



**BİTKİSEL KAYNAKLARDAN PEROKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve RASEMİK
HİDROPEROKSİDİN ENANTİYO
SEÇİMLİ İNDİRGENMESİ**

Ramazan KALIN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2018

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BİTKİSEL KAYNAKLARDAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI ve RASEMİK HİDROPEROKSİDİN
ENANTIYO SEÇİMLİ İNDİRGENMESİ**

Ramazan KALIN

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2018**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BİTKİSEL KAYNAKLARDAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve
RASEMİK HİDROPEROKSİDİN ENANTIYO SEÇİMLİ İNDİRGENMESİ**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Ramazan KALIN tarafından hazırlanan bu çalışma 26/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ali KILINÇ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 19.07/2018 tarih ve 29.../40..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

Doktora Tezi

BİTKİSEL KAYNAKLARDAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve RASEMİK HİDROPEROKSİDİN ENANTIYO SEÇİMLİ İNDİRGENMESİ

Ramazan KALIN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Çalışmanın birinci bölümünde çeşitli bitki kaynaklarından (beyaz turp, kırmızı turp, alabaş turp, tatlı turp, japon turpu, kara lahana, mor lahana, kırmızı pancar, yer elması ve zencefil) hazırlanan peroksidaz homojenatları ile guaiakol varlığında *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin kinetik rezolüsyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonların stereokimyasal sonuçları kiral OD kolunu kullanılarak HPLC ile belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre oluşan (*R*)-alkollerin %60-92 ve (*S*)-hidroperoksidin ise %76-99 aralığında değişen *ee* değerlerine sahip oldukları tespit edildi.

Çalışmanın ikinci kısmında peroksidaz enzimi alabaş turp (*Brassica oleracea* L. Var. *Gongylodes*) ve kara lahana kökünden (*Brassica oleracea* L. Var. *Acephala*) 4-aminobenzohidrazit molekülünün ligant olarak kullanıldığı afinite kromatografisi tekniği ile ilk kez saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimlerin saflıkları ve molekül kütleleri SDS-PAGE yöntemiyle belirlendi. Alabaş turp ve kara lahana kökünden saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin saflaştırma sonuçları ve molekül kütleleri sırasıyla alabaş turp için %35,7 verimle 257,4 kat ve 58,2 kDa, kara lahana kökü için ise %37,2 verimle 313,4 kat ve 73,4 kDa olarak bulundu. Saflaştırılan alabaş turp ve kara lahana kökü POD'lar için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, guaiakol ve H₂O₂ substratlarının K_m ve V_{max} değerleri tespit edildi. Son olarak saflaştırılan POD'lar üzerine ligant olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit molekülünün inhibisyon parametreleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre IC₅₀ değerleri alabaş turp POD için 507,1 µM kara lahana kökü POD için ise 476,7 µM olarak bulundu. K_i değerleri alabaş turp için 741,3±83 µM, kara lahana kökü için ise 342,3±74 µM olarak hesaplandı.

2018, 106 sayfa

Anahtar Kelimeler: Peroksidaz, hidroperoksit, alkol, kiral, kinetik rezolüsyon, afinite kromatografisi, 4-aminobenzohidrazit, enzim saflaştırma

ABSTRACT

PhD Thesis

PURIFICATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM PLANT SOURCES AND ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF RACEMIC HYDROPEROXIDE

Ramazan KALIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In the first part of the work, kinetic resolution of *rac*-(1-hydroperoxideethyl)benzene in the presence of guaiacol was performed with peroxidase homogenates prepared from various plant sources (white radish, red radish, kohlrabi radish, sweet radish, japanese radish, black cabbage, purple cabbage, red beet, ground apple and ginger). The stereochemical results of the reactions were determined by HPLC using chiral OD column. According to the results, it was determined that (*R*)-alcohols have ee values ranging between 60-92% and also the same values ranges between 76-99% in (*S*)-hydroperoxide.

In the second part of the study, the peroxidase enzyme was purified for the first time by affinity chromatography using the 4-aminobenzohydrazide molecule as a ligand from kohlrabi radish (*Brassica oleracea* L. Var Gongylodes) and black cabbage root (*Brassica oleracea* L. var Acephala). The purity of purified enzymes and molecular masses were determined by SDS-PAGE. The purification results and molecular masses of the peroxidase enzymes purified from kohlrabi radis and black cabbage root were found to be 257.4 times with a yield of 35.7% and 58.2 kDa for alabaş and 313.4 times with a yield of 37.2% and 73.4 kDa for black cabbage, respectively. Optimum pH, optimum ionic strength, optimum temperature, K_m and V_{max} values of guaiacol and H_2O_2 substrates were determined for purified kohlrabi radish and black cabbage root PODs. Finally, the inhibition parameters of the 4-aminobenzohydrazide molecule used as a ligand on purified PODs were determined. IC_{50} values were found to be 507.1 μM for kohlrabi radis POD and 476.7 μM for black cabbage root POD. K_i values were calculated as $741.3 \pm 83 \mu M$ for kohlrabi radish and $342.3 \pm 74 \mu M$ for black cabbage root.

2018, 106 pages

Keywords: Peroxidase, hydroperoxide, alcohol, chiral, kinetic resolution, affinity chromatography, 4-aminobenzohydrazide, enzyme purification

TEŞEKKÜR

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

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

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin bütün imkânlarını esirgemeyen Fen Fakültesi Dekanlığına, Kimya Bölümüne ve Biyokimya Anabilim Dalına,

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, Organik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na

Çalışmalarım esnasında her türlü yardımlarını gördüğüm Kafka Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Erbay KALAY'a, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sayın Serpil GERNİ ve Sayın Dr. Yeliz DEMİR başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Çalışmalarımda beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu'na,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli aileme, yoldaşım, hayat arkadaşım Dr. Pınar KALIN'a ve canım oğlum Ali Hamza KALIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ramazan KALIN

Haziran 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Stereokimya.....	1
1.1.1. Yapı izomerleri.....	2
1.1.2. Stereoizomerler	3
1.1.2.a. Diastereomerler	3
1.1.2.b. Enantiyomerler	4
1.2. Enzimler	7
1.3. Peroksidazlar (POD).....	10
1.4. Afinite Kromatografisi	19
1.4.1. Matriks.....	22
1.4.2. Ligant.....	23
1.4.3. Uzantı kolu	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
2.1. Çalışmanın Amacı	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	35
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	35
3.1.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.2. Yöntemler	39
3.2.1. Protein belirleme yöntemleri	39
3.2.1.a. Kalitatif protein tayin yöntemi	39
3.2.1.b. Kantitatif protein tayin yöntemi	39

3.2.2. POD aktivite ölçüm yöntemi	40
3.2.3. Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışmaları.....	42
3.2.3.a. Bitkilerden homojenat hazırlanması	42
3.2.3.b. Afinite jeli hazırlama prosedürü	42
3.2.3.c. Afinite jelinin kolona paketlenmesi.....	44
3.2.3.d. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	44
3.2.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi	45
3.2.5. Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden saflaştırılan POD'ların karakterizasyon çalışmaları	46
3.2.5.a. POD enzimleri için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	47
3.2.5.b. POD enzimleri için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	47
3.2.5.c. POD enzimleri için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	47
3.2.5.d. Guaiakol ve H ₂ O ₂ substratları için K _m ve V _{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	47
3.2.6. Kullanılan ligant için kinetik çalışmalar	48
3.2.7. <i>rac</i> -Hidroperoksit sentezi	48
3.2.8. <i>rac</i> -Hidroperoksit indirgenmesi	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	50
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik	50
4.2. Alabaş Turp ve Kara Lahana Peroksidaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları	51
4.2.1. Afinite kromatografisi kullanılarak elde edilen POD enzimi saflaştırma sonuçları	51
4.2.2. POD'un afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları	53
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforez sonuçları.....	54
4.3. Alabaş Turp ve Kara Lahanadan Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin Karakterizasyon Çalışma Sonuçları.....	56
4.3.1. POD enziminin optimum pH sonuçları	56
4.3.2. POD enziminin optimum iyonik şiddet sonuçları	58
4.3.3. POD enziminin optimum sıcaklık sonuçları	59

4.3.4. Guaiakol ve H ₂ O ₂ substratlarının K _m ve V _{max} değerlerini belirlemeye yönelik yapılan çalışma sonuçları	61
4.4. 4-aminobenzohidrazit Molekülünün IC ₅₀ ve K _i Değerlerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları	63
4.5. <i>rac</i> -Hidroperoksit Sentez Sonuçları	67
4.6. <i>rac</i> -Hidroperoksidin Bitki POD Ekstraktları ile İndirgenme Sonuçları.....	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
KAYNAKLAR	85
EKLER.....	95
EK 1.....	95
EK 2.....	96
ÖZGEÇMİŞ	107

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BSA	: Sığır serum albumin
CNBr	: Siyanojen bromür
DEAE	: Dietilaminoetil
dk	: Dakika
E.C.	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ee	: Enantiyomerik aşırılık
ekv.	: Ekvivalent
EÜ	: Enzim ünitesi
ϵ	: Molar ekstinksiyon kat sayısı
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP	: Bayır turpu peroksidaz (Horseradish peroxidase)
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kat.	: Katalizör
kDa	: Kilodalton
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
M _K	: Molekül kütlesi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
<i>rac</i>	: Rasemik
ROT	: Reaktif oksijen türü
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
UV	: Ultraviyole
V	: Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	: Enzim aktif bölgesinin tamamının substratla dolduğu andaki hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İzomerlerin sınıflandırılması	2
Şekil 1.2. C ₃ H ₈ O'nun yapı izomerleri	2
Şekil 1.3. 1,2-Dibromoetilenin cis ve trans gösterimi	4
Şekil 1.4. Enantiyomer ve diastereomer gösterimi	5
Şekil 1.5. Enantiyomerik olarak saf moleküllerin elde edilme yöntemleri	7
Şekil 1.6. Bir enzimin TΔS± bariyerini azaltma yolları.....	8
Şekil 1.7. Yaygın olarak kullanılan peroksidaz substratları	13
Şekil 1.8. Peroksidaz enziminin katalizlediği kimyasal reaksiyon	13
Şekil 1.9. Guaiakolün yükseltgenme mekanizması	15
Şekil 1. 10. Peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması.....	16
Şekil 1.11. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	22
Şekil 2.1. Bayır turpundan (HRP) saflaştırılan peroksidazın X-ray kristalografisi	27
Şekil 3.1. Guaiakol'ün 3,3'dimetoksi-4,4'-bifenokinona yükseltgenme tepkimesi	41
Şekil 3.2. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin takılma reaksiyonu.....	43
Şekil 3.3. 4-aminobenzohidrazit bağlanma reaksiyon modeli	44
Şekil 3.4. <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin sentez reaksiyonu	48
Şekil 4.1. Bradford metoduna göre sığır serum albuminden hazırlanan standart grafik.....	50
Şekil 4.2. Afinite kolonundan saflaştırılan alabaş turp POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 280 nm'de vermiş oldukları absorbansları gösteren grafik.....	51
Şekil 4.3 Afinite kolonundan saflaştırılan kara lahana POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 280 nm'de vermiş oldukları absorbansları gösteren grafik.....	52
Şekil 4.4. Afinite kolonundan saflaştırılan alabaş turp POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 470 nm'de vermiş oldukları absorbanslara karşılık gelen EÜ'leri gösteren grafik	52

Şekil 4.5. Afinite kolonundan saflaştırılan kara lahana POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 470 nm’de vermiş oldukları absorbanlara karşılık gelen EÜ’leri gösteren grafik	53
Şekil 4.6. Alabaş turp POD enzimi için çizilen R_f -log M_K grafiği	54
Şekil 4.7. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış olan alabaş turp peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü	55
Şekil 4.8. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış olan kara lahana peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü	55
Şekil 4.9. Kara lahana POD enzimi için çizilen R_f -log M_K grafiği	56
Şekil 4.10. Alabaş turp POD için yapılan optimum pH çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-pH grafiği.....	57
Şekil 4.11. Kara lahana POD için yapılan optimum pH çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-pH grafiği.....	57
Şekil 4.12. Alabaş turp POD için yapılan optimum iyonik şiddet çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-[KH_2PO_4] (M) grafiği.....	58
Şekil 4.13. Kara lahana POD için yapılan optimum iyonik şiddet çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-[KH_2PO_4] (M) grafiği.....	59
Şekil 4.14. Alabaş turp POD için yapılan optimum sıcaklık çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-Sıcaklık (°C) grafiği.....	60
Şekil 4.15. Kara lahana POD için yapılan optimum sıcaklık çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-Sıcaklık (°C) grafiği.....	60
Şekil 4.16. Alabaş turp peroksidaz enziminin guaiakol için çizilen $1/[Guaiakol]$ - $1/V$ grafiği	61
Şekil 4.17. Alabaş turp peroksidaz enziminin H_2O_2 için çizilen $1/[H_2O_2]$ - $1/V$ grafiği	62
Şekil 4.18. Kara lahana peroksidaz enziminin guaiakol için çizilen $1/[Guaiakol]$ - $1/V$ grafiği	62
Şekil 4.19. Kara lahana peroksidaz enziminin H_2O_2 için çizilen $1/[H_2O_2]$ - $1/V$ grafiği	63
Şekil 4.20. Alabaş turp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen Aktivite(%)-[4-aminobenzohidrazit] grafiği	64

Şekil 4.21. Kara lahana POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen Aktivite(%)-[4-aminobenzohidrazit] grafiği	65
Şekil 4.21. Alabaş turp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen 1/V ve 1/[S] grafiği	66
Şekil 4.22. Kara lahana POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen 1/V ve 1/[S] grafiği	66
Şekil 4.23. <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin bitki POD enzimi ile indirgenme reaksiyonu	68
Şekil 5.1. Russell mekanizması	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve biyokimyasal fonksiyonları.....	9
Çizelge 1.2. Peroksidaz familyasının sınıflandırılması	11
Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	20
Çizelge 1.4. Uzantı kolunun kullanılma durumları.....	25
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve markaları	35
Çizelge 3.2. Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.....	36
Çizelge 3.3. Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözelti.....	37
Çizelge 3.4. Enzim saflaştırmada kullanılan çözeltiler.....	37
Çizelge 3.5. Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	37
Çizelge 3.6. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti.....	37
Çizelge 3.7. Elektroforez de kullanılan çözeltiler.....	38
Çizelge 3.8. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler	38
Çizelge 3.9. Çalışmamızda kullanılan inhibitör stok çözelti	39
Çizelge 3.10. POD aktivite ölçümü için kuvvet içerikleri	41
Çizelge 3.11. Ayırma ve yığma jeli hazırlama prosedürü	45
Çizelge 4.1. Alabaş turp POD enziminin 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları	53
Çizelge 4.2. Kara lahana POD enziminin 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları	54
Çizelge 4.3. Alabaş turp ve kara lahana POD enzimleri için SDS-PAGE ile hesaplanan molekül kütlesi sonuçları	56
Çizelge 4.4. Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin karakterizasyon çalışması toplu sonuçları	63
Çizelge 4.5. Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin inhibisyon çalışması toplu sonuçları.....	67
Çizelge 4.6. Beyaz turp POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler	69
Çizelge 4.7. Kırmızı turp POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler.....	69

Çizelge 4.8. Alabaş turp POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler.....	69
Çizelge 4.9. Tatlı turp POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler	70
Çizelge 4.10. Japon turpu POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler	70
Çizelge 4.11. Kara lahana POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler	70
Çizelge 4.12. Mor lahana POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler.....	70
Çizelge 4.13. Kırmızı pancar POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler	71
Çizelge 4.14. Yer elması POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler	71
Çizelge 4.15. Zencefil POD enzimi ile <i>rac</i> -(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler.....	71
Çizelge 5.1. Bitki POD'ler için yapılan kinetik rezolüsyon toplu sonuçları	74

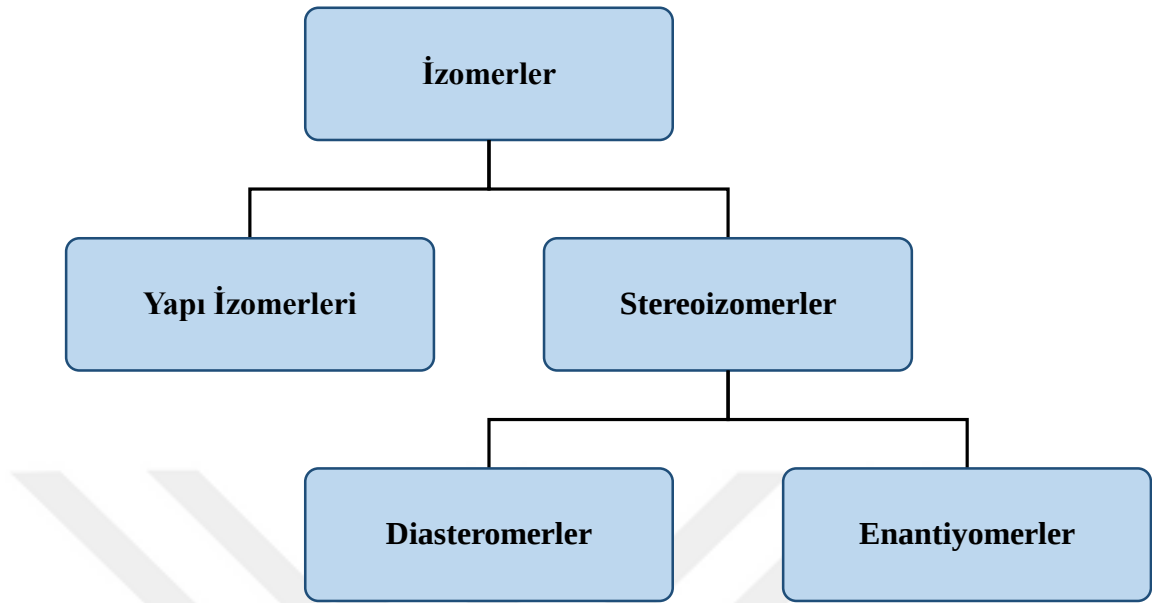
1. GİRİŞ

1.1. Stereokimya

Evrende özellikle de canlı metabolizmasında gerçekleşen kimyasal faaliyetler moleküller arasındaki üç boyutlu etkileşmelerin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kimya biliminin bir alt disiplini olan stereokimya, moleküllerin yapısını ve bu molekülleri meydana getiren atom veya grupların uzaydaki üç boyutlu (uzaysal) düzenlenmeleri ve bu düzenlemeler sonucunda ortaya çıkan farklılıkları inceleyen bir bilim dalıdır. Ön ek olarak stereo üç boyutlu anlamını geldiğinden stereokimya 3D kimyası olarak da bilinmektedir (Karadeniz 2007; Malyemez 2015).

Kiralite, bilimin birçok alanında önemli olan bir asimetri özelliğidir. İlk kez 1874 yılında birbirlerinden bağımsız olarak çalışan kimyacılar Hollandalı Van't Hoff ve Fransız Le Bel bir karbon atomuna farklı dört atom veya grubun bağlanmış olduğu moleküllere kiral moleküller adını vermişlerdir. Bu şekildeki karbon merkezi stereojenik merkez olarak tanımlamışlardır. Aynı zamanda stereojenik merkez; asimetric merkez, kiral merkez veya stereomerkez gibi farklı adlandırmalar şeklinde bilinmektedir. Birbirlerinin ayna görüntüleri olan moleküllere kiral moleküller denir. Kiralin kelime anlamı Yunancada el anlamına gelen “cheir” kelimesinden gelmektedir (İşbakan 2006).

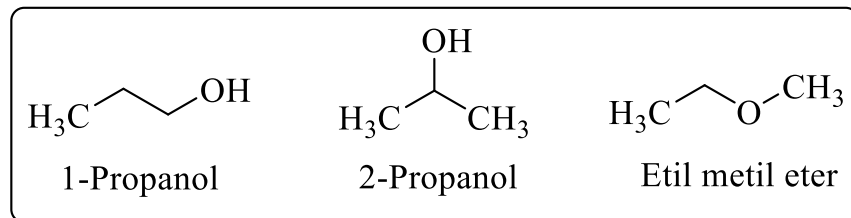
Eski yunanca da eşit anlamına sahip “isos” ve parça anlamına sahip “meros” kelimelerinin bir araya gelmesi sonucu oluşan izomer kavramı; aynı kimyasal formüle sahip olan ancak açık yapıları farklı olan bileşiklere denir. İzomerlerin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. İzomerlerin sınıflandırılması

1.1.1. Yapı izomerleri

Aynı molekül formülü ile gösterilen fakat atomların birbirlerine farklı bir düzen ile bağlanması sonucu meydana gelen iki ya da daha fazla farklı bileşiklere yapı izomerleri denir. Bu şekilde oluşan izomerlerde atomların birbirine bağlanma sıraları farklıdır. Her hangi bir bileşikte işlevsel bir grubun moleküle farklı konumlarda bağlanması yapı izomerisine sebep olmaktadır. C_3H_8O kapalı formülüne sahip bir bileşiğin üç yapı izomeri aşağıdaki gibidir (Şekil 1.2) (Fessenden *et al.* 2001).



Şekil 1.2. C_3H_8O 'nun yapı izomerleri

1.1.2. Stereoizomerler

Aynı atomlardan veya gruplardan oluşan ve birbirlerine aynı sıra ile bağlanmış olan, ancak uzaydaki üç boyutlu yapıları farklı olan moleküllere stereoizomer denir. Molekül ve ayna görüntüsü aynı olan stereoizomer çiftlerini bazı durumlarda kimyasal tepkimelerde ayırt etmek mümkün olmayabilir. Fakat molekülün fiziksel özellikleri incelendiği zaman bu bileşikler arasındaki farklar tanımlanabilmektedir (Aklan 2007).

Stereoizomerler iki gruba ayrılmaktadırlar.

- ❖ Diastereomerler
- ❖ Enantiyomerler

1.1.2.a. Diastereomerler

Kimyasal yapıları aynı olan fakat üç boyutlu uzaydaki konfigürasyonları farklılık gösteren, ayna görüntüleri birbirinin aynısı olmayan stereoizomere diastereomerler denir. Bu yapılar, bir bileşik içerisinde birden fazla stereo merkez var olduğu zaman karşımıza çıkan izomerik durumlardır. Diastereomerlerin kiral olan veya olmayan özellikleri birbirlerinden farklılıklar gösterebilirler. Yalnızca tek bir kiral merkezde meydana gelen değişikliğe sahip diastereomerler genel olarak epimerler şeklinde tanımlanmaktadır (Soyer 2007).

Diastereomerler; geometrik izomerlik ve konformasyon izomerliği olmak üzere kendi içerisinde iki farklı gruba ayrılmaktadır. Bileşiklerdeki değişmezlik anlamına gelen geometrik izomerlik, aynı zamanda yapıca izomerlik, E-Z izomerlik ve cis-trans izomerliği gibi isimlendirmelerle ifade edilmektedir. Bu tür izomerler her hangi bir bileşikteki fonksiyonel grupların oryantasyonunu tanımlamaktadır. Sadece iki molekül sınıfında bu yapılar görülür. Bunlar; halkalı moleküller ve alkenlerdir. Latince de “cis” aynı yönde anlamındayken, “trans” ise diğer yönde (farklı yönde) anlamına gelmektedir (Şekil 1.3) (Fessenden *et al.* 2001).



Şekil 1.3. 1,2-Dibromoetilenin cis ve trans gösterimi

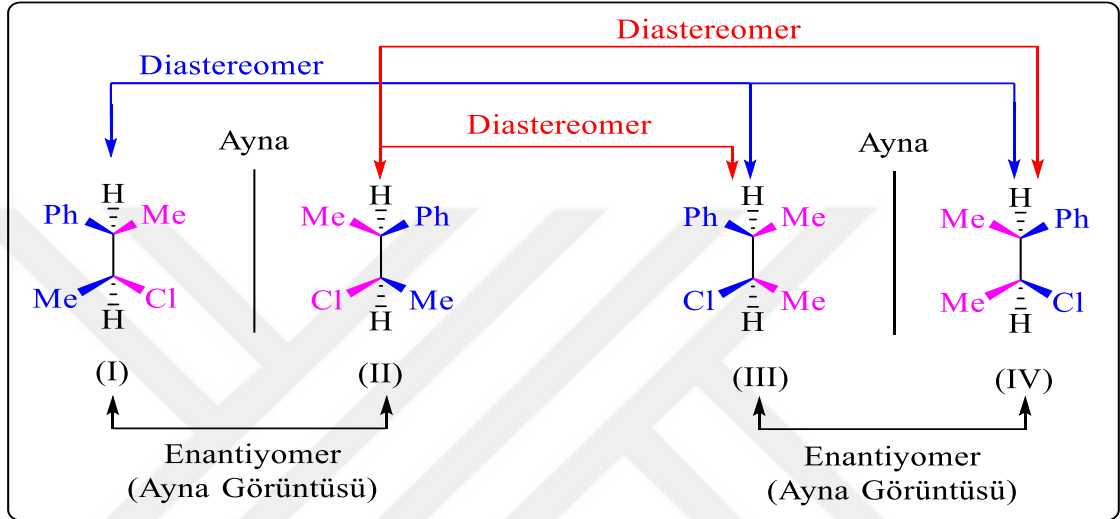
Diastereomerler, aynı kimyasal tepkimeleri gerçekleştirebilirler. Optikçe aktif olan moleküllerle diastereomerlerin vermiş oldukları reaksiyon hızlarında önemli derece de farklılık görülmektedir. Farklı biyolojik aktivitelere sahiptirler. Fiziksel metotlar kullanılarak birbirlerinden kolaylıkla ayrıştırılabilirler.

Diastereomerlerin; düzlem polarize ışığı çevirme yönleri, kaynama noktaları, çözünürlükleri, erime noktaları, düzlem polarize ışığı çevirme açıları birbirlerinden farklıdır. Özetle diastereomerler sanki birbirinden bağımsız iki farklı molekülmüş gibi özellik gösterirler (Solomons and Fryhle 2002; Aklan 2007).

1.1.2.b. Enantiyomerler

Bir ışık kaynağından gelen ışık demeti polarizör adındaki bir cihaz içerisinden geçirilmesi sonucu ışık dalgalarının sadece bir düzlemde titreşmesi sağlanmaktadır. Bu tür ışıklara düzlem polarize ışık denilmektedir. Optikçe aktif olan bileşikler polarize ışık düzlemini belirli bir açıda çevirebilirler. Elde edilen bu açıya optik dönme açısı denir. Bir molekülün optikçe aktiflik özelliğine sahip olabilmesi için kiral ya da enantiyomerlerden birinin oranının diğerinden daha fazla olması gerekir. Optik olarak aktif olan bütün moleküllerin optik çevirme açısı o molekül için spesifiktir ve maddeler için ayırt edici bir özelliktir. Sıcaklığa ve ışık cinsine göre değişiklik gösteren bir maddenin çevirme açısı, teorik bir şekilde hesaplanamaz. Ancak polarimetre cihazları yardımıyla ölçülebilmektedir (Atkins and Carey 1997; İşbakan 2006).

Bir bileşiğin sahip olduğu atomların sayısı, türü ve bağlanma şekilleri aynı ancak üç boyutlu uzayda düzenlenme şekilleri birbirlerinden farklı olan yapılara enantiyomerler denir. Bu tür yapılarda enantiyomerlerin ayna görüntüleri bir biri üzerine çakışmamaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Enantiyomer ve diastereomer gösterimi

Optik olarak aktif olan her molekülün iki tane enantiyomeri bulunmaktadır. Bu moleküllerin optik döndürme açıları rakam olarak aynı fakat çevirme açısı işaretleri (+ veya -) zıt işaretlerle gösterilmektedirler. Aynı zaman da Chan-Ingeld-Prelog adlandırmasına göre bir tanesi (*R*) ile diğeri ise (*S*) enantiyomerik konfigürasyon şeklinde verilmektedir (Bakış 2007).

Kiral olarak farklılık göstermelerine rağmen enantiyomerlerin, kaynama ve erime noktaları, çözünürlük, yoğunluk ve birçok spektroskopik dataları gibi fiziksel özellikleri aynıdır. Ancak fiziksel metotlar kullanılarak bu enantiyomerleri birbirinden ayırmak çoğu zaman mümkün değildir.

Enantiyomerler farklı biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bu durumun ortaya çıkma sebepleri arasında enantiyomerlerin üç boyutlu uzaydaki düzenlenmeleri ve diğeri kiral

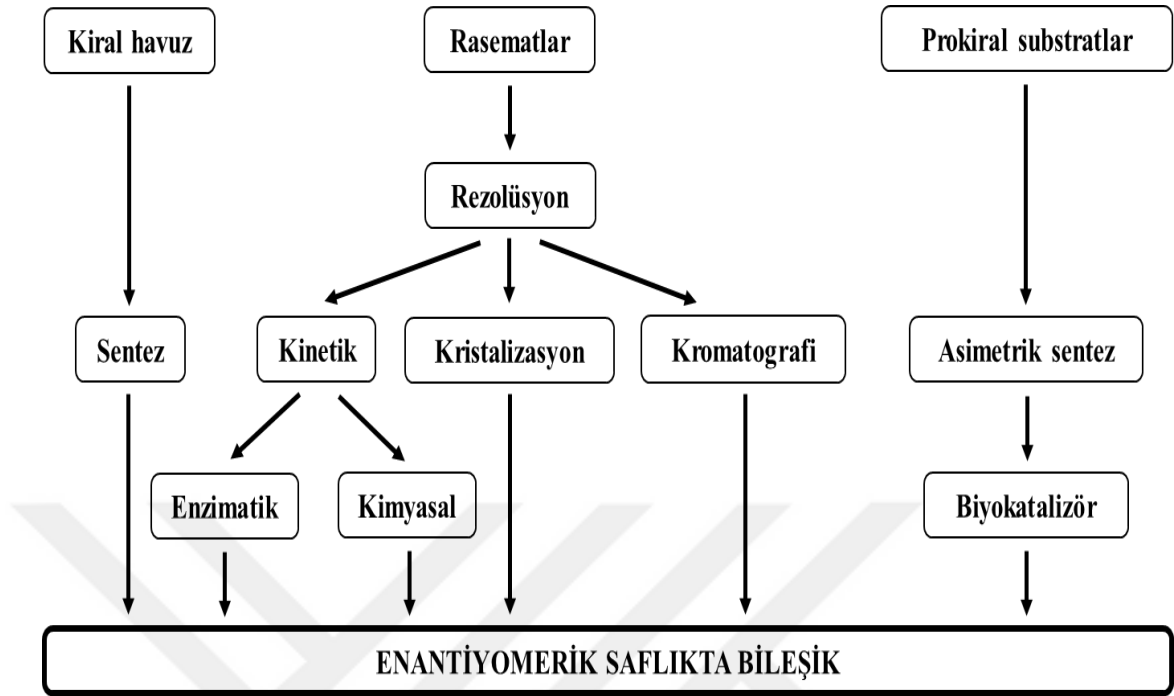
bileşiklerle etkileşmelerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Solomons and Fryhle 2002, Aklan 2007).

Moleküler düzeyde simetrinin biyolojik olaylara egemen olmasından dolayı kiralitenin biyolojik aktivitedeki önemi artmaktadır. Biyoaktivitenin olabilmesi için kiralite olması gerekmektedir. Fakat kiral merkeze sahip olan biyoaktif bileşiklerdeki enantiyomerlerin göstermiş oldukları aktivitelerde büyük oranda farklılıklar meydana gelmektedir. Bu durum ilaç, tarım ve gıda gibi sektörlerde endüstriyel olarak kullanılan bütün biyoaktif molekülerde karşımıza çıkmaktadır. Canlı metabolizmasının moleküler bileşenleri de genelde kiral olduklarından dolayı kiralite olgusu bu bileşiklerin biyoaktif maddelerle vermiş oldukları reaksiyonlarda etkin bir rol oynamaktadır (Sheldon 1993). Özellikle ilaçlar da biyolojik olarak bir enantiyomer aktiviteye sahip iken diğer enantiyomer aktif olamayabilir. Hatta çoğunlukla toksik bir etki dahi göstermektedir. Bu yüzden ilaç endüstrisinde enantiyomerik saflıkta ürünler sentezlemek büyük bir önem arz etmektedir (Kordikowski *et al.*1998).

Eşit oranlarda enantiyomer bulunduran çözeltilere rasemat denir. Her iki enantiyomeri içeren bir çözeltiden enantiyomerlerin saf bir şekilde elde edilmesi olayına da “rezolüsyon” denir. Rezolüsyon işlemleri aşağıdaki gibi beş grupta sınıflandırılabilir.

- ❖ Enantiyomerleri kristallendirerek ayırma
- ❖ Rasematın asimetrik transformasyonu
- ❖ Dinamik kinetik rezolüsyon
- ❖ Enantiyomerleri diastereomerlere dönüştürme
- ❖ Kinetik rezolüsyon

Enantiyomerik olarak zenginleştirilmiş veya enantiyomerik saflığa sahip moleküllerin sentezlenmesinde kullanılan yöntemler genellikle başlangıç maddeleri olan prokiral substratlar, kiral substratlar ve rasemik karışımların türüne göre üç guruba ayrılmaktadır. (Şekil 1.5) (Ghanem and Aboul-Enein 2004).

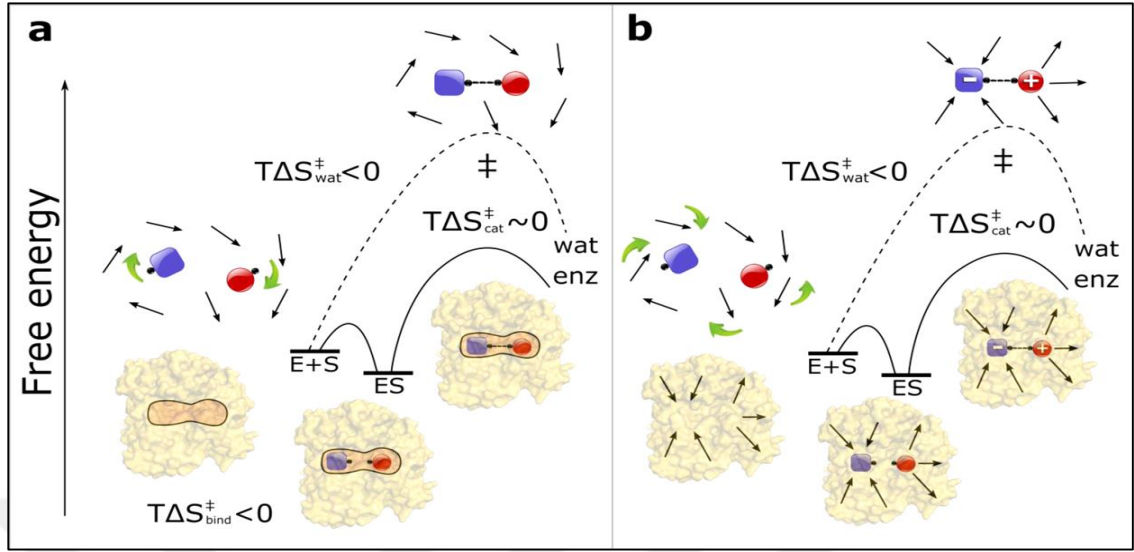


Şekil 1.5. Enantiyomerik olarak saf moleküllerin elde edilme yöntemleri

1.2. Enzimler

Canlıların yaşamı için iki ana koşul vardır. Bir, hayatını devam ettiren varlıklar kendi kopyasını yapabilme yeteneğine sahip olmalıdır. İki, organizmalar yeterince ve spesifik olarak kimyasal tepkimeleri katalizleyebilmelidir. Biyolojik sistemlerde katalizör olarak görev yapan enzimler; metabolizmadaki tüm işlemler sonucunda değişmeden reaksiyonların hızını artıran, enerjinin bir formunu başka forma dönüşümünü gerçekleştiren, protein yapısındaki biyolojik materyallerdir (Nelson and Cox 2004).

Enzimler etkilerini iki farklı şekilde gösterirler. Birincisinde; katalizleme reaksiyonu esnasında meydana gelen enerji değişimi açısından değerlendirilir. Katalizlenmiş reaksiyondan farklı olarak enzimler, enerji açısından tercih edilen alternatif bir reaksiyon yolu sağlarlar. İkincisinde ise aktif merkezin kimyasal açıdan katalizleme işini nasıl gerçekleştirdiği açıklanır.



Şekil 1.6. Bir enzimin $T\Delta S^\ddagger$ bariyerini azaltma yolları

a) Sudaki entropi düşüşü reaktantların sıralanması ile baskın hale gelirse, enzim bu engeli substrat enzim üzerinden geçer. Reaksiyon entropi düşüşü olmaksızın devam eder. **b)** Çözücü reorganizasyonu ile suda $T\Delta S^\ddagger$ baskın halde ise; enzim aktif merkezinin pre-organizasyonu ile engeli ortadan kaldırır. Bu noktada bağlanma entropisinin aktivasyon entropisi ile ilişkilendirilmesine gerek yoktur (Aqvist *et al.* 2017).

Bütün canlı organizmalar tarafından üretilen ve katalitik RNA molekülleri hariç protein yapısında olan enzimler, sayısız biyokimyasal reaksiyonlar için katalizör olarak görev yaparlar. Enzimler sadece *in vivo* şartlarda biyolojik katalizör olarak değil aynı zamanda *in vitro* şartlarda endüstrinin birçok alanında çeşitli reaksiyonlar için katalizör görevi üstlenirler (Jegannathan and Nielsen 2013). Bu zamana kadar bilinen yaklaşık 5500 enzim bulunmaktadır. Enzimler katalizledikleri reaksiyon türlerine göre altı ana sınıfa ayrılırlar (Çizelge 1.1) (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve biyokimyasal fonksiyonları

Enzim Sınıfı	Biyokimyasal Fonksiyonu
Oksidoredüktazlar	Substratlar arasındaki Redoks (indirgenme-yükseltgenme) reaksiyonlarını katalizler
Transferazlar	Hidrojen (H) atomu dışındaki Karbon (C), Fosfor (P) ve Azot (N) ihtiva eden grupların bir molekülden diğer bir moleküle transferini katalizler
Hidrolazlar	Ester, eter, peptit, glikozid, asit anhidrit, C-C, C-halojenür veya P-N gibi kimyasal bağlara su sokarak bağların parçalanmasını sağlayan hidroliz reaksiyonlarını katalizler
Liyazlar	Hidroliz reaksiyonlarından farklı bir mekanizma kullanarak substratlardan grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizler
İzomerazlar	Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirlerine dönüştürüldüğü reaksiyonları katalizler
Ligazlar	ATP ve GTP gibi enerji açısından yüksek enerjili fosfatlı moleküllerden fosfat bağının parçalanması ile açığa çıkan enerjiyle iki molekülün birbirine bağlandığı reaksiyonları katalizler.

Enzimlerin en önemli özellikleri çok spesifik ve güçlü katalizör olmalarıdır. Biyokatalizörler geleneksel kimyasal katalizörlere göre birçok avantaja sahiptir. Bunlar;

- ❖ Yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilirlik
- ❖ Biyolojik bozunabilirlik
- ❖ Nispeten ılımlı pH ve sıcaklık koşullarında çalışabilme özellikleri
- ❖ Hem substrat hem de ürün stereokimyasında seçicilik

Enzimler tıp, ilaç, gıda işleme, kozmetik, kimya endüstrisi, tarım, biodizel üretimi, tekstil, deterjan, hayvan yemi üretimi ve enerji de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılırlar (Jemli *et al.* 2016).

1.3. Peroksidazlar (POD)

Peroksidazlar, çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin yükseltgenmesi ve hidrojen peroksit gibi peroksitlerin indirgenmesi gibi birçok reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır. Bir başka deyişle redoks (indirgenme-yükseltgenme) tepkimelerini katalize eden enzim sınıfının da yer alan bir enzimdir (Bansal and Kanwar 2013). Peroksidaz enzimi International Union of Biotechnology (Uluslararası Biyoteknoloji Derneği) tarafından E.C 1.11.1.7 şeklinde verilmiş olan bir kod numarasına sahiptir.

Bayır turpundan (HRP) saflaştırılan peroksidaz enziminin üç boyutlu yapısı incelendiği zaman, prostetik grubu olarak hem (ferriprotoporfirin IX) grubuna sahip bir holoenzim olduğu görülmektedir (Welinder and Smillie 1972). HRP’de 8 asparagin rezidüsüne bağlı sekiz nötr karbohidrat yan zincirine sahip 308 amino asit kalıntısı bulunmaktadır. Ayrıca iki kalsiyum atomu hem bölgesine distal ve proksimal pozisyonlarda olacak şekilde yerleşmiştir. HRP’nin karbohidrat kısmı, tüm molekül ağırlığının yaklaşık % 18’ini oluşturmaktadır. Prostetik grup olarak hem grubu; bir tanesi proksimal pozisyonda histidin 170, diğeri ise distal pozisyonda histidin 40 olmak üzere 2 tane histidin rezidüsü ile koordineli bir şekilde enzimin aktif merkezinde bulunmaktadır (Ngo 2010).

Ana kaynak olarak mantarlarda, bitkilerde, bakterilerde ve hayvanlarda bulunan hem peroksidazları; birbirini izleyen benzerliğin ışığında aşağıdaki gibi iki ana sınıfta ayrılmaktadırlar (Rompel *et al.* 2007).

- ❖ Mantar, bitki, ve bakteri peroksidazları
- ❖ Hayvan peroksidazları

Bitki peroksidaz üst familyası kendi arasında 3 sınıfa ayrılmaktadır (Çizelge 1.2) (Hiraga *et al.* 2001).

Çizelge 1.2. Peroksidaz familyasının sınıflandırılması

Süper Aile	Enzim	Kaynak	Moleküler Kütle (kDa)
Hayvan Peroksidazları	Eosinophil Peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	78-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutasyon Peroksiaz	Hayvan	6-22
		Bitki	75-112
	Prostaglandin 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)	Mangan Peroksidaz	Mantar	43-49
	Ligninaz	Mantar	40-43
	Peroksidaz (POD)	Bitki	28-60

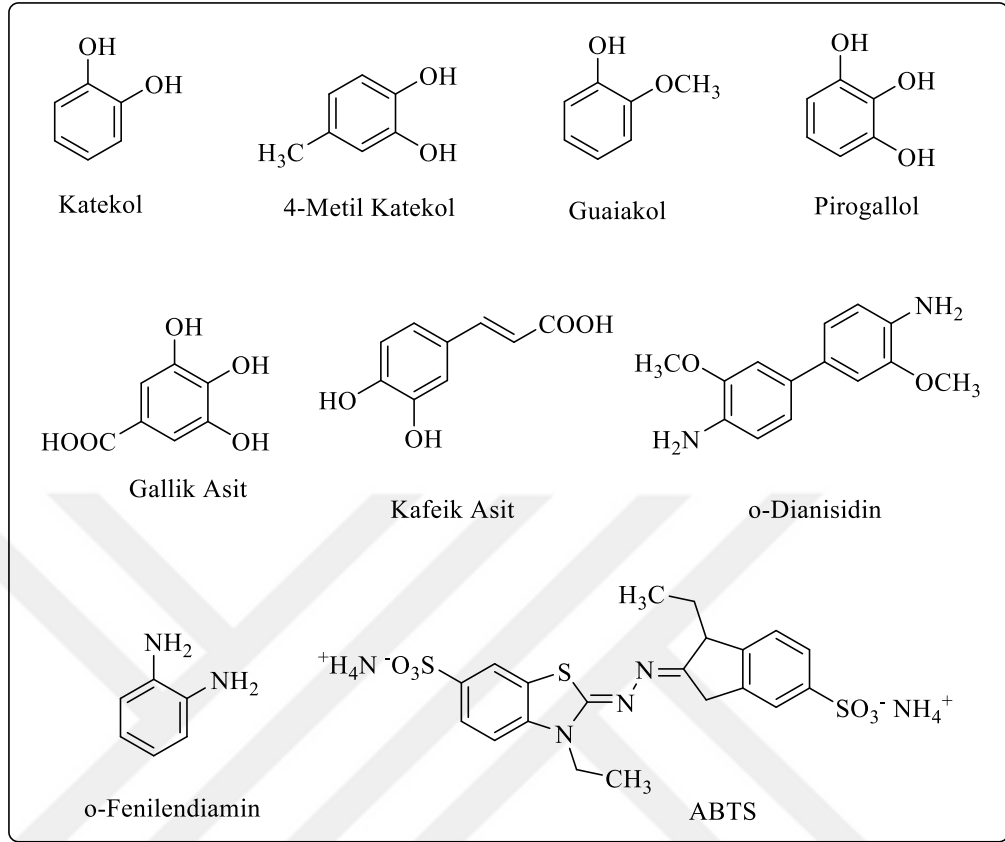
Bitkisel kaynaklarda peroksidaz enzimleri kısmen hücre duvarına bağlı olarak çözünmez halde, kısmen de sitoplazma da çözünmüş olarak bulunabilmektedir. Ancak genel anlamda hücrenin tüm kompartımanlarında ve organellerinde fizyolojik şartlara göre değişkenlik gösteren miktarlarda ve aktivitelerde tespit edilmiştir (Akyol 2004; Cemeroğlu 2011).

POD; H₂O₂ varlığında hem organik hem de inorganik substratların oksidasyonunu katalizlemektedir. Buna ek olarak hidrokinonid aminler, fenoller ve hidrokinonlar gibi fenolik olan veya olmayan birçok organik molekülün dehidrogenasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu tür organik moleküllere; 2-toluidin, 4,4'-diaminodifenilen amin,

lökomaşıit yeşili, propiyonil promozin, o-tolidin, 2-kresol, benzidin, ve bazı azo boya türevleri örnek olarak verilebilir (Fodil *et al.* 2012).

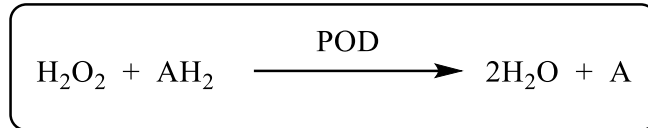
Peroksidaz enzimi tarafından o-dianisidin, guaiakol, ABTS, katekol, pirogallol gibi aromatik moleküller substrat olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.7). POD aktivitesi ölçmede kullanılacak olan ideal bir indirgeyici substrat, mümkün olduğunca aşağıdaki özelliklere de sahip olmalıdır (Kampis *et al.* 1984; Robinson *et al.* 1987; Ngo 2010).

- ❖ Kimyasal stabilitesi yüksek olmalı
- ❖ Kanserojen olmamalı
- ❖ Tanımlanmış bir oksidasyon ürünü olmalı
- ❖ POD ile oksidasyonu çözeltinin pH'sından bağımsız olmalı
- ❖ Reaksiyon ürünleri kolaylıkla ölçülebilmeli
- ❖ Suda çözünürlüğü iyi olmalı
- ❖ 500 nm'den daha büyük dalga boyunda maksimum absorpsiyona sahip oksidasyon ürünlerinin yüksek ekstiksiyon katsayısı olmalı



Şekil 1.7. Yaygın olarak kullanılan peroksidaz substratları

H_2O_2 varlığında POD tarafından katalizlenen tepkimeler birkaç basamakta gerçekleşen oldukça kompleks reaksiyonlardır. Bu yüzden bu tepkimeleri basit bir şekilde göstermek için aşağıdaki gibi genel bir denklem verilmektedirler (Van Huystee 1987).



Şekil 1.8. Peroksidaz enziminin katalizlediği kimyasal reaksiyon

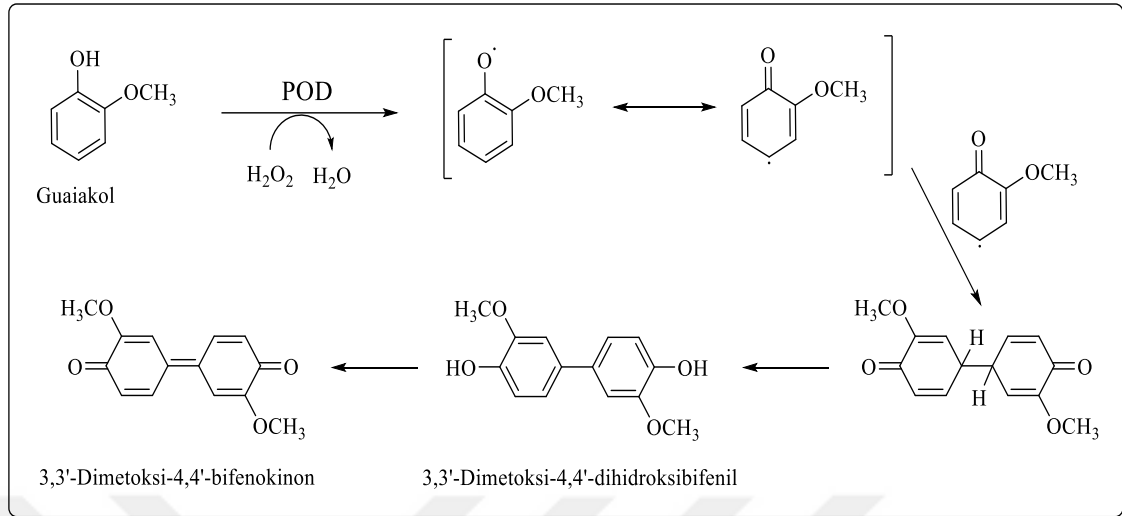
Biyolojik sistemlerde metabolik olaylar esnasında oksitleme özelliğine sahip H_2O_2 molekülleri oluşmaktadır. Metabolizma için oldukça zararlı olan bu molekül hızlı bir şekilde su moleküllerine indirgenerek zararsız bir ürün haline getirilmelidir. Bu işlem hücre içerisinde katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan özelliğe sahip enzimler tarafından

gerçekleştirilmektedir. Canlı metabolizmasındaki H_2O_2 seviyesi peroksizomlarda katalazlar tarafından kontrol edilirken, hücrenin diğer kompartımanlarında bu görev POD enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Halliwell 1984).

POD biyokimyasal açıdan farklı özellikleri bulunan birden fazla izoenzime sahiptir. Bu farklılıklar enzimin optimum pH, substrat ilgisi, spesifik aktivite, kofaktörler ve inhibitörlere karşı tutumu gibi biyokimyasal özelliklerden kaynaklanmaktadır.

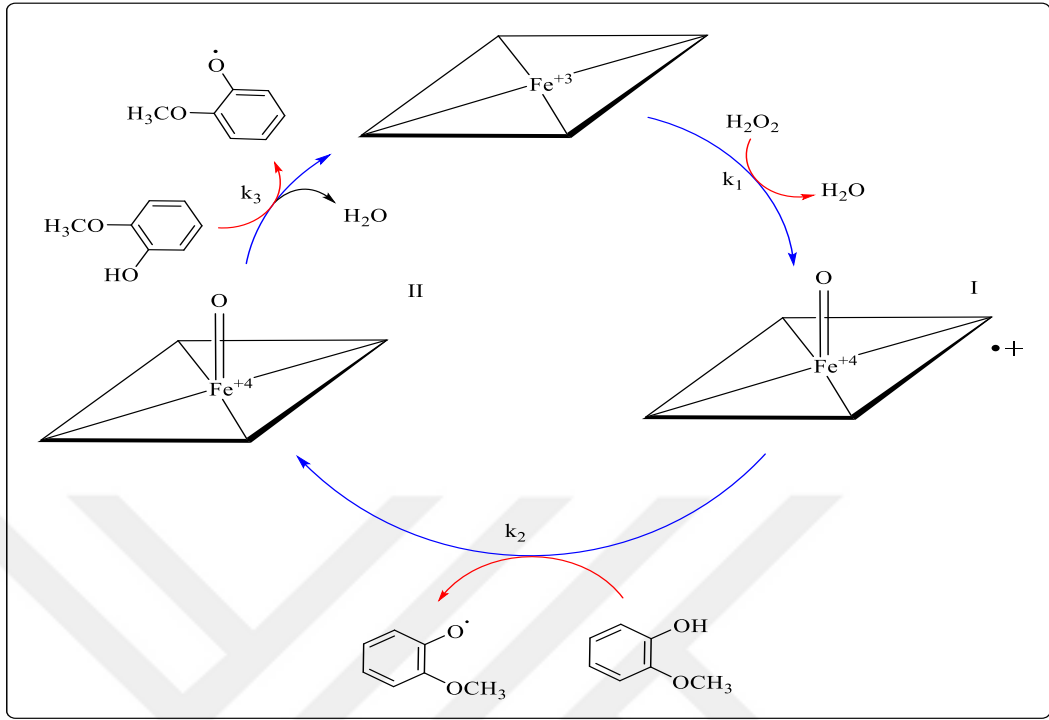
Protein yapıları, enzimatik reaksiyonlar ve enzim fonksiyonu çalışmalarında peroksidazlar sık sık model enzim olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak bu kadar çok tercih edilmelerinin sebepleri arasına; enzimler için sıkıntılı olan artan sıcaklıklarda stabil olması ve aktivitelerinin basit kromojenik yöntemlerle kolayca ölçülebilmesi verilebilir (Hiraga *et al.* 2001).

Biyolojik çalışmalarda substrat olarak guaiakolün ilk defa kullanımı 1809 yılında yapılmış olan bir renk reaksiyonudur. Ancak bu durum bundan yaklaşık olarak 100 yıl sonra peroksidaz terimi ile bağdaştırılmıştır. 100 yıl sonra gelen bu bağdaştırma ilk kez bayır turpundan (HRP) saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılmıştır. Daha sonraları yapılan çalışmalar neticesinde peroksidaz substratı olarak kullanılan guaiakolün yükseltgendiği reaksiyon mekanizması aydınlatılmıştır. Reaksiyon mekanizmasına göre guaiakolün yükseltgenmesi sonucu renkli 3,3'-dimetoksi-4,4'-bifenokinon bileşiğinin oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 1.9) (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.9. Guaiakolün yükseltgenme mekanizması (Van Huystee 1987)

Peroksidaz enziminin reaksiyon mekanizmasının aydınlatılması kapsamında yapılan çalışmalar neticesinde H_2O_2 'nin suya indirgendiği ve substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgendiği reaksiyon mekanizmasının 3 basamakta gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Reaksiyonun birinci basamağında; peroksidaz enzimi peroksitin bir ekivalentiyle tepkimeye girerek bileşik I olan Fe(IV) içeren porfirin katyon radikalini oluşturur. Meydana gelen tepkime H_2O_2 'nin suya indirgendiği ve enzimin yükseltgendiği bir redoks reaksiyonudur. İkinci basamakta bileşik I (katyonik radikal hali) Fe(IV) haline indirgenmek için ortamda bulunan substrattan bir proton alır. Bir protonunu kaybeden substrat böylece radikalik hale dönüşür. Bunun sonucunda oluşan bileşik II merkezinde oksiferril olan bir porfirindir. Üçüncü ve son basamakta ise ortamda bulunan substrattan tekrar bir proton koparan bileşik II indirgenerek tekrar ilk durumdaki eski haline geri döner. Ortamda bulunan ve bir protonlarını kaybetmiş radikalik formdaki substratlar birbirleriyle etkileşerek polimerizasyon reaksiyonları verirler (Şekil 1.10) (Veitch 2004).



Şekil 1. 10. Peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması

Bitkilerdeki metabolik olayların gerçekleşmesinde peroksidazlar önemli fonksiyonlar üstlenmişlerdir. Bunlar;

- ❖ POD reaksiyonları sonucu meydana gelen hidroksil radikalleri tohumdaki kabuğun parçalanmasını ve hücre çoğalmasına yardımcı olmaktadır. Böylece peroksidazlar tohumun çimlenmesi süresince koruyucu olarak görev yapmaktadır (Passardi *et al.* 2004).
- ❖ Hücre duvarlarının içyapısında meydana gelen değişiklikler POD tarafından gerçekleştirilen hidroksilik veya peroksidatif döngüler ile meydana gelmektedir. Buda hücre uzama süreci ve hücre duvarı yumuşamasının peroksidazlar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Passardi *et al.* 2004).
- ❖ Peroksidazlar; patojen saldırısı, yaralanma ya da birçok olumsuz çevresel faktörler gibi dış etmenlere karşı cevap olarak bazı tepkiler gösterirler. Bu tepkileri gösterirken fenolik yapıdaki moleküllerin çapraz olarak bağlanabilmesi için gerekli olan ön şart hücre duvarındaki H_2O_2 varlığını kontrol altında tutabilmektir (Passardi *et al.* 2004).

- ❖ Hücre duvarı POD'ları, makromoleküllerin polimerizasyonu gerçekleştirerek ekstrasellüler yüzeyde birikmelerini sağlamaktadır. Bu sayede patojen istilas ve hücre genişlemesi sınırlandırılarak hücre duvarı kuvvetlendirilir ve bitki gövdesi yapısal olarak desteklenmiş olur (Hiraga *et al.* 2001).
- ❖ Peroksidazların oksinin inaktivasyon işlemi ile oksidatif dekarboksilasyon gerçekleştirmesi oksin metabolizmasında da görev aldığını göstermektedir (Hiraga *et al.* 2001).
- ❖ Peroksidazların patojenlere karşı savunma da önemli görevler aldığı bilinmektedir. Bu görevlerden ilki hidroksiprolin, suberin ve lignince zenginleştirilmiş glikoproteinleri ihtiva eden hücre duvarı fiziksel yapısını kuvvetlendirmek. İkincisi antimikrobiyal ajan ya da sinyal aracı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini artırmak. Son olarak ise fitoaleksinlerin üretilmesini artırmaktır (Kay and Basile 1987).
- ❖ Yüksek oranlardaki hidrojen peroksit konsantrasyonlarını düşürürken süper oksit radikali konsantrasyonlarını artıran peroksidazlar yaşlanmayı teşvik ettiği ortaya çıkmaktadır. Bu da POD'ların bitki dokularında yaşlanma ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Kawano 1998)
- ❖ Peroksidazlar; hücre duvarı yumuşamasından kaynaklanan hücre genişlemesini önlemek için sert ekstensin çapraz bağları meydana getirirler (Brownleader 2000).
- ❖ Bütün organize meristemlerde bulunduğu belirlenmiş POD'lar bitkilerde organogenezde de rol oynadığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra peroksidazların; ligninleşme, hücre bölünmesine yardımcı olma, yaprak ve stamen gelişim, aksial organizasyonunun saptanması, trakeal elementlerin büyümesi ve kallus oluşumu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Kay and Basile 1987).
- ❖ Peroksidazlar, FADH₂, NADPH ve NADH gibi indirgeme özelliğine sahip ajanlardan elektronları oksijene transfer ederek oksidant olarak görev yapabilirler. Bu sayede peroksidaz aktivitesi H₂O₂ ve O₂ üretimi neticesinde sonuçlanmış olur (Minibaeva and Gordon 2003).

Aynı zamanda yukarıda anlatılanlardan farklı olarak POD'lar; fenolik bileşik oksidasyonu (Fry 2004), reaktif azot türlerinin metabolizması (Almagro *et al.* 2009),

suberin ve lignin oluşumu (Passardi *et al.* 2007), fitohormon metabolizması (Cosio and Dunand 2009), meyve ve sebzelerin büyüme dönemleri boyunca indoleasetik asit miktarının ayarlanması (Agostini *et al.* 1997), oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000) ve hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) gibi bitki hücreleri için hayati öneme sahip metabolik olaylarda da görev almaktadır.

Endüstriyel faaliyetlerden ortaya çıkan büyük miktardaki kirleticiler, çevre ve ekolojik dengeye yönelik bir tehdit oluşturmaktadır. Peroksidazlar, çevre kirliliğini azaltma potansiyeline sahip enzimlerden bir tanesidir. Özellikle atık suların arıtılmasında kullanılmaktadır. POD'ların biyokataliz reaksiyonları ile çevre kirleticilerin yönetimi için birçok uygulamaları vardır. Bunlar; sentetik boyaların renksizleştirilmesi (Ong *et al.* 2011), fenolik kirletici maddelerin ve ilgili bileşiklerin giderilmesi gibi atık suların biyoremediasyonu (Hamid and Rehman 2009), endokrin bozucu kimyasalların uzaklaştırılması (Zheng and Colosi 2011), poliklorlu bifenillerin indirgenmesi (McCauley *et al.* 2006), klorlu alkanlar ve alkenlerin bozulması (Yadav *et al.* 2000), fenoksi alkanoik ve triazin herbisitlerin bozulması (Bending *et al.* 2002), klorlu insektisitlerin bozulması (Quintero *et al.* 2008), klorlu dioksinlerin indirgenmesi ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımıdır (Khalid *et al.* 2009).

Enzimlerin kimyasal ve biyokimyasal analizde kullanılmasının başlıca avantajları vardır. Bunlar; enzim katalizli reaksiyonların seçiciliği, çok düşük analit konsantrasyonlarda reaksiyonların gerçekleşebilmesi, düşük reaksiyon sıcaklığı, genel olarak reaksiyon ortam sıcaklığında daha güvenli bir reaksiyon ortamı olarak suyun kullanılmasıdır. Peroksidaz enzimleri hidrojen peroksitin varlığının kontrolü, hücre metabolitlerinin belirlenmesi ve biyosensör olarak kimyasal ve biyokimyasal analizler de kullanılmaktadırlar (Boltz and Howell 1978; Jungreis 1997; Ngo 2010).

Peroksidazların başka bir önemli fonksiyonu da organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılmasıdır (Adam *et al.* 1999a).

Hidrazitler, peroksidaz inhibitörleri olarak bilinen bileşiklerdir. Çeşitli hidrazin ve hidrazin türevleri, iproniazit (sakinleştirici), mebanazin, izokarboksazit, fenelzin (monoamin oksidaz inhibitörleri), hidralazin (tansiyon düşürücü) ve PHZ (fenilhidrazin; polisitemi kontrolü), izoniazid [INH (izonikotinik hidrazit) tüberküloz antibiyotik] terapötik olarak kullanılmıştır. Ancak bu bileşiklerin pek çoğu uzun süreli kullanımda karaciğer hasarı, baz çifti mutasyonları, hemolizise yol açan yan etkilere yol açtığından ilaç olarak kullanılmamaktadır. Hidrazinler ve hidrazit 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'de oto-oksidasyona maruz kaldığından, terapötik bir madde olarak uygun değildir. Bunun aksine, INH'nin oto-oksidasyonu pH 7,0'de 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. Alerjik ve otoimmün sendromlar içeren ciddi yan etkilerine rağmen, INH hala tüberküloz tedavisi için dünya çapında birincil ilaçtır. INH için görülen yan etkiler, ilaç olarak metabolik olarak aktif hidrazitlerin kullanılması ile ortaya çıkan problemlerin görünmesine olanak sağlamaktadır (Aitken *et al.* 2003).

1.4. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, protein saflaştırması çalışmalarında kullanılabilecek en güçlü yöntemlerden bir tanesidir. Yıllar boyunca bu konuyla ilgili birçok sayıda kitap yazılmış ve afinitenin teorisi ile ilgili birçok yorumda bulunulmuştur (Mohr and Pommerening 1985; Turkova 1993). Afinite kromatografisi yıllar boyunca deneysel bir ayırma prosedürü olarak kullanılmış olmasına rağmen biyospesifik bir teknik olarak kullanımı yaklaşık 20 yıl önce başlamıştır (Wilchek *et al.* 1984). Bu metotda saflaştırılan biyomoleküllerin bir veya birden fazla biyolojik özelliklerinden yararlanılır. Afinite kromatografisinde biyospesifik bir ayırım için moleküllerin izoelektrik nokta,

hidrofobiklik veya boyut gibi genel özelliklerinden faydalanılmaktan ziyade biyomoleküller arasındaki spesifik dönüşümlü etkileşimler kullanılır (Ostrove 1990).

Afinite kromatografisi, neredeyse tüm biyomoleküllerin özel kimyasal yapılarını ya da metabolik fonksiyonlarını temel alarak saflaştırma olanağı sağlamaktadır. Diğer kromatografik metotlara göre gelişimi çok sonraları olmasına rağmen uygulama alanları çok hızlı bir şekilde artmaktadır.

Afinite kromatografisinin en fazla kullanıldığı metabolik sistemler Çizelge 1.3'de verildiği şekildedir (Axen and Ernback 1971).

Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler

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

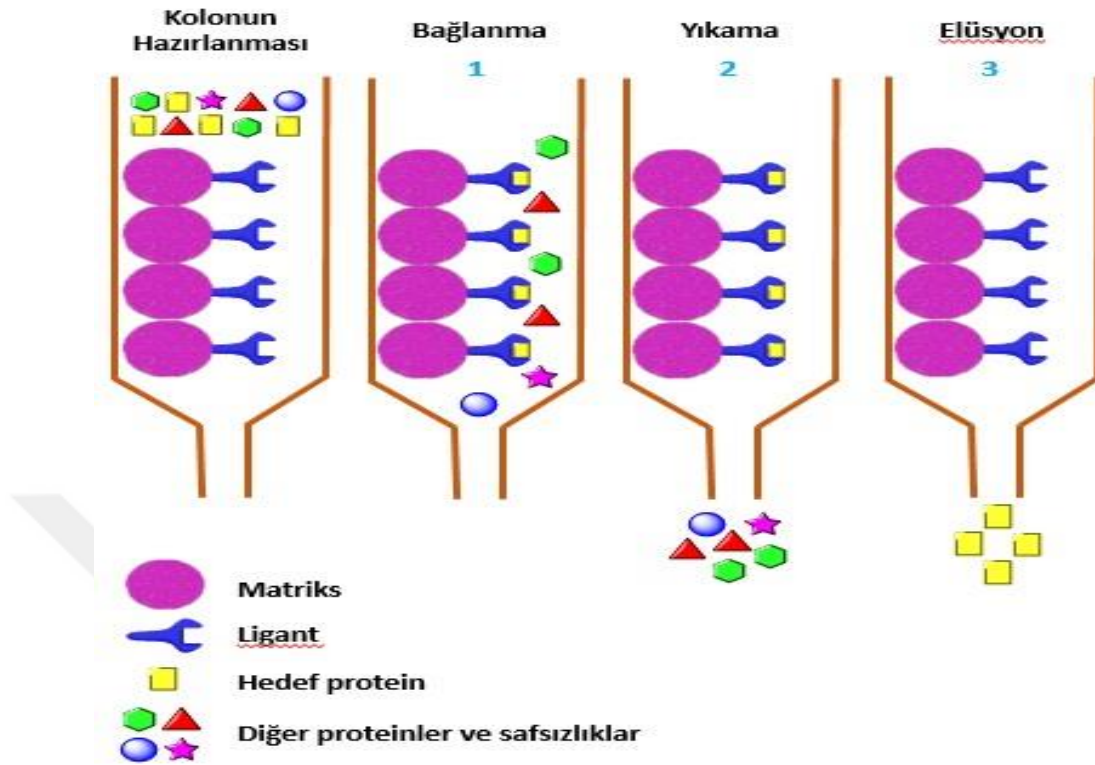
Adsorpsiyon kromatografisi özelliğine sahip olan afinite kromatografisi, saflaştırmak istediğimiz molekülün ligant adı verilen komplementer bağlanma bileşiğine tersinir ve spesifik olarak bağlandığı bir tekniktir. Bu teknikte ligant kolonun sabit fazını yani dolgu maddesini oluşturan matrikse kovalent olarak bağlanmıştır. Afinite tekniğinin diğer tekniklerden ayıran önemli avantajları vardır. Bunlar; saflaştırma işlemi birden fazla basamak isteyen materyallerin tek kademe saflaştırma, zamandan tasarruf ve saflaştırması neredeyse mümkün olmayan materyallerin saflaştırma kolaylığı sağlamasıdır. Yüksek seçicilik sayesinde afinite kromatografisinde yüksek verim ve saflaştırma katsayısı elde edilmektedir.

Afinite kromatografisi aşağıda verilen üç ana amaç doğrultusunda kullanılmaktadır.

- ❖ Karışım halindeki biyolojik bir materyalden istenilen maddeyi izole etmek için
- ❖ Bazı biyolojik maddelerin denatüre olmuş formlarının denatüre olmamış (aktif) formlarından izole etmek için
- ❖ Küçük orandaki biyolojik molekülleri büyük orandaki safsızlıklardan ayırmak için

Bir saflaştırma etkinliğinin meydana gelebilmesi için gerekli olan bazı biyolojik özellikler vardır. Bunlardan ilki reseptörler veya enzimler gibi diğer molekülleri tanıyan özel şekillenmelerdir. İkincisi ise diğer moleküllere bağlanabilen veya etkileşebilen biyomoleküllerin belirli bölgelerindeki ya da pH'daki değişimler sonrasında konformasyonlarda meydana gelen özel değişimlerdir (Ostrove 1990).

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.11'de özetlenmiştir. Bu prensibin birinci basamağında matrikse ligant kovalent bir bağ ile bağlanır. İkinci basamakta ise saflaştırılmak istenen molekül liganta adsorbe edilip, safsızlıklar uzaklaştırılır. Son basamakta ise kolona tutunmuş olan molekül uygun bir metot ile elüe edilerek toplanır.



Şekil 1.11. Afinite kromatografisinin genel prensibi

1.4.1. Matriks

Diğer kromatografik motodlarda kullanılan destek materyallerinde olduğu gibi, afinite kullanılan matrislerin de belirli kriterleri taşıması gerekmektedir. Afinite matrislerinden istenen özellikleri şunlardır: İnert olmalı, hidrofolik olmalı, biyobozunur olmamalı, kimyasal ve fiziksel olarak dayanıklı olmalı, kolayca türetilmeli, geniş kolanlarda kolayca paketlenmeli ve makro gözenekli olmalıdır (Janson and Kristiansen 1990).

Afinite matrislerini seçerken yüksek kütle transfer katsayısı ve adsorban yatağı, adsorpsiyon kapasitesi ve yüksek sıvı akış hızından oluşan bu üç özelliğe dikkat edilmelidir (Katoh 1987). Destek malzemesinin gözenek boyutu, partikül büyüklüğü, gözenek hacmi ve gözenek yüzey alanı gibi fiziksel özellikler kromatografi kolonu içinde çözünen maddelerin kütle transfer oranını ve etkin ligant bağlama kapasitesini belirlemede yardımcı olmaktadır (Narayanan *et al.* 1990).

Destek malzemelerinin spesifik gözenek büyüklüğüne dayanarak, afinite matriksleri dört ana kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar;

- ❖ 40×10^6 Daltona kadar bir molekül ağırlığı sınırına sahip makro gözenekli olan agaroz gibi yumuşak veya rijit olmayan destek malzemeler (Unger 1990)
- ❖ Kalıcı bir gözenekliğe sahip silika, alümina veya zeolitler gibi sert destek malzemeler (bu materyaller, buharlara maruz kaldıklarında veya sıvılara daldırıldığında gözenekli hallerini korurlar ve 60-5000 Å arasında değişen gözenek boyutlarında bulunurlar) (Desilets *et al.* 1991)
- ❖ Polimer veya silikadan yapılmış gözeneksiz mikro parçacıklı malzemeler (Hashimoto 1991)
- ❖ Solventlerin partikülün çapına bir konvektif akış ve geniş yüzey alanı sağlayan bazı küçük difüzyif gözeneklerden nüfuz etmesine izin veren bazı büyük gözeneklerden yapılmış yeni bir polimerik malzemeler (Afeyan *et al.* 1991)

Sephadex, sepharose, biyojel gibi ticari olarak satılan birçok kolon dolgu maddesi afinite kromatografisinde matriks olarak kullanılmaktadır. Bu jeller içerisinde en çok tercih edilen inci gibi dizilmiş agaroz jeli olan sepharosedur. Kullanılan bu jel saflaştırma işlemi için bir matrikste bulunması gereken bütün özellikleri taşımaktadır.

1.4.2. Ligant

Afinite kromatografisi temelli çalışmalarda, ligant saflaştırma protokolünün başarısında çok önemli bir rol oynamaktadır. Spesifikliğe ek olarak, afinite ligantının kararlı ve ekonomik olması istenen diğer bir özelliktir (Narayanan 1994).

Afinite kromatografisinde kullanılmak üzere seçilecek olan bir ligantın aşağıdaki iki önemli özelliği taşıması gerekir. Bunlar;

- ❖ Ligantın saflaştırılmak istenen moleküle tersinir ve spesifik bağlanma afinitesine sahip olmalıdır.

- ❖ Ligantın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır.

Seçilmiş olan bir ligantın saflaştırmak istenilen molekülü serbest çözeltide bağlama afinitesinin 10^{-4} - 10^{-8} M aralığında olması arzu edilir. Eğer ki ayrıştırma sabiti değeri 10^{-4} M'den daha büyük olursa (enzim ile zayıf inhibitör arasındaki ilgi gibi) bu başarılı bir afinite için uygun olmamaktadır. Ayrıştırma sabiti 10^{-8} M'den daha küçük olursa (hormon ile reseptörü arasındaki etkileşme gibi) afinite ligantına bağlanmış olan saflaştırılacak molekülü inaktif hale getirmeden elüsyonunu yapmak neredeyse imkansız hale gelecektir.

Afinite kromatografisinde kullanılmak üzere seçilmiş olan bir ligantın birden fazla matrikse bağlanabilecek fonksiyonel grubu varsa matrikse kovalent olarak bağlandığı bölge önem kazanmaktadır. Bağlanma noktası seçimi yapılırken saflaştırılacak molekülün ligant ile en düşük oranla spesifik etkileşme verebileceği fonksiyonel grup tercih edilmelidir (Cuatrecasas *et al.* 1968).

1.4.3. Uzantı kolu

Bir afinite kromatografisinde uzantı kolunun kullanılıp kullanılmayacağı ligant, numune ve bağlanma kimyasına bakılarak karar verilir. Biyolojik materyallerin aktif merkezleri genellikle molekülün derinliklerine doğru bulunmaktadır. Bu yüzden enzim kofaktörleri gibi küçük ligantların direkt olarak matrikse bağlanması ile hazırlanmış afinite kolonlarında saflaştırılmak istenen moleküller ile matriks arasında istenmeyen etkileşmeler ortaya çıkabilmektedir. Afinite kromatografisinde istenmeyen bu tür etkileşmeleri ortadan kaldırmak için matriks ile ligantın arasına uzantı kolları takılır. Böylece ligantın aktif bölgesi saflaştırılacak numune için kullanılabilir durumdadır (Ostrove 1990).

Afinite kromatografisinde kullanılan uzantı kollarının tam anlamıyla işlevlerini yerine getirebilmeleri için seçilen uzantı kolunun uzunluğu çok büyük önem taşımaktadır.

Uzantı kolu çok kısa olursa ligant numuneyi bağlayamaz ve böylece kol etkisiz kalmış olur. Kısanın aksine uzantı kolu çok uzun olursa böylece ortamda istenmeyen etkileşmeler artar ve ayrıştırmanın seçiciliğinin azalmasına neden olur. Ocarra ve ekibi tarafından yapılan bir deneyde çok uzun bir uzantı kullanılmıştır. Bunun sonucunda uzantı kolu ile numuneler arasında istenmeyen hidrofobik bağlanmalar gözlemlenmiştir. Meydana gelen bu spesifik olmayan hidrofobik bağlanmalar, afinite tekniğinde hiçte istenen bir durum değildir (Ocarra and Barry 1974). Protein saflaştırmalarında matriks ile ligant arasında hangi durumlarda ve hangi boyutlarda uzantı kollarının kullanılacağı aşağıda özetlenmiştir (Çizelge 1.4) (Ostrove 1990).

Çizelge 1.4. Uzantı kolunun kullanılma durumları

Ligant	Protein	Uzantı kolu
Küçük	Küçük	Kısa
Küçük	Büyük	Uzun
Büyük	Küçük	Gerekmez
Büyük	Büyük	Gerekmez

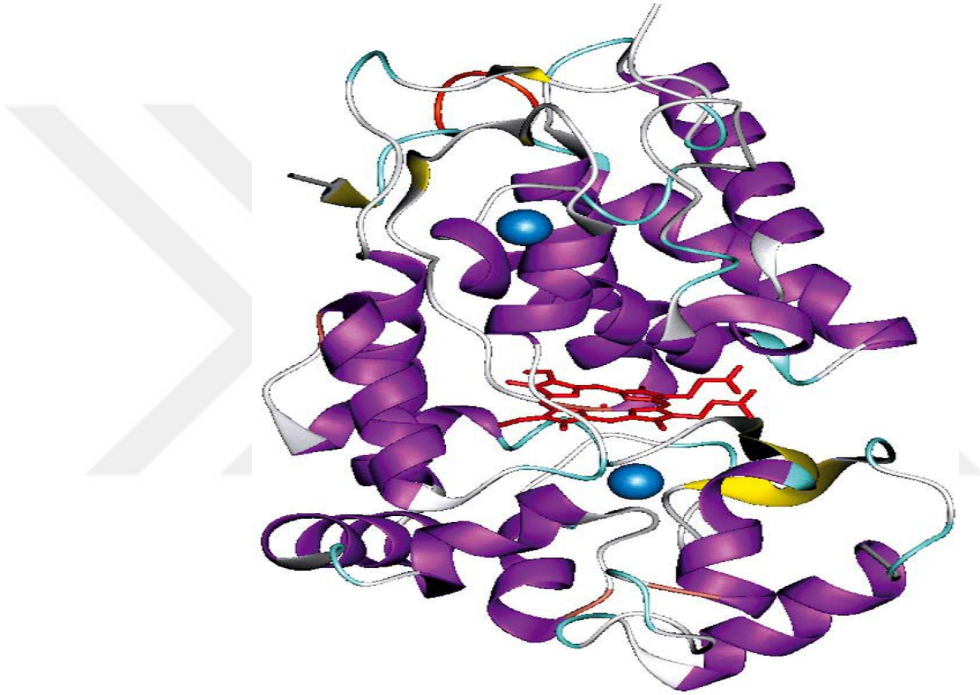
Uzantı kolu olarak kullanılabilecek birçok molekül vardır. Gerekli olan uzantı kolu büyüklüğü bilinmiyor ise, yaklaşık altı karbon atomuna sahip bir molekül ile başlamak en doğru seçimdir. Seçilen bu tür bir uzantı kolu birçok afinite uygulaması için iyi bir uzunluk gibi görünmektedir. Bundan daha kısa kollar daha az esneklik sağlar, buda ligantın ortamdaki işlevini etkilemektedir (Narayanan 1994).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Peroksidazlar, bitkilerin gelişimi ve strese karşı olan cevabı, bitkilerin büyümesindeki hormonal düzenlenme, hücre duvarı metabolizması, oksidasyon defansında hücrelerin cevabı gibi birçok hücresel süreçte rol oynamaktadır (Jouili 2011). Ayrıca peroksidazlar biyotik ve abiyotik stresleri gösteren bir biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler çimlenmeden yaşlanmaya kadar birçok fizyolojik olayda rol oynarlar (Morohashi 2002). Fenolik bileşik oksidasyonu (Fry 2004), hücre uzaması (Liszkay *et al.* 2004), reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin metabolizması (Almagro *et al.* 2009), fitohormon metabolizması (Cosio and Dunand 2009), hücre duvarları bileşenlerinin çapraz bağlanması ve hücre duvarının sertliğinin kontrolü, suberin ve lignin oluşumunda görev alır (Passardi *et al.* 2007; Marjamaa *et al.* 2009). Bunlara ek olarak meyve ve sebzelerin büyüme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının düzenlenmesi, savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991), bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Agostini *et al.* 1997), lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000), oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) ve hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) gibi olaylarda önemli görevler üstlenirler. Ayrıca mikroanalitik uygulamalarda tercih edilmektedirler (Kwak *et al.* 1996). Bitkilerde, hasarlı veya enfekte dokular da fiziksel savunma mekanizmasına (Biles and Martyn 1993) katkıda bulunmaktadır. Peroksidazlar, klinik biyokimya ve enzim immünolojik testlerinde yaygın olarak kullanılırlar (Vamosvigyazo 1981; Lin *et al.* 1996). Peroksidazlar endüstriyel atıklar ve gıda maddeleri gibi materyallerden peroksitlerin uzaklaştırılması, çeşitli aromatik kimyasalların sentezi, fenolik bileşenler içeren atık suların iyileştirilmesi gibi bir çok uygulama alanına sahiptirler (Agostini *et al.* 2002).

Bayır turpundan (HRP) saflaştırılan peroksidaz enziminin aktif merkezinin üç boyutlu yapısı aydınlatılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde peroksidaz enziminin ferriprotoporfirin IX (hem grubu) ve iki kalsiyum atomu olmak üzere iki farklı tip metal merkezinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu iki merkez, enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlamak için çok büyük bir önem arz etmektedir. Aktif merkezdeki kalsiyum atomları hem gurubu bölgesine distal ve proksimal pozisyonlarda olacak şekilde

yerleşmiş bulunmaktadır (Haschke and Friedhoff 1978). Üç boyutlu yapı incelendiği zaman α -sarmal ve β -kırmalı yapıların her ikisinin de bulunduğu görülmektedir. Fakat α -sarmalın β -kırmalı tabaka yapısına göre üç boyutlu yapıda daha baskın olarak bulunmaktadır. Şekil 2.1 deki HRP'nin X-Ray kristalografi yapısına göre hem grubu kırmızıyla, kalsiyum atomları maviyle, α -sarmal yapılar morla ve β -kırmalı yapı sarı renk ile gösterilmiştir (Veitch 2004).



Şekil 2.1. Bayır turpundan (HRP) saflaştırılan peroksidazın X-ray kristalografisi

1960 yılından beri peroksidaz enzimi, iyon değişim, afinite, jel filtrasyon, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi gibi metotlardan biri ya da birkaçı kullanılarak saflaştırılmaktadır. Günümüzde halân endüstrisinde özellikle atık suların zehirsizleştirilmesi için çok büyük öneme sahip peroksidazlar farklı kaynaklardan saflaştırılarak karakterize edilmektedir (Singh and Singh 2002).

Hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera*) peroksidaz enzimi, sulu iki fazlı sistem, hidrofobik ve iyon değişim kromatografisini içeren üç aşamalı prosedürle saflaştırılmıştır. Saflaştırma kat sayısı %41 verim ile 68 kat olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin

termal ve pH stabilite çalışması sonuçları yaban turpu peroksidaz ile kıyaslanmıştır (Al-Bagmi *et al.* 2018).

Yeni bir peroksidaz enzimi, beyaz İspanyol bitkisinden (*Cytisus multiflorus*) ilk defa saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesi, fenil Sepharose, HiTrap SP HP, Süperdex 75 ve 200 olmak üzere dört kromatografik yöntem kullanılmıştır. Peroksidaz enzimi %38 verim ile 1168 kat saflaştırılmış ve yapılan SDS-PAGE ile molekül ağırlığının 50 kDa olduğu tespit edilmiştir (Galende *et al.* 2015).

Papaya kauçuğundan (*Carica papaya* L. Cv Tainung No. 2) asidik bir peroksidaz izoformu saflaştırılmış ve molekül ağırlığı 69,4 kDa olarak bulunmuştur. Optimum parametreler belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda optimum sıcaklığın 50°C ve optimum pH'nın 4,6 olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda ticari olarak satılan sütlerin içerisindeki mikromolar seviyelerdeki hidrojen peroksit miktarları belirlenmiştir (Chen *et al.* 2012).

Selaginella martensii Spring. bitkisinden 2 katyonik peroksidaz olan SmaPrx2 ve SmaPrx3 amonyum sülfat çöktürmesi, fenil Sepharose adsorpsiyon kromatografisi ve SP sepharose katyonik iyon değişim kromatografisi kullanılarak sırasıyla 159 ve 44 kat saflaştırılmıştır. Molekül ağırlıkları sırasıyla 36,3 ve 46,5 kDa olarak bulunmuştur. Substrat spesifitesi bulunmasına yönelik koniferil alkol, sinapil alkol, ferulik asit ve hidrojen peroksit için K_m çalışması yapılmıştır (Martinez-Cortes *et al.* 2012).

Amonyum sülfat çöktürmesine alternatif bir çöktürme metodu bulmak amacıyla yapılan bir çalışmada turp köklerinden peroksidazı çöktürmek için iki sentetik polielektrolit: Eudragit S ve L 100 kullanılmıştır. Her ikisi de, poliakrilatlanmış asidden türetilen ve anyonik olan bu elektrolitler, peroksidazların çöktürülmesinde etkili olduğu bulunmuştur. İlaç taşınımının da matriks olarak kullanılan bu yapıların klasik çöktürme yöntemlerine göre birçok avantajlarının olduğu tespit edilmiştir (Valetti and Pico 2013).

Kozmetikte ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan tıbbi bir bitki olan *Artocarpus lakoocha* kauçuklarından peroksidaz enzimi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak %22,8 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışmaları kapsamında optimum pH, optimum sıcaklık ve substratlar için K_m değerlerini bulmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Aynı zamanda saflaştırılan enzimin anti inflamatuvar ve yaraların iyileştirme özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Sonkar *et al.* 2015).

Hevea brasiliensis hücre süspansiyonundan peroksidaz enzimi, anyonik iyon değişim kromatografisi (DEAE-Sepharose), afinite kromatografisi (Con A-agaroz) ve preparatif SDS-PAGE metotları kullanılarak %1,8 verimle 44 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin optimum parametreleri belirlenmiştir. Aynı zamanda enzim aktivitesine EDTA, β -merkaptoetanol, sodyum azit ve SDS'in etkileri incelenmiştir. Peroksidaz uygulaması olarak da atık sularda bulunabilecek bazı boyar maddelerin renk gidermesine yönelik çalışmalar yapılarak olumlu sonuçlar bulunmuştur (Chanwun *et al.* 2013).

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

Buğdaydan (*Triticum aestivum* Ssp. Vulgare) CM-Sephadex katyonik iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak peroksidaz enzimi %5,4 verimle 284 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan POD'un molekül ağırlığı yapılan SDS-PAGE ile 38,8 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı, substrat olarak kullanılan guaiakol ve hidrojen peroksitin K_m ve V_{max} değerleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Altin *et al.* 2017).

Kuru fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) peroksidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Sephadex katyonik iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kapsayan üç kromatografik yöntem kullanılarak saflaştırılmıştır. Molekül ağırlığı 45 kDa

olarak bulunmuştur. Enzimin optimum ve kinetik parametreleri çalışılmıştır. Aynı zamanda sitrik asit, EDTA, CTAB ve sodyum azid moleküllerinin enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir (Koktepe *et al.* 2017).

Ligant olarak 4-aminobenzohidrazit molekülü kullanılarak hazırlanan afinite kromatografisinden farklı kaynaklardan peroksidaz enzimleri saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi tek kademe gerçekleşmiştir. Saflaştırma kat sayıları karaturp için %10,6 verimle 40,3, şalgam için %9 verimle 269,3, beyaz lahana için %4,3 verimle 24,7, mor lahana için %2,9 verimle 120,6 ve kırmızı pancar için %38 verimle 24,7 kat bulunmuştur. Saf peroksidaz enzimlerinin optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, stabil pH, guaiakol ve H₂O₂ için K_m ve V_{max} gibi kinetik parametreleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Aynı zamanda 4-aminobenzohidrazit molekülün saf enzimler üzerindeki detaylı inhibisyon kinetiği çalışması yapılarak tespit edilmiştir (Kalin *et al.* 2014; Somturk *et al.* 2014; Erdem *et al.* 2015; Inal *et al.* 2015).

POD enzimi endüstriyel olarak çok büyük bir öneme sahip olduğu için birçok bitkiden farklı kromatografik metotlar kullanılarak saflaştırılmıştır. Yukarıda son 6 yıl içerisinde peroksidaz enziminin saflaştırmalarına yönelik yapılan çalışmaların özetleri verilmiştir. Ancak peroksidaz enziminin saflaştırma çalışmalarının geçmişi oldukça eskidir ve bu çalışmalar farklı birçok kaynaktan yapılmıştır. POD'un farklı kaynaklardan yapılmış saflaştırma çalışmaları; ıspanak yapraklarından (Koksal 2012), papaya meyvesinden (Pandey *et al.* 2012), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002; Abdurrahman *et al.* 2011), at turpundan (Lavery *et al.* 2010), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007; Tzika *et al.* 2009), brokoliden (Tipawan and Barrett 2005; Koksal and Gulcin 2008), mısırdan (Mika *et al.* 2008), vanilya çekirdeğinden (Marquez *et al.* 2008), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), marula meyvesinden (Mdluli 2005), kara lahanadan (Gulcin and Yildirim 2005), ısırgan otundan (Gulcin 2002), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), hindiba bitkisinden (Boeuf *et al.* 2000), arpadan (Kristensen *et al.* 1999), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), portakaldan (Clemente 1998), biberden (Pomar *et al.* 1997), çay yapraklarından (Kvaratskhelia *et al.* 1997), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), havuçtan (Nair and Showalter 1996), çilekten

(Civello *et al.* 1995), pamuktan (Triplett and Mellon 1992), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990), bürüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987) ve domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) özetle verilebilir.

Geçmiş yıllarda farklı bitkilerden saflaştırılan POD'un molekül kütlesi yapılan SDS-PAGE metoduyla; hurma yapraklarında 55 kDa (Abdurrahman *et al.* 2011), at turpunda 37 kDa (Lavery *et al.* 2010), zeytinde 44 kDa (Tzika *et al.* 2009), brokoli 43 kDa (Tipawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), vanilya çekirdeğinde 46,5 kDa (Marquez *et al.* 2008), kara lâhanada 95 kDa (Gulcin and Yildirim 2005), hurma yapraklarında 48 kDa (Deepa and Arumughan 2002), çilekte 65 kDa (Civello *et al.* 1995) ve domatesde 43 kDa (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) olarak tespit edilmiştir. Özetle POD'un molekül kütlesi 40 kDa ile 100 kDa aralığında saflaştırılan kaynağa göre değişkenlik göstermektedir.

Lahana (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala) bitkisi üzerine POD saflaştırma çalışmalarından farklı olarak literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Lahana yapraklarının kurutma ve depolama gibi ön işlemler yapılırken sıcaklığın antioksidan seviyesine etkisi incelenmiştir (Korus 2011). Lahana yapraklarında ön işlem ve koruma yönteminin glukosinolat içeriğine etkisi araştırılmıştır (Korus *et al.* 2014). Mikrospordan türetilmiş lahana embriyolarında yüksek frekanslı bitki rejenerasyonu üzerine katı ortamın, gelişim evresinin, embriyonik yaşın, soğuk işlemenin ve katkı maddelerinin etkisi araştırılmıştır (Wang *et al.* 2011). Lahana genotiplerinin mineral konsantrasyonları, düşük moleküler ağırlıklı karbonhidrat konsantrasyonları ve biyokütle kaybı açısından nem stresine olan yanıtını belirlemeye yönelik bir çalışma yapılmıştır (Pathirana *et al.* 2017). Taze ve pişirilmiş lahana yapraklarının amino asit ve protein seviyeleri belirlenmiştir (Lisiewska *et al.* 2008). Lahana yapraklarındaki bazı seçilmiş antioksidatif bileşiklerin ön işlemler ve koruma yöntemlerine etkisi araştırılmıştır (Korus and Lisiewska 2011). Dondurulmuş ve dondurularak kurutulmuş lahana yapraklarının ilavesi ile elma suyuna dayalı içeceklerin fenolik, glukosinolat ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir (Marecik *et al.* 2017). Lahana yapraklarından elde edilen hidroalkolik ekstraktların farklı hayvan grupları üzerine gastroprotektif aktivitesi incelenmiştir (Lemos *et al.* 2011). Farelerin farklı

hücreleri üzerine lahananın genotoksik ve antijenotoksik potansiyelleri belirlenmiştir (Goncalves *et al.* 2012). ABD'de yetiştirilen lahanaların mineral mikrobesein ve prebiyotik karbonhidrat seviyeleri incelenmiştir (Thavarajah *et al.* 2016).

Literatürde alabaş turpu (*Brassica oleracea* L. Var. Gongylodes) ile ilgili saflaştırma dışında birçok çalışma bulunmaktadır. Alabaş turpunun yumrulu kök oluşumu için kantitatif karakter lokus haritalaması yapılmıştır (Hoque *et al.* 2017). Alabaş turpundan elde edilen olgunlaşmamış zigotik embriyolar ve tekrarlayan somatik embriyogenezden *in vitro* bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir (Cosic *et al.* 2013). Yeşil ve mor alabaş turplarının metabolik profilleri aydınlatılmıştır (Park *et al.* 2017). Bitki su stres indeksi kullanılarak alabaş turpunu yetiştirirken sulama planlamasına yönelik bir çalışma yapılmıştır (Cremona *et al.* 2004). Mor alabaş turpundaki korelasyon genlerinin moleküler analizi ve antosiyanin birikimi belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2015). Kükürt ve nitrojen kaynağından etkilenen alabaş turpunda izotiyosiyanat konsantrasyonu incelenmiştir (Gerendas *et al.* 2008). Alabaş turpundaki glukosinolatların, antosiyaninlerin, karotenoidlerin ve diğer sekonder metabolitlerin metabolik profilleri araştırılmıştır (Park *et al.* 2012). Alabaş turpu tohumlarının uçucu yağ bileşenleri belirlenmiştir (Afsharypuor and Suleimany 2002).

Karaturp, şalgam ve brokoliden hazırlanmış bitki ekstraktlarından izole edilmiş peroksidaz enzimleri kullanılarak rasemik feniletil hidroperoksidin kinetik rezolüsyonu araştırılmıştır. Elde edilen hidroperoksit ve alkollerin *ee* değerleri aralarında kıyaslanmıştır. Aynı zamanda enantiyomerik olarak saf bir şekilde elde edilen hidroperoksitler daha sonraki sentez reaksiyonlarında kullanılmıştır (Zilbeyaz *et al.* 2012).

Literatürde hidroperoksitlerin peroksidaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen kinetik rezolüsyon çalışmaları bulunmaktadır. Optik olarak aktif olan doymamış dioller ve hidroperoksi alkollerin hazırlanması için yeni bir enzimatik yöntem geliştirmek amacıyla rasemik hidroperoksi homoalkil alkollerin HRP tarafından katalizlenen bir reaksiyonla enantiyoselektif indirgenmesine yönelik bir çalışma yapılmıştır (Adam *et al.* 1998a).

Toprak bakterilerinden izole edilen peroksidazların hidroperoksitlerin kinetik rezolüsyonuna etkisi araştırılmıştır (Adam *et al.* 1998b). Asimetrik bir sentez için coprinus peroksidaz enzimi hidroperoksitlerin kinetik rezolüsyonunda ve prokiral sülfürlerin asimetrik sülfoksidasyonunda kullanılmıştır (Adam *et al.* 1999). Kiral hidroperoksi alkollerin HRP enziminin katalizlediği kinetik rezolüsyon reaksiyonu ile optikçe aktif alkil hidroperoksi alkoller ve 1,3-dioller hazırlanmıştır (Adam *et al.* 2000a). Serbest ve immobilize mikroorganizma peroksidazları ile rasemik hidroperoksitlerin biyokatalitik kinetik rezolüsyonu yapılmıştır (Adam *et al.* 2000b). Biyokatalizör olarak HRP enziminin kullanıldığı enantiomerik olarak saf hidroperoksitlerin ve alkollerin tek kademe de sentezi gerçekleştirilmiştir (Hoch *et al.* 1997).

2.1. Çalışmanın Amacı

Bayır turpu peroksidaz (HRP) enzimi, enantiyomerce saf alkol ve hidroperoksitlerin kinetik rezolüsyon metodu ile rasemik sekonder hidroperoksitlerden elde edilebilmesi için biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Kinetik rezolüsyon çalışmaları kapsamında biyokatalizör olarak kullanılan HRP enzimi rasemik hidroperoksitlerin *R*-enantiyomerini enantiyo seçici olarak alkole indirgemektedir. Saf olarak ticari amaçlı satılan HRP enzimi hem pahalıdır hem de biyolojik bir materyal olarak kolayca bozulabileceği için taşınması oldukça maliyetlidir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda; farklı bitki kaynaklarından (beyaz turp, kırmızı turp, alabaş turp, tatlı turp, japon turpu, kara lahana, mor lahana, kırmızı pancar, yer elması ve zencefil) izole edilen peroksidaz enzimlerinin kinetik rezolüsyon metodu kullanılarak rasemik hidroperoksit üzerindeki enantiyo seçiciliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Önceki çalışmalarda kullanılan saf HRP enziminden farklı bir enantiyo seçiciliğe (*S*-enantiyomer) sahip ve laboratuvar şartlarında ucuz yöntemler kullanılarak elde edilebilecek bir peroksidaz enzimi bulmak hedeflenmiştir.

Peroksidaz enzimi dünyada; tıp, kimya, ilaç ve gıda endüstrilerinin birçok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak büyük bir öneme sahip olan peroksidaz enzimi literatürde birçok yöntem kullanılarak farklı kaynaklardan saflaştırılmıştır. Alabaş turp bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılmasına yönelik hiçbir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu sebeplerden dolayı yeni bir peroksidaz kaynağı olarak alabaş turpunun literatüre yenilik katacağı düşünülmektedir. Afinite kromatografisi tekniği, daha önceki çalışmalarda peroksidaz enzimini saflaştırmak için kullanılan tekniklere göre birçok açıdan üstünlüğe sahiptir. Kara lahana kökünden peroksidaz enzimi ise afinite kromatografi yöntemi dışında yüksek maliyetlerle oldukça uzun bir zaman alan bir süreçte saflaştırıldığı bilinmektedir. Bu bağlamda hem alabaş turp hem de kara lahana kökünden peroksidaz enzimlerini kısa sürede, düşük maliyetle ve tekrar tekrar kullanılabilirlik gibi avantajlara sahip bir teknik olan afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırmak, karakterize etmek ve afinite kromatografisinde ligant olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit bileşiğinin detaylı inhibisyon parametrelerini belirlemek çalışmamızın ikinci amacını oluşturmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve markaları

Kimyasal adı	Marka
Akrilamit, Amonyum persülfat, Bisakrilamit, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin), SDS (Sodyum dodesil sülfat), Sodyum klorür, Sığır serum albumin (BSA), Trihidroksimetilaminometan (Tris), Potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄), CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, Guaiakol, Sodyum Karbonat, 4-aminobenzohidrazit, Etanol, Metanol, Gümüş nitrat, Sodyum asetat, Glutaraldehit, Sodyum nitrit, Dietileter, Hidrojen peroksit, Magnezyum sülfat, Silika jel, Sodyum bi karbonat, Hekzan, Diklorametan, İzopropanol, Döterokloroform, 1-Feniletanol	Sigma-Aldrich
Coomassie brillant blue G-250, Dötero kloroform, Asetik asit, Brom timol mavisi, Fosforik asit, Gliserol, Hidroklorik asit, Sodyum hidroksit, β –Merkaptoetanol, Formaldehit, Sülfirik asit	Merck KGaA
Protein marker	Thermo Fisher Scientific
Bitkiler	Yerel marketlerden

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic

Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturuu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
¹ H-NMR	: 400 MHz Bruker
¹ C-NMR	: 100 MHz Bruker
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Deneylerde kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve içerikleri aşağıdaki gibidir. Verilen tablolardaki çözeltiler hazırlanırken hesaplanılan miktarda istenilen kimyasaldan alınıp önce bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra istenilen pH'ya 0,1 M HCl veya NaOH ile ayarlandıktan sonra son hacime saf su ile tamamlandı.

Çizelge 3.2. Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
0,1 M NaHCO ₃ tamponu	2,1 g NaHCO ₃	10,0	200 ml
0,2 M NaHCO ₃ tamponu	0,84 g NaHCO ₃	8,8	100 ml
0,05 M Tris-HCl tamponu	1,21 g Tris	7,4	200 ml

Çizelge 3.3. Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözelti

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
0,1 M KH_2PO_4 tamponu	1,36 g KH_2PO_4	6,0	100 ml

Çizelge 3.4. Enzim saflaştırmada kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
Dengeleme tamponu (10 mM)	1,36 g KH_2PO_4	6,8	1 L
Yıkama tamponu	1,36 g KH_2PO_4	6,8	400 ml
Elüsyon tamponu (25 mM/1 M)	0,68 g KH_2PO_4 11,7 g NaCl	6,8	200 ml

Çizelge 3.5. Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
0,1 M KH_2PO_4 tamponu	1,36 g KH_2PO_4	6,0	100 ml
45 mM Guaiakol çözeltisi	498 μl 45 mM Guaiakol	-	100 ml
22,5 mM %30'luk H_2O_2 çözeltisi	228 μl %30'luk H_2O_2	-	100 ml

Çizelge 3.6. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
Coomassie brilliant blue G-250 standart boya çözeltisi	100 mg Coomassie brilliant blue G-250 50 ml %95'lik Etanol 100 ml %95'lik Fosforik asit	-	1 L

Çizelge 3.7. Elektroforez de kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
1 M Tris-HCl tamponu	12,11 g Tris	8,8	100 ml
1 M Tris-HCl tamponu	12,11 g Tris	6,8	100 ml
%30Akrilamit-%0,8 Bisakrilamit çözeltisi	15 g Akrilamit 0,4 g Bisakrilamit	-	34,6 ml
%10'luk SDS çözeltisi	1 g SDS	-	9 ml
%10'luk Amonyum persülfat çözeltisi	1 g Amonyum persülfat	-	10 ml
Yürütme tamponu	1,51 g Tris 7,51 g Glisin 0,5 g SDS	8,3	500 ml
%0,1'lik İndikatör çözeltisi	0,1 g Brom timol mavisi 16 ml 0,01 M'lık NaOH	-	100 ml
Numune tamponu	0,5 ml 1 M Tris-HCl pH:8,8 1 ml %10'luk SDS 1 ml Gliserol 1 ml %0,1'lik İndikatör 0,5 ml β-Merkaptoetanol	-	10 ml

Çizelge 3.8. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
Tespit çözeltisi	30 ml % 96'lik Etanol 10 ml Asetik asit	-	100 ml
Redüksiyon çözeltisi	4,8 g Sodyum asetat 150 mg Sodyum tiyosülfat 45 ml Etanol 3 ml Glutalaldehit	6,0	150 ml
Boyama çözeltisi	0,1 g Gümüş nitrat	-	100 ml
Yıkama çözeltisi 1	3,75 g Sodyum karbonat 120 µl Formaldehit	-	270 ml
Yıkama çözeltisi 2	1 ml Gliserol 12,5 ml Asetik asit	-	250 ml

Çizelge 3.9. Çalışmamızda kullanılan inhibitör stok çözelti

Çözelti Adı	Kimyasal Adı ve Miktarı	pH	Son Hacim
4-aminobenzohidrazit çözeltisi	0,0136 g 4-aminobenzohidrazit	-	3 ml

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein belirleme yöntemleri

3.2.1.a. Kalitatif protein tayin yöntemi

Kalitatif protein tayini, afinite kolonundan saflaştırılarak 1,5 ml’lik eppendorf tüplerine toplanmış olan bütün numuneler için yapıldı. Kullanılan yöntemin esası, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik halka bulunduran amino asitlere sahip proteinlerin 280 nm’de UV ışınlarını absorblamasına dayanır (Segel 1968).

Afinite kromatografisi sonucu kolondan elde edilen elüatların absorbansları köre karşı spektrofotometrede ölçüldü. Ölçümlerde kuvarz küvetler yardımıyla yapıldı ve kör numune olarak ise enzimleri elüe etmede kullandığımız elüsyon tamponu kullanıldı.

3.2.1.b. Kantitatif protein tayin yöntemi

Kantitatif protein miktarı tayini Bradford (1976) metodu ile gerçekleştirildi. Homojenatta ve afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan enzimlerde bulunan protein miktarlarını tayin edildi. Coomassie brilliant blue G-250 bu teknikte boya olarak kullanılan bir reaktiftir. Bu reaktif yapısında negatif yük bulundurur. Protein ise bulundurduğu pozitif yükten kaynaklı olarak boyanın negatif yüküne bağlanır. Boyanın 465 nm’de kırmızı ve 595 nm’de mavi olamk üzere iki formu bulunmaktadır. Proteinin boyaya bağlanması ile kırmızı form mavi forma dönüşür. Tekniğin olası bozucu faktörlere karşı

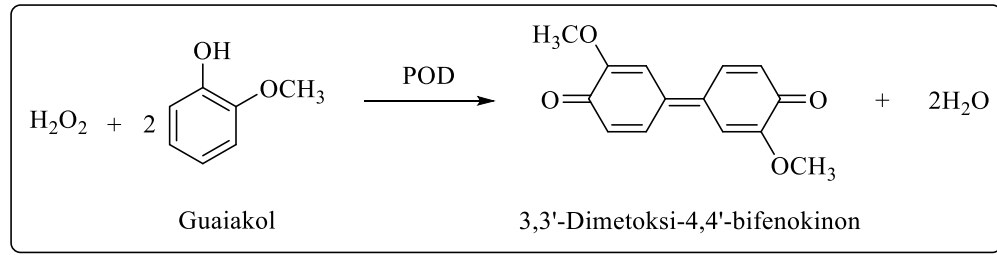
hassasiyeti çok düşük (1-100 µg) seviyelerdedir. Mevcut reaksiyon büyük oranda tekrarlanabilmekte ve çok hızlı bir şekilde vuku bulmaktadır.

Protein tayini için uygulanan prosedür şu şekildedir;

- İçerisinde 1 mg protein bulunan 1 ml BSA çözeltisinden hazırlanan tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu.
- Tüplerin hacimleri saf su kullanarak 100 µl tamamlandı ve her bir tüpe 4900 µl protein tayin çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerin absorbansları 3 ml'lik cam küvet yardımıyla 595 nm'de ölçüldü.
- Spektrofotometreden okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları ile standart bir grafik çizildi.
- Seyreltilmiş bitki homojenatı ve afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan enzimlerden farklı tüplere sırasıyla 100'er µl alındı ve her bir tüp 4900'er µl Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerin absorbansları 3 ml'lik cam küvet yardımıyla 595 nm'de ölçüldü. Yapılan işlem güvenilirlik açısından 3 kez tekrarlandı ve bu 3 ölçümün aritmetik ortalaması alınarak önceden çizilen standart grafik yardımıyla homojenatta ve saflaştırılan enzimlerde bulunan protein miktarları tayin edildi.

3.2.2. POD aktivite ölçüm yöntemi

Kalın ve arkadaşlarının kullanmış oldukları yöntemle göre POD enzim aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Bu yöntem, kromojenik bir substrat olan guaiakolün H_2O_2 tarafından yükseltgenmesi ve meydana gelen renkli molekülün absorbansta meydana getirdiği artışın 470 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.1) (Sisecioglu *et al.* 2010).



Şekil 3.1. Guaiakol'ün 3,3'dimetoksi-4,4'-bifenokinona yükseltgenme tepkimesi

1 cm'lik ışık yolu olan bir cam küvete enzim ilavesiyle reaksiyon başlatıldı ve toplam 3 dk'lık bir süre boyunca her 1 dk'da bir absorbansda meydana gelen artış spektrofotometre yardımıyla 470 nm'de takip edildi.

Çizelge 3.10. POD aktivite ölçümü için küvet içerikleri

Aktivite Çözeltileri	Kör (µl)	Numune (µl)
0,1M KH ₂ PO ₄ Tamponu (pH:6)	1000	900
22,5 mM H ₂ O ₂	1000	1000
45 mM Guaiakol	1000	1000
POD Enzimi	-	100

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı (Kalin *et al.* 2014).

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

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon (µmol/ml)

ε = Ekstinksiyon kat sayısı (5000 M⁻¹ x cm⁻¹)

Df = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (µmol x dk./ml)

3.2.3. Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışmaları

3.2.3.a. Bitkilerden homojenat hazırlanması

100 g taze bitki örnekleri tartılıp alındı ve blender yardımıyla iyice parçalandı. Parçaların üzerine sıvı azot dökülerek havanda dövülerek toz haline getirildi. pH'sı 6,0 olan 0,1 M'lik fosfat tamponunun 50 ml'si içerisine havanda toz haline getirilen bitki parçaları ilave edildi ve 5 dk manyetik karıştırıcı üzerinde düşük bir hızda karıştırıldı. Elde edilen süspansiyondaki bitki hücrelerinin iyice parçalanması ve homojenize olması için 2.400 rpm'de homojenizatörden geçirildi. Homojenat bir tülbent ile süzülerek santrifüj tüplerine dolduruldu ve 16.000 xg'de 1 saat boyunca santrifüj yapıldı. Çökelek süzülüp atıldıktan sonra elde edilen süpernatant bir sonraki deneylerde kullanılmak üzere 4°C'ta bekletildi.

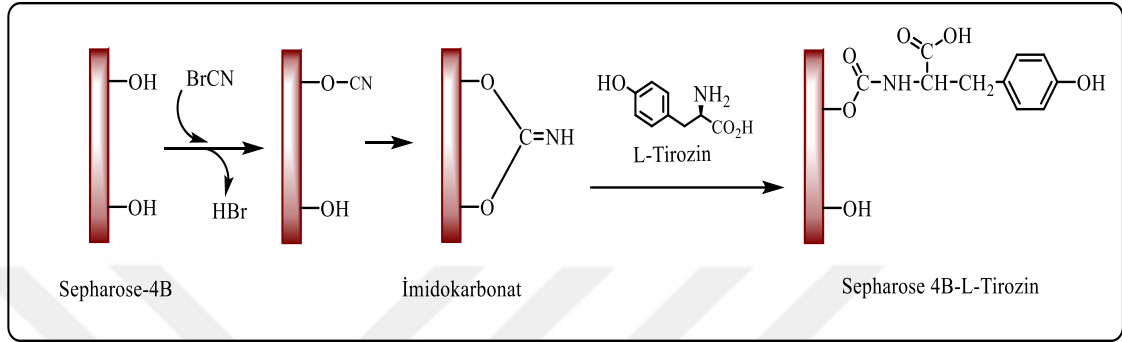
3.2.3.b. Afinite jeli hazırlama prosedürü

Afinite jelinde matriksi olarak CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanıldı. Öncelikle afinite matriksine uzantı kolu görevi görmesi için L-tirozin kovalent bir bağ ile bağlandı. Daha sonra diazonyum tuzu haline getirilmiş 4-aminobenzohidrazit önceden hazırlanmış jeldeki tirozine kenetlendi. Hazırlanan bu afinite jelinde enzimi spesifik olarak bağlayan kısım enzim inhibitörü olan 4-aminobenzohidrazitdir. POD saflaştırmada kullanılan afinite jeli hazırlanırken aşağıdaki prosedür uygulandı.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak tirozin bağlanması

Öncelikle CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, pH'sı 10 olan soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponunun 250 ml'si ile yıkanarak bir behere alındı. Aynı tampondan 20 ml alınarak içerisinde 80 mg tirozin çözöldü ve behere ilave edilerek magnetik karıştırıcı üzerinde 4°C'ta 2 saat süresince karıştırıldı. Süre sonunda karışım 16 saatlik bir süreyle buzdolabında bekletildi. Daha sonra reaksiyona girmeyen fazla miktardaki tirozini ortamdan tamamen uzaklaştırmak için jel 280 nm'de absorbans yıkama suyu absorbans

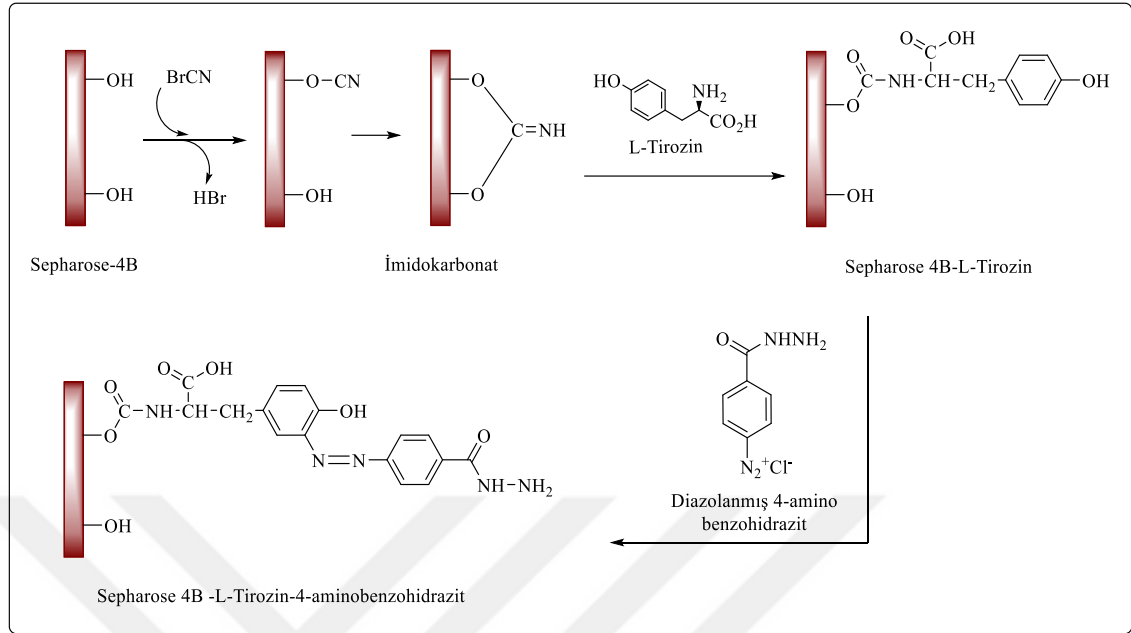
göstermeyinceye kadar iyice saf su ile yıkandı. Su ile yıkama işleminden sonra 0,2 M NaHCO_3 tamponunun 100 ml'si ile de yıkamaya devam edildi. Yıkama bittikten sonra jel yıkama tamponunun 40 ml'sinin içine aktarıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin takılma reaksiyonu

4-aminobenzohidrazit kenetlendirmesi

Bütün reaksiyonların 0°C civarında yapıldığı ligant kenetlendirme de öncelikle 10 ml 1 M HCl içerisinde 25 mg 4-aminobenzohidrazit çözüldü. Daha sonra 5 ml saf su içerisinde 75 mg NaNO_2 bulunan çözelti damla damla 4-aminobenzohidrazit çözeltisine ilave edildi. 10 dk'lık bir reaksiyon sonucunda 4-aminobenzohidrazit diazolanmış hale gelmiş oldu. Diazolanmış 4-aminobenzohidrazit çözeltisi Sepharose-4B-L-tirozin jelinin üzerine yavaşça döküldü ve pH'sı 9,5'da sabit kalıncaya kadar 1 M NaOH ilave edildi. 3 saat boyunca oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı üzerinde yavaşça karıştırıldı. Süre sonunda jel ilk önce 1 L saf su ile daha sonra 200 ml pH'sı 7,4 olan 0,05 M Tris- SO_4 tamponuyla iyice yıkandı. Aynı tamponun 25 ml içerisine alınan jel kolona paketlenmek üzere buzdolabında bekletildi (Whitney 1974). Afinite jelinin bağlanma reaksiyonu Şekil 3.3 de gösterildi.



Şekil 3.3. 4-aminobenzohidrazit bağlanma reaksiyon modeli (Kalin *et al.* 2014)

3.2.3.c. Afinite jelinin kolona paketlenmesi

pH'sı 6,8 olan 10 mM KH_2PO_4 (dengeleme tamponu) tamponu içine alınarak süspansiyon edilen jelin havası su trombu yardımıyla alındı. Havası alınmış afinite jeli 1×10 cm'lik ölçülere sahip cam kolona yüklendi. Afinite jeli pakettendikten sonra peristaltik pompa vasıtasıyla kolon dengeleme tamponuyla dengelenerek numune yüklenecek hale getirildi. Kolonun dengelendiği üstten verilen tampon ile alttan toplanan numunelerin 280 nm'deki absorbanlarının ve pH'larının bir birine eşitlendiğinden anlaşıldı.

3.2.3.d. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Homojenat hazırlama kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan homojenatın 7 ml'si dengelenmiş olan kolona yüklendi. Afinite kolonu yıkama tamponu ile yıkanarak peroksidaz enziminin kolona tutunup diğer safsızlıkların kolondan uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş olan peroksidaz enziminin elüsyonu gerçekleştirildi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 35 ml/saat'e ayarlanarak elüatlar 1,5'er ml'lik eppendorf tüplere toplandı.

Toplanan her bir tüpteki kalitatif protein miktarı 280 nm’de spektrofotometrik olarak belirlendi.

3.2.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Saflaştırılan enzim, Laemmli metodu uygulanarak %3-8 kesikli SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) yapıldı (Laemmli 1970). Böylece enzimin saflık derecesi kontrol edilmiş olundu. İşlem şu şeklide gerçekleştirildi;

Elektroforezde kullanılan camlar başta su ile daha sonrada alkol ile temiz bir şekilde yıkandı. Elektroforez camları üst üste getirildi ve özel kısıkaçlarla sabitleştirildi. Kısıkaçlarla sabitlenen camlar plakalar, sızdırmayı engelleyen sünger bulunduran jel hazırlama standına yerleştirildi. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı aşağıdaki miktarlarda ayrı ayrı hazırlandı.

Çizelge 3.11. Ayırma ve yığma jeli hazırlama prosedürü

Çözelti Adı	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
1 M Tris-HCl (pH: 8,8) tamponu	5 ml	-
1 M Tris-HCl (pH 6,8) tamponu	-	0,41 ml
%30 Akrilamit-%0,8 Bisakrilamit çözeltisi	4,4 ml	0,4 ml
%10’luk SDS çözeltisi	0,2 ml	0,03 ml
%5’lik TEMED çözeltisi	0,13 ml	0,03 ml
Saf su	3,13 ml	2,45 ml
%10’luk Amonyum persülfat çözeltisi	0,2 ml	0,1 ml

Öncelikle ayırma jeli çözeltisi hazırlandı ve plakaların arasında kalan boşluğa dikkatli bir şekilde 0,6 cm kalana kadar dolduruldu. Plakalar arasındaki jelin donması için kısa bir süre beklenildi. Ayırma jelinin donduğundan emin olduktan sonra yığma jeli hazırlandı ve donan ayırma jelinin üstüne pipetle dikkatli bir şekilde dolduruldu. Numuneleri yüklemek için kuyucukların oluşması nedeniyle elektroforez için özel taraklar cam

plakalara dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yığılma jeli de donduktan sonra taraklar dikkatli bir biçimde kuyucukları bozmadan yavaşça çıkartıldı. Tutuculardan çıkarılan içinde jel bulunan cam plakalar elektroforez tankına özel cam plaka tutuculara sabitlendi ve bu da tanka yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu.

100 µl enzim örneği, 100 µl numune tamponu, 100 µl gliserolden oluşan enzim numunesi 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu numuneler ve standart protein dikkatli bir şekilde jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez tankı kapatıldı. 30 dk 80 voltta jel yürütüldü. Daha sonra akım 120 volt'a getirildi ve boya jelden akana kadar jel yürütüldü. Numunelerin yürümesinin takibi, numune tamponunda bulunan brom timol mavisi reaktifi ile yapıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra akım kesildi. Plakalar arasında bulunan jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve 30 dk boyunca jel tespit çözeltisi ile karıştırıldı. Bu süre sonunda redüksiyon çözeltisi içerisinde 30 dk karıştırıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra jel iyice yıkanıcaya kadar 5 dk'lık süreler boyunca 3 defa saf suyla yıkandı. Jelin boyanması için 20 dk taze hazırlanmış gümüş nitrat çözeltisi içerisinde boyandı. Gümüş nitrat çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra bantlar görününceye kadar yıkama 1 çözeltisi ile muamele edildi. Bantlar görününce hızlı bir şekilde yıkama 1 çözeltisi uzaklaştırılıp jel yıkama 2 çözeltisi içerisine alındı. Son olarak jel görüntüleri görüntüleme cihazı yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılıp saklandı (Temel 2006).

3.2.5. Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden saflaştırılan POD'ların karakterizasyon çalışmaları

Afinite kolonlarından saflaştırılan Alabaş ve kara lahana POD'larının optimum ve kinetik parametrelerinin belirlemek için guaiakol substratı varlığında ölçümler alındı. Optimum ve kinetik parametrelerin belirlenmesi kapsamında; optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve guaiakol ve H₂O₂ için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı.

3.2.5.a. POD enzimleri için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum pH değerinin belirlenmesi için pH'sı 5,0 ile 8,5 aralığında olan 0,1 M'lik KH_2PO_4 tamponları hazırlandı ve her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

3.2.5.b. POD enzimleri için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum iyonik şiddet değerinin belirlenmesi için pH'sı 7,0 olan 0,01 M ile 1 M aralığında olan KH_2PO_4 tamponları hazırlandı ve her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

3.2.5.c. POD enzimleri için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden saflaştırılan POD enzimlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla ısıtmalı-soğutmalı özelliğe sahip su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümlerinde kullanılmak üzere alabaş turp için pH'sı 7,0 olan 0,2 M'lik KH_2PO_4 tamponu ve kara lahana için pH'sı 7,0 olan 0,4 M'lik KH_2PO_4 tamponu ve substrat çözeltileri hazırlandı. Çözeltileri bulunduran karışım küvet içerisine alındıktan sonra ilgili sıcaklığa ayarlanan su banyosuna alındı. 10°C aralıklarla 0°C-80°C arasında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

3.2.5.d. Guaiakol ve H_2O_2 substratları için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

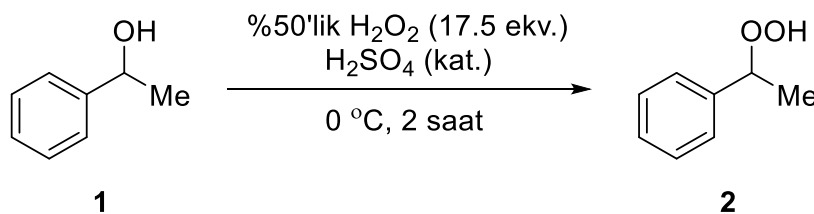
Guaiakol substratı kullanılarak optimum parametreler dahilinde saflaştırılan POD'lar için her bir substratın 5 farklı substrat konsantrasyonunda ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden hem guaiakol hem de H_2O_2 'nin K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

3.2.6. Kullanılan ligant için kinetik çalışmalar

İnhibisyon çalışmasıyla ilgili farklı inhibitör ve 45 mM guaiakol ile 22,5 mM H₂O₂ substrat konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi belirlendi. Bulunan değerlerden %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan 4-aminobenzohidrazitin K_i değerini belirlemek amacıyla POD için enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu ile bulunan bu konsantrasyon değerinden az ve fazla iki konsantrasyon kullanılarak toplamda beş substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesine bakıldı. Çalışmada kullanılan 5 farklı substrat konsantrasyonu önceden hazırlanan stok çözelti yardımıyla ön denemeler yapılarak belirlendi. Sonuçta elde edilen tüm değerler ile 4-aminobenzohidrazitin için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden inhibisyon tipleri ve K_i değerleri belirlendi.

3.2.7. *rac*-Hidroperoksit sentezi

8 ml % 50'lik H₂O₂ bir balonda 0°C'ye soğutulduktan sonra 5 g MgSO₄ 30 dk içinde ilave edildi. 8 mmol *rac*-1-feniletanol damla damla ilave edildikten sonra 2 saat 0°C'de ve 12 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışıma doymuş NaHCO₃ ilave edilip dietileter (15 ml x 3) ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra organik faz MgSO₄ üzerinden kurutuldu. Kolon kromatografisi (30 g silikajel, %10 dietileter/hekzan) yapılarak *rac*-(1-hidroperoksietil)benzen elde edildi ve saflıkları ¹H-NMR ve ¹³C-NMR ile kontrol edildi.



Şekil 3.4. *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin sentez reaksiyonu

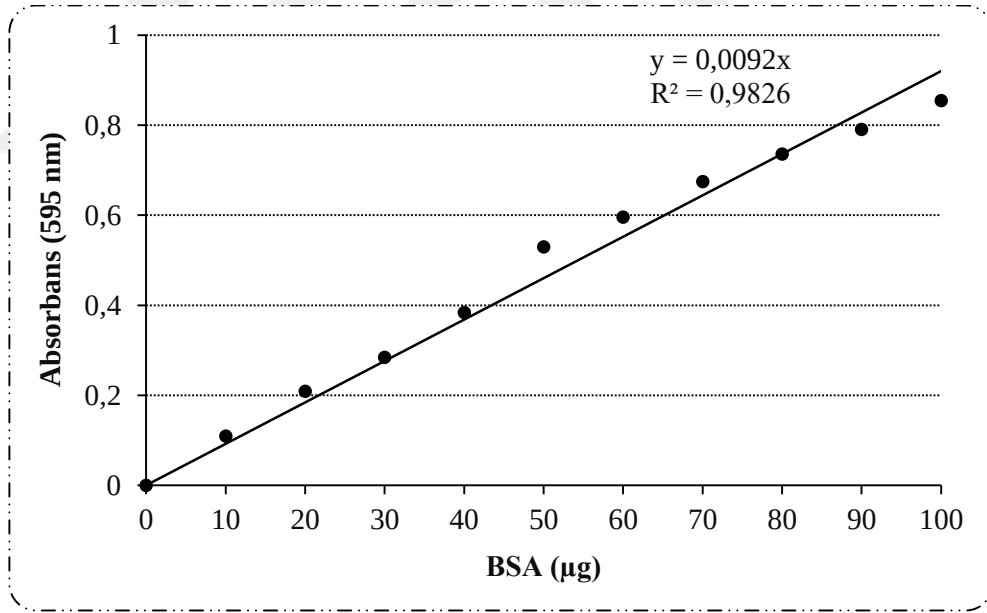
3.2.8. *rac*-Hidroperoksit indirgenmesi

0.1 M pH'sı 6,0 olan fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış bitkilerden elde edilen 50 ml'lik peroksidaz enzim çözeltisi üzerine 0,5 mmol *rac*-(1-hidroperoksietil)benzen ve 0,2 mmol (22 µL) guaiakol ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında sürdürüldü ve HPLC ile takip edildi. Karışım CH₂Cl₂ (75 ml x 3) ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra organik faz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. İnce tabaka kromatografisi (TLC) yapılarak hidroperoksit ve alkol saflaştırıldı. Uygun bir kiral kolon kullanılarak HPLC'de yürütülen numunelerin *ee*'leri belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Alabaş ve kara lahanadan hazırlanmış olan homejenatlar ile 4-aminobenzohidrazit afinite jelinden saflaştırılmış peroksidaz enzim çözeltilerindeki protein miktarları Bradford metodu kullanılarak belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 3.2.1.b’de anlatılmış olan prosedüre göre standart bir grafik çizildi. Çizilen bu grafikten faydalanılarak hem homojenatlardaki hem de saflaştırma sonucu elde etmiş olduğumuz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarları hesaplandı. Protein tayini için çizilen absorbansa karşı µg protein standart grafiği Şekil 4.1’de verildi.

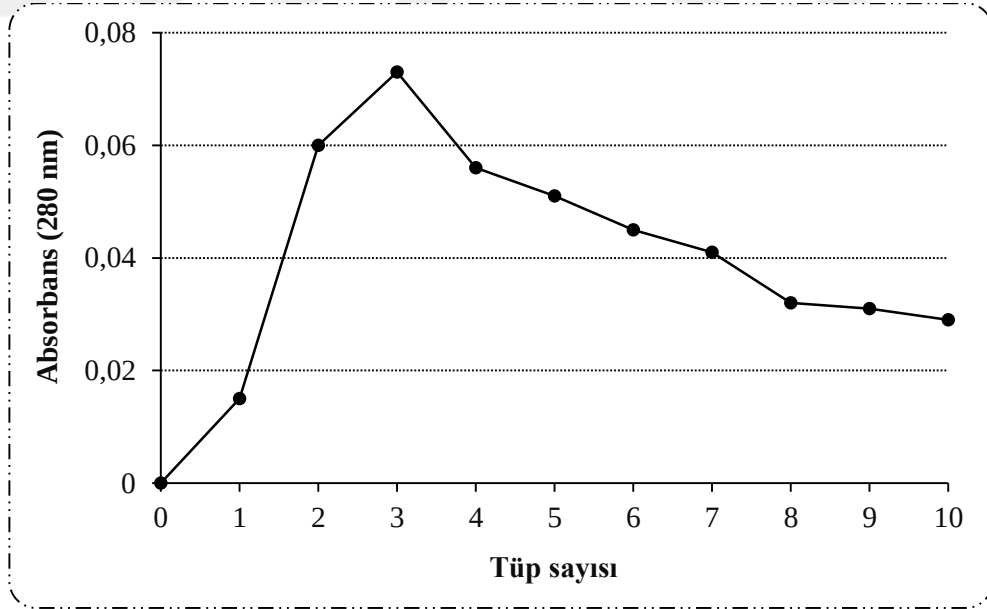


Şekil 4.1. Bradford metoduna göre sığır serum albuminden hazırlanan standart grafik

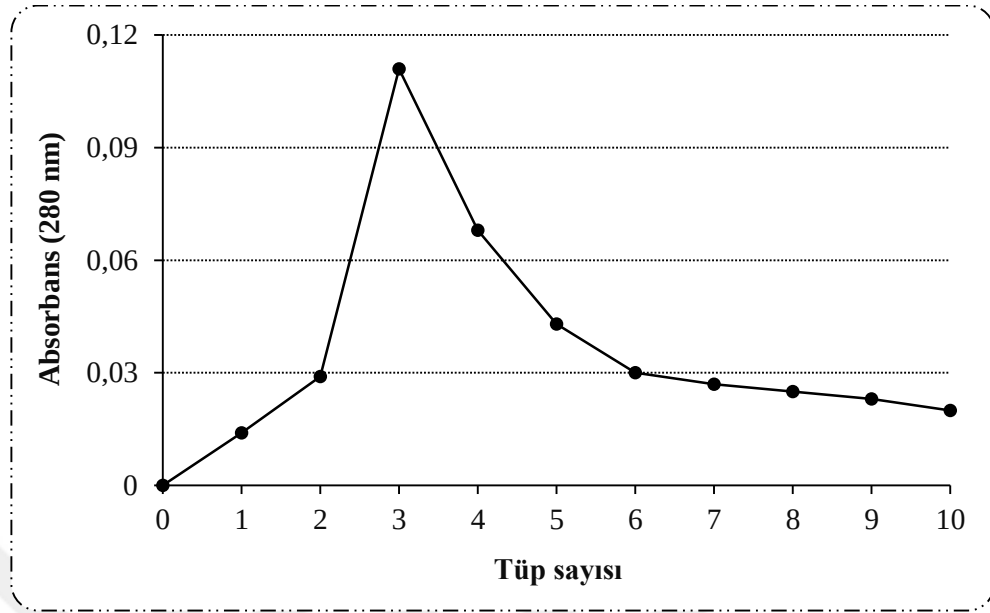
4.2. Alabaş Turp ve Kara Lahana Peroksidaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları

4.2.1. Afinite kromatografisi kullanılarak elde edilen POD enzimi saflaştırma sonuçları

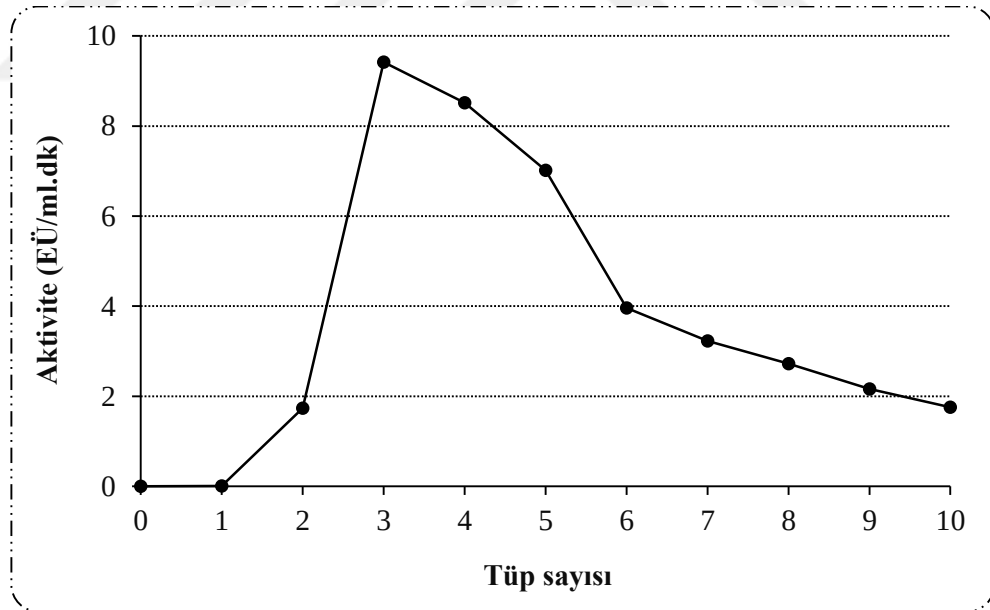
Hazırlanışı 3.2.3.b’de anlatılmış olan kolondan, alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden hazırlanmış olan homojenatlardan ayrı zamanlarda olmak üzere 7’şer ml önceden dengelenmiş kolonlara yüklendi. Kolona tutunmayan safsızlıklar yıkama çözeltisiyle uzaklaştırıldıktan sonra elüsyon yapıldı. Elüatlar 1,5’er ml’lik eppendorf tüplere toplandı. Her bir tüpteki kalitatif protein miktarı 280 nm’de belirlenerek 280 nm’deki absorbansa karşı tüp sayısı grafikleri çizildi (Şekil 4.2, 4.3). Daha sonra absorbans göstermiş olan elüatların 470 nm’de aktiviteleri ölçüldü. Doygun substrat konsantrasyonlarında ölçülen aktivitelerden hesaplanan EÜ’ye karşı tüp sayısı grafikleri çizilerek Şekil 4.4, 4.5’de gösterildi.



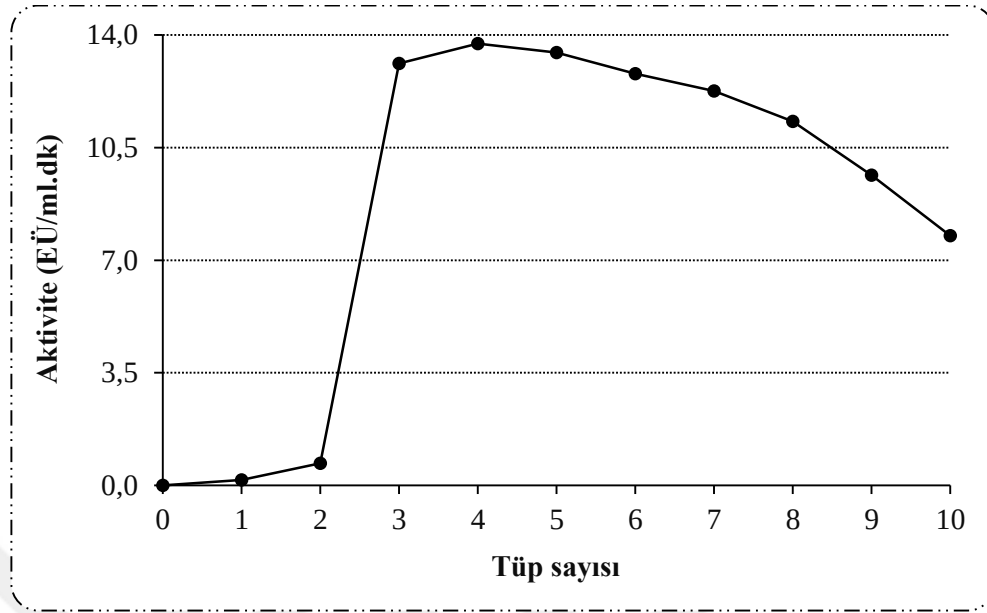
Şekil 4.2. Afinite kolonundan saflaştırılan alabaş turp POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 280 nm’de vermiş oldukları absorbansları gösteren grafik



Şekil 4.3 Afinite kolonundan saflaştırılan kara lahana POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 280 nm’de vermiş oldukları absorbansları gösteren grafik



Şekil 4.4. Afinite kolonundan saflaştırılan alabaş turp POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 470 nm’de vermiş oldukları absorbanslara karşılık gelen EÜ’leri gösteren grafik



Şekil 4.5. Afinite kolonundan saflaştırılan kara lahana POD enziminin saflaştırma sonrasında elüatların 470 nm’de vermiş oldukları absorbanlara karşılık gelen EÜ’leri gösteren grafik

4.2.2. POD’un afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları

Ligantı 4-aminobenzohidrazit olan afinite kolonundan saflaştırılan alabaş turp ve kara lahana peroksidaz enziminin saflaştırma etkinliğini belirlemek için toplanan elüatlara 470 nm’de aktivite ölçümü ve bu elüatlar için Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar saflaştırma tablosu haline getirilerek Çizelge 4.1, 4.2’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Alabaş turp POD enziminin 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları

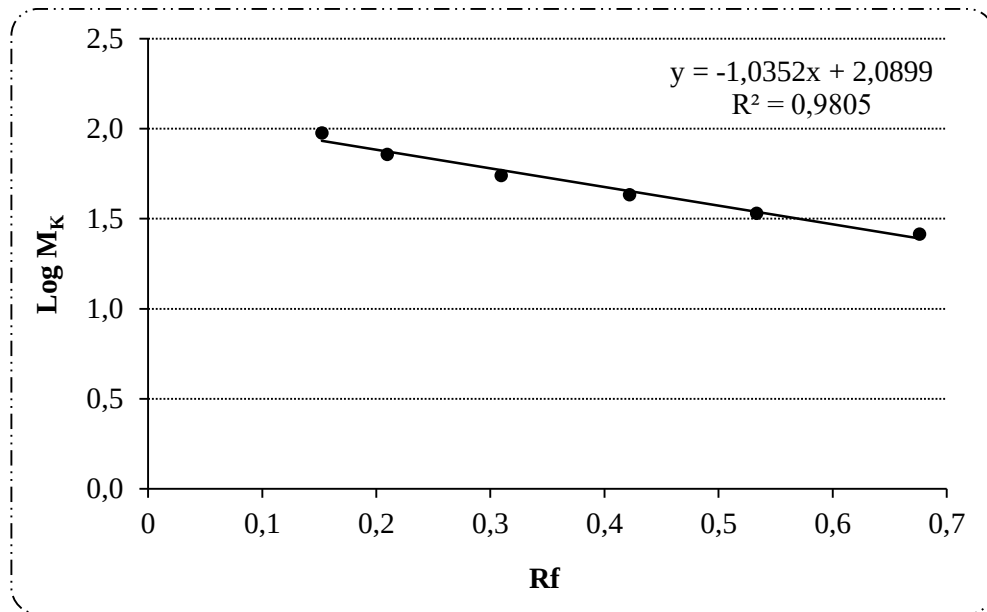
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	7,0	21,96	4,022	28,154	153,72	5,46	100	1
Afinite Kromatografisi	5,0	10,96	0,0078	0,039	54,8	1405,13	35,7	257,4

Çizelge 4.2. Kara lahana POD enziminin 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları

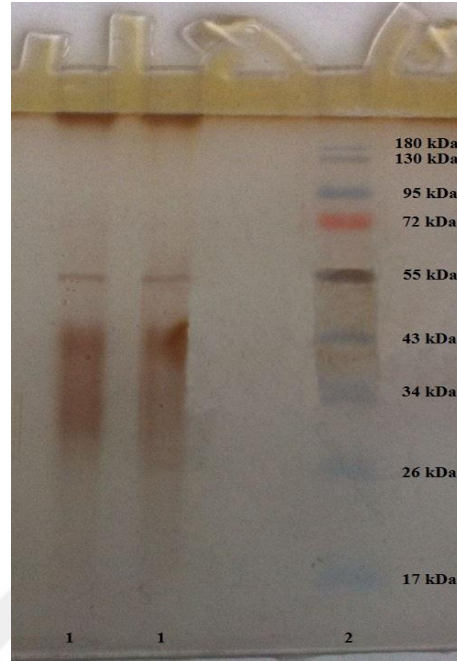
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	7,0	55,12	3,9130	27,391	385,84	14,09	100	1
Afinite Kromatografis	5,0	28,70	0,0065	0,0325	143,5	4415,39	37,2	313,4

4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforez sonuçları

Sentezlenen 4-aminobenzohidrazit afinite kolonundan saflaştırılan alabaş ve kara lahana peroksidaz enzimlerinin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapıldı. Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde yapılan elektroforez sonrasında jeller üzerinde elde edilen bantların görüntüleri görüntüleme cihazlarıyla bilgisayar ortamına aktarılarak molekül kütleleri belirlendi. Saflaştırılan alabaş turp ve kara lahana POD enzimlerinin molekül kütleleri çizilen $\log M_K$ - R_f grafiklerinden hesaplandı (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9; Çizelge 4.3).

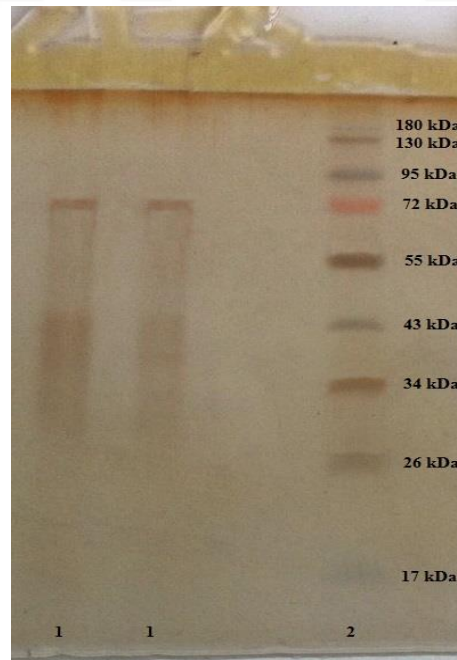


Şekil 4.6. Alabaş turp POD enzimi için çizilen R_f - $\log M_K$ grafiği



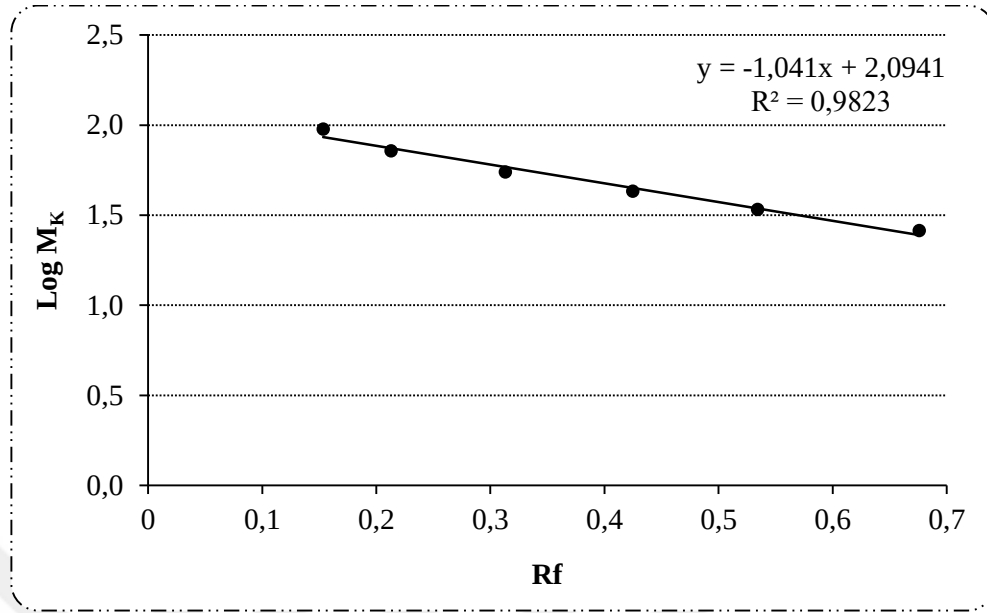
Şekil 4.7. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış olan alabaş turp peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

*(1 Nolu kuyular: Saflaştırılan alabaş turp peroksidaz enzimi, 2 Nolu kuyu: Standart proteinler)



Şekil 4.8. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış olan kara lahana peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

*(1 Nolu kuyular: Saflaştırılan kara lahana peroksidaz enzimi, 2 Nolu kuyu: Standart proteinler)



Şekil 4.9. Kara lahana POD enzimi için çizilen R_f-log M_k grafiği

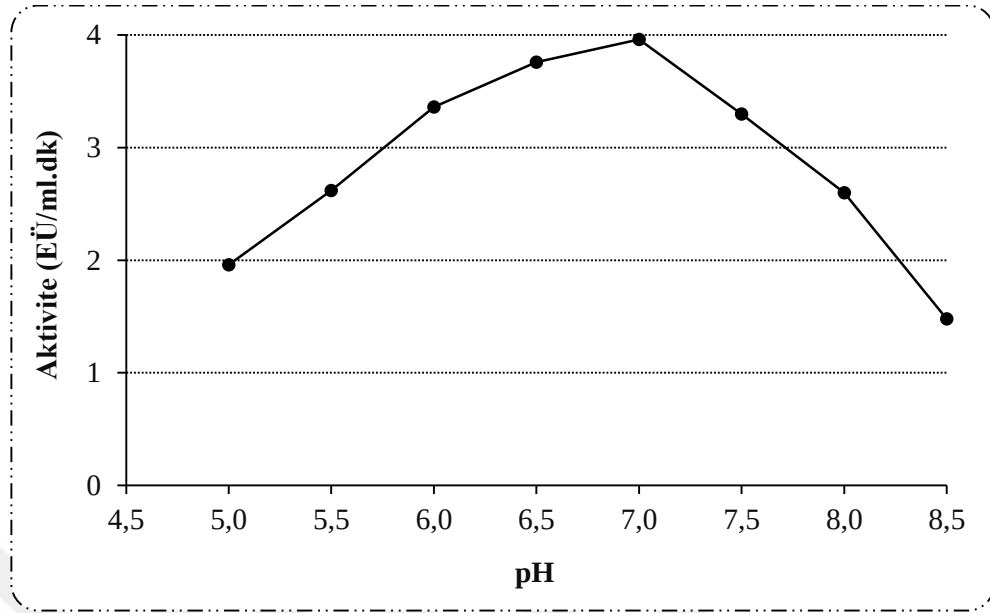
Çizelge 4.3. Alabaş turp ve kara lahana POD enzimleri için SDS-PAGE ile hesaplanan molekül kütlesi sonuçları

Enzim	Bitki	Molekül Kütlesi (kDa)
POD (Peroksidaz)	Alabaş Turp	58,2
	Kara Lahana	73,4

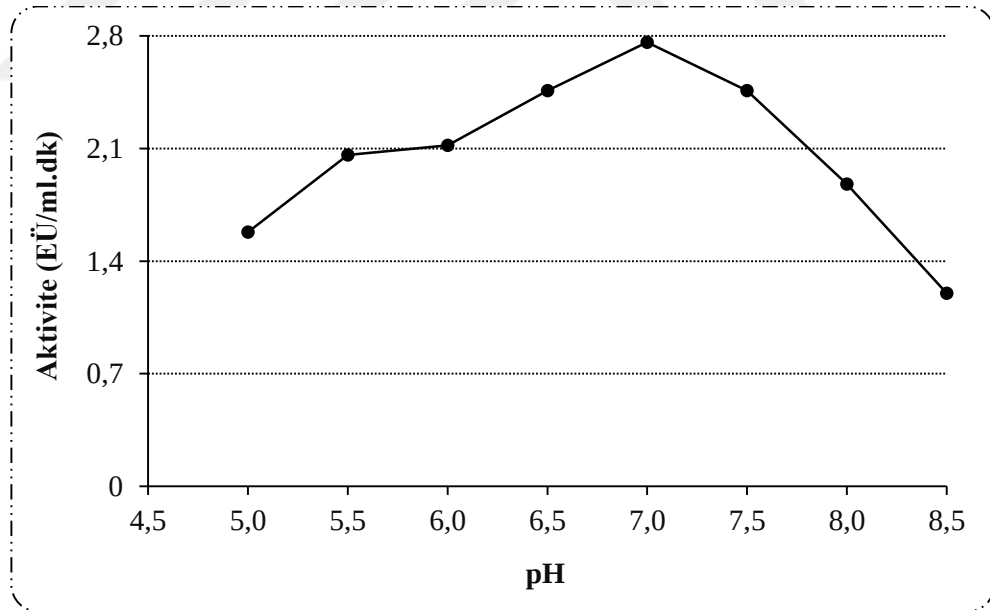
4.3. Alabaş Turp ve Kara Lahanadan Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin Karakterizasyon Çalışma Sonuçları

4.3.1. POD enziminin optimum pH sonuçları

Bölüm 3.2.5.a’da anlatıldığı üzere yapılan optimum pH çalışması neticesinde alabaş turp ve kara lahana POD enzimlerinden elde edilen sonuçlarla çizilen aktiviteye karşı pH grafikleri (Şekil 4.10, 4.11) aşağıda her bir enzim için ayrı ayrı verildi.



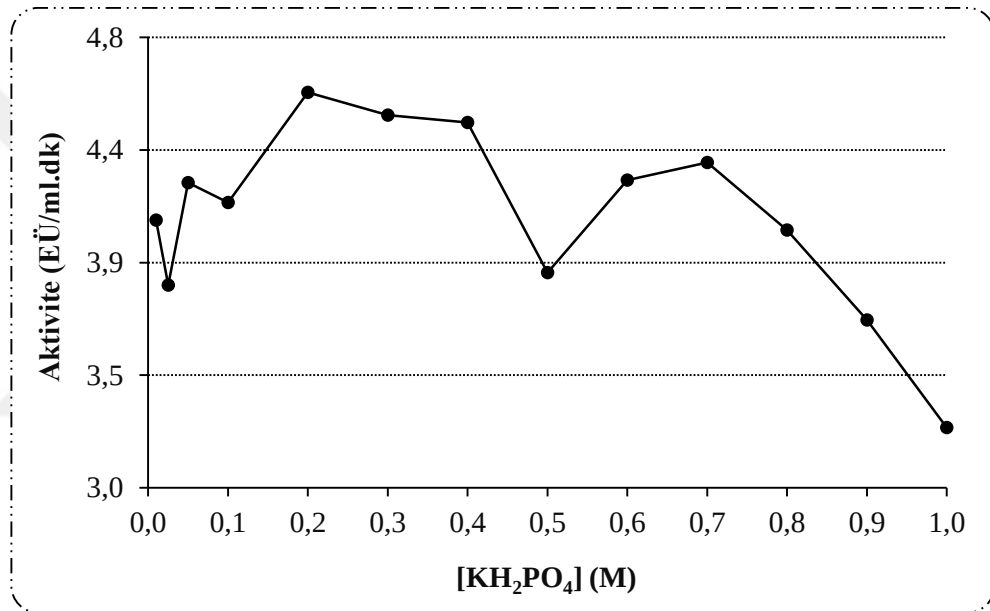
Şekil 4.10. Alabaş turp POD için yapılan optimum pH çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-pH grafiği



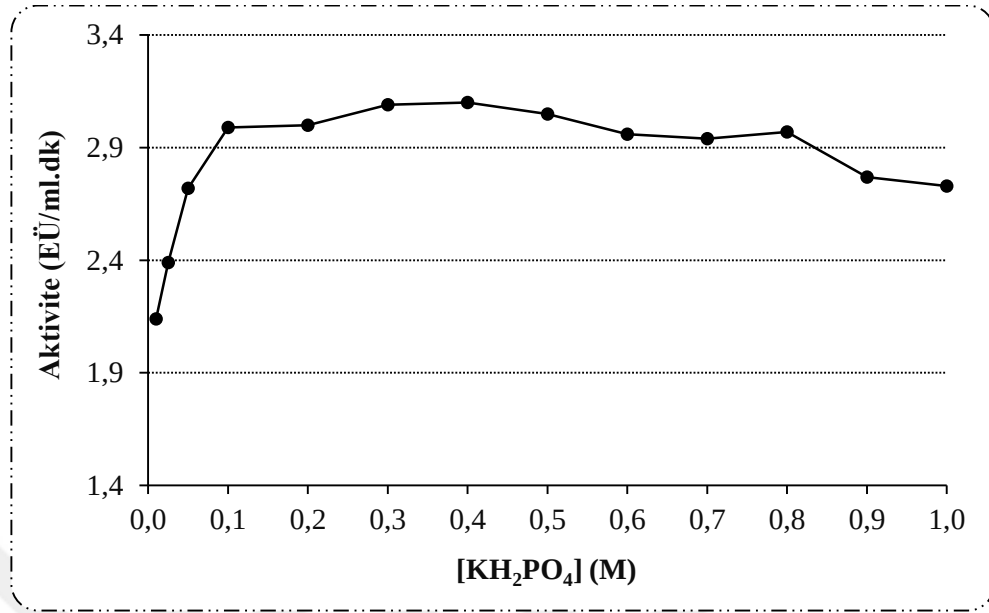
Şekil 4.11. Kara lahana POD için yapılan optimum pH çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-pH grafiği

4.3.2. POD enziminin optimum iyonik şiddet sonuçları

Alabaş turp ve kara lahana peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri için en uygun iyonik şiddet konsantrasyonunu belirlemeye yönelik yapılan çalışma kapsamında bölüm 3.2.5.b’de anlatıldığı şekilde her bir enzim için ayrı ayrı deney düzeneği kurularak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle çizilen aktivite (EÜ/ml.dk)-konsantrasyon grafikleri Şekil 4.12, 4.13’de verildi.



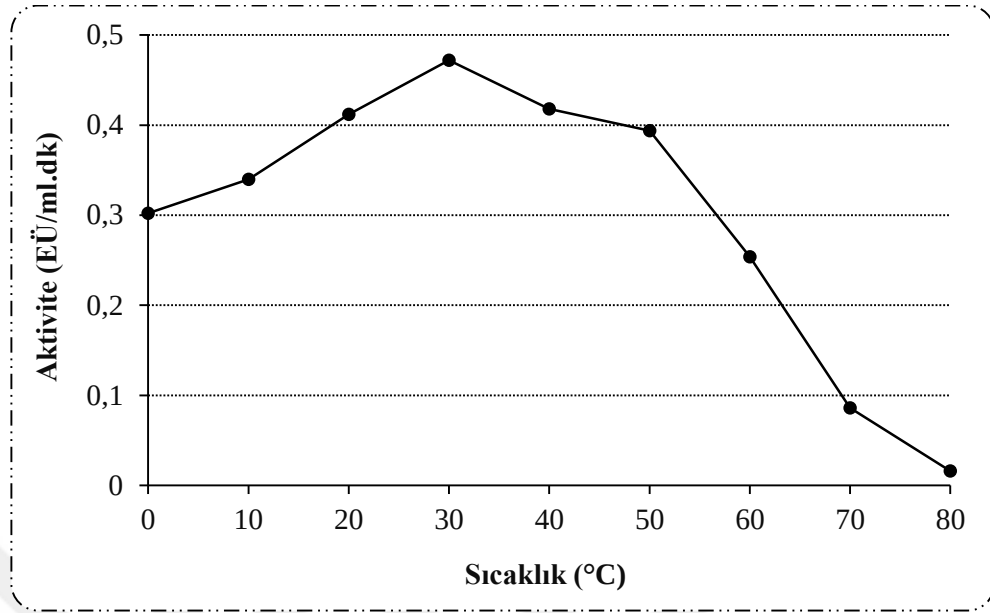
Şekil 4.12. Alabaş turp POD için yapılan optimum iyonik şiddet çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-[KH₂PO₄] (M) grafiği



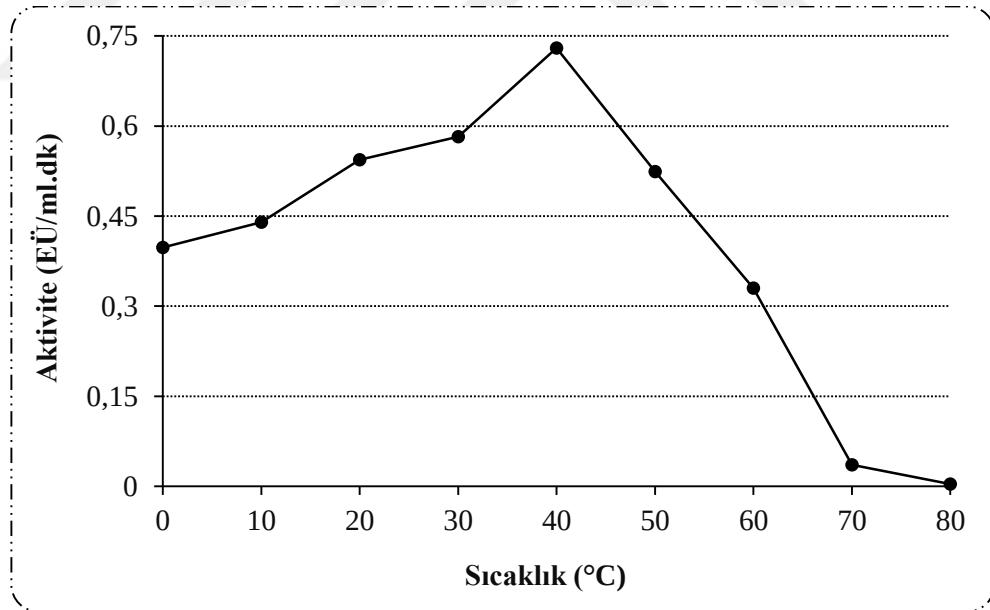
Şekil 4.13. Kara lahanada POD için yapılan optimum iyonik şiddet çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-[KH₂PO₄] (M) grafiği

4.3.3. POD enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarını ayrı ayrı belirlemek üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite ölçümleri yapılırken her bir enzimin optimum pH ve optimum iyonik şiddet değerlerini içeren fosfat tamponları bölüm 3.2.5.c’de anlatıldığı şekilde kullanıldı. Elde edilen aktivite sonuçları ile çizilen aktiviteye (EÜ/ml.dk) karşı sıcaklık grafikleri Şekil 4.14, 4.15’de verildi.



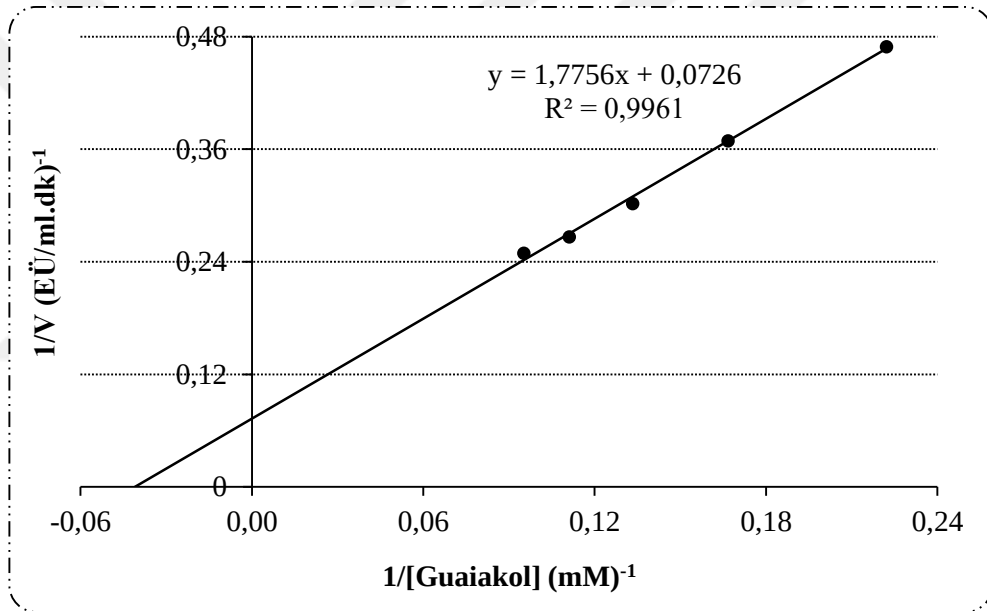
Şekil 4.14. Alabaş turp POD için yapılan optimum sıcaklık çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-Sıcaklık (°C) grafiği



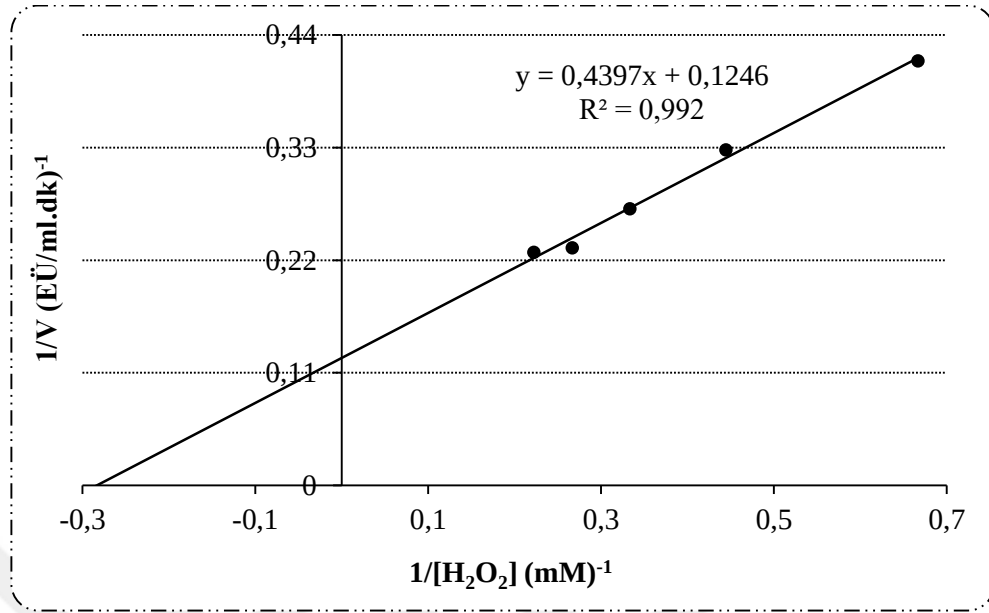
Şekil 4.15. Kara lahana POD için yapılan optimum sıcaklık çalışması sonucu elde edilen verilerle çizilen Aktivite (EÜ/ml.dk)-Sıcaklık (°C) grafiği

4.3.4. Guaiakol ve H₂O₂ substratlarının K_m ve V_{max} değerlerini belirlemeye yönelik yapılan çalışma sonuçları

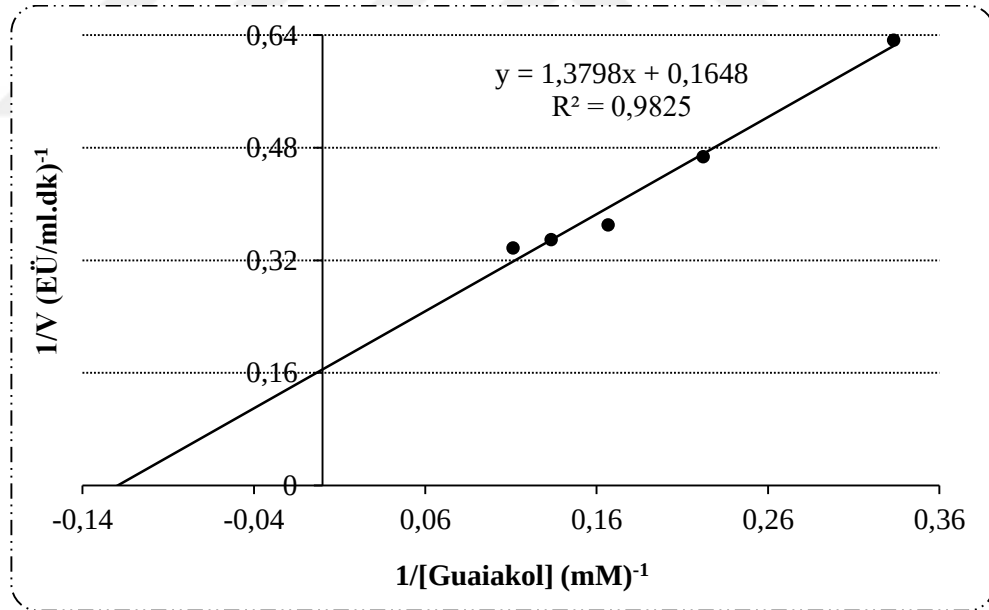
Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin guaiakol ve H₂O₂ için K_m ve V_{max} değerlerini belirlemeye yönelik bölüm 3.2.5.d’de anlatıldığı şekilde deneyler yapıldı. Yapılan deneyler neticesinde elde edilen aktivite değerleri ile her bir substrat için ayrı ayrı çizilen 1/[S]-1/V grafiklerinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.16-4.19).



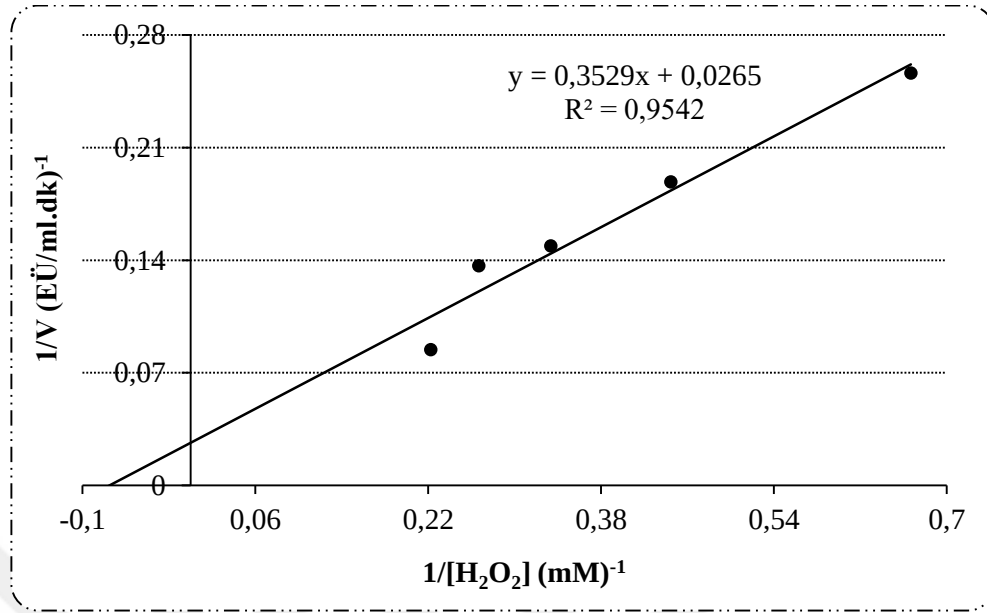
Şekil 4.16. Alabaş turp peroksidaz enziminin guaiakol için çizilen 1/[Guaiakol]-1/V grafiği



Şekil 4.17. Alabaş turp peroksidaz enziminin H_2O_2 için çizilen $1/[H_2O_2]$ - $1/V$ grafiği



Şekil 4.18. Kara lahana peroksidaz enziminin guaiakol için çizilen $1/[Guaiakol]$ - $1/V$ grafiği



Şekil 4.19. Kara lahanada peroksidaz enziminin H_2O_2 için çizilen $1/[H_2O_2]$ - $1/V$ grafiği

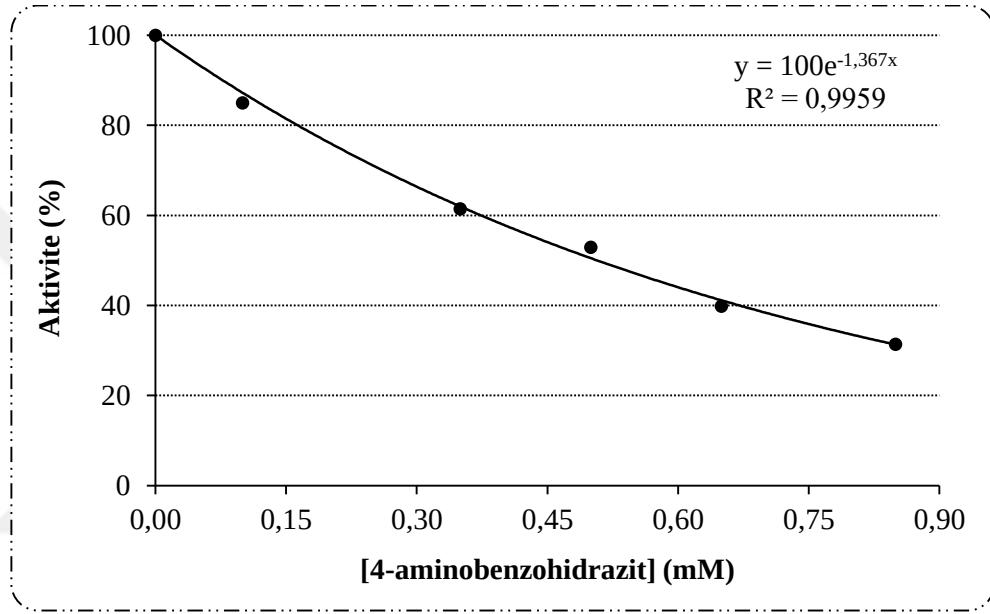
Çizelge 4.4. Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin karakterizasyon çalışması toplu sonuçları

Karakterizasyon Çalışması		Alabaş Turp	Kara Lahana
Optimum pH		7,0	7,0
Optimum İyonik Şiddet (M)		0,2	0,3
Optimum Sıcaklık (°C)		30	40
Guaiakol	K_m (mM)	24,46	8,37
	V_{max} (EÜ/ml.dk)	13,77	6,07
H_2O_2	K_m (mM)	3,53	13,32
	V_{max} (EÜ/ml.dk)	8,03	37,74

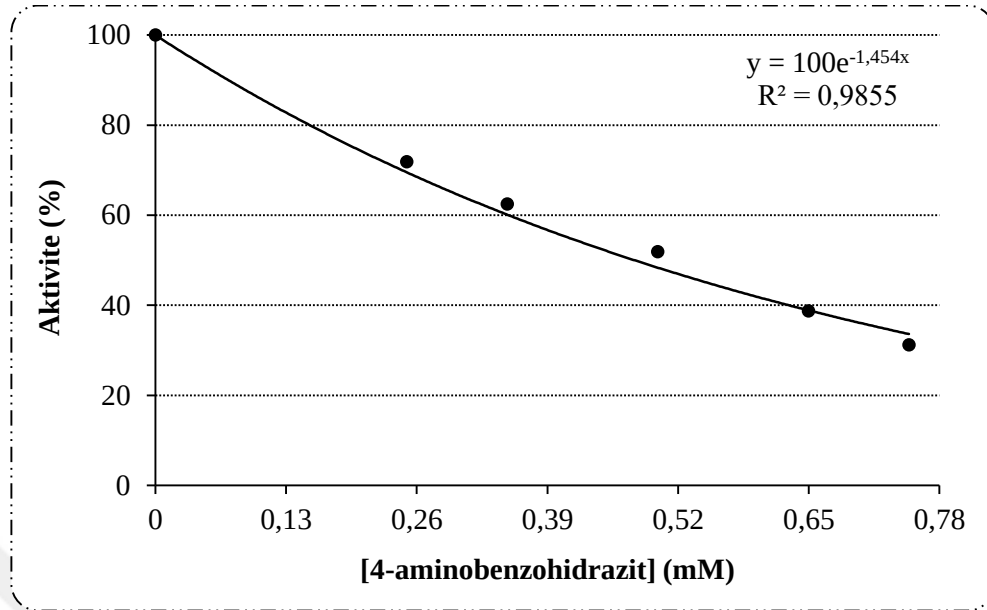
4.4. 4-aminobenzohidrazit Molekülünün IC_{50} ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları

Bu çalışma kapsamında 4-aminobenzohidrazit molekülünün alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimleri üzerine guaiakol substratı kullanılarak

inhibisyon etkileri araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda sabit doygun substrat konsantrasyonunda (Guaiakol 45 mM) ve en az 5 farklı 4-aminobenzohidrazit konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak aktivite değerleri hesaplandı. Daha sonra elde edilen değerler kullanılarak Aktivite (%)-[4-aminobenzohidrazit] grafikleri (Şekil 4.20, 4.21) çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı.

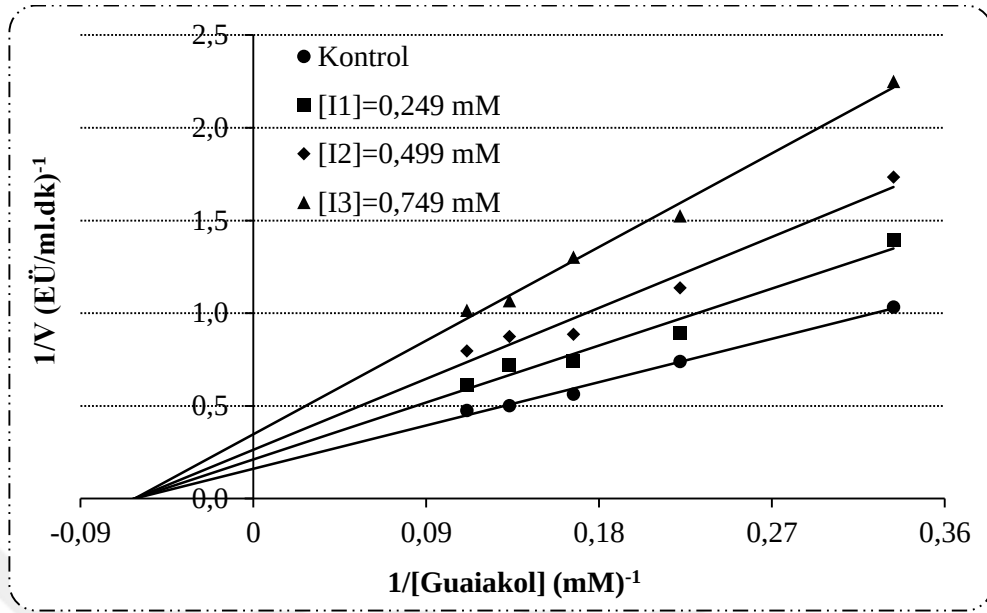


Şekil 4.20. Alabaş turp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen Aktivite(%)-[4-aminobenzohidrazit] grafiği

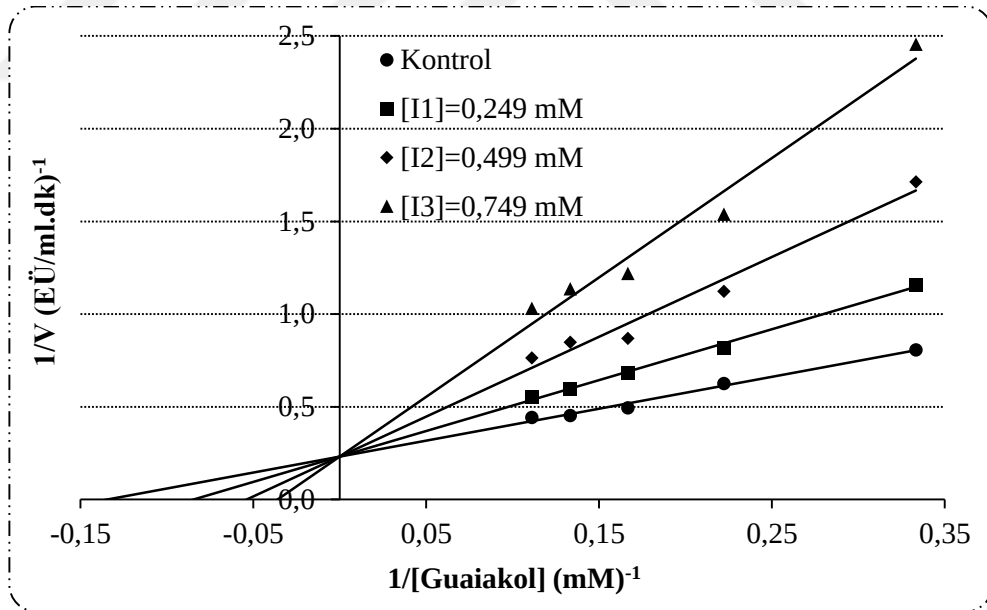


Şekil 4.21. Kara lahana POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen Aktivite(%)-[4-aminobenzohidrazit] grafiği

IC₅₀ değerleri alabaş ve kara lahana POD için belirlendikten sonra bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite sonuçları 1/V ve 1/[S] değerlerine dönüştürüldü. Hesaplanan 1/V ve 1/[S] değerlerinden çizilen grafikler (Şekil 4.22, 4.23) yardımıyla 4-aminobenzohidrazit için inhibisyon tipi ve K_i değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5).



Şekil 4.21. Alabaş turp POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen $1/V$ ve $1/[S]$ grafiği



Şekil 4.22. Kara lahana POD enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-aminobenzohidrazit ile elde edilen $1/V$ ve $1/[S]$ grafiği

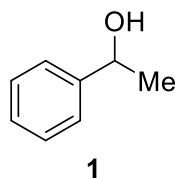
Çizelge 4.5. Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin inhibisyon çalışması toplu sonuçları

Bitki	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	İnhibisyon Tipi
Alabaş Turp	507,1	741,3±83	Yarışmasız
Kara Lahana	476,7	342,3±74	Yarışmalı

4.5. *rac*-Hidroperoksit Sentez Sonuçları

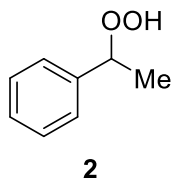
Bölüm 3.2.7’de anlatılan deney prosedürüne göre *rac*-(1-hidroperoksietil)benzen sentezlendi. Sentezlenen bileşik ve sentez esnasında kullanılan *rac*-1-feniletanol 400 MHz ¹H-NMR ve 100 MHz ¹³C-NMR ile kontrol edildi. Elde edilen spektrumlar Ek 1.1, 1.2’de verildi. NMR spektrumlarının yorumu ve HPLC analizi yapıldı.

Rac-1-feniletanol



Renksiz sıvı; **¹H-NMR (400 MHz; ppm; CDCl₃)** δ 7.35-7.23 (m, 5H), 4.85 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 2.19 (bs, 1H), 1.46 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); **¹³C-NMR (100 MHz, ppm, CDCl₃)** δ 145.9, 128.5, 127.5, 125.4, 70.4, 25.2; **HPLC analizi:** Chiralcel OD kolon: *i*PrOH/hekzan, (10/90), akış hızı: 0.6 ml/dk, 220 nm, Alıkonma zamanları *R* = 11.3 dk, *S* = 12.5 dk

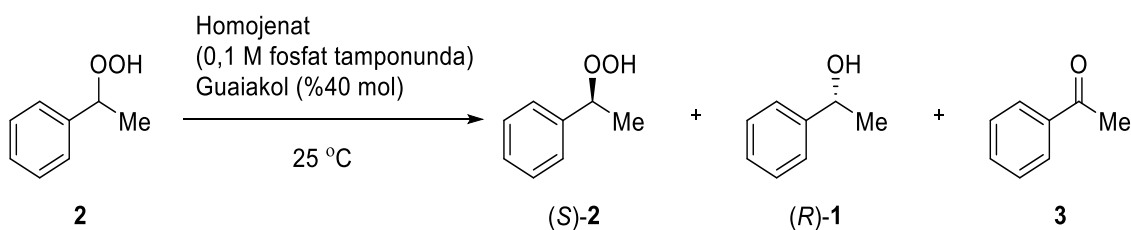
***Rac*-(1-hidroperoksietil)benzen**



Renksiz sıvı; ¹H-NMR (400 MHz; ppm; CDCl₃) δ 7.80 (bs, 1H), 7.39-7.34 (m, 5H), 5.08 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.47 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, ppm, CDCl₃) δ 141.4, 128.7, 128.3, 126.5, 83.8, 20.1; **HPLC analizi:** Chiralcel OD kolon: *i*PrOH/hekzan, (10/90), akış hızı: 0.6 ml/dk, 220 nm, Alıkonma zamanları *R* = 14.6 dk, *S* = 17.6 dk

4.6. *rac*-Hidroperoksidin Bitki POD Ekstraktları ile İndirgenme Sonuçları

Farklı bitki kaynaklarından elde edilen POD ekstraktlarının her biri ile ayrı ayrı bölüm 3.2.8’de anlatıldığı şekilde *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin kinetik rezolüsyon çalışması yapıldı (Şekil 4.23). Reaksiyon sonucunda karışımın kendisi ile izole edilen hidroperoksit ve alkol ayrı ayrı kiral OD kolonu kullanılarak HPLC’de yürütüldü ve elde edilen HPLC spektrumlarından (Ek 2.1-2.10) %*ee* değerleri hesaplandı. Hesaplanan sonuçlar Çizelge 4.6-4.15’de verildi.



Şekil 4.23. *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin bitki POD enzimi ile indirgenme reaksiyonu

Çizelge 4.6. Beyaz turp POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,5	37	88	52	1
2	1,0	50	90	90	
3	1,5	52	88	98	

Çizelge 4.7. Kırmızı turp POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	1,0	28	98	38	0,4
2	1,5	36	94	52	
3	3,75	52	86	96	
4	4,5	53	86	98	

Çizelge 4.8. Alabaş turp POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,75	38	66	40	2,3
2	1,0	43	64	48	
3	1,5	50	64	64	
4	2,0	56	60	76	

Çizelge 4.9. Tatlı turp POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,25	54	86	100	0,2
2	0,75	63	60	100	

Çizelge 4.10. Japon turpu POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,33	34	96	48	2,3
2	1,0	52	90	96	

Çizelge 4.11. Kara lahana POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,5	55	80	98	1,8

Çizelge 4.12. Mor lahana POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,5	41	64	44	2,9
2	1,0	57	58	76	

Çizelge 4.13. Kırmızı pancar POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	1,0	21	84	22	3,7
2	3,0	45	84	68	
3	4,0	51	82	84	

Çizelge 4.14. Yer elması POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	0,5	19	96	22	6,9
2	2,0	27	94	34	
3	4,0	34	94	48	
4	6,0	38	94	58	
5	8,0	41	94	64	
6	11,0	43	94	72	
7	24,0	47	92	84	

Çizelge 4.15. Zencefil POD enzimi ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin reaksiyonu sonucu elde edilen % değerler

No	Süre (saat)	Dönüşüm (%)	R-Alkol (R-1) %ee	S-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) (%)
1	1,0	20	96	24	%5,9
2	2,0	25	84	28	
3	4,0	27	82	30	
4	20,0	32	68	32	

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX (hem grubu) bulunduran peroksidazlar (POD) başlıca hayvanlarda, mantarlarda, bakterilerde ve bitkilerde bulunan bir glikoproteindir (Rompel *et al.* 2007). Metabolik olaylar esnasında meydana gelen H_2O_2 'yi zararsız hale getirmek için birçok aromatik molekül peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılmaktadır (Robert *et al.* 1993).

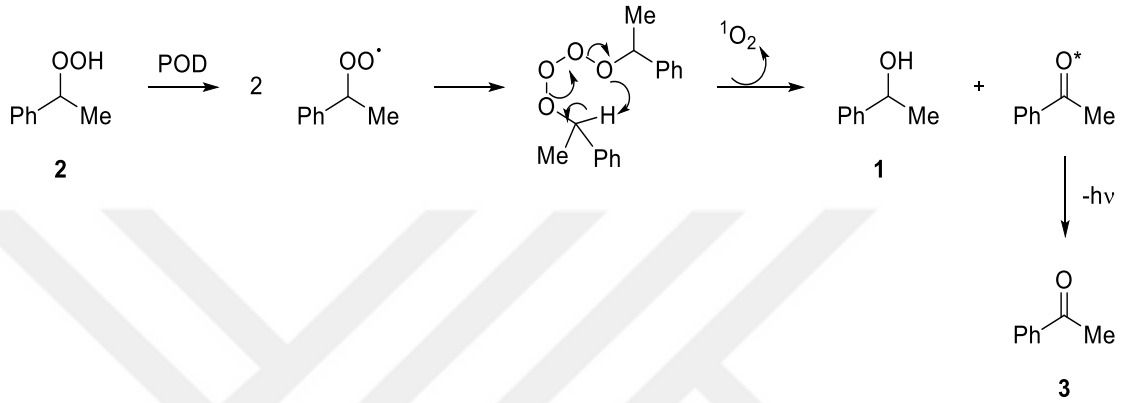
Son yıllarda yapılan çalışmalarda peroksidaz enzimleri özellikle sentetik uygulamalar için biyokatalizör olarak büyük ilgi çekmişlerdir. Peroksidazlar hetero atomlu ve aromatik moleküllerin oksidasyonu, epoksidasyon reaksiyonları ve rasemik hidroperoksitlerin enantiyoselektif indirgenme reaksiyonlarını katalizlemektedir. Organik sentez reaksiyonlarında önemli bir görev üstlenen hidroperoksitler iyi bir yükseltgeyicidir. Rasemik hidroperoksitlerin hazırlanması için literatürde bilinen birkaç yöntem bulunmaktadır. Ancak optikçe aktif saf hidroperoksitlerin hazırlanmasında son yıllara kadar bilinen uygun bir yöntem bulunmamaktadır (Adam *et al.* 1993; Adam and Richter 1994).

Enzimler kiral bir biyokatalizör olarak rasemik ve pirokiral substratlardan optikçe aktif olan bileşiklerin üretilmesi için kullanılabilirler. Biyokatalizör olarak peroksidaz enzimleri rasemik sekonder hidroperoksitlerden kinetik rezolüsyon yöntemi kullanılarak yüksek saflıkta enantiyomerce zenginleştirilmiş alkol ve hidroperoksitlerin elde edilmesinde kullanılırlar. Ancak ticari olarak satın alınan peroksidaz enzimleri hem çok pahalıdır hem de özel taşıma koşulları isteyen bir enzimdir. Bu yüzden sunulan tez kapsamında kolaylıkla piyasadan temin edilebilen ve basit yöntemlerle peroksidaz ekstratları hazırlanabilen farklı bitki kaynağı (beyaz turp, kırmızı turp, alabaş turp, tatlı turp, japon turpu, kara lahana, mor lahana, kırmızı pancar, yer elması ve zencefil) peroksidazları *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin asimetric indirgenmesi için kullanıldılar. Bitkilerden hazırlanan homojenatların her biri için ayrı ayrı bölüm 3.2.8'de anlatıldığı şekilde reaksiyonlar kuruldu ve reaksiyon sonuçları kiral OD kolonunun kullanıldığı HPLC ile belirlenerek alkol ve hidroperoksit için %ee değerleri hesaplandı (Çizelge 5.1).

Hesaplanan değerlere göre beyaz turp POD için % 52'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 88 ve %ee (S)-hidroperoksit 98, alabaş turp POD için % 56'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 60 ve %ee (S)-hidroperoksit 76, tatlı turp POD için % 63'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 60 ve %ee (S)-hidroperoksit 99, kırmızı turp POD için % 53'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 86 ve %ee (S)-hidroperoksit 98, japon turpu POD için % 52'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 90 ve %ee (S)-hidroperoksit 96, kara lahanada POD için % 55'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 80 ve %ee (S)-hidroperoksit 98, mor lahanada POD için % 57'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 58 ve %ee (S)-hidroperoksit 76, kırmızı pancar POD için % 51'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 82 ve %ee (S)-hidroperoksit 84, yer elması POD için % 47'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 92 ve %ee (S)-hidroperoksit 84, zencefil POD için % 32'lik bir dönüşüm ile %ee (R)-alkol 68 ve %ee (S)-hidroperoksit 32 olarak elde edildi. Aynı zamanda bu çalışmalar kerevizden izole edilen POD içinde yapılmış fakat anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu çalışmada elde edilen kinetik rezolüsyon sonuçlarına göre biyokatalizör olarak kullanılan bütün bitki peroksidazlarının enantiyoseçiciliği R-(1-hidroperoksietil)benzen molekülüne olduğu belirlenmiştir. Farklı zaman sürelerinde gerçekleşen reaksiyonlarla elde edilen sonuçlara göre oluşan (R)-alkollerin %60-92 ve (S)-hidroperoksidin ise %76-99 aralığında değişen ee değerlerine sahip oldukları tespit edildi. Bu değerlerden (R)-alkol için en yüksek değer %92 ile yer elmasından ve (S)-hidroperoksit için ise en yüksek değer tatlı turptan izole edilen POD'den elde edilmiştir. Reaksiyon süresiyle orantılı olarak uygun alkol ve hidroperoksidin ee'sindeki bu farklılıklar zamanla enzimin yapısı ile ilgili pH, sıcaklık gibi ortam şartlarında meydana gelen değişikliklerle açıklanabilir. Bitki ham ekstraktları ile yapılan reaksiyon şartları hem alabaş turp hem de kara lahanadan saflaştırılan saf enzimler için yapılmıştır. Ancak; saflaştırma sonrasında yapılan diyaliz ve liyofilizasyon işlemleri esnasında enzimlerde yaşanan aktivite kayıplarından dolayı anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Aynı reaksiyon şartları bütün bitki POD'ler ile rasemik tersiyer hidroperoksitler içinde kurulmuş ancak siterik etkiden dolayı reaksiyonların ilerlemediği gözlemlenmiştir.

Bitki peroksidazları ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin kinetik rezolüsyon reaksiyonu ile farklı yüzdelere keton (3) molekülünün oluştuğu gözlemlenmiştir

(Çizelge 5.1). Russell mekanizmasına (Şekil 5.1) göre incelediğimizde %6,9'luk değer ile en yüksek oranda yer elmasından izole edilen POD ve en düşük değerde ise %0,2'lik oran ile tatlı turptan izole edilen POD enziminin bu mekanizmayı kullandığı belirlenmiştir.



Şekil 5.1. Russell mekanizması

Çizelge 5.1. Bitki POD'ler için yapılan kinetik rezolüsyon toplu sonuçları

Bitki	Dönüşüm (%)	(R)-Alkol (R-1) %ee	(S)-Hidroperoksit (S-2) %ee	Keton (3) %
Beyaz Turp	52	88	98	1
Alabaş Turp	56	60	76	2,3
Tatlı Turp	63	60	99	0,2
Kırmızı Turp	53	86	98	0,4
Japon Turp	52	90	96	2,3
Kara Lahana	55	80	98	1,8
Mor Lahana	57	58	76	2,9
Kırmızı Pancar	51	82	84	3,7
Yer elması	47	92	84	6,9
Zencefil	32	68	32	5,9

Afinite kromatografisi bir tür adsorpsiyon kromatografisidir. Saflaştırmak istediğimiz materyalin, kolonun dolgu maddesini oluşturan matrikse kovalent bir bağ ile bağlanmış

olan liganta spesifik ve tersinir bağlandığı tekniktir. Bu yöntem özellikle proteinlerin saflaştırılmasında çok tercih edilmektedir. Afinite kromatografisi ile diğer kromatografik metotlar kullanılarak saflaştırması birkaç kademe isteyen, zaman olarak uzun süren hatta ayrıştırılması neredeyse mümkün olmayan biyolojik materyaller, bu teknik ile sadece tek kademede oldukça kompleks karışımlardan saflaştırılmıştır. Afinite jelinde genellikle sephadex, sepharose, biyojel gibi matriksler kullanılmaktadır. Seçilen ligantın izole etmek istediğimiz maddeye spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi göstermesi istenilen en önemli özelliğidir. Afinite tekniğinde bazı durumlarda istenmeyen etkileşimler olabilmektedir. İstenmeyen etkileşimler matriks ile ligant arasına uzantı kolu adı verilen moleküller sokularak ortadan kaldırılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerinin afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta ve yüksek saflıkta saflaştırılması birçok araştırmacının temel hedefidir. 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 tez çalışmalarının bir bölümünde ise alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden peroksidaz enziminin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılıp karakterizasyonu ilk defa gerçekleştirildi. Bu bağlamda daha önce grubumuzca yapılan 4-aminobenzohidrazidin ligant olarak kullanıldığı karaturp ve şalgam bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışması esas alındı (Kalin *et al.* 2014). Alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması için öncelikle afinite jeli hazırlandı. Daha sonra ligant olarak 4-aminobenzohidrazidin bağlı olduğu afinite kolonundan peroksidazlar saflaştırıldı ve saf enzimlerin karakterizasyon çalışmaları için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, kullanılan substratların K_m ve V_{max} değerleri ve son olarak kullanılan ligantın inhibisyon özellikleri belirlendi.

Çalışmalarımız esnasında afinite kolonlarından elde ettiğimiz fraksiyonlardaki kalitatif protein tayini spektrofotometrik olarak 280 nm’de ölçümler alınarak yapıldı. Kullanılan bu yöntem fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik bir halka bulunduran protein

yapısındaki amino asitlerin 280 nm’de UV ışınlarını absorplaması esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

Saflaştırma işlemlerinde kantitatif protein tayinleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Proteine coomassie brilliant blue G-250’nin bağlanması esasına dayanan bu yöntemde, oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı olmaktadır. Kullanılan yöntemin bozucu etkilere karşı hassasiyetinin düşük olması ve yüksek oranlarda tekrarlanabilmesi diğer yöntemlerden üstünlükleridir. Protein–boya kompleksinin çözeltiye uzun süre kalabilmesi ve hassasiyetinin 1-100 µg arasında olması diğer bir tercih sebebidir (Bradford and Williams 1976).

Alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivite ölçümü spektrofotometrik bir metot kullanılarak yapıldı. Bu yöntem, kromojenik bir substrat olan guaiakolün H_2O_2 tarafından yükseltgenmesi ve meydana gelen renkli molekülün (3,3'-dimetoksi-4,4'-bifenokinon) absorbansta meydana getirdiği artışın 470 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Kalin *et al.* 2014). Enziminin birçok substratı olmasına rağmen substrat olarak guaiakolün seçilmesinin sebebi literatürde molar ekstinksiyon katsayısının ($\epsilon_{470nm}=5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) verilmesidir. Substratı guaiakol olan peroksidaz enziminin saflaştırma basamaklarından sonra yapılan enzim aktivite ölçüm sonuçlarını vermek için; 1 enzim ünitesi “20°C’de ve 1 dk’da 1 µmol guaiakolün yükseltgenmesini katalizleyen enzim miktarı” olarak tanımlandı.

Hazırlamış olduğumuz 4-aminobenzohidrazit afinite kolonundan alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden POD enzimini saflaştırmak için ham ekstraktlar hazırlandı. Bitki peroksidazlarını hücre kompartımanlarından açığa çıkarmak için etkili bir yöntem olan dondurma çözme tekniği tercih edildi. Bu yöntemin tercih edilmesinin diğer bir sebebi ise biyomoleküllerin bozulmaması için de düşük bir sıcaklık ortamı sağlamasıdır.

Alabaş turp ve kara lahanadan hazırlanmış olan homojenatlar önceden dengelenmiş 4-aminobenzohidrazit kolonundan ayrı ayrı geçirilmiştir. Spesifik liganta POD'ların tutunup safsızlıkların jel ortamından uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra liganta tutunmuş olan POD'lar elüe edilerek tüm elüatların aktiviteleri ve protein miktarları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar kullanılarak alabaş turp ve kara lahana POD'ların saflaştırma etkinliklerini göstermek için saflaştırma tabloları çizilmiştir. Çizilen saflaştırma tablolarına bakıldığında alabaş turp POD enzimi 1405,13 (EÜ/mg)'lık bir spesifik aktiviteyle %35,7 verimle 257,4 kat, kara lahana POD ise 4415,39 (EÜ/mg)'lık bir spesifik aktiviteyle ve %37,2 verimle 313,4 kat saflaştırılmıştır. Yapmış olduğumuz saflaştırma işlemi tek bir kademe gerçekleşmiştir. Ancak literatüre baktığımız zaman amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve diyaliz gibi kromatografik yöntemlerden en az iki tanesi kullanılarak peroksidaz enzimi farklı kaynaklardan saflaştırılmıştır. Yapılan POD saflaştırma çalışmaları sonucu elde edilen saflaştırma katsayılarına örnek olarak; hurma yapraklarından üç kromatografik yöntem ile 1510000 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %41 verimle 68 kat (Al-Bagmi *et al.* 2018), buğdaydan üç kromatografik yöntem ile 5,43 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %85 verimle 284 kat (Altin *et al.* 2017), kuru fasulyeden üç kromatografik yöntem ile 25,29 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %4,8 verimle 0,86 kat (Koktepe *et al.* 2017), beyaz İspanyol bitkisinden (*Cytisus multiflorus*) dört kromatografik yöntem ile 17961,5 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %37,8 verimle 1167,8 kat (Galende *et al.* 2015), *Artocarpus lakoocha* kauçuklarından iki kromatografik yöntem ile 10,8 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %28,82 verimle 4,0 kat (Sonkar *et al.* 2015), *Hevea brasiliensis* hücre süspansiyonundan üç kromatografik yöntem ile 76872,7 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %1,77 verimle 44,21 kat (Chunwan *et al.* 2013), papayadan üç kromatografik yöntem ile 68,59 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %44,37 verimle 30,22 kat (Pandey *et al.* 2012), hurma yapraklarından üç kromatografik yöntem ile 906,2 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %5,8 verimle 17 kat (Abdurrahman *et al.* 2011), ıspanak yapraklarından iki kromatografik yöntem ile 96,4 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %4,2 verimle 22,6 kat (Koksal 2011). at turpundan iki kromatografik yöntem ile 772,25 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %71,3 verimle 291 kat (Lavery *et al.* 2010), siyah gram kabuğundan (*Vigna mungo*) iki kromatografik yöntem ile 1215291 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %44 verimle 44 kat (Ajila and Prasada Rao 2009), vanilya

çekirdeğinden iki kromatografik yöntem ile 1563,5 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %19 verimle 21 kat (Marquez *et al.* 2008), karnabahardan (üç kromatografik yöntem ile 466987,9 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %0,2 verimle 19,33 kat (Koksal and Gulcin 2008) kırmızı pancardan üç kromatografik yöntem ile 10500 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %84,6 verimle 15 kat (Rudrappa *et al.* 2007), marula meyvesinden üç kromatografik yöntem ile 361,469 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %1,3 verimle 19 kat (Mdluli 2005), kara lahanadan üç kromatografik yöntem ile 43805 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %33 verimle 33,5 kat (Gulcin and Yildirim 2005) saflaştırmaları verilebilir. Literatürdeki POD saflaştırma yöntemleri maliyet açısından oldukça külfetli ve zaman açısından uzun bir süre gerektiriyor. Bu tez kapsamında yapmış olduğumuz çalışmayı önceki çalışmalarla kıyasladığımız zaman hem süre hem de maliyet açısından oldukça avantajlı olduğu görülmektedir.

POD enzimi aynı zamanda 4-aminobenzohidrazit molekülünden hazırlanmış afinite jelinden daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan saflaştırılmıştır. Bu çalışmalarda; karaturptan 947,5 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %10,6 verimle 40,3 kat (Kalin *et al.* 2014), şalgamdan 9626,7 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %9 verimle 269,3 kat (Kalin *et al.* 2014), beyaz lahanadan 964,5 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %4,3 verimle 24,7 kat (Erdem *et al.* 2015), mor lahanadan 3550 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %2,9 verimle 120,6 kat (Somturk *et al.* 2014) ve kırmızı pancardan 1725 (EÜ/mg) spesifik aktiviteyle %38 verimle 24,7 kat (Inal *et al.* 2015) saflaştırma sonuçları bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre hem alabaş turp hem de kara lahana peroksidaz enzimi önceki çalışmalara göre daha yüksek verimle ve saflaştırma kat sayısı ile saflaştırılmıştır. Önceki çalışmalar ve bu çalışma elde edilen sonuçlar gösteriyor ki 4-aminobenzohidrazitden hazırlanmış olan bir afinite kolonundan peroksidaz enzimi farklı kaynaklardan tek kademedede saflaştırılabilmektedir.

Saflaştırmış olduğumuz alabaş turp ve kara lahana peroksidaz enzimlerinin saflıklarını ve molekül kütlelerini belirlemek için daha önceden anlatılan şekilde SDS-PAGE yapıldı. Yapılan elektroforez çalışmalarından anlaşıldığı üzere hem alabaş turp hem de kara lahana peroksidazları saf bir şekilde izole edilmiştir. Görüntüleri bilgisayar ortamına

aktarılan jellerden alabaş turp ve kara lahanada peroksidazlarının molekül kütleleri ayrı ayrı çizilen R_f -log M_K grafiklerinden hesaplandı. Hesaplanan değerlere göre alabaş turp için molekül kütlesi 58,2 kDa bulunurken kara lahanadan izole edilen peroksidaz için ise 73,4 kDa olarak tespit edildi. Literatürde farklı kaynaklardan saflaştırılan peroksidaz izoenzimlerinin molekül kütleleri yine aynı yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Farklı kaynaklardan izole edilmiş bu peroksidazların molekül kütleleri; hurma yapraklarında 68 kDa (Al-Bagmi *et al.* 2018), buğdayda 38,8 kDa (Altin *et al.* 2017), kuru fasulyeden 45 kDa (Koktepe *et al.* 2017), beyaz İspanyol bitkisinde 50 kDa (Galende *et al.* 2015), *Artocarpus lakoocha* kauçuklarında 53 kDa (Sonkar *et al.* 2015), beyaz lahanada 73,2 kDa (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancarda 80 kDa (Inal *et al.* 2015), karaturpta 67,3 kDa (Kalin *et al.* 2014), şalgamda 65,8 (Kalin *et al.* 2014), mor lahanada 69,3 kDa (Somturk *et al.* 2014), hurma yapraklarında (Al-Senaidy and Ismael 2011) 55 kDa, at turpunda (Lavery *et al.* 2010) 37 kDa, zeytinde (Tzika *et al.* 2009) 44 kDa, brokoli (Tipawan and Barrett 2005; Koksall and Gulcin 2008) 43 kDa, vanilya çekirdeğinde (Marquez *et al.* 2008) 46,5 kDa, kara lahanada (Gulcin and Yildirim 2005) 95 kDa, hurma yapraklarında (Deepa and Arumughan 2002) 48 kDa, çilekte (Civello *et al.* 1995) 65 kDa ve domatesde (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982) 43 kDa olarak belirlenmiştir. Özetle POD'un molekül kütlesi 40 ile 100 kDa aralığında saflaştırılan kaynağa göre değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada belirlenen peroksidaz enzimlerinin molekül kütlesi sonuçları bu aralık içerisinde olduğu için literatürü doğrulamaktadır.

Alabaş turp ve kara lahanadan peroksidaz enzimi saflaştırıldıktan sonra enzimlerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu bağlamda hem alabaş turp hem de kara lahanada POD için optimum pH, optimum iyonik şiddet ve optimum sıcaklık parametreleri belirlendi.

Saf alabaş turp ve kara lahanada peroksidaz enzimlerinin optimum pH'larını belirlemek için 0,1 M'lik fosfat tamponundan farklı pH'larda (5,0-8,0 aralığında) çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak enzimler için ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlardan çizilen grafiklerle hem alabaş hem de kara lahanada POD için optimum pH değeri 0,1 M'lik fosfat tamponunda pH 7,0 olarak belirlendi. Farklı kaynaklardan izole

edilen POD enzimleri için optimum pH değerleri ise; buğday için fosfat tamponunda 5,5 (Altin *et al.* 2017), kuru fasulye için fosfat tamponunda 5,0 (Koktepe *et al.* 2017), beyaz lahana için fosfat tamponunda 6,5 (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancar için fosfat tamponunda 6,5 (Inal *et al.* 2015), karaturp için fosfat tamponunda 6,5 (Kalin *et al.* 2014), şalgam için fosfat tamponunda 6,5 (Kalin *et al.* 2014), mor lahana için fosfat tamponunda 6,5 (Somturk *et al.* 2014), karnabahar için fosfat tamponunda 5,0 (Koksal and Gulcin 2008), kara lahana için Tris/HCl tamponunda 7,5 (Gulcin and Yildirim 2005), ıspanak yaprakları için fosfat tamponunda 5,2 (Koksal 2011), at turpu için fosfat tamponunda 7,0 (Lavery *et al.* 2010), karayip bitkisi için fosfat tamponunda 7,0 (Kumar *et al.* 2011) olarak belirlenmiştir. Önceki yapılan çalışmalar gösteriyor ki optimum pH değerleri 5,0-7,5 aralığında saflaştırılan kaynağa göre değişkenlik göstermektedir. Bu çalışma kapsamında belirlenen optimum pH değerleri literatürle uyum içindedir. Elde edilen bulgular eşiğinde peroksidaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH aralığı genellikle nötr pH'nın altı olan asidik pH değerleridir.

Diğer bir karakterizasyon çalışması kapsamında her iki peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddeti çalışması yapıldı. Bu bağlamda alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimleri için optimum pH değerinde olan 0,01 ile 1,0 M arasındaki konsantrasyona sahip fosfat tamponlarında ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile çizilen grafiklerden alabaş turp ve kara lahana için optimum iyonik şiddet değerleri sırasıyla pH'sı 7,0 olan fosfat tamponunda 0,2 M ve 0,3 M olarak belirlendi. Daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilen peroksidaz izoenzimlerinin optimum iyonik şiddet değerleri; buğday için fosfat tamponunda (pH:5,5) 0,1 M (Altin *et al.* 2017), kuru fasulye için fosfat tamponunda (pH:5,0) 0,3 M (Koktepe *et al.* 2017), beyaz lahana için fosfat tamponunda (pH:6,5) 0,6 M (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancar için fosfat tamponunda (pH:6,5) 0,7 M (Inal *et al.* 2015), karaturp için fosfat tamponunda (pH:6,5) 0,1 M (Kalin *et al.* 2014), şalgam için fosfat tamponunda (pH:6,5) 1,0 M (Kalin *et al.* 2014), mor lahana için fosfat tamponunda (pH:6,5) 0,3 M (Somturk *et al.* 2014), karnabahar için fosfat tamponunda (pH:5,0) 1,0 M (Koksal and Gulcin 2008) olduğu tespit edilmiştir. Genel anlamda baktığımızda bitki

peroksidazlarının optimum iyonik şiddet değerlerinin sabit kalmadığını kaynaktan kaynağa göre farklılık gösterdiği görülmektedir.

Optimum sıcaklık değerini belirlemek için alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin optimum pH ve optimum iyonik şiddet değerlerine sahip fosfat tamponunda 10'ar °C artışla 0-80°C aralığında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen verilere göre optimum sıcaklık değerleri alabaş turp için 30°C, kara lahana için ise 40°C olduğu belirlendi. Peroksidaz enzimin optimum sıcaklık değerleri literatürde optimum pH ve optimum iyonik şiddette yapılan çalışmalar sonucunda; buğday için 40°C (Altin *et al.* 2017), kuru fasulye için 30°C (Koktepe *et al.* 2017), beyaz lahana için 30°C (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancar için 70°C (Inal *et al.* 2015), karaturp için 30°C (Kalin *et al.* 2014), şalgam için 30°C (Kalin *et al.* 2014), mor lahana için 40°C (Somturk *et al.* 2014), vanilya çekirdeği için 16°C (Marquez *et al.* 2008), hurma yaprakları için 55°C (Al-senaidy and Ismael 2011), kara lahana için 40°C (Gulcin and Yildirim 2005), karnabahar için 30°C (Koksall and Gulcin 2008), ıspanak yaprakları için 60°C (Koksall 2011), karayip bitkisi için 50°C (Kumar *et al.* 2011) olarak bulunmuştur. Literatür verileri ve bu çalışmada elde edilen sonuçlar gösteriyor ki peroksidaz enzimi, genelde ya 30°C yada 40°C'ta maksimum aktivite göstermektedir.

Enzimin substrata olan ilgisini gösteren K_m ve V_{max} değerlerini bulmak için alabaş turp ve kara lahanadan saflaştırılana peroksidaz enzimlerinin substratı olan guaiakol ve hidrojen peroksidin doymuş olmayan en az 5 farklı konsantrasyonda her bir enzim ve her bir substrat için ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapıldı. Bulunan değerler $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerine dönüştürülerek Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen bu grafiklerden alabaş turp POD için guaiakol substratında K_m değeri 24,46 mM ve V_{max} değeri 13,77 EÜ/ml.dk, hidrojen peroksit substratında K_m değeri 3,53 mM ve V_{max} değeri 8,03 EÜ/ml.dk, kara lahana POD için ise guaiakol substratında K_m değeri 8,37 mM ve V_{max} değeri 6,07 EÜ/ml.dk, hidrojen peroksit substratında K_m değeri 13,32 mM ve V_{max} değeri 37,74 EÜ/ml.dk olarak hesaplandı. Guaiakol substratı ile peroksidazlar için literatürde yapılan çalışmalarda K_m ve V_{max} değerleri; buğday için K_m değeri 6,6 mM (Altin *et al.*

2017), kuru fasulye için K_m değeri 0,0154 mM (Koktepe *et al.* 2017), beyaz lahana için K_m değeri 3,19 mM ve V_{max} değeri 0,2 EÜ/ml.dk (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancar için K_m değeri 9,09 mM ve V_{max} değeri 1,38 EÜ/ml.dk (Inal *et al.* 2015), karaturp için K_m değeri 24,88 mM ve V_{max} değeri 3,23 EÜ/ml.dk (Kalin *et al.* 2014), şalgam için K_m değeri 3,23 mM ve V_{max} değeri 0,797 EÜ/ml.dk (Kalin *et al.* 2014), mor lahana için K_m değeri 0,048 mM ve V_{max} değeri 1,46 EÜ/ml.dk (Somturk *et al.* 2014), vanilya çekirdeği için K_m değerini 3,8 mM (Marquez *et al.* 2008), palmiya yaprakları için K_m değeri 3,96 mM (Deepa and Arumughan 2002), hurma yaprakları için K_m değeri 0,77 mM (Al-senaidy and Ismael 2011), at turpu için K_m değeri 0,5 mM (Lavery *et al.* 2010), kara lahana için K_m değeri 5,5 mM (Gulcin and Yildirim 2005), karnabahar için K_m değeri 141,64 mM ve V_{max} değeri 7500 EÜ/ml.dk (Koksal and Gulcin 2008), ıspanak yaprakları için K_m değeri 17,35 mM ve V_{max} değeri 1234 EÜ/ml.dk (Koksal 2011) olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde hidrojen peroksit substratı ile peroksidazlar için literatürde yapılan çalışmalarda K_m ve V_{max} değerleri; buğday için K_m değeri 7,3 mM (Altin *et al.* 2017), kuru fasulye için K_m değeri 0,065 mM (Koktepe *et al.* 2017), karaturp için K_m değeri 3,247 mM ve V_{max} değeri 0,799 EÜ/ml.dk (Kalin *et al.* 2014), şalgam için K_m değeri 12,49 mM ve V_{max} değeri 4,055 EÜ/ml.dk (Kalin *et al.* 2014) olarak tespit edilmiştir. K_m değeri enzim substrat kompleksinin sağlamlığının bir ölçüsüdür. K_m değerinin yüksek olması enzimin substrata ilgisinin az olduğunu, düşük olması ise enzimin substrata ilgisinin yüksek olduğunu gösterir. Bu tez kapsamında yapmış olduğumuz çalışmalar ile her iki substrat için bulunan K_m değerlerine bakıldığında; guaiakol substratına kara lahana peroksidaz enzimi, hidrojen peroksit substratına ise alabaş turptan izole edilen peroksidaz enzimi daha yüksek ilgi göstermektedir.

Ligant olarak kullandığımız 4-aminobenzohidrazit molekülünün alabaş turp ve kara lahana bitkilerinden izole edilen peroksidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. 4-aminobenzohidrazit molekülünün alabaş turp ve kara lahana POD enzimleri üzerine inhibisyon etkisi detaylı bir şekilde ilk defa bu tez kapsamında yapıldı. Her bir enzimin IC_{50} değerini belirlemek için guaiakol substratı varlığında reaksiyon ortamına 5 farklı konsantrasyonda 4-aminobenzohidrazit çözeltisi ilavesiyle aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite ölçümlerin % Aktivite-[4-aminobenzohidrazit]

grafikleri çizildi. Bu grafiklerden IC_{50} değerleri alabaş turp POD için 507,1 μM kara lahana POD için ise 476,7 μM olarak hesaplandı. Literatürde yapılan inhibisyon çalışmaları kapsamında 4-aminobenzohidrazit molükülünün POD'lar için IC_{50} değerleri; beyaz lahanada 0,517 mM (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancarda 0,047 mM (Inal *et al.* 2015), karaturpta 0,726 mM (Kalin *et al.* 2014), şalgamda 1,167 mM (Kalin *et al.* 2014), mor lahanada 1,047 mM (Somturk *et al.* 2014) olarak belirlenmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri incelendiğinde her ne kadar sonuçlar bir birine yakın olsa da alabaş turp peroksidaz enzimini inhibe etmek için kara lahana peroksidaz enzimine göre daha yüksek konsantrasyonda 4-aminobenzohidrazit molekülü gerekmektedir.

IC_{50} değerleri hesaplandıktan K_i ve inhibisyon tiplerini belirlemek için alabaş turp ve kara lahana POD'lar için çalışmalar yapıldı. Bu çalışma kapsamında her bir bitki peroksidazı için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit 4-aminobenzohidrazit konsantrasyonunda aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Hesaplanan aktivite değerlerinden faydalanılarak $1/V$ ve $1/[S]$ değerleriyle Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafikler yardımıyla alabaş turp için K_i değeri $741,3 \pm 83 \mu M$, inhibisyon tipi yarışmasız, kara lahana için ise K_i değeri $342,3 \pm 74 \mu M$, inhibisyon tipi ise yarışmalı olduğu bulundu. Literatürde 4-aminobenzohidrazit'in POD üzerine inhibisyon etkileri; beyaz lahana için K_i değeri $0,994 \pm 0,453 \mu M$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Erdem *et al.* 2015), kırmızı pancar için K_i değeri $0,78 \pm 0,17 \mu M$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Inal *et al.* 2015), karaturp için K_i değeri $0,5947 \pm 0,012 mM$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Kalin *et al.* 2014), şalgam için K_i değeri $1,103 \pm 0,102 mM$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Kalin *et al.* 2014), mor lahana için K_i değeri $0,702 \pm 0,05 mM$ ve inhibisyon tipi yarışmasız (Somturk *et al.* 2014) şeklinde belirlenmiştir. K_i ve inhibisyon tipi belirleme çalışması çerçevesinde elde edilen sonuçlara göre; alabaş turp peroksidaz enzimi önceki çalışmalarda olduğu gibi yarışmasız inhibisyon gösterirken kara lahana peroksidaz enzimi ise yarışmalı inhibisyon tipi göstermiştir. İnhibisyon tiplerine göre 4-aminobenzohidrazit inhibitörü alabaş turptan saflaştırılan peroksidaz enziminin aktif merkezinden farklı bir yere bağlanırken, kara lahanadan saflaştırılan peroksidaz enziminde ise substrat ile 4-aminobenzohidrazit inhibitörü enzimin aktif merkezine bağlanmak için yarış halindedir. Alabaş turp POD için

enzim inhibitör ayrışma sabiti olan K_i değeri kara lahana POD'un inhibisyonundan elde edilen değerin iki katından daha fazladır.

Peroksidaz enzimini saflaştırmak için kullandığımız saflaştırma tekniği; düşük maliyetli olması, kısa zaman zarfında yüksek saflıkta ürün elde edilmesi ve en önemlisi hazırlanan kolon dolgu malzemesinin defalarca kullanılabilir olması gibi özellikleri ile bizlere avantajlar sağlamaktadır.

Sonuç Olarak;

- 1) Farklı bitki kaynaklarından izole edilen POD'lar ile *rac*-(1-hidroperoksietil)benzenin kinetik rezolüsyonu ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirildi.
- 2) Alabaş turpundan POD enzimi ilk defa bu tez kapsamında saflaştırıldı. Aynı zamanda saflaştırma işlemi ilk kez afinite kromatografisi metoduyla yapıldı.
- 3) Kara lahana köklerinden POD enzimi ilk kez afinite kromatografisi tekniği ile bu çalışma kapsamında saflaştırıldı.
- 4) Saflaştırılan alabaş turp ve kara lahana POD karakterizasyon çalışması alabaş turp için ilk kez kara lahana için ise literatürü doğrulamak için tekrar yapıldı.
- 5) Yapılan çalışmada afinite kolonunun ligantını oluşturan 4-aminobenzohidrazit molekülü için detaylı inhibisyon kinetiği parametreleri alabaş turp ve kara lahana POD için ilk defa gerçekleştirildi.

KAYNAKLAR

- Abdurrahman, M., Al-Senaidy, A.M., Ismael, M.A., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293-298.
- Adam, W., Boss, B., Harmsen, D., Lukacs, Z., Saha-Moller, C.R, Schreier, P., 1998b. Kinetic resolution of chiral hydroperoxides: hydrogen-peroxide-mediated screening of peroxidase-active soil bacteria. *The Journal of Organic Chemistry*, 63, 7598-7599.
- Adam, W., Lukacs, Z., Saha-Moller, C.R, Schreier, P., 2000b. Biocatalytic kinetic resolution of racemic hydroperoxides through the enantioselective reduction with free and immobilized microorganisms. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 4887-4892.
- Adam, W. and Richter, M. 1994. Metal-catalyzed direct hydroxy-epoxidation of olefins. *Accounts of Chemical Research*, 27, 57-62.
- Adam, W., Lazarus, M., Hoch, U., Korb, M.N., Saha-Moller, C.R, Schreier, P., 1998a. Horseradish peroxidase-catalyzed enantioselective reduction of racemic hydroperoxy homoallylic alcohols: a novel enzymatic method for the preparation of optically active, unsaturated diols and hydroperoxy alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 63, 6123-6127.
- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U., Scherier, P. 1999a. Biotransformations with peroxidases. *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74-108.
- Adam, W., Mock-Knoblauch, C., Saha-Moller, C.R., 1999b. Asymmetric synthesis with the enzyme coprinus peroxidase: kinetic resolution of chiral hydroperoxides and enantioselective sulfoxidation. *The Journal of Organic Chemistry*, 64, 4834-4839.
- Adam, W., Saha-Moller, C.R, Schmid, K.S., 2000a. Preparation of optically active allylic hydroperoxy alcohols and 1,3-diols by enzyme-catalyzed kinetic resolution and photooxygenation of chiral homoallylic alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 65, 1431-1433.
- Afeyan, N.B., Fulton, S.P., Regnier, F.E., 1991. Perfusion chromatography packing materials for proteins and peptides. *Journal of Chromatography A*, 544, 267-279.
- Afsharypuor, S. and Suleimany, M., 2002. Volatile oil constituents of *Brassica oleracea*
- Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H., 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598.
- Aitken, S.M., Ouellet, M., Percival, M.D., English, A.M., 2003. Mechanism of Horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors, *Biochemical Journal*, 375, 613-621.
- Ajila, C.M., Prasada Rao, U.J.S., 2009. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60, 36-44.
- Aklan, A.P., 2007. Enantiyomerik saflıkta 1-fenil–1-propanolün lipaz katalizörlüğünde esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.

- Akyol, Ç., 2004. Yüksek hidrostatik basınç ve düşük ısı işlem kombinasyonu ile yeşil fasulye, bezelye ve havuçta peroksidaz ve lipoksigenazın inaktivasyonu. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Orta Doğu teknik Üniversitesi.
- Al-Bagmi, M.S., Khan, M.S., Ismael, M.A., Al-Senaidy, A.M., Bacha, A.B., Husain, F.M., Alamery, S.F., 2018. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, In press.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro Bru, S.R., Ros Barcelo, A., Pedreno, M.A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60, 377-390.
- Altin, S., Tohma, H., Gülcin, I., Koksall, E., 2017. Purification, characterization, and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* Ssp. Vulgare). *International Journal of Food Properties*, 20(9), 1949-1959.
- Aqvist, J., Kazemi, M., Isaksen, V.G., Brandsdal, O.B., 2017. Entropy and enzyme catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 50, 199-207.
- Atkins, R.C. and Carey, F.A., 1997. Organic Chemistry. The McGraw-Hill companies, Inc, 184-212, New York.
- Axen, R. and Ernback, S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.
- Bakış, P., 2007. Enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle biyoreaktörde kinetik rezolüsyonu. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Bansal, N. and Kanwar, S.S., 2013. Peroxidase(s) in environment protection. *The Scientific World Journal*, 714, 1-9.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral Horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245-250.
- Bending, G.D., Friloux, M., Walker, A., 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 59-63.
- Boeuf, G., Bauw, G., Legrand, B., Rambour, S., 2000. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 217-224.
- Boltz, D. F. and Howell. J. A., 1978. Colorimetric determination of nonmetals. John Wiley & Sons., 308. New York.
- Bradford, M.M. and Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274-274.
- Brownleader, M.D., 2000. Role of extensine peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta*, 210, 668-676.
- Cemeroğlu, B., 2011. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Cilt 1-2, Nobel Akademik Yayıncılık, 636, Ankara.
- Chanwun, T., Muhamad, N., Chirapongsatunkul, N., Churngchow, N., 2013. Hevea brasiliensis cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express*, 3, 14-23.
- Chen, L.C., Chung, Y.C., Chang, C.T., 2012. Characterisation of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. Cv Tainung No. 2) latex and its application in the

- determination of micromolar hydrogen peroxide in milk. *Food Chemistry*, 135, 2529-2535.
- Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R., Anon, M.C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)-partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596-2601.
- Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29-36.
- Cosic, T., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Mitic, N., Cingel, A., Savic, J., Bohanec, B., Ninkovic, S., 2013. In vitro plant regeneration from immature zygotic embryos and repetitive somatic embryogenesis in kohlrabi (*Brassica oleracea* Var. Gongylodes). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 294-303.
- Cosio, C. and Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60, 391-408.
- Cremona, M.V., Stützel, H., Kge, H., 2004. Irrigation scheduling of kohlrabi (*Brassica oleracea* Var. Gongylodes) using crop water stress index. *HortScience*, 39(2), 276-279.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 159, 417-419.
- Deepa, S.S. and Arumughan, C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503-511.
- Desilets, C.P., Rounds, M.A., Regnier, F.E. 1991. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 544, 25-39.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10-17.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. Var Ssculenta D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574-1579.
- Erdem, H.U., Kalin, R. Ozdemir, N., Ozdemir, H., 2015. Purification and biochemical characterization of peroxidase isolated from white cabbage (*Brassica oleracea* Var. Capitata F. Alba). *International Journal of Food Properties*, 18, 2099–2109.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., Logue, M.W., 2001. Organik Kimya. Güneş Kitabevi, 1170, Ankara.
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z., Ferradji, F., Bejar, S., Boutoumi, H., 2012. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. Strain AH4: purification and biochemical characterization. *Bioresource Technology*, 11, 383-390.
- Fry, S.C., 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Reviews*, 3, 97-111.
- Galende, P.P., Cuadrado, N.H., Arellano, J.B., Gavilanes, F., Kostetsky, E.Y., Zhadan, G.G., Villar, E., Roig, M.G., Kennedy, J.F., Shnyrov, V.L., 2015. Purification and structural stability of white spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 718-723.

- Gazaryan, I.G. and Lagrimini, L.M. 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029-1034.
- Gerendas, J., Breuning, S., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V., Mühling, K.H., 2008. Isothiocyanate concentration in kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. Gongylodes) plants as influenced by sulfur and nitrogen supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8334-8342.
- Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y., 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 78, 15, 3331-3351.
- Gonçalves, A.L.M., Lemos, M., Niero, R., Andrade, S.F. Maistro. E.L., 2012. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. Var. Acephala D.C. in different cells of mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 740-745.
- Gulcin, I. and Yildirim, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea* Var. Acephala. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. (Doktora tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Ezurum.
- Halliwell, B. 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*, 54, 644-649.
- Hamid, H. and Rehman, K.U., 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177-1186.
- Haschke, R.H. and Friedhoff, J.M., 1978. Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80, 1039-1042.
- Hashimoto, T., 1991. Non-porous hydrophilic resin-based packings for the separation of biopolymers. *Journal of Chromatography A*, 544, 257-265.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III olant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Hoch, U., Adam, W., Fell, R., Saha-Moller, C.R, Schreier, P., 1997. Horseradish peroxidase-a biocatalyst for the one-pot synthesis of enantiomerically pure hydroperoxides and alcohols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 117, 321-328.
- Hoque. M., Shea, D.J., Asada, M., Asad-ud-doullah, M., Shimizu, M., Fujimoto, R., Fukai, E., Okazaki, K., 2017. QTL mapping for tuberous stem formation of kohlrabi (*Brassica oleracea* Var. Gongylodes L). *Molecular Breeding*, 37, 109.
- Inal, S., Kalin, R. ozdemir, N., Ozdemir, H., 2015. Purification and characterization of red beet (*Beta vulgaris*) peroxidase. *Biochemistry & Molecular Biology Letters*, 1(1), 37-49.
- İşbakan, N., 2006. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Janson, J.C. and Kristiansen, T., 1990. Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques. Elsevier, 747, New York.

- Jegannathan, R.K, Nielsen, H.P., 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240.
- Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H.B., Bejar, S., 2016. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36, 246-258.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal of Food Science*, 45, 60-63.
- Jouili, H., Bouazizi, H., Ferjani, E., 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2075-2082.
- Jungreis, E., 1997. Spot test analysis: clinical, environmental, forensic, and geochemical applications. John Wiley & Sons, 360. New York.
- 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.
- Karadeniz, F., 2007. Rasemik 1-fenil 1-propanolün lipaz katalizörlüğünde enantiyoseçimli esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu. (Y.Lisans Tezi), Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Katoh, S., 1987. Scaling-up affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, 5(12), 328-331.
- Kawano, T., 1998. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, 39, 721-730.
- Kay, L.E. and Basile, D.V., 1987. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiology*, 84, 99-105.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu. Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınları, Erzurum.
- Khalid, A., Arshad, M., Crowley, D.E., 2009. Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater. *Water Research*, 43(4), 1110-1116.
- Koksal, E., 2012. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology*, 7(1), 135-139.
- Koksal, E., Gulcin, I., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. Var. Botrytis) buds, *Protein and Peptide Letters*, 15(4), 320-326.
- Koktepe, T., Altin, S., Tohma, H., Gulcin, I., Koksal, E., 2017. Purification, characterization and selected inhibition properties of peroxidase from haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Food Properties*, 20(2) 1944-1953.
- Kordikowski, A., York, P., Latham, D., 1998. Resolution of ephedrine in supercritical co₂: a novel technique for separation of chiral drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 786-791.

- Korus, A. and Lisiewska, Z., 2011. Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of selected antioxidative compounds in kale (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala) leaves. *Food Chemistry*, 129, 149-154.
- Korus, A., 2011. Effect of preliminary processing, method of drying and storage temperature on the level of antioxidants in kale (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala) leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1711-1716.
- Korus, A., Slupski, J., Gebczynski, P., Banas, A., 2014. Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of glucosinolates in kale (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala) leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1003-1008.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120(2), 501-512
- Kumar, R., Sing, K.A., Sing, V.K., Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. *Process Biochemistry*, 46, 1350-1357.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N.F. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology*, 114, 1237-1245.
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D'Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, H.C., Klein, B.P. 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137-152.
- Lemos, M., Santin, J.R., Junior, L.C.K., Niero, R., Andrade, S.F., 2011. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* Var. Acephala DC in different animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 503-507.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011-1019.
- Lin, Z.F., Chen, L.H., Zhang, W.Q., 1996. Peroxidase from *I. Cairica* (L) SW Isolation, purification and some properties. *Process of Biochemistry*, 5, 443-448.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 57(685), 1934.
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W., Korus, A., 2008. The amino acid composition of kale (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala), fresh and after culinary and technological processing. *Food Chemistry*, 108, 642-648.
- Liszkay, A., Van Der Zalm, E., Schopfer, P., 2004. Production of reactive oxygen intermediates (O₂, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 136, 3114-3123.

- Malyemez, A.S., 2015. Rasemik-2-pentanolün lipaz katalizli kinetik rezolüsyonu. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Marecik, R.B., Kubzdela, E.R., Marecik, R., 2017. Characterization of phenolics, glucosinolates and antioxidant activity of beverages based on apple juice with addition of frozen and freeze-dried curly kale leaves (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala L). *Food Chemistry*, 230, 271-280.
- Marjamaa, K., Kukkola, E.M., Fagerstedt, K.V., 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 60, 367-376.
- 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.
- Martinez-Cortes, T., Pomar, F., Espineira, J.M., Merino, F., Novo-Uzal, E., 2012. Purification and kinetic characterization of two peroxidases of *Selaginella martensii* spring. involved in lignification. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 130-139.
- McCauley, L.A., Anger, W.K., Keifer, M., Langley, R., Robson, M.G., Rohlman, D., 2006. Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 114(6), 953-960.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305-319.
- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* Subsp. Caffra). *Food Chemistry*, 92, 311-323.
- Mika, A., Buck, F., Lüthje, S., 2008. Membrane-bound class III peroxidases: identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics*, 71, 412-424.
- Minibaeva, F.V. and Gordon, L.K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plants tissues under stress conditions. *Russian Journal of Physiology*, 50, 411-416.
- Mohr, P. And Pommerening, K., 1985. Affinity Chromatography: Practical and theoretical aspects. Elsevier, 293, New York and Basel.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53(374), 1643-1650.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry*, 68, 777-784.
- Nair, A.R. and Showalter, A. M. 1996. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(1), 254-260.
- Narayanan, S.R., 1994. Preparative affinity chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*, 658, 237-258.
- Narayanan, S.R., Knoch, S., Crane, L.J., 1990. Preparative affinity chromatography of proteins: influence of the physical properties of the base matrix. *Journal of Chromatography A*, 503, 93-102.

- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Ngo, T.T., 2010. Peroxidase in chemical and biochemical analysis. *Analytical Letters*, 43, 1572-1587.
- Ocarra, P. and 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.
- Ong, S.T., Keng, P.S., Lee, W.N., Ha, S.T. And.Hung, W.T., 2011. Dye waste treatment. *Water*, 3(1), 157-176.
- Ostrove, S., 1990. Affinity chromatography: general methods. *Methods in Enzymology*, 182, 357-371.
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 367-376.
- Park, C.H., Yeo, H.J., Kim, N.S., Eun, P.Y., Kim, S.J., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Park, S.Y., Kim, J.K., Park, S.U., 2017. Metabolic profiling of pale green and purple kohlrabi (*Brassica oleracea* Var. Gongylodes). *Applied Biological Chemistry*, 60(3), 249-257.
- Park, W.T., Kim, J.K., Park, S., Lee, S.W., Li, X., Kim, Y.B., Uddin, M.R., Park, N.I., Kim, S.J., Park, S.U., 2012. Metabolic profiling of glucosinolates, anthocyanins, carotenoids, and other secondary metabolites in kohlrabi (*Brassica oleracea* Var. Gongylodes). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8111-8116.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C., 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9, 534-540.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007. Peroxibase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68, 1605-1611.
- Pathirana, I., Thavarajah, P., Siva, N., Wickramasinghe, A.N.K., Smith, P., Thavarajah, D., 2017. Moisture deficit effects on kale (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala) biomass, mineral, and low molecular weight carbohydrate concentrations. *Scientia Horticulturae*, 226, 216-222.
- Pomar, F., Bernal, M. A., Diaz, J., Merino, F. 1997. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313-1317.
- Quintero, J. C., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M., 2008. Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH). *Ciencia e Investigacion Agraria*, 35(2), 123-132.
- Robert. K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., Victor, W.R., 1993. Harper'in Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Robinson, F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G., 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26, 291-302.
- Rodriguez L, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia-Canovas, F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1537-1541.

- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1422-1430.
- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M., Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L). *Food Chemistry*, 105, 1312-1320.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase-Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571-1579.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Sheldon, R.A., 1993. *Chirtechnology*. Marcel Dekker, Inc, 47-83, New York.
- Signoret, A. and Crouzet, J. 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(2), 459-464.
- Singh, W.N. and Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39-49.
- Sisecioglu, M., Gulcin, İ., Cankaya, M., Atasever, A., Sehitoglu, M.H., Kaya, H.B., Ozdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1187-1196.
- Solomons, G. and Fryhle, C., 2002. *Organik kimya*. Literetür Yayıncılık, 1258, İstanbul.
- Somturk, B., Kalin, R. and Ozdemir, N., 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* Var. Capitata F. Rubra) by affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 1815-1828.
- Sonkar, K.S., Pachauri, M., Kumar, A., Shukla, A., Patel, M., Jagannadham, M.V., 2015. Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakoocha*: purification, characterization and wound healing studies. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 180-190.
- Soyer, A., 2007. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyon ile enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün üretimi. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. (Y.Lisans tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Thavarajah, D., Thavarajah, P., Abare, A., Basnagala, S., Lacher, C., Smith, P., Combs, G.F., 2016. Mineral micronutrient and prebiotic carbohydrate profiles of USA-grown kale (*Brassica oleracea* L. Var. Acephala). *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 9-15.
- Tıpawan, T. and Barrett M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206-3214.
- Triplett, B. A. and Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science*, 81, 147-154.
- Turkova, J., 1993. *Bioaffinity chromatography*. Elsevier, 781, New York.
- Tzika, E.D., Sotiroudis, T.G., Papadimitriou, V., Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* Cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology*, 228, 487-495.

- Unger, K.K., 1990. Packings and stationary phases in chromatographic techniques. Elsevier, 43, New York.
- Valetti, N.W. and Pico, G., 2013. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. *Separation and Purification Technology*, 119, 1-6.
- Vamosvigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*, 15(1), 49-127.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Biology*, 38, 205-219.
- Var. Gongylodes seeds. *Journal of Essential Oil Research*, 14, 18-19.
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Wakamatsu, K. and Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167-171.
- Wang, Y., Tong, Y., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Feng, J., Feng, H., 2011. High frequency plant regeneration from microspore-derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). *Scientia Horticulturae*, 130, 296-302.
- Welinder, K. G. and Smillie, L.B., 1972. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. II. *Thermolytic Peptides*, 50, 63-90.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., 1984. Affinity Chromatography. *Methods in Enzymology*, 104, 3-55.
- Yadav, J. S., Bethea, C., Reddy, C. A., 2000. Mineralization of trichloroethylene (TCE) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(1), 28-34.
- Yemenicioglu, A., Ozkan, M., Cemeroglu, B. 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158-4163.
- Zhang, Y., Hu, Z., Zhu, M., Zhu, Z., Wang, Z., Tian, S., Chen, G., 2015. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of correlated genes in purple kohlrabi (*Brassica oleracea* Var. Gongylodes L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4160-4169.
- Zheng, W. and Colosi, L.M., 2011. Peroxidase-mediated removal of endocrine disrupting compound mixtures from water. *Chemosphere*, 85(4), 553-557.
- Zia, M.A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H. M. N., Abbas, R.Z., 2011. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. *African Journal of Biotechnology*, 10(33), 6300-6303.
- Zilbeyaz, K., Kilic, H., Sisecioglu, M., Ozdemir H., Gungor A.A., 2012. Preparation of enantiomerically pure p-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz-Scheffer epoxidation of E-chalcone. *Tetrahedron-Asymmetry*, 23, 594-601.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Rize’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Rize’de tamamladı. 2005’te kazandığı Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği’nden 2010 yılında mezun oldu. 2011-2012 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2013-2014 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında doktora öğrenimine başladı. 2015 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel Bilimler Bölümüne Arş. Gör. olarak atandı. Evli ve bir erkek evlat babasıdır.