand 2009), hücre duvarları bileşenlerinin çapraz bağlanması ve hücre duvarının sertliğinin kontrolü, suberin ve lignin oluşumunda görev alır (Passardi *et al.* 2007; Marjamaa *et al.* 2009).

Ayrıca sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması, bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry 1986; Agostini *et al.* 1997), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) gibi olaylarda etkilidirler. Ayrıca mikroanalitik uygulamalarda tercih edilir (Kwak *et al.* 1996). Bitkilerde, hasarlı veya enfekte dokular da fiziksel savunma mekanizmasına (Biles and Martyn 1993) katkıda bulunmaktadır. Peroksidazlar, klinik biyokimyada ve enzim immünolojik testlerinde yaygın olarak

kullanılır (Vamos-vizago 1981; Lin *et al.* 1996). Peroksidazların bazı yeni uygulamaları, örneğin endüstriyel atıklar ve gıda maddeleri gibi materyallerden peroksitlerin uzaklaştırılması, çeşitli aromatik kimyasalların sentezi, fenolik bileşenler içeren atık suların iyileştirilmesi gibi öneriler de içermektedir (Agostini *et al.* 2002).

Klasik salgı bitki peroksidazları (Sınıf III), hücre uzaması, hücre duvarı yapı ve farklılaşması yanısıra değişik bitki patojenlerine karşı savunmada görev alan bitki salgı glikoproteinleridir (Zamocky and Obinger 2010).

Göl, nehir suyu gibi ham içme suyu kaynakları, toksik alifatik ve aromatik kirleticiler (fenol ve fenolik bileşenler) tarafından kontamine olabilir. Bunlar toksik olduğu için insan sağlığına potansiyel tehlike sunmaktadır ve bunların çoğunun kanserojen olduğu düşünülmektedir. Bu aromatiklerin konvansiyonel su arıtma tesislerinde biyo çözünürlüğü kolay değildir (Kim *et al.* 2006). Toprak, endüstriyel atıklar, çamur ve atık sulardan fenolik bileşenlerin uzaklaştırılması için çeşitli kimyasal, mikrobiyolojik ya da enzimatik yöntemler geliştirilmiştir. Ozon tedavisi gibi kimyasal yöntemler, çok pahalıdır ve bazı toksik kloro-organik bileşiklerin artmasına (klorin oksidasyonu) neden olabilir ki bu da fenolik bileşiklerin kendisinden daha tehlikelidir. İçme suyu mikrobiyolojik işleme karşı güvenli değildir. Çünkü hastalık üreten bakteri ve diğer mikropların vücuda girişine neden olabilir. Bu yüzden enzimatik metodlar, içme suyu kaynaklarındaki toksik aromatik bileşenleri uzaklaştırmak için yeni ve iyi bir opsiyon olmaktadır. Horseradish ve diğer bitki kaynaklarından peroksidazın izolasyonu mikrobiyal kaynak ürünlerinden daha ucuzdur. Bu nedenle bitki peroksidazları suların iyileştirilmesini de içeren çoğu ticari uygulamalar için kullanılmaktadır (Lavery *et al.* 2010).

1.5. Afinite Kromatografisi

Biyokimya araştırmalarında ayırma teknolojisinin vazgeçilmezlerinden olan afinite kromatografisi, hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarını veya özelleşmiş kimyasal yapılarını esas alarak saflaştırma yapmayı mümkün kılar.

Afinite kromatografisi bir tür adsorbsiyon kromatografisidir. Saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Saflaştırma çoğu zaman bir kaç bin kat olur ve hazırlanan aktif materyalin geri kazanılması olasılığı genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan, hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyalin, bu teknikle bir tek basamakta ayrımı gerçekleştirilir. Afinite kromatografisinin konsantre edici özelliği de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmayı mümkün kılmaktadır. Ayrımların yüksek seçiciliği, birbirini etkileyen moleküllerin doğal spesifitesinden kaynaklanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi saflaştırma çalışmalarında halen önemini korumaktadır. Afinite kromatografi şu amaçlarla kullanılabilir:

- Kompleks biyolojik karışımlardan tek bir maddeyi saflaştırmak için,
- Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden doğal şekillerini ayırmak için,
- Kirlenmiş büyük miktarlardaki madde karışımlarından küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için.

Başarılı bir ayırım, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligand gerektirir. Afinite kromatografisi kullanılarak spesifik ve yüksek verimde bir ayırım yapabilmek için şu iki husus çok önemlidir;

- Immobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlanma afinitesinin olması,
- Safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması gereklidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkisel kaynaklı peroksidaz enzimi; at turpu, şalgam, ananas, brokoli, incir, baklagiller, karaturp, ıspanak ve patates gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Memelilerdeki peroksidaz enzimleri ise sütte, karaciğerde, dalakta, uterusu, tükrük bezlerinde, akciğer duvarlarında, sitoplazmada, mitokondride, mikrozom ile lizozomlarda lokalize olmuşlardır (Pütter and Becker 1987).

1960'lerden beri peroksidaz enzimi ile ilgili farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırma çalışmaları yapılmaktadır. Afinite, iyon değişim, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi kullanılan saflaştırma metodlarından birkaç tanesidir (Singh and Singh 2002).

Manu ve arkadaşları peroksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişimi, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yoluyla buğday kepeğinden saflaştırmıştır (Manu *et al.* 2009). Kırmızı tatlı biberden elde edilen peroksidaz (POD) enzimini, %30 ve %80 arasında amonyum sülfat fraksiyonu ve Triton X-114 ile ayrılan fazın bir kombinasyonunu kullanarak kısmen saflaştırılmıştır (Serrano *et al.* 2008). Pancarın genetik olarak değiştirilmiş kök kültürleri ile üretilmiş hücre içi peroksidazını (POD), iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat ayrışsal damıtmasının birleşimi kullanılarak saflaştırmıştır (Rudrappa *et al.* 2007). Zeytinden elde ettikleri peroksidaz enzimi elektroforetik homojenlik için saflaştırılmıştır (Saraiva *et al.* 2007).

Aynı zamanda peroksidazların önemli bir kaynağı Horseradish bitkisinin kökleridir. Horseradish kök yumruları genellikle peroksidaz üretimi için ticari bir kaynak olarak kullanılmaktadır (Yamada *et al.* 1987). Farklı POD enzim türlerinin varlığı, potansiyel endüstriyel proseslerin ve yeni analitik metotların oluşmasına yol açmaktadır (Gülçin and Yıldırım 2005).

Belcarz *et al.* (2008) peroksidaz enzimini lahanadan kısmen saflaştırmış ve izole etmiştir. POD için optimum pH 6,0 bulunmuştur. POD için optimal sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur. Peroksidazlar 4°C’de 4 hafta depolanma süresince tamamıyla aktivite göstermektedir ki, ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM) ve o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM)’e ait K_m değerleri için guaiacol (6,41 ve 13,89 mM)’den daha düşük değerlere sahiptir (Vıtalı *et al.* 1998). POD enziminin saflaştırıldığı bu çalışmalara örnek olarak karalahanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), ıspanak yapraklarından (Köksal 2011), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), arpadan (Kristensen 1999), ısırgan otundan (Gülçin 2002), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990), pamuktan (Triplett and Mellon 1992), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), bürüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987), domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), havuçtan (Nair *et al.* 1996), portakaldan (Clemente 1998), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002), çilekten (Civello *et al.* 1995), at turpundan (Lavery *et al.* 2010), mısırdan (Mika *et al.* 2008), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007) ve papaya meyvesinden (Pandey *et al.* 2012) yapılan saflaştırma çalışmaları verilebilir.

Peroksidaz ve polifenol oksidaz enziminin birbirleriyle olan ilişkisiyle ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada kestane çekirdeğinden ilgili enzimler saflaştırılmıştır. PPO ve POD enzimleri, DE-52 anyon-değişim kromatografisi tekniğiyle amonyom sülfat (30-80 g/100mL arası) çöktürmesi yapılarak enzimlerin aktiviteleri PPO ve POD için sırasıyla 4,6 ve 9,52 kat artırdığını bulmuşlardır. PPO ve POD enzimlerinin spesifik aktiviteleri ise sırasıyla 1,375 ve 16,500 EU/mg protein olarak bulunmuştur. SDS PAGE yöntemini kullanılarak PPO ve POD enzimlerin moleküler kütlesi sırayla 32,5 kDa ve 30,3 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzimler katekol ve 2-hidroksi fenol substratlarını kullanarak iki enzim için optimum pH değeri 7,0; optimum sıcaklık değeri ise saflaştırılmış PPO ve POD enzimleri için sırasıyla 40°C ve 50°C olarak bulunmuştur. Bu çalışmada PPO enzimi için katekol en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Gong *et al.* 2015).

Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında karaturp, şalgam ve diğer bitki çeşitleri üzerinde de birçok çalışma mevcuttur. Bu anlamda Türk karaturpundan (*Raphanus sativus* L.) peroksidaz enzimi (Şişecioğlu *et al.* 2010), japon turpu (*Raphanus sativus* L.) köklerinden askorbat peroksidaz enzimi (Ohya *et al.* 1997) saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Karalahanadan (*Brassica oleracea*) POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat ve %33 verimle (Gülçin 2005), karnabahardan POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) 19,33 kat ve %0,2 verimle (Köksal and Gülçin 2008) saflaştırılmıştır. Kırmızı lahanada afinite kromatografisini kullanarak 120 kat ve %2.9 verimle (Somtürk *et al.* 2014). Yabani sinamekinden peroksidaz saflaştırılmıştır (Vitali *et al.*1998). Marul mahsülünden elde ettiği peroksidaz enzimi, Sefadeks G-100 jel filtrasyonu, DEAE - iyon değişimi ve Triton X-114 içindeki faz ayrımı, sıcaklığın bir kombinasyonu yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Mdluli *et al.*2005). Kavun meyvesinden kısmen kavun peroksidazı anyon-değişim kromatografisi yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Rodriguez *et al.* 2000). Hurma yaprağı yağından elde edilen peroksidaz (POD) enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi ve moleküler dışlama kromatografisi yoluyla saflaştırılmıştır (Deepa *et al.* 2002).

Karaturpun (*Raphanus sativus* L.) dışında diğer turp çeşitleri ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilki, antioksidan enzimlerin turp (*Raphanus sativus* L.) dokularındaki kadmiyuma verdiği tepkilerin incelenmesidir (Vitoria *et al.* 2001). Çin turpunun (*Raphanus sativus* L.) besin kalitesi araştırılmıştır (Zhao-liang *et al.* 2008). Turp (*Raphanus sativus* L.) içindeki arsenatın alınımı, taşınımı ve dönüşümü araştırılmıştır (Smith *et al.* 2008). Başka bir çalışmada ise Avusturalya'da farklı sezonlar içinde yetiştirilen beyaz turpun (*Raphanus sativus* L.) keskinlik seviyeleri incelenmiştir (Coogan *et al.* 2001). Jing ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çin kırmızıturp (*Raphanus sativus* L.) köklerinde antosiyanin ve glukosinolat oluşumu araştırılmıştır (Jing *et al.* 2012). Diğer bir çalışmada ise İspanyol karaturpunun (*Raphanus sativus* L.) sulu ekstraktının detoksifikasyon özelliği incelenmiştir (Hanlon *et al.* 2009).

Peroksidaz üzerine yapılan en son saflaştırma yönteminde ise afinite kromatografisinde 4-amino benzohidrazid ligand olarak kullanılmıştır (Kalin *et al.* 2014). Yapılan çalışmada şalgam ve karaturptan peroksidaz enziminin tek basamakta saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Karaturp için 40,3 kat saflaştırma ve %10,6 verime; şalgam için ise 269,3 kat saflaştırma ve %9 verime ulaşılmıştır (Kalin *et al.* 2014).

Literatürlerden özetle görüleceği gibi; bitki peroksidazlarının saflaştırma yöntemleri üzerine birkaç örnek hariç, en az iki kromatografik yöntemle başvurulmuş ve sadece tek bir bitki için spesifik kullanılmıştır. Yine bu çalışmalardan görüleceği gibi saflaştırma verimleri yüzde 02 – 70 arasında değişmektedir. Aromatik bir hidrazin kullanılarak karaturp ve şalgam POD enziminin tek basamakta saflaştırılması ise sadece tek bir literatürde gösterilmiştir. Literatürde birden fazla bitki peroksidazını saflaştıracak ne yeni bir afinite jeli, ne de yeni bir ligand molekülü üzerine bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Var olan çalışmalarda ise saflaştırma katsayısı ve % verim ticari kullanıma uygun değildir.

2.1. Çalışmanın Amacı

Bitki peroksidazları üzerine birçok saflaştırma prosedürü vardır. Daha önceki çalışmalarda 4-amino benzohidrazid peroksidaz inhibitörü olarak bulunmuş ve afinite jeli hazırlanarak enzimin saflaştırılması yapılmıştır. Bu tez kapsamında ise enzimin aktivitesi üzerine 3-amino benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid, 5-amino 2-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-amino 2 metil benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri çalışıldı ve inhibisyon etkisi gösteren benzohidrazid türevlerinden afinite jelleri hazırlandı. Afinite jellerinden peroksidaz enzimi karaturp saflaştırılarak önceki çalışmalardaki sonuçlarla mukayesesi yapıldı. Peroksidaz enziminin daha yüksek verimle saflaştırılması amacıyla bulunan yeni bir benzohidrazid türevi karaturp peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında yeni bir yöntem olarak sunuldu ve diğer bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasına da ışık tutacak kapasiteye sahip olduğu belirlendi. Karaturp POD saflaştırma çalışmalarımızın

tek basamakta ve uygun maliyetle olması ticari bir kullanım potansiyeli ortaya çıkardı. Bu tez kapsamında;

3-Amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak karaturp peroksidaz enzimi saflaştırıldı, daha sonra saflaştırılan peroksidaz enzimi üzerine sentezlediğimiz 3-amino benzohidrazid ve turevlerine inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu molekullein K_i , IC_{50} değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. İnhibisyon gösteren moleküllerin Sepharose-4B matriksi kullanılarak afinite jelleri hazırlandı.

Hazırlanan afinite jellerinden karaturp peroksidaz enzimi saflaştırıldı ve daha önce saflaştırılan 4 –amino benzohidrazid afinite kolonu ile mukayese edildi. En iyi kolon için kolon kapasitesi parametresi çalışıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, Guaiakol, Standart serum albumin, Sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Diyaliz torbası, Sodyum karbonat, 3-amino benzohidrazid, Hidrojen peroksit, Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Sodyum klorür, Glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol, Dikloro metan, Etil asetat, Sodyum Nitrit, %64 Hidrazin monohidrat, Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum dodesilsülfat (SDS) Sodyum perklorat, Sodyum azotür, Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, L-Tirozin, Fosforik asit, İzoproponal E. Merk AG'den; Potasyum fosfat, Sodyum hidroksit, Triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den; β -merkaptotanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den 3 amino benzohidrazid, 5-amino 2-metil metilbenzoat, 3-amino 5-metil metilbenzoat, 3-amino 4-nitro metilbenzoat, 3-amino 2-metil metilbenzoat Fluorochem firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma süresince aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı.

Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1800
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
pH metre	: Mettler Toledo Seven Compact
Otomatik pipet	: Eppendorf
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
NMR	: Bruker 400 MHz
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Afinite kolonu	: Sigma
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolapları	: Samsung
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Samsung
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo
Rotary Evaporatör	: Heidolph
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Tez kapsamında yapılan biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler:

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirilmesi reaksiyonunda: 0,1 M NaHCO_3 (pH 9,0) çözeltisi kullanıldı: 1,68 g (0,01 mol) NaHCO_3 150 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 9,0 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.
2. Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 3-amino benzohidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi işleminde: 0,2 M NaHCO_3 (pH 8,8) çözeltisi kullanıldı: 0,42 g (0,005 mol) NaHCO_3 25 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 8,8 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 50 mL'ye tamamlandı.
3. Sepharose-4B-L-Tirozin-3-amino (R_1 , R_2) benzohidrazid afinite jellerinin yıkanması işleminde: 10 mM NaH_2PO_4 pH 6,8 kullanıldı. 3 g (0,025 mol) NaH_2PO_4 , 200 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, toplam hacim suyla 250 mL'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. Afinite kolonlarının dengelenmesinde: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) kullanıldı. 2,84 g ($1 \cdot 10^{-1}$ mol) NaH_2PO_4 , 1800 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 2 L'ye tamamlandı

2. Afinite kolonlarının yıkanmasında: 25 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) tamponu kullanıldı. 2,84 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 750 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 800 mL'ye tamamlandı

3. POD enziminin elüe edilmesinde: 1 M NaCl içeren 25 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) kullanıldı. 11,7 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 150 mL suda çözüldü. 1,42 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti

1. Karaturpdan homojenat elde edilmesinde: 0,3 M KH_2PO_4 (pH 7,0) tamponu kullanıldı. 12,24 g KH_2PO_4 , 260 mL suda çözüldü. 1N NaOH ile pH 7,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 300 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. POD enzimi aktivite ölçümünde: 0,1 M KH_2PO_4 (pH 6,0) tampon çözeltisi kullanıldı. 4,08 g KH_2PO_4 , 260 mL suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH 6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 300 mL'ye tamamlandı.

2. Substrat çözeltisi: 45 mM Guaiakol çözeltisi kullanıldı. 1494 μL guaiakol alınarak son hacim 300 mL'ye tamamlandı.

3. Substrat çözeltisi: 22,5 mM H_2O_2 çözeltisi kullanıldı. Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk H_2O_2 'den 684 μL alınarak suyla 300 mL'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Proteinlerin kantitatif tayininde Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi kullanıldı. 50 mg Coomassie brilliant blue G-250, 25 mL %95'lik etanol içerisinde çözöldü, bu çözeltiye %95'lik 50 mL fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin hacmi saf su ile son hacim 500 mL olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Bakır reaktifi; %0,5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve %1 sodyum-potasyum tartaratın 1,0 mL'si %2 sodyum karbonat ihtiva eden 50 mL 0,1M NaOH içine katılarak hazırlanır. Protein çözeltisi (0,5mL), 5,0 mL alkali bakır reaktifine katılır ve çözelti 10 dk inkübe edilir. Daha sonra 0,5mL Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş) hızlıca katılır ve karıştırılır. Bu çözelti 30 dk inkübe edilir ve absorbansı 660 nm 'de ölçölür. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

Elektroforezde kullanılan çözeltiiler:

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8): 36,3 g Tris, 260 mL suda çözöldü. 1 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanıp, toplam hacim suyla 300 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8): 36,3 g Tris, 260 mL suda çözöldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanıp, toplam hacim suyla 300 mL'ye tamamlandı.
3. Numune tamponu: 1,3 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 6 mL %10'luk SDS ve 3 mL %100'lük gliserin, 2 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim su ile 20 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan önce 1000 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

4. Yürütme tamponu: 4,53 g Tris ve 22,53 g glisin, 1250 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 15 mL %10'lık SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 1500 mL'ye tamamlandı.

5. Coomassie brilliant blue boyasında kullanılan çözeltiler;

a. Renksizleştirme çözeltisi: %7,5 asetik asit %5 metanol ve %87,5 destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

b. 0,66 g coomassie brilliant blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Stabilizasyon çözeltisi: 120 mL su, 60 mL %96'lık etanol, 20 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.

2. Redüksiyon çözeltisi: 14,4 g sodyum asetat, 135 mL etanol ve 240 mL saf su karıştırılıp, pH 6,0'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 450 mg sodyum tiyosülfat, 9 mL glutaraldehit eklenip su ile 450 mL'ye tamamlandı.

3. Boyama çözeltisi: 300 mg gümüş nitrat, 300 mL suda çözülüp üzerine 90 µL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.

4. Yıkama Çözeltisi 1: 11,25 g sodyum karbonat, 810 mL suda çözüldü ve üzerine 360 µL formaldehit ilave edildi.

5. Yıkama çözeltisi 2: 1 ml gliserin ve 250 ml'lik % 5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlar kuvarz küvetlere konuldu. Spektrofotometrede, proteinin içinde bulunduğu tamponun köre karşı absorbansları ölçüldü.

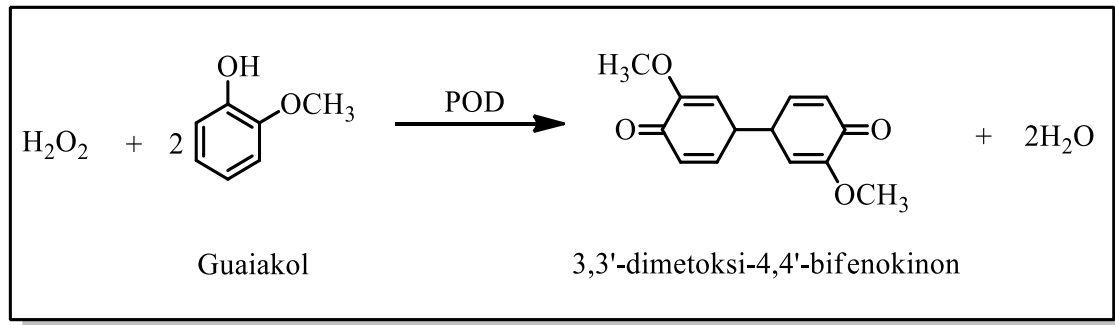
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Homojenattaki ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları Bradford metoduna göre belirlendi. Negatif yüke sahip olan ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanıldı. Bu boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 μg arası). Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μL konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak protein numunesinin içinde bulunmadığı tampondan, ölçüm için ise 0,1 mL protein çözeltisi ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden oluşan karışımlar kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μg

protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri üç ayrı tüpe 100, 250 ve 500 µl alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5'er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem üç defa tekrarlanarak üç ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi. (Bradford 1976).

3.2.2. Karaturp Peroksidaz aktivitesi tayini

şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre Karaturp Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, H₂O₂ tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanır (şekil 3.1) (şişecioğlu *et al.* 2010).



şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme mekanizması

Reaksiyon enzim çözeltisinin ilavesiyle başlatıldı ve 3 dakika süresince oda sıcaklığında 470 nm'de absorbans artışı spektrofotometrede 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak ölçüldü.

Karaturp Peroksidaz enziminin aktivitesini tayin etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad c = A/\epsilon \cdot b \quad V = c \cdot D_f$$

A = Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon ($\mu\text{mol/mL}$)

ϵ = Ekstinksiyon kat sayısı ($5000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

D_f = Seyreltme katsayısı

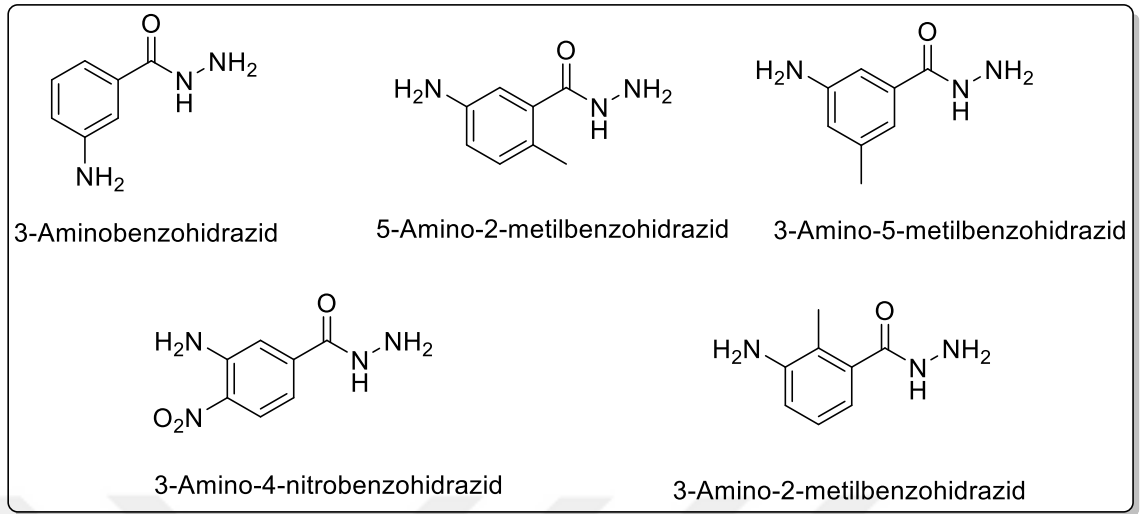
V = Reaksiyon hızı ($\mu\text{mol} \times \text{dak. /mL}$)

Substrat olarak guaiakolün kullanıldığı enzim saflaştırma işlemlerinde saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi 20°C 'de 1 dakikada 1 μmol guaiakol'ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3. Karaturp Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1. Ligand seçimi

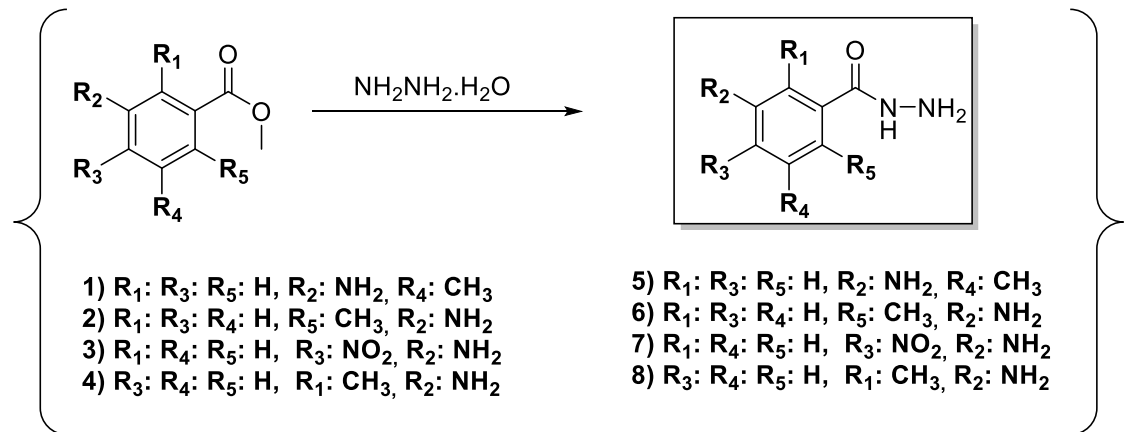
Karaturp enzimi saflaştırmak amacı ile 3-Amino benzohidrazid satın alındı. Ayrıca 5-Amino 2-metil metilbenzoat, 3-Amino 5-metil metilbenzoat, 3-Amino 4-nitro metilbenzoat, 3-Amino 2-metil metilbenzoat maddeleri de satın alındı ve bu dört molekülün hidrazin formları tarafımızca sentezlendi. Bu moleküllerin ligand olarak kullanılabilirliği incelendi. İnhibisyon çalışmaları yapıldı. Sentezlenen bu moleküller diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olduklarından dolayı karaturp'un afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında kullanıldı.



Şekil 3.2. Karaturp Peroksidaz inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller

3.3.2. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

Ticari olarak satın alamadığımız 5-Amino 2-metil benzohidrazid, 3-Amino 5-metil benzohidrazid, 3-Amino 4-nitro benzohidrazid, 3-Amino 2-metil benzohidrazid bileşiklerinden, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.



Şekil 3.3. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması

3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezleri (Hiroshi *et al.* 2012) yönteminde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda 3-Amino metil benzoatlar (1, 2, 3, 4) (3

mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon tamamlanıncaya kadar geri soğutucu altında ısıtılarak (Reaksiyon TLC ile takip edildi) çözücü uzaklaştırıldı. Katı pellet etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı ve oluşan beyaz kristaller süzgeç kağıdı yardımıyla ayrıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Böylece 3-Amino benzohidrazid türevi olan 4 molekül (5, 6, 7, 8) sentezlenmiş oldu. Karakterizasyonları H^1 -NMR yöntemiyle doğrulandı.

3.3.3. İnhibitör çalışmaları

3.3.3.a. 3-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

Literatürde önceden sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-3-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan karaturp enzimi üzerine çalışılması planlanan, 3-aminobenzohidrazid ve sentezlediğimiz 3-Amino 5-metil benzohidrazid (5), 5-Amino 2-metil benzohidrazid (6), 3-Amino 4-nitro benzohidrazid (7) 3-Amino 2-metil benzohidrazid (8) inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. İnhibitör ihtiva etmeyen ortamda yapılan aktivite ölçümü kontrol olarak kabul edilerek aktivite %100 olarak kabul edildi. Her bir deney üç kez tekrar edildi. İnhibisyon etkisi gösteren 3-Amino benzohidrazid ve türevlerinin IC_{50} (enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değerleri % Aktivite-[İnhibitör] grafiğinden bulundu. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerlerinden faydalanılarak Linewaver-Burk grafikleri çizildi ve K_i değerleri tespit edildi.

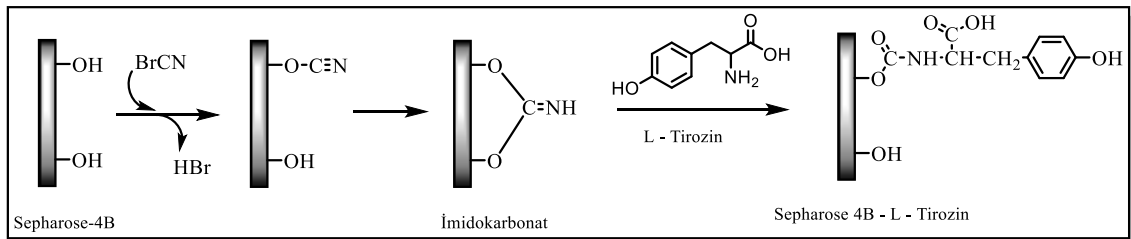
3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanılarak afinite jeli hazırlandı. L-tirozin uzantı kolu bu kolon materyaline kovalent olarak bağlandı. Sepharose 4-B-L-Tirozin jel materyaline, ligand olarak 3-Amino benzohidrazid, 5-Amino 2-metil benzohidrazid, 3-

Amino 5-metil benzohidrazid, 3-Amino 4-nitro benzohidrazid, 3-Amino 2-metil benzohidrazid diazollanarak tirozin'deki benzen halkasının 3 ve 5 pozisyonuna kenetlendirildi. Hazırlanan afinite jelinde Sepharose 4-B; matriksi, tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitörler ise enzimin spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 300 mL soğuk su ile yıkanarak 0,1 M NaHCO_3 tamponu (pH=10) ile bir behere aktarıldı. Kullandığımız aynı tamponun 50 mL'sinde 70 mg tirozin çözülerek çözelti Sepharose 4-B ile aynı behere aktarıldı ve reaksiyon başlatıldı. 4°C 'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 16 saat boyunca 4°C 'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile jel yıkandı, böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 300 mL 0,2 M NaHCO_3 (pH=8,8) tamponu ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.4'te verilmiştir.



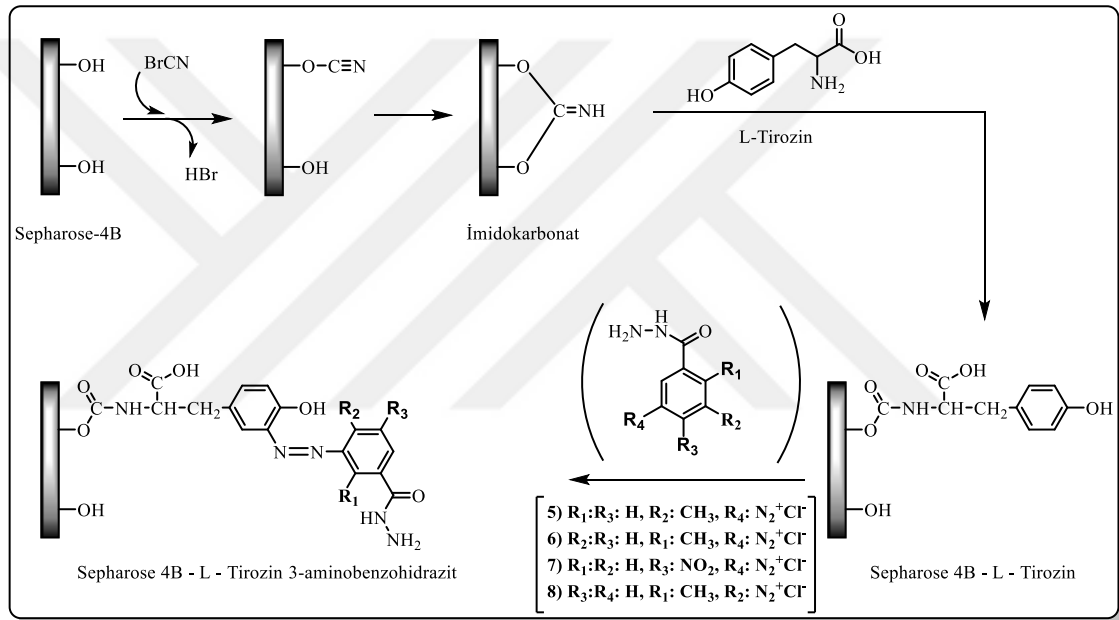
Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılma reaksiyonu

3.3.4.b. 3-Aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi

3-Amino benzohidrazid ve (türevi olan 4 molekülün her birinden) 100'er μmol alınarak 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 20 mg NaNO_2 bulunan 0°C 'deki 5 mL çözelti, inhibitör çözeltisine damla damla reaksiyon çözeltisine eklendi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-

L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak ve sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 100 mL, 10 mM KH_2PO_4 (pH=6,8) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).

Hazırlanan 3-Amino benzohidrazid (türevi) afinite jelleri için reaksiyon mekanizmaları Şekil 3.5'te gösterildi.



Şekil 3.5. 3-Amino benzohidrazid ve türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu

3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

pH=6,8 olan KH_2PO_4 dengeleme tamponu içine hazırlanmış olan jeller alınarak süspanse edildi. Su trombu kullanılarak vakum ile sistemin havası alındı. 1×10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona, süspanse edilen jel paketlendi. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponu kullanılarak peristaltik pompa yardımıyla yıkandı. Kolonun dengelenmiş olup olmadığını anlamak için eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının eşitlenmiş olmasına bakıldı.

3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Karaturp bitkisinin homojenatları 10 mM fosfat (pH=6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolonlara tatbik edildi. Kolonlar 500 mL 25 mM fosfat (pH=6,8) çözeltisi ile yıkandı. Böylece Karaturp Peroksidaz enzimi kolona tutunmuş oldu ve bu şekilde diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH=6,8) tamponu tatbik edilerek Karaturp Peroksidaz enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'deki absorbans değeri köre karşı ölçüldü. Toplanmış olan elüatlardan absorbans gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 470 nm'de Karaturp Peroksidaz aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi

Karaturp enzimi her bir afinite kolonundan saflaştırıldıktan sonra diyaliz edildi. Daha sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) ile saflaştırılan enzimin saflık derecesi ve molekül ağırlığı kontrol edildi. Standart olarak ise molekül ağırlığı belirlenmiş olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bunun için elektroförez plakaları önce su sonra alkol ile yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 20 mL 1 M Tris-HCl (pH: 8,8), 17,6 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,8 mL %10 SDS, 0,52 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 12,52 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,8 mL %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 1,64 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1,6 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,12 mL %10'luk SDS, 0,12 mL %5'lik TEMED ve 9,8 mL saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine %10'luk PER'den 0,4 mL ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar enjektörle döküldü. Hava almamasına dikkat edildi. Jelin donması için bir süre beklendi. Ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığıma jeli hazırlandı. Yığıma jeli tarağın üst seviyesine kadar ilave edildi. Üzerine tarak yerleştirildikten sonra jelin kuruması için beklendi ve sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına konuldu. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu eklendi. Numuneler her birinde 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numuneler soğutulurken, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 90 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 130 volta çıkarılarak 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

Elektroforez bitince cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle muamele edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi ve bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

Hazırlanan afinite jellerinin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi:

Hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden peroksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan peroksidaz enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden peroksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.5.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

Peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için hazırlanan kolonda, sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8'de, 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlendi ve mg protein /g jel başına grafik edildi.

3.5.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

Peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH'sı 5,5 ile 9 arasında) tamponlar kullanıldı. En uygun pH için sonuçlar mg protein /g jel başına grafik edildi.

3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

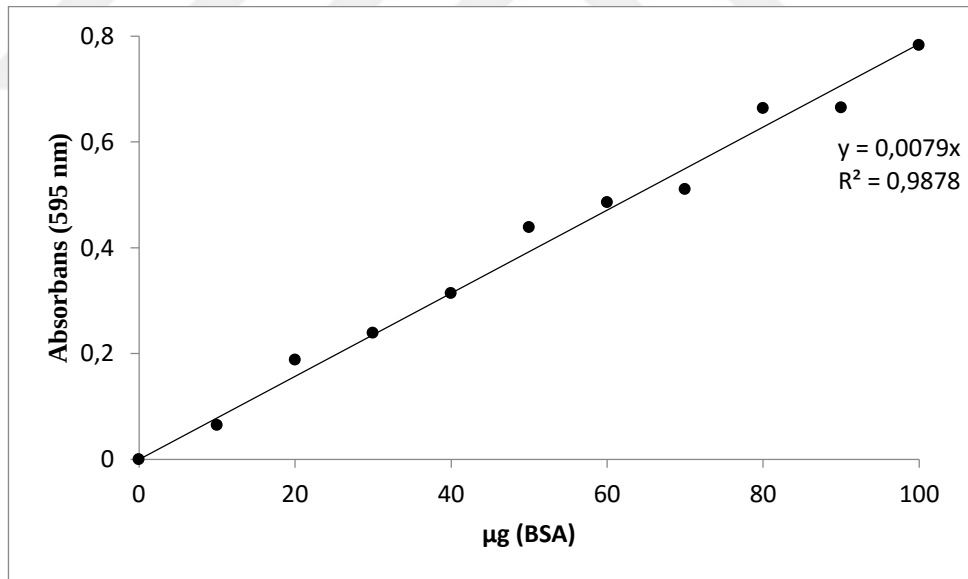
Peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı. Bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek, sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karaturp Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Karaturp bitkisinden hazırlanan homejenatlar ve afinite kolonlarından saflaştırılan POD enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Karaturp bitkisinin homojenatları ve afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



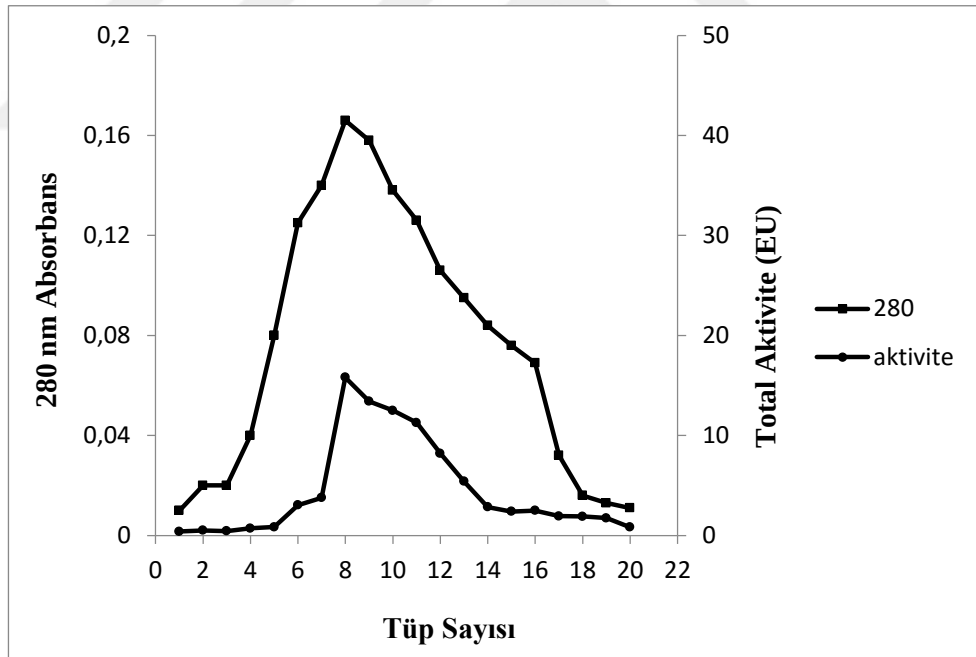
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

*Protein miktarı (BSA: Bovine Serum Albumini)

4.2. Karaturp Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Karaturp POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Karaturp bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5'er mL Bölüm 3.3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan dengelenmiş olan 3-Aminobenzohidrazid kolonuna pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 35 mL/saat'e ayarlanarak 1,5'er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. 280 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2'de verildi. Absorbans gösteren tüplerin 470 nm'de aktivitelerine bakıldı. 470 nm'de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doymun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. 3-Amino benzohidrazid kolonundan Karaturp POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik

4.2.2. Karaturp POD enziminin 3-Amino Benzohidrazid Kolonu ile saflaştırma sonuçları

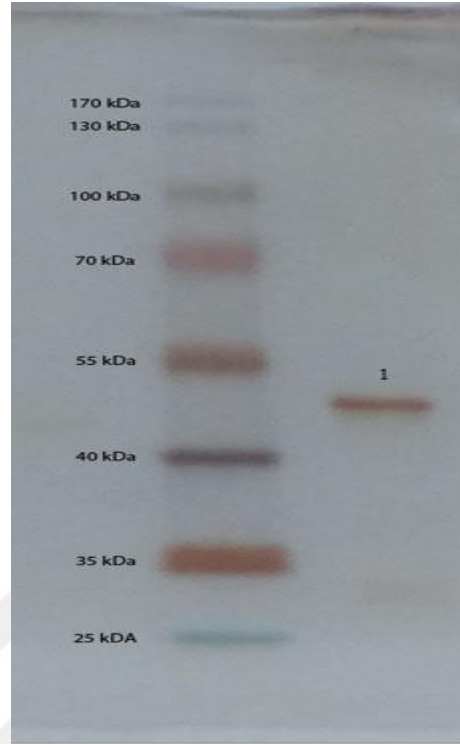
Ligand olarak 3-Amino benzohidrazid molekülünün kullanıldığı kolondan, karaturp bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin saflaştırılması kademesinde 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Karaturp POD enziminin 3-Amino benzohidrazid kolonu ile saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Karaturp enziminin 3-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

Karaturp		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
3-Amino benzohidrazid	Homojenat	6	148,4	1,45	890,4	8,7	102,3	100	1
	Sepharose 4B Afinité	3	35,32	0,0014	105,96	0,0042	25228,5	11,9	246,6

4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu 3-Amino benzohidrazid afinite kolonu kullanılarak karaturp saflaştırılan peroksidaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforez kuyularına sırayla saflaştırılan Karaturp POD’lar ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü. Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı çekildi.



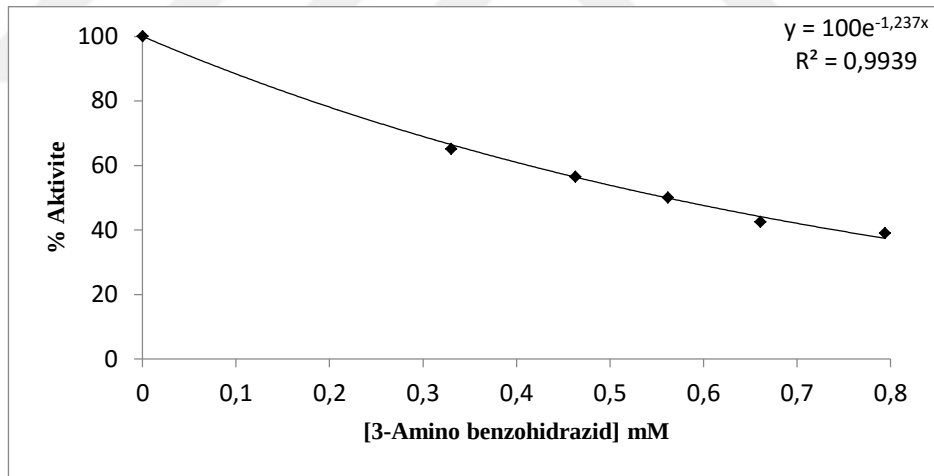
Şekil 4.3. 3-Amino benzohidrazid (1) kolonundan saflaştırılan Karaturp enziminin SDS- PAGE fotoğrafı

4.3. Kullanılan İnhibitörün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları

Bu çalışmada 3-Amino benzohidrazid molekülünden saflaştırılan Karaturp POD enzimi üzerine 3 Amino benzohidrazit türevlerinin inhibisyon etkisi incelendi. Sabit substrat konsantrasyonunda (45mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değeri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürü gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değei bulundu ve Lineawear-Burk grafiğinden K_i değeri tespit edildi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller için afinite jelleri sentezlendi.

Çizelge 4.2. 3-Amino benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

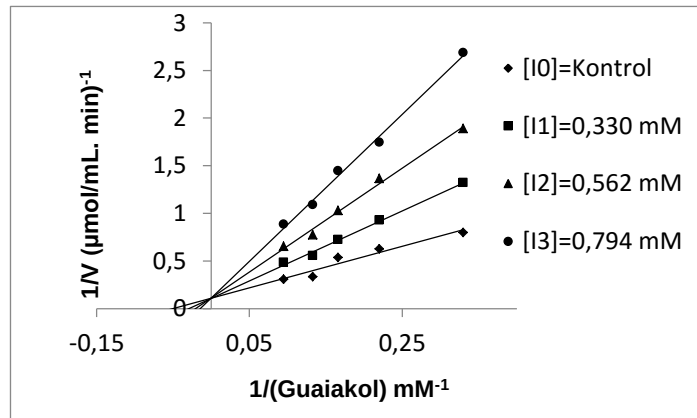
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,015	0,435	0,33	65,11
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,015	0,415	0,463	56,39
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,420	0,5	1,0	1,0	0,08	0,015	0,405	0,562	50
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,015	0,385	0,661	42,44
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,380	0,5	1,0	1,0	0,12	0,015	0,365	0,794	38,95



Şekil 4.4. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino benzohidrazid** inhibitörü ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

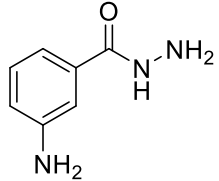
Çizelge 4.3. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino benzohidrazid** inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,785	0,015	0,798	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,685	0,015	0,625	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,585	0,015	0,536	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,485	0,015	0,335	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,385	0,015	0,305	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,05	0,750	0,2	1,0	1,0	0,05	0,735	0,015	1,32	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,650	0,3	1,0	1,0	0,05	0,635	0,015	0,927	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,550	0,4	1,0	1,0	0,05	0,535	0,015	0,722	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,435	0,015	0,556	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,350	0,6	1,0	1,0	0,05	0,335	0,015	0,484	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,085	0,715	0,2	1,0	1,0	0,085	0,700	0,015	1,89	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,085	0,615	0,3	1,0	1,0	0,085	0,600	0,015	1,366	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,085	0,515	0,4	1,0	1,0	0,085	0,500	0,015	1,028	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,085	0,415	0,5	1,0	1,0	0,085	0,400	0,015	0,773	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,085	0,315	0,6	1,0	1,0	0,085	0,300	0,015	0,653	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,12	0,680	0,2	1,0	1,0	0,12	0,665	0,015	2,685	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,12	0,580	0,3	1,0	1,0	0,12	0,565	0,015	1,745	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,12	0,480	0,4	1,0	1,0	0,12	0,465	0,015	1,445	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,380	0,5	1,0	1,0	0,12	0,365	0,015	1,088	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,12	0,280	0,6	1,0	1,0	0,12	0,265	0,015	0,883	0,09



Şekil 4.5. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino benzohidrazid** inhibitörü için edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.4. Karaturp enzimi üzerine **3-Amino benzohidrazid** inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Karaturp POD	IC ₅₀ (μ M)	Ortalama K _i $\pm$ SD (μ M)	İnhibisyon tipi
		560	405 $\pm$ 74	Yarışmalı

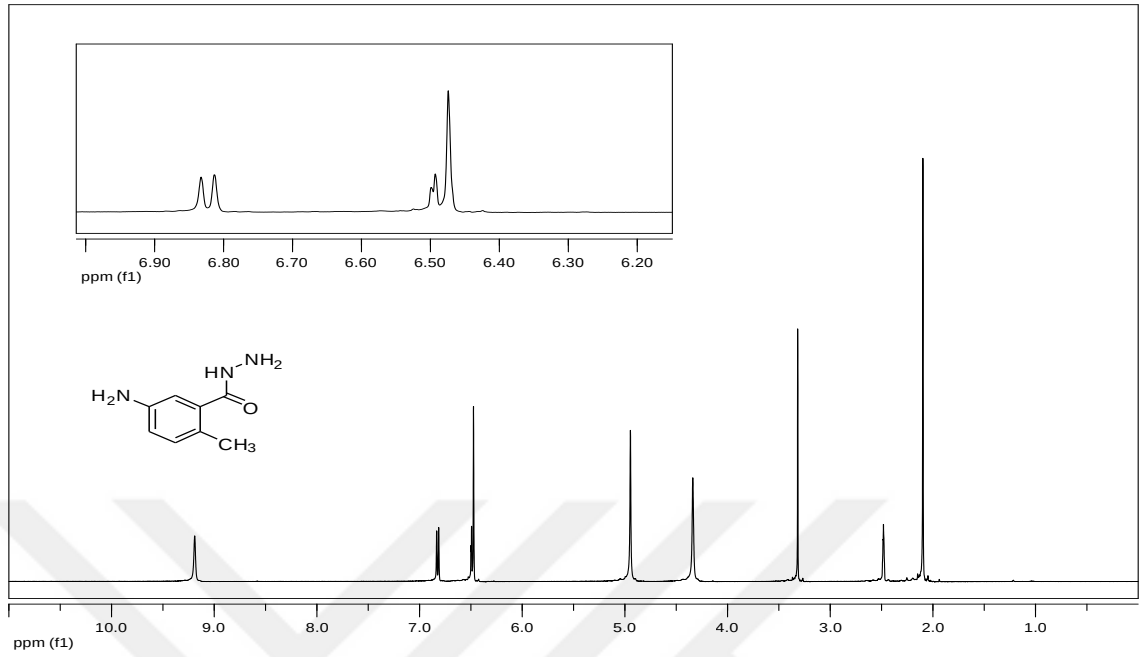
4.4. 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi

3-Amino 5-metil benzohidrazid, 5-Amino 2-metil benzohidrazid, 3-Amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-amino 2-metil molekülleri ticari olarak temin edilemediğinden dolayı bu bileşiklerin metil esterleri kullanılarak bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hidrazin sentezleri yapıldı. ¹H-NMR’la moleküllerin karakterizasyonu doğrulandı.

Çizelge 4.5. 3-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları

Reaktant 1	Reaktant 2	R ₁ /R ₂ mmol	Ürün	Süre	% Verim
3-Amino 5-metil metil benzoat (1)	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 5-metil benzohidrazid (5)	36 saat	45
5-Amino 2- metil metil benzoat (2)	Hidrazin monohidrat	3/12	5-Amino 2-metil benzohidrazid (6)	24 saat	50
3-Amino 4-nitro metil benzoat (3)	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 4-nitro benzohidrazid (7)	24 saat	62
3-Amino 2-metil metil benzoat (4)	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 2-metil benzohidrazid (8)	36 saat	54

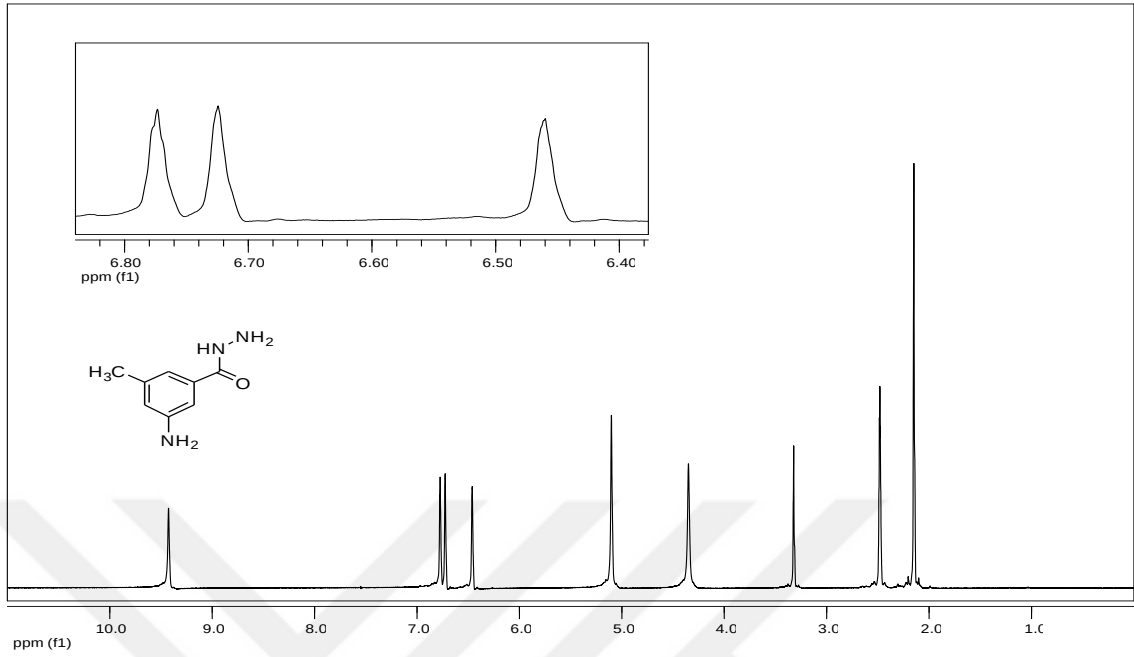
Satın aldığımız 3-Amino 5-metil metilbenzoat, 5-Amino 2-metil metilbenzoat, 3-Amino 4-nitro metilbenzoat, 3-Amino 2-metil metilbenzoat çıkış molekülleri olarak kullanılıp bunların hidrazin formları sentezlendi. Sonuçlar Çizelge 4.5’de ve sentezlenen moleküllerin ¹H-NMR (400 MHz) spektrumları Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9’da gösterildi.



Şekil 4.6. 5-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

5-Amino 2-metil benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

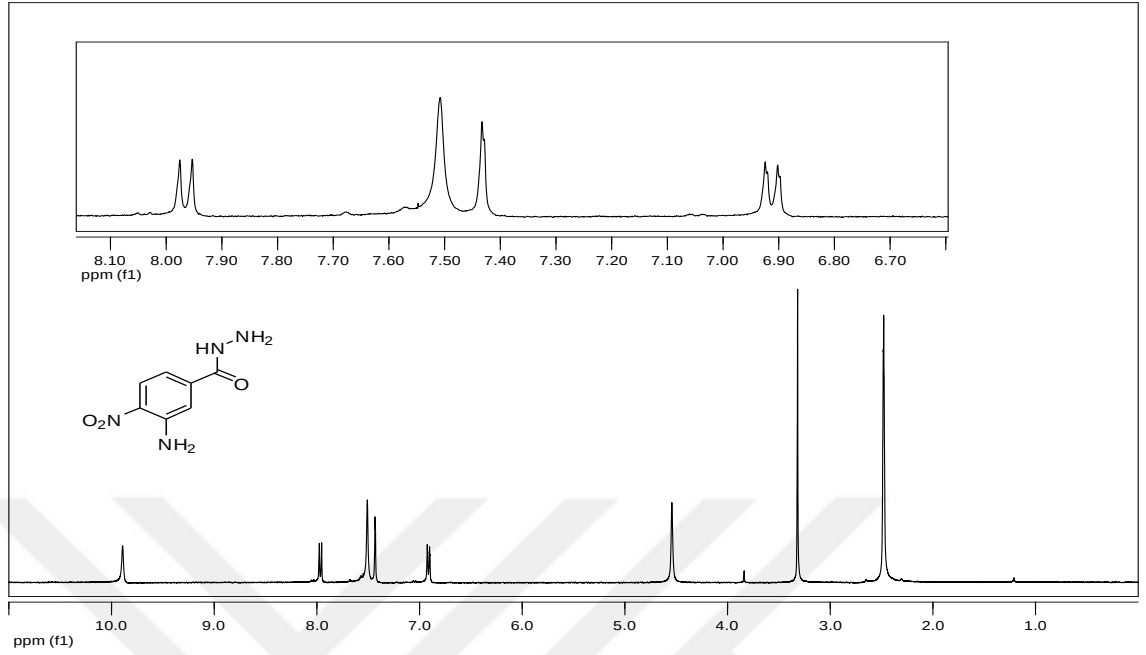
5-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu sonuçları. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 9.19 (bs, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.71 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.36 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.95 (bs, 2H), 4.34 (bs, 2H), 2.10 (s, 3H)



Şekil 4.7. 3-Amino 5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

3-Amino 5-metil benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

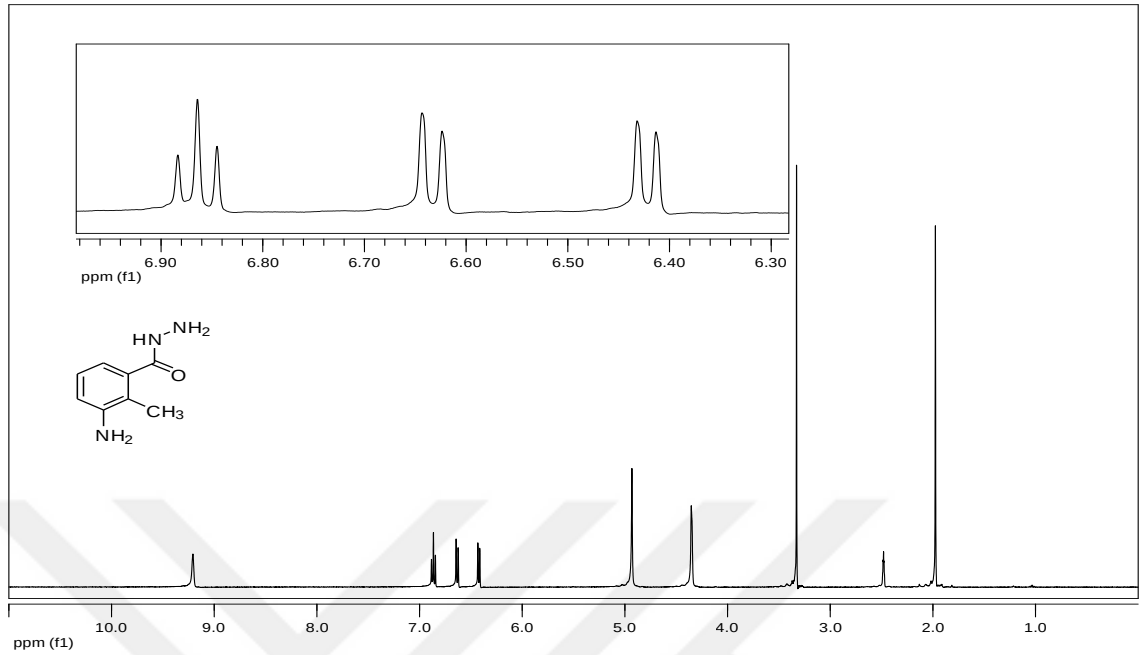
3-Amino 5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu sonuçları. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) □ ppm 9.43 (bs, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.10 (bs, 2H), 4.35 (bs, 2H), 2.15 (s, 3H)



Şekil 4.8. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

3-Amino 4-nitro benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

3-Amino 4-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu sonuçları.
 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) □ 9.89 (bs, 1H), 7.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.51 (bs, 2H), 7.43 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.54 (bs, 2H)



Şekil 4.9. 3-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

3-Amino 2-metil benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

3-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu sonuçları. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) □ 9.21 (bs, 1H), 6.86 (t, *J* = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.93 (bs, 2H), 4.35 (bs, 2H), 1.97 (s, 3H)

4.5. Sentezlenen 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

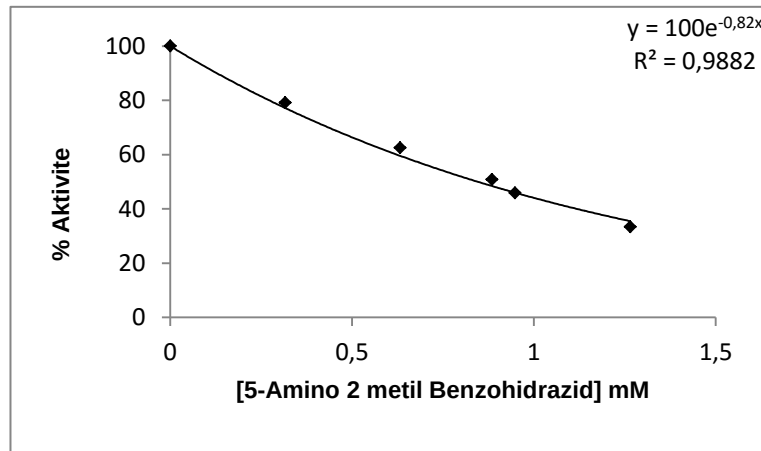
Bu çalışmada sentezlenen 5-Amino 2-metil benzohidrazid, 3-Amino 5-metil benzohidrazid, 3-Amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-Amino 2-metil benzohidrazid moleküllerinin Karaturp POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Guaiakol substratı doygunluğun altında alındı. Böylece reaksiyon hızı guaiakole bağlı olarak bulundu. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (45 mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı

inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değerleri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürleri gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu ve Lineawear-Burk grafiklerinden K_i değerleri tespit edildi.

4.5.1. 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.6. 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

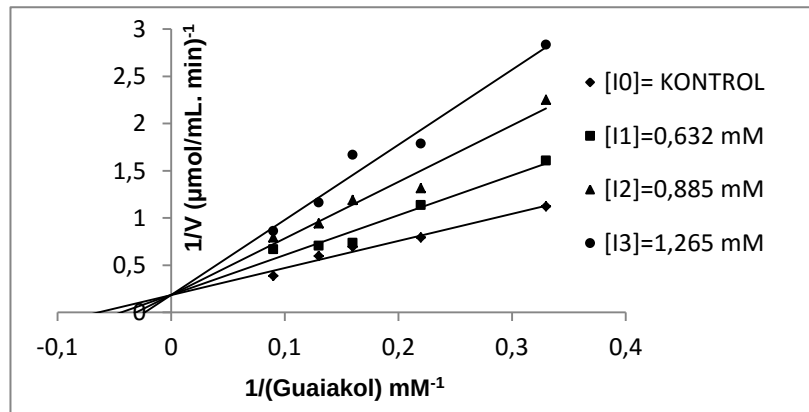
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiaakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiaakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
5-amino 2-metil benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,440	0,316	79,16
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,01	0,390	0,632	62,5
	0,5	1,0	1,0	0,14	0,360	0,5	1,0	1,0	0,14	0,01	0,350	0,885	50,83
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,340	0,948	45,83
	0,5	1,0	1,0	0,20	0,300	0,5	1,0	1,0	0,20	0,01	0,290	1,265	33,33



Şekil 4.10. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 5-Amino 2-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

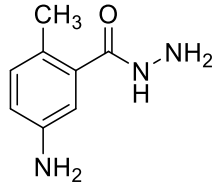
Çizelge 4.7. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

5-Amino 2-metil benzohidrazid	Kör Tüpü					Numune Tüpü						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$)	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	1,123	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,793	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,694	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,595	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,387	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,10	0,7	0,2	1,0	1,0	0,10	0,690	0,010	1,605	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,10	0,6	0,3	1,0	1,0	0,10	0,590	0,010	1,136	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,10	0,5	0,4	1,0	1,0	0,10	0,490	0,010	0,735	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,4	0,5	1,0	1,0	0,10	0,390	0,010	0,704	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,10	0,3	0,6	1,0	1,0	0,10	0,290	0,010	0,666	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,14	0,66	0,2	1,0	1,0	0,14	0,65	0,010	2,252	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,14	0,56	0,3	1,0	1,0	0,14	0,55	0,010	1,315	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,14	0,46	0,4	1,0	1,0	0,14	0,45	0,010	1,19	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,14	0,36	0,5	1,0	1,0	0,14	0,35	0,010	0,943	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,14	0,26	0,6	1,0	1,0	0,14	0,25	0,010	0,793	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,20	0,60	0,2	1,0	1,0	0,20	0,59	0,010	2,834	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,20	0,50	0,3	1,0	1,0	0,20	0,49	0,010	1,785	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,20	0,40	0,4	1,0	1,0	0,20	0,39	0,010	1,666	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,20	0,30	0,5	1,0	1,0	0,20	0,29	0,010	1,162	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,20	0,20	0,6	1,0	1,0	0,20	0,19	0,010	0,862	0,09



Şekil 4.11. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 5-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

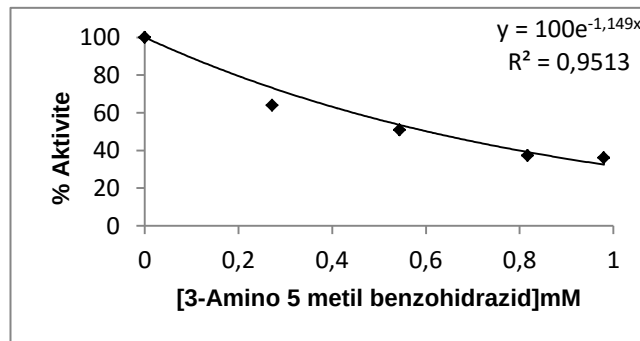
Çizelge 4.8. Karaturp enzimini üzerine **5-Amino 2-metil benzohidrazid** inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Karaturp POD	IC ₅₀ (μ M)	Ortalama K _i $\pm$ SD (μ M)	İnhibisyon tipi
		845	952 $\pm$ 343	Yarışmalı

4.5.2. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.9. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

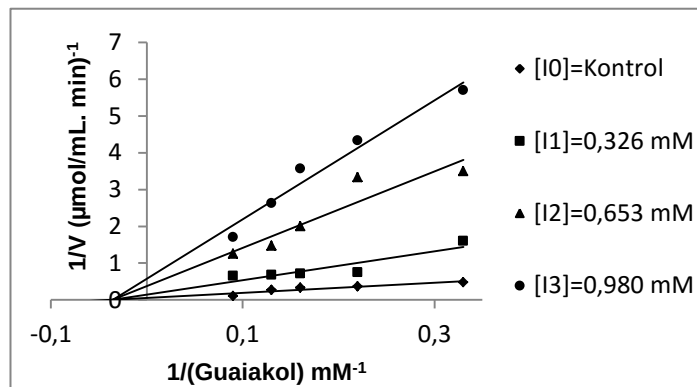
	Kör Tüpü					Numune Tüpü					Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)			
3-amino 5-metil benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,030	0,420	0,272	63,9
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,030	0,370	0,544	50,88
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,030	0,320	0,817	37,27
	0,5	1,0	1,0	0,18	0,320	0,5	1,0	1,0	0,18	0,030	0,290	0,98	36,09



Şekil 4.12. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 5-metil benzohidrazid** ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

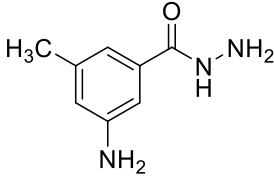
Çizelge 4.10. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 5-metil benzohidrazid** inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$) ⁻¹	$1/S \text{ mM}^{-1}$
3-Amino 5-metil benzohidrazid	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,01	0,48	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,01	0,362	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,01	0,333	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,01	0,27	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,01	0,1	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,06	0,740	0,2	1,0	1,0	0,06	0,730	0,01	1,6	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,640	0,3	1,0	1,0	0,06	0,630	0,01	0,746	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,540	0,4	1,0	1,0	0,06	0,530	0,01	0,714	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,440	0,5	1,0	1,0	0,06	0,430	0,01	0,675	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,340	0,6	1,0	1,0	0,06	0,330	0,01	0,649	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,12	0,68	0,2	1,0	1,0	0,12	0,670	0,01	3,5	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,12	0,58	0,3	1,0	1,0	0,12	0,570	0,01	3,333	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,12	0,48	0,4	1,0	1,0	0,12	0,470	0,01	2	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,38	0,5	1,0	1,0	0,12	0,370	0,01	1,47	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,12	0,28	0,6	1,0	1,0	0,12	0,270	0,01	1,25	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,18	0,62	0,2	1,0	1,0	0,18	0,610	0,01	5,7	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,18	0,52	0,3	1,0	1,0	0,18	0,510	0,01	4,333	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,18	0,42	0,4	1,0	1,0	0,18	0,410	0,01	3,571	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,18	0,32	0,5	1,0	1,0	0,18	0,310	0,01	2,631	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,18	0,22	0,6	1,0	1,0	0,18	0,210	0,01	1,7	0,09



Şekil 4.13. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 5-metil benzohidrazid** inhibitörü için edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

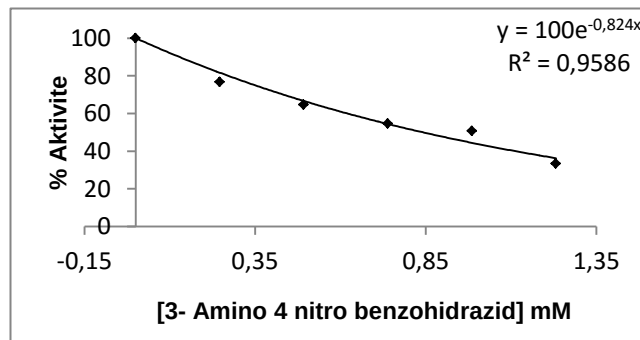
Çizelge 4.11. Karaturp enzimini üzerine **3-Amino 5-metil benzohidrazid** inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Karaturp POD	IC ₅₀ (μ M)	Ortalama K _i $\pm$ SD (μ M)	İnhibisyon tipi
		603	129 $\pm$ 48	Yarışmasız

4.5.3. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.12. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

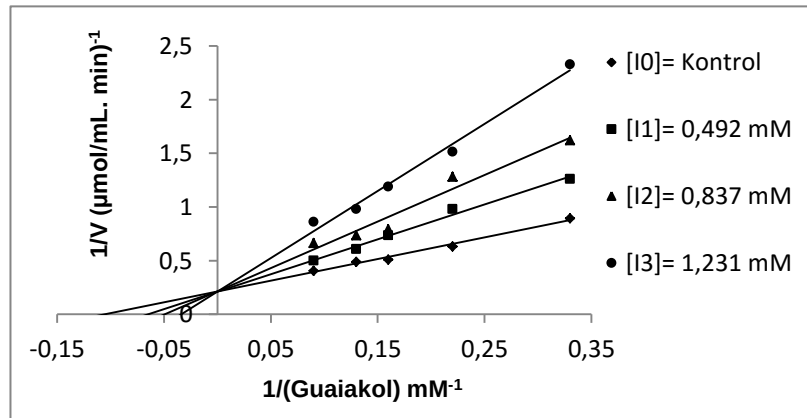
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 4-nitro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,440	0,246	76,66
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,01	0,390	0,492	64,66
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,340	0,739	54,66
	0,5	1,0	1,0	0,20	0,300	0,5	1,0	1,0	0,20	0,01	0,290	0,985	50,66
	0,5	1,0	1,0	0,25	0,250	0,5	1,0	1,0	0,25	0,01	0,240	1,231	33,33



Şekil 4.14. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 4-nitro benzohidrazid** ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

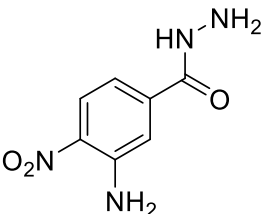
Çizelge 4.13. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 4-nitro benzohidrazid** inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

3-Amino 4-nitro benzohidrazid	Kör Tüpü					Numune Tüpü						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,79	0,01	0,893	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,69	0,01	0,632	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,59	0,01	0,51	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,49	0,01	0,49	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,39	0,01	0,406	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,10	0,700	0,2	1,0	1,0	0,10	0,69	0,01	1,26	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,10	0,600	0,3	1,0	1,0	0,10	0,59	0,01	0,98	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,10	0,500	0,4	1,0	1,0	0,10	0,49	0,01	0,735	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,39	0,01	0,609	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,10	0,300	0,6	1,0	1,0	0,10	0,29	0,01	0,5	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,18	0,620	0,2	1,0	1,0	0,17	0,62	0,01	1,622	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,18	0,520	0,3	1,0	1,0	0,17	0,52	0,01	1,282	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,18	0,420	0,4	1,0	1,0	0,17	0,42	0,01	0,793	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,18	0,320	0,5	1,0	1,0	0,17	0,32	0,01	0,735	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,18	0,220	0,6	1,0	1,0	0,17	0,22	0,01	0,666	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,25	0,550	0,2	1,0	1,0	0,25	0,54	0,01	2,329	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,25	0,450	0,3	1,0	1,0	0,25	0,44	0,01	1,515	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,25	0,350	0,4	1,0	1,0	0,25	0,34	0,01	1,19	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,25	0,250	0,5	1,0	1,0	0,25	0,24	0,01	0,98	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,25	0,150	0,6	1,0	1,0	0,25	0,14	0,01	0,862	0,09



Şekil 4.15. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 4-nitro benzohidrazid** inhibitörü için edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

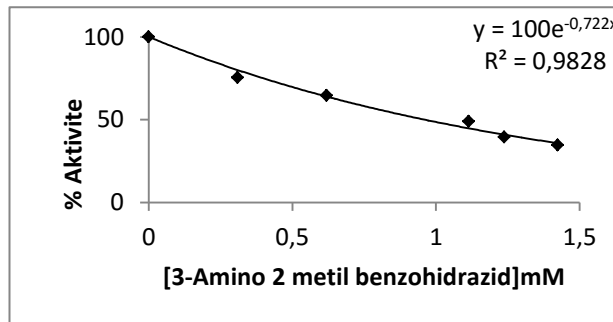
Çizelge 4.14. Karaturp enzimini üzerine **3-Amino 4-nitro benzohidrazid** inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Karaturp POD	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i ± SD (μM)	Inhibisyon n tipi
		841	712 ± 49	Yarışmalı

4.5.4. 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için karaturp POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.15. 3-Amino 2-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

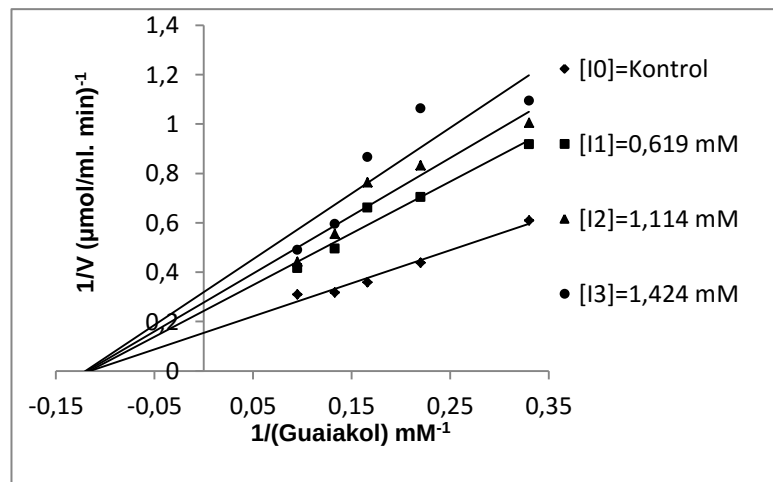
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 2-metil benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,010	0,440	0,309	75,42
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,010	0,390	0,619	64,62
	0,5	1,0	1,0	0,18	0,320	0,5	1,0	1,0	0,18	0,010	0,310	1,114	48,97
	0,5	1,0	1,0	0,20	0,300	0,5	1,0	1,0	0,20	0,010	0,290	1,238	39,45
	0,5	1,0	1,0	0,23	0,270	0,5	1,0	1,0	0,23	0,010	0,260	1,424	34,69



Şekil 4.16. Karaturp enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 2-metil benzohidrazid** ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

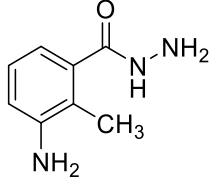
Çizelge 4.16. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 2-metil benzohidrazid** inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
3-Amino 2-metil benzohidrazid	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H_2O_2 (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,609	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,438	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,36	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,318	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,31	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,10	0,700	0,2	1,0	1,0	0,10	0,690	0,010	0,918	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,10	0,600	0,3	1,0	1,0	0,10	0,590	0,010	0,704	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,10	0,500	0,4	1,0	1,0	0,10	0,490	0,010	0,662	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,390	0,010	0,495	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,10	0,300	0,6	1,0	1,0	0,10	0,290	0,010	0,416	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,18	0,62	0,2	1,0	1,0	0,18	0,610	0,010	1,005	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,18	0,52	0,3	1,0	1,0	0,18	0,510	0,010	0,833	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,18	0,42	0,4	1,0	1,0	0,18	0,410	0,010	0,764	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,18	0,32	0,5	1,0	1,0	0,18	0,310	0,010	0,555	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,18	0,22	0,6	1,0	1,0	0,18	0,210	0,010	0,442	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,23	0,57	0,2	1,0	1,0	0,23	0,560	0,010	1,094	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,23	0,47	0,3	1,0	1,0	0,23	0,460	0,010	1,063	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,23	0,37	0,4	1,0	1,0	0,23	0,360	0,010	0,866	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,23	0,27	0,5	1,0	1,0	0,23	0,260	0,010	0,595	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,23	0,17	0,6	1,0	1,0	0,23	0,160	0,010	0,49	0,09

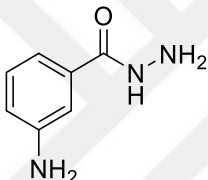
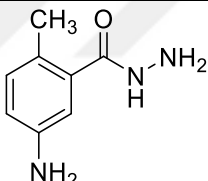
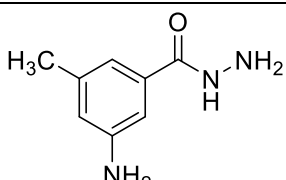
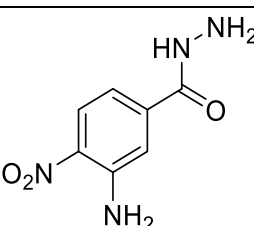
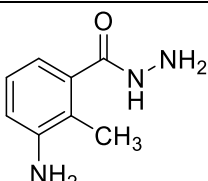


Şekil 4.17. Karaturp enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak **3-Amino 2-metil benzohidrazid** inhibitörü için edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.17. Karaturp enzimini üzerine **3-Amino 2-metil benzohidrazid** inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Karaturp POD	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i ± S.D (μM)	İnhibisyon tipi
		959	1414 ± 355	Yarışmasız

Çizelge 4.18. Karaturp enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	İnhibisyon Tipi
	560	405 ± 74	Yarışmalı
	845	952 ± 343	Yarışmalı
	603	129 ± 48	Yarışmasız
	841	712 ± 49	Yarışmalı
	959	1414 ± 355	Yarışmasız

Karaturp POD Enzimlerinin 3-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

Karaturp POD enzimleri üzerine 5-Amino 2-metil benzohidrazid, 3-Amino 5-metil benzohidrazid, 3-Amino 4-nitro benzohidrazid, 3-Amino 2-metil benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon etkileri incelendikten sonra bu moleküllerin ligand olarak kullanıldığı Sepharose 4-B-L-Tirozin-5-Amino 2-metil benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-3-Amino 5-metil benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-3-Amino 4-nitro benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-3-Amino 2-metil benzohidrazid kolonlarının sentezi bölüm 3.3.4.b’de anlatıldığı gibi yapıldı. Hazırlanan kolonlardan Karaturp bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini yapıldı. Tüm kolonlardan saflaştırılan Karaturp enziminin saflaştırma sonuçları Çizelge 4.19’da gösterildi.

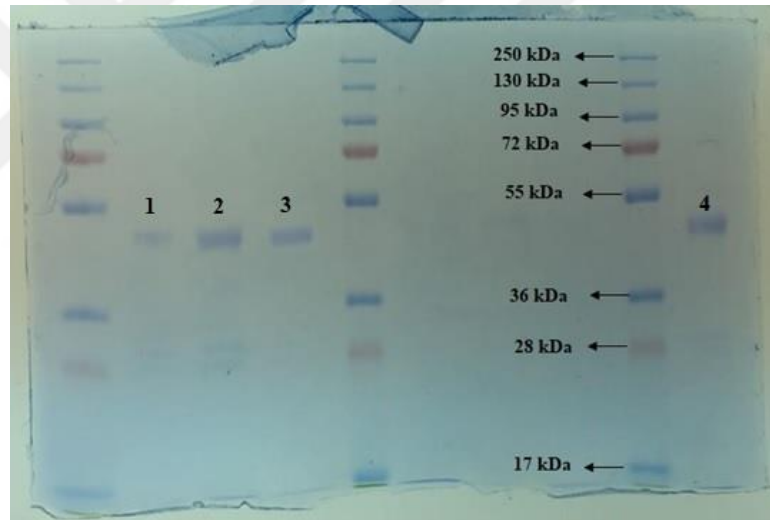
Çizelge 4.19. Afinite kolonlarından elde edilen Karaturp enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

Karaturp		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
5-Amino 2-metil benzohidrazid	Homojenat	6	60,5	1,45	363,1	8,7	41,7	100	1
	Sepharose 4B Afinite	3	52	0,0017	156	0,0051	30588,2	43	733,5
3-Amino 5-metil benzohidrazid	Homojenat	6	126	1,45	756	8,7	86,8	100	1
	Sepharose 4B Afinite	3	15,36	0,0008	46,08	0,0024	19200	6,09	221,2
3-Amino 4-nitro benzohidrazid	Homojenat	6	133,1	1,45	798,6	8,7	91,79	100	1
	Sepharose 4B Afinite	3	38,96	0,0017	116,88	0,0051	22917,6	14,6	249,6
3-Amino 2-metil benzohidrazid	Homojenat	6	102,2	1,45	613,2	8,7	70,5	100	1
	Sepharose 4B Afinite	6	21,9	0,0018	131,4	0,0108	12166,6	21,4	172,5

4.6. Karaturp Peroksidaz Enzimi Üzerine SDS-PAGE ve Kinetik Çalışma Sonuçları

4.6.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Sentezlediğimiz molekülleri kullanarak hazırladığımız Sepharose 4-B-L-Tirozin-(**5, 6, 7, 8**) afinite jellerinden saflaştırdığımız karaturp enziminin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Jellerin boyanmasında commasie boyama metodu tercih edildi. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE fotoğrafları Şekil 4.18’de gösterildi.



Şekil 4.18. (1) 3-Amino 5-metil benzohidrazid, (2) 5-Amino 2-metil benzohidrazid, (3) 3-Amino 4-nitro benzohidrazid, (4) 3-amino 2-metil benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

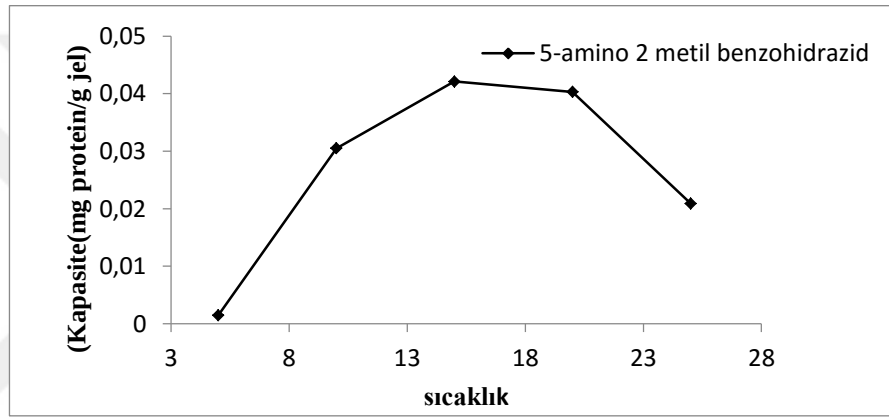
4.7. 5-Amino 2-metil Benzohidrazid Molekülü Kullanılarak Hazırlanan Afinite Kolonunun Karaturp POD Enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Çizelge 4.19 dan görüleceği gibi safalaştırma katsayısı en yüksek olan ve ticari kullanım kapasitesine sahip en iyi kolon 5-Amino 2-metil Benzohidrazid olup bu koln için POD

enzimini tutma kapasitesi belirlendi ve bu amaçla sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Deney prosedürü bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde uygulandı.

4.7.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

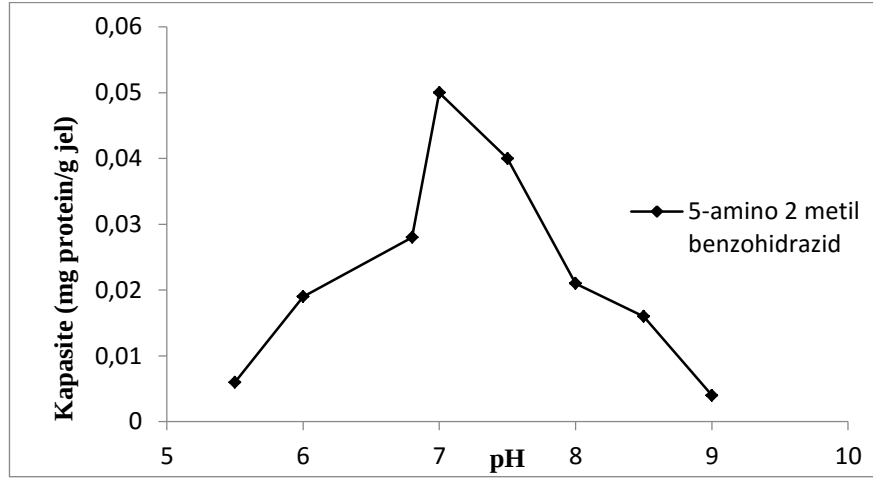
pH:6,8’de Karaturp POD farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel) sonuçlar Şekil 4.19’da verildi.



Şekil 4.19. Sepharose-4B-5-Amino 2-metil benzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.7.2. pH’nın kolon kapasitesine etkisi

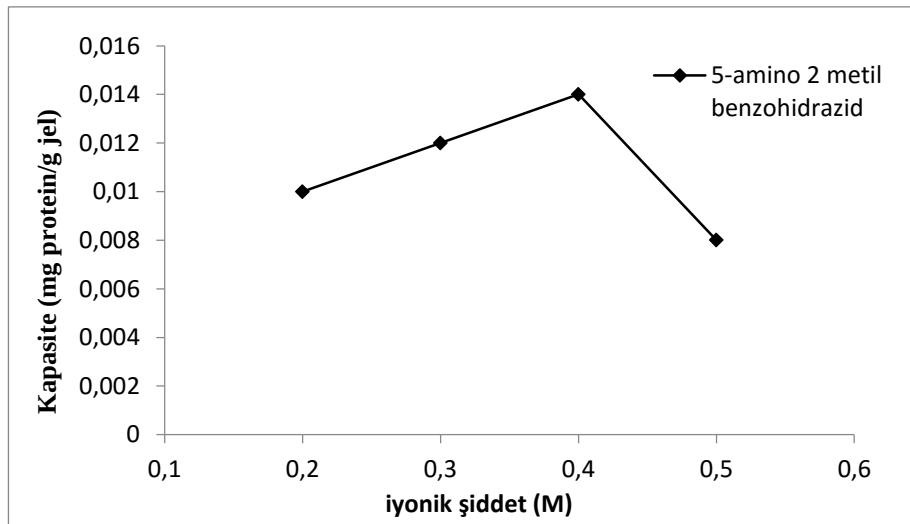
Bu bölümdeki deneyler pH’sı 5,5 ile 9 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel başına) belirlenerek Şekil 4.20’de verildi.



Şekil 4.20. Sepharose-4B-5-Amino 2-metil benzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği

4.7.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

Karaturp enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilip, sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.21’de verildi.



Şekil 4.21. Sepharose-4B-5-Amino 2-metil benzohidrazid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidaz (POD) enzimi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden bir glikoproteindir (Rompel *et al.* 2007). Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak, metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'yi etkisiz hale getirmektedir (Robert *et al.* 1993).

Bitkisel peroksidazlar (POD veya POX) ise peroksidaz enzim ailesinin küçük bir bölümünü oluşturur (Fry 1986). Bitki peroksidazları hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) ve lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi hayati fonksiyonlarda çok önemli görevler aldığı bilinmektedir. Ayrıca POD organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonunda kullanılmaktadır (Adam *et al.* 1999; Zilbeyaz *et al.* 2012).

Organizmalarda geniş bir yayılımı olan peroksidaz çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Bitkilerde bulunan peroksidaz, bayırturpu kökü, karaturp, ıspanak yaprakları, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı hücrelerinden saflaştırılmıştır (Miranda *et al.* 2002). Uygulama alanlarının yaygın olması ve ticari önemi olan enzimler olmaları nedeniyle bitki peroksidaz enzimlerinin saf olarak eldesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

Enzimlerinin afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta ve yüksek saflıkta saflaştırılması birçok araştırmacının temel hedefidir. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak bağlanan liganda spesifik ve tersinir bir şekilde tutunur ve seçimli bir biçimde liganttan ayrılır.

Hidrazidler, peroksidaz inhibitörleri olarak bilinen bileşiklerdir. Çeşitli hidrazin ve hidrazin türevleri, iproniazid (sakinleştirici), mebanazine, izokarboksazid, fenelzin (monoamin oksidaz inhibitörleri), hidralazin (tansiyon düşürücü) ve PHZ (fenilhidrazin;

polisitemi kontrolü), izoniazid [INH (izonikotinin hidrazit) tüberküloz antibiyotik] terapötik olarak kullanılmıştır. Ancak bu bileşiklerin pek çoğu uzun süreli kullanımda karaciğer hasarı, baz-çifti mutasyonları, hemolizise yol açan yan etkilere yol açtığından ilaç olarak kullanılmamaktadır. Hidrazinler ve hidrazid inhibitörleri metabolik olarak aktive edilir. Enzimatik aktivasyon sonrasında, metabolik olarak aktive edilen inhibitörler farklı bir biyomoleküle ya da aynı enzime ya yeniden bağlanabilir ya da aktif bölgesinden serbest bırakılır, dolayısıyla inaktivasyona yol açar. Özgüllük hem bağlanma afinitesi hem de aktif inhibitörün reaktivitesine göre değişir. HRP C, PHZ tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir fakat PHZ süperoksit üretimi için pH 7,0'da oto-oksidasyona maruz kaldığından, terapötik bir madde olarak uygun değildir. Bunun aksine, INH'nin oto-oksidasyonu pH 7,0'da daha düşük bir hızda gerçekleşir. *Mycobacterium tuberculosis* / katalaz (katG) peroksidaz ile aktivasyondan sonra aktive INH bir inhibitörünün oluşturulması için, enoil redüktazın kofaktörü ile reaksiyona girer. Hidrazinlerin enzimler üzerine yapılan çalışmalarda miyeloperoksidazı dönüşümsüz inhibe ettikleri bulunmuştur (Kumar and Bhatla 1995). Peroksidazlara inhibitör olma potansiyelleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. (Kalın *et al.* 2014). Bu çalışmalardan görüleceği gibi Dönüşümlü inhibitör olma potansiyelleri üzerine POD enzimlerinin safalaştırılmasında kullanıma potansiyelleri ortaya çıkmıştır.

Literatürde Peroksidazların safalaştırılmasında birçok yöntem vardır. Başarılı bir saflaştırma yapabilmek için öncelikle matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalı ve safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir metod bulunması gerekmektedir. Bu metodların kullanıldığı birçok çalışma vardır ve bir kısmı aşağıda özetlemiştir. Bu çalışmalara örnek olarak *Leucaena leucocephala* ağacı meyvesinden, papayadan (Pandey and Dwivedi 2011; Pandey *et al.* 2012), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), kırmızı pancardan (Rudrappa *et al.* 2007), karalâhanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008) örnek verilebilir.

Peroksidaz enzimleri literatürde at turpundan POD enzimi iki kromatografik adımda 772,25 (EÜ/mg) ve 291 kat %71,3 verimle (Lavery *et al.* 2010), karalâhanadan POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat %33 verimle (Gülçin and Yıldırım 2005), vanilya çekirdeğinden POD enzimi iki kromatografik adımda 1563,5 (EÜ/mg) 21 kat %19 verimle saflaştırılmıştır (Marquez *et al.* 2008).

Afinite kromatografisi tekniğinde PABH ligand olarak kullanılarak POD enzimi karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat, şalgamdan ise %9 verimle 269,13 kat (Kalın *et al.* 2014), kırmızı lahanadan 120 kat %2,9 verimle (Somtürk *et al.* 2014) saflaştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada özellikle bitkilerin yaralanan gövdelerinde, yapraklarında, nükleus, çiçek ve saplarında, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunan POD enziminin afinite kromatografi metoduyla saflaştırılması yapılmıştır. POD enziminin saflaştırılması üzerine literatürde birçok kromatografik metot bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler hem zaman açısından uzun sürmekte hem de maliyeti açısından daha maliyetlidir (Özdemir *et al.* 2001).

Afinite kromatografisi çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları ortadan kaldırmak ve enzimi yüksek bir verimle izole etmek için saflaştırma işlemlerinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu tez çalışmasında ise saflaştırma çalışmalarını daha ileri götürme ve verimi artırmaya katkı sağlamak amacı ile daha önce grubumuzca yapılan 4-Amino benzohidrazidin ligand olarak kullanıldığı karaturp ve şalgam bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışması esas alınarak (Kalın *et al.* 2014), karaturp (*Raphanus sativus* L.) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması için afinite jeli hazırlandı. Ligand olarak 3-aminobenzohidrazid'in bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan enzimlerin kinetik özellikleri, protein tayini, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi ve kullanılan ligandın kinetik özellikleri belirlendi.

Karaturp POD enziminin, 3-Amino benzohidrazid ve türevi molekülleri (5, 6, 7, 8) ligand olarak afinite kromatografisinde kullanarak, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi hedefiyle Şekil 3.2'de verilen türevler (5, 6, 7, 8) ticari olarak temin

edilemediğinden dolayı moleküllerin metil benzoat türevleri (**1, 2, 3, 4**) satın alınarak hidrazin sentezleri tarafımızca yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.5’de gösterildi. 3-Amino benzohidrazid ve sentezi yapılan türevlerinin ilk olarak inhibisyon kinetikleri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerin afinite jellerinin sentezi yapıldı. Saflaştırma tabloları hazırlandı ve elde edilen sonuçlar tartışıldı.

Çalışmamızın tüm basamaklarında kantitatif protein tayinleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Proteine coomassie brillant blue G-250’nin bağlanması esasına dayanan bu yöntemde, oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı olmaktadır. Protein–boya kompleksi çözeltielerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Çalışmamızın kolon kapasitesi basamağında lowry metodu ile protein tayin yöntemi kullanılarak yapıldı. Kolondan geçirilen enzim çözeltisinin protein miktarı bu yöntem ile belirlendi. Bu yöntemde ilk basamakta biüret yöntemi gibi alkali ortamda bir bakır-protein kompleksi oluşmakta, bu kompleks de Folin-Ciocalteu fenol reaktifini indirgemektedir. Bu yöntemin hassasiyeti Warburg yönteminden 10 kat, Biüret yönteminden 100 kat daha hassastır.

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı (2010) prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 µmol madde alınarak Sepharose-4B-L-tirozin jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A_{470} yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

Saflaştırılan bu enzim üzerine 3-amino benzohidrazid, 5-amino 2-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-amino 2-metil benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.2, 4.6, 4.9, 4.12 ve 4.15 de

gösterildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Karaturp POD enzimi için bu grafikler Şekil 4.4, 4.10, 4.12, 4.14 ve 4.16'da gösterildi.

Karaturp POD enzimi için sırasıyla IC_{50} değerleri 3-amino benzohidrazid için; 0,560 mM, 5-amino 2-metil benzohidrazid için; 0,845 mM, 3-amino 5-metil benzohidrazid için; 0,603 mM, 3-amino 4-nitro benzohidrazid için; 0,841 mM ve 3-amino 2-metil benzohidrazid için; 0,959 mM olarak hesaplandı. Tüm moleküllerin IC_{50} değerlerinin sonuçlarına bakıldığında POD enzimi inhibitörü olabileceği ortaya konuldu.

İnhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile K_i değerlerinin hesaplanması çalışmaları yapıldı. Karaturp POD enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.7, 4.10, 4.13 ve 4.16'da gösterildi. 3-Amino benzohidrazid, 5-amino 2-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-amino 2-metil benzohidrazid için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

Karaturp POD enzimi üzerine denenen inhibitörlerin K_i grafikleri Şekil 4.5, 4.11, 4.13, 4.15, ve 4.17'de gösterildi. Karaturp POD enzimi K_i değerleri sırasıyla 3-amino benzohidrazid için 0,405 mM, 5-amino 2-metil benzohidrazid için 0,952 mM, 3-amino 5-metil benzohidrazid için 0,129 mM, 3-amino 4-nitro benzohidrazid için 0,712 mM ve 3-amino 2-metil benzohidrazid için 1,414 mM olarak grafiklerden yararlanılarak hesaplandı. Böylece saflaştırmada ligand olarak kullanılacak moleküllerin detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan 3-amino benzohidrazid türevi moleküllerin karaturp POD enziminin yeni inhibitörleri olarak belirlendi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 μ mol madde alınarak Sepharose-4B-L-tirozin-3-amino benzohidrazid, 5-amino 2-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ve 3-amino 2-metil benzohidrazid jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A_{470} yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

Karaturp POD enzimi saflaştırma tabloları Çizelge 4.1 ve 4.19'da gösterildi. Karaturp POD enzimini saflaştırmak için 3-amino benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanıldığında sırasıyla %11,9 verimle 246,6 kat, 5-amino 2-metil benzohidrazid ile %43 verimle 733,5 kat, 3-amino 5-metil benzohidrazid ile %6,09 verimle 221,2 kat, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ile %14,6 verimle 249,6 kat ve 3-amino 2-metil benzohidrazid ile %21,4 verimle 172,5 kat saflaştırma yapıldı.

5-amino 2-metil benzohidrazid molekülü ile yapılan saflaştırma çalışmalarında karaturp POD enziminde %43 verime ve 733,5 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Afinite tekniği kullanılarak karaturp POD enziminin saflaştırmada 5-amino 2-metil benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanılabileceğinin oldukça önemli olduğu belirlendi ve bu çalışma ilk defa tarafımızdan gerçekleştirildi.

Karaturp POD enzimlerini kolon tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametreleri incelendi ve protein/gram-jel cinsinden karaturp POD enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işlemlerinde en yüksek verim ve saflaştırma katsayısına ulaşılan kolon olan 5-amino 2-metil benzohidrazid jelinden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen karaturp POD enzimleri ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan POD enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Jel kurutulup tartılarak mg protein/gram-jel cinsinden POD enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi (Arslan *et al.* 1996). Karaturp POD enzimi için 15°C, pH 7,0 ve 0,4 M iyonik şiddette kolon tutma kapasitesi 1,17 mg/g jel olarak tespit edildi.

Karaturp POD enzimlerinin saflaştırılmasında 5-amino 2-metil benzohidrazid ile hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8'de 5, 10, 15, 20, 25 ve 30°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.19 da görüldüğü gibi 15°C'de karaturp POD enziminin jele bağlanma kapasitesi maksimum 1,40 mg/g jeldir.

Karaturp POD enzimleri için 5-amino 2-metil benzohidrazid afinite jeline pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 5,5 ile 9 arasında) tamponlar kullanılarak en iyi pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 4.20'de grafik edildi. Buradan 5-amino 2-metil benzohidrazid afinite jeli için karaturp POD enziminin pH=7,0'da maksimum bağlandığı ve sırasıyla 1,66 mg/g jel olarak belirlenmiştir.

5-Amino 2-metil benzohidrazid afinite jeline Karaturp POD enzimlerinin bağlanma kapasitesine iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı ve bu iyonik şiddet 0,2 M ile 0,5 M arasında değiştirilerek, sonuçlar grafikte gösterildi. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi 0,40 M iyonik şiddet konsantrasyonunda karaturp POD enziminin 0,46 mg/g jel başına bağlanmanın maksimum olduğu tespit edildi.

Saflaştırılan karaturp POD enzimlerinin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.3 ve şekil 4.18'de karaturp POD enzimi için SDS-PAGE fotoğrafı gösterildi ve molekül ağırlığı 47 kDa olarak hesaplandı.

Sonuç Olarak;

3-Amino Benzoat molekülleri temin edilerek; 3-Amino benzohidrazid, 3-Amino 5-metil benzohidrazid (5), 5-Amino 2-metil benzohidrazid (6), 3-Amino 4-nitro benzohidrazid (7) ve 3-amino 2-metil benzohidrazid (8) moleküllerinin sentezi yapıldı ve Karaturp POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Çalışılan beş molekülün

enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi ve afinite kolonunda ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.

Bu moleküller kullanılarak afinite jelleri hazırlandı, Karaturp POD enzimleri herbir kolondan tek basamakta saflaştırıldı. Karaturp POD enzimlerinin saflaştırılmasında; 5-Amino 2-metil benzohidrazid molekülünün çalışılan moleküller içerisinde en etkili ligand olduğu belirlendi ve POD enziminin saflaştırma katsayılarının, literatürde olan çalışmalardan çok daha kısa sürede ve tek kademede daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu çalışmada ligand olarak kullandığımız **5-Amino 2-metil benzohidrazid** molekülünün ucuz maliyette ve yüksek verimde karaturp POD enzimlerini saflaştırdığı ve diğer bitki peroksidazlarını da saflaştırmada kullanılma potansiyelinin olduğu sliteratüre kazandırıldı.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafariet, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, 331-336.
- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U. and Scherier, P., 1999. Biotransformations with peroxidases. *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74-108.
- Agostini, E., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Milrand, S.R., Tigier, H.A., Acosta, M., 2002. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 1-7.
- 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, 596-598.
- Ak, T. and Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological. Interaction*, 174, 27-37.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro Bru, S.R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot*, 60, 377-390.
- Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L.M.P., 2000. *Pharmacol & Toxicol*, 87, 229-233.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O. I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H. and Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral Horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P., 2008. Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, 69, 627-636.
- Biles, C.L. and Martyn, R.D., 1993. Peroxidase, polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 499-506.
- Boyer, P.D., 1970. *The Enzymes* (3rd Edition) Academic Press Inc, New York.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *72*, (1-2), 248-254.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Ciftci, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.

- Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R., Anon, M.C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601.
- Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29-36.
- Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., 1987. *Methods in Enzymology*. (Editors: Colowick, S. P., Kaplan, N. O.) academic Press, Inc., London, 1-55.
- Coogan, R.C., Wills, R.B.H., Nguyen, V.Q., 2001. Pungency levels of white radish (*Raphanus sativus* L.) grown indifferent seasons in Australia. *Food Chemistry*, 72, 1-3.
- Cosio, C., Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot*, 60, 391-408.
- Deepa, S.S. and Arumughan, C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10–17.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C. and Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574–1579.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif stress ve antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29, 95-101.
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z., Ferradji, F., Bejar, S., Boutoumi, H., 2012. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. Strain AH4: Purification and biochemical characterization. *Bioresource Technology* 11, 383-390.
- Fridowich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-877.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 4-17 p, New York, USA.
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 165-186.
- Fry, S.C., 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochem. Rev*, 3, 97-111.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029–1034.
- Ghosh, J. and Myers, C.E., 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci*, 95, 13182-7.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic concepts in biochemistry*. Mc Graw-Hill Inc. Germany, 81.
- Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., Wang, W., 2015. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Science and Technology* 60, 1095-1099.
- Gözükara, E.M., 2001. *Biyokimya Cilt 2*. 4. Ankara Nobel Tıp Kitapevi, 1258.

- Gözükara, M.E., 1997. Enzimler, 13. *Biyokimya Z* 3. Nobel tıp Kitabevleri, İstanbul, 1225s.
- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- 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, Ezurum.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science*, 54, 644.
- Hanlon, P.R., Robbins, M.G., Hammon, L.D., Barnes, D.M., 2009. Aqueous extract from the vegetative portion of Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzyme expression in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 356-365.
- Harvey, R.A. and Champe, P.C., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 53-68.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.* 42, 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y., Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium İon Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72-77.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60-63.
- Jing, P., Zhao, S.J., Si-Yu Ruan, S.Y., Xie, Z.H., Dong, Y., Yu, L., 2012. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chemistry*, 133, 1569-1576.
- Jouili, H., Bouazizi, H., Ferjani, E., 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol Plant*, 33, 2075-2082.
- Kalin, R., Atasver, A., Ozdemir, H., 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from turkish blackradish and turnip roots. *Food Chemistry* 335-340.
- Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A., Aosvigyazo, V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293-295.

- Keha, E. ve Küvrevioğlu, Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. Biyokimya. Aktif Yayinevi, 118, 91-95.
- Kumar, R. And Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Crystallographica*, 51, 1094
- Kim, E.Y., Choi, Y.J., Chae, H.J., Chu, K.H., 2006. Removal of aqueous pentachlorophenol
- Köksal, E. and Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15, 320-326.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K., 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501.
- 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, 565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D'Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, Y.J., Galoforo, S.S., Berns, C.M., *et al* 1998. Glucose deprivation induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *J Biol Chem*, 273: 5294-9.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Yu., Csoregi, E., Sakharov, I.Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lin, Z.F., Chen, L.H., Zhang, W.Q., 1996. Peroxidase from *I. Cairica* (L) SW Isolation, purification and some properties. *Process of Biochemistry*, 5, 443–448.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc*, 57, 685.
- Liszkay, A., Van Der Zalm, E., Schopfer, P., 2004. Production of reactive oxygen intermediates (O₂, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol*, 136, 3114-3123.
- Manu, B.T., Prasada Rao, U.J.S., 2009. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. *Food Chemistry*, 114, 66–71.
- Marjamaa, K., Kukkola, E.M., Fagerstedt, K.V., 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignifications. *J. Exp. Bot*, 60, 367-376.
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M. and Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Food Science and Technology*, 41, 1372-1379.

- McLellan, K.M. and Robinson, D.S., 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Miranda, M.V., Magrı, M.L., Navarro Del Can˜ Izo, A.A., Cascone, O., 2002. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A Agarose, *Process Biochemistry*, 38, 537–543.
- Mika, A., Buck, F., Lüthje, 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, 412–424.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643–1650.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777–78.
- Nair, A. R., Showalter, A.M., 1996. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemistry biophys. Research Communication*, 226, 254.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Ohya, T., Morimura, Y., Saji, h., Mihara, T., Ikawa, T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Science*, 125, 137–145.
- Özdemir, H., Aygöl, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties. *Prep Biochem. and Biotech.*, 31(2), 125–134.
- Pandey, V.P., and Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, (2), 367–376.
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 367–376.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68, 1605–1611.
- Pütter, J. and Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases*. Bergmeyer, third edition, VCH, 286 p, New York, USA.
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G. Victor, W.R., 1993. *Harper'ın Biyokimyası*. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Robinson, F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G., 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rodriguez L, J.N., Espin, J.C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia Canovas, F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic

- peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1537–1541.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1422–1430.
- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M. and Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- 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, 1571-1579.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York.
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M. I., Del Amor, F. M., Nuñez-Delgado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107, 193–199.
- Signoret, A., Crouzet, J., 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Singh, W.N. and Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Somtürk, B., Kalın, R. and Özdemir, N., 2014. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol*, 173, 1815–1828.
- Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Tıpawan, T. Barrett M., 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Triplett, B.A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science*, 81, 147-154.
- Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, 3. Baskı, Palme Yayınları, Ankara, 124.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*, 15 (1), 49–127.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Vitali, A., Botta B, Delle Monache G, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, Petruzzelli R, Giardina, B., 1998. Purification and partial characterization of a peroxidase from

- plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies, *Biochem. J.*, 331, 513-519,
- Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57, 701-710.
- Wakamatsu, K. and Takahama, U., 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K., Hayashi, U., Yajima, Y., Inoue, H., 1987. Production of Horseradish peroxidase by plant cell culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 38, 31–39.
- Yemenicioglu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B., 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158–4163.
- Zamocky, M. and Obinger, C., 2010. *Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases*. Springer Verlag, 20-48 p, Berlin, Heidelberg.
- Zhao-liang, L., Li-wang, L., Xiao-yan, L., Yi-qin, G., Xi-lin, H., Xian-wen, Z., Jin-lan, Y., Long-zhi, W., 2008. Analysis and evaluation of nutritional quality in Chinese radish (*Raphanus sativus* L.). *Agricultural Sciences in China*, 7 (7), 823-830.
- Zilbeyaz, K., Kilic, H., Sisecioglu, M., Ozdemir H. and Gungor A.A., 2012. Preparation of enantiomerically pure p-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz–Scheffer epoxidation of E-chalcone. *Tetrahedron*, 23, 594-601.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2008 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü’nden 2013 yılında mezun oldu. 2015 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

