



**HORSERADİŞH PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE
KROMATOĞRAFI YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Serpil GERNİ

**Doktora Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2022
(Her hakkı saklıdır.)**

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

**HORSERADİSH PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR
AFİNİTE KROMATOGRAFI YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

(Development Of A New Affinity Chromatography Method For Purification Horseradish
Peroxidase Enzyme)

DOKTORA TEZİ

Serpil GERNİ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Erzurum
Mart, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Serpil GERNİ tarafından hazırlanan “HORSERADİSH PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE KROMATOĞRAFI YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı çalışması 31/03/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Murat ÇANKAYA <i>Erzincan Binalı Yıldırım Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Veysel ÇOMAKLI <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

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

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

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2020-8596

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak **Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR** danışmanlığında sunulan “HORSERADİŞH PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE KROMATOĞRAFI YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	18	30
Kuramsal Temeller	16	30
Materyal ve Yöntem	21	35
Bulgular	17	20
Tartışma	8	20
Tezin Geneli	19	25

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

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Serpil GERNİ	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
31.3.2022	31.3.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

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

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

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

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum çalışmamın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarında her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin bütün imkânlarını esirgemeyen Fen Fakültesi Dekanlığına, Kimya Bölümüne ve Biyokimya Anabilim Dalına, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezine (DAYTAM),

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, Sayın Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVLİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Çalışmalarım esnasında her türlü yardımlarını gördüğüm Atatürk Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Duygu EKİNCİ'ye, Sayın Doç. Dr. Mine AKSOY'a, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Erzurum Teknik Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KALIN'a, Muş Alparslan Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Züleyha ALMAZ'a, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sayın Uzman Songül BAYRAK, Sayın Nurgül ABUL, Sayın Dr. Cansu ÖZTÜRK, Sayın Dr. Şeyda KALIN, Sayın Feyza SÖNMEZ AYDIN, Sayın Zahra RASULZADE başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Tez çalışmamı FDK-2020-8596 nolu proje kapsamında destekleyen BAP'a teşekkür ederim.

Ayrıca her alanda destek ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman maddi manevi yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Serpil GERNİ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

HORSERADİSH PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE KROMATOĞRAFI YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Serpil GERNİ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Amaç: Bu tez çalışmasında 4-Amino benzohidroksamik asit türev molekülleri kullanılarak Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin tek basamakta ve yüksek verimde saflaştırılması için en etkili ve yeni afinite ligantlarının belirlenmesi hedeflendi.

Yöntem: İlk defa 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit, 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit ve 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit molekülleri sentezlenerek HRP enziminin saflaştırılmasında kullanıldı. Moleküllerin metilbenzoat formlarından hidroksamik sentezleri yapılarak HRP enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline bağlanarak elde edilen afinite jelleri ile tek kademede HRP enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi. FT-IR ile afinite jeli kontrol edildi.

Bulgular: Horseradish POD enzimi; ligand olarak farklı moleküller kullanılarak sentezlenen afinite jeli ile sırasıyla 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit ligandı için %35,97 verimle 601,13 kat, 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit molekülü için %14,00 verimle 404,11 kat, 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit molekülü ile %8,70 verimle 394,88 kat, 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit molekülü ile %4,48 verimle 284,85 kat saflaştırıldı. Tüm kolonlardan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı ve enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildikten sonra sonucun doğruluğunu teyit etmek amacıyla western blot analizi yapıldı. HRP enzimi için 40-50 kDa'da tek bant gözlemlendi. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit ve 4-Amino 3-metil benzohidroksamik kolonları için kolon tutma kapasitesi, HRP enzimi için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde çalışıldı. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit kolonu için HRP enzimi pH 8,0 sıcaklık 15°C, iyonik şiddet 0,4 M, 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit kolonu için ise pH 7,5 sıcaklık 20 °C, iyonik şiddet 0,4 M olarak hesaplandı.

Sonuç: Tez kapsamında Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit ligandının, bilinen diğer ligandlara oranla HRP enzimini daha yüksek verimle saflaştırdığı bulundu.

Mart 2022, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: horseradish peroksidaz (HRP), afinite kromatografisi, saflaştırma, 4-amino benzohidroksamik asit türevleri

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

DEVELOPMENT OF A NEW AFFINITY CHROMATOGRAPHY METHOD FOR PURIFICATION HORSERADISH PEROXIDASE ENZYME

Serpil GERNİ

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Aim: In this thesis, it was aimed to determine the most effective and new affinity ligands for the purification of Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme in one step and with high efficiency by using 4-Amino benzohydroxamic acid derivative molecules.

Method: For the first time, 4-Amino 2-methoxy benzohydroxamic acid, 4-Amino 3-nitro benzohydroxamic acid, 4-Amino 3-methyl benzohydroxamic acid and 4-Amino 3-chloro benzohydroxamic acid molecules were synthesized and used in the purification of HRP enzyme. Inhibition effects on HRP enzymes were investigated by hydroxamic synthesis of molecules from methylbenzoate forms, and HRP enzyme purification was carried out in one step with affinity gels obtained by binding reversible inhibiting molecules to Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material. The affinity gel was checked with FT-IR.

Results: The affinity gel that synthesized using different molecules as ligands were used for purified of HRP POD enzyme. It was purified for 4-amino 2-methoxy benzohydroxamic acid ligand 601.13 times with 35.97% yield, 4-amino 3-nitro benzohydroxamic acid ligand 404.13 times with 14.00% yield, 4-amino 3-methyl benzohydroxamic acid ligand 394.88 times with 8.70% yield, and 4-amino 3-chloro benzohydroxamic acid ligand 284.85 times with 4.48% yield, respectively. After controlling the molecular weight and enzyme purity of the purified enzyme from all columns by SDS-PAGE, western blot analysis was performed to confirm the accuracy of the result. For the HRP enzyme, a single band was observed at 40-50 kDa. Column holding capacity for 4-Amino 3-nitro benzohydroxamic acid and 4-Amino 3-methyl benzohydroxamic columns were studied at different pH, temperature and ionic strengths for HRP enzyme. Optimum conditions were calculated as pH 8.0, temperature 15°C, ionic strength 0.4 M for 4-Amino 3-nitro benzohydroxamic acid column and pH 7.5 temperature 20 °C, ionic strength 0.4 M for 4-amino 3-methyl benzohydroxamic acid column.

Conclusion: Within the scope of the thesis, it was found that Sepharose-4B-L-tyrosine-4-amino-2-methoxy benzohydroxamic acid ligand purified the HRP enzyme with higher efficiency compared to other known ligands.

March 2022, 78 pages

Keywords: horseradish peroxidase (HRP), affinity chromatography, purification, 4-amino benzohydroxamic acid derivatives

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Peroksidazlar (E.C.1.11.1.7)	2
Peroksidaz-siklooksijenaz süper ailesi (PCOXS)	3
Peroksidaz-katalaz süper ailesi (PCATS)	3
Horseradish (<i>Armoracia Rusticana</i>) peroksidazı (HRP)	7
Hidroksamik Asitler	11
Afinite Kromatografisi	12
Kızılötesi (IR) Spektroskopisi.....	13
KURAMSAL TEMELLER.....	14
Çalışmanın Amacı.....	17
MATERYAL ve YÖNTEM	18
Materyal	18
Tez sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması	20
Yöntemler.....	24
Ham ekstraktın hazırlanması.....	24
Protein tayini	24
HRP enzim aktivitesi tayini	26
HRP Enzim Saflaştırma Çalışmaları.....	26
Ligand'ın seçilmesi	26
4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin sentezlenmesi	27
İnhibitör çalışmaları	28
SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü	30
Western Blot Analizi.....	31
Jelde bulunan proteinlerin membrana transferi, bloklama ve görüntüleme aşamaları.....	31

Afinite Kolonlarının HRP Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	32
Kolon kapasitesi üzerine sıcaklığın etkisi	32
Kolon kapasitesi üzerine pH'nın etkisi	32
Kolon kapasitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi.....	32
ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4-Amino Benzohidroksamik asit Türevlerinin Sentezlenmesi	33
4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (1a) bileşiğinin ¹ H-NMR değerleri.....	34
4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit (2a) bileşiğinin ¹ H-NMR değerleri	35
4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit (3a) bileşiğinin ¹ H-NMR değerleri	35
4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit (4a) bileşiğinin ¹ H NMR değerleri.....	36
Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	36
Sentezlenen 4-Amino Benzohidroksamik Asit Türevlerinin IC ₅₀ ve K _i Sonuçlarının Saptanması	37
FTIR Spektroskopisi	42
Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enziminin 4-Amino benzohidroksamik Asit Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları.....	43
SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	44
Western Blot Analizi.....	46
4-Amino 3-Nitro Benzohidroksamik Asit ve 4-Amino 3-Metil Benzohidroksamik Asit Molekülü Kullanılarak Hazırlanan Afinite Kolonlarının HRP Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	46
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	66

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Biyokimyasal Fonksiyonları	1
Tablo 2. Yaygın Olarak Kullanılan POD Substratları.	5
Tablo 3. Afinite Kromatografisinin En Çok Uygulandığı Biyolojik Sistemler	12
Tablo 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
Tablo 5. Kullanılan Alet ve Cihazlar	20
Tablo 6. Kolon Materyali Sentezinde Kullanılan Çözeltiler	21
Tablo 7. Afinite Kolonunda Yararlanılan Çözeltiler	21
Tablo 8. Homojenat Hazırlamada Kullanılan Çözelti.....	21
Tablo 9. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	22
Tablo 10. Bradford Metodu İle Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	22
Tablo 11. Lowry Metodu İle Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	22
Tablo 12. SDS-PAGE ve Western Blot İşleminde Yararlanılan Çözeltiler.....	22
Tablo 13. Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler.....	23
Tablo 14. Commasie Boyamada Kullanılan Çözeltiler	24
Tablo 15. Çalışmamızda Kullanılan İnhibitör Stok Çözeltileri	24
Tablo 16. HRP Aktivite Ölçümü İçin Küvet İçerikleri.....	26
Tablo 17. 4-Amino Benzohidroksamik Asit Türevleri Sentez Sonuçları	33
Tablo 18. 4-amino 2-metoksi Benzohidroksamik Asit İnhibitörünün HRP üzerine İnhibisyon Etkisi	38
Tablo 19. 4-amino 3-nitro Benzohidroksamik Asit İnhibitörünün HRP üzerine İnhibisyon Etkisi	39
Tablo 20. 4-amino 3-metil Benzohidroksamik Asit İnhibitörünün HRP üzerine İnhibisyon Etkisi	40
Tablo 21. 4-amino 3-kloro Benzohidroksamik Asit İnhibitörünün HRP üzerine İnhibisyon Etkisi	41
Tablo 22. HRP Enzimi İçin Moleküllerin Toplu İnhibisyon Sonuçları.....	42
Tablo 23. HRP Enziminin Benzohidroksamik Asit Türevleri Kullanılarak Saflaştırılması....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Peroksidazların sınıflandırılmasının şematik gösterimi	3
Şekil 2. Peroksidaz enziminin katalizlediği kimyasal reaksiyon	4
Şekil 3. Guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgenme mekanizması	6
Şekil 4. Oksitleyici ve indirgeyici substratlar olarak hidrojen peroksit ve bir fenol kullanan klasik peroksidaz döngüsü	6
Şekil 5. Bitki peroksidazlarının fizyolojik rollerinin şematik gösterimi.	7
Şekil 6. Yaban turpu (<i>Armoracia rusticana</i>) bitkisi	8
Şekil 7. HRP enziminin X-ray kristalografisi	9
Şekil 8. Horseradish Peroksidaz (HRP C)‘nin katalitik döngüsü, indirgenen substrat ferrulat	10
Şekil 9. a) Amitlerin genel formülü b) Hidroksamik asitlerin genel formülü.....	11
Şekil 10. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi	26
Şekil 11. HRP inhibitörü ve ligand olarak kullanılacak moleküller.....	27
Şekil 12. 4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması	27
Şekil 13. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B’ye L-tirozin takılması reaksiyonu.....	29
Şekil 14. 4-Amino benzohidroksamik asit türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin’e..... bağlanma reaksiyonu.....	30
Şekil 15. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (1a) molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu.....	34
Şekil 16. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit (2a) molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu.....	35
Şekil 17. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit (3a) molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu.....	35
Şekil 18. 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit (4a) molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu.....	36
Şekil 19. Bradford metoduna göre sığır serum albümininden hazırlanan standart grafik.....	37
Şekil 20. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit’in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi	37
Şekil 21. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik] asit’in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 22. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit’in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi	39
Şekil 23. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 3-nitro benzohidroksamik] asit’in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	39

Şekil 24. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit'in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi	40
Şekil 25. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 3-metil benzohidroksamik] asit'in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	40
Şekil 26. 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit'in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 27. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 3-kloro benzohidroksamik] asit'in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	41
Şekil 28. Sepharose 4B-L-Tirozin- 4- Amino 3-metil Benzohidroksamik Asit kenetlenmesi	43
Şekil 29. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enziminin PAGE resmi.....	45
Şekil 30. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit, 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enziminin PAGE resmi	45
Şekil 31. Western blot analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	46
Şekil 32. Lowry metoduna göre sıgır serum albümininden hazırlanan standart grafik.....	46
Şekil 33. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği	47
Şekil 34. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği	47
Şekil 35. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için pH-kapasite grafiği.....	48
Şekil 36. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için pH-kapasite grafiği.....	48
Şekil 37. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği	49
Şekil 38. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Sığır serum albümin
CNBr	Siyanojen bromür
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
E.C.	Enzim kod numarası
E.Ü.	Enzim ünitesi
ϵ	Molar ekstinksiyon katsayısı
FT-IR	Fourier transform
HRP	Horseradish Peroxidase (Yaban turpu peroksidazı)
I	İnhibitör
IC ₅₀	Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
M _K	Molekül kütlesi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
POD	Peroksidaz
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TMB	3',4,5,5'-tetrametil-[1,1'-bifenil]-3,4'-diamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan

GİRİŞ

Hem kimya hem de biyolojinin bir alt disiplini olan biyokimya, canlı organizmalardaki biyolojik materyallerin, moleküler seviyede ve kimyasal prensipler çerçevesinde inceleyen bilim dalıdır. Biyokimya temel olarak yapısal biyoloji, enzimoloji ve metabolizma olmak üzere üç alana ayrılır. Biyokimya, canlı organizmaların kimyasal yapısını, görevini ve hücrelerimizde gerçekleşen olayları açığa çıkarmanın yanı sıra; protein, yağ, karbonhidrat, nükleik asit ve diğer biyomoleküller gibi bileşenleri incelemede büyük rol oynar (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Biyolojik katalizörler olarak bilinen enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenir. Canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonların %100 bir ürün verimi ile gerçekleşmesini sağlayan biyomoleküllerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç tutulduğunda tüm enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu 2012). Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını protein yapılarıyla yerine getirirken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen yardımcı gruplara ihtiyaç duyarlar. Bağlı olunan grup bir metal iyonu ise kofaktör olarak adlandırılırken, NAD, FAD, NADP, tiamin, CoA gibi ısıya dayanıklı organik moleküller ise koenzim olarak adlandırılır. Enzimin yapısındaki protein kısmına apoenzim, protein olmayan grup içeren enzime de holoenzim denir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimler katalizledikleri reaksiyon türlerine göre altı ana sınıfa ayrılırlar (Tablo 1) (Telofoncu vd. 2007).

Tablo 1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Biyokimyasal Fonksiyonları

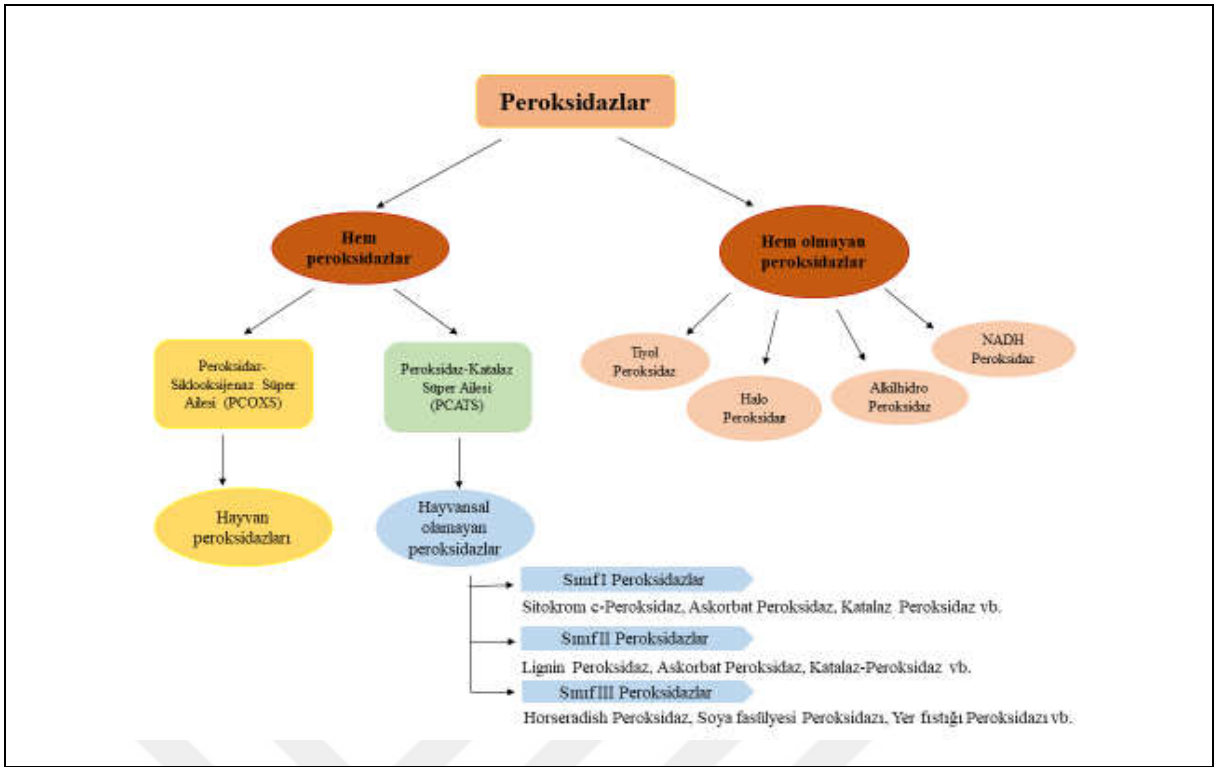
Enzim Sınıfı	Biyokimyasal Fonksiyonu
Oksidoredüktazlar	Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Genel adları dehidrogenaz, oksidaz, redüktaz ve katalaz olarak bilinir.
Transferazlar	Bir molekülden başka bir moleküle grup transferini katalizleyen enzimlerdir. Bu gruba giren bazı enzimler asetil transferaz, metilaz, protein kinaz gibi genel adlarla bilinir.
Hidrolazlar	Bir molekülün su katılması sonucu iki veya daha fazla küçük moleküle parçalandığı reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Peptidazlar, proteazlar, nükleazlar, fosfatazlar gibi genel adlarla bilinir.
Liyazlar	Çift bağa katılma ve çift bağ oluşum reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilaz ve aldolaz gibi genel adlarla bilinirler.
İzomerazlar	Bir molekül içindeki atomik düzenlemeleri katalizlerler. Epimeraz, rasemaz, mutaz gibi genel adlarla bilinirler.
Ligazlar	ATP ve GTP gibi yüksek enerjili molekül kullanarak iki molekül arasında yeni bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.

Peroksidazlar (E.C.1.11.1.7)

Oksidoredüktaz sınıfına ait olan peroksidazlar, doğal bir substrattan (hidrojen peroksit) başka bir sentetik bileşiğe (guaiakol) elektron alışverişinden sorumludurlar (Dahdouh *et al.* 2020). İkinci bir substratı oksitlerken hidrojen peroksitin (H_2O_2) indirgenmesine katkıda bulunabilen proteinlerdir. Bu enzimler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonunda ve oksidatif stres önlenmesinde rol oynayan anahtar antioksidan biyokatalizörler arasındadır (Wedelsback Bladh and Olsson 2011; Hua *et al.* 2013). Peroksidazlar (POD) savunma mekanizması gibi birçok kritik biyolojik süreçte rol oynar (Deepa and Arumughan 2002). Molekül ağırlıkları saflaştırıldığı kaynaklar dikkate alındığında 30.000 ile 150.000 Da aralığındadır (Regalado *et al.* 2004).

Peroksidaz terimi on dokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru kullanılmaya başlanmış olsa da, tanımı yirminci yüzyılın ilk yıllarında Cenevre Üniversitesi'nde Robert Chodat (1865–1934) ve Alexei Nikolaevich Bach (1857–1946) tarafından yapılmıştır. Yaban turpu kökünden ve diğer bitki kaynaklarından peroksidaz enzimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yine bu yıllarda başlatılmıştır (Bach and Chodat 1903).

POD enzimleri hem ve hem grubu olmayan POD olarak ikiye ayrılmaktadır (Passardi *et al.* 2007). PeroxiBase veritabanına göre hem grubu içeren POD grubu, POD genlerinin %80' ninden fazlasını oluşturur. Tiyol peroksidaz, alkilhidroperoksidaz, NADH peroksidaz gibi hem olmayan peroksidazlar sadece küçük bir kısmı kapsar. Heme peroksidazlar ayrıca iki üst aileye, yani peroksidaz-siklooksijenaz üst ailesine (PCOXS) ve peroksidaz-katalaz üst ailesine (PCATS) ayrılır (Passardi *et al.* 2007, Zamocky and Obinger 2010). Peroksidazların şematik bir sınıflandırması Şekil 1'de sunulmaktadır.



Şekil 1. Peroksidazların sınıflandırılmasının şematik gösterimi. (Pandey *et al.* 2017).

Peroksidaz-siklooksijenaz süper ailesi (PCOXS)

PCOXS süper ailesinin peroksidazları, yalnızca doğuştan gelen bağışıklık, savunma tepkileri ile ilgili olduğu öne sürülen hayvan peroksidazlarını içerir (So'derhall 1999, Dick *et al.* 2008). Miyeloperoksidaz (MPO; 1.11.1.7), eozinofil peroksidaz (EPO; E.C.1.11.1.7), laktoperoksidaz (LPO; E.C 1.11.1.7), tiroid peroksidaz (TPO; 1.11.1.8) bu aileye aittir.

Peroksidaz-katalaz süper ailesi (PCATS)

PCATS, hayvansal olmayan heme peroksidazların en yoğun çalışılan üst ailesidir. Sınıf I, II ve III peroksidazlar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Pandey *et al.* 2017).

Sınıf I peroksidazlar

Hem prokaryotik hem de ökaryotik peroksidazları (POD) içerir. Oksidatif strese, yani ROS'un detoksifikasyonunda önemli bir rol sergilerler (Skulachev 1998, Shigeoka *et al.* 2002, Passardi *et al.* 2007). Bu POD sınıfı sitokrom c peroksidazları (CCP; E.C 1.11.1.5), katalaz peroksidazları (CP; E.C 1.11.1.6) ve askorbat peroksidazları (APX; E.C 1.11.1.11) içerir. CCP, hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya indirger. APX, hidrojen peroksit detoksifikasyonunun yanı sıra yüksek bitkilerde kloroplastların ve sitozolün foto-korunmasında görev alır (Sharp *et al.* 2003, Kangasjarvi *et al.* 2008). CP ise bakterilerde bulunurlar ve hem katalaz hemde peroksidazın iki işlevli enzim aktivitesi gösteren antioksidan enzimlerdir (Bernroither *et al.* 2009).

Sınıf II peroksidazlar

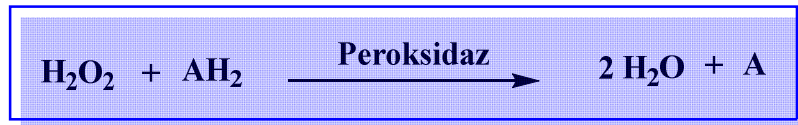
Yalnızca mantar peroksidazlarını içerir ve lignin biyodegradasyonunda önemli bir role sahiptir (Piontek *et al.* 2001). Lignin peroksidazları (LİP; E.C 1.11.1.14), mangan peroksidazları (MnP; E.C 1.11.1.13) ve çok yönlü peroksidazlar (VP; E.C 1.11.1.16) bu sınıfa dahildir. Beyaz çürük mantarlar tarafından salgılanan LİP ve MnP, lignini polimerize etme yeteneğine sahiptir. LİP'ler, çeşitli fenolik olan veya olmayan bileşiklerini indirgerken, MnP'ler ise Mn (II) formdaki POD'a bağlı oksidasyonu katalize eder (Perez-Boada *et al.* 2005). VP'ler, LİP ve MnP arasında bulunan hibrit bir yapıyı paylaşır. Bu sebepten dolayı sadece Mn (II)'yi değil aynı zamanda Mn yokluğunda LİP'e benzeyen fenolik olan veya olmayan bileşiklerini de oksitler (Martinez *et al.* 1996). Ayrıca sınıf I peroksidazların aksine, sınıf II peroksidazlar yapılarında N-terminel sinyal peptitlerine, dört korunmuş disülfür köprüsüne ve kalsiyuma sahiptir (Pandey *et al.* 2017).

Sınıf III Peroksidazlar

Yaygın olarak bitkilerde bulunan, yaban turpu (HRP), soya fasulyesi (SBP), yer fıstığı (PNP) ve çeşitli bitki POD'larını içerir (Tognolli *et al.* 2002). Bu grupta yer alan POD enzimleri E.C 1.11.1.7 şeklinde verilmiş olan bir kod numarasına sahiptir.

Peroksidazların protein analizinde model bir enzim olarak tercih edilmesinin nedeni; yüksek sıcaklıkta stabil kalabilmeleri ve aktivitelerinin kolay ölçülmesinden dolayıdır (Hiraga *et al.* 2001).

Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonun genel formülü Şekil 2'de verilmiştir. (VanHuystee 1987).



Şekil 2. Peroksidaz enziminin katalizlediği kimyasal reaksiyon

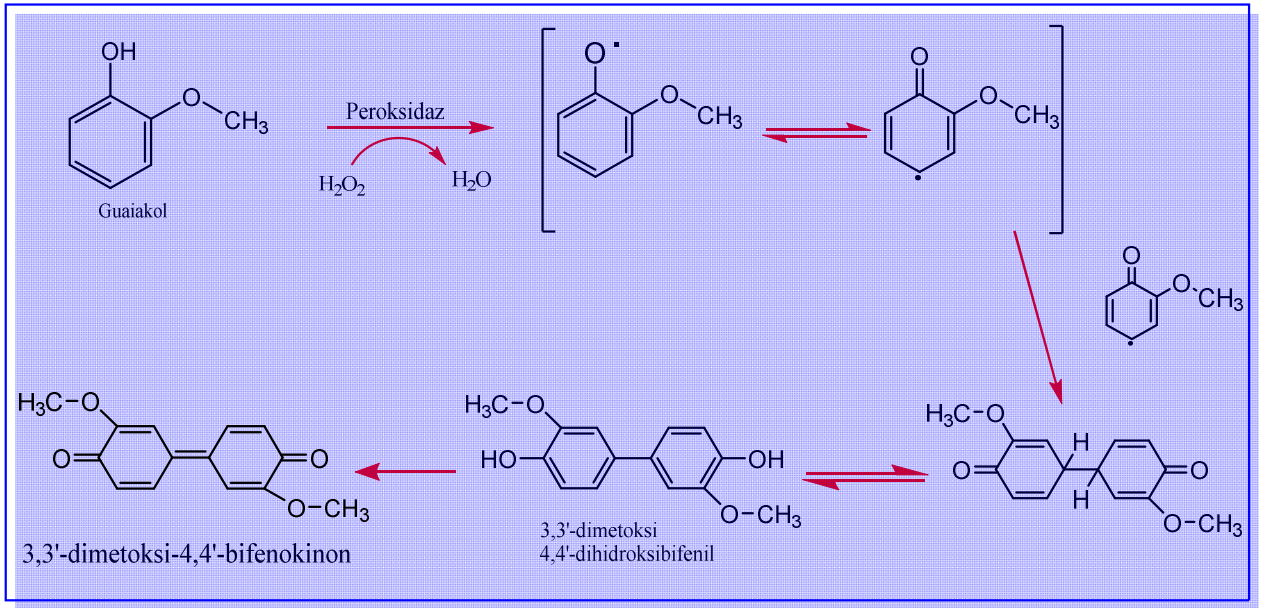
Bitki peroksidazları; klorogenik asit, katekol, pirogallol, katekin ve guaiakol gibi birtakım fenolik molekülün peroksit karşısında oksidasyonunu gerçekleştirir (Onsa *et al.* 2004). Metabolizma sırasında oluşan, oksitleyici özelliği olan H₂O₂'nin ortamdan hızlı bir şekilde uzaklaştırılması işlevi hücrede antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984). Hücre içindeki hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda katalazlar tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer bölümlerinde ise çeşitli aromatik bileşiklerini substrat olarak kullanan peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Robert *et al.* 1993; Scandalios *et al.* 1994).

POD aktivitesini ölçmede kullanılan substratlar Tablo 2’de verilmiştir. Kullanılacak olan substratlar hakkında bilgi vermemiz gerekirse; kanserojen olmamalı, suda kolaylıkla çözünebilmeli, kimyasal stabilitesi yüksek olmalı, reaksiyon ürünleri kolaylıkla ölçülebilmeli, tanımlanmış bir oksidasyon ürünü olmalı, peroksidaz ile oksidasyonu çözeltinin pH’sından bağımsız olmalı, 500 nm’den daha büyük dalga boyunda maksimum absorpsiyona sahip oksidasyon ürünlerinin yüksek ekstiksiyon katsayısı olmalıdır (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987; Ngo 2010).

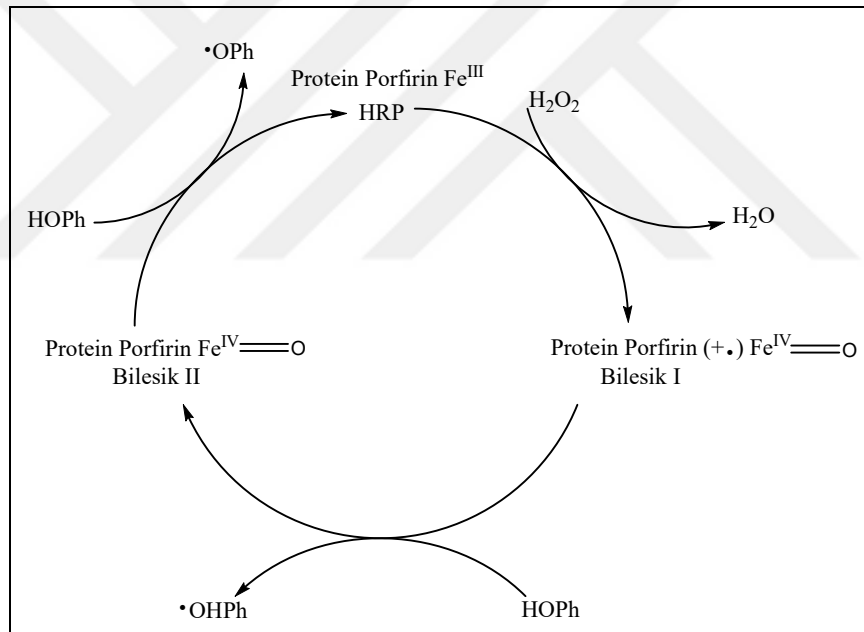
Tablo 2. Yaygın Olarak Kullanılan POD Substratları (Azevedo *et al.* 2003).

Substrat	Kimyasal Adı	Yöntem
ABTS	2,2’-Azino-di(3-ethylbenzothiazolin-6 sulfonate)	Spektrofotometrik
Benzidin	4,4’-Diaminobifenil	Spektrofotometrik
TMB	3,3’,5,5’-Tetrametilbenzidin	Spektrofotometrik
DAB	3,3’-Diaminobenzidin	Spektrofotometrik
Guaiakol	2-Metoksifenol	Spektrofotometrik
Pirogalol	1,2,3-Trihidroksibenzen	Spektrofotometrik
Fenol	Hidroksibenzen	Spektrofotometrik
<i>p</i> - Kresol	4-Metilfenol	Spektrofotometrik
<i>o</i> - Dianisidin	3,3’-Dimetoksibenzidin	Spektrofotometrik
<i>p</i> - Tolidin	1-Amino-4-metilbenzen	Spektrofotometrik
Tolidin	3,3’-Dimetilbenzidin	Spektrofotometrik
Hidrokinon	1,4-Dihidroksibenzen	Spektrofotometrik
Resorsinol	1,3-Dihidroksibenzen	Spektrofotometrik
Katekol	1,2-Dihidroksibenzen	Spektrofotometrik
4-Aminoantipirin	4-Amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin	Spektrofotometrik
<i>p</i> -Anisidin	1-Amino- 4-metoksifenol	Spektrofotometrik
<i>o</i> -Fenilendiamin	1,2-Diaminofenol	Spektrofotometrik
Luminol	3-Aminofitalhidrazid	Fluorimetrik
Ferulik asit	4-Hidroksi-3-metoksisinamik asit	Fluorimetrik
Kafeik asit	3,4-Dihidroksisinamik asit	Fluorimetrik

Guaiakolün substrat olarak kullanımı, ilk kez 1809’da biyomateriyallerde yapılan renk reaksiyonuyla gerçekleşmiştir. Yaban turpundan saflaştırılan enzimle peroksidaz teriminin kullanılması bundan 100 yıl sonra gerçekleşmiştir (Van Huystee 1987). Guaiakol *in vitro* koşullarda POD’un substratı olarak kullanılır ve reaksiyon mekanizmasında guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgendiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Doerge *et al.* 1997).



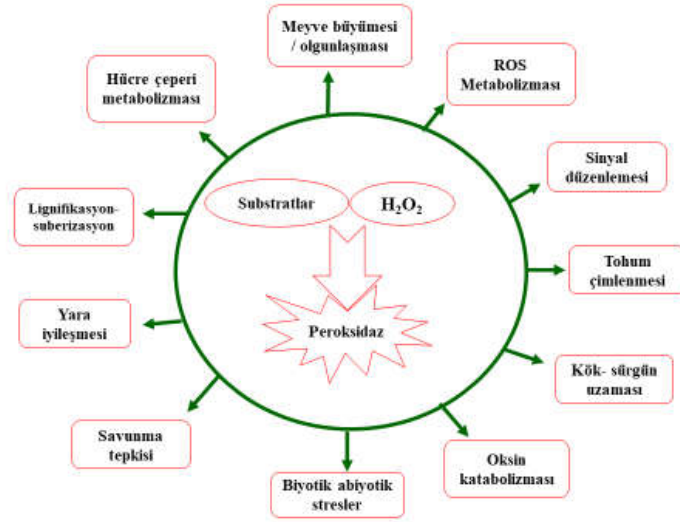
Şekil 3. Guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgenme mekanizması



Şekil 4. Oksitleyici ve indirgeyici substratlar olarak hidrojen peroksit ve bir fenol kullanan klasik peroksidaz döngüsü

Şekil 4’de yaban turpu peroksidazının oksidasyon durumu görülmektedir. HRP, iki elektronlu bir reaksiyon olan Bileşik I’i oluşturmak üzere hidrojen peroksit tarafından oksitlenir. Bileşik I’in Bileşik II’ye indirgenmesi ve Bileşik II’nin durma noktasına gelmesiyle substratların indirgenmesi sağlanır (Dunford *et al.* 2010).

Bitkiler; şekil 5’de görüldüğü gibi büyüme, gelişme ve farklılaşma gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alırlar (De Gara 2004).



Şekil 5. Bitki peroksidazlarının fizyolojik rollerinin şematik gösterimi (Pandey *et al.* 2017).

Biyolojik fonksiyonlarının yanı sıra bitki peroksidazları enzim immünoassay kitleri (ELISA) gibi klinik teşhis ve laboratuvar deneyleri (Azevedo *et al.* 2003), atıkların dekolorizasyonu, birkaç farklı aromatik kimyasal ve polimerik malzemenin sentezi, fenolik bileşikler içeren atık suyun arıtılması, gıda maddelerinden ve endüstriyel atıklardan peroksitlerin uzaklaştırılması (Regaldo *et al.* 2004; Mohan *et al.* 2005; Hamid 2009), kanser tedavisi (Jeong *et al.* 2010) ve biyosensör hazırlanması (Lomillo *et al.* 2005; Xu *et al.* 2014) ile ilgilenirler.

Horseradish (*Armoracia Rusticana*) peroksidazı (HRP)

Enzimler, çok sayıda endüstriyel proste istisnai bir uygulama ile iyi karakterize edilmiş, spesifik ve yüksek verimli katalizörlerdir. HRP enzimi de, yüksek biyoaktivitesi, özgüllüğü ve seçiciliği nedeniyle biyo-kataliz alanında en yaygın kullanılan enzimlerden biridir (Li *et al.* 2020; Morsi *et al.* 2020). HRP, hayvansal olmayan peroksidazların sınıf III üyesidir ve genellikle yaban turpu bitkisinden izole edilir (Veitch and Smith 2000; Veitch 2004; Pandey *et al.* 2007).

Horseradish (*Armoracia rusticana*), Brassicaceae familyasından gelir (Veitch 2004). Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yetişen düşük sıcaklığa ve kuraklığa dayanıklı çok yıllık bir bitkidir ve uzun ömürlüdür. Humus bakımından zengin, killi alkali topraklarda yetişir. (Gajhede *et al.* 1997). Horseradish; yaban turpu, at turpu ve bayır turpu adı altında geçmektedir. Sarı, kalın etli kökü, baharatlı tadı ve antibiyotik ve antienflamatuar yeteneği olan bir bitkidir (Sarika *et al.* 2015). *Armoracia rusticana* (yaban turpu) nin kökleri bir tioglikozid ihtiva etmektedir. Hidroliz sonucu eterik yağ allilizotiyosiyanat (hardal yağı gibi) ayrılmaktadır. Ayrıca şeker, nişasta, sakızlı maddeler de içermektedir. Yapraklar, askorbik asid (vitamin C),

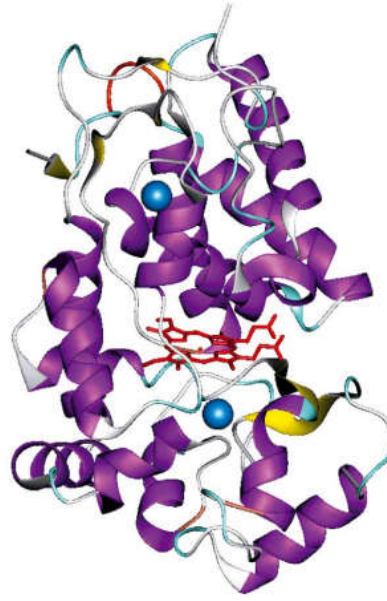
kalsiyum, sodyum, magnezyum içerirken tohumlar da, katı yağ içermektedir. Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir Şekil 6 (Veitch 2004).



Şekil 6. Yaban turpu (*Armoracia rusticana*) bitkisi

HRP oksidoredüktazlar enzim grubu içinde sınıflandırılan bir heme proteinidir. Bu sınıf içinde olmasının nedeni çok çeşitli substratların hidrojen peroksit'e bağlı oksidasyonunu katalize etmesidir (Marquez *et al.* 2008). Molekül ağırlığı yaklaşık 44 kDa aralığında, 308 amino asit rezidüsü içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşur (Welinder 1976). Toplam karbonhidrat içeriği enzimin kaynağına göre %18 ile %22 değerleri arasında değişir (Veitch 2004). HRP'nin ayrıca protohemin yapısında olan bir haloenzim olduğu bilinmektedir. Protohemin yapısı sayesinde enzimin absorpsiyon spektrumu 280 nm'den başka 403 nm'de de maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Çözeltinin 403 nm'deki absorbans değerinin 280 nm'dekine oranı RZ değerini yani enzimin saflığını göstermektedir (Leon *et al.* 2002; Fraguas *et al.* 2004).

Yaban turpundan (HRP) saflaştırılan peroksidaz enziminin aktif merkezinin üç boyutlu yapısı incelendiğinde; iki farklı tipte metal merkez içerir, demir(III) protoporfirin IX (genellikle 'hem grubu' olarak adlandırılır) ve iki kalsiyum atomu bulunur. Her ikisi de enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için gereklidir. İki kalsiyum atomu hem bölgesine distal ve proksimal pozisyonlarda olacak şekilde yerleşmiştir (Berglund *et al.* 2002). Ayrıca üç boyutlu yapıda α -sarmal ve β -kırmalı yapılar bulunmaktadır. Ancak α -sarmal yapının daha baskın olduğu görülmektedir. Şekil üzerinde bu yapıları baktığımızda hem grubu kırmızıyla, kalsiyum atomları maviyle, α -sarmal yapılar morla ve β -kırmalı yapı sarı renk ile gösterilmiştir (Veitch 2004).

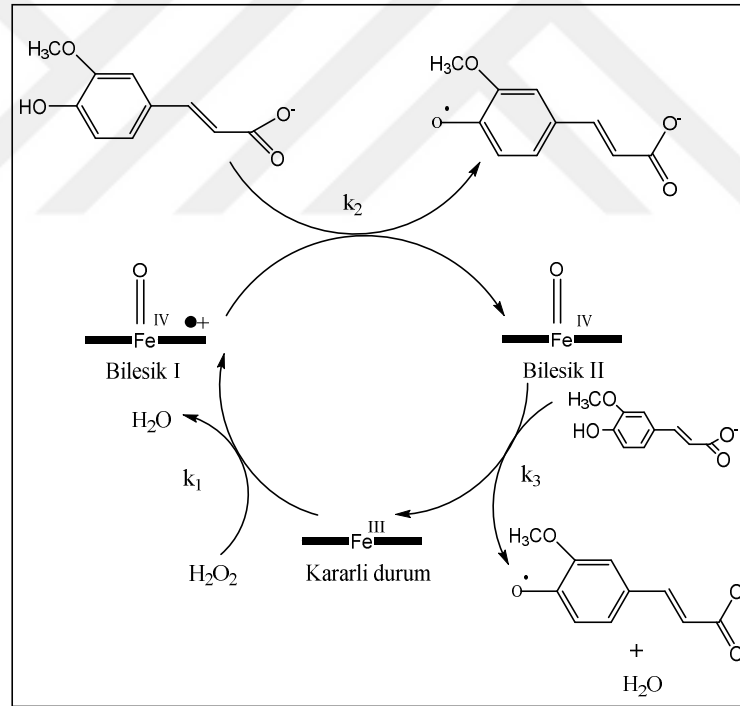


Şekil 7. HRP enziminin X-ray kristalografisi

Yaban turpu peroksidazı (HRP) bilimsel literatürde 200 yılı aşkın bir süre önce ortaya çıkmıştır ve bugüne kadar çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. 1980'lerin sonu 1990'ların başında moleküler teşhis, moleküler biyoloji araç kitleri ve ilk HRP geninin yayınlanmasıyla birlikte HRP'ye olan bilimsel ilgi artmıştır (Fujiyama *et al.* 1988). HRP araştırmaları; enzimolojik karakterizasyon, çeşitli ekspresyon sistemlerinde rekombinant üretim, kimya mühendisliğinde ve mutagenizde onların gelişmesi ve uygulamalarıyla ilgilenir. Şimdiye kadar HRP araştırmalarının büyük çoğunluğu, tek bir izoenzim olan C1A'ya odaklanılmıştır. Yeni doğal HRP izoenzimlerinin keşfi nedeniyle (Näätäsaari *et al.* 2014), HRP ile ilgili çalışmalar da artış beklenmektedir. Horseradish'te 1950'lerin başında izoenzimlerinin sayısı 5'e kadar uzanan birden fazla bileşen ile peroksidaz aktivitesi bulunmuştur (Jermyn 1952; Jermyn and Thomas 1954). Ayrıca bu peroksidaz bileşenlerinin nisbi miktarlarında mevsimsel değişimler ve farklı substratlara karşı reaktivliklerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Ortaya çıkan bileşenlerde vurgulanan şey, tek bir peroksidaz enziminin eserinden ziyade aslında farklı izoenzimlerin olduğudur (Jermyn and Thomas 1954). 1966 yılında yaban turpu köklerinden peroksidaz izoenzimleri adlı bildiride yedi farklı izoenzimin saflaştırılması ve fiziksel özellikleri yayınlanmıştır (Shannon *et al.* 1966; Kay *et al.* 1967; Strickland *et al.* 1968; Shih *et al.* 1971). HRP izoenzimi ile bazik bir izoenzim karşılaştırılarak kinetik ve substrat profil farklılıkları bulunmuştur (Marklund *et al.* 1974). 1977 yılında, izoelektrik odaklama ile Horseradish'ten üç ticari preparatın peroksidaz aktivitelerini ayırarak toplamda 42 HRP izoenzimi tespit edilmiştir (Hoyle 1977). 1980'lerin başında, B1-B3, C1 ve C2 diye beş izoenzim ayrıca E1-E6 izoenzimleri biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Aibara *et al.* 1981, 1982). 2014'te, *Armoracia rusticana*, yaban turpu'nun salgılayıcı bir bitki peroksidaz alanına sahip enzimleri

kodlayan toplam 28 dizi yayınlanmıştır (Näätäsaari *et al.* 2014). Peroksidaz izoenziminin bitkilerde fizyolojik roller oynadığı düşünülmektedir. Peroksidaz aktivitesi bir bitkinin tüm ömrü boyunca geniş bir reaksiyon çeşitliliği ile saptanabildiği bilinmektedir. Ancak, HRP izoenzimlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde mevcut bilgi çok azdır. Son zamanlarda tanımlanan HRP izoenzim dizileri, dış uyaranlara tepki olarak ve farklı bitki dokularındaki izoenzimlerinin ekspresyonu üzerine gelecek çalışmaları kolaylaştıracaktır (Näätäsaari *et al.* 2014). Rekombinant teknoloji, yakın gelecekte yeni ve geliştirilmiş biyokatalizörlere imkan sağlayan HRP araçları içinde bu tür özellikleri birleştirme ve kullanmaya olanak vermektedir (Krainer and Glieder 2015).

Genel olarak Yaban turpu peroksidazının (HRP) yedi ana izoenzimi, iyon değişim kromatografisi kullanılarak izole edilmiştir ve bunlar anyonik (asidik) form için A1, A2 ve A3 ve katyonik (nötr yada az bazik) için B, C, D ve E olarak gösterilir. İzoenzim C (HRPC) yaban turpundaki baskın izoenzimdir ve toplam peroksidazın %50'sinden fazlasını oluşturur (Ngo 2010).



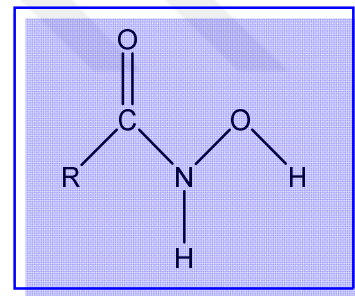
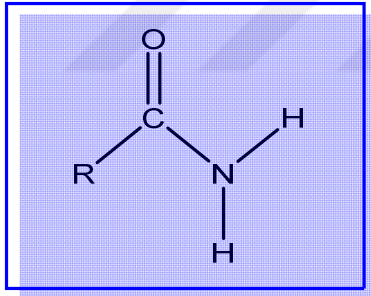
Şekil 8. Horseradish Peroksidaz (HRP C)'nin katalitik döngüsü, indirgenen substrat ferrulat Hız sabitleri k_1 , k_2 ve k_3 sırasıyla bileşik I in oluşum hızı, bileşik I ve bileşik II nin indirgenme hız oranlarını göstermektedir.

İndirgeyici substrat olarak ferulik asitin kullanıldığı katalitik döngünün bazı önemli özellikleri Şekil 8'de gösterilmiştir. Katalitik döngüdeki ilk adım, H_2O_2 ve kararlı halde bulunan enzimdeki Fe(III) ile bileşik I'i oluşturmak için yapacakları reaksiyon ki bu hal yüksek oksidasyon durumudur ve Fe (IV) oksoferil merkez ve porfirin bazlı katyon radikali içerir. Bileşik I'den önce geçici bir ara madde (bileşik 0) tespit edilir. Düşük sıcaklıklarda HRP C ve

H₂O₂ arasındaki reaksiyonlarda gözlenmiştir ve Fe(III) hidroperoksi kompleksi olarak tanımlanmaktadır. Bu peroksit bağlı komplekslerin moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir (Filizola and Loew 2000). Formal terimlerle ifade edecek olursak I nolu bileşik kararlı durumun üzerinde iki oksitleyici eşdeğerleri mevcuttur. Birinci tek elektronlu indirgeme aşaması, bir indirgeyici substratın katılımını gerektirir ve dinlenme durumunun üzerinde bir oksitleyici eşdeğer olan bir Fe(IV) oksoferril türü olan bileşik II'nin üretilmesine yol açar. Hem bileşik I hem de bileşik II güçlü oksidanlardır. Tahmini redoks potansiyelleri +1 V'ye yakındır. İkinci tek elektronlu indirgeme aşaması, bileşik II'yi enzimin kararlı durumuna döndürür. Fazla olan hidrojen peroksit ile kararlı hal enziminin reaksiyonu bileşik III ü verir. Bu sonuç başka yollar kullanılarak ta elde edilebilir (Dundorf 1999). Bu ara madde en iyi şekilde demir(III)-süperoksit ve demir(II)-dioksijen komplekslerinin bir rezonans melezi olarak tanımlanır (Veitch 2004).

Hidroksamik Asitler

Hidroksamik asitler (RCO-NH-OH) formülüne sahip, yapısında amitlerdeki -NH₂ grubunun bir hidrojeni yerine hidroksil (OH) grubunun gelmesiyle oluşmaktadır (Malstrom 1970; Nielsens 1974).



Şekil 9. a) Amitlerin genel formülü

b) Hidroksamik asitlerin genel formülü

Hidroksamik asitler çok yönlü biyolojik aktivite gösteren şelatlayıcı bir ajan sınıfıdır (McCall KA *et al.* 2000) . Zayıf asit özelliklerinden dolayı karboksilik asidin biyoizosterleri olarak da kullanılabilir. Son yıllarda, histon deasetilaz inhibitörleri olarak kanser tedavisinde, üreaz inhibitörü olarak, spesifik anti HCV (Hepatit C virüs) ajanı olarak kullanımları yaygınlaşmaktadır (Vandenbroucke *et al.* 2014). Hidroksamik asit türevleri şelatlayıcı etkilerinden dolayı metallo enzimleri inhibe etmektedir (Cheng *et al.* 2000). Peroksidaz enzimleri aktif bölgelerinde demir iyonu bulundurduğundan dolayı hidroksamik asitler aynı zamanda peroksidaz inhibitörüdür. Peroksidaz inhibitörü olmaları sebebi ile afinite kromatografisinde ligand olma özellikleri de ortaya çıkmaktadır.

Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi özgüllük, tekrarlanabilirlik ve zaman tasarrufu açısından mevcut saflaştırma yöntemlerinin en etkilisidir. Çok aşamalı tekniklerle bile ayıramayan birçok biyolojik materyal, bu yöntemle tek basamakta kolaylıkla ayrılabilir (Gu *et al.* 2003).

Afinite kromatografisindeki temel adımlar;

1. Uygun matriksin seçimi
2. Ligantın destek materyaline immobilizasyonu
3. Örneğin uygulanması
4. Safsızlıklar ve spesifik olarak bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması
5. İlgili proteinin saf olarak elüsyonu

Genelde çarpaz bağlı agaroz, poliakrilamid/agaroz, akrilamit/akrilat.; silika ve CPG tabanlı Affi-gel, Sephadex, Sepharose, Bio-gel agaroz jeli ticari isimlere sahip destek materyalleri matriks olarak kullanılır (Telofoncu ve Kılınç 2009). Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bir şekilde bağlanabilmesi için kolayca derivatize edilebilmektedir. Bu yüzden en çok kullanılan jel Sepharose-4B'dir. Afinite kromatografisi spesifik etkileşmelere ve kovalent bağlanmalar ile etkin olduğu için kullanılan jelin oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon göstermesi beklenir. Küresel ve rijit bir yapıya sahip olan sepharose jeli bu şartı sağlayan en iyi jeldir. Ayrıca sepharose jeli; yüksek ve düşük pH, deterjanlar ve bozucu maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklılık göstermektedir. Bazı durumlarda bu jel yerine yine bu jelin bir başka türevi kullanılabilir. (Cuatrecasas 1970).

Destek materyaline bağlanacak ligant saflaştırılmak istenen proteinin ilgisi olduğu ve o proteine özel bileşenlerdir. Afinite tekniğinde seçilecek ligandın iki önemli özelliğe sahip olması şarttır. Ligand saflaştırılacak maddeye hem spesifik hemde tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. Ligandın bağlama ilgisini ortadan kaldıracak grupların uzaklaştırılması, matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupların artırılması sağlanmalıdır.

Tablo 3. Afinite Kromatografisinin En Çok Uygulandığı Biyolojik Sistemler

Saflaştırılacak madde	Ligant
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Hormon, Vitamin	Reseptör taşıyıcı protein
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, Nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein

Dikkat edilmesi gereken bir diğer husus, düşük molekül kütleli ligantlar için uzatıcı kol ihtiyacıdır. Uzatıcı kol matriks ve ligand arasında yer alır ve seçiminde hidrofilik, nötral, kararlı ve protein bağlama özelliği olmaması gibi kriterler önemlidir.

Afinite kromografisinin avantajları seçimli ve spesifik olması, saflaştırma adımı ile yüksek saflıkta proteinin eldesi ve düşük konsantrasyonlardaki hedef proteinlerin saflaştırılmasıdır. Dezevantajları ise pahalı stasyonere faz ihtiyacı, uygun liganın seçimi ve yeterliliği ve protein liganların sert elüsyon koşullarında düşük stabiliteli olmasıdır (Telofoncu ve Kılınç 2009).

Kızılötesi (IR) Spektroskopisi

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim14000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim4000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır (Skoog *et al.* 1998).

Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenir.

KURAMSAL TEMELLER

Bitki peroksidazları (POD) (E.C 1.1.1.7), peroksitlerin varlığında çok çeşitli aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen hem içeren enzimlerdir (Chanwun *et al.* 2013). Çeşitli fenolik ve fenolik olmayan substratların oksidasyon reaksiyonunu katalize etme yetenekleri göz önüne alındığında POD'lar, endüstriyel uygulamalar için önde gelen bir enzim grubudur. POD'ların bu uygulamaları tarım, gıda, kimya ve tıp sektörlerinde dikkate değer seviyelere ulaşmıştır (Pandey *et al.* 2017).

1960'lerden beri peroksidaz enziminin saflaştırılmasına dair literatürde farklı birçok kromatografik teknik kullanılmakta ve günümüzde bu çalışmalar devam etmektedir. Kullanılan teknikler arasında amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, metal, hidrofobik, afinite, jel filtrasyon kromatografisi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi gibi yöntemler bulunmaktadır (Singh and Singh 2002).

Hurma (*Phoenix dactylifera*) yapraklarından elde edilen POD, sulu iki fazlı sistem, hidrofobik ve iyon değişim kromatografisini içeren üç aşamalı yöntemle %41 verimle 68 kat saflaştırılmıştır (Al-Bagmi *et al.* 2019).

Moringa oleifera Lam yapraklarından POD enzimi, Sephadex G-100 üzerinde ATPS ve boyut dışlama kromatografisini içeren iki yöntemle %84,12 verimle saflaştırılmıştır (Agunbiade *et al.* 2021).

Kavun meyvesinden kavun peroksidazı anyon-değişim kromatografisi yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Rodriguez *et al.* 2000).

Elma ve portakal çekirdeklerinden peroksidaz sırasıyla %40 verimle 8,3 kat, %33,7 verimle 30,6 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sırasında amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kapsayan 3 kromatografik yöntem kullanılmıştır (Zia *et al.* 2011).

Beyaz İspanyol bitkisinden (*Cytisus multiflorus*) dört kromatografik yöntem kullanılarak peroksidaz enzimi %38 verim ile 1168 kat saflaştırılmıştır (Galende *et al.* 2015).

Kriyojel membranlar kullanılarak *Brassica oleracea* köklerinden POD %85,38 verim ile 18,38 kat saflaştırılmıştır (Peşint *et al.* 2021).

Kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinden POD enzimi (NH₄)₂SO₄ çöktürme, diyaliz, CM-Sephadex ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırılmıştır. SDS-PAGE yapılarak 45 kDa'lık bir moleküler ağırlık göstermiştir (Köktepe 2018).

Coleus forskohlii'den elde edilen peroksidaz, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 749 (EÜ/mg), %19 verim ve 11 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE yapılarak 39 kDa'lık bir moleküler ağırlık göstermiştir (Almulaiky *et al.* 2020).

Şevketibostan (*Cnicus benedictus*) bitkisinden elde edilen peroksidaz üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) kullanılarak % 55,44 verim ve 20,53 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE yapılarak 63 kDa'lık bir moleküler ağırlık göstermiştir (Abak 2021).

Literatürde afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan POD'lar; Fasulyeden % 56,2 verimle 253 kat saflaştırma (Oztekin and Tasbası 2020), soğan köklerinden % 37,7 verimle 750 kat (Oztekin 2020), pazıdan %8,83 verimle 50,3 kat (Boldaz 2021), börülceden % 53,6 verimle 91,6 kat (Taşbaşı 2021), alabaş turptan %35,7 verimle 257,4 kat, kara lahana kökünden %37,2 verimle 313,4 kat (Kalin 2018), karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat (Kalin *et al.* 2014), şalgamdan %9 verimle 269,3 kat (Kalin *et al.* 2014), kırmızı pancardan %38 verimle 24,7 kat (Inal *et al.* 2015), beyaz ve kırmızı lahana kallus kültürlerinden %57 verimle 133 kat ve %61 verimle 134 kat saflaştırılmıştır (Oztekin *et al.* 2021).

Günümüze kadar, farklı endüstrilerde kullanım kapasitesine sahip olan peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu için birçok çalışma yapılmıştır. Ağaç kavunundan (*Citrus medica*) (Mall *et al.* 2013), brokoliden (*Brassica oleracea* var. *Italica*) (Thongsook and Barrett, 2005), kividen (*Actinidia deliciosa*) (Soda *et al.* 1991), kaba limondan (*Citrus jambhiri*) (Mohamed *et al.* 2008), palmiyeden (*Roystonea regia*) (Sakharov, 2001), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), karnabahardan (Köksal ve Gülçin 2008), maruldan (*Lactuca sativa* L.) (Hu *et al.* 2012), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009), şalgamdan (Oztekin *et al.* 2019), yaban turpundan (Almaz *et al.* 2021) yapılan peroksidaz saflaştırmaları bu çalışmalara örnek olarak verilebilir.

Geçmiş yıllarda farklı bitkilerden saflaştırılan POD'un molekül kütlesi yapılan SDS PAGE metoduyla; biberiye için 33 kDa (Aghelan and Shariat 2015), sarımsak için 36,5 kDa (Marzouki *et al.* 2005), nohut için 39 kDa (Bhatti *et al.* 2006), yaban turpu kök için 40 kDa (Lavery *et al.* 2010), avokado için 40 kDa (Rojas-Reyes *et al.* 2014), kuş otu çiçeği için 44 kDa (Yan *et al.* 2015), rüzgar palmiyesi için 50 kDa (Caramyshev *et al.* 2006), enginar için 57 kDa (Cardinali *et al.* 2011), kırmızı lahana için, 69,3 kDa (Zeyadi 2019) kara lahana için 95 kDa (Somturk *et al.* 2014), fasulye bitkisi için 31,2 kDa (Oztekin and Tasbası 2020), soğan için 51,2

kDa (Oztekin 2020), pazı için 37 kDa (Boldaz 2021), börölce için 39 kDa (Taşbaşı 2021), kuru fasulye için 45 kDa (Köktepe 2018), kırmızı ve beyaz lahana kallus kültürleri için ise 43 ve 44 kDa (Oztekin *et al.* 2021) olarak tespit edilmiştir. Özetle POD'un moleköl kütlesi saflaştırılan kaynağa göre 30 kDa ile 150 kDa aralığında değışkenlik göstermektedir.

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

HRP saflaştırmasında, iki fazlı sistem (Miranda *et al.* 1995, 1998), ters miseller (Regalado *et al.* 1996), iyon değışim kromatografisi (Lestari 2020), diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi (Khurshid *et al.* 2012), ultrafiltrasyon (Qin 2015) ve afinite kromatografisi (Almaz *et al.* 2021) teknikleri kullanılmıştır.

Literatürde Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur.

Fenölün sudan uzaklaştırılması için biyokömürle immobilizasyonu yaban turpu peroksidazının (HRP) uygulaması ve karakterizasyonu önerilmiştir (Petronijevic *et al.* 2021). Kanseri tedavisinde kullanılabilecek ön ilaç için glikosile edilmemiş Horseradish Peroksidaz (HRP) varyantlarının potansiyeli çalışılmıştır (Humer *et al.* 2021). Grigorenko ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada rekombinant HRP üretimi ve analitik uygulamaları araştırılmıştır (Grigorenko *et al.* 2015). İmmobilize Horseradish Peroksidaz (HRP) tarafından fenollerin uzaklaştırılması incelenmiştir (Alemzadeh *et al.* 2009). Stiren ve türevlerinden (örneğin ambalaj malzemesi olarak kullanılan) polistireni oluşturmak için polimerizasyon reaksiyonları HRP ile başarıyla gerçekleştirilmiştir (Krainer and Glieder 2015). Ayrıca, kitosan ve polivinil alkolün fenolik türevleri kullanılarak hidrojeller oluşturmak için HRP kullanılmıştır (Sakai *et al.* 2014). HRP gübrelerin kokusunun giderilmesi için etkili bir alternatif olarak kanıtlanmıştır (Govere *et al.* 2007). Yaban turpu peroksidaz, pratik analitik uygulamalar için en yaygın olarak kullanılan enzimdir. Örneğin süt ve süt ürünlerinde bulunan laktoz, spektrofotometre, biyosensör gibi sofistike araçlar gerektiren çeşitli analitik yöntemlerle tespit edilmektedir. Laktoz tahmini için β -galaktosidaz, galaktoz oksidaz ve HRP'yi immobilize ederek basit ve ekonomik bir biostrip teknolojisi geliştirilmiştir (Sharma *et al.* 2002). Yapılan diğeri bir çalışmada HRP enziminin Ramazol mavisi gibi endüstriyel öneme sahip azo boya larını parçalama ve çökeltme de etkili olduğu gözlenmiştir (Bhunia *et al.* 2002). Horseradish Peroksidazına ait antikorların biyokonjugasyonu incelenmiştir (Hnasko 2015). Yaban turpunda bulunan bileşiklerin bazı bakteri türlerini öldürdüğü ve ayrıca rekombinant enzim üretiminde kullanıldığı bulunmuştur (Veitch ve Smith 2001). Bronşit, sinüzit,

paradontoz, romatizma, anemi ve grip gibi hastalıklar yaban turpu kökü kullanılarak tedavi edilebildiği belirtilmiştir (Wardaman 2002; Tupper *et al.* 2010). HRP, idrarda 8-hidroksideoksiguanozin ve analoglarının tespiti, mesane ve prostat kanseri risklerini belirlemek gibi tıpta çeşitli tanı uygulamalarında da kullanılmıştır (Chiou *et al.* 2003).

Çalışmanın Amacı

Endüstriyel çalışmalarda enzimler sürekli olarak kullanılmaktadır ve elde edilen sonuçlar yüksek verime sahiptir. Bu sebeple enzimlerin farklı kaynaklar kullanılarak saflaştırılması, izole edilmesi, içerisinde bulunan özelliklerin karakterize edilmesi ile enzimlerin kullanılabilirliği endüstride araştırılmakta ve bu çalışmaların zamanla sayısı ve değeri artmaktadır.

HRP'nin tıp, kimya, ilaç ve gıda sanayisinde dünyada yaygın kullanımı sebebi ile tek kademede, yüksek verimle, kısa sürede ve en ekonomik şekilde saflaştırılması önemlidir. Literatürde HRP enzimi saflaştırılması için yöntem geliştirme üzerine sürekli yeni çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında HRP enziminin ticari üretimini yapabilecek yeni ligandlar sentezleyerek afinite kromatografisi tekniği ile tek kademede ve daha yüksek verimde saflaştırılması ve ligant olarak kullanılan 4- aminobenzohidroksamik asit türevi bileşiklerinin detaylı inhibisyon parametrelerini belirlemek çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Tablo 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

KİMYASAL MADDE	ÜRETİCİ FİRMA
CNBr İle Aktifleştirilmiş Sepharose-4B	Sigma Chemical Company
Guaiakol	Sigma Chemical Company
Standart Serum Albumin	Sigma Chemical Company
Sodyum Asetat	Sigma Chemical Company
Temed	Sigma Chemical Company
Sodyum Karbonat	Sigma Chemical Company
Hidrojen Peroksit	Sigma Chemical Company
Formaldehit	Sigma Chemical Company
Sodyum Tiyosülfat	Sigma Chemical Company
Sodyum Klorür	Sigma Chemical Company
Gluteraldehit	Sigma Chemical Company
N,N'-Metilen Bisakrilamid	Sigma Chemical Company
Akrilamid	Sigma Chemical Company
Commase Brillant Blue G-250	Sigma Chemical Company
Sodyum Bikarbonat	Sigma Chemical Company
Brom Timol Mavisi	Sigma Chemical Company
Gliserol	Sigma Chemical Company
Trihidroksimetilaminometan	Sigma Chemical Company
Etanol	Sigma Chemical Company
Metanol	Sigma Chemical Company
Di Kloro Metan	Sigma Chemical Company
Etil Asetat	Sigma Chemical Company
Sodyum Nitrit	Sigma Chemical Company
%64 Hidroksil Amin	Sigma Chemical Company
Sodyum Sülfat	E.Merk AG

Tablo 4. (Devamı)

SDS (Sodyum Dodesilsülfat)	Sigma Chemical Company
Sodyum Perklorat	E.Merk AG
Hidroklorik Asit	E.Merk AG
Sülfirik Asit	Sigma Chemical Company
L-Tirozin	Sigma Chemical Company
Fosforik Asit	Sigma Chemical Company
Potasyum Fosfat	Riedel de Haen
Sodyum Hidroksit	Riedel de Haen
Triklor Asetik Asit (TCA)	Riedel de Haen
B-Merkaptoetanol	Fluka
Glisin	ICN Biomedical s.inc.
Dimethyl Sulfoxide-D6	Sigma Chemical Company
Potasyum Klorür	Sigma Chemical Company
Sepharose-4B	Sigma Chemical Company
Anti-Hrp Antibody	Abcam
Rabbit Anti-Goat IgG H&L (Hrp)	Abcam
Supersignal West Pico Pluschemiluminescent Substrate	Thermo scientific
Super Signal West Femto Maximumsensitivity Substrate	Thermo scientific
Skim Milk Powder, For Microbiology	Bioshop
Protein Marker	Thermo Fisher Scientific
4-Amino 2- Metoksi Metilbenzoat	Fluorochem
4-Amino 3-Metil Metilbenzoat	Fluorochem
4-Amino 3-Nitro Metil Benzoat	Fluorochem
4-Amino 3-Kloro Metil Benzoat	Fluorochem

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Tablo 5. Kullanılan Alet ve Cihazlar

MATERYAL CİHAZ ADI	ŞİRKET ADI
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1800
Elektroforez tankı	Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	Denver Instrument
Otomatik pipet	Eppendorf
Afinite kolonu	Sigma
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
Liyofilizatör	Alfa 1-2 LD plus
Peristaltik pompa	İsmatec
Werstern Blot Cihazı	Marka
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000
NMR	Bruker 400 MHz
pH Metre	Mettler Toledo
Homojenizatör	Benchmarck Scientific BeadBaster
Çeker Ocak	Space Series Fume Cupeboard
Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Blotlama (Semidry Blotting) Cihazı	Bio-Rad
Hassas terazi	Denver Instruments Summit S-203, Gecavery (UK)
Otomatik pipet seti (1-1000)	Eppendorf
Su banyosu	Memmert WNB 14

Tez sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Bu tez çalışmasında çözeltilerin hazırlanış şekilleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 6. Kolon Materyali Sentezinde Kullanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanma Şekli
Siyanojen bromür (CNBr) ile aktif hale getirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin takılması	pH 9,0'da NaHCO ₃ (0,1 M) tamponu: 0,84 g sodyum bikarbonat 75 mL suda çözülerek, pH 9,0'a getirildi ve hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
Sepharose-4B-L-Tirozin kolonuna 4-amino benzohidroksamik asit türevlerinin bağlanması	pH 8,8'de NaHCO ₃ (0,2 M) tamponu: 0,42 g sodyum bikarbonat 20 mL suda çözülerek, pH 8,8'e getirildi ve hacim 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino benzohidroksamik asit türevi (1a,2a,3a,4a) afinite jellerinin yıkanması	pH 6,8'de NaH ₂ PO ₄ (10 mM) tamponu: 3 g NaH ₂ PO ₄ , 200 mL suda çözüldü. pH 6,8'e getirildi. Son hacim 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 7. Afinite Kolonunda Yararlanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanma Şekli
Afinite kolonlarının dengelenmesi için kullanılan çözelti	pH 6,8'de KH ₂ PO ₄ (10 mM) tamponu: 1,36 g KH ₂ PO ₄ , 950 mL suda çözüldü ve pH 6,8'e getirildi ve 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
Afinite kolonlarının yıkanması için kullanılan çözelti	pH 6,8'de KH ₂ PO ₄ 25 mM tamponu: 1,36 g KH ₂ PO ₄ 350 mL suda çözüldü ve pH 6,8'e getirildi ve 400 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
HRP enziminin elüe edilmesinde kullanılan çözelti	1 M NaCl içeren 25 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,8 tamponu: 11,7 g NaCl 150 mL suda çözdürüldü. 0,6805 g KH ₂ PO ₄ çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. pH'sı ayarlandı, son hacim 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 8. Homojenat Hazırlamada Kullanılan Çözelti

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
Horseradish (yaban turpu) den homojenat elde edilmesi	0,3 M KH ₂ PO ₄ (pH 7,0) tamponu: 8,16 g KH ₂ PO ₄ , 160 mL suda çözüldü ve pH'sı 7,0'e getirildi. 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 9. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
HRP enzimi aktivite ölçümünde kullanılan çözelti	0,1 M KH_2PO_4 (pH 6,0) tamponu: 2,72 g KH_2PO_4 , 160 mL saf suda çözülüp pH'sı 6,0 getirildi. Son hacim 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
Substrat (Guaiakol) çözeltisinin hazırlanması	45 mM Guaiakol çözeltisi: 498 μL guaiakol bir miktar saf suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
Substrat (H_2O_2) çözeltisinin hazırlanması	22,5 mM H_2O_2 çözeltisi: 228 μL H_2O_2 bir miktar saf suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 10. Bradford Metodu İle Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
Kantitatif protein tayininde kullanılan çözelti	Coomassie brilliant blue G-250 (200 mg), etanol (100 mL) ile birlikte çözülerek fosforik asit (200 mL) katıldı ve çözelti 2 L 'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 11. Lowry Metodu İle Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
Kantitatif protein tayininde kullanılan çözelti	A belirteci: (1 g) Na veya K-tartarat, (0,5 g) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ saf su (100 mL) ile çözülerek hazırlandı. Çözelti karanlık ortamda saklandı. B belirteci: Na_2CO_3 (20 g) ve NaOH (4 g) 1 L saf suda çözülerek hazırlandı. C belirteci: A reaktifi (1 mL) ile B reaktifi (50 mL) karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 12. SDS-PAGE ve Western Blot İşleminde Yararlanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
pH'sı 6,8 olan Tris-HCl (1 M) çözeltisi	Tris (24,2 g), su (160 mL) çözülerek pH ayarlandıktan sonra su ile 200 mL olacak şekilde hazırlandı.
pH'sı 8,8 olan Tris-HCl (1 M) çözeltisi	Tris (24,2 g), su (160 mL) çözülerek pH ayarlandıktan sonra su ile 200 mL'ye olacak şekilde hazırlandı.
Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi	Akrilamid 30 g, bisakrilamid 0,8 g karışımı alınıp 69,2 mL su ile çözülerek tamamlandı.
Amonyum persülfat çözeltisi	PER (1 g) alınarak 10 mL su ile hazırlandı.
SDS çözeltisi	1 g SDS alındı ve 9 mL suda çözülerek hazırlandı.
Numune tamponu	pH'sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl 0,65 mL, SDS 3 mL, gliserin 1 mL, bromtimol mavisinden 1 mL olacak şekilde alındı ve karıştırılarak toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti kullanılmadan önce 50 μL β -merkaptotanol alındı ve 950 μL numune tamponu ile karıştırıldı.

Tablo 12. (Devamı)

Yürütme tamponu	Tris (1,51 g) ve glisin (7,2 g) alınarak 450 mL su ile çözülerek, 5 ml SDS eklendi. pH'sı 8,3 olana kadar titre edildi. Toplam hacim 500 mL olacak şekilde hazırlandı.
Ayırma Jeli	pH'sı 8,8 olan 5 mL Tris-HCl (1 M) tamponu, %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamidden 4,4 mL, %10 SDS'den 0,2 mL, %5'lik TEMED'den 0,13 mL ve saf sudan 3,13 mL miktarlarında kullanılıp karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma %10'luk amonyum persülfat (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (PER) 0,2 mL eklenerek ayırma jeli hazırlandı.
Yığma Jeli	pH'sı 6,8 olan 0,41 ml Tris-HCl (1 M) tamponu, %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamidden 0,4 mL, %10'luk SDS'den 0,03 mL, %5'lik TEMED'den 0,03 ml ve saf sudan ise 2,45 mL miktarlarında kullanılıp karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma %10'luk PER 0,1 mL eklenerek yığma jeli hazırlandı.
%5'lik Bloklama çözeltisi	5 g Skim Milk Powder (Yağsız Süt Tozu) ya da Sığır Serum Albumin (BSA) tartıldı ve 95 mL TBST içerisinde çözündürüldü.
10X TBS çözeltisi	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris tartıldı ve 900 mL saf su içerisinde çözündürüldü. pH 7,4'e getirilerek 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
1X TBST çözeltisi	10X TBS çözeltisinden 100 mL alındı ve 900 mL saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Ardından 1 mL Tween-20 eklendi.
10X Transfer çözeltisi	58 g Glisin, 116 g Tris, 7,4 g SDS tartıldı ve 1800 mL distile su ile çözündürüldü ve pH 8.3'e getirilerek, 2 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
1X Transfer çözeltisi	10X Transfer çözeltisinden 200 mL alınarak, 1400 mL saf su ve 400 mL metanol eklendi.

Tablo 13. Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
Stabilizasyon çözeltisi	Saf su (60 mL), etanol (30 mL) ve asetik asitten (10 mL) alınıp hazırlandı.
Redüksiyon çözeltisi	Sodyum asetat (4,8 g), saf su (80 mL) ve etanolden (45 mL) alınıp pH'sı 6,0'a asetik asitle titre edildikten sonra, sodyum tiyosülfat (150 mg) ve glutaraldehit (3 mL) eklendikten sonra toplam hacim 150 mL olacak şekilde hazırlandı.
Boyama çözeltisi	AgNO ₃ (100 mg) saf su (100 mL) ile çözüldü ve formaldehit (30 µL) ilavesiyle çözelti hazırlandı.
Yıkama Çözeltisi 1	Na ₂ CO ₃ (3,75 g) saf su (270 mL) ile çözülerek, formaldehit (120 µL) ilavesiyle çözelti hazırlandı.
Yıkama Çözeltisi 2	Gliserin (1 mL) ve asetik asit (250 mL) karışımından oluşmaktadır.

Tablo 14. Commasie Boyamada Kullanılan Çözeltiler

Çözelti Adı	Hazırlanış Şekli
Sabitleştirme çözeltisi	İzopropanol (%50), TCA (%10) ve su (%40) ilave edilerek hazırlandı.
Boyama çözeltisi	Metanol (50 mL), asetik asit (10 mL) ve su (40 mL) karışımında Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1 g) reaktifi çözülerek hazırlandı.
Yıkama çözeltisi	Metanol (50 mL), asetik asit (10 mL) ve su (40 mL) olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 15. Çalışmamızda Kullanılan İnhibitör Stok Çözeltileri

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	Son Hacim
4-Amino 2-Metoksi benzohidroksamik asit çözeltisi	0,0050 g 4-Amino 2-Metoksi benzohidroksamik asit	2 mL
4-Amino 3-Nitro benzohidroksamik asit çözeltisi	0,0021 g 4-Amino 3-Nitro benzohidroksamik asit	1 mL
4-Amino 3-Metil benzohidroksamik asit çözeltisi	0,0088 g 4-Amino 3-Metil benzohidroksamik asit	3 mL
4-Amino 3-Kloro benzohidroksamik asit çözeltisi	0,0058 g 4-Amino 3-Kloro benzohidroksamik asit	2mL

Yöntemler

Ham ekstraktın hazırlanması

İlk olarak yaban turpu kökü ticari bir işletmeden satın alındı. Daha sonra rendelenip üzerine sıvı azot eklenip havanda ezildi. Ürün, bir behere alınıp 0,3 M KH_2PO_4 (pH 7) tamponu eklendi. Tampon eklenen yaban turpu kökü ekstraktı homojenizatör ile iyice homojenize edildi. Daha sonra yaban turpu ekstratı $+4^\circ\text{C}$ 'de 3 kat tülbent kullanılarak süzüldü. Süzüntü santrifüj tüplerine konularak 13.500 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 45 dk santrifüj edildi. Çöken katı atık uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatant $+4^\circ\text{C}$ 'de tekrar süzüldü. Bu çözelti ham enzim çözeltisi olarak isimlendirildi.

Protein tayini

Kalitatif protein tayini

Bu metod proteinlerin yapısındaki fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de absorbans göstermesidir (Segel 1968). Eşit hacimdeki tüm fraksiyonlardan kalitatif protein tayini yapılarak, absorbansları köre karşı okundu.

Bradford metodu ile protein tayini

Homojenat ve afinite kromatografisi metoduyla saflaştırılmış olan enzimlerin protein miktarları Bradford metodu kullanılarak belirlenmiştir. Boya olarak ise Coomassie G-250 kullanılır ve (-) bir yük içerir. Proteindeki (+) yük ile kompleks oluşturur ve boyanın $\lambda_{max}=465$ nm'de kırmızı formu, $\lambda_{max}=595$ nm'de mavi forma dönüşmektedir. Aşağıdaki işlemlere göre hazırlanmıştır.

- ❖ İçerisinde 1 mg protein bulunan 1 mL BSA çözeltisinden hazırlanan tüplere 10-100 μ L konuldu.
- ❖ Tüm tüpler saf su ilavesi ile 0,1 mL'ye getirildi ve tüplere 4,9 mL protein tayin çözeltisinden eklenerek karıştırıcı ile karıştırıldı.
- ❖ 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerin absorbansları 3 ml'lik cam küvet yardımıyla 595 nm'de ölçüldü.
- ❖ Sonuçlara göre standart bir grafik çizildi.
- ❖ Seyreltilmiş bitki homojenatı ve afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan enzimlerden farklı tüplere sırasıyla 100'er μ L alındı ve her bir tüpe 4900'er boyama reaktifi eklenerek tüpler karıştırıldı.
- ❖ 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerin absorbansları 3 ml'lik cam küvet yardımıyla 595 nm'de ölçüldü. Standart grafik yardımıyla protein miktarları belirlendi.

Lowry metodu ile protein tayini

Folin-Lowry metodu, protein tayin işlemlerinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik aminoasitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptit bağları ile Cu^{+2} arasında biüret reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan aminoasitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana getirir. Bu yöntemin hassasiyeti 5-100 μ g/mL civarındadır. Bu işlem yaklaşık olarak 40 dakikada tamamlanır. Absorbans ölçümleri 660 nm'de yapılmaktadır (Telofoncu ve Kılınç 2009).

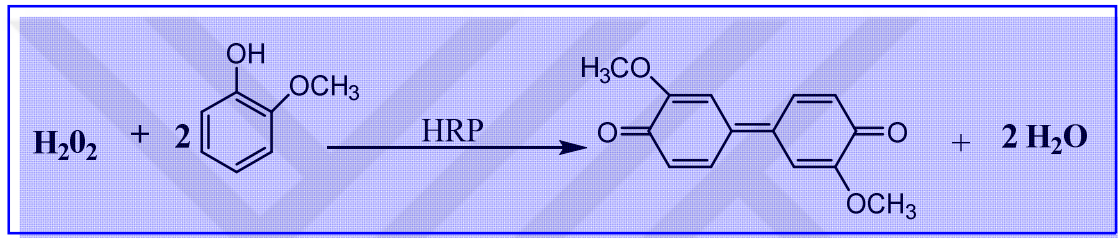
Folin –Ciocalteu belirteci ticari olarak satılmaktadır. Deney 660 nm dalga boyunda ve oda sıcaklığında yapılmaktadır. Sığır serum albumin kullanılarak 1mg/mL olacak şekilde stok çözelti hazırlandı.

Tayin işlemleri aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirilmiştir:

- ❖ Tüplere protein çözeltisinden 100 µL alınarak 1000 µL alkali bakır reaktifi eklenir ve çözelti 10 dk bekletilir.
- ❖ 1000 µL Folin-Ciocalteu belirteci katılır ve karıştırılır. Bu çözelti 30 dk bekletilir.
- ❖ Absorbanslar 660 nm dalga boyunda ölçüldü.
- ❖ Protein miktarları standart grafik hazırlanarak belirlendi.

HRP enzim aktivitesi tayini

H₂O₂'nin kullanılmasıyla birlikte guaiakol substratın yükseltgenmesi sonucu bir renk şiddeti meydana gelir ve spektrofotometre cihazında 470 nm'de absorbans ölçümü yapılması esasına dayanmaktadır (Şişecioğlu et al. 2010) (Şekil 10).



Şekil 10. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

Enzim çözeltisinin ilave edilmesiyle başlatılan reaksiyonda 3 dakika boyunca 1 dk'lık aralıklarla absorbanstaki değişim kaydedildi.

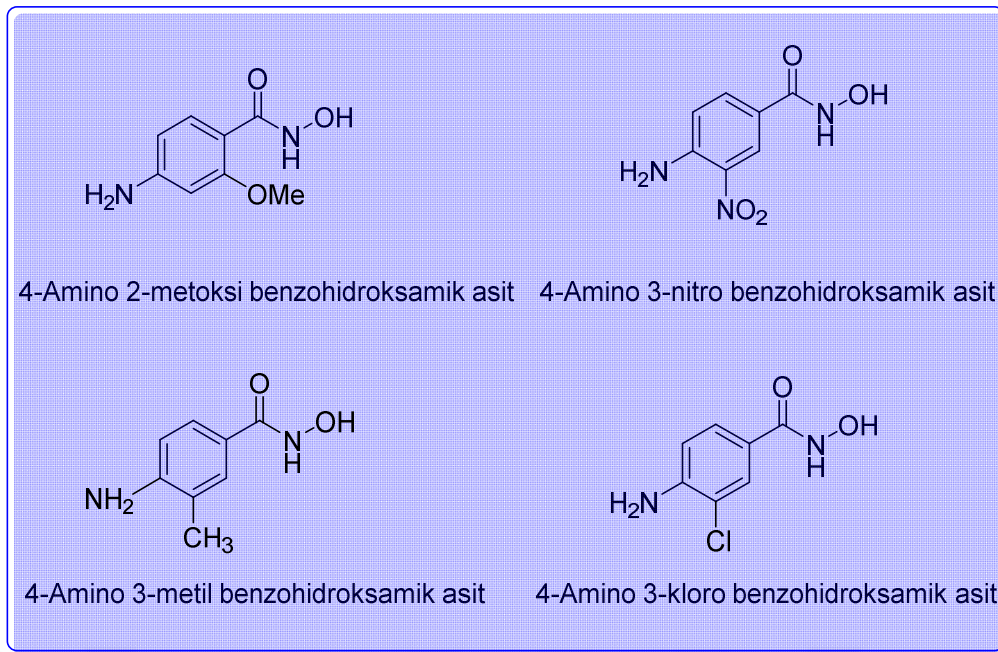
Tablo 16. HRP Aktivite Ölçümü İçin Küvet İçerikleri

Aktivite Çözeltileri	Kör (µL)	Numune (µL)
pH 6,0'da Fosfat Tamponu (0,1M)	1000	990
H ₂ O ₂ (22,5 mM)	1000	1000
Guaiakol (45 mM)	1000	1000
HRP Enzimi	-	10

HRP Enzim Saflaştırma Çalışmaları

Ligand'ın seçilmesi

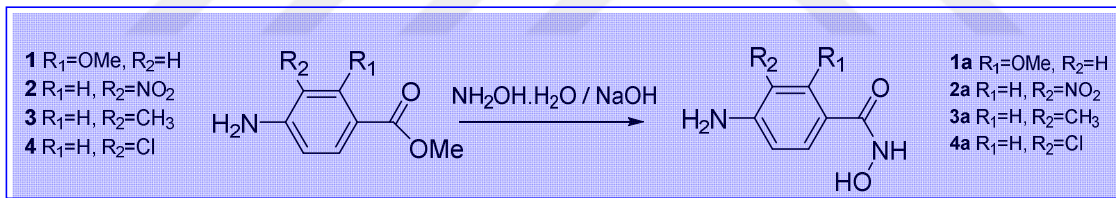
HRP enziminin saflaştırılması için 4-amino 2-metoksi metilbenzoat, 4-amino 3-nitro metilbenzoat, 4-amino 3-metil metilbenzoat, 4-amino 3-kloro metilbenzoat maddeleri ticari olarak tedarik edildi. Bu dört maddenin hidroksamik asit formları tarafımızca sentezlendi, inhibisyon çalışmaları yapıldı ve ligand olarak kullanılabilirliği incelendi (Şekil 11). Sentezlenen bu moleküllerin afinite kromatografisi ile yüksek verimle saflaştırılması için diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olmaları oldukça önemlidir.



Şekil 11. HRP inhibitörü ve ligand olarak kullanılacak moleküller

4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin sentezlenmesi

4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit, 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit moleküllerinin, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılmasıyla hidroksamik sentezleri yapıldı.



Şekil 12. 4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması

4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin sentezleri, Hiroshi ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları sentez protokolüne göre yapıldı. Bu kapsamda 4-amino metil benzoatlar (**1**, **2**, **3**, **4**) (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidroksil amin çözeltisi 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon bitimine kadar geri soğutucu ile ısıtıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen çökelek, etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı. Meydana gelen beyaz kristaller süzgeç kağıdı ile ayrıldı. Böylece 4-amino benzohidroksamik asit türevi olan 4 molekül (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) sentezlenmiş oldu ve karakterizasyonları H¹-NMR, ¹³C-NMR ve Q-TOF (m/z) yöntemiyle doğrulandı.

İnhibitör çalışmaları

HRP enzim aktivitesi üzerine 4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin etkilerinin incelenmesi

Çalışmamızda öncelikle literatürde bilinen Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılmış olan HRP enzimi (Almaz *et al.* 2021) üzerine sentezlediğimiz 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**) 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) inhibitörlerinin IC₅₀ sonuçları belirlenerek oda sıcaklığında ve optimum pH'da her bir deney 3 kez tekrar edilerek, substrat (guaiakol) konsantrasyonu sabit tutularak ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edildi ve % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi. (stok inhibitör çözeltisi hazırlanarak inhibisyon aralığı belirleme çalışmaları yapıldı). Daha sonra oda sıcaklığında, optimum pH'da 3 farklı inhibitör ve 5 farklı substrat konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerleri belirlenerek grafikleri çizilip, Ki ve inhibisyon tipleri tespit edildi.

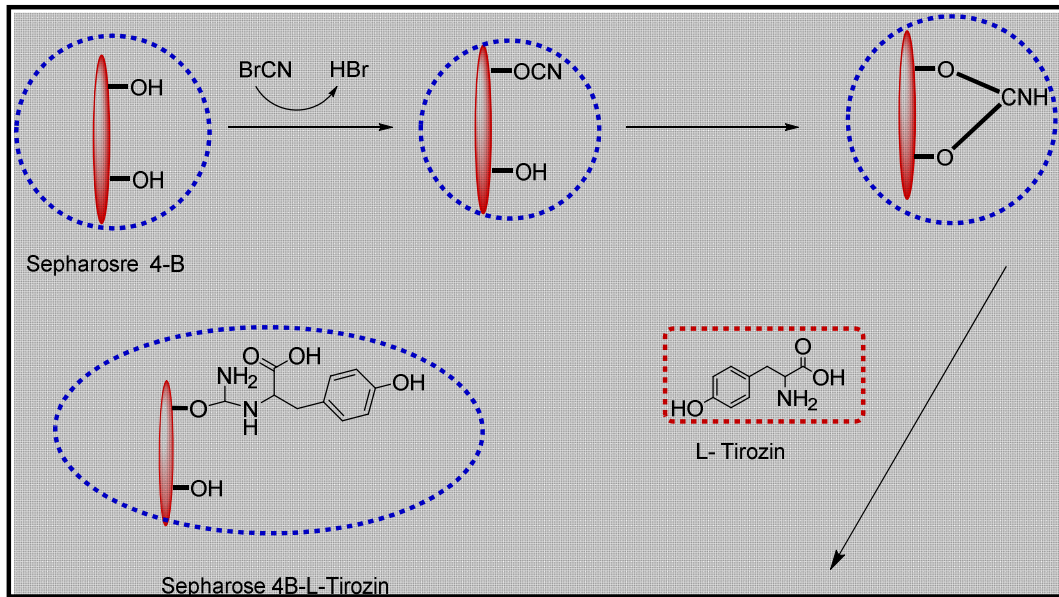
Kullanılan afinite jellerinin sentezi

Afinite jellerinin sentezinde matriks olarak CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanıldı. Uzantı kolu olarak L-tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**) 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) molekülleri ligand olarak önceden hazırlanan Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline, ayrı ayrı kenetlendirildi. Sentezlenen afinite jellerinde matriks Sepharose-4B, uzantı kolu L-tirozin, bileşikler ise enzime spesifik olarak liganda bağlanan kısımlarını meydana getirmektedir. Kullanılan bileşikler grubumuz tarafından sentezlenen yeni HRP enzim inhibitörleridir.

Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-Tirozin takılması

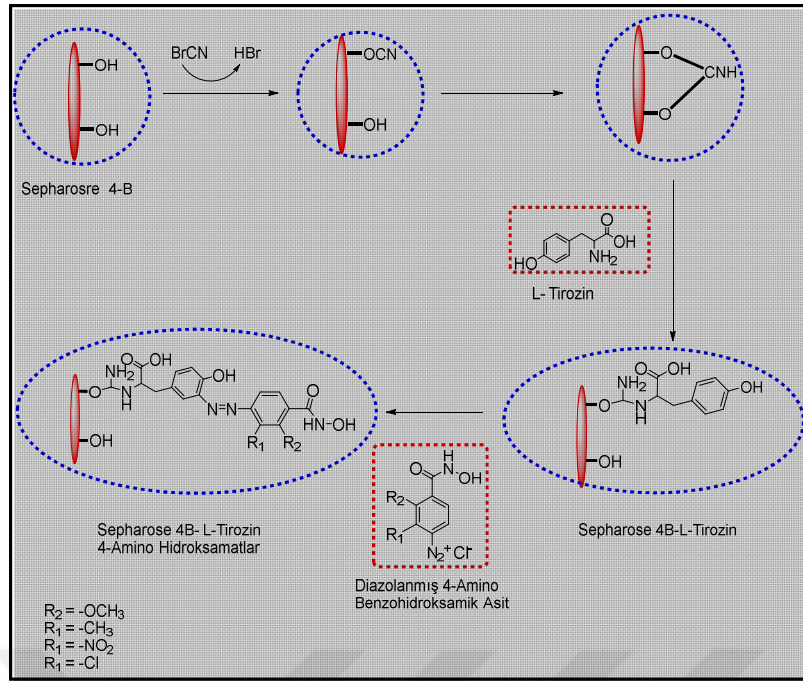
Matriks olarak kullanılan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, pH'sı 10 olan 250 mL NaHCO₃ 0,1 M tamponu ile yıkandı. 80 mg tirozin aynı tamponun 20 mL'si ile soğuk ortamda çözöldü. Elde edilen süspansiyon soğuk ortamda iki saat karıştırıldı. 4°C'de 16 saat bekletilen jel, yıkama suyu 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar yıkandı. Bu şekilde tirozinin fazlası uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, pH 'sı 8,8 olan NaHCO₃ (0,2 M) tamponu ile tekrarlandı. Tirozine bağlı jel aynı tampona aktarıldı. Reaksiyon Şekil 13'deki gibidir.



Şekil 13. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-tirozin takılması reaksiyonu

4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin (1a, 2a, 3a, 4a) Sepharose-4B-L-Tirozin'e bağlanması

4-Amino benzohidroksamik asit türevi 4 molekülden ayrı ayrı 25 mg alınarak 0°C civarında 10 mL 1 M HCl'de çözüldü. Üzerine soğuk ortamda 5 mL saf suda çözülmüş olan 20 mg NaNO₂ yavaş yavaş ilave edildi. Reaksiyon buz banyosunda 15 dk bekletildikten sonra diazolanmış inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin karışımına eklendi. pH 9,5 olana kadar titre edildi ve 3 saat karıştırıldı. Öncelikle 1 L suyla, daha sonra 100 mL pH 6,8 olan 10 mM KH₂PO₄ tamponuyla yıkandı ve kolon paketleninceye kadar aynı tampon içerisinde tutuldu (Whitney 1974). Hazırlanan 4-amino benzohidroksamik asit türevi afinite jelleri için reaksiyon mekanizmaları Şekil 14'de gösterildi.



Şekil 14. 4-Amino benzohidroksamik asit türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e bağlanma reaksiyonu

Afinite kolonlarına numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan afinite jelleri kolonlara (1x10 cm'lik) paketlenildi ve dengeleme işlemi pH'sı 6,8 olan 10 mM KH₂PO₄ tamponu ile gerçekleştirildi. Homojenatın 5 ml'si dengelenmiş olan kolona yüklendi. Yıkama işlemi pH'sı 6,8 olan 50 mL 25 mM KH₂PO₄ tamponu ile yapıldı. Bu şekilde HRP enziminin büyük kısmı jellere tutundu, safsızlıklar ise uzaklaştırıldı. Elüsyon işlemi pH'sı 6,8 olan 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ tamponu ile gerçekleştirildi. Elüatlar 1,5'er mL şeklinde toplandı. Toplanan tüplerin 280 nm'deki absorbanslarına, 470 nm'de ise aktivitelerine bakıldı.

SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

HRP enzimleri afinite kolonundan saflaştırıldıktan sonra enzimlerin saflık derecesi %3-8 kesikli SDS-PAGE ile kontrol edildi (Laemmli 1970). Elektroforez plakaları önce su sonra alkol ile yıkandıktan sonra aralıklı ve cam plakalar birbiri üzerine getirilerek kısaçaklarla sabitleştirildi. Plakalar, jel hazırlama kabinine konuldu. Daha sonra ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Plakalar arasına üst kesimde 3/4 kalıncaya kadar ayırma jeli döküldü ve katılaşması beklendi. Bu jelin katılaştığı görüldükten sonra yığma jeli hazırlandı ve üst yüzeye kadar eklendi. Tarak yerleştirildi ve polimerizasyonun oluşması beklendi. Yığma jeli polimerleştikten sonra tarak çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Meydana gelen kuyular belirlendikten sonra jel sırasıyla saf su ve yürütme tamponu ile yıkandı. Tankın

tamamı yürütme tamponu ile dolduruldu. 20 µg protein içeren numuneye, toplam hacim 100 µL'ye tamamlanacak oranda numune tamponu katıldı. 5 dakika kaynar suyla denatüre edildikten sonra kuyulara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak ilk olarak 80 voltta yarım saat, sonrasında 120 voltta 1,5 saat yürütüldü. Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jelin birine gümüş boyama diğerine ise commasie boyama yapıldı. Gümüş boyama yapılırken 30 dakika tespit çözeltisine, sonra ise 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle muamele edildi. Daha sonra saf su ile jel 3 kez yıkandı. Gümüş nitrat çözeltisi ile 20 dakika boyandı. Boyama işlemi sonunda yıkama çözeltisiyle ile yıkandı ve bantların fotoğrafı çekildi (Temel 2006).

Western Blot Analizi

Deneyin amacına ve kullanılacak olan proteinin molekül kütlesine göre hangi yüzdelik jel hazırlanmasının uygun olduğuna karar verildikten sonra yükleme jeli ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan jel hazırlandı. Numuneler jele yüklenmeden önce içeriğindeki protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi. Numuneler 10 dakika boyunca 95°C ısıtma blokunda ardından 10 dakika buz üzerinde bekletilerek proteinlerin denatüre olması sağlandı. Numuneler hazırlanan yürütme jeline yüklendi ve elektroforezde 50 Voltta 30 dakika yürütüldü. Ayırma jeline geçtikten sonra numuneler 120 Voltta 120 dakika boyunca yürütüldü.

Jelde bulunan proteinlerin membrana transferi, bloklama ve görüntüleme aşamaları

SDS-PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlığına göre jelde yürütülen proteinler semidry blotlama cihazı (Bio-Rad TransBlotR Turbo™ Transfer System) kullanılarak PVDF membran üzerine aktarıldı (blotlandı). Deneyin ilerleyişi aşağıda maddeler halinde verilen protokole göre gerçekleştirildi.

- ❖ Membranlar kullanılmadan önce 5 dk metanol ile muamele edildi. Ardından 5 dk 1X Transfer buffer ile yıkandı.
- ❖ SDS-PAGE jeli blotlanma işleminden önce 5 dk 1X Transfer Buffer ile yıkandı.
- ❖ Semidry Blotter cihazına sırasıyla transfer buffer ile muamele edilmiş 2 parça blot kağıdı, jel, PVDF membran, ve yine aynı şekilde transfer buffer ile muamele edilmiş 2 parça blot kağıdı konuldu ve 25 Volt 2,5 Amper'de 75 dakika boyunca blotlandı.
- ❖ Blotlama işleminin ardından 10 dk TBST ile yıkandı.
- ❖ Membran 1 saat oda sıcaklığında %5'lik bloklama çözeltisi ile muamele edildi.
- ❖ 4°C'de 1 gece primer antikor ile inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından membran 3 kez 10 dk TBST ile yıkandı.

- ❖ HRP ile konjuge edilmiş sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon işleminin ardından 3 kez 10 dk TBST ile yıkandı.
- ❖ Antikorların kimyasal ışığa vermesi için Femto ve Pico substratları kullanıldı.
- ❖ Görüntüleme cihazı (BioRad ChemiDoc™ Touch Imaging System) kullanılarak membranın kemilüminesans görüntüsü elde edildi.

Afinite Kolonlarının HRP Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Afinite jellerinin tutma kapasitesi belirlenirken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet değerleri çalışıldı. Hazırlanan jellerden 1 mL alınarak pH'sı 6,8 olan 10 mM KH_2PO_4 tamponu ile dengelenmiş kolona tatbik edildi. Dengelenmiş kolon saflaştırılmış HRP enzimi ile doyuruldu. Yıkama tamponu ile safsızlıklar uzaklaştırıldı. Elüsyon tamponu ile peroksidaz enzimleri elüe edilerek protein miktarı tespit edildi. Daha sonra jel kurutuldu ve tartıldı. Peroksidaz enziminin tutma kapasitesi mg protein/gram-jel cinsinden belirlendi.

Kolon kapasitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Hazırlanan kolonlarda, sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini incelemek için pH 6,8'de 10 mM KH_2PO_4 tamponu ile farklı sıcaklıklarda (5, 10, 15, 20 ve 25°C) tutma kapasiteleri belirlendi ve mg protein /gram-jel başına grafik çizildi.

Kolon kapasitesi üzerine pH'nın etkisi

Hazırlanan kolonlarda, pH'nın kolon kapasitesine etkisini incelemek için değişik pH'larda (pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında) 10 mM KH_2PO_4 tamponları kullanıldı. Tutma kapasiteleri belirlendi ve mg protein /gram-jel başına grafik çizildi.

Kolon kapasitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi

Hazırlanan kolonlarda iyonik şiddetin kolon kapasitesi üzerine etkisini incelemek için (0,2 ile 0,5 M arasında) KH_2PO_4 tamponları kullanıldı. Sonuçlar mg protein /gram- jel başına grafik çizildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

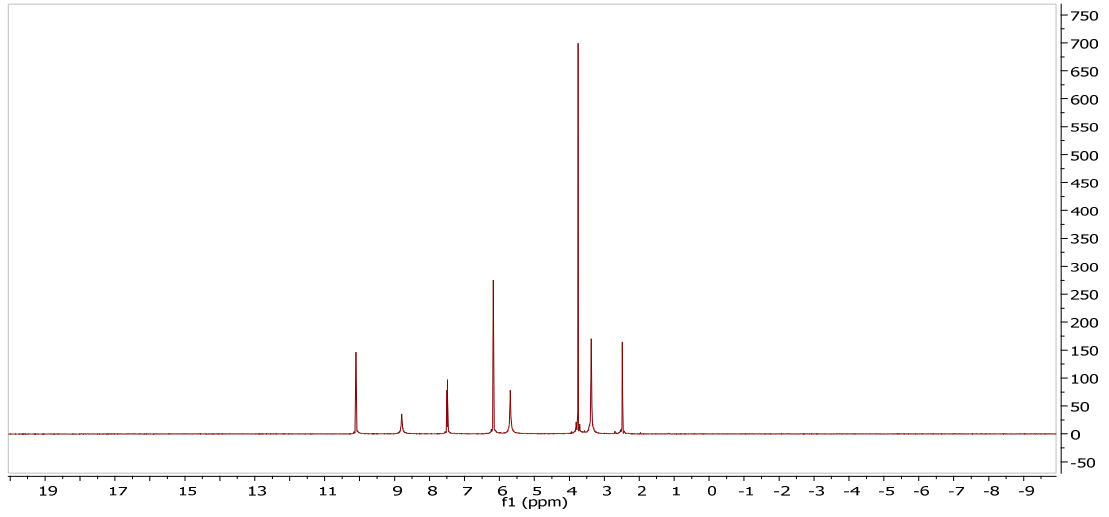
4-Amino Benzohidroksamik asit Türevlerinin Sentezlenmesi

Tez süresince çalışılan 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**) 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) moleküllerinin metil esterleri satın alınarak yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi hidroksamik asit sentezleri yapıldı ve ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve Q-TOF (m/z)'la moleküllerin karakterizasyonu doğrulandı.

Tablo 17. 4-Amino Benzohidroksamik Asit Türevleri Sentez Sonuçları

Reaktant 1	Reaktant 2	R ₁ /R ₂ mmol	Ürün	Süre	% Verim
4-amino 2- metoksi metil benzoat (1)	Hidroksil amin	3/15	4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (1a)	30 dk	27
4-amino 3- nitro metil benzoat (2)	Hidroksil amin	3/15	4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (2a)	30 dk	20
4-amino 3-metil metil benzoat (3)	Hidroksil amin	3/15	4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (3a)	30 dk	17
4-amino 3-kloro metil benzoat (4)	Hidroksil amin	3/15	4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (4a)	30 dk	30

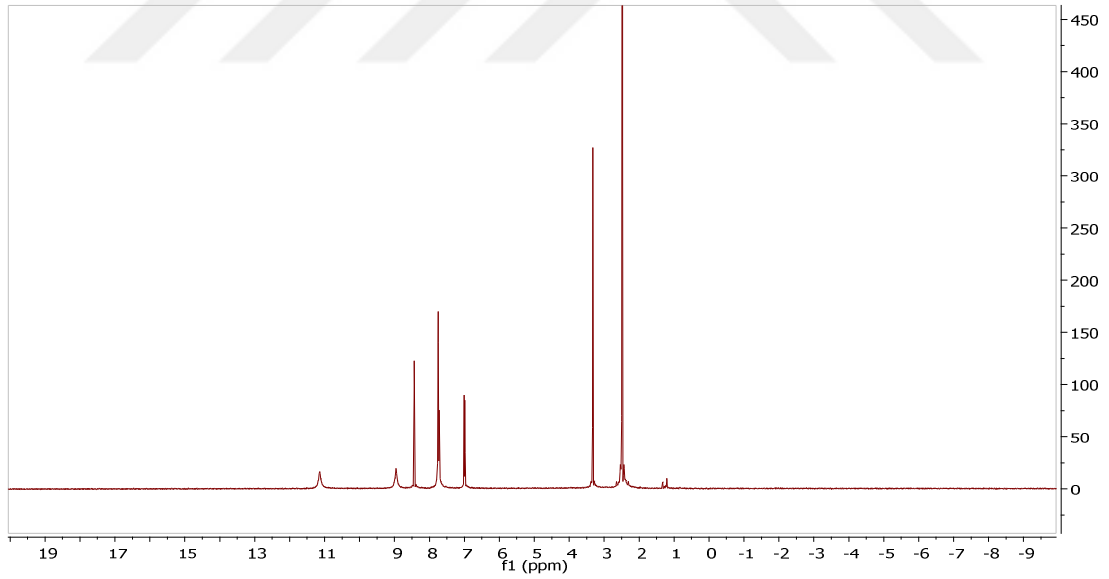
Satın alınan 4-amino 2-metoksi metilbenzoat (**1**), 4-amino 3-nitro metilbenzoat (**2**), 4-amino 3-metil metilbenzoat (**3**), ve 4-amino 3-kloro metilbenzoat (**4**) çıkış bileşikleri baz alınarak hidroksamik asit türleri sentezlendi. Değerler Tablo 17’de ve sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR (400 MHz) spektrumları Şekil 15, 16, 17, 18’de gösterildi.

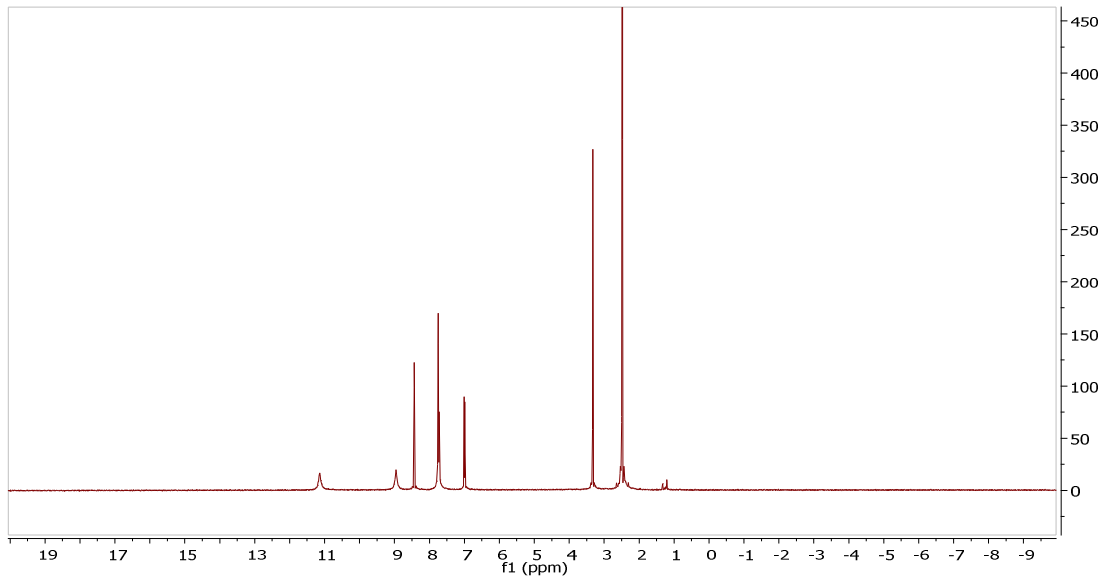


Şekil 15. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (1a) bileşiğinin 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (1a) bileşiğinin ^1H -NMR değerleri

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.17 -6.14 (m, 1H), 5.69 (s, 2H), 3.75 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.5, 159.1, 153.8, 132.6, 108.3, 106.7, 96.5, 55.8. Q-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ için hesaplanan: 182,0691, bulunan: 182,0702.

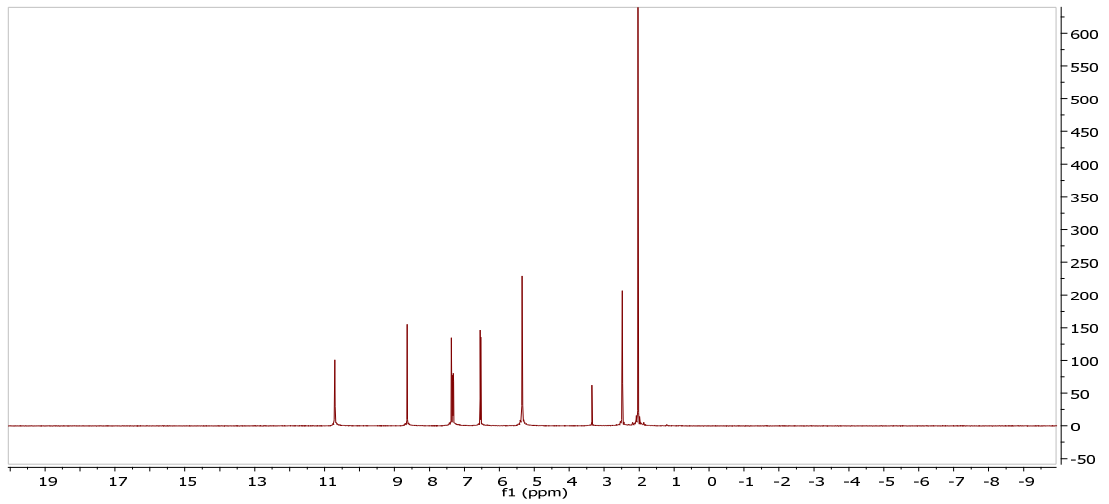




Şekil 16. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit (2a) bileşiğinin 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit (2a) bileşiğinin NMR değerleri

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.14 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.85 – 7.64 (m, 3H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 163.4, 148.4, 134.1, 130.2, 125.7, 120.1, 119.7. Q-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_4$ için hesaplanan 197,0437 bulunan: 197,0447.

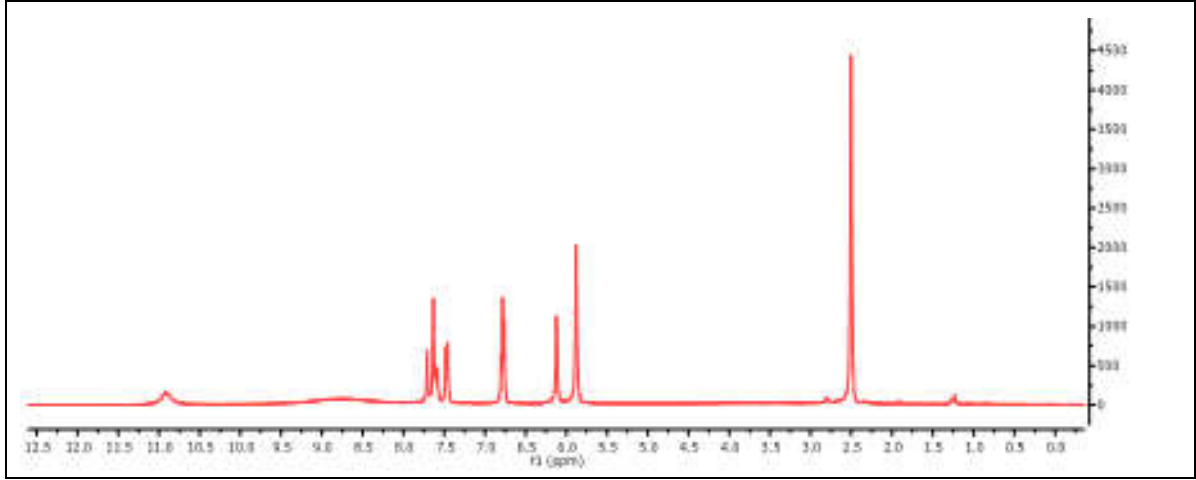


Şekil 17. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit (3a) bileşiğinin 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit (3a) bileşiğinin NMR değerleri

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.71 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.33 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 2.03 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz,

DMSO) δ 165.8, 150.3, 129.8, 126.5, 120.5, 120.1, 113.3, 18.1. Q-TOF (m/z) $[M+H]^+$: $C_8H_{10}N_2O_2$ için hesaplanan: 166,0742, bulunan: 166,0754.



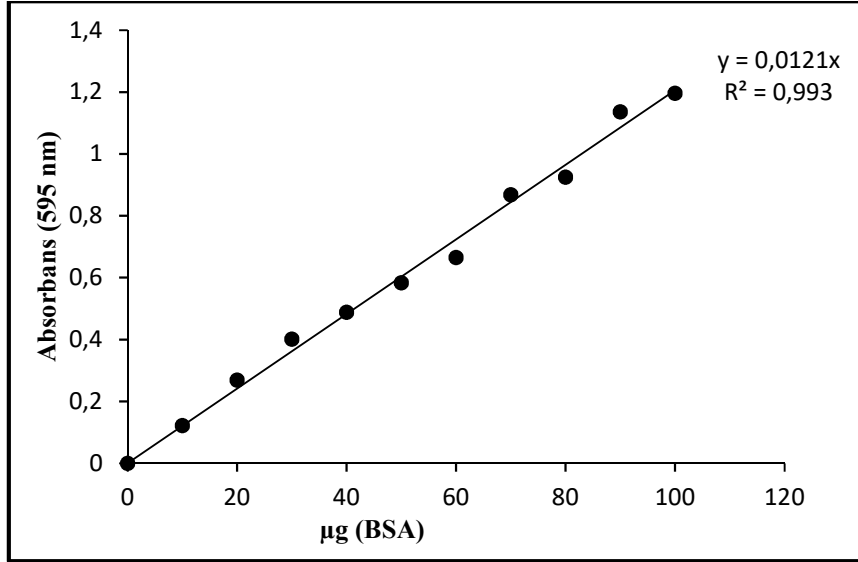
Şekil 18. 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit (4a) bileşiğinin 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit (4a) bileşiğinin NMR değerleri

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.91 (s, 1H), 8.78 (s, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.78 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.88 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.83, 163.69, 148.65, 147.28, 130.80, 129.34, 128.08, 126.67, 120.53, 118.60, 116.06, 115.86, 114.19, 114.08. Q-TOF (m/z) $[M+H]^+$: $C_7H_7ClN_2O_2$ için hesaplanan: 186,0194, bulunan: 186,0196.

Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

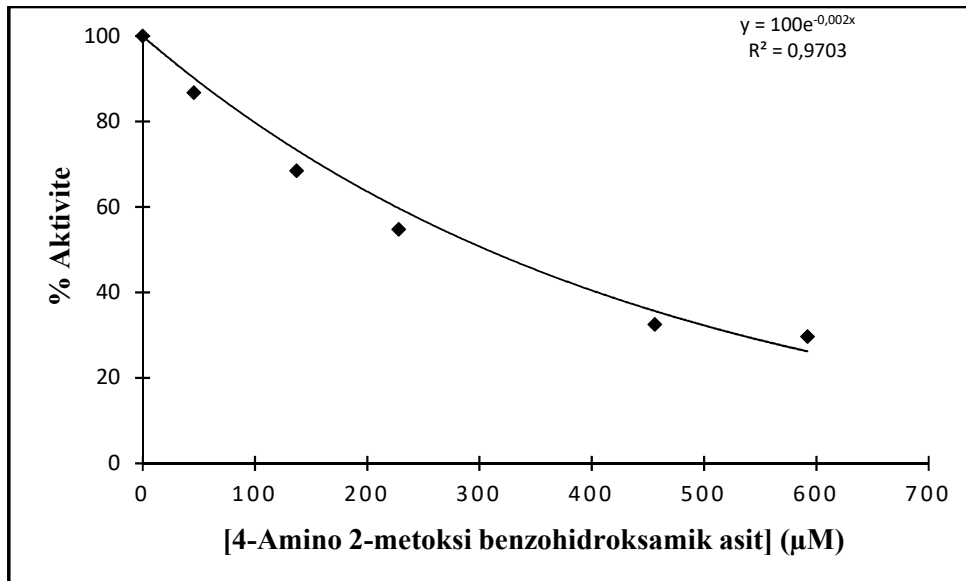
Bradford yöntemi kullanılarak yaban turpu bitkisinden elde edilen homojenat afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı belirlendi. Bu amaçla standart grafik hazırlandı. Yaban turpu bitkisinin homojenatı ve afinite kromatografisi ile elde edilen HRP enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafik kullanılarak tespit edildi. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 19’da gösterildi.



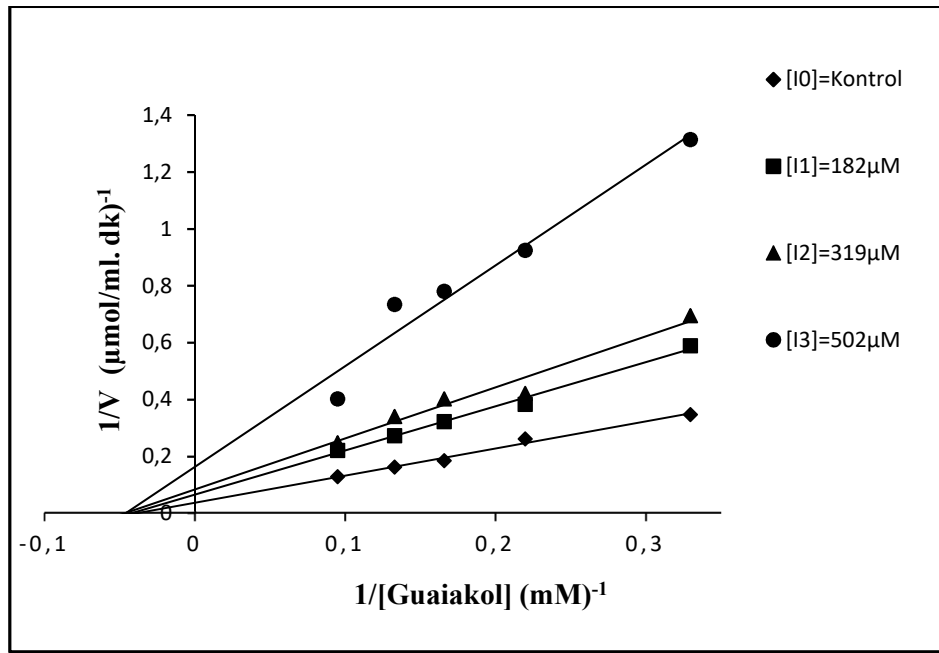
Şekil 19. Bradford metoduna göre sığır serum albümininden hazırlanan standart grafik

4-Amino Benzohidroksamik Asit Türevlerinin IC₅₀ ile K_i Sonuçlarının Saptanması

Çalışmamızda 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**) 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) bileşiklerinin HRP enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Guaiakole bağlı olarak reaksiyon hızı bulundu. 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. % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC₅₀ ve K_i değerleri belirlendi.



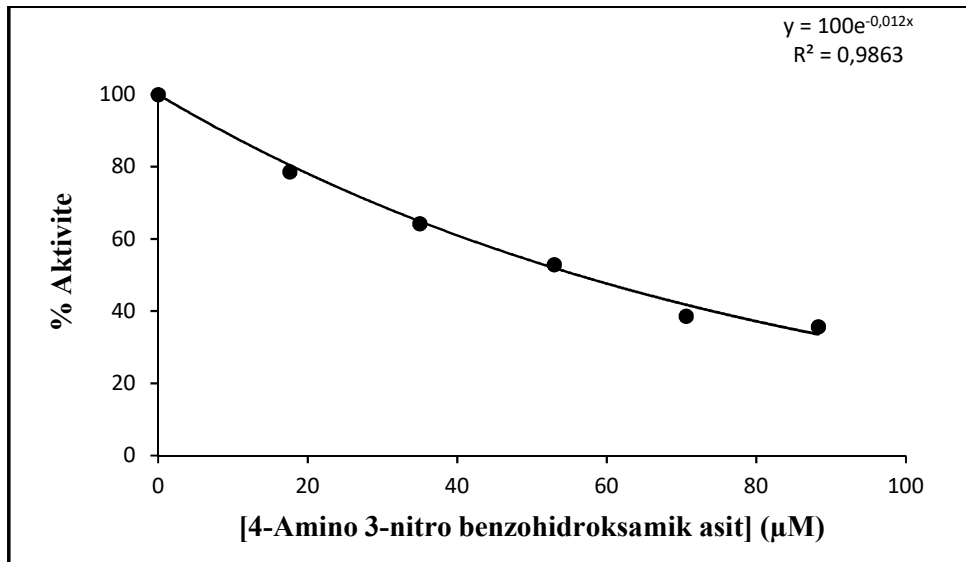
Şekil 20. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit'in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi



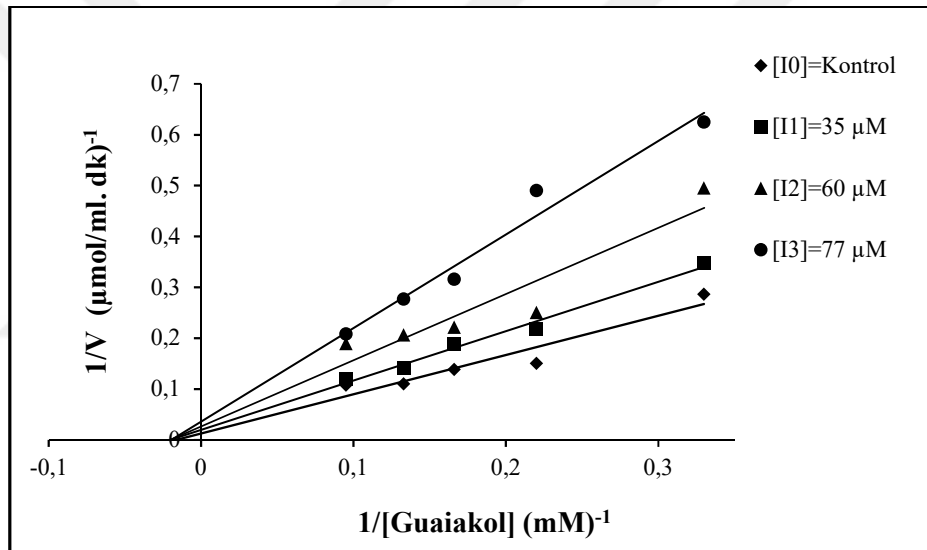
Şekil 21. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik] asit'in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 18. 4-amino 2-metoksi Benzohidroksamik inhibitörünün HRP üzerine İnhibisyon Etkisi

IC ₅₀ (µM)	Ortalama K _i ± S.D. (µM)	İnhibisyon tipi
306	218 ± 68,8	Yarışmasız

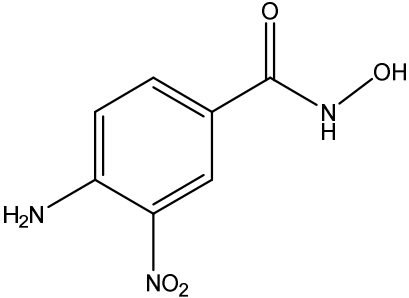


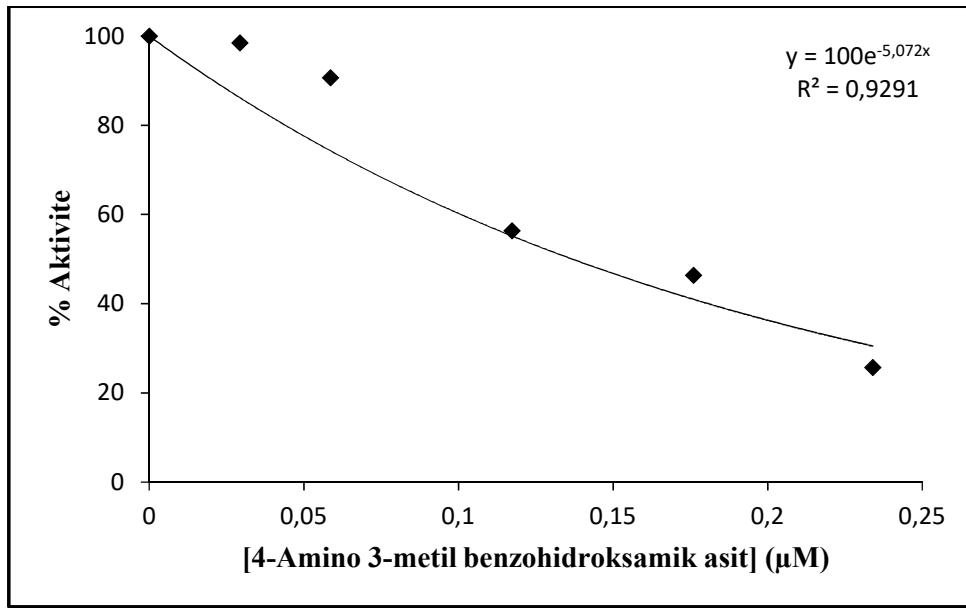
Şekil 22. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit'in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi



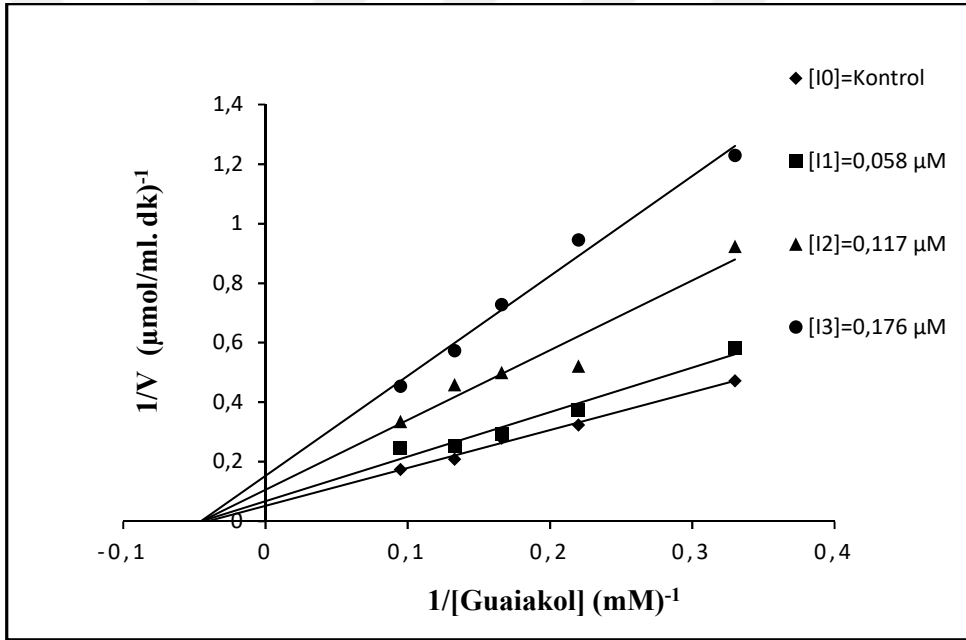
Şekil 23. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 3-nitro benzohidroksamik] asit'in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 19. 4-amino 3-nitro Benzohidroksamik Asit İnhibitörün HRP Üzerine İnhibisyon Etkisi

	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i ± S.D. (μM)	İnhibisyon tipi
	56	51,9 ± 9,9	Yarışmasız

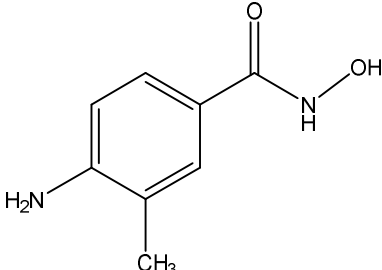


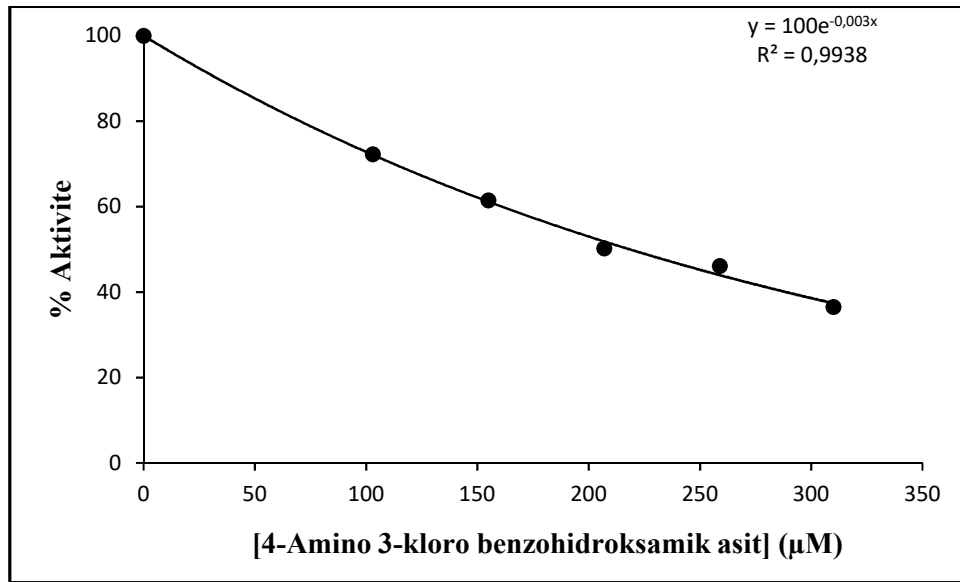
Şekil 24. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit'in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi



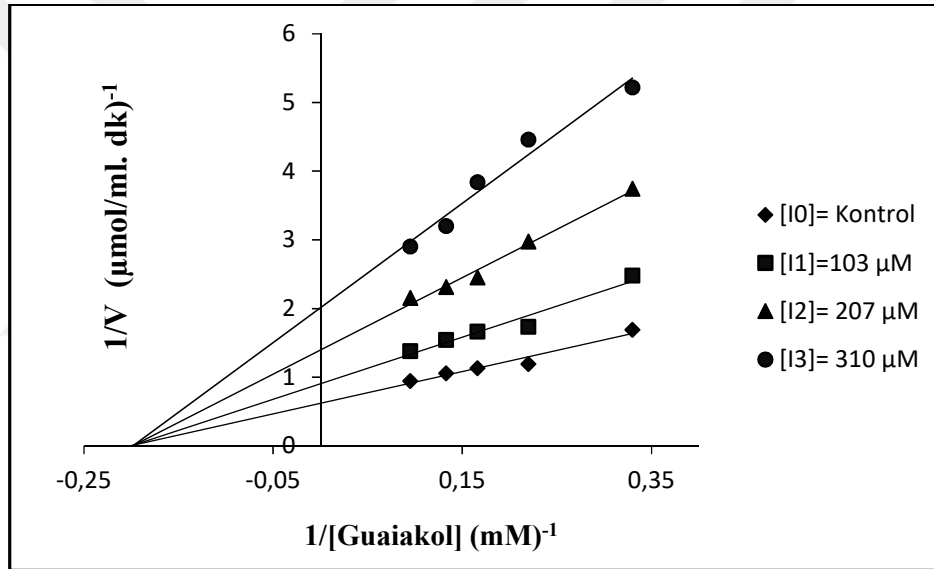
Şekil 25. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 3-metil benzohidroksamik] asit'in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 20. 4-amino 3-metil Benzohidroksamik Asit İnhibitörün HRP Üzerine İnhibisyon Etkisi

	IC ₅₀ (µM)	Ortalama K _i ± S.D. (µM)	İnhibisyon tipi
	0,136	0,132 ± 0,054	Yarışmaz



Şekil 26. 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit'in HRP enzim aktivitesi üzerine etkisi

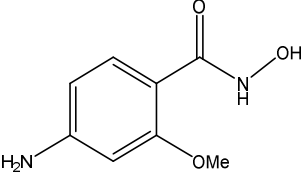
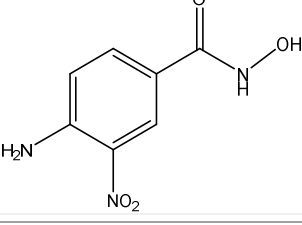
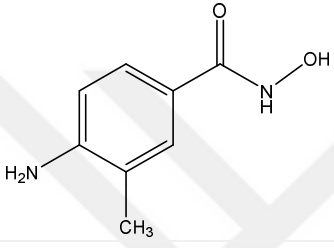
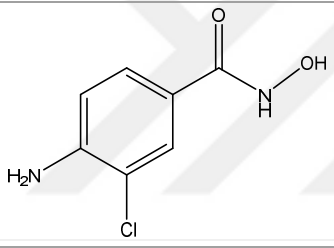


Şekil 27. HRP enzim aktivitesi üzerine [4-Amino 3-kloro benzohidroksamik] asit'in inhibisyon etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 21. 4-amino 3-kloro Benzohidroksamik Asit İnhibitörün HRP Üzerine İnhibisyon Etkisi

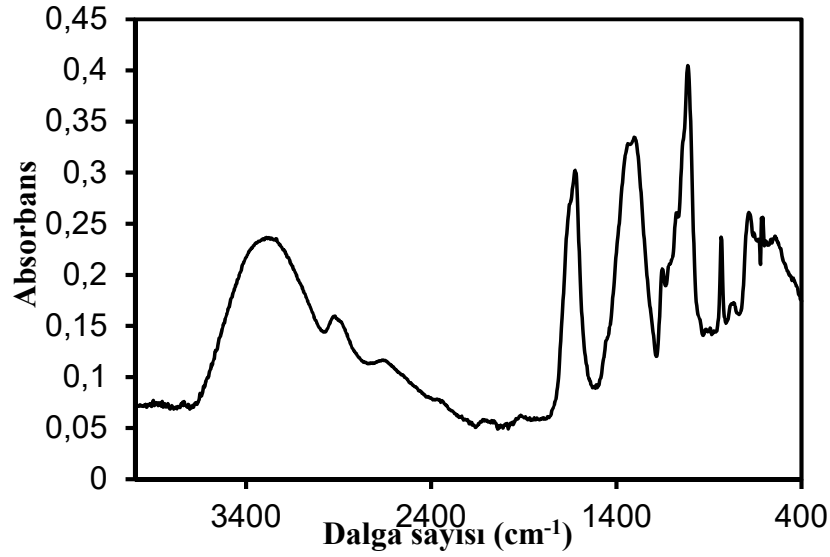
<chem>Nc1ccc(cc1Cl)C(=O)NO</chem>	IC ₅₀	Ortalama K _i ± S.D.	İnhibisyon tipi
	(μM)	(μM)	
	218,33	175,67 ± 43,78	Yarışmasız

Tablo 22. HRP Enzimi İçin Moleküllerin Toplu İnhibisyon Sonuçları

İnhibitör	Horseradish (HRP) (μM)	
	IC ₅₀	306
	Ort. K _i ± S.D.	218 ± 68,8
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
	IC ₅₀	56
	Ort. K _i ± S.D.	51,9 ± 9,9
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
	IC ₅₀	0,136
	Ort. K _i ± S.D.	0,132 ± 0,054
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
	IC ₅₀	218,33
	Ort. K _i ± S.D.	175,67 ± 43,78
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız

FTIR Spektroskopisi

Sepharose 4B-L-Tirozin 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit molekülünün ATR-FTIR spektrumu Şekil 28’de verilmektedir. Şekilde fenolik C-OH, hidroksilamin NH-OH fonksiyonel gruplarından kaynaklanan geniş bir bant 3680-2980 cm⁻¹ aralığında açık bir şekilde görülmektedir. Ayrıca, spektrumda 2904, 2862 ve 2650 cm⁻¹ dalga sayılarında alifatik C-H simetrik/asimetrik ve aromatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan pikler mevcuttur. Spektrumun düşük frekanslı bölgesinde ise, yapıya fenolik halka, karboksilik asit grubu ve amid halkasının katıldığını doğrulayan 1654, 1621, 1327 ve 1296 cm⁻¹ dalga sayılarında karboksilik asit C=O, amid HN-C=O, aromatik C=C ve fenolik C-O gerilmelerinden kaynaklanan pikler görülmektedir. Üstelik bu bölgede 1452 cm⁻¹’de küçük bir omuz ve 1150 cm⁻¹ ‘de düşük şiddetli iki pikin varlığı yapıda N=N ve N-H gruplarının olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 28. Sepharose 4B-L-Tirozin- 4- Amino 3-metil Benzohidroksamik Asit kenetlenmesi

Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enziminin 4-Amino benzohidroksamik Asit Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

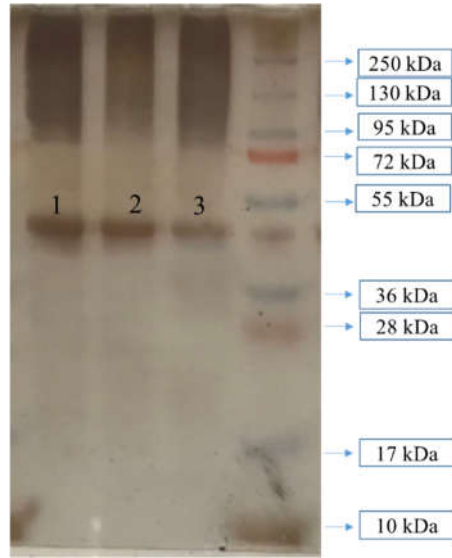
HRP üzerine 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**), 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**), 4-amino 3- kloro benzohidroksamik asit (**4a**) bileşiklerinin inhibisyon etkilerine bakıldıktan sonra bileşiklerin ligand olarak kullanıldığı Sepharose 4B-L-Tirozin-4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, Sepharose 4B-L-Tirozin-4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, Sepharose 4B-L-Tirozin-4-amino 3-metil benzohidroksamik asit, Sepharose 4B-L-Tirozin-4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit kolonlarının sentezi yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Hazırlanan kolondan yaban turpu bitkisinin ekstraktından HRP enzimi saflaştırıldı ve bu aşamalarda belirli dalga boyunda (470 nm) aktivite ve protein tayinine bakıldı. Sentezlenen afinite kolonundan saflaştırılan HRP enziminin saflaştırma sonuçları Tablo 23’de gösterildi.

Tablo 23. HRP Enziminin Benzohidroksamik Asit Türevleri Kullanılarak Saflaştırılması

HRP Enzimi		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit	Homojenat	5	140	1,27	700	6,35	110,23	100	1
	Sepharose 4B Afinite	2	125,9	0,0019	251,8	0,0038	66263,15	35,97	601,13
4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit	Homojenat	5	140	1,27	700	6,35	110,23	100	1
	Sepharose 4B Afinite	2	49,00	0,0011	98,00	0,0022	44545,45	14,00	404,11
4-amino 3-metil benzohidroksamik asit	Homojenat	5	140	1,27	700	6,35	110,23	100	1
	Sepharose 4B Afinite	2	30,47	0,0007	60,95	0,0014	43528,57	8,70	394,88
4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit	Homojenat	5	140	1,27	700	6,35	110,23	100	1
	Sepharose 4B Afinite	2	15,7	0,0005	31,4	0,001	31400	4,48	284,85

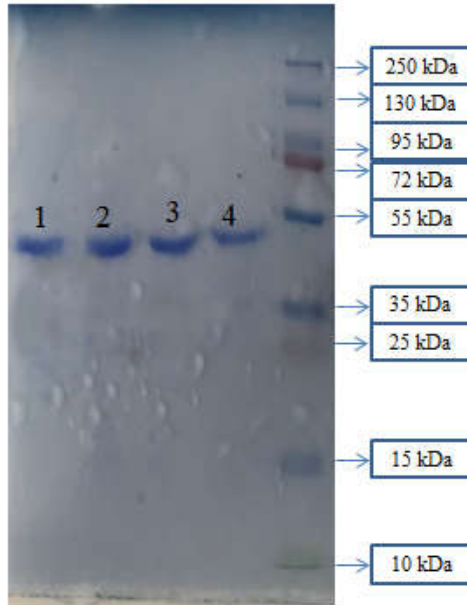
SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Sentezlenen bileşikler üzerine Sepharose 4B-L-Tirozin-(**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) jellerinden saflaştırdığımız HRP enziminin molekül ağırlığını saptamak için PAGE yapıldı. Jellerin boyanmasında gümüş ve commasie boyama yöntemi tercih edildi. Saflaştırılan HRP enziminin molekül ağırlıkları, SDS-PAGE’de standart proteinler ile belirlendi. HRP enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 40-50 kDA aralığında hesaplandı. Şekil 29 ve 30’da SDS-PAGE fotoğrafları gösterildi.



Şekil 29. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enziminin PAGE resmi

*HRP (1,2,3) **1:**4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, **2:**4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, **3:** 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit

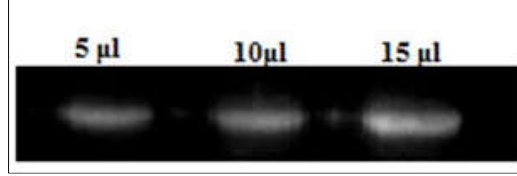


Şekil 30. 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit, 4-Amino 3-kloro benzohidroksamik asit afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enziminin PAGE resmi

*HRP (1,2,3,4) **1:**4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit, **2:**4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit, **3:** 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit, **4:** 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit.

Western Blot Analizi

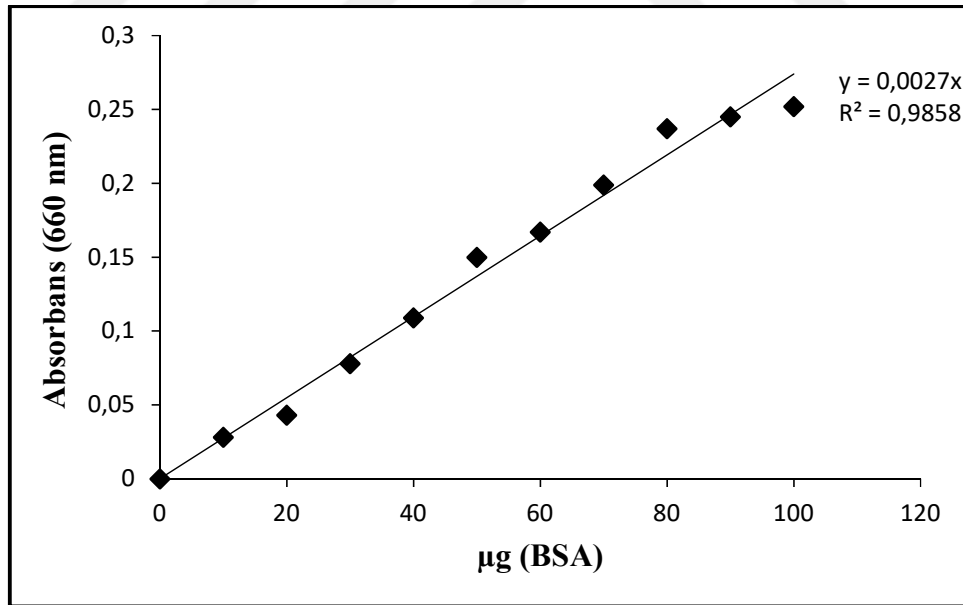
4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit kolonundan HRP enziminin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendikten sonra sonucun doğruluğunu teyit etmek amacıyla western blot analizi yapıldı (Şekil 31).



Şekil 31. Western blot analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü

4-Amino 3-Nitro Benzohidroksamik Asit ve 4-Amino 3-Metil Benzohidroksamik Asit Moleküllü Kullanılarak Hazırlanan Afinite Kolonlarının HRP Enzimini Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

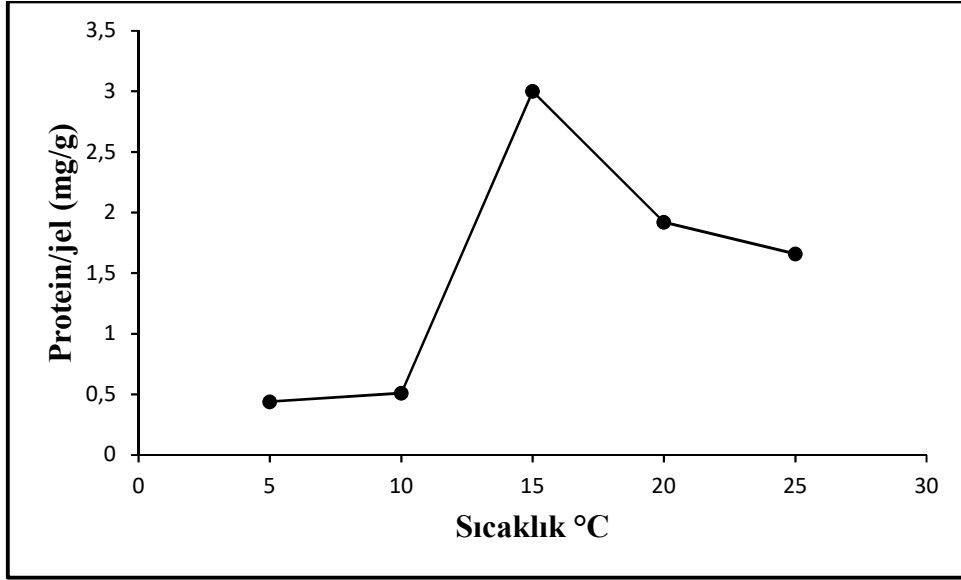
4-Amino benzohidroksamik asit türevlerinin (2a, 3a) ligand olarak kullanıldığı afinite jelleriyle saflaştırılan horseradish peroksidaz (HRP) enzimlerinin kantitatif protein tayini Lowry yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde ilk olarak standart grafik hazırlandı. HRP enzimini tutma kapasitesi değişik sıcaklık, pH ve iyonik şiddetlerde belirlendi. Deney aşamaları yöntemde anlatıldığı şekilde uygulandı.



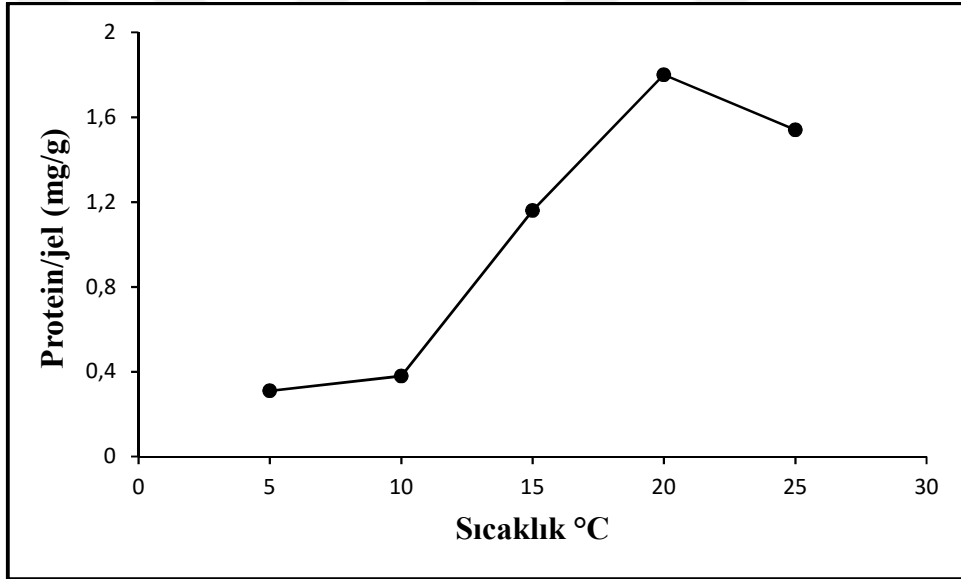
Şekil 32. Lowry metoduna göre sığır serum albümininden hazırlanan standart grafik

Kolon kapasitesine sıcaklığın etkisi sonuçları

HRP enziminde farklı sıcaklık parametrelerinde (5, 10, 15, 20, 25, 30 °C) afinite jelinin bağlama kapasitesi incelendi, sonuçlar (mg protein/g jel) Şekil 33, 34'de gösterildi.



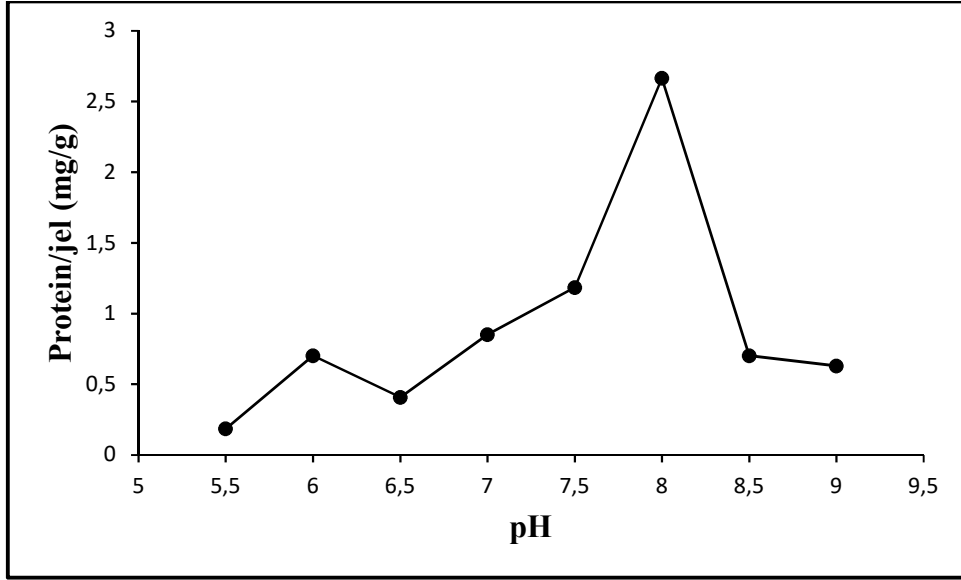
Şekil 33. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği



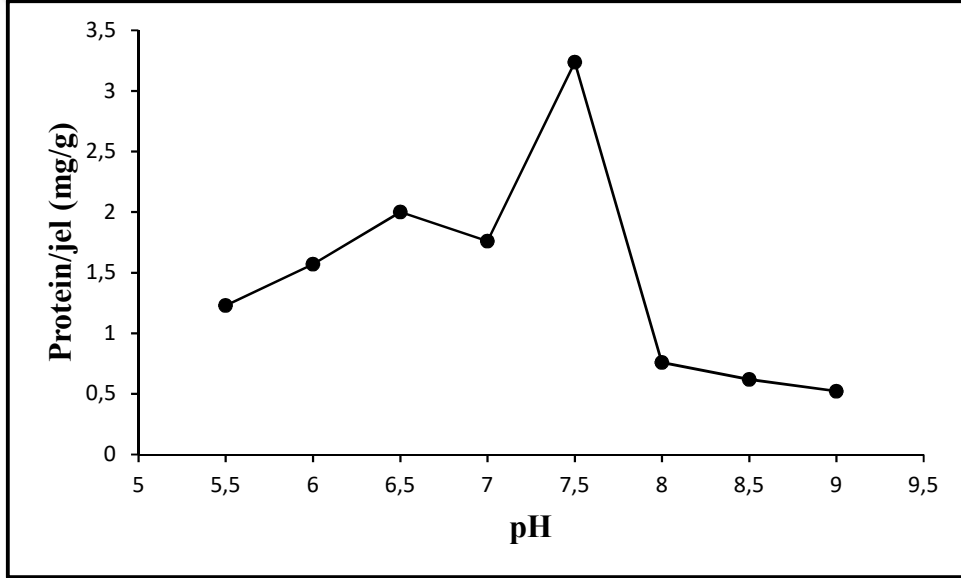
Şekil 34. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği

pH'nın kolon kapasitesine etkisi sonuçları

HRP enziminde farklı pH parametrelerinde (5,5 ile 9) arasında değişen tamponlar ile afinite kolonunda bulunan jelin bağlama kapasitesi (mg protein/g jel) Şekil 35, 36'da gösterildi.



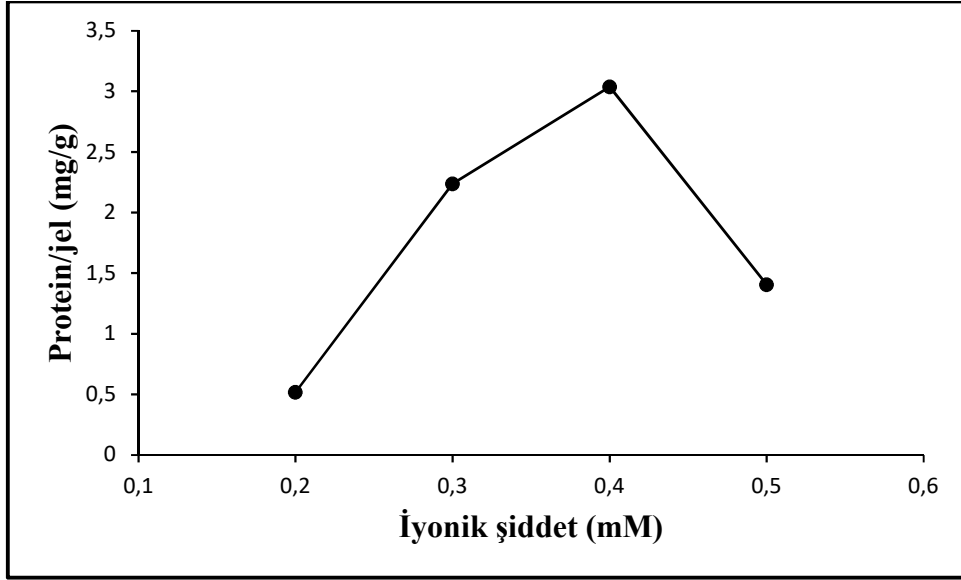
Şekil 35. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için pH-kapasite grafiği



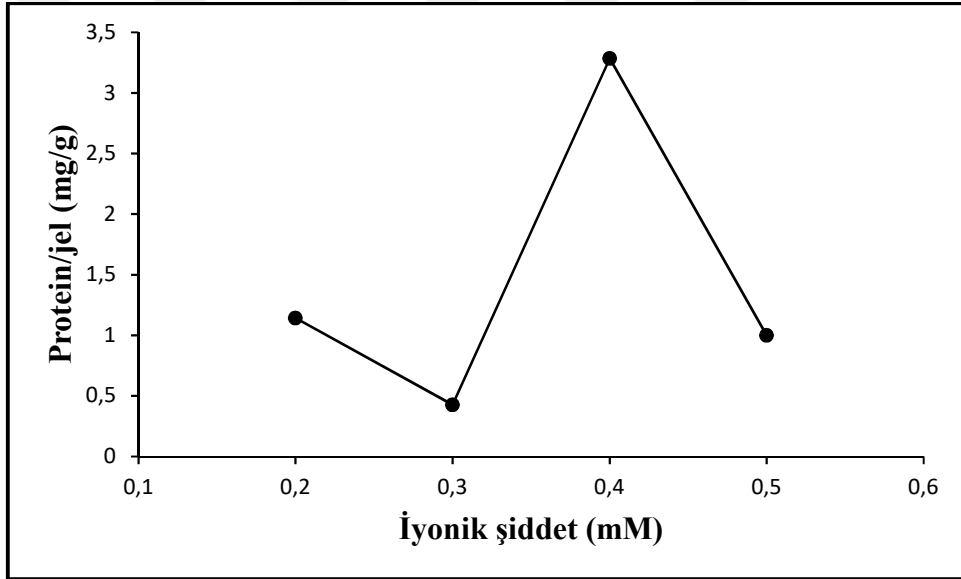
Şekil 36. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için pH-kapasite grafiği

İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi sonuçları

HRP enziminin afinite jeline bağlanması için iyonik şiddet 0,2-0,5 molar arasında deneyler gerçekleştirildi, çıkan değerler (mg protein/g jel) başına Şekil 37, 38'de gösterildi.



Şekil 37. 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği



Şekil 38. 4-Amino 3-metil benzohidroksamik asit afinite jelinin HRP enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği

TARTIŞMA VE SONUÇ

Peroksidaz enzimi bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunan hem grubu içeren bir glikoproteindir (Rompel *et al.* 2007). Bitki POD'ları, yapı, hücre duvarlarının lignifikasyonu, yaşlanma, organogenez, fenol oksidasyonu, hücre duvarı proteinlerinin çapraz bağlanması, doku hasarının korunması ve patojenik mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların önlenmesi gibi birçok önemli fizyolojik fonksiyona sahiptir (Şişecioğlu *et al.* 2012).

Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi gıda, tekstil, deri, kozmetik ve kağıt sanayilerinde kullanılan zehirli atıklar olarak değerlendirilen boyaların giderilmesinde HRP'nin etkili olduğu bilinmektedir (Önder *et al.* 2009). Organik bileşiklerin biyotransformasyonu, organik sentezleri ve H_2O_2 algılanması için biyosensörlerin oluşumu için de sıklıkla kullanılmaktadır. H_2O_2 güçlü bir oksitleyici maddedir; birikmesine izin verilirse toksik olabilir. Bu nedenle, peroksidazlar normal ve stres koşulları altında hücrelerde aşırı H_2O_2 uzaklaştırmada önemli bir rol oynar (Sarika *et al.* 2015).

Ticari öneme sahip ve uygulama alanlarının geniş olması sebebiyle Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimini saflaştırma çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Literatürde farklı kromatografik metotların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır.

Concanavalin A agaroz afinite kromatografisi kullanılarak Horseradish köklerinden peroksidaz enzimi saflaştırılmıştır. Substrat olarak 4-aminoantipirin-fenol çözeltisi kullanılarak enzim aktivitesi üzerine inhibitör, pH ve sıcaklık bakılmıştır. HRP enziminin $14,45 \times 10^{-4}M$ substrat konsantrasyonu ve $38 \times 10^{-2} \mu g$ enzim konsantrasyonunda etkili bir aktivite göstermiştir. Optimum pH değerinin 6, optimum sıcaklık değerinin ise $40^\circ C$ olduğu gözlemlenmiştir. Saflaştırılmış HRP doğal PAGE üzerinde 40 kDa bir molekül ağırlığına sahip tek bir band olarak bulunmuştur (Sarika *et al.* 2015).

Concanavalin A (con A), Merserize makro gözenekli selüloz membranlar üzerinde hareketsizleştirilmiş ve membran afinite kromatografisi için bir ligand olarak kullanılmıştır. 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin, glutaraldehit veya diazotizasyon içeren üç aktivasyon ve immobilizasyon yöntemi kullanılmış ve karşılaştırılmıştır. Hazırlanan afinite membranları, sırasıyla yaban turpu ve ticari peroksidazdan peroksidazın ayrılması ve saflaştırılması için kullanılmıştır. Ayırma ve saflaştırma, substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) kullanılıp peroksidaz aktivitesi izlenmiştir. Yaban turpundan ayırmak için, %24,5 verim ve 142 kat saflaştırma sağlanmıştır; ticari bir numunenin

saflaştırılması için %71 verim ve 2,3 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır (Guo and Ruckenstein 2003).

Yaban turpu peroksidazının saflaştırılması için Sepharose'a bağlı concanavalin A üzerinde afinite kromatografisi tekniği ile %73 verimle 2,3 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış yaban turpu peroksidazının karakterizasyonu, hem 403 nm'de absorbansa hem de protein içeriğine göre artan bir enzimatik aktivite göstermiştir (Brattain *et al.* 1976).

Yaban turpu peroksidazı (HRP), diyaliz edilmiş sulu ekstraktan iki aşamalı ters misel özütleme ile yaban turpu köklerinden saflaştırılmıştır. Ters misel fazları üretmek için izooktan içinde çözünen anyonik yüzey aktif madde AOT kullanılmıştır. %46 verimle 80 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. SDS-PAGE yapılarak 43,8 kDa da üst üste binen iki bant görülmüştür (Regalado *et al.* 1996).

Concanavalin A'ya sahip süper makro gözenekli kriyojeller hazırlanarak yaban turpu peroksidazı üç kromatografik yöntemle saflaştırılmıştır. Kriyojellerin yaban turpu peroksidaz bağlanması 3,85 mg/g kriyojel olarak bulunmuştur. Ayrıca saflaştırma kat sayısı 115,1 kat olarak belirlenmiştir (Keçili *et al.* 2018).

Yaban turpu (*Armoracia rusticana*) köklerinden elde edilen peroksidaz ultrasonikasyon, amonyum sülfat tuz çöktürmesi ve fenil Sepharose CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak üç aşamada saflaştırılmıştır. Bu çalışma sonunda 772 (EÜ/mg) spesifik aktivite, % 71,3 verim ve 291 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. (Lavery *et al.* 2010).

Horseradish peroksidaz enzimi üç kromatografik yöntemle saflaştırılarak aktivitesi 6,3027'den 9,9452 (EÜ/mg) spesifik aktiviteye yükseltilmiş ve 45,77 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır (Khurshid *et al.* 2012).

Yaban turpu (*Armoracia rusticana*) köklerinden peroksidazı yüksek verimde saflaştırmak için yüksek yoğunluklu Concanavalin A hazırlanması çalışılmıştır. İki aşamadan oluşan saflaştırma tekniği ile %73 verimle 14 kat saflaştırma kat sayısına ulaşılmıştır (Fraguas *et al.* 2004).

HRP enzimi iyon değişim kromatografisi tekniği (DEAE-Sepharose reçinesi) ile 52,52 (EU/ml) olarak saflaştırılmıştır (Lestari 2020).

Yaban turpu peroksidazının (HRP) horseradish köklerinden iki aşamalı bir yöntem kullanılarak % 0,15 verim ile 84,26 kat saflaştırma ve % 0,10 verim ile 9,15 kat saflaştırma elde edilmiştir (Ji *et al.* 2021). Başka bir çalışmada iki aşamalı ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak

642,6 (EU/mg) spesifik aktivitesi ve %86 verim ile 238 kat saflaştırılmıştır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez ile molekül ağırlığı yaklaşık 41 kDa'da gözlenmiştir (Qin 2015).

Biyomakro moleküllerin saflaştırılmasında kullanılan afinite kromatografisi, diğer kromatografik yöntemler ile kıyaslandığında etkinlik, verim ve ekonomik açıdan oldukça önem arz etmektedir. Fakat afinite için ligand sentezlemek ve dolgu maddesine bağlayacak kimyasal bir yöntemi geliştirmek oldukça zor ve üzerinde çok çalışılması gereken bir prosestir. Bu bağlamda daha önce bu alanda yapmış olduğumuz çalışmalar ve ön denemeler ışığında, sistematik bir yaklaşımla 4-amino benzohidroksamik asit türevleri sentezlenerek HRP saflaştırılmasında kullanılacak yeni ligantlar afinite kromatografi kütüphanesine eklenecektir.

Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada 26 aminobenzohidrazid türevi sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve yeni HRP inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Bu moleküllerin HRP enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Afinite kromatografisi tekniği ile sepharose-4B'ye bağlı benzohidrazid türevleri ligand olarak kullanılmıştır. Her bir afinite jelinden HRP enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılma sonuçlarına göre 4-Amino 3-bromo benzohidrazid ve 3-Amino 4-kloro molekülü kullanılarak sırasıyla %8,5 ve %16,67 verim bulunarak literatüre kazandırılmıştır (Almaz *et al.* 2021).

Bu tez kapsamında ise verimi artırmak ve saflaştırma çalışmalarını daha ileri götürmeye yönelik yapılan çalışmalarda yaban turpu bitkisinden HRP enzimini saflaştırmak için yeni ligandların tasarımı ve sentezi yapıldı. (4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**), 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**)) kullanıldı.

HRP, farklı enzim inhibitörlerinin kinetik mekanizmalarının ve parametrelerinin araştırılması için iyi bir model olarak kabul edildiği literatürdeki çalışmalarda kanıtlanmıştır

2017 yılında yapılan bir çalışmada on üç tane sentezlenmiş flavonoidin aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi çalışmaları gösterilmiştir. Substrat olarak 4-metil katekol kullanılarak optimize edilmiştir. Bu flavonoidlerin 0,14 – 0,01 ile 65 – 0,04 mM arasında değişen K_i değerleri ile peroksidazı inhibe ettiği belirlenmiştir. Çalışılan inhibitörler, tiroid hastalıklarını kontrol etmek için yeni moleküllerin geliştirilmesine yardımcı olabilecek umut verici HRP inhibitörleri olabileceğini göstermiştir (Mahfoudi *et al.* 2017).

Yaban turpu peroksidazın 4-Amino antipirin oksidasyonunun merkaptasetik asit ve merkaptetanol tarafından inhibisyonları karşılaştırılmıştır. Merkaptetanol ve merkaptasetik asit için IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. Belirlenen IC_{50} değerleri kinetik çalışmalar için kullanılmıştır. Enzim aktivitesi için substrat olarak 4-Amino antipirin kullanılmış olup inhibitörlerin varlığında ölçümler yapılmıştır. Merkaptetanolün peroksidaz aktivitesi üzerinde merkaptasetik asitten daha güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur. Kinetik çalışmalarda, her iki durumda da karışık tipte yarışmasız inhibisyon gösterdiği görülmüştür. Bu tip inhibitörlerin AIDS'in tedavisinde diğer anti-viral ilaçlar ile kombinasyon halinde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir (Sariri *et al.* 2006b).

Bu tezde ise HRP enzimi üzerine amino benzohidroksamik asit türevlerinin inhibisyon etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda inhibitör eklenerek aktivite değerleri hesaplandı ve elde edilen verilerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. HRP enzimi için oluşturulan grafikler Şekil 20, 22, 24 ve 26'da gösterildi ve IC_{50} değerleri: 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**) için; 306 μ M, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**) için; 56 μ M, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) için; 0,136 μ M ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) için; 218,33 μ M olarak hesaplandı. Daha sonra HRP enziminin K_i değerlerini hesaplamak için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda ve 5 farklı guaiakol konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**), 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**), 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) moleküllerinin HRP enzimi üzerine K_i değerlerini ve inhibisyon çeşitlerini bulmak için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Lineweaver *et al.* 1934). Grafikler Şekil 21, 23, 25 ve 27'de gösterildi. Yapılan çalışma sonucu elde edilen K_i değerleri: 1a molekülü için; $218 \pm 68,8 \mu$ M, 2a molekülü için; $51,9 \pm 9,9 \mu$ M, 3a molekülü için; $0,132 \pm 0,054 \mu$ M ve 4a molekülü için ise; $175,67 \pm 43,78 \mu$ M'dır. Sonuçlar, çalışılan tüm hidroksamik asitler ile HRP katalitik bölgesi arasındaki etkileşimleri daha iyi anlamaya ve yeni moleküller geliştirmeye yardımcı olabilecek umut verici HRP inhibitörleri olabileceğini gösterdi.

HRP enziminin aktivite ölçümü belirlendi (Şişecioğlu *et al.* 2010). CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 μ mol madde alınarak Sepharose-4B-L-tirozin jelleri hazırlandı. Afinite jellerinin FT-IR ile kontrolü sağlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, 470 nm'de yüksek aktivite gösteren eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

HRP enzimi afinite kromatografisinde 4-amino 2-metoksi benzohidroksamik asit (**1a**) ile %35,97 verimle 601,13 kat, 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit (**2a**) ile %14,00 verimle

404,11 kat, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit (**3a**) ile %8,70 verim ile 394,88 kat ve 4-amino 3-kloro benzohidroksamik asit (**4a**) ile %4,48 verim ile 284,85 kat saflaştırıldı. HRP enzim saflaştırma sonuçları Tablo 22’de verildi.

Literatürde farklı kaynaklardan POD enzimlerinin saflaştırılması çalışmalarında farklı molekül ağırlığına sahip birçok izozim yapısı tespit edilmiştir. SDS-PAGE yöntemiyle POD’ların molekül ağırlıkları; şalgamda 65,8 (Kalin *et al.* 2014), mor lahanada 69,3 kDa (Somturk *et al.* 2014), yaban turpunda 44 kDa (Almaz *et al.* 2021), soğan köklerinde 51,2 kDa (Öztekin 2020), börülcede 39 kDa (Taşbaşı 2021), pazıda 37 kDa (Boldaz 2021) olarak bulunmuştur. Peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıkları, saflaştırılan kaynağa göre değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmamızda ise afinite tekniği kullanarak tek kademede saflaştırdığımız HRP enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40-50 kDa aralığında hesaplandı ve SDS-PAGE Şekil 29 ve 30’da gösterildi. Ayrıca western blot tekniği uygulanarak enzim saflığı Şekil 31’de doğrulandı.

HRP enzimi saflaştırılmasında 4-amino 3-bromo benzohidrazid ve 3-amino 4-kloro benzohidrazid kolonlarının kullanıldığı bir çalışmada kolon kapasitesi incelenmiş ve 4-amino 3-bromo benzohidrazid için sıcaklık 20 °C, pH 8,5 ve iyonik şiddet 0,35 M, 3-amino 4-kloro benzohidrazid için ise sıcaklık 15 °C, pH 8,0 ve iyonik şiddet 0,40 M optimum şartları gözlemlenmiştir. Optimum bağlanma kapasitesi ise 4-amino 3-bromo benzohidrazid için 2,680 mg/g-jel, 3-Amino 4-kloro benzohidrazid için 3,420 mg/g-jel olarak bulunmuştur (Almaz *et al.* 2021). Erel tarafından yapılan çalışmada 4-amino-2-nitro benzohidrazid, 3-amino-5-metoksi benzohidrazid kolonları için kolon kapasitesi incelenmiş ve optimum şartlar sırasıyla sıcaklık 20°C, pH 7,5 ve iyonik şiddet 0,3 M; sıcaklık 20°C, pH 7 ve iyonik şiddet 0,2 M bulunmuştur. Kolonlar için optimum bağlanma kapasitesi ise sırasıyla 2,363 mg/g jel ve 2,060 mg/g jel olarak belirlenmiştir (Erel 2019).

Bu tez kapsamında; HRP enziminin saflaştırılmasında 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit ve 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit ile yapılan kolonlardan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8 de (5 ile 25°C) aralıklarında, farklı sıcaklıklarda (mg protein /g) jel başına sonuçları grafik edildi. Şekil 33 ve 34’ de gösterildi.

HRP enzimi ile kolonun etkileşiminde pH’nın etkisini saptayabilmek için pH’sı 5,5 ile 9 arasında değişen tampon çözeltiler kullanılmıştır. En iyi bağlanmanın gözlemlendiği pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 35 ve Şekil 36’da grafik edildi. Buradan 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit için pH:8,0 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit için ise pH:7,5 da en iyi bağlanma olduğu belirlendi.

Kolonların bağlanma kapasitelerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile 0,2 M ile 0,5 M arasında değiştirilerek sonuçlar grafiklerle gösterildi. Şekil 37 ve Şekil 38’de görüldüğü gibi 4-amino 3-nitro benzohidroksamik asit için 0,4 M, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit için 0,4 M’da bağlanmanın maksimum olduğu belirlendi. Kapasite sonuçlarına göre, 4-Amino 3-nitro benzohidroksamik asit için 15°C’de pH 8,0’de 0,4 M’da optimum bağlanma 2,90 mg/g jel, 4-amino 3-metil benzohidroksamik asit için ise 2,77 mg/g jel olarak tespit edildi.

Bu çalışma sonucunda gerçekleştirilen afinite kromatografisi ile HRP enziminin tek basamakta ve yüksek verimde saflaştırılmasında kullanılan 4-Amino 2-metoksi benzohidroksamik asit molekülü literatüre kazandırılmıştır.

Bu tez kapsamında;

1. Aromatik halkada amino grubu içeren benzoik asitlerin (1a-2a-3a-4a) metil esterlerinden çıkılarak hidroksamik asit bileşiklerinin sentezleri yapıldı.
2. HRP enzimi üzerine sentezlenen hidroksamik asit moleküllerinin inhibisyonlarına bakılarak IC₅₀, K_i, ve inhibisyon tipleri tespit edildi.
3. Dönüşümlü inhibisyon gösteren hidroksamik asit türevleri Sepharose-4B-L-tirozin destek materyaline kovalent bağlanma ile afinite jelleri sentezlendi ve FT-IR ile afinite jeli kontrol edildi.
4. Sentezi yapılan her bir afinite jelinden yaban turpu (horseradish) ekstraktları geçirilerek HRP enzimlerinin tek basamakta saflaştırılması gerçekleştirildi.
5. Saflaştırmalar sonucunda elde edilen HRP için SDS-PAGE ve western blot ile enzim saflığı kontrol edildi.
6. Saflaştırma tabloları hazırlanarak, yüzde verimler ve spesifik aktiviteler hesaplandı.
7. Saflaştırılmada afinite kolonunun enzimi bağlama kapasitesi üzerine iyonik şiddet, pH, sıcaklık gibi değerler belirlendi.

KAYNAKLAR

- Abak, Ç., 2021. Şevketibostan (Cnicus Benedictus) bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.
- Aghelan, Z., & Shariat S.Z.S., 2015. Partial purification and biochemical characterization of peroxidase from rosemary (Rosmarinus officinalis L.) leaves. *Advanced biomedical research*, 4:159.
- Agunbiade, O. J., Famutimi O. G., Kadiri F. A., Kolapo O. A., Adewale I. O., 2021. Studies on peroxidase from Moringa oleifera Lam leaves. *Heliyon*, 7(1), e06032.
- Aibara, S., Kobayashi T., Morita Y., 1981. Isolation and properties of basic isoenzymes of horseradish peroxidase. *The Journal of Biochemistry*, 90(2), 489–96.
- Aibara, S., Yamashita H., Mori E., Kato M., Morita Y., 1982. Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase. *The Journal of Biochemistry* 92(2), 531–539.
- Al-Bagmi, M. S., Khan, M. S., Ismael, M. A., Al-Senaidy, A. M., Bacha, A. B., Husain, F. M., & Alamery, S. F., 2019. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi journal of Biological Sciences*, 26(2), 301-307.
- Alemzadeh, I., Nejati S., 2009. Phenols removal by immobilized Horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 1082-1086.
- Almaz, Z., Oztekin A., Abul N., Gerni S., Erel D., Kocak S. M., ... & Ozdemir, H. 2021. A new approach for affinity-based purification of horseradish peroxidase. *Biotechnology and applied biochemistry*, 68(1), 102-113.
- Almulaiky, Y. Q., & Almulaiky Y. Q., 2020. Peroxidase from Coleus Forskohlii: Purification and Biochemical Characterization. *International Journal of Nutrition*, 5(1), 9-20.
- Azevedo, A.M., Martins V.C., Prazeres D.M., Vojinovic V., Cabral J.M., Fonseca L.P., 2003. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology annual review*, 9(3), 1387-2656.
- Bach, A. and Chodat R., 1903. Untersuchungen u"ber die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IV. Ueber Peroxydase. Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 36, 600–605.
- Brattain, M.G., Marks, M.E., Pretlow, T.G., 1976. Purification of Horseradish-peroxidase by affinity chromatography on sepharose-bound concanavalin-A. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 346–352
- Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., Hajdu, J., 2002. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417(6887), 463–468.
- Bernroitner, M., Zamocky M., Furtmuller, P.G., Peschek, G.A., Obinger C., 2009. Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *Journal of experimental botany*, 60(2), 423-440.
- Bhatti, H.N., Najma A., Asgher, M., Hanif, M., Zia, M., 2006. Purification and thermal characterization of a novel peroxidase from a local chick pea cultivar. *Protein and peptide letters*, 13(8),799–804.

- Bhunja, A., Durani, S., & Wangikar, P. P., 2002. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(5), 562–567.
- Boldaz, B., 2021. Pazı Kökü (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Substrat Spesifikliğin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Caramyshev, A.V., Firsova, Y.N., Slasya, E.A., Tagaev, A.A., Potapenko, N.V., Lobakova, E.S., Pletjushkina, O.Y., Sakharov, I.Y., 2006. Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 9888–9894.
- Cardinali, A., Tursi, N., Ligorio, A., Giuffrida, M.G., Napolitano, L., Caliandro, R., Sergio, L., Di, Venere D., Lattanzio, V., Sonnante, G., 2011. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 395–403.
- Chanwun, T., Muhamad, N., Chirapongsatunkul, N., Churngchow, N., 2013. Hevea brasiliensis cell suspension peroxidase: Purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express*, 3 (1), 1–9.
- Cheng, M., De, B., Pikul, S., Almstead, N. G., Natchus, M. G., Anastasio, M. V., & Wang-Weigand, S., 2000. Design and synthesis of piperazine-based matrix metalloproteinase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 43(3), 369-380.
- Chiou, C. C., Chang, P. Y., Chan, E. C., Wu, T. L., Tsao, K. C., & Wu, J. T., 2003. Urinary 8-hydroxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinical chemistry acta*, 334(1-2), 87–94.
- Cuatrecasa, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography: derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059–3065.
- Dahdouh, A., Bachir-Bey, M., & Kati, D. E., 2020. Optimization of peroxidase activity of turnip (*Brassica rapa*) using response surface methodology. *Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology*, 24(2), 186–194.
- De Gara, L., 2004. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 195–205.
- Deepa, S. S., & Arumughan, C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61(5), 503-511.
- Dick, G. J., Podell, S., Johnson, H. A., Rivera-Espinoza, Y., Bernier-Latmani, R., McCarthy, J.K., & Tebo, B. M., 2008. Genomic insights into Mn (II) oxidation by the marine alpha proteobacterium *Aurantimonas* sp. strain SI85-9A1. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), 2646-2658.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250(1), 10-17.
- Dunford, H. B. and Jones, P. A., 2010. Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology, 2nd Edition, John Wiley and Sons Inc.
- Dunford, H.B., 1999. Heme peroxidases. Wiley–VCH, New York.
- Erel, D., 2019. Horseradish Peroksidaz (Hrp) Enzimi Üzerine Bazı Benzohidrazid Türevlerinin Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

- Fraguas, L. F., Batista-Viera, F., Carlsson, J., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from Horseradish roots. *Journal of Chromatography B*, 803(2), 237-241.
- Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J. K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y., Okada, H., 1988. Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *European journal of biochemistry*, 173(3), 681–687.
- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., Poulos, T.L., 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 angstrom resolution. *Nature structural biology*, 4(12), 1032–1038.
- Galende, P.P., Cuadrado, N.H., Arellano, J.B., Gavilanes, F., Kostetsky, E.Y., Zhadan, G.G., Villar, E., Roig, M.G., Kennedy, J.F., Shnyrov, V.L., 2015. Purification and structural stability of white spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. *International journal of biological macromolecules*, 72, 718-723.
- Govere, E.M., Tonegawa, M., Bruns, M.A., Wheeler, E.F., Kephart, K.B., Voigt, J.W., 2007. Using minced Horseradish roots and peroxidase for the deodorization of swine manure: A pilot scale study. *Bioresourse Technology*, 98, 1191–1198.
- Grigorenko, V.G., Andreeva, I.P., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M., 2015. Recombinant horseradish peroxidase: production and analytical applications. *Biochemistry (Moscow)*, 80(4), 408-416.
- Gu, T., Hsu, K. H., & Syu, M. J., 2003. Scale-up of affinity chromatography for purification of enzymes and other proteins. *Enzyme and microbial technology*, 33(4), 430-437.
- Gulcin, İ., & Yildirim, A., 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. *Acephala*.
- Guo, W., & Ruckenstein, E., 2003. Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *Journal of Membrane Science*, 211(1), 101-111.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Hamid, M., 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177– 1186.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42 (5), 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y. and Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium Ion Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72–77.
- Hnasko, R. M., 2015. Bioconjugation of Antibodies to Horseradish Peroxidase (HRP). *Methods in Molecular Biology*, 1318, 43-50.
- Hoyle M.C., 1977. High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiology*, 60(5), 787–793.
- Hu, Y., Wu, J., Luo, P., Mo, Y., 2012. Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2752-2756.
- Humer, D., Furlanetto, V., Schruelf, A. K., Wlodarczyk, A., Kuttke, M., Divne, C., & Spadiut, O., 2021. Potential of unglycosylated horseradish peroxidase variants for enzyme prodrug cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112037.

- Inal, S., Kalin, R., Ozdemir, N., Ozdemir, H., 2015. Purification and characterization of red beet (*Beta vulgaris*) peroxidase. *Biochemistry & Molecular Biology Letters*, 1(1), 37-49.
- Jeong, Y. M., Oh, M. H., Kim, S. Y., Li, H., Yun, H. Y., Baek, K. J., & Kim, D. S., 2010. Indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase induces apoptosis in TCCSUP human urinary bladder carcinoma cells. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(2), 122–126.
- Jermyn, M. A., Thomas, R., 1954. Multiple components in horseradish peroxidase. *Biochemical Journal*, 56(4), 631-639.
- Jermyn, M.A., 1952. Multiple nature of the enzymes of *aspergillus oryzae* and of horseradish: Horseradish peroxidase. *Nature*, 169(4299), 488–489.
- Ji, W., Ao, W., Sun, M., Feng, C., & Wang, Y., 2021. Separation and purification of horseradish peroxidase from horseradish roots using a novel integrated method. *New Journal of Chemistry*, 45(4), 1959-1966.
- Kalın, R., 2018. Bitkisel Kaynaklardan Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Rasemik Hidroperoksidin Enantiyo Seçimli İndirgenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Kalin, R., Atasever, A., Ozdemir, H., 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from turkish blackradish and turnip roots. *Food Chemistry*, 150, 335-340.
- Kampis, A., Bartucz-kovacs, O., Hoschke, A., & Vámos-Vigyázo, L., 1984. Changes in peroxidase activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17(5), 293–295.
- Kangasjärvi, S., Lepistö, A., Hännikäinen, K., Piippo, M., Luomala, E. M., Aro, E. M., & Rintamäki, E., 2008 Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal*, 412(2), 275-285.
- Kay, E., Shannon, L. M., Lew, J.Y., 1967. Peroxidase isozymes from horseradish roots. II. Catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 242(10), 2470-2473.
- Keçili, R., Çelikoğlu, U., Mil, S., Ersöz, A., & Say, R., 2018. Concanavalin A photocross-linked affinity cryogels for the purification of horseradish peroxidase. *Adsorption Science & Technology*, 36(3-4), 1199-1212.
- Keha, E. ve Kürevioğlu. Ö.İ., 2012. Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- Khurshid, S., Qureshi, M. Z., Ibrahim, A., Nawaz, Z., Sajid, A., & Ikram, M., 2012. Production and purification of horseradish peroxidase in Pakistan. *International Journal of the Physical Sciences*, 7(19), 2706–2712.
- Köksal, E., & Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15(4), 320-326.
- Köktepe, T., 2018. Kuru Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Erzincan.
- Krainer, F.W., Glieder, A., 2015. An updated view on Horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(4), 1611-1625.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

- 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(15), 8471–8476.
- Leon, J. C., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I. Y., Csoregi, E., Sakharov, I. Y., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163(5), 1011–1019.
- Lestari, F. P., Al-Baarri, A. N. M., Widayat, & Legowo, A. M., 2020. Single-step purification of peroxidase enzyme from Horseradish (*Raphanus sativus* L.). Paper presented at the Proceedings of 2nd International Conference on Chemical Process and Product Engineering (Iccppe).
- Li, Q., Wang, X., Xiong, X., Zhu, S., Meng, Z., Hong, Y., ... Lin, Y., 2020. Graphene-supported biomimetic catalysts with synergistic effect of adsorption and degradation for efficient dye capture and removal. *Chinese Chemical Letters*, 31 (1), 239–243.
- Lomillo, M.A.A., Ruiz, J.G., Pascual, F.J.M., 2005. Biosensor based on platinum chips for glucose determination. *Analytica Chimica Acta*, 547(2), 209–214.
- Mahfoudi, R., Djeridane, A., Benarous, K., Gaydou, E. M., & Yousfi, M., 2017. Structure-activity relationships and molecular docking of thirteen synthesized flavonoids as horseradish peroxidase inhibitors. *Bioorganic chemistry*, 74, 201-211.
- Mall, R., Naik, G., Mina, U., Mishra, S. K., 2013. Purification and characterization of a thermostable soluble peroxidase from *Citrus medica* leaf, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(2), 137-151.
- Malstrom, B. G., 1970. Biochemical Functions of Iron Deficiency, Academic Press, NewYork.
- Marklund, S., Ohlsson, P. I., Opara, A., Paul, K. G., 1974. The substrate profiles of the acidic and slightly basic horseradish peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 350(2), 304–313.
- Marquez, O., Waliszewski, K. N., Oliart, R. M., & Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Food Science and Technology*, 41(8), 1372-1379.
- Martinez, M., Ruiz-Duenas, F.J., Guillen, F., Martinez, A.T., 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, 237(2), 424-432.
- Marzouki, S.M., Limam, F., Smaali, M. I., Ulber, R., Marzouki, M. N., 2005. A new thermostable peroxidase from garlic *Allium sativum*: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127(3), 201–214.
- McCall, K. A., Huang, C. C., Fierke, C. A., 2000. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1437S–1446S.
- Miranda M.V, Lahore H.M.F and Cascone O., 1995. Horseradish peroxidase extraction and purification by aqueous two-phase partition. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 53(2), 147–154.
- Miranda, M.V., Lahore, H.M.F., Cascone, O., & Dobrecky, J., 1998 The extraction and purification of peroxidase from plant raw materials in aqueous two-phase systems. *Acta Biotechnologica* 18(3), 179–188.
- Mohamed, S. A., El-Badry, M. O., Drees, E. A., Fahmy, A. S., 2008. Properties of a cationic peroxidase from *Citrus jambhiri* cv. Adalia. *Applied biochemistry and biotechnology*, 150(2), 127-137.

- Mohan, S.V., Prasad, K.K., Rao, N.C., Sarma, P. N., 2005. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere* 58(8), 1097–1105.
- Morsi, R., Bilal, M., Iqbal, H.M., Ashraf, S.S., 2020. Laccases and peroxidases: the smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Science of the total environment*, 714, 136572.
- Murakami, S., Takahara, H., & Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68(6), 777–784.
- Näätäsaari, L., Krainer, F. W., Schubert, M., Glieder, A., Thallinger, G.G., 2014. Peroxidase gene discovery from the horseradish transcriptome. *BMC Genomics*, 15(1), 1-16.
- Ngo, T.T., 2010. Peroxidase in chemical and biochemical analysis. *Analytical Letters*, 43(10-11), 1572-1587.
- Nielands, J.B., 1974. Microbial Iron Metabolism, Academic Press, New York.
- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J., & Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85(3), 365–376.
- Oztekin, A., & Tasbasi, S., 2020. A novel peroxidase from runner bean (*Phaseolus coccineus* L.): Enhanced affinity purification, characterization, and dye decolorization activity. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13411.
- Oztekin, A., 2020. Guaiakol Peroksidazın Soğan Köklerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 1163-1170.
- Oztekin, A., Almaz, Z., and Onlu, S., 2021. Production and purification of peroxidases from callus cultures of white and red cabbage for enzymatic decolourization of reactive blue 19 and acid blue 25 dyes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1- 10.
- Oztekin, A., Almaz, Z., Gerni, S., Erel, D., Kocak, S. M., Sengül, M. E., & Ozdemir, H., 2019. Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. *Journal of Chromatography B*, 1114, 86-92.
- Önder, R.S., Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Kuzu, H., 2009. He effect of Horseradish peroxidase (HRP)-dextran conjugate on naphtol blue black. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 27, 18-25.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N., 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem*, 6(1), 308.
- Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F. K., Pinheiro-Margis, M., Penel, C., & Dunand, C., 2007. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organellar-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics*, 89(5), 567-579.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., ... & Dunand, C., 2007. PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605-1611.
- Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., Obinger, C., & Dunand, C., 2007. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are these patches of order in chaos *Gene*, 397(1-2), 101-113.
- Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M. J., ... & Martínez, A. T., 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways; *Journal of Molecular Biology*, 354(2), 385-402.

- Peşint, G. B., Zenger, O., Perçin, I., & Denizli, A., 2021. Spongy membranes for peroxidase purification from Brassica oleracea roots. *Process Biochemistry*, 103, 98-106.
- Petronijevic, M., Panic, S., Savic, S., Agbaba, J., Molnar Jazic, J., Milanovic, M., & Durisic-Mladenovic, N., 2021. Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 208, 112038.
- Piontek, K., Smith, A. T., Blodig, W., 2001. Lignin peroxidase structure and function. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 111-116.
- Qin, M., 2015. Production and purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots using ultrafiltration, *Research Journal of Biotechnology*, 10(2), 43-45.
- Regalado, C., Asenjo, J. A., & Pyle, D. L., 1996. Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reverse micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(5), 332-339.
- Regalado, C., García-Almendárez, B. E., Duarte-Vázquez, M. A., 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 243-256.
- Robert. K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and 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 of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1537-1541.
- Rojas-Reyes, J. O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Castro Matinez, C., Waliszewski, K. N., Aguilar-Uscanga, M. G., 2014. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1844-1853.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., Büldt-Karentzzopoulos, K., Jasper, B., & Krebs, B., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and proteomics*, 1774(11), 1422-1430.
- Sakai, S., Khanmohammadi, M., Khoshfetrat, AB ve Taya, M., 2014. Her ikisi de fenolik hidroksil gruplarına sahip olan kitosan ve poli (vinil alkol) türevlerinden yaban turpu peroksidaz katalizli hidrojel oluşumu. *Karbonhidrat polimerleri*, 111, 404-409.
- Sakharov, I.Y., 2001. Long-term chemiluminescent signal is produced in the course of luminol peroxidation catalyzed by peroxidase isolated from leaves of African oil palm tree. *Biochemistry (Moscow)*, 66(5), 515-519.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S. and Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101(4), 1571-1579.
- Sarika, D., Kumar, P.S.S.A., Arshad, S., Sukumaran, M. K., 2015. Purification and evaluation of Horseradish peroxidase activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4 (7), 367-375.

- Sariri, R., Jafarian, V., Hassan Sajedi, R., Khajeh, Kh., 2006b. Inhibition of Horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid, *Journal of Molecular Liquids*, 128, 175–177.
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Shannon, L.M., Kay, E., Lew, J.Y., 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *Journal of Biological Chemistry*, 241(9), 2166–2172.
- Sharma, S. K., Sehgal, N., & Kumar, A., 2002. A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechnology Letters*, 24(20), 1737-1739.
- Sharp, K. H., Mewies, M., Moody, P. C., Raven, E. L., 2003. Crystal structure of the ascorbate peroxidase–ascorbate complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 10(4), 303-307.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305-1319.
- Shih, J. H., Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J.Y., 1971. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. IV. Structural relationships. *Journal of Biological Chemistry* 246(14), 4546–4551.
- Singh, N., Gade, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32(1), 39–49.
- Sisecioglu, M., Gulcin, I., Cankaya, M., Ozdemir, H. 2012. The inhibitory effects of L-Adrenaline on lactoperoxidase enzyme (LPO) purified from bovine milk. *International Journal of Food Properties*, 15(6), 1190-1199.
- Sisecioglu, M., Gulcin, İ., Cankaya, M., Atasever, A., Sehitoglu, M.H., Kaya, H.B. and Ozdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., and Nieman, T. A., 1998. Principles of Instrumental Analysis. Ed. Harbor Drive, part IV, Orlando Florida.
- Skulachev, V.P., 1998. Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Letters*, 423(3), 275-280.
- So'derhall, K., 1999. Invertebrate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 23(4-5), 263-266.
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T., Ogura, N., 1991. Purification and some properties of peroxidase from kiwifruit. *Agricultural and biological chemistry*, 55(6), 1677-1678.
- Somturk, B., Kalin, R., and Ozdemir, N., 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* Var. Capitata F. Rubra) by affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(7), 1815-1828.
- Strickland, E. H., Kay, E., Shannon, L. M., Horwitz, J.O.S.E.P.H., 1968. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots: III. Circular dichroism of isoenzymes and apoisoenzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 243(13), 3560–3565.
- Taşbaşı, Ş., 2021. Börülce Bitkisinden (*Vigna Unguiculata*) Afinite Tekniği Kullanılarak Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı.
- Telefoncu, A. and Kılınç, A., 2009. Protein analitiği, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.

- Telofoncu, A., Erbil, M.K., Zihnioğlu, F., Kılınç, A., 2007. Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler, 402, 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.
- Thongsook, T. and Barrett D.M., 2005. Heat inactivation and reactivation of broccoli peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 3215-3222.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., Simon, P., 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288(1-2), 129–138.
- Tupper, J., Stratford, M.R., Hill, S., Tozer, G.M., Dachs, G.U., 2010. In vivo characterization of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid and 5-bromoindole-3-acetic acid for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy*, 17(6), 420-428.
- Tzika, E.D., Sotioudis, T.G., Papadimitriou, V., & Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology*, 228(3), 487-495.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Biology*, 38(1), 205-219.
- Vandenbroucke, R.E., Libert, C., 2014. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition, *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(12), 904–927.
- Veitch N.C., Smith A.T., 2001. Horseradish peroxidase. *Adv. Inorg. Chem.*, 51, 107-162.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Wardaman, P., 2002. Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: A new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 8(15), 1363-1374.
- Wedelsback Bladh, K., & Olsson, K. M., 2011. Introduction and use of horseradish (*Armoracia rusticana*) as food and medicine from antiquity to the present: emphasis on the Nordic countries. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 17(3), 197–213.
- Welinder, K. G., 1976. Covalent structure of the glycoprotein Horseradishperoxidase. *FEBS Letters*, 72(1), 19–23.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57(2), 467-476.
- Xu, S., Qi, H., Zhou, S., Zhang, X., Zhang, C., 2014. Mediatorless amperometric biosensor based on horseradish peroxidase and glucose oxidase cross-linked to multiwall carbon nanotubes. *Microchimica Acta*, 181(5), 535– 541.
- 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(1), 31–39.
- Yan, J., Yuan S.S., Jiang L.L., Ye X.J., Ng, T.B., Wu, Z.J., 2015. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnology* 99(12), 4961–4981.
- Zamocky, M. and Obinger, C., 2010. Molecular phylogeny of heme peroxidases. In *In Biocatalysis based on heme peroxidases* (pp. 7-35). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Zeyadi, M., 2019. Purification and characterization of peroxidase from date palm cv. Agwa fruits. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1910–1919.
- Zia, M. A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H. M. N., Abbas, R.Z., 2011. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. *African Journal of Biotechnology*, 10(33), 6300-6303.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Serpil GERNİ
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Ziya Gökalp Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı (2017)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta