



**BAYIR TURPU (*Armoracia rusticana*) PEROKSİDAZ  
ENZİMİNİN 3-AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ  
KULLANILARAK AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ  
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

**Nurgül ABUL**

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

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAYIR TURPU (*Armoracia rusticana*) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN 3-AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Nurgül ABUL

KİMYA ANABİLİM DALI  
Biyokimya Bilim Dalı

**ERZURUM**  
2019

Her hakkı saklıdır



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



**TEZ ONAY FORMU**

**BAYIR TURPU (*Armoracia rusticana*) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN 3-AMİNO  
BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİSİYLE SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Nurgül ABUL tarafından hazırlanan bu çalışma, 30/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **13/6/2019** tarih ve **24/32** nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

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

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **BAYIR TURPU (*Armoracia rusticana*) PEROKSİDAZ ENZİMİNİN 3-AMİNO BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Nurgül ABUL

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Horseradish peroksidaz (HRP, E.C 1.11.1.7) sanayide, tıpta ve klinik tanılamada kullanılan önemli bir enzimdir. Bu tez kapsamında amino benzohidrazid molekülleri kullanılarak afinite kromatografisi tekniği ile bayır turpu (*Armoracia rusticana*) bitkisinden POD enziminin tek basamakta saflaştırılması için etkili ve yeni afinite ligantlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 3-amino benzohidrazid türevi olan, 3-amino 5-kloro benzohidrazid, 3-amino 5-bromo benzohidrazid, 3-amino 4-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid moleküllerinin metilbenzoat formlarından hidrazin sentezleri yapıldı. Sentezlenen moleküllerin karakterizasyonu <sup>1</sup>H-NMR ile doğrulandı. HRP enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri belirlendi. Dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline bağlandı ve HRP enzimi %6,72 verimle ve 284,5 kat saflaştırıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen enzimler için SDS-PAGE yapıldı ve 47 kDa'da tek bant gözlemlendi. Kullanılma potansiyeli en yüksek olan Sepharose-4B-L-Tirozin-3-amino 4-nitro benzohidrazid afinite kolonu için pH:6, 20°C, 0,4 M'da optimum bağlanma gözlemlendi.

**2019, 71 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Peroksidaz, Afinite kromatografisi, Bayır turpu, Enzim saflaştırma, 3-Amino benzohidrazid türevleri

## ABSTRACT

Master Thesis

### PURIFICATION OF HORSERADISH (*Armoracia rusticana*) PEROXIDASE ENZYME BY AFINE CHROMATOGRAPHY USING 3-AMINO BENZOHIDRAZIDE DERIVATIVES

Nurgül ABUL

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

Advisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Horseradish peroxidase (HRP, E.C. 1.11.1.7) is an important enzyme used in industry, medicine and clinical diagnosis. In this thesis, it was aimed to determine the effective and novel affinity ligands for purifying the POD enzyme from the Horseradish (*Armoracia rusticana*) plant in a single step by affinity chromatography using amino benzohydrazide molecules. For this purpose, 3-amino 5-kloro benzohidrazide, 3-amino 5-bromo benzohidrazide, 3-amino 4-methyl benzohidrazide, 3-amino 4-nitro benzohidrazide, which are 3-amino benzohidrazide derivatives were synthesized from the mthylbenzoate forms. The characterization of the synthesized molecules was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR. The inhibition effects of these molecules on the HRP enzyme were investigated. IC<sub>50</sub> and K<sub>i</sub> values were determined. Molecules with reversible inhibition were bound to Sepharose-4B-L-Tyrosine material and the HRP enzyme was purified in %6,72 yield and 284,5 fold. SDS-PAGE was performed for enzymes obtained from purification step and single band was observed at 47 kDa. For the Sepharose-4B-L-Tyrosine-3-amino 4-nitro benzohydrazide affinity column, which had the highest potential, optimum binding at pH: 6, 20°C, 0.4 M was observed.

**2019, 71 sayfa**

**Keywords:** Peroxidase, affinity chromatography, horseradish, enzyme purification, 3-Amino benzohydrazide derivatives

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bu zaman zarfında bana verdiği tüm desteklerden dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını benden esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Cavit KAZAZ'a ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU'na ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Sayın Uzman Songül BAYRAK ve Uzman Serpil GERNİ'ye;

Tez çalışmamı 215Z386 nolu proje kapsamında destekleyen Tübitak'a teşekkür ederim.

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

**Nurgül ABUL**

**Nisan, 2019**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                           | i         |
| ABSTRACT.....                                                                       | ii        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                       | iii       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                | vii       |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                             | ix        |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                                | <b>1</b>  |
| 1.1. Enzimatik İnhibisyon .....                                                     | 6         |
| 1.1.1. Dönüşümsüz inhibisyon .....                                                  | 6         |
| 1.1.2. Dönüşümlü inhibisyon .....                                                   | 7         |
| 1.3. Antioksidanlar .....                                                           | 10        |
| 1.4. Peroksidazlar .....                                                            | 10        |
| 1.4.1. Bitki peroksidazları .....                                                   | 14        |
| 1.5. Afinite Kromatografisi .....                                                   | 17        |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>                                                     | <b>20</b> |
| 2.1. Çalışmanın Amacı .....                                                         | 23        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....</b>                                                | <b>25</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                  | 25        |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....                                            | 25        |
| 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....                                           | 26        |
| 3.2. Yöntemler.....                                                                 | 30        |
| 3.2.1. Protein tayini .....                                                         | 30        |
| 3.2.1.a. Kalitatif protein tayini .....                                             | 30        |
| 3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi .....                                       | 30        |
| 3.2.2. HRP aktivitesi tayini .....                                                  | 31        |
| 3.3. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları ..... | 32        |
| 3.3.1. HRP saflaştırmada kullanılan ligand moleküller.....                          | 32        |
| 3.3.2. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....                        | 33        |
| 3.3.3. İnhibitör çalışmaları .....                                                  | 34        |

|                                                                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.3.a. Enzim aktivitesi üzerine 3-Amino benzohidrazid türevlerinin etkilerinin incelenmesi.....                                                      | 34        |
| 3.3.4. Afinite jelinin hazırlanması .....                                                                                                              | 34        |
| 3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması .....                                                                             | 34        |
| 3.3.4.b. 3-aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi.....                                                                                   | 35        |
| 3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi .....                                                                                                         | 36        |
| 3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....                                                                                              | 36        |
| 3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi .....                                                                       | 37        |
| 3.5. $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması.....                                                                                                    | 38        |
| 3.6. Afinite Kolonunun HRP Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması.....                                                                                 | 38        |
| 3.6.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi .....                                                                                                          | 39        |
| 3.6.2. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....                                                                                                  | 39        |
| 3.6.3. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi .....                                                                                                      | 39        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                                                                                                    | <b>40</b> |
| 4.1. 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi .....                                                                                            | 40        |
| 4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....                                                                                    | 43        |
| 4.3. Sentezlenen 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin $K_i$ ve $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....                                                 | 44        |
| 4.3.1. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakolsubstratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....                          | 45        |
| 4.3.2. 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakolsubstratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....                          | 48        |
| 4.3.3. 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakolsubstratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....                          | 51        |
| 4.3.4. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar .....                         | 54        |
| 4.4. HRP Enziminin 3-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları.....                                                                   | 57        |
| 4.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....                                                                                                | 58        |
| 4.6. Horseradish Bitkisinden 3-Amino 4-nitro Benzohidrazid Molekülü ile Hazırlanan Afinite Kolonunun HRP Enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi ..... | 59        |

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi .....                      | 59        |
| 4.6.2. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....              | 59        |
| 4.6.3. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları..... | 60        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>                                   | <b>61</b> |
| KAYNAKLAR .....                                                    | 66        |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                     | 72        |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Michaelis–Menten grafiği.....                                                                            | 4  |
| Şekil 1.2. Lineweaver-burk grafiği .....                                                                            | 5  |
| Şekil 1.3. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi .....                                                          | 7  |
| Şekil 1.4. Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi .....                                              | 8  |
| Şekil 1.5. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi.....                                           | 8  |
| Şekil 1.6. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi .....                                       | 9  |
| Şekil 1.7. Peroksidazların farklı fenoliksubstratları kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması .....       | 13 |
| Şekil 1.8. Peroksidaz enziminin guaiakolsubstratınıguaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması..... | 13 |
| Şekil 1.9. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü .....                   | 14 |
| Şekil 1.10. Peroksidazların farklı fenoliksubstratları kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması.....       | 15 |
| Şekil 1.11. Yaban turpu ( <i>Armoracia rusticana</i> ) bitkisi .....                                                | 16 |
| Şekil 1.12. HRP enziminin çalışma mekanizması .....                                                                 | 16 |
| Şekil 1.13. HRP enziminin üç boyutlu molekül yapısı.....                                                            | 17 |
| Şekil 3.1.Guaiakolsubstratının yükseltgenme denklemi.....                                                           | 31 |
| Şekil 3.2.HRP inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller.....                                                | 33 |
| Şekil 3.3. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması ..                               | 33 |
| Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B’ye tirozin takılması reaksiyonu .....                             | 35 |
| Şekil 3.5. 3-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin’e kenetlendirilmesi reaksiyonu .....    | 36 |
| Şekil 4.1. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid (5) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....                 | 41 |
| Şekil 4.2. 3-Amino 5-kloro benzohidrazid (6) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....                 | 41 |
| Şekil 4.3. 3-Amino 4-metil benzohidrazid (7) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....                 | 42 |

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.4.</b> 3-Amino 4-nitro benzohidrazid (8) molekülünün 400 MHz $^1\text{H}$ -NMR spektrumu .....                                                | 43 |
| <b>Şekil 4.5.</b> Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....                                                 | 44 |
| <b>Şekil 4.6.</b> HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromobenzohidrazidile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....    | 45 |
| <b>Şekil 4.7.</b> HRP enzimi üzerine guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği .....     | 47 |
| <b>Şekil 4.8.</b> HRP enzimi için guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 5-kloro benzohidrazidile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....     | 48 |
| <b>Şekil 4.9.</b> HRPenzimi üzerine guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği .....      | 50 |
| <b>Şekil 4.10.</b> HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-metil benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği ..... | 51 |
| <b>Şekil 4.11.</b> HRPenzimi üzerine guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....      | 53 |
| <b>Şekil 4.12.</b> HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği ..... | 54 |
| <b>Şekil 4.13.</b> HRPenzimi üzerine guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....      | 56 |
| <b>Şekil 4.14.</b> Yabanturpu (HRP) enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....                                                                                    | 58 |
| <b>Şekil 4.15.</b> Sepharose-4B-L-Tirozin-3Amino 4-nitro benzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği.....                                                  | 59 |
| <b>Şekil 4.16.</b> Sepharose-4B-L-Tirozin-3-Amino 4-nitro benzohidrazid jelinin iyonik şiddet-kapasite grafiği .....                                     | 60 |
| <b>Şekil 4.17.</b> Sepharose-4B-L-Tirozin-3Amino 4-nitro benzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği .....                                           | 60 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması .....                                                                                                                            | 12 |
| Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....                                                                                                      | 18 |
| Çizelge 3.1. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler .....                                                                                                                                 | 29 |
| Çizelge 4.1. 3-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları .....                                                                                                                     | 40 |
| Çizelge 4.2. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü..... | 45 |
| Çizelge 4.3. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için 1/V, 1/[S] değerleri ve deney prosedürü .....                           | 46 |
| Çizelge 4.4. HRP enzimini üzerine 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi .....                                                                                   | 47 |
| Çizelge 4.5. 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü..... | 48 |
| Çizelge 4.6. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için 1/V, 1/[S] değerleri ve deney prosedürü .....                           | 49 |
| Çizelge 4.7. HRP enzimi üzerine 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi .....                                                                                     | 50 |
| Çizelge 4.8. 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü..... | 51 |
| Çizelge 4.9. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörü için 1/V, 1/[S] değerleri ve deney prosedürü .....                           | 52 |
| Çizelge 4.10. HRP enzimini üzerine 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....                                                                                   | 53 |

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.11.</b> 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakolsubstratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü..... | 54 |
| <b>Çizelge 4.12.</b> HRP enzimi üzerine guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro bezohidrazid inhibitörü için $1/V$ , $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü .....                       | 55 |
| <b>Çizelge 4.13.</b> HRP enzimini üzerine 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi .....                                                                                  | 56 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> HRP enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları .....                                                                                                      | 56 |
| <b>Çizelge 4.15.</b> Afinite kolonlarından elde edilen HRP enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu .....                                                                                    | 57 |

## 1. GİRİŞ

Canlı hücrelerde meydana gelen yapım ve yıkım tepkimelerinin tümüne metabolizma denir. Kimyasal tepkimelerin başlayabilmesi ve devam edebilmesi için tepkimeye girecek moleküllerin aktivasyon enerjisi engelini aşması gerekir. Aktivasyon enerjisi, belli bir sıcaklıkta 1 molreaktanın aktifleşmiş durum kazanmaları için gerekli enerji miktarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Aktivasyon enerjisi engelini aşılması, katalizör kullanılmasıyla sağlanır. Hücrede enerji engelini aşarak kimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için biyolojik katalizör kullanılır.

Enzimler, canlı organizmalardaki reaksiyonları hiçbir yan ürün oluşturmada %100'lük bir ürün verimi sağlayarak katalizleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu dışında protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu). Enzimler protein yapısında olduklarından primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılarını korumaları, aktiflikleri açısından oldukça önemlidir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalitik güçleri ve spesifiklikleridir (Lehninger 1982; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler protein yapısındadır ve DNA seviyesinde düzenlenip kontrol edilir. Hücre içinde meydana gelen bir reaksiyon enzimsiz hemen hemen hiç gerçekleşmez, reaksiyonlar kendiliğinden meydana gelmez. Bu yüzden enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemek eksik bir tanımlama olacaktır. Gerçekten bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır (Keha ve Küfrevioğlu).

Aktif merkeze bağlanan ve enzim tarafından dönüşüme uğratılan moleküle substrat denir. Her substrat veya substrat grubunun spesifik bir enzimi vardır. Enzimler substratlarına kıyasla daha büyük moleküllerdir. Reaksiyonun gerçekleştiği yere küçük bir bölgedir (Tüzün 2005). Aktif merkez, polipeptit zincirinin belirli kısımlarının

özel katlanmaları sonucunda meydana gelir ve katalitik aktiviteden sorumludur (Karlson and Telefoncu 1998).

Enzimatik reaksiyon hızlarını etkileyen faktörler (Daniel *et al.* 2010);

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

### **Sıcaklık**

Sıcaklık enzimatik reaksiyonları hızlandırır. Ancak sıcaklık artışı belirli bir yere kadar aktiviteyi artırır, daha sonra aktivite düşmeye başlar. Birçok enzim 50-60°C civarındaki sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Enzimler optimum sıcaklıkta maksimum aktivite gösterirler (Daniel *et al.* 2010).

### **pH**

Enzimlerin ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişir ve enzimler optimum pH'da en yüksek aktivite gösterirler. Enzimatik çalışmalarda optimum pH'da çalışabilmek için tamponlar kullanılır. Optimum pH'dan daha düşük veya daha yüksek pH'lar, enzimin aktivitesinde kayba neden olur. Bunun nedenleri pH değişimine bağlı olarak meydana gelen enzim veya substratta bulunan yüklü grupların yapısının değişmesi ve enzimin denatüre olmasıdır (Altunkaya ve Gökmen 2011).

**Enzim konsantrasyonu**

Enzimin substrata doygun olduğu Şartlarda enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı da doğrusal olarak artar (Al-Senaidy and Ismael 2011).

**Zaman**

Bir enzimatik reaksiyon devam ederken reaksiyonun hızı giderek azalır. Bu durum reaksiyon sırasında oluşan ürünlerin aralarında birleşerek ters yönde bir reaksiyon oluşturmaları, reaksiyonu engelleyen maddelerin oluşumu, enzimin zamanla inaktive olması ve substratın tükenmesi gibi faktörlerden kaynaklanır. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun kullanıldığı reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekteştirilir (Keha ve Kűvreviođlu 2009).

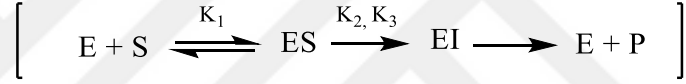
**Substrat konsantrasyonu**

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak belirli bir noktaya kadar artar. Daha sonra enzim substrat doygunluğuna ulaştığı anda reaksiyon hızı değişmeden devam eder. Bu durumda enzim, maksimum hızda çalışıyor demektir. Maksimum hız  $V_{max}$  ile gösterilir.

Eđer enzimler olmaz ise birçok biyokimyasal olay ya hiç gerçekteşmez ya da gerçekteşmesi son derece yavaş olur. Enzimler canlı dokuların bileşiminde az miktarda bulundukları gibi hücre dışında da çalışabilir. Birçok sanayi alanında enzimlerden yararlanılır. Tıpta, kimya endűstrisinde, gıda prosesinde, ekmek, bira, peynir üretiminde ve ziraatte pek çok kullanım alanı vardır.

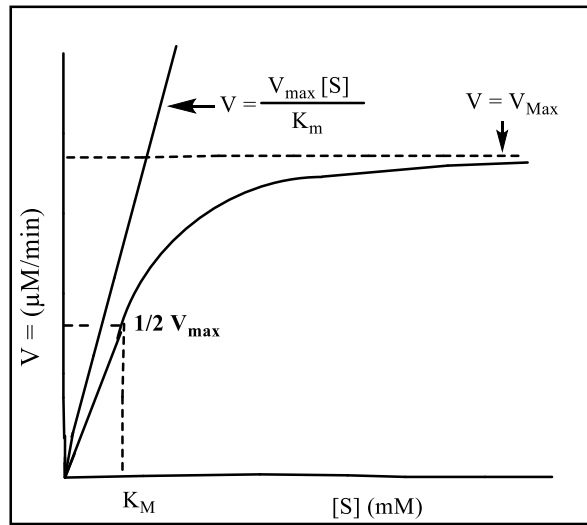
Enzim kinetiği enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızlarını inceler. Enzimler canlılarda çok az miktarlarda bulunduğundan enzimlerin miktarları değil aktiviteleri

ölçülür. Enzim kinetiğinde reaksiyon hızı ölçülerek reaksiyon şartlarını değiştirmenin reaksiyon üzerine etkisi incelenir. Bu şekilde enzimin katalitik mekanizması, inhibitör veya aktivatörler tarafından nasıl kontrol edilebileceği ve metabolizmadaki rolü belirlenebilir (Lehninger 2005). Araştırmacılar 1902 yılında Enzim-Substrat ile Enzim-Substrat kompleksi arasında bir dengenin olduğunu ifade etmişlerdir. Sonra bu fikri Michaelis-Menten genişleterek bugün kendi adlarıyla anılan sabite ve eşitliğe ulaşmışlardır (Colowick and Kaplan 1987). Enzim kinetiği için 1913 yılında Lenor Michaelis ve Maude Menten tarafından geliştirilen Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle enzimlerin kinetik özellikleri ifade edilir. Bu denklemdeki  $V_{max}$  enzimin katalitik aktivitesini ve  $K_M$  sabiti enzimin substrata ilgisini ifade eder. Enzim kinetiği reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibidir (Menten and Michaelis 1913);



Michaelis-Menten formülü şu şekilde gösterilir; (Menten and Michaelis 1913).

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



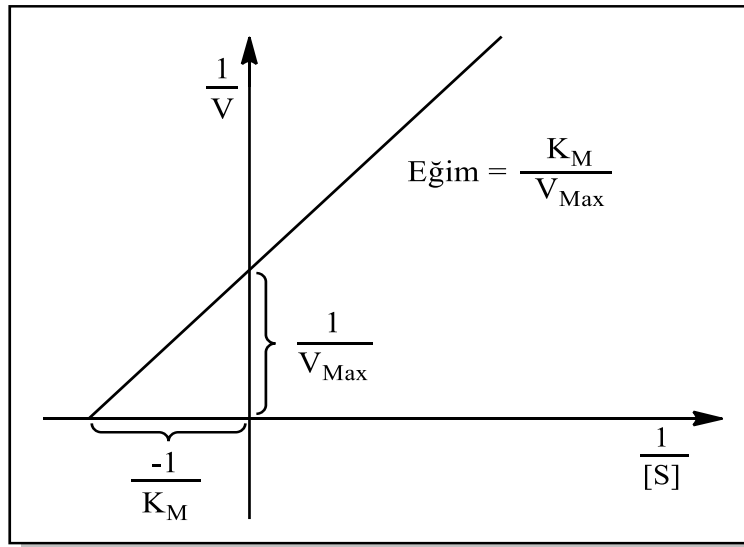
**Şekil 1.1.** Michaelis–Menten grafiği

$V_{max}$  ve  $K_M$ , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir. Burada  $V_{max}$ , maksimum hız olarak ifade edilir ve hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır.

$K_M$  (Michaelis–Menten sabiti), maksimum hızın yarısına ( $V_{max}/2$ ) karşılık gelen substrat konsantrasyonunu ifade eder (Menten and Michaelis 1913).

Michaelis-Menten denklemi; hiperbolik bir eğrinin denklemidir ve hiperbolik bir eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zordur. Bir enzime ait  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerlerini deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir. Bunlardan sık kullanılan *Lineweaver-Burk* denklemidir ve bu denklem Michaelis-Menten denkleminin tersine çevrilip çarpanlarına ayrılmasıyla elde edilir (Lineweaver and Burk 1934).

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



**Şekil 1.2.** Lineweaver-burk grafiği

Enzim aktivitesi; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin konsantrasyonlarından etkilenir. Enzimler, optimum pH ve doygunluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışırlar. Böylece sıfırıncı dereceden bir reaksiyon oluşur. Enzim kofaktör içeriyorsa, koenzim veya metal iyonları konsantrasyonları doygunluğun çok üzerinde alınır. Bu durumda sistemde hızı sınırlayan tek faktör enzim konsantrasyonudur. Yani bu durumda hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Bu yüzden düşük substrat konsantrasyonlarında elde edilen değerler daha az sağlıklıdır (Lehninger 1982). Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. 25°C'de ve optimal şartlarda 1  $\mu$ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına "Enzim Ünitesi" denir. "Michaelis-Menten" denklemi neredeyse tüm enzimler için enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde kullanılan temel bir ifadedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin bazı bileşikler tarafından in vivo ve in vitro aktivitelerinin azaltılması hatta yok edilmesi olayına "inhibisyon", bu olaya sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir.

Enzimatik aktivite inhibisyonu, biyolojik sistemlerde kontrol mekanizması oluşturduğundan biyolojik sistemler açısından önemlidir. İnhibitörler, metabolik yolların aydınlatılmasında ve enzim etki mekanizmalarında biyokimyasal için önemlidir (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

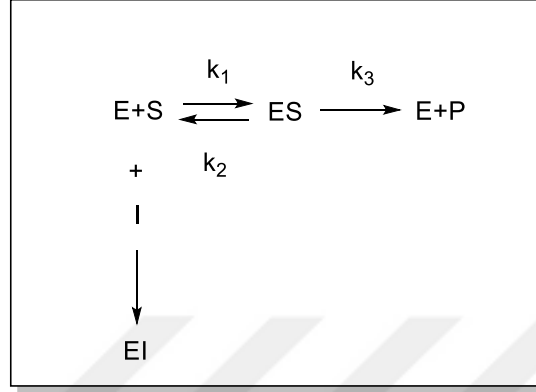
## **1.1. Enzim İnhibisyonu**

Enzimatik inhibisyon, dönüşümsüz ya da dönüşümlü olmak üzere iki şekilde incelenir.

### **1.1.1. Dönüşümsüz inhibisyon**

İnhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana getirir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu durumda enzimin tekrar aktivite göstermesi beklenemez. Dönüşümsüz inhibisyon da  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak max. hız) azalırken  $K_M$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmez (Segel 1975;

Keha ve Küfrevioğlu 2009). Kimyasal maddeler, ilaçlar ve zehirli bileşikler bu yolla etki gösterir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



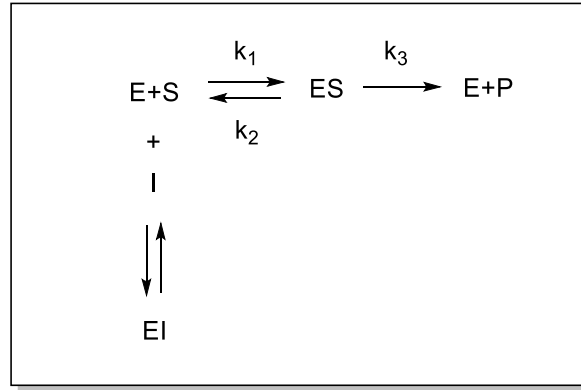
**Şekil 1.3.** Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi

### 1.1.2. Dönüşümlü inhibisyon

Enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonudur. İnhibitör enzimle veya enzim substrat kompleksiyle kovalent olmayan şekilde bağlanır (Lehninger *et al.* 2005). Bu tip inhibisyonlarda enzim inhibitör ilişkisi, inhibitöre oranla enzim konsantrasyonunun veya substrat konsantrasyonunun arttırılması ile tersine çevrilebilmektedir. Bu inhibisyon türü üç gruba ayrılır. Bunlar;

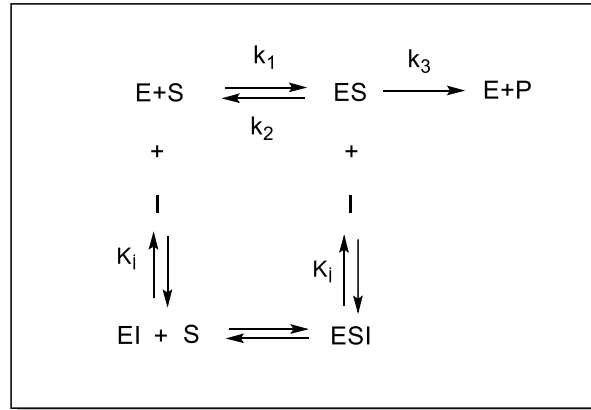
- ✓ Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- ✓ Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- ✓ Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)

**i. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon:** İnhibitörün yapısı, yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanma noktasında inhibitör, substratla yarış halindedir. Ancak substrat konsantrasyonu artırıldığında inhibitörlerin inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Enzimin  $V_{max}$  değeri değişmez ancak  $K_M$  değerinde artış meydana gelir (Şekil 1.4) (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



**Şekil 1.4.** Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

**ii. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon:** Yarışmalı inhibisyondaki gibi enzim aktif bölgesine bağlanma hususunda inhibitör ve substrat arasında bir yarış yoktur. Çünkü inhibitör ve substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanır ve enzimin iki farklı inaktif kompleksi olan EI, ESI meydana gelir. Enzimin  $V_{\max}$  değeri azalırken  $K_M$  değeri değişmez (Şekil 1.5) (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).



**Şekil 1.5.** Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

**iii. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon:** Bu inhibisyon türü, iki substratlı reaksiyonlarda yaygın olarak görülmektedir. Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör, serbest enzime değil sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanabilmektedir. ES konsantrasyonu azalır ve bunun sonucunda  $V_{\max}$  ve  $K_M$  değerleri azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



### 1.3. Antioksidanlar

Organizma serbest radikallere ve bunların neden olduğu zararlara karşı bir savunma sistemine sahiptir. Serbest radikalleri ve bunların meydana getirdiği zararları önleyen maddeler antioksidan olarak adlandırılır (Akkuş 1995; Dündar ve Aslan 1999).

Antioksidanlar radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve radikalik zincir reaksiyonunun ilerlemesini önler (Dündar ve Aslan 1999). Ayrıca serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak antioksidanların rolleri arasında sayılabilir (Pham-Huy *et al.* 2008).

Antioksidanlar üç gruba ayrılmıştır. Bunlar radikal oluşumunu önleyici, oluşan radikali tutucu ve oluşan hasarı onarıcı/hücreyi yenileyici antioksidanlardır. İlk olarak önleyici antioksidanlar radikal oluşumunu engellerler. Engellenemeyen antioksidanlar, zincirin başlaması veya ilerlemesinin durdurulabilmesi için radikal yakalayıcılar tarafından tutulur. Durdurulamayan radikaller hücreye zarar vermişse, hücreleri onarmak veya yenileyerek hastalıkların oluşmasını engellemek için onarıcı/yenileyici antioksidanlar devreye girerler (Willcox *et al.* 2004).

Başlıca enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz (GST), katalaz, mitokondriyal sitokrom oksidazdır (Akkuş vd 1995; Madi *et al.* 1999).

### 1.4. Peroksidazlar

Peroksidaz (POD; E.C. 1.11.1.7), oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir ve hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan  $H_2O_2$  bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizler (Adams 1978; Whitaker 1994). Hücreyi, oksijenli solunum oluşturan canlı organizmaların hücrelerinde bulunan  $H_2O_2$ 'in

oksidatif etkisinden korumak için bu molekölü, moleköler oksijen ve suya çevirirler (Şişecioğlu *et al.* 2010).

Hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda,  $H_2O_2$ 'den başka bir substrata ihtiyaç duymayan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer kompartımanlarında aktivitesini göstermek için  $H_2O_2$ 'den başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Scandalus *et al.* 1994).

Peroksidazlar tarafından kataliz edilen reaksiyonun genel formölü aşağıda verilmiştir (Van Huystee 1987).



Bu reaksiyon, iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonudur ve buradaki hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir (Battistuzzi *et al.* 2012).

Peroksidazlar; aktivitelerinin kolay ölçölmesi ve yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilmesinden dolayı enzimatik çalışmalarda ve protein yapı tayinlerinde model bir enzim olarak tercih edilmektedir (Hiraga *et al.* 2001).

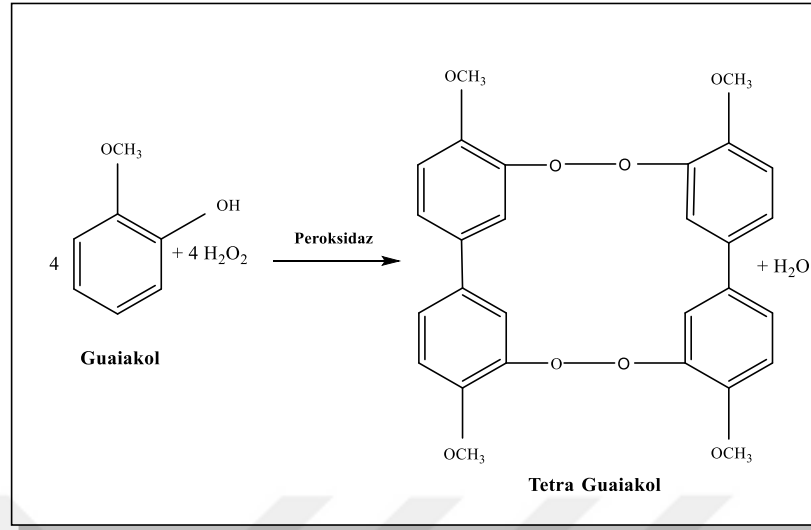
Peroksidazlar başlıca bitkilerde, hayvanlarda, bakterilerde ve mantarlarda bulunur ve iki üst familya içinde sınıflandırılabilir. Bunlar;

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

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

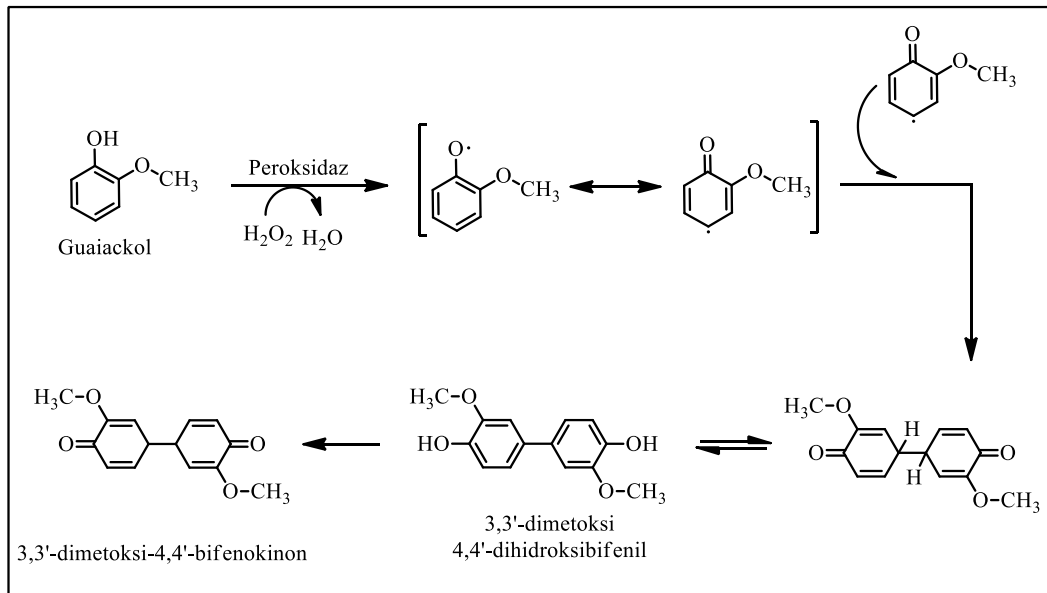
| Süper Aile                       | Enzim                             | Kaynak                      | Molekül Ağırlığı (kDa) |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Hayvan Peroksidazları            | Eosinophil Peroksidaz             | Hayvan                      | 50-75                  |
|                                  | Laktoperoksidaz                   | Hayvan                      | 78-85                  |
|                                  | Miyeloperoksidaz                  | Hayvan                      | 79-150                 |
|                                  | Tiroid Peroksidaz                 | Hayvan                      | 90-110                 |
|                                  | Glutasyon Peroksiaz               | Hayvan, Bitki               | 6-22, 75-112           |
|                                  | Prostaglantin endoperoksit Sentaz | Hayvan                      | 115-140                |
| Katalaz                          | Katalaz                           | Hayvan, Bitki, 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 (POD)                  | Bitki                       | 28-60                  |

Bitki peroksidazları, peroksit karşısında guaiakol, pirogallol ve katekol gibi fenolik bileşikler yükseltgeyebilir (Onsa *et al.* 2004).



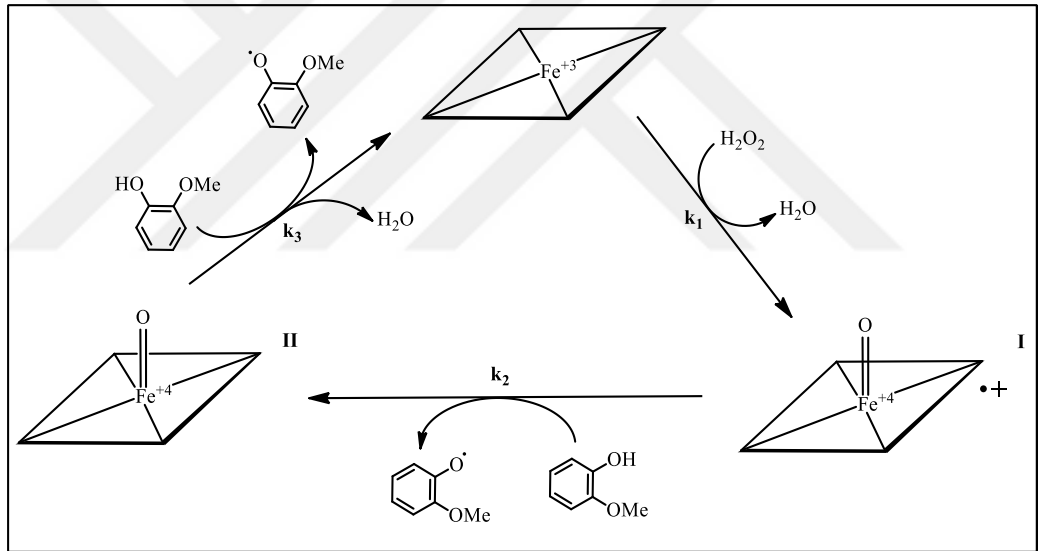
**Şekil 1.7.** Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması

Peroksidaz varlığında yapılan çalışmalarda guaiakol substratının oksidasyon mekanizması aydınlatılmış ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona okside olduğu bulunmuştur (Doerge *et al.* 1997).



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

Peroksidaz; protestik grup olarak b'-tip heme taşıyan,  $H_2O_2$  ile çeşitli elektron donörlerinin oksidasyonunu katalizleyen bir oksidoredüktazdır. Bu mekanizmada enzim, peroksinin bir ekivalenti ile reaksiyon vererek bileşik I'ı oluşturur. Bu bileşik Fe içeren bir porfirin katyon radikalıdır. Bu reaksiyon, iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonudur. Burada hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. Bir oksitleme ekivalenti ortadaki oksiferrili vererek demir üzerine yerleşir. Bileşik II sonra 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 1.9.** Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

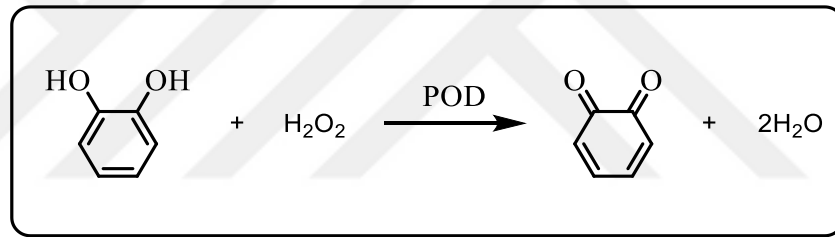
#### 1.4.1. Bitki peroksidazları

Peroksidazlar, bitki ailesi içinde geniş olarak yayılmış durumdadırlar (Miranda *et al.* 2003).

Bitkilerde bulunan peroksidaz, ıspanak yaprakları, enginar yaprakları, lahana, marul, brokoli, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı hücrelerinden saflaştırılmaktadır (Soda *et al.* 1991).

Birçok yüksek bitki birkaç peroksidaz (Prx) izozimlerine sahiptir. İzoelektrik noktaları üzerinde temellendirilen peroksidazlar anyonik, nötral ve katyonik olmak üzere üç alt grupta sınıflandırılırlar (Soda *et al.* 1991).

Peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar komplekstir ve aşağıda genel formülü verilen reaksiyonları katalizlerler (Huystee 1987). Metabolizma esnasında oluşan  $H_2O_2$ 'i etkisiz hale getirirler (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987).



**Şekil 1.10.** Peroksidazların farklı fenolik substratları kullanarak hidrojen peroksit giderme mekanizması

#### 1.4.2. Horseradish (bayır turpu) Peroksidaz (HRP, EC 1.11.1.7)

Bayır turpu (*Armoracia rusticana*), esas olarak köklerinin besin değeri sebebi ile dünyanın ılıman bölgelerinde yetiştirilen uzun ömürlü, dayanıklı bir bitkidir. HRP enzimi bunun köklerinden elde edilmektedir (Şekil 1.12) (Veitch 2004).



**Şekil 1.11.** Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) bitkisi (Veitch 2004)

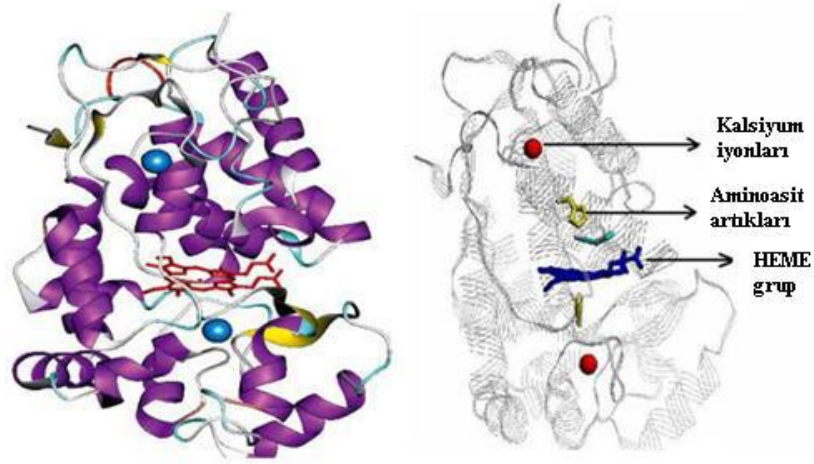
Horseradish (bayır turbu) peroksidaz terimi genel olarak kullanıldığı halde bitkinin kökü bir kaç tane farklı peroksidaz izoenzimi içermektedir. C izoenzimi (HRP C) en yaygın olanıdır (Veitch 2004).

Peroksidazlar  $H_2O_2$  ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP'nin genel çalışma mekanizması aşağıda verildiği gibidir. Bileşik I ve Bileşik II sırasıyla HRP-I ve HRP-II'yi, AH ise indirgenen substratı ifade eder (Deshpande 1996; Leon *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2005).



**Şekil 1.12.** HRP enziminin çalışma mekanizması

Yapısında iki farklı tipte metal merkez ve %18-22 arasında değişen karbohidrat artığı bulunmaktadır. Metal merkezler, demir (III) protoporfirin IX (hem grubu) ve iki kalsiyum atomudur. Her iki merkez de enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü açısından gereklidir (Klibanov 1983; Deshpande 1996; Veitch and Nigel 2004).



**Şekil 1.13.** HRP enziminin üç boyutlu molekül yapısı

### 1.5. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi hedef biyomolekölün bir destek materyali (matriks) üzerine immobilize edilmesi ve hedef molekülün tamamlayıcı bağlanma bölgelerinin bulunduğu ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesi esasına dayalı bir yöntemdir (Wilchek and Chaiken 2000; Kumpalume and Ghose 2003).

Afinite kromatografisi pratik olarak uygulandığında saflaştırma işleminin üç basamakta tamamlandığı görülür. İlk aşamada kolon dengelenir ve hedef molekülü içeren numunede bulunan kolona tutunamayan türler uygun tampon ile yıkanır. Son olarak enzim uygun bir çözelti ile elüe edilir.

#### **Matriks**

Seçilen kolon matriksi, kolonda bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Afinite kromatografisinde kullanılan kolon matriksinin, ayırma işlemlerinde kullanılan kimyasallara karşı stabil, hidrofobik, sert (rigid), büyük gözenekli ve inert olması gerekmektedir (Hage and Clarke 2004).

Afinite kromatografisinde matriks olarak; Bio-gel, Sephadex ve Sepharose gibi farklı polimerler kullanılmaktadır. Bunlar içinde inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jel olan Sepharose, en çok kullanılan matrikstir. Bu matriks, biyolojik aktif moleküllerin immobilizasyonu işleminde gereken bütün özelliklere sahiptir. 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

Kolon içerisinde ayırımın uygun bir şekilde gerçekleşmesi için afinite kromatografisi matriksine bağlanan ligandın afiniteye uygun bir şekilde seçilmesi gerekir. Bu ligandların çoğu biyolojik kökenlidir ancak ayırım için biyolojik kökenli olmayan doğal veya sentetik moleküller de kullanılmaktadır (Hage 1999; Hage and Clarke 2004).

**Çizelge 1.2.** 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**

Enzimlerde bulunan aktif bölge genellikle molekülün iç kısımlarına doğru yerleşmiştir. Bu nedenle küçük ligandların (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlanması sonucu hazırlanan adsorbanlarda, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında istenmeyen etkileşimler meydana gelebilir. Bu durumlar da ligand ile matriks arasına uzantı kolu adı verilen moleküller yerleştirilerek istenmeyen bağlanmalar ortadan kaldırılabılır.

Uzantı kolunun işlevini tam olarak yerine getirebilmesi için uzunluğu çok önemlidir. Eğer uzantı kolu çok kısa olursa, kol etkisiz kalır ve ligand numunedeki saflaştırılacak maddeyi bağlayamaz. Aksine uzantı kolu çok uzun olursa, spesifik olmayan etkiler fazlalaşır ve böylece ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları çok uzun uzantı kolu kullanarak yaptığı deneyde, uzantı kolunun numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını gözlemlemiştir. Spesifik olmayan bu hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisi için arzu edilen bir durum değildir (Ocarra *et al.* 1974).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan çalışmalarda POD enziminin, bitkilerde çimlenme (Morohashi 2002), sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997), hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry 1986), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) ve oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) gibi hayati fonksiyonlarda önemli görevlerinin olduğu görülmektedir. POD'un organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda kullanılması bir başka önemli fonksiyonudur (Adam vd 1999).

Bitki hücreleri  $H_2O_2$  salınmasıyla patojen saldırısına karşılık vermektedir. Bu savunma reaksiyonunun memelilerde fagositik lökositlerin NADPH oksidazına benzer bir NAD(P)H oksidaz tarafından mı yoksa bir hücre dışı peroksidaz tarafından mı katalizlendiği tartışma konusudur. Bitki hücreleri tarafından üretilen  $H_2O_2$  memeli NADPH oksidazının güçlü bir inhibitörü olan, Diphenyleneiodonium (DPI) tarafından inhibe edilebilir. DPI, bir memeli tip enzimin bitki hücreleri tarafından  $H_2O_2$  üretiminden sorumlu olduğu görüşü için önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu çalışmada HRP tarafından NADH bağımlı  $H_2O_2$  üretimini inhibe ettiği gösterilmektedir. Bitkilerde varsayılan NADPH oksidaz aktivitesinin inhibisyonu için daha önce kullanılanla aynı konsantrasyon aralığındaki HRP kullanılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada DPI'nin, peroksidazın katalitik aktivitesinin  $H_2O_2$  üretiminin etkili bir inhibitörü olduğu gösterilmektedir. Oysaki guaiakoldiaminobenzidin gibi aromatik substratların  $H_2O_2$  aracılı oksidasyon ile belirlenen klasik peroksidaz aktivitesi etkilenmemiştir. Bu durumda bu inhibitörün, bitki hücrelerinin oksidatif patlamasının enzimatik mekanizmasında peroksidazın ve memeli tipi NAD(P)H oksidazın ayrıştırılması için bir araç olarak uygun olmadığı saptanmıştır. Bu da DPI'nin inhibitör etkisinin geciktirilmesinde açıklamaya olanak sağlamıştır (Frahry and Schopfer 1998).

HRP'nin 4-Amino antipirin oksidasyonunun merkaptasetik asit ve merkaptetanol tarafından inhibisyonu karşılaştırılmıştır. Merkaptetanol ve merkaptasetik asit için

IC<sub>50</sub> belirlenmiştir ve bu kinetik çalışmalar için kullanılmıştır. Enzim aktivitesi, substrat olarak 4-Amino antipirin ile inhibitörlerin varlığında ölçülmüştür. Merkaptotanolün peroksidaz aktivitesi üzerinde merkaptasetik asitten daha güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur. Kinetik çalışmalarda, her iki durumda da karışık tipte yarışmasız inhibisyon gösterdiği görülmüştür. Bu tip inhibitörlerin AIDS'in tedavisinde diğer anti-viral ilaçlar ile kombinasyon halinde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir (Sariri *et al.* 2006b).

1960'lardan beri peroksidaz enzimi ile ilgili farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırma çalışmaları yapılmaktadır. Afinite, iyon değişim, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi kullanılan saflaştırma metodlarından birkaç tanesidir (Singh and Singh 2002).

Bitkilerden saflaştırılan peroksidaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmaların hepsinde birçok izoenzim yapıları bildirilmiştir. Çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılan bu izoenzimler için genelde farklı moleküler ağırlık, stabil sıcaklık, optimum pH, substrat spesifitesi ve fizyolojik rol tespit edilmiştir (Tıpawan and Barrett 2005). Örneğin enzimin molekül kütlesi brokoli (Tıpawan and Barrett 2005) ve domateste (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa, hurma yaprakları (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa olarak tespit edilmiştir. Kuşkonmazda (Civello *et al.* 1995) 34 kDa ve çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa olarak bildirilmiştir. Son zamanlarda Gülçin ve Yıldırım (2005) tarafından karalahanadan (*Brassicaoleracea* var. *Acephala*) saflaştırılan peroksidazın molekül kütlesi SDS-PAGE metoduyla 95 kDa olarak bulunmuştur. Yine optimum pH değerleride 4,5–6,5 aralığında değişiklik göstermekte (Tıpawan and Barrett 2005) ve enzimin asidik şartlarda daha iyi fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Peroksidaz enzimi birçok bitkide bulunmasına rağmen ticari olarak POD'un en önemli kaynağının bayır turpu kökleri olduğu bilinmektedir. Ayrıca farklı POD enzim türlerinin bulunması yeni analitik metotların ve potansiyel endüstriyel proseslerin ortaya çıkmasına öncülük etmiştir (Gülçin and Yıldırım 2005).

Literatürde HRP enzimi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Sepharose bağlı Concanavalin-A (lektin) üzerine afinite kromatografisiyle HRP'nin saflaştırması adlı araştırmada %73 verim ve 2.45 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Saf HRP'nin karakterizasyonu, 403 nm de hem absorbands hem de protein içeriği bakımından artan bir enzimatik aktivite göstermiştir (Brattain *et al.* 1976).

*Armoracia rusticana* kökleri ve *Glycine max* (soya) tohum kabuklarından afinite ve sıcaklığa bağlı mikroküre ihtiva eden sulu iki fazlı sistemlerle peroksidaz saflaştırması incelenmiştir. *Armoracia rusticana* köklerinden peroksidaz için iki aşamalı saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bir polietilen glikol/fosfat sulu iki fazlı sisteme Concanavalin A afinite mikroküreleri eklenerek geliştirilmiştir ve verim %60 olarak tespit edilmiştir (Miranda *et al.* 1998).

*Armoracia rusticana* kökü ekstrelerinden HRP ters akım kromatografisi saflaştırması (CCC), polimer fosfat sulu iki-fazlı sistemler (ATPS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu fraksiyonda yüklenen toplam aktivitenin %45'i ve 6 gibi bir saflaştırma faktörü hesabıyla HRP nin geri kazanımı sağlanmıştır (Magri *et al.* 2003).

Horseradish köklerinden Fenil Sepharose CL-4B üzerinde ultrasonikasyon amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisiyle üç adımda peroksidaz saflaştırması çalışması yapılmış, bu çalışma sonucunda 772 EÜ/mg spesifik aktivite ile %71,3 verim ve 291 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır (Lavery *et al.* 2010).

Son yıllarda rekombinant HRP üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

2013 yılında yapılan bir çalışmada rekombinant HRP'nin yeniden katlanma süreci ile ilgili araştırmaları mevcuttur (Asad *et al.* 2013). Doku mühendisliği uygulamaları için katalizli in situ oluşturulan hidrojellerde HRP incelenmiştir (Bae *et al.* 2015). Asidik bayır turpu peroksidaz aktivitesinin yaygın kullanılan boyaların genotoksitesini ortadan kaldırması çalışılmıştır (Janović *et al.* 2016). İmmobilize HRP tarafından fenollerin uzaklaştırılması incelenmiştir (Alemzadeh *et al.* 2009). HRP'ye antikorların

biyokonjugasyonu incelenmiştir (Hnasko 2015). Ürünün nanohidrofobik bir bileşeni tarafından HRP'nin inhibisyonu araştırılmıştır (Campbell *et al.* 2014).

Ayrıca farklı konuk organizmalarda HRP'nin üretimi ve saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır.

*Escherichiacoli*'de tek bir adımda iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Ucuz üretimi ve yüksek hücre yoğunluğunu artırmadaki kolaylık bu üretimdeki avantajdır (Smith *et al.* 1990).

Memeli hücrelerinden HRP'nin saflaştırılması, yine tek bir adımda afinite kromatografisi (Greco *et al.* 2000) ile olmuştur. Ancak bunun saflaştırılmasında virüs uzaklaştırma adımı, üretimin maliyetli olması ve üretim işleminin zorluğu (Connell-Crowley *et al.* 2012), verimin düşük olması bu çalışmadaki dezavantajdır (Holland *et al.* 2010).

Mayada ise amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi gibi aşamalarla HRP'nin ekspresyonu incelenmiştir (Morawski *et al.* 2000).

## 2.1. Çalışmanın Amacı

Literatürde yapılan çalışmalarda HRP enzimi üzerine pek çok saflaştırma prosedürü mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda saflaştırma katsayısının veya verimin düşük olduğu görülmektedir. Bu tez kapsamında ise enzimin aktivitesi üzerine ilk kez 3-amino 5-bromo benzohidrazid, 3-amino 4-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid, 3-amino 5-kloro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri çalışıldı ve inhibisyon etkisi gösteren benzohidrazid türevlerinden afinite jeli hazırlanarak peroksidaz enzimi bayır turpundan (Horseradish) saflaştırıldı. Amino benzohidrazid tabanlı yeni ligandların tasarımı ve sentezi ile daha yüksek verimle HRP enziminin saflaştırılması yeni bir yöntem olarak sunuldu. Bu çalışmanın, diğer bitki peroksidaz

enzimlerinin saflaştırılmasında da etkili olabilecek kapasiteye sahip olduğu belirlendi. HRP enziminin tek basamakta saflaştırılması, bu saflaştırmanın da uygun maliyette ve daha az zamanda gerçekleşmesi, ticari bir kullanım potansiyeli sunmuş oldu.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasal Maddeler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Üretici<br>Firma             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, %64 Hidrazinmonohidrat, Sodyum asetat, Tirozin, Sodyum Nitrit, Trihidroksimetilaminometan(Tris), Sodyumtiyosülfat, Glutaraldehit, N,N,N,N'tetrametiletilendiamin(TEMED), Guaiakol, Hidrojen peroksit, Formaldehit, Sodyum klorür, N,N'-metilen bisakrilamid, Standart serum albumin, Coomassie brilliantblue G-250, Etanol, Coomassiebrillantblue R-250, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Akrilamid, Sodyum karbonat, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Metanol, Diklorometan, Etil asetat, Diyaliz torbası | Sigma<br>Chemical<br>Company |
| L-Tirozin, Sodyum azotür, Hidroklorik asit, Sodyum perklorat, Fosforik asit, Gümüş nitrat, Sodyum sülfat, Sülfirik asit, İzoproponal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | E. Merk AG                   |
| Sodyum hidroksit, Triklor asetik asit (TCA), Potasyum fosfat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Riedel de<br>Haen            |
| $\beta$ -merkaptetoetanol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Fluka                        |
| Glisin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | ICN<br>Biomedical<br>s. inc. |
| 3-amino 5-bromo metilbenzoat, 3-amino 4-metil metilbenzoat, 3-amino 5-kloro metilbenzoat, 3-amino4-nitro metilbenzoat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Fluorochem                   |

### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma süresince aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı.

|                                  |                                           |
|----------------------------------|-------------------------------------------|
| Afinite kolonu                   | : Sigma                                   |
| Buzdolapları                     | : Samsung                                 |
| Çalkalayıcı                      | : Midi Dual 14                            |
| Elektroforez tankı               | : Biorad (dikey)                          |
| Derin dondurucu (-85°C'ye kadar) | : Sanyo Ultra Lo                          |
| Derin dondurucu (-20°C'ye kadar) | : 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                 | : Shimadzu UV 1800                        |
| Soğutmalı santrifüj              | : Hermle Z 323 K(Germany)                 |
| Su banyosu                       | : Nüve                                    |
| Ultraturaks                      | : Heidolph Silient Crusher M              |

### **Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler:**

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirme reaksiyonunda kullanılan tampon: 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9): 0,84 g (0,01 mol)  $\text{NaHCO}_3$  80 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 9 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 100 mL'ye tamamlandı.
2. Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 3-amino benzohidrazid ve türevi olan moleküllerin kenetlendirilmesi işleminde kullanılan 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8) tampon çözelti: 0,84 g (0,005 mol)  $\text{NaHCO}_3$  80 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 9.5 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 100 mL'ye tamamlandı.
3. Sepharose-4B-L-Tirozin-3-Amino benzohidrazid (türevleri) afinite jelinin yıkanması işleminde kullanılan 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.8) tampon: 6 g (0,025 mol)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 400 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.8'e kadar titre edildi, toplam hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

### **Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler**

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonlarının dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti: 10 mM  $\text{KH}_2\text{P}_4$  tampon çözeltisi kullanıldı. Bunun için; 950 ml destile suda 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{P}_4$  çözülerek pH 8 oluncaya kadar 1N NaOH ile titre edildi ve son olarak hacim suyla 1 L'ye tamamlandı.
2. Sepharose-4B afinite kolonuna homojenat tatbik edildikten sonra afinite kolonlarının yıkanması işleminde kullanılmak üzere hazırlanan tampon: 25 mM  $\text{KH}_2\text{P}_4$  kullanıldı. Bunun için 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{P}_4$  350 ml suda çözülerek pH 6.8 oluncaya kadar 1N NaOH ile titre edildi ve toplam hacim suyla 400 ml'ye tamamlandı.
3. Afinite kolonundan HRP enzimini elüe etmede kullanılan tampon: 1 M NaCl/25mM içeren  $\text{KH}_2\text{P}_4$  kullanıldı. 11,7 g NaCl 150 ml suda çözüldü ve 06805 g  $\text{KH}_2\text{P}_4$  çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. Daha sonra pH 6.8 olacak şekilde 1N NaOH ile titre edildi ve toplam hacim suyla 200 ml'ye tamamlandı.

### **Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler**

Horseradish bitkisinin sıvı azot ile parçalamasından sonra bitki dokularının içine alındığı 0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0) tamponu kullanıldı. Bunun için; 16,33 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 350 mL saf suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH 7.0 olacak şekilde ayarlandı ve son hacim saf suyla 400 mL'ye tamamlanarak tampon çözelti hazırlandı.

### **Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan çözelti**

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi kullanılarak proteinlerin kantitatif tayini yapıldı. %95'lik etanolden 100 mL alınarak içerisinde 200 mg Coomassie brilliant blue G-250 çözüldü, bu çözeltiye %95'lik fosforik asitten 200 mL eklendi ve çözeltinin toplam hacmi 2 L'ye tamamlandı, karanlık ortamda muhafaza edildi.

### **Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler**

- 1.HRP enziminin aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon çözelti: 0,1 M'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ten 2,72 g 150 mL suda çözülüp pH 6.0 olacak şekilde 1 N NaOH ile titre edildi, daha sonra son hacim saf suyla 200 mL'ye tamamlandı.
- 2.Guaiakol substrat çözeltisi (45 mM): 996  $\mu\text{L}$  guaiakol alınıp hacim 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. $\text{H}_2\text{O}_2$  substrat çözeltisi (22,5 mM): %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den (d:1/11 g/ml) 228  $\mu\text{L}$  alınarak suyla 100 mL'ye tamamlandı.

### **Elektroforezde kullanılan çözeltiler**

1. Numune tamponu: 1,95 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 3 mL %100'lük gliserin, 3 mL 0,1'lik brom timol mavisi ve 9 mL %10'luk SDS karıştırıldı. Son hacim saf su ile 30 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce bu tampona, 1000  $\mu\text{L}$  numune tamponunda 50  $\mu\text{L}$  olacak şekilde  $\beta$ -merkaptoetanol eklendi.

2. 1 M (pH 6.8) Tris-HCl tamponu: 36,34 g (0,2 mol) Tris, 240 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlanıp, son hacim 300 mL'ye tamamlandı.
3. 1 M (pH 8.8) Tris-HCl tamponu: 36,34 g (0,2 mol) Tris, 240 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 8.8'e ayarlanıp, son hacim 300 mL'ye tamamlandı.
4. SDS (%10): 9 ml saf suda 1 g SDS çözüldü.
5. Amonyum persülfat çözeltisi (%10): 1 g amonyum persülfat alınarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid: 15 g akrilamid ile 0,4 g bisakrilamid tartılarak 34,6 ml saf suda çözüldü.
7. Yürütme tamponu: 4,5 g Tris ve 14,4 g glisin, 300 mL suda çözüldü. Üzerine %10'lik SDS'den 15 mL ilave edilip toplam hacim saf suyla 1500 mL'ye tamamlandı.

**Çizelge 3.1.** Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

|   |                      |                                                                                                                                                                                                                                                |
|---|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Tespit çözeltisi     | 120 mL su, %96'lık 60 mL etanol ve 20 mL asetik asitten hazırlandı.                                                                                                                                                                            |
| 2 | Redüksiyon çözeltisi | 45 mL etanol ve 80 mL saf su karıştırıldı. İçerisinde 4,8 g sodyum asetat çözüldü. Asetik asitle pH 6 olacak şekilde titre edildi. 3 mL glutaraldehit ve 150 mg sodyum tiyosülfat eklendikten sonra son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı. |
| 3 | Boyama çözeltisi     | 100 mL saf suda 100 mg gümüş nitrat çözüldü ve üzerine 30 µl formaldehit eklendi.                                                                                                                                                              |
| 4 | Yıkama Çözeltisi 1   | 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf suda çözüldü ve üzerine 120 µl formaldehit eklendi.                                                                                                                                                         |
| 5 | Yıkama çözeltisi 2   | 2mL gliserin ve %5'lik asetik asitin 500 mL'si karıştırılarak hazırlandı.                                                                                                                                                                      |

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Protein tayini

#### 3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip fenilalanin, tirozin ve triptofan amino asitleri 280 nm'deki UV ışınlarını absorblar. Bu esasa dayanarak kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı (Segel 1968).

Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlar kuvarz küvetlere konuldu. Proteinin içinde bulunduğu tamponun köre karşı absorbanları, spektrofotometrede ölçüldü.

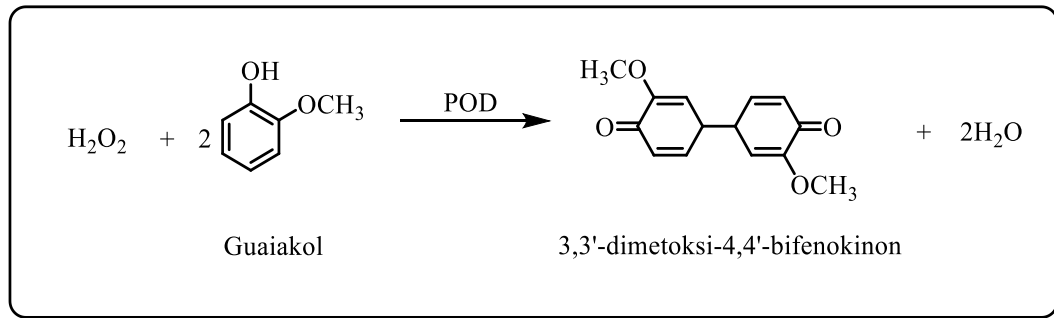
#### 3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Horseradish bitkisinden elde edilen homajenattaki ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları, Bradford metodu kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde fosforik asitli ortamda pozitif yüklü proteinler, negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturur. Boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, iki farklı  $\lambda_{max}$  değerine sahiptir.  $\lambda_{max}=465$  nm (kırmızı) ve  $\lambda_{max}=595$  nm (mavi). Proteinin bağlanması ile boyanın  $\lambda_{max}$  değeri 465 nm'den 595 nm'ye kayar ve kırmızı, mavi forma dönüşür. Kompleks oluşumu iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein bulunan standart Bovin Serum Albümin (BSA) çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu$ L konuldu. Bütün tüplerin hacmi saf su ile 0,1 mL'ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 3 mL'lik küvetlerde içinde protein numunesinin olmadığı köre karşı, 0,1 mL protein çözeltisi ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden oluşan karışımların bulunduğu numunelerin 595

nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Daha sonra örneklerin total protein miktarları bu çalışmada oluşturulan standart eğri grafiği kullanılarak belirlendi. Saflaştırmanın her aşamasında 3 ayrı tüpe sırasıyla 100, 250, 500 µL alınan enzim numunelerinin üzerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5’er mL renklendirme reaktifi eklenerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometrede 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Bu işlemin 3 kez tekrarlanmasıyla elde edilen sonuçların aritmetik ortalaması alındı ve standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford and Williams 1976).

### 3.2.2. HRP aktivitesi tayini

Guaiakol kromojenik substratın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm’de izlenmesi esasına dayanarak HRP enziminin aktivitesi belirlendi (Şekil 3.1) (Şişecioğlu *et al.* 2010).



**Şekil 3.1.**Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

Enzim çözeltisinin ilavesiyle reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika süresince oda sıcaklığında spektrofotometrede 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak 470 nm’de absorbans artışı ölçüldü.

HRP enziminin aktivitesini tayin etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)

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

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

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

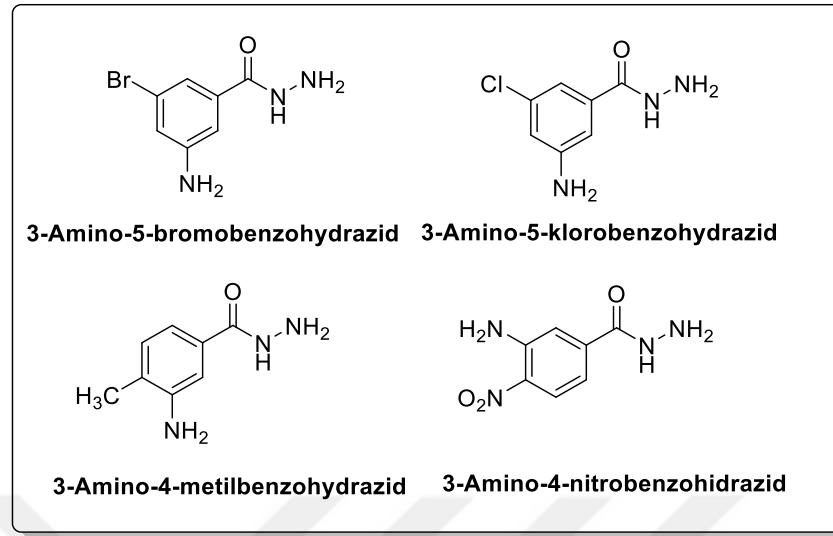
$D_f$  = Seyreltme katsayısı

Guaiakolün substrat olarak kullanıldığı enzim saflaştırma işlemlerinde, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi  $20^\circ\text{C}$ 'de 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  guaiakol'ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### 3.3. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

#### 3.3.1. HRP saflaştırmada kullanılan ligand moleküller

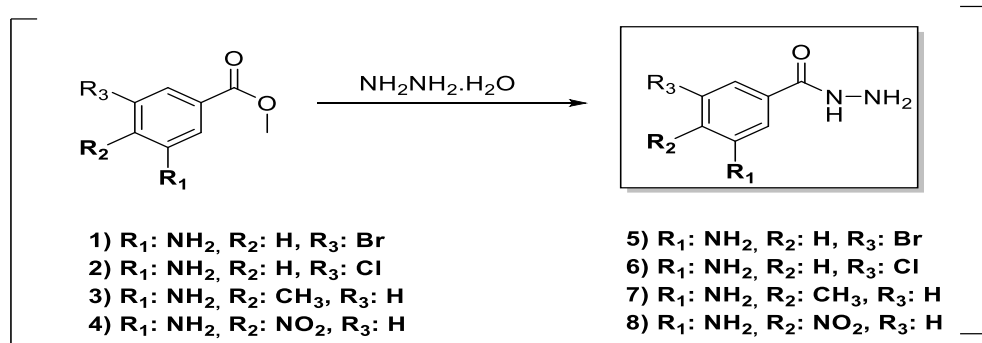
Horseradish bitkisinden peroksidaz enzimini yüksek verimle saflaştırmak için 3-amino 5-kloro metilbenzoat, 3-amino 5-bromo metilbenzoat, 3-amino 4-metil metilbenzoat, 3-amino 4-nitro metilbenzoat maddeleri satın alındı ve tarafımızca bu dört molekülün hidrazin formları sentezlendi. Bu moleküllerin ligand olarak kullanılabilirliği incelendi. İnhibisyon çalışmaları yapıldı. Aromatik amin bulunduran sentezlenen bu moleküller diazonyum tuzu oluşturabilirler. Dolayısıyla bu moleküller HRP'nin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında önem arz etmektedir.



Şekil 3.2. HRP inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller

### 3.3.2. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezleri (Hiroshiet *al.* 2012) yönteminde belirtildiği üzere yapılmıştır. Bu kapsamda 3-Amino metil benzoatlar (**1, 2, 3, 4**) (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve çözücünün uzaklaştırılması için reaksiyon tamamlanincaya kadar geri soğutucu altında ısıtıldı (Reaksiyon TLC ile takip edildi). Etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı ve oluşan beyaz kristaller süzgeç kağıdı ile ayrıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Böylece 3-Amino benzohidrazid türevi olan 4 molekül (**5, 6, 7, 8**) sentezlenmiş oldu (Şekil 3.3).  $^1\text{H-NMR}$  ile karakterizasyonları doğrulandı.



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

### 3.3.3. İnhibitör çalışmaları

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

Literatürde önceden sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-4-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan HRP enzimi üzerine çalışılması planlanan sentezlediğimiz 3-amino 5-bromo benzohidrazid(5), 3-amino 5-kloro benzohidrazid(6), 3-amino 4-metil benzohidrazid(7), 3-amino 4-nitro benzohidrazid(8) inhibitörlerinin  $IC_{50}$  değerlerinin 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.

#### 3.3.4. Afinite jelinin hazırlanması

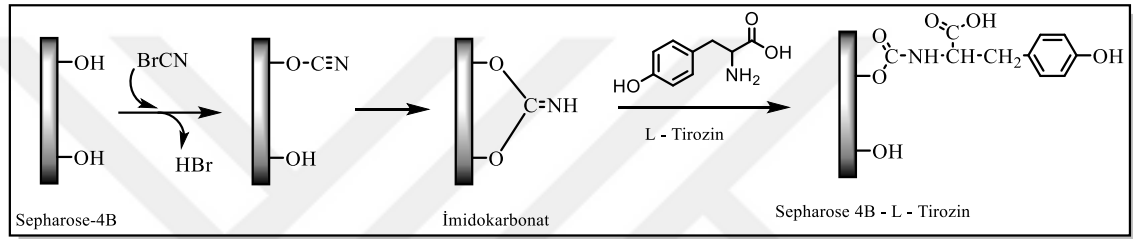
Matriks olarak CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanıldı. L-Tirozin uzantı kolu bu kolon materyaline kovalent olarak takılarak Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline diazolananan ve enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturan 3-amino 5-bromo benzohidrazid, 3-amino 5-kloro benzohidrazid, 3-amino 4-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid ligant molekülleri kenetlendirildi. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

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

200 mL soğuk su ile yıkanan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, bir miktar da 0,1 M  $NaHCO_3$  tamponu (pH 10) ile yıkandı ve yine aynı tampon çözelti ile bir behere alındı. Kullandığımız aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti

behere ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Manyetik karıştırıcıda, 4°C’de 2 saat süreyle karıştırıldı. 4°C’de 16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda reaksiyona girmeyen tirozinin tamamen uzaklaştırılması için jel, yıkama suyu 280 nm’de absorbanans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.8) tamponu ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL’si içine alındı (Arslan vd. 1996).

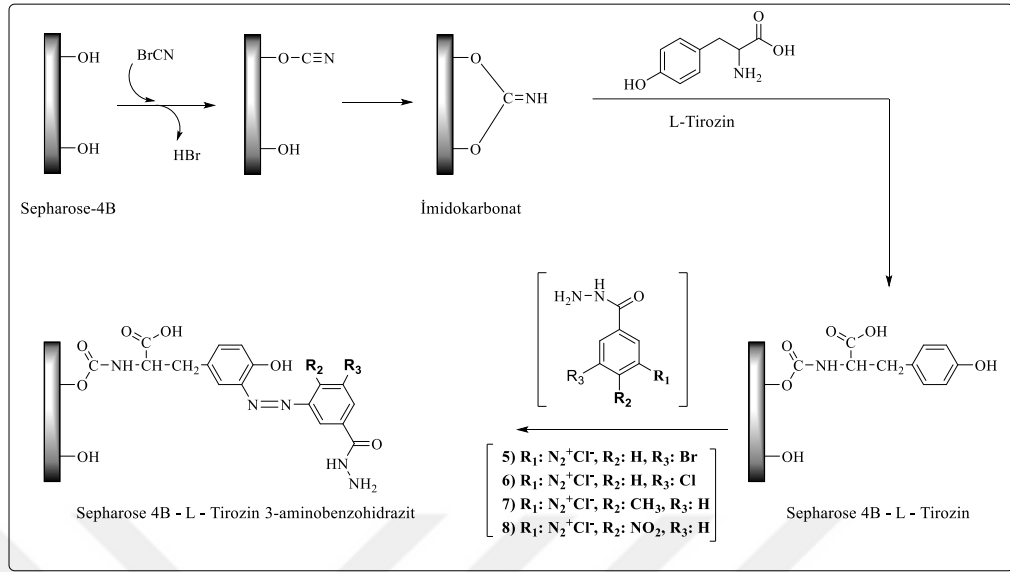
Reaksiyon mekanizması Şekil 3.4’te verilmiştir.



**Şekil 3.4.** CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B’ye tirozin takılması reaksiyonu

### 3.3.4.b. 3-aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi

0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içerisine 3-Amino benzohidrazid türevi olan 4 molekülün (Şekil 3.2) her birinden 100’er µmol alınarak çözüldü ve hazırlanan bu inhibitör çözeltisine, içerisinde 20mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0°C’deki 5 mL çözelti damla damla eklendi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH.5’a çıkarılarak ve sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 100 mL, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).



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

### 3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

Hazırlanan jel, pH 6.8 olan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dengeleme tamponu içine alınarak süspansiyon edildi. Su trombu kullanılarak sistemin havası alındı. Süspansiyon edilen jel, (1x10) cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Daha sonra kolonda çöken jel peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu kullanılarak yıkandı. Kolonun dengelenip dengelenmediği, 280 nm'de tampon ve eluatın absorbanslarının eşitlenmesinden anlaşıldı.

#### 3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Horseradish bitkisinden elde edilen homojenatlar, dengelenmiş olan kolonlara tatbik edildi. Kolonlar 400 ml 25 mM fosfat (pH .8) yıkama çözeltisi ile yıkanarak HRP enziminin kolona tutunması ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. HRP enzimini kolondan elüe etmek için 1 M  $\text{NaCl}/25 \text{ mM } \text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.8) tamponu tatbik edildi. Elüatlar 2'şer mL halinde tüplere alınarak 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompa vasıtasıyla 20 mL/saat'e ayarlandı. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alınarak her bir elüatın 280 nm'deki absorban değeri köre karşı

ölçüldü. Toplanmış olan elüatlardan absorbans gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 470 nm'de HRP aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

### 3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi

Çalışılan her bir afinite kolonundan saflaştırılan HRP enzimi diyaliz edildi. Daha sonra %3-8 kesikli, sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrophorezi (SDS-PAGE) ile standart olarak molekül ağırlığı belirlenmiş olan proteinler kullanılarak saflaştırılan enzimin saflık derecesi ve molekül ağırlığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektrophorez cam plakaları önce saf su, daha sonra alkol ile iyice yıkanır. İki cam plaka üst üste konularak kışkaçlarla tutturulur ve jel hazırlama cihazına konulur.

**Ayrırma jeli:** 15 ml 1M Tris-HCl pH 8.8 (ayırma jeli tamponu); 13,2 ml %30 akrilamid + %0,8 metilenbisakrilamid; 0,4 ml %10 SDS; 0,4 ml %5 TEMED ve 9,4 ml saf su karıştırılır, son olarak üzerine taze hazırlanmış 0,8 ml %1,5 amonyum persülfat  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (PER) ilave edilir. Hazırlanan çözelti plakalar arasına üst kısımda 0,5 cm kalıncaya kadar döküldü. Hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşınca kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Ayrırma jeli katılaştıktan sonra üstündeki %0,1 SDS çözeltisi döküldü.

**Yığılma jeli:** 1,24 ml 1M Tris-HCl pH6.8 (yığılma jeli tamponu); 1 ml %30 akrilamid + %0,8 metilenbisakrilamid; 0,1 ml %10 SDS; 0,1 ml %5 TEMED ve 7,36 ml saf su karıştırılır, son olarak üzerine taze hazırlanmış 0,2 ml %1,5 amonyum persülfat  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (PER) ilave edilir. Hazırlanan çözelti üst yüzeye kadar enjektörle döküldü. Tarak dikkatlice yerleştirildi. Jel kuruduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrophorez tankına yerleştirildi.

Elektroforez tankına yürütme tamponu konuldu, 20 µg numuneye toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi, 3 dakika kaynar su banyosunda denatüre edildi. Daha sonra numune çözeltileri soğutularak oyuklara dikkatli bir şekilde ince bir enjektörle uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafı anod (+), üst tarafı katod (-) olacak şekilde bağlantı kuruldu. Önce 80 voltta yarım saat daha sonra 120 voltta 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Elektroforez sonunda cam plaklardan çıkarılan jel, tespit çözeltilisiyle 30 dakika karıştırıcıda yıkandı. Daha sonra redüksiyon çözeltilisiyle 30 dakikada karıştırıcıda bekletildi. Daha sonra jel üç defa saf su ile yıkandı. Ardından gümüş nitrat çözeltilisiyle 20 dakika karıştırıcı üstünde boyandı. (Hazırlanan boya kullanılmadan kısa bir süre önce hazırlanarak karanlıkta muhafaza edildi). Boyamadan sonra jel, 5'er dakika üç kez suyla yıkandı ve siyahlaşan sıvı döküldü. Bantların gözlenmesi için karıştırıcının üstünde jel, 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su ve 120 µL formaldehitten oluşan çözelti ile iyice yıkandı.

### 3.5. $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

5 farklı substrat konsantrasyonunda Guaiakol kullanılarak optimum sıcaklık, optimum pH değerinde ve spektrofometrede 470 nm'de Horseradish POD enzimi için absorbans değerleri ölçülerek aktivite değerleri belirlendi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edildi.  $1/V_{ve}$   $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. Grafik ve doğru denklemleri yardımıyla  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı, sonuçlar tablo ve grafik olarak gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

### 3.6. Afinite Kolonunun HRP Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

HRP enzimi saflaştırma sonuçlarına göre kullanılma potansiyeli en yüksek olan afinite kolonunun enzimi bağlama kapasitesi üzerine pH, sıcaklık ve iyonik şiddet etkileri

incelendi. Kolonun kapasite tayin işlemi için: (1x10) cm'lik bir kolona, hazırlanan jelden 1 mL alınarak konuldu ve dengeleme tamponuyla dengelendi. Daha önceden saflaştırılan HRP enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra uygun elüsyon tamponuyla bağlanmış olan HRP enzimi elüe edildi ve protein miktarı belirlendi. Kolondaki jel kurutularak tartıldı ve (mg protein/gram-jel) cinsinden HRP enzimi üzerine tutma kapasitesi belirlendi.

### **3.6.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi**

Hazırlanan kolonlardan HRP enziminin saflaştırılmasında kolonun enzimi bağlama kapasitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla pH'sı 5-9,5 aralığında (5,5, 6, 6,8, 7, 7,5, 8, 8,5, 9) hazırlanan tamponlar kullanıldı ve en uygun pH için sonuçlar (mg protein /g jel) olarak grafik edildi.

### **3.6.2. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi**

HRP enzimi için iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında sonuçlar, (mg protein /g jel)olarak grafikte gösterildi.

### **3.6.3. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi**

HRP enziminin saflaştırılmasında hazırlanan kolonlarda kolon kapasitesine üzerine sıcaklığın etkisini tespit etmek amacı ile pH 6,8'de sıcaklığı 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de tutma kapasitesi belirlendi ve (mg protein /g jel) şeklinde grafik edildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

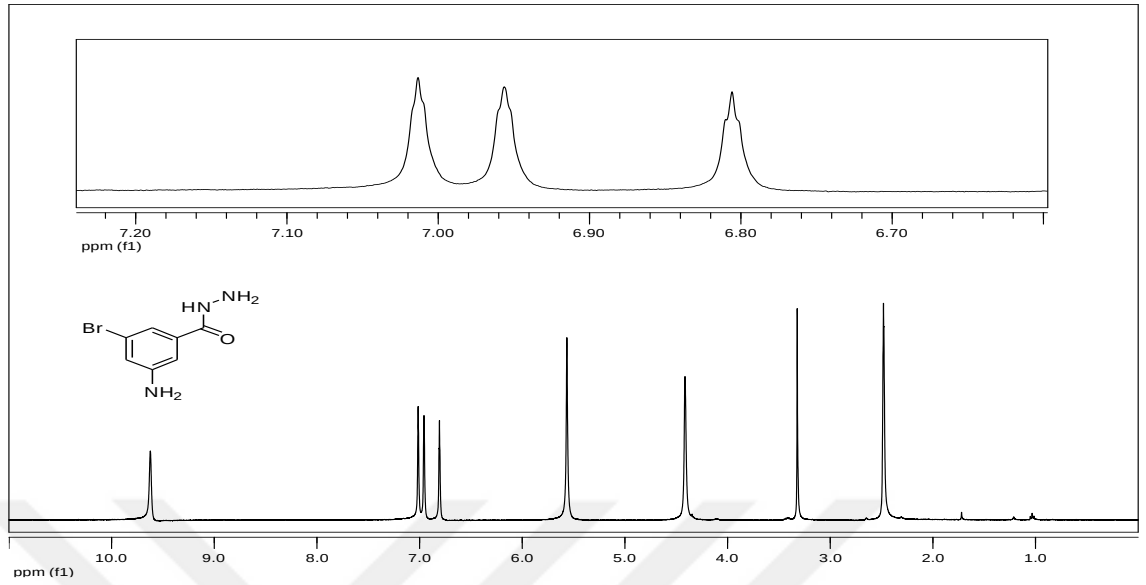
### 4.1. 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi

3-amino 5-bromo benzohidrazid, 3-amino 5-kloro benzohidrazid, 3-amino 4-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid moleküllerinin metil esterleri satın alındı ve bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hidrazin sentezleri yapıldı.

**Çizelge 4.1.** 3-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları

| Reaktant 1                        | Reaktant 2          | R <sub>1</sub> /R <sub>2</sub> mmol | Ürün                              | Süre    | % Verim |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|
| 3-amino 5-bromo metil benzoat (1) | Hidrazin monohidrat | 3/12                                | 3-amino 5-bromo benzohidrazid (5) | 12 saat | 76      |
| 3-amino 5-kloro metil benzoat (2) | Hidrazin monohidrat | 3/12                                | 3-amino 5-kloro benzohidrazid (6) | 12 saat | 68      |
| 3-amino 4-metil metil benzoat (3) | Hidrazin monohidrat | 3/12                                | 3-amino 4-metil benzohidrazid (7) | 18 saat | 62      |
| 3-amino 4-nitro metil benzoat (4) | Hidrazin monohidrat | 3/12                                | 3-amino 4-nitro benzohidrazid (8) | 12 saat | 73      |

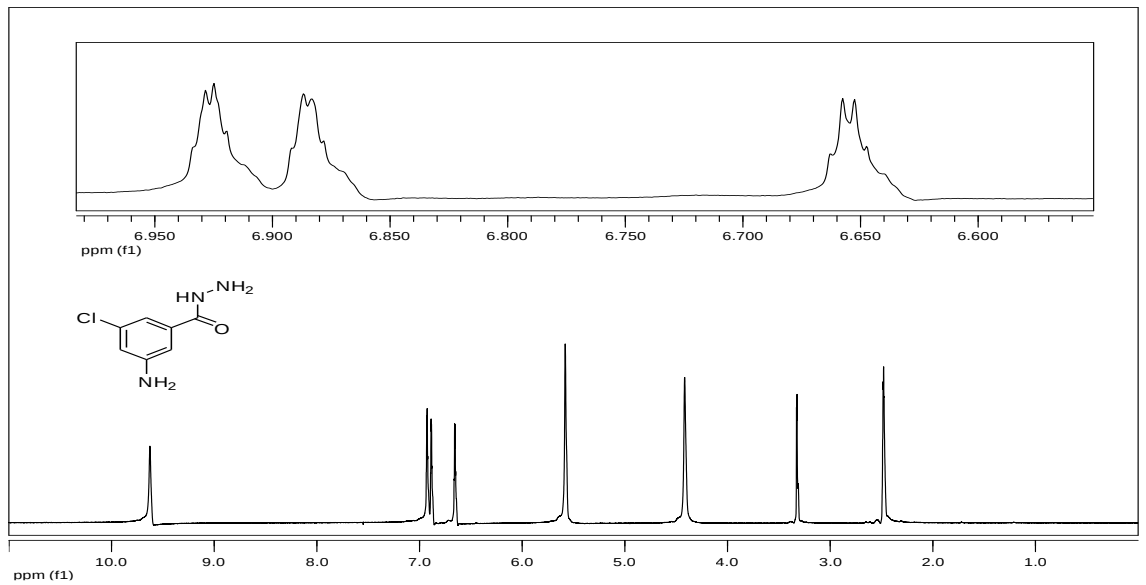
Sentezlenen moleküllerin karakterizasyonu <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz)’la doğrulandı. Sentezlenen her bir molekül için; 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4’de gösterildiği gibidir.



**Şekil 4.1.** 3-Amino 5-bromo benzohidrazid (5) molekülünün 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

### 3-Amino 5-bromo benzohidrazid (5) molekülü için NMR sonuçları:

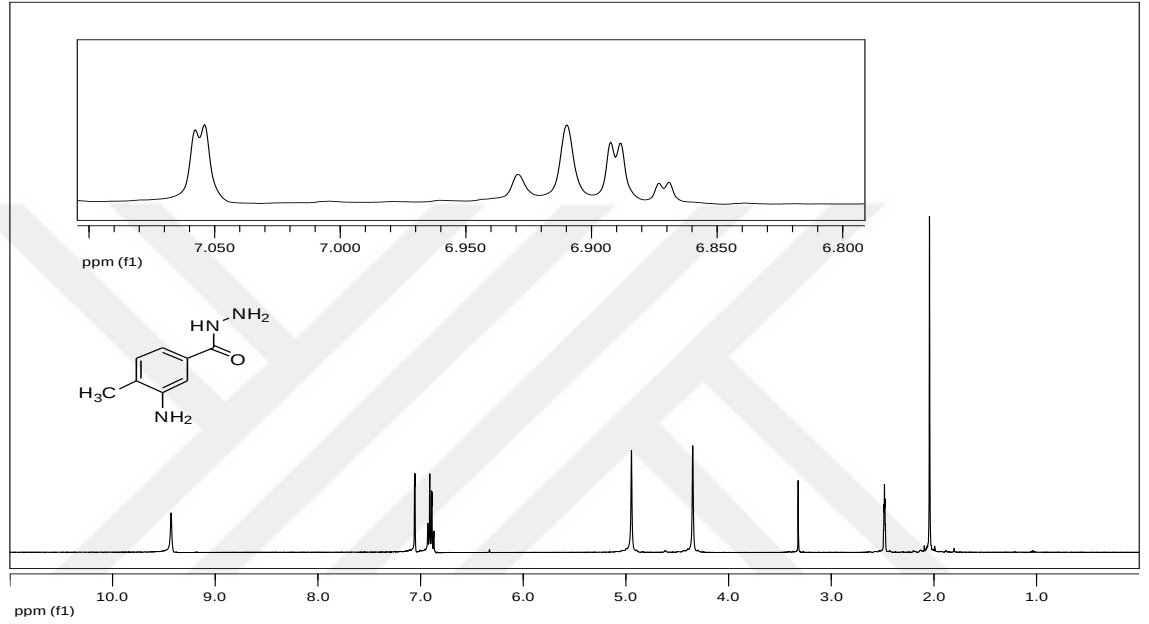
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , ppm): 9.62 (bs, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.56 (bs, 2H), 4.41 (bs, 2H)



**Şekil 4.2.** 3-Amino 5-kloro benzohidrazid (6) molekülünün 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

**3-Amino 5-kloro benzohidrazid (6) molekülü için NMR sonuçları:**

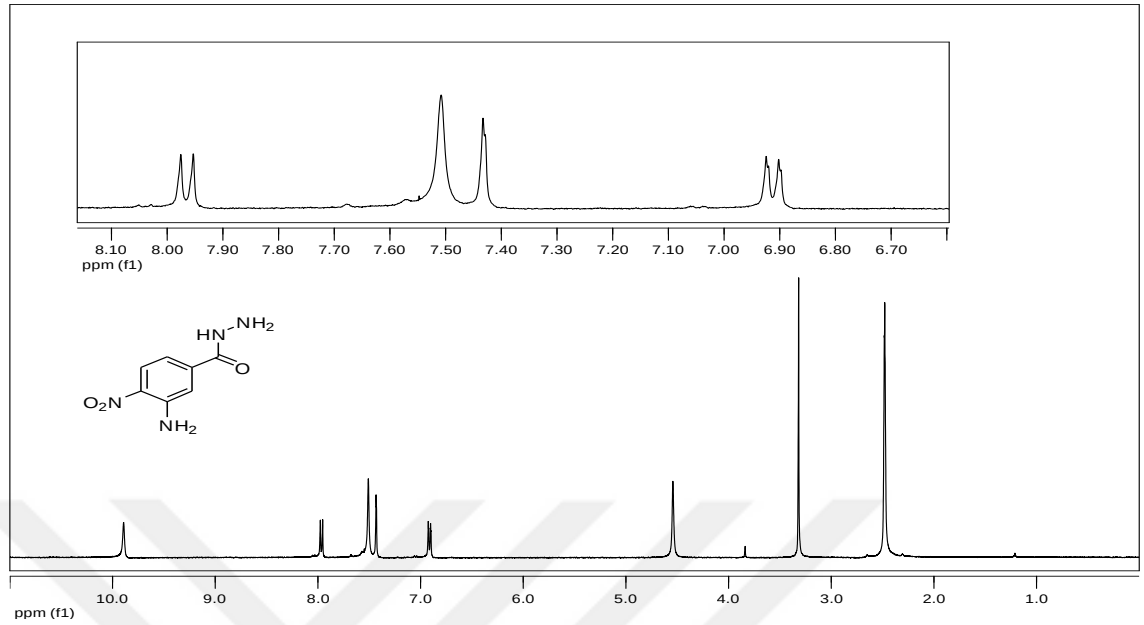
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , ppm): 9.63 (bs, 1H), 6.93 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 5.58 (bs, 2H), 4.42 (bs, 2H)



**Şekil 4.3.** 3-Amino 4-metil benzohidrazid (7) molekülünün 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

**3-Amino 4-metil benzohidrazid (7) molekülü için NMR sonuçları:**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , ppm): 9.43 (bs, 1H), 7.06 (d,  $J = 1.47$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 7.76$  Hz, 1H), 6.88 (dd,  $J = 7.70, 1.58$  Hz, 1H), 4.95 (bs, 2H), 4.35 (bs, 2H), 2.04 (bs, 3H)



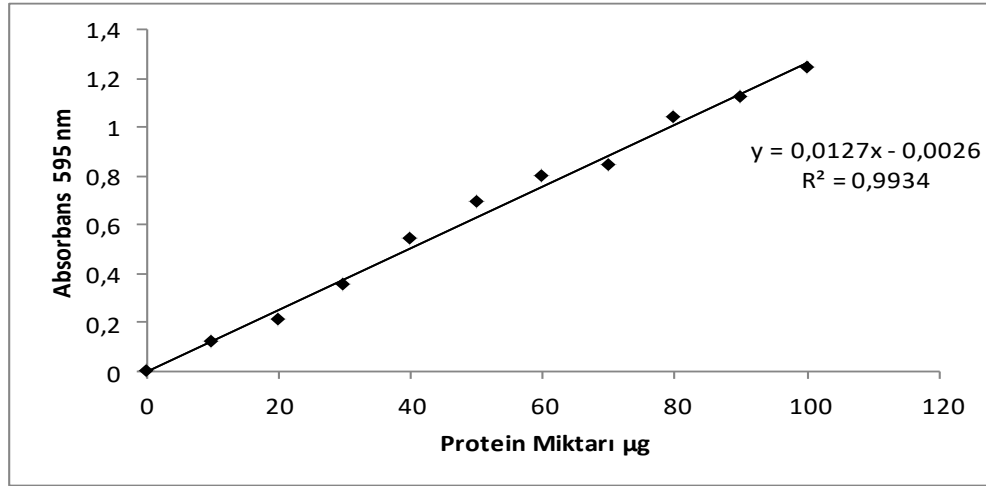
**Şekil 4.4.** 3-Amino 4-nitro benzohidrazid (8) molekülünün 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

#### 3-Amino 4-nitro benzohidrazid (8) molekülü için NMR sonuçları:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 9.89 (bs, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.51 (bs, 2H), 7.43 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.54 (bs, 2H)

#### 4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemi kullanılarak bayır turpu bitkisinden hazırlanan homejenatlar ve afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Bayır turpu bitkisinin homejenatları ve afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.5’de gösterildi.



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

\*Protein miktarı (BSA: Bovine Serum Albumini)

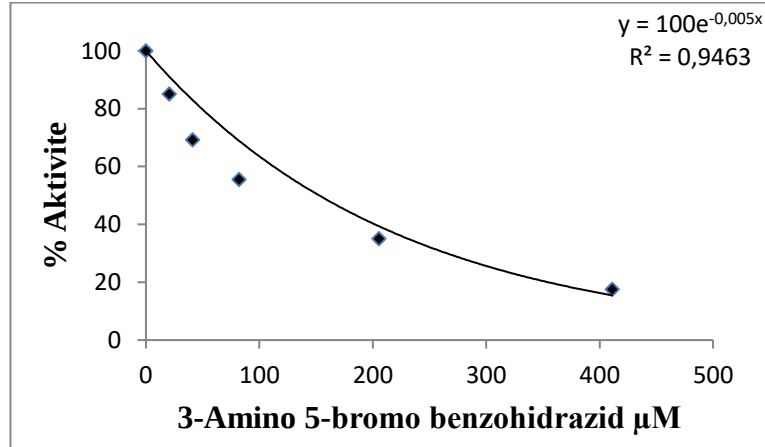
#### 4.3. Sentezlenen 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin $K_i$ ve $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Yapılan bu çalışmada 3-amino benzohidrazid türevi 3-amino 5-bromo benzohidrazid, 3-amino 5-kloro benzohidrazid, 3-amino 4-metil benzohidrazid, 3-amino 4-nitro benzohidrazid moleküllerinin HRP 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 tipi belirlendi.

#### 4.3.1. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.2.** 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

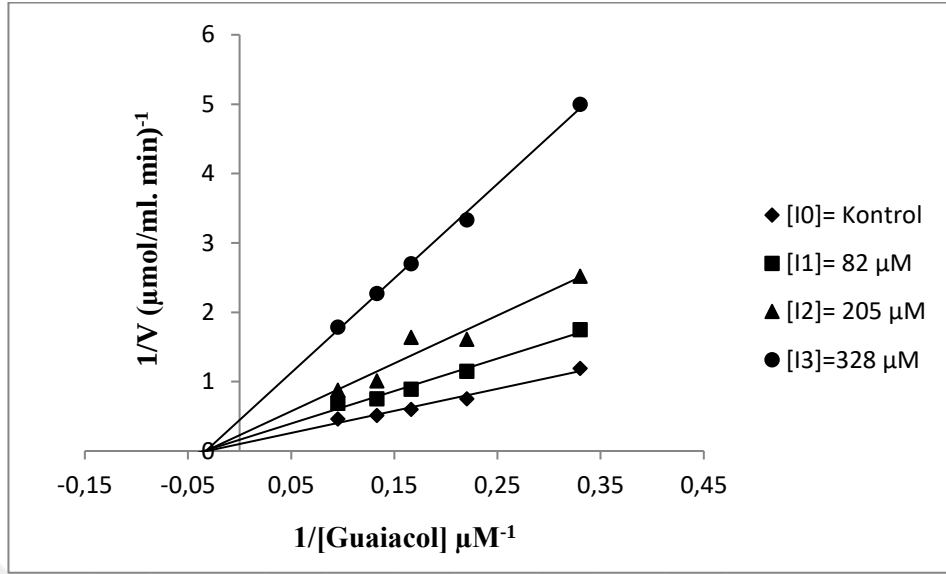
| Kör Tüpü                      |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü  |                  |                                    |                |         |         | [I] mM | %Aktivite |
|-------------------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|--------------|------------------|------------------------------------|----------------|---------|---------|--------|-----------|
| İnhibitör                     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiakol(mL) | Fosfat Tamp (mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | POD(mL) | Su (mL) |        |           |
| 3-Amino 5-bromo benzohidrazid | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,005          | 0,495   | 0,5          | 1,0              | 1,0                                | 0,005          | 0,02    | 0,475   | 0,02   | 85        |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,01           | 0,490   | 0,5          | 1,0              | 1,0                                | 0,01           | 0,02    | 0,470   | 0,04   | 69,25     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,480   | 0,5          | 1,0              | 1,0                                | 0,02           | 0,02    | 0,460   | 0,08   | 55,5      |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,450   | 0,5          | 1,0              | 1,0                                | 0,05           | 0,02    | 0,430   | 0,2    | 35        |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,1            | 0,400   | 0,5          | 1,0              | 1,0                                | 0,1            | 0,02    | 0,380   | 0,41   | 17,5      |



**Şekil 4.6.** HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromobenzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

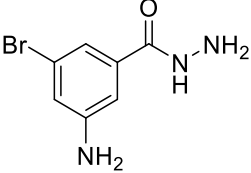
**Çizelge 4.3.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için  $1/V$ ,  $1/[S]$  değerleri ve deney prosedürü

| Kör Tüpü         |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü   |                  |                                    |                 |         |          |                                                          |                        |
|------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------------|------------------|------------------------------------|-----------------|---------|----------|----------------------------------------------------------|------------------------|
| Inhibitör no     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | Inhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp (mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | Inhibi-tör (mL) | Su (mL) | POD (mL) | $1/V$ ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ | $1/S$ mM <sup>-1</sup> |
| [I] <sub>0</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,8     | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,78    | 0,02     | 1,19                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,7     | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,68    | 0,02     | 0,75                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,6     | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,58    | 0,02     | 0,6                                                      | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,5     | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,48    | 0,02     | 0,51                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,4     | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,38    | 0,02     | 0,46                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>1</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,78    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,76    | 0,02     | 1,75                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,68    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,66    | 0,02     | 1,15                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,58    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,56    | 0,02     | 0,892                                                    | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,48    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,46    | 0,02     | 0,75                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,38    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,36    | 0,02     | 0,689                                                    | 0,095                  |
| [I] <sub>2</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,75    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,05            | 0,73    | 0,02     | 2,521                                                    | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,65    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,05            | 0,63    | 0,02     | 1,61                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,55    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,05            | 0,53    | 0,02     | 1,639                                                    | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,45    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,05            | 0,43    | 0,02     | 1,01                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,35    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,05            | 0,33    | 0,02     | 0,877                                                    | 0,095                  |
| [I] <sub>3</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,08           | 0,72    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,08            | 0,70    | 0,02     | 4,999                                                    | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,08           | 0,62    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,08            | 0,60    | 0,02     | 3,33                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,08           | 0,52    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,08            | 0,50    | 0,02     | 2,702                                                    | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,08           | 0,42    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,08            | 0,40    | 0,02     | 2,27                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,08           | 0,32    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,08            | 0,30    | 0,02     | 1,785                                                    | 0,095                  |



**Şekil 4.7.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

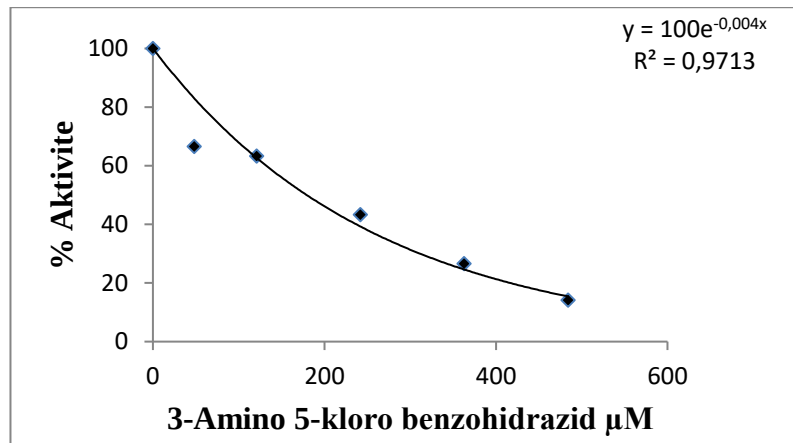
**Çizelge 4.4.** HRP enzimini üzerine 3-Amino 5-bromo benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

|                                                                                                                      |     |                          |                                 |                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| <br>3-Amino 5-bromo benzohidrazid | HRP | IC <sub>50</sub><br>(μM) | Ortalama K <sub>i</sub><br>(μM) | İnhibisyon<br>tipi |
|                                                                                                                      |     | 138,6                    | 131,667±33,71                   | Yarışmasız         |

#### 4.3.2. 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.5.** 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

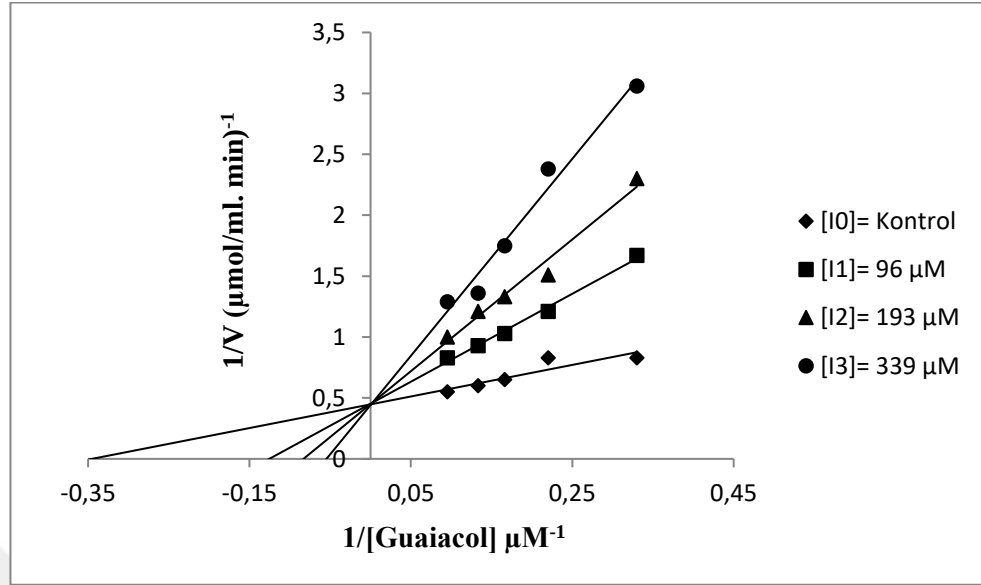
| Kör Tüpü                     |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü |                 |                                    |                |         |         |        |           |
|------------------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|-------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------|--------|-----------|
| İnhibitör                    | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiako(mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | POD(mL) | Su (mL) | [I] mM | %Aktivite |
| 3-Amino 5-klorobenzohidrazid | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,01           | 0,490   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,01           | 0,02    | 0,470   | 0,17   | 66,6      |
|                              | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,025          | 0,475   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,025          | 0,02    | 0,455   | 0,424  | 63,3      |
|                              | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,450   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,02    | 0,430   | 0,530  | 43,3      |
|                              | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,75           | 0,425   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,75           | 0,02    | 0,405   | 0,636  | 26,6      |
|                              | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,400   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,02    | 0,380   | 0,706  | 14,1      |



**Şekil 4.8.** HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-kloro benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

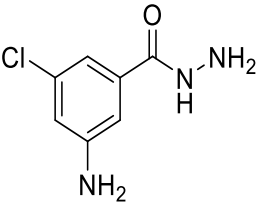
**Çizelge 4.6.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olara 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için  $1/V$ ,  $1/[S]$  değerleri ve deney prosedürü

| Kör Tüpü         |               |                 |                                    |                |         | umune Tüpü    |                  |                                    |                 |         |          |                                                          |                        |
|------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------------|------------------|------------------------------------|-----------------|---------|----------|----------------------------------------------------------|------------------------|
| İnhibitör no     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp (mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibi-tör (mL) | Su (mL) | POD (mL) | $1/V$ ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ | $1/S$ $\text{mM}^{-1}$ |
| [I] <sub>0</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,80    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,780   | 0,02     | 0,83                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,70    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,680   | 0,02     | 0,83                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,60    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,580   | 0,02     | 0,65                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,50    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,480   | 0,02     | 0,6                                                      | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,40    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,380   | 0,02     | 0,55                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>1</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,60    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,760   | 0,02     | 1,67                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,50    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,660   | 0,02     | 1,21                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,40    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,560   | 0,02     | 1,03                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,30    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,460   | 0,02     | 0,93                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,02           | 0,20    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,02            | 0,360   | 0,02     | 0,83                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>2</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,04           | 0,760   | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,04            | 0,740   | 0,02     | 2,3                                                      | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,04           | 0,660   | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,04            | 0,640   | 0,02     | 1,51                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,04           | 0,560   | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,04            | 0,540   | 0,02     | 1,33                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,04           | 0,460   | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,04            | 0,440   | 0,02     | 1,21                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,04           | 0,360   | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,04            | 0,340   | 0,02     | 1                                                        | 0,095                  |
| [I] <sub>3</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,730   | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,07            | 0,710   | 0,02     | 3,06                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,630   | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,07            | 0,610   | 0,02     | 2,38                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,530   | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,07            | 0,510   | 0,02     | 1,75                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,430   | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,07            | 0,410   | 0,02     | 1,36                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,330   | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,07            | 0,310   | 0,02     | 1,29                                                     | 0,095                  |



**Şekil 4.9.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

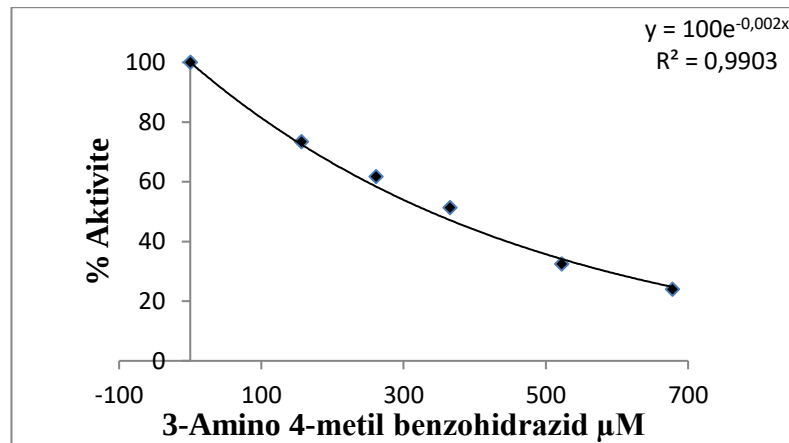
**Çizelge 4.7.** HRP enzimi üzerine 3-Amino 5-kloro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

|                                                                                                                          |     |                                |                                     |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
|  <p>3-Amino 5-kloro benzohidrazid</p> | HRP | $IC_{50}$<br>( $\mu\text{M}$ ) | Ortalama $K_i$<br>( $\mu\text{M}$ ) | İnhibisyon<br>tipi |
|                                                                                                                          |     | 173,25                         | 58,667 $\pm$ 4,163                  | Yarışmalı          |

#### 4.3.3. 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

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

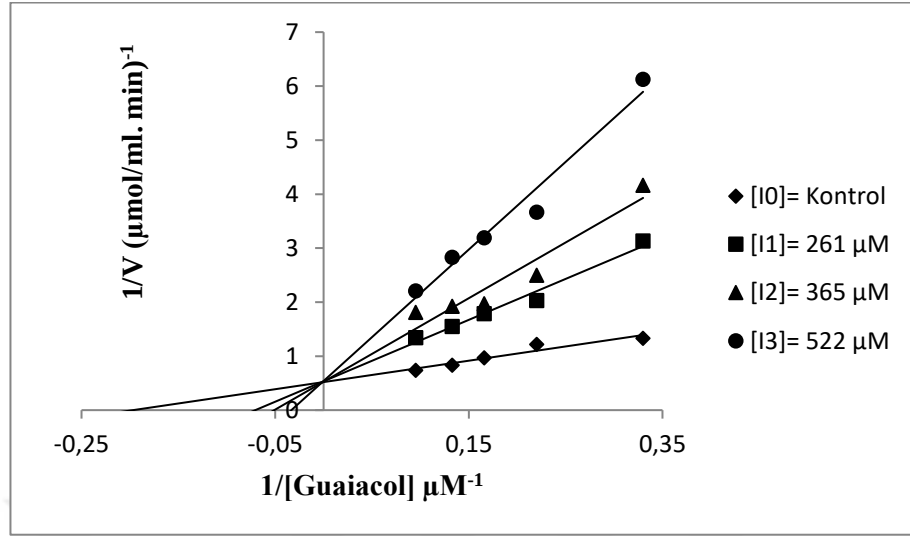
| Kör Tüpü                      |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü |                 |                                    |                |         |         | [I] mM | %Aktivite |
|-------------------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|-------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------|--------|-----------|
| İnhibitör                     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiako(mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | POD(mL) | Su (mL) |        |           |
| 3-Amino 4-metil benzohidrazid | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,03           | 0,470   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,03           | 0,03    | 0,440   | 0,16   | 73,37     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,450   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,03    | 0,420   | 0,32   | 61,68     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,430   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,03    | 0,400   | 0,40   | 51,29     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,400   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,03    | 0,370   | 0,48   | 32,46     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,130          | 0,370   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,130          | 0,03    | 0,340   | 0,64   | 24,02     |



**Şekil 4.10.** HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-metil benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

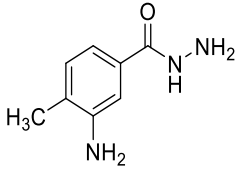
**Çizelge 4.9.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-metil bezohidrazid inhibitörü için  $1/V$ ,  $1/[S]$  değerleri ve deney prosedürü

| Kör Tüpü         |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü   |                  |                                    |                |         |          |                                                          |                        |
|------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------------|------------------|------------------------------------|----------------|---------|----------|----------------------------------------------------------|------------------------|
| İnhibitör no     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp (mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | POD (mL) | $1/V$ ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ | $1/S$ mM <sup>-1</sup> |
| [I] <sub>0</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,8     | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | -              | 0,770   | 0,03     | 1,33                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,7     | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | -              | 0,670   | 0,03     | 1,22                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,6     | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | -              | 0,570   | 0,03     | 0,97                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,5     | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | -              | 0,470   | 0,03     | 0,83                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,4     | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | -              | 0,370   | 0,03     | 0,74                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>1</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,75    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,05           | 0,720   | 0,03     | 3,132                                                    | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,65    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,05           | 0,620   | 0,03     | 2,028                                                    | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,55    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,05           | 0,520   | 0,03     | 1,785                                                    | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,45    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,05           | 0,420   | 0,03     | 1,547                                                    | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,05           | 0,35    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,05           | 0,320   | 0,03     | 1,34                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>2</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,73    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,07           | 0,700   | 0,03     | 4,163                                                    | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,63    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,07           | 0,600   | 0,03     | 2,5                                                      | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,53    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,07           | 0,500   | 0,03     | 1,972                                                    | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,43    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,07           | 0,400   | 0,03     | 1,923                                                    | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,07           | 0,33    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,07           | 0,300   | 0,03     | 1,808                                                    | 0,095                  |
| [I] <sub>3</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,7     | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,100          | 0,670   | 0,03     | 6,124                                                    | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,6     | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,100          | 0,570   | 0,03     | 3,663                                                    | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,5     | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,100          | 0,470   | 0,03     | 3,194                                                    | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,4     | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,100          | 0,370   | 0,03     | 2,832                                                    | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,100          | 0,3     | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,100          | 0,270   | 0,03     | 2,207                                                    | 0,095                  |



**Şekil 4.11.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

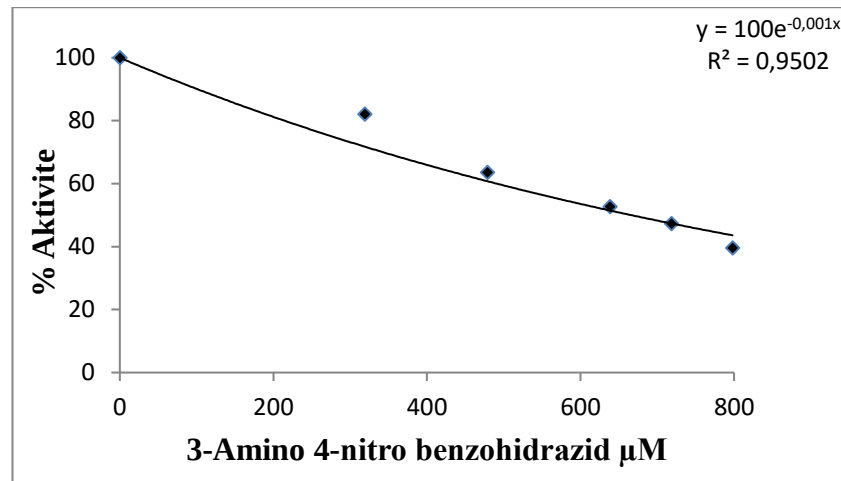
**Çizelge 4.10.** HRP enzimini üzerine 3-Amino 4-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

| <br>3-Amino 4-metil benzohidrazid | HRP | $IC_{50}$<br>( $\mu\text{M}$ ) | Ortalama $K_i$<br>( $\mu\text{M}$ ) | İnhibisyon<br>tipi |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
|                                                                                                                      |     | 346,5                          | $122 \pm 16,623$                    | Yarışmalı          |

#### 4.3.4. 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

**Çizelge 4.11.** 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

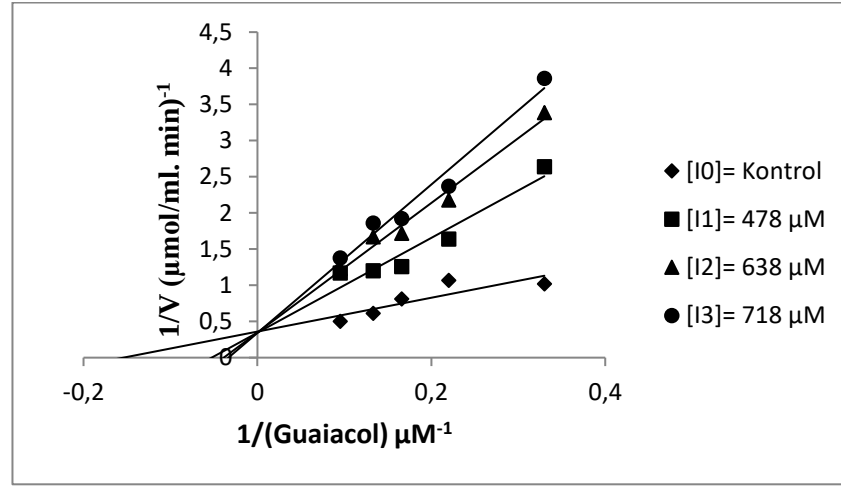
| Kör Tüpü                      |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü |                 |                                    |                |         |         |        |           |
|-------------------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|-------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------|--------|-----------|
| İnhibitör                     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | Su (mL) | Guaico(mL)  | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | İnhibitör (mL) | POD(mL) | Su (mL) | [I] mM | %Aktivite |
| 3-Amino 4-nitro benzohidrazid | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,080          | 0,420   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,080          | 0,02    | 0,400   | 0,16   | 82,06     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,120          | 0,380   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,120          | 0,02    | 0,360   | 0,32   | 63,58     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,340   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,02    | 0,320   | 0,40   | 52,71     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,320   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,02    | 0,300   | 0,48   | 47,28     |
|                               | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,200          | 0,300   | 0,5         | 1,0             | 1,0                                | 0,200          | 0,02    | 0,280   | 0,64   | 39,52     |



**Şekil 4.12.** HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

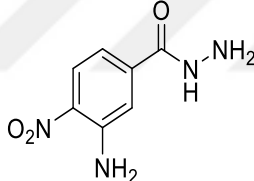
**Çizelge 4.12.** HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro bezohidrazid inhibitörü için  $1/V$ ,  $1/[S]$  değerleri ve deney prosedürü

| Kör Tüpü         |               |                 |                                    |                |         | Numune Tüpü   |                  |                                    |                 |         |          |                                                          |                        |
|------------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------|---------|---------------|------------------|------------------------------------|-----------------|---------|----------|----------------------------------------------------------|------------------------|
| Inhibitör no     | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp(mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | Inhibitör (mL) | Su (mL) | Guaiakol (mL) | Fosfat Tamp (mL) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | Inhibi-tör (mL) | Su (mL) | POD (mL) | $1/V$ ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ | $1/S$ $\text{mM}^{-1}$ |
| [I] <sub>0</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,8     | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,780   | 0,02     | 1,02                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,7     | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,680   | 0,02     | 1,07                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,6     | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,580   | 0,02     | 0,81                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,5     | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,480   | 0,02     | 0,61                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | -              | 0,4     | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | -               | 0,380   | 0,02     | 0,5                                                      | 0,095                  |
| [I] <sub>1</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,12           | 0,68    | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,12            | 0,660   | 0,02     | 2,64                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,12           | 0,58    | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,12            | 0,560   | 0,02     | 1,64                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,12           | 0,48    | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,12            | 0,460   | 0,02     | 1,26                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,12           | 0,38    | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,12            | 0,360   | 0,02     | 1,2                                                      | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,12           | 0,28    | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,12            | 0,260   | 0,02     | 1,17                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>2</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,740   | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,160           | 0,620   | 0,02     | 3,388                                                    | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,640   | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,160           | 0,520   | 0,02     | 2,181                                                    | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,540   | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,160           | 0,420   | 0,02     | 1,72                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,440   | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,160           | 0,320   | 0,02     | 1,67                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,160          | 0,340   | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,160           | 0,220   | 0,02     | 1,23                                                     | 0,095                  |
| [I] <sub>3</sub> | 0,2           | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,6     | 0,2           | 1,0              | 1,0                                | 0,180           | 0,600   | 0,02     | 3,86                                                     | 0,330                  |
|                  | 0,3           | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,5     | 0,3           | 1,0              | 1,0                                | 0,180           | 0,500   | 0,02     | 2,37                                                     | 0,220                  |
|                  | 0,4           | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,4     | 0,4           | 1,0              | 1,0                                | 0,180           | 0,400   | 0,02     | 1,92                                                     | 0,166                  |
|                  | 0,5           | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,3     | 0,5           | 1,0              | 1,0                                | 0,180           | 0,300   | 0,02     | 1,86                                                     | 0,133                  |
|                  | 0,6           | 1,0             | 1,0                                | 0,180          | 0,2     | 0,6           | 1,0              | 1,0                                | 0,180           | 0,200   | 0,02     | 1,38                                                     | 0,095                  |



**Şekil 4.13.** HRPenzimi üzerine guaiakolsubstratına bağlı olarak 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

**Çizelge 4.13.** HRP enzimini üzerine 3-Amino 4-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

|                                                                                                                      |     |                          |                               |                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <br>3-Amino 4-nitro benzohidrazid | HRP | $IC_{50}$<br>( $\mu M$ ) | Ortalama $K_i$<br>( $\mu M$ ) | İnhibisyon<br>tipi |
|                                                                                                                      |     | 693                      | $215,333 \pm 24,826$          | Yarışmalı          |

**Çizelge 4.14.** HRP enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

| LİGAND<br>MOLEKÜLLER             | $IC_{50}$<br>( $\mu M$ ) | $K_i$<br>( $\mu M$ ) | İnhibisyon Tipi |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------|
| 3-Amino 5-bromo<br>benzohidrazid | 138,6                    | $131,667 \pm 33,71$  | Yarışmasız      |
| 3-Amino 5-kloro<br>benzohidrazid | 173,25                   | $58,667 \pm 4,163$   | Yarışmalı       |
| 3-Amino 4-metil<br>benzohidrazid | 346,5                    | $122 \pm 16,623$     | Yarışmalı       |
| 3-Amino 4-nitro<br>benzohidrazid | 693                      | $215,333 \pm 24,826$ | Yarışmalı       |

#### 4.4. HRP Enziminin 3-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

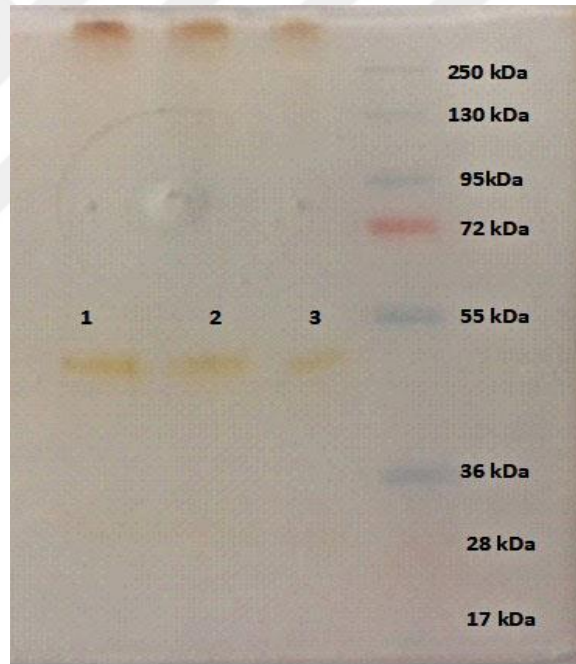
HRP enzimleri üzerine 3-Amino 5-bromo benzohidrazid, 3-Amino 5-kloro benzohidrazid, 3-Amino 4-metil benzohidrazid ve 3-Amino 4-nitro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon etkileri incelendikten sonra bölüm 3.3.4.b’de anlatıldığı üzere bu moleküllerin ligand olarak kullanıldığı Sepharose 4B-L-Tirozin-3-Amino 5-kloro benzohidrazid, Sepharose 4B-L-Tirozin-3-Amino 5-bromo benzohidrazid, Sepharose 4B-L-Tirozin-3-Amino 4-metil benzohidrazid ve Sepharose 4B-L-Tirozin-3-Amino 4-nitro benzohidrazid kolonlarının sentezi yapıldı. Hazırlanan kolonlardan Horseradish bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini yapıldı. Tüm kolonlardan saflaştırılan HRP enziminin saflaştırma sonuçları Çizelge 4.15’de gösterildi.

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

| Horseradish Peroksidaz (HRP)  |              | Toplam Hacim (mL) | Aktivite (EU/mL) | Protein Miktarı (mg/mL) | Total Aktivite (EU) | Total Protein Miktarı (mg) | Spesifik Aktivite (EU/mg) | Yüzde Verim | S. Katsayısı |
|-------------------------------|--------------|-------------------|------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------------|-------------|--------------|
| 3-Amino 5-Kloro benzohidrazid | Homojenat    | 6                 | 202              | 1,27                    | 1212                | 7,6                        | 159,1                     | 100         | 1            |
|                               | Afinite jeli | 3                 | 46,5             | 0,0015                  | 139,5               | 0,0045                     | 31000                     | 11,5        | 194,8        |
| 3-Amino 5-bromo benzohidrazid | Homojenat    | 6                 | 161,3            | 1,27                    | 967,8               | 7,6                        | 127,01                    | 100         | 1            |
|                               | Afinite jeli | 1,5               | 46,8             | 0,0016                  | 70,2                | 0,0024                     | 29250                     | 7,3         | 230,3        |
| 3-Amino 4-metil benzohidrazid | Homojenat    | 6                 | 250,9            | 1,27                    | 1505,4              | 7,62                       | 197,55                    | 100         | 1            |
|                               | Afinite jeli | 1,5               | 93               | 0,0018                  | 139,5               | 0,0027                     | 51666,6                   | 9,26        | 261,5        |
| 3-Amino 4-nitro benzohidrazid | Homojenat    | 6                 | 226,6            | 1,27                    | 1359,6              | 7,62                       | 178,4                     | 100         | 1            |
|                               | Afinite jeli | 1,5               | 60,92            | 0,0012                  | 91,38               | 0,0018                     | 50766,6                   | 6,72        | 284,5        |

#### 4.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi Sonuçları

Bayır turpu bitkisinden peroksidaz enzimi, 3-amino benzohidrazid türevlerinin (şekil 3.5) Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesiyle hazırlanan afinite kolonundan tek basamakta saflaştırıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 470 nm'de ölçüldü. Peroksidaz enziminin saflığını kontrol etmek ve göreceli molekül ağırlığını tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofözezi yapıldı ve 47 kDa'da tek bant gözlemlendi. Bunun için hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektrofözezi kuyularına sırayla saflaştırılan HRP enzimi ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü. Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı çekildi.



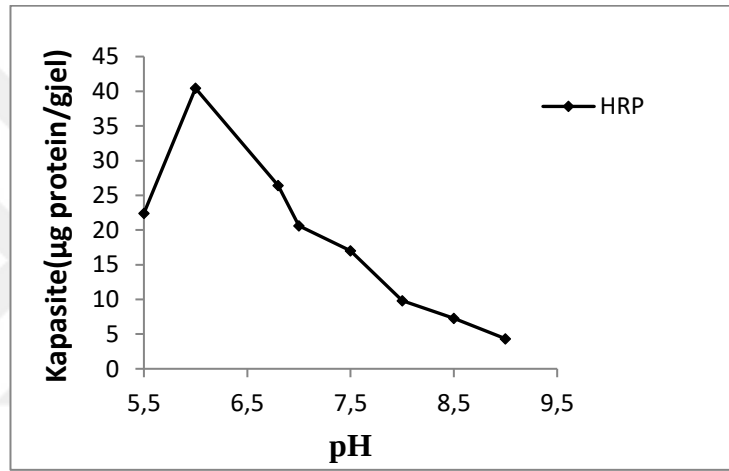
**Şekil 4.14.** Bayır turpu (HRP) enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

(1) 3-Amino 4-nitro benzohidrazid, (2) 3-Amino 4-metil benzohidrazid, (3) 3-Amino 5-bromo benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan yaban turpu enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

#### 4.6. Horseradish Bitkisinden 3-Amino 4-nitro Benzohidrazid Molekülü ile Hazırlanan Afinite Kolonunun HRP Enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

##### 4.6.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

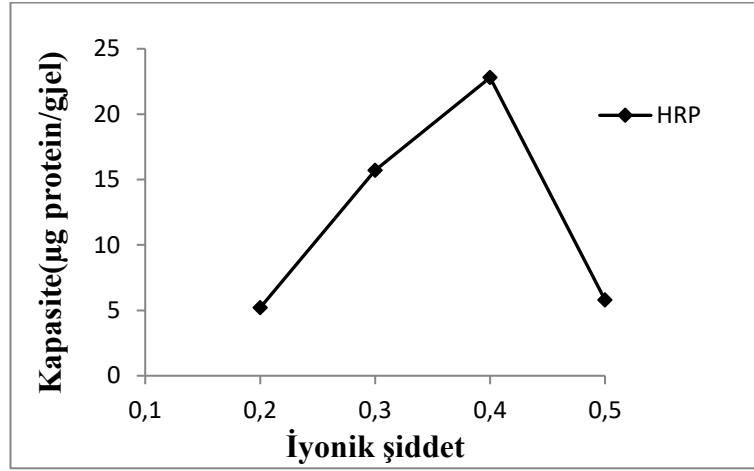
Bu bölümdeki deneyler pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel) başına belirlenerek Şekil 4.15'de verildi.



**Şekil 4.15.** Sepharose-4B-L-Tirozin-3Amino 4-nitro benzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği

##### 4.6.2. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

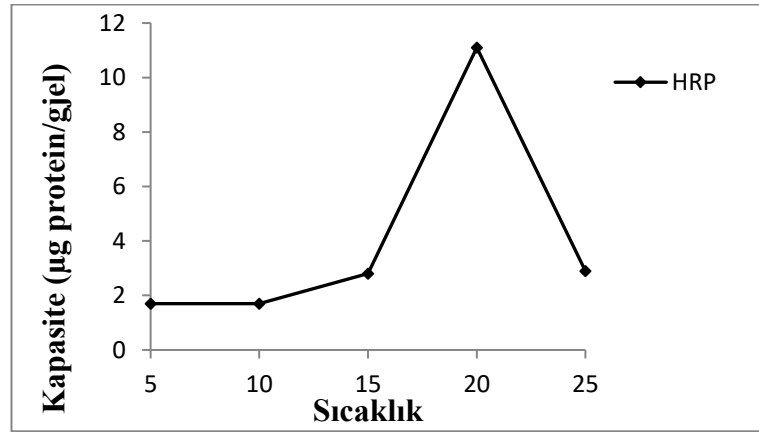
HRP enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilip, sonuçlar (mg protein/g jel) başına grafik Şekil 4.16'da verildi.



**Şekil 4.16.** Sepharose-4B-L-Tirozin-3-Amino 4-nitro benzohidrazid jelinin iyonik şiddet-kapasite grafiği

#### 4.6.3. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

pH 6.8’de HRP farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel) sonuçlar Şekil 4.17’de verildi.



**Şekil 4.17.** Sepharose-4B-L-Tirozin-3Amino 4-nitro benzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Peroksidazlar, oksidoredüktaz enzim sınıfının hidrojen peroksit veya organik peroksitleri kullanan bir üyesidir. Bitkisel peroksidazlar (POD veya POX) ise peroksidaz enzim ailesinin küçük bir bölümünü oluşturur.

HRP enziminin ticari önemi ve uygulama alanlarının yaygın olması nedeniyle saf olarak elde edilmesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

HRP enzimi tıbbi tanı kitlerinde kullanılmaktadır. Gıda, tekstil, deri, boya, kozmetik ve kağıt sanayilerinde boyalar önemli kirleticilerdir. çevre çalışmaları yönünden önemli olan boyaların giderilmesinde biyolojik ve fiziksel yöntemlerin uygulanmasına yönelik araştırma çalışmaları yapılmaktadır (Önder *et al.* 2009). Organik bileşiklerin biyotransformasyonu, organik sentezleri ve  $H_2O_2$  algılanması için biyosensörlerin oluşumu için de sıklıkla kullanılmaktadır. Güçlü bir oksitleyici olan  $H_2O_2$ , birikmesine izin verilirse toksik olabilir. Peroksidazlar, normal ve stres koşulları altında hücrelerde aşırı  $H_2O_2$ 'i uzaklaştırmada önemli bir rol oynar (Sarika *et al.* 2015).

HRP enzimlerinin ticari önemi sahip olması ve uygulama alanlarının yaygın olmasından dolayı enzimin saf olarak elde edilmesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Litratürde bitkisel kaynaklı peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasına yönelik farklı kromatografik metotların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır ve bu çalışmalar halen devam etmektedir. Afinite kromatografisi tekniği ile bu peroksidaz enzimlerinin tek basamakta ve yüksek saflıkta saflaştırılması birçok araştırmacının hedefidir.

Hidrazidler, peroksidaz inhibitörleri olarak bilinen bileşiklerdir. Çeşitli hidrazin ve hidrazin türevleri, iproniazid (sakinleştirici), mebanazine, izokarboksazid, fenelzin (monoamin oksidaz inhibitörleri), hidralazin (tansiyon düşürücü) ve PHZ (fenilhidrazin; polisitemi kontrolü), izoniazid [INH (izonikotinik hidrazit) tüberküloz antibiyotik]

terapötik olarak kullanılmıştır. Hidrazinler ve hidrazid inhibitörleri metabolik olarak aktive edilir. Enzimatik aktivasyon sonrasında, metabolik olarak aktive edilen inhibitörler farklı bir biyomoleküle ya da aynı enzime ya yeniden bağlanabilir ya da aktif bölgesinden serbest bırakılır, dolayısıyla inaktivasyona yol açar. Özgüllük hem bağlanma afinitesi hem de aktif inhibitörün reaktivitesine göre değişir. HRP C, PHZ tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir fakat PHZ süperoksit üretimi için pH 7,0'da oto-oksidasyona maruz kaldığından, terapötik bir madde olarak uygun değildir. Bunun aksine, INH'nın oto-oksidasyonu pH 7,0'da daha düşük bir hızda gerçekleşir. *Mycobacterium tuberculosis* / katalaz (katG) peroksidaz ile aktivasyondan sonra aktive INH bir inhibitörünün oluşturulması için, enoil redüktazın kofaktörü ile reaksiyona girer. Hidrazinlerin enzimler üzerine yapılan çalışmalarda miyoloperoksidazı dönüşümsüz inhibe ettikleri bulunmuştur (Kumar and Bhatla 1995). Peroksidazlara inhibitör olma potansiyelleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. (Kalin *et al.* 2014). Bu çalışmalardan görüleceği gibi dönüşümlü inhibitör olma potansiyelleri üzerine POD enzimlerinin saflaştırılmasında kullanılma potansiyelleri ortaya çıkmıştır.

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

Literatürde HRP enzimi ile ilgili birçok çalışma mevcut olup, son yıllarda rekombinant HRP üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Bayır turpu peroksidazı köklerinden hızlı ve yüksek verimli saflaştırma için yüksek yoğunluklu Concanavalin A hazırlanması ve kullanımı araştırılmıştır. İki aşamalı bu saflaştırma çalışmasında amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi kullanılarak %73 verimle 14 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Fragus *et al.* 2004). Fenil Sepharose CL-4B üzerinde ultrasonikasyon amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi üç adımda peroksidaz saflaştırma çalışması yapılmış ve sonuç

olarak 772 EÜ/mg spesifik aktivite ile %71,3 verim ve 291 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır (Lavery *et al.* 2010). Yine Rekombinant HRP üretimi ve uygulamaları incelenmiştir (Grigorenko *et al.* 2015). Hedeflenmiş kanser tedavisi için rekombinant HRP varyantları çalışılmıştır (Bonifert *et al.* 2016).

Kromatografik metotların kullanılarak bitkisel peroksidaz enzimlerin saflaştırılmasında çok sayıda çalışma vardır. Kullanılan yöntemler arasında jel filtrasyon kromatografisi, metal ve hidrofobik afinite, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik yöntemler bulunmaktadır.

Afinite kromatografisi, çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları ortadan kaldırmak ve enzimi yüksek bir verimle izole etmek için saflaştırma işlemlerinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu peroksidaz enzimlerinin afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta saflaştırılması birçok araştırmacının hedefidir. Yukarıda verilen yöntemlere bakıldığında dar kapsamlı olup, saflaştırma katsayıları ve verimlerinin düşük olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, endüstriyel kullanılabilen POD'lerin afinite kromatografisi ile tek basamakta doğal kaynaklardan yüksek oranda saflaştırılması güncel araştırma sahalarından biridir ve çalışmanın amacıdır.

Bu tez kapsamında afinite kromatografisi tekniği ile bitkisel kaynaklı peroksidazların yüksek saflıkta elde edilmesi için daha kapsamlı ve daha ekonomik bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda 4-aminobenzohidrazid bileşiğinin bitki POD enzimlerinin yarışmalı bir inhibitörü olduğu ve bitki peroksidazlarının saflaştırılmasında kullanılabileceği tespit edilmiş ve literatüre kazandırılmıştı (Özdemir H. *et al.* 2019). Bu çalışma esas alınarak 3-aminobenzohidrazid molekülünün aromatik halkasının *orto*, *meta* ve *para* pozisyonlarına sübstitüentler takarak, farklı elektronik ve sterik özellik taşıyan aminobenzohidrazid türevleri sentezlenerek bitki peroksidaz enziminin saflaştırılmasında en etkin ligand saptandı. HRP enziminin afinite kromatografisi ile yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi amacıyla kullanılan Şekil 3.2'de verilen 3-

Amino benzohidrazid türevi ligant molekülleri (**5**, **6**, **7**, **8**), ticari olarak temin edilemediğinden, moleküllerin metil benzoat türevleri (**1**, **2**, **3**, **4**) satın alınarak hidrazin sentezleri Şekil 3.'te verildiği şekilde tarafımızca yapıldı ve sentez sonuçları Çizelge 4.1'de gösterildi. Hazırlanan amino-benzohidrazid türevlerinin önce inhibisyon kinetikleri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller belirlendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.2, 4.5, 4.8, 4.11 ve 4.14'te gösterildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek  $IC_{50}$  değerleri bulundu. Horseradish POD enzimi için bu grafikler Şekil 4.6, 4.8, 4.10, 4.12'de gösterildi. HRP enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.6, 4.9 ve 4.12'de gösterildi. 3-Amino 5-bromo benzohidrazid (**5**), 3-Amino 5-kloro benzohidrazid (**6**), 3-Amino 4-metil benzohidrazid (**7**) ve 3-Amino 4-nitro (**8**) için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve  $K_i$  değerleri bulundu (Lineweaver *et al.*1934). Horseradish (*Armoracia rusticana*) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması için dönüşümlü inhibisyon gösteren sentezlenen moleküller belirlendi ve toplu sonuçlar Çizelge 4.14'te verildi. Bu moleküllerin ilgili diazonyum tuzu Şekil 3.5'te verildiği üzere Sepharose-4B'ye kenetlenerek afinite kromatografisi dolgu maddesi hazırlandı.

Sonuç olarak ligand olarak hazırlanan Şekil 3.2'de verilen 3-aminobenzohidrazid türevi moleküllerin (**5**, **6**, **7**, **8**) bağlı olduğu afinite kolonundan HRP enzimini tek basamakta, yüksek saflıkta elde etmek amaçlandı ve saflaştırma sonuçları Çizelge 4.15'te gösterildi. Saflaştırılan enzimlerin kinetik özellikleri, protein tayini, ve kullanılan ligandın kinetik özellikleri belirlendi. SDS-PAGE metoduyla enzimin molekül kütlesi 47 kDa olarak belirlendi (Şekil 4.14). Çalışılan dört molekülün HRP enziminin yeni, dönüşümlü, etkili inhibitörü olduğu ve afinite kolonunda ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.

Kullanılan moleküller içerisinde kullanılma potansiyeli en yüksek olan 3-Amino 4-nitro ligant molek l  için pH, iyonik şiddet ve sıcaklık parametreleri çalışılarak grafik edildi ( ekil 4.15, 4.16, 4.17) ve (mg protein/gram-jel) cinsinden HRP enzimini tutma kapasitesi belirlendi. Safla tırmada elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının, literatürde olan çalışmalardan çok daha yüksek olduğu belirlendi ve tek kademedeyapılmasından dolayı etkin bir yöntem sunuldu.

Bu  alı ma ligand olarak kullandığımız 3-Amino 4-nitro benzohidrazid molekülünün ucuz maliyette ve yüksek verimde HRP enzimini safla tırdığı ve diğer bitki peroksidazlarını da safla tırmada kullanılma potansiyelinin olduğu literatüre kazandırıldı.

## KAYNAKLAR

- Adam, W., Lazarus M., Saha-Moler C.R., Weichold O., Hoch U. and Scherier P. 1999. Biotransformations with peroxidases. *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74–108.
- Adams, J.B., 1978. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature-short time processing of vegetables. *Journal Food Technology*, 13, 281–297.
- Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H., 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598.
- Akkuş İ (1995): Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Akpoyraz, M., Durak, İ. Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine) Vol. 48 : 253-262, 1995.
- Alemzadeh, I., Nejati, S., 2009. Phenols removal by immobilized Horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2), 1082-1086.
- Al-Senaidy, A., Gsmael, M., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 293-298.
- Altunkaya, A., Gökmen, V., 2011. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipxygenase from Freshly Cut Lettuce (*L. sativa*). *Food Technol. Biotechnol.* 49: 249–256
- 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.
- Asad, S., Dabirmanesh, B., Ghaemi, N., Etezad, S.M., Khajeh, K., 2013. Studies on the refolding process of recombinant Horseradish peroxidase. *Mol. Biotechnol.*, 54(2), 484-492.
- Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayiroğlu F (1995) Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. *Sağl. Bil. Der.*, 2:13742.
- Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.
- Bae, J.W., Choi, J.H., Lee, Y., Park, K.D., 2015. Horseradish peroxidase-catalysed in situ-forming hydrogels for tissue-engineering applications. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.*, 9(11), 1225-1232
- 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., Redox properties of heme peroxidases. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 500, 21-36 (2012).
- Bonifert, G., Folkes, L., Gmeiner, C., Dachs, G., Spadiut, O., 2016. Recombinant Horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment. *Cancer Med.*, 5(6), 1194-1203.

- Bradford. M.M., Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274-274
- Brattain, M.G., Marks, M.E., Pretlow, T.G., 1976. Purification of Horseradish-peroxidase by affinity chromatography on sepharose-bound concanavalin-A. *Anal. Biochem.*, 72 (1-2), 346-352.
- Campbell, K.L., Lopresti, M., Lukas, W., 2014. Inhibition of Horseradish Peroxidase (HRP) by a nonhydrophobic component of urine: A caution for immunoassays. *Open Clinical Chemistry Journal*, 7(1), 1-7.
- Carvalho, A.S.L., Neves-Petersen, M.T., Peterson, S.B., v.d., Formation of a misfolded conformation during refolding of HRPA1 in the presence of calcium, *Biochim. Et Biophys. Acta*, 1747, 99-107, 2005.
- Chromatography-Methods and Protocols, P. Bailon, G.K. Ehrlich, Wen-Jian Fung and W. Berthold (Editors), Humana Press, pp. 1-6, New Jersey.
- 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.
- Connell-Crowley, L., Nguyen, T., Bach, J., 2012. Cation exchange chromatography provides effective retrovirus clearance for antibody purification processes. *Biotechnol. Bioeng.* 2012; 109, 157-165.
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 3-4: 92- 95.
- Daniel, R.M., Peterson, M.E., Danson, M.J., *et al.*, 2010. "The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity". *Biochem. J.* 425 (2): 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.
- Desphande, S.S., *Enzyme Immunoassays*, chapter 5, Chapman & Hall, New York, 1996.
- 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.
- Dündar Y, Aslan R. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*. 1999; 2(2): 134-142.
- Fraguas, L.F., Batista-Viera, F., Carlsson, J., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from Horseradish roots. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 803, 237-241.
- Frahry. G., Schopfer. P., 1998. Inhibition of O<sub>2</sub>-Reducing Activity of Horseradish Peroxidase by Diphenyleneiodonium, *Phytochemistry*, 48, 223-227

- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 165-186.
- Greco, O., Folkes, L.K., Wardman, P., Tozer, G.M., Dachs, G.U., 2000. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer. Horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. *Cancer Gene Ther.* 7,1414–1420.
- Grigorenko, V.G., Andreeva, I.P., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M., 2015. Recombinant Horseradish peroxidase: production and analytical applications. *Biochemistry (Mosc.)*, 80(4), 408-416.
- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- 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, pp. 40-43, New York.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1–4.
- Hiraga, S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y. and Matsui H., 2001. A large family of class III olant peroxidases. *Plant Cell Physiol.*,42 (5), 462-468.
- Hnasko, R.M., 2015. Bioconjugation of Antibodies toHorseradish Peroxidase(HRP). *Methods in Molecular Biology*, 1318, 43-50.
- Holland, T., Sack, M., Rademacher, T., 2010. Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 107, 278–289.
- Janović, B.S., Collins, A.R., Vujčić, Z.M., Vujčić, M.T., 2016. Acidic Horseradish peroxidase activity abolishes genotoxicity of common dyes. *J. Hazard. Mater.*, 321, 576-585.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60–63.
- Kalin R., Atasever A., Ozdemir H. 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from turkish blackradish and turnip roots. *Food Chemistry*335-340
- Kampis, A., Bartuczkovacs, O., Hoschke, A., Aosvigyazo, V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293–295.
- Karlson, P., Telefoncu, A. Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya, Sermet Mat., Kırıkkale, s.68 (1998).
- Keha, E. ve Küvrevioğlu Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö., Biyokimya, AktifYaynevi, Ankara, 2010. Klibanov, A. M., Stabilization of enzymes against thermal inactivation, *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 1-28, 1983.
- Kumar, R., Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk . *Acta Cryst*, 51, 1094-1096.
- Kumpalume, P., Ghose, S., 2003. Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation. In: *Isolation and Purification of Proteins*, R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson (Editors), Marcel Dekker, pp. 29-56, New York.

- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lam, C. W. 2000. Free radicals, nutritional anti-oxidants and trace elements. [www. cpy. cuhk](http://www.cpy.cuhk).
- 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. [hk/~cpy/ lecture/1999-2000/week37/ free Radicals. htm](http://www.hk/~cpy/lecture/1999-2000/week37/freeRadicals.htm).
- Lehninger, A.L., 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers Inc New York,
- Lehninger, A.L., 2005. Principles of biochemistry. Worth publisher, Academic Press, New York.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., v.d., Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tubers, *Plant Science*, 163, 1011-1019, 2002.
- Lineweaver, H. and Burk D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc*, 57, 685 1934.
- Madi BC, Sandal J, Bannett R (1999) Effects of Female Relative in Labor. *Birth*, 26:910.
- Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT*, 41, 1372-1379.
- Mc Murry John : Organic Chemistry, Second Edition, California 93950, 1988.
- Menten, L., Michaelis, M.I., 1913, "Die Kinetik der Invertinwirkung", *Biochem Z* 49: 333-369
- Miranda, M.V., Magri, 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.
- Morawski, B., Lin, Z.L., Bandara, G., Arnold, F.H., 2000. Expression of Horseradish peroxidase (HRP) in *Scerevisiae* and *P-pastoris*. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 219, 165–165.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643-1650.
- 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.
- Önder, R.S., Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Kuzu, H., 2009. He effect of Horseradish peroxidase (HRP)-dextran conjugate on naphtol blue black. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 27, 18-25.
- 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*.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2): 89-96.

- 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.
- Sarika, D., Ashwin Kumar, P.S.S., Arshad, S., Sukumaran, M. K., 2015. Purification and evaluation of Horseradish peroxidase activity. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4 (7), 367-375
- Sariri, R., Jafarian, V., Hassan Sajedi, R., Khajeh, Kh., 2006b. Inhibition of Horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid, *Journal of Molecular Liquids* 128, 175–177.
- Scandalios J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–316.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York.
- Sen S, Chakraborty R. *The Role of Antioxidants in Human Health*. American Chemical Society, *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*. Chapter 1: 1-37. 2011.
- 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 & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Smith, A.T., Santama, N., Dacey, S., 1990. Expression of a synthetic gene for Horseradish peroxidase-C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca-2+ and heme. *J.Biol. Chem.* 265, 13335–13343.
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzıki, T., Ogura, N., Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit, *Agric. Biol. Chem.*, 55(6), 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 (12), 1187-1196.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Tıpawan, T. Barrett M., 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214
- Tüzün, C., *Biyokimya, Palme yayıncılık*, 81, Ankara, 2005.
- Van Huystee, R.B., 1987, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219.
- Veitch, N.C. ve Nigel, C., Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme, *Phytochemistry*, 65,3:249-259, 2004.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167–171.
- Whitaker, J.R., 1994, Catalase and peroxidase. In *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Whitaker, J. R., Ed., pp 565-578, Dekker: New York.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.

Wilchek, M., Chaiken, I., 2000. An Overview of Affinity Chromatography. In: Affinity  
Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease.  
Crit Rev Food Sci Nutr. 2004; 44(4): 275-295.



## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Erzurum’da doğdu. İlk ve orta eğitimini Erzurum’da tamamladı. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde başladığı üniversite eğitimini 2015 yılında tamamladı. 2017 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans’a başladı.

