



**SOYA FASÜLYESİNDEN (*Glycine max L. Merrill*)
AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK
PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Zahra RASULZADE

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR**

2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**SOYA FASÜLYESİNDEN (*Glycine max L. Merrill*) AFİNİTE TEKNİĞİ
KULLANILARAK PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

(Purification of Peroxidase Enzyme from Soybean (*Glycine max L. Merrill*) Using Affinity
Technique and Investigation of Some Kinetic Properties)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zahra RASULZADE

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Erzurum
Ocak, 2022



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**SOYA FASÜLYESİNDEN (*Glycine max L. Merrill*) AFİNİTE TEKNİĞİ
KULLANILARAK PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof.Dr.Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Zahra RASULZADE tarafından hazırlanan bu çalışma, 31/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Danışman:	Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Murat Çankaya Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır.

Enstitü Yönetim
Kurulunun/.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır.

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında sunulan “Soya Fasulyesinden Afinite Tekniği Kullanılarak Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	10	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Yöntem	22	35
Bulgular	14	20
Tartışma	8	20
Tezin Geneli	16	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Zahra RASULZADA	Prof. Dr.Hasan ÖZDEMİR
31.1.2022	31.1.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır.	İmza: Aslı Islak İmzalıdır.

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarım boyunca ilgisini ve önerisini göstermekten çekemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı Semra Karaca'ya, Biyokimya Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU'na ve Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Erzurum Teknik Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KALIN'a, Sayın Serpil GERNİ'ye, Nurgül ABUL'a, Uzman Songül BAYRAK'a ve Dr. Işıl Nihan KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her alanında maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Zahra RASULZADE

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOYA FASÜLYESİNDEN (*Glycine max L. Merrill*) AFİNİTE TEKNİĞİ KULLANILARAK PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zahra RASULZADE

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Amaç: Bu çalışmada, afinite ligandı olarak 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid moleküllerini kullanarak, soya filizinin yapraklarından peroksidaz enziminin tek kademede saflaştırılması, saflaştırılan enzimin kinetik parametrelerinin araştırılması ve çeşitli substratlara olan ilgisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid moleküllerinin sentezi yapıldı. Sentezlenen moleküller Sepharose-4B-L tirozine kenetlendirildi ve soya fasulyesi peroksidazı (SBP) afinite tekniği kullanılarak tek basamakta saflaştırıldı. Saflaştırılan SBP enziminin; optimum pH, optimum sıcaklık, iyonik şiddet, substratların K_M ve V_{max} değerleri, ligand moleküllerinin inhibisyon etkileri (IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipi) ve kolon tutma kapasitesi belirlendi.

Bulgular: Ligand olarak kullanılan 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid moleküllerinden sentezlenen afinite jellerinden SBP enzimi sırasıyla %87,1 verimle 130,2 kat, %5,44 verimle 122,44 kat, %4,3 verimle 133,8 kat ve %43,55 verimle 79,7 kat saflaştırıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen enzim için sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı ve yaklaşık 40 kDa’da tek bant gözlemlendi. Saflaştırılan SBP enzimi için optimum pH, iyonik şiddet, sıcaklık parametreleri belirlendi. Guaiakol, ABTS, H_2O_2 , 4-metilkatekol, prokatekol substratları için K_M ve V_{max} değerleri tespit edildi. Saflaştırılan SBP enzimi üzerine ligant olarak kullanılan 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid için IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, peroksidaz, aminobenzohidrazid türevleri

Ocak 2022, 74 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

PURIFICATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM SOYBEAN (*Glycine max* L. *Merrill*) USING AFFINITY TECHNIQUE AND INVESTIGATION OF SOME KINETIC PROPERTIES

Zahra RASULZADE

Advisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Objective: In this study, 4-amino-3-bromo-5-fluoro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-5-chloro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-2-methyl benzohydrazide, 5-aminoisophthalohydrazide as affinity ligands. In this study, it was aimed to purify the peroxidase enzyme from the leaves of soybean sprouts in a single step, to investigate the kinetic parameters of the purified enzyme and to determine its affinity for various substrates.

Method: Synthesis of 4-amino-3-bromo-5-fluoro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-5-chloro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-2-methyl benzohydrazide, 5-aminoisophthalohydrazide molecules was performed. The synthesized molecules were coupled to Sepharose-4B-L tyrosine and purified in a single step using the soybean peroxidase (SBP) affinity technique. The purified SBP enzyme; optimum pH, optimum temperature, ionic strength, K_M and V_{max} values of the substrates, inhibition effects of ligand molecules (IC_{50} , K_i and inhibition type) and column holding capacity were determined.

Results: Affinity synthesized from 4-amino-3-bromo-5-fluoro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-5-chloro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-2-methyl benzohydrazide, 5-aminoisophthalohydrazide molecules used as ligands. From the gels, the SBP enzyme was purified 130.2 times with 87.1% yield, 122.44 times with 5.44% yield, 133.8 times with 4.3% yield and 79.7 times with 43.55% yield, respectively. For the enzyme obtained as a result of purification, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed and a single band was observed at approximately 40 kDa. Optimum pH, ionic strength and temperature parameters were determined for the purified SBP enzyme. K_M and V_{max} values were determined for guaiacol, ABTS, H_2O_2 , 4-methylcatechol, procatechol substrates. IC_{50} , K_i values and inhibition for 4-amino-3-bromo-5-fluoro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-5-chloro benzohydrazide, 4-amino-3-bromo-2-methyl benzohydrazide, 5-aminoisophthalohydrazide used as ligand on the purified SBP enzyme. types were determined.

Keywords: Affinity chromatography, peroxidase, aminobenzohydrazide derivatives

January 2022, 74 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Enzimlerin Sınıflandırılması	1
pH.....	2
Sıcaklık.....	2
Substrat konsantrasyonu	2
Çevresel unsurlar.....	2
Peroksidazlar	5
POD Enziminin Etki Mekanizması.....	8
Bitki peroksidazları	9
Afinite Kromatografisi	11
Matriks	12
Afinite ligandları	12
Uzantı kolu.....	13
KURAMSAL TEMELLER.....	14
Çalışmanın Amacı.....	15
MATERYAL ve YÖNTEMLER	17
Materyal	17
Kullanılacak çözeltiler ve hazırlanması	18
Yöntem.....	21
Soya filizlerinin yetiştirilmesi	21
Protein tayini	21
POD aktivite ölçümü yöntemi.....	22
SBP Enzim Saflaştırma Çalışmaları.....	23

Ligand Seçimi	23
Aminobenzohidrazit türevlerinin sentezlenmesi.....	23
Afinite kolonun paketlenmesi	25
Bitkilerden homojenat hazırlanması	26
Afinite kolonuna numüne tatbiki ve elüsyonu	26
SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi.....	26
Ayırma jeli şöyle hazırlandı	26
Yığılma jeli şöyle hazırlandı	27
Afinite jellerinin SBP Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması.....	27
Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	28
pH'nın kolon kapasitesine etkisi	28
Kolon kapasitesine iyonik şiddetin etkisi.....	28
Guaiakol ve H ₂ O ₂ Substratları İçin K _m ve V _{max} Değerlerinin Belirlenmesine Üzerindeki Çalışmalar	28
Saflaştırılan SBP Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	28
SBP enzimi için optimum pH çalışması.....	28
Optimum iyonik şiddet çalışmaları SBP enzimi için	29
SBP enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları	29
ARAŞTIRMA BULGULAR.....	30
Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	30
SBP Enzimi İçin Afinite Tekniği Kullanılarak Elde Edilen Saflaştırma Sonuçları.....	30
SDS –Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....	31
Aminobenzohidrazid Türevlerinin SBP Enzimi Üzerine IC ₅₀ ve K _i Değerlerinin Belirlenmesi	32
4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	33
4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	34
4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	35
Guaiakol Substrat İçin K _m ve V _{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları	37
H ₂ O ₂ substratı için K _m ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları.....	38

ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	40
4 –Metilkataköl substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	41
Pirokatekol Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları	42
SBP Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	43
SBP enzimi için optimum pH çalışma sonuçları.....	43
SBP enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları.....	45
SBP enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları	46
4-amino 3-bromo 2- metil benzohidrazid Molekülü ile Hazırlanan Afinite jelinin SBP Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	47
Sıcaklığın kolon tutma kapasitesine etkisi	48
pH'nın kolon kapasitesine etkisi	48
İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi	49
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	60

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Enzimlerin Sınıflandırılması.	1
Tablo 2. Peroksidaz Enzimlerinin Sınıflandırılması	6
Tablo 3. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Matrislerin Sınıflandırılması	12
Tablo 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
Tablo 5. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	18
Tablo 6. Afinite Kolonun Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	18
Tablo 7. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler	19
Tablo 8. Homojenat Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler.....	19
Tablo 9. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	19
Tablo 10. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılacak Çözeltiler	19
Tablo 11. Lowry Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler.....	20
Tablo 12. Elektroforez İçin Kullanılacak Çözeltiler	20
Tablo 13. Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler.....	20
Tablo 14. Çalışmamızda Kullanılan İnhibitör Stok Çözeltileri	21
Tablo 15. Substrat Spesifikliğine Yönelik Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	21
Tablo 16. SBP Enziminin Aminobenzohidrazid Türevleri Kullanılarak Saflaştırılması.....	31
Tablo 17. 4-Amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid İnhibitörünün SBP Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi	34
Tablo 18. SBP Enzimi Üzerine 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid İnhibitörünün İnhibisyon Etkisi	35
Tablo 19. 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid İnhibitörünün SBP Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi	36
Tablo 20. 5- Amino –izoftalohidrazid İnhibitörünün SBP Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi	37
Tablo 21. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Guaiakol Derişim Çizelgesi.....	38
Tablo 22. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri	38
Tablo 23. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik H_2O_2 Derişim Çizelgesi.....	39
Tablo 24. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri	39

Tablo 25. SBP Enzimi için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik ABTS	
Derişim Çizelgesi	40
Tablo 26. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri.....	41
Tablo 27. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik 4- Metilkatekol	
Derişim Çizelgesi	41
Tablo 28. SBP Enzimi için K_m ve V_{max} Değerleri	42
Tablo 29. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Prokatekol	
Derişim Çizelgesi	42
Tablo 30. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri	43
Tablo 31. Toplu K_m ve V_{max} Sonuçları	43
Tablo 32. Farklı pH'larda 0,1 M $C_2H_3NaO_2$ Tampon Çözeltisi İçerisinde SBP Enziminin	
Aktivite Ölçüm Sonuçları	44
Tablo 33. Farklı pH'larda 0,1 M KH_2PO_4 Tampon Çözeltisi İçerisinde SBP Enziminin	
Aktivite Ölçüm Sonuçları	44
Tablo 34. Farklı pH'larda 0,1 M $C_4H_{11}NO_3$ Tampon Çözeltisi İçerisinde SBP Enziminin	
Aktivite Ölçüm Sonuçları	44
Tablo 35. SBP enzimi için iyonik şiddet/aktivite ölçüm sonuçları.....	45
Tablo 36. Saflaştırılan SBP Enziminin Optimum Sıcaklığını Belirlemek İçin	
Sıcaklık/Aktivite Ölçüm Sonuçları	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi	3
Şekil 2. Yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi	4
Şekil 3. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi	4
Şekil 4. Yarı yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi	4
Şekil 5. Enzim ile substrat arasında anahtar kilit modeli	5
Şekil 6. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş uyum modeli	5
Şekil 7. Peroksidazların farklı aromatik bileşiklerini kullanarak hidrojen peroksit giderme mekanizmaları	7
Şekil 8. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması	8
Şekil 9. POD oksidasyon-redüksiyon döngüsü	9
Şekil 10. Uzantı kolunun gösterimi	13
Şekil 11. SBP inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller	23
Şekil 12. Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu	24
Şekil 13. Amino benzohidrazid molekülünün Sefaroz-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu	25
Şekil 14. Kantitatif protein tayini için sığır serum albümin standart olarak kullanılarak oluşturulmuş grafik	30
Şekil 15. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid kolonundan saflaştırılan SBP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	32
Şekil 16. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 4-Amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite – 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid grafiği	33
Şekil 17. SBP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği	33
Şekil 18. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 4-Amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite –4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid grafiği	34
Şekil 19. SBP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği	34

Şekil 20. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 4-Amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite – 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid grafiği	35
Şekil 21. POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği	35
Şekil 22. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 5-Aminoizoftalbenzohidrazid le elde edilen %Aktivite –5-aminoizoftalohidrazid grafiği.....	36
Şekil 23. POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 5-Aminoizoftalohidrazid inhibitörü için edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği	37
Şekil 24. SBP enziminin Guaiakol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik	38
Şekil 25. SBP enziminin H_2O_2 substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik	39
Şekil 26. SBP enziminin ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik	40
Şekil 27. SBP enziminin 4- Metilkatekol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik.....	42
Şekil 28. SBP enziminin Prokatekol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik	43
Şekil 29. SBP enziminin optimum pH sını belirlemek için yapılan Enzim Ünitesi (EU) –pH grafiği	45
Şekil 30. Farklı konsantrasyonlarda KH_2PO_4 (pH =6,0) tampon çözeltileri kullanılarak SBP enzimi için Aktivite (EU/mL)-İyonik şiddet grafiği.....	46
Şekil 31. SBP enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için Aktivite (EU/mL)-Sıcaklık ($^{\circ}C$) grafiği	47
Şekil 32. Lowry metoduna göre sıgır serum albümininden hazırlanan standart grafik.....	47
Şekil 33. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid afinite jelinin SBP enzimini bağlamasında sıcaklığın etkisi	48
Şekil 34. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid afinite jelinin SBP enzimini bağlamasında pH'nın etkisi.....	48
Şekil 35. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid afinite jelinin SBP enzimini bağlamasında iyonik şiddetin etkisi	49

GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki reaksiyonları katalizleyen, %100 ürün verimi sağlayan ve hiçbir yan ürün oluşturmeyen protein yapılı biyolojik katalizörlerdir (Berg *et al.* 2013). Enzimler kimyasal reaksiyonların hızını, kendiliğinden oluşan tepkimelere göre 10^{17} kat artırır (Nelson and Cox 2008).

Enzimlerin nasıl çalıştığına dair bilgilerimiz bir asırlık çalışmalar ışığında bile tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle enzimlerin yüksek katalitik verime ulaşmasını sağlayan faktörler hala tam olarak bilinmemektedir. Bazı kanıtlar, enzimlerin katı yapıda olmadıklarını ispat etse de enzimlerin sürekli olarak çok çeşitli konformasyonel dalgalanmalara ve iç hareketlere maruz kaldıkları bilinmektedir (Agarwal 2018).

Tüm enzimler, seri halinde birleştirilmiş amino asit birimlerinden oluşan büyük moleküller olan proteinlerdir. Bu biyolojik katalizörler meydana gelen kimyasal reaksiyonun hızını artırır (Aitken,1993). Enzimler 5000'den fazla biokimyasal reaksiyon tipini katalize eder. Enzimlerin katalizlediği tepkimelerde kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküllerin üretimi sağlanır (Lehninger 2005).

Enzimlerin Sınıflandırılması

Metabolizmada ki tüm kimyasal reaksiyonlardan sorumlu olan enzimler 6 ana sınıfa ayrılmaktadırlar (Busch and Saier 2002).

Tablo 1. Enzimlerin Sınıflandırılması (Busch and Saier 2002).

Sınıflandırma	Ayrırtedici özellik
1. Oksidoredüktazlar	$A_{red} + B_{ox} \rightarrow A_{ox} + B_{red}$ Pürüvat + NADH $\xrightarrow{\text{laktat dehidrogenaz}}$ Laktik asit + NAD^+
Oksidazlar	Moleküler oksijeni alıcı olarak kullanarak oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
2. Transferaz	$A-B+C \rightarrow A+B-C$ Met- Ala- Lev + Lys $\xrightarrow{\text{peptidil transferaz}}$ Met- Ala- Lev- Lys + tRNA tRNA
Metiltransferazlar	Bir hidrojen atomunun metil grubuyla yer değiştirmesini sağlayan enzimlerdir.
3. Hidrolazlar	$A-B+H_2O \rightarrow A-H + B-OH$ Lys- Ala + H_2O $\xrightarrow{\text{serin hidrolaz}}$ Lys + Ala
Proteazlar	Proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzimlerdir.

Tablo 1. (devamı)

4. Liyazlar	$A(XH)-B \rightarrow A-X + B-H$ Argininosüksinat $\xrightarrow{\text{argininsüksinat liyaz}}$ Arginin + Fumarat
Dekarboksilazlar	Bir substrattan karboksil grubunun ayrılmasını sağlayan enzimlerdir.
5. İzomerazlar	$A \leftrightarrow \text{İzo- } A$ Glukoz- 6-F $\xrightarrow{\text{fosfoglukoz izomera}} \text{Fruktoz- 6-F}$
Rasemazlar	L ve D stereoizomerlerinin dönüşümünü sağlayan enzimlerdir.
6. Ligazlar	$A+B+ATP \rightarrow A-B + ADP + P_i$ Pürüvat $\xrightarrow{\text{pürüvat karboksilaz}}$ Oksalasetat
Karboksilazlar	Substrata karboksil grubunun eklenmesini katalize eden enzimlerdir.

Enzimatik reaksiyonun hızını etkileyen faktörler;

pH

Bir çözeltinin biyolojik aktivitesinde değişik faktörleri etkileyerek önemli rol oynar. Bir çözeltinin pH'sı değişikçe iyonlaşabilir grupların durumu değişir. Ortaya çıkan yük değişikliği enzimin içindeki kalıntıların protonlaşmasına, denatüre olmayan yapısal değişikliklere, aktivite değişikliğine, oligomerlerin ayrılmasına ve denatürasyona yol açar (Oellermann *et al.*2014).

Sıcaklık

Enzimatik bir reaksiyonda sıcaklıktaki küçük bir yükselme enerji seviyesini artırarak aktivasyon enerjisini azalmasına neden olur. Böylece reaksiyonun hızını ciddi oranda etkiler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Substrat konsantrasyonu

Reaksiyonun hızı yüksek substrat konsantrasyonlarında artar, düşük substrat konsantrasyonlarında azalır. Reaksiyonun hızı yüksek substrat konsantrasyonlarında belli bir süre sonra sabitlenmeye başlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

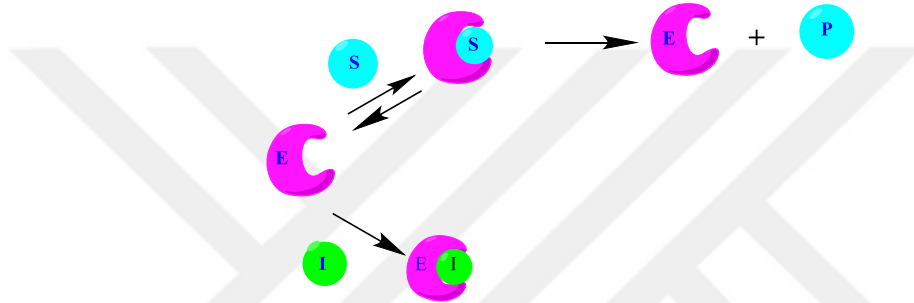
Çevresel unsurlar

Enzimatik aktivite için son derece önemlidir ve enzim aktivitesini etkileyen birçok çevresel faktör vardır. Çevresel hususlara yararlı bir örnek, polifenol oksidaz verilebilir. Polifenol oksidaz meyve ve sebzelerde bulunan kinonları oksitler ve melanin pigmentini oluşturmak için proteinlerle reaksiyona girerek kahverengi bir renk oluşur. Polifenol oksidaz için oksijen gerekli olduğundan, oksijeni reaksiyondan uzaklaştırarak bu aktiviteyi engelleyebilir (Oellermann *et al.*2014).

İnhibitörler, enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda aktivitelerinin azalmasına neden olan maddelerdir. Genelde küçük molekül yapısına sahip olan bu maddeler, iyonlar veya şelatlayıcılardır. Enzim inhibisyonu, biyolojik sistemlerdeki kontrol mekanizmalarının önemli bir kısmını oluşturur. Kimyasal maddeler, ilaçlar ve zehirli bileşikler bu yolla etki gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

İnhibisyon, dönüşümlü veya dönüşümsüz olmak üzere iki gruba ayrılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009)

Dönüşümsüz inhibisyon; inhibitör enzime ya zor ayrılabilen bir kompleks şeklinde ya da kovalent olarak bağlanır ve enzimi inaktif hale getirir. Bu durumda enzimin aktivite göstermesi beklenmez.



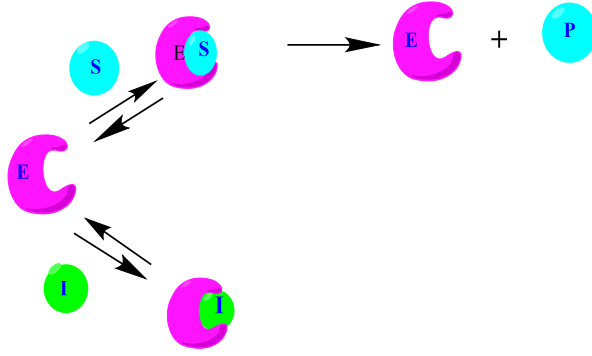
Şekil 1. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi

Dönüşümlü inhibisyon; inhibitör enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanır.

Dönüşümlü inhibisyon tipleri:

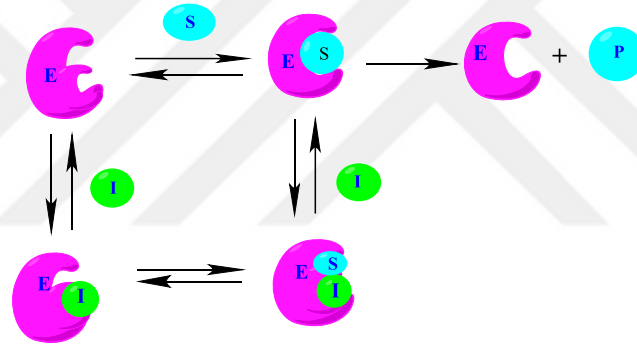
1. Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
2. Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)
3. Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
4. Karışık inhibisyon

1. Yarışmalı inhibisyon; inhibitör ile substrat aktif bölgeye bağlanma için rekabet halindedir. Substratın konsantrasyonu arttıkça denge substrata doğru kaydığı için inhibitörün etkisi azalır. Bu sebepten yarışmalı inhibisyonda V_{max} değeri değişmez, KM değeri artar.



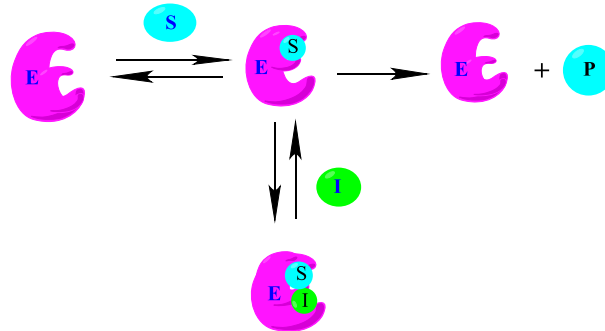
Şekil 2. Yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi

2. Yarışmasız inhibisyon; yarışmasız inhibisyon tipinde inhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanabilir. Çünkü yapılarının benzer olma olasılığı düşüktür, böylece aktif bölge için rekabet etmezler. Hem inhibitör hem de substrat enzime farklı bölgelerden bağımsız olarak bağlanabilir. İnhibisyon derecesi substrat konsantrasyonundaki değişimden etkilenmez. Bu inhibisyonda K_M değeri değişmez, V_{max} değeri inhibitör konsantrasyonu arttıkça azalır (Saboury 2009).



Şekil 3. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi

3. Yarı yarışmalı inhibisyon; yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör ES (Enzim-Substrat) kompleksine bağlanır. İnhibitör enzime bağlanmak için substrat ile rekabet etmez. V_{max} ve K_M değerlerinde azalma görülür (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



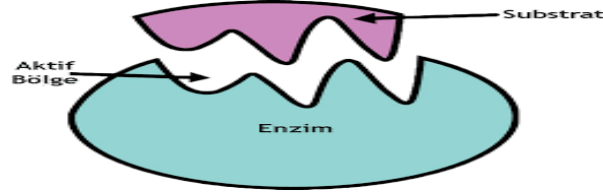
Şekil 4. Yarı yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi

4. Karışık inhibisyon; karışık inhibisyon tipinde substrat ve inhibitör enzime aynı anda iki farklı bölgeden bağlanabilir. Substrat veya inhibitörün bağlanma afinitesi diğerinin

bağlanmasından etkilenir. Karışık tip inhibisyon genellikle rekabete dayalı inhibisyon tipi olarakta adlandırılır. Karışık tip inhibisyon teriminin farklı inhibisyon tiplerinin karışımı olduğunu ima etmediğinin bilinmesi önemlidir (Saboury 2009).

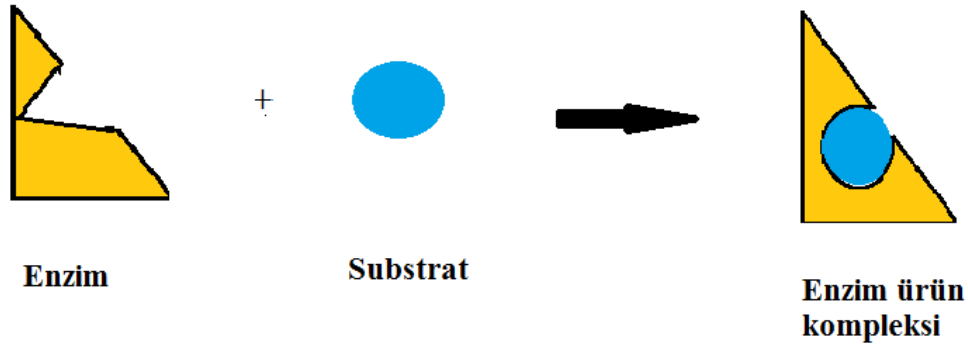
Enzim ile katalizlenen reaksiyonda, enzim ile substrat bir araya gelerek enzim substrat kompleksini oluşturur. Substrat ve enzimin bağlanmasıyla ilgili iki model vardır:

Emil Fisher tarafından tanımlanan anahtar kilit modelidir. Bu modelde substrat enzimin aktif bölgesine anahtar kilit uyumuna göre bağlanır.



Şekil 5. Enzim ile substrat arasında anahtar kilit modeli

Daniel Koshland tarafından ileri sürülmüş indüklenmiş uyum modelidir. Enzim bağlandığı substratı parçalayarak ürüne dönüştürür ve reaksiyon bittiği zaman enzim hiçbir değişikliğe uğramadan ortamdan uzaklaşır (Nelson and Cox 2005; Megep 2006).



Şekil 6. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş uyum modeli

Peroksidazlar

Peroksidazlar (POD) meyve ve sebzeler gibi çiğ gıdalarda, doku, renkte değişikliklere neden olan enzimlerdir (Burnette 1977, Haard 1977). POD'lar peroksidatik reaksiyonlara ek olarak katalitik, oksidazik ve hidroksilasyon reaksiyonlarını da katalize edebilirler (Haard 1977). POD'lar, yağ asidi oksidasyonunda rol oynamaktadır (Stumpf and Bradbber 1959; Rothe 1956). Katalizör olarak POD'lar, hidrojen peroksit varlığında çeşitli organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalize eden hem proteinleridir ve oksidoredüktazların (E.C.1.11.1.7) bir üyesidir. POD'lar turp, patates yumrusu, pancar,

şalgam, tatlı patates, ekşi limon, armut, muz, domates, buğday, soya fasülyesi, hurma gibi bitkilerde bulunur (Müftügil 1985).

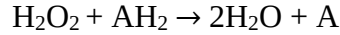
POD'ların %80'ini hem grubu içerenler oluşturur. Hem olmayan POD'lar dört süper aileye ayrılırlar. Bunlar; NADH peroksidazlar, tiol peroksidazlar, halo-peroksidazlar, alkilhidro-peroksidazlar'dır. Heme peroksidazlar hayvansal olmayan peroksidazlar, hayvansal peroksidazlar, katalazlar, haloperoksidazlar olarak gruplandırılır. Hayvansal peroksidazlar sitokrom c peroksidazları, lignin peroksidazları ve bitki hem peroksidazlarını içerir. Bu peroksidazlar lokalizasyonlarına ve işlevselliklerine göre şu şekilde sınıflandırılır (Graham *et al.* 2015).

1. Sınıf: Hücre içi bitki peroksidazları.
2. Sınıf: Hücre dışı peroksidazları: Lignin ve manganez peroksidazları.
3. Sınıf: Hücre dışı bitki peroksidazları: Horseradish Peroksidaz (HRP) ve Soybean Peroksidaz (SBP).

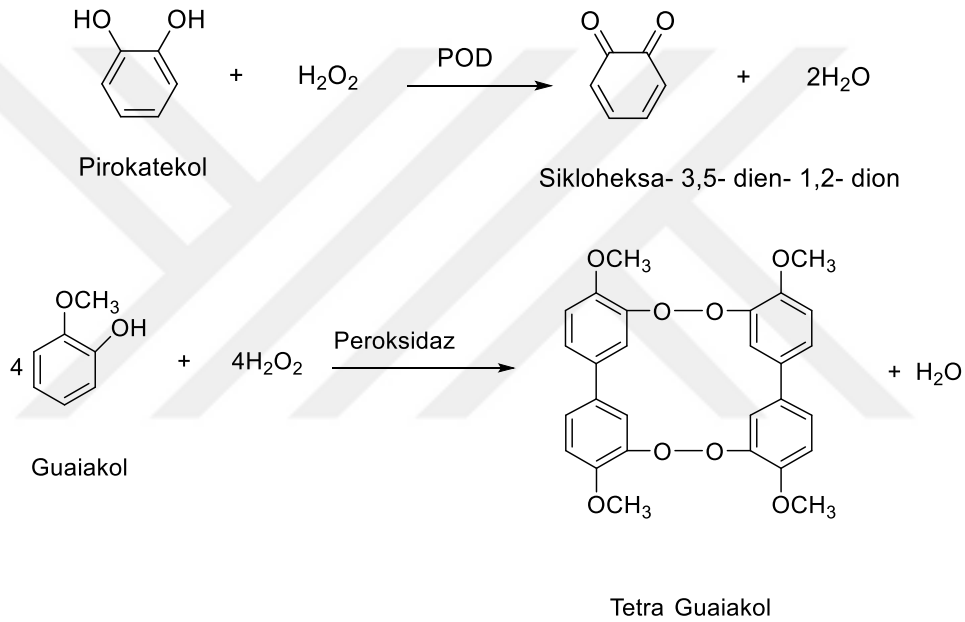
Tablo 2. Peroksidaz Enzimlerinin Sınıflandırılması (Hiraga *et al.* 2001)

Süper aile	Enzim	Kaynak	Moleküler kütle(kDa)
Hayvan peroksidazları	Eozinofil peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	78-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutasyon Peroksidaz	Hayvan	6-22,75-112
	Prostaglandin endoperoksit Sentaz	Hayvan	115-140
Katalaz	Katalaz	Hayvan, bitki, maya, mantar	140-530
Bitki peroksidazları (Sınıf 1.)	Sitokrom c Peroksidaz	Maya, bakteri	32-63
	Katalaz Peroksidaz	Bakteri, mantar	150-240
Bitki Peroksidazları (Sınıf 2.)	Askorbat Peroksidaz	Bitki	30-58
Bitki Peroksidazlar (Sınıf 3.)	Manganaz Peroksidaz	Mantar	43-49
	Ligninaz	Mantar	40-43
	Peroksidaz(POD)	Bitki	28-60

POD enziminin bitkilerde lignin biyosentezinde (Duara *et al.* 2000), indolik asit miktarının belirlenmesinde (Agostini *et al.* 1997) rol almaktadır. POD birçok bitkilerde farklı izoenzimler şeklinde bulunur. (Adams *et al.* 1978). POD aşağıda verilen genel bir katalizleme reaksiyonu ile gösterilir (Van Huystee 1987).

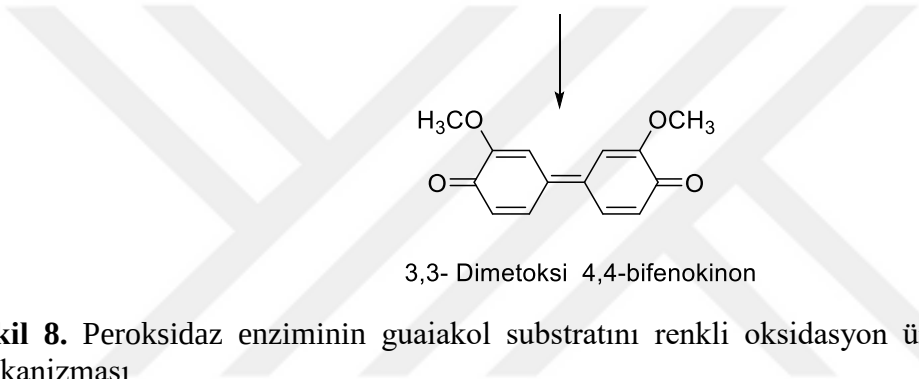


Bitki POD'ları, birçok kimyasal proseste önemli rol almakla beraber, çoğu fenolik bileşiklerin peroksit karşılığında oksidasyonunu gerçekleştirir. Örnek olarak, pirogallol, klorogenik asit, katekol, guaiakolün oksidasyonu gösterilebilir (Onsa *et al.* 2004). POD'lar bu fenolik bileşikleri substrat olarak kullanarak metabolizmada meydana gelen H_2O_2 'yi suya indirgeyerek etkisiz hale getirirler (Doerge *et al.* 1997).



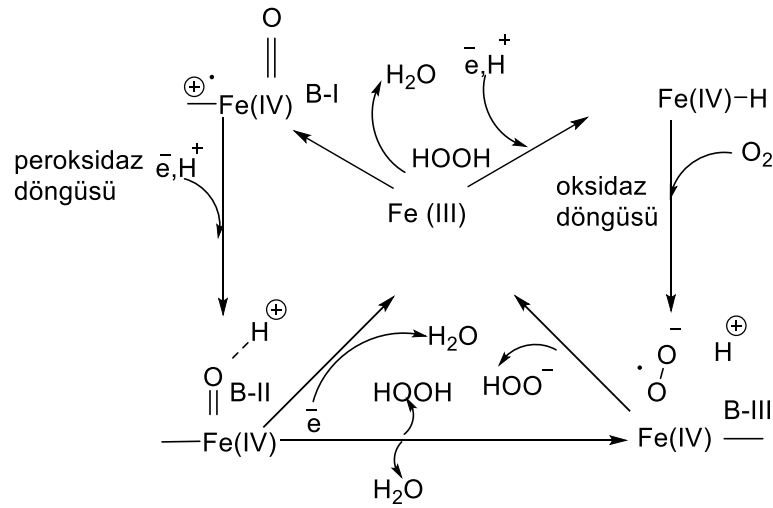
Şekil 7. Peroksidazların farklı aromatik bileşikleri kullanarak hidrojen peroksit giderme mekanizmaları

POD varlığında guaiakol 3,3 –dimetoksi -4,4 bifenokinona okside olur (Doerge *et al.* 1997).



POD Enziminin Etki Mekanizması

8



Şekil 9. POD oksidasyon-redüksiyon döngüsü (Gazaryan *et al.* 2006)

Bitki peroksidazları

Bitki POD'larının tekstil, polimer sentezi, biyosensör, teşhis kiti geliştirme gibi alanlarda uygulamaları bulunmaktadır (Jadhav *et al.* 2009).

Lupinus albus (Price *et al.* 2003), Armoracia rustikana (Fujiyama *et al.* 1990) ve Triticum aestivum (Baga *et al.* 1995) gibi bir dizi bitkiden POD genleri klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bir genin heterolog ekspresyonu, yalnızca genin fonksiyonel karakterizasyonu açısından değil aynı zamanda enzimin çeşitli ekolojik süreçlerde uygulanması için toplu üretimi son derece önemlidir. Soya fasülyesi (Chen and Vierling, 2000), kavak ağacı (Pham *et al.* 2011), yaban turpu (Krainer *et al.* 2014) ve patates gibi birçok kaynaktan peroksidaz genlerinin heterolog ifadesi (Kim *et al.* 2002) hem prokaryotik hem de ökaryotik (Pichia pastoris) sistemlerde gösterilmiştir (Hiraga *et al.* 2001). POD'lar, bakterilerde bulunan çok çeşitli fenolik bileşiklerin redoks reaksiyonunu katalize eden başlıca enzimatik antioksidanlardan biridir. Üçüncü sınıfa ait bitki peroksidazları, hücre duvarı metabolizması, odunlaşma, suberizasyon, patojenlere karşı savunma, yara iyileşmesi, reaktif oksijen türleri (ROS) dahil olmak üzere bitki yaşam döngüsü boyunca bitki büyümesinin ve gelişiminin çeşitli hayati süreçlerinde rol oynar (Wang *et al.* 2015).

POD enzimlerinin fonksiyonlarından biri de organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılmasıdır. POD'lar pH, çinko, bakır, DNA ve diğer metallerin belirlenmesi için floresans sensörler olarak kullanılmaktadır. Bitki POD'ları içerisinde en çok çalışılan enzim yaban turpu peroksidazıdır (HRP). Bu enzim azo boyaların renk giderilmesi, kirletilmiş suların arıtılması, organik sentezler, biyosensörlerin oluşumu için kullanılmaktadır. Organik kirletici maddelerin başlıca sınıflarından biri de fenolik bileşiklerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilen: krezoller, katekol, klorofenoller,

nitrofenoller, 4,4- izopropilidendifol bu bileşiklere örnek olarak verilebilir. Fenolik bileşiklerin çeşitli organizmalar için zehirli olduğu bilinmektedir. Sulu çözeltilerde oluşan fenolik kirletici maddeleri gidermede HRP gibi bir peroksidaz ve H₂O₂'yi kullanan bir enzimatik proses etkinlik gösterir (Jasim *et al.* 2019).

POD endüstriyel atık sulardaki organizmalara için zararlı olan molekülleri katalizli polimerizasyon yolu ile ortadan kaldırabilir. Bu yüzden fenoller, polimerlerin olduğu reaksiyonlara katılarak fenol radikallerini oksitler. POD enzimi klinik teşhis için belirteçlerin önemli bileşini olarak görev alır. Ayrıca, POD enzimi organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunu ve toksik fenollerin bozulma reaksiyonlarını katalize edebilir (Agarwel 2018).

Soya fasülyesi: Soya fasülyesi Hindistan'daki önemli bakliyat ürünlerinden biridir ve vejeteryan popülasyonun protein ihtiyacının önemli bir kısmını karşılar. Tam bakliyatın yanı sıra bölünmüş bakliyat şeklinde de tüketilir. Ayrıca, baklagil bazlı gıdalarda çeşitlendirilmiş uygulama potansiyeline sahiptir (Munir *et al.* 2000).

Soya fasülyesi Doğu Asya'da proteinli gıda maddesi olarak uzun bir geçmişe sahiptir. Doğu halkı yüz yıllar boyunca soya sosu, tempeh, miso dahil olmak üzere çok sayıda soya fasülyesi tabanlı yiyecekler geliştirmiştir (Wolf 1970). Soya fasülyesini en çok yetiştiren ülkeler ABD, Kore, Çin, Rusya, Yugoslavya ve Türkiye'dir. Türkiye'de 1950'li yıllarda başlanan soya üretimi Karadeniz ve Akdeniz Bölgelerinde yoğunlaşmıştır (Munir *et al.* 2000).

Soya fasülyesinde tohum kabuğu dokusunun alt epidermisinin kum saati hücrelerinde genellikle büyük miktarda peroksidaz bulunur (Gijzen *et al.* 1993). Tohum kabuğu dokusundaki peroksidaz, sıklıkla yaralanma veya patojen enfeksiyonunun neden olduğu tohum kabuğunun odunlaşması veya suberizasyonunda işlev görür (Gillikin and Graham *et al.* 2005). Aynı peroksidaz, daha düşük spesifik aktivite dışında kök ve yaprak dokusunda da bulunur (Gijzen *et al.* 1993). Soya fasülyesi peroksidazı (SBP) tohum kabuğundan ekstrakte edilir ve 3. sınıf POD sınıfına aittir. SBP, %75 amino asit sekans homolojisine sahip HRP ile yakından ilişkilidir. SBP proteininde bir pirolidin karboksilik asit kalıntısıyla başlayan ve bir serin kalıntısıyla biten 306 amino asit kalıntısı vardır (Mashhadi.2019). SBP dört disülfür köprüsü, iki kalsiyum iyonu ve yedi glikosilasyon bölgesi içerir. SBP, HRP'den daha yüksek termal stabiliteye sahiptir. SBP'nin 90,5°C'lik bir inaktivasyon sıcaklığı vardır. SBP 60°C'lik sıcaklıkta pH 2,4'te yüksek stabiliteye sahip olarak düşük oksidasyon potansiyelini telafi eder (McEldoon *et al.* 1995). Bu nedenle endüstriyel uygulamalar için SBP daha büyük potansiyel gösterir. Bu enzim gövdenin toplam çözünür proteininin %5'ini oluşturur

ve en zengin peroksidaz kaynaklarından biri olduğuna inanılmaktadır. SBP fenollerin, fenol olmayan aromatiklerin, aromatik aminlerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların oksidasyonunu katalize eder ve bu nedenle sentez ve iyileştirmede kullanıma adaydır. Ayrıca, SBP yüksek termostabilite sergiler, asidik koşullar altında ve çeşitli organik çözücüler içinde aktiftir (Munir *et al.* 2000).

SBP için en büyük potansiyel pazarlar polimer ve reçine üretimidir. SBP, tüm dünya pazarlarında yasaklanmış olan toksik potasyum bromatın yerine fırıncılık endüstrisinde kullanılmaktadır. İyi performansı, daha düşük maliyeti ve termal stabilitesi sayesinde antikorları ve antijenleri tespit etmek için, tıbbi ve tanısal testlerde HRP'nin yerine kullanılmaktadır (Vierling *et al.* 2004). Yüksek katalitik aktivitesi ve termostabilitesi nedeniyle biyosensörlerde de kullanılmaktadır (Ryan *et al.* 2006).

Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, bir karışımı oluşturan bileşenleri saflaştırmak ve ya analiz etmek için kullanılan bir tür sıvı kromatografisidir (Hage *et al.* 2017). Bu metot biyoafinite, lektin afinitesi, biyometrik afinite, boronat afinitesi, metal iyon afinitesi, biyometrik afinite, gibi sınıflara ayrılmaktadır. Bu metodun avantajı hedef proteinleri tek basamakta yüksek saflıkta ayırabilmesidir (Hage 2005).

Afinite kromatografisinin nispeten yeni bir yöntem olduğu düşünülse de sıvı kromatografisinin en eski formlarından birini oluşturmaktadır. Afinite kromatografisi ile yapılan tüm çalışmalarda hem durağan faz hem de destek materyali olarak işlev gören çözünmeyen materyaller kullanılmaktadır (Arora *et al.* 2016).

Çok çeşitli protein–ligand sistemleri afinite kromatografisinin spesifik biyolojik etkileşim olgusunu kullanmaktadır. Saflaştırılacak makromolekülü içeren bir çözelti, başka bir ligandın kovalent olarak eklendiği çözünmez bir jel içeren kolondan geçirilir. Spesifik olarak adsorbe edilmiş protein, çözücünün bileşimini değiştirerek ayrıştırılabilir. Afinite kromatografisi, saflaştırılmış proteinlerin kimyasal modifikasyonlarından kaynaklanan protein bileşenlerinin ayrılmasında, çözünmesinde, saflaştırılmış proteinin denatüre formlarının çıkarılmasında faydalı olabilir. Afinite kromatografisi ile saflaştırma yönteminin avantajları olarak; saflaştırılacak proteinin proteazlar gibi kirleticilerden ve inhibitörlerden hızlıca ayrılması, tek aşamalı prosedürün hızlılığı, kolaylılığı, proteinin üç boyutlu yapısının stabilizasyonu sayılabilir (Wilchek 2004).

Matriks

Afinite kromatografisi için bir ön koşul, ligandlar ve hedefler için bir destek sistemidir. Enzim veya antikorların saflaştırılması için poliaminostiren ve cam boncuklar gibi katı desteklere bağlanan bağlayıcı ajanlar kullanılır. Boncuklu agaroz 1964'te geliştirilmiştir ve daha sonra 1967'de siyanojen bromür immobilizasyon yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilerlemeler, peptitlerin ve proteinlerin polisakarit bazlı malzemelere kovalent olarak bağlanması için uygun araçların geliştirilmesine izin vermiştir. Bileşiklerin kökenine bağlı olarak afinite kromatografisinde kullanılan matriksler doğal, sentetik ve inorganik olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Arora *et al.* 2016).

Tablo 3. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Matrikslerin Sınıflandırılması (S. Arora *et al.* Methodos 2016).

Matrix	Sınıf	Örnekler
Doğal	Agaroz	Sepharose
	Dextran boncuklar	Sepadex ve Superdex
	Selüloz boncukları	Sellüloz boncukları
Sentetik	Akrilamid	Bio -jel
	Polistiren	Polistiren
	Polimetakralat	Separon HEMA
İnorganik	Gözenekli silika	Gözenekli silika
	Cam elyafı	Cam elyafı
	TiO ₂	TiO ₂

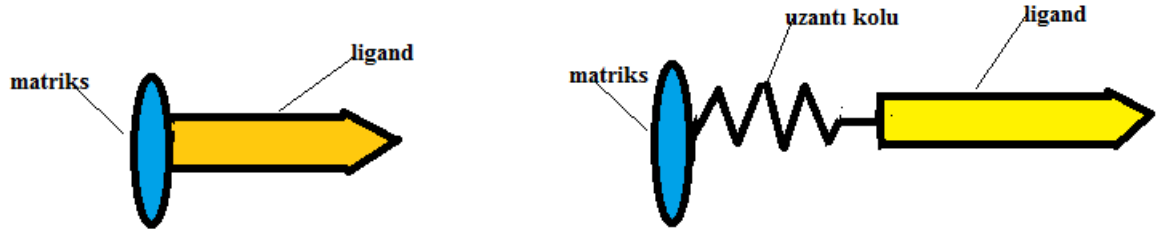
Bu yöntemde en fazla kullanılan inci şeklinde dizilmiş agaroz jeli olan, sepharosedur. Sepharose kullanılarak hazırlanan adsorbanlar: deterjanlar, yüksek pH, disosiye yapan bileşikler gibi olumsuz koşullara dirençlidir (Axen and Emback 1971).

Afinite ligandları

Afinite kromatografisi için uygun bir ligandın nitelikleri arasında özgüllük, haraketsizleştirme fizibilitesi, elüsyon koşullarında stabilite ve matrikse eklendikten sonra hedef bağlanma kapasitesinin korunması yer alır. Bu ligandlar üç geniş grupta sınıflandırılır. Bu sınıflar: biyospesifik ligandlar, psödobiyospesifik ligandlar ve sentetik ligandlardır (Hage *et al.* 2005).

Uzantı kolu

Canlı organizmalarda aktif bölge enzimlerde iç kısma yerleşmiştir. Enzim kofaktörleri gibi küçük ligandların matrikse direkt olarak bağlanması sonucu hazırlanmış afinite kolonlarında matriks ile liganda bağlanan proteinler arasında istenmeyen etkileşimler oluşabilir. Bu gibi durumları ortadan kaldırmak için matriks ile ligand arasına uzantı kolu yerleştirilir (Occara *et al.* 1974). Afinite kromatografi yönteminde kullanılan uzantı kolunun uzunluğu çok önemlidir. Uzantı kolu kısa olursa ligant numuneyi bağlayamaz. Eğer uzantı kolu çok uzun olursa, uzantı kolu ortamdaki maddelerle istenmeyen hidrofobik etkileşimlere girer. Oluşan hidrofobik etkileşimler afinite kromatografi tekniğinde istenmeyen bir durumdur (Occara *et al.* 1974).



Şekil 10. Uzantı kolunun gösterimi

KURAMSAL TEMELLER

Literatürde farklı kromatografik yöntemler kullanılarak bitkisel kaynaklardan POD enziminin saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır ve bu çalışmalar halen devam etmektedir. Kullanılan metotlar arasında, ultrafiltrasyon, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi gibi çeşitli yöntemler vardır. Bu çalışmalara örnek olarak afinite kromatografi tekniği ile kırmızı lahanadan %2,9 verimle 120 kat (Somtürk *et al.* 2014), papayadan POD enzimini % 44,37 verimle 30,22 kat verimle (Pandey *et al.* 2012), kırmızı pancardan %84,6 verimle 15 kat (Rudrappa *et al.* 2007), at turpundan % 71 verimle 291 kat (Lavery *et al.* 2010), hurma yapraklarından %5,8 verimle 17 kat (Al- Senaidy *et al.* 2011), vanilya çekirdiğinden % 19 verimle 21 kat (Marguez *et al.* 2008), soya fasülyesi kabuklarından %16,4 verimle 57 kat (Lakshmi *et al.* 2010), karnabahardan % 0,2 verimle 19,33 kat verimle (Köksal and Gülçin 2008) POD enzimi saflaştırılmıştır.

Yapılan saflaştırma çalışmaları sonucunda POD enziminin birden fazla izoenzimi bulunmuştur. Farklı bitkilerden izole edilen izoenzimlerin: moleküler ağırlığının farklı olduğu belirlenmiştir (Tıpawan and Barrett 2005). Farklı bitki kaynaklarında elde edilen POD enzimi için molekül ağırlıkları (SDS –PAGE): vanilya çekirdeğinde 46,5 kDa (Marguez *et al.* 2008), kırmızı pancarda 80 kDa (Inal *et al.* 2015), kara lahanada 95 kDa (Gülçin and Yıldırım 2005), soya fasülyesinde 67 kDa (Fernandes *et al.* 2020), olarak tespit edilmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalarda POD enziminin guaiakol substratı için K_m ve değerleri: palmya yaprakları için K_m değeri 3,96 mM (Deepa and Arumuguhan 2002), at turpu için K_m değeri 0,5 mM (Lavery *et al.* 2010), ıspanak yaprakları için K_m değeri 17,35 mM (Köksal 2011), H_2O_2 substratı için soya fasülyesinde K_m 1.092 mM (Ghaem *et al.* 2010), karnabahar için K_m değeri 141,64 mM (Köksal and Gulcin 2008) V_{max} değerleri: ıspanak yaprakları için V_{max} değeri 12,34 EÜ/ml dk (Köksal 2011), karnabahar için V_{max} değeri 7500 EÜ/ml dk (Köksal and Gulcin 2008) tespit edilmiştir.

SBP enzimi için Ghaem *et al.* (2010) yaptığı çalışmada H_2O_2 substratı için soya fasülyesinde K_m 1,092 mM olarak, Lee *et al.* (2003) SBP enzimi için H_2O_2 substratı için K_m 0,98Mm V_{max} 0,21 μ mol tespit edilmiştir.

Rojas- Reyes *et al.* (2014) yaptığı çalışmada Sefakril S-200 jel kromatografi tekniği ile avokado meyvesinden POD enzimi izole edilip ve molekül kütleini 40 kDa, izoelektrik noktasını 4,7 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 6 farklı substrat kullanılarak enzim üzerine etkisi incelenmiştir. ABTS kullanılarak optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 3,8 ve 51°C olarak belirlenmiştir.

Şişecioğlu *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmalarda iyon değişim kromatografi tekniği kullanılarak karaturptan CM-sefadeks ve amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle POD enzimini 9,7 kat saflaştırarak karakterizasyonu yapmışlardır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE elektroforez metodu kullanılarak 66 kDa olarak belirlenmiştir.

Sessa and Anderson (1981) yaptığı çalışmada Bio-Gel P-60 üzerinde jel filtrasyonu ile kolon kromatografisi kullanılarak SBP enzimi 628 kat (%4) verimle saflaştırıldı. Soya peroksidazları hidrojen donörü olarak guaiakol substratıyla ile pH 5,5'te optimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Ambreen *et al.* (2000) yaptığı çalışmada soya fasulyesinden peroksidaz enzimi ilk amonyum sülfat çökelme tekniğiyle, daha sonra OEAE-selüloz kromatografisiyle saflaştırıldı. Optimum pH 5,5, optimum sıcaklık 24°C olarak belirlenmiştir.

Liu *et al.* (1999) yaptığı çalışmada soya fasülyesinden izole edilen asidik bir peroksidaz olan soya fasülyesi kabuğu peroksidaz (EC.1.11.1.7) amonyum sülfat fraksiyonasyonu, DEAE- Sephadex A-50 kromatografisi, Konkanavalin A – Sepharose-4B Afinite kromatografisi ve Bio- Gel 60 jel filtrasyon kombinasyonu ile elektroforetik homojenliğe kadar saflaştırıldı. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı 38 kDa olarak belirlendi. Optimum pH 4,6, optimum sıcaklık 5°C tespit edildi.

Ajila *et al.* (2009) yaptığı çalışmada siyah gram bitkisinden POD enzimi iyon değişim kromatografisi kullanılarak iki adımda saflaştırılmış, saflaştırma katsayısı 44 olarak belirlenmiştir. POD enziminin molekül ağırlığını SDS-PAGE metodu kullanılarak 35 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin K_m değeri hidrojen peroksit ve o – Diansidin için 43,5 mM ve 4,7 mM olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın Amacı

Literatürde peroksidaz enzimleri üzerine çeşitli saflaştırma prosedürleri bulunmaktadır. Daha önce rapor edilen çalışmalarda inhibisyon etkisi gösteren aminobenzohidrazid türevleri peroksidaz inhibitörü olarak bulunmuş ve afinite jelleri hazırlanarak enzimlerinin saflaştırılması yapılmıştır. Fakat soya filizinin yapraklarından SBP enziminin 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro

benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid ligandları kullanılarak afinite kromotografisi metoduyla saflaştırılması ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Daha önce kullanılan tekniklere göre Afinite kromatografi tekniği peroksidaz enzimini saflaştırmak için birçok açıdan üstünlüğe sahiptir. Soya filizi yapraklarından SBP enziminin düşük maliyetde, kısa sürede, afinite kromotografisi tekniğiyle tekrar tekrar kullanılabilirlik gibi avantajlara sahip bir yöntemle saflaştırmak, karakterize etmek, ligant olarak kullanılan aminobenzohidrazit türevlerinin detaylı inhibisyon parametrelerini, bazı kinetik özelliklerini belirlemek amaçlanmıştır.



MATERYAL ve YÖNTEMLER

Materyal

Tablo 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal maddeler	Üretici firma
Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sefaroz -4B ,%64 Hidrazinmonohidrat, Sodyum Nitrit, Tirozin, CH ₃ COONa, Na ₂ S ₂ O ₃ , Trihidroksimetilaminometan(Tris), Glutaraldehit, N,N,N,N'-tetrametilendiamin (TEMED), Hidrojen peroksit, Guaiakol, Amonyum persülfat (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , Coomassiebrillantblue R-250,Formaaldehit, NaCl, Coomassie brilliantblue G-250, N,N'- metilen bisakrilamid, Standart serum albumin, Etanol, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Na ₂ CO ₃ , Akrilamid, NaHCO ₃ , Brom timol mavisi, Metanol, Gliserol, Etil asetat, Diyaliz torbası, Diklorometan	Sigma Chemical Company
L-Tirozin, HCl, H ₃ PO ₄ , NaN ₃ , NaClO ₄ , AgNO ₃ , Na ₂ SO ₄ , H ₂ SO ₄ , C ₃ H ₈ O	E. Merk. AG
KH ₂ PO ₄ , Triklor asetik asit (TCA), NaOH	Riedel de Haen
β – merkapttoetanol	Fluka
Glisin	ICN Biomedical s. İnc.
4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5- kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5- aminoizoftalohidrazid	Fluorochem

Tablo 5.Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Marka
Elektroforez tankı	Biorad (dikey)
Afinite kolonu	Sigma
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Buz dolapları	Beko
Magnetik karıştırıcı	1WiseStir MSH -20A
Ph metre	Mettler Toledo Seven Compact
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisonswhirli-mixer
Hassas terazi	Denver instrument
Kar makinesi	Scotsman AF -20 (Automaticice machines)
NMR	Bruker 400 MHz
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000
Otomatik pipet	Nıchıryo
Peristaltik pompa	İsmatec
Su banyosu	Nüve
Ph metre Karıştırıcı(Shaker)	Mettler Toledo Seven Compact
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K (Germany)
Ultraturaks	Heidolph Silient Crusher M

Kullanılacak çözeltiler ve hazırlanması

Çözeltileri hazırlamak için saf su kullanıldı. Çözeltilerin hazırlanış şekli aşağıdaki gibidir.

Tablo 6. Afinite Kolonun Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Siyanojen Bromür ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye L-Tirozin kenetlendirilmesi reaksiyonu:	80 ml destille suda 0,84 g NaHCO_3 çözüldü, pH 9,0 oluncaya kadar NaOH ile titre edildi. Toplam hacim destille suyuyla 100 mL'ye tamamlandı.
Sefaroz -4B-L-Tirozin kolon materyaline amino bezohidrazit türevlerinin kenetlendirilmesi işlemi:	0,84 g NaHCO_3 80 ml saf suda çözülecek, pH 8,8 oluncaya kadar 1M NaOH ile titre edildi. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Afinite jelinin yıkanması işleminde kullanılan tampon çözelti:	6g NaH_2PO_4 400 mL saf suda çözüldü. pH 6,8 oluncaya kadar 1 M HCl ile titre edildi. Toplam hacim destille suyu ile 500 mL'ye tamamlandı.

Tablo 7. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Afinite kolonlarının dengelenmesinde kullanılan tampon:	pH 6,8 olan 10 mM NaH ₂ PO ₄ : 6g NaH ₂ PO ₄ , 450 ml destille suda çözüldü. 1M HCl ile pH 6,8'e ayarlanacak, son hacim destille suyla 500 mL'ye tamamlandı.
Afinite kolonlarının yıkanmasında kullanılan tampon:	pH 6,8 olan 25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,84 g Na ₂ PO ₄ 750 mL saf suda çözüldü. pH 6,8'e 1 M HCl ile ayarlandı, son hacim 800 mL'ye tamamlandı
Elüsyonda kullanılan çözelti:	pH 6,8 olan 1M NaCl içeren 25 mM NaH ₂ PO ₄ 23,4 g NaCl destile suyunda çözüldü, 2,84g Na ₂ HPO ₄ çözeltiye eklendi. 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlandı, son hacim 400mL'ye tamamlandı

Tablo 8. Homojenat Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Homojenat tamponu:	4,08277 g KH ₂ PO ₄ , 80 ml saf suda çözüldü. pH 7,0'a kadar 1 N NaOH ile titre edilecek, sonra destile suyu ile son hacim 100mL'ye tamamlandı.

Tablo 9. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Substrat çözeltisi: 45 mM Guaikol çözeltisi	996 $\frac{1}{10}$ pipet yardımıyla guaiaikol alınarak son hacim 200 ml'ye tamamlandı
POD aktivite ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi:	2,72 g KH ₂ PO ₄ , 150 ml destile suda çözülecek. pH 6,0'a kadar 1N NaOH ile titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 200mL'ye tamamlandı.
Substrat çözeltisi:	1,11 g/mL olan yoğunluğu olan % 30'luk H ₂ O ₂ 'den 456 μ L alınarak saf suyla son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

Tablo 10. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılacak Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Bradford çözeltisi:	50 mg Coomassie brilliant blue G-250, %95'lik etanolde 25 ml çözüldü, bu çözeltiye 50 ml % 95'lik H ₃ PO ₄ ilave edildi ve çözelti destille suyuyla 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

Tablo 11. Lowry Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Lowry yöntemiyle protein tayininde kullanılan çözeltiler:	0,05 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0,1 g sodyum potasyum tartarat 10 mL saf suda çözülür. Aynı beherde 1 g Na_2CO_3 ile 0,2 g NaOH eklenerek 50 mL de çözülür üzerine 1 mL saf su eklendi ve bakır reaktifinden 1 μL alınarak çözeltiliye eklendi. Tüplere protein çözeltilisinden 100 μL alınarak 1000 μL alkali bakır reaktifi katılır ve 10 dakika inkübe edilir. 1:1 oranında saf suyla seyretilmiş 1000 μL folin ciocalteu fenol reaktifi ilave edilerek 30 dakika inkübe edilir ve 660 nm’de adsorbansı ölçülür.

Tablo 12. Elektroforez İçin Kullanılacak Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
pH 6,8 1 M Tris tamponu	24,2g (0,2 mol) Trizma, 160 mL destile suyunda çözülecek. pH 6,8’e 1 M HCl ile ayarlandı, toplam hacim destile suyuyla 200 mL’ye tamamlandı.
pH 8,8 1 M Tris tamponu	24,2g (0,2 mol) Trizma, 160 mL destile suyunda çözülür. pH 8,8’e 1 N HCl ile ayarlanacak, toplam hacim destile suyuyla 200 mL’ye tamamlandı.
Yürütme tamponu	14,4 g glisin ve 3 g trizma, 200 mL destile suyunda çözülür, üzerine %10’lık 10 mL Sodyum Dodesil Sülfat ilave edilip son hacim destile suyuyla 1000 mL’ye tamamlandı.
Numune tamponu	1 M Trizma 1,3 mL (pH 6,8), %10’lık SDS 6 ml ve %100 ‘lük gliserin 3 ml, 0,1’lik 2 ml brom timol mavisi karıştırılarak, hacimi destile suyuyla 20 ml’ye tamamlandı. Bu tampon kullanmadan hemen önce 1000 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β – merkaptotanol ilave edildi.

Tablo 13. Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Boyama çözeltisi	250 mg AgNO_3 , 250 mL destile suyunda çözülüp üzerine 75 mL formaldehit eklenerek hazırlandı.
Yıkama çözeltisi:	9,37 g Na_2CO_3 , 675 mL destile suyunda çözülür ve üzerine 300 μL formaldehit eklendi.
Tespit çözeltisi:	Destille su 150 mL, % 96’lık etanol 75 mL, 25 mL CH_3COOH karıştırılmasıyla elde edildi.
Redüksiyon çözeltisi	CH_3COONa 12 g, etanol 11,25 mL ve destille su 200 mL karıştırılıp, pH 6,0’a CH_3COOH ile ayarlandıktan sonra, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 375 mg, glutaraldehit 7,5 mL eklendi son hacim saf su ile 375 ml’ye tamamlandı.

Tablo 14. Çalışmamızda Kullanılan İnhibitör Stok Çözeltileri

Çözelti adı	Kimyasal adı ve Miktarı	Son Hacim
4-amino 3-bromo 5-floro benzohidrazid çözeltisi	0,0016 g 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid	2 mL
4-amino 3-bromo 5- kloro benzohidrazid çözeltisi	0,0089 g 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid	4 mL
4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid çözeltisi	0,0028 g 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid	3 mL
5-aminoizoftalohidrazid çözeltisi	0,0018g 5-aminoizoftalohidrazid	2 mL

Tablo 15. Substrat Spesifikliğine Yönelik Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
0,1 M guaiakol çözeltisi:	2200 µL guaiakol alındı ve son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
0,1 M H ₂ O ₂ çözeltisi:	634 µL H ₂ O ₂ alındı ve son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
0,1 M 4- metilkatekol çözeltisi:	2,48 g 4- metilkatekol alındı ve son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
ABTS çözeltisi:	0,1 M NaH ₂ PO ₄ 'ten 3 gr ve ABTS ' den 0,137 gr tartıldı ve son hacim 200 mL' ye tamamlandı. pH 6'ya titre edildi ve son hacim 0,25 L'ye tamamlandı.
Pirokatekol çözeltisi:	1100 µL pirokatekol alındı ve son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

Yöntem

Soya filizlerinin yetiştirilmesi

8 gr soya tohumu alınmış ve aralarındaki mesafe 1 cm olacak şekilde pamuğun üzerine yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığının 25°C olması şartıyla her gün 1 kere pamuk ıslatılmış ve 3 hafta boyunca aynı işlem tekrar edilmiştir. Süreç sonunda yetiştirilen filizler toplanmış ve -80°C de muhafaza edilmiştir.

Protein tayini

Bradford protein tayin yöntemi

Bradford protein tayin metodu kullanılarak, soya filizlerinden elde edilen homojenattaki ve afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları belirlendi. Bu yöntemde, negatif yüklü Comassie Brilliant Blue G-250 reaktifi, pozitif yüklü proteinler ile kompleks oluşturur. Comassie Brilliant Blue G-250 boyası iki farklı λ_{max} değerine sahiptir. $\lambda_{max} = 595$ nm'de mavi, $\lambda_{max}=465$ nm'de kırmızı değer

gösterir. Proteinin bağlanması sonucu boyanın λ_{max} değeri 465 nm'den 595 nm'ye kayar ve kırmızı, mavi formu oluşturur. İki dakikada kompleks oluşumu tamamlanır. Tayin işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirilir:

İçerisinde 1 mg protein bulunan 1 mL BSA çözeltisinden hazırlanan tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ L konuldu. Her bir tüpe 4900 μ L protein tayini çözeltisi eklendi, tüplerin hacmi saf suyla 100 μ L tamamlandı ve tüp vorteks ile karıştırıldı. Tüplere 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı ve cam küvet yardımıyla 595 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Adsorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları ile standart grafik çizildi.

Saflaştırılmış enzimlerden farklı tüplere sırasıyla 100'er μ L alındı ve her tüpe 4900'er μ L Comassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek tüp vorteks ile karıştırıldı. Karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılan tüplerin adsorbansları 3 ml'lik cam küvet yardımıyla 595 nm'de ölçüldü. Çizilen standart grafik yardımıyla homojenatta ve afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılan enzimlerde bulunan protein miktarları tayin edildi.

POD aktivite ölçümü yöntemi

Şişecioğlu ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemle göre peroksidaz enziminin aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Bu prosedür H_2O_2 tarafından guaiakolun yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin 470 nm'de neden olduğu adsorbans artışın ölçülmesi esasına dayanır.

Reaksiyon 1 cm'lik ışık yolu olan cam küvete enzimin ilave edilmesiyle başlatıldı ve 3 dakika süresince 470 nm' de adsorbans artışı spektrofotometrede ölçüldü.

SBP enziminin aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

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

A = Adsorbans (180 saniye sonunda okunan)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

D_f = Seyreltme katsayısı

c = Konsantrasyon (μ mol/ mL)

V = Reaksiyon hızı

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

Enzim saflaştırma işleminde substrat olarak guaiakolun kullanıldığı saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümünün sonuçları için: enzim ünitesi 0°C'de 1 dakikada 1 μ mol guaiakolun oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak sunulmuştur.

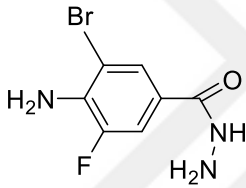
Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesinde küvet içeriği

Kullanılan çözeltiler	Kör (µL)	Numune (µL)
Guaikol	1000	1000
Aktivite tamponu	1000	990
Hidrojen peroksit	1000	1000
Enzim	-	10
Toplam	3000	3000

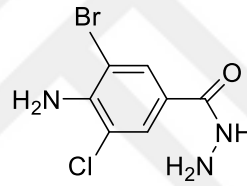
SBP Enzim Saflaştırma Çalışmaları

Ligand Seçimi

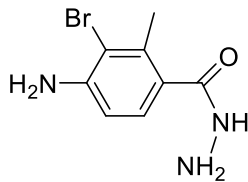
SBP enzimi saflaştırmak amacıyla 4-amino 3-bromo 5-floro benzohidrazid, 4-amino 3-bromo 5- kloro benzohidrazid, 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid molekülleri ligand olarak kullanıldı.



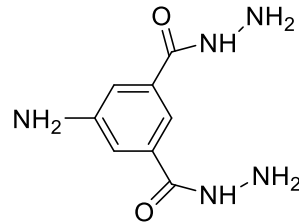
4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid



4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid



4 -amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid



5- aminoizoftalohidrazid

Şekil 11. SBP inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller

Aminobenzohidrazit türevlerinin sentezlenmesi

4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5- kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid moleküllerinin sentezi Öztekin at al. (2021)'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Bu doğrultuda, moleküllerin metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılmıştır. Moleküller (3 mmL) 30 mL metil alkol içerisinde %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi çözünmüş, reaksiyon tamamlanıncıya kadar geri soğutucu altında ısıtılarak çözücü uzaklaştırıldı ve elde edilen çökelekler tekrar etanolde

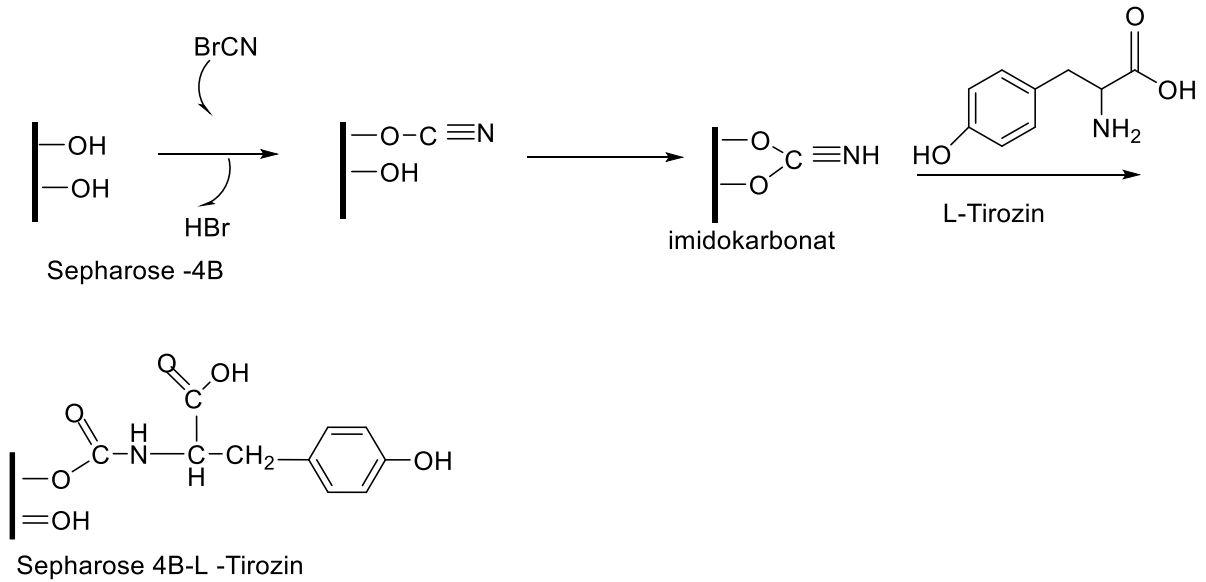
çözülerek kristallenmeye bırakılmıştır. Elde edilen kristallerin yapıları H^1 -NMR ile doğrulanmıştır.

Sefaroz -4B-L – tirozin afinite jelinin hazırlanması

Sefaroz-4B matriksi üzerinde Siyanojen Bromür ile aktifleştirilmiş afinite jeli hazırlandı. Kovalent olarak kolon materyaline L-tirozin uzantı kolu bağlandı, daha sonra türev moleküller Sefaroz-4B-L tirozin jel materyaline diazolanarak kenetlendi. Hazırlanan afinite jeline inhibitör enzimi spesifik olarak bağlayan kısım, Sepharpose 4-B matriksi, tirozin afinite jelinin uzantı kolunu oluşturmaktadır.

Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sefaroz -4B'ye tirozin takılması

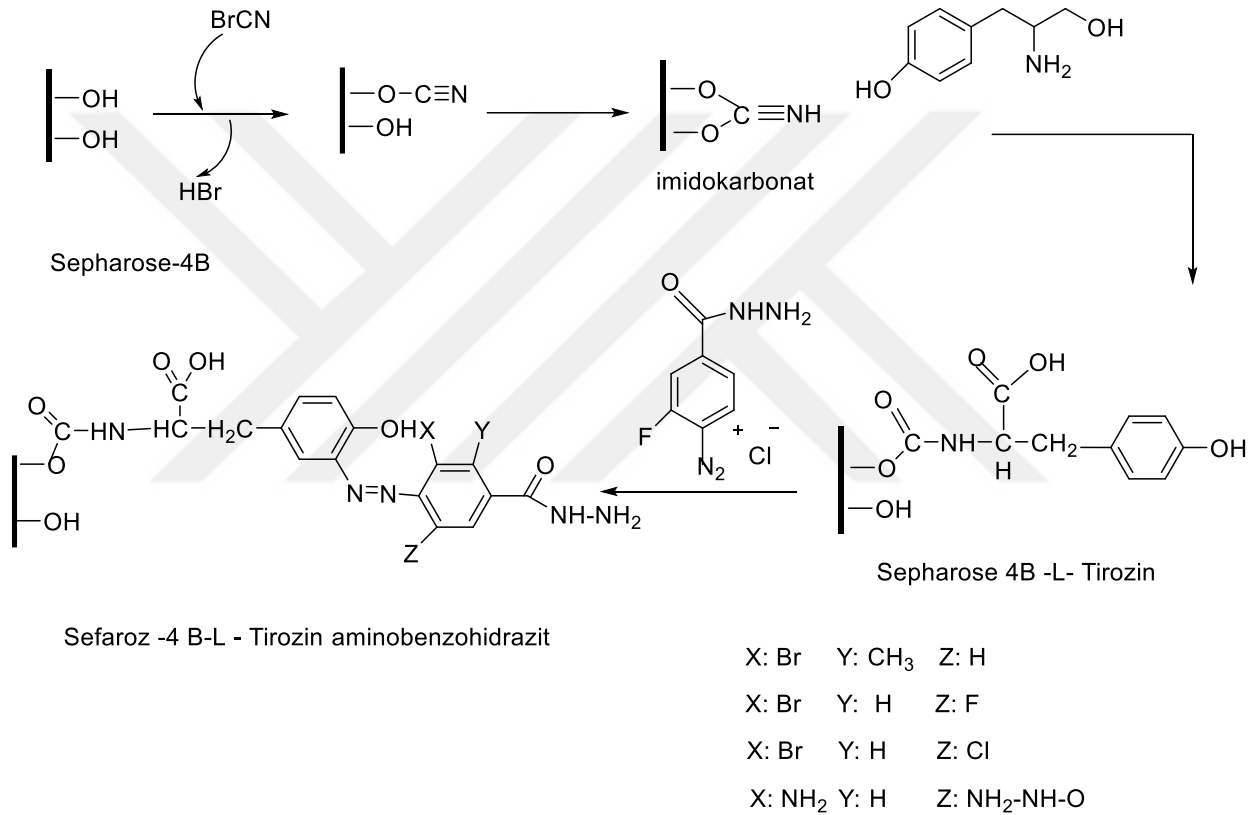
Siyanojen Bromürle aktifleştirilmiş Sefaroz-4B, 250 mL saf suyla yıkanarak pH'sı 10 olan 0,1 M $NaHCO_3$ tamponu bir behere aktarıldı. 80 mg L- tirozin kullandığımız tamponun 20 mL'sinde çözülerek çözelti Sefaroz-4B ile aynı behere aktarıldı. Süspansiyon manyetik karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca $4^\circ C$ 'de karıştırıldı, daha sonra $4^\circ C$ 'de 16 saat boyunca bekletildi. Bu süreden sonra, yıkama suyu 280 nm' de adsorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen tirozin jelden uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 0,2 M $NaHCO_3$ 100mL (pH 8,8) tamponu ile tekrarlandı, aynı tamponun 40 mL'si içine tirozin takılı jel alındı.



Şekil 12. Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu

Aminobenzohidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi

4 Aminno benzohidrazid türevi molekülün her birinden 25mg alınarak 10 ml 0°C civarında, 1M HCl içinde çözüldü, içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti her bir inhibitör çözeltileri içerisine damla damla ilave edildi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış olan amino benzohidrazid türevleri ayrı ayrı 40 mL Sefaroz-4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9,6'a 1 M NaOH ile çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı üzerinde yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve pH 6,8 olan 200 ml 0,05M olan KH₂PO₄ tamponuyla yıkandı, sonra aynı tampondan üzerine bir miktar konularak saklandı ve Şekil 13'de gösterildi (Whitney 1974).



Şekil 13. Amino benzohidrazid molekülünün Sefaroz-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu

Afinite kolonun paketlenmesi

pH 6,8 olan KH₂PO₄ dengeleme tamponu içine hazırlanan jeller alınarak, jel süspanse edildi. Sistemin su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Kapalı sistemden oluşan 1x10 cm'lik soğutmalı kolona, süspanse edilmiş jel paketlenildi. Jel çöktürüldükten sonra, peristaltik pompa yardımıyla yıkama tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğunu anlamak için elüat ile tamponun 280 nm'de adsorbanslarının ve pH'larının eşitlenmiş olup olmadığına bakıldı.

Bitkilerden homojenat hazırlanması

20g soya fasülyesi filizi alındı. Bu filizler blender yardımıyla iyice parçalandı. Parçaların üzerine sıvı azot dökülerek ve havanda dövülerek toz haline getirildi. pH'sı 6,0 olan 0,1M'lık fosfat tamponunun 50 ml'si havanda toz haline getirilen bitki parçaları üzerine ilave edildi ve 8 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen süspansiyondaki bitki hücrelerinin iyice parçalanması ve homojenize olması için 2.400 rpm'de homojenizatörden geçirildi. Homojenat tülbentden süzülerek santrifüj tüplerine koyuldu ve 3000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Çökelek süzülüp atıldıktan sonra süpernatant bir sonraki deneylerde kullanılmak üzere 4°C'de bekletildi.

Afinite kolonuna numüne tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan homojenatın 8 ml'si daha önceden dengelenmiş olan kolona yüklendi. Afinite kolonu yıkama tamponu ile yıkanarak peroksidaz enziminin kolono tutunması ve diğer safsızlıkların kolondan uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işleminden sonra kolona elüsyon tamponu eklendi ve elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş olan peroksidaz enziminin elüsyonu gerçekleştirildi. Peristaltik pompa yardımıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı ve elüatlar 1,5'er mL'lik eppendorf tüplere toplandı. Her bir tüpdeki kalitatif protein miktarı 280 nm' de spektrofotometrik olarak belirlendi.

SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi

SBP enzimi saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra, enzimin saflık derecesi 3-8% kesikli SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) yapılarak, kontrol edildi (Laemmli 1970). İşlem şu şekilde yapıldı.

Elektroferezde kullanılan plaklar ilk önce su ile daha sonra alkol ile yıkandı. Elektroferez plakları üst üste getirilerek özel kısıkaçların aracılığıyla tutturuldu. Sabitlenen camlar, sızdırmayı engelleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama stadına yerleştirildi. Ayırma ve yığma jeli aşağıda belirtilen miktarlarda ayrı ayrı hazırlandı.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı

pH 8,8 olan 5 mL 1 M Tris-HCl tamponu, 4,4 mL % 30 Akrilamit - % 0,8 Bisakrilamit çözeltisi, %5'lik 0,13 mL (TEMED) çözeltisi, % 10'luk 0,2 mL SDS çözeltisi, 3,13 mL destile suyuyla karıştırıldı ve bu karışımın üzerine % 10'luk 0,2 mL (NH₄)₂S₂O₈ eklendi.

Yığma jeli şöyle hazırlandı

pH 6,8 olan 0,41 mL 1 M Tris –HCl tamponu, 0,4 mL % 30 akrilamid ve % 0,8 bisakrilamid çözeltisi, %10'luk 0,03 mL SDS çözeltisi, % 5'lik 0,03 mL TEMED çözeltisi ve 2,45 mL destile suyuyla karıştırıldı. % 10'luk 0,1 mL $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ilave edildi.

İlk olarak ayırma jeli çözeltisi hazırlandı ve plakların arasına üst kesimde 0,5 cm kalana kadar enjektörle dolduruldu. Plakların arasındaki jelin belli bir süre donması için beklendi. Ayırma jeli donduktan sonra yığma jeli hazırlandı ve daha sonra yığma jeli ayırma jelinin üzerine ilave edildi. Kuyucukların oluşması için taraklar dikkatlice yerleştirildi ve jelin kuruması beklendi. Daha sonra taraklar kuyucukları bozmadan, dikkatli bir şekilde çıkarılarak, plaklar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının hem üst kısmı hem de alt kısmı yürütme tamponu ile dolduruldu. Kaynar su banyosunda 100 μL enzim örneği, 100 μL gliserol ve 100 μL nümune tamponu 5 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra nümuneler soğutularak dikkatli bir şekilde elektroforeze enjektör yardımıyla yüklendi. Elektroforez tank kapağı kapatılarak üst tarafından katot kablo, alt taraftan anot kablo yerleştirildi. Önce jel 80 voltta yarım saat yürütüldü. Daha sonra akım 120 volta getirilerek oda sıcaklığında boya jelden akana kadar (1,5 saat) yürütüldü. Akım durdurularak, cam plakların arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Daha sonra jel 30 dakika boyunca jel tespit çözeltisi ile karıştırıldı. Bu süre sonunda jel 30 dakika redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi. Jel 3 defa 5 dakikalık süreler boyunca saf suyla iyice yıkandı. Daha sonra jelin boyanması için jel gümüş nitrat çözeltisi ile 20 dakika boyunca karıştırıcı üzerinde boyandı. Siyahlaşan sıvı banyo çözeltisiyle yıkanarak dökülmüştür. Bantlar görününce jel yıkama 2 çözeltisi içine alındı ve yıkandı (Temel 2006).

Afinite jellerinin SBP Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid Afinite jelinin SBP tutma kapasitesi bulunurken iyonik şiddet, pH, sıcaklık incelendi. Kolonun kapasite belirleme işleminde uygulanan prosedüre göre: Hazırlanmış olan jelden 1 ml alındı ve dengeleme tamponuyla 1x10 cm'lik bir kolona konuldu. Daha sonra önceden hazırlanmış olan SBP enzimiyle doyuruldu. Bu süreden sonra yıkama tamponu ile enzimin fazlası yıkanarak, uygun elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş olan peroksidaz enzimi elüe edildi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve kurutulan jeller 0,02 gr ile 0,05 gr arasında bulundu. Bulunan değerlerin en yükseği alınarak, mg protein/gram- jel cinsinden peroksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

SBP enzimi saflaştırılmasında hazırlanan kolonda kolon kapasitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla pH 6,8'de 0,1 M KH_2PO_4 tamponu hazırlandı, sıcaklığı 5, 10, 15, 20 ve 25 °C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi tespit edildi ve mg protein/ g jel başına grafik çizildi.

pH'nın kolon kapasitesine etkisi

SBP enziminin saflaştırılmasında pH'sı 4,0 ile 9,0 arasında 0,1M KH_2PO_4 tamponları kullanılarak kolonun enzimi tutma kapasitesi üzerine pH'nın nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla, en uygun pH için elde ettiğimiz sonuçlar mg protein /g jel başına grafik çizildi.

Kolon kapasitesine iyonik şiddetin etkisi

pH 6,8'de KH_2PO_4 tamponları hazırlanarak, iyonik şiddet 0,2 ile 0,5M arasında değiştirilerek SBP enzimi için en iyi kolon tutma sıcaklığında deney yapıldı, sonuçlar (mg protein /g jel başına) grafik olarak verildi.

Guaiakol ve H_2O_2 Substratları İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Üzerindeki Çalışmalar

Guaiakol substratı kullanılarak optimum sıcaklık, iyonik şiddet, optimum pH değerinde 5 farklı substrat konsantrasyonunda K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için aktivite ölçümleri yapıldı. Guaiakol, H_2O_2 , ABTS, pirokatekol ve 4-metil katekol 5 farklı substrat konsantrasyonunda spektrofotometre cihazında aktivite değerleri ölçüldü. Yapılan çalışmalar zamanı elde edilen verilerden $1/V$ ve $1/S$ değerleri bulunarak Lineweaver –Burk grafikleri çizildi. Hem guaiakol hem de H_2O_2 'nin K_m ve V_{max} değerleri hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

Saflaştırılan SBP Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

SBP enziminin kinetik özelliklerini araştırmak amacıyla guaiakol substratı kullanılarak optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık için KM ve V_{max} değerleri hesaplandı.

SBP enzimi için optimum pH çalışması

SBP enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 0,1 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (sodyum asetat) pH'sı 4,0-4,5-5,0-5,5 olan, 0,1 M KH_2PO_4 (potasyum fosfat) pH'sı 6,0-6,5-7,0-7,5 olan, 0,1 M $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (tris tamponu) pH 'sı 8,0-8,5-9,0 olan tamponlar hazırlandı. Uygun

substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar tablo 32, 33, 34 ve şekil 29 halinde gösterildi

Optimum iyonik şiddet çalışmaları SBP enzimi için

SBP enzimi için optimum iyonik şiddetleri tespit etmek amacıyla optimum pH'da 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ve 1000 mM'lık KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler her tampon için spektrofotometrik olarak belirlendi, elde edilen sonuçlar tablo 35 ve şekil 30 halinde gösterildi.

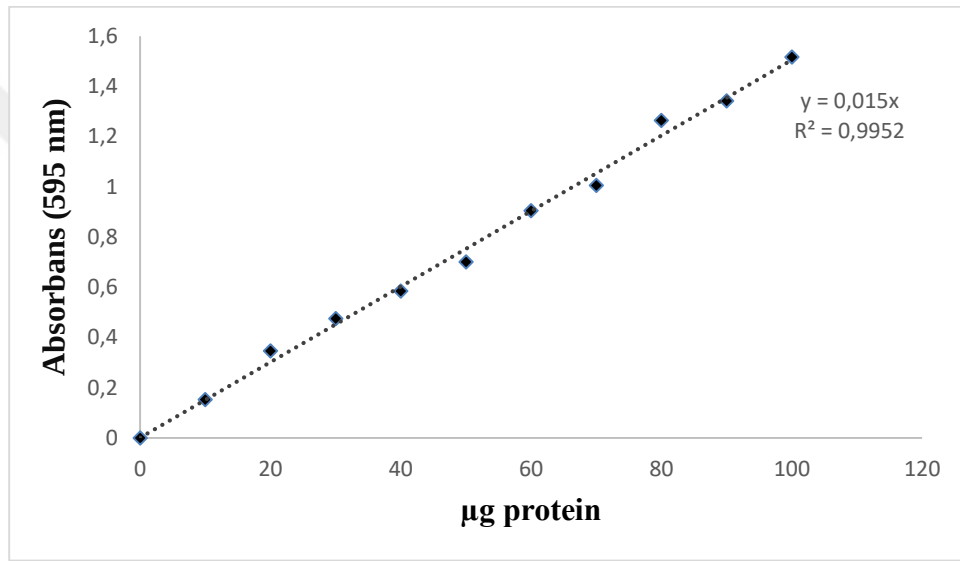
SBP enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları

Soya bitkisinde bulunan SBP enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla sıcak su banyosu kullanılmıştır. Enzim aktivitesi için hazırladığımız guaiakol, H_2O_2 substratları ve KH_2PO_4 tamponu su banyosuna yerleştirdi. Çözeltiler kısa süre su banyosunda bekletildiden sonra 5 ile 80°C arasındaki sıcaklıklara bakılarak aktivite ölçümü yapıldı. Çıkan sonuçlar Tablo 36 ve Şekil 31 halinde gösterildi.

ARAŞTIRMA BULGULAR

Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Soya fasülyesi filizlerinden hazırlanmış olan homojenat ve afinite kolonundan saflaştırılan peroksidaz enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı Bradford metodu ile belirlenmiştir. Afinite kromatografi yöntemiyle elde edilen enzim ve homojenat çözeltisindeki kantitatif protein miktarı hesaplandı. Çözeltinin μg proteine karşı gelen absorbands değerleri Şekil 14’de verildi.



Şekil 14. Kantitatif protein tayini için sıgır serum albümin standart olarak kullanılarak oluşturulmuş grafik

SBP Enzimi İçin Afinite Tekniği Kullanılarak Elde Edilen Saflaştırma Sonuçları

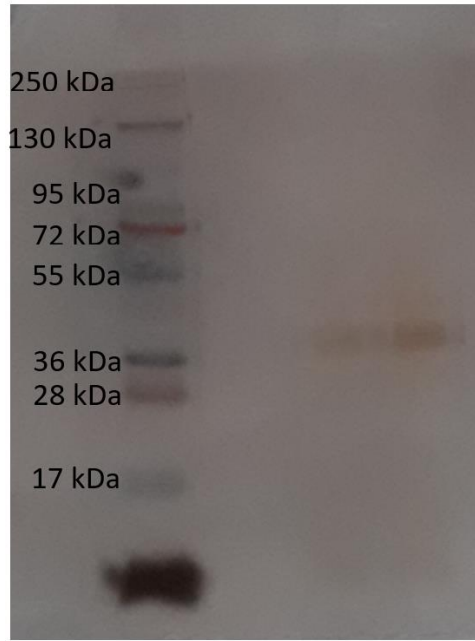
Ligand olarak aminobenzohidrazid türevi olan 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid molekülünün kullanıldığı kolonda, soya filizinden elde edilen peroksidaz enzimini için aktivite tayini 470 nm’de ve Bradford protein tayini ise 595 nm’de yapıldı. SBP enziminin 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid kolonundan saflaştırma sonuçları Tablo 16’ da gösterildi.

Tablo 16. SBP Enziminin Aminobenzohidrazid Türevleri Kullanılarak Saflaştırılması

Soya fasülyesi		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
4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid	Homojenat	8	34,44	11,2	275,5	89,6	3,07	100	1
	Sepharose 4B Afinite	2	6	0,0146	12	0,0292	410,9	4,3	133,8
4-amino 3-bromo 5-klorobenzohidrazid	Homojenat	8	34,44	11,2	275,5	89,6	3,07	100	1
	Sepharose 4B Afinite	1,5	10	0,0266	15	0,0399	375,9	5,44	122,44
4-amino 3-bromo 5-florobenzohidrazid	Homojenat	8	34,44	11,2	275,5	89,6	3,07	100	1
	Sepharose 4B Afinite	1,5	16	0,04	24	0,06	400	8,71	130,2
5-aminoizoftalo hidrazid	Homojenat	8	34,44	11,2	275,5	89,6	3,07	100	1
	Sepharose 4B Afinite	1,5	8	0,033	12	0,0495	242,4	4,35	78,9

SDS –Poliakrilamid Jel Elektroföresi Sonuçları

SBP enziminin saflığını ve molekül ağırlığını belirleyebilmek için SDS–PAGE yapıldı. Saflaştırılmış peroksidaz enzimi, standart proteinler jel kuyularına yüklendi ve yürütüldü. Sonra jel üzerinde elde edilen bantın fotoğrafı çekildi ve molekül kütlesi yaklaşık 40 kDa tespit edildi.

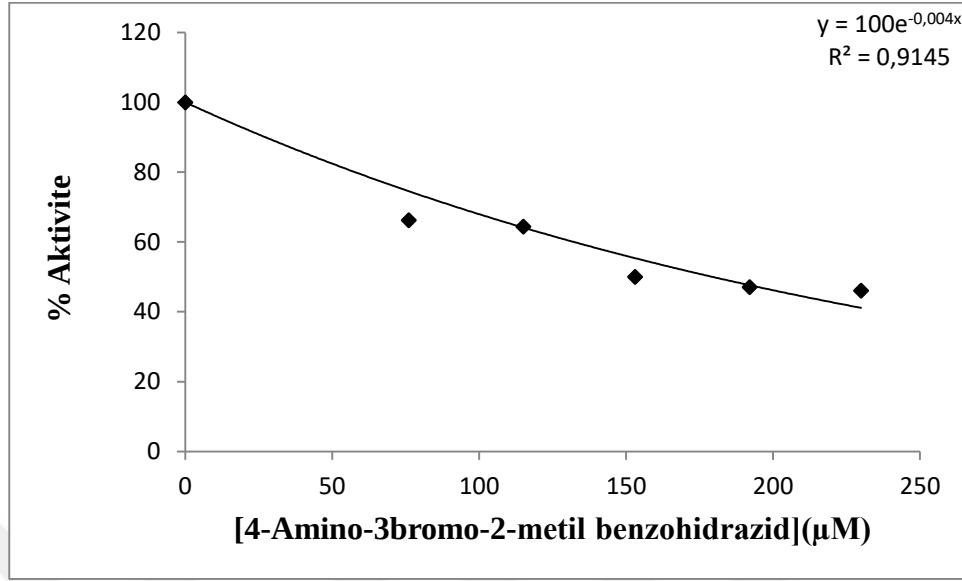


Şekil 15. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid kolonundan saflaştırılan SBP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

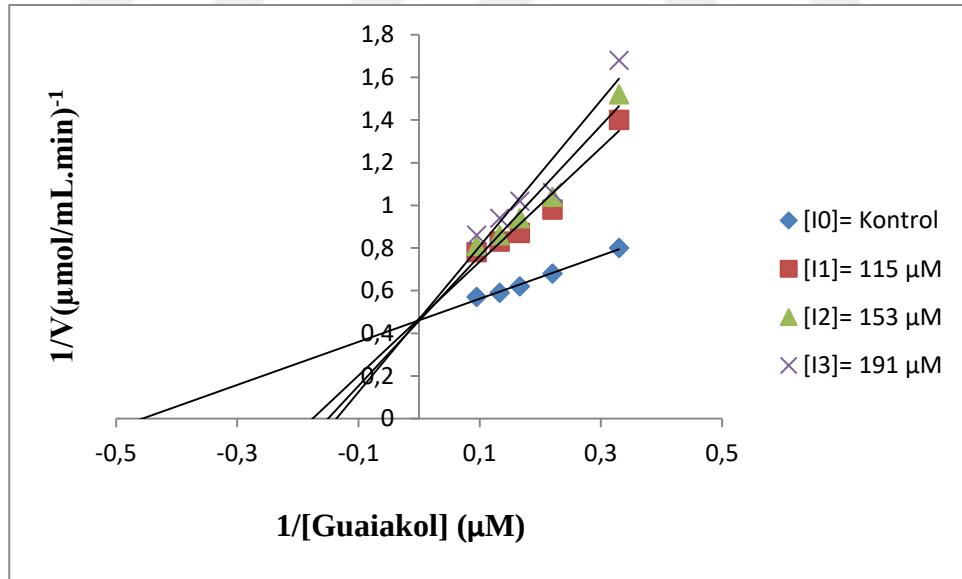
Aminobenzohidrazid Türevlerinin SBP Enzimi Üzerine IC₅₀ ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada sentezlenen 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid moleküllerinin soya SBP enzimleri üzerine inhibisyon etkileri ve saflaştırma performansıyla olan ilişkinin belirlenmesi ayrıntılı olarak incelendi. Guaiakol substratıyla reaksiyon hızı belirlendi. Aktivite – konsantrasyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri her bir molekül için ayrı ayrı belirlendi. İnhibisyon çeşiti ve K_i değeri için ise Lineawear–Burk grafikleri kullanıldı.

4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

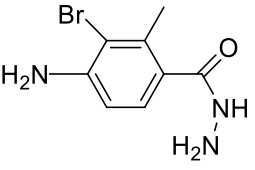


Şekil 16. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 4-Amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite – 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid grafiği

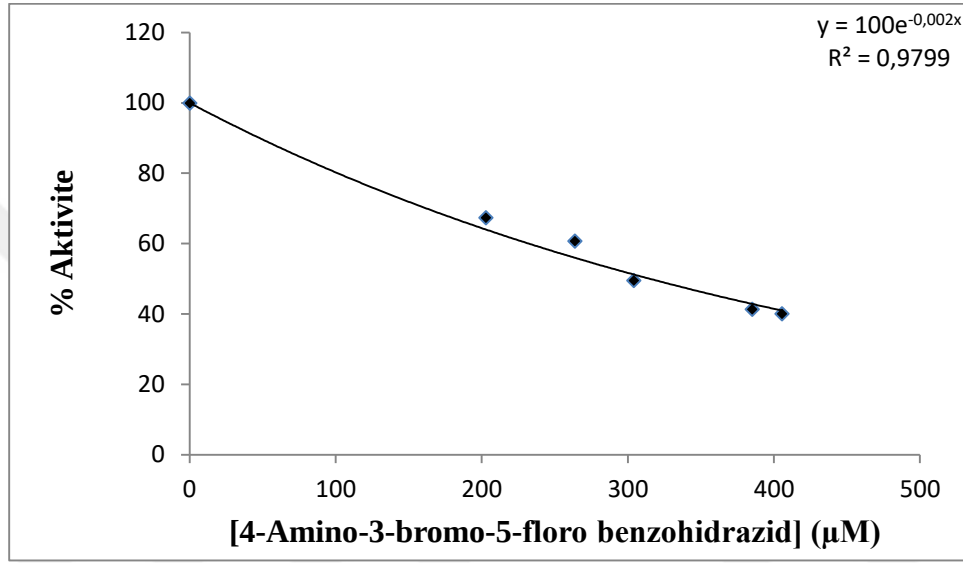


Şekil 17. SBP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V$ - $1/[S]$ grafiği

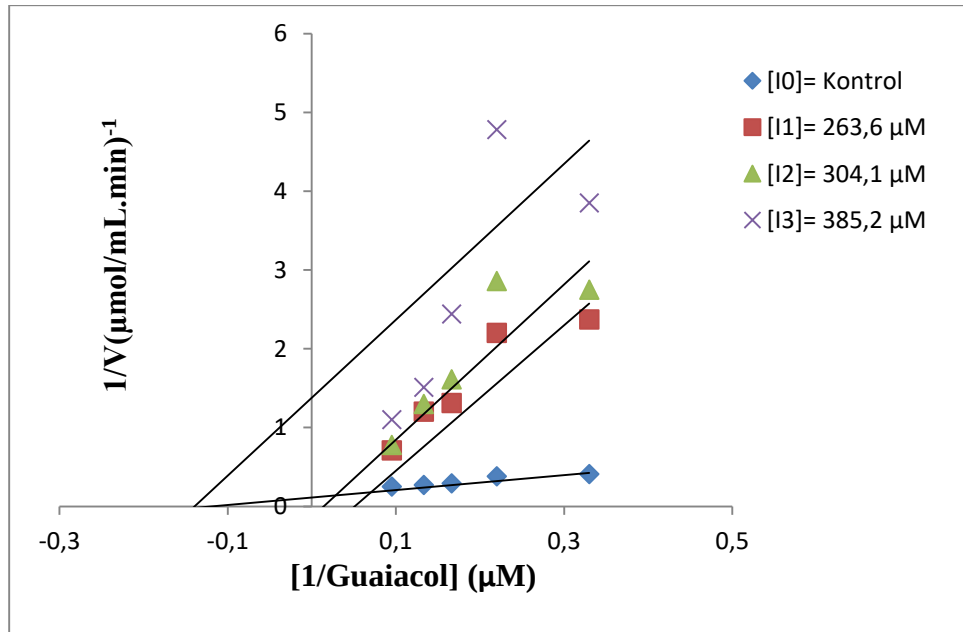
Tablo 17. 4-Amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid İnhibitörünün SBP Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi

	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon Türü
	173	80,55 ± 12,6	Yarışmalı

4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

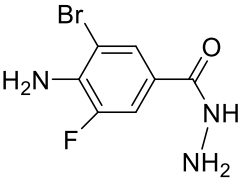


Şekil 18. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 4-Amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite –4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid grafiği

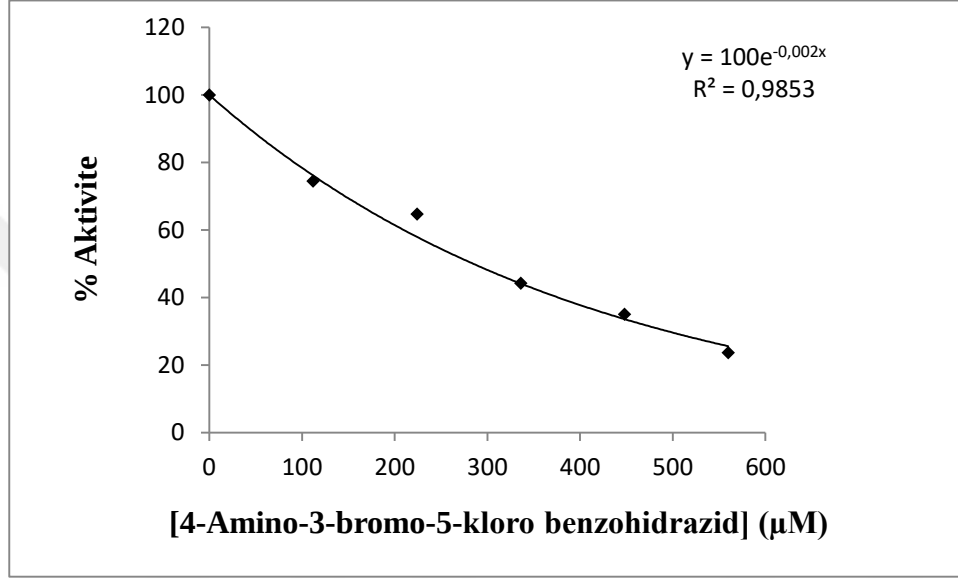


Şekil 19. SBP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği

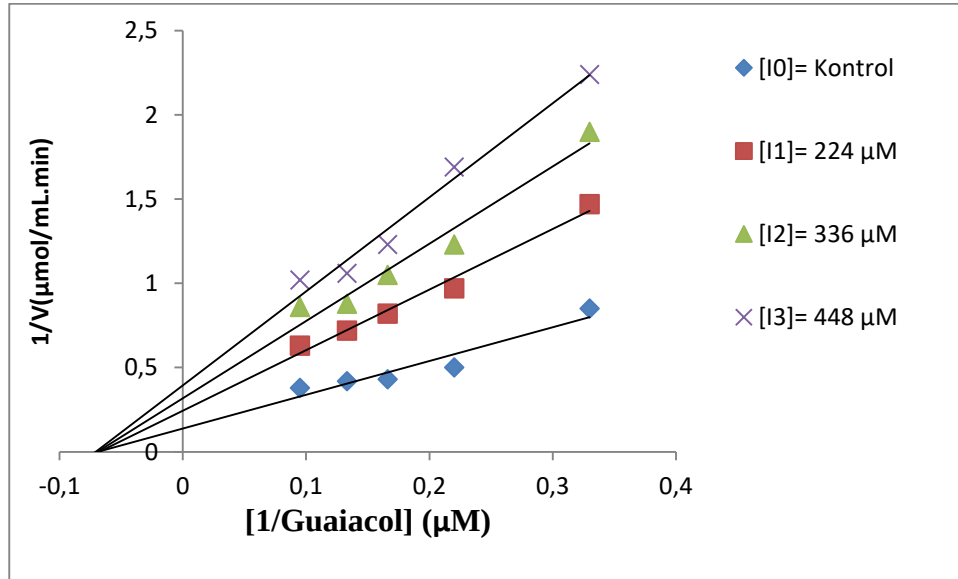
Tablo 18. SBP Enzimi Üzerine 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid İnhibitörünün İnhibisyon Etkisi

	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon Türü
	346	283 ± 46,8	Yarışmalı

4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

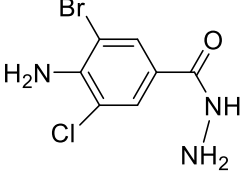


Şekil 20. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 4-Amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite – 4-amino-3-bromo-5-kloro benzohidrazid grafiği

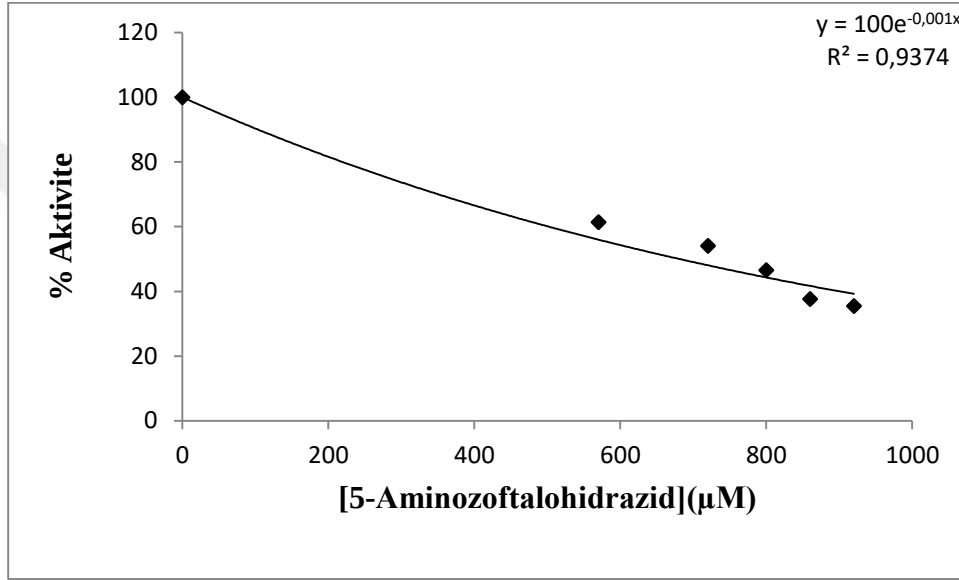


Şekil 21. POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid inhibitörü için edilen 1/V -1/[S] grafiği

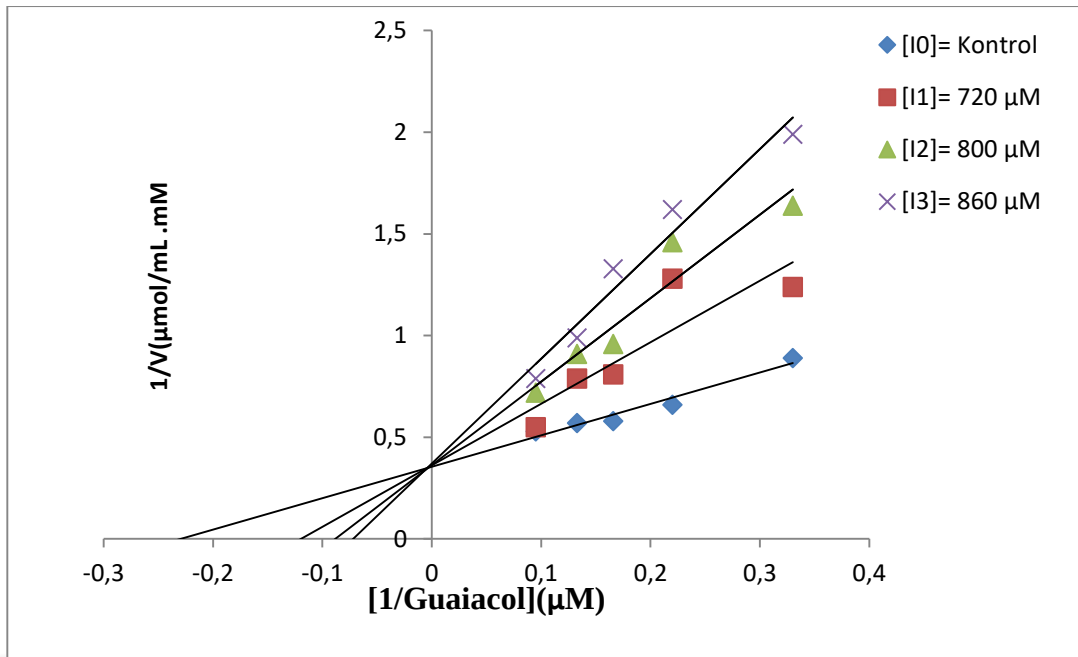
Tablo 19. 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid İnhibitörünün SBP Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi

	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon Türü
	346	264 ± 26,7	Yarışmasız

5-aminoizoftalohidrazid inhibitörü için SBP enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

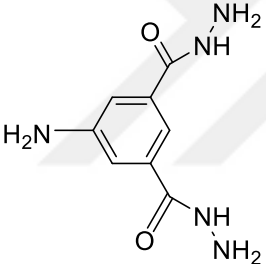


Şekil 22. Guaiakol substratına bağlı olarak SBP enzimi için 5-Aminoizoftalbenzohidrazid le elde edilen %Aktivite –5-aminoizoftalohidrazid grafiği



Şekil 23. POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 5-Aminoizoftalohidrazid inhibitörü için edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği

Tablo 20. 5- Amino –izoftalohidrazid İnhibitörünün SBP Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi

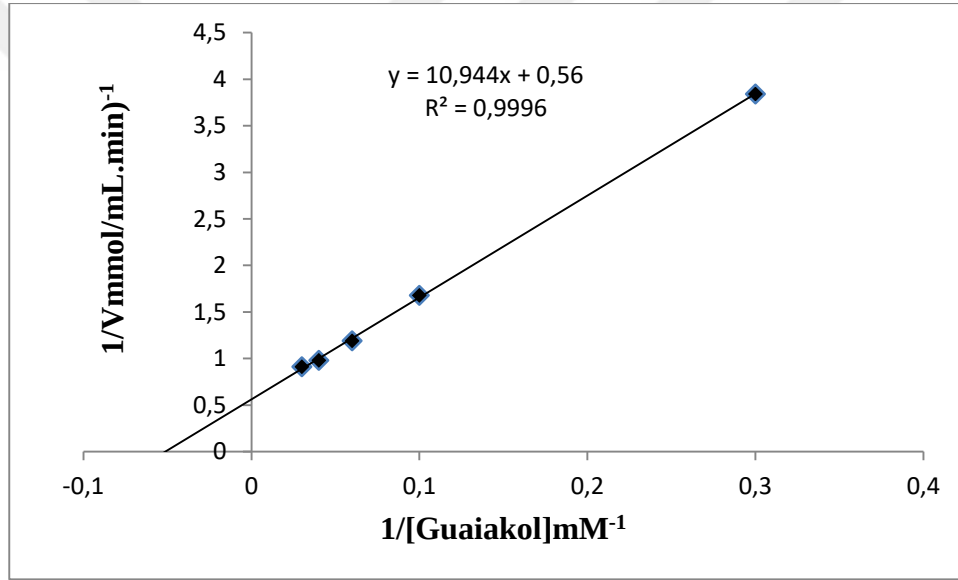
	IC_{50} (μM)	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon Türü
	693	480 ± 130	Yarışmalı

Guaiakol Substrat İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları

Soya bitkisinden saflaştırılan SBP enzimi için guaiakol substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar yapıldı. SBP için aktivite ölçümü 5 farklı guaiakol substratı kullanılarak belirlendi. Çizilen $1/[Guaiakol] - 1/V$ Lineweaver–Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuç: guaiakol için K_m değeri 19,61 mM tespit edildi. V_{max} değeri 1,78 EU/mL. dk bulundu.

Tablo 21. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Guaiakol Derişim Çizelgesi

Kör tüpü(mL)			Numune tüpü (mL)				
Guaiakol	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂	Guaiakol	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,98	1,0	0,90	0,020
1,0	1,0	1,0	0,3	0,98	1,0	0,70	0,020
1,0	1,0	1,0	0,5	0,98	1,0	0,50	0,020
1,0	1,0	1,0	0,7	0,98	1,0	0,30	0,020
1,0	1,0	1,0	0,9	0,98	1,0	0,10	0,020



Şekil 24. SBP enziminin Guaiakol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik

Tablo 22. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri

Kinetik çalışmalar	
K_m	19,61 mM
V_{max}	1,78 EU/mL. dk

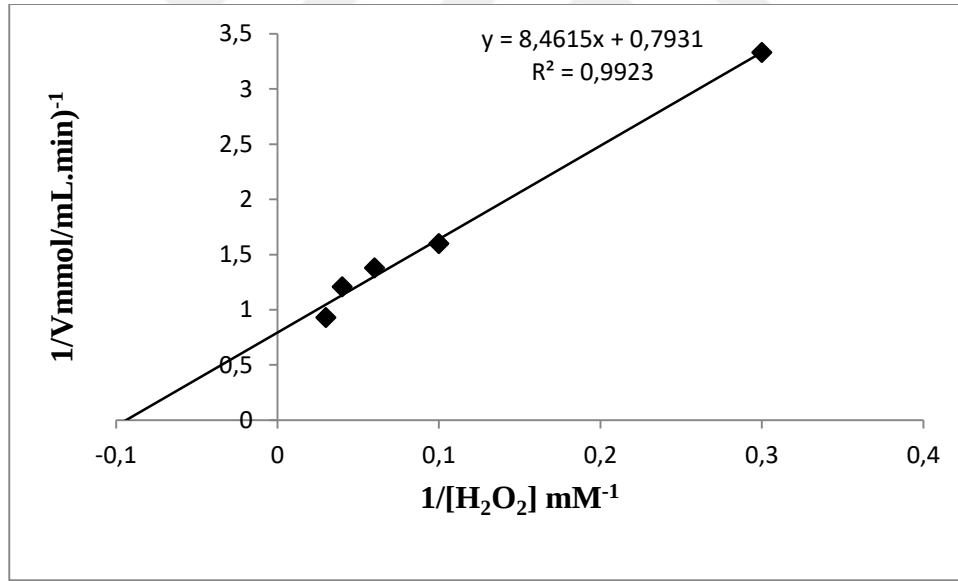
H₂O₂ substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Soya bitkisinden saflaştırılan SBP enzimi için H₂O₂ substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar yapıldı. SBP için 5 farklı H₂O₂ konsantrasyonu kullanılarak belirlendi. Çizilen $1/[H_2O_2]$ - $1/V$ Lineweaver –Burk grafiğinden K_m ve V_{max}

değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuç: H_2O_2 K_m değeri 10,67 mM tespit edil. V_{max} değeri 1,26 EU/mL. dk bulundu.

Tablo 23. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik H_2O_2 Derişim Çizelgesi

Kör tüpü(mL)					Numune tüpü (mL)		
Guaia kol	Fosfat tamponu	H_2O_2	H_2O_2	Fosfat tamponu	Guaia kol	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,98	1,0	0,90	0,020
1,0	1,0	1,0	0,3	0,98	1,0	0,70	0,020
1,0	1,0	1,0	0,5	0,98	1,0	0,50	0,020
1,0	1,0	1,0	0,7	0,98	1,0	0,30	0,020
1,0	1,0	1,0	0,9	0,98	1,0	0,10	0,020



Şekil 25. SBP enziminin H_2O_2 substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik

Tablo 24. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri

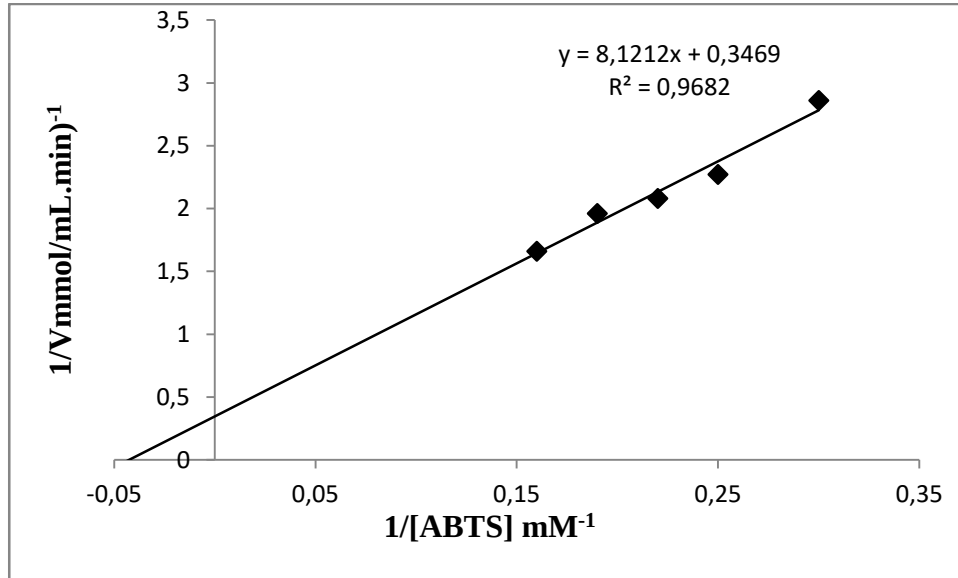
Kinetik çalışmalar	
K_m	10,67 mM
V_{max}	1,26 EU/mL. dk

ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Soya bitkisinden saflaştırılan SBP enzimi için ABTS substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar yapıldı. SBP için 5 farklı ABTS konsantrasyonu kullanılarak belirlendi. Çizilen $1/[ABTS]-1/V$ Lineweaver–Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuç: ABTS K_m değeri 23,25 mM tespit edildi. V_{max} değeri 2,88 EU/mL.dk bulundu.

Tablo 25. SBP Enzimi için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik ABTS Derişim Çizelgesi

Kör tüpü (mL)				Numune tüpü(mL)				
ABTS	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	ABTS	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
2,0	0,88	0,110	0,01	1,1	0,88	0,110	0,89	0,020
2,0	0,88	0,110	0,01	1,3	0,88	0,110	0,69	0,020
2,0	0,88	0,110	0,01	1,5	0,88	0,110	0,49	0,020
2,0	0,88	0,110	0,01	1,7	0,88	0,110	0,29	0,020
2,0	0,88	0,110	0,01	1,9	0,88	0,110	0,09	0,020



Şekil 26. SBP enziminin ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik

Tablo 26. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri

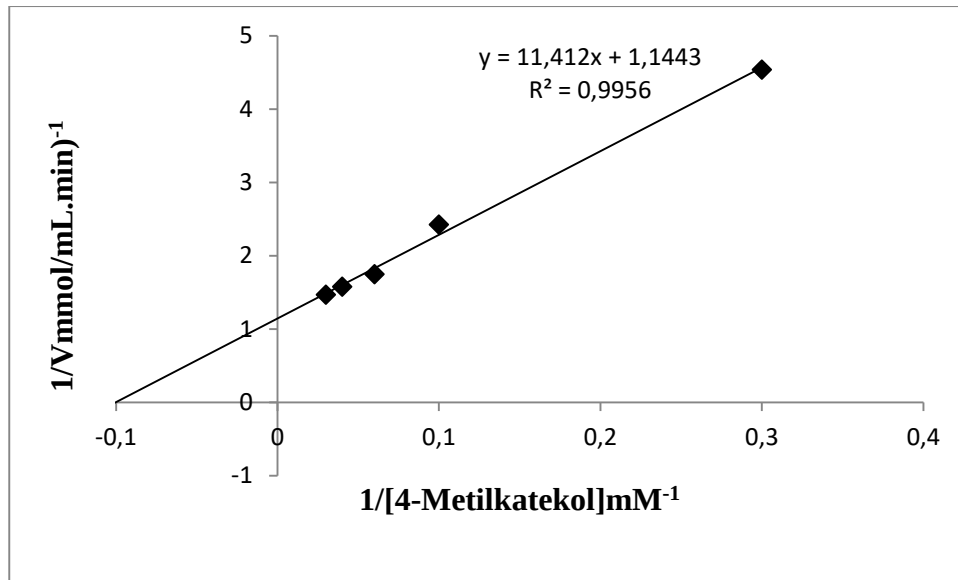
Kinetik çalışmalar	
K_m	23,25 mM
V_{max}	2,88 EU/mL. dk

4 –Metilkataköl substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Soya bitkisinden saflaştırılan SBP enzimi için 4-Metilkateköl substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar yapıldı. SBP için 5 farklı ABTS konsantrasyonu kullanılarak belirlendi. Çizilen $1/[4\text{-Metilkataköl}]-1/V$ Lineweaver –Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuç: 4- Metilkataköl K_m değeri 0,873mM tespit edildi. V_{max} değeri 9,9 EU/mL. dk bulundu.

Tablo 27. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik 4- Metilkatekol Derişim Çizelgesi

Kör tüpü(mL)			Numune tüpü (mL)				
4-metilkatekol	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂	4-metilkatekol	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,98	1,0	0,90	0,020
1,0	1,0	1,0	0,3	0,98	1,0	0,70	0,020
1,0	1,0	1,0	0,5	0,98	1,0	0,50	0,020
1,0	1,0	1,0	0,7	0,98	1,0	0,30	0,020
1,0	1,0	1,0	0,9	0,98	1,0	0,10	0,020



Şekil 27. SBP enziminin 4- Metilkatekol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik

Tablo 28. SBP Enzimi için K_m ve V_{max} Değerleri

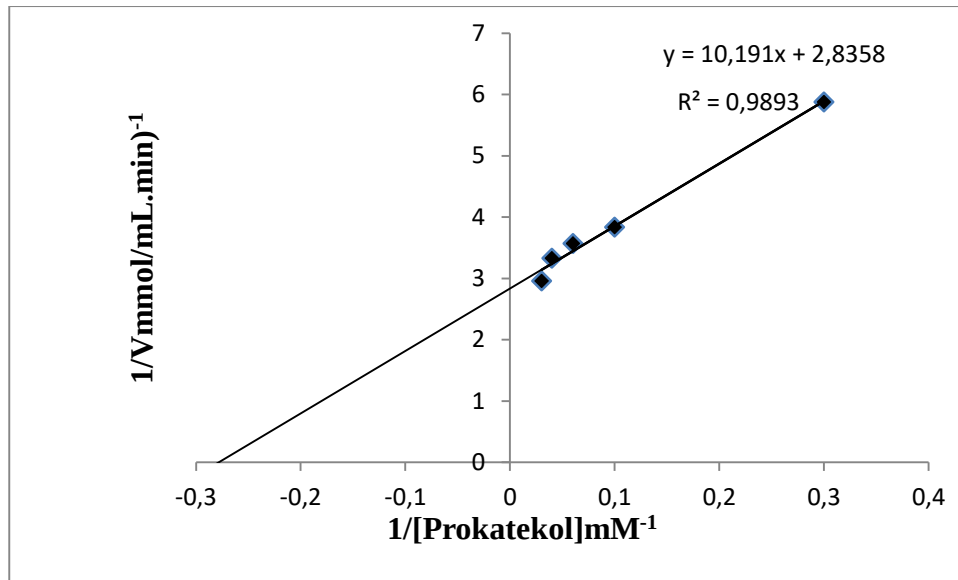
Kinetik çalışmalar	
K_m	0,873mM
V_{max}	9,9 EU/mL. dk

Pirokatekol Substratı İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları

Soya bitkisinden saflaştırılan SBP enzimi için prokatekol substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar yapıldı. SBP için 5 farklı prokatekol konsantrasyonu kullanılarak belirlendi. Çizilen $1/[Prokatekol]-1/V$ Lineweaver –Burk grafiğinden. K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuç: Prokatekol K_m değeri 3,59 mM tespit edildi. V_{max} değeri 0,352 EU/mL. dk bulundu.

Tablo 29. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Prokatekol Derişim Çizelgesi

Kör tüpü(mL)			Numune tüpü (mL)				
Prokatekol	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂	Prokatekol	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,98	1,0	0,90	0,020
1,0	1,0	1,0	0,3	0,98	1,0	0,70	0,020
1,0	1,0	1,0	0,5	0,98	1,0	0,50	0,020
1,0	1,0	1,0	0,7	0,98	1,0	0,30	0,020
1,0	1,0	1,0	0,9	0,98	1,0	0,10	0,020



Şekil 28. SBP enziminin Prokatekol substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafik

Tablo 30. SBP Enzimi İçin K_m ve V_{max} Değerleri

Kinetik çalışmalar	
K_m	3,59 mM
V_{max}	0,352 EU/mL. dk

Tablo 31. Toplu K_m ve V_{max} Sonuçları

	KM	V_{max}
Guaiakol	19,61 mM	1,78 EU/mL. dk
H ₂ O ₂	10,67 mM	1,26 EU/mL. dk
ABTS	23,25 mM	2,88 EU/m. dk
4-metilkatekol	0,873 mM	9,9 EU/ml. dk
Prokatekol	3,59 mM	0,352 EU/ml. dk

SBP Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

SBP enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

SBP'ın optimum pH'sının belirlenmesinde 0,1 M C₂H₃NaO₂ (sodyum asetat) pH'sı 4,0-5,5, 0,1 M KH₂PO₄ (potasyum fosfat) pH'sı 6,0-7,5, 0,1M C₄H₁₁NO₃ (tris) tamponları kullanıldı. yapılan ölçümler sonucunda enzim için optimum pH 6,0 olarak belirlendi.

Tablo 32. Farklı pH'larda 0,1 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ Tampon Çözeltisi İçerisinde SBP Enziminin Aktivite Ölçüm Sonuçları

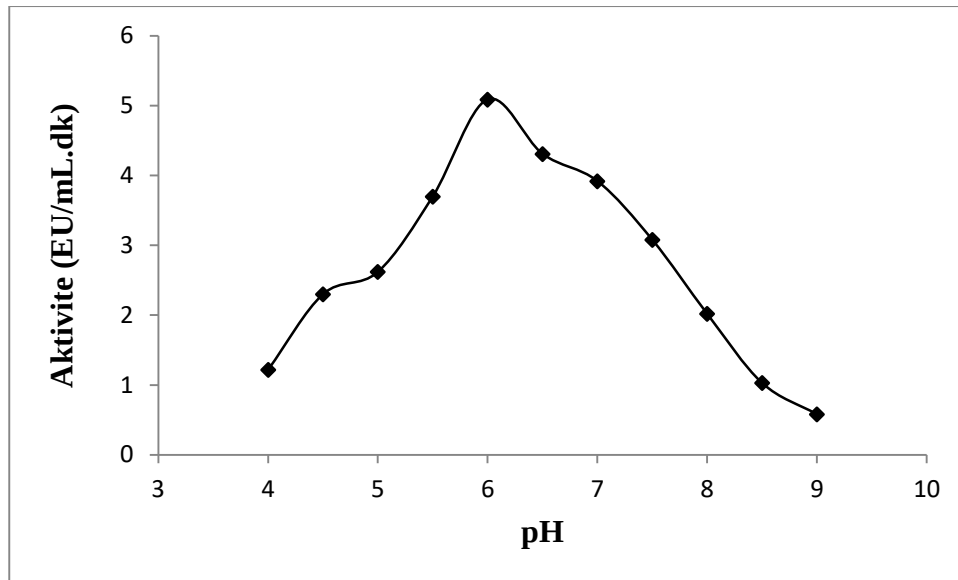
Sodyum Asetat	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
4,0	1,22
4,5	3,08
5,0	2,62
5,5	3,70

Tablo 33. Farklı pH'larda 0,1 M KH_2PO_4 Tampon Çözeltisi İçerisinde SBP Enziminin Aktivite Ölçüm Sonuçları

Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
6,0	5,09
6,5	4,31
7,0	3,92
7,5	3,08

Tablo 34. Farklı pH'larda 0,1 M $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ Tampon Çözeltisi İçerisinde SBP Enziminin Aktivite Ölçüm Sonuçları

Tris	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
8,0	2,02
8,5	1,03
9,0	0,58



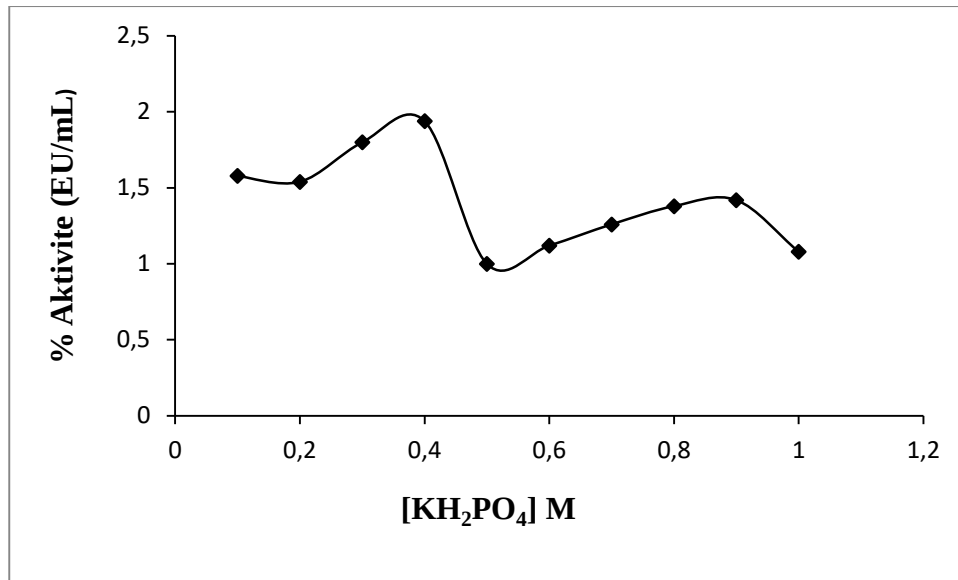
Şekil 29. SBP enziminin optimum pH sını belirlemek için yapılan Enzim Ünitesi (EU) –pH grafiği

SBP enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları

Soya bitkisinden saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin aktivitesi için uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla KH_2PO_4 tamponu kullanıldı ve çeşitli KH_2PO_4 derişimlerinde 0,1M-1 M arasında POD enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar Tablo 36’da ve grafik 31’de gösterildi. Bu verilerden çıkan sonuç soya bitkisinde saflaştırılan POD enzimi için optimum iyonik şiddet 0,4M olduğu tespit edildi.

Tablo 35. SBP enzimi için iyonik şiddet/aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat	
İyonik Şiddet	Aktivite
100	1,58
200	1,54
300	1,8
400	1,94
500	1
600	1,12
700	1,26
800	1,38
900	1,42
1000	1,08



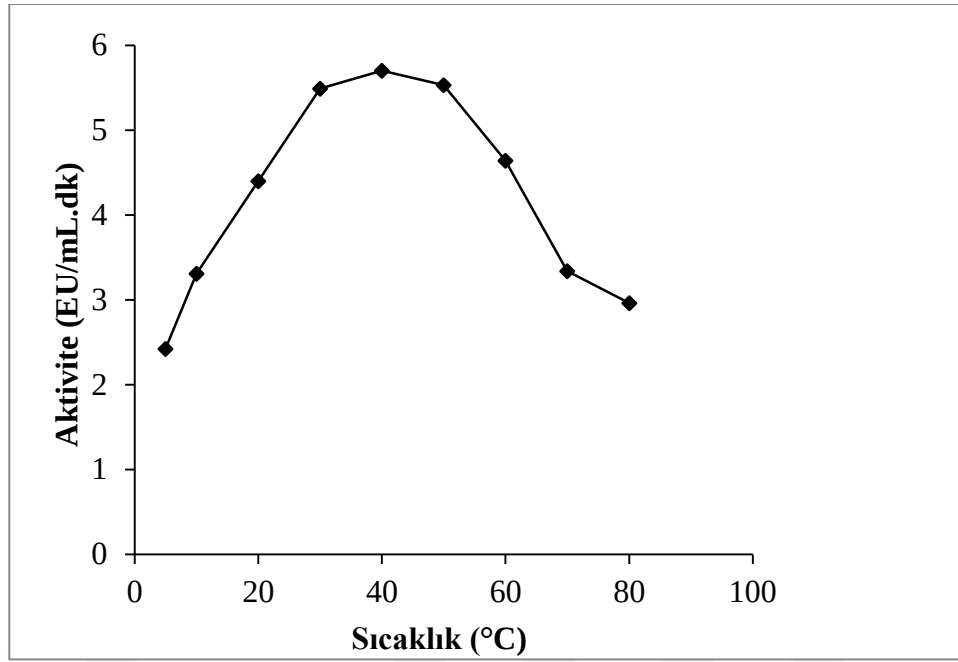
Şekil 30. Farklı konsantrasyonlarda KH₂PO₄ (pH =6,0) tampon çözeltileri kullanılarak SBP enzimi için Aktivite (EU/mL)-İyonik şiddet grafiği

SBP enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Soya bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi için optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla 0,1 M pH =6,5 olan KH₂PO₄ tamponu kullanıldı. 5 ile 80°C arasında aktivite ölçümleri yapıldı ve çıkan sonuçlar tablo 37’de ve şekil 32’de gösterildi. Çalışma verileri peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık 40°C olarak gösterdi.

Tablo 36. Saflaştırılan SBP Enziminin Optimum Sıcaklığını Belirlemek İçin Sıcaklık/Aktivite Ölçüm Sonuçları

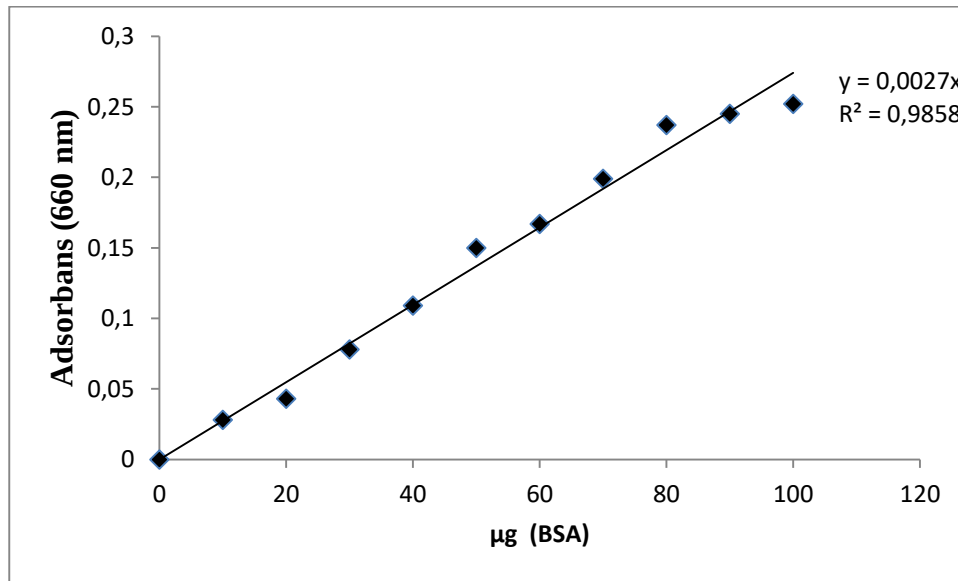
Potasyum Fosfat(KH ₂ PO ₄)	
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
5°C	2,42
10°C	3,31
20°C	4,40
30°C	5,49
40°C	5,70
50°C	5,53
60°C	4,64
70°C	3,34
80°C	2,96



Şekil 31. SBP enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için Aktivite (EU/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği

4-amino 3-bromo 2- metil benzohidrazid Molekülü ile Hazırlanan Afinite jelinin SBP Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

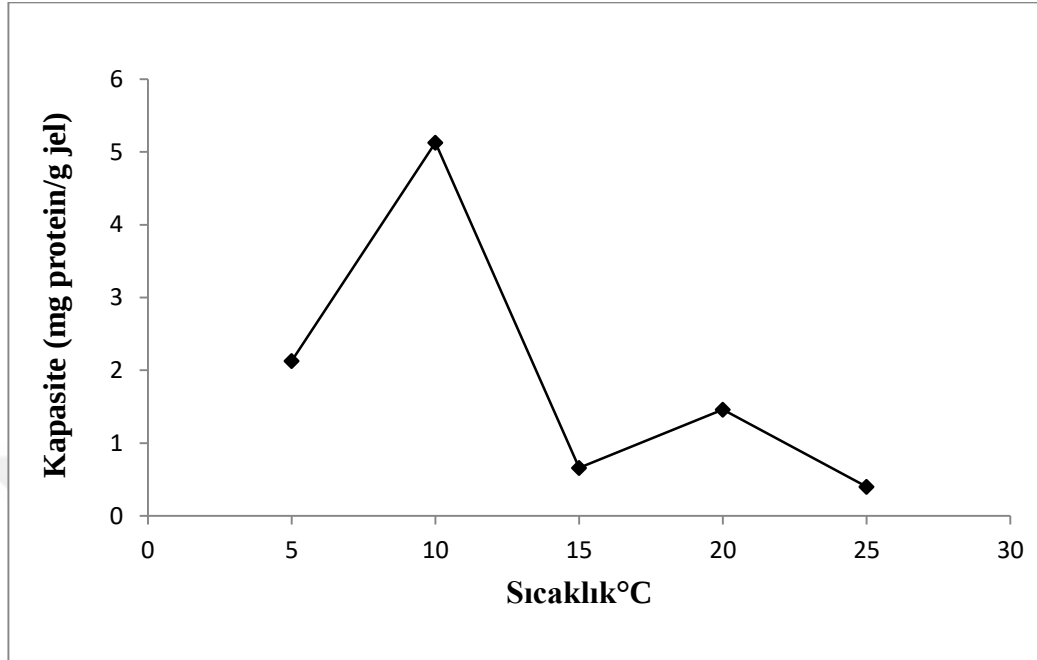
4-amino 3-bromo 2- metil benzohidrazid molekülünü ligand olarak kullanıldığı hazırlanan jelle saflaştırılan SBP enziminin kantitatif protein tayini Lowry metodu kullanılarak belirlenmiştir. İlk olarak bu metotta standart grafik hazırlandı. SBP enziminin kolon tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Deney prosedürü Afinite kolonunun SBP enzimini tutma kapasitesinin bulunması bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 32. Lowry metoduna göre sığır serum albümininden hazırlanan standart grafik

Sıcaklığın kolon tutma kapasitesine etkisi

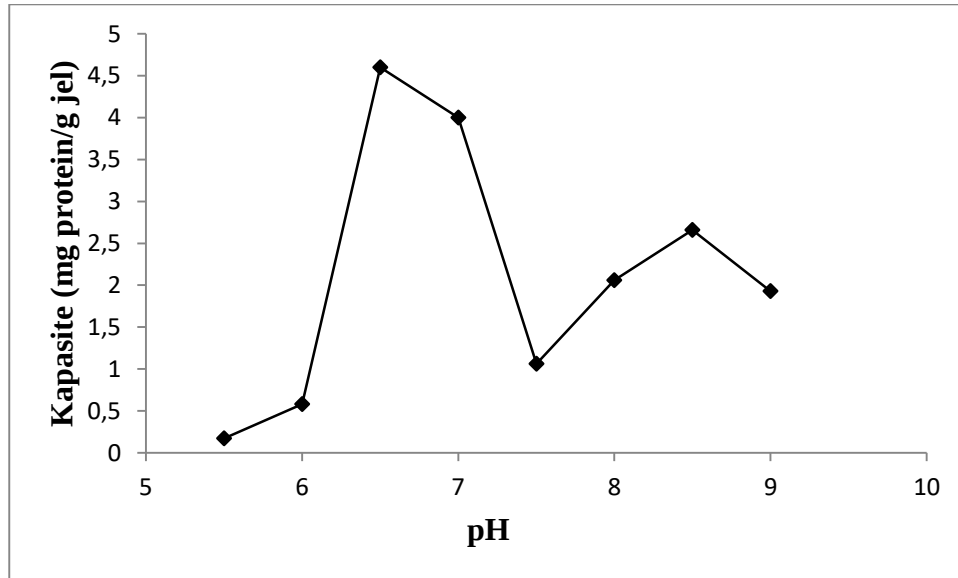
SBP enzimi için pH: 6,8'de farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20, 25 °C tutma kapasitesi belirlenerek mg protein/g jel sonuçlar Şekil 33'de verildi.



Şekil 33. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid afinite jelinin SBP enzimini bağlamasında sıcaklığın etkisi

pH'nın kolon kapasitesine etkisi

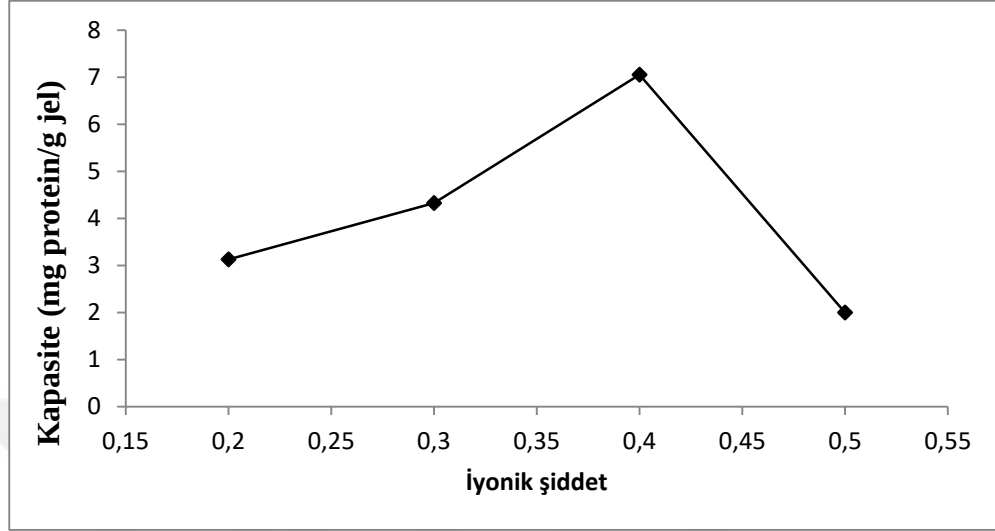
SBP enzimi için pH'sı 5,5 ile 9 arasında farklı tamponlar kullanılarak Afinite jelinin tutma kapasitesi mg protein/g jel olarak belirlendi ve sonuçlar Şekil 34'de verildi.



Şekil 34. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid afinite jelinin SBP enzimini bağlamasında pH'nın etkisi

İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

SBP enziminin kolona bağlanması için iyonik şiddet 0,2-0,5 M arası tuz konsantrasyonlarında deneyler yapıldı, sonuçlar mg protein/g jel olarak belirlendi. Şekil 35’de verildi.



Şekil 35. 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid afinite jelinin SBP enzimini bağlamasında iyonik şiddetin etkisi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada aminobenzohidrazid türevleri afinite kromatografisinde ligand olarak kullanılarak, SBP enziminin ilk defa ve tek kademede saflaştırılması gerçekleştirildi. Literatürde farklı kromatografik metotların kullanıldığı çalışmalar yapılmış, bitkisel kaynaklardan peroksidaz enzimleri saflaştırılmıştır. Çalışmamızda ise Soya filizinin yapraklarından peroksidaz enzimi tek kademede başarıyla saflaştırmıştır. Bu işlemler boyunca, elüatlar için aktivite tayini ve kantitatif protein tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler ışığında, saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Tablo 16'da). SBP enzimi 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid kolonundan %8,71 verimle 130,2 kat, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid kolonundan %5,44 verimle 122,44 kat, 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid kolonundan %4,3 verimle 133,8 kat, 5-aminoizoftalohidrazid kolonundan %4,35 verimle 78,9 kat saflaştırılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalara örnek olarak afinite tekniği kullanılarak papayadan POD enzimini 30,22 kat %44,37 verimle (Pandey *et al.* 2012), kırmızı pancardan %84,6 verimle 15 kat (Rudrappa *et al.* 2007), at turpundan 291 kat % 71 verimle (Lavery *et al.* 2010), hurma yapraklarından 17 kat %5,8 verimle (Al- Senaidy *et al.* 2011), soya fasülyesi kabuklarından 57 kat %16,4 verimle (Lakshmi *et al.* 2010) POD enzimi saflaştırılmıştır.

Ligand etkinliklerinin değerlendirilmesi için, saflaştırılan SBP enzimi üzerine 4-amino-3-bromo-5-floro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-5- kloro benzohidrazid, 4-amino-3-bromo-2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid moleküllerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. Her bir ligand molekülün guaiakol substratı varlığında IC₅₀ değerini belirlemek için reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda bu moleküllerle hazırlanmış çözeltiler ilave edilerek aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen değerlerle % Aktivite –[inhibitör] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu. SBP enzimi için bu grafikler Şekil 17, 19, 21, 23'de gösterildi. SBP enzimi için sırasıyla IC₅₀ değerleri 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid için 346 µM, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid için 346 µM, 5-amino-izoftalohidrazid için 693 µM ve 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid için 173µM olarak hesaplandı. Literatürde yapılan çalışmalarda değişik kaynaklardan saflaştırılan peroksidazların IC₅₀ değerleri mor lahanada 1,047 mM (Somturk *et al.* 2014), kırmızı pancarda 0,047 mM (Inal *et al.* 2015), karaturpda 0,726 mM (Kalin *et al.* 2014) ,beyaz lahanada 0,517 mM (Erdem *et al.* 2015), şalgamda 1,167 mM (Kalin *et al.* 2014) olarak belirlenmiştir.

Kullanılan ligandların enzime olan ilgisini araştırmak için K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tiplerini belirlenmiştir. Bu çalışmada 5 farklı substrat konsantrasyonunda ve 4 farklı aminobenzohidrazid türevleri (4-amino 3-bromo 5-floro benzohidrazid, 4-amino 3-bromo 5- kloro benzohidrazid, 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid, 5-aminoizoftalohidrazid) konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak, $1/V$ ve $1/S$ değerleriyle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934). Çizilen grafikler yardımıyla 4-amino-3-bromo-5-florobenzohidrazid K_i değeri $283 \pm 46,8 \mu\text{M}$ ve inhibisyon tipi yarışmalı, 4-amino-3-bromo-5-klorobenzohidrazid K_i değeri $264 \pm 26,7 \mu\text{M}$ ve inhibisyon tipi yarışmasız, 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid K_i değeri $80,55 \pm 12,6 \mu\text{M}$ ve inhibisyon tipi yarışmalı, 5-aminoizoftalohidrazid K_i değeri $480 \pm 130 \mu\text{M}$ ve inhibisyon tipi yarışmalı, bulundu. Literatürde 4-aminobenzohidrazid türevlerinin çeşitli peroksidazlar üzerine inhibisyon etkileri; şalgam için K_i değeri $1,103 \pm 0,102 \text{ mM}$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Kalin *et al.* 2014), kırmızı pancar için K_i değeri $0,78 \pm 0,17 \text{ mM}$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Inal *et al.* 2015), mor lahana için K_i değeri $0,702 \pm 0,05 \text{ mM}$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Somturk *et al.* 2014), beyaz lahana için K_i değeri $0,994 \pm 0,453 \text{ mM}$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Erdem *et al.* 2015), karaturp için K_i değeri $0,5947 \pm 0,012 \text{ mM}$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Kalin *et al.* 2014) olarak belirlenmiştir.

Enzimin substrata olan ilgisini gösteren SBP enzimi için Ghaem *et al* (2010) yaptığı çalışmada H_2O_2 substratı için soya fasülyesinde K_m $1,092 \text{ mM}$ olarak, Lee *et al* (2003) SBP enzimi için H_2O_2 substratı için K_m $0,98 \text{ mM}$ V_{max} $0,21 \mu\text{mol}$ tespit edilmiştir.

K_m ve V_{max} değerleri eşitli substratlar iin belirlenmiştir. SBP enziminin guaiakol substratına K_m değeri $19,61 \text{ mM}$ ve V_{max} değeri $1,78 \text{ EU/ml}$, hidrojen peroksit substratına K_m değeri $10,67 \text{ mM}$ ve V_{max} değeri $1,26 \text{ EU/ml}$, ABTS substratına K_m değeri $23,25 \text{ mM}$ ve V_{max} değeri $2,88 \text{ EU/ml}$, pirokatekol substratına K_m değeri $3,59 \text{ mM}$ ve V_{max} değeri $0,35 \text{ EU/ml}$, 4-metil katekol substratında K_m değeri $0,873 \text{ mM}$ ve V_{max} değeri $9,9 \text{ EU/ml}$ olarak hesaplandı. Literatürde yapılan alışmalarda guaiakol substratı iin K_m değerleri; şalgam iin K_m değeri $12,49 \text{ mM}$ (Kalin *et al.* 2014), palmiya yaprakları iin K_m değeri $3,96 \text{ mM}$ (Deepa and Arumuguhan 2002), at turpu için K_m değeri $0,5 \text{ mM}$ (Lavery *et al.* 2010), ıspanak yaprakları için K_m değeri $17,35 \text{ mM}$ (Koksall 2011), karaturp için K_m değeri $24,88 \text{ mM}$ (Kalin *et al.* 2014), beyaz lahana için K_m değeri $3,19 \text{ mM}$ (Erdem *et al.* 2015), vanilya çekirdeği için K_m değeri $3,8 \text{ mM}$ (Marguez *et al.* 2008), mor lahana için K_m değeri $0,048 \text{ mM}$ (Somturk *et al.* 2015), kuru fasülye için K_m değeri $0,065 \text{ mM}$ (Koktepe *et al.* 2017)

V_{max} değerleri: ıspanak yaprakları için V_{max} değeri 12,34 EÜ/ml.dk (Koksal 2011), şalgam için V_{max} değeri 4,055EÜ/ml dk (Kalin *et al.* 2014) karaturp için V_{max} değeri 3,23 EÜ/ml.dk (Kalin *et al.* 2014), beyaz lahana için V_{max} değeri 0,2 EÜ/ml.dk (Erdem *et al.* 2015), mor lahana için V_{max} değeri 1,46 EÜ/ml.dk (Somturk *et al.* 2015)

SBP enzimi için Ghaem *et al* (2010) yaptığı çalışmada H_2O_2 substratı için soya fasüyesinde K_m 1,092 mM olarak, Lee *et al* (2003) SBP enzimi için H_2O_2 substratı için K_m 0,98Mm, V_{max} 0,21µmol tespit edilmiştir.

SBP enziminin saflığını ve molekül kütlesini belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Enzimin molekül ağırlığı 40 kDa olarak hesaplandı. Literatürlerde farklı bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıkları yine aynı yöntem kullanılarak kullanılarak tespit edilmiştir. Örnek olarak: mor lahanada 69,3 kDa (SomturKm *et al.* 2014), beyaz lahanada 73,2 kDa (Erdem *et al.* 2015), vanilya ekirdiğinde 46,5 kDa (Marguez *et al.* 2008), kırmızı pancarda 80 kDa (Inal *et al.* 2015), şalgamda 65,8 kDa (Kalin *et al.* 2014), zeytinde 44 kDa (Tzika *et al.* 2009), kuru fasulyede 45 kDa (Koktepe *et al.* 2017), hurma yapraklarında 68 kDa (Al –Bagmi *et al.* 2018), siyah turpda 66 kDa (şişecioğlu *et al.* 2010), papaya meyvesinde 70 kDa (Pandey *et al.* 2012), kuşkonmazda 34 kDa (Civello *et al.* 1995), beyaz İspanyol bitkisinde 50 kDa (Galende *et al.* 2015), buğdayda 38,8 kDa (Altin *et al.* 2017), soya fasüyesi tohum kabuğu için 67 kDa (Fernandes *et al.* 2020) olarak tespit edilmiştir.

Soya bitkisinde POD enzimi saflaştırıldıktan sonra karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Soya bitkisi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Soya bitkisinden saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 0,1 M'lık sodyum asetat, potasyum fosfat, tris tamponları hazırlandı. Elde edilen aktivite sonuçları yardımıyla oluşturulan grafikte SBP enzimi için optimum pH 6 olarak tespit edildi. Literatürlerde farklı bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimleri için optimum pH değerleri: fosfat tamponunda at turpu için 7,0 (Lavery *et al.* 2010), kara lahana için Tris/HCl tamponunda 7,5 (Gulcin and Yıldırım 2005), mor lahana için fosfat tamponunda 6,5 (Somturk *et al.* 2014) , fosfat karayip bitkisi için tamponunda 7,0 (Kumar *et al.* 2011), karaturp için fosfat tamponunda 6,5 (Kalin *et al.* 2014), ıspanak yaprakları için fosfat tamponunda 5,2(Koksal 2011), avakado meyvesi için 3,8 (Rojas –Reyes *et al.* 2014), şalgam için fosfat tamponunda 6,5 (Kalin *et al.* 2015), kuru fasülye için fosfat tamponunda 5,0 (Koktepe *et al.* 2017), soya fasüyesi tohum kabuğu için fosfat tamponunda 6 (Ghaem *et al.*

2010) olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda peroksidaz enzimi için optimum pH genellikle 5,0-7,5 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

SBP enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek amacıyla 0,1 M ile 1,0 M arasında optimum pH'da aktivite ölçümleri yapılmıştır ve sonuçlar grafiklerle gösterilmiştir. Şekil 31'de gösterildiği gibi 0,40 M iyonik şiddet konsantrasyonunda SBP enziminin aktivitesinin maksimum olduğu tespit edildi. Literatürde farklı bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimleri için optimum iyonik şiddet değerleri: karnabahar için 1,0M (Köksal and Gülçin 2008), siyah turp için 1,0 M(Şişecioğlu *et al.* 2010), ıspanak yaprakları için 0,075 M (Köksal *et al.* 2008) bulunmuştur.

Soya bitkisinden saflaştırılan peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık 10 ar derece artışla 0-90°C aralığında aktiviteler spektrofotometrik olarak 470 nm'de ölçüldü. Şekil 32'de gösterilen aktivite sıcaklık grafiğinden elde edilen sonuçlara göre SBP enzimi için optimum sıcaklığın 40°C olduğu tespit edilmiştir. Literatürde farklı bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimleri için optimum sıcaklık: vanilya çekirdeğinde saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 16°C (Marguez *et al.* 2008),taze kesilmiş Zizania Latifolia bitkisinden POD enzimi için optimum sıcaklık 40°C (Lou *et al.*2010), hurma yapraklarından saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 55°C(Al –senaidy and Ismael 2011), karalahanadan saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 40°C (Gülçin and Yıldırım 2005), karnabahardan saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 30°C (Köksal and Gülçin 2008), Hindistan cevizinden saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 40°C (Balasubramanian and Boopathy 2013), karayip bitkisinden saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 50°C(Kumar *et al.* 2011), kestane çekirdeğinden saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 50°C (Gong *et al.* 2015), soya fasülyesi kabuğundan saflaştırılan POD enzimi için optimum sıcaklık 50°C (Liu *et al.* 1999) tespit edilmiştir.

SBP enziminin kolonlara bağlanma kapasitesi bulunurken pH, sıcaklık, iyonik şiddet parametreleri incelendi ve protein/ gram-jel cinsinden SBP enziminin tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işleminde en yüksek verim ve saflaştırma katsayısına ulaşan kolon olan 4- amino 3- bromo 2- metil benzohidrazid 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı. Yıkama tamponuyla enzmin fazlası yıkandıktan sonra SBP enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Daha sonra jel kurutulup tartılarak mg protein / gram-jel cinsinden SBP enziminin tutma kapasitesi incelendi (Aslan *et al.* 1996).

SBP enzimi için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla farklı pH'larda (5,5- 9 arasında) tamponlar kullanılarak en iyi pH için sonuçlar (mg protein /

gram-jel başına) Şekil 35’de grafik edildi ve yaklaşık pH: 6,5 civarında maksimum bağlanmaya ulaşıldı.

Kolon tutma kapasitesini etkileyen iyonik şiddetin, bağlanmaya etkisini belirlemek amacıyla 0,2 M ile 0,5 M arasında tamponlar kullanılarak ölçümler yapıldı, sonuçlar grafikte gösterildi. Şekil 36’de görüldüğü gibi bağlanmanın maksimum olduğu iyonik şiddet konsantrasyonu 0,4 M’dır.

Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla pH: 6,8’de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi tespit edildi. Şekil 34’de görüldüğü gibi SBP enziminin jele bağlanma kapasitesinin maksimum olduğu sıcaklık konsantrasyonu 10°C’dir. 4-amino 3-bromo 2- metil benzohidrazid için 10°C de pH 7,5 0,3 M’da optimum bağlanma 4,19 mg/g jel olarak tespit edildi.

Sonuç Olarak:

1) Soya filizinin yapraklarından peroksidaz enzimi ilk defa amino benzohidrazid molekülleri ile Afinite kromatografi tekniği kullanarak tek kademede ve az maliyetle saflaştırıldı.

2) Yapılan çalışmada ligant olarak kullanılan amino benzohidrazid molekülleri için kinetik parametreler K_I , IC_{50} çalışıldı.

3) SBP enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, sıcaklık kolon tutma kapasitesi, pH kolon tutma kapasitesi, iyonik şiddet kolon tutma kapasitesi, K_m ve V_{max} gibi kinetik parametreler tespit edildi.

KAYNAKLAR

- Agarwal, P. K. (2018). A biophysical perspective on enzyme catalysis. *Biochemistry*, 58(6), 438-449.
- Ajila, C. M. & Rao, U. P. (2009). Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(1-2), 36-44
- Arora, S.Saxena, V., & Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*, 116, 84-94.
- Al-Ansari, M. M., Saha, B., Mazloum, S., Taylor, K. E., Bewtra, J. K., & Biswas, N. (2011). Soybean peroxidase applications in wastewater treatment. *Soybeans: Cultivation, Uses and Nutrition*, 189-221
- Abul,N.2019. Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidaz enziminin 3 –am, nobenzohidrazid türevleri kullanılarak Afinite kromatografisi ile saflaştırılması / Purfication of horseradish (*Armoracia rusticana*) peroxidase enzyme by afine cromotography using 3 –amino benzohidrazidederivatives.Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi,Fen Bilimleri Ensititüsü
- Almaz, Z.. 2016 Benzohidrazid türevleri kullanılarak horseradish peroksidaz (HRP) enziminin tek basamakta saflaştırılması / One step purification of horseradish peroxidase (HRP) enzyme using benzohydraside derivatives. Doktora tezi,Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ensititüsü
- Aitken, M. D. (1993). Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *The chemical engineering journal*, 52(2), B49-B58.
- Bilal, M., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2017). Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *Journal of environmental management*, 188, 137-143.
- Biswas, K. (1999). Removal of cresols from synthetic wastewater using crude soybean peroxidase
- Burnette, F. S. (1977). Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Science*, 42(1), 1-6.
- Busch, W., & Saier, M. H. (2002). The transporter classification (TC) system, 2002. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37(5), 287-337
- Cuatrecasas, P., & Anfinsen, C. B. (1971). [31] Affinity chromatography. *Methods in enzymology*, 22, 345-378.
- Caza, N., Bewtra, J. K., Biswas, N., & Taylor, K. E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research*, 33(13), 3012-3018.
- 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.

- Doerge, D. R., Divi, R. L., & Churchwell, M. I. (1997). Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical biochemistry*, 250(1), 10-17.
- Erdem, H.Ü., Kalın, R., Özdemir, N., Özdemir, H., 2015. Purification and Biochemical Characterization of Peroxidase Isolated from White Cabbage (*Brassica Oleracea* var. capitata f. alba). *International Journal of Food Properties*, 18:2099–2109.
- Gazaryan, I. G., Xushpul'yan, D. M., & Tishkov, V. I. (2006). Osobennosti struktury'i mexanizma dejstviya peroksidaz rastenij. *Uspexi biologicheskoy ximii*, 303-322.
- Guo, W., & Ruckenstein, E. (2003). Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *Journal of Membrane Science*, 211(1), 101-111.
- Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C., & Yada, R. Y. (2015). Factors affecting enzyme activity. In *Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality* (pp. 11-55). Woodhead Publishing.
- Ghaem, M. F., Aalezmazadeh, I., & Motamed, S. (2010). Seed coat soybean peroxidase: extraction and biocatalytic properties determination.
- Gijzen, M., van Huystee, R., & Buzzell, R. I. (1993). Soybean seed coat peroxidase (a comparison of high-activity and low-activity genotypes). *Plant physiology*, 103(4), 1061-1066.
- 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.
- Hage, D. S., & Cazes, J. (Eds.). (2005). *Handbook of affinity chromatography*. CRC Press.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Hailu, G., Weersink, A., & Cahlik, F. (2010). Examining the prospects for commercialization of soybean peroxidase.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, 10(1), 108-115.
- Jasim, A. M., & Aziz, G. M. (2019). Degradation efficiency of phenolic compounds using immobilized peroxidase purified from soybean. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 50(3), 928-935.
- Köksal, E., & Gülçin, İ. (2008). Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds. *Protein & Peptide Letters*, 15(4), 320-326.
- Kaur, A., Taylor, K. E., & Biswas, N. (2021). Soybean peroxidase-catalyzed degradation of a sulfonated dye and its azo-cleavage product. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(2), 423-430.
- Kalın R. 2018 Bitkisel kaynaklardan peroksidaz enziminin saflaştırılması ve rasemik hidroperoksidin enantiyo seçimli indirgenmesi / Purification of peroxidase enzyme from plant sources and enantioselective reduction of rasemic hydroperoxide. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

- Kumar, R., Singh, K.A., Singh, V.K., Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry* 46: 1350–1357
- Köksal E.2007 Karnabahar (*Brassica oleraceae* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu,antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi / Purification and characterization of peroxide from cauliflower (*Brassica oleraceae* L.) and determination of their antioxidant and antiradical activities. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Jouili, H., Bouazizi, H., Rossignol, M., Borderies, G., Jamet, E., & El Ferjani, E. (2008). Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant physiology and Biochemistry*, 46(8-9), 760-767..
- Jasim, A. M., & Aziz, G. M. (2019). Degradation efficiency of phenolic compounds using immobilized peroxidase purified from soybean. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 50(3), 928-935.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Grwin, 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.
- Lakshmi, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2010). Downstream processing of soy hull peroxidase employing reverse micellar extraction. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6), 937-945.
- Lehninger, A. L., 2005. Principles of biochemistry. Worth publisher, Academic Press, New York.
- Lee, M. Y., Srinivasan, A., Ku, B., & Dordick, J. S. (2003). Multienzyme catalysis in microfluidic biochips. *Biotechnology and bioengineering*, 83(1), 20-28.
- Luo, H., Jiang, J., Jiang, L., Zhang, L., Yu, Z., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Fresh-Cut *Zizania Latifolia*. *Journal of Food Biochemistry*, 36: 309–316.
- Liu, W., Fang, J., Zhu, W. M., & Gao, P. J. (1999). Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var HH2. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(5), 779-785.
- Mashhadi, N. (2019). Oxidative polymerization of heterocyclic aromatics using soybean peroxidase for treatment of wastewater
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT*, 41, 1372-1379.
- Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z*, 49(333-369), 352.
- Munir, I. Z., & Dordick, J. S. (2000). Soybean peroxidase as an effective bromination catalyst☆. *Enzyme and microbial technology*, 26(5-6), 337-341
- Müftügil, N. (1985). The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 877-880.
- Öztekin A. 2016 4-amino benzohidrazid türevleri kullanılarak karaturp ve şalgamdan peroksidaz enziminin saflaştırılması / Purification of black radish and turnip pod enzymes using with 4-amino benzohydrazide derivatives. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü

- Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2015). A ripening associated peroxidase from papaya having a role in defense and lignification: heterologous expression and in-silico and in-vitro experimental validation. *Gene*, 555(2), 438-447.
- Paradkar, V. M., & Dordick, J. S. (1993). Affinity-based reverse micellar extraction and separation (ARMES): A facile technique for the purification of peroxidase from soybean hulls. *Biotechnology progress*, 9(2), 199-203.
- Price, N. J., Pinheiro, C., Soares, C. M., Ashford, D. A., Ricardo, C. P., & Jackson, P. A. (2003). A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from lupin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41389-41399.
- Ryan, B. J., Carolan, N., & Ó'Fágáin, C. (2006). Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches?. *Trends in biotechnology*, 24(8), 355-363.
- Rojas-Reyes, J.O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Matinez, C.C., Waliszewski, K.N., Aguilar-Uscanga, M.G., 2014. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). *J Sci Food Agric*, 94: 1844–1853.
- Sessa, D. J., & Anderson, R. L. (1981). Soybean peroxidases: purification and some properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 29(5), 960-965.
- Sadeghian, N. (2016). Afinite kromatografisi tekniği ile tatlı turp (*Raphanus sativus*), Japon turp'u (*R. sativus* L. var. *longipinnatus*) ve karnabahardan (*Brassica oleracea*) peroksidaz (POD) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu / Purification and characterization of peroxidase enzyme from sweet radish (*Raphanus sativus*), Japanese radish (*R. sativus* L. var. *longipinnatus*) and cauliflower (*Brassica oleracea*) by affinity chromatography technique. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Saboury, A. A. (2009). Enzyme inhibition and activation: a general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6(2), 219-229.
- Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N., 2014. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol*, 173:1815–1828
- Turgut, H. İ. (2009). Sakarya bölgesinde yetişen devedikeni (*silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu (Master's thesis, Sakarya Üniversitesi).
- Zhang, Z. Y., & Wong, Y. N. (2005). Enzyme kinetics for clinically relevant CYP inhibition. *Current drug metabolism*, 6(3), 241-257.
- Wang, Y., Wang, Q., Zhao, Y., Han, G., & Zhu, S. (2015). Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response. *Gene*, 566(1), 95-108
- Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 969-976.
- Wilchek, M., 2004. My life with affinity. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 13(11), 3066
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Jadhav, U. U., Dawkar, V. V., Telke, A. A., & Govindwar, S. P. (2009). Decolorization of Direct Blue GLL with enhanced lignin peroxidase enzyme production in *Comamonas* sp UVS. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(1), 126-132.

- Price, N. J., Pinheiro, C., Soares, C. M., Ashford, D. A., Ricardo, C. P., & Jackson, P. A. (2003). A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from lupin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41389-41399.
- Churin, Y., Schilling, S., & Börner, T. (1999). A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS letters*, 459(1), 33-38.
- Taurog, A. (1999). Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie*, 81(5), 557-562.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem apoprotein interactions. *Protein Science*, 10(1), 108-115.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı : Zahra RASULZADE
Doğum tarihi :
Doğum Yeri :
Uyruğu :
Adres :
Tel :
E-mail :
Eğitim
Lise :
Lisans :
Yüksek lisans :
Doktora :
Yabancı Dil Bilgisi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Tezden Üretilmiş Yayınlar