



**ALABAŞ TURPU PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
3-AMİNO BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ
KULLANILARAK AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Ahmet AKKAŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2019
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALABAŞ TURPU PEROKSİDAZ ENZİMİNİN 3-AMİNO
BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Ahmet AKKAŞ

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her Hakkı Saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**ALABAŞ TURPU PEROKSİDAZ ENZİMİNİN 3-AMİNO BENZOHİDRAZİD
TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Ahmet AKKAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, 22/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu...21.10.3.../2019... tarih ve .13... / ...23... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALABAŞ TURPU PEROKSİDAZ ENZİMİNİN 3-AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Ahmet AKKAŞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu tez çalışmasında 3-amino benzohidrazid türevleri olan; 3-amino-5-metil benzohidrazid, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-amino-4-metil benzohidrazid, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid, 3-amino-5-bromo benzohidrazid molekülleri sentezlenerek Alabaş turpunda (Kohlrabi Radish) POD enziminin saflaştırılması yapıldı. Sentezlenen moleküllerin Alabaş turpu POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller, enzimin saflaştırılmasında Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyalinin ligandı olarak kullanıldı. Alabaş turpu POD enzimi, 3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülü kullanıldığında %28,8 verimle 1192,3 kat, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid ile %68,4 verimle 1060,6 kat, 3-amino-4-metil benzohidrazid %24,07 verimle 1085,3 kat, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid %46,9 verimle 341,1 kat, 3-amino-5-bromo benzohidrazid ile %32 verimle 610,3 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflık dereceleri ve molekül ağırlıkları SDS-PAGE ile belirlendi. Alabaş turpu POD enziminin molekül ağırlığı 47 kDa da olarak bulundu. Bütün kolonların saflaştırma sonuçlarına bakıldığında Alabaş turpu POD enzimi saflaştırılmasında en iyi kolon materyali sepharose-4B-L-Tirozin 3-amino-5-metil benzohidrazid kolonu olarak belirlendi.

2019, 74 sayfa

AnahtarKelimeler: Alabaş turpu, Enzim Saflaştırma, Peroksidaz, Afinite kromatografisi, 3- Amino benzohidrazid türevleri

ABSTRACT

MS. Thesis

PURIFICATION OF KOHLRABI RADISH PEROXIDASE ENZYME WITH AFFINITY CHROMATOGRAPHY USING 3-AMINO BENZOHDRAZIDE DERIVATIVES

Ahmet AKKAŞ

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

Purification of the Peroxidase (POD) enzyme was performed from Kohlrabi radish by synthesizing 3-amino benzohydrazide derivatives; 3-amino 5-methyl benzohydrazide, 3-amino 5-methoxy benzohydrazide, 3-amino 4-methyl benzohydrazide, 3-amino 4-methoxy benzohydrazide, 3-amino 5-bromo benzohydrazide molecules. The inhibitory effects of the synthesized molecules on the POD enzyme were examined and the molecules showing reversible inhibition were used as the ligand of the Sepharose-4B-L-Tyrosine material in the purification of the enzyme. Kohlrabi radish POD enzyme was purified 1192.3-fold with a 28.8 % yield through 3-amino 5-methyl benzohydrazide molecule, 1060.6-fold with 68.4 % yield through 3-amino 5-methoxy benzohydrazide molecule, 1085.3-fold with 24.07 % yield through 3-amino 4-methyl benzohydrazide molecule, 341.1-fold with 46.9 % yield through 3-amino 4-methoxy benzohydrazide molecule, 610.3-fold with 32 % yield through 3-amino 5-bromo benzohydrazide. The purity degree of purified enzyme and molecular weights were checked by SDS-PAGE. The molecular weight of Kohlrabi radish POD enzyme was found to be 47 kDa. The purification results of all the columns were taken into consideration that the best column material for POD enzyme purification was identified as the sepharose-4B-L-Tyrosine 3-amino 5-methyl benzohydrazide column.

2019, 74 pages

Keywords: Enzyme safraction, Peroxidase, Kohlrabi radish, Afinite cromatography, 3-amino benzohydrazide derivatives

TEŞEKKÜR

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

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Erzurum Teknik Üniversitesi Sayın Arş. Gör. Dr. Ramazan KALIN' a ve laboratuvar çalışma arkadaşlarım uzman Songül BAYRAK'a, Sayın Serpil GERNİ' ye,

Akademik kariyerimin bir basamağı olan yüksek lisans tez çalışmamda her zaman duasıyla ve desteği ile yanımda olan çok kıymetli eşime, biricik kızıma ve yaşıntım boyunca desteğini hissettiğim başta fedakâr annem ve babam olmak üzere tüm aile bireylerime en kalbi duygularıyla teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamı 215Z386 nolu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Ahmet AKKAŞ

Şubat, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim Reaksiyonlarının Hızını Etkileyen Faktörler	5
1.2. Serbest Radikaller.....	7
1.3. Antioksidan Enzimler	9
1.4. Peroksidazlar	9
1.5. Afinite Kromatografisi	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
2.1. Çalışmanın Amacı	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	20
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	21
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Protein tayini	25
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	25
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	25
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	26
3.3. Alabaş Turpr Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	27
3.3.1. Ligand seçimi	27
3.3.2. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....	28
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	29
3.3.3.a. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi.....	29

3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	30
3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye Tirozin takılması	30
3.3.4.b. 3-Aminobenzohidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi	31
3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi	32
3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	32
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. Alabaş Turpu Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	35
4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	35
4.2. Kullanılan İnhibitörün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları	36
4.3. 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi	36
4.4. Sentezlenen 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	41
4.4.1. 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	42
4.4.2. 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	45
4.4.3. 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	48
4.4.4. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	54
4.5. Alabaş Peroksidaz Enzimi Üzerine SDS-PAGE ve Kinetik Çalışma Sonuçları	59
4.5.1. SDS-poliakrilamid jel elektrophorezi sonuçları	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: (2Z,2'Z)-2,2'-(hidrazin-1,2-diliden)bis(3-etil-2,3-dihidrobenzo[d]tiazol-6-sulfonat)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EI	: Enzim inhibitör kompleksi
ES	: Enzim substrat kompleksi
ESI	: Enzim inhibitör substrat kompleksi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
IC ₅₀	: Enzimin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
ROS	: Reaktif oksijen türü
POD	: Peroksidaz
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasındaki anahtar-kilit modeli	3
Şekil 1.2. Enzim ile substrat arasındaki indüklenmiş-uyum modeli.....	4
Şekil 1.3. Lineweaver-Burk grafiği	7
Şekil 1.4. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme reaksiyonu	10
Şekil 1.5. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması	11
Şekil 1.6. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü	12
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme mekanizması.....	26
Şekil 3.2 Alabaş Turpu Peroksidaz inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller ..	28
Şekil 3.3. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması ..	29
Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılma reaksiyonu.....	31
Şekil 3.5. 3-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu.....	32
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	35
Şekil 4.2. 3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	37
Şekil 4.3. 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	38
Şekil 4.4. 3-Amino-4-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	39
Şekil 4.5. 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	40
Şekil 4.6. 3-Amino-5-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	41
Şekil 4.7. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5- metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	42

Şekil 4.8. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	44
Şekil 4.9. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	45
Şekil 4.10. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği ...	47
Şekil 4.11. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği ..	48
Şekil 4.12. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	50
Şekil 4.13. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	51
Şekil 4.14. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği ...	53
Şekil 4.15. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-bromo benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği..	54
Şekil 4.16. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	56
Şekil 4.17. Alabaş turpu POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması	10
Çizelge 3.1. Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler	21
Çizelge 3.2. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler	22
Çizelge 3.3. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	23
Çizelge 3.4. Elektroforezde kullanılan çözeltiler.....	24
Çizelge 4.1. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentez sonuçları.....	36
Çizelge 4.2. 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	42
Çizelge 4.3. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	43
Çizelge 4.4. Alabaş turpu POD enzimi üzerine 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	44
Çizelge 4.5. 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	45
Çizelge 4.6. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	46
Çizelge 4.7. Alabaş turpu POD enzimini üzerine 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	47
Çizelge 4.8. 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	48
Çizelge 4.9. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	49

Çizelge 4.10. Alabaş turpu POD enzimini üzerine 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	50
Çizelge 4.11. 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	51
Çizelge 4.12. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	52
Çizelge 4.13. Alabaş turpu POD enzimi üzerine 3-Amino 4-metoksi benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	53
Çizelge 4.14. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	54
Çizelge 4.15. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	55
Çizelge 4.16. Alabaş turpu POD enzimini üzerine 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	56
Çizelge 4.17. Alabaş turpu POD enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları	57
Çizelge 4.18. Afinite kolonlarından elde edilen Alabaş turpu POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu	59

1. GİRİŞ

Canlıların, canlılık özelliklerini devam ettirebilmeleri için dışarıdan aldıkları besin türü maddeleri kendilerine has biyolojik moleküllere dönüştürebilmesi için birçok kimyasal faaliyet gerçekleştirmesi gerekmektedir. Temel konusu madde olan kimyanın bilimsel çalışma alanı; maddelerin bileşimi, birbirleriyle etkileşimi ve bu etkileşimlerin sonucunda meydana gelen yeni maddeleri incelemektir (Bağ 2017).

Kimyanın önemli bir alt alanı olan ve çalışmamızda da üzerinde durduğumuz biyokimya, canlıların biyolojik sistemlerinin kimyasal yapısını inceler. Biyokimya, canlı hücrelerin kimyasal olaylarını moleküler düzeyde yani protein, karbonhidrat, lipit gibi organik bileşikleri inceleyen bir alandır. Aynı zamanda biyokimya, kimyasal tepkimelerde büyük rol oynayan nükleik asitlerin, vitaminlerin ve hormonların yapısal ve nicel çözümlemesini yapmaktır (Biyokimya'nın Tanımı ve Amacı 2017). Yapılan bu çözümlemelerde de enzimler, canlı mikroorganizmalarda biyolojik katalizör olarak verimliliği %100 olan ürünlere dönüştürmesi ve kimyasal reaksiyonları hızlandırması şeklinde ortaya çıkar.

Enzim çalışmaları bütün dünyada yaygınlaşarak artmaktadır. Bu alan ile ilgili en önemli gelişmelerden biri de Summer'in 1926 yılındaki Jack Bean bitkisinden elde ettiği üreaz enzimini kristallendirmeyi ve bunun protein yapısında olduğunu bulmasıdır. Şimdiye kadar 2000' e yakın enzim tanımlanmış olup bu enzimlerin çoğunluğu saflaştırılmış, karakterize edilmiştir ve bunlarında 200' den fazlası kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Tüm canlı organizmaların ürettiği proteinler olup birçok biyokimyasal reaksiyonu katalizleyen enzimler, yapısal olarak proteine benzeyip ve 3 boyutlu yapısından dolayı da reaksiyonlarda spesifikliğı oldukça yüksektir. Farklı olarak metabolizmada protein yapısında olmayıp da reaksiyonları katalizleyen katalitik RNA molekülleri (ribozim) de vardır (Schomburg *et al.* 2013).

Proteinlerin, en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu enzimler oluşturur. Yani katalitik aktivite özelliği olan RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2004).

Enzimler, çok yüksek katalitik aktiviteye sahiplerdir. Tepkimeye girdikleri madde karşısında oldukça özel davranışlar sergileyip molekülün sadece bir bölgesini etkiler. Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda doğal olarak oluşturulmaktadır. Ancak kendilerinden beklenen aktiviteleri göstermeleri için hücre içinde bulunmalarına gerek yoktur. Enzimin yapısında amino asitler bulunmaktadır. Amino asitlerin kendilerine has dizilişleri, konformasyon ve tersiyer yapıları vardır. Enzimlerin bir diğer özelliği de metabolik olayların kontrolünü sağlamak için gerekli olmasıdır (Gözükara 2001).

Enzimler, kullanım açısından giderek yaygınlaşmış ve artık günlük hayatımızda çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin; ekmek, yoğurt ve peynir üretimi gibi tüketim, temizlik ve hastalık teşhis ve tedavisi alanlarında enzimler büyük rol oynamaktadır. Enzimlerin büyük oranda kullanımı da kimya endüstrisi, gıda prosesi, ziraat işlerinde olmaktadır.

Enzimlerin kullanımını ve etkisini artırmak için “substrat” adı verilen kimyasal moleküller ile tepkimeye girmesi gerekmektedir. Her enzimin kendine özgü bir substratı vardır. Enzim ile substrat arasındaki komplekse enzim-substrat kompleksidenir (Geçkil 2012).

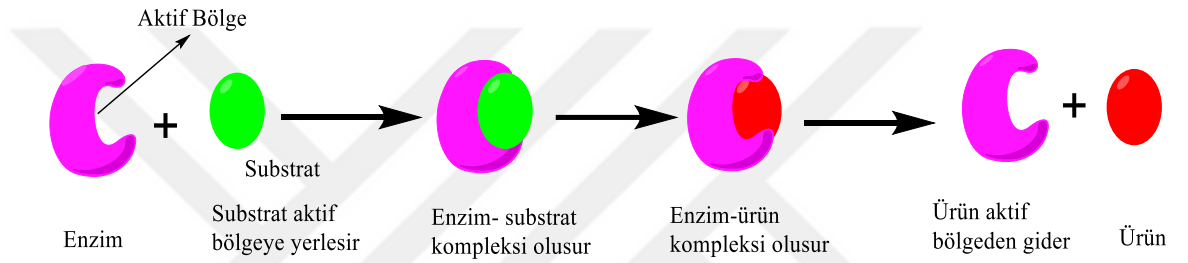
Kendilerine has özellikleri olan enzimler, bir substrata veya aynı fonksiyon grubuna sahip olan diğer substrat serisine karşı etkindirler. Aynı zamanda çok özel enzimler de bulunmaktadır. Bu enzimler maddenin izomerlerinden sadece birisiyle etkileşmektedirler (Tüzün 1997).

Enzimlerde özel bir alan olarak bilinen aktif bölgeler vardır. Bu alanlar substratla üç boyutlu bir yüzey oluşturabilen amino asit yan zincirlerine sahiptirler ve bu aktif bölge

substratı kendine bağlayarak enzim-substrat (ES) kompleksini oluşturur. Oluşan bu kompleks farklı bir enzime veya ürüne dönüşebilir (Harvey and Champe 2007).

Enzimle substratın bağlanmasında iki model vardır;

1. Emil Fischer'in anahtar-kilit modelidir ki; substrat enzimin aktif kısmına anahtar kilit şeklinde bağlanır.

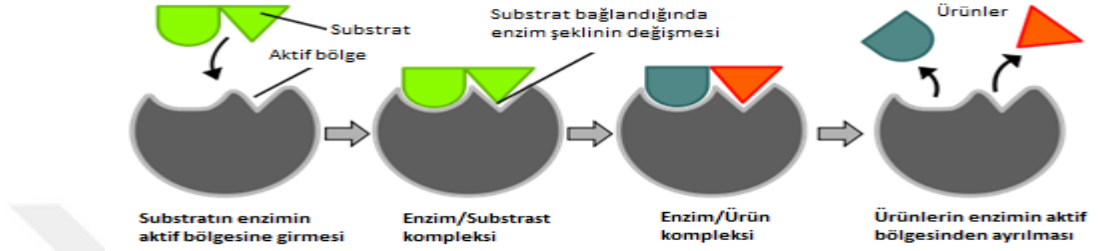


Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasındaki anahtar-kilit modeli

Aktif bölgelerin ortak özellikleri

- Enzimin hacmine oranla küçük bir bölgeyi oluşturur.
- Üç boyutlu bir yapıdır.
- Bir yarı ve girinti içindedirler.
- Spesifik bir bağlanma, aktif bölgeye bağlanacak yapıların belirli tarzlarda düzenlenmeleri sonucunda oluşur. Substrat bu bölgeye tam yerleşebilecek şekilde olmalıdır. Enzim ile substrat arasındaki bu ilişkiye anahtar-kilit modeli adı verilmektedir (Keha ve Küfrelioğlu 2011).

2. Daniel Koshland'ın, indüklenmiş-uyum modelinde ise substrat varsa enzim, substratı kendisine çeker ve bağlanmış olduğu substratı parçalayıp ürüne dönüştürür ve reaksiyonun sonunda da enzimde hiç değişme olmadan ayrılır (Nelson and Cox 2005; Megep 2006).



Şekil 1.2. Enzim ile substrat arasındaki indüklenmiş-uyum modeli

Substrat-enzim kompleksini engelleyen ve enzim aktivitesini düşüren bileşiklere “enzim inhibitörleri”, olaya ise “enzim inhibisyonu” denir. Enzim aktivitesine; enzim derişimi, sıcaklık, pH, substrat derişimi, iyonik şiddet, aktivatörler ve inhibitörler etki eder. Nasıl proteinler sıcaktan etkilenirlerse enzimlerde aynen etkilenirler. Enzimler optimum sıcaklık (30-40 °C) ta en yüksek aktiviteyi gösterirler. Sıcaklık değişmesi ise enzimin çalışma hızını negatif etkiler (Keha and Küfrevioğlu 2009; Berg *et al.* 2013).

ES kompleksi sayesinde her bir saniyede yaklaşık olarak 100 ile 1000 arasında yeni ürün meydana gelebilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substrat sayısıdır (Harvey and Champe 2007). Katalaz enzimi 40.000.000 s^{-1} ile en yüksek turnover sayısı olan enzim iken, karbonik anhidraz enzimi 10.000.000 s^{-1} ile en yüksek ikinci turnover sayısına sahip enzimdir (Bülbül 2003). Bilinmesi gereken önemli bir nokta ise enzimler bir veya birden fazla substratı etkilerken aktivite gösterebilmek için bazı durumlarda “kofaktör” adı verilen yan gruplara ihtiyaç duyarlar. Bu gruplar bazen bir metal iyonu veya kompleks bir organik bileşik (koenzim) olabilirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Holoenzim, bir proteinin işlevi için ihtiyaç hissedilen tüm yardımcı faktörleri içeren ve katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksidir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Kofaktörler enzimlere ligand bağlarıyla

farklı kuvvetlerde tutunmuş olup diyaliz yoluyla enzimlerden uzaklaştırılabilirler. Kofaktörü kendinden uzaklaşmış enzim aktivitesini kaybeder. Enzimin proteinden oluşan kısmına “apoenzim” denilmektedir (Gözükara 1997).

Reaksiyona giren maddelerin gerekli enerjiye sahip olmaları halinde reaksiyonun gerçekleşebilir. Belirli bir eşik değerinden fazla olması gereken ve “Aktivasyon enerjisi” olarak adlandırılan bu enerji ile reaksiyonlar çok hızlı ilerleyebilirler. Ancak bilinmesi gereken önemli bir nokta ise katalizörler aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandırırlar. Enzimler ve katalizörler reaksiyona giren maddelerle belirli bir hal oluşturup serbest enerji değişimini indirerek reaksiyonu etkilerler.

1.1. Enzim Reaksiyonlarının Hızını Etkileyen Faktörler

Enzim reaksiyonlarının hızını etkileyen faktörler;

- 1- Enzim konsantrasyonu
- 2- Isı veya sıcaklık
- 3- pH
- 4- Substrat konsantrasyonu
- 5- Işık ve diğer fiziksel faktörler
- 6- Zaman
- 7- Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler
- 8- Reaksiyon ürünleri
- 9- İyonların doğası ve konsantrasyonu

Enzim Kinetiği

1913 yılında Lenor Michaelis ve Maude Menten tarafından geliştirilen ve Michaelis-Menten modeli olarak da bilinen ve kullanımı devam eden bu model ile Enzim kinetiği için birçok açıdan olumlu sonuçlar elde edilmektedir (Telefoncu 2007). Enzimlerin kinetik özellikleri Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilir. Bazı

araştırmacılar önceleri Enzim-Substrat ile Enzim-Substrat kompleksi arasında bir dengenin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Michalies-Menten bu tanımını daha fazla genişleterek bugün kendi adlarıyla anılan sabite ve eşitliğe ulaşmışlardır (Boyer 1970; Colowick and Kaplan 1987).

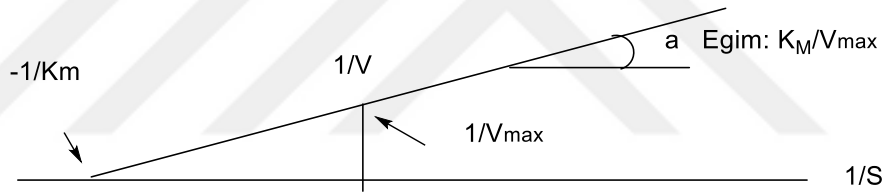
$$V = V_{\max} [S] / K_m + [S]$$

Denklemden belirtilen K_M sabiti enzimin substrata olan ilgisini gösterir. $V_{\max}$ enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi (Enzim Ünitesi), 25°C'de ve optimal şartlarda 1 μ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. 1 Katal enzim ise saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzimdir. Genelde Enzim Aktivitesi, katal cinsinden enzimin doğal hedefi varsayılarak ifade edilir. Spesifik aktivite ise 1 mg protein başına düşen enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsü olup ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşılması hedeflenir. Böylece enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim aktivitesinden farklı olarak enzim inhibisyonu da çok önemli bir terimdir. Enzim inhibisyonu ise enzime bağlanan ve enzimin etkinliğini azaltan bir olaydır. İnhibisyonun dönüşümsüz ve dönüşümlü olmak üzere iki şekli bulunmaktadır. Dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitör, enzime kovalent bağlanabilir veya zor ayrılabilen bir kompleks meydana getirir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Dönüşümlü inhibisyonunda ise enzim-inhibitör etkileşimleri bir denge reaksiyonudur. Dönüşümlü inhibisyon ise yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olacak şekilde üç şekildedir. İlk olarak yarışmalı inhibisyon ele alındığında inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmak için yarıştıkları görülür. Bu yarışın etkisi ise inhibisyonun, substrat konsantrasyonu ile ters orantılı olması ile ilgilidir. Yarışmalı inhibisyonunda K_M değeri artar $V_{\max}$ değişmez. Yarışmasız inhibisyonunda inhibitör ile substrat, enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Yarışmasız inhibisyonunda ise K_M değişmezken $V_{\max}$ değeri düşer. Yarı yarışmalı inhibisyonunda ise, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır ve $V_{\max}$ ve K_M

değerlerinin her ikisi de azalır. Dönüşümlü inhibisyonda genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak ayrımını kesin bir şekilde belirtmek mümkün değildir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Sigmodial grafikler gösteren allosterik enzim kinetiği, Michaelis-Menten kinetiğinden farklı olarak karşımıza çıkmıştır. İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için iki temel yöntemden en çok kullanılan Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 1.3); $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği üç ve daha fazla farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilerek kesim noktalarından değerlendirmeler yapılarak elde edilir. Farklı bir yöntem olan Dixon grafiği; iki ve daha fazla sabit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından hesaplanarak elde edilir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Gilbert 1992; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.3. Lineweaver-Burk grafiği

1.2. Serbest Radikaller

Oksidan madde veya serbest radikaller, kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri olarak ifade edilen ve reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamıdır.

Bir veya birden çok eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, kısa ömürlü, molekül ağırlıkları küçük, oldukça reaktif moleküller serbest radikallerdir (Abdollahi *et al.* 2003).

Vücutta fitri metabolik sistemlerde serbest radikaller oluşur fakat radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir

sitotoksisite ortaya çıkmaz. Organizmada serbest radikal oluşturan fitri olayların bazıları mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyarılarla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır (Fridowich 1978; Ghosh and Myers 1998). Serbest radikal düzeyinin organizmada düzenli bir denge içerisinde olması gerekir. Serbest radikal dengesinin bozulması hücresel veya biyolojik içerikli olabilir. Böyle bir durumda vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek organizmanın onlardan etkilenmemesini sağlamaktadırlar (Dündar ve Aslan 2000). Serbest radikaller etkilediği atomun bulunduğu maddenin görevini yerine getirememesine neden olur. Bunların sonucu olarak, etkilenmiş olan maddelerin biyolojik önemine ve onun tamir edilip edilememesine bağlı olarak önemlilik ve kalıcılık etkiler gösterdiği görülür. Serbest radikaller, hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (Lee *et al.* 1998).

Reaktif oksijen türleri solunum ve bağışıklık sistemine bağlı bazı hücrelerde olduğu gibi vücudun oksijeni normal kullanımı esnasında da sürekli üretilir. ROS süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot-}$) gibi serbest radikalleri; singlet oksijen ($^1O_2$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit ($NO^{\cdot-}$) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) gibi serbest radikal olmayan türleri içerir (Gülçin 2010). Bu reaktif oksijen türleri, canlı metabolizmasında farklı şekillerde meydana gelmektedir. Normal aerobik solunum, makrofajları, peroksizomları ve polimorfonükler lökositleri stimüle eder. Hücre tarafından üretilen çoğu ROS türünün en önemli endojen kaynağı peroksizomlardır. Sigara dumanı, radyasyon, çevre kirliliği, organik çözücüler, UV ışınları ve pestisitler ise ROS' un ekzojen kaynaklarıdır (Ak and Gülçin 2008).

Birçok hastalık belirtilerine ve hatta erken yaşlanmaya bakıldığında ROS'un kontrolsüz üretimi ve dengesiz antioksidan mekanizması görünür (Gülçin 2008). ROS'un fizyolojik konsantrasyonları hücrenin normal fonksiyonları için gerekli olabilir. Serbest radikaller nükleik asitler, lipitler, proteinler, karbohidratlar ve doymamış yağ asitleri gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilir (Gülçin 2010).

1.3. Antioksidan Enzimler

Çok yüksek katalizleme gücüne sahip olan enzimler, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Canlılardaki yapım (sentez) ve parçalanma reaksiyonlarının hemen hemen hepsi enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Enzimler canlılar için olmazsa olmazdır denilebilir. Enzimlerin önemini artıran bir diğer özelliği de canlı dışında da aktivite göstermeleridir. Enzimler, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Serbest radikalleri zararsız hale getiren endojen antioksidan enzimlerdir. Organizma aktif oksijen türleri ve serbest radikallerden etkilenmez (Arosio *et al.* 2000).

1.4. Peroksidazlar

Peroksidaz enzimi, oksidoredüktaz enzim sınıfındadır ve eletron verme eğiliminde olan bileşikler ile bu elektronları alıcı durumunda olan hidrojen peroksit bileşiği arasında gerçekleşen reaksiyonu katalizler. Prostetik grup olarak peroksidazlar, ferroprotoporfirin IX ihtiva eden hem proteinleridir (Adams 1978; Whitaker 1994).

Peroksidazlar, oksijenli solunum yapan canlı organizmaların hücrelerinde bulunan hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya çevirerek hücreyi bu molekülün oksidatif etkisinden korurlar (Şişecioglu *et al.* 2010). Peroksidaz enzimlerinin yüksek sıcaklıktaki stabillliği ve aktivitelerinin basit kromojenik reaksiyonlarla kolayca ölçülmesinden ötürü protein yapısı, enzim reaksiyonları ve enzim fonksiyonu çalışmalarında model bir enzim olarak kullanılmaktadır (Hiraga *et al.* 2001).

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



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

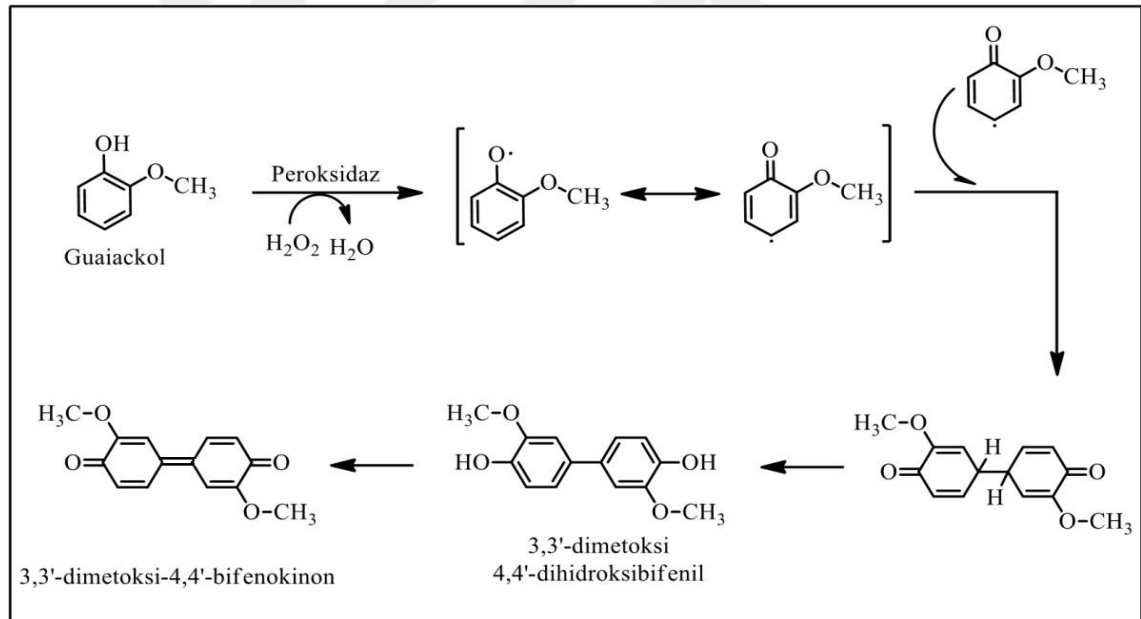
Süper Aile	Enzim	Kaynak	Moleküler Kütle (kDa)
Hayvan Peroksidazları	Eosinophil Peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	78-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutasyon Peroksiaz	Hayvan, Bitki	6-22, 75-112
	Prostaglantin endoperoksit Sentaz	Hayvan	115-140
Katalaz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

Hücrede antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri metabolizma sırasında oluşan ve oksitleyici özelliği olan H_2O_2 'nin ortamdan hızlı bir şekilde uzaklaştırılması işlevini gerçekleştirir (Halliwell 1984). Peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılan aromatik moleküller, metabolizmada meydana gelen hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürürler (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987). Katekolün oksidasyonu bu reaksiyonlara örnek olarak verilebilir.

**Şekil 1.4.** Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme reaksiyonu

Peroksidazlar, hidrojen peroksit molekülünü kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu katalizlerken, hidrokinonid aminler, hidrokinonlar ve fenoller gibi fenolik olan ve olmayan birçok molekülün dehidrogenasyonunu da katalizlerler. Farklı olarak bu bileşikler arasında 2-kresol, 2-toluidin, 4,4'-diamino difenilen amin, pirogallol, guaiakol, o-tolidin, lökomalaşit yeşili, propiyonil promozin, benzidin, di-o-anisidin ve bazı azo-boya çeşitleri bilinmektedir (Fortea *et al.* 2011; Fodil *et al.* 2012).

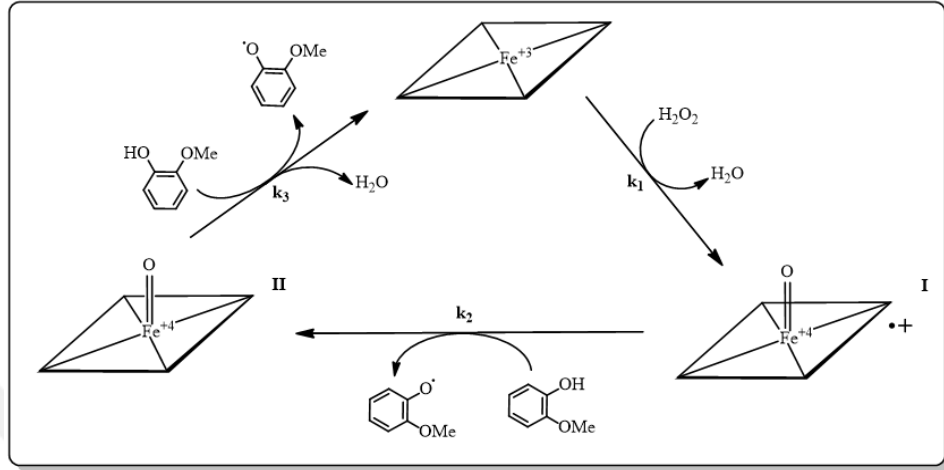
Peroksidaz ile aynı şartlarda substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgenme mekanizması, araştırmalar sonucu açığa çıkarılıp guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinona yükseltgendiği tespit edilmiştir (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.5. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması

İlk defa 1809'da biyomateryallerde yapılan renk reaksiyonuyla guaiakolün substrat olarak kullanımı gerçekleşmiştir. Bayır turpundan saflaştırılan enzimle peroksidaz teriminin kullanılması bundan 100 yıl sonra gerçekleşmiştir (Van Huystee 1987).

H_2O_2 nin indirgendiği ve guaiakol substratının yükseltgendiği reaksiyonlar ile peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması üç basamakta gerçekleşir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Şekil 1.6’da verilen mekanizmanın birinci basamağında peroksidaz enzimi, Fe(IV) içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I’i oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Redoks reaksiyonu olan bu reaksiyonda enzim yükseltgenmekteyken H_2O_2 suya indirgenir. İkinci adımda ise bileşik 1. adımdaki guaiakol substratından bir proton alarak Fe(IV) haline indirgenirken, substrat bir proton kaybederek radikale dönüşür. Bunun sonucunda oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan tekrar bir proton alıp indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimer hale dönüşürler (Veitch 2004).

Hayvanlar, mikroorganizmalar ve bitkilerde peroksidaz aktivitesi tespit edilenler arasındadır. H_2O_2 yada diğer peroksitleri kullanarak çeşitli substratların oksidasyonunu katalize eder. Peroksidazlar, hücre içi boşluklarda, hücre duvarının içinde veya dışında, plazmada bulunabilir. Hücre duvarı bileşenlerine hücre içinde bulunan enzimin bağlanma şekli iyonik ya da kovalent olabilir (Belcarz *et al.* 2008). Peroksidazların substrat ilgisi, spesifik aktivite, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi

biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimi vardır (Fric 1976). Bazı izoenzimler yapısal olarak ifade edilirken bazıları bitki yapısı ve gelişiminde önemli yer tutar. Bu enzimler bitki hücre bölmelerinde izoenzimlerin varlığı ile belirtilmiş çeşitli fonksiyonlara sahiptirler (Vitali *et al.* 1998). Bitkilerin gelişimi, bitkilerin büyümesindeki hormonal düzenlenme ve strese karşı olan cevabı, hücre duvarı metabolizması, oksidasyon defansında hücrelerin cevabı gibi birçok hücresel süreçte peroksidazlar rol oynamaktadırlar (Jouili *et al.* 2011).

Peroksidazların farklı bir özelliğide biyotik ve abiyotik stresleri gösteren bir biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler çimlenmeden tut da yaşlanmaya kadar birçok fizyolojik olayda rol oynar (Morohashi 2002). Fenolik bileşik oksidasyonu (Fry 2004), hücre uzaması (Liskay *et al.* 2004), reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin metabolizması (Almagro *et al.* 2009), fitohormon metabolizması (Cosio and Dunand 2009), hücre duvarları bileşenlerinin çapraz bağlanması ve hücre duvarının sertliğinin kontrolü, suberin ve lignin oluşumunda görev alır (Passardi *et al.* 2007; Marjamaa *et al.* 2009).

Bununla birlikte sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemlerinde indoleasetik asit miktarının ayarlanması, savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry 1986; Agostini *et al.* 1997), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000), oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) gibi olaylarda etkilidirler ve mikroanalitik uygulamalarda tercih edilir (Kwak *et al.* 1996). Bitkilerde, hasarlı veya enfekte dokularda fiziksel savunma mekanizmasına (Biles and Martyn 1993) katkıda bulunmaktadırlar.

Peroksidazların uygulama alanlarından birisi de klinik biyokimyada ve enzim immünolojik testlerinde yaygın olarak kullanılmasıdır (Vamos-vizago 1981; Lin *et al.* 1996). Peroksidazların bazı yeni uygulamaları da endüstriyel atıklar ve gıda maddeleri gibi materyallerden peroksitlerin uzaklaştırılması, çeşitli aromatik kimyasalların sentezi, fenolik bileşenler içeren atık suların iyileştirilmesi gibi öneriler de içermektedir (Agostini *et al.* 2002).

Yukarıda verilen tabloda III. Sınıf olarak gösterilen klasik salgı bitki peroksidazları, hücre duvarı yapısı ve farklılaşması ve hücre uzaması yanısıra farklı bitki patojenlerine karşı savunmada görev alan bitki salgı glikoproteinleridir (Zamocky and Obinger 2010).

Endüstriyel atıklar, çamur, toprak ve atık sulardan fenolik bileşenlerin uzaklaştırılması için çeşitli kimyasal, mikrobiyolojik ya da enzimatik yöntemler geliştirilmiştir. Ozon tedavisi gibi kimyasal yöntemler, çok pahalıdır ve bazı toksik kloro-organik bileşiklerin artmasına (klorin oksidasyonu) neden olabilir ki bu da fenolik bileşiklerin kendisinden daha tehlikelidir. Horseradish ve diğer bitki kaynaklarından peroksidazın izolasyonu mikrobiyal kaynak ürünlerinden daha ucuzdur. Bu nedenle bitki peroksidazları suların iyileştirilmesini de içeren çoğu ticari uygulamalar için kullanılmaktadır (Lavery *et al.* 2010).

1.5. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, çoğu biyomoleküllerin özelleşmiş kimyasal yapılarını veya biyolojik fonksiyonlarını saflaştırma yöntemidir. Bu yönteme bakıldığında bir tür adsorbsiyon kromatografisi olduğu anlaşılır. Hangi molekül saflaştırılacaksa matriks denilen kolon materyaline, kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) tersinir ve spesifik olarak bağlanır. Saflaştırma genellikle bir kaç bin kat olur ve hazırlanan aktif materyalin geri kazanılması olasılığı çok yüksektir. Farklı tekniklerle yapılırken çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan, hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyalin, bu teknikle bir tek basamakta ayrımı gerçekleştirilir. Afinite kromatografisinin büyük hacimlerle de çalışmayı mümkün kılması konsantre edici özelliğinin olmasıdır. Ayrımaların yüksek seçiciliği, birbirini etkileyen moleküllerin doğal spesifitesinden kaynaklanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bundan ötürü afinite kromatografisi saflaştırma çalışmalarında halen önemini korumaktadır. Afinite kromatografisi

- Kompleks biyolojik karışımlardan tek bir maddeyi saflaştırmak için,
- Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden doğal şekillerini ayırmak için,

- Kirlenici büyük miktarlardaki madde karışımlarından küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için gibi amaçlarla kullanılabilir:

Afinite kromatografisinde spesifik ve yüksek verimde bir ayırım yapabilmek için;

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



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Peroksidaz enzimi ile ilgili saflaştırmalar ilk olarak 1960’larda başlamış olup literatürde geniş bir araştırma alanına sahiptir. Kullanılan yöntemlerden bazıları iyon değişim kromatografisi, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi, hidrofobik ve metal afinite, diyaliz gibi kromatografik metotlardır.

Peroksidaz enzimi bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabilir. İncir, ananas, patates, ıspanak, baklagiller, bazı turp türlerinde, mantarlarda, mayalarda ve bakteriler gibi bitkisel kaynaklı olurken karaciğer, süt, dalak, tükürük bezlerinde, hayvansal hücrelerin çoğu kısımlarında hayvansal kaynaklı olarak bulunmaktadır (Pütter and Becker 1987).

Peroksidaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi, kation değişimi, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yoluyla buğday kepeğinden saflaştırması yapılmıştır (Manu *et al.* 2009). Pancarın genetik olarak değiştirilmiş kök kültürleri ile üretilmiş hücre içi peroksidazını (POD), iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat ayrımsal damıtmasının birleşimi kullanılarak saflaştırması yapılmıştır (Rudrappa *et al.* 2007). Afinite kromatografisinde %9 verimle şalgamdan 269,13 kat (Kalın *et al.* 2014), %2,9 verimle kırmızı lahanadan 120 kat (Somtürk *et al.* 2014), %10,6 verimle karaturptan 40,3 kat (Kalın *et al.* 2014), %55 verimle rekombinant HRP den 12 kat (Spadiut *et al.* 2014), %5,8 verimle hurma yapraklarından 17 kat (Al-Senaidy *et al.* 2011), %71 verimle 3 kademedede at turpundan 291 kat (Lavery *et al.* 2010), %0,2 verimle karnabahardan 19,33 kat (Köksal and Gülçin 2008), %19 verimle vanilya çekirdeğinden 21 kat (Marquez *et al.* 2008), %84,6 verimle kırmızı pancardan 15 kat (Rudrappa *et al.* 2007) POD saflaştırılmıştır. Elektroforetik homojenlik için zeytinden elde edilen peroksidaz enzimi saflaştırılmıştır (Saraiva *et al.* 2007).

Literatürdeki POD enziminin saflaştırıldığı bazı çalışmalar ise; domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), bürüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee

and Klein 1990), pamuktan (Triplett and Mellon 1992), çilekten (Civello *et al.* 1995), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), havuçtan (Nair *et al.* 1996), portakaldan (Clemente 1998), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), arpadan (Kristensen 1999), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), ısırgan otundan (Gülçin 2002), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002), karalahanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007), Köksal and Gülçin 2008), mısırdan (Mika *et al.* 2008), at turpundan (Lavery *et al.* 2010), ıspanak yapraklarından (Köksal 2011) ve papaya meyvesinden (Pandey *et al.* 2012) yapılan çalışmalardır.

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

Peroksidazlar 4°C’de yaklaşık 1 ay depolanma süresince tamamıyla aktivite göstermektedir ki, ABTS (0,0377 ve 0,0625 mM) ve o-dianisidin (0,357 ve 0,286 mM)’e ait K_m değerleri için guaiacol (6,41 ve 13,89 mM)’den daha düşük değerlere sahiptir (Vitali *et al.* 1998).

Karaturp, şalgam ve diğer bitki çeşitleri üzerinde de enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları mevcuttur ki; japon turpu (*Raphanus sativus* L.) köklerinden askorbat peroksidaz enzimi (Ohya *et al.* 1997), türk karaturpundan (*Raphanus sativus* L.) peroksidaz enzimi (Şişecioğlu *et al.* 2010) saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Kara lahanadan (*Brassica oleracea*) POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat ve %33 verimle (Gülçin 2005), karnabahardan POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) 19,33 kat ve %0,2 verimle (Köksal and Gülçin 2008) saflaştırılmıştır. Kırmızı lahanada afinite kromatografisini kullanarak 120 kat ve %2.9 verimle (Somtürk *et al.* 2014). Yabani

sinamekinden peroksidaz saflaştırılmıştır (Vitali *et al.*1998). Marul mahs l nden elde ettiği peroksidaz enzimi, Sefadeks G-100 jel filitrasyonu, DEAE - iyon değişimi ve Triton X-114 içindeki faz ayrımı, sıcaklığın bir kombinasyonu yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Mdluli *et al.*2005). Kavun meyvesinden kısmen kavun peroksidazı anyon-değişim kromatografisi yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Rodriguez *et al.* 2000). Hurma yaprağı yağından elde edilen peroksidaz (POD) enzimi, amonyum sülfat    kt rmesi, anyon değişim kromatografisi ve moleküler dışlama kromatografisi yoluyla saflaştırılmıştır (Deepa *et al.* 2002).

Farklı turp çalışmalarından bazıları; antioksidan enzimlerin turp (*Raphanus sativus* L.) dokularındaki kadmiyuma verdiği tepkilerin incelenmesidir (Vitoria *et al.* 2001).  in turpunun (*Raphanus sativus* L.) besin kalitesi araştırılmıştır (Zhao-liang *et al.* 2008). Turp (*Raphanus sativus* L.) içindeki arsenatın alınımı, taşınımı ve dönüşümü araştırılmıştır (Smith *et al.* 2008), Avusturalya'da farklı sezonlar içinde yetiştirilen beyaz turpun (*Raphanus sativus* L.) keskinlik seviyeleri incelenmiştir (Coogan *et al.* 2001). Jing ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada  in kırmızı turp (*Raphanus sativus* L.) köklerinde antosiyanin ve glukosinolat oluşumu araştırılmıştır (Jing *et al.* 2012). Diğer bir çalışmada ise İspanyol karaturpunun (*Raphanus sativus* L.) sulu ekstraktının detoksifikasyon özelliği incelenmiştir (Hanlon *et al.* 2009).

Araştırmalara göre; bitki peroksidazlarının saflaştırılmasında sadece tek bir bitki için spesifik kullanılmış olup bu da aromatik bir hidrazin kullanılarak karaturp ve şalgam POD enziminin tek basamakta saflaştırılmasıdır. Diğerleri ise en az iki kromatografik yönteme başvurulmuştur. Saflaştırma verimleri ise yüzde 02 – 70 arasında değişmektedir.

2.1. Çalışmanın Amacı

Literatüre bakıldığında bitki peroksidazı üzerine saflaştırma işlemleri oldukça fazladır. Bu çalışmada enzim aktivitesi üzerine 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-amino-4-metil benzohidrazid, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri üzerine çalışmalar yapıldı ve inhibisyon etkisi gösteren benzohidrazid türevlerinden afinite jelleri hazırlandı. Bu afinite jellerinden peroksidaz enzimi alabaş turpu saflaştırılarak daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarıyla kıyaslanarak peroksidaz enziminin daha yüksek verimle saflaştırılması ve farklı bitki POD enzimlerinin saflaştırılmasına ışık tutması amaçlanmıştır. Tek basamakta ve düşük maliyette yapabildiğimiz Alabaş turpu POD enzimi %28,8 verimle 1192,3 kat saflaştırma çalışmalarımız iyi bir ticari kullanım potansiyelini ortaya çıkardı. Çalışmalarımızda alabaş peroksidaz enzimi saflaştırılırken 3-Amino benzohidrazid türevlerinin afinite jeli kullanıldı. Saflaştırılmış olan peroksidaz enzimi üzerine sentezlenen 3-Amino benzohidrazid türevlerine inhibisyon çalışması yapıldı. Çalıştığımız moleküllerin IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tip belirlemesi yapıldı. Alabaş turpu peroksidaz enzimi hazırlanan afinite jellerinden saflaştırılıp önceden saflaştırılmış olan 4-amino benzohidrazid afinite kolonu ile kıyaslandı.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı.

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| • Spektrofotometre | : Shimadzu UV 1800 |
| • Saf su cihazı | : Barnstead Easy Pure UV/UF |
| • Karıştırıcı (Shaker) | : IKA KS 130 basic |
| • Soğutmalı santrifüj | : Hermle Z 323 K(Germany) |
| • Elektroforez tankı | : Bio rad (dikey) |

- Peristaltik pompa : İsmatec
- Karıştırıcı (Vorteks) : Fisons whirli-mixer
- Hassas terazi : Denver Instrument
- pH metre : Mettler Toledo Seven Compact
- Otomatik pipet : Güç kaynağı: 1-Bio Rad Power Pac 3000
- NMR : Bruker 400 MHz
- Çalkalayıcı : Midi Dual 14
- Magnetik karıştırıcı : WiseStir MSH-20A
- Afinite kolonu : Sigma
- Su banyosu : Nüve
- Buzdolapları : Samsung
- Derin dondurucu (-20°C'ye kadar): Samsung
- Derin dondurucu (-85°C'ye kadar): Sanyo Ultra Lo
- Rotary Evaporatör : Heidolph

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdadır. Çözelti hazırlamada saf su kullanıldı.

Çizelge 3.1. Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kullanılan Kimyasalların Adı ve Alınan Miktarları	pH	Son Hacim
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirilmesi	NaHCO ₃ 0,1 M (pH 9,0) tampon çözeltisi- NaHCO ₃ 1,68 g (0,01 mol) 170 mL suda çözölmüş	9,0	200 mL
Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 3-amino benzohidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi	NaHCO ₃ 0,2 M (pH 8,8) tampon çözeltisi- NaHCO ₃ 0,42 g (0,005mol) 35 mL suda çözöldü	8,8	50 mL
Sepharose-4B-L-Tirozin-3-amino (R ₁ , R ₂) benzohidrazid afinite jellerinin yıkanması	NaH ₂ PO ₄ 10 mM pH 6,8 tampon çözeltisi- NaH ₂ PO ₄ 3 g (0,025 mol) 200 mL destile suda çözöldü	6,8	250 mL

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

Çizelge 3.2. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kullanılan Kimyasalların Adı ve Alınan Miktarları	pH	Son Hacim
Afinite kolonlarının dengelenmesi	NaH_2PO_4 10 mM (pH 6,8)- NaH_2PO_4 24 g (1.10^{-1} mol) 1800 mL suda çözüldü	6,0	2L
Afinite kolonlarının yıkanması	NaH_2PO_4 25 mM (pH 6,8) tamponu kullanıldı- Na_2HPO_4 2,84 g (1.10^{-2} mol) 725 mL suda çözüldü	6,0	800 mL
POD enziminin elüe edilmesi	1 M NaCl içeren 25 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) kullanıldı---11,7 g (2.10^{-1} mol) NaCl 170 mL suda çözüldü--1,42 g (1.10^{-2} mol) Na_2HPO_4 çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı	6,8	200 mL

Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti:

1- Çalışılacak olan bitkiden homojenat taze olarak hazırlandı ve protein aktivite ölçümleri yapıldıktan sonra sentezlenen afinite kolonlarına tatbik edildi. Bitkiler önceden marketlerden satın alınarak depo edildi ve deneysel çalışmalar sırasında kullanılabilir.

2- 20 g tartılan örnekler blendırda parçalacak daha sonra sıvı azotla havanda dövülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen numune fosfat tamponuna (pH 7.0, 0.3 M KH_2PO_4) alınarak buz içerisinde 10 dakika manyetik karıştırıcıda yavaş bir hızla karıştırıldı, bir tülbent yardımıyla süzülecek ve sonrasında 16.000 rpm'de soğutmalı santrifüj ile $+4^\circ\text{C}$ 'de 60 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çökelekten ayrılacak ve elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

Çizelge 3.3. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kullanılan Kimyasalların Adı ve Alınan Miktarları	pH	Son Hacim
POD enzimi aktivite ölçümü	0,1 M KH_2PO_4 (pH 6,0) tampon çözeltisi 4,08 g KH_2PO_4 , 270 mL suda çözüldü	6,0	300 mL
Substrat çözeltisi	45 mM 1494 μL Guaiakol çözeltisi kullanıldı.	6,0	300 mL
Substrat çözeltisi	22,5 mM H_2O_2 çözeltisi kullanıldı. Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk H_2O_2 'den 684 μL	--	300 mL

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Proteinlerin kantitatif tayininde Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi kullanıldı. 50 mg Coomassie brilliant blue G-250, 25 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü ve bu çözeltiye %95'lik 50 mL fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin hacmi 300 mL oluncaya kadar saf su eklendi. Hazırlanan çözelti ışık görmeyecek şekilde saklandı.

Elektroforezde kullanılan çözeltiler:

Çizelge 3.4. Elektroforezde kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kullanılan Kimyasalların Adı ve Alınan Miktarları	pH	Son Hacim
1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8)	36,3 gTris, 260 mL suda çözüldü--	8,8	300 mL
1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8)	36,3 gTris, 260 mL suda çözüldü	6,8	300 mL
Numune tamponu	1,3 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 6 mL %10'luk SDS ve 3 mL %100'lük gliserin, 2 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak	--	20 mL
Yürütme tamponu	4,53 g Tris ve 22,53 g glisin, 1250 mL suda çözüldü--bunun üzerine 15 mL %10'lik SDS eklendi	---	1500 mL

Coomassie brilliant blue boyasında kullanılan çözeltiler;

- a. Renksizleştirme çözeltisi: %5 metanol %7,5 asetik asit ve %87,5 destile su karıştırılarak hazırlandı.
- b. 120 mL metanolde 0,66 g coomassie brilliant blue R-250'nin çözünmesi ve üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun eklenmesi ile hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Stabilizasyon çözeltisi: 120 mL su, 20 mL asetik asit ve 60 mL %96'lık etanol karıştırılarak elde edildi.
2. Redüksiyon çözeltisi: 9,6 g sodyum asetat, 90 mL etanol ve 160 mL saf su karıştırılıp, pH 6,0'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 300 mg sodyum tiyosülfat, 6 mL glutaraldehit eklenip 300 mL'ye safsu ile tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 200 mg gümüş nitrat, 200 mL suda çözülüp üzerine 60 µL formaldehit eklendi.

4. Yıkama Çözeltisi 1: 7,5 g sodyum karbonat, 540 mL suda çözüldü ve üzerine 240 µL formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 ml gliserin ve 250 ml'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde toplanan tüm fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Metodun esası proteinin yapısında olan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınları absorblamalarıdır (Segel 1968).

Kromatografik işlemlerden elde edilen elüatlar kuvartz küvetlere konuldu. Spektrofotometrede, tamponun (proteinin içinde bulunduğu) köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.

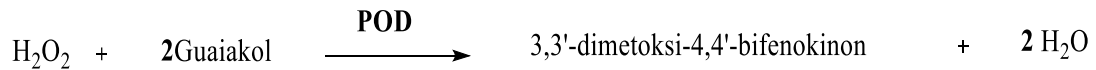
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Bradford metoduna göre homojenattaki ve afinite kromatografisi ile saflaştırılmış enzim çözeltisindeki protein miktarları belirlendi. Negatif yüke sahip olan ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanıldı. Bu boyanın mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) ve kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) formu vardır. Kırmızı formun mavi forma dönüşmesini proteinin bağlanması sağlar. Bu yöntem bozucu faktörlere karşı hassastır (1-100 µg arası).

Protein tayin yönteminin prosedürü; 1 mL'sinde 1 mg içeren standart sığır albumin çözeltisinden alınarak tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu sonra hacimleri destile su ile 0,1 mL'ye tamamlandı. 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildi. Sonra 3 mL'lik kuvvetlerde 595 nm'deköre karşı absorbans değerlerine kaydedildi. Kör olarak protein numunesinin içinde bulunmadığı tampondan, ölçüm için ise 0,1 mL protein çözeltisi ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden karışımlar kullanıldı. Elde edilen sonuçların absorbans değerlerine göre µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Ortamdaki protein miktarının belirlenmesi için saflaştırma aşamalarının herbirinde üç farklı tüpe (500, 250, 100 µL) enzim numuneleri alınarak sırasıyla 4,5, 4,75, 4,9'ar mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldı sonrasında da 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Üç defa tekrarlanan bu işlemlerin ölçümlerinin aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976).

3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

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



Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme mekanizması

Enzim çözeltisinin eklenmesiyle başlatılan reaksiyon yaklaşık 3 dk süresince 470 nm'de oda sıcaklığında absorbans artışı spektrofotometrede 1 cm ışık yoluna sahip kuvvet kullanılarak ölçüldü.

Alabaş turpu peroksidaz enziminin aktivitesini tayin etmek için

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

A = Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)

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

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

D_f = Seyreltme katsayısı

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

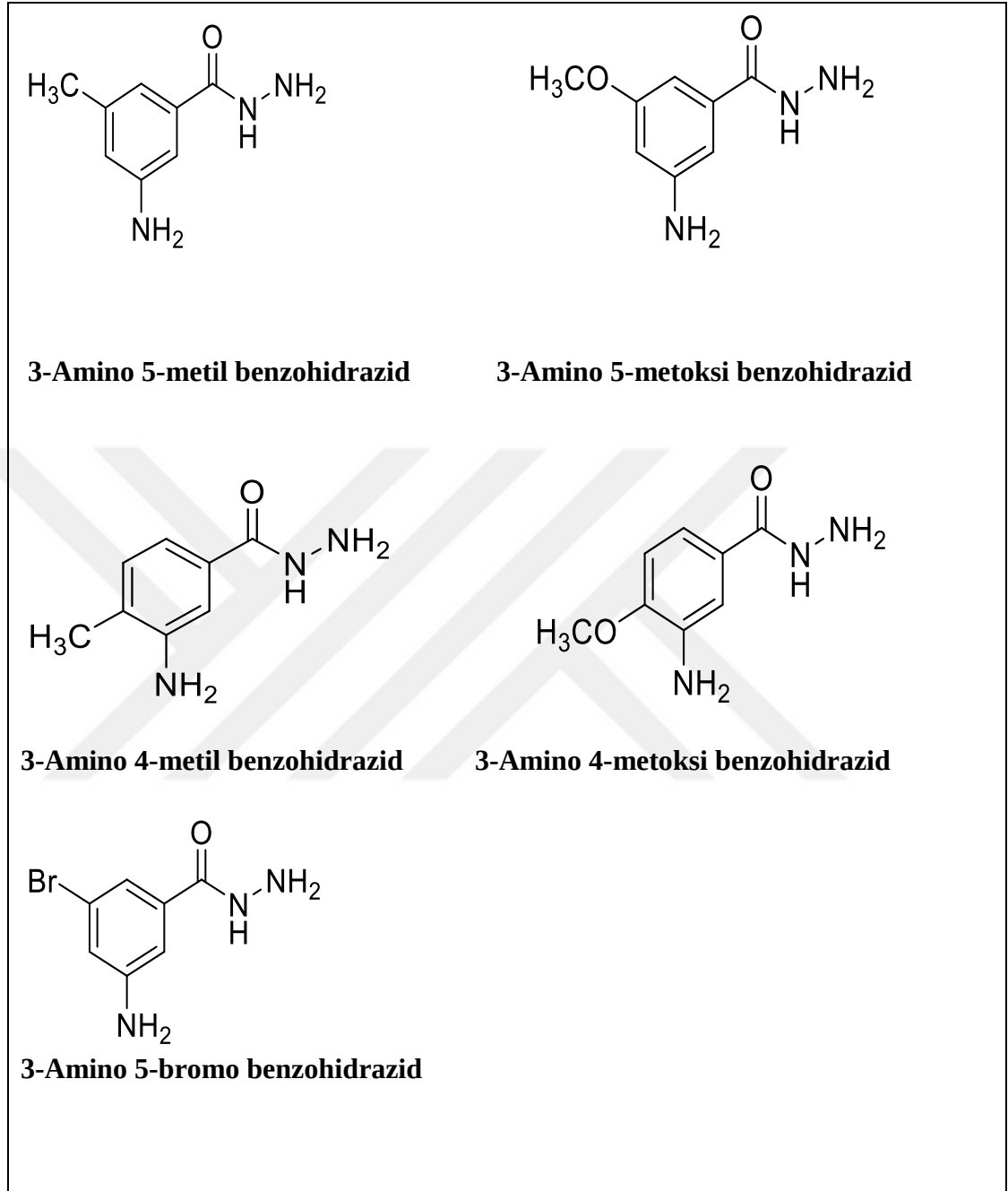
formülü kullanıldı.

Enzim saflaştırma işleminde substrat olarak guaiakol kullanıldı. 1 enzim ünitesi; 20°C 'de, 1 dakikada, 1 μmol guaiakol'ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarıdır.

3.3. Alabaş Turpr Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1. Ligand seçimi

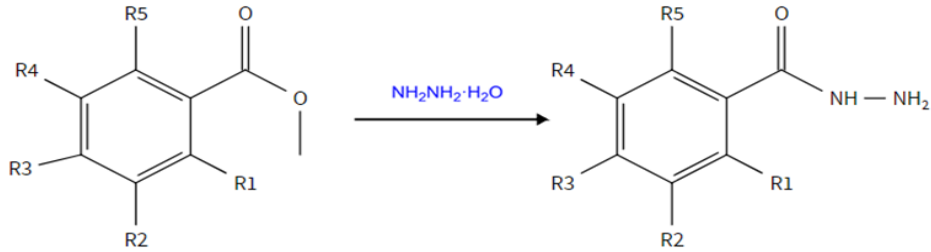
Alabaş turpu POD enzimi saflaştırmak için 3-Amino-5-metil metilbenzoat, 3-Amino-5-metoksi metilbenzoat, 3-Amino-4-metil metilbenzoat, 3-Amino-4-metoksi metilbenzoat ve 3-Amino-5-bromo metilbenzoat maddeleri satın alındı ve bu beş molekülün hidrazin formları sentezlendi. Bu moleküllerin ligand olarak kullanılabilirlikleri incelendi ve inhibisyon çalışmaları yapıldı. Sentezlenen bu moleküller diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olduklarından dolayı alabaşın afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında önem arz etmektedir.



Şekil 3.2 Alabaş Turpu Peroksidaz inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller

3.3.2. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

3-Amino-5-metil benzohidrazid, 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-4-metil benzohidrazid, 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-5-bromo benzohidrazid bileşiklerinden, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.



1) R ₁ :R ₃ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₄ :CH ₃	6) R ₁ :R ₃ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₄ :CH ₃
2) R ₁ :R ₃ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₄ :OCH ₃	7) R ₁ :R ₃ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₄ :OCH ₃
3) R ₁ :R ₄ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₃ : CH ₃	8) R ₁ :R ₄ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₃ : CH ₃
4) R ₁ :R ₄ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₃ : OCH ₃	9) R ₁ :R ₄ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₃ : OCH ₃
5) R ₁ :R ₃ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₄ :Br	10) R ₁ :R ₃ :R ₅ :H, R ₂ :NH ₂ , R ₄ :Br

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

3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezleri (Hiroshi *et al.* 2012) yöntemine göre yapılmıştır. Bu kapsamda 3-Amino metil benzoatlar (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon tamamlanincaya kadar geri soğutucu altında ısıtılarak (Reaksiyon TLC ile takip edildi) çözücü uzaklaştırıldı. Katı pellet etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı ve oluşan beyaz kristaller süzgeç kağıdı yardımıyla ayrıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Böylece 3-Amino benzohidrazid türevi olan 5 molekül sentezlenmiş oldu. Karakterizasyonları H¹-NMR yöntemiyle doğrulandı.

3.3.3. İnhibitör çalışmaları

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

Literatürde önceden sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-3-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan alabaş turp enzimi üzerine çalışılması planlanan sentezlediğimiz 3-Amino-5-metil benzohidrazid, 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-4-metil

benzohidrazid, 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-5-bromo benzohidrazid inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında inhibitörlerin herbiri için aktivite değerleri hesaplandı. Kontrol olarak, inhibitör içermeyen ortamda yapılan aktivite ölçümü kabul edildi ve aktivite %100 olarak kabul edildi. İnhibisyon etkisi gösteren 3-Amino benzohidrazid türevlerinin IC_{50} (enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değerleri % Aktivite-[İnhibitör] grafiğinden bulundu. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen aktivite değerlerinden faydalanılıp Linewaver–Burk grafikleri çizilerek ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

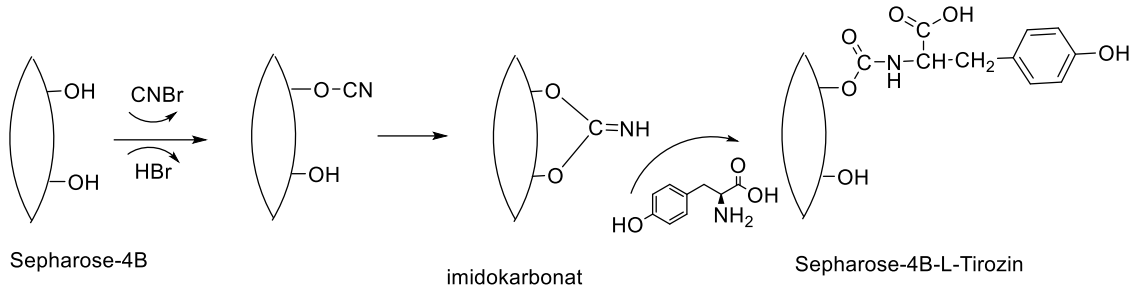
3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli hazırlarken CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanıldı. Bu kolon materyaline kovalent olarak L-Tirozin uzantı kolu bağlandı. Sepharose 4-B-L-Tirozin jel materyaline, ligand olarak sentezlediğimiz 3-Amino-5-metil benzohidrazid, 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-4-metil benzohidrazid, 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-5-bromo benzohidrazid ayrı ayrı diazollanarak tirozin'deki benzen halkasının 3 pozisyonuna kenetlendirildi. Hazırlanan afinite jellerinde Sepharose 4-B; matriksi, tirozin uzantı kolunu, inhibitörler ise enzimin spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır.

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

Aktifleştirilmiş Sepharose-4B ile CNBr, 300 mL soğuk su ile yıkandı ve 0,1 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 10) ile birlikte behere konuldu. 70 mg tirozin, 50 mL 0,1 M $NaHCO_3$ tamponda çözüldü ve bu çözelti Sepharose 4-B ile aynı behere aktarıldı ve reaksiyon başlatıldı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla 4°C' de 2 saat karıştırıldı sonra da 16 saat 4°C'de beklemeye alındı. Bu süre bittikten sonra jel, yıkama suyu ile 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkandı ve böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 300 mL 0,2 M $NaHCO_3$ (pH 8,8)

tamponu ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.4' te verilmiştir.

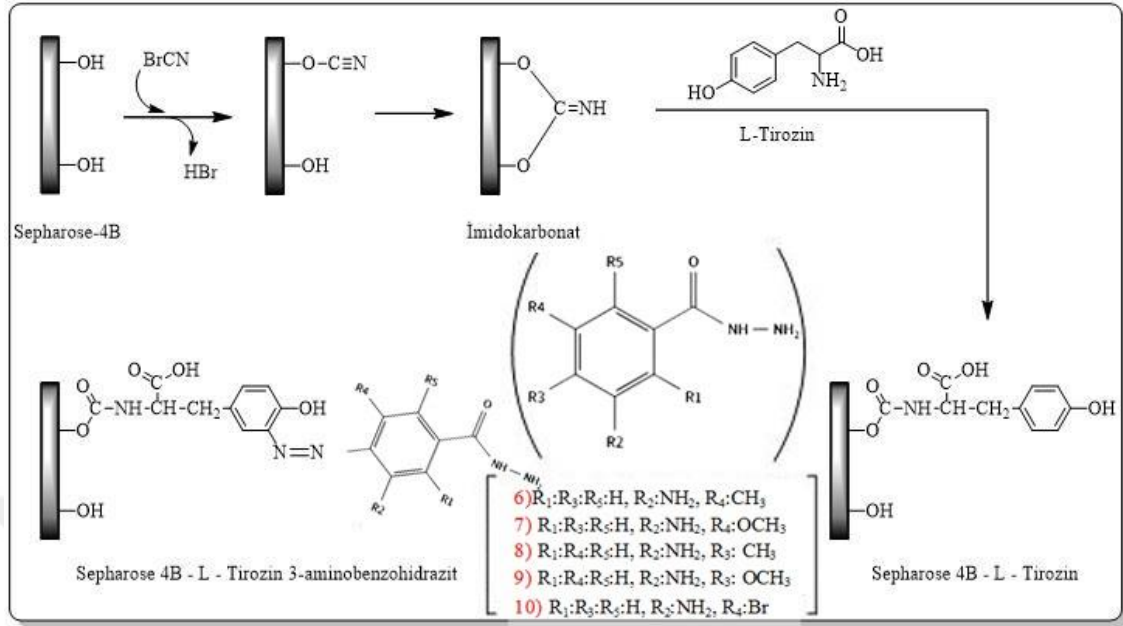


Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılma reaksiyonu

3.3.4.b. 3-Aminobenzohidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi

3-Amino benzohidrazid türevi olan 5 molekülün her birinden ayrı olarak farklı kaplara 100'er mmol alındı ve yakalşık 0°C'de 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü sonra aynı sıcaklıkta içerisinde 20 mg NaNO₂ bulunan 5 mL çözelti, inhibitör çözeltisine damla damla reaksiyon çözeltisine eklendi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1M NaOH ile pH 9,5' a çıkarılarak ve sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Sonra 1 L saf su ve 100 mL 10 mM KH₂PO₄ (pH 6,8) tamponuyla yıkaması yapıldı ve üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).

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



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

3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

Dengeleme tampon ve pH 6,8 olan KH₂PO₄'in içine önceden hazırlanmış olan jeller alınarak süspanse edildi. Su trombu ile vakum yapıp sistemin havası alındı. 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşmuş olan soğutmalı kolona süspanse edilen jel paketlenildi. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponu kullanılarak peristaltik pompa ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olmasını anlamak için 280 nm'de eluat ile tamponun absorbanlarının eşitlenmiş olmasına bakıldı.

3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Alabaş turp bitkisinin homojenatları, 10 mM fosfat (pH 6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolonlara ilave edildi. Kolonlar 25 mM fosfat (pH 6,8) 500 mL çözeltisi ile yıkandı. Bu şekilde Alabaş turp Peroksidaz enzimi kolona tutundu ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,8) tamponu ilave edilerek Alabaş turp Peroksidaz enzimi elüe edildi. 1,5' er mL halinde elüatlar tüplere alındı ve

280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa yardımıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Yeniden 1,5' er mL halinde elüatlar tüplere alındı. Köre karşı her bir elüatın 280 nm'deki absorbans değeri ölçüldü. Toplanmış olan elüatlardan absorbans gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 470 nm'de Alabaş turp Peroksidaz enziminin aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi

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

Elektroforez plakaları ilk önce su ile sonra da alkolle yıkandı. Her iki kenarında boşluk oluşturuca bir plaka ile düz bir plaka alt alta getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Plakalar sabitleştirildi ve sünger ihtiva eden, içerisinde sızdırmayı önleyen jel, hazırlama kabine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Ayırma jeli: 1 M Tris-HCl (pH 8,8) 20 mL, %30 akrilamid- %0,8 bisakrilamid 17,6 mL, %10 SDS, 0,52 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) 0,8 mL ve 12,52 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak %10'luk amonyum persülfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (PER) 0,8 mL ilave edildi.

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

Hazırlanan ayırma jeli, hava almayacak şekilde, plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar enjekte edildi.. Jelin donması için bir süre beklendi. Ayırma jelinin katılaşmasından hemen sonra hazırlanan yığma jeli, eklenecek olan tarağı üstten

gececek şekilde eklendi. Tarak üst tarafa yerleştirildi ve bir süre jelin kuruması için zaman ayrıldı. Tarak özenle çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankında görülen boşluklara işaretleme yapıldı ve daha sonra jelin üstü sırasıyla saf su ve yürütme tampon ile yıkaması yapıldı. Yürütme tampon elektroforez tankının iki tarafından da konuldu. Her birinde 10 µg protein olacak numuneler hazırlandı. Sıcak su banyosunda 3 dakika inkübe edildi. Numuneler soğutulduktan sonra, ince bir enjektör ile elektroforeze uygulaması yapıldı. Alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirilen tank, kapağı kapatılarak önce 30 dk akım 90 voltta sonra da 90 dk akım 130 voltta oda sıcaklığında yürütüldü ve akım kesilerek jel, dikkatli bir şekilde, cam plakalar arasından çıkarıldı.

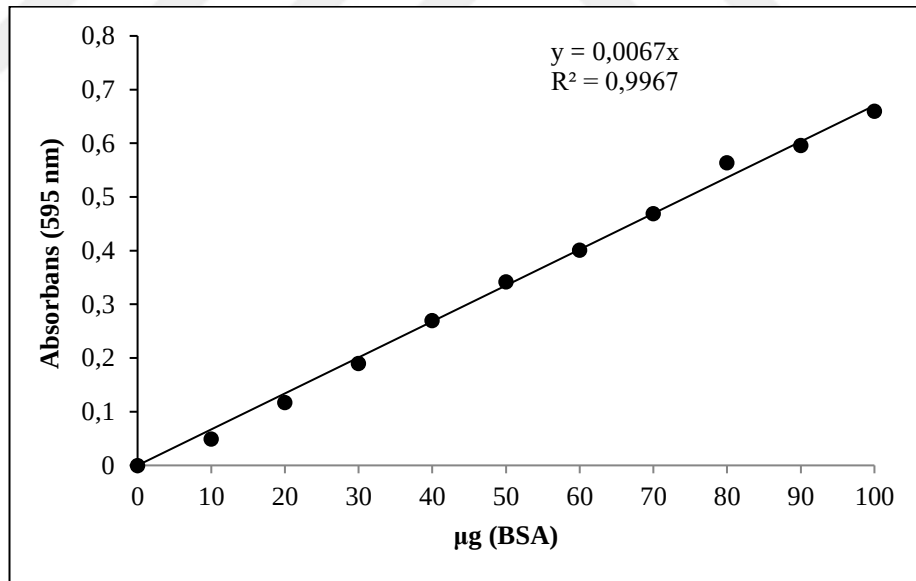
Cam jel, elektroforez bittikten sonra karıştırıcıda tespit çözeltisiyle 30 dakika kadar işlem gördü. Sonra redüksiyon çözeltisiyle birlikte 30 dakika karıştırıcıda bekletildi ve jel saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra karıştırıcının üstünde, önceden hazırlanıp karanlıkta bekletilen boya ile gümüş nitrat çözeltisi, 20 dakika kadar boyandı. Son olarak da banyo çözeltisiyle hemen yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görüldüğünde jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Alabaş Turpu Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

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



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

*Protein miktarı (BSA: Bovine Serum Albumini)

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

Bu çalışmada 3-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin alabaş turpu POD enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelemesi yapıldı. Sabit substrat konsantrasyonunda (45mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değeri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürü gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değeri bulundu ve Lineawear-Burk grafiğinden K_i değeri tespit edildi.

4.3. 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi

3-Amino-5-metil benzohidrazid, 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-4-metil benzohidrazid, 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid molekülleri ticari olarak alınamadığından bu bileşiklerin metil esterleri kullanılarak bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hidrazin sentezleri yapıldı. ^1H-NMR la moleküllerin karakterizasyonu doğrulandı.

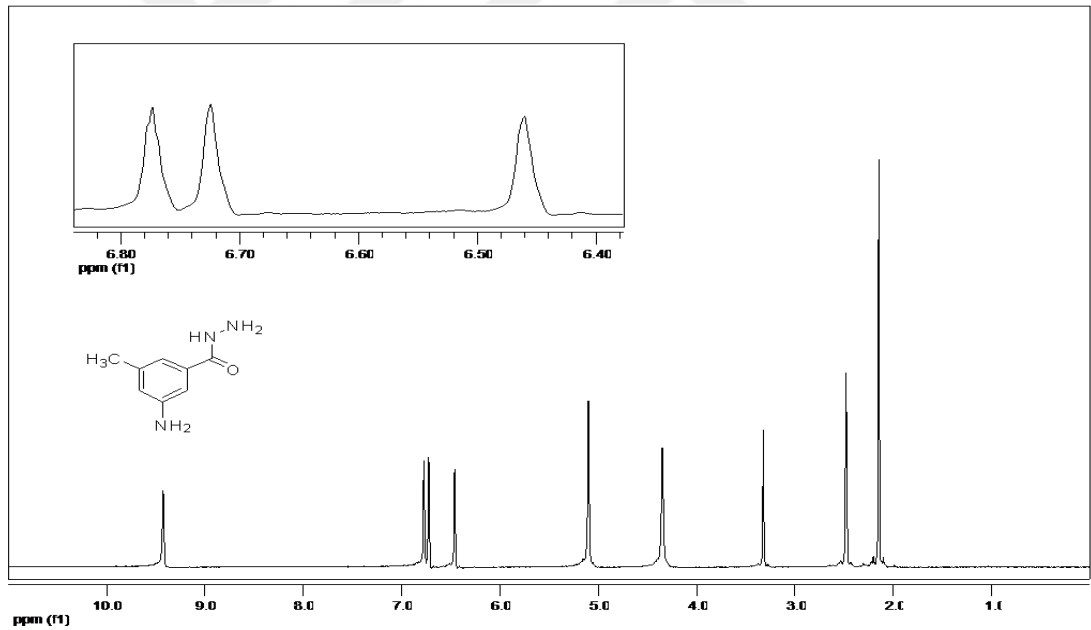
Çizelge 4.1. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentez sonuçları

Reaktant 1	Reaktant 2	R_1/R_2 mmol	Ürün	Süre (saat)	% Verim
3-Amino 5-metil metil benzoat	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 5-metil benzohidrazid	28	43
3-Amino 5- metoksi metil benzoat	Hidrazin monohidrat	3/12	5-Amino 5- metoksi benzohidrazid	36	55
3-Amino 4-metil metil benzoat	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 4-metil benzohidrazid	24	34
3-Amino 4-metoksi metil benzoat	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 4- metoksi benzohidrazid	32	42
3-Amino 5-bromo metil benzoat	Hidrazin monohidrat	3/12	3-Amino 5- bromo benzohidrazid	24	51

Satın aldığımız 3-Amino-5-metil metilbenzoat, 3-Amino-5-metoksi metilbenzoat, 3-Amino-4-metil metilbenzoat, 3-Amino-4-metoksi metilbenzoat ve 3-Amino-5-bromo metilbenzoat çıkış molekülleri olarak kullanılıp bunların hidrazin formları sentezlendi. Sonuçlar Çizelge 4.1’de ve sentezlenen moleküllerin ^1H -NMR (400 MHz) spektrumları Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’da gösterildi.

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

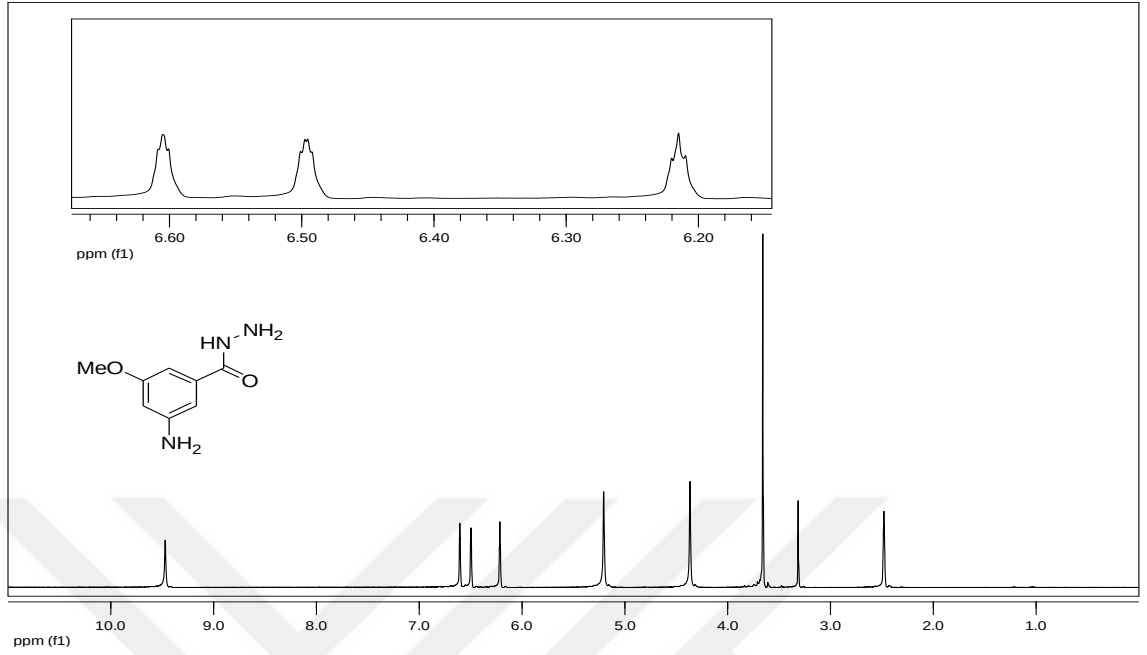
3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu sonuçları. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) ppm 9.43 (bs, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.10 (bs, 2H), 4.35 (bs, 2H), 2.15 (s, 3H)



Şekil 4.2. 3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

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

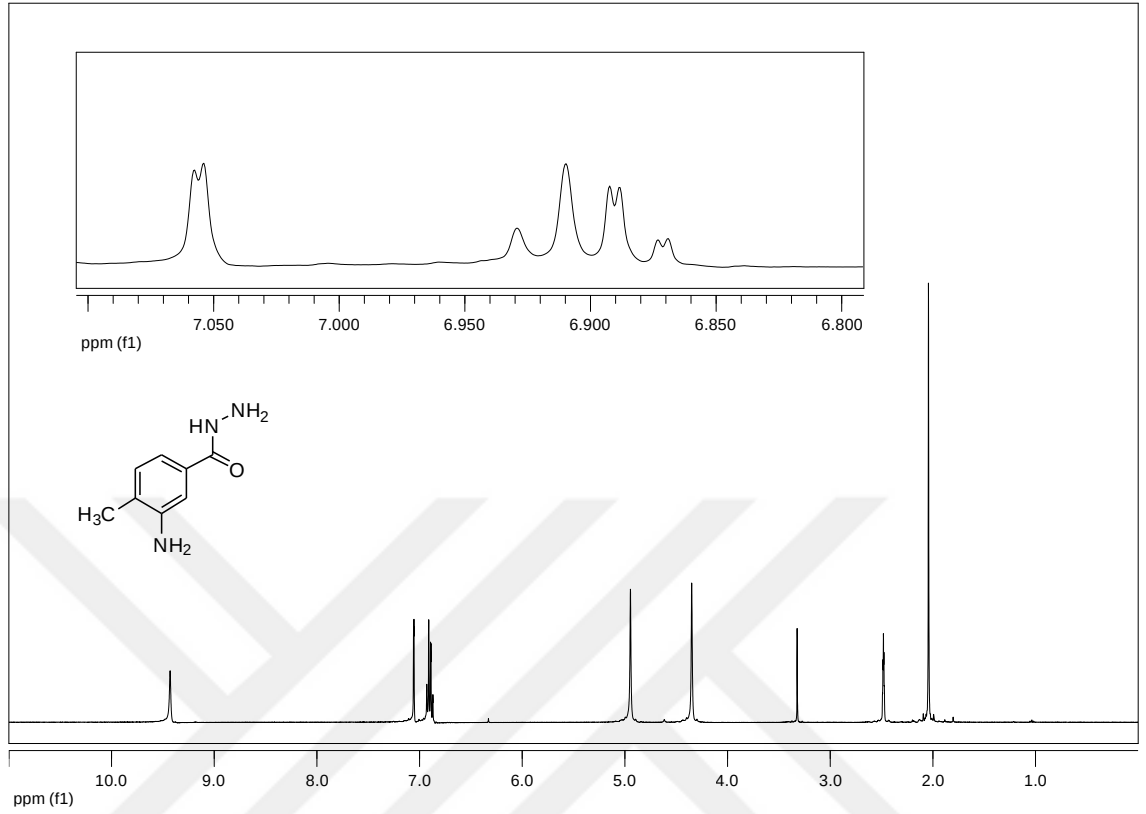
3-Amino-5-metoksi benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu sonuçları. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) ppm 9.47 (bs, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.21 (bs, 2H), 4.37 (bs, 2H), 3.66 (s, 3H)



Şekil 4.3. 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

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

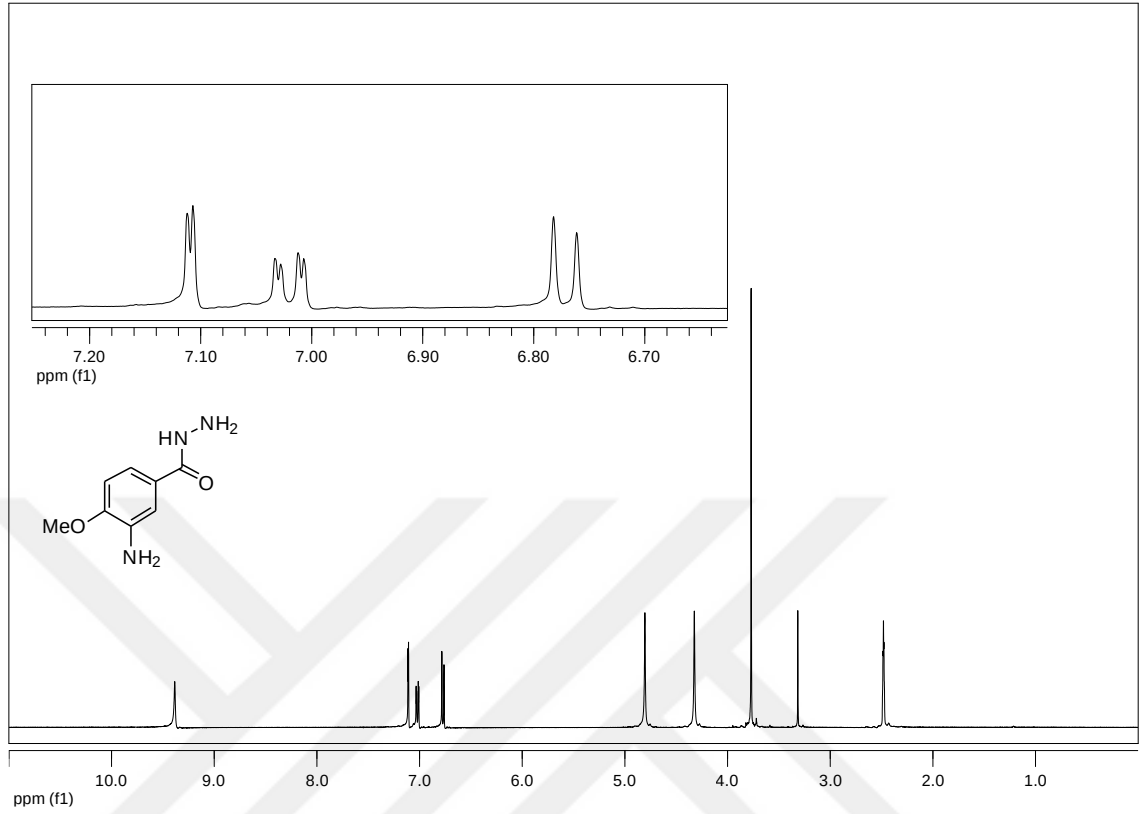
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 9.43 (bs, 1H), 7.06 (d, $J = 1.47$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 7.76$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J = 7.70, 1.58$ Hz, 1H), 4.95 (bs, 2H), 4.35 (bs, 2H), 2.04 (bs, 3H)



Şekil 4.4. 3-Amino-4-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

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

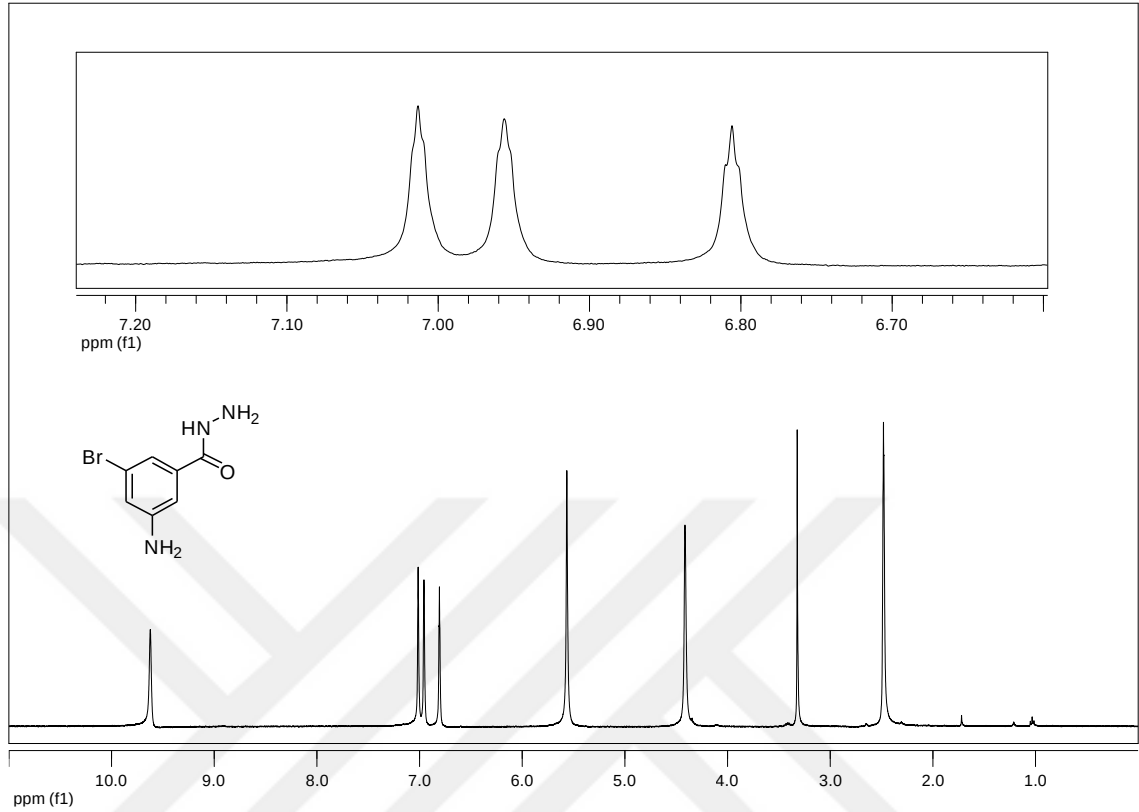
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ ppm 9.38 (bs, 1H), 7.11 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.80 (bs, 2H), 4.32 (bs, 2H), 3.77 (s, 3H)



Şekil 4.5. 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

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

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 9.62 (bs, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.56 (bs, 2H), 4.41 (bs, 2H)



Şekil 4.6. 3-Amino-5-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

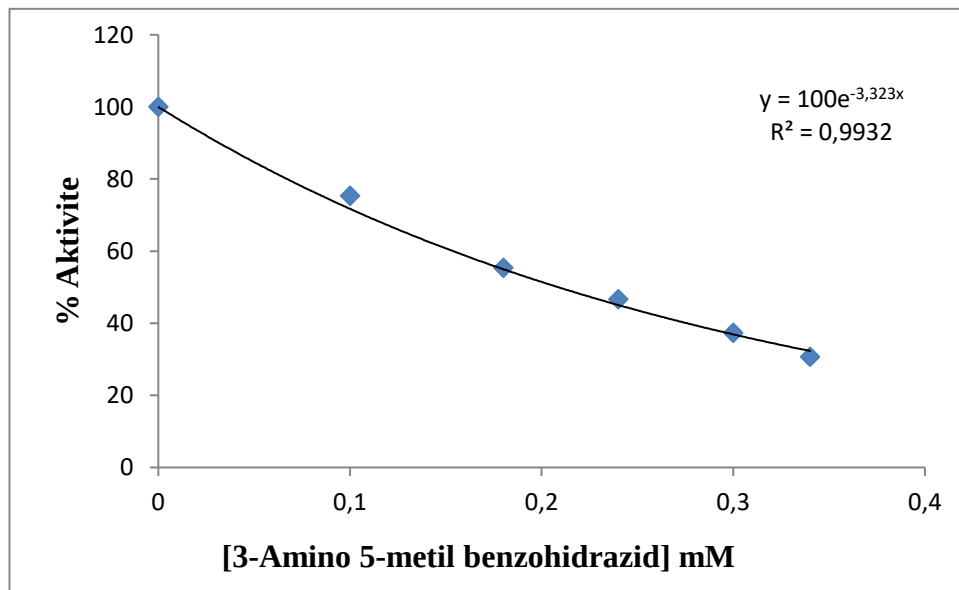
4.4. Sentezlenen 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada sentezlenen 3-Amino-5-metil benzohidrazid, 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-4-metil benzohidrazid, 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid ve 3-Amino-5-bromo benzohidrazid moleküllerinin Alabaş turpu POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelemesi yapıldı. Guaiakol substratı doygunluğun altında alındı ve reaksiyon hızı guaiakole bağlı olarak bulundu. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (45 mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değerleri belirlendi. K_i ve IC₅₀ deney prosedürleri gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu ve Lineawear-Burk grafiklerinden K_i değerleri tespit edildi.

4.4.1. 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.2. 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

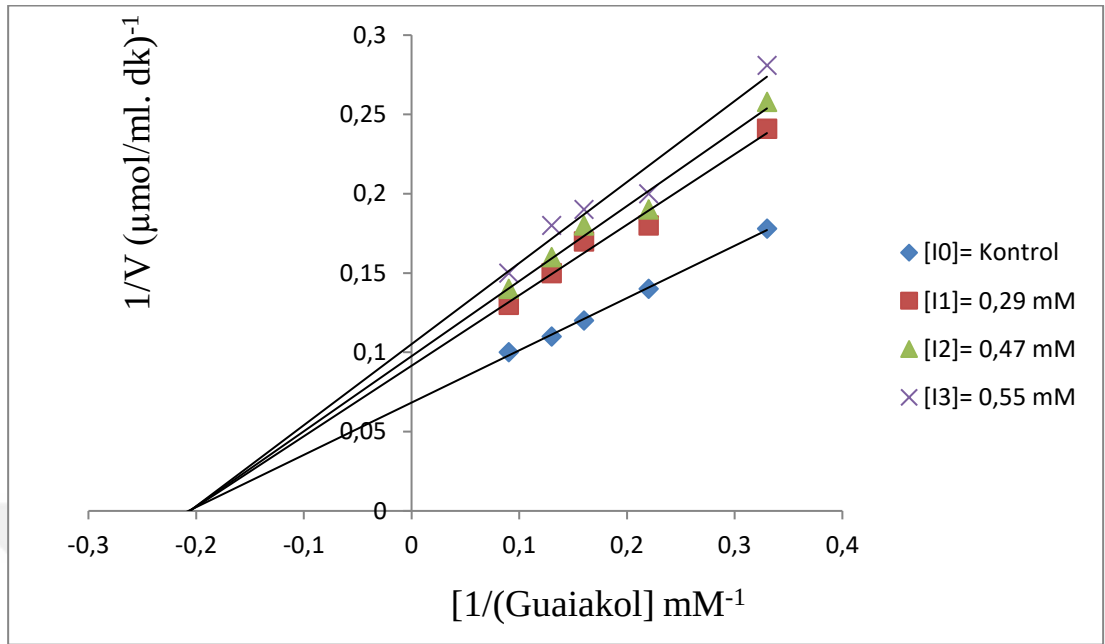
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 5-metil benzohidrazid	0,50	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,440	0,1	75,33
	0,50	1,0	1,0	0,09	0,410	0,5	1,0	1,0	0,09	0,01	0,400	0,18	55,33
	0,50	1,0	1,0	0,12	0,380	0,5	1,0	1,0	0,12	0,01	0,370	0,24	46,66
	0,50	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,340	0,3	37,33
	0,50	1,0	1,0	0,17	0,330	0,5	1,0	1,0	0,17	0,01	0,320	0,34	30,66



Şekil 4.7. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

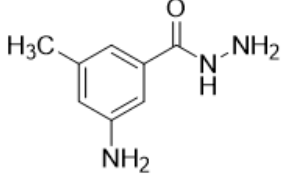
Çizelge 4.3. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
3-Amino 5-metil benzohidrazid	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (mmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,20	1,00	1,00	-	0,8	0,20	1,00	1,00	-	0,780	0,020	0,178	0,33
	0,30	1,00	1,00	-	0,7	0,30	1,00	1,00	-	0,680	0,020	0,14	0,22
	0,40	1,00	1,00	-	0,6	0,40	1,00	1,00	-	0,580	0,020	0,12	0,16
	0,50	1,00	1,00	-	0,5	0,50	1,00	1,00	-	0,480	0,020	0,11	0,13
	0,60	1,00	1,00	-	0,4	0,60	1,00	1,00	-	0,380	0,020	0,1	0,09
[I] ₁	0,20	1,00	1,00	0,05	0,740	0,20	1,00	1,00	0,05	0,730	0,020	0,241	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,05	0,640	0,30	1,00	1,00	0,05	0,630	0,020	0,18	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,05	0,540	0,40	1,00	1,00	0,05	0,530	0,020	0,17	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,05	0,440	0,50	1,00	1,00	0,05	0,430	0,020	0,15	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,05	0,340	0,60	1,00	1,00	0,05	0,330	0,020	0,13	0,09
[I] ₂	0,20	1,00	1,00	0,1	0,68	0,20	1,00	1,00	0,1	0,680	0,020	0,258	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,1	0,58	0,30	1,00	1,00	0,1	0,580	0,020	0,19	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,1	0,48	0,40	1,00	1,00	0,1	0,480	0,020	0,18	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,1	0,38	0,50	1,00	1,00	0,1	0,380	0,020	0,16	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,1	0,28	0,60	1,00	1,00	0,1	0,280	0,020	0,13	0,09
[I] ₃	0,20	1,00	1,00	0,15	0,62	0,20	1,00	1,00	0,15	0,630	0,020	0,281	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,15	0,52	0,30	1,00	1,00	0,15	0,530	0,020	0,2	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,15	0,42	0,40	1,00	1,00	0,15	0,430	0,020	0,19	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,15	0,32	0,50	1,00	1,00	0,15	0,330	0,020	0,18	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,15	0,22	0,60	1,00	1,00	0,15	0,210	0,020	0,15	0,09



Şekil 4.8. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

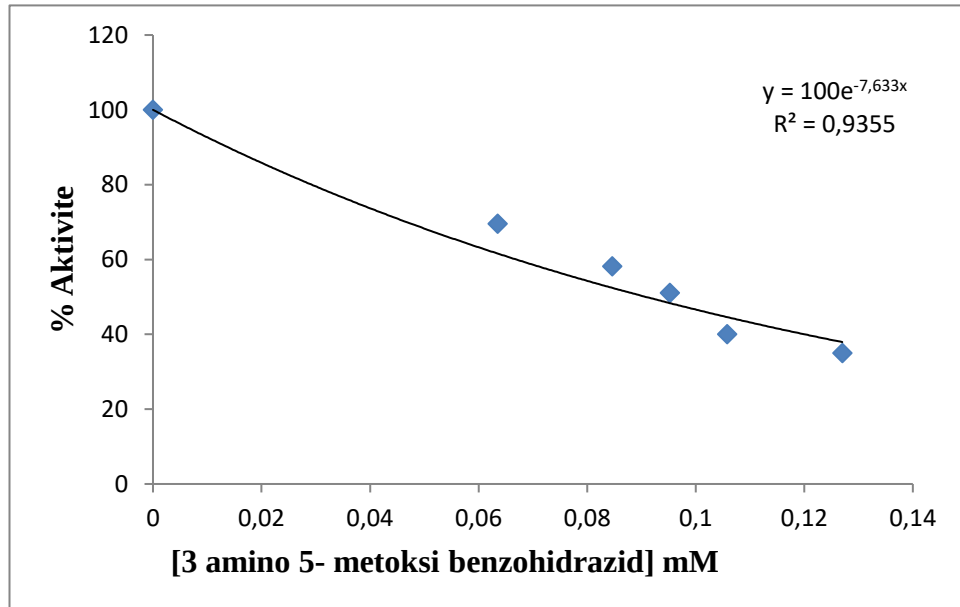
Çizelge 4.4. Alabaş turpu POD enzimi üzerine 3-Amino-5-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Alabaş turpu POD	IC_{50} (mM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (mM)	İnhibisyon tipi
		0,208	$0,436 \pm 0,133$	Yarışmasız

4.4.2. 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.5. 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

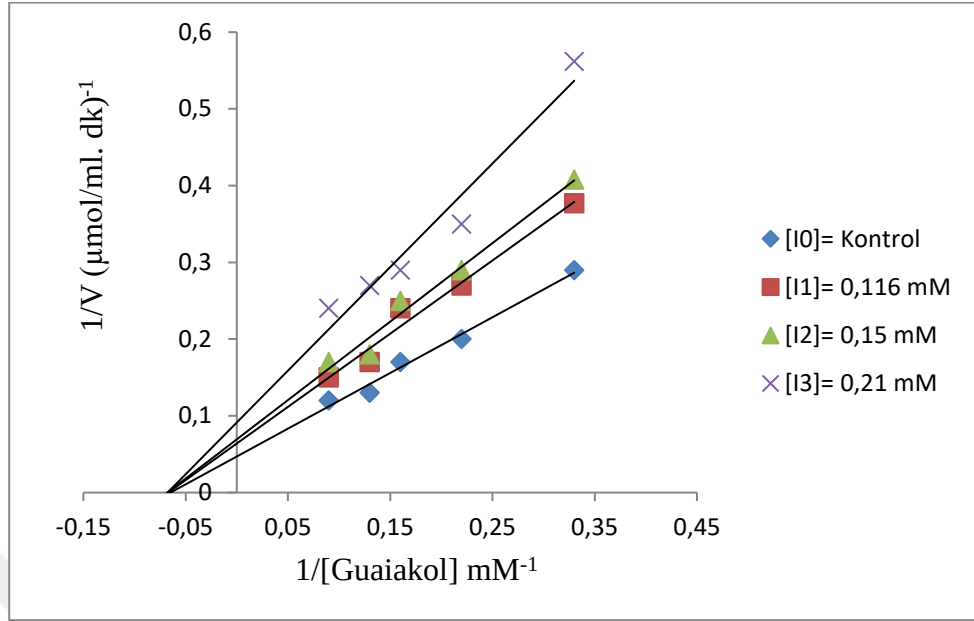
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 5-metoksi benzohidrazid	0,50	1,00	1,00	0,03	0,470	0,50	1,00	1,00	0,03	0,01	0,460	0,0635	69,56
	0,50	1,00	1,00	0,04	0,460	0,50	1,00	1,00	0,04	0,01	0,450	0,0846	58,15
	0,50	1,00	1,00	0,045	0,455	0,50	1,00	1,00	0,045	0,01	0,445	0,0952	51,08
	0,50	1,00	1,00	0,05	0,450	0,50	1,00	1,00	0,05	0,01	0,440	0,1058	40
	0,50	1,00	1,00	0,06	0,440	0,50	1,00	1,00	0,06	0,01	0,430	0,127	35



Şekil 4.9. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.6. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

3-Amino 5-metoks benzohidrazid	Kör Tüpü					Numune Tüpü						$1/V$ (mmol/ mL. min) ⁻¹	$1/S$ mM ⁻¹
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
	0,20	1,00	1,00	-	0,8	0,20	1,00	1,00	-	0,790	0,010	0,29	0,33
	0,30	1,00	1,00	-	0,7	0,30	1,00	1,00	-	0,690	0,010	0,2	0,22
[I] ₀	0,40	1,00	1,00	-	0,6	0,40	1,00	1,00	-	0,590	0,010	0,17	0,16
	0,50	1,00	1,00	-	0,5	0,50	1,00	1,00	-	0,490	0,010	0,13	0,13
	0,60	1,00	1,00	-	0,4	0,60	1,00	1,00	-	0,390	0,010	0,12	0,09
[I] ₁	0,20	1,00	1,00	0,02	0,78	0,20	1,00	1,00	0,02	0,770	0,010	0,377	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,02	0,68	0,30	1,00	1,00	0,02	0,670	0,010	0,27	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,02	0,58	0,40	1,00	1,00	0,02	0,570	0,010	0,24	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,02	0,48	0,50	1,00	1,00	0,02	0,470	0,010	0,17	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,02	0,38	0,60	1,00	1,00	0,02	0,370	0,010	0,15	0,09
[I] ₂	0,20	1,00	1,00	0,045	0,755	0,20	1,00	1,00	0,045	0,745	0,010	0,408	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,045	0,655	0,30	1,00	1,00	0,045	0,645	0,010	0,29	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,045	0,555	0,40	1,00	1,00	0,045	0,545	0,010	0,25	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,045	0,455	0,50	1,00	1,00	0,045	0,445	0,010	0,18	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,045	0,355	0,60	1,00	1,00	0,045	0,345	0,010	0,17	0,09
	0,20	1,00	1,00	0,07	0,73	0,20	1,00	1,00	0,07	0,720	0,010	0,562	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,07	0,63	0,30	1,00	1,00	0,07	0,620	0,010	0,35	0,22
[I] ₃	0,40	1,00	1,00	0,07	0,53	0,40	1,00	1,00	0,07	0,520	0,010	0,29	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,07	0,43	0,50	1,00	1,00	0,07	0,420	0,010	0,27	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,07	0,33	0,60	1,00	1,00	0,07	0,320	0,010	0,24	0,09



Şekil 4.10. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

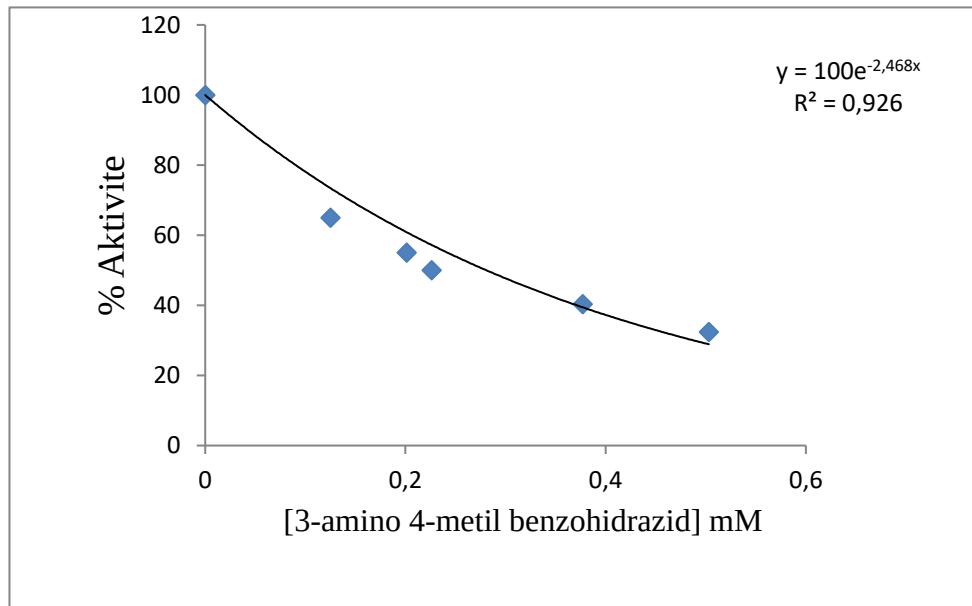
Çizelge 4.7. Alabaş turpu POD enzimini üzerine 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

<chem>COc1ccc(NC(=O)N)cc1N</chem>	Alabaş turpu POD	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i ± SD (mM)	İnhibisyon tipi
		0,208	0,159 ± 0,0473	Yarışmasız

4.4.3. 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.8. 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

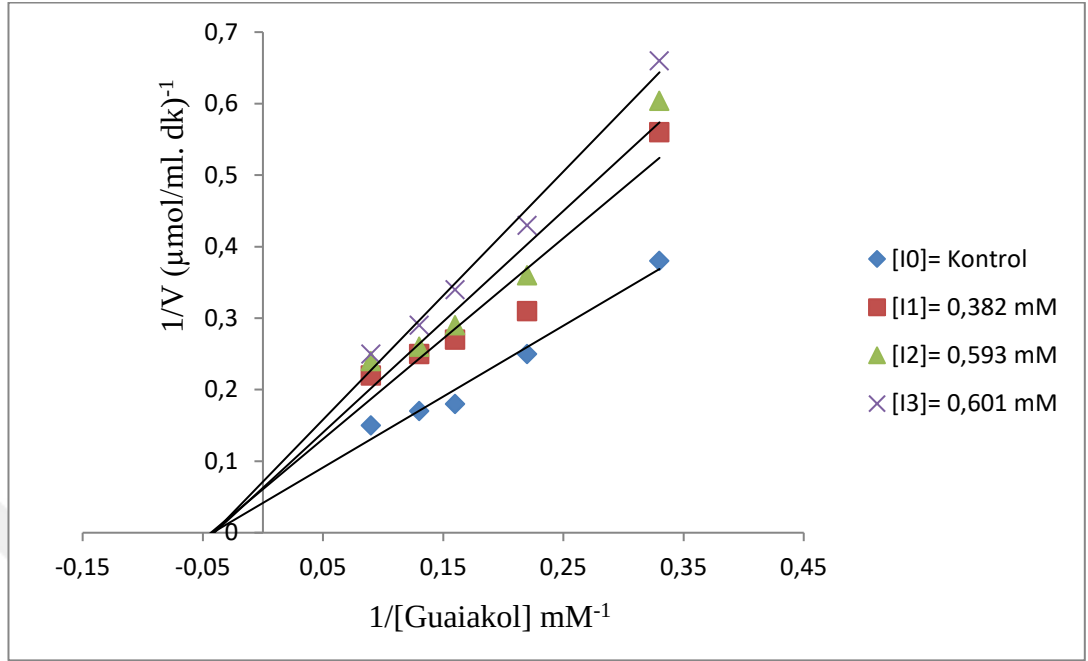
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	inhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 4-metil benzohidrazid	0,50	1,00	1,00	0,05	0,450	0,50	1,00	1,00	0,05	0,01	0,440	0,125	65
	0,50	1,00	1,00	0,08	0,420	0,50	1,00	1,00	0,08	0,01	0,410	0,201	55,11
	0,50	1,00	1,00	0,09	0,410	0,50	1,00	1,00	0,09	0,01	0,400	0,226	50
	0,50	1,00	1,00	0,15	0,350	0,50	1,00	1,00	0,15	0,01	0,340	0,377	40,34
	0,50	1,00	1,00	0,20	0,300	0,50	1,00	1,00	0,20	0,01	0,290	0,503	32,38



Şekil 4.11. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

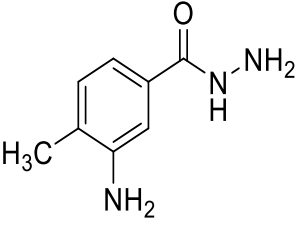
Çizelge 4.9. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
3-Amino 4-metil benzohidrazid	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (mmol/ mL min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
	0,20	1,00	1,00	-	0,8	0,20	1,00	1,00	-	0,79	0,01	0,38	0,33
	0,30	1,00	1,00	-	0,7	0,30	1,00	1,00	-	0,69	0,01	0,25	0,22
[I] ₀	0,40	1,00	1,00	-	0,6	0,40	1,00	1,00	-	0,59	0,01	0,18	0,16
	0,50	1,00	1,00	-	0,5	0,50	1,00	1,00	-	0,49	0,01	0,17	0,13
	0,60	1,00	1,00	-	0,4	0,60	1,00	1,00	-	0,39	0,01	0,15	0,09
[I] ₁	0,20	1,00	1,00	0,07	0,730	0,20	1,00	1,00	0,07	0,720	0,01	0,56	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,07	0,630	0,30	1,00	1,00	0,07	0,620	0,01	0,31	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,07	0,530	0,40	1,00	1,00	0,07	0,520	0,01	0,27	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,07	0,430	0,50	1,00	1,00	0,07	0,420	0,01	0,25	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,07	0,330	0,60	1,00	1,00	0,07	0,320	0,01	0,22	0,09
[I] ₂	0,20	1,00	1,00	0,12	0,680	0,20	1,00	1,00	0,12	0,670	0,01	0,604	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,12	0,580	0,30	1,00	1,00	0,12	0,570	0,01	0,36	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,12	0,480	0,40	1,00	1,00	0,12	0,470	0,01	0,29	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,12	0,380	0,50	1,00	1,00	0,12	0,370	0,01	0,26	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,12	0,280	0,60	1,00	1,00	0,12	0,270	0,01	0,24	0,09
	0,20	1,00	1,00	0,17	0,630	0,20	1,00	1,00	0,17	0,620	0,01	0,66	0,33
[I] ₃	0,30	1,00	1,00	0,17	0,530	0,30	1,00	1,00	0,17	0,520	0,01	0,43	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,17	0,3430	0,40	1,00	1,00	0,17	0,420	0,01	0,34	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,17	0,330	0,50	1,00	1,00	0,17	0,320	0,01	0,29	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,17	0,230	0,60	1,00	1,00	0,17	0,220	0,01	0,25	0,09



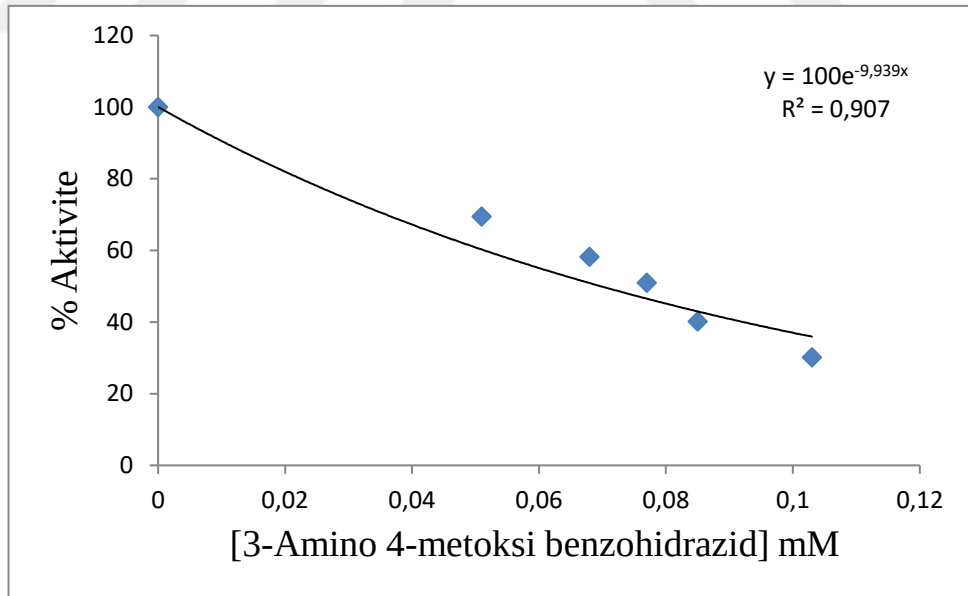
Şekil 4.12. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.10. Alabaş turpu POD enzimini üzerine 3-Amino-4-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Alabaş turpu POD	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i ± SD (mM)	Inhibisyon tipi
		0,281	0.525 ± 0,124	Yarışmasız

Çizelge 4.11. 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

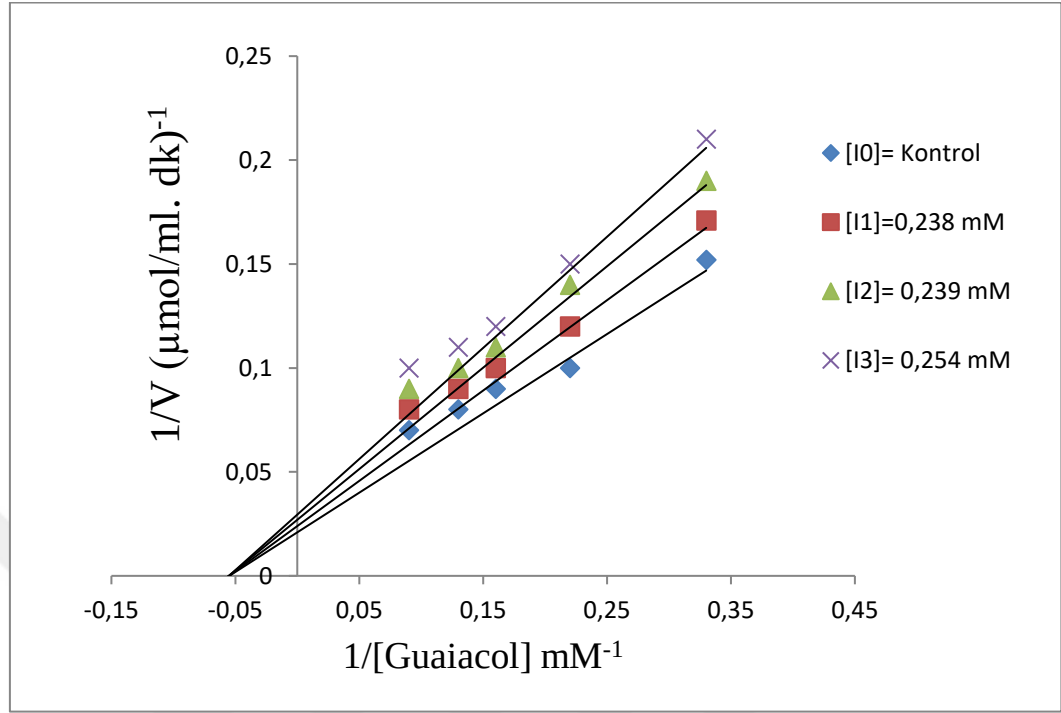
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 4-metoksi benzohidrazid	0,50	1,00	1,00	0,05	0,450	0,50	1,00	1,00	0,03	0,020	0,450	0,051	69,5
	0,50	1,00	1,00	0,07	0,430	0,50	1,00	1,00	0,04	0,020	0,440	0,068	58,2
	0,50	1,00	1,00	0,08	0,420	0,50	1,00	1,00	0,045	0,020	0,435	0,077	51
	0,50	1,00	1,00	0,10	0,400	0,50	1,00	1,00	0,05	0,020	0,430	0,085	40,2
	0,50	1,00	1,00	0,12	0,380	0,50	1,00	1,00	0,06	0,020	0,420	0,103	30,2



Şekil 4.13. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4metoksi benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

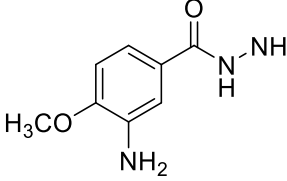
Çizelge 4.12. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü						$1/V$ (mmol/ mL min) ⁻¹	$1/S$ mM ⁻¹
3-Amino-4-metoksi benzohidrazid	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
	0,20	1,00	1,00	-	0,8	0,20	1,00	1,00	-	0,780	0,020	0,152	0,33
	0,30	1,00	1,00	-	0,7	0,30	1,00	1,00	-	0,680	0,020	0,1	0,22
[I] ₀	0,40	1,00	1,00	-	0,6	0,40	1,00	1,00	-	0,580	0,020	0,09	0,16
	0,50	1,00	1,00	-	0,5	0,50	1,00	1,00	-	0,480	0,020	0,08	0,13
	0,60	1,00	1,00	-	0,4	0,60	1,00	1,00	-	0,380	0,020	0,07	0,09
[I] ₁	0,20	1,00	1,00	0,02	0,780	0,20	1,00	1,00	0,02	0,760	0,020	0,171	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,02	0,680	0,30	1,00	1,00	0,02	0,660	0,020	0,12	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,02	0,580	0,40	1,00	1,00	0,02	0,560	0,020	0,1	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,02	0,480	0,50	1,00	1,00	0,02	0,460	0,020	0,09	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,02	0,380	0,60	1,00	1,00	0,02	0,360	0,020	0,08	0,09
[I] ₂	0,20	1,00	1,00	0,04	0,760	0,20	1,00	1,00	0,04	0,740	0,020	0,19	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,04	0,660	0,30	1,00	1,00	0,04	0,640	0,020	0,14	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,04	0,560	0,40	1,00	1,00	0,04	0,540	0,020	0,11	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,04	0,460	0,50	1,00	1,00	0,04	0,440	0,020	0,1	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,04	0,360	0,60	1,00	1,00	0,04	0,340	0,020	0,09	0,09
[I] ₃	0,20	1,00	1,00	0,06	0,740	0,20	1,00	1,00	0,06	0,720	0,020	0,21	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,06	0,640	0,30	1,00	1,00	0,06	0,620	0,020	0,15	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,06	0,540	0,40	1,00	1,00	0,06	0,520	0,020	0,12	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,06	0,440	0,50	1,00	1,00	0,06	0,420	0,020	0,11	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,06	0,340	0,60	1,00	1,00	0,06	0,320	0,020	0,1	0,09



Şekil 4.14. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino-4-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

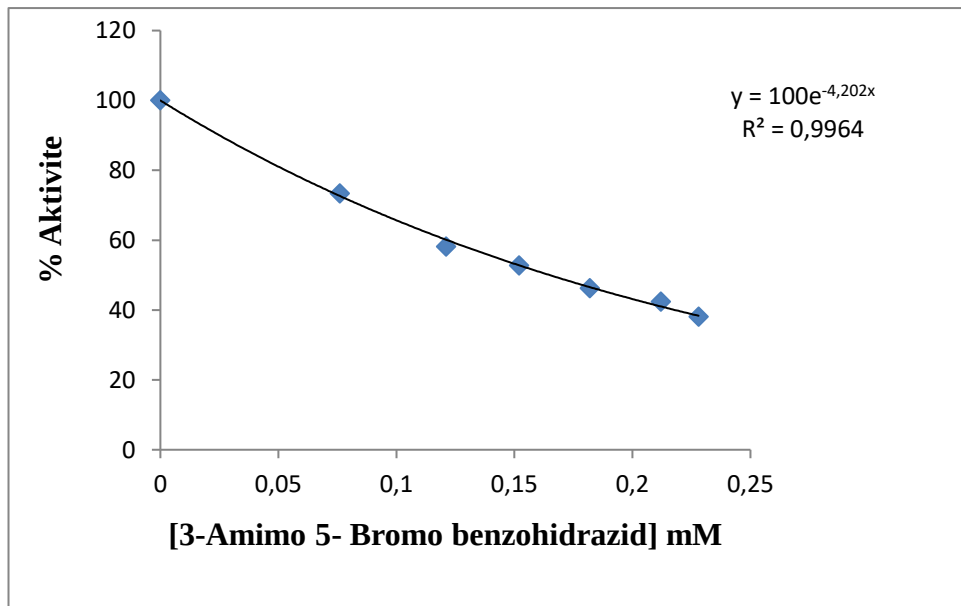
Çizelge 4.13. Alabaş turpu POD enzimi üzerine 3-Amino 4-metoksi benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Alabaş turpu POD	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i ± SD (mM)	Inhibisyon tipi
		0,069	0,243 ± 0,008	Yarışmasız

4.4.4. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.14. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

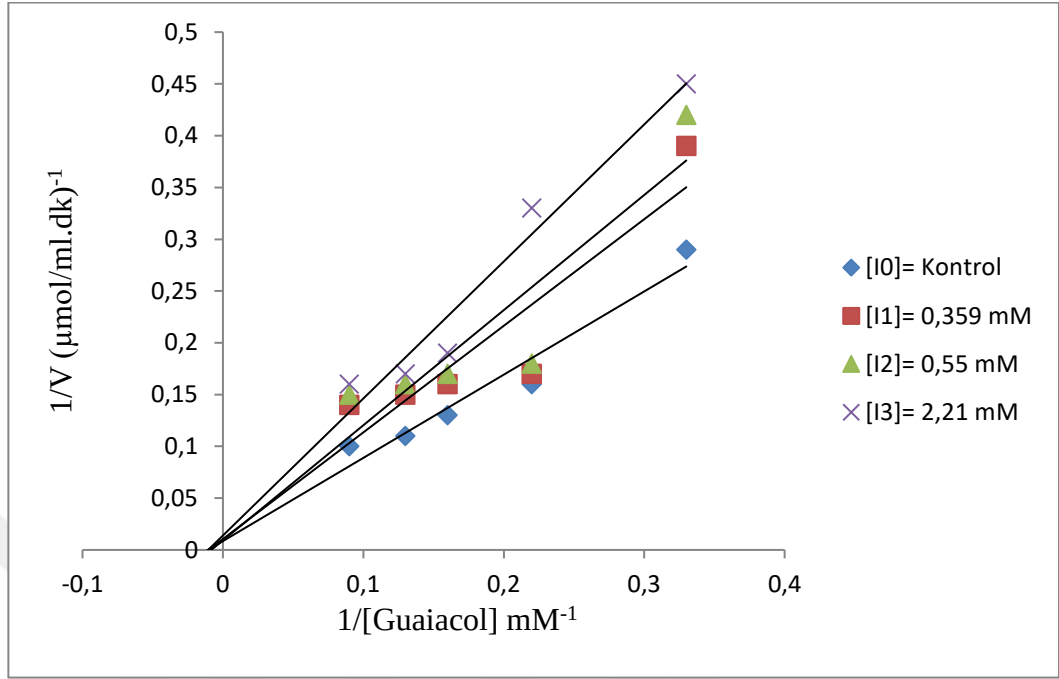
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)	Su (mL)	[I] mM	%Aktivite
3-amino 5-bromo benzohidrazid	0,50	1,00	1,00	0,050	0,450	0,50	1,00	1,00	0,050	0,030	0,420	0,076	73,36
	0,50	1,00	1,00	0,080	0,420	0,50	1,00	1,00	0,080	0,030	0,390	0,121	58,15
	0,50	1,00	1,00	0,100	0,400	0,50	1,00	1,00	0,100	0,030	0,370	0,152	52,71
	0,50	1,00	1,00	0,120	0,380	0,50	1,00	1,00	0,120	0,030	0,350	0,182	46,19
	0,50	1,00	1,00	0,140	0,360	0,50	1,00	1,00	0,140	0,030	0,330	0,212	42,39
	0,50	1,00	1,00	0,150	0,350	0,50	1,00	1,00	0,150	0,030	0,320	0,228	38,04



Şekil 4.15. Alabaş turpu POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

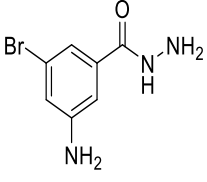
Çizelge 4.15. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpi						Numune Tüpi							
3-Amino 5-bromo benzohidrazid	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitor (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (mmol/ mL min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
	0,20	1,00	1,00	-	0,8	0,20	1,00	1,00	-	0,790	0,010	0,29	0,33
	0,30	1,00	1,00	-	0,7	0,30	1,00	1,00	-	0,690	0,010	0,16	0,22
[I] ₀	0,40	1,00	1,00	-	0,6	0,40	1,00	1,00	-	0,590	0,010	0,13	0,16
	0,50	1,00	1,00	-	0,5	0,50	1,00	1,00	-	0,490	0,010	0,11	0,13
	0,60	1,00	1,00	-	0,4	0,60	1,00	1,00	-	0,390	0,010	0,10	0,09
[I] ₁	0,20	1,00	1,00	0,09	0,710	0,20	1,00	1,00	0,09	0,700	0,010	0,39	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,09	0,610	0,30	1,00	1,00	0,09	0,600	0,010	0,17	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,09	0,510	0,40	1,00	1,00	0,09	0,500	0,010	0,16	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,09	0,410	0,50	1,00	1,00	0,09	0,400	0,010	0,15	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,09	0,310	0,60	1,00	1,00	0,09	0,300	0,010	0,14	0,09
[I] ₂	0,20	1,00	1,00	0,12	0,680	0,20	1,00	1,00	0,12	0,670	0,010	0,42	0,33
	0,30	1,00	1,00	0,12	0,580	0,30	1,00	1,00	0,12	0,570	0,010	0,18	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,12	0,480	0,40	1,00	1,00	0,12	0,470	0,010	0,17	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,12	0,380	0,50	1,00	1,00	0,12	0,370	0,010	0,16	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,12	0,280	0,60	1,00	1,00	0,12	0,270	0,010	0,15	0,09
	0,20	1,00	1,00	0,15	0,650	0,20	1,00	1,00	0,15	0,640	0,010	0,45	0,33
[I] ₃	0,30	1,00	1,00	0,15	0,550	0,30	1,00	1,00	0,15	0,540	0,010	0,33	0,22
	0,40	1,00	1,00	0,15	0,450	0,40	1,00	1,00	0,15	0,440	0,010	0,19	0,16
	0,50	1,00	1,00	0,15	0,350	0,50	1,00	1,00	0,15	0,340	0,010	0,17	0,13
	0,60	1,00	1,00	0,15	0,250	0,60	1,00	1,00	0,15	0,240	0,010	0,16	0,09

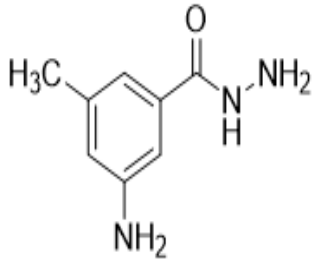
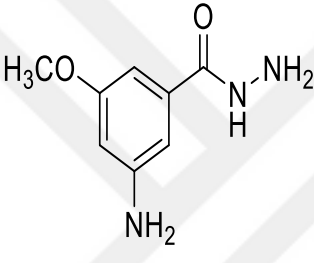
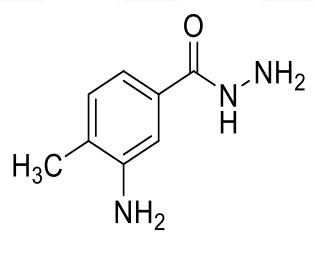
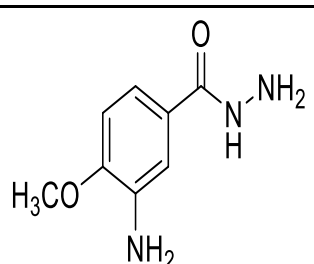
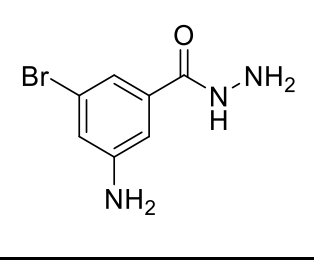


Şekil 4.16. Alabaş turpu POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.16. Alabaş turpu POD enzimini üzerine 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

	Alabaş turpu POD	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i ± S.D (mM)	İnhibisyon tipi
		0,165	0,706 ± 0,446	Yarışmasız

Çizelge 4.17. Alabaş turpu POD enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
	0,208	0,436 ± 0,133	Yarışmasız
	0,208	0,159 ± 0,0473	Yarışmasız
	0,281	0,525 ± 0,124	Yarışmasız
	0,069	0,243 ± 0,008	Yarışmasız
	0,165	0,706 ± 0,446	Yarışmasız

Alabaş turpu POD Enzimlerinin 3-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

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

Çizelge 4.18. Afinite kolonlarından elde edilen Alabaş turpu POD enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

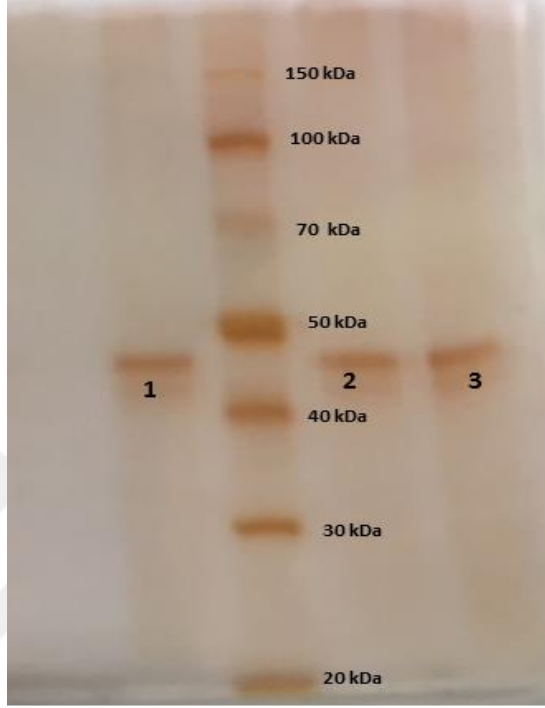
Alabaş turpu POD		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
3-Amino -5metil benzohidrazid	Homojenat	6	35,3	1,24	211,8	7,44	28,46	100	1
	Sepharose 4B Afinite	1,5	40,72	0,0012	61,08	0,0018	33933,3	28,8	1192,3
3-Amino 5-metoksi benzohidrazid	Homojenat	6	34,3	1,24	205,8	7,44	27,66	100	1
	Sepharose 4B Afinite	3	46,94	0,0016	140,82	0,0048	29337,5	68,4	1060,6
3-Amino 4-metil benzohidrazid	Homojenat	6	39,26	1,24	235,5	7,44	31,66	100	1
	Sepharose 4B Afinite	1,5	37,8	0,0011	56,7	0,00165	34363,6	24,07	1085,3
3-Amino 4-metoksi benzohidrazid	Homojenat	6	46,7	1,24	280,2	7,4	37,6	100	1
	Sepharose 4B Afinite	6	21,8	0,0017	130,8	0,0102	12823,5	46,9	341,1
3-Amino 5- bromo benzohidrazid	Homojenat	6	60	1,24	360	7,4	48,4	100	1
	Sepharose 4B Afinite	3	38,4	0,0013	115,2	0,0039	29538,5	32	610,3

4.5. Alabaş Peroksidaz Enzimi Üzerine SDS-PAGE ve Kinetik Çalışma Sonuçları

4.5.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Sentezlediğimiz molekülleri kullanarak hazırladığımız Sepharose 4-B-L-Tirozin-afinite jellerinden saflaştırdığımız Alabaş turpu POD enziminin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Jellerin boyanmasında gümüş boyama

metodu daha hassas olduğu için tercih edildi. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE fotoğrafları Şekil 4.18’de gösterildi.



Şekil 4.17. Alabaş turpu POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafi
(1) 3-Amino-5-metil benzohidrazid, (2) 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, (3) 3-Amino-4-metil benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan Alabaş turpu POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidaz (POD) enzimi prostetik grup olup hem de grubu içeren bir glikoprotein olup bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur (Rompel *et al.* 2007). Peroksidazlar farklı aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak, metabolizma esnasında ortaya çıkan H_2O_2 'yi etkisiz hale getirmektedirler (Robert *et al.* 1993).

POD organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonunda kullanılmaktadır (Adam *et al.* 1999; Zilbeyaz *et al.* 2012).

Peroksidaz enzim ailesinin küçük bir bölümünü bitkisel peroksidazlar (POD) oluşturur (Fry 1986). Peroksidaz enziminin, bitkilerde hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) ve lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi hayati fonksiyonlarda çok önemli görevler aldığı bilinmektedir.

Organizmalarda oldukça yayılımı fazla olan peroksidazlar, bayır turpu kökü, karaturp, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı vs. hücrelerinden saflaştırılmış (Miranda *et al.* 2002) olup bu da peroksidazların farklı kaynaklardan izole edildiğinin göstergesidir. Aynı zamanda da çok geniş bir uygulama alanı bulunan ve ticari olarak da önemi artan bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasının çalışmaları her geçen gün fazlalaşıyor.

Araştırmacıların temel hedeflerinden biri de enzimlerin afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta ve yüksek saflıkta saflaştırılmasıdır. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak bağlanan liganda spesifik ve tersinir bir şekilde tutunur ve seçimli bir biçimde liganttan ayrılır.

Peroksidaz inhibitörleri olarak bilinen hidrazidler, farklı hidrazin ve hidrazin türevleri, hidralazin (tansiyon düşürücü), izoniazid [INH (izonikotinik hidrazit) tüberküloz antibiyotik], iproniazid (sakinleştirici), mebanazine, izokarboksazid, fenelzin (monoamin oksidaz inhibitörleri), ve PHZ (fenilhidrazin; polisitemi kontrolü), terapötik olarak kullanılmıştır. Ama bu bileşiklerin çoğu uzun süre kullanıldığında baz-çifti mutasyonları, karaciğer hasarı, hemolizise gibi etkilere yol açtığından ilaç olarak kullanılmamaktadır. Hidrazinler ve hidrazid inhibitörleri metabolik olarak aktive edilir. Enzimatik reaksiyondan sonra, aktive edilen inhibitörler aynı enzime ya da farklı bir biyomoleküle; ya yeniden bağlanır ya da aktif bölgeden serbest bırakılır bu da inaktivasyona yol açar. Hem bağlanma afinitesi hem de aktif inhibitörün reaktivitesine göre özgülük değişir. HRP C, PHZ tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir ama PHZ süperoksit üretimi için pH 7,0' da oto-oksidasyona maruz kaldığından, terapötik bir madde olarak uygun değildir. Bunun tersine, INH'ın oto-oksidasyonu pH 7,0' da daha az bir hızda gerçekleşir. Mycobacterium tuberculosis/katalaz peroksidaz ile aktivasyondan sonra aktive INH bir inhibitörünün oluşturulması için, enoil redüktazın kofaktörü ile reaksiyona girer. Tüberküloz tedavisi için dünya çapında önde gelen INH ilacının alerjik ve otoimmün sendromlar içeren ciddi yan etkileri vardır. INH için görülen bu yan etkiler, ilaç olarak metabolik olarak aktif hidrazitlerin kullanılması ile ortaya çıkan problemlerin görünmesine de olanak sağlamaktadır (Aitken *et al.* 2003).

Peroksidazlara inhibitör olma potansiyelleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Kalın *et al.* 2014). Çalışmaların sonuçlarında görüldüğü üzere dönüşümlü inhibitör olma potansiyelleri üzerine POD enzimlerinin saflaştırılmasında kullanılma potansiyelleri vardır. POD saflaştırma çalışmaları ile ilgili birçok yöntem literatürde gösterilmiştir. Başarılı bir saflaştırma düşünüldüğünde ise öncelikle matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalı ve safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir metod bulunması gerekmektedir. Bu metodların kullanıldığı birçok çalışma vardır. Bu çalışmalara örnek olarak brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), kara lâhanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), Leucaena leucocephala ağacı meyvesinden,

papayadan (Pandey and Dwivedi 2011; Pandey *et al.* 2012), kırmızı pancardan (Rudrappa *et al.* 2007), örnek verilebilir.

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

Afinite kromatografisinde ligand olarak PABH kullanılarak POD enzimi şalgamdan %9 verimle 269,13 kat (Kalin *et al.* 2014), karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat, kırmızı lahanadan ise 120 kat %2,9 verimle (Somtürk *et al.* 2014) saflaştırılması yapılmıştır. Çalışmalarda özellikle bitkilerin çiçek ve saplarında, yaralanan gövdelerinde, hücre duvarı, ribozom, yapraklarında, nucleus ve hücre membranlarında bulunan POD enziminin afinite kromatografi metoduyla saflaştırılmasından elde edilmiştir. POD enziminin saflaştırılmasında kullanılan farklı yöntemler, afinite kromatografisine göre zaman ve maliyet açısından daha fazladır (Özdemir *et al.* 2001).

Saflaştırma işlemlerinde çok önemli bir yere sahip olan afinite kromatografisi, çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları ortadan kaldırır ve enzimi yüksek bir verimle izole eder.

Bu tez çalışmasında amaç ise saflaştırma çalışmalarını daha ileri götürüp verimi artırmaya katkı sağlamaktır.

Labaratuar grubumuzca daha önce çalışılan 4-Amino benzohidrazidin ligand olarak kullanıldığı karaturp ve şalgam bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışması esas alınarak (Kalin *et al.* 2014), Alabaş turpu bitkisinden POD enziminin saflaştırılması için afinite jeli hazırlandı. Ligand olarak 3-amino benzohidrazid türevi moleküllerin bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan enzimlerin kinetik özellikleri,

kullanılan ligandın kinetik özellikleri, protein tayini, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi belirlendi.

Alabaş turpu POD enziminin, 3-Amino benzohidrazid türevi molekülleri ligand olarak afinite kromatografisinde kullanarak, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi hedefiyle Şekil 3.2’ de verilen türevler ticari olarak temin edilemediğinden dolayı moleküllerin metil benzoat türevleri satın alınarak hidrazin sentezleri tarafımızca yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterildi. Sentezi yapılan 3-Amino benzohidrazid türevlerinin ilk olarak inhibisyon kinetikleri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerin afinite jellerinin sentezi yapıldı. Saflaştırma tabloları hazırlandı ve elde edilen sonuçlar tartışıldı. Çalışmalarımızın bütün basamaklarında kantitatif protein tayinleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Bu yöntemle saflaştırılan hemolizattaki protein miktarları ve enzim çözeltisi belirlendi. Bu yöntem Proteine Coomassie Brilliant Blue G-250’ nin bağlanması esasına dayanıp oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbanst göstermektedir. Çok hızlı bir şekilde proteine boya bağlanması olmaktadır. Protein–boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır ve 1-100 µg arasında bir hassasiyeti vardır (Bradford 1976).

Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı (2010) prosedür uygulanarak peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, spektrofotometrik olarak belirlendi. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-Tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 µmol madde alınarak Sepharose-4B-L-Tirozin jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A₄₇₀ yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

Saflaştırılan bu enzim üzerine 3-amino-5-metil benzohidrazid, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-amino-4-metil benzohidrazid, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.2, 4.5, 4.8, 4.11 ve 4.14 de gösterildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doymuş olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı

konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle % Aktivite grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Alabaş turpu POD enzimi için bu grafikler Şekil 4.7, 4.9, 4.11, 4.13 ve 4.15’da gösterildi.

Alabaş turpu POD enzimi için IC_{50} değerleri 3-amino-5-metil benzohidrazid için; 0,208 mM, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid için; 0,208 mM, 3-amino-4-metil benzohidrazid için; 0,281 mM, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid için; 0,069 mM ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid için; 0,165 mM olarak hesaplandı.

Inhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile K_i değerlerinin hesaplanması çalışmaları yapıldı. Alabaş turpu POD enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.6, 4.9, 4.12 ve 4.15’te gösterildi. 3-amino-5-metil benzohidrazid, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-amino-4-metil benzohidrazid, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

Alabaş turpu POD enzimi üzerine denenen inhibitörlerin K_i grafikleri Şekil 4.8, 4.10, 4.12, 4.14, ve 4.16’de gösterildi. Alabaş POD enzimi K_i değerleri sırasıyla 3-amino-5-metil benzohidrazid için; 0,436 mM, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid için; 0,159 mM, 3-amino-4-metil benzohidrazid için; 0,525 mM, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid için; 0,243 mM ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid için; 0,706 mM olarak grafiklerden yararlanılarak hesaplama yapıldı. Bu sayede saflaştırmada ligand olarak kullanılacak moleküllerin detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan 3-amino benzohidrazid türevi moleküllerin Alabaş turpu POD enzimi için yeni inhibitörleri olarak belirlendi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi.

L-Tirozin ise uzantı kolu olarak CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 mmol madde alınarak Sepharose-4B-L-Tirozin-3-

amino-5-metil benzohidrazid için, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-amino-4-metil benzohidrazid, 3-amino-4-metoksi benzohidrazid ve 3-amino-5-bromo benzohidrazid jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A_{470} yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

Alabaş turpu POD enzimi saflaştırma tabloları Çizelge 4.1 ve 4.19’da gösterildi. Alabaş turpu POD enzimini saflaştırmak için 3-amino-5-metil benzohidrazid molekülü kullanıldığında Alabaş turpu POD enzimi %28,8 verimle 1192,3 kat, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid ile %68,4 verimle 1060,6 kat, 3-amino-4-metil benzohidrazid %24,07 verimle 1085,3 kat, 3-amino-4-metoksi benzohidrazi %46,9 verimle 341,1 kat, 3-amino-5-bromo benzohidrazid ile %32 verimle 610,3 kat saflaştırıldı.

3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülü ile yapılan saflaştırma çalışmalarında Alabaş turpu POD enzimi %28,8 verimle 1192,3 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Afinite tekniği kullanılarak Alabaş turpu POD enziminin saflaştırmada 3-amino-5-metil benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanılabileceğinin oldukça önemli olduğu belirlendi ve bu çalışma ilk defa tarafımızdan gerçekleştirildi.

Saflaştırılan Alabaş turpu POD enzimlerinin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı ve şekil 4.18’de Alabaş turpu POD enzimi için SDS-PAGE fotoğrafı gösterildi ve molekül ağırlığı 47 kDa olarak hesaplandı.

Sonuç Olarak;

3-Amino metilbenzoat türevleri hazır olarak satın alınarak 3-Amino-5-metil benzohidrazid, 3-Amino-5-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-4-metil benzohidrazid ve 3-amino-4-metoksi benzohidrazid, 3-Amino-5-bromo benzohidrazid molekülleri sentezlendi ve Alabaş turpu POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Çalışılan

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

Bu moleküller kullanılarak afinite jelleri hazırlandı, Alabaş turpu POD enzimleri tek basamakta saflaştırıldı. Alabaş turpu POD enzimlerinin saflaştırılmasında; 3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülünün çalıştığımız moleküller içerisinde en etkili ligand olduğu belirlendi. Saflaştırmada elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının, literatürde olan çalışmalardan çok daha kısa sürede ve tek kademedede daha yüksek olduğu görüldü.

Ligand olarak kullandığımız 3-Amino-5-metil benzohidrazid molekülünün, ucuz maliyette ve yüksek verimde Alabaş turpu POD enzimlerini saflaştırdığı ve diğer bitki peroksidazlarını da saflaştırmada kullanılma potansiyelinin olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafariet, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, 331-336.
- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U. and Scherier, P., 1999. Biotransformations with peroxidases. *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74-108.
- Agostini, E., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Milrand, S.R., Tigier, H.A., Acosta, M., 2002. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 1-7.
- Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H., 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598.
- Aitken, S.M., Ouellet, M., Percival, M.D., English, A.M., Biochem, J., 2003. Mechanism of Horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors, 375, 613-621.
- Ak, T. and Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological. Interaction*, 174, 27-37.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro Bru, S.R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot*, 60, 377-390.
- Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L.M.P., 2000. *Pharmacol & Toxicol*, 87, 229-233.
- Bağ, H. (2017). Genel kimya. *Pegem Atf İndeksi*, 1-272.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H. and Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral Horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P., 2008. Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, 69, 627-636.
- Biles, C.L. and Martyn, R.D., 1993. Peroxidase, polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 499-506.
- Biyokimya'nın Tanımı ve
,(2017).<https://amac1/fkbvh.tr.gg/B%26%23304%3BYOK%26%23304%3BMYA-h-NIN-TANIMI-VE-AMACI.htm>, Erişim: 05.05.2018
- Boyer, P.D., 1970. *The Enzymes* (3rd Edition) Academic Press Inc, New York.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *72*, (1-2), 248-254.

- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Ciftci, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R., Anon, M.C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*), partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601.
- Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29-36.
- Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., 1987. *Methods in Enzymology*. (Editors: Colowick, S. P., Kaplan, N. O.) Academic Press, Inc., London, 1-55.
- Coogan, R.C., Wills, R.B.H., Nguyen, V.Q., 2001. Pungency levels of white radish (*Raphanus sativus* L.) grown in different seasons in Australia. *Food Chemistry*, 72, 1-3.
- Cosio, C., Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.*, 60, 391-408.
- Deepa, S.S. and Arumughan, C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511.
- Dinçer, A., & Telefoncu, A. (2007). Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(1-2), 10-14.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10–17.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C. and Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574–1579.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif stress ve antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29, 95-101.
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z., Ferradji, F., Bejar, S., Boutoumi, H., 2012. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. Strain AH4: Purification and biochemical characterization. *Bioresource Technology* 11, 383-390.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 4-17 p, New York, USA.
- Fridowich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-877.
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 165-186.
- Fry, S.C., 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochem. Rev.*, 3, 97-111.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029–1034.

- Ghosh, J. and Myers, C.E., 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci*, 95, 13182-7.
- Gilbert, H.F., 1992. Basic concepts in biochemistry. Mc Graw-Hill Inc. Germany, 81.
- Gözükara, E.M., 2001. *Biyokimya Cilt 2. 4*. Ankara Nobel Tıp Kitapevi, 1258.
- Gözükara, M.E., 1997. Enzimler, 13. *Biyokimya Z 3*. Nobel tıp Kitabevleri, İstanbul, 1225s.
- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea var. Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Ezurum.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science*, 54, 644.
- Hanlon, P.R., Robbins, M.G., Hammon, L.D., Barnes, D.M., 2009. Aqueous extract from the vegetative portion of Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzyme expression in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 356-365.
- Harvey, R.A. and Champe, P.C., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 53-68.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.* 42, 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y., Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium İon Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72-77.
- Huystee, R. V. (1987). Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1), 205-219.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60-63.
- Jing, P., Zhao, S.J., Si-Yu Ruan, S.Y., Xie, Z.H., Dong, Y., Yu, L., 2012. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chemistry*, 133, 1569-1576.

- Jouili, H., Bouazizi, H., Ferjani, E., 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol Plant*, 33, 2075–2082.
- Kalin, R., Atasever, A., Ozdemir, H., 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from turkish blackradish and turnip roots. *Food Chemistry* 335-340.
- Kampis, A., Bartuczakovacs, O., Hoschke, A., Aosvigyazo, V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Keha, E. ve Küvrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97, 118, 125, 637 Erzurum.
- Köksal, E. and Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15, 320-326.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *Intenational Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K., 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D'Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, Y.J., Galoforo, S.S., Berns, C.M., *et al* 1998. Glucose deprivation induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *J Biol Chem*, 273: 5294-9.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Yu., Csoregi, E., Sakharov, I.Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685.
- Liszkay, A., Van Der Zalm, E., Schopfer, P., 2004. Production of reactive oxygen intermediates (O₂, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol*, 136, 3114-3123.
- Manu, B.T., Prasada Rao, U.J.S., 2009. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. *Food Chemistry*, 114, 66–71.
- Marjamaa, K., Kukkola, E.M., Fagerstedt, K.V., 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignifications. *J. Exp. Bot*, 60, 367-376.
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M. and Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Food Science and Technology*, 41, 1372-1379.

- McLellan, K.M. and Robinson, D.S., 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Mika, A., Buck, F., Lüthje, S., 2008. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics*, 71, 412–424.
- Miranda, M.V., Magri, M.L., Navarro Del Can˜ Izo, A.A., Cascone, O., 2002. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A Agarose, *Process Biochemistry*, 38, 537–543.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643–1650.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777–78.
- Nair, A. R., Showalter, A.M., 1996. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemistry biophys. Research Communication*, 226, 254.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Ohya, T., Morimura, Y., Saji, h., Mihara, T., Ikawa, T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Science*, 125, 137–145.
- Özdemir, H., Aygöl, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties. *Prep Biochem. and Biotech.*, 31(2), 125–134.
- Pandey, V.P., and Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, (2), 367–376.
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 367–376.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68, 1605–1611.
- Pütter, J. and Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases*. Bergmeyer, third edition, VCH, 286 p, New York, USA.
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G. Victor, W.R., 1993. Harper’ın Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Robinson, F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G., 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rodriguez L, J.N., Espin, J.C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia Canovas, F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic

- peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1537–1541.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1422–1430.
- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M. and Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571-1579.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M. and Schomburg, D., 2013. Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA". *Nucleic Acids Research*, 41 (Database issue): D764–72.
- Segel, I. H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Segel, I. H., 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York.
- Signoret, A., Crouzet, J., 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Smith, D., & Adams, N. G. (1978). Molecular synthesis in interstellar clouds-radiative association reactions of CH₃⁺ ions. *The Astrophysical Journal*, 220, L87-L92.
- Somtürk, B., Kalın, R. and Özdemir, N., 2014. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol*, 173, 1815–1828.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Tıpawan, T. Barrett M., 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Triplett, B.A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science*, 81, 147-154.
- Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, 3. Baskı, Palme Yayınları, Ankara, 124.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*, 15 (1), 49–127.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.

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

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kütahya’da doğdu. İlk ve orta okulu Kütahya’da okudu. Lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2005 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. 2015 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

