



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE
KARNABAHARDAN SAFLAŞTIRILMASI VE
İNİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Mayıs-2022
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE
KROMATOGRAFİSİ TEKNİĞİ İLE
KARNABAHARDAN SAFLAŞTIRILMASI VE
İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Züleyha ALMAZ

Mayıs-2022
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK tarafından hazırlanan “Peroxidaz Enziminin Afinite Kromatografisi Tekniği ile Karnabahardan Saflaştırılması ve İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 27/04/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniuersitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Güvenliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN
Ağrı İbrahim een Üniuersitesi
Sağlık Hizmetleri MYO
Sağlık Hizmetleri ve Teknikleri Bölümü

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Züleyha ALMAZ
Muş Alparslan Üniuersitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR
Muş Alparslan Üniuersitesi
Sağlık Hizmetleri MYO
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

.....

Yukarıdaki sonuç;
Enstitü Yönetim Kurulu/...../..... tarih ve/..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Sedat BOZARI
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE KARNABAHARDAN SAFLAŞTIRILMASI VE İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK

**Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Güvenliği Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Züleyha ALMAZ

Bu tez kapsamında 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekülü kullanılarak karnabahar (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması, afinite kromatografisi tekniği ile ilk defa ve tek kademede gerçekleştirildi. Ligand olarak kullandığımız 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekülünün karnabahar peroksidaz (POD) enzimi için inhibisyon tipi araştırıldı ve dönüşümlü inhibisyon etkisi gösteren bu molekül Sepharose-4B-L-Tirozin matrisine bağlanarak elde edilen afinite jeli ile bu enzimin saflaştırılması gerçekleştirildi. Hazırlanan bu afinite jelinden saflaştırılan Karnabahar POD enziminin SDS-PAGE tekniğiyle saflık kontrolü yapıldı, molekül ağırlığı belirlendi ve bu enzim için 44 kDa'da tek bant gözlemlendi. Afinite tekniği ile saflaştırmada ligand olarak kullandığımız 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekülü ile Karnabahar POD enzimi % 15,4 gibi yüksek bir verimle 562 kat saflaştırıldı. İnhibitör olarak kullandığımız 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekülü karnabahar peroksidazı için yarışmalı inhibisyon tipi sergiledi. Guaiakol substratı için K_i ve IC_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen kinetik çalışmada ise Karnabahar POD enzimi için K_i değeri $0,113 \pm 0,012$ mM ve IC_{50} değeri 0,196 mM olarak hesaplandı.

Ayrıca bu çalışmada peroksidaz enziminin kullanım alanı, endüstri açısından önemi, saflaştırma yöntemleri ve hangi ürünlerden elde edildiği gibi konulara değinildi. Literatürde bulunan peroksidaz çalışma metotları ve elde edildiği kaynaklar incelendi.

2022, 67

Anahtar Kelimeler: Affinite kromatografisi, enzim saflaştırma, enzim kinetiği, karnabahar, peroksidaz

ABSTRACT

MS THESIS

PURIFICATION OF PEROXIDASE ENZYME FROM CAULIFLOWER BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE AND INVESTIGATION OF INHIBITION KINETICS

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK

**Muş Alparslan University
Natural and Applied Science
Department of Food Safety**

Advisor: Assist. Prof. Züleyha ALMAZ

Within the scope of this thesis, the purification of Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) peroxidase enzyme using 4-amino 3-bromo 2-methyl benzohydrazide molecule was carried out for the first time and in a single step by affinity chromatography technique. The inhibition type for the Cauliflower peroxidase (POD) enzyme of the 4-amino 3-bromo 2-methyl benzohydrazide molecule we used was investigated. Purification of this enzyme was carried out with the affinity gel obtained by binding this molecule to the Sepharose-4B-L-Tyrosine matrix, which showed a reversible inhibition effect. The purity of the Cauliflower POD enzyme purified from this affinity gel was checked by the SDS-PAGE technique and its molecular weight was determined. A single band at 44 kDa was observed for the cauliflower POD enzyme. Cauliflower POD enzyme was purified 562 fold with a yield of 15.4% with 4-amino 3-bromo 2-methyl benzohydrazide molecule used as a ligand in purification by affinity technique. The 4-amino 3-bromo 2-methyl benzohydrazide inhibitor exhibited a competitive type of inhibition for Cauliflower peroxidase. In this study, which was carried out to determine the K_i and IC_{50} values for the guaiacol substrate, the K_i value for the Cauliflower POD enzyme was calculated as 0.113 ± 0.012 mM and the IC_{50} value as 0.196 mM. In addition, in this study, the usage area of peroxidase enzyme, its importance in terms of industry, purification methods and the products from which it is obtained were mentioned. The peroxidase working methods in the literature and the sources from which it was obtained were examined in detail.

2022, 67

Keywords: Affinity chromatography, enzyme purification, enzyme kinetics, cauliflower, peroxidase

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında benden bilgisel desteğini, tecrübe ve sabrını esirgemeyen, bana her konuda rehberlik eden değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Züleyha ALMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tezime katkıda bulunan sayın hocam Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ' e, tezimin bütün aşamalarında yanımda olan ve laboratuvar çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen görev arkadaşlarım Ulviye TASALI ve Pınar GÜLER'e ve özellikle eğitimimi tamamlamam konusunda her türlü hassasiyeti gösteren Muş Tarım ve Orman İl Müdürlüğü Gıda ve Yem Şube Müdürü Veteriner Hekim Haluk AYDINOĞLU'na, en büyük destekçim Sevgi YALÇIN'a ve desteklerinden ötürü çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olduğu gibi tez çalışmam sırasında da desteklerini hep hissettiğim aileme ve manevi desteğinden ötürü biricik eşim Emrah AĞIRÇELİK' e en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Fatma Nurdan AĞIRÇELİK
MUŞ-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimlerin Reaksiyon Hızını Etkileyen Faktörler	1
1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
1.3 Enzim İnhibisyonu	6
1.3.1 Geri dönüşümlü inhibisyon	6
1.3.2 Geri dönüşümsüz inhibisyon	8
1.4 Enzim Kinetiği	8
1.4 Enzimin Kataliz Olayı	9
1.5 Antioksidan Enzimler	11
1.6 Peroksidaz Enzimi (POD).....	12
1.6.1 Bitki Peroksidazları.....	17
1.7 Peroksidazların Kullanım Alanları	19
1.8 Afinite Kromotografisi	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	23
2.1 Bitkilerden POD Enzimi Saflaştırılması Çalışmaları	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	26
3.1 Materyal	26
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	26
3.1.2 Kullanılan alet ve cihazlar	27
3.1.3 Yararlanılan çözeltiler ve hazırlanması	28
3.2 Yöntemler	31
3.2.1 Protein tayini.....	31
3.3. Karnabahar Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları.....	33
3.3.1 Karnabahar (<i>Brassica oleracea var. botrytis L.</i>) için homojenat hazırlanması .	33
3.3.2 POD inhibitörleri ve ligand seçimi	33
3.3.3 Afinite jelinin elde edilmesi.....	36
3.3.4 Afinite kolonunun paketlenmesi	38
3.3.5 Afinite kolonuna homojenatın yüklenmesi ve elüsyonu.....	38
3.3.6 SDS - poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi	39
3.3.7 Kullanılan inhibitör için yapılan kinetik çalışmalar	41

4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	42
4.1 Karnabahar Peroksidaz Enzimi ile İlgili Araştırma Sonuçları.....	42
4.1.1 Ligand molekülün sentezlenmesi.....	42
4.1.2 Kantitatif protein tayini amacıyla yararlanılan standart grafik.....	42
4.2. Karnabahar Peroksidaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları.....	43
4.2.1 Afinite kromotografisi ile elde edilen karnabahar POD enziminin saflaştırma sonuçları.....	43
4.2.2 Karnabahar POD enziminin 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid affinite kolonu ile saflaştırma sonuçları.....	44
4.2.3 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	44
4.3.5 Kullanılan inhibitörün K_i ve IC_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışma sonuçları.....	45
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	50
5.1 Sonuçlar.....	50
5.2 Öneriler.....	56
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

cm	:	Santimetre
dk	:	Dakika
g	:	Gram
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
KDa	:	Kilo Dalton
M	:	Molar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
nm	:	Nanometre
pH	:	Hidrojen konsantrasyonunun logaritması
UV	:	Ultraviyole
V	:	Hacim
μ	:	Mikro
μg	:	Mikrogram
μm	:	Mikrometre
μL	:	Mikrolitre
β	:	Beta
°C	:	Santigrat (Celcius) derece
%	:	Yüzde
+	:	Artı
-	:	Eksi

Kısaltmalar

CAT	:	Katalaz
E.C.	:	Enzim komisyonu
ES	:	Enzim substrat kompleksi
GSH-Px	:	Glutasyon peroksidaz
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	:	Peroksidaz
ROS	:	Reaktif oksijen türü
SDS	:	Sodyum dodesilsülfat
SOD	:	Süperoksit dismutaz
DMSO	:	Dimetil sülfoksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Optimum sıcaklık grafiği.....	2
Şekil 1.2. Optimum pH grafiği	3
Şekil 1.3. Reaksiyon hızının enzim konsantrasyonu ile değişim grafiği	3
Şekil 1.4. Reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi grafiği	4
Şekil 1.5. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şekilsel anlatımı	7
Şekil 1.6. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şekilsel anlatımı	7
Şekil 1.7. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şekilsel anlatımı	8
Şekil 1.8. Lineweaver-Burk grafiği	9
Şekil 1.9. Bir kimyasal tepkimenin enzim varlığında ve yokluğunda sağlanması gereken enerji grafiği.....	10
Şekil 1.10. Antioksidanların sınıflandırılması	12
Şekil 1.11. Guaiakol varlığında peroksidaz enziminin katalizleme döngüsü	14
Şekil 1.12. Substrat olarak guaiakolun bulunduğu ortamda peroksidaz enziminin tepkimeyi katalize etme döngüsü.....	15
Şekil 1.13. Peroksidaz enzimlerinin substrat olarak kullandığı aromatik bileşikler.....	16
Şekil 1.14. Afinite kromatografisinin temel ilkesi.....	21
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenmesi	32
Şekil 3.2. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılma reaksiyonu	37
Şekil 3.3. 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid kenetlendirilmesi	37
Şekil 3.4. Peristaltik pompa	38
Şekil 3.5. Elektroforez plakaları	39
Şekil 4.1. Protein miktarlarını belirlemek için kullanılan Bradford standart grafiği	42
Şekil 4.2. Karnabahar POD enziminin saflaştırılması sırasında elde edilen elüatların 280 nm'deki absorbanlarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik	43
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış karnabahar POD enziminin SDS-PAGE görüntüsü	45
Şekil 4.4. Karnabahar POD enzimi aktivitesi üzerine 5 farklı 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid inhibitörü yoğunluğunda elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon ([I]) grafiği	46
Şekil 4.5. 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülünün Karnabahar POD enzimi üzerinde inhibisyon etkisini gösteren grafik.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	5
Çizelge 1.2. Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması	17
Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinin uygulanmasında en çok tercih edilen canlılık sistemleri	22
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve markaları	26
Çizelge 3.2. Kullanılan aletler, cihazlar ve markaları	27
Çizelge 3.3. Homojenat hazırlanmasında yararlanılan çözelti	28
Çizelge 3.4. Elektroforezde yararlanılan çözeltiler	30
Çizelge 3.5. Karnabahar peroksidaz enzimi aktivite ölçümü için kuvvet içerikleri	32
Çizelge 3.6. POD enzim aktivitesinin tespiti amacıyla uygulanan formül	33
Çizelge 3.7. Ayırma ve yığma jeli hazırlama	40
Çizelge 4.1. Karnabahar POD enziminin 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid kolonundan saflaştırma sonuçları	44
Çizelge 4.2. Karnabahar POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid inhibitörü için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü	46
Çizelge 4.3. Karnabahar POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid inhibitörü için 1/V, 1/[S] değerleri ve deney prosedürü	48
Çizelge 4.4 Karnabahar POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	49

1. GİRİŞ

Canlı sistemlerinde meydana gelen tüm yapım ve yıkım olaylarına metabolizma adı verilir (Boldaz, 2021). Canlı mekanizmalarında yaşamın devam edebilmesi için çeşitli kimyasal reaksiyonlar gerçekleşmelidir. Kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi yaşamsal faaliyetler açısından önemlidir. Bu reaksiyonlar aktivasyon enerjisi engelini aşılmasıyla gerçekleşmektedir. Katalizörler tepkimeye giren moleküllerin aktivasyon enerjisini kolay aşması amacıyla kullanılır (Klibanov, 1983). Tepkimeler kendi doğal akış süreçlerine bırakıldığında yaşamsal faaliyetlerin aksamasını engelleyebilecek kadar hızlı değildirler. Bu sebeple hızlandırılmaları yani enzimatik katalizlenmeleri gerekmektedir (İnal, 2013). Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyerek hızlarını arttıran, yapıları reaksiyon esnasında değişse de sonuçta ilk formuna dönerek reaksiyon hızını 10^6 - 10^{10} kat artıran, bazı kaynaklara görece 10^{17} kat arttıran protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlere enzim denir (Koçak, 2018).

Enzimlerin yaklaşık 5.000 kadar biyokimyasal reaksiyonun hızlanmasında rol aldığı bilinmektedir (Öztekin, 2016). Enzimler tarafından katalizlenmenin gerçekleştirildiği reaksiyonlarda kimyasal enerji kaybolmaz, korunur veya başka bir yapıya çevrilir ve basit öncüllerden çok büyük molekül yapıları imal edilir (Lehninger ve ark., 2005).

Enzimler tepkimelerdeki reaksiyon hızını arttıran, tepkimelerde seçicilikleri fazla olan ve protein formundaki biyomoleküllerdir. Bunlar, enzimlerin kendilerine mahsus üç boyutlu yapılarına dayanmaktadır. Canlı sistemlerinde reaksiyonları katalizleyen ancak protein formunda olmayan katalitik RNA molekülleri (ribozim) de bulunmaktadır (Schomburg ve ark., 2012).

Enzimler çok eski zamanlardan beri farkında olunmadan kullanılmaktadır. Örneğin yoğurt, kefir, peynir ve şarap gibi gıda ürünlerinin yapım aşamasında insanlık uzun yıllardır enzimleri kullanmaktadır. Teknolojinin gelişimiyle beraber enzimlerin önemi anlaşılmış ve böylece üretimleri hız kazanmıştır (Algül, 2019).

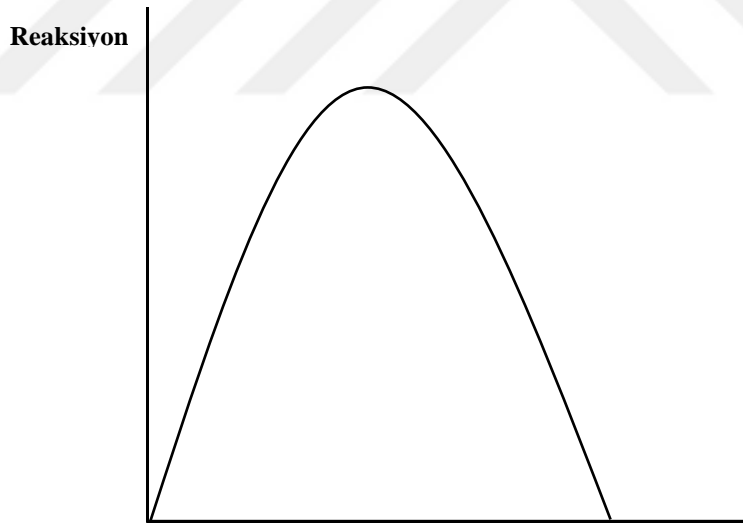
1.1 Enzimlerin Reaksiyon Hızını Etkileyen Faktörler

Enzimlerin reaksiyon katalizleme hızlarını etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir.

1. Substrat konsantrasyonu,
2. Kofaktör konsantrasyonu,

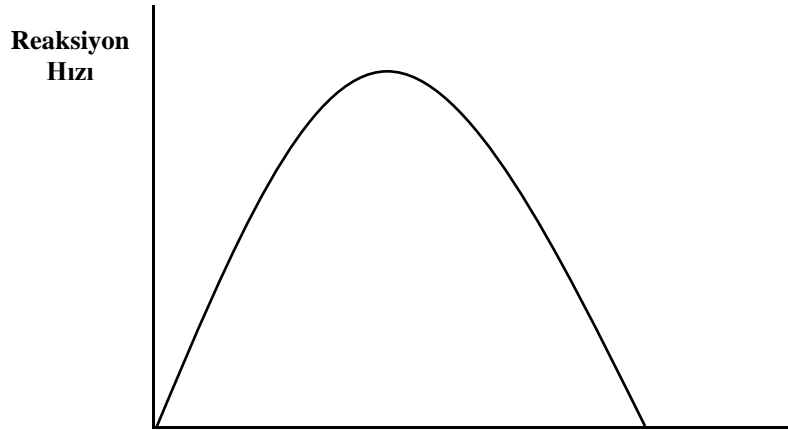
3. Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler,
4. Zaman,
5. Sıcaklık,
6. İyonik şiddet,
7. Enzim miktarı,
8. pH,
9. İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonları,
10. Reaksiyon ürünleri (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Sıcaklık: Sıcaklık enzimatik reaksiyon hızını etkileyen ve enzim üzerinde doğrudan etkiye sahip etmenlerden biridir. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi değişken olmaktadır. Normal ortam şartlarında pek çok enzim 50-60 °C sıcaklıkta denatüre olur. Enzim aktivitesi sıcaklığın artması ile önce bir miktar kadar artar ancak sonrasında düşer. Enzim aktivitesinin en yüksek olarak gözlemlendiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir (Daniel ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Optimum sıcaklık grafiği

pH: Enzimler ortamın asidik veya bazik olmasından etkilenmektedir. En yüksek enzim aktivitesinin gösterildiği pH değerine o enzimin optimum pH 'sı denir (Özata ve Kutlu, 2000). Her enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu optimum pH değişiklik gösterebilmektedir ancak pek çok enzim pH: 1 ve pH: 11 dolaylarında aktivitesini kaybeder (Keskin, 1987).

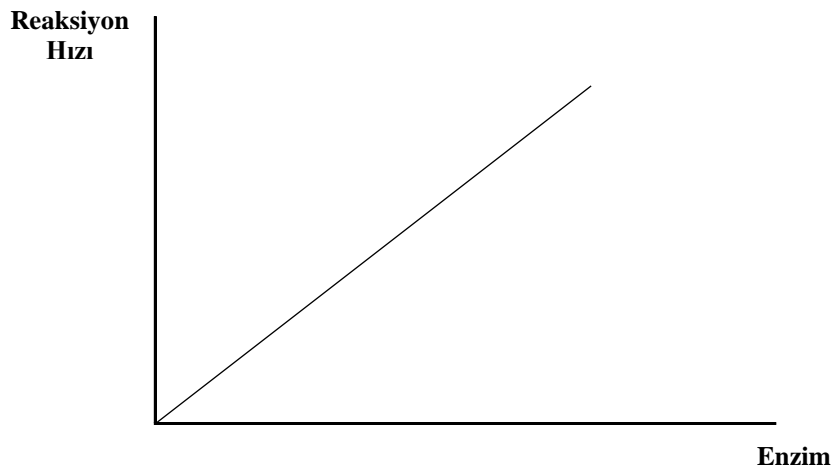


Şekil 1.2. Optimum pH grafiği

Zaman: Enzimatik reaksiyonlar devam ederken substratın zamanla azalması ve enzimin zamanla aktivitesini kaybetmesi gibi nedenlerden, zaman geçtikçe reaksiyon hızı düşmektedir (Keha ve Ö.İ., 2009).

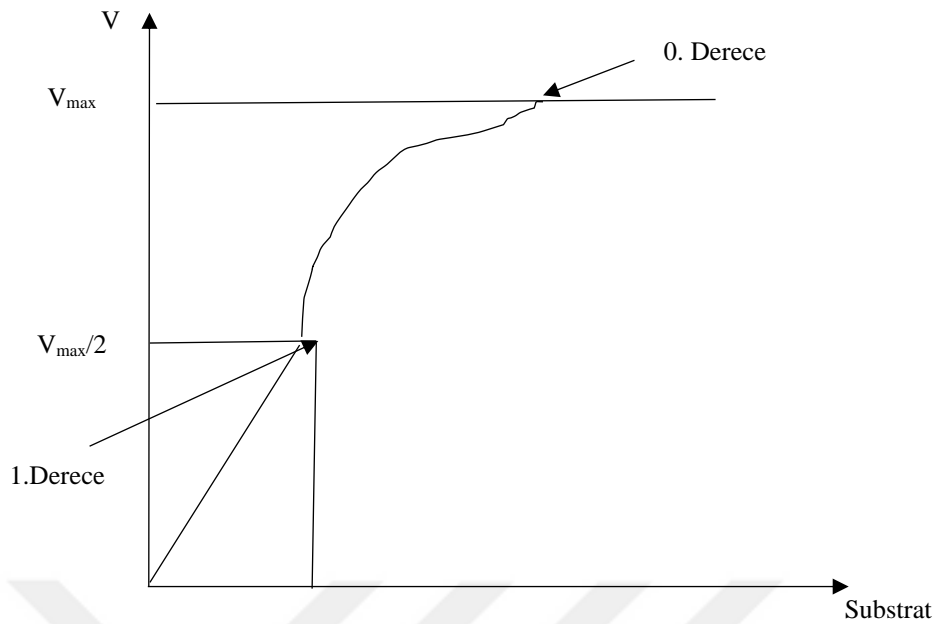
İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonları: Enzimin reaksiyon hızı inhibitör varlığında azalırken aktivatörlerin varlığı ile reaksiyon hızı artmaktadır. Bu durumda, her iki molekülün konsantrasyon değişiminde de enzim hızı değişmektedir.

Enzim miktarı: Ortamda bulunan substrat miktarının yeterli olması halinde enzim miktarının yüksek olması reaksiyon hızını yükseltir.



Şekil 1. 3. Reaksiyon hızının enzim konsantrasyonu ile değişim grafiği

Substrat konsantrasyonu: Enzim ve diğer faktörlerin sabit tutulması halinde ortamda bulunan substrat konsantrasyonunun artırılması ile reaksiyon hızı artmaktadır ancak enzimin substrat açısından doygunluğa ulaşması ile reaksiyon hızı sabit kalmaktadır.



Şekil 1.4. Reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi grafiği

Enzimler çok güçlü katalizörlerdir buna karşın genellikle tek tip substratı ürüne dönüştürebilme özgülüğündedir (Gökçal, 2020).

1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından katalize ettikleri tepkime gurubuna göre 6 ana gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar Çizelge 1.1' de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması (Yıldırım, 2014)

Enzim sınıfı	Canlı sistemlerdeki biyokimyasal fonksiyonu	Tipik enzimler	Tipik polimerler
Oksidoredüktazlar	Oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalizlerler	Peroksidaz, Lakkaz	Polianilinler, Polifenoller, Polistiren, Polimetil metakrilat
Transferazlar	Fonksiyonel takımın moleküller arası aktarımını hızlandırır	PHA sentetaz, Hyalüronik asit sentetaz, Fosforilaz	Poliester, Hyalüronik asit, Amiloz
Hidrolazlar	Suyla hidroliz reaksiyonunu katalizler	Selülaz, Kitinaz, Ksilanaz, Papain, Lipaz	Selüloz, Kitin, Ksilan, Poliesterler, Polikarbonatlar
Liyazlar	Çift bağ oluşturur veya bozarlar		
İzomerazlar	Moleküller izomerlerine çevrilirler		
Ligazlar	ATP ile bağ yapımını hızlandırır	Cyanophycin Sentetaz	Cyanophycin

Enzimlerin sınıflandırmasının kolay ve kullanışlı olabilmesi amacı ile IUBMB tarafından dizilmiş dört rakam içeren sistematik bir sınıflandırma ile Enzim Kod (E.C) numaraları her enzim için ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu numaraların verilme sebebi;

- I. Karışıklıkların önüne geçilmesi,
- II. Enzimin katalize ettiği reaksiyonu belirlenmesi,

III. Enzimin durumunun kesinlik kazanmasıdır.

Numaralandırmada ilk sayı enzimin bağlı olduğu takımı, ikinci sayı onun alt takımını, üçüncü sayı bir alt takımını, dördüncü sayı ise o enzime ait sıra rakamını belirtmektedir. Bunu bir örnekle açıklayacak olursak;

Peroksidaz enzimi EC: 1.11.1.7 ile gösterilen Enzim Kod numarasında;

- ✓ Verilen ilk rakam olan 1: Peroksidaz enzimin oksidoredüktaz sınıfına dahil olduğunu bildirir. Bununla beraber yükseltgenme indirgeme reaksiyonlarını hızlandırdığı veya hidrojen/oksijen atomu aktarımını gerçekleştirdiğini açıklar.
- ✓ İkinci rakam olan 11: Alıcı olarak hidrojen peroksit üzerinde etkili oksidoredüktaz sınıfına dahil olanları içerir.
- ✓ Üçüncü rakam olan 1: Alt sınıf olan peroksidazların tamamını içerir.
- ✓ Son rakam olan 7: Enzimin sistemik adını hemen işaret ederek; peroksidazı ifade eder (Anonim, 2021).

1.3 Enzim İnhibisyonu

Enzim aktivitesini durduran veya yavaşlatan bileşikler bulunmaktadır. Yavaşlatma olayına inhibisyon, yavaşlatmayı gerçekleştiren bileşiğe ise inhibitör denilmektedir. Bunlar sıklıkla küçük molekül ağırlıklarına sahip moleküllerdir ki bazen bir iyon, bazen bir bileşik olmaktadır (İnal, 2013).

Biyolojik sistemlerde enzimatik aktivite inhibisyonu, kontrol mekanizması işlevi görmesi sebebiyle tüm canlı sistemlerde bakımından önemli bir olay olarak kabul edilmektedir. İnhibisyon enzimin etkilediği mekanizmalar açısından ve metabolik yolların aydınlatılması açısından önemlidir (Lehninger ve ark., 2005; Keha ve Ö.İ., 2009).

Enzim inhibisyonu genel anlamda iki başlık altında incelenmektedir.

- Geri dönüşümlü inhibisyon
- Geri dönüşümsüz inhibisyon

1.3.1 Geri dönüşümlü inhibisyon

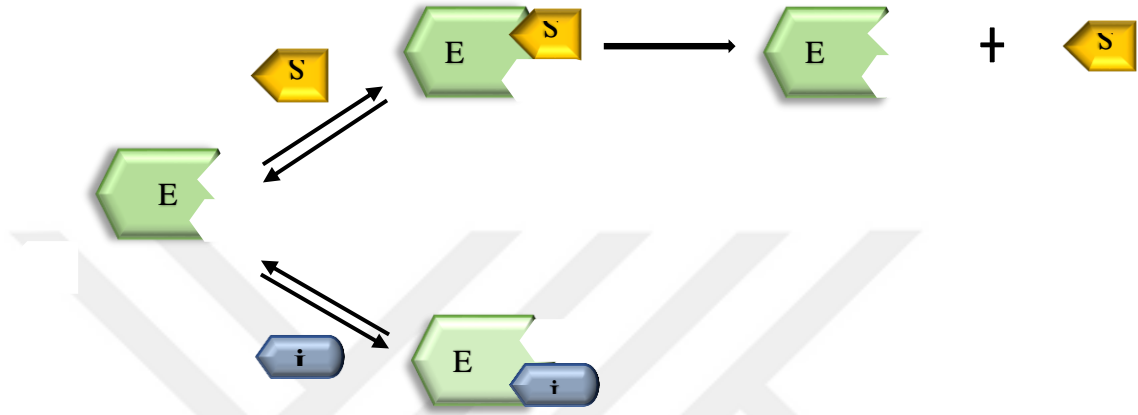
Geri dönüşümlü inhibisyonunda inhibitör bağlanmadan sonra enzimden rahat bir şekilde ayrılabilir. Bir denge reaksiyonu şeklindedir. Bu inhibisyon çeşidi 3 başlık altında toplanır;

- I. Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon
- II. Nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon

III. Unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon

I. Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon

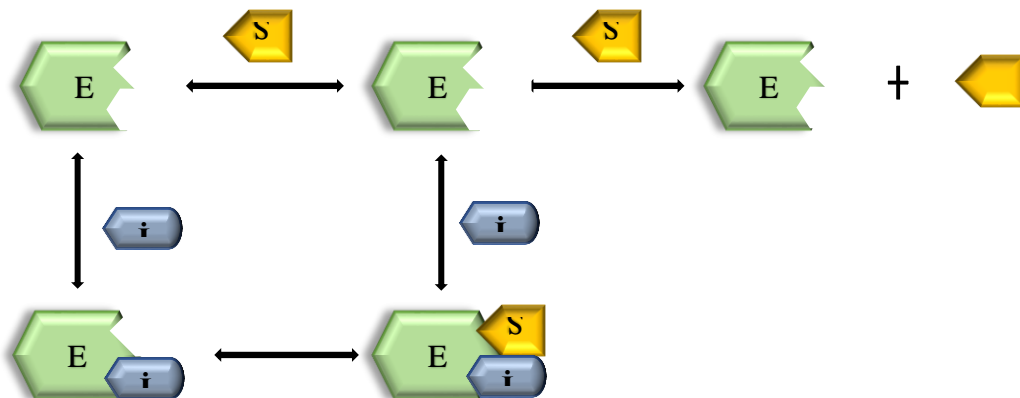
Yarışmalı inhibisyonda substrat ve inhibitör enzimin aktif olan bölümüne bağlanmak için yarış halindedirler. İnhibitör strüktür bakımından substrat ile uyumludur (Segel, 1975; Telefoncu, 1986).



Şekil 1.5. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şekilsel anlatımı (Telefoncu, 1986; Keha ve Ö.İ., 2009)

II. Nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon

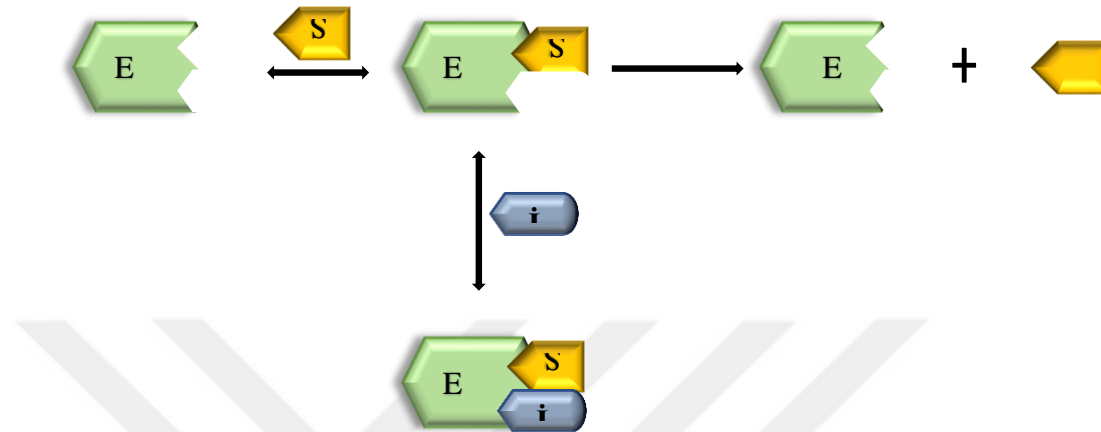
Nonkompetitif inhibisyon çeşidinde substrat enzimin farklı bir bölgesine bağlanırken inhibitör farklı bir bölgeye bağlandığından ortamda genellikle bir yarış söz konusu olmaz ve çoğunlukla substrat konsantrasyonu inhibisyonu etkilemez. Yarışmasız inhibisyon çeşidinde enzim ve inhibitör arasında bir yarış söz konusu olmamaktadır.



Şekil 1.6. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şekilsel anlatımı (Telefoncu, 1986; Keha ve Ö.İ., 2009)

III. Unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon

Unkompetitif inhibisyonunda ise inhibitör sadece substratın bağlanmış olduğu enzim kompleksine (ES) bağlanır. Genellikle de birden fazla substratın bağlandığı enzim-substrat kompleksine bağlanırlar.



Şekil 1.7. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şekilsel anlatımı (Keha ve Ö.İ., 2009)

1.3.2 Geri dönüşümsüz inhibisyon

Geri dönüşümsüz inhibisyon çeşidinde ise inhibitör ve enzim arasında kovalent bağ ile ayrılması güç bir kompleks oluşur (Keha ve Ö.İ., 2009). Bu durumda enzim tekrardan aktif hale gelmez (Boldaz, 2021).

1.4 Enzim Kinetiği

Kimyasal reaksiyonların enzimler aracılığıyla katalizlenmesini inceleyen bilim dalına enzim kinetiği denir. Enzim kinetiği çalışmalarında reaksiyon ortam şartları değiştirilir ve reaksiyonun gerçekleşme hızı ölçülür. Bir enzimin kinetiği, ortam şartlarının değiştirilerek çalışılması ve inhibitör ya da aktivatörler aracılığıyla aktivitesinin istenen şartlar altında nasıl tutulabileceği hakkında yol gösterebilir (Lehninger ve ark., 2005; Voet ve Voet, 2010).

Enzim kinetiği Michaelis–Menten denklemi ile hesaplanarak enzimler karakterize edilebilir. Bunun sebebi uygulanabilir modeller arasındaki kolay anlaşılabilir basit model olmasıdır.

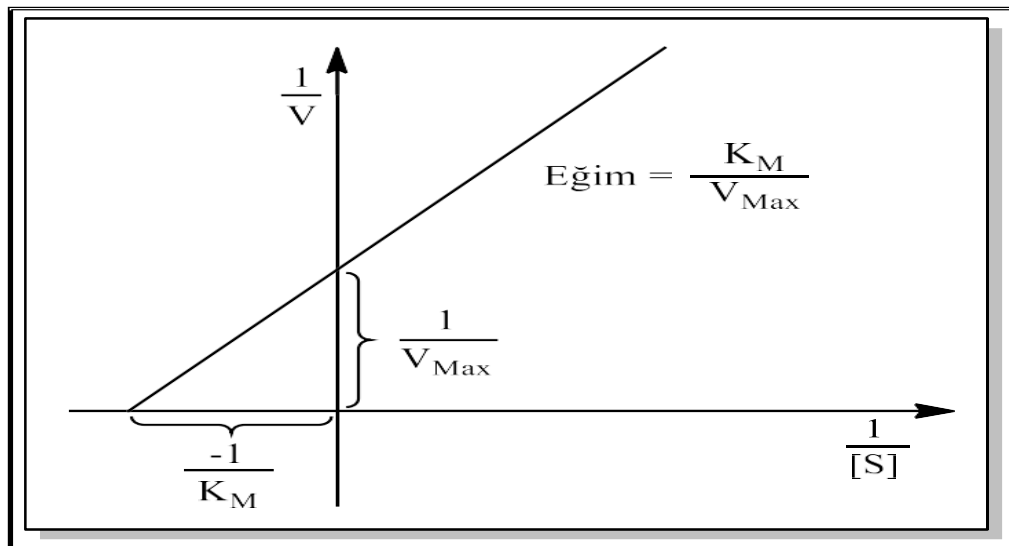
V_{max} ve K_M , Michaelis–Menten grafiğinde yer alan ve bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir. V_{max} reaksiyonlarda ulaşılabilecek en yüksek hızı ifade eder. Enzimin doygunluğa ulaştığı substrat yoğunluğunda ulaşılan hız V_{max} dır. K_m değeri ise en yüksek tepkime hızının %50'sinde iken varolan substrat yoğunluğudur.

K_m (Michaelis-Menten sabiti), substrat ile enzimin birbirine olan ilgisini belirler ve K_m değerinin düşük olması enzim hızının daha kısa sürede V_{max} 'a ulaştığının bir ifadesidir.

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında bilgi sahibi olabilmek için ilk olarak enzim derişimi sabit alınır sonrasında farklı substrat yoğunluklarının reaksiyon hızına etkisi ile aktivite ölçümleri yapılır. Yapılan bu ölçüm sonucunda Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edilir. Elde edilen bu grafiğin doğru denklemi şeklinde verilmesi uygulamalarda rahatlık sağlar. Bu amaçlada en çok tercih edilen yöntem Lineweaver– Burk denklemdir. Lineweaver – Burk kinetik denklemi aşağıda verilmiştir (Lineweaver ve Burk, 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} \quad (1.1)$$

Bu denkleme göre değişik substrat konsantrasyonlarında bir enzimin katalizleme hızı veya kataliz hızı bulunarak $1/V - 1/[S]$ verileriyle Lineweaver– Burk grafiği elde edilir. Elde edilen bu grafik doğru şeklinde olup doğrunun eğimi K_M ve V_{max} değerlerini verir. Çizilen Lineweaver– Burk grafiği ile enzimin substrata olan ilgisi ve bunun sonucunda inhibisyon tipi anlaşılmış olacaktır (Keha ve Ö.İ., 2009).

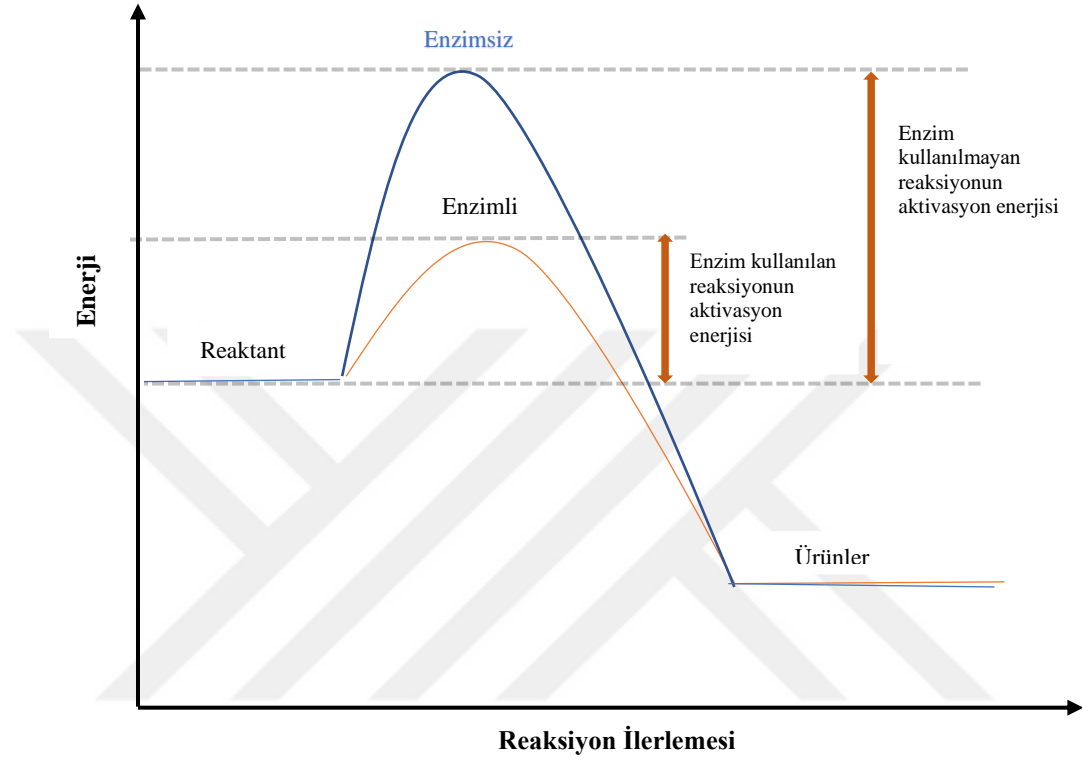


şekil 1.8. Lineweaver-Burk grafiği

1.4 Enzimin Kataliz Olayı

Enzim reaksiyonlarında reaksiyona katılan maddelerin ürünlere dönüşmeleri için varolan bir enerji basamağını geçmeleri gerekmektedir. Bir mol substratta var olan tüm maddelerin enerji gücüne ulaşmalarına önyak olan enerji miktarına aktivasyon enerjisi

denir. Yani enerji engeline “aktifleşme enerjisi” denir. Aktifleşme enerjisinin tepe noktasını gösteren bir “geçiş hali” yahut “geçiş kompleksi” diye isimlendirilen ayrıca etkileşim içindeki maddelerin enerji miktarınca bol olduğunu anlatan bir kompleks vardır (Denli, 2013). Bu durum aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Bir kimyasal tepkimenin enzim varlığında ve yokluğunda sağlaması gereken enerji grafiği

1.5 Antioksidan Enzimler

Vücutta serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif etkiyi önleyici özelliğe sahip bileşiklere antioksidan denir. Antioksidanlar hasar verici molekülleri temizleme özelliğine sahip olup hücrede oluşabilecek muhtemel zararlardan korurlar (Atabeyoğlu, 2011).

Serbest radikaller, bir reaksiyonda moleküllerin görevlerini yapmalarının önüne geçebilir. Serbest radikaller, normal metabolizmanın doğal yan ürünü olarak oluşabilmenin yanı sıra zehirli maddeler aracılığıyla meydana gelebilmektedirler (Lee ve ark., 1998). Metabolizmada serbest radikaller aşağıda verilen çeşitli metabolik yollarda kendiliğinden gerçekleşebilir.

- ✓ mitokondriyal elektron taşıma zinciri,
- ✓ pentoz fosfat yolu,
- ✓ ksenobiyotiklerin metabolizması,
- ✓ koşulsuz tembih edici fagositik hücrelerin etkinleştirilmesi,
- ✓ biyosentetik ve biyokimyasal tahrip vakaları (Fridowich, 1978; Ghosh ve Myers, 1998) bu olaylara örnektir.

Hücrede antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri biyolojik reaksiyonlarda oluşan ve oksitleyici özelliği olan H_2O_2 'nin ortamdan çabuk bir şekilde atılması işlemini gerçekleştirir (Halliwell, 1984).

Diplock' un 1998 yılında yaptığı çalışmaya göre antioksidanları mekanizmalarına göre sınıflandırdığımızda, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayırmış olduğu görülmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) gibi enzim sistemleri birincil antioksidan kısmında yer alıp serbest radikalleri yok etme özelliğine sahiptirler (Diplock, 1998).

Yapılarına göre antioksidanlar; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Enzimatik antioksidanlara örnek olarak peroksidaz, katalaz ve SOD verilebilirken enzimatik olmayan antioksidanlara örnek A ve E vitaminini, melatonin veya albümin verilebilir (Akay, 2004; Araújo ve Monteiro, 2005).

Antioksidanlar gıdaların tüketimiyle alınabilmekte veya vücut hücreleri tarafından sentezlenebilmektedir. Antioksidanlardan gıda içerisinde bulunanları; vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenoller insan vücudunu serbest radikallerin zararlı oksidatif etkilerinden koruyan antioksidanlardan bazılarıdır (Yavaşer, 2011). İncelenen birçok araştırma, kalp ve kanser hastalığı olan

insanlarda meyve ve sebze tüketiminin az olduğunu ve bu iki parametrenin birbiri ile ters orantılı olduğunu göstermektedir (Güçlü, 2009).

ANTIÖKSİDANLAR			
Doğal Antioksidanlar			Sentetik Antioksidanlar
<u>Enzimatik</u>	<u>Enzimatik Olmayan</u>		BHT, BHA
SOD	<u>Endojen</u>	<u>Eksojen</u>	Troloks
Katalaz	Glutasyon	E vitamini	Çeşitli Şelat Oluşturucu Maddeler
Glutasyon Peroksidaz	Serüloplazmin	Beta Karoten	
Glutasyon Redüktaz	Bilirubin	Askorbik Asit	
Glutasyon-S-Transferaz	Ferritin	Flavonoidler	
	Laktoferrin		
	Ürik Asit		
	Haptoglobulinler		
	Albumin		

Şekil 1.10. Antioksidanların sınıflandırılması (Yavaşar, 2011)

1.6 Peroksidaz Enzimi (POD)

Peroksidaz enzimi (POD; EC 1.11.1.7) hidrojen moleküllerini verme halinde olan bileşikler ile bu molekülleri alma halinde olan H₂O₂ (hidrojen peroksit) bileşiği arasında gerçekleşen tepkimeyi hızlandıran enzimdir (Whitaker, 1994). POD doğada bol miktarda ve neredeyse her yerde bulunabilmekte olup (Zamocky ve Obinger, 2010) kilit antioksidan enzimlerden biridir. Canlı metabolizmada meydana gelen H₂O₂ oksitleyici olduğu için ortamdan süratle uzaklaştırılması gerekir. Bu görev eğer hücre içinde gerçekleşiyor ise antioksidan olan katalaz ve peroksidaz enzimleri aracılığıyla yerine getirilir (Halliwell, 1984).

Peroksidazlar (EC: 1.11), oksidoredüktazların (EC: 1) enzimatik sınıfının bir parçasıdır ve adından da anlaşılacağı gibi, oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarını katalize ederler.

Peroksidazlar, çok çeşitli fenolik ve fenolik olmayan substratların yardımıyla birlikte hidrojen peroksiti (H₂O₂) ayrıştırarak zararsız hale getiren enzimlerdir.

Katalizledikleri reaksiyonlar kompleks reaksiyonlar olduğu için genel bir denklemlerle gösterilir (Huystee, 1987).



Peroksidazların çok çeşitli substratlar için redoks reaksiyonunu katalize etme yetenekleri göz önüne alındığında, çeşitli tıbbi, biyokimyasal, immünolojik, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar açısından önemli enzimlerden olduğu kabul edilir.(Pandey ve ark., 2017).



Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar çok karışık olup aşağıda verilen reaksiyon sınıfını hızlandırarak katalize ederler (Huystee, 1987);



Bu peroksidatik tepkimede;

R: H⁺, C₂H₅, CH₃

AH₂: Hidrojen donörü (indirgenmiş formda)

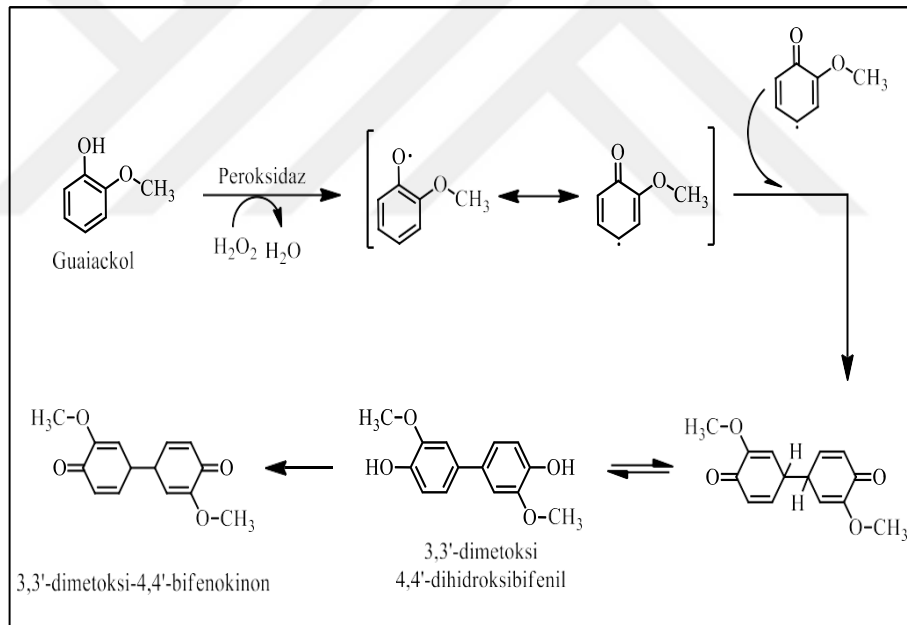
A: Hidrojen donörü (oksidlenmiş formda) (Doğanay, 2019).

Peroksidazların spesifik özelliği, proteine bir histidin kalıntısı yoluyla bağlanan bir hem prostetik grubu (demir (III) protoporfirin IX) içermeleridir (Veitch, 2004). Peroksidazların termal deaktivasyonu ve pH bağımlılığı üzerine yapılan araştırmalar, hem grubunun aşırı ısınma üzerine ayrıştığını ve bozulduğunu veya aşırı pH değerlerinde (her peroksidaz için optimum pH'ya bağlı olarak 5'in altında veya 9'un üzerinde) pH değişkenleri, peroksidazların termal duyarlılığını etkileyebilir, bu da uygun pH koşulları altında peroksidazların termal toleransının artırılabilirliğini veya engellenebileceğini gösterir (Halliwell, 1984; Routoula, 2019). Fenolik moleküllerden katekol, katekin, guaiakol ve klorojenik asit gibi bazı yapılar bitkide bulunan peroksidazlar aracılığıyla

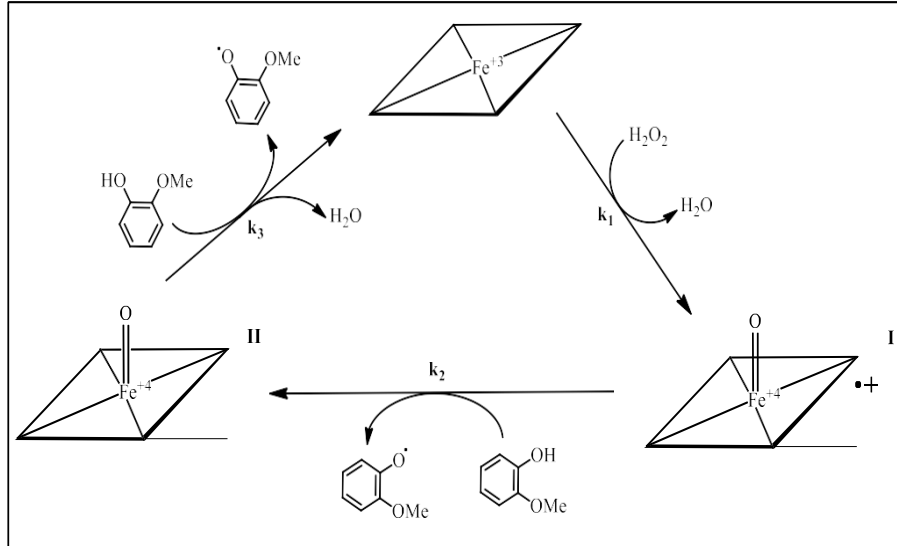
peroksit muvacehesinde oksidasyonu gerçekleştirebilirler (Onsa ve ark., 2004). Peroksidazlar yukarda bahsedilen bu fenolik molekülleri substrat olarak kullanırlar ve metabolizmada oluşturulan hidrojen peroksidi H_2O molekülüne dönüştürerek etkisiz hale getirirler (Robinson ve ark., 1997).

Peroksidazlar yukarda bahsedilen fenolik moleküller dışında 2-toluidin, 2-kresol, ve bazı azo-boya gibi çok sayıda molekülün dehidrojenasyonunu da hızlandırarak katalize ederler (Fodil ve ark., 2012). Substrat olarak kullanılan guaiakolün, peroksidaz varlığında, yükseltgenme mekanizması gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde guaiakol substratının 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona dönüştüğü aydınlatılmıştır (Doerge ve ark., 1997).

Hidrojen peroksitin ve substrat olarak kullanılan guaiakolun sırasıyla indirgendiği ve yükseltgendiği tepkimeler Şekil 1.11, 1.12, 1.13' de verildiği üzere üç ayrı kademede gerçekleşir.

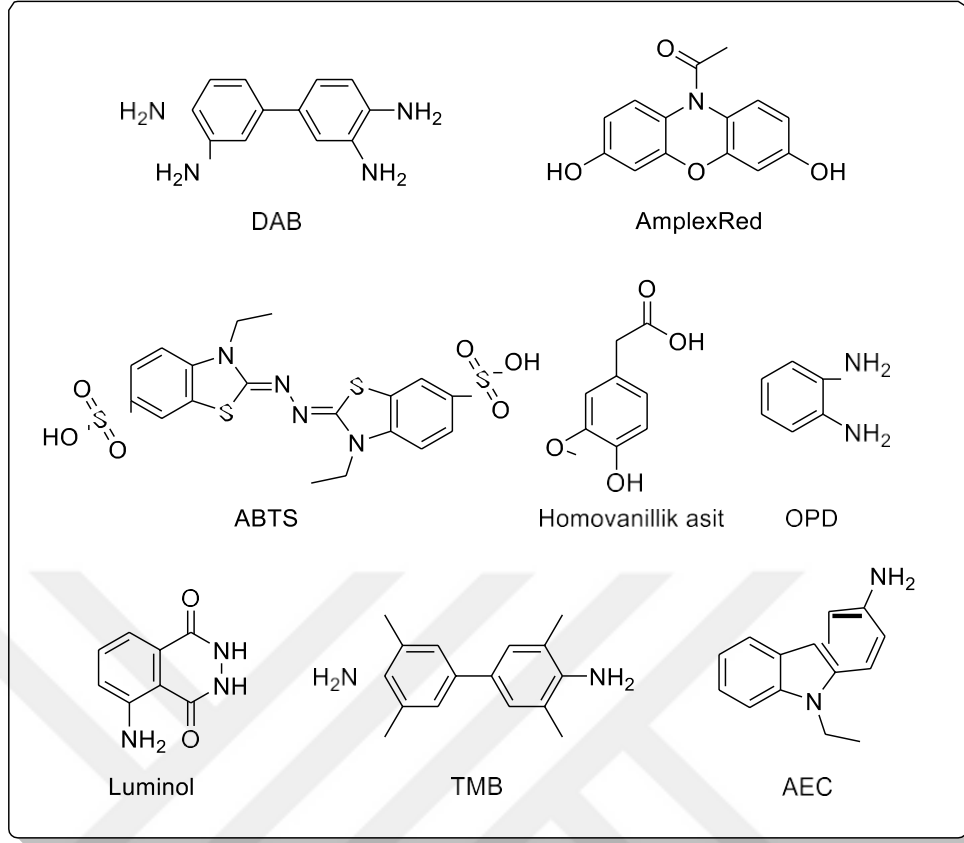


Şekil 1.11. Guaiakol varlığında peroksidaz enziminin katalizleme döngüsü (İnal, 2013)



Şekil 1.12. Substrat olarak guaiakolun bulunduğu ortamda peroksidaz enziminin tepkimeyi katalize etme döngüsü

Gerçekleşen mekanizma da ilk olarak peroksidaz enzimi Fe(IV) içeren bileşik I'ı oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyon sonucunda H₂O₂ suya indirgenirken enzim de yükseltgenmektedir. İkinci basamakta ise bileşik I guaiakolden bir proton alarak Fe(IV) haline indirgenirken substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür ve bileşik II oluşur. Son olarak ta bileşik II guaiakolden tekrar bir proton alarak indirgenir ve ilk durumuna geri döner (Veitch, 2004).



Şekil 1.13. Peroksidaz enzimlerinin substrat olarak kullandığı aromatik bileşikler (Öztekin, 2016)

Bakterilerde, hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda peroksidaz enzimi bulunur ve sınıflandırılması iki üst aile içinde gerçekleştirilir. Bunlar;

1. Mantar, bitki ve bakteri peroksidazları,
2. Hayvan peroksidazlarıdır (Soda ve ark., 1991).

Çizelge 1.2. Peroksidaz enzimlerinin sınıflandırılması (Hiraga ve ark., 2001)

Süper Aile	Enzim	Kaynak	Moleküler Kütle (kDa)
Hayvan Peroksidazları	Eosinophil Peroksidaz	Hayvan	50-75
	Laktoperoksidaz	Hayvan	78-85
	Miyeloperoksidaz	Hayvan	79-150
	Tiroid Peroksidaz	Hayvan	90-110
	Glutatyon Peroksidaz	Hayvan, Bitki	6-22, 75-112
	Prostaglantin Endoperoksit Sentaz	Hayvan	115-140
Katalaz	Katalaz	Hayvan, Bitki, Mantar, Maya	140-530
Bitki Peroksidazları (Sınıf I)	Sitokrom c Peroksidaz	Maya, Bakteri	32-63
	Katalaz Peroksidaz	Bakteri Mantar	150-240
Bitki Peroksidazları (Sınıf II)	Askorbat Peroksidaz	Bitki	30-58
	Manganaz Peroksidaz	Mantar	43-49
Bitki Peroksidazları (Sınıf III)	Ligninaz	Mantar	40-43
	Peroksidaz (POD)	Bitki	28-60

1.6.1 Bitki Peroksidazları

Peroksidaz enzimi bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı olabilir. Tükrük bezleri, karaciğer, dalak ve süt hayvansal kaynaklı olurken baklagiller, incir, ıspanak, ananas, bazı turp türleri, mantarlar ve mayalarda bitkisel kaynaklı olarak bulunmaktadır (Pütter ve Becker, 1987).

Aynı bitki içerisinde farklı peroksidaz enzimleri bulunur ancak bunlar spesifik aktivite, moleküler kütle, kofaktörler, optimum pH ve sıcaklık, izoelektrik nokta, substrat ilgisi, aminoasit ve şeker bileşimi ve ısı stabilitesi gibi biyokimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterirler. İşlevsel olarak, bitki peroksidazları reaksiyonları katalizleyen bir oksidoredüktaz gibi hareket ederler (Somtürk, 2013).

Bitki peroksidazları, yaşam döngüleri boyunca bitkilerin büyümesi ve gelişiminin çeşitli temel fizyolojik süreçlerinde yer alan anahtar enzimlerdendir (Pandey ve ark., 2017). Bitkilerde çok sayıda bulunan peroksidazların rol aldığı pek çok metabolik reaksiyon bulunmaktadır.

- ❖ Fitohormon metabolizması (Cosio ve Dunand, 2009),
- ❖ Bitkilerde organik moleküllerin hücre içi taşınması (Sakharov ve ark., 2001),
- ❖ Fenolik bileşik oksidasyonu (Fry, 1998),
- ❖ Büyümenin hormonal düzenlenmesi (Wakamatsu ve Takahama, 1993),
- ❖ Zararlılara karşı savunma ve lignin oluşumu (Kahraman, 2003),
- ❖ Oksidan moleküller ve azot çeşitlerinin metabolizması (Almagro ve ark., 2009),
- ❖ Hücre duvarı metabolizması ve hücrelerin oksidasyona karşı direnci,
- ❖ Hücre duvarı bileşenlerinin çapraz bağlanması, suberin üretimi (Marjamaa ve ark., 2009),
- ❖ Sebze ve meyvelerin gelişme ve olgunlaşma zamanları zarfında indoleasetik asit değerinin dengesi (Agostini ve ark., 1997),
- ❖ Bitkilerdeki savunma sistemlerinde (Bartonek-Roxå ve ark., 1991) gibi örnekler peroksidazların bitkilerdeki görevlerindedir.

Bitki peroksidazları; bitkilerde hücre duvarı proteinlerinin bağlanması (Fry, 1986), oksidatif stres (Hiraga ve ark., 2001), lignin biyosentezi ve çimlenme (Morohashi, 2002) gibi biyolojik pek çok olayda rol üstlenir. Bitkisel peroksidazlar analitik çalışmalarda da rol üstlenen enzimlerdir (Kwak ve ark., 1996). Bitkisel peroksidazlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) metabolizması, patojenlere karşı savunma vb. gibi çeşitli süreçlerinde yer alır.

1.7 Peroksidazların Kullanım Alanları

Peroksidazların endüstrideki kullanım alanları oldukça geniştir. Bunun nedeni ise sıcaklığa dayanıklılıklarının iyi olması ve kullanabileceği substrat alternatifinin çok çeşitli olmasıdır.

Peroksidazların immünoloji, biyoteknoloji, çevre mühendisliği ve endüstri gibi kilit alanlardaki geniş kullanımları göz önüne alındığında, pek çok alan için büyük öneme sahip enzimler olarak kabul edilirler. Bu nedenle, peroksidazlar fenolik bileşikler gibi çevresel kirleticilerin biyoremediasyonunda, kâğıt ve kağıt hamuru endüstrisinde delignifikasyonda, immünolojik testte ve eliza teknolojisinde kullanılırlar. Peroksidazlar, fenoliklerin yanı sıra çok çeşitli fenolik olmayan bileşiğin de oksidasyonunu katalize eder. Ayrıca yüksek oranda duyarlılıklarından kaynaklı mikroanalitik ve klinik tanı amacıyla kuvvetli bir belirteç görevinde ve organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunda da kullanılır (Adam, 1999). Kimyasal üretim ve potansiyel ikinci nesil biyoyakıt üretimi (Regalado ve ark., 2004), teşhis kitleri gibi uygulama alanlarında da kullanılırlar.

POD enzimlerinin sanayideki kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır.

- ✓ Havada bulunan kirliliklerin takip ve kontrolünde,
- ✓ Oksidanların üretiminde (Lee ve ark., 2002),
- ✓ Arge çalışmalarında ve tıbbi alanda tanı amaçlı ikincil antikorların üretiminde,
- ✓ Biyo-bozulma işleminde,
- ✓ Pek çok donuk meyve kalitesinin bozulmasını engellenmesinde (Dicko ve ark., 2006),
- ✓ İmmunoenzimatik kitlerin %80'den fazlasında tanımlayıcı enzim olarak,
- ✓ POD enzimleri yapay boyalarda renklerin uzaklaştırılmasında,
- ✓ Organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunun hızlanmasında (Kahraman, 2003),
- ✓ Cilt ve saç renginin açılmasında (Oztekin ve Tasbasi, 2020)

gibi kullanım alanına sahip olan POD enzimi yukarıda bahsedilen uygulama alanlarında kullanılmalarının yanısıra suların toksik içeriğinden arındırılması ile ilgili çalışmalarda daha çok tercih edilir.

Göller, ırmaklar, nehirler bizim içme suyu kaynaklarımız olup toksik ve aromatik kirleticiler barındırabilmektedirler. Bu kirleticiler, fenol ve fenolik bileşenler toksik olduğu için insan sağlığı açısından tehlikelidirler. Bileşenlerin uzaklaştırılması için günümüzde kimyasal, mikrobiyolojik ya da enzimatik yöntemler bulunmaktadır. Örneğin ozon tedavisi, kirleticilerin uzaklaştırılmasında kullanılan kimyasal bir yöntem olup çok pahalı bulunmaktadır. Bu sebeple enzimatik yöntemler içme sularında toksik aromatik bileşenleri uzaklaştırmak için daha çok tercih edilmektedir. Toksik ve aromatik kirleticilerin uzaklaştırılması için mikrobiyal kaynak ürünlerindense bitkilerden izole edilen peroksidazlar daha az maliyetlidirler. Bu nedenledir ki peroksidazlar pek çok kullanım alanının olmasının yanı sıra bilhassa suların iyileştirilmesi çalışmalarında kullanılmaktadırlar (Lavery ve ark., 2010).

Ayrıca, nano tabanlı biyosensör uygulamalarının potansiyelleri sayesinde son yıllarda peroksidazlar daha fazla önem kazanmıştır (Pandey ve ark., 2017).

1.8 Afinite Kromotografisi

Diğer yöntemlere kıyasla afinite kromotografisi çok karmaşık yapıdaki proteinlerin saflaştırılması çalışmalarında tercih edilen en etkili yöntem olarak kabul görmektedir. Çoğunlukla bu yöntemde aktif metaryal ve saflaştırmanın geri kazanımı çok yüksektir. Saflaştırılması çok zor görülen maddeler ile çok kolay maddeler bile bu yöntemle daha kolay şekilde saflaştırabilir. Afinite kromotografisi saflaştırma çalışmalarında biyomoleküllerin pekçok biyolojik özelliklerinden yararlanır. Burada ayırım için moleküllerin boyut, izoelektrik nokta veya hidrofobiklik gibi özelliklerinden faydalanılarak değil de biyomoleküller arasındaki kendine has dönüşümlü etkileşimlerden faydalanılır (Ostrove, 1990).

Afinite kromotografisi yüksek seçiciliğinden dolayı pek çok amaç için tercih edilir (Atasever, 2010).

- a) Çok karmaşık biyolojik madde topluluklarını saflaştırmak için,
- b) Kimi moleküllerin denatüre olmuş hallerinden doğal hallerini seçmek için,
- c) Fazla orandaki kirleticiyi, az orandaki biyolojik metaryallerden seçmek

(Somtürk, 2013) gibi amaçlar örnek olarak verilebilir.

Afinite Kromotografisinde yüksek oranda bir ayırım yapılabilmesi için;

- Biyospesifik olan,
- Matriks ile kovalent bağ oluşturabilecek bir ligand gerekmektedir

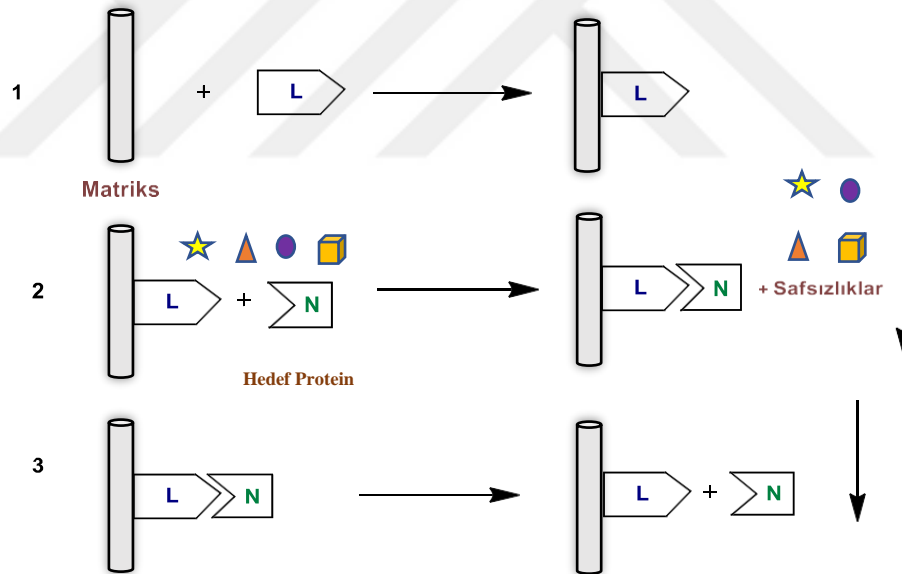
(Somtürk, 2013). Bununla birlikte iki husus daha önemlidir.

1) Matrikse bağlanan ligandın ayrıştırılmak istenen molekül için kendine özgü bağ kurma yatkınlığı olması,

2) Saf olmayan maddeler giderildikten sonra, bağlanmış molekülün faal olup seçimli ayrışması için uygun bir yol izlenmesi gerekir (Almaz, 2016).

Enzimlerin aktif bölgeleri çoğunlukla molekülün iç bölgesinde yer alır. Bu nedenle küçük ligantların direk matriks ile bağ kurması neticesinde elde edilen adsorbanlarda, bağlanma esnasında moleküller arasında arzu edilmeyen etkileşimler oluşabilir. Ligand ile matriks arasında arzu edilmeyen etkileşimleri engellemek ve doğru etkileşimi yani bağlanmaları sağlamak için uzantı kolu yerleştirilir (İnal, 2013).

Afinite kromatografisinin temel prensibi Şekil 1.14'te özetlenmiştir. Bu ilkenin birinci basamağında matrikse ligant kovalent bir bağ ile bağlanır. İkinci basamakta ise saflaştırılmak istenen molekül liganda adsorbe olup, safsızlıklar uzaklaştırılır. Üçüncü basamakta ise kolona tutunmuş olan molekül elüe edilerek toplanır. Afinite kromatografisi temel ilkesi şu şekilde şematize edilmiştir (Kalın, 2018);



Şekil 1.14. Afinite kromatografisinin temel ilkesi

Afinite kromatografisinde Sephadex, Sepharose, Bio-gel gibi maddeler matriks olarak tercih edilmektedir (Erel, 2019).

Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinin uygulanmasında en çok tercih edilen canlılık sistemleri (Somtürk ve ark., 2014)

Safılaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit izomeraz
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Hormon	Reseptör, taşıyıcı protein
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karnabahar (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) bitkisi lahanagillerden olup yıllık 20 ila 40 cm kadar boy alabilen yaygın olarak Akdeniz ülkelerinde bulunabilen bir bitkidir. Karnabahar bitkisinin anavatanı Güney Avrupa olarak geçmektedir. İlk olarak milattan önce 600'lü yıllarda Türkiye'de görüldüğü bilinmektedir (Güvenç, 2006).

Lahana grubu sebzelerin çeşitli hastalıklara karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Bunun sebebi içeriğindeki vitaminler ve kükürtlü bileşiklerdir. Yapılan bazı çalışmalarda karnabaharın vitamin içeriğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Karnabahar yüksek kalorili olmayıp C ve K vitamini, magnezyum, kalsiyum potasyum minarelleri açısından zengin bir bitkidir (Köksal, 2007).

Serbest radikallerin oluşumuna sebep olduğu oksidatif stres oluşumunun engellenmesi ve sebep olabileceği hasarların minimuma indirilmesi için doğru oranlarda antioksidanın tüketilmesi gerekmektedir (Kıyak, 2014). Karnabaharın kanser gibi çeşitli hastalıklara karşı etkisinin içeriğinde bulunan kükürtlü bileşikler olan glukozinolat isimli sekonder metabolitlere dayandırıldığı yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır (Sarıkamış, 2016). Kanseri riskini karnabaharın %67 oranında azalttığı belirtilmektedir (Güven ve Gulmez, 2006).

Karnabahar bitkisi üzerinde pek çok karakterize etme ve saflaştırma çalışması yapılmıştır.

1- Karnabahardan protein fosfataz enzimi ayrıştırılmış ayrıca ayırıcı özelliğini ortaya koymak amacıyla karakterize edilmiştir (Andreava *et al.* 2001).

2- Yine karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) DNA polimeraz ve endotransglikolizaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiş enzimler arasındadır (Halls ve ark., 2006).

3- Ayrıca bu bitkiden ayrıştırılan sistein proteazın inhibe etme niteliği de araştırma konusu olmuştur. (Halls ve ark., 2006).

POD enzimi pek çok bitkide bulunmakla beraber akla gelen ilk ticari menbainın at turpu kökleri olduğu bilinmektedir (Köksal, 2007).

2.1 Bitkilerden POD Enzimi Saflaştırılması Çalışmaları

Organizmalarda geniş bir yayılımı olan POD enzimi bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabileceği gibi çok çeşitli kaynaklardan izole edilebilmektedir. Bitkilerde bulunan peroksidaz incir, ananas, ıspanak yaprakları, enginar yaprakları, lahanaya, marul,

brokoli, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı bitkisel kaynaklı olurken karaciğer, süt, dalak, uterus ve hayvansal hücrelerin çoğu kısımlarından saflaştırılmaktadır (Pütter ve Becker, 1987).

Bitkisel kaynaklı POD enzimlerinin saflaştırılmasında literatürde pek çok kromatografik yöntemin uygulandığı çalışmalar 1960'larda yapılmış ve günümüzde bu çalışmalar sürdürülmektedir. Tercih edilmiş metotlar arasında diyaliz, amonyum sülfat çöktürmesi, metal ve hidrofobik afinite, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi pek çok yöntem bulunmaktadır (Öztekin, 2016).

POD enzimi yabancı sinamekinden (Vitalı ve ark., 1998), hurma yapraklarından (Deepa ve Arumughan, 2002), karalahanadan (Gulcin ve Yildirim, 2005), brokoliden (Thongsook ve Barrett, 2005), tatlı patates yumrularından (Leon ve ark., 2002), papaya meyvesinden (Pandey ve ark., 2012), şalgamdan (Hamed ve ark., 1998), ısırgan otundan (Gülçin, 2002), kavundan (Rodriguez-Lopez ve ark., 2000), ıspanak yapraklarından (Köksal, 2011), bürüksel lahanasından, lahanadan (McLellan ve Robinson, 1987), karalahanadan (Gulcin ve Yildirim, 2005), arpadan (Kristensen ve ark., 1999), bamyadan (Yemenicioğlu ve ark., 1998), portakaldan (Clemente, 1998), çay yapraklarından (Kvaratskhelia ve ark., 1997), biberden (Pomar ve ark., 1997), havuçtan (Nair ve Showalter, 1996), tütünden (Gazaryan ve Lagrimini, 1996), at turpundan (Lavery ve ark., 2010), yeşil bezelyeden (Lee ve Klein, 1990), çavdar yapraklarından (Murakami ve ark., 2007), pamuktan (Triplett ve Mellon, 1992), domatesten (Signoret ve Crouzet, 1982) ve çilekten (Civello ve ark., 1995) saflaştırılmıştır.

Yukarıda bahsedilen metot veya ürünlerin kullanıldığı çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir. Bu çalışmalara örnek olarak afinite tekniğinin kullanıldığı karaturptan tek kademedeki 40,3 kat %10,6 verimle, karalahanadan (*Brassica oleracea*) üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat %33 verimle (Gülçin, 2005), kırmızı lahanadan afinite kromatografisi yöntemini kullanarak 120 kat %2,9 verimle (Somtürk ve ark., 2014), şalgamdan afinite kromatografisi tekniğiyle 269,13 kat %9 verimle (Kalin ve ark., 2014), horseradish bitkisinde afinite kromatografisi tekniği kullanılarak 149 kat %4,46 verimle (Almaz, 2016), koşucu fasulyeden afinite yöntemiyle 253 kat %56,2 verimle (Oztekin ve Tasbasi, 2020) saflaştırılmıştır.

POD enzimi ticari olarak pek çok bitkide bulunmakla beraber ticari kaynak olarak en çok at turpundan (Horseradish Peroksidaz) elde edildiği bilinmektedir. POD enziminin

elde edildiği kaynakların fazlalığı uygulanan endüstriyel proseslerin çeşitlenmesini farklı ve yeni analitik metotların oluşmasını sağlamaktadır (Gulcin ve Yildirim, 2005).

Bu tez kapsamında ticari olarak kullanılan Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimine alternatif olabilecek, ülkemizde kolaylıkla yetişebilen karnabahar bitkisinden afinite kromatografisi tekniği kullanılarak tek kademedede POD enziminin saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda bitki peroksidazlarını saflaştırma işlemlerinde kullanılabilir bir inhibitör olan 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekülünün (ligand) ilk kez karnabahar POD enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi ve kinetiği incelenmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve markaları

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka
CNBr-Sepharose-4B, Sodyum asetat, Diyaliz torbası, Sodyum klorür (%99), Trihidroksimetilaminometan (Tris), N,N'-metilen bisakrilamid, Glutalaldehit, TEMED (N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin), SDS (Sodyum dodesilsülfat), Trihidroksimetilaminometan (Tris) Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Sodyum Nitrit %64 Hidrazin monohidrat, Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Standart serum albumin, Etanol, Dikloro metan, Hidrojen peroksit (%30), Guaiakol (%98), Akrilamid, Glutaraldehit, Coomassie brillant blue G-250, Metanol, Sodyum karbonat, Coomassie brillant blue R-250, Tirozin, Gliserol, Etil asetat,	Sigma Chemical Company
Sodyum perklorat, Hidroklorik asit, Sodyum sülfat, L-Tirozin, İzoproponal, Sodyum azotür, Fosforik asit, Sülfirik asit	E. Merk AG
Sodyum hidroksit, Potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄), Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
β -merkaptoetanol	Fluka
Aminobenzohidrazid, Metil 4-amino 3-bromo 2-metil benzoat (%98)	Fluorochem Ltd. (Derbyshire, UK)
Karnabahar bitkisi (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>)	Yerel

3.1.2 Kullanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.2. Kullanılan aletler, cihazlar ve markaları

Kullanılan Alet ve Cihazlar	Marka
pH metre	Hanna Instrument
Hassas Terazî	Scaltec SBA 41
Derin dondurucu (-20 °C ye kadar)	Arçelik
Afinite kolonu	Sigma
Karıştırıcı	Shaker (IKA KS 130 basic)
Magnetik Karıştırıcı	(Heidolph)
Güç kaynağı	Bio Rad Power Pac (3000)
Karıştırıcı (vortex)	Four E's Scientific Vortex Mixer
Saf su cihazı	Nüve NS103
Otomatik pipet	Eppendorf Research® plus
Peristaltik pompa	İsmatec
Elektroforez tankı dikey	Biorad
Jel görüntüleme cihazı	CemiDoc XRS Biorad
Spektrofotometre	Agilent Cary 60
Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z 323 K
Ultraturaks	Heidolph Silient Crucher M

3.1.3 Yararlanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalar sürecinde yararlanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanış biçimleri aşağıda detaylı olarak belirtilmiştir.

Karnabahar homojenatının hazırlanmasında yararlanılan çözelti

- ✓ 0,3 M KH_2PO_4 (pH: 7,0): 4,08 g KH_2PO_4 , 80 mL saf su içerisinde çözüldü.
- ✓ Normalitesi 1 olan NaOH bileşiği ile pH: 7,0'e kadar titrasyon yapıldı.
- ✓ Tüm hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Çizelge 3.3. Homojenat hazırlanmasında yararlanılan çözelti

Çözelti Adı	Kimyasal Miktarı	pH	İlk Hacim	Son Hacim
0,3 M KH_2PO_4 tamponu	4,08 g	7,0	80 mL	100mL

Afinite kolon materyalinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M, pH: 10 olan NaHCO_3 tamponu CNBr-Sefaroz-4B ile L-tirozin reaksiyonunu gerçekleştirmek amacı ile 2,1 gram NaHCO_3 150 mL saf suda çözünmesi sağlandı. Sonrasında pH: 10'a eşitleninceye kadar 2 N NaOH ile titrasyon işlemi gerçekleştirildi ve tüm hacim saf su ile 200 mL olacak şekilde ayarlandı.
2. 0,2 M, pH: 10 olan NaHCO_3 tamponu Sefaroz-4B-L-tirozine ligandların kenetlenmesini gerçekleştirmek amacı ile 1,2 g Tris-HCl 85 mL saf su içerisinde çözüldü. Sonrasında pH: 10'a getirmek amacı ile 3 M HCl çözeltisiyle muamele edildi ve nihai hacim 100 mL olacak şekilde ayarlandı.
3. En sonunda ise afinite jellerinin yıkama ve kolona yüklenmesi amacı ile 87 gr K_2HPO_4 (25mM) tartıldı ve 175 mL saf su içerisinde çözüldü. Sonrasında pH: 6,8'e getirmek amacı ile 0,5 M HCl çözeltisiyle muamele edildi ve nihai hacim 200 mL olacak şekilde ayarlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. Afinite kolonunun (CNBr-Sepharose-4B) dengelenmesi amacıyla yararlanılan tampon: 10 mM KH_2PO_4 (pH: 6,8), 1,74 g KH_2PO_4 , 950 mL saf su içerisinde çözüldü.

2. 1 N NaOH kullanılarak pH: 6,8'e gelinceye kadar titrasyon işlemi yapıldı, sonrasında tüm hacim saf suyla 1000 mL olacak şekilde ayarlandı.
3. Afinite kolonuna (CNBr-Sepharose-4B) hazırlamış olduğumuz homojenatın ilavesinin ardından yıkamada yararlanılan tampon: 25 mM KH_2PO_4 (pH: 6,8), 1,74 g KH_2PO_4 350 mL saf su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH kullanılarak pH: 6,8'e gelinceye kadar titrasyon işlemi yapıldı, sonrasında tüm hacim saf suyla 400 mL olacak şekilde ayarlandı.
4. Karnabahar POD enziminin elüsyonunda kullanılan tampon: 1 M NaCl/25mM KH_2PO_4 (pH: 6,8), 11,7 g NaCl ve 0,68 g KH_2PO_4 150 mL saf su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH bileşiği kullanılarak pH: 6,8'e gelinceye dek titrasyon işlemi gerçekleştirildi, sonrasında tüm hacim saf su kullanılarak 200 mL olacak şekilde ayarlandı.

Karnabahar peroksidazının aktivitesin belirlenmesinde yararlanılan çözeltiler:

1. Karnabahar POD enzimi aktivite ölçümü amaçlı: 0,1 M, pH: 6,0 olan KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanıldı. 1,36 g KH_2PO_4 , 80 mL saf su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH ile pH: 6,0'a gelinceye kadar titrasyonu gerçekleştirildi. Ardından tüm hacim saf su kullanılarak 100 mL olacak şekilde ayarlandı.
2. Karnabahar POD enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: guaiakol (45 mM) 249 μL alındı ve toplam hacim 50 mL olacak şekilde ayarlandı.
3. Karnabahar POD enzim aktivitesinin ölçümünde substrat çözeltisi olarak ayrıca 22,5 mM H_2O_2 çözeltisi kullanıldı. %30'luk H_2O_2 'den (yoğunluğu 1,11 g/mL olan) 684 μL alınarak saf suyla toplam hacim 300 mL'ye çıkarıldı.

Bradford metoduyla gerçekleştirilen protein tayini için yararlanılan çözelti

Kantitatif proteinlerin analizinde Coomassie Brilliant Blue G-250 belirteci tercih edildi. %95'lik 50 mL etanol içerisinde, 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 çözüldü, sonrasında %95'lik fosforik asitten 50 mL eklendi ve saf su ile tüm hacim 500 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözelti ışıksız bir ortamda saklandı.

Elektroforezde yararlanılan çözeltiler:

Çizelge 3.4. Elektroforezde yararlanılan çözeltiler

Elektroforezde kullanılan çözeltiler	
Molaritesi: 1 ve pH: 8,8 olan Tris-HCl tamponu:	0,2 mol 12,11 g Tris, 80 mL suda eritildi. Molaritesi 1 olan HCl kullanılarak pH: 8,8'e getirilip, tüm miktar 100 mL olacak şekilde ayarlandı.
Molaritesi: 1 ve pH: 6,8 olan Tris-HCl tamponu:	0,2 mol 12,11 g Tris, 80 mL suda eritildi. Molaritesi: 1 olan HCl kullanılarak pH: 6,8'e getirilip, tüm miktar 100 mL olacak şekilde ayarlandı.
Yürütme tamponu:	4,5 g Tris ile 14,4 g glisin, 300 mL su içerisinde eritildi. 15 mL SDS (%10'lük) üzerine eklenerek toplam miktar saf su kullanılarak 1500 mL olacak şekilde ayarlandı.
Numune tamponu:	18 mL %10'lük SDS, molaritesi: 1, pH: 6,8 olan 3,90 mL Tris-HCl ve %100'lük 6 mL gliserin, 0,1'lik 6 mL brom timol mavisi karışım haline getirilip, tüm miktar 60 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Hazırlanan tampona işlemler yapılmadan önce 200 µL'de 10 µL olacak gibi β-merkaptoetanol eklendi.
Renklendirme çözeltisi:	Coomassie brilliant blue R-250'den 1,98 g alınıp 360 mL metanolde çözünmesinden sonra 360 mL saf suya 72 mL saf asetik asit eklenmesiyle hazırlandı.
Renksizleştirme çözeltisi:	Asetik asit %7,5 oranında, metanol %5 oranında ve %87,5 oranında saf suyun karışımıyla çözelti elde edildi.
SDS (%10'lük):	9 g saf suda 1 g SDS çözülerek temin edildi.
Amonyum persülfat (%10'lük):	1 g amonyum persülfat ölçülerek 10 mL saf su üzerine eklendi.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Protein tayini

3.2.1.1 Kalitatif protein tayini

Yapılan kromatografi çalışmaları sonucunda aynı miktarlarda temin edilen tüm gruplara protein tayini (kalitatif) yapıldı. Ancak bu tayinin dayandığı kriterler bulunmaktadır. Aminoasitlerin 280 nm’de protein formunda olmaları, aromatik halka barındırmaları ve de UV ışınlarını absorblamaları bu kriterler arasında bulunmaktadır (Segel, 1975).

Kromatografi işlemleri bitiminde elde edilen elüatlar spektrofotometrede kullandığımız kuvarz küvetlere konuldu. İçinde protein bulunduran numunelerin spektrofotometrede absorbans ölçümleri alındı ve kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.2.1.2 Bradford protein tayin yöntemi

Saf hale getirilen enzim çözeltisinde ve de homojenatta var olan protein oranı Bradford (1976) metodu tayini ile belirlendi. Bu metotta boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden yararlanıldı. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklü bir boyadır. Proteinin yüzeyindeki pozitif yük ile bağ kurar. Bu boyanın mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) ve kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm) rengi bulunmaktadır. Protein bağlanınca kırmızı renk maviye dönüşür.

Tayin işleminin gerçekleştirilmesi ise şu prosedüre dayanır:

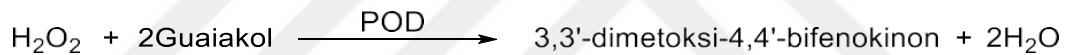
- Standart sığır albumin çözeltisinden (1 mL’inde 1 mg protein içeren) 10 ila 100 μ l arasında 10’ar 10’ar arttırılarak toplamda 10 tüpe alındı ve saf su ile bütün tüplerin miktarı 0,1 mL’ye getirildi.
- Sonra Coomassie Brilliant Blue G-250 karışımı 4,9 mL eklenerek tüp karıştırıcı ile çalkalandı.
- 10 dakikalık inkübasyon işleminden sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde absorbans değerleri köre karşı okundu.
- Kör adına 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 karışımı, protein numunesinin içinde bulunmadığı tampon ve ölçüm için 0,1 mL protein çözeltisi kullanılarak oluşturulan karışım kullanıldı.
- Ortaya çıkan sonuçlardan absorbans ölçümlerine denk olan μ g protein ölçümleri ile standart grafik çizildi.

➤ Ortamda bulunan protein miktarının tespiti amacıyla saflaştırmanın tüm aşamalarında enzim numuneleri üç farklı tüpe 200, 500 ve 1000 µl konularak üzerlerine sırasıyla 9 mL renklendirme reaktifi eklendi.

➤ Vorteks ile iyice çalkalandı ve sonrasında 10 dakika inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Devamında 595 nm'de absorbans ölçümü alındı. Bu işlemler üç kez tekrarlandı, elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart grafikten protein değerleri ölçüldü (Bradford ve Williams, 1976).

Karnabahar peroksidaz enziminin aktivite ölçümü

Aktivite spektrofotometre kullanımıyla hesaplandı. Spektrofotometrik uygulamalar H₂O₂ aracılığıyla guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve sonucunda meydana gelen renkli maddelerin ortaya çıkardığı absorbans yükselişinin 470 nm'de incelenmesi prosedürüne dayanır (Şekil 3.1) (Şişecioglu ve ark., 2010).



Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenmesi

Tepkime enzim çözeltilisinin eklenmesi ile başlar ve oda sıcaklığında her 1 dakikada toplamda 3 dakika süre ile 470 nm'de absorbans yükselişi incelendi. Spektrofotometrede 1 cm ışık yoluna sahip kuvvet tercih edilerek artış incelendi.

Çizelge 3.5. Karnabahar peroksidaz enzimi aktivite ölçümü için kuvvet içerikleri

Aktivite Çözeltileri	Kör (µl)	Numune (µl)
0,1 M KH ₂ PO ₄ Aktivite Tamponu	1000	990
22,5 mM H ₂ O ₂	1000	1000
45 mM Guaiakol	1000	1000
Karnabahar POD Enzimi	-	10

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki çizelgede verilen formül kullanıldı.

Çizelge 3.6. POD enzim aktivitesinin tespiti amacıyla uygulanan formül

$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad c = A/\epsilon \cdot b \quad V = c \cdot Df$
<p>A = Absorbans</p> <p>b = Işığın vardığı uzaklık (1 cm)</p> <p>c = Konsantrasyon ($\mu\text{mol/mL}$)</p> <p>ϵ = Ekstinksiyon katsayısı ($5000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)</p> <p>Df = Seyreltme katsayısı</p> <p>V = Reaksiyon hızı ($\mu\text{mol} \times \text{dak. /mL}$)</p>

3.3. Karnabahar Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1 Karnabahar (*Brassica oleracea var. botrytis L.*) için homojenat hazırlanması

20 g taze karnabahar (*Brassica oleracea var. botrytis L.*) bitkisinin köke yakın kısımları tartıldı ve kesme tahtasında incecik doğrandı. Doğranan bu parçalar havan içerisine alınıp sıvı azot eklenerek küçük kırıntılar haline getirildi ve pH: 7,0, Molaritesi: 0,3 olan tampondan (KH_2PO_4) 50 mL üzerine eklenerek 1-2 dakika gibi bir süre manyetik karıştırıcıda çalkalandı. Sonrasında ultraturraks ile iyice homojenize olması sağlandı. Homojenat tülbent yardımıyla behere süzüldü ve süzüntü santrifüj tüplerine aktararak 16.000 xg de 50 dakika gibi bir süre santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj tüpünün üstünde kalan kısım (süpernatant) alındı ve saflaştırma basamaklarında kullanılabilmesi amacıyla 4 °C’de bekletildi.

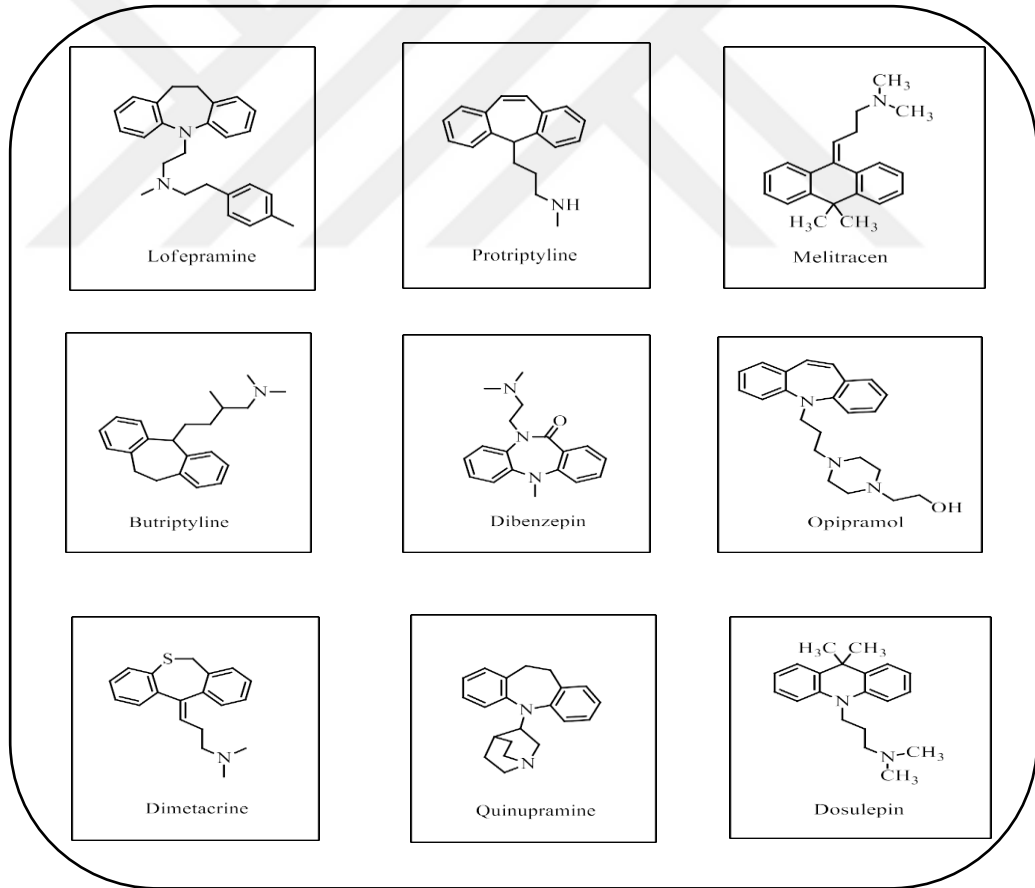
3.3.2 POD inhibitörleri ve ligand seçimi

Bitki peroksidazlarının saflaştırılmasında farklı inhibitör moleküllerin ligand olarak kullanıldığı çalışmalar oldukça dikkat çekici olmaya başlamıştır. Bu sebeple inhibisyon kinetiği çalışmalarında peroksidaz enziminin literatürdeki inhibitörleri tespit edilmiştir (Doerge, 1986). Literatürde tespit edilen inhibitörlerden yola çıkarak POD’un afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında kullanılmak üzere tirozin uzantı kolu ile diazonyum tuzu meydana getirebilecek en uygun yapıdaki ligand seçimi yapılmıştır.

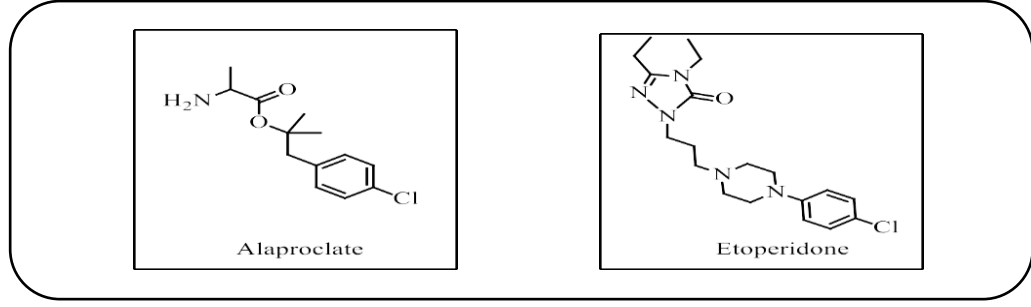
Yukarda bahsedilen özellik POD'un afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında önem arz etmektedir. Bu ligandlar arasında 4-aminobenzohidrazid türevi moleküller araştırmacıların ilgisini çeken yaklaşımlarından biri haline gelmiştir. Bu moleküller kullanılarak at turpundan (Almaz, 2016), karaturp ve şalgamdan (Öztekin, 2016) ve çalı fasulyesinden (Oztekin ve Tasbasi, 2020) POD enzimleri afinite kromatografisi ile tek kademede saflaştırılmıştır.

Yapılan daha önceki çalışmaların sonuçları dikkate alındığında bu moleküllerin güçlü POD inhibitörleri oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmada da bu moleküllerden etkili bir inhibitör olan 4-amino-3-bromo-2-metilbenzohidrazid molekülü kullanılarak karnabahar POD'un saflaştırılmasında kullanılmıştır. POD'un literatürdeki inhibitör çeşitleri ise aşağıda verilmiştir.

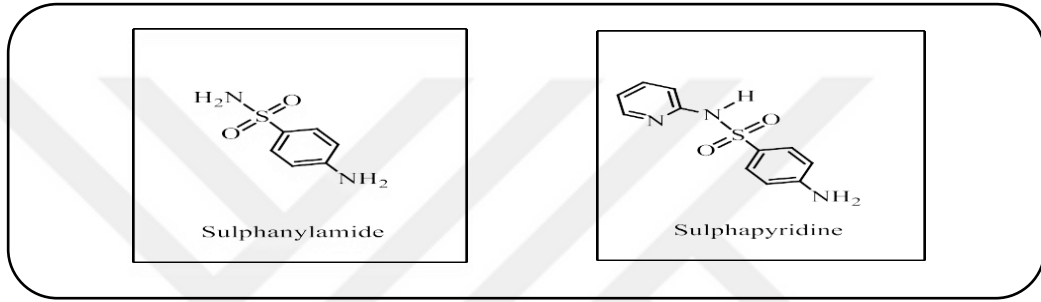
Monoamin (seçici olmayan) geri alım inhibitörler



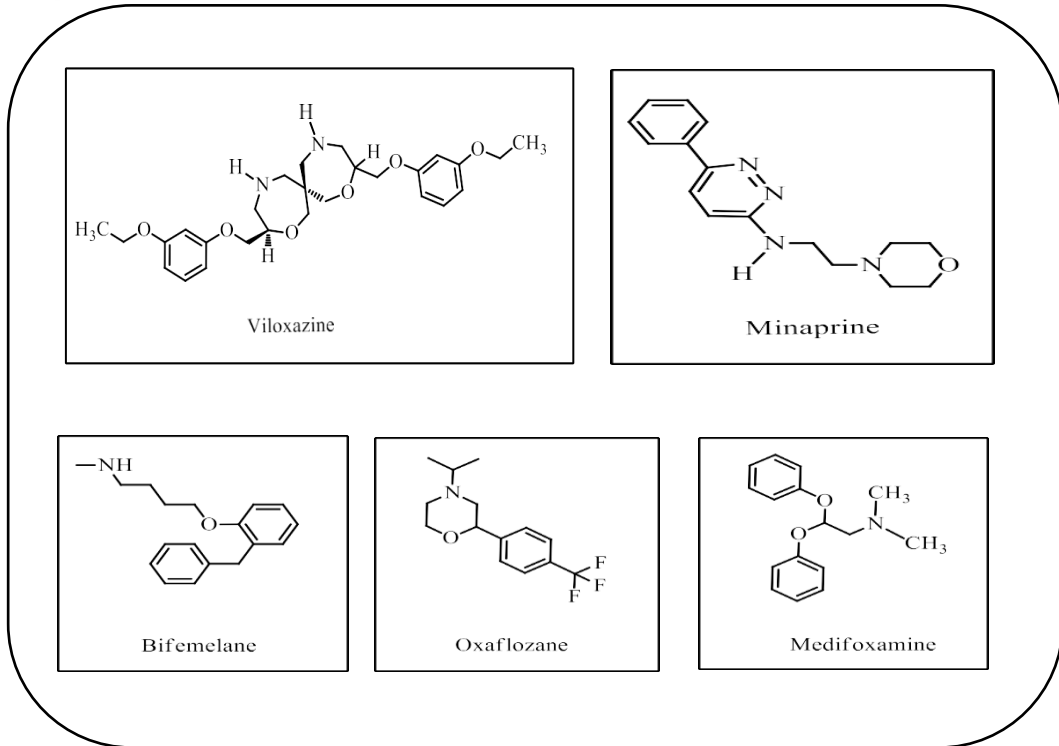
Serotonin (seçici) geri alım inhibitörler



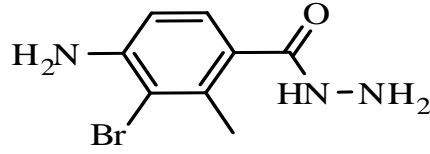
Mikroorganizmaları öldüren veya gelişimini yavaşlatan inhibitörler



Antidepresan inhibitörler



Tez çalışmamızda kullandığımız inhibitör



4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid

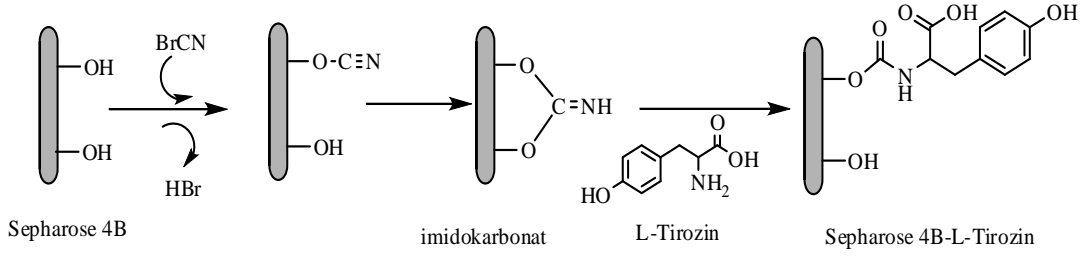
Ligand molekülün sentezi; 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülünün sentezinde metil benzoat formu çıkış bileşiği olarak kullanılmış ve benzohidrazid formu sentezlenmiştir. Sentez prosedürü önceki çalışmamızda ayrıntılı olarak verilmiştir (Oztekin ve Tasbasi, 2020; Oztekin ve ark., 2021).

3.3.3 Afinite jelinin elde edilmesi

Afinite jeli temini aşamasında CNBr ile aktive edilmiş sepharose-4B kullanıldı. Bu kolon örneğine L-tirozin uzantı kolu kovalent bağ ile bağlandı. Sepharose 4-B-L-tirozin jel materyaline, ligand olarak sentezlediğimiz 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid diazollanarak tirozindeki benzen halkasına tutturuldu. Elde edilen afinite jellerinde CNBr ile aktive edilmiş sepharose-4B; matriksi, tirozin; uzantı kolunu, inhibitörümüz, enzimin seçici bir şekilde tutturulan bölümünü (ligand) oluşturmaktadır. Afinite jeli aşağıda belirtilen yöntemle hazırlandı.

3.3.3.1 CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

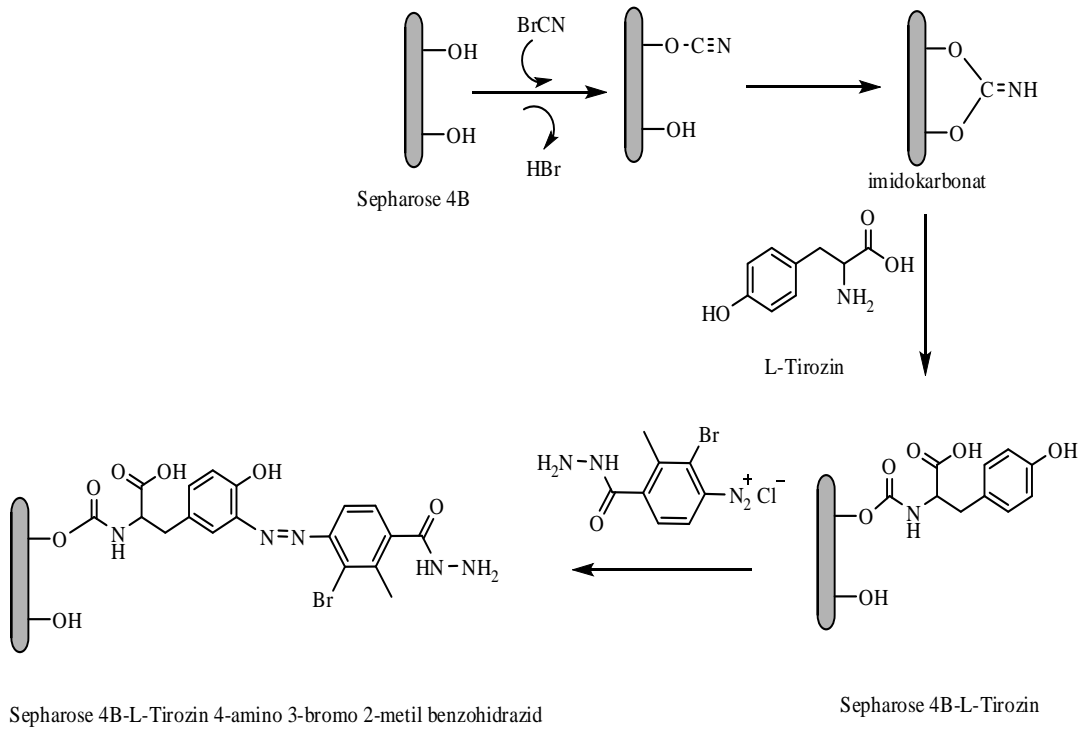
İlk olarak 2 g CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B alınıp soğuk suda çözüldü. 10 dk bekletilerek nuçhede süzme işlemi yapıldı ve molaritesi: 0,1 olan 50 mL NaHCO₃ ve pH: 10 olan tamponu ile yıkayıp uygun bir kaba alındı. Bu tamponun 20 mL' sinde 20 mg tirozin eritilmiş soğuk çözelti kaba aktarıldı ve karıştırılarak 4 °C de 16 saat kullanılmadan muhafaza edildi. 16 saatlik sürenin sonunda yıkama suyu 280 nm de absorbans gözlenmeyene kadar sürekli olarak yıkandı ve nitekim tepkimeye katılmayan tirozin bütünüyle uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL, molaritesi: 0,2 olan NaHCO₃ (pH: 8,8) tamponu ile tekrar yapıldı. Tirozin takılmış jel, aynı tamponun 20 mL'si içine aktarıldı. Reaksiyon mekanizması şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılma reaksiyonu

3.3.3.2 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid kenetlendirilmesi

Ligand olarak kullanacağımız 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülünden 12 mg alınarak $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ civarında, molaritesi: 0,1 olan HCl çözeltisi içerisinde çözünmesi sağlandı ve $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 mL 30 mg NaNO_2 çözeltisi, çözelti içerisinde azar azar ilave edildi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklendikten sonra diazolanmış halde bulunan ligand solüsyonu 40 mL sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna aktarıldı. Molaritesi: 1 olan NaOH kullanılarak titrasyon işlemi yapıldı, pH: 9,5'e getirildi ve bu şekilde 3 saat boyunca oda sıcaklığında hızı çok arttırılmadan karıştırıldı. Devamında 1 L saf su ve 200 mL molaritesi: 0,05 olan Tris- SO_4 (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı, daha sonra üstüne yine aynı tampondan katılarak muhafaza edildi (Whitney 1974). Elde edilen jele bağlanma mekanizması Şekil 3.3'te bulunmaktadır.



Şekil 3.3. 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid kenetlendirilmesi

3.3.4 Afinite kolonunun paketlenmesi

10 mM KH_2PO_4 (pH: 6,8) dengeleme tamponu içerisine alınan jel süspanse edilerek karıştırıldı ve havası su trompu yardımıyla vakumlandı. Karıştırılarak süspanse olmuş jel, 1x10 cm'lik kolona paketlendi. Jelin ökme işleminin tamamlanmasının ardından peristaltik pompadan faydalanarak dengeleme tamponuyla yavaş yavaş muamele edildi. Kolondan elde edilen solüsyon ve kullanmış olduğumuz tamponun pH'larının ve 280 nm'de absorbanslarının eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğu anlaşıldı.



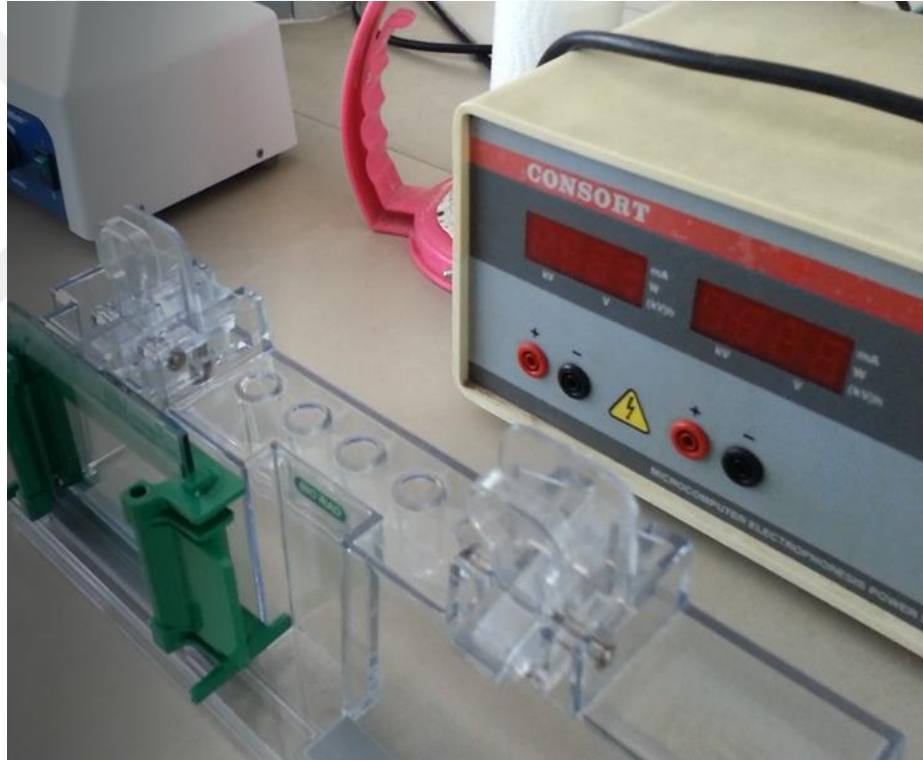
Şekil 3.4. Peristaltik pompa

3.3.5 Afinite kolonuna homojenatın yüklenmesi ve elüsyonu

Kolonun dengeleme tamponuyla (pH: 6,8 ve 10 mM KH_2PO_4) dengelenmesinin ardından homojenat hazırlama kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan homojenatın 5 mL'si kolona yüklendi. Afinite kolonu yıkama tamponu ile yıkanarak karnabahar POD enziminin kolona tutunup diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işleminin tamamlanmasıyla elüsyon tamponu kullanılarak kolona tutunmuş olan karnabahar POD enziminin elüsyonu gerçekleştirildi. Kolonda elüatın akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 40 mL/saat'e ayarlanarak elüatların 1,5'er mL'lik eppendorf tüplere akması sağlandı. Toplanan tüm tüplerdeki protein varlığının anlaşılması amacıyla kalitatif protein miktarı 280 nm'de spektrofotometrik olarak hesaplandı.

3.3.6 SDS - poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Karnabahar (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) POD enzimi afinite kolonu yardımı ile saflaştırıldıktan ve diyaliz işleminden sonra Laemmli yöntemi kullanılarak %3-8 kesikli SDS-PAGE (sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi ve molekül ağırlığı kontrol edildi. Bu işlemler esnasında molekül ağırlıkları belli olan standart proteinler tercih edildi (Laemmli, 1970). Bu amaç ile elektroforezde bulunan plakalar ilk olarak su sonrasında alkol kullanılarak temiz bir şekilde yıkandı. Yan taraflarında belli bir mesafe bırakacak bir plaka ile düz zeminli bir plaka üst üste getirildi ve kıskaç yardımı ile sabitlendi. Oturtulan plakalar, içerisinde sünger bulunan ve sızdırmayı önleyen jel hazırlama kabineine yerleştirildi. Ayırma ve yığma jelleri aşağıda belirtilen miktarlarda ve ayrı ayrı hazırlandı.



Şekil 3.5. Elektroforez plakaları

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: %30 akrilamid, %0,8 bisakrilamid, 5 mL (M: 1, pH: 8,8) Tris-HCl, 200 µl %10 SDS, 130 µl %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 3130 µl saf su ile çözelti oluşturuldu. Bu çözeltinin içerisine son olarak 200 µl %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) eklendi.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 410 µl molaritesi: 1 olan Tris-HCl (pH 6,8), 400 µl %30 akrilamid, %0,8 bisakrilamid, 30 µl %10'luk SDS, 30 µl %5'lik TEMED ve 2450

μ l saf su temin edilerek çalkalandı. Ardından %10'luk PER'den 100 μ l eklendi. Ayırma ve yığma jelleri aşağıda ayrıca tablo halinde verilmiştir.

Çizelge 3.7. Ayırma ve yığma jeli hazırlama

Çözelti Adı	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
1 M, pH: 8,8, Tris-HCl tamponu	5000 μ l	-
1 M, pH: 8,8, Tris-HCl tampon	-	410 μ l
%30 Akrilamit-%0,8 Bisakrilamit çözeltisi	4400 μ l	400 μ l
%10'luk SDS çözeltisi	200 μ l	30 μ l
%5'lik TEMED çözeltisi	130 μ l	30 μ l
Saf su	3130 μ l	2450 μ l
%10'luk Amonyum persülfat çözeltisi	200 μ l	100 μ l

Hazır hale getirilen ayırma jeli, plakalar arasındaki boşluğa üst bölümde 0,5 cm aralık oluşuncaya kadar enjektör yardımıyla akıtıldı. Havanın içeriye girmemesine özen gösterildi. Bir miktar, jelin donması beklendi. Ayırma jelinin katılaştığı kesinleşmesinin ardından yığma jeli yapıldı. Yığma jeli hazır olunca üst yüzeye kadar, ayırma jelinin üzerine pipetle dikkatli bir şekilde eklendi. Sonrasında elektroforeze özel tarak (numuneleri yüklemek için kuyucukların oluşması amacıyla), üzerine dikkatlice yerleştirildi ve jelin kuruması için yine bir süre işlem yapılmadı. Ardından tarak dikkatli bir şekilde kuyucukları bozmadan çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Varolan boşluklara belirteç konularak jelin yüzeyi ilk olarak saf su ile yıkandı. Ardından yürütme tamponu ile temizlendi. Elektroforez tankının alt ve üst bölümlerine yürütme tamponu konuldu.

Numuneler hepsinin içerisinde 20 μ g protein bulunduracak miktarda hazırlandı. Toplam hacim ise 100 μ g olacak düzeyde 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi. Sıcak su banyosunda 4 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Numuneler soğutuldu ve sonrasında numuneler ve standart protein, elektroforezde bulunan jeldeki kuyucuklara ince uçlu enjektör vasıtasıyla yüklendi. Tank kapağı kapatılarak alt ve üst kısımlarına sırasıyla (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) konuldu. Başlangıçta 30 dk 80 volt verilmesinin ardından akım 120 volta yükseltilerek oda ısısında 1,5 saat yürütüldü. Bu işlem boya jelden akana kadar devam etti. Numune tamponun içerdiği brom timol mavisi

reaktifi sayesinde numunelerin yürümesinin takibi gerçekleştirildi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra akım verilmesi durduruldu. Plakalar ortasına yerleştirilmiş olan jel özenli bir şekilde alındı. Bu yürütme tamponu yeniden yararlanmak üzere muhafaza edildi. Çalışma sonunda elde edilen jel Meyer ve Lamberts'in (1965) yöntemine göre Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile boyanmıştır. Jel boya çözeltisi içerisinde 24 saat bekletildikten sonra renksizleştirme çözeltisi içinde yıkama işlemi için iki saat bekletilmiştir. Yıkama işlemi birkaç kez yapıp bantların belirginleşmesi sağlanmıştır (Meyer ve Lamberts, 1965).

3.3.7 Kullanılan inhibitör için yapılan kinetik çalışmalar

Bu tez kapsamında ligand olarak kullandığımız 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid inhibitörünün guaiakol substratına tutunmuş olduğu vaziyette, oda ısısında ve en ideal pH'da, karnabahar POD enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Sabit substrat ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri gerçekleştirildi ve bu değerlere göre % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi. Çizilen bu grafik ile enzimin %50 inhibisyonu için gerekli inhibitör konsantrasyonunu temsil eden IC_{50} değeri tespit edildi. K_i değerlerini bulmak için üç ayrı inhibitör ve beş ayrı substrat konsantrasyonu kullanıldı. Spektrofotometrik olarak elde ettiğimiz absorbans değerleriyle Linewaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak K_i değerleri bulundu ve standart sapma hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

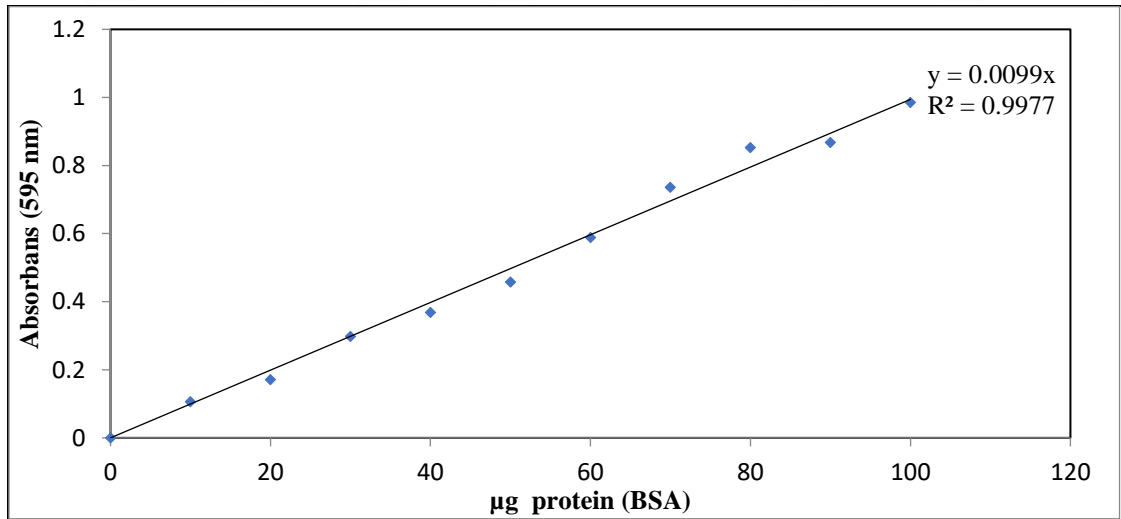
4.1 Karnabahar Peroksidaz Enzimi ile İlgili Araştırma Sonuçları

4.1.1 Ligand molekülün sentezlenmesi

Bu tez kapsamında ligand olarak kullanılan 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülü daha önceki çalışmamızda sentezlenmiştir. Sentezi ve karakterizasyonu önceki çalışmamızda ayrıntılı olarak verilmiştir (Oztekin ve Tasbasi, 2020; Oztekin ve ark., 2021).

4.1.2 Kantitatif protein tayini amacıyla yararlanılan standart grafik

Karnabahar bitkisinden hazırlanan homejenatlar ve yine karnabahar bitkisi kullanarak afinite kolonlarından saf hale getirilen POD enzim solüsyonlarındaki kantitatif protein hesabı Bradford metodu ile belirlendi. Bu amaç ile 3.2.1.2’de bahsi geçen yol izlenerek standart bir grafik çizildi. Homojenatlardaki ve de saflaştırma sonucu elde etmiş olduğumuz enzim çözeltilerindeki protein miktarları verilen standart grafikten yararlanılarak tespit edildi. Bunun sonucunda standart çözeltilerin μg proteine denk absorbans ölçümleri Şekil 4.1’de verildi.

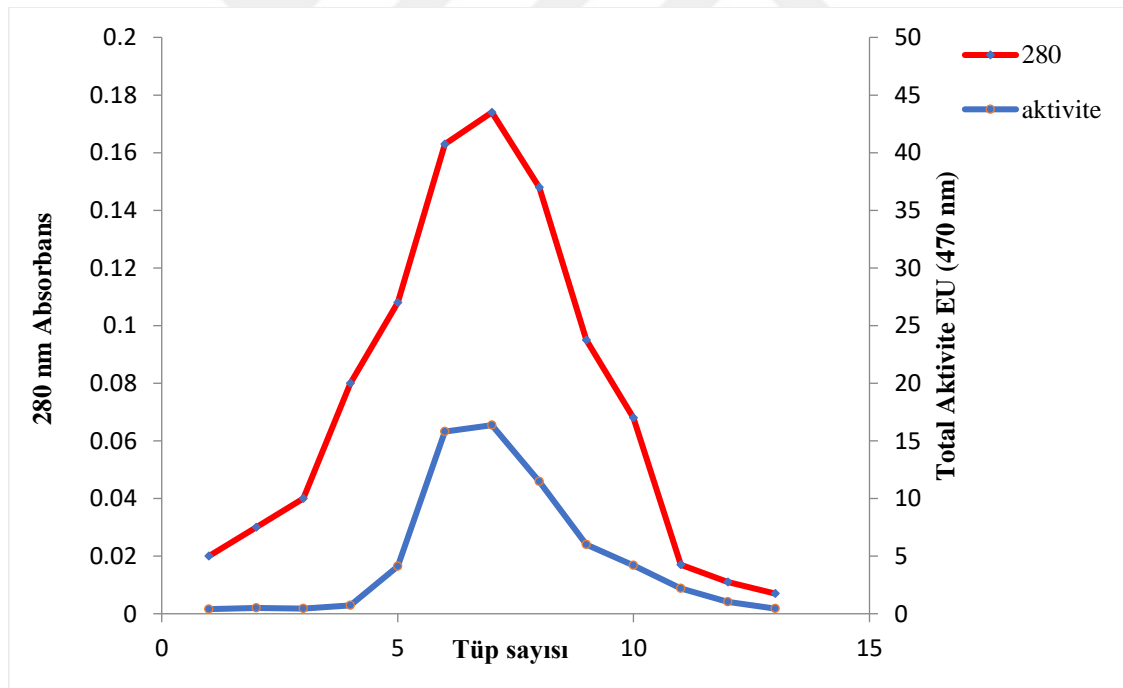


Şekil 4.1. Protein miktarlarını belirlemek için kullanılan Bradford standart grafiği (BSA:Bovine Serum Albumini)

4.2. Karnabahar Peroksidaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları

4.2.1 Afinite kromatografisi ile elde edilen karnabahar POD enziminin saflaştırma sonuçları

Hazırlanışı daha önce bahsedilmiş olan karnabahar bitkisinden elde edilen homojenatlardan dengelenmiş kolonlara 5'er mL pipet yardımı ile yüklendi. Yıkama çözeltisi ile kolona tutunmayan safsızlıklar yıkanarak uzaklaştırıldı. Sonrasında elüsyon çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen çözeltiler 1,5'er mL'lik eppendorf tüplere akması sağlandı. Tüm tüpler için 280 nm'de ayrı ayrı absorbans değeri ölçülüp kalitatif protein analizleri gerçekleştirildi. 280 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin tüp adetine karşı grafiği Şekil 4.2,'de verildi. Daha sonra absorbans gösteren tüm tüplerin 470 nm'de absorbans ölçümleri yapılarak aktiviteleri hesaplandı. Doymun substrat konsantrasyonunda ölçülen absorbanslardan aktiviteler hesaplanarak ortaya çıkan enzim ünitesi (EÜ)' ne karşı tüp sayısı grafiği çizildi.



Şekil 4.2. Karnabahar POD enziminin saflaştırılması sırasında elde edilen elüatların 280 nm'deki absorbanslarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik

4.2.2 Karnabahar POD enziminin 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid affinite kolonu ile saflaştırma sonuçları

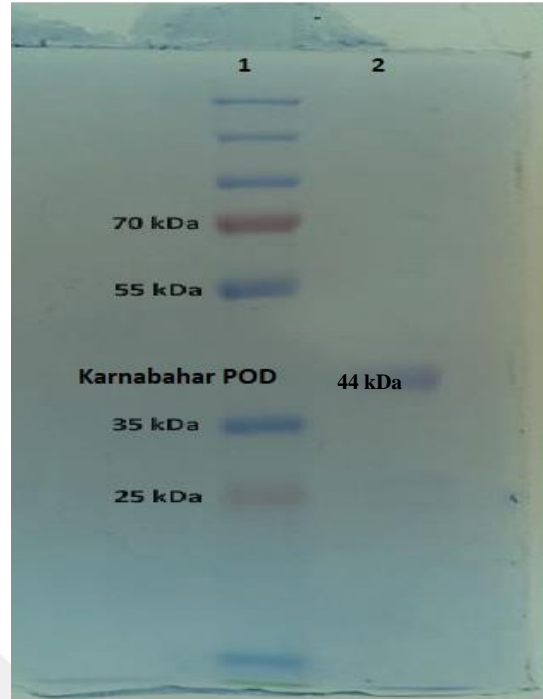
Ligandı 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülü olan affinite kolonundan karnabahar POD enziminin saflaştırma aşamasında elde edilen elüatlara 470 nm’de aktivite tayini ve Bradford yöntemi ile 595 nm’de kantitatif protein tayini işlemi uygulandı. 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid kolonu ile elde edilen sonuçlar saflaştırma tablosu haline getirilerek Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1. Karnabahar POD enziminin 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid kolonundan saflaştırma sonuçları

Karnabahar POD		En Son Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivi-te (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivi-te (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Kat- sayısı
4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid	Homojenat	5,00	62,6	0,7	313	3,5	89,4	100	1
	Sepharose 4B Afinite	3,00	16,08	0,00032	48,24	0,00096	50250	15,4	562

4.2.3 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid affinite kolonu ile karnabahar bitkisinden saflaştırılan POD enziminin hem saflığını doğrulamak hem molekül ağırlığını belirleyebilmek amaçlarıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi işlemi uygulandı. Bölüm 3.3.6’da aktarıldığı üzere yapılan elektroforez sonrasında elde edilen bantların görüntüleri Şekil 4.3’de verilmiştir. SDS-PAGE ile karnabahar bitkisi POD enzimi için tespit edilen molekül tayini sonucu yaklaşık 44 kDa olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış karnabahar POD enziminin SDS-PAGE görüntüsü

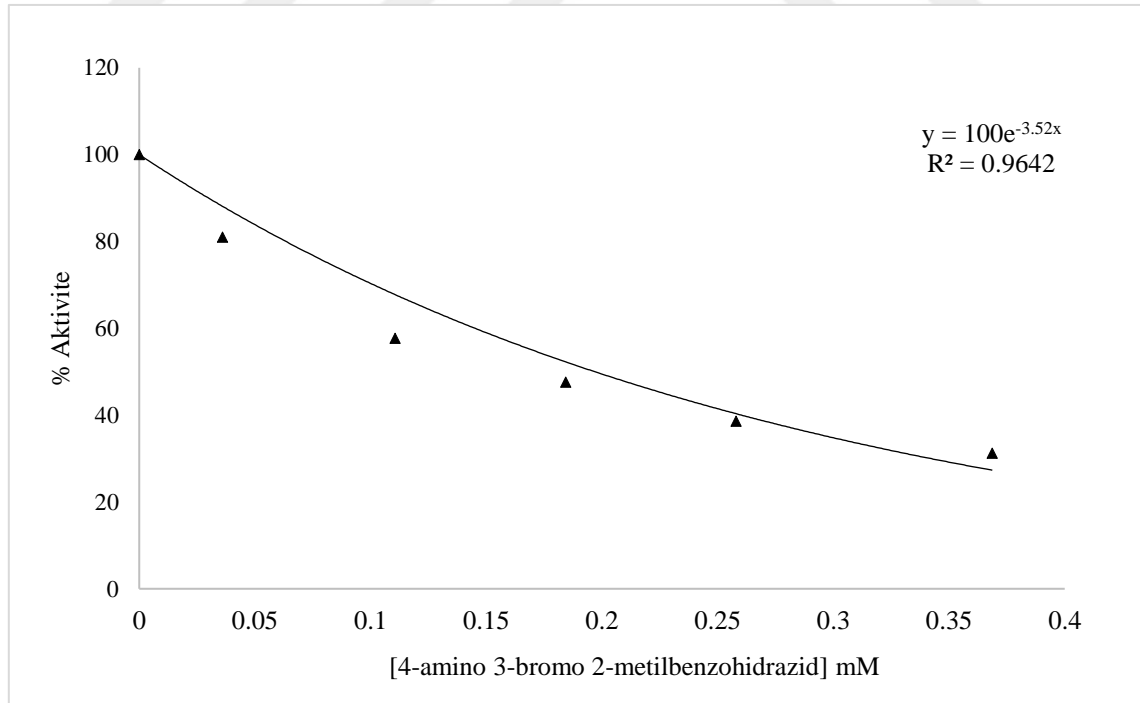
*(1 Nolu kuyular: Standart proteinler, 2 Nolu kuyu: Saflaştırılan karnabahar peroksidaz enzimi)

4.3.5 Kullanılan inhibitörün K_i ve IC_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışma sonuçları

Çalışmamız kapsamında 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid inhibitörü DMSO da çözüldü, gerekli seyreltmeleri saf su ile yapıldı ve karnabahar bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine bu molekülün inhibisyon etkisine bakıldı. Bu amaçla, guaiakol substratı doyunluğun altında alındı ve bu şekilde reaksiyon hızı substrata bağlı olarak belirlenmiş oldu. Sabit substrat (Guaiakol 45 mM) ve beş farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Uygulanan işlem prosedürü Çizelge 4.2’de verildi. % Aktivite- Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değeri hesaplandı. Bu grafik Şekil 4.4’te gösterildi. Karnabahar POD enziminin IC_{50} değeri 0,196 mM olarak bulundu.

Çizelge 4.2. Karnabahar POD enziminin aktivitesi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid inhibitörü için yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						[I] mM	%Aktivite
	Guaicol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaicol(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)		
4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,01	0,490	0,5	1,0	1,0	0,01	0,01	0,480	0,036	80,95
	0,5	1,0	1,0	0,03	0,470	0,5	1,0	1,0	0,03	0,01	0,460	0,110	57,67
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,440	0,184	47,61
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,01	0,420	0,258	38,62
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,01	0,390	0,368	31,21



Şekil 4.4. Karnabahar POD enzimi aktivitesi üzerine 5 farklı 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid inhibitörü yoğunluğunda elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon ([I]) grafiği

IC₅₀ değerinin belirlenmesinden sonra molekülün inhibisyon tipinin yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı çeşitlerinden hangisi olduğunun belirlenmesi ve K_i değerinin hesaplanabilmesi için 5 farklı guaiakol ve 3 farklı inhibitör yoğunluğunda aktiviteleri hesaplandı. Deney prosedürü ve elde edilen sonuç sırasıyla çizelge 4.3 ve 4.4'te verildi. 1/V değerleri spektrofotometrede ölçülen absorbanslarla hesaplandı. 1/[S] değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Lineweaver ve Burk, 1934), inhibisyon türü ve K_i değeri hesaplandı. (Şekil 4.5) Karnabahar POD enzimi için K_i sabiti 0,113±0,012 mM, inhibisyon türünün ise yarışmalı olduğuna varıldı.

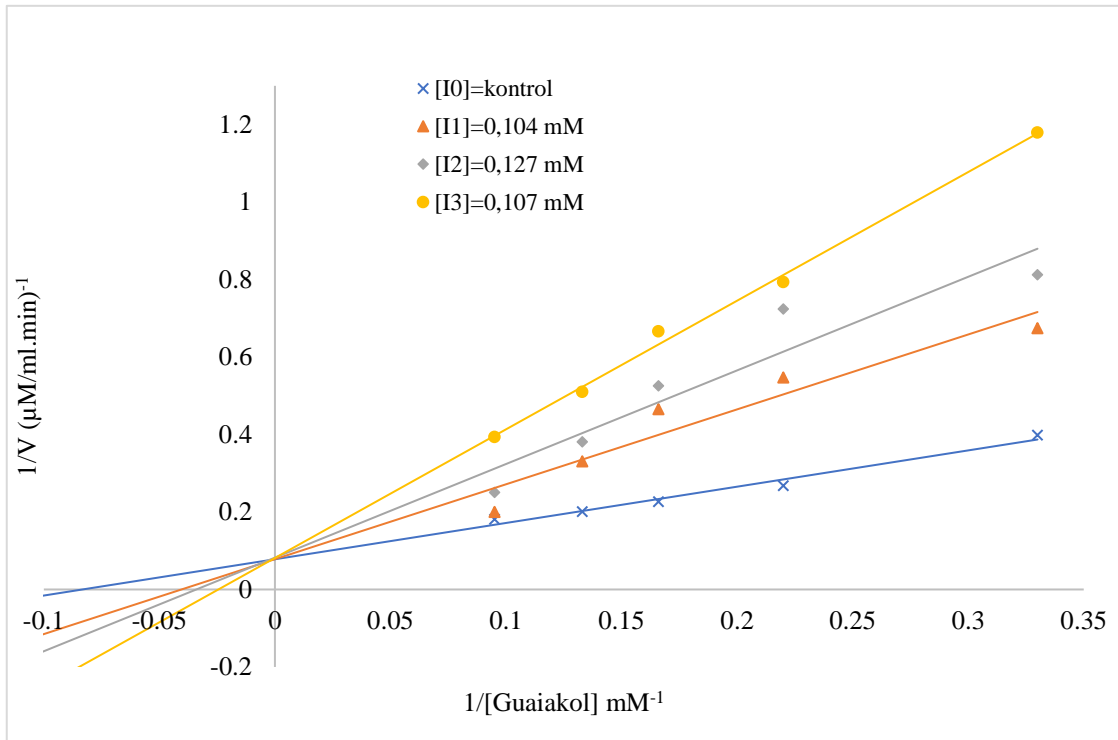
Yarışmalı inhibitörün varlığında, maksimum hız aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} \quad (4.1)$$

Burada [I], K_i, [S] ve V_{max} sırasıyla inhibitör konsantrasyonunu, enzim inhibitör konsantrasyonunun ayrışma sabitini, substrat konsantrasyonunu ve maksimum hızı belirtir.

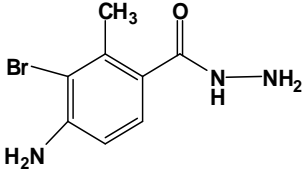
Çizelge 4.3. Karnabahar POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiacol (μl)	Fosfat Tamponu(μl)	H_2O_2 (μl)	İnhibitör (μl)	Su (μl)	Guaiacol (μl)	Fosfat Tamp μl)	H_2O_2 (μl)	İnhibitör (μl)	Su (μl)	POD (μl)	$1/V$ ($\mu\text{mol}/$ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
[I] ₀	200	1000	1000	-	800	200	1000	1000	-	790	10	0,398	0,330
	300	1000	1000	-	700	300	1000	1000	-	690	10	0,268	0,220
	400	1000	1000	-	600	400	1000	1000	-	590	10	0,226	0,166
	500	1000	1000	-	500	500	1000	1000	-	490	10	0,201	0,133
	600	1000	1000	-	400	600	1000	1000	-	390	10	0,181	0,095
[I] ₁	200	1000	1000	30	770	200	1000	1000	30	760	10	0,674	0,330
	300	1000	1000	30	670	300	1000	1000	30	660	10	0,547	0,220
	400	1000	1000	30	570	400	1000	1000	30	560	10	0,465	0,166
	500	1000	1000	30	470	500	1000	1000	30	460	10	0,330	0,133
	600	1000	1000	30	370	600	1000	1000	30	360	10	0,200	0,095
[I] ₂	200	1000	1000	50	750	200	1000	1000	50	740	10	0,812	0,330
	300	1000	1000	50	650	300	1000	1000	50	640	10	0,724	0,220
	400	1000	1000	50	550	400	1000	1000	50	540	10	0,525	0,166
	500	1000	1000	50	450	500	1000	1000	50	440	10	0,381	0,133
	600	1000	1000	50	350	600	1000	1000	50	340	10	0,250	0,095
[I] ₃	200	1000	1000	70	730	200	1000	1000	70	720	10	1,179	0,330
	300	1000	1000	70	630	300	1000	1000	70	620	10	0,793	0,220
	400	1000	1000	70	530	400	1000	1000	70	520	10	0,666	0,166
	500	1000	1000	70	430	500	1000	1000	70	420	10	0,510	0,133
	600	1000	1000	70	330	600	1000	1000	70	320	10	0,393	0,095



Şekil 4. 5. 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülünün Karnabahar POD enzimi üzerinde inhibisyon etkisini gösteren grafik

Çizelge 4.4 Karnabahar POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid	Karnabahar POD	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon tipi
		0,196	0,113±0,012	Yarışmalı

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bitkilerde bulunan peroksidaz (POD) enzimlerinin çeşitli biyokimyasal reaksiyonları kataliz etmeleri sebebiyle, bu enzimlerle ilgili geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır. Bilim insanları, POD enzimlerinin endüstride oldukça değerli enzimler olduklarını tespit etmişlerdir. Bu enzimi içeren kaynakların farklı özelliklere sahip olanlarının tespit edilmesi, endüstride hem farklı uygulamalar açısından hemde farklı kaynaklar açısından önem taşımaktadır.

POD enzimi, kendisine prostetik olarak sıkı şekilde bağlanmış olan hem isimli gurubu barındıran bir oksidoredüktazdır. (Rompel ve ark., 2007). Peroksidazlar çeşitli aromatik bileşikleri (hidrokinonlar, fenoller, hidrokinonid aminleri) substrat olarak kullanıp, metabolizmada oluşan hidrojen peroksit 'i (H_2O_2) etkisiz hale getirmektedir (Pütter ve Becker, 1987; Victor ve ark., 1993). Yani H_2O_2 'yi maddenin temel parçacığı olan elektron temin edici olarak kullanan peroksidazlar, aromatik maddelerin hidrojen gidericiliğini de çok yüksek oranda hızlandırır.

Hidrojen peroksit pek çok oksidaz enzimi tarafından meydana getirilebilir ve pek çok bileşiği oksitleyebilir. Hidrojen peroksit serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan dolayı, hücrede bulunmaya devam ettikçe hücre için toksik olabilir. Bu sebeple özellikle bazı sistemlerde oksidatif hasarın önlenmesi için hidrojen peroksidin uzaklaştırılması gerekir (Köksal, 2007).

Hayvanlarda, mantarlarda, bitkilerde ve bakterilerde POD enzimi bulunur. Bitkiler açısından POD enzimi; bitkinin kök, yaprak, kauçuk, çiçek, meyve ve tohum gibi kısımlarında vardır (Neves, 2002; Lopez-Molina ve ark., 2003; Maciel ve ark., 2007; Lavery ve ark., 2010). Bitkilerde pek çok farklı fizyolojik reaksiyon oluşmaktadır (Goyal and Chugh 2013). POD'lar bitkilerde bulunan zararlı maddelerin (serbest radikaller gibi) zararsız hale gelmelerini, onları dönüştürerek sağlamaktadırlar (Sadeghgan, 2016). POD'lar pekçok hücresel süreçte hayati roller üstlenmektedir. POD'lar, fenolik bileşiklerin oksidasyonu (Fry, 1986), hormonal faaliyet (Wakamatsu ve Takahama, 1993), hücre uzaması (Liskay ve ark., 2003), lignin biyosentezi (Duarte-Vázquez ve ark., 2000), harcanıp ürüne dönüşen oksijen ve azot çeşitlerinin metabolizması (Almagro ve ark., 2009), korunma mekanizmaları (Bartonek-Roxá ve ark., 1991), suberin oluşumu (Passardi ve ark., 2007), organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonu (Adam, 1999), indolasetik asit oranlarının dengelenmesi, canlı ortamında bitki büyüme ve

farklılaşması, bitkilerde hücre çeper proteinlerinin tutunması (Agostini ve ark., 1997), oksidatif stres (Hiraga ve ark., 2001) gibi olaylarda ayrıca sentetik boya ağartmada (Spadaro ve Renganathan, 1994), çeşitli sanayi kolları kullanımlarında (Kwak ve ark., 1996), organik çözücülerin fenol polimerizasyonunu katalizlemede, klinik tanı ve mikroanalitik uygulamalarda, atık sulardaki zehirli fenollerini parçalamada, önemli görevler üstlenirler (Yaman, 2018).

POD enzimi ticari olarak çok talep görmesi sebebiyle çeşitli kaynaklardan izole edilmişlerdir. Peroksidaz enziminin karaturp, karayip bitkisi, ıspanak yaprakları, incir, ananas, bayırturpu kökü, brokoli, domates tohumları, lahana, yağ palmyesi, patates yumruları, marul ve kültürlü yerfıstığı gibi pek çok bitkiden farklı yüzdelerde izole edilebildiğini belirten çalışmalar vardır (Miranda ve ark., 2002).

Affinite kromatografisi istenen proteinin, ayrılmayan bir kolon dolgu maddesi üzerine bağlanan ve istenen proteini bağlama uçları taşıyan spesifik ligandlar sayesinde geri dönüşümlü olarak proteinlerin adsorbe edilerek ayrıştırılması esasına dayanan kromatografik bir yöntemdir. Saf olarak elde edilmesi arzu edilen maddenin matrikse bir enzimin koenzimi kimyasal bir reaksiyon ile bağlanır. Saflaştırılması istenen madde bu kolon dolgu maddesine uygulandığı zaman sadece ilgilendiğimiz enzim proteinleri koenzime spesifik ve tersinir bağlandığı gözlemlenecektir. Çünkü diğer enzimlerin koenzime bağlanma özelliği bulunmamakta ve kolondan kolayca ayrılmaktadır. Sonrasında ise kolona serbest koenzim çözeltisi yavaş yavaş dökülür ve bu defa kolona bağlanmış enzimler rekabetten ötürü bu koenzimlere bağlanırlar ve diğer binlerce enzimden istenen enzim ayrıştırılmış olur. Günümüzde var olan diğer tekniklerle bu kadar kısa sürede çok kompleks karışımlardan tek basamakta saflaştırma yapmak mümkün olmamaktadır. Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı polimerler kolon dolgu maddesi olarak tercih edilmektedirler. Bu metotta saflaştırılacak protein için önemli olan, matrikse bağlanan ligandın seçici ve tersinir bağlanma özelliğine sahip olmasıdır. Bazen matriks ile ligand arasında bazı istenmeyen etkileşimler olmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırmak için matriks ve ligand arasına uzantı kolonu yerleştirilir (Keha ve Ö.İ., 2009).

Bitkilerin bilhassa kök, yaprak, kauçuk, gövde, çiçek, sap, meyve, tohum, hücrenin belli kısımlarında ihtiva edilen peroksidaz enzimi, bizim çalışmamızda karnabahar bitkisinin köküne yakın kısımlarından afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılmıştır. POD enziminin saflaştırılması 1960' lardan bu yana yapılmakta olup literatürde iyon değişim, afinite, hidrofobik ve metal afinite kromatografisi gibi birçok kromatografik metot bulunmaktadır (Singh ve ark., 2002). Köksal'ın yaptığı çalışmaya

göre karnabahar bitkisi CM-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-25 kullanılarak POD enzimi 19,33 kat ve %0,2 verimle (Köksal, 2007), Sakharov ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak palmiye ağacı yapraklarından POD enzimi 73 kat (Sakharov ve ark., 2001), Zia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre elma ve portakalda POD enzimi Sephadex veya Sefadeks G-75, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz yöntemleri kullanılarak elma tohumlarından ve portakal kabuklarından sırası ile 8.34 kat, 30.64 kat (Zia ve ark., 2011), Şişecioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre Türk kara turpunda diyaliz, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex iyon değiştirici kromatografi yöntemleri kullanılarak 9.7 kat (Şişecioğlu ve ark., 2010), Somtürk ve arkadaşlarının çalışmasına göre POD enzimi yaban turpundan jel filtrasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi kullanılarak 45.77 (Somtürk ve ark., 2014), Rojas – Reyes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak avokadodan POD enzimi 14.5 kat (Rojas-Reyes ve ark., 2014) saflaştırılmış olduğu yapılan literatür taramalarından tespit edilmiştir. Saflaştırma işlemleri esnasında saflaştırılacak maddenin aktivitesinde oluşabilecek önemli kayıpları yok etmek ve böylece yüksek verimde saflaştırılacak maddenin izole edilmesi önemlidir. Afinite kromatografisi çok basamak gerektirmediği için hızlı, kullanımı basit ve çok karmaşık yapılardan bile tek bir maddeyi saflaştırabilmesi sebebiyle seçiciliği yüksek bir yöntemdir. Yine affinite kromatografisi ince tabaka kromatografisine kıyasla kesin miktar tayini yapabilmesi açısından bir adım öne geçmektedir. Spektrofometrik yöntemlere kıyasla ise seçicilikleri daha fazladır ancak affinite kromatografisi pahalı bir yöntem olup daha çok büyük oranda saflaştırma işlemlerinde tercih edilmektedir.

Bu çalışmada karnabahar (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) POD enziminin yüksek verim ve saflıkta elde edilmesi amacıyla, 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekölü, bu bileşimin metilbenzoat formunun çıkış molekölü olarak kullanılmasıyla sentezlendi ve ligand olarak affinite jelinin hazırlanmasında kullanıldı. Bu ligandın seçilme sebebi ise dönüşümlü inhibisyon gösteriyor olduğunun yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarından tespit edilmesidir. Ayrıca diazonyum tuzu oluşturduğunun önceki saflaştırma çalışmalarından biliniyor olmasıdır. Sentezlenen bu moleköl diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olduğundan dolayı Karnabahar POD enziminin affinite kromatografisi ile saflaştırılmasında önem taşımaktadır. Bu aşamada hazırlanan kolon dolgu maddesinin sentezlendiği, diazonyum tuzu oluşturup uzantı koluna

bağlanarak ortaya bir renk çıkması ile bilinmektedir ki diazonyum tuzu oluşturabilen bileşiklerin renkli ürünler verdiği literatürden de bilinmektedir (Kalın, 2018).

Saflaştırma işleminin ilk aşamasında, karnabahardan alınan kısım sıvı azot ile muamele edilerek parçalanması sağlandı, hazırladığımız potasyum fosfat tamponu ile muamele edilerek manyetik karıştırıcıda bulamaç haline getirildi ve ultratüraks ile homojenize edildikten sonra ekstre santrifüje tabi tutuldu. POD aktiviteleri santrifüjdeki süpernatant kısmından alınan homojenattan ölçüldü. İlk olarak afinite kolonu dengeleme çözeltisi ile dengelenmiş sonrasında hazırlanan karnabahar homojenatları 4-amino 3-bromo 2- metil benzohidrazid kolonundan geçirilmiş ve yıkama tamponu ile enzim dışındaki diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında elüsyon tamponu ile kolon dolgu maddesindeki liganda bağlanmış olan karnabahar POD enzimi elüe edilmiştir.

Çalışmalarımız esnasında hazırlanan afinite kolonundan elde edilen karnabahar elüatlarının 470 nm'deki absorbans değerlerinin ölçümü alındı. Böylece POD aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Yapılan bu çalışma, guaiakol substratının H₂O₂ molekülü sayesinde yükseltgenmesi ve bunun sonucunda meydana gelen tetra guaiakolün 470 nm'de absorbans vermesi esası üzerine kuruludur. (Şişecioğlu ve ark., 2010). Burda aktivite belirlenirken bu yöntemin tercih edilme sebebi ise literatürde belirtildiği gibi enzim için en uygun substratın guaiakol olması ve molar ekstinksiyon katsayısının daha önceki çalışmalarla tespit edilmiş olmasıdır ($\epsilon_{470nm}=5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Kalın, 2018).

Çalışmamızın tüm aşamalarında Bradford metodunu kullanarak kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu çalışmada saflaştırılan enzimin tüplerdeki aktivitesine bakıldıktan sonra aktivitesi en yüksek üç tüp esas alınarak bu tüplere ve homojenata Bradford metodunu ile protein tayini yapılarak tüplerdeki protein miktarları bulundu. Bradford metodu ile protein tayininde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanıldı. Kullandığımız boya negatif yüklü bir boya olup protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır ve sonucunda kırmızı renk açığa çıkararak oluşan bu rengin spektrofotometrede 595 nm'de absorbans vermesi ile ölçüm alınır. Bu metod Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının fosforik asit ile karmaşık bir yapı meydana getirmesi ve bu yapının spektrofotometrede absorbans vermesi ilkesine dayanmaktadır. Uygulanan metodun yıkıcı etkilere karşı çok hassas olmaması ve reaksiyonun çabuk gerçekleşmesinden ötürü yüksek oranda tekrarlanabilir olması en büyük avantajıdır.

Ligand olarak dönüşümlü inhibisyon gösteren 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid molekülünün bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırma işlemi

gerçekleştirildi sonrasında spektrofotometre ile aktivitelerine bakıldı ve protein tayini yapılarak alınan sonuçlar üzerinden hesaplamaların yapılması ile saflaştırma tablosu hazırlandı (Çizelge 4.1) ve bunun üzerinden tartışıldı. Bu çalışmada karnabahar bitkisinden hazırlanan ekstraktan saflaştırma gerçekleştirildi. Saflaştırma kısmında affinite kromatografisi; enzimin saflık doğrulamada ve molekül ağırlığının tespitinde SDS-PAGE yöntemini kullanıldı. Hazırlanan saflaştırma tablosuna bakıldığında tek kromatografik işlemle POD enzimi karnabahardan 50250 (EÜ/mg) ve %15,4 verimle 562 kat saflaştırıldı. Yapılan literatür taraması sonucunda peroksidaz enzimin saflaştırılması hakkında çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Pandey ve arkadaşları papayadan (*Carica papaya*) peroksidaz enzimini 68,59 (EÜ/mg) ile 30,22 kat %44,37 verimle üç kromatografik adımda saflaştırmıştır (Pandey et al. 2012). Lavery ve arkadaşları at turpundan (*Armoracia rusticana*) peroksidaz enzimini 772,25 (EÜ/mg) ve 291 kat %71,3 verimle iki kromatografik adımda saflaştırmıştır (Lavery et al. 2010). Marquez ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden peroksidaz enzimini 1563,5 (EÜ/mg) ile 21 kat %19 verimle iki kromatografik adımda saflaştırmıştır (Marquez et al. 2008). Al-Senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) peroksidaz enzimini 906,2 (EÜ/mg) ile 17 kat %5,8 verimle üç kromatografik adımda saflaştırmıştır (Al-Senaidy and Ismael 2011). Gülçin ve Köksal karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enzimini 466987,9 (EÜ/mg) ile 19,33 kat %0,2 verimle üç kromatografik adımda saflaştırmıştır (Köksal and Gülçin 2008). Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) peroksidaz enzimini 43805 (EÜ/mg) ile 33,5 kat %33 verimle üç kromatografik adımda saflaştırmıştır (Gülçin and Yıldırım 2005). Mdluli marula meyvesinden (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra) peroksidaz enzimini 361,469 (EÜ/mg) ile 19 kat %1,3 verimle üç kromatografik adımda saflaştırmıştır (Mdluli 2005). Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından peroksidaz enzimini 96,4 (EÜ/mg) ile 22,6 kat %4,2 verimle iki kromatografik adımda saflaştırmıştır (Köksal 2011). Rudrappa ve arkadaşları kırmızı pancardan (*Beta vulgaris* L.) peroksidaz enzimini 10500 (EÜ/mg) ile 15 kat %84,6 verimle üç kromatografik adımda saflaştırmıştır (Rudrappa et al. 2007). Ajila ve Prasada Rao siyah gram kabuğundan (*Vigna mungo*) peroksidaz enzimini 1215291 (EÜ/mg) ile 44 kat %44 verimle iki kromatografik adımda saflaştırmıştır (Ajila ve Rao, 2009). Yapılan literatür araştırmasında gerçekleştirilen çalışmalarda saflaştırma tekniklerinden “jel filtrasyon kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon gibi” en az iki tanesinin kullanıldığı görülmektedir. Bu daha fazla maliyet

ve zaman kaybı demektir. Biz bu çalışmamızı literatürdeki çalışmalara kıyasla daha az maliyet ve daha kısa bir sürede gerçekleştirmiş olduğumuzu görmekteyiz.

Saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra elde edilen enzimin molekül kütlesinin belirlenmesi ve saflık kontrolü bölüm 3.3.6'da aktarıldığı gibi SDS-PAGE metoduyla belirlendi. Gerçekleştirilen SDS-PAGE işleminden sonra karnabahar bitkisinden yapılan saflaştırma işleminin gerçekleşmiş olduğu ve enzimin saf olduğu belirlendi. Saflaşması gerçekleştirilebilen karnabahar POD enziminin molekül kütlesinin yaklaşık 44 kDa olduğu bulundu. Değişik bitki çeşitlerinden ayrılması ile toplanan izoenzimlerin; molekül kütleleri SDS-PAGE yöntemiyle; Civello ve arkadaşlarının 1995'deki çalışmasına göre 56 kDa çilek peroksidazı için (Civello ve diğerleri, 1995), Forsyth ve Robinson'unun 1998'deki çalışmasına göre 2648 kDa brussel filiz peroksidazı için (Forsyth ve Robinson, 1998), Deepa ve Arumughan'nın 2002'deki çalışmasına göre 48 kDa palmye ağacı yapraklarında için (Deepa ve Arumughan, 2002), Pandey ve arkadaşlarının 2012'deki çalışmasına göre 43.11 kDa karayip bitkisi için (Pandey ve ark., 2012), sakharov ve arkadaşlarının 2001'deki çalışmasına göre 51 kDa palmye ağacı için (Sakharov ve ark., 2001), Signoret ve Crouzet'in 1982'deki çalışmasına göre 37 kDa tatlı patates kökleri için (Signoret ve Crouzet, 1982), Laver ve arkadaşlarının 2010'deki çalışmasına göre 37 kDa at turpu için (Laver ve ark., 2010), Marquez ve arkadaşlarının 2008'deki çalışmasına göre 46,5 kDa vanilya çekirdeği için (Marquez ve diğerleri, 2008), Rudrappa ve arkadaşlarının 2007'deki çalışmasına göre 45 kDa kırmızı pancarda (Rudrappa ve ark., 2007), başka bir çalışmaya göre 43 kDa domateste (Jen ve ark., 1980; Signoret ve Crouzet, 1982), Dicko ve arkadaşlarının 2006'deki çalışmasına göre 95 kDa karalâhanada (Dicko ve ark., 2006), Tzika ve arkadaşlarının 2009'deki çalışmasına göre 44kDa zeytinde (Tzika ve ark., 2009), Deepa ve Arumughan'nın 2002'deki çalışmasına göre 55 kDa hurma yapraklarında (Deepa ve Arumughan, 2002), Chibbar ve Huystee'nin 1984'deki çalışmasına göre 42 kDa fıstık perosidazında (Chibbar ve Huystee, 1984), Paul ve Stigbrand'ın 1970'deki çalışmasına göre 40-46 kDa turp için (Paul ve Stigbrand, 1970), Wang ve Luh'un 1983'deki çalışmasına göre ise 34 kDa yeşil kuşkonmaz peroksidazı için (Wang ve Luh, 1983) tespit edilen değerlerdir. Karnabahar (*brassica oleracea* var. *botrytis* l) POD enzimleri için SDS-PAGE fotoğrafı Şekil 4.2'de verilmiştir. İzole edilen POD'un molekül ağırlıkları saflaştırmanın yapıldığı bitki çeşidine göre farklılık göstermektedir. İzole edilen peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıklarına bakıldığında genel olarak 34-95 kDa arasında olduğu görülmektedir. Karnabahar POD enzimleri için elde ettiğimiz molekül ağırlıkları literatürdeki kaynaklarla uyum içindedir.

Karnabahar bitkisinden saflaştırılan peroksidaz enzimi için ligand olarak seçtiğimiz 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid inhibitörü üzerine kinetik çalışmalar yapıp detaylı olarak incelendi. Öncelikle guaiakol (45 mM) substratına bağlı olarak inhibitörsüz bir absorbans ölçümü yapıldı ve enzimin aktivite değeri hesaplandı. Sonrasında yine 45 mM guaiakol substratı varlığında 5 ayrı konsantrasyonlarında inhibitör ilave edilerek tekrardan absorbans ölçümü alındı ve aktivite değerleri hesaplandı. İnhibitörümüzün enzim aktivitesini yarıya düşürdüğü inhibitör konsantrasyonu bizim IC_{50} değerimizi verir. Bu çalışmamızda küvette bulunan inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.2' de verildi. Sonuçta elde ettiğimiz enzim aktivitesini yarıya düşüren değerin alt ve üstündeki değerler alındı ve %Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değeri bulundu. Karnabahar (*Brassica Oleracea* Var. *Botrytis* L) POD enzimi için bu grafikler Şekil 4.4'te gösterildi.

Karnabahar POD enzimi üzerine 4-amino 3-bromo 2-metilbenzohidrazid molekülünün inhibisyon etkisinin incelenmesi sonucunda IC_{50} değeri; 0,196 mM olarak hesaplandı. Bulunan bu sonuca bakıldığında tercih edilen molekülün POD enzimin molekül üzerine inhibisyonu ortaya konuldu.

IC_{50} çalışmasından sonra amacımız K_i değerini tespit etmek ve inhibisyon tipini belirlemek oldu. Daha önce tespit edilen IC_{50} değerini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu baz alınarak 3 farklı inhibitör konsantrasyonu seçildi. K_i değerinin bulunması için ayrıca 5 farklı substrat konsantrasyonu da belirlendi ve bu değerler üzerinden aktivite ölçümü yapıldı. Bulunan sonuçlar Çizelge 4.3' te verildi. Sonrasında 4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid için $1/V$ ve $1/[S]$ değer ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri oluşturuldu (Lineweaver ve Burk, 1934). Grafik şekil 4.5' te verildi. Çizilen grafikten inhibisyon çeşidi ve K_i değeri bulundu. Karnabahar peroksidazın K_i sabiti $0,113 \pm 0,012$ mM, inhibisyon çeşidinin ise yarışmalı olduğu görüldü.

5.2 Öneriler

4-amino 3- bromo 2- metil benzoat molekülü hazır bir şekilde satın alındı ve 4-amino 3- bromo 2- metil benzohidrazid molekülünün sentezi yapıldı. Karnabahar (*Brassica Oleracea* Var. *Botrytis* L) peroksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. Araştırmanın yapıldığı molekülün karnabahar POD enziminin saflaştırılmasında ilk kez kullanıldığı yapılan literatrür taramalarında belirlenmiştir. Yine araştırmanın yapıldığı molekülün enzim ile dönüşümlü inhibisyon sergilediği ve aynı

zamanda güçlü bir inhibitör olduğu tespit edildi. Bu çalışmamızda 4-amino 3- bromo 2- metil benzohidrazid ligandı için detaylı kinetik çalışma K_i , IC_{50} ve inhibisyon tipi karnabahar POD enzimi için ilk defa yapılmıştır.

Literatürde POD enzimi ile alakalı pek çok saflaştırma yöntemi bulunmakta olup kullanılan affinite kolonunun bu yöntemlerden daha üstün olduğu, hazırlanan kolonun defalarca kullanılabildiği ve daha az maliyetli olduğu anlaşıldı.

Bu çalışmada, ticari olarak satılan HRP enzimine alternatif olan karnabahar POD enzimi yüksek katsayıyla karnabahar bitkisinden saflaştırılmış, kinetik aktiviteleri araştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız ligandın (4-amino 3-bromo 2-metil benzohidrazid) karnabahar POD enzimi saflaştırma işlemini tek kademede başarı ile gerçekleştirdiği ve bundan sonraki çalışmalarda diğer bitki peroksidaz saflaştırma işlemlerinde de ligand olarak kullanılabileceği literatüre kazandırıldı.

Yüksek saflaştırma katsayısı ve verimle elde ettiğimiz karnabahar POD enziminin endüstriye kazandırılması ve suların iyileştirilmesi amacıyla kullanılabileceği araştırma kaynaklarından tespit edilmiştir.

Ayrıca dünya nüfusun hızla artması sonucu günümüz problemi haline gelen nüfusa yeterli olmayan gıda sıkıntısının giderilmesi amacıyla, peroksidaz enziminin meyve sebzelerin olgunlaştırılmasında etkili olduğu düşünüldüğünde, hasat verimliliğinin artırılması çalışmalarında kullanılabileceği fikrine ulaşılmış ve bu yönde araştırmaların çoğaltılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U. and Scherier, P. 1999. Biotransformations with peroxidases, *Advanced Biochemistry Engineering*, 63, 74-108.
- 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 (3), 596-598.
- Ajila, C., Rao, U.P. 2009. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60 (1-2), 36-44.
- Akay, C. 2004. Biyomarkörlerin toksikolojide kullanımı. in: *Gülhane Tıp Dergisi*, Vol. 46, pp. 73-83.
- Algül, D.Ç. (2019), "Topraktan İzole Edilen *Bacillus Subtilis* A8'den Proteaz Üretimi Ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Dicle Üniversitesi, Erzurum,
- Almagro, L., Gómez Ros, L., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreño, M. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions, *Journal of experimental botany*, 60 (2), 377-390.
- Almaz, Z. (2016), "Benzohidrazid Türevleri Kullanılarak Horseradish Peroksidaz (Hrp) Enziminin Tek Basamakta Saflaştırılması", Doktora Tezi *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R. 2005. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost, *Scientia Agricola*, 62, 286-290.
- Atabeyoğlu, K. (2011), "Bazı Ağır Metallerin Subletal Dozlarının Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum 1792) Katalaz, Süperoksit Dismutaz, Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktiviteleri Ve Mrna Ekspresyonları Üzerine Etkileri", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Atasever, A. (2010), "Laktoperoksidaz Enziminin Sığır Sütünden Afinite Kromatografisi Tekniği İle Saflaştırılması", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Bartonek-Roxå, E., Eriksson, H., Mattiasson, B. 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1088 (2), 245-250.
- Boldaz, B. (2021), "Pazı Kökü (*Beta Vulgaris* L. Var. Cicla) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Bradford, M., Williams, W., 1976, New, rapid, sensitive method for protein determination, *Federation proceedings*, FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA, 274-274.
- 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 (10), 2596-2601.
- Clemente, E. 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges, *Phytochemistry*, 49 (1), 29-36.
- Cosio, C., Dunand, C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes, *Journal of experimental botany*, 60 (2), 391-408.
- Coşkun, B. (2013), "Tekstil Atık Sularında Enzimatik Renk Gideriminin Deneysel Tasarımı Ve Optimizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla,
- Daniel, R.M., Peterson, M.E., Danson, M.J., Price, N.C., Kelly, S.M., Monk, C.R., Weinberg, C.S., Oudshoorn, M.L., Lee, C.K. 2010. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity, *Biochemical journal*, 425 (2), 353-360.
- Deepa, S., Arumughan, C. 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf, *Phytochemistry*, 61 (5), 503-511.
- Denli, Z. (2013), "Kiwano (*Cucumis Metuliferus*) Bitkisinde Peroksidaz Enzimlerinin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya Üniversitesi, Sakarya,
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A.G., van Berkel, W.J. 2006. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase, *The FEBS journal*, 273 (10), 2293-2307.
- Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients, ILSI Europe concise monograph series, 59.
- Doerge, D.R. 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitrogens, *Biochemistry*, 25 (16), 4724-4728.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I. 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases, *Analytical biochemistry*, 250 (1), 10-17.
- Doğanay, G. (2019), "Elma Suyunda Isıl İşlem Süresince Polifenoloksidaz, Peroksidaz İnaktivasyonu Ve Fenolik Bileşiklerdeki Değişiminin FTIR Spektroskopisi Kullanılarak Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde,
- Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendárez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R. 2000. Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) Peroxidases, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (5), 1574-1579.
- Erel, D. (2019), "Horsradış Peroksidaz (Hrp) Enzimi Üzerine Bazı Benzohidrazid Türevlerinin Etkisinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z.J., Ferradji, F.Z., Bejar, S., Boutoumi, H. 2012. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: Purification and biochemical characterization, *Bioresource technology*, 111, 383-390.
- Fridowich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. in: *Science*, Vol. 201, pp. 875-877.

- Fry, S.C. 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals, *Biochemical Journal*, 332 (2), 507-515.
- Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, *Annual review of plant physiology*, 37 (1), 165-186.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M. 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase, *Phytochemistry*, 41 (4), 1029-1034.
- Gerni, S. (2017), "Karaturp Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Benzohidrazidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi ", Yüksek lisans Tezi *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Ghosh, J., Myers, C.E. 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (22), 13182-13187.
- Gökçal, B. (2020), "Monodispers Gözenekli Formda Metal Oksit Mikrokürelerin Peroksidaz Benzeri Aktivitelerinin İncelenmesi Ve Biyosensör Geliştirilmesinde Kullanımı", Yüksek Lisans, *Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara,
- Gulcin, L., Yildirim, A. 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. *Acephala*, *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4), 2175-2183.
- Güven, A., Gulmez, M. 2006. Functional foods and their relationship with health, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 12, 91-96.
- Güçlü, K., Apak, R., Özyürek, M. . 2009. hidroksil ve süperoksit radikallerinin süpürülmesine dayalı yeni antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin geliştirilmesi. . in: Tübitak Proje, pp. 1-114.
- Gülçin, İ. 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds, *International journal of food sciences and nutrition*, 56 (7), 491-499.
- Gülçin, İ. (2002), "Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi", *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Güvenç, İ., 2006, *Sebzecilik: Temel Bilgiler Muhafa ve Yetiştiricik Kitabı*, 978-605-83781-3-1.
- Halliwell, B. 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance, *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halls, C.E., Rogers, S.W., Oufattole, M., Østergard, O., Svensson, B., Rogers, J.C. 2006. A Kunitz-type cysteine protease inhibitor from cauliflower and *Arabidopsis*, *Plant science*, 170 (6), 1102-1110.
- Hamed, R.R., Maharem, T.M., Fatah, M.M.A., Ataya, F.S. 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots, *Phytochemistry*, 48 (8), 1291-1294.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant and Cell Physiology*, 42 (5), 462-468.
- <https://tr.wikipedia.org/wiki/Oksidored%C3%BCktaz> [Erişim Tarihi: 25 Şubat 2022].
- <https://web.archive.org/web/20120716211126/http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/intro.html> [Erişim Tarihi: 25 Şubat 2022].

- <https://web.archive.org/web/20120527173242/http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/09p.html#1111> [Erişim Tarihi: 25 şubat 2022].
- Huystee, R.V. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies, *Annual review of plant physiology*, 38 (1), 205-219.
- İnal, S. (2013), "Afinite Kromatografisi Tekniği İle Peroksidaz Enziminin Kırmızı Pancardan (Beta Vulgaris) Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi,
- Jouili, H., Bouazizi, H., El Ferjani, E. 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (6), 2075-2082.
- Kahraman, S. (2003), "Peroksidazın pazıdan (Beta vulgaris L. var. cicla.) saflaştırılması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul,
- Kalın, R. (2018), "Bitkisel Kaynaklardan Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Rasemik Hidroperoksidin Enantiyo Seçimli İndirgenmesi", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Kalin, R., Atasever, A., Özdemir, H. 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots, *Food chemistry*, 150, 335-340.
- Keha, E., Ö.İ., K., 2009, *Biyokimya*, Erzurum, Aktif Yayınları,
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö., 2010, *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Ankara,
- Keskin, H., 1987, *Besin Kimyası*, İstanbul. , 49.
- Kıyak, S., Dağlı, Y., Zeren, Ü., Arıburnu, M., Gülbandılar, A., Dönmez, M. ve Okur, M. 2014. Türk Tarım in: *Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, Vol. 2(6), pp. 277-279.
- Klibanov, A.M. 1983. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts, *Science*, 29, 1-28.
- Koçak, ř.M. (2018), "Amino Benzohidrazid Türevi Moleküller Kullanılarak Karaturp Peroksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi Tekniği İle Saflaştırılması ", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi,
- Köksal, E. 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): partial purification and some biochemical properties, *International Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Köksal, E. (2007), "Karnabahar (*Brassica Oleracea L.*) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu, Antioksidan Ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi ", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- 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.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves, *Plant Physiology*, 114 (4), 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 (3), 565-568.

- Laemmli, D. 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Lajmanovich, RC, Andres, M., Attademo, AM, Peltzer, PM, Junges, CM.
- Lavery, C.B., MacInnis, M.C., MacDonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J., D’Cunha, G.B. 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (15), 8471-8476.
- Lee, D.J., Kim, S.S., Kim, S.S. 2002. The regulation of Korean radish cationic peroxidase promoter by a low ratio of cytokinin to auxin, *Plant Science*, 162 (3), 345-353.
- Lee, H.C., Klein, B.P. 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing, *Journal of Food Biochemistry*, 14 (2), 137-152.
- Lee, Y.J., Galoforo, S.S., Berns, C.M., Chen, J.C., Davis, B.H., Sim, J.E., Corry, P.M., Spitz, D.R. 1998. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (9), 5294-5299.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., Cox, M.M., 2005, *Lehninger principles of biochemistry*, *Macmillan*,
- Leon, J.C., Alpeeva, I., Chubar, T., Galaev, I.Y., Csoregi, E., Sakharov, I.Y. 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers, *Plant science*, 163 (5), 1011-1019.
- Lineweaver, H., Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants, *Journal of the American chemical society*, 56 (3), 658-666.
- Liszky, A., Kenk, B., Schopfer, P. 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth, *Planta*, 217 (4), 658-667.
- Lopez-Molina, D., Heering, H.A., Smulevich, G., Tudela, J., Thorneley, R.N., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N. 2003. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L, *Journal of inorganic biochemistry*, 94 (3), 243-254.
- Maciel, H.P.F., Gouvêa, C.M.C.P., Toyama, M., Smolka, M., Marangoni, S., Pastore, G.M. 2007. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves, *Quimica Nova*, 30 (5), 1067-1071.
- Marjamaa, K., Kukkola, E.M., Fagerstedt, K.V. 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignification, *Journal of Experimental Botany*, 60 (2), 367-376.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes, *Food Chemistry*, 23 (4), 305-319.
- Meyer, TS., Lamberts, BL., 1965. *Biochimica et biophysica acta*, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.
- Miranda, M., Magri, M., del Canizo, A.N., Cascone, O. 2002. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agarose, *Process Biochemistry*, 38 (4), 537-543.
- Morohashi, Y. 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle 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 (6), 777-784.
- Nair, A.R., 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.
- Neves, V.A. 2002. Ionically bound peroxidase from peach fruit, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 7-16.
- Onsa, G.H., bin Saari, N., Selamat, J., Bakar, J. 2004. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from Metroxylon sagu, *Food Chemistry*, 85 (3), 365-376.
- Ostrove, S. 1990. [29] Affinity chromatography: General methods, *Methods in Enzymology*, 182, 357-371.
- Oztekin, A., Almaz, Z., Onlu, S. 2021. Production and purification of peroxidases from callus cultures of white and red cabbage for enzymatic decolourization of reactive blue 19 and acid blue 25 dyes, *Biocatalysis and Biotransformation*, 1-10.
- Oztekin, A., Tasbasi, S. 2020. A novel peroxidase from runner bean (*Phaseolus coccineus* L.): Enhanced affinity purification, characterization, and dye decolorization activity, *Journal of Food Biochemistry*, 44 (10), e13411.
- Özata, A., Kutlu, M. 2000. Enjimoloji Ders Notları. in: T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları Vol. 1254. Eskişehir.
- Öztekin, A. (2016), "4-Amino Benzohidrazid Türevleri Kullanılarak Karaturp Ve Şalgamdan Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Pandey, V., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, U. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases, *Biochem Anal Biochem*, 6 (1), 308.
- 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 (2), 367-376.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L. 2007. PeroxiBase: the peroxidase database, *Phytochemistry*, 68 (12), 1605-1611.
- Pomar, F., Bernal, M.A., Díaz, J., Merino, F. 1997. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase, *Phytochemistry*, 46 (8), 1313-1317.
- Pütter, J., Becker, R. 1987. *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases* Bergmeyer, VCH, New York.
- Regalado, C., García-Almendárez, B.E., Duarte-Vázquez, M.A. 2004. Biotechnological applications of peroxidases, *Phytochemistry Reviews*, 3 (1), 243-256.
- Robinson, E.E., Maxwell, S.R., Thorpe, G.H. 1997. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence, *Free Radical Research*, 26 (3), 291-302.

- Rodriguez-Lopez, J.N., Espin, J.C., del Amor, F., Tudela, J., Martinez, V., Cerdá, A., Garcia-Canovas, F. 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (5), 1537-1541.
- Rojas-Reyes, J.O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Castro Matinez, C., Waliszewski, K.N., Aguilar-Uscanga, M.G. 2014. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (9), 1844-1853.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., Büldt-Karentzopoulos, K., Jasper, B., Krebs, B. 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774 (11), 1422-1430.
- Routoula, E. (2019), "Understanding Peroxidase immobilisation on Bioinspired Silicas and application of the biocatalyst for dye removal", University of Sheffield, 71-77.
- Sadeghgan, N. (2016), "Afinite kromotografisi tekniği İle tatlı turp (*raphanus sativus*), japon turpu (*r.sativus* l. var. *longipinnatus*) ve karnabahardan (*Brassica oleracea*) eroksidaz (POD) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu ", Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum,
- Sakharov, I.Y., Galaev, I.Y., Sakharova, I., Pletjushkina, O.Y. 2001. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties, *Plant Science*, 161 (5), 853-860.
- Sarıkamış, G. 2016. Sofralarımızın Sağlık Kaynağı Kış Sebzeleri. in: TÜRKTOB, Vol. 20, pp. 51-57.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A. 2012. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA, *Nucleic acids research*, 41 (D1), D764-D772.
- Segel, I.H., 1975, *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*, Wiley New York:,
- Signoret, A., Crouzet, J. 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography, *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 (2), 459-464.
- Singh, N., Gade, W., Singh, J. 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32 (1), 39-49.
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T., Ogura, N. 1991. Purification and some properties of peroxidase from kiwifruit, *Agricultural and biological chemistry*, 55 (6), 1677-1678.
- Somtürk, B. (2013), "Peroksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Bitkisel Kaynaklardan Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erciyes Üniversitesi, Kayseri,
- Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N. 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography, *Applied biochemistry and biotechnology*, 173 (7), 1815-1828.

- Spadaro, J.T., Renganathan, V. 1994. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation, *Archives of biochemistry and biophysics*, 312 (1), 301-307.
- Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Cankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H. 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.), *J. Med. Plants Res*, 4 (12), 1187-1196.
- Telefoncu, A. 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. in: Fen Edebiyat Fakültesi Yayını, Vol. 59, Ege Üniversitesi. İzmir.
- Temel, D. (2006), "Doğal ve sentetik biomateryallerde, osteogenik (rhBMP-7) ve angiogenik (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi", Yüksek lisans tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çukurova Üniversitesi, Adana,
- Thongsook, T., Barrett, D.M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (8), 3206-3214.
- Triplett, B.A., Mellon, J.E. 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Science*, 81 (2), 147-154.
- Veitch, N.C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65 (3), 249-259.
- Victor, W., Robert, K., Daryl, K., Peter, A. 1993. Metabolism of purine & pyrimidine nucleotides, *Harper's Biochemistry* (Robert, KM, Daryl, KG, Peter, AM & Victor, WR, eds.), 363-377.
- Vıtalı, A., Botta, B., Monache, G.D., Zappitelli, S., Ricciardi, P., Melino, S., Petruzzelli, R., Giardina, B. 1998. Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies, *Biochemical Journal*, 331 (2), 513-519.
- Voet, D., Voet, J.G., 2010, *Biochemistry*, *John Wiley & Sons*,
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus, *Physiologia Plantarum*, 88 (1), 167-171.
- Whitaker, J. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2da Edicion Marcel Dekker, Inc, New York, 565-578.
- Yaman, M. (2018), "Peroksidazın Üç Fazlı Ayırma Yöntemi İle Pazıdan (*Beta Vulgaris* L. Var. *Cicla*) Saflaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul,
- Yavaşer, R. (2011), "Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın,
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 4158-4163.
- Yıldırım, P. (2014), "Yeni Tip Fenoksi İmin Türevli Monomerlerin Horseradish Peroksidaz Enzimi (HRP) İle Oksidatif Polimerizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde Üniversitesi Niğde,

- Zamocky, M., Obinger, C. 2010. Molecular phylogeny of heme peroxidases. in: *Biocatalysis based on heme peroxidases*, Springer, pp. 7-35.
- Zia, M.A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H.M.N., Abbas, R.Z. 2011. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds, *African Journal of Biotechnology*, 10 (33), 6300-6303.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatma Nurdan AĞIRÇELİK

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Yabancı Dil Ağırlıklı Lise, Merkez, MUŞ	2007
Üniversite	: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Merkez, VAN	2011
Yüksek Lisans	: Muş Alparslan Üniversitesi, Merkez, MUŞ	2022
Doktora	: ---	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012	Beykoz Teknik Lisesi	Öğretmen
2014	Muş Tarım ve Orman İl Müdürlüğü	Mühendis

YABANCI DİLLER

İngilizce (Temel)