



**PAZI KÖKÜ (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*)
PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE SUBSTRAT
SPESİFİKLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Betül BOLDAZ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

2021

(Her hakkı saklıdır.)

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

**PAZI KÖKÜ (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SUBSTRAT SPESİFİKLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

(Purification, Characterization and Determination of Substrate Specifity of the Chard (*Beta vulgaris* L. var. *Cicla*) Peroxidase Enzyme)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül BOLDAZ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Erzurum
Ocak, 2021

PAZI KÖKÜ (Beta vulgaris L. var. cicla) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SUBSTRAT SPESİFİKLİĞİNİN
BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Betül BOLDAZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 12/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oy birliği / oy çokluğu (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Atatürk Üniversitesi

.....

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Atatürk Üniversitesi

.....

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

.....

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

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

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN

Enstitü Müdürü

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında sunulan “Pazı Kökü (Beta vulgaris L. var. cicla) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	11	30
Kuramsal Temeller	10	30
Materyal ve Yöntem	21	35
Bulgular	16	20
Tartışma	17	20
Tezin Geneli	8	25

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

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Betül BOLDAZ	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
12.2.2021	12.2.2021
İmza:	İmza:

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

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

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na ve Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Erzurum Teknik Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KALIN'a ve yardımlarını esirgemeyen laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her alanında maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve hayat arkadaşım Oğuzhan KARAKILIÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Betül BOLDAZ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PAZI KÖKÜ (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE SUBSTRAT SPESİFİKLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Betül BOLDAZ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Amaç: Bu çalışmada, 4-Amino-3-floro benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanılarak, pazı bitkisinden peroksidaz enziminin tek kademede saflaştırılması, saflaştırılan enzimle kinetik çalışmalar yapılması ve çeşitli substratlara olan ilgisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: 4-Amino-3-floro benzoat molekülü ticari olarak temin edildi ve bu molekülden 4-Amino-3-floro benzohidrazid sentezi yapıldı. Sentezlen molekül Sepharose-4B-L tirozine kenetlendirildi ve pazı peroksidaz enzimi tek basamakta saflaştırıldı. Saflaştırılan POD enzimi üzerine K_M , V_{max} , K_i , optimum pH, optimum sıcaklık ve inhibisyon etkileri incelendi.

Bulgular: 4-Amino-3-floro benzohidrazid molekülü ligand olarak kullanılarak sentezlenen afinite jeli ile pazı POD enzimi %8,83 verimle 50,3 kat saflaştırıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen enzim için sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı ve yaklaşık 37 kDa’da tek bant gözlemlendi. Saflaştırılan enzim üzerine kinetik çalışmalar guaiakol substratı varlığında yapılarak kullanılan ligandın dönüşümlü inhibisyon gösterdiği belirlendi ve IC_{50} değeri 577 μ M ve K_i değeri $523,11 \pm 145,11$ μ M bulundu. Enzimin substrat spesifliği çalışmaları kapsamında 5 farklı substrat kullanılarak her bir substrat için sırasıyla, hidrojen peroksit için K_M 0,05 mM, V_{max} 5,91 EU/mL, ABTS için K_M 0,074 mM, V_{max} 37,04 EU/mL, pirokatekol için K_M 1,295 mM, V_{max} 58,82 EU/mL, *o*-Dianisidin için K_M 1,724 mM, V_{max} 55,55 EU/mL, guaiakol için K_M 15,15 mM, V_{max} 20,66 EU/mL değerleri hesaplandı. Guaiakol substratı ile yapılan çalışma sonucunda optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 5,5 ve 30 °C olarak bulundu.

Sonuç: Yapılan çalışmada pazı peroksidaz enzimi, sentezlenen 4-Amino-3-floro benzohidrazid ligandı ile yüksek verim ve saflıkta elde edildi. Optimum pH 5,5 olarak hesaplanan ve substrat spesifite çalışmalarından en iyi substratının Lineweaver – Burk grafikleri kullanılarak guaiakol olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, pazı, peroksidaz, 4-Amino 3-floro benzohidrazid.

Ocak 2021, 52 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF THE CHARD (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) PEROXIDASE ENZYME

Betül BOLDAZ

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Purpose: In this study, it was aimed to prepare affinity gel with synthesized 4-Amino-3-fluoro benzohydrazide molecule for one-step purification of peroxidase enzyme from chard plant. Then, kinetic studies and determination of substrate specificity of the purified peroxidase were carried out.

Method: The 4-Amino-3-fluoro benzoate molecule was commercially available and hydrazide was synthesized from this molecule. The synthesized molecule was bound to the Sepharose-4B column as a ligand and by purifying the chard peroxidase enzyme, K_m , V_{max} , K_i , optimum pH, optimum temperature and inhibition effects on the purified POD enzyme were investigated.

Findings: POD enzyme with 4-Amino-3-fluoro benzohydrazide ligand was bound to Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material and purified 50,3 times by affinity chromatography in 8,83 % yield. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were made and a single band a 37 kDa were observed for the enzymes obtained in purification. Kinetic studies on the purified enzyme were performed with the guaiacol substrate. It was determined that the used ligand showed alternating inhibition and the IC_{50} value was 0,577 mM and the K_i value was $0,5231 \pm 0,1451$ mM. For substrate specificity of the enzyme, try 5 different substrates, primary for one substrate, K_M 0,05 mM for hydrogen peroxide, V_{max} 5,91 EU/mL, K_M 0,074 mM for ABTS, V_{max} 37,04 EU/mL, K_M 1,295 mM for pyrocatecol, V_{max} 58,82 EU/mL, K_M 1,724 mM for *o*-Dianicidine, V_{max} 55,55 EU/mL, K_M 15,15 mM for guaiacol, V_{max} 20,66 EU/mL were calculated. In the case of working with guaiacol substrate, optimum pH and optimum temperatures were found between 5,5 and 30 °C.

Results: In the study carried out, chard peroxidase enzyme was obtained in high efficiency and purity with the synthesized 4-Amino-3-fluoro benzohydrazide ligand. Using Lineweaver-Burk plots, it was found that the best substrate from substrate specificity studies, which was calculated as the optimum pH of 5,5 was guaiacol.

Keywords: Affinity chromatography, chard, peroxidase, 4-Amino-3-fluoro benzohydrazide.

January 2021, 52 pages

İÇİNDEKİLER

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
Enzim İnhibisyonu	4
Dönüşümlü inhibisyon	4
Dönüşümsüz İnhibisyon.....	6
Enzimlerin Sınıflandırılması.....	6
Peroxidazlar	7
Bitki Peroxidazları	10
Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>).....	10
Afinite Kromatografisi.....	11
KURAMSAL TEMELLER	15
Çalışmanın Amacı.....	17
MATERYAL VE YÖNTEMLER	18
Materyal	18
Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	19
Yöntem.....	23

Pazı kökü ham ekstraktının hazırlanması.....	23
Protein Tayini	23
Kalitatif protein tayini	23
Bradford protein tayin yöntemi	23
Peroksidaz aktivitesi tayini.....	24
Pazı Kökü (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	25
POD inhibitörü ve ligand seçimi	25
4-Amino 3-floro benzohidrazidin sentezlenmesi	25
İnhibitör Çalışmaları	26
POD Enzim aktivitesi üzerine 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülünün etkilerinin incelenmesi.....	26
Afinite jelinin hazırlanması.....	26
CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	27
4-Amino benzohidrazidin kenetlendirilmesi.....	27
Afinite kolonlarının paketlenmesi.....	28
Afinite kolonun numune tatbiki ve elüsyonu	28
SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi	29
Ayırma jelinin hazırlanması	29
Yığılma jelinin hazırlanması	29
Pazı Bitkisinin Kökünden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları.....	30
Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları.....	30
Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları	30
5 farklı substrat için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması çalışmaları.....	30
ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4-Amino 3-floro Benzohidrazidin Sentezlenmesi	32
4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülü için ^1H -NMR sonuçları	32
Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	33

Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Molekülünün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi .	33
4-Amino 3-floro benzohidrazid inhibitörü için POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar.....	34
POD Enziminin 4-Amino Benzohidrazid Molekülü İle Saflaştırılması Sonuçları.....	36
SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi Sonuçları	37
Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. Var. cicla) Bitkisinden Saflaştırılan POD Enzminin Karakterizasyon Çalışmaları İle İlgili Sonuçlar	38
Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları	38
Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları.....	39
Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	40
H_2O_2 substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	41
ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	42
<i>o</i> -Dianisidin substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	43
Pirotekol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	44
TARTIŞMA ve SONUÇ	45
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Peroksidaz Enzimlerinin Sınıflandırılması	8
Tablo 2. Afinite Kromatografisinin En Çok Uygulandığı Biyolojik Sistemler	13
Tablo 3. 4-Amino 3-floro Benzohidrazid İnhibitörü İçin Afinite Kolonundan Elde Edilen POD Enzimi Üzerine Guaiakol Substratıyla Yapılan %Aktivite-Konsantrasyon Deney Prosedürü	34
Tablo 4. POD Enzimi Üzerine Guaiakol Substratına Bağlı Olarak 4-Amino-3-Floro Benzohidrazid İnhibitörü İçin $1/V$, $1/[S]$ Değerleri Ve Deney Prosedürü	35
Tablo 5. POD Enzimini Üzerine 4-Amino 3-Floro Benzohidrazid İnhibitörünün İnhibisyon Etkisi	36
Tablo 6. Afinite Kolonlarından Elde Edilen POD Enzimi İçin Hazırlanan Saflaştırma Tablosu	37
Tablo 7. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>) POD Enziminin Optimum pH'sı İçin 0,1 M KH_2PO_4 Tampon Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Aktivite Ölçüm Sonuçları	38
Tablo 8. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>) Saflaştırılan POD Enziminin Optimum Sıcaklığı İçin Sıcaklık Aktivite Ölçüm Sonuçları.....	39
Tablo 9. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Guaiakol Derişimi Çizelgesi	40
Tablo 10. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik H_2O_2 Derişimi Çizelgesi	41
Tablo 11. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik ABTS Derişimi Çizelgesi	42
Tablo 12. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik <i>o</i> -Dianisidin Derişimi Çizelgesi	43
Tablo 13. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Pirokatekol Derişimi Çizelgesi	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Michaelis-Menten grafiği.	2
Şekil 2. Lineweaver-Burk grafiği.	3
Şekil 3. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.	4
Şekil 4. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.	5
Şekil 5. Yarı yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyonun şema üzerinde gösterimi.	5
Şekil 6. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi.	6
Şekil 7. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.	9
Şekil 8. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü.	10
Şekil 9. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojen peroksit giderme mekanizması.	10
Şekil 10. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) bitkisinin kökü.	11
Şekil 11. Afinite kromatografisinin genel prensibi.	12
Şekil 12. Uzantı kolunun gösterimi.	14
Şekil 13. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.	24
Şekil 14. POD inhibitörü ve ligand olarak kullanılan 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülü.	25
Şekil 15. 4-Amino 3-floro benzohidrazidin sentezlendiği genel reaksiyon şeması.	26
Şekil 16. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu.	27
Şekil 17. 4-Amino benzohidrazid molekülünün Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu.	28
Şekil 18. Sentezlenen 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu.	32
Şekil 19. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.	33
Şekil 20. POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-floro benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.	34
Şekil 21. POD enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino-3-floro benzohidrazid inhibitörü için edilen 1/V-1/[S] grafiği.	36
Şekil 22. Pazı bitkisi enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.	37
Şekil 23. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Enzim Ünitesi (EU)-pH grafiği.	38

Şekil 24. Pazıdan (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EU/mL) –Sıcaklık (°C) grafiği.....	39
Şekil 25. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) POD enziminin Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.....	40
Şekil 26. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) POD enziminin H_2O_2 substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.....	41
Şekil 27. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) POD enziminin ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.....	42
Şekil 28. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) POD enziminin <i>o</i> -Dianisidin substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.	43
Şekil 29. Pazı (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla) POD enziminin Pirokatekol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik	44

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BSA	: Sığır serum albümin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
E.C	: Enzim komisyonu
EÜ	: Enzim ünitesi
ε	: Molar ekstinksiyon kat sayısı
IC₅₀	: Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilodalton
K_i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_M	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
POD	: Peroksidaz
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
UV	: Ultraviyole
V_{max}	: Enzim aktif bölgesinin tamamının substratla dolduğu andaki hız

GİRİŞ

Canlılarda meydana gelen tüm yapım ve yıkım olaylarına metabolizma adı verilir. Tepkimeye giren moleküller aktivasyon enerjisi engelini aşınca kimyasal tepkimeler başlar ve devam eder. Aktivasyon enerjisi, belli bir sıcaklıkta 1 mol reaktanın aktif duruma geçmesi için gerekli olan en düşük enerji miktarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Aktivasyon enerjisi engelini aşılması amacıyla katalizörler kullanılır. Biyolojik katalizörlerin kullanılmasının nedeni, hücrede enerji engelini aşarak kimyasal tepkimenin gerçekleştirilebilmesidir (Keha ve Küfrevioğlu). Enzimlerin aktiflikleri; primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılarını korumaları açısından oldukça önemlidir (Lehninger 1982; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Hücre içerisinde oluşan reaksiyonlar kendiliğinden meydana gelmez ve enzimsiz gerçekleşmesi neredeyse imkânsızdır. Bu yüzden enzimleri sadece bir katalizör olarak tanımlamak yetersiz bir tanımlama olacaktır. Bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden ayıran özellikleri DNA aracılığıyla aktaran en önemli araçlardır (Keha ve Küfrevioğlu).

Enzim kullanılarak dönüşüme uğratılan ve aktif merkeze bağlanan molekül, substrat olarak isimlendirilir. Her substrat veya substrat grubunun anahtar-kilit modelinde spesifik bir enzimi vardır. Enzimler substratlarına oranla daha büyük, reaksiyonun gerçekleştiği yer ise daha küçüktür (Tüzün 2005).

Aktif merkez, polipeptit zincirlerinin belirli bir bölgesinde özel katlanmalar sonucunda oluşur ve katalitik aktiviteden sorumludur (Karlson and Telefoncu 1998).

Enzimatik reaksiyonların hızlarını etkileyen parametreler aşağıda belirtilmiştir (Daniel *et al.* 2010);

- Sıcaklık
- pH
- Enzim konsantrasyonu
- Zaman
- Substrat konsantrasyonu
- İnhibitör

Sıcaklık: Reaksiyon hızına etki eden en önemli faktör sıcaklıktır (Carabasa-Giribet and Ibarz-Ribas 2000; Yılmaz and Toledo 2005). Sıcaklığın artmasıyla enzimatik reaksiyonlar hızlanır ve aktivite artar. Fakat belli bir süre sonra düşmeye başlar.

pH: pH, amino asit zincirlerinin iyonlaşma seviyelerini veya substratın iyonizasyonunu değiştirdiği için enzim aktivitesinin ifadesinde belirleyici bir faktördür. Enzimlerin aktiviteleri ortamdaki hidrojen iyonu sayısı ile doğru orantılı olarak değişir ve enzimler en yüksek aktiviteyi optimum pH'da gösterirler. Enzimatik çalışmalarda optimum pH'da çalışabilmek amacıyla tamponlar kullanılır.

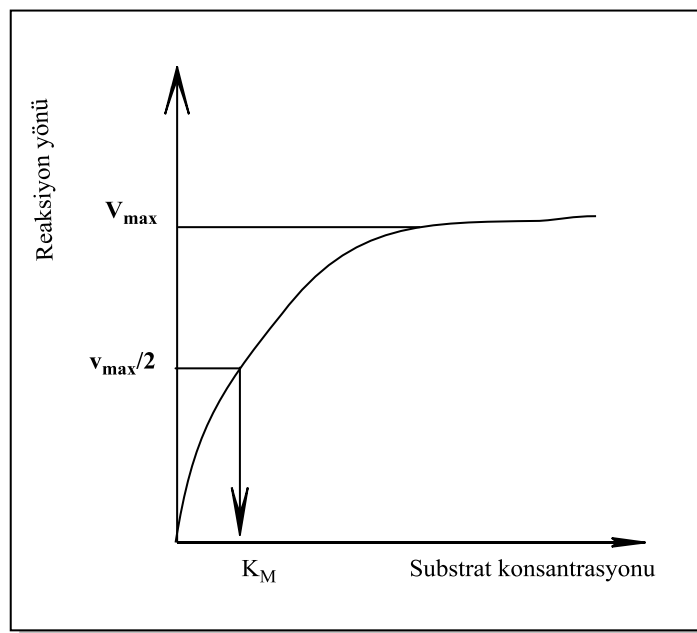
Enzim konsantrasyonu: Enzimin substrata doymuş olduğu durumlarda, reaksiyona giren moleküllerin konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı da doğrusal olarak artar (Al-Senaidy and Ismael 2011).

Zaman: Reaksiyonu engelleyen maddelerin birikmesi, enzimin zamana bağlı olarak aktivitesini kaybetmesi ve substratın tükenmesi gibi nedenlerden dolayı reaksiyon hızı zamanla giderek azalır (Keha ve Küvrevioğlu 2009).

Substrat konsantrasyonu: Enzimatik tepkimelerin hızı, sabit enzim konsantrasyonunda substrat miktarı ile eş zamanlı olarak artar. Doymuşluğa eriştiğinde reaksiyon hızı sabitlenir. Bunun nedeni ortamda bulunan enzimlerin tümünün substratlarla reaksiyona girmiş olmasıdır. Bu durumda enzim, maksimum hıza ulaşmış demektir.

Araştırmacılar, 1902 yılında Enzim-Substrat ile Enzim-Substrat kompleksi arasında bir ilişki olduğu fikrini ortaya atmışlardır. Daha sonra bu fikri Michaelis-Menten geliştirerek günümüzde kendi isimleriyle anılan sabit ve eşitliğe ulaşmışlardır (Colowick and Kaplan 1987).

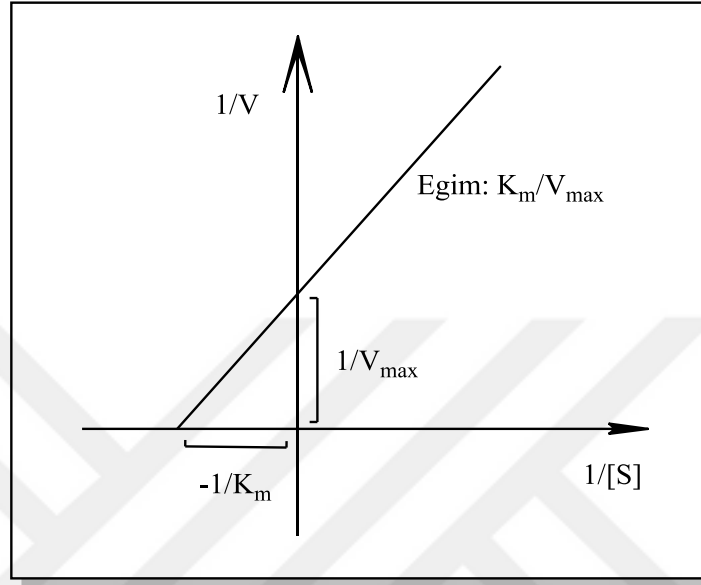
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$



Şekil 1. Michaelis-Menten grafiği.

Grafiği doğrusal olan başka denklemler kullanılarak bir enzime ait $V_{\max}$ ve K_M ifadelerini deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak amaçlanmıştır. Bu denklemlerden en sık kullanılan Lineweaver-Burk denklemidir ve bu denklem Michaelis-Menten denkleminin ters çevirilip çarpanlarına ayrılmasıyla oluşturulmuştur (Lineweaver and Burk 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot [S] + \frac{1}{V_{\max}}$$



Şekil 2. Lineweaver-Burk grafiği.

Enzim aktivitesinin etkilendiği faktörler; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. Enzimlerin çalışabilmesi için optimum pH ve substrat konsantrasyonlarının doygunluğun üzerine çıkması gerekmektedir. Böylece sıfırıncı dereceden bir reaksiyon oluşmuş olur. Kofaktör bulunduran enzim, metal iyonları veya koenzim derişimleri doygunluğun çok üstünde alınır ve enzim konsantrasyonu hızını sınırlayan tek faktördür. Böylece hız, enzim miktarıyla doğru orantıya sahiptir. Bu nedenle düşük substrat konsantrasyonlarından elde edilen değerler daha az güvenilir (Lehninger 1982). Enzim aktivitesi ‘Enzim Ünitesi’ ile ifade edilmektedir. 25°C’de ve optimum şartlarda 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına ‘Enzim Ünitesi’ denir. Neredeyse tüm enzimler için “Michaelis-Menten” denklemi enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde kullanılan temel bir ifadedir (Keha ve Küfrelioğlu 2009).

Enzimlerin bazı bileşikler tarafından hücre içi ve hücre dışı etkinliklerinin zayıflatılması ve bunun yanında ortadan kaldırılması durumuna inhibisyon, bu duruma sebebiyet veren bileşikler ise inhibitör olarak adlandırılır. İnhibitörler, metabolik yolların

aydınlatılmasında biyokimyacılar için oldukça önemlidir (Lehninger 2005; Keha ve Küfrelioğlu 2009).

Enzim İnhibisyonu

Enzimatik bir reaksiyon hızının inhibitör olarak tanımlanan bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulması olarak tanımlanmaktadır. Enzim inhibisyonu, dönüşümlü (Reversibl) ve dönüşümsüz (Irreversibl) olmak üzere iki alt başlıkta incelenir (Keha ve Küfrelioğlu 2009).

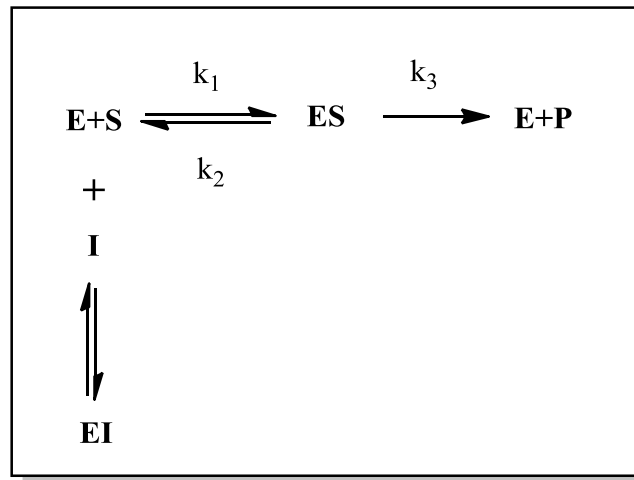
Dönüşümlü inhibisyon

Enzim-inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu oluşturur. İnhibitör enzim veya enzim-substrat kompleksiyle kovalent olmayan şekilde bağlanır (Lehninger *et al.* 2005). Bu tip inhibisyonlarda enzim-inhibitör ilişkisi, inhibitöre nazaran enzim konsantrasyonunun veya substrat konsantrasyonunun artırılması ile tersine çevrilebilmektedir. Bu inhibisyon çeşidi 3 başlık altında toplanır:

- I. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon
- II. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon
- III. Yarı yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyon

I. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon:

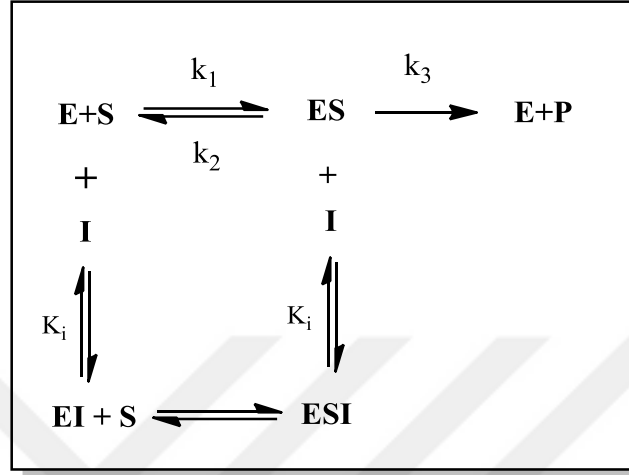
Yapısal olarak substrata benzeyen inhibitör, enzimin etkin bölgesi için substratla yarış halindedir. İnhibisyon etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla substrat konsantrasyonu artırılmaktadır. Şekil 3'te gösterildiği gibi enzimin K_M değerinde artış gözlenirken V_{max} değeri değişmez (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrelioğlu 2009).



Şekil 3. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.

II. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon:

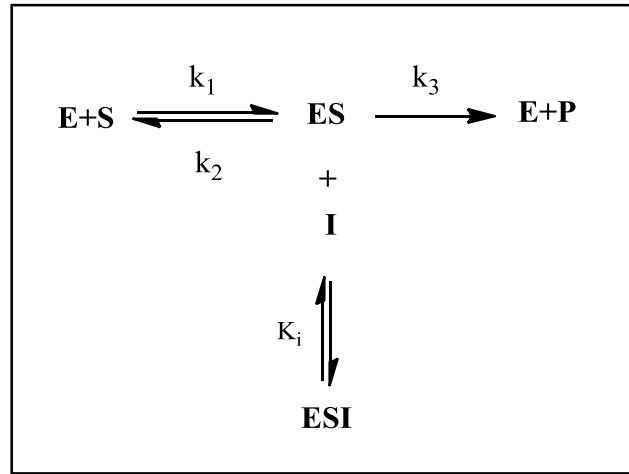
Substrat ile inhibitör yarışmalı inhibisyonunda olduğu gibi enzimin aktif bölgesi için yarış halinde değildirler. Bunun nedeni substrat ile inhibitörün, enzimin farklı bölgelerine bağlanması ve EI, ESI kompleksinin oluşmasıdır. Şekil 4'te gösterildiği gibi enzimin K_M değeri değişmezken V_{max} değeri azalır (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 4. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.

III. Yarı yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyon:

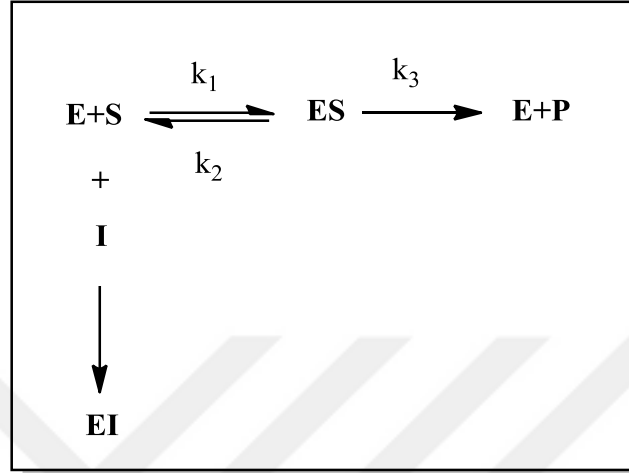
Yarı yarışmalı inhibisyonunda inhibitör sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır, serbest enzime bağlanmaz ve bunun neticesinde ES konsantrasyonunda azalma meydana gelir. Şekil 5'te gösterildiği üzere K_M ve V_{max} ikisi birden azalma gösterir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 5. Yarı yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyonun şema üzerinde gösterimi.

Dönüşümsüz İnhibisyon

İnhibitörler enzimle kolay ayrılamayan bir kompleks oluşturur ve kovalent bağ kurarlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu durumda enzimin yeniden aktifleşmesi söz konusu değildir. Dönüşümsüz inhibisyonunda K_M sabiti değişmezken V_{max} azalır (Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 6. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi.

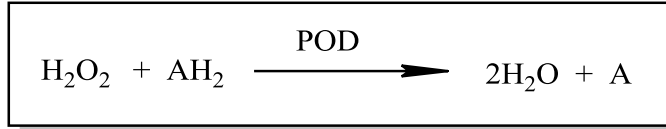
Enzimlerin Sınıflandırılması

Katalize ettikleri tepkimelere göre sınıflara ayrılan enzimlerden, aynı tepkimeleri gösteren farklı enzimler izoenzim olarak isimlendirilir (Paulo and Gübitz 2003). Enzimler gösterdikleri özelliklere göre 6 başlık altında incelenir:

- 1- Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederler.
- 2- Transferazlar: Alıcı ve verici moleküller arasında amino, açıl ve fosfat grubu gibi grup transferi yapan enzimlerdir.
- 3- Hidrolazlar: Bir molekülü iki ve daha fazla sayıda moleküle ayırmak için su varlığında gerçekleşen hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.
- 4- Liyazlar: C-C, C-O, C-S, C-N bağlarının kırılmasını, hidrolizden ve yükseltgenme harici yollarla katalizlerler.
- 5- İzomerazlar: Bir molekül içerisindeki atomların yeniden düzenlenme reaksiyonlarını katalizlerler.
- 6- Ligazlar: İki molekülün birbirlerine bağlanma tepkimelerini katalizlerler (Tsai 2007).

Peroksidazlar

Oksidoredüktaz enzim sınıfına ait olan peroksidaz enzimleri (POD, E.C.1.11.1.7), hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında organik ve inorganik substratın oksidasyonunu gerçekleştiren enzimlerdir. Yapılarında prostetik grup olarak hem grubu taşıyan peroksidazlar, reaksiyonlarının bitiminde hidrojen peroksit, su ve serbest radikale dönüşür. Aşağıda şekil ile özetlenmiştir;



Bitki ve hayvanlarda çok sayıda bulunan peroksidazlar tüm bu organizmalarda birçok görevi üstlenirler. Peroksidazlar organik moleküllerin hücre içi taşınmasında kullanılmaktadır (Sakharov *et al.* 2001). Bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi, zararlılara karşı savunmayı ve lignin üretimini kontrol ederler. Hayvan dokularında ise oksidatif hasarın engellenmesinde büyük bir öneme sahiptir (Kahraman 2003).

Peroksidazların ısıya dayanıklılıklarının yüksek olması ve kolay aktivite ölçümlerinden dolayı hem endüstride kullanım alanları her geçen gün yayılmakta hem de enzimatik çalışmalarda model enzim olarak sıkça tercih edilmektedir (Hiraga *et al.* 2001). Peroksidazlar kâğıt ve tekstil endüstrisi gibi pek çok kullanım alanına sahiptir ve özellikle fenolik kirleticilerin etkisini ortadan kaldırarak çevre kirliliğinin önlenmesi amaçlanmaktadır (Kirk *et al.* 2002).

Peroksidaz enzimi kitlerin %80'den fazlasında marker olarak kullanılmaktadır. Peroksidazlar organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunun katalizlenmesinde, sentetik boyaların renk gideriminde, oksijen türleri için indikatör ve fenollü reçine sentezleri için ise katalizör olarak tercih edilmektedir (Kahraman 2003).

Peroksidazlar bitkilerde, hayvanlarda, bakterilerde, mantarlarda bulunur ve iki üst familya içinde sınıflandırılabilir. Bunlar;

- Mantar, bitki ve bakteri peroksidazları,
- Hayvan peroksidazlarıdır (Soda *et al.* 1991).

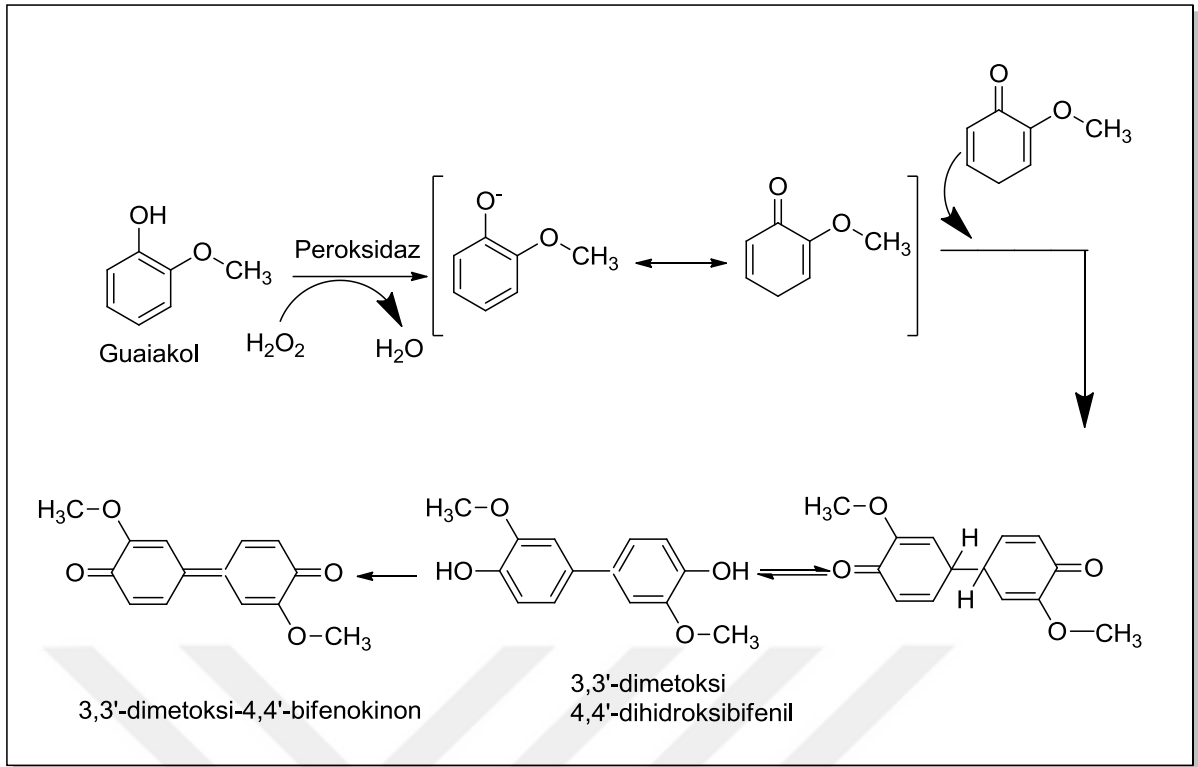
Tablo 1. Peroksidaz Enzimlerinin Sınıflandırılması (Hiraga *et al.* 2001).

Süper Aile	Enzim	Kaynak	Moleküler Kütle (kDa)
Hayvan Peroksidazları	Eosinophil Peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	78-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutasyon Peroksidaz	Hayvan, Bitki	6-2, 75-112
	Prostaglantin endoperoksidaz Sentaz	Hayvan	115-140
Katalaz	Katalaz	Hayvan, Bitki Mantar, Maya	140-530
Bitki Peroksidazları (Sınıf I)	Sitokrom c Peroksidaz	Maya, Bakteri	32-63
	Katalaz Peroksidaz	Bakteri, Mantar	150-240
Bitki Peroksidazları (Sınıf II)	Askorbat Peroksidaz	Bitki	30-58
Bitki Peroksidazları (Sınıf III)	Manganaz Peroksidaz	Mantar	43-49
	Ligninaz	Mantar	40-43
	Peroksidaz	Bitki	28-60

Bitki peroksidazları, guaiakol, pirogallol ve katekol gibi çeşitli fenolik bileşiklerin peroksit karşısında yükseltgenmesini gerçekleştirebilir (Onsa *et al.* 2004).

Biyolojik reaksiyonlarda hidrojen peroksitin oksitleyici özelliğinden dolayı hızlıca ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunu da hücre içerisinde antioksidan özelliğe sahip katalaz ve peroksidaz enzimleri gerçekleştirir (Halliwell 1984).

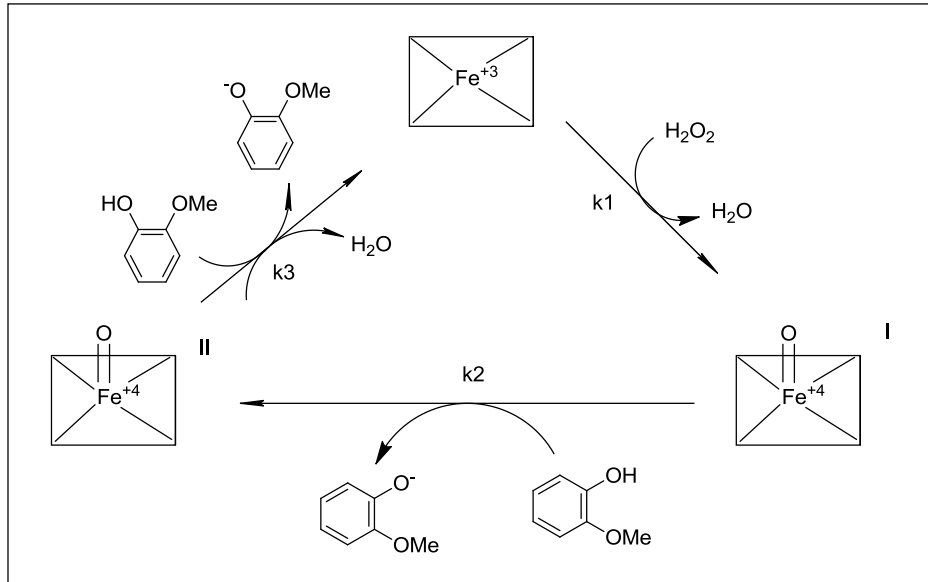
Substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgenme mekanizması, peroksidaz varlığında yapılan çalışmalar neticesinde açığa çıkarılmış ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinona yükseltgendiği tespit edilmiştir (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 7. Peroksidaz enziminin guaiakol substratını guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.

Guaiakol'ün substrat olarak kullanılması ilk kez 1809 yılında başlanmıştır. Fakat peroksidaz teriminin kullanımı bundan yaklaşık 100 yıl sonra olmuştur. Bu kullanım at turpundan saflaştırılan enzim için yapılmıştır (Van Huystee 1987).

Peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması yapılan bu çalışmalar neticesinde aydınlatılmıştır. Bu mekanizmada enzim, peroksinin bir ekivalenti ile reaksiyon vererek bileşik I'ı oluşturur. Bileşik I, Fe içeren bir porfirin katyon radikalıdır. Bu reaksiyon iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonudur. Hidrojen peroksit (H_2O_2) suya indirgenirken enzim ise yükseltgenmektedir. Demir üzerine yerleşmesi bir oksitleme ekivalenti ortadaki oksiferrili vererek gerçekleşir. Daha sonra bileşik II organik substratı yükseltgeyerek I substrat radikalini oluşturur. I, ikinci bir reaksiyona maruz kalır ve II ürününü verir. Bileşik II normal bir porfirin ligand için düzenlenmiş oksiferril bir merkez içerir. Sonuç olarak bileşik II diğer substratla etkileşerek indirgenir ve doğal haline geri döner (Battistuzzi *et al.* 2012).

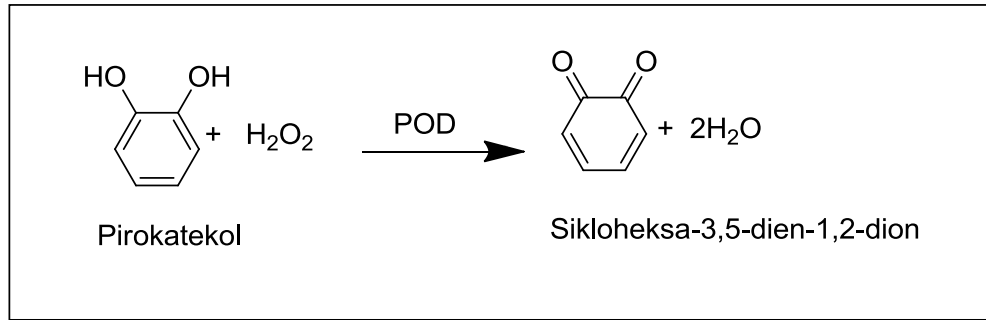


Şekil 8. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü.

Bitki Peroksidazları

Peroksidazlar, bitki familyası içinde geniş bir yayılım göstermektedirler (Miranda *et al.* 2003). Peroksidaz bitkilerden, pazı yaprak ve kökleri, ıspanak yaprakları, lahana, brokoli ve domates tohumlarından saflaştırılmaktadır. Peroksidazlar anyonik, nötral ve katyonik olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılırlar (Soda *et al.* 1991).

Peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar karmaşıktır ve şekil 9’da gösterilen formül ile reaksiyonları katalizlerler (Van Huystee 1987). Yapım-yıkım aşamasında oluşan hidrojen peroksiti inaktif hale getirirler (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987).



Şekil 9. Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması.

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*)

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) *Chenopodiaceae* familyasına ait otsu bir bitkidir. Kırılarda kendiliğinden yetişebildiği gibi sera ve sebze bahçelerinde de yetiştirilebilmektedir. Mart ayından temmuz ayına kadar ekilebilmekte ve kış sonuna kadar hasatı yapılabilir. Bakımı iyi yapılırsa yılda 5 kez hasat almak mümkündür.

Pazı geniş ve yeşil yapraklara sahiptir, kökleri ise dallıdır. Yetiştirilmesi için serin topraklara ihtiyaç duymaktadır. Yapraklarının palmitik asit, stearik asit, oleik asit, şiringik asit, linoleik asit, glikolipitler, folik asit, β -karoten, askorbik asit, E vitamini, pektin, polisakkaritler ve saponin içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca pazı yapraklarının anti-diyabetik özellik gösterdiği de rapor edilmiştir (Bolkent vd 2000).



Şekil 10. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) bitkisinin kökü.

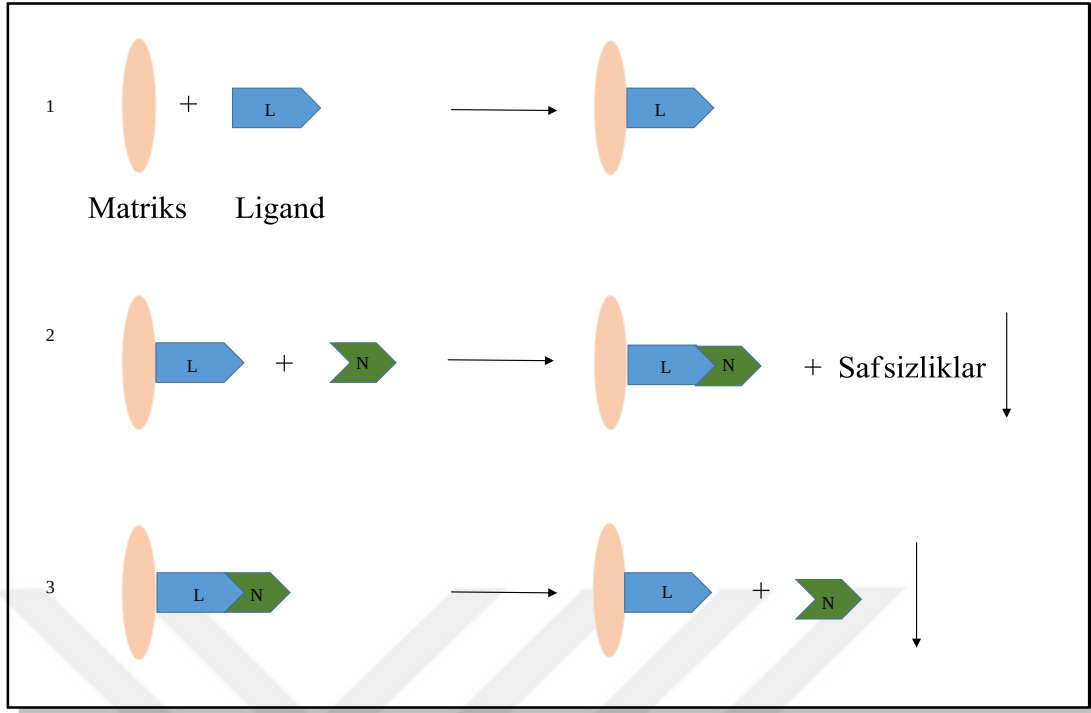
Afinite Kromatografisi

Bu kromatografik yöntemde protein moleküllerinin fiziksel veya kimyasal özellikleri yerine biyolojik fonksiyonları kullanılarak ayırım yapılması sağlanmaktadır. Hedef proteinin, çözünmeyen bir kolon dolgu maddesi üzerine immobilize edilen ve hedef proteini tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesi esasına dayanır.

Afinite kromatografisi hızlı, kullanımı oldukça kolay ve yüksek seçiciliğe sahip bir yöntemdir. Tek basamakta yüksek oranda enzimlerin saflaştırılmasını sağlamasına rağmen pahalı bir yöntem olduğundan büyük ölçekli saflaştırma işlemleri için tercih edilmemektedir (Konak vd 2014).

Matrikse kovalent olarak bağlanabilen bir ligand varlığında başarılı ve verimli bir ayırım yapılabilmektedir. Bu işlem için ayrıca immobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlanma göstermesi ve safsızlıklar giderildikten sonra bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması gerekmektedir (Axen and Ernback 1971).

Afinite koromatografisinin genel prensibi Şekil 11’de gösterildiği gibidir:



Şekil 11. Afinite kromatografisinin genel prensibi.

*((1)'de ligand matrikse kovalent bağlanır, (2)'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir).

Matriks

Seçilen kolon matriksi, kolonda bileşiklerin ayrılmasında önemli bir yere sahiptir. Ayırma işlemlerinde kullanılan kimyasallara karşı kararlı, hidrofobik, sert, büyük gözenekli ve inert özelliklere sahip olduğundan sıklıkla tercih edilmektedir (Hage and Clarke 2004).

Afinite kromatografisinde matriks olarak; Bio-gel, Sephadex ve Sepharose gibi farklı polimerler kullanılmaktadır. Bunlar içinde en çok kullanılanı inci halinde dizilmiş agaroz jel olan Sepharose'dir. Bu matriksin tercih edilme nedeni, aktif moleküllerin immobilizasyonu işleminde gereken tüm özellikleri barındırdığındandır. Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bağlanması için kolayca türevlendirilebilir. Bunlardan Sepharose-4B en iyisidir ve en çok kullanılanıdır (Axen and Ernback 1971).

Ligand

Afinite kromatografisi matriksine bağlanan ligandın afiniteye uygun şekilde tercih edilmesinin nedeni, kolon içerisinde ayrımın uygun bir şekilde gerçekleşmesi içindir. Biyolojik kökenli olmayan doğal ya da sentetik moleküllerin kullanılmasının yanı sıra bu ligandların çoğu biyolojik kökenlidir (Hage 1999; Hage and Clarke 2004).

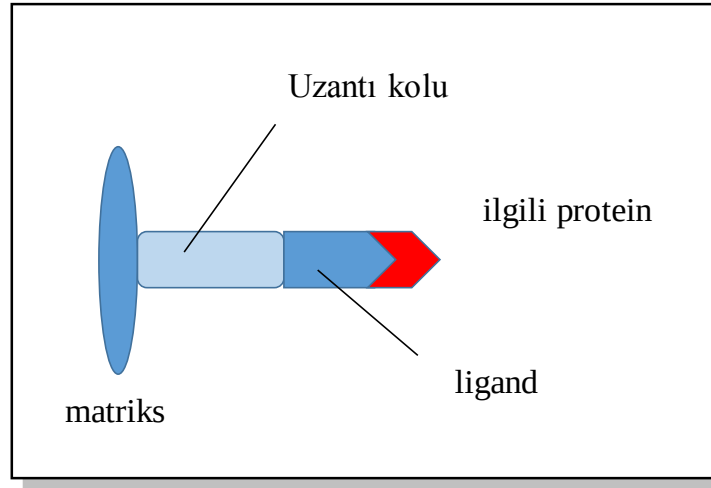
Tablo 2. Afinite Kromatografisinin En Çok Uygulandığı Biyolojik Sistemler

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

Uzantı kolu

Aktif bölge enzimlerde genellikle iç kısma yerleşmiş olarak bulunur. Bu nedenle matriks ile ligand arasında istenmeyen etkileşimler oluşabilmektedir. Bu istenmeyen etkileşimleri ortadan kaldırmak amacıyla matriks ile ligand arasına “uzantı kolu” adı verilen moleküller yerleştirilir.

Uzantı kolunun uzunluğu işlevi açısından oldukça önemlidir. Uzantı kolunun çok kısa olması durumunda, kol etkisiz kalır ve ligand örnekteki saflaştırılacak maddeyi bağlayamaz. Bunun aksine, uzantı kolunun çok uzun olması durumunda ise spesifik olmayan etkiler fazlalaşır ve ayırmanın seçiciliği azalır. Ocarra ve arkadaşlarının uzantı kolunu çok uzun kullanarak yaptığı deneyde, uzantı kolunun örnekteki maddelere hidrofobik etkileşimlerle bağladığını gözlemlemiştir. Spesifik olmayan bu hidrofobik etkileşimler, afinite kromatografisi için istenilen bir durum değildir (Ocarra *et al.* 1974).



Şekil 12. Uzantı kolunun gösterimi.

KURAMSAL TEMELLER

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

Peroksidazlar (E.C.1.11.1.7) hidrojen peroksit varlığında çok sayıda organik ve organik olmayan substratın yükseltgenmesini katalize eden oksidoredüktaz sınıfında yer alan enzimlerdir. Mikroorganizmalarda, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunurlar ve bitkilerde büyüme ve gelişmenin kontrolü, patojenlere karşı savunma, lignin biyosentezi ve hücre çeperi yapımı gibi birden fazla görevi icra ederler. Ayrıca peroksidaz enzimi, hayvan dokularında H_2O_2 oluşumu sonucu gerçekleşen oksidatif hasara karşı oldukça etkilidir (Kahraman 2003).

Peroksidaz enzimi, kağıt ve tekstil endüstrisinde özellikle fenolik kirleticilerin nötr hale getirilmesi (Kirk *et al.* 2002), organik moleküllerin biyotransfer reaksiyonlarının katalizlenmesi gibi pek çok kullanım alanına sahiptir (Sakharov *et al.* 2001). Peroksidazlar enzimatik kitlerin %80'den fazlasında marker olarak kullanılmaktadır (Kahraman 2003). Bu enzimlerin endüstride tercih edilme sebepleri yüksek ısıya tolerans göstermeleri ve farklı substratları kullanabilme yeteneklerindendir.

Peroksidazlar hurma yaprakları (Al-Senaidy and Ismael 2011), avakado (Rojas-Reyes *et al.* 2014), karnabahar (Köksal ve Gülçin 2008), domates (Kokkinakis and Brooks 1979) gibi çeşitli bitkisel kaynaklardan başarıyla saflaştırılmışlardır. Ayrıca peroksidazlar bazı mantar ve bakteri türlerinden de başarı ile saflaştırılmışlardır. *Streptomyces cyaneus* (Mliki and Zimmermann 1992) ve *Geotrichum candidum* (Kim and Shoda 1999) sırası ile peroksidaz enzimi için bakteri ve mantar kaynaklarıdır.

Yetiştirilebilmesi için serin topraklara ihtiyaç duyan pazı bitkisi, geniş yaprak ve dallı köklere sahiptir. Yapraklarında şiringik asit, palmitik asit, oleik asit, glikolipitler, folik asit, linoleik asit, askorbik asit, β -karoten, stearik asit, E vitamini, pektin, polisakkaritler ve saponin gibi kimyasal bileşikler bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca pazının kan şekeri düzeyinin kontrol altına alınmasında etkili olduğu bulunmuştur (Bolkent vd 2000).

Yapılan çalışmalar sonucunda peroksidaz enziminin çok sayıda izoenzim yapısı tespit edilmiştir. Değişik bitki kaynaklarından elde edilen bu izoenzimlerin; substrat spesifitesi, moleküler ağırlık, stabil sıcaklık, optimum pH, ve fizyolojik rol gibi spesifik özelliklerinin farklı olduğu bulunmuştur (Tıpawan and Barrett 2005). SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen verilere göre molekül kütlesi özelliği; at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, brokoli (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal ve Gülçin 2008) ve domateste (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, hurma yaprakları ile yapılan başka bir çalışmada ise (Al-Senaidy *et al.* 2011) 55 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak tespit edilmiştir. Optimum pH değerlerinin ise 5,0-7,5 arasında değişkenlik gösterdiği bulunmuştur (Tıpawan and Barrett 2005).

Peroksidaz üzerine yapılan en son saflaştırma çalışmalarında ise turp türlerinden peroksidaz enziminin afinite kromatografi tekniği ile hızlı ve yüksek verimde saflaştırılmış ve 10 farklı 4-Amino benzohidrazid türevi sentezlenerek ligand olarak kullanılmıştır (Özdemir vd 2019). Bir diğer çalışmada ise yaban turpu peroksidazının afiniteye dayalı saflaştırılması için yeni bir teknik geliştirilmiştir. Aminobenzohidrazid bazlı afinite kromatografisi kullanarak yaban turpu peroksidazının (HRP) izolasyonu için verimli bir prosedür geliştirilmiştir. Uzun süreli kullanım ve büyük ölçekli saflaştırmaya uygun olduğundan Sepharose 4B-aminobenzohidrazidler kullanılmıştır. Bu çalışmada 26 aminobenzohidrazid türevi sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve yeni HRP inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu moleküllerin HRP enzimi üzerindeki detaylı inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Özdemir vd 2020).

Çalışmanın Amacı

Literatürde yapılan çalışmalarda peroksidaz enzimi üzerine pek çok saflaştırma metodu mevcuttur. Bu çalışmalarda amino hidrazinlerin ligand olarak kullanıldığı ve farklı bitkilerden POD saflaştırıldığı belirtilmiştir. Fakat pazı peroksidaz enziminin 4-Amino 3-floro benzohidrazid ligandı kullanılarak afinite kromatografisi metoduyla saflaştırılması ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır. POD enzimlerinin tek basamakta saflaştırılması daha önce kullanılan metotlara göre; daha yüksek verimle, daha az maliyetle ve daha az sürede gerçekleştirilmesi ve yaygın kullanımları sebebiyle önemlidir.

Bu çalışmada, 4-Amino-3-floro benzohidrazid ligandı ilk defa sentezlenerek afinite jelinin hazırlanması ve pazı bitkisinden peroksidaz enziminin tek kademedede saflaştırılması, saflaştırılacak peroksidaz enzimi için kinetik çalışmalar ve substrat spesifikliğin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Böylece pazı peroksidaz enzimi için yeni afinite tekniği ile saflaştırılmasının yapılması literatüre önemli katkı sağlayacak ve araştırmacılara ışık tutacaktır.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Materyal

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasallar	Üretici Firma
İzoproponal, L-Tirozin, Sodyum azotür, Hidroklorik asit, Sodyum perklorat, Fosforik asit, Gümüş nitrat, Sodyum sülfat, Sülfirik asit, Pirokatekol	E. Merck AG
ABTS, Akrilamid, Brom timol mavisi, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, Dikloro metan, Diyaliz torbası, Etanol, Etil asetat, Formaldehit, Gliserol, Glutaraldehit, Guaiakol, , %64 Hidrazin monohidrat, Hidrojen peroksit, Metanol, N,N'-metilen bisakrilamid, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Sodyum asetat, Sodyum bikarbonat, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Sodyum karbonat, Sodyum klorür, Sodyum Nitrit, Sodyum tiyosülfat, Standart serum albumin, Tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), 4-Amino benzohidrazid, o-Dianisidin	Sigma Chemical Company
4-Amino 3-floro metilbenzoat	Fluorochem
Sodyum hidroksit, Potasyum fosfat, Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
β -merkaptetoetanol	Fluka
Glisin	ICN Biomedical s. inc.

Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma sırasında aşağıda verilen cihazlar kullanıldı:

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

Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler

1) Siyanojen Bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye α amino asit olan ve doğada karşımıza genelde L-formunda çıkan L-Tirozin kenetlendirme reaksiyonunda kullanılan tampon: pH'ı 9 olan 0,1 M NaHCO_3 'ten 0,84 g tartılarak üzerine 80 mL saf su eklendi ve çözünmesi beklendi. Daha sonra 1 M NaOH kullanılarak pH 9 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf suyla tamamlandı.

2) Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 4-Amino benzohidrazid molekülünün kenetlendirilmesi işleminde kullanılan 0,2 M NaHCO_3 (pH 8) tampon çözelti: 0,84 g (0,005 mol) NaHCO_3 tartılarak üzerine 80 mL su eklendi ve çözünmesi için beklenildi, pH 9 oluncaya kadar 1 M NaOH ilave edildi ve toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3) Sepharose-4B-L-Tirozin-4-Amino benzohidrazid afinite jelinin yıkanması işleminde kullanılan 10 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) tampon: 6 g (0,025 mol) NaH_2PO_4 , 400 mL saf suda çözüldü. pH 6,8 olana dek 1 M HCl ile titre edildi, toplam hacim destile su kullanılarak 500 mL'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. Siyanojen Bromür (CNBr) ile aktif hale getirilmiş Sepharose-4B afinite kolonlarının dengelenmesi işleminde kullanılan çözelti: 1,3609 g mono KH_2PO_4 (10 mM) tartılarak 950 mL destile su içerisinde çözüldü ve pH 8 oluncaya kadar 1 M NaOH ilavesi yapıldı. Daha sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.

2. Sepharose-4B afinite kolonuna homojenat tatbik edildikten sonra afinite kolonlarının yıkanması işleminde kullanılmak üzere hazırlanan tampon: 25 mM KH_2PO_4 kullanıldı. Bunun için 1,3609 g KH_2PO_4 350 mL suda çözülerek pH 6,8 oluncaya kadar 1 M NaOH ile titre edilerek son hacim destile su ilavesi ile 400 mL'ye tamamlandı.

3. Afinite kolonundan POD enzimini elüe etmede kullanılan tampon: 1 M NaCl/25mM içeren KH_2PO_4 kullanıldı. 11,7 g NaCl 150 mL suda çözüldü ve 0,6805 g KH_2PO_4 çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. Daha sonra pH 6,8 olacak şekilde 1 M NaOH ile titre edildi ve toplam hacim destile su ilave edilerek 200 mL'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

8,16 g KH_2PO_4 tartılarak üzerine 150 mL saf su eklendi ve çözünmesi sağlandı. Daha sonra 1 M NaOH kullanılarak pH 7 oluncaya dek titre edildi ve toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf suyla tamamlanarak tampon çözelti hazırlandı.

Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan çözelti

Proteinlerin kantitatif tayini Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi kullanılarak yapıldı. Bir beher içerisine %95'lik etanolden 100 mL alınarak içerisine 200 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 konularak çözüldü. Bu çözelti üzerine %95'lik fosforik asitten 200 mL eklenerek çözeltinin toplam hacmi saf suyla 2 litreye tamamlanarak çözelti daha sonra kullanılmak amacıyla ışık görmeyen bir ortama kaldırıldı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. Pazı kökü peroksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan tampon: 0,1 M'lık KH_2PO_4 'ten 2,72 g 150 mL suda çözülüp pH 6 oluncaya kadar 1 M NaOH ile titre edildi ve daha sonra toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf suyla tamamlandı.

2. Guaiakol substratının 45 mM sulu çözeltisinden 498 μL alınıp toplam hacim 100 mL oluncaya kadar saf su ile tamamlandı.

3. H_2O_2 substratının 22,5 mM sulu çözeltisinden (d:1/11 g/mL) 228 μL alınarak saf suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

4. 3 g potasyum fosfat ve 0,137 g ABTS tartılarak bir beher içerisine alındı. 200 mL saf suda çözünmesi beklendi. pH 6 oluncaya dek 1 M NaOH ile titre edildi. Daha sonra son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

5. o-Dianisidin substratından 0,73 g alınarak bir beher içerisinde 100 mL DMSO'da çözünmesi sağlandı.

6. Pirokatekol substratından 0,33 g alınarak 100 mL saf suda çözdürüldü.

Elektroforezde kullanılan çözeltiler

1. pH'sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponunu hazırlamak için 12,114 g Tris tartılarak üzerine 80 mL su eklendi ve çözünmesi beklendi. Daha sonra 1 M HCl (Hidroklorik asit) yardımıyla pH 6,8'e getirildi. Destile su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2. pH'sı 8,8 olan 1 M Tris-HCl tamponunu hazırlamak için 12,114 g Tris tartılarak 80 mL saf suda çözünmesi sağlandı ve pH 8,8 olana dek HCl eklendi. Son hacmin 100 mL olması için destile su ile üzeri tamamlandı.

3. Numune tamponu: Tris-HCl, SDS, gliserin, kimyasal pH indikatörü olan bromtimol mavisi ve β -merkaptotanol kullanılarak şu şekilde hazırlandı: pH'sı 6,8 olan Tris-HCl tamponundan 0,65 mL, %10'luk SDS'den 3 mL, %100'lük gliserinden ve 0,1'lik bromtimol mavisinden ise 1 mL alınarak bir kap içerisinde karışmaları sağlandı. Bu karışım saf su ilave edilerek 10 mL'ye tamamlandı. Daha sonra bu tampona kullanılmadan hemen önce 95 μ L numune tamponundan 5 μ L olacak biçimde β -merkaptotanol eklendi.

4. Yürütme tamponu glisin, tris ve saf su kullanılarak hazırlandı: Öncelikle 7,51 g glisin ve 1,51 g tris tartılarak bir kaba eklendi. Daha sonra 400 mL destile su eklenerek çözünmesi sağlandı. Bu karışım üzerine ise %10'luk SDS'den 5 mL alınarak toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

5. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: Akrilamid'den 15 g, bisakrilamid'den 0,4 g alınarak bir kap içerisine konuldu. Daha sonra üzerine toplam hacim 50 mL olacak şekilde destile su eklendi ve çözünmeleri sağlandı.

6. %10'luk SDS: 1 g SDS tartıldı ve 9 mL saf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

7. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g Amonyum persülfat 10 mL destile suda çözünerek hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: Etanol, asetik asit ve destile su kullanılarak hazırlandı. Öncelikle % 96'lık etanol'den 90 mL, asetik asit'den 30 mL alınarak karıştırıldı. Daha sonra toplam hacim 300 mL olacak şekilde üzeri saf su ile tamamlandı.

2. Redüksiyon Çözeltisi: Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$), etanol (C_2H_5OH) ve saf su kullanılarak hazırlandı. Öncelikle 4,8 g sodyum asetat tartılarak üzerine 45 mL etanol eklendi ve 80 mL destile su içerisinde çözünmeleri sağlandı, asetik asit kullanılarak pH 6 oluncaya dek titre edildi. Sonra 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutalaldehit eklenip toplam hacim 150 mL oluncaya kadar destile su ilavesi yapıldı.

3. Boyama çözeltisi şu şekilde hazırlandı: 100 mg gümüş nitrat tartılarak 100 mL saf su içerisinde çözdürüldü ve bu karışım içerisine 30 μ L formaldehit eklendi.

4. Yıkama Çözeltisi 1: 270 mL saf su içerisinde 3,75 g sodyum karbonat çözdürüldü ve bu karışım içerisine 120 μ L formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.

5. Yıkama çözeltisi 2: 1 mL gliserin üzerine % 5'lik asetik asitten 250 mL eklenmesiyle hazırlandı.

Yöntem

Pazı kökü ham ekstraktının hazırlanması

İlk olarak pazı kökü; üzerinde çamur kalmayacak şekilde yıkandı. Daha sonra rendelenip üzerine sıvı azot eklenip havanda ezildi. Ürün, bir behere alınıp üzerine yavaş bir şekilde, pazı kökü bitkisinin sıvı azot ile parçalamasından sonra bitki dokularının içine alındığı 0,3 M KH_2PO_4 (pH 7) tamponu eklendi. Bunun için; 8,16 g KH_2PO_4 , 150 mL destile suda çözündü. 1 M NaOH ile pH 7 olacak şekilde ayarlandı ve toplam hacim saf suyla 200 mL'ye tamamlanarak tampon çözelti elde edildi.

Tampon eklenen pazı kökü ekstraktı homojenizatör ile karıştırıldı. Daha sonra pazı ekstratı $+4^\circ\text{C}$ 'de 2 kat tülbent kullanılarak süzüldü. Süzüntü bir sonraki aşama için ayrıldı ve falcon tüplerine konularak 20.000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika santrifüj edildi. Çöken pelet hücre atıkları olarak değerlendirilerek uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatant $+4^\circ\text{C}$ 'de süzgeç kâğıdı ile tekrar süzüldü. Bu çözelti ham enzim çözeltisi olarak isimlendirildi.

Protein Tayini

Kalitatif protein tayini

Bu metod kullanılarak fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik halka içeren amino asitlerin 280 nm'de ışımaya vermeleri temeline dayanır. Aynı hacimde toplanan tüm fraksiyonlara kromatografi işlemleri sonunda kalitatif protein tayini yapıldı (Segel 1968). Kromatografi işlemi neticesinde toplanan elüatlar kuvarz küvetlere konulup proteinin içinde yer aldığı tamponun absorban değerleri köre karşı spektrofotometre cihazında ölçüldü.

Bradford protein tayin yöntemi

Bradford metodu kullanılarak pazı kökünden elde edilen homajenat ve afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı tespit edildi. Bu yöntemde eksi yük taşıyan Coomassie Brilliant Blue G-250 artı yüke sahip olan proteinlere bağlanır. Boyama amacıyla kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 maddesi, $\lambda_{\text{max}} = 465$ nm (Kırmızı) ve $\lambda_{\text{max}} = 595$ nm (Mavi) olmak üzere iki ayrı λ_{max} değerine sahiptir. Proteinin bağlanması sonucu, kırmızı rengin mavi renge dönüşümü gözlemlenir. İki dakikada tamamlanan bu reaksiyonun bozucu faktörlere karşı duyarlılığı düşüktür (1-100 μg arası). Tayin aşamaları aşağıdaki prosedüre uyularak gerçekleştirildi:

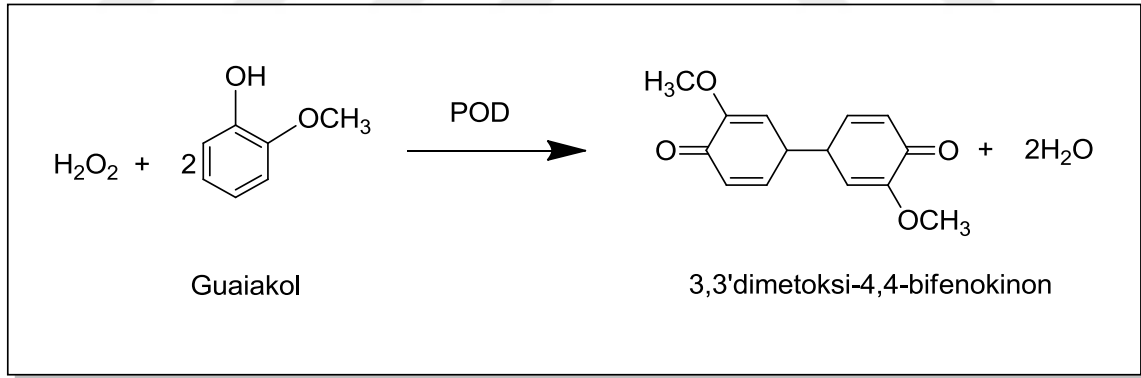
- Tüplere, 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart Bovin Serum Albümin (BSA) çözeltisinden 10, 30, 50, 70 ve 90 μL eklendi. Bütün tüplerin hacmi destile su ilave

edilerek 100 µL'ye tamamlandı ve üzerine 4900 µL Coomassie Brilliant Blue G-250 maddesi eklenerek vorteks yapıldı.

- 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 3 mL'lik küvetlerde, 100 µL enzim çözeltisi ve 4900 µL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlanan köre karşı 595 nm'de absorbens değeri ölçüldü. Elde edilen absorbens değerleri ile standart grafik çizildi.
- Ortamdaki protein miktarını tespit etmek amacıyla saflaştırmanın her aşamasında 3 farklı tüpe sırasıyla 100, 250, 500 µL alınan enzim numunelerinin üzerine sırasıyla 4900, 4750, 4500'er µL boyama reaktifi eklendi ve vorteks yapıldı.
- 10 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 595 nm'de absorbens değerleri okundu.
- Bu işlemin 3 kez tekrar edilmesiyle elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart grafikten protein miktarı bulundu (Bradford and Williams 1976).

Peroksidaz aktivitesi tayini

H₂O₂'nin kullanılmasıyla birlikte guaiakol substratının yükseltgenmesi sonucu bir ışıma meydana gelir ve spektrofotometre cihazında 470 nm'de absorbens ölçümü yapılması esasına dayanmaktadır (Şekil 13) (Şişecioğlu vd 2010).



Şekil 13. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.

Enzim çözeltisinin eklenmesiyle başlatılan reaksiyonun, absorbens artışı spektrofotometrede 3 dakika boyunca 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak 470 nm'de ölçüldü. Peroksidaz enziminin aktivitesinin tayini için aşağıdaki formül kullanıldı:

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

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbens)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon (µmol/mL)

D_f = Seyreltme katsayısı

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

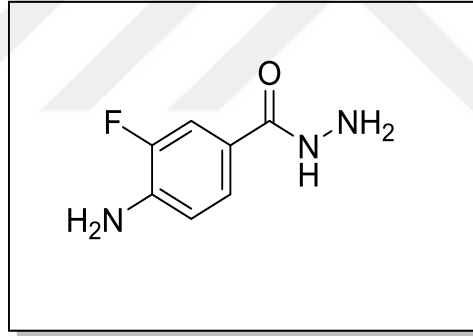
V = Reaksiyon hızı ($\mu\text{mol} \times \text{dak.} / \text{mL}$)

Substrat olarak guaiakolün kullanıldığı enzim saflaştırmalarında, izolasyon aşamalarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi optimal koşullarda 20°C 'de 1 dakikada 1 μmol guaiakol'ün yükseltgenmesini kataliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Pazı Kökü (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

POD inhibitörü ve ligand seçimi

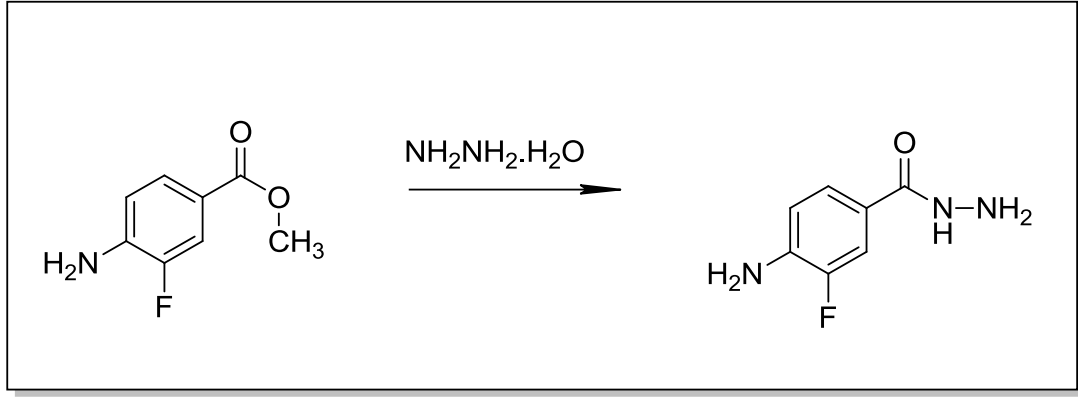
Peroksidaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarından literatürdeki enzimin inhibitörleri belirlendi (Geike *et al.* 1975; Doerge 1986; Kumar and Bhatla 1995). Afinite jelleri, literatürde bulunan inhibitörlerden yararlanarak POD'un afinite kromatografisiyle yüksek verimle saflaştırılmasında en uygun diazonyum tuzu oluşturabilecek ligandın 4-Amino 3-floro olduğuna karar verildi ve hidrazin formu tarafımızca hazırlandı.



Şekil 14. POD inhibitörü ve ligand olarak kullanılan 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülü.

4-Amino 3-floro benzohidrazidin sentezlenmesi

4-Amino 3-floro benzohidrazidin sentezi (Hiroshi *et al.* 2012) yönteminde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda 4-Amino 3-floro benzoat (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon tamamlanincaya kadar geri soğutucu altında ısıtıldı (Reaksiyon TLC ile takip edildi). Reaksiyon sonunda elde edilen çökelek, etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı ve oluşan beyaz kristaller süzgeç kâğıdı ile ayrıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Böylece 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülü sentezlenmiş oldu (Şekil 15). $^1\text{H-NMR}$ ile karakterizasyonları doğrulandı.



Şekil 15. 4-Amino 3-floro benzohidrazidin sentezlendiği genel reaksiyon şeması.

4-Amino 3-floro benzohidrazid inhibitörünün tirozin uzantı kolu ile diazonyum tuzu oluşturuldu. Pazı POD enziminin saflaştırılması için kullanıldı.

İnhibitör Çalışmaları

POD Enzim aktivitesi üzerine 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülünün etkilerinin incelenmesi

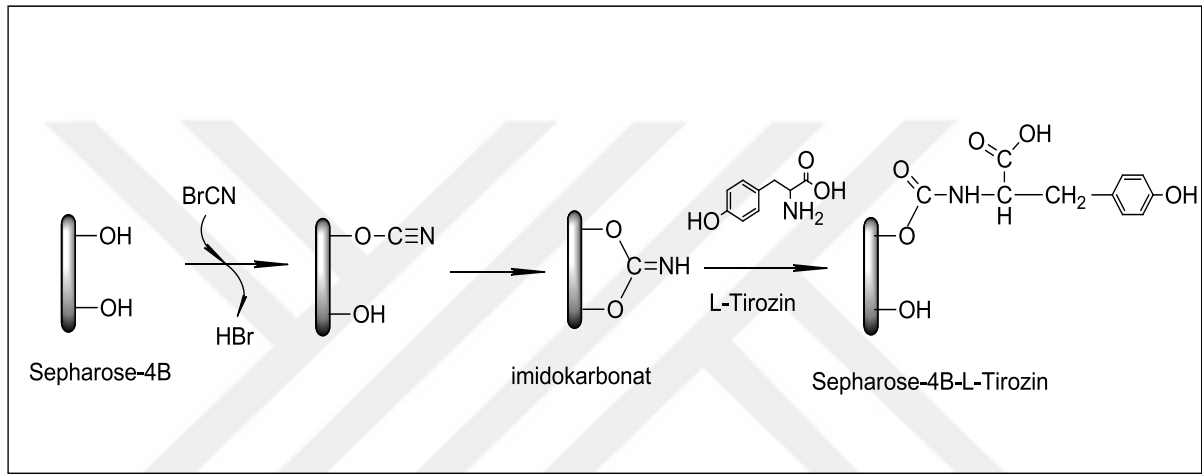
Önceki çalışmalarda yapılan bitki POD saflaştırılmasında kullanılan Sepharose-4B-L-tirozin-4-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan POD enzimi ön denemeler için elde edildi. Bu enzim üzerine çalışılması planlanan ve ilk defa sentezlenen 4-Amino 3-floro benzohidrazid inhibitörünün IC₅₀ değerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında ve optimum pH'da her bir deney 3 kez tekrar edilerek, substrat (Guaiakol) konsantrasyonu sabit tutularak ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edildi ve % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi (Stok inhibitör çözeltisi hazırlanarak inhibisyon aralığı belirleme çalışmaları yapıldı). Daha sonra oda sıcaklığında, optimum pH'da 3 farklı inhibitör ve 5 farklı substrat konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerleri belirlenerek Linewaver–Burk grafikleri çizildi. K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

Afinite jelinin hazırlanması

Matriks olarak CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B seçildi. L-tirozin uzantı kolu bu kolon materyaline kovalent olarak bağlandı. Daha sonra benzohidrazid inhibitörü tirozine diazollanarak önceden hazırlanan jele kenetlendirildi. Burada afinite jelinin uzantı kolunu tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan bölümünü ise 4-Amino 3-floro oluşturmaktadır. Afinite jelinin hazırlanması:

CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

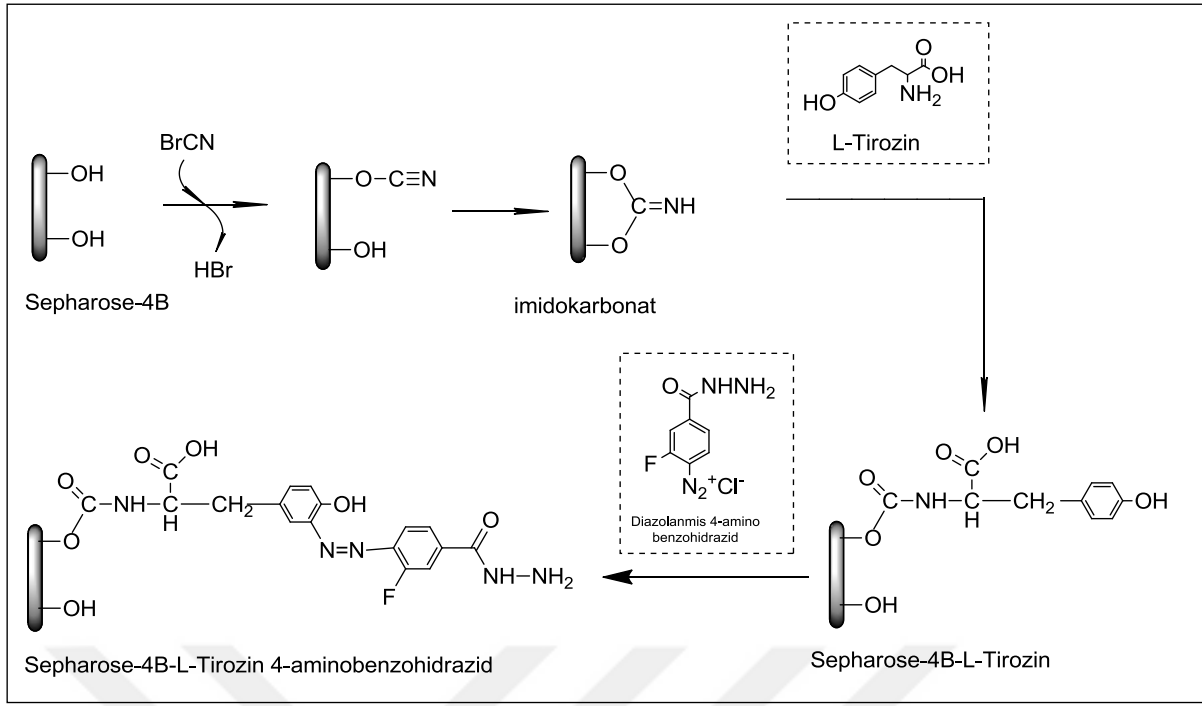
Siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilen Sepharose-4B önce 200 mL soğuk su ile daha sonra pH'ı 10 olan 0,1 M NaHCO₃ tamponu ile yıkandı ve yine aynı tampon çözelti ile bir behere alındı. Behere aynı tamponun 20 mL'si içinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti eklenerek karışması sağlandı ve 4°C'de 16 saat bekletildi böylece reaksiyon başlatıldı. Bu sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm'de ışıma vermeyinceye dek bol suyla yıkanarak tepkimeye girmeyen tirozinin tamamının uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi pH'ı 8,8 olan 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile yinelenildi. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Şekil 16) (Arslan vd 1996).



Şekil 16. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu.

4-Amino benzohidrazidin kenetlendirilmesi

1 M HCl içinde inhibitörden 25 mg alınarak yaklaşık 0°C'de 10 mL çözüldü ve inhibitör çözeltisine içerisinde 75 mg NaNO₂ mevcut olan 0°C'deki 5 mL karışımdan damla damla akıtıldı. Diazolanmış olan inhibitör 10 dakikalık reaksiyondan sonra 40 mL Sepharose-4B-L-Tirozin süspansiyonuna eklendi. pH 5 oluncaya kadar 1 M NaOH ile titre edildi ve bu pH'da sabit tutularak oda sıcaklığında 3 saat boyunca dikkatli bir şekilde karıştırıldı. Sonrasında 1 litre destile su ve 100 mL, 10 mM pH'ı 6,8 olan KH₂PO₄ tamponuyla yıkandı ve üzerine bir miktar daha aynı tampondan ilave edilerek kaldırıldı (Whitney 1974).



Şekil 17. 4-Amino benzohidrazid molekülünün Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu.

Afinite kolonlarının paketlenmesi

pH'ı 6,8 olan KH_2PO_4 dengeleme tamponuna hazırlanan jel alınarak süspanse edildi ve havası su trombu yardımıyla boşaltıldı. Daha sonra $1 \times 10 \text{ cm}$ 'lik kolona süspanse edilen jel paketlenildi. Peristaltik pompa kullanılarak çöken jel yıkama ve dengeleme tamponuyla yıkandı. Kolonun dengelendiği, spektrofotometrede 280 nm 'de tampon ile eluat absorbanlarının eşit olmasıyla anlaşıldı.

Afinite kolonun numune tatbiki ve elüsyonu

Pazı bitkisinden elde edilen homojenatlar, 1 gece KH_2PO_4 (pH 6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolonlara uygulandı. Kolonlar 400 mL 25 mM pH'sı 6,8 olan fosfat yıkama çözeltisi ile yıkandı.

Sonuç olarak peroksidaz enziminin 4-Amino 3-floro kolonuna adsorpsiyonu ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Peroksidaz enzimini kolondan elüe etmek için 1 M $\text{NaCl}/25 \text{ mM}$ KH_2PO_4 (pH 6,8) tamponu uygulanarak peristaltik pompa aracılığıyla kolonun akış hızı saatte 20 ml 'ye ayarlandı. Toplanan elüatlar $1,5 \text{ mL}$ kapasiteye sahip tüplere alındıktan sonra cihazda 280 nm 'de ölçüm yapılarak her bir elüatın absorban değeri köre karşı okundu. Toplanan elüatlardan absorban gösteren tüplere 470 nm 'de peroksidaz aktivite tayini yapıldı ve SDS-PAGE ile aktivitesi yüksek olan elüatların saflıklarına bakıldı.

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Belirlenmesi

Afinite kolonundan saflaştırılan peroksidaz enzimi diyaliz edilmenin ardından %3-8 kesikli, SDS-PAGE ile standart olarak molekül ağırlığı bilinen proteinler kullanılarak saflaştırılan enzimin saflık dereceleri belirlendi (Laemmli 1970). Bu nedenle elektroforez plakaları saf sudan geçirilmesinin ardından alkol ile iyice yıkandı. Daha sonra düz bir plaka ile kenarlarında aralık oluşturu bir plaka üst üste gelecek şekilde konularak kısıpçalarla sıkıca tutturuldu. Sabitlenen plakalar jel hazırlama cihazına konuldu. Bu süre sonunda ayırma ve yığma jelleri aşağıda belirtildiğı şekilde hazırlandı:

Ayırma jelinin hazırlanması

pH'ı 8,8 olan 1 M Tris-HCl tamponundan 5 mL, %30 akrilamid ve %0,8 bisakrilamid'den 4,4 mL, %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat)'den 0,2 mL, %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin)'den 0,13 mL ve destile sudan ise 3,13 mL alınarak karıştırıldı. Son aşama olarak taze hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat (PER)'den 0,2 mL ilave edildi. Bu çözelti üst kısımda 0,5 cm kalıncaya dek plakalar arasına döküldü. Jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu ve yarım saat katılaşması beklendi. Katılaşma gerçekleştikten sonra jel yüzeyindeki %0,1'lik SDS çözeltisi döküldü.

Yığma jelinin hazırlanması

pH'ı 6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponundan 0,41 mL, %30 akrilamid ve %0,8 bisakrilamid'den 0,4 mL, %10'luk SDS'den 0,03 mL, %5'lik TEMED'den 0,03 mL, saf sudan ise 2,45 mL alınarak bir kaptan iyice karışmaları sağlandı. Son olarak yine taze hazırlanmış %10'luk PER'den 0,1 mL ilave edildi. Bu çözelti üst kısımda 0,5 cm kalıncaya dek enjektör yardımıyla plakalar arasına döküldü. Hava almamasına dikkat edildi ve yarım saat kadar katılaşması beklendi. Katılaşma gerçekleştikten sonra yığma jeli hazırlandı ve üst yüzeye gelinceye kadar eklendi. Tarak, jel üzerine özenle yerleştirildikten sonra jel kurumaya bırakıldı. Ardından tarak jelden yine dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Tarak çıkarıldıktan sonra oluşan boşluklar tespit edilerek işaretlendi. Jelin üst kısmı önce destile su ile sonra da yürütme tamponu kullanılarak yıkandı. Tankın alt ve üstüne yürütme tamponu eklendi. Her birinde 20 µg enzim içeren numuneye son hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi. 3 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Numunelerin soğuması beklendikten sonra, ince bir enjektör kullanılarak dikkatli bir şekilde oyuklara uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt kısımdan anot (+) kablo, üst kısımdan katot (-) kablo bağlandı. Akım hızı 80 volta ayarlanarak

oda sıcaklığında 30 dakika, daha sonra 120 voltta 1,5 saat yürütüldü. Akımın kesilmesi sağlanarak, cam plakaların ortasında yer alan jel yavaş ve dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Yürütme tamponu daha sonra kullanılmak için kaldırıldı.

Elektroforez bitiminde cam plaklardan çıkarılan jel, karıştırıcıda 30 dakika boyunca tespit çözeltisiyle yıkandı. Ardından 30 dakika boyunca da redüksiyon çözeltisiyle bekletildi. Hemen sonra jel destile suyla 3 kez iyice yıkandı ve 20 dakika gümüş nitrat çözeltisi ile karıştırıcının üzerinde, kullanılmadan önce hazırlanıp karanlıkta bekletilen boya ile boyandı. Boyama sonrası jel 3 defa saf sudan geçirildi ve siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünceye kadar karıştırıcının üstünde jel, 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su ve 120 µL formaldehitten oluşan çözelti ile iyice yıkandı (Temel 2006).

Pazı Bitkisinin Kökünden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

Afinite kromatografisi kolonu kullanılarak saflaştırılan POD enziminin kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla guaiakol substratıyla optimum pH ve optimum sıcaklık, guaiakol için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları

Peroksidaz enziminin optimum pH'sının tespiti için pH'ı 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olan 0,1 M KH_2PO_4 tamponları hazırlandı. Uygun bir substrat çözeltisi kullanılarak her bir tamponda gösterdiği farklı aktiviteler spektrofotometre cihazında ölçülerek tespit edildi. Tablo ve grafik şeklinde sonuçlar verildi.

Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları

Pazı peroksidaz enziminin optimum sıcaklığının tespiti için su banyosu kullanıldı. Küvet içerisinde istenilen sıcaklığa ayarlı olan su banyosunda optimum pH'a sahip tampon ve substrat içeren karışım 5 dakika bekletilerek istenilen sıcaklığa getirildi. Sonra enzim çözeltisi pipetlendi. 0 ila 80 °C arasında 10'ar derece aralıklarla her sıcaklık için aktivite ölçümü yapıldı. Tablo ve grafik şeklinde sonuçlar verildi.

5 farklı substrat için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması çalışmaları

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik; guaiakol kullanılarak optimum sıcaklık ve pH seviyesinde saflaştırılan peroksidaz enziminin farklı substrat aktiviteleri üzerine guaiakol, H_2O_2 , ABTS, pirokatekol ve o-Dianisidin için 5 değişik substrat konsantrasyonunda spektrofotometre cihazında aktivite değerleri ölçüldü ve $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak

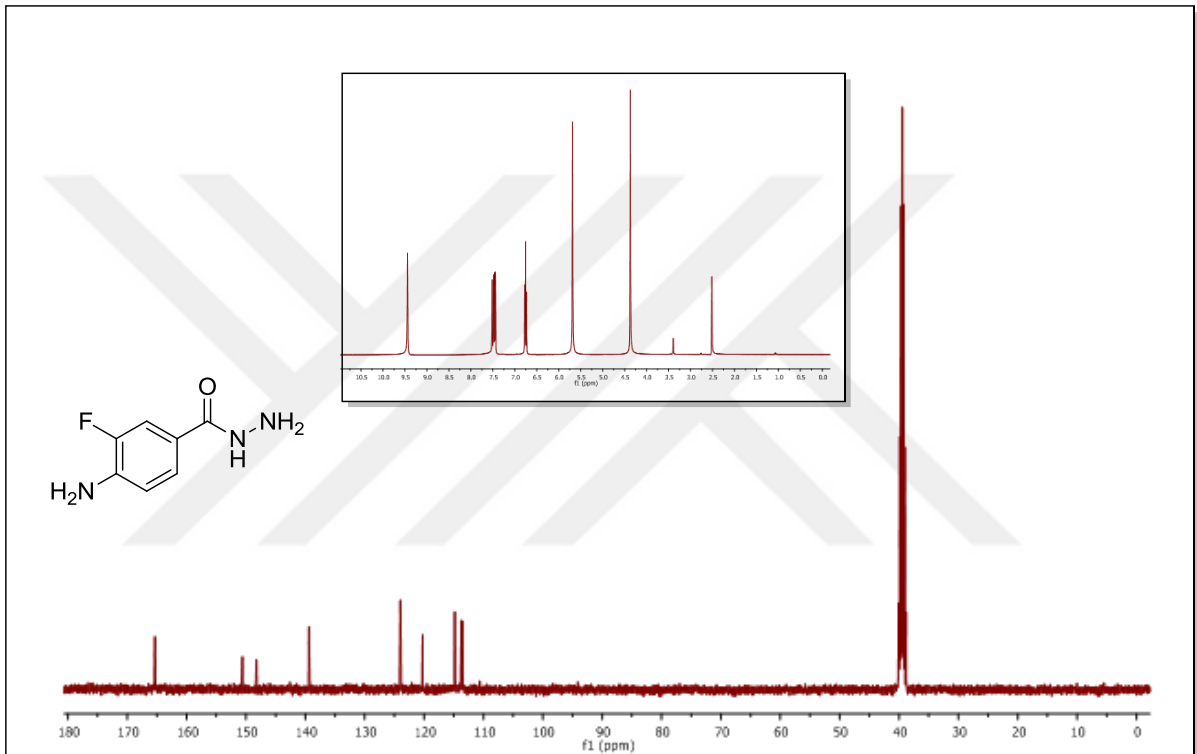
Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_M ile V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri kullanılarak hesaplandı, sonuçlar tablo ve grafik olarak gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).



ARAŞTIRMA BULGULARI

4-Amino 3-floro Benzohidrazidin Sentezlenmesi

POD ligandı olarak kullanılacak hidrazin molekülünün sentezini yapmak için, 4-Amino-3-floro metil benzoat satın alındı ve yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde hidrazid formunun sentezi yapıldı. Sentezlenen molekülün karakterizasyonu ^1H -NMR (400 MHz)'la doğrulandı. Sentezlenen molekül için; 400 MHz ^1H -NMR spektrumu Şekil 18'de gösterildiği gibidir.



Şekil 18. Sentezlenen 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu.

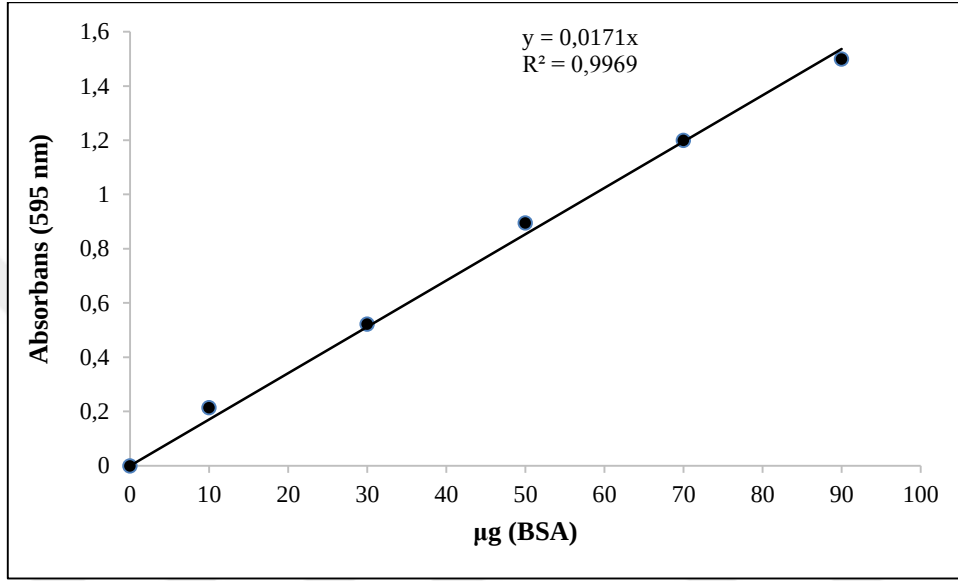
4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülü için ^1H -NMR sonuçları:

^1H NMR (400 MHz, DMSO, ppm): 9.44 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 6.75 (t, $J = 17.6$ Hz, 8.8 Hz, 2H), 5.68 (s, 2H)

C^{13} NMR (100 MHz, DMSO, ppm): 164.3, 150.5, 139.5, 123.9, 120.3, 114.8, 113.6

Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemi kullanılarak pazı bitkisinden elde edilen homejenatlar ve afinite kolonundan saflaştırılan peroksidaz enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı belirlendi. Bu amaçla standart grafik hazırlandı. Pazı bitkisinin homojenatı ve afinite kromatografisi ile elde edilen peroksidaz enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafik kullanılarak tespit edildi. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 19’da gösterildi.



Şekil 19. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.

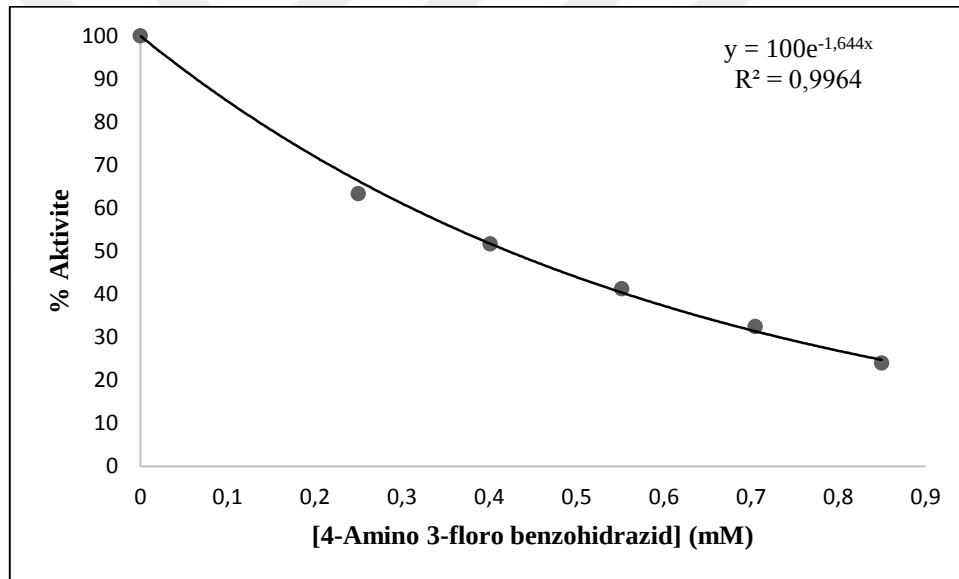
Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Molekülünün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Daha önce elimizde bulunan ve farklı bir teknikle saflaştırılan POD enzimi ile sentezlene 4-Amino-3-floro benzohidrazid molekülünün POD enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelendi. Guaiakole bağlı olarak reaksiyon hızı bulundu. Sabit substrat konsantrasyonunda (45 mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değeri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürü gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değeri ve Lineawear-Burk grafiğinden K_i değeri ve inhibisyon türü belirlendi.

4-Amino 3-floro benzohidrazid inhibitörü için POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Tablo 3. 4-Amino 3-floro Benzohidrazid İnhibitörü İçin Afinite Kolonundan Elde Edilen POD Enzimi Üzerine Guaiakol Substratıyla Yapılan %Aktivite-Konsantrasyon Deney Prosedürü

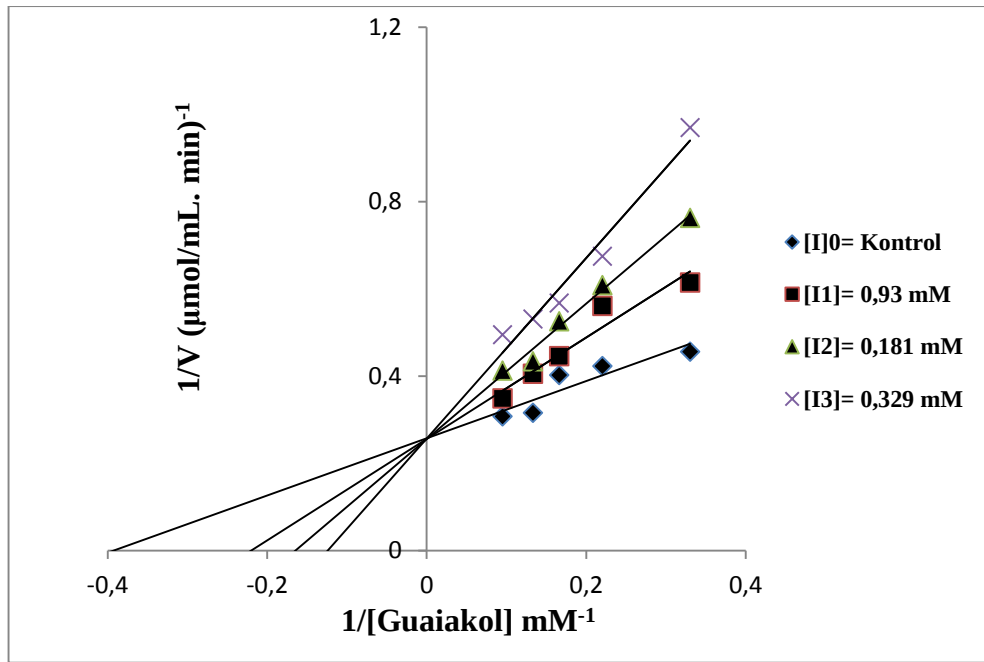
Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)							
Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	[I] mM	%Aktivite
0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,440	0,010	0,130	73,37
0,5	1,0	1,0	0,08	0,420	0,5	1,0	1,0	0,08	0,410	0,010	0,216	61,62
0,5	1,0	1,0	0,11	0,390	0,5	1,0	1,0	0,11	0,380	0,010	0,303	51,29
0,5	1,0	1,0	0,14	0,360	0,5	1,0	1,0	0,14	0,350	0,010	0,390	32,46
0,5	1,0	1,0	0,17	0,330	0,5	1,0	1,0	0,17	0,320	0,010	0,476	24,02



Şekil 20. POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-floro benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.

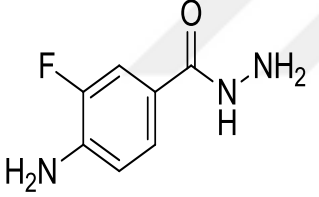
Tablo 4. POD Enzimi Üzerine Guaiakol Substratına Bağlı Olarak 4-Amino-3-Floro Benzohidrazid İnhibitörü İçin $1/V$, $1/[S]$ Değerleri Ve Deney Prosedürü

Kör Tüpü (mL)						Numune Tüpü (mL)							
İnhibitör numarası	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	POD	$1/V$ ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,79	0,010	0,446	0,330
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,69	0,010	0,413	0,220
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,59	0,010	0,387	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,49	0,010	0,354	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,39	0,010	0,324	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,05	0,75	0,2	1,0	1,0	0,05	0,74	0,010	0,542	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,65	0,3	1,0	1,0	0,05	0,64	0,010	0,490	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,55	0,4	1,0	1,0	0,05	0,54	0,010	0,442	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,45	0,5	1,0	1,0	0,05	0,44	0,010	0,387	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,35	0,6	1,0	1,0	0,05	0,34	0,010	0,352	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,06	0,74	0,2	1,0	1,0	0,06	0,73	0,010	0,609	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,06	0,64	0,3	1,0	1,0	0,06	0,63	0,010	0,537	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,06	0,54	0,4	1,0	1,0	0,06	0,53	0,010	0,471	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,06	0,44	0,5	1,0	1,0	0,06	0,43	0,010	0,413	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,06	0,34	0,6	1,0	1,0	0,06	0,33	0,010	0,375	0,095
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,07	0,73	0,2	1,0	1,0	0,07	0,72	0,010	0,747	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,07	0,63	0,3	1,0	1,0	0,07	0,62	0,010	0,574	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,07	0,53	0,4	1,0	1,0	0,07	0,52	0,010	0,510	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,43	0,5	1,0	1,0	0,07	0,42	0,010	0,485	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,07	0,33	0,6	1,0	1,0	0,07	0,32	0,010	0,420	0,095



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

Tablo 5. POD Enzimini Üzerine 4-Amino 3-Floro Benzohidrazid İnhibitörünün İnhibisyon Etkisi

	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon Türü
	577	523,11 ± 145,11	Yarışmalı

POD Enziminin 4-Amino Benzohidrazid Molekülü İle Saflaştırılması Sonuçları

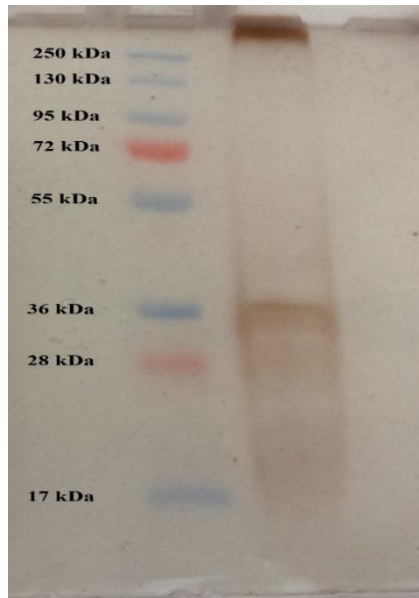
POD enzimi üzerine 4-Amino 3-floro benzohidrazid molekülünün inhibisyon etkileri incelendikten sonra bu molekülün ligand olarak kullanılabileceği tespit edildi. Sonra yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde Sepharose-4B-L-Tirozin-4-Amino-3-floro benzohidrazid kolonunun sentezi yapıldı. Hazırlanan kolondan pazı bitkisinin ekstraktından POD enzimi saflaştırıldı ve bu aşamalarda 470 nm’de aktivite ve protein tayini yapıldı. Sentezlenen afinite kolonundan saflaştırılan POD enziminin saflaştırma sonuçları Tablo 6’da gösterildi.

Tablo 6. Afinite Kolonlarından Elde Edilen POD Enzimi İçin Hazırlanan Saflaştırma Tablosu

Pazı POD Enzimi		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	S. Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-Amino 3-floro benzohidrazid	Homojenat	7	202	1,2	1414	8,4	168,3	100	1
	Sepharose 4B Afinité	3	41,6	0,013	124,8	0,039	3,200	8,83	50,3

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroförez Sonuçları

Pazı bitkisinden peroksidaz enzimi, 4-Amino benzohidrazidin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesiyle (Şekil 17) hazırlanan afinité kolonundan tek basamakta saflaştırıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometre cihazı kullanılarak 470 nm'de ölçüldü. Peroksidazın saflığını kontrol etmek ve göreceli moleköl ağırlığını tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroförez yapıldı ve yaklaşık 37 kDa'da tek bant gözlemlendi. Bunun için hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroförez kuyularına sırası ile saflaştırılan peroksidaz enzimi ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü. Daha sonra elde edilen bandın fotoğrafı çekildi.

**Şekil 22.** Pazı bitkisi enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.

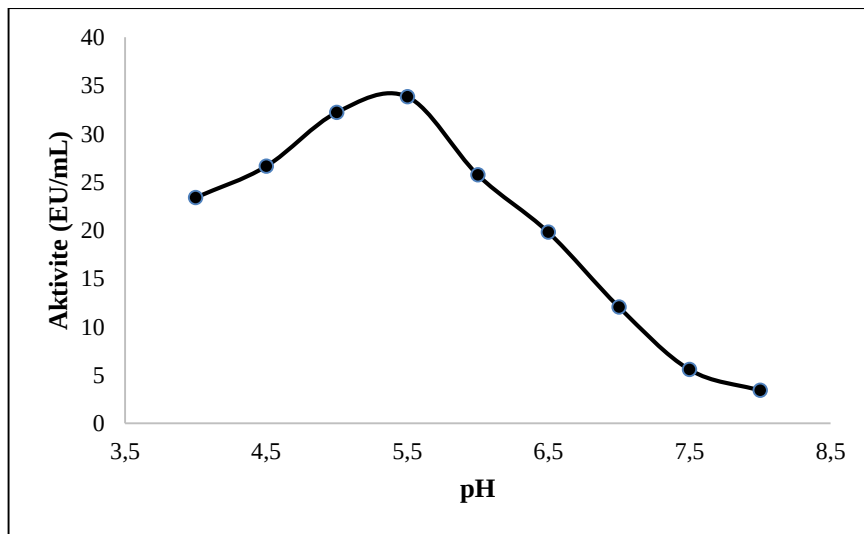
Pazı (*Beta vulgaris* L. Var. cicla) Bitkisinden Saflaştırılan POD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları İle İlgili Sonuçlar

Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) peroksidaz enziminin optimum pH çalışması; pH'sı 4,0-8,0 aralığında 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak tespit edildi (Tablo 7 ve Şekil 23). Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) peroksidaz enzimi için optimum pH 0,1 M KH_2PO_4 pH=5,5 tamponu olarak belirlendi.

Tablo 7. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD Enziminin Optimum pH'sı İçin 0,1 M KH_2PO_4 Tampon Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Aktivite Ölçüm Sonuçları

Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EU/mL)
4,0	0,33
4,5	0,38
5,0	0,47
5,5	0,56
6,0	0,44
6,5	0,35
7,0	0,24
7,5	0,19
8,0	0,13



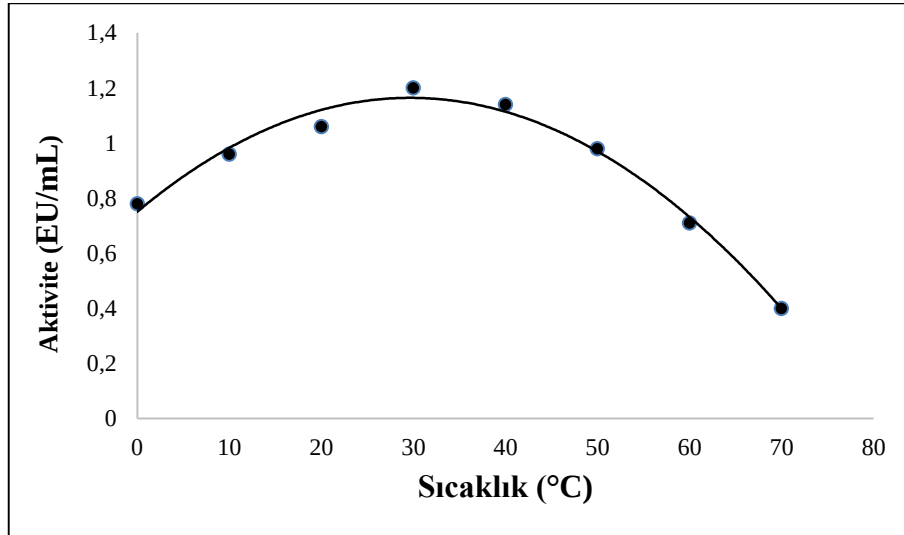
Şekil 23. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Enzim Ünitesi (EU)-pH grafiği.

Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 0,1 M KH_2PO_4 (pH 6,5) tamponu kullanıldı. 0 ila 70°C arasında her 10°C’de bir aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 8 ve Şekil 24’de gösterildi. Bu çalışma sonucu pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık 30 °C olarak belirlendi.

Tablo 8. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) Saflaştırılan POD Enziminin Optimum Sıcaklığı İçin Sıcaklık Aktivite Ölçüm Sonuçları

Potasyum Fosfat	
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
0	0,78
10	0,96
20	1,06
30	1,20
40	1,14
50	0,98
60	0,71
70	0,40



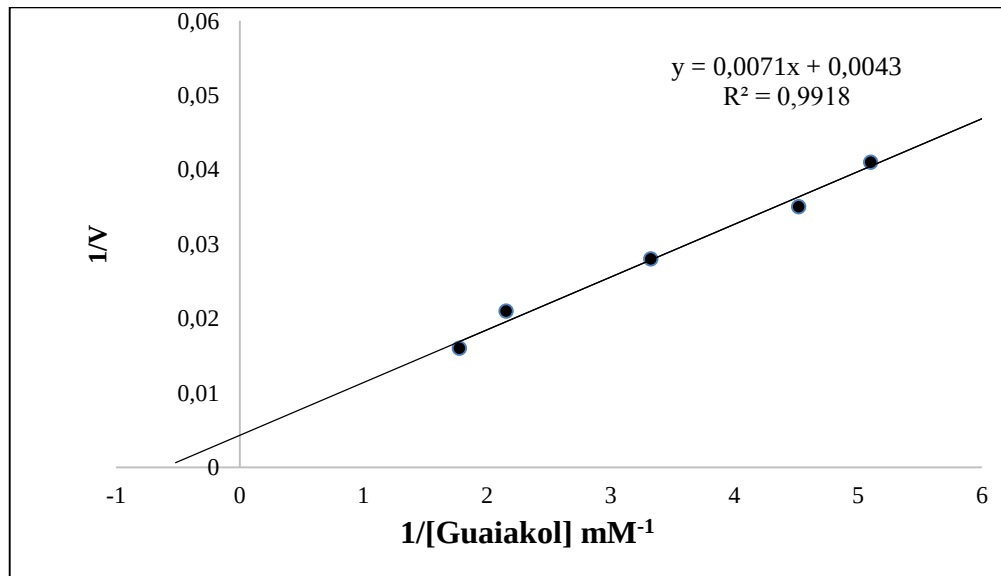
Şekil 24. Pazıdan (*Beta vulgaris* L. var. cicla) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EU/mL)–Sıcaklık (°C) grafiği.

Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Guaiakol substratı kullanılarak pazı bitkisinden saflaştırılan POD enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. POD enzimi için en az 5 farklı guaiakol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçüldü. $1/[Guaiakol]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 9 ve Şekil 25’de görülmektedir. Sonuç olarak guaiakol için K_M değeri 15,15 mM bulunurken V_{max} değeri ise 20,66 EU/mL olarak tespit edildi.

Tablo 9. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Guaiakol Derişimi Çizelgesi

Kör Tüpü (mL)			Numune Tüpü (mL)				
Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,99	1,0	0,90	0,010
1,0	1,0	1,0	0,3	0,99	1,0	0,70	0,010
1,0	1,0	1,0	0,5	0,99	1,0	0,50	0,010
1,0	1,0	1,0	0,7	0,99	1,0	0,30	0,010
1,0	1,0	1,0	0,9	0,99	1,0	0,10	0,010



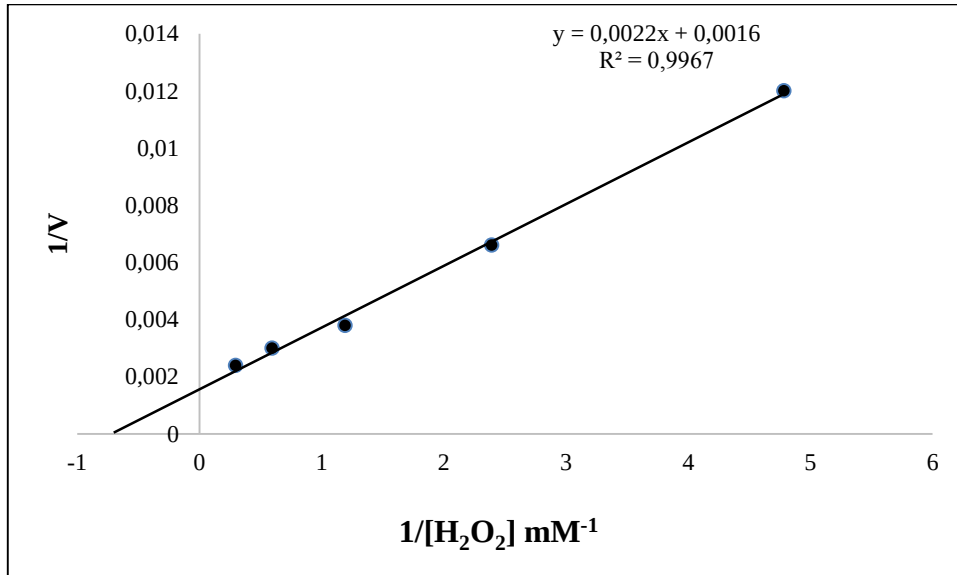
Şekil 25. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.

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

H₂O₂ substratı için pazı bitkisinden saflaştırılan POD enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. POD enzimi için en az 5 farklı H₂O₂ konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçüldü. 1/[H₂O₂]-1/V Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 26'da görülmektedir. Sonuç olarak H₂O₂ için K_M değeri 0,05 mM bulunurken V_{max} değeri ise 5,91 EU/mL olarak tespit edildi.

Tablo 10. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik H₂O₂ Derişimi Çizelgesi

Kör Tüpü (mL)			Numune Tüpü (mL)				
Guaia kol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	Fosfat Tamponu	Guaia kol	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,99	1,0	0,90	0,010
1,0	1,0	1,0	0,3	0,99	1,0	0,70	0,010
1,0	1,0	1,0	0,5	0,99	1,0	0,50	0,010
1,0	1,0	1,0	0,7	0,99	1,0	0,30	0,010
1,0	1,0	1,0	0,9	0,99	1,0	0,10	0,010



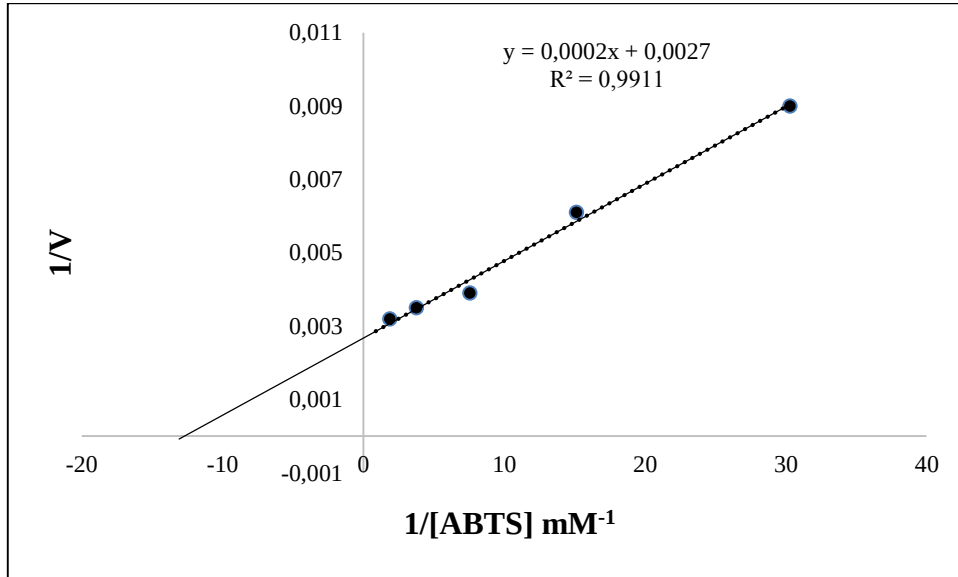
Şekil 26. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin H₂O₂ substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.

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

ABTS substratı için pazı bitkisinden saflaştırılan POD enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. POD enzimi için en az 5 farklı ABTS konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçüldü. $1/[ABTS]$ - $1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 11 ve Şekil 27’de görülmektedir. Sonuç olarak ABTS için K_M değeri 0,074 mM bulunurken V_{max} değeri ise 37,04 EU/mL olarak tespit edildi.

Tablo 11. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik ABTS Derişimi Çizelgesi

Kör Tüpü (mL)		Numune Tüpü (mL)		
ABTS	H ₂ O ₂	ABTS	H ₂ O ₂	POD
2,9	0,1	1/2	0,1	0,010
2,9	0,1	1/4	0,1	0,010
2,9	0,1	1/8	0,1	0,010
2,9	0,1	1/16	0,1	0,010
2,9	0,1	1/32	0,1	0,010



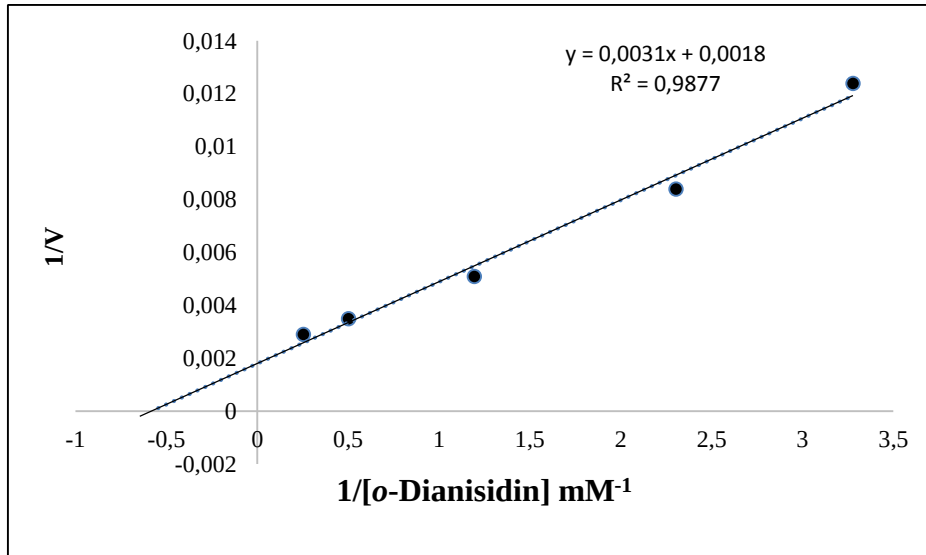
Şekil 27. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin ABTS substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.

***o*-Dianisidin substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları**

o-Dianisidin substratı için pazı bitkisinden saflaştırılan POD enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. POD enzimi için en az 5 farklı *o*-Dianisidin konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçüldü. $1/[o\text{-Dianisidin}]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 12 ve Şekil 28'de görülmektedir. Sonuç olarak *o*-Dianisidin için K_M değeri 1,724 mM bulunurken V_{max} değeri ise 55,55 EU/mL olarak tespit edildi.

Tablo 12. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik *o*-Dianisidin Derişimi Çizelgesi

Kör Tüpü (mL)			Numune Tüpü (mL)				
<i>o</i> -Dianisidin	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	<i>o</i> -Dianisidin	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,99	1,0	0,90	0,010
1,0	1,0	1,0	0,3	0,99	1,0	0,70	0,010
1,0	1,0	1,0	0,5	0,99	1,0	0,50	0,010
1,0	1,0	1,0	0,7	0,99	1,0	0,30	0,010
1,0	1,0	1,0	0,9	0,99	1,0	0,10	0,010



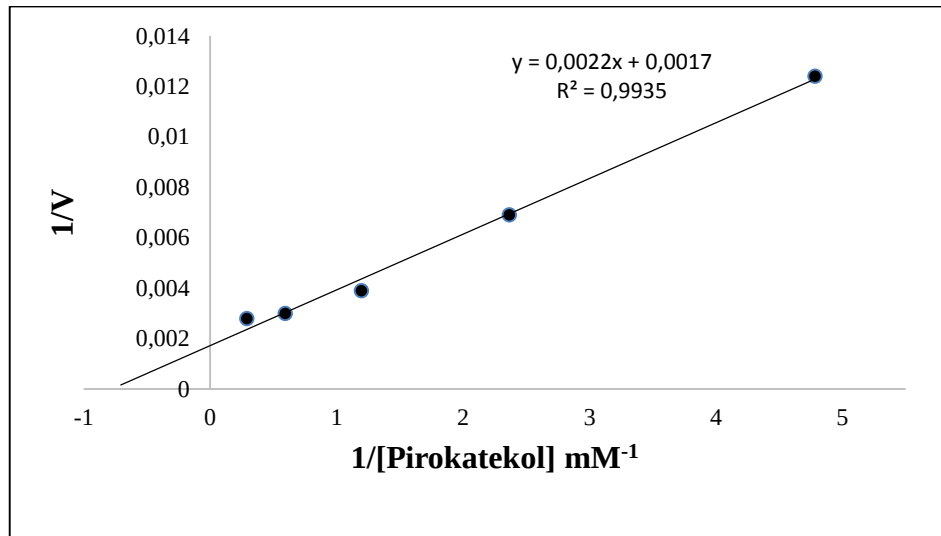
Şekil 28. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin *o*-Dianisidin substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.

Pirokatekol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Pirokatekol substratı için pazı bitkisinden saflaştırılan POD enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. POD enzimi için en az 5 farklı pirokatekol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçüldü. $1/[Pirokatekol]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 13 ve Şekil 29'da görülmektedir. Sonuç olarak pirokatekol için K_M değeri 1,295 mM bulunurken V_{max} değeri ise 58,82 EU/mL olarak tespit edildi.

Tablo 13. POD Enzimi İçin K_M Ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Pirokatekol Derişimi Çizelgesi

Kör Tüpü (mL)			Numune Tüpü (mL)				
Pirokatekol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Pirokatekol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	Su	POD
1,0	1,0	1,0	0,1	0,99	1,0	0,90	0,010
1,0	1,0	1,0	0,3	0,99	1,0	0,70	0,010
1,0	1,0	1,0	0,5	0,99	1,0	0,50	0,010
1,0	1,0	1,0	0,7	0,99	1,0	0,30	0,010
1,0	1,0	1,0	0,9	0,99	1,0	0,10	0,010



Şekil 29. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin Pirokatekol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlendiği grafik.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidaz enzimi hem grubu içeren, bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunan bir glikoproteindir (Rompel *et al.* 2007). Peroksidazlar H_2O_2 'yi inaktif hale getirmek için çeşitli aromatik bileşikler substrat olarak kullanırlar (Robert *et al.* 1993). Bitki peroksidazlarının hormonal etkinlik (Wakamatsu and Takahama 1993), savunma sistemleri (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) ve lignin polimeri üretimi (Duarte *et al.* 2000) gibi önemli görevlere sahip olduğu bilinmektedir. Peroksidaz enzimi yüksek duyarlılığa sahip olduğundan klinik tanı ve mikroanalitik analizler açısından önemli bir ayıraç olarak kullanılmakta ve aynı zamanda ilaç, kimya ve gıda sanayisinde sıklıkla tercih edilmektedir (Kwak *et al.* 1996).

Afinite kromatografisi, saflaştırılmak istenen molekülün liganda özgül ve geri dönüştürülebilir olarak bağlandığı bir tekniktir. Matrikse bağlanan liganın özgül ve dönüştürülebilir olması gerekmektedir. Bu yöntem bir çeşit adsorbsiyon kromatografisidir ve proteinlerin saflaştırılması esasına dayanır. Kolon dolgu maddesi olarak çoğunlukla Sepharose, Sephadex gibi jeller tercih edilmektedir. İstenmeyen etkileşimleri ortadan kaldırmak amacıyla bazı durumlarda matriks ile ligand arasına uzantı kolları yerleştirilir. Günümüzde başka teknikler kullanılarak saflaştırılmak istenen pek çok biyolojik materyal, bu teknik ile çok daha kısa sürede ve tek bir basamakta saflaştırılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bu çalışmada özellikle bitkilerin köklerinde bulunan peroksidaz enziminin afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Özdemir vd 2001). Çok basamaklı saflaştırma tekniklerinde işlem sırasında enzim aktivitesinde önemli bir kayıp meydana gelmektedir. Enzimi yüksek verimlilikle saflaştırmak için afinite kromatografisi önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle pazıdan (*Beta vulgaris* L. var. cicla) peroksidaz enziminin izole edilmesi amacıyla ilk kez afinite jeli hazırlandı. 4-Amino 3-floro benzohidrazid kolonundan enzim saflaştırıldı. Daha sonra saflaştırılan enzimin SDS-PAGE tekniğiyle molekül ağırlığı tespit edildi ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Sonuçları tartışmadan evvel çalışma aşamalarında kullandığımız teknikleri kısaca hatırlatalım:

Öncelikle afinite tekniği kullanılarak pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) elüatları elde edildi. Daha sonra spektrofotometre cihazında 280 nm'de absorbands değerleri okundu ve böylece toplanan fraksiyonlara kalitatif protein tayini yapılmış oldu. Bu teknik aromatik halka içeren amino asitlerin 280 nm'de absorbands göstermeleri temeline dayanmaktadır (Segel 1968).

Bradford tekniğine göre kantitatif protein tayini yapıldı. Afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları belirlendi. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüke sahip olduğundan pozitif yüklü proteine bağlanır ve renkli kompleks oluşturur. Spektrofotometrede 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Bu yöntem, diğer metotlara göre bozucu etkenlere karşı daha az hassas ve yüksek oranda tekrarlanabilir. Yöntemin duyarlılığı 1-100 µg arasında değişmektedir (Bradford and Williams 1976).

Afinite kromatografisi kullanılarak izole edilen pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin aktivitesi spektrofotometre cihazında belirlendi. Bu uygulamaya göre, hidrojen peroksit tarafından guaiakol substratı yükseltgenir ve bunun sonucunda oluşan renkli bileşik 470 nm’de ışıma verir (Şişecioğlu vd 2010). Literatür taraması sonucunda enzimin en iyi substratının guaiakol olduğu bilindiğinden aktivite belirlemede sıklıkla tercih edilmektedir (Kettle *et al.* 1997).

Peroksidaz enzimi mevcut yöntemler kullanılarak pazı bitkisinden 43,55 kat saflaştırılmıştır (Kahraman 2003). Kullandığımız yöntem ile daha kısa sürede ve daha az maliyetli bir saflaştırma gerçekleşmiştir ve saflaştırma oranı diğer yöntemlere oranla daha yüksektir.

Kromatografik metotların kullanılarak bitkisel peroksidaz enzimlerin saflaştırılmasında jel filtrasyon kromatografisi, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi gibi çok sayıda yöntem olduğu görülmüştür. Ancak bu yöntemlere bakıldığında saflaştırma katsayılarının düşük olduğu görülmektedir. Bunlar arasından afinite kromatografisinin tercih edilme nedeni, enzim aktivitesinde meydana gelen kayıpları ortadan kaldırmak ve yüksek verimle enzimi saflaştırmaktır. Bu yüzden, endüstride sıkça kullanılan peroksidaz enziminin afinite tekniği ile tek basamakta pazı gibi doğal kaynaklardan yüksek oranda izole edilmesi çalışmanın amacıdır.

Bu tez kapsamında amacımız afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak pazı gibi bitkisel kaynaklı peroksidazların yüksek verimlilikte elde edilmesi ve bunun daha az zaman harcanarak gerçekleştirilmesidir. Daha önce yapılan çalışmalarda 4-Amino benzohidrazid bileşiğinin bitki POD enzimlerinin yarışmalı bir inhibitörü olduğu ve bitki peroksidazlarının saflaştırılmasında kullanılabileceği tespit edilmiş ve literatüre kazandırılmıştı (Özdemir vd. 2019). Amino benzohidrazid molekülü sentezlenerek bitki peroksidaz enziminin saflaştırılmasında en etkin ligand tespit edildi ve metil benzoat satın alınarak hidrazin sentezi gerçekleştirildi.

Saflaştırılan pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) peroksidazının saflık kontrolü ve molekül ağırlığını belirlemek amacı ile SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE sonrasında pazıdan izole edilen peroksidaz enziminin saf olduğu belirlendi (Şekil 22). Literatürde yapılan saflaştırma çalışmaları neticesinde POD enzimi için çok sayıda izoenzim yapısı tespit edilmiştir. Değişik bitki kaynaklarından elde edilen bu izoenzimlerin bazılarının molekül ağırlıkları SDS-PAGE tekniğiyle; hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, kırmızı pancarda (Rudrappa *et al.* 2007) 45 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44 kDa, at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa olarak bulunmuştur. Peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıkları, saflaştırılan kaynağa göre 35-95 kDa arasında değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda ise pazıdan elde edilen peroksidaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 37 kDa olarak bulunmuştur. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enzimi için bulduğumuz molekül ağırlığı literatürle uyum içindedir.

Saflaştırma sonrasında POD enzimi için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Sonuç olarak, Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enzimi için optimum pH, optimum sıcaklık, K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

Her peroksidazın optimum pH değeri izole edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir. Örneğin; mevcut yöntemlerle at turpundan (*Armoracia rusticana*) saflaştırılan peroksidazın optimum pH değeri fosfat tamponunda 7 (Lavery *et al.* 2010), ıspanak yapraklarından (*Spinacia oleracea*) saflaştırılan peroksidazın optimum pH değeri fosfat tamponunda 5,2 olarak bulunmuştur (Köksal 2011). POD enzimi ile yapılan çalışmalarda genellikle optimum pH değeri 5,0-7,5 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla pH 4,0-8,0 aralığında 0,1 M'lık KH_2PO_4 tamponlarında enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometre cihazında ölçüldü. İzole edilen pazı POD enzimi için optimum pH değeri 0,1 M'lık KH_2PO_4 tamponunda 5,5 olduğu tespit edildi. Bizim bulduğumuz optimum pH değeri literatürde bulunan değerlerle uyum içindedir. Hem bizim bulduğumuz hem de literatürde bulunan optimum pH değerleri gösteriyor ki peroksidaz enzimi asidik bir pH'a sahiptir.

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemede optimum pH'da 10'ar derece artışla 0-70 °C aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enzimi için optimum sıcaklık 30 °C olarak bulundu. Vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı 16 °C (Marquez *et al.* 2008), hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı 55 °C (Al-senaidy and Ismael

2011), karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı 30 °C (Köksal and Gülçin 2008), ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı 60 °C (Köksal 2011), karayip bitkisinden (*Euphorbia cotinifolia*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı 50 °C (Kumar *et al.* 2011) olarak bulunmuştur. Bulduğumuz optimum sıcaklık değeri literatürde bulunan değerlerle uyum içindedir.

Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin guaiakol substratına olan ilgisini belirlemek amacıyla en az beş farklı guaiakol konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen 1/V ve 1/[S] değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin K_M değeri 141,64 mM ve V_{max} değerini 7,500 EU/mL.dk (Köksal ve Gülçin 2008), vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin K_M değeri 3,8 mM (Marquez *et al.* 2008) ve ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin K_M değeri 17,35 mM ve V_{max} değerini 1,234 EU/mL.dk olarak bulmuştur (Köksal 2011). Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) peroksidazı için ise K_M değeri 15,15 mM ve V_{max} değeri 20,66 EU/mL.dk olarak tespit edildi. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enzimlerinin K_M değeri literatürde bulunan değerlere yakın olduğu görölmektedir. Ancak V_{max} değeri literatürden oldukça farklıdır. K_M değeri enzim substrat kompleksinin sağlamlığının bir göstergesidir. K_M değerinin yüksek olması ES kompleksinin bağlanması zayıf olduğunu yani enzimin substrata ilgisinin az olduğunu gösterir. Yapmış olduğumuz çalışmalarda bulunan K_M değerlerine bakıldığında pazı (*Beta vulgaris* L. var. cicla) POD enziminin guaiakol substratına olan ilgisinin yüksek olduğu kanısına varılmıştır. Peroksidaz enziminin endüstriyel değerinin yüksek olması ve kullanım alanlarının fazla olması sebebiyle enzimin yüksek verimlilikle saflaştırılması amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Ancak ölkemizde bol miktarda yetiştirilen pazı bitkisinden peroksidaz enziminin izole edilmesi amacıyla hem daha az maliyetli olduğundan ve hem de daha az zaman gerektirdiğinden diğer yöntemlere oranla afinite kromatografisi daha çok tercih edilmektedir.

Literatürde afinite kromatografisi tekniği ile enzimlerin yeni ligand olan 4-Amino 3-floro ile saflaştırılması için detaylı bir saflaştırma prosedürü bulunmamaktadır. Bu amaç doğrultusunda POD enziminin saflaştırılmasında kullandığımız siyanojen bromürle aktiveştirilmiş Sepharose 4B matriksine ligandımızı bağlayarak afinite jeli hazırlandı ve literatüre ucuz maliyetli ve yüksek verimli yeni bir yöntem olarak kazandırıldı.

KAYNAKLAR

- Al-Senaidy, A.M., Ismael, M.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.
- Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. European Journal of Biochemistry, 18, 351-360.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. Biochimica et biophysica acta, 1080, 245–250.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C., Sola, M., 2012, Redox properties of heme peroxidases. Archive of Biochemistry and Biophysics 500, 21-36.
- Bolkent, Ş., Yanardağ, R., Tabakoğlu-Oğuz, A., Özsoy-Saçan, Ö., 2000, Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on pancreatic B cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study, Journal of Ethnopharmacology, 73, 251-259.
- Bradford. M.M., Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. Federation Proceedings, 35, 274-274.
- Carabasa-Giribet, M. and Ibarz-Ribas, A. 2000. Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. Journal of Food Engineering, 44, 181-189.
- 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.
- Colowick, S.P.and Kaplan, N.O., 1987. Methods in Enzymology.(Editors: Colvick, S. P., Kaplan, N. O.) academic Press, Inc., London,1-55. Converso, D.A., Fernandez, M.E., 1995, Peroxidase isozymes from wheat germ : purification and properties, Phytochemistry, 40. 1341-1345.
- Daniel, RM., Peterson, M.E., Danson, M.J., *et al.*, 2010. "The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity". Biochemical Journal.425, 353-60.
- Deepa, S. S., Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf. Phytochemistry, 61, 503–511.
- Doerge, D.R., 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitrogens. Biochemistry, 25, 4724-4728.
- Doerge, D.R., Divi R.L. and Churchwell M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. Analytical Biochemistry, 250, 10–17.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., 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.
- Geike, F., and Parasher, C.D., 1975. Simple screening-test for detection of lactoperoxidase inhibitors. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 276, 77-78.
- Hage, D.S., 1999. Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. Clinical Chemistry, 45, 593-615.
- Hage, D.S., Clarke, W., 2004. Affinity Chromatography: An Overview. In: Encyclopedia of Chromatography, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, 40-43, New York.
- 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. and Matsui H., 2001. A large family of class III olant peroxidases. Plant Cell Physiol., 42, 462-468.

- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y. and Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium Gon Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72–77.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63.
- Kahraman, S., 2003, Peroksidazın pazıdan (*Beta vulgaris* L. var. cicla.) saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A., Aosvgyazo, V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Karlson, P., Telefoncu, A. 1998. Tıp ve Fen Bilimciler Gülçin Biyokimya, Sermet Mat., Kırıkkale, s.68.
- Keha, E. ve Kürevioğlu Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- Keha, E.E. ve Kürevioğlu, Ö., Biyokimya, AktifYayınevi, Ankara, 2010. Klivanov, A. M., Stabilization of enzymes against thermal inactivation, *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 1-28, 1983.
- Kettle, A.J., Gedye, C.A., Winterbourn, C.C, 1997. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochemical Journal*, 321, 503-508.
- Kim, S.J., Shoda, M., 1999, Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1029-1035.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002, Industrial enzyme applications, *Current Opinion In Biotechnology*, 12, 345-351.
- Kokkinakis, D.M., Brooks, J.L., 1979, Tomato peroxidase: purification, characterization and catalytic properties, *Plant Physiology*, 63, 93-99.
- Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M., 2014, Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması, *Akademik Gıda*, 12, 79-87.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassicaoleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein and Peptide Letters*, 15.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *Intenational Journal of Pharmacology*, 7, 135-139.
- Kumar, R., Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk . *Acta Crystallographica*, 51, 1094-1096.
- Kumar, R., Sing, K.A., Sing, V.K., Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry*, 46, 1350-1357.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D’Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lehninger, A.L., 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers Inc New York.
- Lehninger, A.L., 2005. Principles of biochemistry. Worth publsher, Acedemic Press, New York.
- Lineweaver, H. and Burk D., 1934. The determination of enzyme dissocation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 57, 685 1934.

- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 41, 1372-1379.
- Miranda, M.V., Magrı, M.L., Cabrera, R.B., Fernandez, L. Ve Cascone, O., Optimisation of peroxidase adsorption on concanavalin a-agarose, *Latin American Applied Research*, 33, 67-71, 2003.
- Mliki, A., Zimmermann, W., 1992, Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyaneus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 916-919.
- Ocarra, P., Barry S., 1974. Griffin T Spacer Arms in Affinity Chromatography - Use of Hydrophilic Arms to Control or Eliminate Nonbiospecific Adsorption Effects. *FEBS Letters*, 43, 169-175.
- 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. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31, 125-134.
- Özdemir, H., Öztekin, A. Almaz, Z., 2019. *et al.* Purification of Peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique., *Jornal of Chromatography B*. Kahraman, S., 2003, Peroksidazın pazıdan (*Beta vulgaris* L. var. cicla) saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özdemir, H., Öztekin, A. Almaz, Z., 2020. *et al.* A new approach for affinity-based purification of horseradish peroxidase. *IUBMB Journals*.
- PAULO, A. C., and GUBITZ, G. M., 2003. Textile processing with enzymes. CRC press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1.
- Robert. K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Robinson, F.E., Maxwell S.R.J. and Thorpe G.H.G. 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291–302.
- Rojas-Reyes, J.O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Matinez, C.C., Waliszewski, K.N., Aguilar-Uscanga, M.G., 2014, Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 1844-1853.
- 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., 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.
- Sakharov, I.Y., Vesga, M.K., Galaev, B.I.Y., Sakharova, I.V., Pletjushkina, O.Y., 2001, Peroksidase from leaves of royal palm tree Roystonea regia: purification and some properties, *Plant Science*, 161, 853-860.
- 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.
- Singh, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32, 39–49.
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T., Ogura, N., Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit, *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1677-1678, 1991.

- Şişecioğlu, M., Gülçin İ., Çankaya M., Atasever A., Şehitoğlu M.H., Kaya H.B. and Özdemir H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Medicinal Plants Research, 4, 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, osteogenik (rhBMP-7) ve angiogenik (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
- Tsai C.S. 2007. Biomacromolecules. Department of Chemistry, Carleton University, New Jersey. 11:323-325.
- Tüzün, C., Biyokimya, Palme yayıncılık, 81, Ankara, 2005.
- Tzika, E.D., Sotiroidis, T.G., Papadimitriou, V., Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). European Food Research and Technology, 228, 487-495.
- Van Huystee, R.B., 1987, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Annual Review Plant Biology, 38, 205-219.
- 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.
- Yılmaz, Y. and Toledo, R. 2005. Antioxidant activity of water soluble maillard reaction products. Food Chemistry, 93, 273-278.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Betül BOLDAZ
Doğum Tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Ziya Gökalp Anadolu Lisesi
Lisans:	Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (2018)