



**AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVİ MOLEKÜLLER
KULLANILARAK KARATURP PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Şeyma Mehtap KOÇAK

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2018**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVİ MOLEKÜLLER
KULLANILARAK KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Şeyma Mehtap KOÇAK

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2018**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**AMİNO BENZOİDRAZİD TÜREVİ MOLEKÜLLER KULLANILARAK
KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Şeyma Mehtap KOÇAK tarafından hazırlanan bu çalışma 06/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 19/07/2018 tarih ve 29/34 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVİ MOLEKÜLLER KULLANILARAK KARATURP PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Şeyma Mehtap KOÇAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu tez kapsamında bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırma çalışmalarına katkı sağlamak amacı ile 4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid, 4-amino 2-bromo benzohidrazid ve 4-amino 3-bromo benzohidrazid molekülleri ligant olarak sentezlendi ve karaturp köklerinden peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında kullanıldı. 4-amino benzohidrazid molekülleri metilbenzoat formlarından hidrazin sentezleri yapılarak karaturp POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyali, dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllere bağlanarak afinite jelleri sentezlendi ve tek kademedeki karaturp POD enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi. 4-amino 2-bromo benzohidrazid molekülü kullanıldığında POD enzimi, karaturptan %28,5 verimle 258 kat, 4-amino 3-bromo benzohidrazid ile karaturptan %31,4 verimle 677 kat, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ile karaturptan %33,8 verimle 613,3 kat, 4-amino 3-nitro benzohidrazid ile karaturptan %7,5 verimle 365,6 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimlerin saflığı ile molekül ağırlığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Karaturp POD enzimi için 43-47 kDa'da tek bant gözlemlendi. Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino-3-bromo benzohidrazid kolonu için kolon tutma kapasitesi, karaturp POD enzimleri için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde çalışıldı. Karaturp POD enzimi için optimum şartlar: pH 7,5, sıcaklık 15°C, iyonik şiddet 0,30 M olarak hesaplandı.

2018, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Peroksidaz, Afinite kromatografisi, Karaturp, Şalgam, Saflaştırma, 4-Amino benzohidrazid türevleri

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF THE PEROXIDASE ENZYME WITH AFINITE CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE USING Amino BENZOHYDRAZIDE DERIVATIVE MOLECULES

Şeyma Mehtap KOÇAK

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this thesis, it is aimed to contribute to the purification studies of plant peroxidase enzymes 4-amino 2-nitrobenzohydrazide, 4-amino 3-nitrobenzohydrazide, 4-amino 2-bromobenzohydrazide and 4-amino 3-bromobenzohydrazide molecules was synthesized as a ligand and was used for the purification of peroxidase enzymes from radish roots. 4 amino benzohydrazide molecules was synthesized from methyl benzoate form to obtain benzohydrazide molecules and effects of inhibition on the black radish POD enzyme were studied. Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material was synthesized by binding to molecules displaying alternating inhibition effect, and purification of the single-step POD enzyme was performed. When 4-amino 2-bromo benzohydrazide was used as a ligand for the black radish POD enzyme was purified 258 fold with a yield of 28.5%, 4-amino 3-bromo benzohydrazide 677 fold with a yield of 31.4%, 4-amino 2-nitrobenzohydrazide 613.3-fold with yield of 33%, 4-amino 3-nitro benzohydrazide 365,6 fold with yield of 7,5%. Molecular weight was controlled by purity of the purified enzymes by SDS-PAGE. Single band at 43-47 kDa was observed for the black radish POD enzyme. Column retention capacity for Sepharose-4B-L-Tyrosine-4-amino-3-bromo benzohydrazide column was studied on different pH, temperature, ionic strengths for black radish POD enzymes. Optimum conditions for black radish POD enzyme was calculated as a pH 7.5, temperature 15 ° C, ionic strength 0.30 M.

2018, 70 pages

Keywords: Affinity chromatography, Peroxidase, Black Radish,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmanın tüm aşamalarında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi/Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulundan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşım Özge BALPINAR NALCI'ya,

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

Ayrıca yüksek lisans süresi boyunca maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Şeyma Mehtap KOÇAK

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim Kinetiği ve Peroksidaz Enzimi.....	1
1.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	3
1.1.2. Enzim aktivitesine etki eden faktörler.....	5
1.2. Enzimin Kinetiği	8
1.3. Enzim İnhibisyonu	11
1.3.1. Dönüşümlü İnhibisyon	12
1.3.1.a. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon	12
1.3.1.b Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon.....	12
1.3.1.c. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon	12
1.3.2. Dönüşümsüz inhibisyon	13
1.4. Peroksidaz Enzimi	13
1.5. Afinite Kromotografisi	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
2.1. Enzim saflaştırma çalışmaları	19
2.2. Çalışmanın Amacı	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.1.2. Yararlanılacak alet ve cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	23
3.2. Yöntemler.....	26
3.2.1. Protein Tayini	26

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	26
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	26
3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	27
3.3. Karatürp POD Enziminin Saflaştırılma Çalışmaları	28
3.3.1. Ligand seçimi	28
3.3.2. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....	29
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	30
3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi.....	30
3.3.4. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jellerinin hazırlanması.....	30
3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	31
3.3.4.b. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlenmesi.	31
3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi	32
3.3.5.a. Afinite kolonlarına numune uygulanması ve elüsyonu	33
3.4. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Belirlenmesi	33
3.5. Afinite Kolonunun POD Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması	34
3.5.1. Kolon kapasitesine sıcaklık etkisi	35
3.5.2. Kolon kapasitesine pH etkisi.....	35
3.5.3. Kolon kapasitesine iyonik şiddet etkisi	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. 4 Amino Benzohidrazid ve Türevlerinin Sentezlenmesi.....	36
4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması	39
4.3. Karatürp Bitkisinden POD Enzimlerinin 4-Amino Benzohidrazid Kolonu ile Saflaştırılması Sonuçları	40
4.4. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	41
4.4.1. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için karatürp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	42
4.4.2. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörü için karatürp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	45

4.4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için karaturp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	48
4.4.4. 4-Amino-3-nitro benzohidrazid inhibitörü için karaturp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar	51
4.5. Karaturp POD Enzimlerinin 4-Amino benzohidrazid Türevleri ile Saflaştırılması Sonuçları	54
4.6. SDS-PAGE Sonuçları.....	55
4.6.1. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülüyle hazırlanan afinite kolonunun karaturp POD enzimi tutma kapasitesinin belirlenmesi.....	56
4.6.1.a. Kolon kapasitesine sıcaklık etkisi ve sonuçları	56
4.6.1.b. Kolon kapasitesine pH etkisi ve sonuçları	57
4.6.1.c. Kolon kapasitesine iyonik şiddet etkisi ve sonuçları.....	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	(2Z,2'Z)-2,2'-(hidrazin-1,2-diliden)bis(3-etil-2,3-dihidrobenzo[d]tiazol-6-sulfonat)
DAB	[1,1'-bifenil]-3,3',4,4'-tetraamin
DMSO	Dimetil sülfoksit
E.C.	Enzim kod numarası
E.Ü.	Enzim ünitesi
HRP	Horseradish Peroxidase (At turpu peroksidazı)
LPO	Laktoperoksidaz enzimi
PABH	Para amino benzoikhidrazid (4-amino benzohidrazid)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
POD	Peroksidaz
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
IC ₅₀	Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimin konsantrasyonuna göre reaksiyon hızının değişimi	6
Şekil 1.2. Substrat konsantrasyonuna göre reaksiyon hızının değişimi.....	7
Şekil 1.3. Bir kimyasal reaksiyonun enzim ile ve enzim olmadan halleri için enerji diyagramı	9
Şekil 1.4. Michaelis- Menten grafiği	10
Şekil 1.5. Lineweaver-Burk grafiği	11
Şekil 1.6. Bazı peroksidaz enzimi substratları	14
Şekil 1.7. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojenperoksiti giderme mekanizması	16
Şekil 1.8. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.....	16
Şekil 1.9. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	18
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.....	27
Şekil 3.2. Karaturp POD inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller	29
Şekil 3.3. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu	31
Şekil 3.4. 4-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu.....	32
Şekil 4.1. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	36
Şekil 4.2. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	37
Şekil 4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	38
Şekil 4.4. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu	39
Şekil 4.5. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	40

Şekil 4.6. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği.....	43
Şekil 4.7. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği 1/V-1/S grafiği.....	44
Şekil 4.8. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği.....	45
Şekil 4.9. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği 1/V-1/S grafiği.....	47
Şekil 4.10. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği	48
Şekil 4.11. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği 1/V-1/S grafiği.....	50
Şekil 4.12. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği	51
Şekil 4.13. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-nitro benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği 1/V-1/S grafiği.....	53
Şekil 4.14. (1) 4-Amino 3-bromo benzohidrazid ve (2) 4-Amino 3-nitro benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	56
Şekil 4.15. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği	57
Şekil 4.16. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için pH-kapasite grafiği.....	57
Şekil 4.17. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	4
Çizelge 4.1. 4-Amino benzohidrazid kolonundan karaturp POD enzimlerinin saflaştırma sonuçları.....	41
Çizelge 4.2. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	42
Çizelge 4.3. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.	43
Çizelge 4.4. Karaturp POD enziminin 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları	44
Çizelge 4.5. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	45
Çizelge 4.6. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü	46
Çizelge 4.7. Karaturp POD enziminin 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları	47
Çizelge 4.8. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	48
Çizelge 4.9. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü	49
Çizelge 4.10. Karaturp POD enziminin 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları	50
Çizelge 4.11. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.....	51
Çizelge 4.12. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün K _i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	52

Çizelge 4.13. Karaturp POD enziminin 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları	53
Çizelge 4.14. Karaturp peroksidaz enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları	53
Çizelge 4.15. Afinite kolonlarından elde edilen Karaturp enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu	55



1. GİRİŞ

1.1. Enzim Kinetiği ve Peroksidaz Enzimi

Canlıların yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için kendi kimyasal reaksiyonlarını katalizlemeleri gerekmektedir. Bu reaksiyonların çoğunluğu mikro boyutta ve çok kompleks reaksiyonlardır. Biyolojik reaksiyonların gerçekleşebilmesi normal şartlarda uzun zaman alabilir fakat bu reaksiyonlar kataliz varlığında çok kısa zamanlarda gerçekleştiğini görmekteyiz. Katalizörler reaksiyonları hızlandırırlar ve reaksiyon esnasında fiziksel değişimlere uğrasalar da reaksiyon tamamlandığında orjinal hallerine geri döner. Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, kendileri değişmeden reaksiyon hızını 10^6 - 10^{10} kat artıran, protein yapısındaki, biyokimyasal katalizörlere enzim denir. Enzimlerin çok büyük bir kısmı protein yapıda olsa da proteinlerin hepsi enzim değildir. Enzimler 5000 kadar biyolojik reaksiyonu katalizlerler (Lehninger 2005). Bu sebeple çok sayıda enzim, farklı amaçlar için görev yapar. Her enzim reaksiyonuna özgü katalizleme yaptığı için spesifik reaksiyonlar gözlemlenir. Biyokimyasal bir reaksiyonda, enzimin etki ettiği ve ürüne (P) çevirdiği maddeye substrat (S) denir. Her enzimin kendine özgü bir substratı vardır. Enzim ile substrat arasındaki komplekse enzim-substrat kompleksi denir (Geçkil 2012).

Enzimler katalizleme işlemini yaparken üç boyutlu yapılarını kullanırlar. Bir takım enzimler ise aktivite için küçük moleküllere gereksinim duyarlar. Bu moleküller Mg^{2+} ve ya Fe^{2+} gibi bir metal iyonu olan “kofaktör”ler ve kompleks bir organik bileşik olan “koenzim”ler olabilirler. Bazı durumlarda ise aktivite için her ikisi de gerekebilir. Koenzimle beraber olan enzim molekülüne “haloenzim” denir. Herhangi bir kofaktör taşımayan enzime ise “apoenzim” denir. Apoenzimlerin protein yapısındaki dizilişleri ve aminoasit türleri her enzimde farklıdır. Bu sebeple enzimin spesifikliğini belirleyen kısım apoenzimdir (Kaplan 1987).

Enzimler yapılarına göre, basit enzimler ve bileşik enzimler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Basit enzimler, sadece proteinden meydana gelen enzimlerdir. Örnek olarak sindirim enzimleri (pepsin, tripsin, gibi enzimler) ve üreaz enzimi verilebilir. Bu enzimlerde reaksiyon, protein kısmı tarafından yürütülür. Bileşik enzimler ise, iki kısımdan meydana gelir (Kaplan 1987).

- Protein + Vitaminler
- Protein + Mineral maddeler veya metal iyonları

Enzimin aktif merkez yüzeyi, substratla etkileşen aminoasitlerden oluşmuştur. Enzimler, oldukça spesifiktirler. Her substratın spesifik bir enzimi vardır. Substratlar enzimlere göre daha küçük moleküllerdir. Reaksiyonun gerçekleştiği yer enzimin tamamına nazaran küçük bir bölgedir. Enzimlerin aktif merkezinin girintili, küçük bir oyuk ya da cep şeklinde olduğu gözlemlenmiştir (Tüzün 2005).

Substratın enzime bağlanma modelleri iki tanedir;

- **Anahtar kilit modeli:**

Substratlar, enzimlerde ki aktif bölge olarak adlandırılan özel bir bölgeye bağlanır. Enzim-substrat kompleksi oluşur (Bakan 2007).

- **İndüklenmiş uyum modeli**

Aktif bölge substrat bağlanmasına uygundur fakat bağlanma esnasında, hem enzim konformasyonu, hem de substratın üç boyutlu yapısı değişikliğe uğrar böylece aktif kompleks oluşur (Bakan 2007).

Aktif bölgelerin ortak özellikleri

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

1.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler, IUBMB tarafından sistematik olarak altı ayrı grupta sınıflandırılır ayrıca her sınıfın kendisine ait katalizlenen reaksiyon tipine göre alt sınıfları vardır. Bu sınıflandırmaya göre her enzime 4 numara verilir (E.C:1.2.3.4.). İlk numara enzimin altı sınıfını, ikinci numara etkilediği fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise enzimin sıra numarasını gösterir (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim sınıfı	Canlı sistemlerdeki biyokimyasal fonksiyonu	Tipik enzimler	Tipik polimerler
Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler	Peroksidaz, Lakkaz	Polianilinler, Polifenoller, Polistiren, Polimetil metakrilat
Transferazlar	Fonksiyonel bir grubun bir molekülden diğer bir moleküle transferini katalizlerler	PHA sentetaz, Hiyalüronik asit sentetaz, Fosforilaz	Poliester Hiyalüronik asit Amiloz
Hidrolazlar	Suyla hidroliz reaksiyonunu katalizler	Selülaz, Kitinaz, Ksilanaz,	Selüloz, Kitin, Ksilan,
Liyazlar	Çift bağ yapar veya kırarlar		
İzomerazlar	Molekülleri izomerlerine çevirirler		
Ligazlar	ATP ile bağ oluşumunu katalizlerler	Cyanophycin sentetaz	

Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederler. Bu enzimlerin substratları çoğunlukla hidrojen ve elektron vericidir. Hidrojen veya oksijen alıcısı konumunda iseler bu durumda oksidazlar olarak adlandırılırlar. Örnek olarak dehidrojenazlar, katalazlar, oksidazlar, redüktazlar, peroksidazlar verilebilir.

Transferazlar: Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) taşıyan grupların bir molekülden diğer bir moleküle transferlerini katalize ederler. Örnek olarak poliestere, hiyalüronik asit, amiloz verilebilir.

Hidrolazlar: Başlara (C-C, C-O, C-N ve bazı diğer başlara) su katılması ile başların parçalandığı ve hidrolitik yıkımın gerçekleştiği hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. rnek olarak Selüloz, Kitin, Ksılan verilebilir.

Liyazlar: Hidrolizden farklı olarak substratlardan grupları uzaklaştırılarak, çift başların meydana geldiği reaksiyonları katalize ederler. C-N, C-O ve C-C başlarının yıkımını katalizlerler.

İzomerazlar: İzomerik şekil oluşumunu sağlayan reaksiyonlardır. Optik veya geometrik izomerlerin dönüştürülmesini katalize ederler. Katalizledikleri izomerizasyon tiplerine göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, mutaz vb. gibi alt isimlerden oluşurlar.

Ligazlar: ATP gibi enerjisi yüksek bir molekülün hidrolizi ile oluşan enerji ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler. (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.1.2. Enzim aktivitesine etki eden faktörler

Sıcaklık

Kimyasal reaksiyonlarda sıcaklık artışının genellikle reaksiyon hızını arttırdığı gözlenmektedir. Enzim katalizli reaksiyonlarda da sıcaklık artışı reaksiyon hızını artıracak yönde etki etmektedir. Yalnız protein yapıda ki enzimler yüksek sıcaklıklarda denatürasyona uğrayabilirler. Bu yüzden her enzimin kendine ait bir optimum sıcaklık değeri bulunmaktadır. Enzimin en iyi etki gösterdiği sıcaklık değerine o enzimin ‘optimum sıcaklığı’ denir. Bu sıcaklıkta enzim aktivitesi maksimumdur. Fakat bu sıcaklık değeri çok aşıldığında 3 boyutlu yapıda bozulmalar gözlenir. En uygun sıcaklık kısa zaman aralığında en iyi aktivite gösteren, uzun zaman aralığında ise denatürasyona uğramayan değerdir. Ekstranofil bakterilerden elde edilen bazı enzimler 100°C sıcaklığa kadar dayanabilirler. Fakat enzimlerin çoğunluğu 40–60°C sıcaklıkta denatüre olduğu gözlenmiştir. Enzimler genellikle 37°C’de optimum sıcaklık verirler. Soğuk ortamlarda

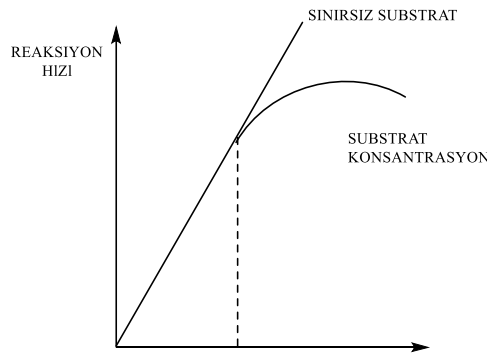
Enzimlerin uzun zaman saklanabilmesi mümkündür. Buzdolapları, soğuk odalar ve derin dondurucular gibi yerler denatürasyonu geciktirirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

pH

Enzimlerin tıpkı sıcaklık aralıklarında olduğu gibi pH aralıklarında da optimum değerleri vardır. Enzimler yapılarına göre asidik, bazik ve nötr ortamlarda optimum olarak çalışır. Optimum pH değerlerinde enzimler maksimum aktivite gösterirler ve pH değişimlerine karşı yüksek hassasiyete sahiplerdir. Enzimlerin optimum pH aralığı dışında ki değerlerinde üç boyutlu yapısı değişir ve denatürasyona uğrarlar. Enzimin substratı değişirse optimum pH'sı da değişir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonlarda hız; substrata doymun enzim konsantrasyonu arttıkça artar. Reaksiyonda ki enzim molekül miktarı ne kadar fazla ise reaksiyon hızı da ona bağlı olarak artış gösterir. Substratın oldukça bol olduğu bir enzimatik reaksiyonda, Optimal şartlar sağlandığında ölçülen ilk hız (V_o), enzim konsantrasyonu $[E]$ ile doğru orantılıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



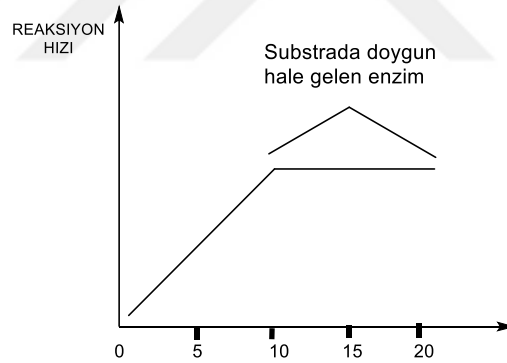
Şekil 1.1. Enzimin konsantrasyonuna göre reaksiyon hızının değişimi

Zaman

Enzimatik reaksiyonlarda hız başlangıçta artar, sonra sabit kalır ve zamanla ters orantılı olarak azalır. Bunun nedeni ise oluşan ürünlerin zamanla birleşerek aksi yönde bir reaksiyon vermesi, enzimin zamanla inaktive olması ve substratın tükenmesi olarak gösterilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Substrat konsantrasyonu

Enzimatik tepkime hızı, substrat konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılıdır. Reaksiyon hızı sabit bir enzim konsantrasyonunda belirli bir noktaya kadar artar. Reaksiyon hızı maksimuma ulaştığında ise substrat konsantrasyonu artsa bile reaksiyon hızı değişmez. Bu noktada ki hıza V_{max} hızı denir ve bu noktada hız sabit kalır (Holme 2005).



Şekil 1.2. Substrat konsantrasyonuna göre reaksiyon hızının değişimi

Reaksiyon ürünleri

Enzimatik reaksiyonlar dönüşümlü reaksiyonlara örnektir. Bu reaksiyonlardan oluşan ürünlerin ortamda ki artışı reaksiyon hızını azaltıcı yöndedir. Bazı reaksiyonlar da bu durumun reaksiyonun yönünü tersine çevirdiği de gözlenmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2011).

İyonik şiddet

Metal iyonlarının katalitik özellikleri olduğu için özellikle de kofaktör gerektiren enzimler, metal iyonlarının aktiviteleri için kullanırlar. Metal iyonları, reaktantların yapısını bozarak reaksiyonun denge sabitini değiştirirler. Enzim aktivitesinin reaksiyonda maksimum olduğu noktaya optimum iyonik şiddet denir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Fiziksel faktörler

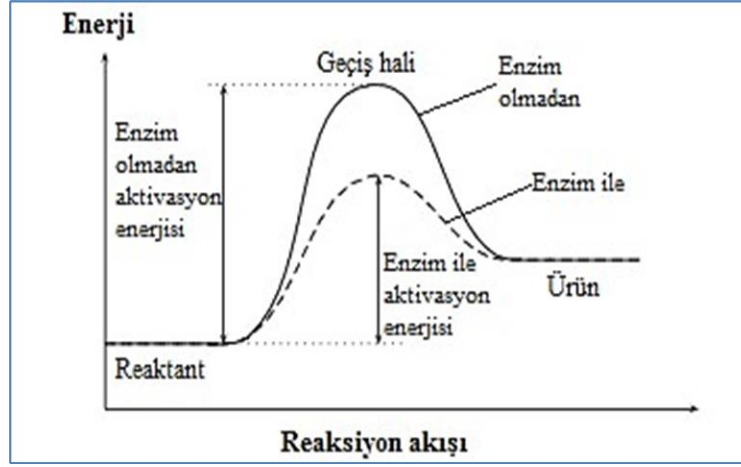
Işık ve radyasyonun reaksiyon hızı üzerine etkileri vardır. Örneğin mavi ve kırmızı ışınlar amilaz enzimi gibi enzimlerin aktivitesini çoğaltırken UV ve röntgen ışınları bu aktiviteyi azaltır. Protein yapılı enzimlerin denatüre olmasına sebep olur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Aktivatör ve inhibitör etkisi

Enzim aktivitesini artırıcı yönde etkileyen organik ya da inorganik maddelere aktivatör, azaltan ya da yok eden maddelere ise inhibitör denir. İnhibisyon reaksiyonları dönüşümlü ya da dönüşümsüz reaksiyonlardır (Keha ve Küfrevioğlu 2011).

1.2. Enzimin Kinetiği

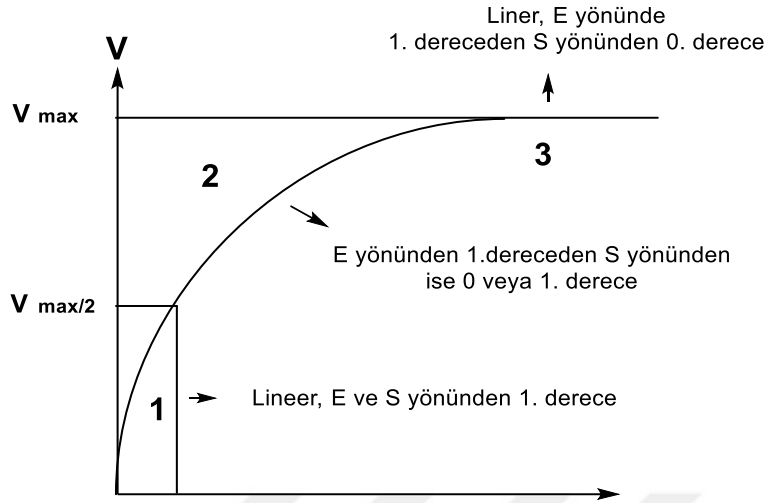
Enzim kinetiği, enzim reaksiyonlarının hızını inceler. Reaksiyonların gerçekleşebilmesi için reaktantların belli bir enerji seviyesini geçerek ürünlere dönüşmesi gerekmektedir. Reaksiyona sabit sıcaklıkta giren 1 mol maddenin aktifleşebilmesi için gerekli olan enerji miktarına aktifleşme enerjisi denir.



Şekil 1.3. Bir kimyasal reaksiyonun enzim ile ve enzim olmadan halleri için enerji diyagramı

Reaktantların aktifleşme enerjisini aşan kısmı ürüne dönüşür. Aktifleşme enerjisini düşürerek reaktantların geçişini kolaylaştıran maddelere katalizör denir. Katalizörler sayesinde düşük enerjide geçiş kompleksi oluşturan reaktantlar; bu sayede reaksiyonda çok sayıda ürün elde edilmesini sağlar. Reaksiyon esnasında katalizörlerde herhangi bir değişiklik gözlenmez (Keha ve Küfrevioğlu 2011).

Reaksiyonlarda enzimler substratlarını ürüne dönüştürürken onunla öncelikle bir ‘Enzim-Substrat kompleksi’ oluştururlar daha sonra bu kompleks enzim ve ürüne dönüşür.



Şekil 1.4. Michaelis- Menten grafiği

Bu grafikte ES kompleksi, serbest E ve serbest S'den k_1 hızı ile oluşurken, ES nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla gerçekleşir. k_3 ve k_4 hızları ise P ve E arasında ki oluşum ve ayrışma reaksiyon hızlarıdır. Enzim reaksiyonları hakkında ilk çalışmalar Michaelis- Menten tarafından 1913 yılında yapılmıştır. Michaelis- Menten kinetiğine göre başlangıçta ki enzim derişimi sabit alındığında reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir. Sonuç olarak, hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2011).

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır.

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

$V_{\max}$; hiperbol grafiğin y eksenini kestiği noktadır ve maximum hız olarak belirtilen yerdir. K_M ; maksimum hızın yarısına karşılık gelen substrat derişimidir. $K_M, V_{\max}$ enzim sabitleridir.

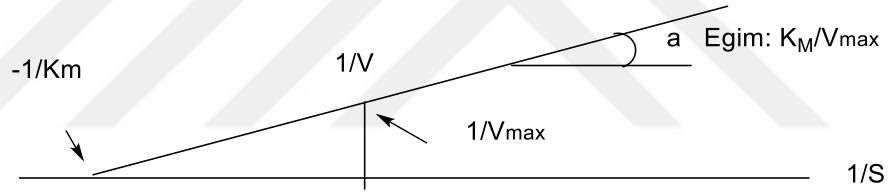
Michaelis-Menten grafiği 3 alandan oluşmaktadır. Birinci alanda substrat derişim düşük olacağı için $[S] \ll K_M$ grafik doğrusaldır. İkinci alanda substrat derişimi yoğun olduğundan herhangi bir ihtimal yapılamaz ve reaksiyon karışık derecelerde yürür.

Üçüncü alanda ise $[S] \gg K_M$ dir. $V = V_{\max}$ olur ve reaksiyon sabit hızlıdır.

Michaelis-Menten hiperbol bir grafik olduğundan uygulamalarda kullanılması zordur. Bu sebeple eksen ölçekleri uygun bir şekilde değiştirilerek doğrusal bir grafiğe dönüştürülmesi gerekir. Bu denklemlerden en çok kullanılan Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver 1934).

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

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



Şekil 1.5. Lineweaver-Burk grafiği

1.3. Enzim İnhibisyonu

Enzim aktivitesini *in vitro* ya da *in vivo* azaltan ya da yok eden küçük M_A lara sahip organik maddelere inhibitör denir. İnhibisyonlar dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak 2 ye ayrılır.

1.3.1. Dönüşümlü İnhibisyon

Enzim ve inhibitör reaksiyonunun belirli bir dengede gerçekleştiği inhibisyonudur.

1.3.1.a. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

Kompetitif inhibisyon reaksiyonunda; substrat ve inhibitör enzimin aktif bölgesine aynı yerden bağlanmak için yarışır. Yapı bakımından substrat ve inhibitör benzer olduğundan inhibitör substratın bağlanmasını engellemeye çalışır. Bu durumda substrat derişimi artırılırsa inhibitörün bağlanması önleneceğinden inhibisyon etkisi azalır hatta ortadan kalkar. Böylece enzimin V_{max} değeri değişmez, K_M değeri artar (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.3.1.b Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon

Nonkompetitif inhibisyon da substrat ve inhibitör aynı zamanda enzime farklı bölgelerden bağlandığından aralarında herhangi bir yarış yoktur. Bu durumda iki farklı inaktif kompleks oluşur. Substratı artırmak inhibisyonu değıştirmez. V_{max} değeri azalırken enzimin K_M değeri sabit kalır (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.3.1.c. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Unkompetitif inhibisyon nadir görünen inhibisyonlardandır ve genellikle iki substratlı reaksiyonlarda görülür. İnhibitör enzim substrat kompleksine bağlanır. ES kompleksi sürekli uzaklaşır ve böylece K_M azalır. Fakat ortamda ESI kompleksi varlığını devam ettirdiği için V_{max} değeri de azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.3.2. Dönüşümsüz inhibisyon

İnhibitör enzime kovalent olarak bağlanırken enzimlerde bir ya da daha fazla fonksiyonel grubu etkiler. Bu tür inhibisyon da $V_{\max}$ azalır, K_M değişmez. Dönüşümsüz inhibisyon ile yarışmasız inhibisyonu $V_{\max}$ grafiklerinden ayırt ederiz (Segel 1975; Keha ve Küfrelioğlu 2009).

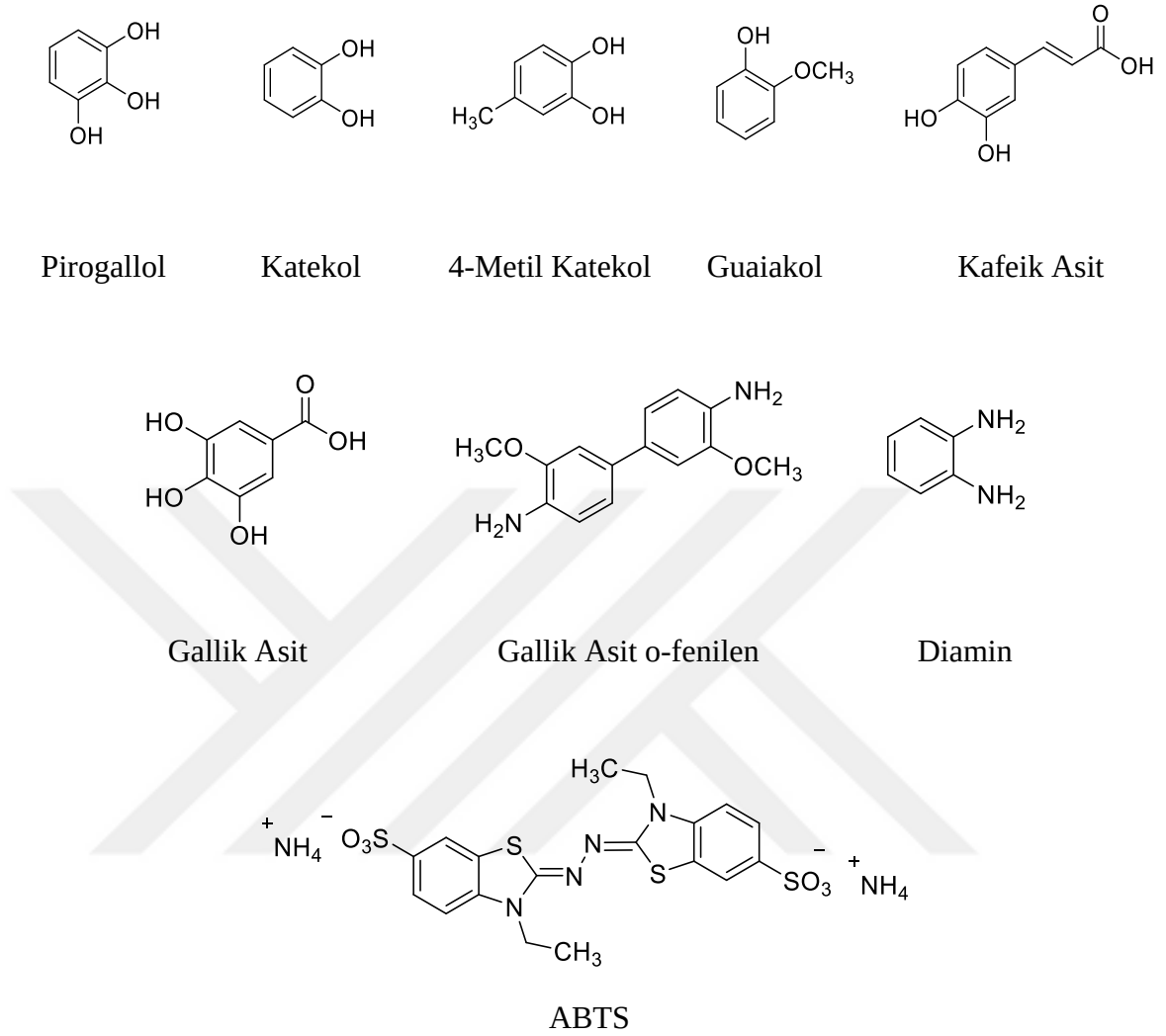
1.4. Peroksidaz Enzimi

Peroksidazlar (POD, E.C: 1.11.1.7), hidrojen atomlarını verme yöneline olan bileşiklerle, bu atomları alma durumunda olan H_2O_2 bileşiği arasında ki reaksiyonu katalizlediklerinden dolayı oksidoredüktazlardır. Ayrıca Peroksidazlar ferriprotoporfirin IX bulunduran hem proteinlerdir (Adams 1978; Whitaker 1994).

Peroksidaz enzimler hidrojen peroksidaz kullanarak inorganik ve organik substratların oksidasyonunu katalizerler (Scandalus *et al.* 1994). Katalizledikleri reaksiyonlar kompleks reaksiyonlar olduğu için genel bir denklemle gösterilir (Van Huystee 1987).



POD substratlarına örnekler;



Şekil 1.6. Bazı peroksidaz enzimi substratları

POD enzimleri; bitki, hayvan, bazı bakterilerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Peroksidazlar; bitki (mantar, bakteri) ve hayvan peroksidazları olmak üzere 2 sınıfa ayrılır (Rompel *et al.* 2007). Yüksek bitkiler üç ana peroksidazdan biri olan ferriprotoporfirin peroksidaz içerirler. Ferriprotoporfirin peroksidazlar bir prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX (hematin ya da hem) ihtiva ederler (Adams 1978; Whitaker 1994). Ayrıca peroksidaz enziminin hem çözülmüş hem de membran yapısında yer alan formları da mevcuttur (Robinson *et al.* 1991).

POD enzimlerinin; optimum pH, spesifik aktivite, kofaktörler, inhibitörler ve substrat ilgisi gibi hassas biyokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren izoenzimleri vardır (Fric 1976). Perosidaz enzimi yapraklar, yumru kökler gibi geniş kaynaklardan izole edilir. POD pirinç, arpa, tütün gibi türlerden de saflaştırılabilir.

POD bitkilerin büyüme ve gelişmesini kontrol ettiğinden dolayı genellikle hücre duvarında epikotillerde ve hücre membranlarında bulunurlar. POD enzimlerinden biri de glutatyon peroksidazdır. Glutatyon peroksidazların başlarda sadece hayvanlarda bulunduğu kabul ediliyordu (Halliwell and Gutteridge 1989) fakat bu düşünce zamanla bitkilerde de H_2O_2 giderilmesinde glutatyon peroksidazın kullanılmasıyla değişmiştir.



H_2O_2 oksitleyici özelliklerinden dolayı canlı ortamından hızlıca uzaklaştırılması gerekir. Hücre içerisinde bunu gerçekleştiren ve antioksidan görev üstlenen enzimler katalaz ve peroksidazlardır (Halliwell 1984). Hücre içinde ki H_2O_2 miktarı peroksizomlarda katalazlar ile yapılırken, hücrenin geri kalan kısmında bu düzeni peroksidazlar sağlar (Scandalios *et al.* 1994).

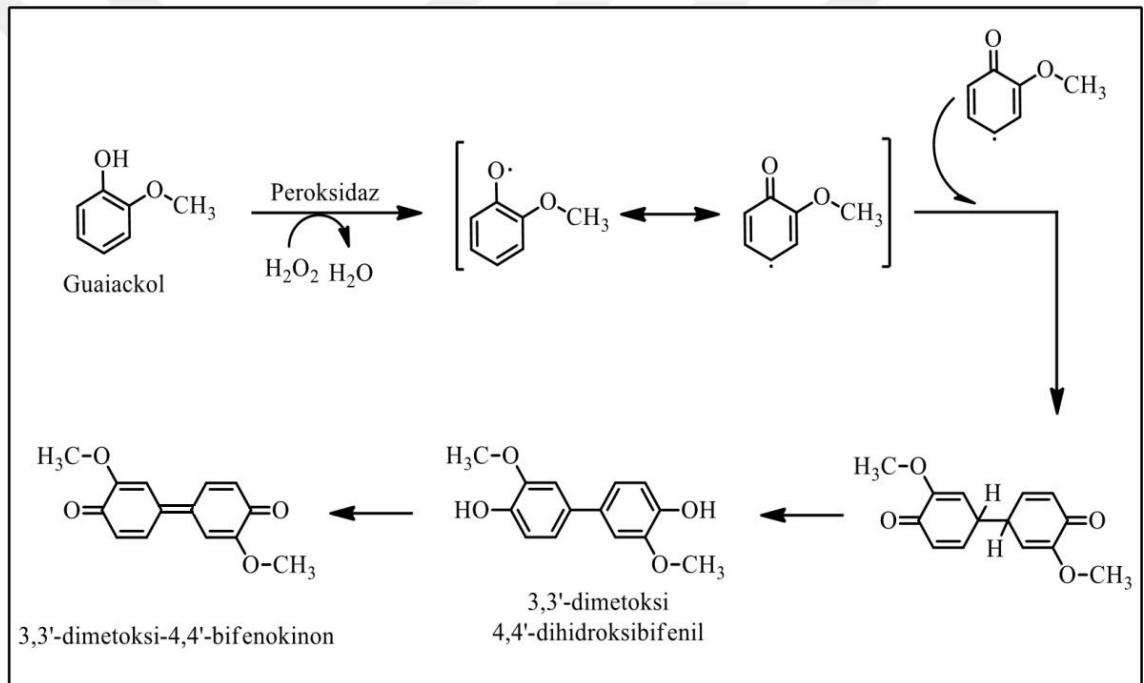
POD enziminin; bitkilerde savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), sebze ve meyvelerin indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997) ve lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi durumlarda rol aldığı bilinmektedir.

Peroksidaz enzimleri bitkilerde substrat olarak guaiakol, klorogenik asit, progalol ve katekol gibi fenolik bileşikleri yükseltgeyebilir (Onsa *et al.* 2004). Bu substratlar ile metabolizma sırasında meydana gelen H_2O_2 etkisiz hale getirilir (Robinson *et al.* 1987; Kamps *et al.* 1984).



Şekil 1.7. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojenperoksiti giderme mekanizması

POD enzim çalışmaları sonucunda guaiakolun 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona okside olduğu bulunmuştur (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.8. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.

Guaiakol ilk defa 1809 yılında substrat olarak kullanıldı ve at turpundan saflaştırılan enzimde uygulandı (Van Huystee 1987). Çalışmalar sonucunda çıkarılan sonuçlarda anlaşıldı ki POD enzimi; bitki yapılarında hücre duvarına protein bağlanmasında (Fry 1986), sebze ve meyvelerde indoleasetik asit miktarının ayarlanmasında (Agostini *et al.* 1997), çimlenmede (Morohashi 2002), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), hormonal faaliyetlerde (Wakamatsu and Takahama 1993), lignin biyosentezinde (Duarte *et al.* 2000) ve oksidatif stresinde (Hiraga *et al.* 2001) görev almaktadır.

Peroksidaz enzimi yüksek hassasiyete sahip olduğu için klinik tanılarda ayraç olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte gıda, kimya ve ilaç sektöründe de kullanılmaktadır (Kwak *et al.* 1996).

1.5. Afinite Kromatografisi

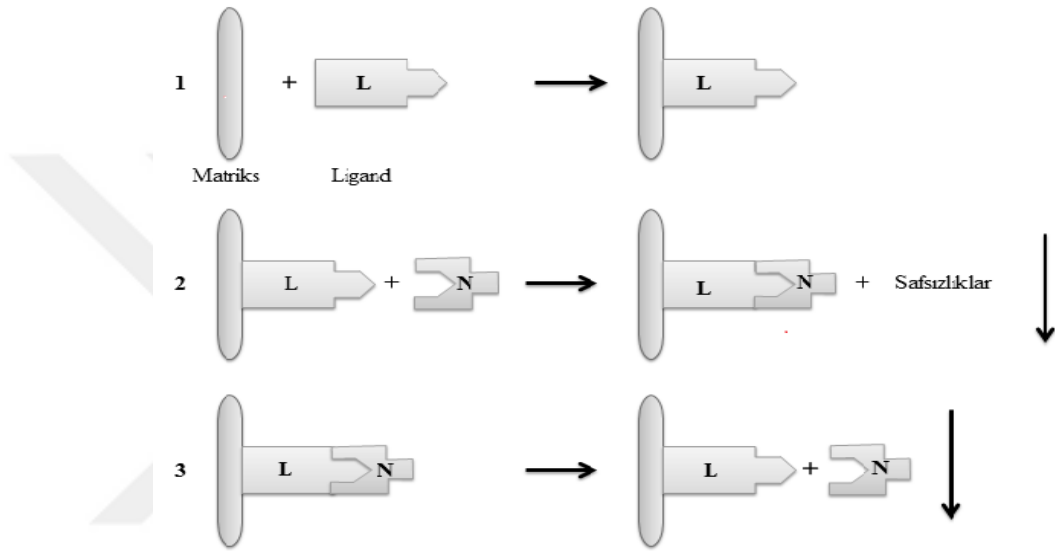
Afinite kromatografisi biyokimya çalışmalarının çok önemli bir bölümünü kapsamaktadır. Bu teknik ile neredeyse bütün biyomoleküllerin özel kimyasal yapılarını ve biyolojik fonksiyonlarını esas alarak saflaştırma sağlanır (Wilchek *et al.* 1984).

Afinite kromatografisinde saflaştırılacak molekül ‘matriks’ isimli kolon maddesine, kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlanır. Adsorpsiyon kromatografisidir. Genellikle aktif metaryal ve saflaştırmanın geri kazanımı çok yüksektir. Afinite kromatografisi; diğer kromatografik tekniklere göre daha az basamak gerektirir, daha kısa sürede sonuca ulaşılır ve saflaştırılması neredeyse imkansız olan maddeleri bile yüksek saflaştırma katsayılarında saflaştırma yapılabilir. Bu kromatografi tekniğinin konsantre edici bir etkisi de vardır ve bu sebeple büyük hacimlerde de çalışmak mümkündür (Wilchek *et al.* 1984).

Afinite kromatografisinin kullanım alanları şu şekildedir.

- İstenen maddeyi kompleks biyolojik bir karışımlardan saflaştırmak,
- Denatüre olmuş bazı maddelerin şekillerini doğal şekillerinden ayırmak,
- Kirletici büyük miktarlardaki madde karışımlarından küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak.
- Enzim benzeri biyomolekülleri yüksek sıcaklıkta saflaştırmak.

Afinite kromatografisinde başarının yüksek olabilmesi için, ilk olarak biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilen bir liganta ihtiyaç vardır. Bununla beraber İmmobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olması ve safsızlıklardan arındırıldıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması çok önemlidir.



Şekil 1.9. Afinite kromatografisinin genel prensibi

a) *((1)'de ligand matrikse kovalent bağlanması, (2)'de numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir) (Kalın 2018)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enzim saflaştırma çalışmaları

Peroksidaz enzim çalışmaları literatürde geniş bir araştırma alanına sahiptir. Saflaştırma tekniklerinin çeşitliliği ve enzim çalışma alanının genişliği bu çalışmaların devam etmesini ve geliştirilmesini sağlayacaktır. Kullanılan yöntemlerden bazıları iyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi, hidrofobik ve metal afinite, diyaliz gibi kromatografik metotlardır. Bu çalışmalara örnekler afinite kromatografisinde şöyledir. %9 verimle şalgamdan 269,13 kat (Kalin *et al.* 2014), %71 verimle 3 kademedede at turpundan 291 kat (Lavery *et al.* 2010), %2.9 verimle kırmızı lahanadan 120 kat (Somtürk *et al.* 2014), %84,6 verimle kırmızı pancardan 15 kat (Rudrappa *et al.* 2007), %10,6 verimle karaturptan 40,3 kat (Kalin *et al.* 2014), %55 verimle rekombinant HRP den 12 kat (Spadiut *et al.* 2014), %0,2 verimle karnabahardan 19,33 kat (Köksal and Gülçin 2008), %19 verimle vanilya çekirdeğinden 21 kat (Marquez *et al.* 2008), %5,8 verimle hurma yapraklarından 17 kat (Al-Senaidy *et al.* 2011), POD saflaştırılmıştır. Bu çalışmalar haricinde literatürde farklı çalışmalar da vardır. Lahanadan (McLellan and Robinson 1987), karalahanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), çilekten (Civello *et al.* 1995), mısırdan (Mika *et al.* 2008), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002, Al-Senaidy *et al.* 2011), kırmızı pancardan (Rudrappa *et al.* 2007), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), ve papayadan (Pandey and Dwivedi 2011; Pandey *et al.* 2012), saflaştırmalar bunlara örnektir.

Peroksidaz enziminin çok farklı izoenzim yapıları vardır. İzoenzimlerde stabil sıcaklık, fizyolojik rol, M_A , optimum pH, substrat spesifitesi vb gibi karakteristik özellikler farklılık gösterir. Optimum pH aralığı genellikle 5,0-7,5 değerleri arasında değişmektedir (Tıpawan and Barrett 2005). SDS-PAGE metoduyla molekül ağırlığı; domates de 43 kDa (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), brokoli de 43kDa (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), at turpunda 37 kDa (Lavery *et al.*

2010), karalâhanada 95kDa (Gülçin and Yıldırım 2005), hurma yapraklarında 55kDa (Al-Senaidy *et al.* 2011), çilekte 65 kDa (Civello *et al.* 1995), hurma yapraklarında 48kDa (Deepa and Arumughan 2002), olarak bulunmuştur.

Özetle; görüldüğü üzere saflaştırma verim yüzdeleri 2-70 arasında değişiklik gösterir. Peroksidaz enziminin aromatik hidrazinle karaturptan tek basamakta saflaştırılması bir literatürde belirtilmiştir. Saflaştırma yöntemlerinde en az iki kromatografik yöntemle başvurulmuştur. Literatürde çoklu bitki peroksidazın saflaştırılması için herhangi bir ligant ya da jele rastlanmamıştır. Literatürde ki çalışmalarda bulunan verim yüzdeleri ticari kullanıma uygun bulunmamaktadır.

POD için yapılan son çalışmalarda ise afinite kromatografisi kullanılmaktadır. Ligant olarak da 4-amino benzohidrazid kullanılır (Kalin *et al.* 2014). Bu çalışmada karaturp afinite kromatografisinden tek basamakta saflaştırılmıştır. Değerleri ise 40.3 kat saflaştırma ve %10.6 verim elde edilmiştir (Kalin *et al.* 2014).

2.2. Çalışmanın Amacı

POD enzimleri ile ilgili birçok saflaştırma yöntemleri bulunmaktadır. 4-amino benzohidrazid önceki çalışmalarda POD inhibitörü olarak bulunmuş ve afinite jeli hazırlanarak POD enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu tez içeriğinde ise enzim aktivitesi üzerine 4-amino benzohidrazid türevi olan 4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri üzerine çalışıldı. Bu türevlerden inhibisyon etkisi gösterenlerin afinite jelleri yapıldı. Afinite jellerinden POD enzimi karaturp saflaştırıldı ve önceki çalışma sonuçları ile karşılaştırıldı. Amacı; POD enzimini daha yüksek verimde saflaştırmak olan yeni benzohidrazit türevi, karaturp saflaştırma çalışmalarında yeni bir yöntem olarak sunuldu. Bu sonucun diğer saflaştırma çalışmalarına da yön verebileceği belirlendi

Bu tez kapsamında;

4-Amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak karaturp POD enzimi saflaştırıldı. Saflaştırılan POD enzimi üzerine sentezlenen 4-amino benzohidrazid türevi 4 molekül için inhibisyon çalışmaları yapıldı. Çalışılan dört molekül için IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon çeşidi belirlendi. İnhibisyon gösteren moleküllerin Sepharose-4B matriksi kullanılarak afinite jeli hazırlandı.

Elde edilen afinite jellerinden karaturp POD enzimi saflaştırıldı. Daha önceden sentezlenmiş olan 4 –amino benzohidrazid afinite kolonu ile karşılaştırıldı ve en iyi tutan kolon için kolon kapasitesi hesaplanarak parametreleri çalışıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yararlanılacak alet ve cihazlar

Tez kapsamında ki çalışmada kullanılan alet ve cihazlar şu şekildedir.

Afinite kolonu	: Sigma
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Hassas terazi	: Denver Instrument

Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
NMR	: Bruker 400 MHz
Otomatik pipet	: Eppendorf
Peristaltik pompa	: İsmatec
pH metre	: Mettler Toledo Seven Compact
Rotary Evaporatör	: Heidolph
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1800
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Su banyosu	: Nüve
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Bu tez çalışması kapsamında kullanılmış olan çözeltiler ve kullanım yerleri, kullanım biçimleri ile beraber aşağıda belirtilmiştir. Çözeltiler hazırlanırken kullanılan su aksi belirtilmediği durumlarda saf sudur.

Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler:

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirilmesi reaksiyonunda kullanılan çözelti: 0,1M NaHCO₃; (pH=9,0); 0,01 mol (2,1 g) NaHCO₃ 230ml suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH:9,0 olacak şekilde titre edildi. Son hacim saf suyla 250 mL'ye tamamlandı.
2. Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 4-amino benzohidrazid ve türevleri olan moleküllerin kenetlendirilmesi işleminde kullanılan çözelti: 0,2 M NaHCO₃; (pH=8,8) : 0,005 mol, 4,2 g NaHCO₃ 230 mL suda çözüldü ve 1 M NaOH ile pH 8,8'e kadar titre edildi. Son hacim suyla 250 mL'ye tamamlandı.

3. Sepharose-4B-L-Tirozin-4-Amino benzohidrazid (türevleri) afinite jelinin yıkanması işleminde kullanılan tampon çözelti: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) kullanıldı. 0,025mol, 2,4 g NaH_2PO_4 , 150 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8 olacak şekilde titre edildi. Son hacim suyla 200 mL'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. **Dengeleme çözeltisi:** 10 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) kullanıldı. 24 g ($1 \cdot 10^{-1}$ mol) NaH_2PO_4 , 1950 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8 olacak şekilde titre edildi. Son hacim 2 L'ye tamamlandı.

2. **Yıkama çözeltisi:** 25 mM NaH_2PO_4 (pH= 6,8) tamponu kullanıldı. 7,1 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 1950 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8 olacak şekilde titre edildi. Son hacim suyla 2L'ye tamamlandı.

3. **Elüsyon çözeltisi:** 1 M NaCl içeren 25 mM NaH_2PO_4 (pH =6,8) kullanıldı. 11,7 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 750 mL suda çözüldü. 5,68 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 çözeltiye eklenip çözünmesi sağlandı. 1 M HCl ile pH 6,8 olacak şekilde titre edildi. Son hacim suyla 800 mL'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti

Karaturp homojenat eldesinde kullanılan çözelti: pH= 7,0'de 0,3 M KH_2PO_4 tamponu kullanıldı. 20,4 g KH_2PO_4 , 430 mL suda çözüldü ve 1N NaOH ile pH 7,0 olacak şekilde titre edildi. Son hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

Peroksidaz enzimi aktivite ölçümünde kullanılan çözelti: 0,1 M KH_2PO_4 (pH=6,0) tampon çözeltisi kullanıldı. 6,8 g KH_2PO_4 , 430 mL suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH 6,0 olacak şekilde titre edildi. Son hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: 45 mM Guaiakol çözeltisi kullanıldı. 2,490 mL guaiakol alındı, son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: 22,5 mM H_2O_2 çözeltisi kullanıldı. Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk H_2O_2 'den 1,140 mL alındı ve suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi genellikle kantitatif protein tayininde kullanılır. 100 mg Coomassie brilliant blue G-250 ile 50 mL %95'lik etanol içerisinde çözöldü ve bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit eklendi. Çözeltinin son hacmi su ile 1 L olacak şekilde ayarlandı.

Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Bakır reaktifi; %1 sodyum-potasyum tartaratın 1,0 mL'si ve %0,5 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, %2 sodyum karbonat ve ihtiva eden 50 mL 0,1M NaOH içine katılarak hazırlandı. Protein çözeltisi (0,5mL), 5,0 mL alkali bakır reaktifine katıldı. Çözelti 10 dk inkübe edildikten sonra 0,5mL Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş) hızlıca katıldı ve karıştırıldı. Çözelti 30 dk inkübe edildi ve absorbanısı 660 nm'de ölçöldü. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

Elektroforezde kullanılan çözeltiler:

1. **(pH=8,8) 1 M HCl-Tris tamponu:** 48,4 g (0,2 mol) Tris, 380 mL suda çözöldü. 1 M HCl ile pH:8,8 oluncaya kadar titre edildi ve son hacim suyla 400 mL'ye tamamlandı.
2. **(pH=6,8) 1 M HCl-Tris tamponu:** 48,4 g (0,2 mol) Tris, 380 mL suda çözöldü. 1 M HCl ile pH:8,8 oluncaya kadar titre edildi ve son hacim suyla 400 mL'ye tamamlandı.
3. **Numune tamponu:** 2,6 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %100'lük gliserin ve 12 mL %10'luk SDS, 4 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırıldı. Son hacim su ile 40

mL'ye tamamlandı. Tampon kullanılmadan önce 1000 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

4. Yürütme tamponu: 28,8 g glisin ve 6 g Tris, 400 mL suda çözüldükten sonra bu çözelti üzerine 20 mL %10'lik SDS ilave edildi. Son hacim suyla 2 L'ye tamamlandı.

Commessie blue r-250 boya masında kulanıan çözeltiler

1- Renklendirme çözeltisi: 2,64 g coomassie brilliant blue R-250'nin 480 mL metanolde çözüldü ve bunun üzerine 96 mL saf asetik asit, 480 mL destile su ilave edilerek hazırlandı.

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

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kromtografi işlemleri sonrasında eşit miktarda toplanmış olan tüm fraksiyonlara kalitatif protein tayini uygulandı. Kromatografik işlemlerden elde edilen elüatlar kuvartz küvetlere konuldu ve spektrofotometrede, proteinin içinde bulunduğu tamponun köre karşı absorbansları ölçüldü.

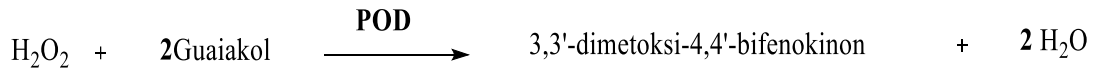
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanıldı. Bu boyanın özelliği ise negatif yüke sahip olduğu için protein üzerinde ki pozitif yüke bağlanmasıdır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) olmak üzere iki farklı formu vardır. Protein bağlanması kırmızı formu maviye çevirir. Ancak bu yöntemin hassasiyeti çok düşüktür

(1-100 µg arası). Protein tayini sırasında gerçekleştirilen işlemler şu şekildedir. Tüplere, 1 mL'sinde 1 mg protein bulunduran standart sığır albumin çözeltisinden sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu. Su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve 10 dakika inkübe edildi. 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak protein numunesinin içinde bulunmadığı tampondan, ölçüm için ise 0,1 mL protein çözeltisi ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden meydana gelen karışımlar kullanıldı. Sonuçlar, absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik haline getirildi. Enzim numuneleri, her aşamasında ki protein miktarını belirlemek adına; üç ayrı tüpe (100, 250 ve 500 µl) alındı. Sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5'er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteksle karıştırmanın ardından 10 dakika inkübasyona bırakıldı. 595 nm'de absorbans değerleri okundu. İşlem üç defa tekrarlandı ve üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınarak standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976).

3.2.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre Karaturp Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, spektrofotometrik olarak tespit edildi.



Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

Reaksiyona enzim çözeltisinin eklenmesi ile başlatıldı. 3 dakika boyunca oda sıcaklığında 470 nm'de absorbans artışı spektrofotometrede 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanıldı.

POD enzim aktivitesini belirlemek adına kullanılan formül şöyledir.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

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

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

$$D_f = \text{Seyreltme katsayısı}$$

$$A = \text{Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)}$$

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

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

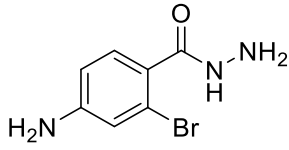
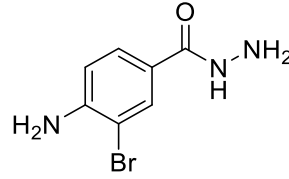
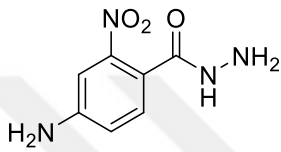
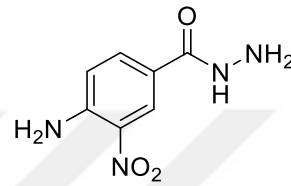
$$b = \text{Işığın geçtiği mesafe (1 cm)}$$

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

3.3. Karaturp POD Enziminin Saflaştırılma Çalışmaları

3.3.1. Ligand seçimi

POD enzimini saflaştırılması gayesi ile 4-amino 2-bromo metilbenzoat, 4-amino 3-bromo metilbenzoat, 4-amino 2-nitro metilbenzoat, 4-amino 3-nitro metilbenzoat maddeleri satın alındı. 4 molekülün hidrazin formları sentezlendi. İnhibisyon çalışmaları ve ligand olarak kullanılabilirliği incelendi. Sentezlenen bu moleküllerin önemi Peroksidazın afinite kromatografisiyle saflaştırılmasından diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olmalarıdır.

**4-amino 2-bromo benzohidrazid****4-amino 3-bromo benzohidrazid****4-amino 2-nitro benzohidrazid****4-amino 3-nitro benzohidrazid****Şekil 3.2.** Karaturp POD inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller**3.3.2. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi**

4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid bileşikleri ticari olarak temin edilememektedir. Bu yüzden bu bileşikleri, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.

4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezleri; (Hiroshi *et al.* 2012) yönteminde belirtildiği gibi yapılmıştır. Bu kapsamda 4-amino metil benzoatlar (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi, 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü. Reaksiyon tamamlanıncaya kadar geri soğutucu altında ısıtıldı. Reaksiyon TLC ile takip edildi. Çözücü uzaklaştırıldı. Katı pellet etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı. Beyaz kristaller süzgeç kağıdı yardımıyla ayrılarak bu işlem iki defa tekrarlandı. Böylece 4-amino benzohidrazid türevi olan dört molekül sentezlenmiş oldu ve karakterizasyonları H^1 -NMR yöntemiyle doğrulandı.

3.3.3. İnhibitör çalışmaları

3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

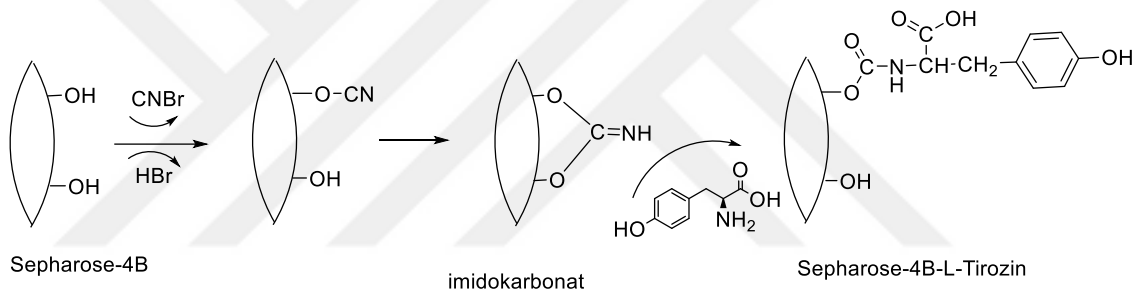
Literatürde önceden sentezlenmiş olan Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış karaturp, peroksidaz enzimleri üzerine çalışılması planlanan, sentezlediğimiz 4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid, inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. IC_{50} değerleri bulundu. Bu değerler; Enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonudur. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerlerinden faydalanılarak Linewaver–Burk grafikleri çizildi. K_i değerleri tespit edildi.

3.3.4. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jellerinin hazırlanması

Sepharose-4B kullanılarak CNBr ile aktifleştirilmiş afinite jeli hazırlandı. Bu kolon materyaline kovalent olarak L-Tirozin uzantı kolu bağlandı. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid ligand olarak önceden hazırlanan Sepharose 4-B-L-Tirozin jel materyaline kenetlendi. Ligandlar diazolanarak L-Tirozin'deki benzen halkasının 3 pozisyonuna kenetlendirildi. Hazırlanan afinite jelinde tirozin uzantı kolunu, Sepharose-4B matriksi, inhibitörler ise enzimlerin spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Kullanılan inhibitörler tarafımızca sentezlenen yeni peroksidaz enzim inhibitörleridir.

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

CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B, 500 mL soğuk su ile yıkanarak 0,1 M NaHCO_3 tamponuyla (pH:10,0) bir behere alındı. Kullandığımız tamponun 50 mL'sinde 70 mg tirozin çözülerek çözelti Sepharose-4B ile aynı behere aktarıldı. Reaksiyon başlatıldı. 4°C ' sıcaklıkta ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 16 saat süresince 4°C 'de bekletildi. Süre bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbands gözlenmeyinceye kadar jel bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona dahil olmayan tirozinin hepsi uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 400 mL 0,2 M NaHCO_3 tamponuyla (pH: 8,8) yinelenerek tirozin takılı olan jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

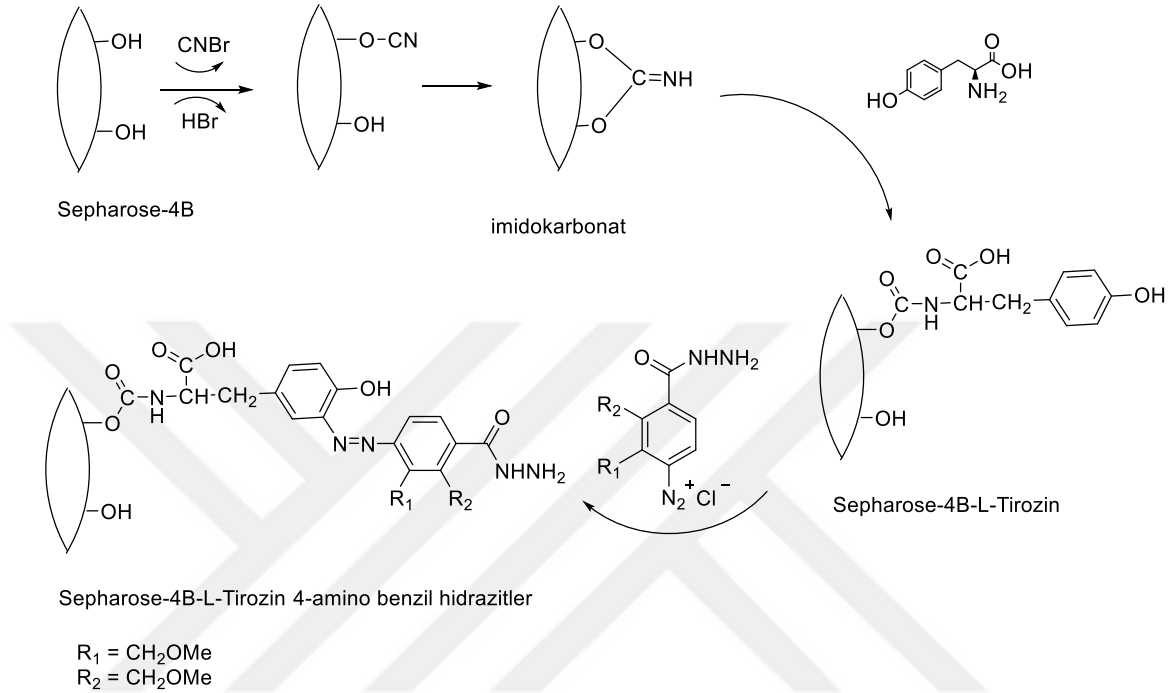


Şekil 3.3. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu

3.3.4.b. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi.

4-Amino benzohidrazid türevi ve diğer 4 molekülden 100'er μmol alınarak 0°C civarında 40 mL, 1 M HCl içinde çözüldü. İçinde 40 mg NaNO_2 bulunan 0°C 'deki 10 mL çözelti, inhibitör çözeltisine azar azar şekilde reaksiyon çözeltisine eklendi. 10 dakika süren reaksiyonun ardından diazolanmış olan inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarıldı ve pH sabit tutuldu. Bu şekilde 3 saat boyunca yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 100 mL, 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) tamponu ile yıkanmasının ardından üzerine bir miktar daha aynı tampondan eklenerek saklandı (Whitney 1974).

Hazırlanan 4-amino benzohidrazid türevi afinite jelleri için reaksiyon mekanizmaları Şekil 3.4'te gösterildi.



Şekil 3.4. 4-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu

3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

pH=6,8 de olan KH_2PO_4 dengeleme tamponu içine hazırlanmış olan jeller alındı ve süspansiyon edildi. Su trombu yoluyla vakum yapılarak havası alındı. Jel; 1x10 cm'lik kapalı bir sistemden oluşan kolona paketlenildi. Jelin çökmesinin ardından peristaltik pompa ile dengeleme tamponu kullanılarak yıkandı. Kolonun dengelenip dengelenmediğinin anlaşılmasında, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının eşitlenmesine bakıldı.

3.3.5.a. Afinite kolonlarına numune uygulanması ve elüsyonu

Hazırlanmış olan karaturp homojenatları 10 mM fosfat (pH=6,8) tamponuyla dengelenmiş kolonlara uygulandı. Kolonlar 50 mL 25 mM fosfat (pH 6,8) çözeltisiyle yıkandı. Böylece karaturp POD enzimleri kolona tutundu ve safsızlıklar uzaklaştırıldı. 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH=6,8) tamponu uygulanarak POD enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı. 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa yardımı ile kolonun akış hızı 25 mL/saat'e ayarlandı. Elüatlar 1,5'er mL şeklinde tüplere toplandı. Köre karşı her bir elüatın 280 nm'deki absorbans değeri ölçüldü. Toplanan elüatlardan absorbans gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 470 nm'de karaturp POD aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

3.4. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Belirlenmesi

POD enzimleri afinite kolonundan saflaştırıldı ve diyaliz edildi. Daha sonra %3-8 kesikli SDS-PAGE ile saflaştırılan enzimlerin M_A'ları ve saflık derecesi kontrol edildi. Standart olarak M_A'ları belirli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Elektroforez plakaları öncelikle su ve alkol ile yıkandı. Her iki kenarında aralık olacak şekilde plaka ile düz bir plaka üst üste gelecek şekilde materyal ile tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içinde sızdırmayı önleyen sünger bulunduran jel hazırlama kabineye yerleştirildikten sonra jelleri hazırlandı.

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 30 mL 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 26,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 1,2 mL %10 SDS, 0,78 mL %5'lik TEMED ve 18,78 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 0,12 mL %10'luk (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 2,46 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 2,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,18 mL %10'luk SDS, 0,09 mL %5'lik TEMED ve 7,35 mL saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine %10'luk PER'den 0,06 mL ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli, plakalar arasına üst kesimde 0,4 cm kalana kadar enjektör yardımıyla döküldü. Özellikle hava almamasına dikkat edildi. Jelin donması beklendi ve ayırma jeli katılaştıktan sonra yığma jeli hazırlandı. Yığma jeli tarak üst seviyesine kadar eklendi ve tarak yerleştirildi. Jelin kuruması beklendi. Sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlendi, jelin üstü önce saf su ile daha sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Tankın alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Her birinde 10 µg protein olacak biçimde numuneler hazırlandı. 1/1 oranında; toplam hacim 100 µg olacak biçimde numune tamponu katıldı ve 5 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutuldu, elektroforeze oldukça ince bir enjektör yardımı ile uygulandı. Tank kapağı kapatıldı. Alt tarafından (+) kablo, üstten (-) kablo yerleştirildi. 90 voltta yarım saat bekletildikten sonra akım 130 volta çıkartıldı ve 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesildi ve cam plakalar arasındaki jel çıkartıldı. 20 dakika gümüş nitrat çözeltisi ile karıştırıcının üstünde boyandı. Banyo çözeltisiyle hızlıca yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar gözle görülünce jel karıştırıcının üstünde 250 mL %5'lik asetik asit ve 1 mL gliserinden oluşan çözeltiyle yıkandı (Temel 2006).

3.5. Afinite Kolonunun POD Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

Afinite jellerinin tutma kapasitesi bulunurken kapasiteye; pH, iyonik şiddet ve sıcaklık etkileri incelendi. Kolonun kapasite belirleme işlemi şöyle gerçekleştirildi: Dengeleme tamponuyla dengelenmiş jelden 1 mL alınarak 1x10 cm'lik bir kolona alındı. POD enzimiyle doyuruldu. Enzimin artanı yıkama tamponu ile yıkanmasının ardından bağlanmış olan POD enzimleri uygun elüsyon tamponu ile elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Jel kurutuldu, tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden POD enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.5.1. Kolon kapasitesine sıcaklık etkisi

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

3.5.2. Kolon kapasitesine pH etkisi

POD enzimlerinin saflaştırılması için kolonda pH'nın bağlanmayı ne şekilde etkilediğini belirlemek için birkaç farklı pH'larda tamponlar kullanıldı. En uygun pH için sonuçlar μg protein /g jel başına grafik edildi.

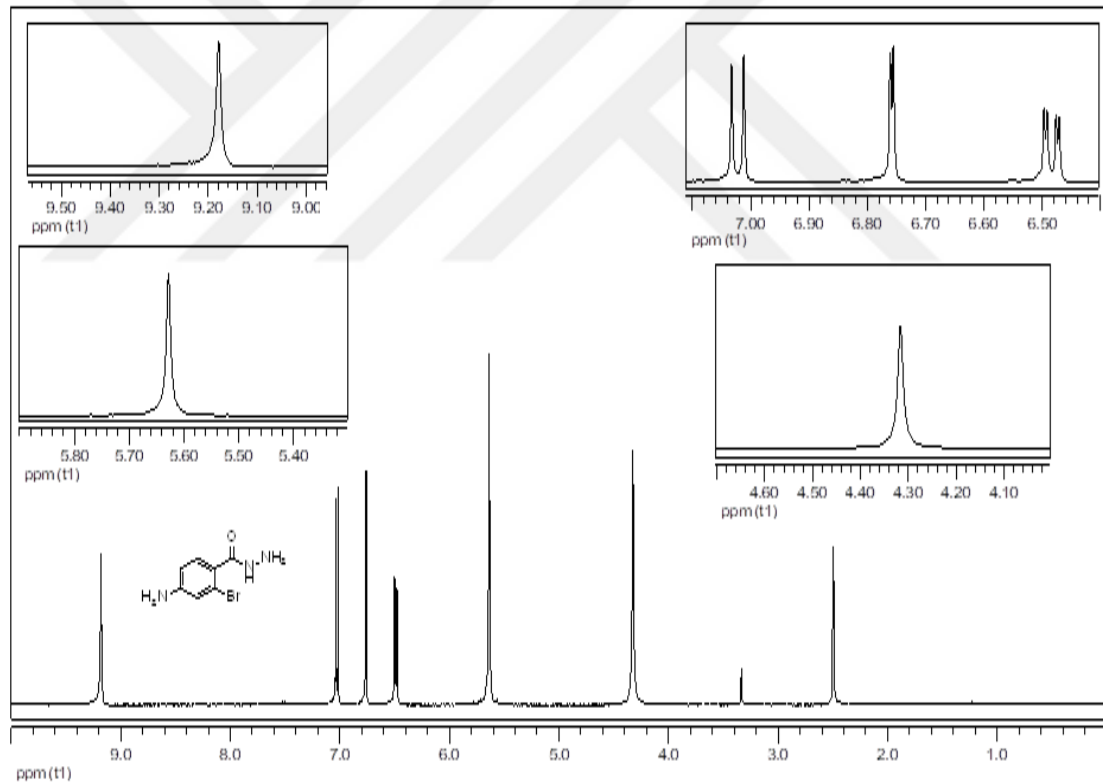
3.5.3. Kolon kapasitesine iyonik şiddet etkisi

POD enzimlerinin saflaştırılması için optimum sıcaklık da ve optimum pH da deney yapıldı. Bu deneyde iyonik şiddet değerleri 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek, sonuçlar μg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. 4 Amino Benzohidrazid ve Türevlerinin Sentezlenmesi

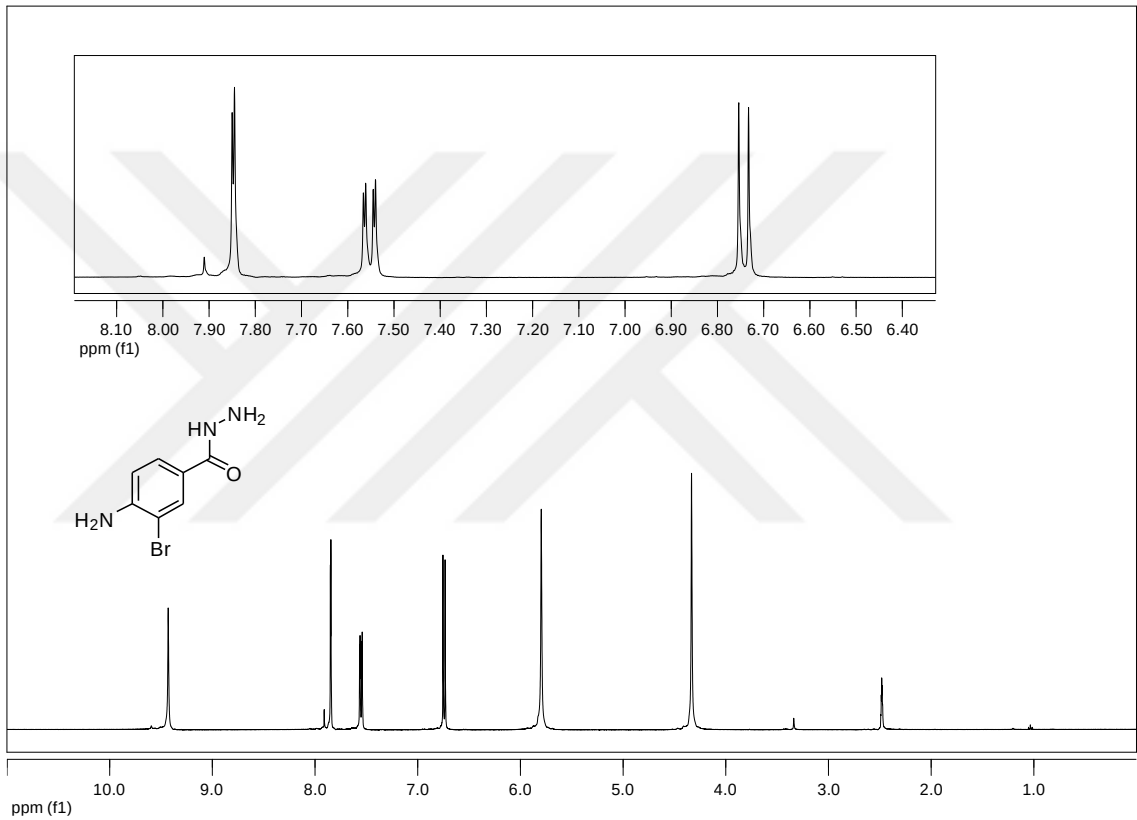
4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid molekülleri ticari olarak temin edilemediği için bu bileşiklerin metil esterleri kullanılarak hidrazin sentezleri yapıldı. $^1\text{H-NMR}$ 'la moleküllerin karakterizasyonu doğrulandı. Sonuçlar $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) spektrumları Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'te gösterildi.



Şekil 4.1. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

4-Amino 2-bromo benzohidrazid (1a) molekülü için NMR sonuçları:

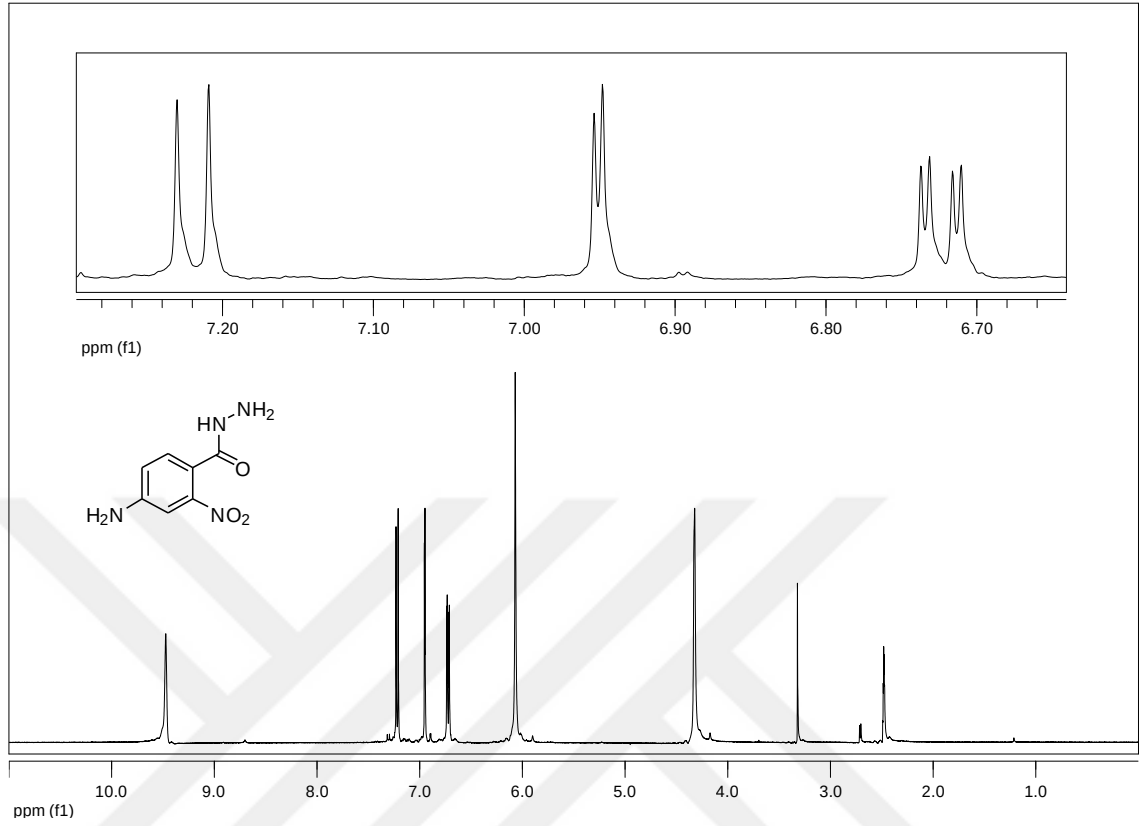
^1H -NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 9.20 (s, 1H, -NH-N-); 7.04 (d, $J_{65}=8$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{aril}}$); 6.77 (d, $J_{53}=2$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{aril}}$); 6.50 (dd, $J_{65}=8$ Hz, $J_{53}=2$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{aril}}$); 5.65 (s, 2H, Ar-NH₂); 4.33 (s, 2H, -N-NH₂)



Şekil 4.2. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 3-bromo benzohidrazid (1f) molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu sonuçları:

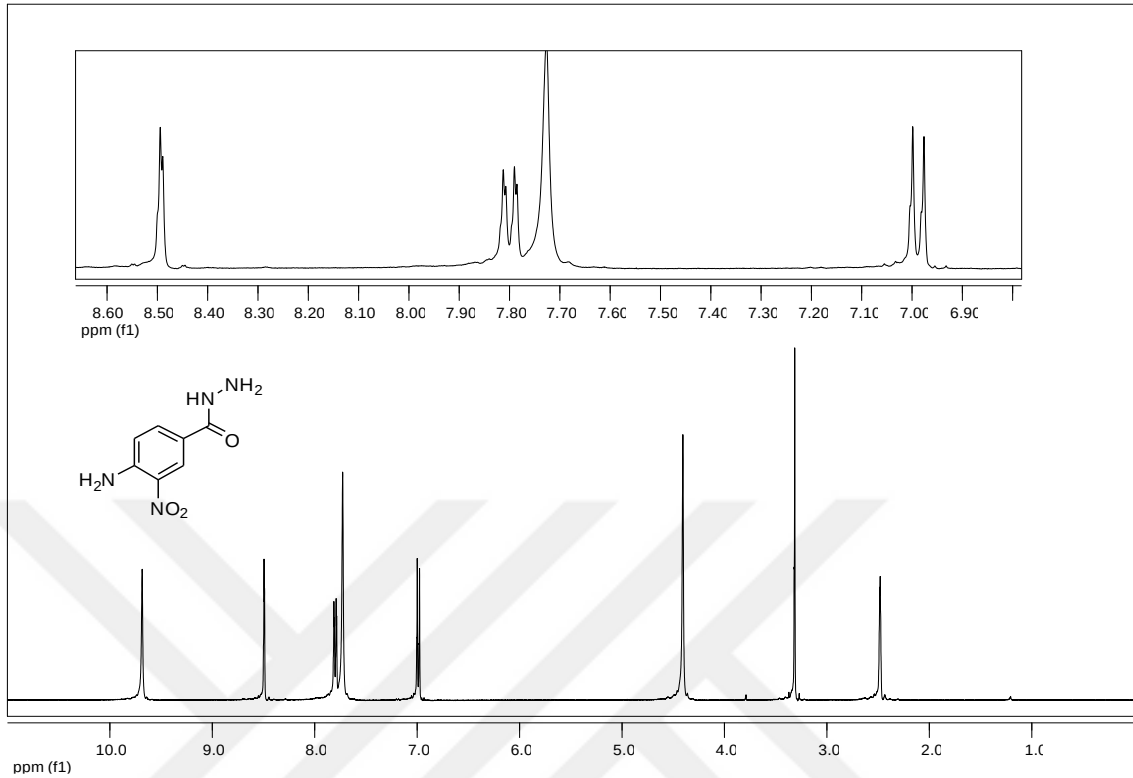
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm): 9.43 (bs, 1H), 7.85 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.80 (bs, 1H), 4.33 (bs, 1H)



Şekil 4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

4-Amino 2-nitro benzohidrazid (1e) molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu sonuçları:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) 9.47 (bs, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.07 (bs, 2H), 4.32 (bs, 2H)



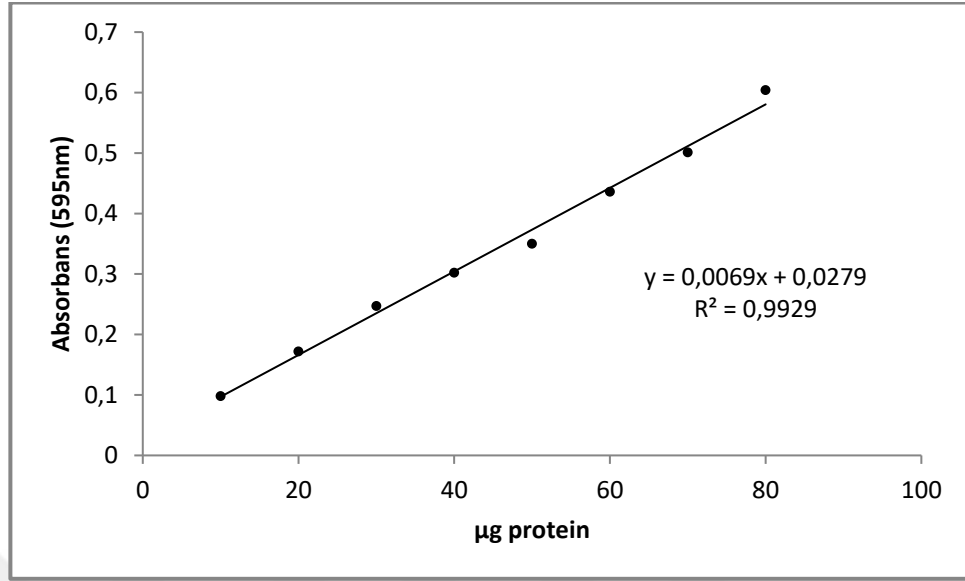
Şekil 4.4. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 3-nitro benzohidrazid (1i) molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu sonuçları:

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): ppm 9.68 (bs, 1H) 8.49 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.73 (bs, 2H), 6.99 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.41 (bs, 2H).

4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması

Karaturp bitkisinden hazırlanan homejenatlar ile afinite kolonlarından saflaştırılan peroksidaz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Bunun için öncelikle standart grafik hazırlandı. Afinite kromatografisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı ve karaturp bitkisinin homejenatları bu standart grafikten yararlanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.5’de gösterildi.



Şekil 4.5. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

*Protein miktarı (BSA: Bovine Serum Albumini)

4.3. Karaturp Bitkisinden POD Enzimlerinin 4-Amino Benzohidrazid Kolonu ile Saflaştırılması Sonuçları

Afinite jellerinde ligand olarak kullanılacak olan 4-amino benzohidrazid türevlerinin inhibisyon kinetiklerini belirleyebilmek için 4-amino benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanıldı ve karaturp peroksidaz enzimleri saflaştırıldı. Karaturptan hazırlanmış olan 5'er mL homojenat, dengelenmiş 4-amino benzohidrazid kolonuna pipet ile tatbik edildi.

Yıkama işleminin ardından elüsyon işlemi yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 45 mL/saate ayarlanarak 1,5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alındı. Her bir eluat için protein ve aktivite tayini yapıldı. 280 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan eluatlar birleştirildi ve diyaliz edildi. 4-amino benzohidrazid türevlerinin inhibisyon parametrelerini belirlemede kullanılmak üzere -20 °C saklandı. 4-amino benzohidrazid molekülü kullanılarak karaturp peroksidaz enzimleri için saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1'de gösterildi.

Çizelge 4.1. 4-Amino benzohidrazid kolonundan karaturp POD enzimlerinin saflaştırma sonuçları

	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim %	S. Katsayısı
Homojenat Karaturp	5	45	0,88	51,1	100	1,0
Afinite-4-amino benzohidrazid	3	2,2	0,0012	1833,3	2,9	35,9

4.4. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada sentezlenen 4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid moleküllerinin karaturp POD enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Guaiakol substratı doymunluğun altında tutuldu ve reaksiyon hızı guaiakole bağlı olarak bulundu. Bu amaçla, sabit guaiakol konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değerleri belirlendi.

IC_{50} ve K_i deney prosedürleri karaturp peroksidaz enzimleri 4-amino 2-bromo benzohidrazid molekülü için sırasıyla Çizelge 4.2, 4.3'de, 4-amino 3-bromo benzohidrazid molekülü için Çizelge 4.5, 4.6'da; 4-amino 2-nitro benzohidrazid molekülü için Çizelge 4.8, 4.9'da; 4-amino 3-nitro benzohidrazid molekülü için Çizelge 4.11, 4.12'de gösterildi. %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Lineawear-Burk grafiklerinden K_i değerleri tespit edildi.

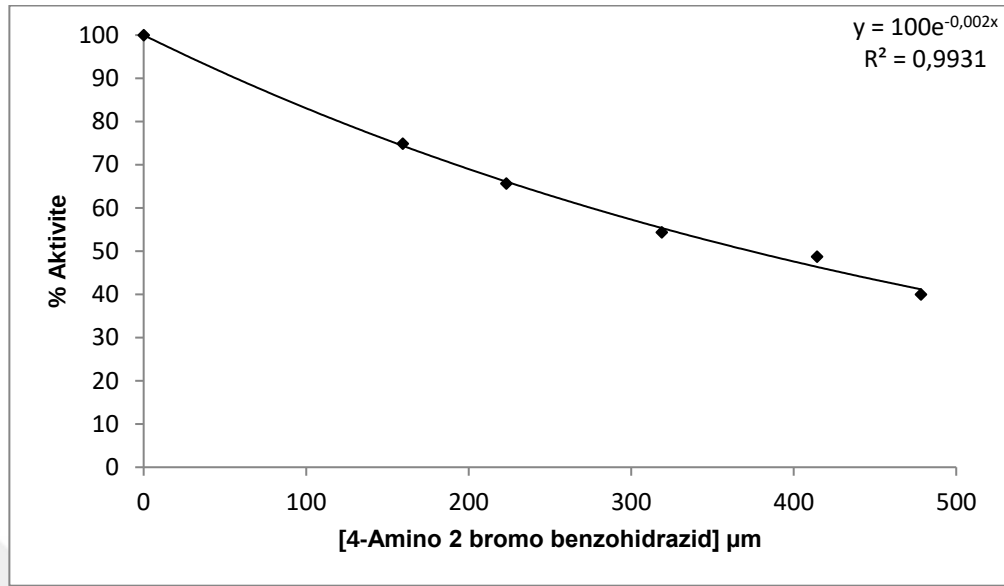
IC_{50} ve K_i grafikleri karaturp peroksidaz enzimleri 4-amino 2-bromo benzohidrazid molekülü için sırasıyla Şekil 4.6, 4.7'de, 4-amino 3-bromo benzohidrazid molekülü için Şekil 4.8, 4.9'da, 4-amino 2-nitro benzohidrazid molekülü için Şekil 4.10, 4.11'de, 4-amino 3-nitro benzohidrazid molekülü için Şekil 4.12, 4.13'de gösterildi.

IC₅₀ ve K_i değerlerinin ve inhibisyon tipleri belirlenmesi için; her molekül ve her enzime ayrı ayrı çizilen IC₅₀ ve K_i grafiklerinden yararlanıldı. Karaturp POD enzimleri, 4-amino 2-bromo benzohidrazid molekülü için bu değerler sırasıyla Çizelge 4.2 ve 4.3’de, 4-amino 3-bromo benzohidrazid molekülü için Çizelge 4.5 ve 4.6’da, 4-amino 2-nitro benzohidrazid molekülü için Çizelge 4.8 ve 4.9’da, 4-amino 3-nitro benzohidrazid molekülü için Çizelge 4.11 ve 4.12’de gösterildi.

4.4.1. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için karaturp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.2. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaia kol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaia kol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] µM	%Aktivite
4-amino 2-bromo benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,45	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,44	159,4	74,87
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,43	0,5	1,0	1,0	0,07	0,01	0,42	223,1	65,64
	0,5	1,0	1,0	0,1	0,4	0,5	1,0	1,0	0,1	0,01	0,39	318,8	54,35
	0,5	1,0	1,0	0,13	0,37	0,5	1,0	1,0	0,13	0,01	0,36	414,3	48,71
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,35	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,34	478,2	40



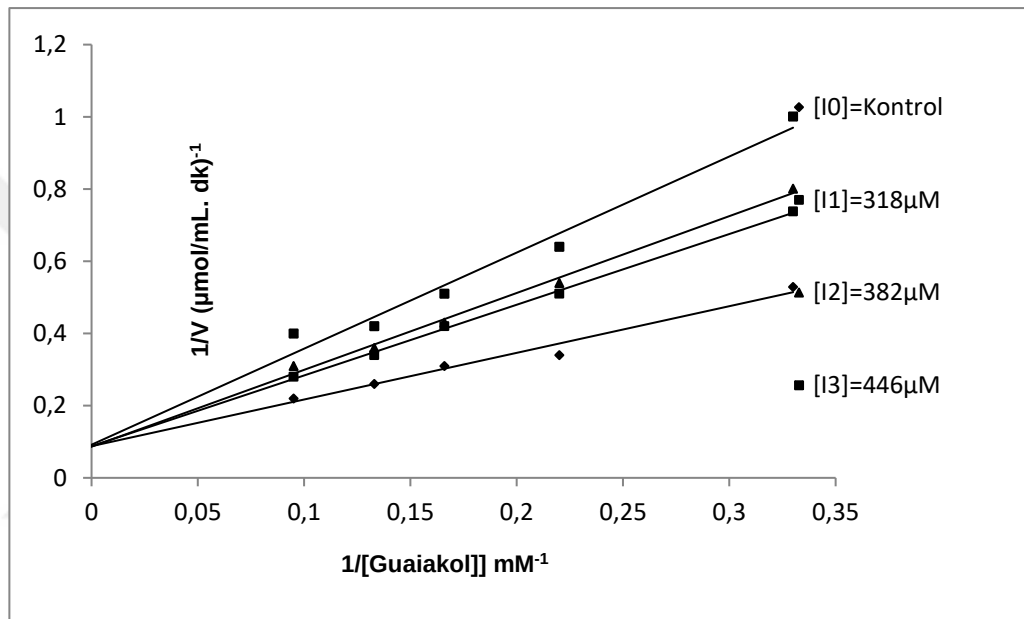
Şekil 4.6. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği.

Çizelge 4.3. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						1/V (µmol/ ml. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
	Guaia kol. (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	inhibitör. (mL)	Su (mL)	Guaia kol. (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,4	0,2	1,0	1,0	-	0,79	0,01	0,529	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,4	0,3	1,0	1,0	-	0,69	0,01	0,34	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,4	0,4	1,0	1,0	-	0,59	0,01	0,31	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,4	0,5	1,0	1,0	-	0,49	0,01	0,26	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,39	0,01	0,22	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,10	0,7	0,2	1,0	1,0	0,10	0,69	0,01	0,738	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,10	0,6	0,3	1,0	1,0	0,10	0,59	0,01	0,51	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,10	0,5	0,4	1,0	1,0	0,10	0,49	0,01	0,42	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,4	0,5	1,0	1,0	0,10	0,39	0,01	0,34	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,10	0,3	0,6	1,0	1,0	0,10	0,29	0,01	0,28	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,12	0,68	0,2	1,0	1,0	0,12	0,67	0,01	0,801	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,12	0,58	0,3	1,0	1,0	0,12	0,57	0,01	0,54	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,12	0,48	0,4	1,0	1,0	0,12	0,47	0,01	0,43	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,38	0,5	1,0	1,0	0,12	0,37	0,01	0,36	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,12	0,28	0,6	1,0	1,0	0,12	0,27	0,01	0,31	0,09

Çizelge 4.3. (devam)

[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,14	0,66	0,2	1,0	1,0	0,14	0,65	0,01	1,001	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,14	0,56	0,3	1,0	1,0	0,14	0,55	0,01	0,64	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,14	0,46	0,4	1,0	1,0	0,14	0,45	0,01	0,51	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,14	0,36	0,5	1,0	1,0	0,14	0,35	0,01	0,42	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,14	0,26	0,6	1,0	1,0	0,14	0,25	0,01	0,4	0,09

Şekil 4.7. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği 1/V-1/S grafiği

Çizelge 4.4. Karaturp POD enziminin 4-amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

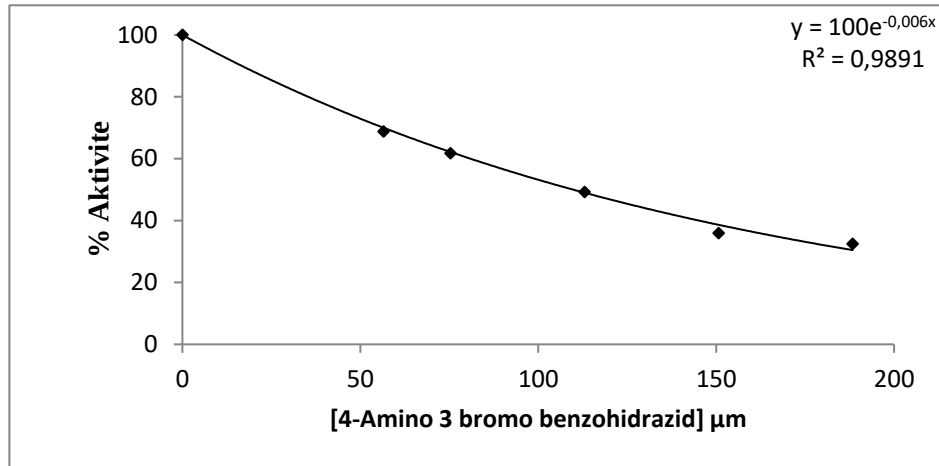
	Karaturp POD	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i ± SD (μM)	İnhibisyon tipi
		373,5	547,2 ± 81,5	Yarışmalı

Sonuçlardan görüleceği üzere, 1a molekülünün başarı ile hidrazin sentezi yapılmış yapı NMR spektrumu ile doğrulanmış ve karaturp peroksidaz enziminin yarışmalı inhibitörü olduğu bulunmuştur.

4.4.2. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörü için karaturp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.5. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.

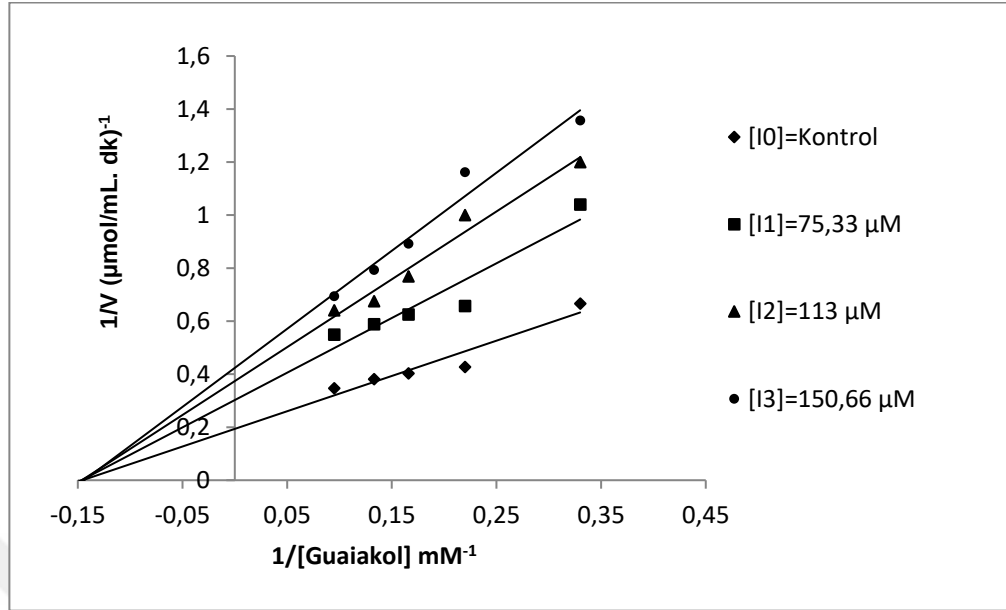
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] µM	%Aktivite
4-amino 3-bromo benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,03	0,470	0,5	1,0	1,0	0,03	0,01	0,460	56,5	68,75
	0,5	1,0	1,0	0,04	0,460	0,5	1,0	1,0	0,04	0,01	0,450	75,33	61,71
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,440	0,5	1,0	1,0	0,06	0,01	0,430	113	49,21
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,420	0,5	1,0	1,0	0,08	0,01	0,410	150,66	35,93
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,01	0,390	188,33	32,46



Şekil 4.8. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği

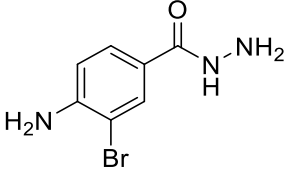
Çizelge 4.6. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaia kol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör. (mL)	Su (mL)	Guaia kol. (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (μmol/ ml. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,80	0,2	1,0	1,0		0,79	0,01	0,666	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,70	0,3	1,0	1,0		0,69	0,01	0,427	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,60	0,4	1,0	1,0		0,59	0,01	0,403	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,50	0,5	1,0	1,0		0,49	0,01	0,381	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,40	0,6	1,0	1,0		0,39	0,01	0,347	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,04	0,76	0,2	1,0	1,0	0,04	0,75	0,01	1,04	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,04	0,66	0,3	1,0	1,0	0,04	0,65	0,01	0,657	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,04	0,56	0,4	1,0	1,0	0,04	0,55	0,01	0,625	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,04	0,46	0,5	1,0	1,0	0,04	0,45	0,01	0,588	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,04	0,36	0,6	1,0	1,0	0,04	0,35	0,01	0,549	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,73	0,01	1,2	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,63	0,01	1	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,53	0,01	0,769	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,43	0,01	0,675	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,33	0,01	0,641	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,08	0,72	0,2	1,0	1,0	0,08	0,71	0,01	1,357	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,08	0,62	0,3	1,0	1,0	0,08	0,61	0,01	1,162	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,08	0,52	0,4	1,0	1,0	0,08	0,51	0,01	0,892	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,42	0,5	1,0	1,0	0,08	0,41	0,01	0,793	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,08	0,32	0,6	1,0	1,0	0,08	0,31	0,01	0,694	0,09



Şekil 4.9. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği $1/V-1/S$ grafiği

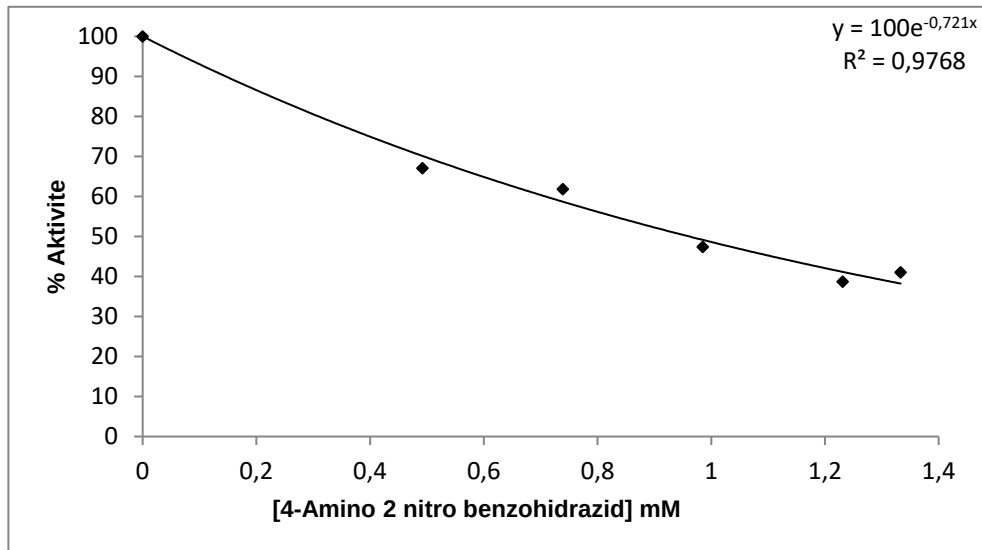
Çizelge 4.7. Karaturp POD enziminin 4-amino 3-bromo benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

	Karaturp POD	IC_{50} (μM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (μM)	İnhibisyon tipi
		115,5	$127,5 \pm 6,4$	Yarışmasız

4.4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için karaturp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.8. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.

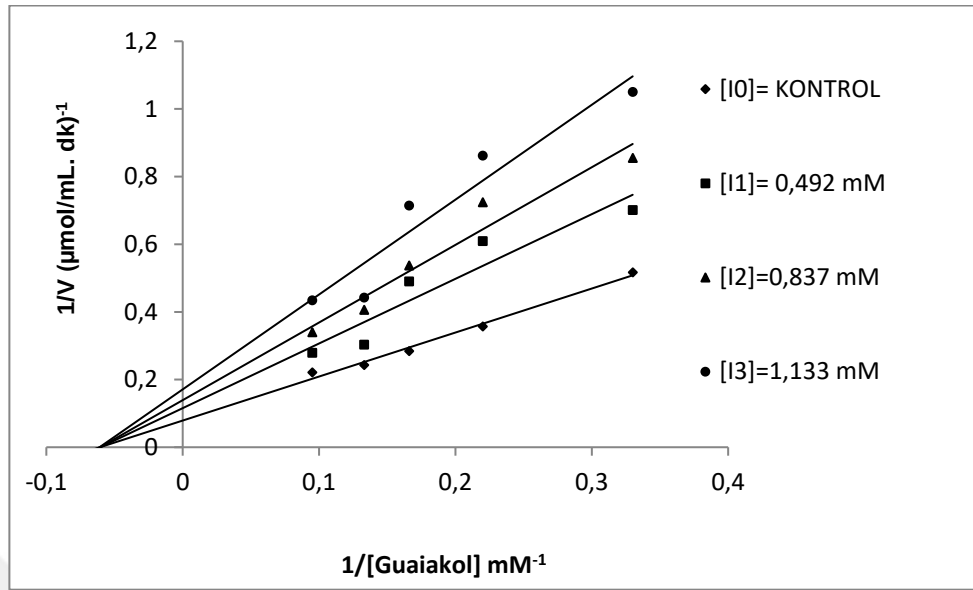
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] µM	%Aktivite
4-amino 2-nitro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,01	0,390	0,492	67,05
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,340	0,739	61,84
	0,5	1,0	1,0	0,20	0,300	0,5	1,0	1,0	0,20	0,01	0,290	0,985	47,39
	0,5	1,0	1,0	0,23	0,270	0,5	1,0	1,0	0,23	0,01	0,260	1,333	41,04
	0,5	1,0	1,0	0,25	0,250	0,5	1,0	1,0	0,25	0,01	0,240	1,231	38,72



Şekil 4.10. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği

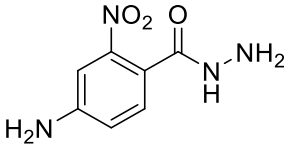
Çizelge 4.9. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaia kol. (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör. (mL)	Su (mL)	Guaia kol. (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (μmol/ ml. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,517	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,357	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,284	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,243	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,221	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,10	0,7	0,2	1,0	1,0	0,10	0,690	0,010	0,701	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,10	0,6	0,3	1,0	1,0	0,10	0,590	0,010	0,609	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,10	0,5	0,4	1,0	1,0	0,10	0,490	0,010	0,49	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,4	0,5	1,0	1,0	0,10	0,390	0,010	0,303	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,10	0,3	0,6	1,0	1,0	0,10	0,290	0,010	0,279	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,17	0,63	0,2	1,0	1,0	0,17	0,62	0,010	0,855	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,17	0,53	0,3	1,0	1,0	0,17	0,52	0,010	0,724	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,17	0,43	0,4	1,0	1,0	0,17	0,42	0,010	0,537	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,17	0,33	0,5	1,0	1,0	0,17	0,32	0,010	0,406	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,17	0,23	0,6	1,0	1,0	0,17	0,22	0,010	0,34	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,23	0,57	0,2	1,0	1,0	0,23	0,56	0,010	1,05	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,23	0,47	0,3	1,0	1,0	0,23	0,46	0,010	0,862	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,23	0,37	0,4	1,0	1,0	0,23	0,36	0,010	0,714	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,23	0,27	0,5	1,0	1,0	0,23	0,26	0,010	0,442	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,23	0,17	0,6	1,0	1,0	0,23	0,16	0,010	0,434	0,09



Şekil 4.11. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği $1/V-1/S$ grafiği.

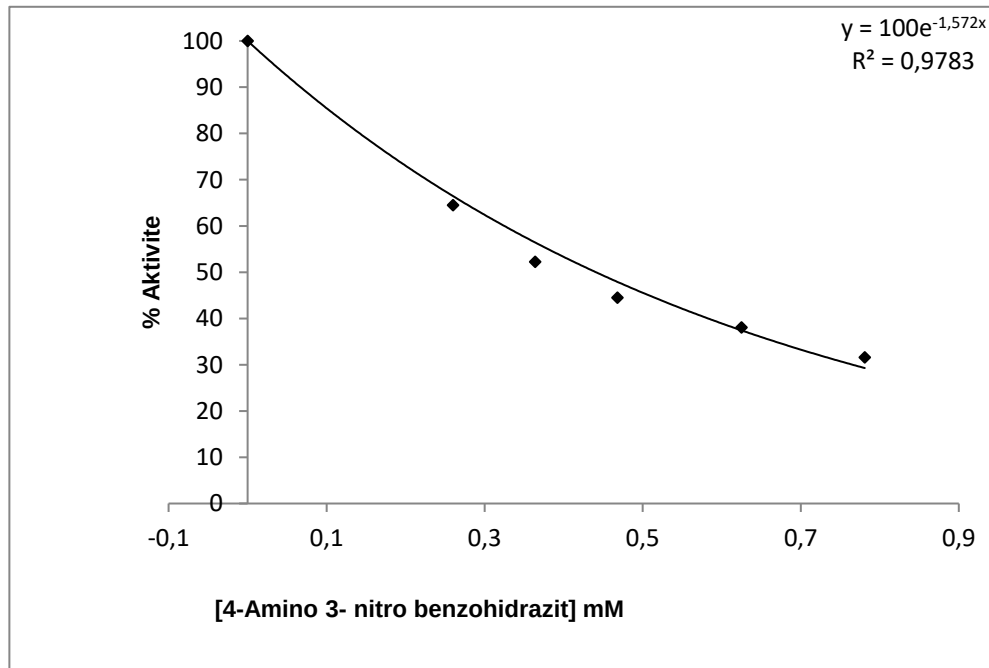
Çizelge 4.10. Karaturp POD enziminin 4-amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

	Karaturp POD	IC_{50} (mM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (mM)	İnhibisyon tipi
		0,961	1,04 $\pm$ 0,064	Yarışmasız

4.4.4. 4-Amino-3-nitro benzohidrazid inhibitörü için karaturp peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı ile yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.11. Karaturp POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü.

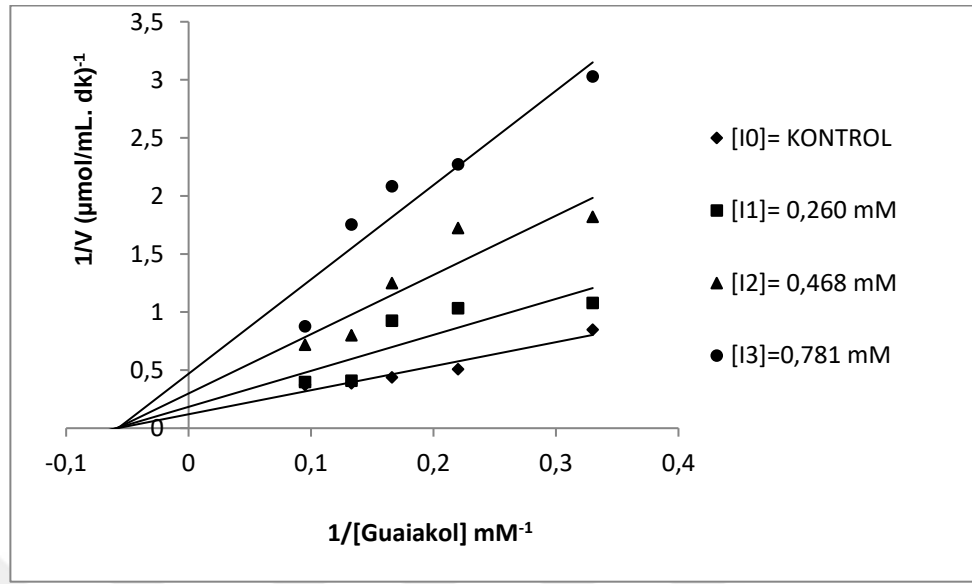
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaia kol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaia kol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] µM	%Aktivite
4-amino 3-nitro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,440	0,26	64,51
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,01	0,420	0,364	52,25
	0,5	1,0	1,0	0,09	0,410	0,5	1,0	1,0	0,09	0,01	0,410	0,468	44,51
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,380	0,5	1,0	1,0	0,12	0,01	0,370	0,625	38,06
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,340	0,781	31,61



Şekil 4.12. Karaturp POD enzimi aktivitesi için 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün 5 farklı konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[I] grafiği

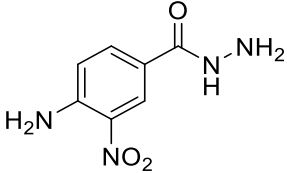
Çizelge 4.12. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün K_i değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.

Kör Tüpü						Numune Tüpü						1/V ($\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}$) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
	Guaia kol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör. (mL)	Su (mL)	Guaia kol. (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,780	0,020	0,848	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,680	0,020	0,508	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,580	0,020	0,438	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,480	0,020	0,387	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,380	0,020	0,373	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,05	0,750	0,2	1,0	1,0	0,05	0,730	0,020	1,079	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,650	0,3	1,0	1,0	0,05	0,630	0,020	1,033	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,550	0,4	1,0	1,0	0,05	0,530	0,020	0,925	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,430	0,020	0,409	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,350	0,6	1,0	1,0	0,05	0,330	0,020	0,398	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,09	0,710	0,2	1,0	1,0	0,09	0,690	0,020	1,82	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,09	0,610	0,3	1,0	1,0	0,09	0,590	0,020	1,724	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,09	0,510	0,4	1,0	1,0	0,09	0,490	0,020	1,25	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,09	0,410	0,5	1,0	1,0	0,09	0,390	0,020	0,8	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,09	0,310	0,6	1,0	1,0	0,09	0,290	0,020	0,719	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,15	0,650	0,2	1,0	1,0	0,15	0,630	0,020	3,029	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,15	0,550	0,3	1,0	1,0	0,15	0,530	0,020	2,272	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,15	0,450	0,4	1,0	1,0	0,15	0,430	0,020	2,083	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,350	0,5	1,0	1,0	0,15	0,330	0,020	1,754	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,15	0,250	0,6	1,0	1,0	0,15	0,230	0,020	0,877	0,09

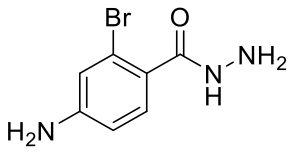


Şekil 4.13. Karaturp POD enzimi üzerine 4-amino 3-nitro benzohidrazidin inhibisyon tipini gösteren ve K_i değerinin belirlendiği $1/V-1/S$ grafiği.

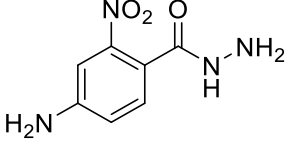
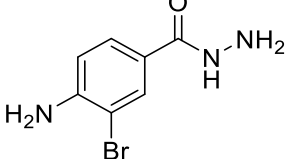
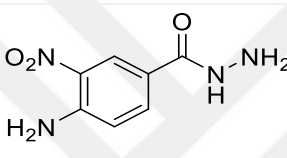
Çizelge 4.13. Karaturp POD enziminin 4-amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

	Karaturp POD	IC ₅₀ (mM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (mM)	İnhibisyon tipi
		0,440	0,356 ± 0,116	Yarışmasız

Çizelge 4.14. Karaturp peroksidaz enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	Ortalama $K_i \pm SD$ (mM)	İnhibisyon tipi
	0,373	0,547 ± 0,081	Yarışmalı

Çizelge 4.3. (devam)

	0,961	$1,04 \pm 0,0649$	Yarışmasız
	0,115	$0,127 \pm 0,006$	Yarışmasız
	0,440	$0,356 \pm 0,116$	Yarışmasız

4.5. Karaturp POD Enzimlerinin 4-Amino benzohidrazid Türevleri ile Saflaştırılması Sonuçları

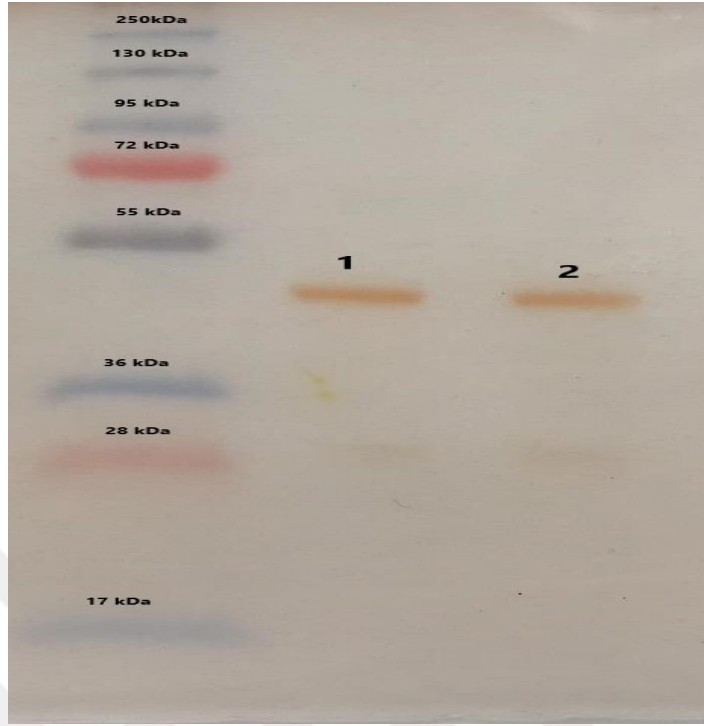
Karaturp POD enzimleri üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazid ,4-amino 3-bromo benzohidrazid , 4-amino 2-nitro benzohidrazid ,4-amino 3- nitro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon etkileri incelendikten sonra bu moleküllerin ligand olarak kullanıldığı Sepharose 4B-L-Tirozin-4-amino 3-bromo benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-amino 2-bromo benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-amino 2-nitro benzohidrazid, Sepharose 4B-L-Tirozin-4-amino 3-nitro benzohidrazid kolonlarının sentezi yapıldı. Tüm kolonlardan saflaştırılan Karaturp enziminin saflaştırma sonuçları Çizelge 4.19’da gösterildi.

Çizelge 4.15. Afinite kolonlarından elde edilen Karaturp enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

KARATURP			Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	S. Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
4-Amino Bromo Benzohidrazid	2-	Homojenat	6	102,2	1,45	613,2	8,7	70,5	100	1
		Sepharose 4B Afinite	6	29,1	0,0016	174,8	0,0096	18187,5	28,5	258
4-Amino Nitro benzohidrazid	2-	Homojenat	6	85,4	1,45	512,4	8,7	58,8	100	1
		Sepharose 4B Afinite	3	57,7	0,0016	173,2	0,0048	36062,5	33,8	613,3
4-Amino Bromo benzohidrazid	3-	Homojenat	5	108	1,45	540	7,25	74,5	100	1
		Sepharose 4B Afinite	3	56,5	0,0011	169,5	0,0033	50454,6	31,4	677
4-Amino Nitro Benzohidrazid	3-	Homojenat	6	85,4	1,45	512,4	8,7	58,8	100	1
		Sepharose 4B Afinite	1,5	25,8	0,0012	38,7	0,0018	21500	7,5	365,6

4.6. SDS-PAGE Sonuçları

Sentezlediğimiz molekülleri kullanarak hazırladığımız Sepharose 4-B-L-Tirozin afinite jellerinden saflaştırdığımız karaturp POD enzimlerinin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Jellerin boyanmasında gümüş boyama metodu daha hassas olduğu için tercih edildi. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE fotoğrafları Şekil 4.14’de gösterildi.



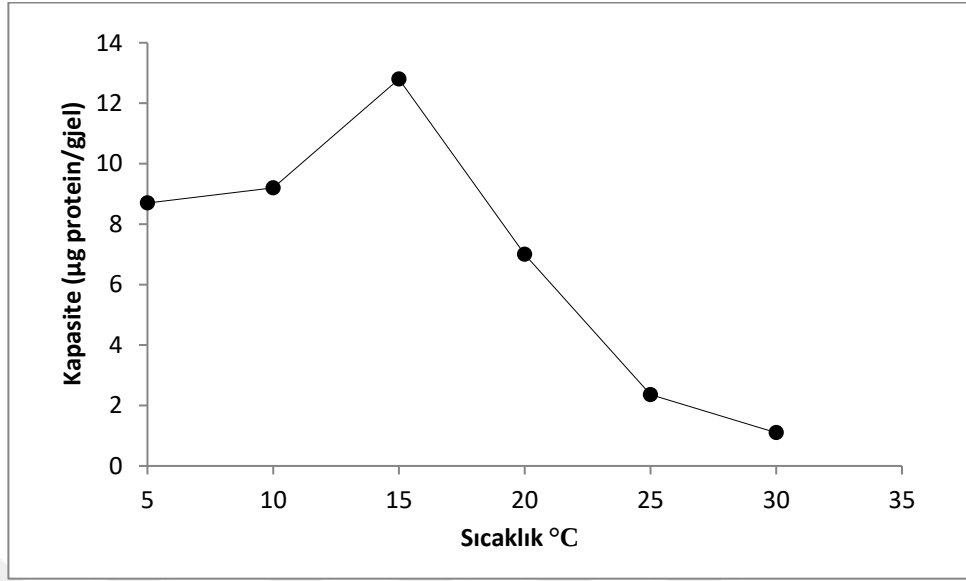
Şekil 4.14. (1) 4-Amino 3-bromo benzohidrazid ve (2) 4-Amino 3-nitro benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan karaturp enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

4.6.1. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülüyle hazırlanan afinite kolonunun karaturp POD enzimi tutma kapasitesinin belirlenmesi

4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülünü ligand olarak kullanılarak hazırlanan afinite jelinin karaturp POD enzimlerini tutma kapasitesi değişik pH, sıcaklık, ve iyonik şiddetlerde incelendi. Deney prosedürü bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde uygulandı.

4.6.1.a. Kolon kapasitesine sıcaklık etkisi ve sonuçları

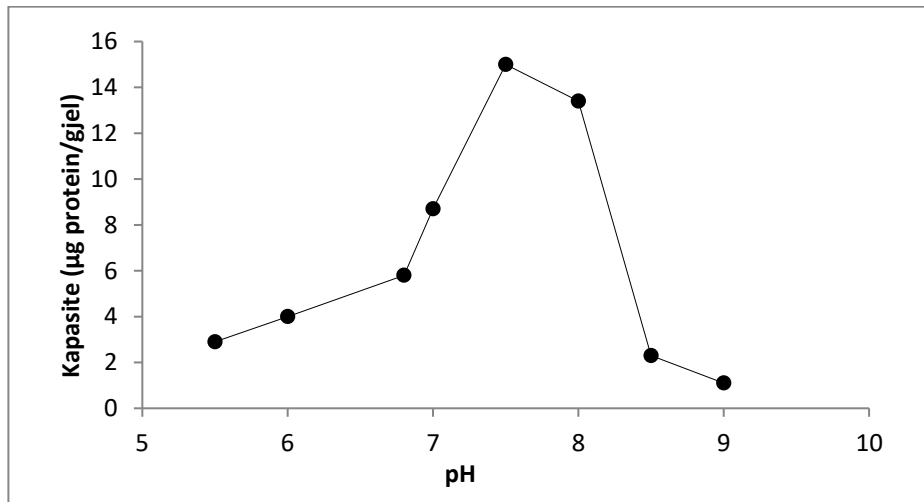
Karaturp POD enzimleri için farklı sıcaklıklarda (5, 10, 15, 20, 25, 30°C pH 6,8 sabit) kolon tutma kapasiteleri belirlendi. Sonuçlar μg protein/g jel olarak Şekil 4.15'de verildi.



Şekil 4.15. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği

4.6.1.b. Kolon kapasitesine pH etkisi ve sonuçları

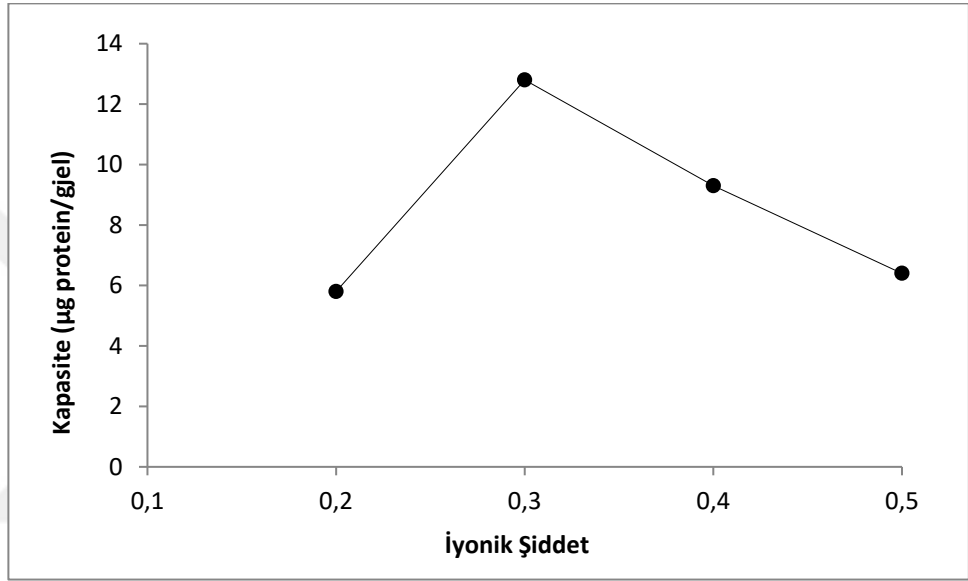
Karaturp POD enzimleri için pH'sı 4 ile 9 arasında değişen tamponlar kullanılarak afinite jelinin tutma kapasitesi µg protein/g jel olarak belirlendi ve sonuçlar Şekil 4.16'da verildi.



Şekil 4.16. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için pH-kapasite grafiği

4.6.1.c. Kolon kapasitesine iyonik şiddet etkisi ve sonuçları

Karaturp POD enzimlerinin kolona bağlanması için optimum şartlarda (pH, sıcaklık sbt.) iyonik şiddet 0,2-0,5 M arası tuz konsantrasyonlarında deneyler gerçekleştirildi, sonuçlar $\mu\text{g protein/g jel}$ başına grafik Şekil 4.17’de verildi.



Şekil 4.17. 4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jelinin karaturp POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidazlar değişik aromatik bileşikleri substrat olarak kullanırlar metabolizma sırasında ortaya çıkan H_2O_2 'yi etkisiz hale getirirler. (Robert *et al.* 1993). POD enzimleri bitki, ayvan, mantar ve bakterilerde bulunan prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden bir tür glikoproteindir. (Rompel *et al.* 2007).

Bitkisel POD olan enzimler; enzim yapılarının küçük bir kısmını oluştururlar (Fry 1986). POD enziminin; bitkilerde savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), sebze ve meyvelerin indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997) ve lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) gibi durumlarda rol aldığı bilinmektedir.

Organizmalarda geniş bir alana sahip olan peroksidaz çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Örneğin bitkilerde ki peroksidaz enzimleri karaturp, şalgam, bayırturpu kökü, domates tohumları vb hücrelerinden saflaştırılmıştır (Miranda *et al.* 2002). Ticari öneminin yüksek olması ve uygula alanının genişliği nedeniyle bitki peroksidaz enzimleri için saflaştırma çalışmaları zamanla daha da önemli bir hal almıştır.

Afinite Kromatografisi tekniği ile enzimler yüksek saflıkta ve tek basamakta saflaştırılmaktadır. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak bağlanan liganda spesifik ve tersinir bir şekilde tutunur ve seçimli bir biçimde liganttan ayrılır.

Hidrazidler, POD inhibitörleri olarak bilinirler. Çeşitli hidrazin ve hidrazin türevleri, mebanazine, iproniazid (sakinleştirici), izokarboksazid, hidralazin (tansiyon düşürücü), fenelzin (monoamin oksidaz inhibitörleri) ve PHZ (fenilhidrazin; polisitemi kontrolü), izoniazid [INH (izonikotinik hidrazit) tüberküloz antibiyotik] terapötik olarak kullanılmıştır. Fakat bu bileşiklerin çoğunluğu uzun süreli kullanımda hemolis, baz çifti mutasyonları ve karaciğer hasarı gibi yan etkilere sebep olduğundan ilaç olarak

kullanılmamaktadır. Hidrazinler metabolik olarak aktive edilir. Enzimatik reaksiyondan sonra, aktive edilen inhibitörler aynı enzime ya da farklı bir biyomoleküle ; ya yeniden bağlanır ya da aktif bölgeden serbest bırakılır. Bu durum inaktivasyona yol açar. Özgüllük hem aktif inhibitörün reaktivitesine hem de bağlanma afinitesine göre değişir. HRP C, PHZ tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir fakat PHZ süperoksit üretimi için pH 7,0'da oto-oksidasyona maruz kaldığından, terapötik bir madde olarak uygun değildir. Bunun aksine, INH'ın oto-oksidasyonu pH 7,0'da daha düşük bir hızda gerçekleşir. Hidrazinlerin enzimleri ile ilgili çalışmalarda miyeloperoksidazı dönüşümsüz inhibe ettikleri bulunmuştur. Peroksidazlara inhibitör olma potansiyelleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Kalın *et al.* 2014). Çalışmaların sonuçlarında görüldüğü üzere Dönüşümlü inhibitör olma potansiyelleri üzerine POD enzimlerinin saflaştırılmasında kullanılma potansiyelleri vardır.

Literatürde POD saflaştırma çalışmaları ile ilgili bir çok yöntem gösterilmiştir. Saflaştırmanın başarılı olabilmesi için ilk olarak matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligant olması gerekir ve bu ligant da numuneye spesifik bağlanmalıdır. Safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra , bağlı olan numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir metod bulunması gerekmektedir. Bu metodlarda pek çok çalışma yapılmıştır. Lahanadan (McLellan and Robinson 1987), *Leucaena leucocephala* ağacı meyvesinden, papayadan (Pandey and Dwivedi 2011; Pandey *et al.* 2012), karalâhanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), kırmızı pancardan (Rudrappa *et al.* 2007), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008) yapılan çalışmalar örnek verilebilir.

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

Afinite kromatografisinde PABH ligant olarak kullanıldığında peroksidaz enzimi kırmızı lahanadan 120 kat %2,9 verimle (Somtürk *et al.* 2014), şalgamdan ise %9 verimle 269,13 kat (Kalın *et al.* 2014), karaturptan %10,6 verimle 40,3 kat saflaştırılmıştır. Bu çalışmalarda bitkilerin özellikle nükleus, çiçek ve saplarında, yapraklarında, gövdelerinde, hücre duvarı, hücre membranlarında ve ribozomda bulunan peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından elde edilmiştir. Peroksidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan diğer yöntemler hem maliyet olarak daha maliyetli hem de zaman açısından daha uzun zaman almaktadır (Özdemir *et al.* 2001).

Afinite kromatografisini özel kılan durum çok basamaklı saflaştırma işlemleri sırasında enzim aktivitesinde ki kayıpları ortadan kaldırması ve daha yüksek verimle izole etmesidir. Bu tez çalışmasında ki amaç ise saflaştırma çalışmalarını geliştirmek ve verime katkı sağlamaktır. Bununla birlikte daha önce çalışılan 4-Amino benzohidrazidin ligand olarak kullanıldığı karaturp ve şalgam bitkilerinden peroksidaz enziminin saflaştırılması çalışması esas alınarak (Kalın *et al.* 2014), karaturp (*Raphanus sativus* L.) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması için afinite jeli hazırlandı. Ligand olarak 4-aminobenzohidrazid'in bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan POD enzimlerinin protein tayini, kinetik özellikleri, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi ve kullanılan ligandın kinetik özellikleri belirlendi.

Karaturp POD enziminin, 4-Amino benzohidrazid ve türevi moleküller, ligand olarak afinite kromatografisinde kullanarak, yüksek verimde ve saflıkta elde edilmesi hedefiyle türevler ticari olarak temin edilemediği için moleküllerin metil benzoat türevleri satın alınarak tarafımızca hidrazin sentezleri yapıldı. Sentezi yapılan 4-amino benzohidrazid türevlerinin ilk olarak inhibisyon kinetikleri incelendi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerinden afinite jellerinin sentezleri yapıldı. Saflaştırma tabloları hazırlanarak elde edilen sonuçlar üzerine tartışıldı. Çalışmamızın bütün basamaklarında kantitatif protein tayinleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Hemolizattaki protein miktarları ve saflaştırılan enzim çözeltisi bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem Proteine coomassie brillant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Elde edilen kompleks 595 nm'de

maksimum absorbans göstermektedir. Proteine boya bağlanması reaksiyonu çok hızlı gerçekleşmektedir. . Protein–boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır ve yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976). Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı (2010) prosedüre göre POD enziminin aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak belirlendi. L-tirozin uzantı kolu, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ise matriks olarak kullanıldı. Sepharose-4B-L-tirozin jelleri her bir inhibitörden 90 µmol madde alınarak hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara uygulandı, A₄₇₀ yüksek olan eluatlar birleştirilerek protein tayini yapıldı.

Saflaştırılan bu enzim üzerine 4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid ve 4-amino 2-nitro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.2, 4.5, 4.8 ve 4.11 de gösterildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek için doymuş olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplanan bu değerlerle çizilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiklerinde IC₅₀ değerleri bulundu. Karaturp peroksidaz enzimi için bu grafikler Şekil 4.6, 4.8, 4.10, ve 4.12’de gösterildi.

Karaturp peroksidaz enzimi için sırasıyla IC₅₀ değerleri; 4-amino 2-bromo benzohidrazid için; 373,5 mM, 4-amino 3-bromo benzohidrazid için; 115,5 mM, 4-amino 2-nitro benzohidrazid için; 0,961 mM ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid için; 0,440 mM olarak hesaplandı. Bütün moleküllerin IC₅₀ değerlerinin sonuçları değerlendirildiğinde peroksidaz enzimi inhibitörü olabileceği ortaya çıktı.

İnhibisyon tiplerini belirlemek için K_i değerleri hesaplandı. Karaturp peroksidaz enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda, 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı ve inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.6, 4.9 ve, 4.12’de gösterildi. 4-amino 2-bromo benzohidrazid, 4-amino 3-bromo benzohidrazid, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid için

Lineweaver-Burk grafikleri çizildi, K_i değerleri ve inhibisyon çeşitleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

Karaturp peroksidaz enzimi üzerine denenen inhibitörlerin K_i grafikleri Şekil 4.7, 4.9, 4.11 ve 4.13’de gösterildi. Karaturp peroksidaz enzimi K_i değerleri sırasıyla 4-amino 2-bromo benzohidrazid için 373,5 mM, 4-amino 3-bromo benzohidrazid için 127,5 mM, 4-amino 2-nitro benzohidrazid için 1,04 mM ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid için 0,356 mM olarak hesaplandı. Böylelikle saflaştırmada ligand olarak kullanılacak olan moleküllerin inhibisyon tipleri ve ayrıntılı kinetik parametreleri ilk defa tespit edilmiş oldu. 4-amino benzohidrazid türevi moleküllerinin karaturp peroksidaz enzimi için yeni inhibitörleri tespit edildi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için ayrı ayrı afinite jelleri sentezlendi.

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

Karaturp peroksidaz enzimi saflaştırma tabloları Çizelge 4.1 ve 4.15’de gösterildi. Karaturp peroksidaz enzimini saflaştırmak için 4-amino benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanıldığında sırasıyla %2,9 verimle 35,9 kat, 4-amino 2-bromo benzohidrazid ile %28,5 verimle 258 kat, 4-amino 3-bromo benzohidrazid ile %31,4 verimle 677 kat, 4-amino 2-nitro benzohidrazid ile %33,8 verimle 613,3 kat ve 4-amino 3-nitro benzohidrazid ile %7,5 verimle 365,6 kat saflaştırma yapıldı.

4-amino 3-bromo benzohidrazid molekülü ile yapılan saflaştırma çalışmalarında karaturp peroksidaz enziminde %31,4 verime ve 677 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Afinite tekniği kullanılarak karaturp peroksidaz enziminin saflaştırmada 4-

amino 3-bromo benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanılabileceğinin oldukça mühim olduğu belirlendi. Bu çalışma ilk defa tarafımızca gerçekleştirildi.

Karaturp peroksidaz enzimlerini kolon tutma kapasitesi bulunurken pH, sıcaklık ve iyonik şiddet parametreleri incelendi. Protein/gram-jel cinsinden karaturp peroksidaz enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite belirleme işlemlerinde en yüksek saflaştırma katsayısı ve verime ulaşılan kolon olan 4-amino 3-bromo benzohidrazid jelinden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı. Daha önceden afinite ile elde edilen karaturp peroksidaz enzimleri ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra, bağlanmış olan peroksidaz enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Jel kurutulup tartılarak mg protein/gram-jel cinsinden peroksidaz enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi (Arslan *et al.* 1996). Karaturp POD enzimi için 15 °C, pH 7,5 ve 0,3 M iyonik şiddette kolon tutma kapasitesi 1353,3 µg/g jel olarak tespit edildi.

Karaturp POD enzimlerinin saflaştırılmasında 4-amino 3-bromo benzohidrazid ile hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8'de 5, 10, 15, 20, 25 ve 30°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (µg protein/g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.15 de görüldüğü gibi 15°C'de karaturp peroksidaz enziminin jele bağlanma kapasitesi maksimum 1280 µg/g jeldir.

Karaturp POD enzimleri için 4-amino 3-bromo benzohidrazid afinite jeline pH'nın bağlanmasını belirlemek için farklı pH'larda (pH 5,5 ile 9 arasında) tamponlar kullanıldı ve en iyi pH için sonuçlar (µg protein/gram-jel başına) Şekil 4.16'da grafik edildi. Buradan 4-amino 3-bromo benzohidrazid afinite jeli için karaturp POD enziminin pH=7,5'da maksimum bağlandığı 1500 µg/g jel olarak belirlenmiştir.

4-Amino 3-bromo benzohidrazid afinite jeline Karaturp peroksidaz enzimlerinin bağlanma kapasitesine iyonik şiddetin etkisini belirlemek için enzimin en uygun bağlanma sıcaklığında ve optimum pH denemeler yapıldı. Bu iyonik şiddet 0,2 M ile 0,5 M arasında değiştirilerek, sonuçlar grafikte gösterildi. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi

0,30 M iyonik şiddet konsantrasyonunda karaturp peroksidaz enziminin 1280 µg/g jel başına bağlanmanın maksimum olduğu bulundu.

Saflaştırılan karaturp peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıklarını ve saflığını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.14’de karaturp peroksidaz enzimi için SDS-PAGE fotoğrafı gösterildi. Molekül ağırlığı 47 kDa olarak hesaplandı.

Sonuç Olarak;

4-Amino metil benzoat türevleri tedarik edilerek; 4-Amino 3-bromo-metil benzohidrazid, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid, 4-Amino 3-nitro benzohidrazid ve 4-amino 2-nitro benzohidrazid moleküllerinin sentezi yapıldı. Karaturp peroksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Çalışılan 4 molekülün enzimin dönüşümlü, yeni ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi. Afinite kolonunda ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.

Bu moleküller kullanılarak afinite jelleri hazırlandı. Karaturp peroksidaz enzimleri tek basamakta saflaştırıldı. Karaturp peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında; 4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülünün çalıştığımız moleküller içinde en etkili ligand olduğu belirlendi. Bu çalışmada ligand olarak kullandığımız 4-Amino 3-bromo benzohidrazid molekülünü kullandığımızda saflaştırma katsayılarının, literatürde bulunan çalışmalardan çok daha yüksek olduğu, tek kademedeki ve kısa sürede saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesinden dolayı da ticari kullanım potansiyelinin bulunduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- Adams, J.B., 1978. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature-short time processing of vegetables. *Journal Food Technology*, 13, 281–297.
- Agostini, E., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Milrand, S.R., Tigier, H.A., Acosta, M., 2002. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 1–7.
- Agostini, E., Medina, M. I., Milrad de Forchetti, S.R. and Tigier, H., 1997. properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596–598.
- Ak, T. and Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological Interaction*, 174, 27–37.
- Al-Senaidy, M., Abdurrahman, M. and Mohammad, A., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 293–298
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O. I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163–166.
- Bakan, N. 2007–2008. Kimyasal kinetik ve kataliz-Enzimler
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H. and Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–250.
- Bingöl, G., 1983. Biyokimya. Güven Matbaası. 285, Ankara.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 72, (1–2), 248–254.
- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*-Duch)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601.
- Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29–36.
- Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., 1987. *Methods in Enzymology*. (Editors: Colowick, S. P., Kaplan, N. O.) Academic Press, Inc., London, 1–55.
- Coogan, R.C., Wills, R.B.H., Nguyen, V.Q., 2001. Pungency levels of white radish (*Raphanus sativus* L.) grown indifferent seasons in Australia. *Food Chemistry*, 72, 1–3.
- Cosio, C., Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot*, 60, 391–408.
- Deepa, S. S. and Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C. and Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var

- esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574–1579.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 4-17 p, New York, USA.
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 165-186.
- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.* 42, 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y., Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium İon Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72–77.
- Holme, D.J., Peck, H., 2005 *Analytical Biochemistry*, Prentice Hall, 259261, England
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63.
- Kalin, R., Atasever, A. and Ozdemir, H., 2013. The Single-Step Purification of Peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish Blackradish and Turnip Roots. *Food Chemistry*, 10.125.
- Kampis, A., Bartuczakovacs, O., Hoschke, A. and Aosvigyazo, V., 1984. Changes in peroxidasesactivity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2011. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, 89138, Erzurum
- Keha, E. ve Küfrevioğlu. Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu. Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Köksal, E. and Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassicaoleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H. and Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.

- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D'Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lehninger, A.L., 2005. Principles of biochemistry. Worth publisher, Acedemic Press, New York.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Yu., Csoregi, E., Sakharov, I.Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lin, Z.F., Chen, L.H., Zhang, W.Q., 1996. Peroxidase from I. Cairica (L) SW Isolation, Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissocation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685.
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M. and Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Food Science and Technology*, 41, 1372-1379.
- McLellan, K.M. and Robinson, D.S., 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Miranda, M.V., Magri, M.L., Navarro Del Can˜ Izo, A.A., Cascone, O., 2002. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A Agarose, *Process Biochemistry*, 38, 537-543.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643-1650.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777–78.
- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J. and Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, 85, 365–376.
- Özdemir, H., Aygöl, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties. *Prep Biochem. and Biotech.*, 31(2), 125-134.
- Pandey, V.P., and Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from Leucaena, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, (2), 367–376.
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 367-376.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68, 1605-1611.
- Pütter, J. and Becker, R., 1987. Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases. Bergmeyer, third edition, VCH, 286 p, New York, USA.
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G. Victor, W.R., 1993. Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.

- Robinson, F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G., 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1422–1430.
- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M. and Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571–1579.
- Scandalios J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–316.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York.
- Signoret, A., Crouzet, J., 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Somtürk, B., Kalın, R. and Özdemir, N., 2014. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Appl Biochem Biotechnol*, 173:1815–1828.
- Spadiut O., Rossetti L., Dietzsch C. and Herwig C., 2012. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expression and Purification*, 86, 89–97.
- Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187–1196.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateryallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Tıpawan, T. Barrett M., 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
- Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, 3. Baskı, Palme Yayınları, Ankara, 124.
- Tzika, E.D., Sotiroidis, T.G., Papadimitriou, V. and Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology*, 228, 487–495.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205–219.

- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Vitali, A., Botta B, Delle Monache G, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, Petruzzelli R, Giardina, B., 1998. Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies, *Biochem. J*, 331, 513-519,
- Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57, 701-710.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Wilchek, M., Miron, T. and Kohn, J. 1984. Affinity chromatography. *Methods in enzymology*, 104, 3-55.

ÖZGEÇMİŞ

15.02.1991 yılında memur bir baba ve ev hanımı bir annenin tek çocuğu olarak Erzincan'da doğdu. İlköğretimini 2005 yılında Erzincan Barbaros İlköğretim Okulunda tamamladı. 2009'da Erzincan Anadolu Lisesini bitirdikten sonra aynı yıl Erzurum Atatürk Üniversitesi/Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi-Kimya Öğretmenliği Bölümünü bitirdi. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalı -Biyokimya alanında yüksek lisansına başladı.

