

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİSİ İLE BİTKİSEL KAYNAKLARDAN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan  
Burcu SOMTÜRK**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Haziran 2013  
KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİSİ İLE BİTKİSEL KAYNAKLARDAN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan  
Burcu SOMTÜRK**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

**Haziran 2013  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Burcu SOMTÜRK

İmza:




**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

“Peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile bitkisel kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



**Tezi Hazırlayan  
Burcu SÖMTÜRK**



**Danışman  
Yrd.Doç.Dr.Nalan ÖZDEMİR**



**Kimya ABD Başkanı  
Prof. Dr. Talat ÖZPOZAN**

Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR danışmanlığında **Burcu SOMTÜRK** tarafından hazırlanan **“Peroxidaz enziminin afinite kromatografisi ile bitkisel kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

10/06/2013

**JÜRİ:**

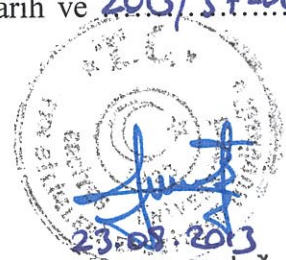
Danışman : Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

Üye : Prof. Dr. Nilgün ÖZPOZAN

Üye : Doç. Dr. Kemal SARIOĞLU

**ONAY:**

Bu Tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun **23/8/2013** tarih ve **2013/37-04** sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

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

Çalışmalarımın bütün safhalarında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümünün bütün imkanlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yardımlarını benden esirgemeyen, doktora öğrencisi Sayın Ramazan KALIN, Sayın Arş. Gör. Zuhâl ALIM, Sayın Arş. Gör. Zeynep KÖKSAL başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi açıdan her türlü desteği benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve ilgisini ömür boyu hissettirmeye devam edecek olan Hakan YILMAZ'a,

Her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşlarım Ayşe ÇAKIR, Hacer Ülkü ERDEM'e,

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

Burcu SOMTÜRK

Kayseri, Haziran 2013

# PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE BİTKİSEL KAYNAKLARDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

**Burcu SOMTÜRK**

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2013**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

## ÖZET

Peroksidaz enziminin inhibitörü olan 4-aminobenzohidrazit molekülü tirozine kenetlendirilerek afinite jeli hazırlandı. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) bitkisinden peroksidaz (POD) enzimi Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta %2,9 verimle 120,6 kat saflaştırıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 470 nm’de ölçüldü. Enzim saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini belirlemek için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Molekül kütlesi kırmızı lahana peroksidaz için yaklaşık 69,3 kDa olarak bulundu. Enzim üzerinde yapılan kinetik çalışmalar neticesinde optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla 7, 0,1 M, 30°C, 5,5 olarak tespit edildi. Guaiakol substratı için saf enzimlerin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı ve kırmızı lahana için  $K_M$  0,048 mM ve  $V_{max}$  1,46 EÜ/mL olarak belirlendi. Ayrıca saf peroksidaz enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda incelendi. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü bitki peroksidazı için yarışmasız inhibisyon gösterdiği bulunmuştur ve kırmızı lahana için  $IC_{50}$  değeri 1,047 mM olarak  $K_i$  değeri ise  $0,0702 \pm 0,05$  mM olarak tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Afinite, peroksidaz, saflaştırma, karakterizasyon

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE  
ENZYME FROM VEGETABLE SOURCE BY AFFINITY  
CHROMATOGRAPHY**

**Burcu SOMTÜRK**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**M.Sc. Thesis, June 2013**

**Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR**

**ABSTRACT**

Affinity gel was prepared by coupling tyrosine to 4-aminobenzohydrazide molecule that is an inhibitor of the peroxidase enzyme. Peroxidase (POD) enzyme of red cabbage (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) plant was purified in a single step by using Sepharose-4B-L-tyrosine-4-aminobenzohydrazide affinity chromatography with 2,9% yield, 120,6-fold. Enzyme activity was measured spectrophotometrically at 470 nm. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed to check the enzyme purity and to determine molecular weight and a single band was observed. Molecular masses of weight of purified enzyme was found to be approximately 69.3 kDa. As a result of the kinetic studies of the enzyme; optimum pH, optimum ionic strength, the optimum temperature and stable pH were determined as 7, 0.1 M, 30°C, 5,5 respectively for red cabbage.  $K_M$  and  $V_{max}$  values were calculated for the purified enzyme using guaiacol as substrate and for red cabbage.  $K_M$  and  $V_{max}$  values were found as 0,048 mM and 1,46 EU/mL. Also, inhibitory effect of 4-aminobenzohydrazide inhibitor on purified peroxidase enzyme was examined *in vitro* conditions. 4-aminobenzohydrazide have shown noncompetitive inhibition for purified peroxidase enzyme of red cabbage,  $IC_{50}$  value was calculated as 1,047 mM and  $K_i$  value was calculated as  $0,0702 \pm 0,05$  mM.

**Keywords:** Affinity, peroxidase, purification, characterization

## İÇİNDEKİLER

### PEROKSİDAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE BİTKİSEL KAYNAKLARDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

	<u>Sayfa</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMA VE SİMGELER .....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xvi
<b>GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER

<b>1.1.Enzimler .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Enzim katalizli reaksiyonların hızını etkileyen faktörler .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1. Sıcaklık.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2. pH.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3. Enzim konsantrasyonu .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.4. Zaman .....</b>	<b>5</b>

1.2.5. Substrat konsantrasyonu .....	5
1.2.6. Ürün konsantrasyonu .....	6
1.2.7. Çeşitli iyonlar .....	6
1.2.8. Fiziksel faktörler .....	6
1.2.9. İnhibitör .....	7
1.3. Enzim kinetiği .....	7
1.4. Enzim inhibisyonu.....	9
1.4.1. Yarışmalı inhibisyon .....	11
1.4.2. Yarışmasız inhibisyon .....	11
1.4.3. Yarı yarışmalı inhibisyon .....	13
1.5. Enzim aktivite birimleri.....	14
1.6. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları .....	14
1.7. Afinite kromatografisi.....	16
1.8. Afinite kromatografisi prensibi ve en çok uygulandığı biyolojik sistemler .....	16
1.8.1 Afinite kromatografisi prensibi.....	16
1.8.1.1. Matriks.....	18
1.8.1.2. Ligand .....	18
1.8.1.3. Uzantı Kolu .....	18
1.8.1.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi .....	19
1.9. Peroksidaz enzimi .....	20

## 2. BÖLÜM

### GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24
2.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	24
2.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	25
2.4. Yöntemler .....	28
2.4.1. Protein tayini.....	28
2.4.1.1. Kalitatif protein tayini .....	28
2.4.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini .....	29
2.4.2. Peroksidaz aktivitesi tayini .....	29
2.5. Kırmızı lahana bitkisinden POD enziminin saflaştırılması çalışmaları .....	31
2.5.1. Kırmızı lahana homojenatının hazırlanması .....	31
2.5.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi .....	31
2.5.3. Afinite jelinin hazırlanması .....	35
2.5.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması .....	36
2.5.3.2. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirmesi: .....	36
2.5.4. Afinite kolonunun paketlenmesi .....	37
2.5.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu .....	38
2.5.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlen- mesi. ....	38
2.6. Kırmızı lahana ( <i>Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra</i> ) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin karakterizasyon çalışmaları .....	39
2.6.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları .....	39
2.6.2. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları .....	40
2.6.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları .....	40

2.6.4. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları .....	40
2.6.5. Guaiakol için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması .....	40
2.6.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar .....	41

### 3. BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik.....	42
3.2. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra</i> ) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması çalışma sonuçları.....	43
3.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları .....	43
3.2.2. POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları .....	44
3.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları .....	45
3.3. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra</i> ) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin karakterizasyon çalışmaları ile ilgili sonuçlar ...	47
3.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları .....	47
3.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları ..	48
3.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları .....	48
3.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları .....	49
3.3.5. Guaiakol substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları .....	50
3.3.6. Kullanılan inhibitörün $K_i$ ve $IC_{50}$ değerlerinin bulunması yönelik yapılan çalışma sonuçları .....	51

## 4. BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Tartışma ve Sonuç.....57

KAYNAKLAR.....65

**KISALTMA VE SİMGELER**

E: Enzim

S: Substrat

P: Ürün

ES: Enzim substrat kompleksi

EI: Enzim inhibitör kompleksi

ESI: Enzim inhibitör substrat kompleksi

PAGE: Poli akrilamid jel elektroforezi

POD: Peroksidaz

SDS: Sodyum dodesil sülfat

BSA: Bovine Serum Albumin

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler .....	17
Tablo 1.2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlandıkları jeller .....	20
Tablo 2.1. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki kuvvet içeriği .....	30
Tablo 3.1. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları.....	45
Tablo 3.2. Kırmızı lahanadan ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) saflaştırılan POD enzimi için SDS-PAGE ile molekül tayini sonuçları .....	47
Tablo 3.3. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enzimi için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi .....	50
Tablo 3.4. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	52
Tablo 3.5. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan $IC_{50}$ çalışmasında kullanılan deney prosedürü .....	52
Tablo 3.6. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) bitkisin-den saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan substrat konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge .....	54
Tablo 3.7. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) bitkisin-den saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü.....	55
Tablo 3.8. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enzimlerinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları .....	56

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi grafiği.....	6
Şekil 1.2. Enzim Kinetiği Mekanizması .....	7
Şekil 1.3. Michaelis- Menten grafiği .....	8
Şekil 1.4. Lineweaver-Burk grafiği .....	9
Şekil 1.5. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim).....	10
Şekil 1.6. Yarışmalı enzim inhibisyonu (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim)....	11
Şekil 1.7. Yarışmasız enzim inhibisyonu (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim)..	12
Şekil 1.8. Yarışmasız enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği.....	12
Şekil 1.9. Yarı yarışmalı enzim inhibisyonu (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim).....	13
Şekil 1.10. Yarı yarışmalı enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği .....	13
Şekil 1.11. Afinite kromatografisi prensibi.....	17
Şekil 1.12. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü.....	19
Şekil 2.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi.....	30
Şekil 2.2. Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri.....	32
Şekil 2.3. Seçici serotonin geri alım inhibitörleri.....	32
Şekil 2.4. Seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri.....	33
Şekil 2.5. Diğer Antidepresanlar .....	34
Şekil 2.6. Mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan inhibitörler.....	34
Şekil 2.7. Bilinen diğer organik moleküller .....	35
Şekil 2.8. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması .....	36
Şekil 2.9. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli.....	37
Şekil 3.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan stan-dart grafik (BSA: Bovine Serum Albumin).....	42
Şekil 3.2. Afinite kolonundan elde edilen elüatların 280nm'deki absorbans değerlerinin tüp sayısı ile değişimi .....	43
Şekil 3.3. Kırmızı lahana ( <i>Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra</i> ) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit afinite kolonundan elde edilen elüatların 470 nm deki Absorbans değerlerinin tüp sayısı ile değişimi.....	44

Şekil 3.4. 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	46
Şekil 3.5. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) dan saflaştırılan POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen Rf-log MK grafiği.....	46
Şekil 3.6. Kırmızı lahanadan ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) saflaştırılan POD enziminin aktivitesinin (EÜ/mL) pH ile değişimi.....	47
Şekil 3.7. Değişik konsantrasyonlardaki $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH:7,0) tampon çözeltileri kullanılarak kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-İyonik şiddet (M) grafiği.....	48
Şekil 3.8. Kırmızı lahanadan ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık ( $^{\circ}\text{C}$ ) grafiği.....	49
Şekil 3.9. Değişik pH'lardaki $\text{KH}_2\text{PO}_4$ tampon çözeltileri kullanılarak kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	50
Şekil 3.10. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enziminin guaiakol için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği .....	51
Şekil 3.11. Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) POD enziminin aktivitesinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile değişimi .....	53
Şekil 3.12. Kırmızı lahanadan ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> F. <i>Rubra</i> ) saflaştırılan POD enzimi üzerine uygulanan 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik.....	56

## GİRİŞ

Canlı sistemlerde meydana gelen olayların anlık olabilmesi, yürüyen mekanizmanın aksamaması ve işlevini olağan sürecinde yerine getirebilmesi için enzimler önemlidir. Bu işlemler metabolizma içerisinde biyolojik katalizörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesini genellikle yitirir. Bu yüzden protein enzimlerinin birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) yapısı katalitik aktivite için esastır.

Oksidoredüktazların bir üyesi olan Peroksidaz (E.C.1.11.1.7), bir heme proteindir ve hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) bir elektron akseptörü olarak kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizler.

Peroksidazlar (POD); mikroorganizma, bitki ve hayvan gibi organizmalarda geniş ölçüde yayılmıştır. POD özellikle hücre duvarında bulunur ve bitkilerin büyümesini ve gelişmesini kontrol eden önemli enzimlerden biridir.

Bitkisel peroksidazlar, birçok iyonik formları mevcut olan, canlı ortamında bitki büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden anahtar enzimlerden biridir. Aynı bitki kaynağı içinde bulunan birçok izoperoksidaz formunun moleküler kütlesi, optimal pH ve sıcaklık, izoelektrik nokta, substrat özgüllüğü, aminoasit ve şeker bileşimi ve ısı stabilitesi açısından önemli ölçüde farklılık gösterebilir. İşlevsel olarak, bu enzimler bir reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktaz gibi davranırlar ve burada  $H_2O_2$  akseptör (alıcı) olarak davranır ve diğer bir bileşik hidrojen atomlarının donörü (verici) olarak davranır.

Peroksidaz yüksek hassasiyetinden dolayı mikroanalitik ve klinik tanı için önemli bir ayırıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten, ilaç, kimya ve gıda sanayinde peroksidaz için yeni uygulamalar önerilmektedir. Ticari olarak peroksidazlar, alkaloid üretimi, biyosensör yapımı, hava kirliliği ve hasar kontrolü, gıda üretimi, gıda depolama, organik bileşiklerin biyotransformasyonu, fenoller ve aromatik aminler içeren endüstriyel atık sularının arıtılması, oksidanların üretimi, yakıtlarda lignin parçalama, biyo-bozulma işlemi, araştırma ve tıbbi teşhis için ikincil antikoların üretimi, dimerik alkaloidlerin üretimi, birçok dondurulmuş meyve kalitesinin bozulmasının önlenmesi, organik bileşiklerin biyodönüşümleri, hazır yiyeceklerin bozulmasının önlenmesi amacı ile kullanılmaktadır. Aynı zamanda, peroksidaz enziminin saflaştırılması ile ilgili birçok kromatografik yöntem olmasına rağmen enzimlerin saflaştırılmasında çok önemli bir yöntem olan afinite kromatografisi ile ilgili literatürde çok detaylı saflaştırma prosedürü yoktur. Bu amaçla endüstriyel, analitik, biyomedikal, mikro analitik ve klinik tanıda büyük öneme sahip olan peroksidaz enziminin, kırmızı lahana bitkisinden saflaştırılması amaçlanmıştır.

Sunulan tez çalışmasında; kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) bitkisinden peroksidaz (POD) enzimi Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta %2,9 verimle 120,6 kat saflaştırıldı. Molekül kütlesi kırmızı lahana peroksidaz için yaklaşık 69,3 kDa olarak bulundu. Saflaştırılan peroksidaz enzimi üzerinde yapılan kinetik çalışmalar neticesinde optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla 7, 0,1 M, 30°C, 5,5 olarak tespit edildi, ve  $K_M$  0,048 mM,  $V_{max}$  1,46 EÜ/mL olarak belirlendi. Kırmızı lahana için  $IC_{50}$  değeri 1,047 mM,  $K_i$  değeri ise 0,0702±0,05 mM olarak tespit edildi.

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER

#### 1.1.Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki reaksiyonları hiçbir yan ürün oluşturmadan %100' lük bir ürün verimi sağlayarak katalizleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler protein yapısında olduklarından primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuaterner (dördüncül) yapılarını korumaları aktiflikleri açısından oldukça önemlidir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir [1, 2].

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını sadece protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları ise protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duymaktadırlar. Kofaktör metal iyonu olabileceği gibi koenzim adı verilen kompleks bir bileşik de olabilir [1- 3].

Bu bakımdan enzimler yapılarına göre, basit enzimler ve bileşik enzimler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Basit enzimler, sadece proteinden meydana gelir. Bunlara en iyi örnek sindirim enzimleri (pepsin, tripsin, gibi enzimler) ve üreyi parçalayan üreaz enzimidir. Reaksiyon, direk olarak protein kısmı tarafından yürütülür.

Bileşik enzimler ise, iki kısımdan meydana gelir:

Protein + Vitaminler

Protein + Mineral maddeler veya metal iyonları

Bu enzimlerin protein kısmına apoenzim, vitamin kısmına koenzim denilmektedir. Metal iyonları ve mineral maddeler gibi kısımlarına ise enzim aktivatörleri denir. Katalitik olarak aktif olan enzim kofaktör kompleksine haloenzim adı verilir. Apoenzim katalitik olarak inaktiftir [5].

Aktif merkeze bağlanan ve enzimin dönüşüme uğrattığı molekül substrat olarak adlandırılır. Aktif merkez yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asit bakiyeleri oluşturulmuştur. Enzimler, oldukça spesifiklerdir. Her substrat veya substrat grubunun spesifik bir enzimi vardır. Enzimler substratlarına göre daha büyük moleküllerdir. Reaksiyonun gerçekleştiği yer ise küçük bir bölgedir [4]. Yapısı aydınlatılmış enzimlerin hepsinde aktif merkezin küçük bir oyuk, girinti veya cep şeklinde olduğu bilinmektedir.

Substratın enzime bağlanması ile ilgili iki model vardır;

1- Anahtar kilit modeli

Substratlar, enzimlerde aktif bölge adı verilen özel bir bölgeye bağlanmaktadır. Bu durumda enzim-substrat kompleksi oluşmaktadır.

2-İndüklenmiş uyum modeli

Enzimin aktif bölgesi substrat bağlanmasına uygun olsa da, bağlanma sırasında, hem enzim konformasyonu, hem de substratın şekli biraz değişikliğe uğrayarak aktif kompleksi oluşturmaktadır [5].

## **1.2. Enzim katalizli reaksiyonların hızını etkileyen faktörler**

### **1.2.1. Sıcaklık**

Enzim katalizli reaksiyonların hızı sıcaklık ile artar. Fakat belirli bir sıcaklığa ulaştıktan sonra azalmaya başlar. Bazı enzimler (termofilik bakterilerden izole edilen enzimler) 100°C sıcaklığa kadar kısa süreli dayanabilirler. Ancak, enzimlerin çoğu 40–60°C gibi sıcaklıklarda denatüre olabilmektedirler. Bu nedenle canlı dokulardan ekstrakte edilen

enzimlerin soğuk oda, buzdolabı, derin dondurucu gibi yerlerde saklanması gerekmektedir. Sıcaklık artışı belirli bir yere kadar aktiviteyi artırmaktadır, sonrasında ise aktivitede düşüş başlar. Bunun nedeni ise, enzimin denatürasyonundan kaynaklanmaktadır. Aktivitenin maksimum olduğu sıcaklığa optimum sıcaklık denilmektedir [6].

### **1.2.2. pH**

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'sı denilmektedir. Optimum pH'nın her iki yanındaki pH değerlerinde aktivite kaybı olmaktadır ve bunun nedeni ise pH değişimine bağlı olarak enzimin veya substratın taşıdığı yüklü grupların iyonizasyonun ve bunun sonucunda enzimin üç boyutlu yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır [1].

### **1.2.3. Enzim konsantrasyonu**

Enzim katalizli reaksiyon hızı, enzimin substratına doymuş olduğu şartlarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterir. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar fazla ise reaksiyon daha hızlı yürür. Substratın oldukça fazla olduğu bir ortamda ve optimal şartlarda enzimatik reaksiyonun ölçülen ilk hızı ( $V_0$ ), enzim konsantrasyonu  $[E]$  ile doğru orantılı olarak artar [1].

### **1.2.4. Zaman**

Enzim katalizli reaksiyonların hızı zamanla azalır.

Bunun nedenleri arasında,

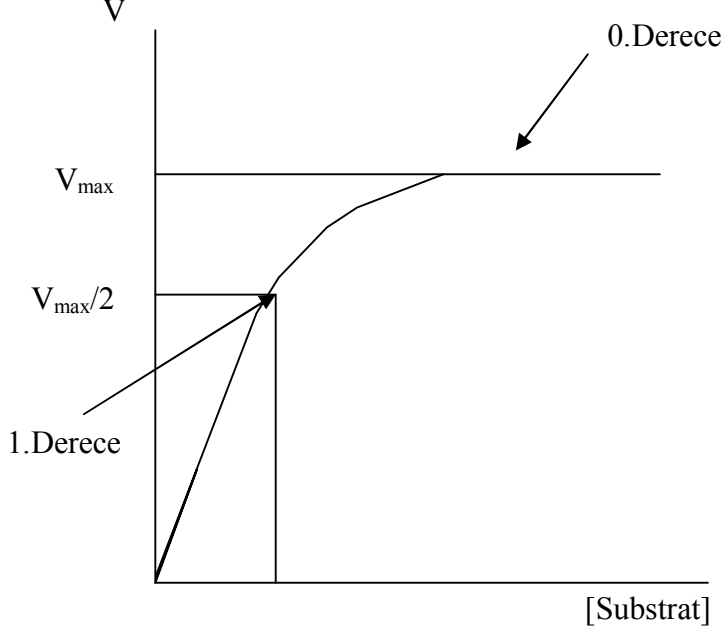
- Enzimin zamanla inaktive olması
- Reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu ve substratın tükenmesidir.

Aynı zamanda enzimatik reaksiyonda yer alan bileşenlerin miktarları da zamana bağlı olarak değişebilir [1].

### **1.2.5. Substrat konsantrasyonu**

Enzim konsantrasyonunun ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla doğrusal bir artış gösterir,

daha sonra substrat ilavesine devam edildikçe hız giderek daha az bir artış göstermektedir ve belirli bir süre sonra ise  $V_{max}$  düzeyinde sabit kalır.



Şekil 1.1. Reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimi grafiği

### 1.2.6. Ürün konsantrasyonu

Enzim katalizli reaksiyonların dönüşümlü olmasından dolayı zamanla ürünlerin birleşerek reaktantlara dönüşümü söz konusudur. Bu da enzim katalizli reaksiyonların başlangıç hızını değiştirmektedir.

### 1.2.7. Çeşitli iyonlar

Kofaktör gerektiren enzimler üzerinde metal iyonunun varlığı ya da yokluğu ve aynı zamanda konsantrasyonu oldukça etkili bir faktördür.

### 1.2.8. Fiziksel faktörler

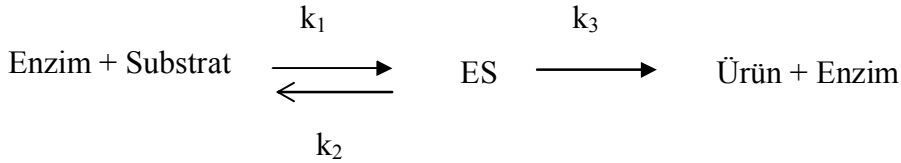
Fiziksel faktörlerin başında, ışık ve radyasyon gelmektedir. Işığın enzimler üzerindeki etkisi değişiklik göstermektedir. Örneğin, kırmızı ve mavi ışık tükürük amilazın aktivitesinde artışa neden olurken, UV ışınlarının ise aktiviteyi azalttığı görülmektedir.

### 1.2.9. İnhibitör

İnhibitörler, enzim katalizli reaksiyonların hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, enzimin aktif merkezine bağlanarak, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler. Bu nedenle ortamda inhibitör varlığı enzim katalizli reaksiyonun hızını azaltır [5]. Bununla ilgili farklı mekanizmalar vardır. Etki mekanizması ayrıntılı olarak inhibisyon başlığı altında anlatılacaktır.

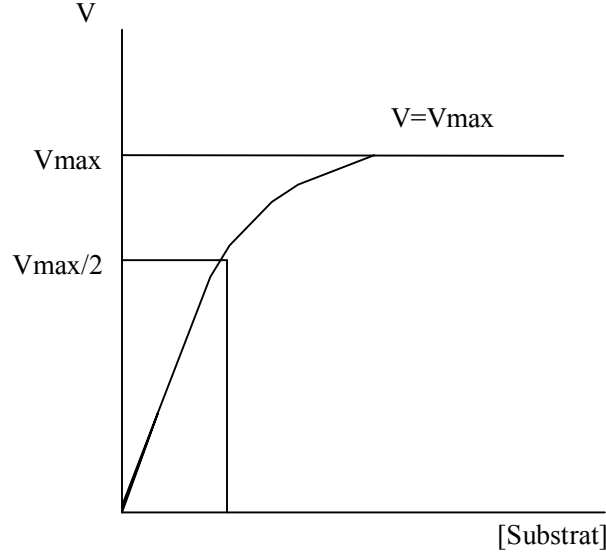
### 1.3. Enzim kinetiği

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken öncelikle bir “Enzim-Substrat kompleksi” oluşturmaktadır, sonra bu kompleks ürün ve enzime dönüşmektedir. Enzim kinetiği mekanizması Şekil 1.2’ de gösterilmektedir [6].



Şekil 1.2. Enzim Kinetiği Mekanizması

Burada ES kompleksi, serbest enzim ve serbest substrat’ dan  $k_1$  hızı ile oluşur. ES’ nin ayrışması ise  $k_2$  hızındaki geri reaksiyonla ve  $k_3$  hızı ile serbest ürün ve serbest enzime ayrışması ile olmaktadır. Enzim reaksiyonları üzerinde kinetik çalışmalar ilk olarak 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre, başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenmiştir. Sonuç olarak, hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Michaelis- Menten grafiği

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır.

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

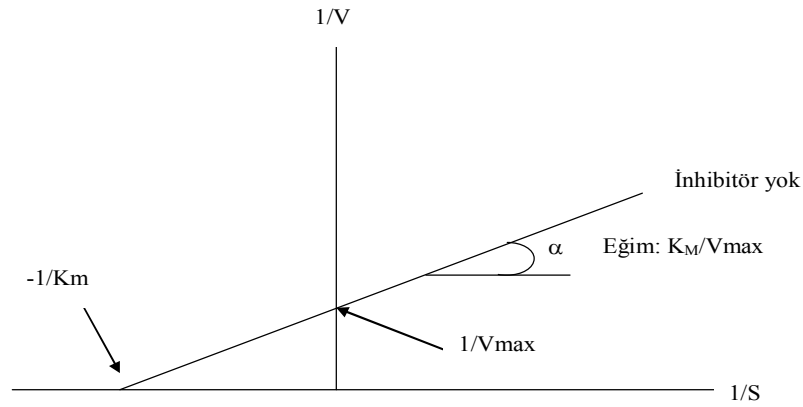
Burada  $V_{\max}$  y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilmektedir.  $K_M$  (Michaelis-Menten sabiti), maksimum hızın yarısına ( $V_{\max} / 2$ ) karşılık gelen substrat derişimidir.  $V_{\max}$  ve  $K_M$ , enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiğinin birinci bölgesinde  $[S] \ll K_M$  olduğundan grafik doğrusaldır. İkinci bölgede ise büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamamaktadır, reaksiyon karışık dereceden yürümektedir. Üçüncü bölgede  $[S] \gg K_M$  dir, bu nedenle  $V = V_{\max}$  olur ve reaksiyon sabit hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edilmektedir. Ancak, uygulamalarda kolaylık sağlanması amacı ile bir doğru denklemine dönüştürülmesi gerekir. Bunun için eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek doğru denklemine dönüştürülür. En çok kullanılanı ise Lineweaver-Burk denklemdir.

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

Bu denkleme göre ordinatta  $1 / V_{\max}$ , apsiste  $1 / [S]$  değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise  $K_M / V_{\max}$ 'dır (Şekil 1.4) [7].



Şekil 1.4. Lineweaver-Burk grafiği

#### 1.4. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin aktivitelerini azaltan ya da tamamen durduran maddelere inhibitör denir. Bazı ilaçlar ve bir kısım kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkilerine engel olurlar.

İnhibisyon, bazı bileşikler tarafından enzimlerin *in vivo* yada *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması veya tamamen durdurulmasıdır.

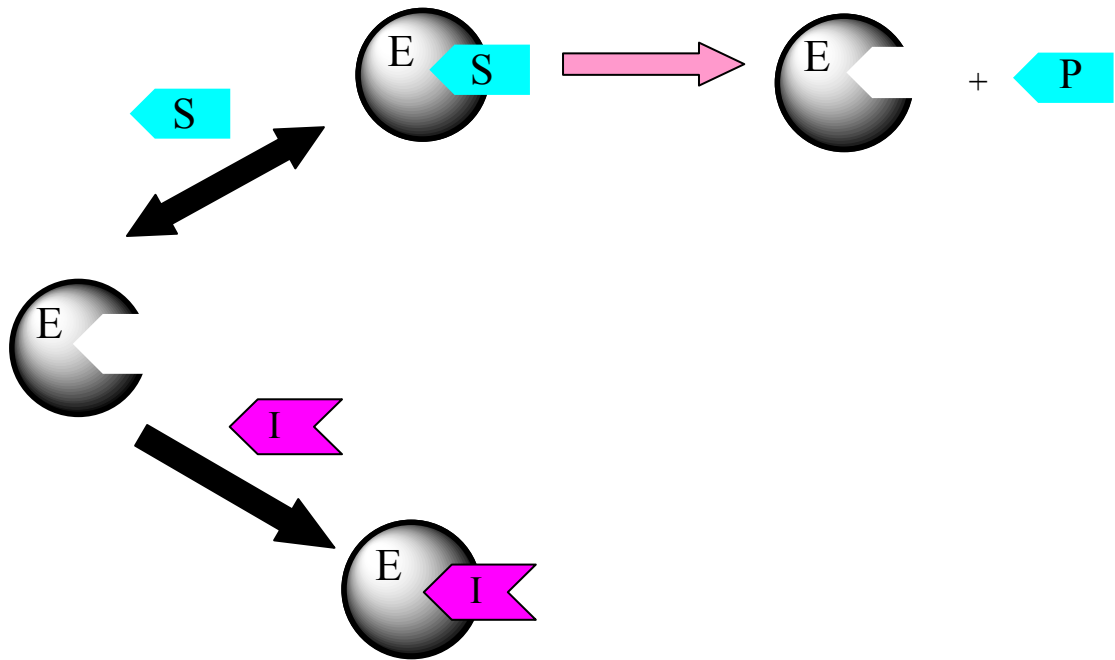
Enzim inhibitörleri ile enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir [8]. Eğer inhibisyon geri dönüşümlü ise inhibitör enzime nonkovalent olarak bağlanmıştır. İnhibisyon geri dönmüyor ise geri dönüşümsüz inhibisyonudur [9].

İnhibitörler, hem enzim etki mekanizmaların da hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar açısından önemli bir yere sahiptir [1, 2].

İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır [10].

Enzimatik inhibisyon iki ana gruba ayrılır. Bunlar;

**1. Dönüşümsüz inhibisyon:** İnhibitörün enzime kovalent olarak bağlanması ile meydana gelen inhibisyon türüdür. Dönüşümsüz inhibisyonda enzimlerin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenmektedir. Dönüşümsüz inhibisyon da  $V_{max}$  azalırken,  $K_M$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişime uğramamaktadır [1, 11]. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi Şekil 1.5' de verilmiştir.



Şekil 1.5. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim)

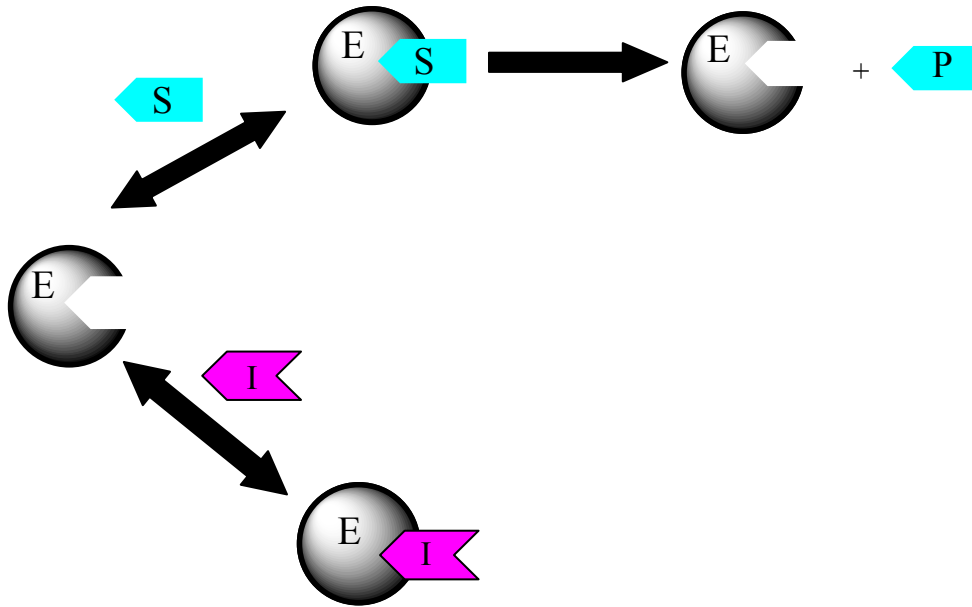
**2. Dönüşümlü inhibisyon:** Enzim ile inhibitör etkileşmesinin bir denge reaksiyonu oluşturduğu dönüşümlü inhibisyon türü dönüşümsüz inhibisyonun tersidir.

Dönüşümlü inhibisyon 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

- Yarışmalı inhibisyon
- Yarışmasız inhibisyon
- Yarı yarışmalı inhibisyon

### 1.4.1. Yarışmalı inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyon türleri içerisinde inhibisyonun en basit olanı yarışmalı inhibisyonudur [14]. Dönüşümlü enzim inhibisyonunda, inhibitör, enzimin aktif yeri için substrat ile yarışmaktadır. Bu inhibisyon türünde, yapı itibariyle inhibitör substrata benzemekte ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını önlemektedir. Yarışmalı enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır;  $K_M$  değeri büyür [1, 11, 12]. Yarışmalı inhibisyon Şekil 1.6' da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Yarışmalı enzim inhibisyonu (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim)

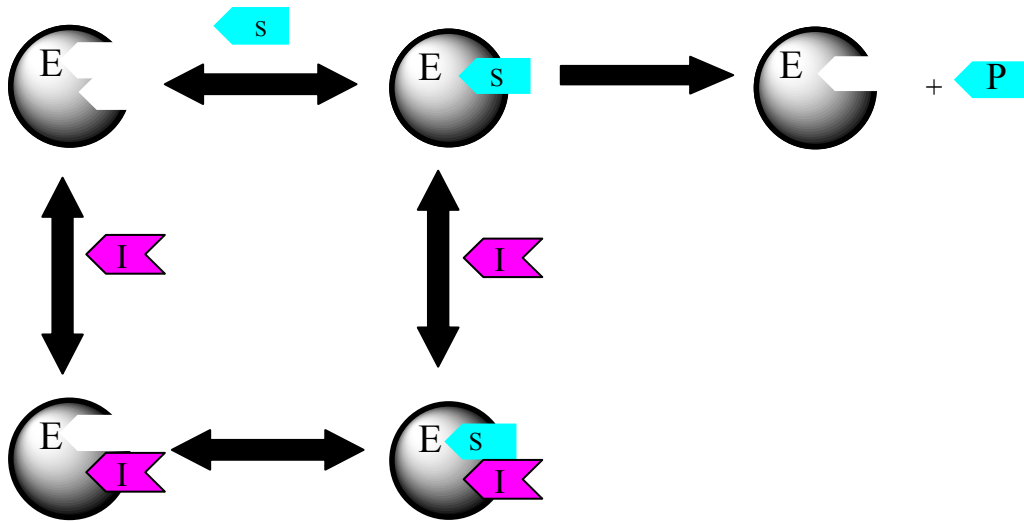
Yarışmalı enzim inhibisyonunda inhibitör enzime tersinir olarak bağlandığından yarışma, basit olarak daha fazla substrat ekleyerek substrat lehine çevrilebilir. Yeterli substrat varsa bir yarışmalı inhibitörün enzime bağlanma olasılığı oldukça azdır. Bu durumda reaksiyon az çok normal bir  $V_{max}$  değeri gösterir, fakat yarışmalı inhibitörün varlığında, yarı maksimal hızın gözlendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan  $K_M$  değeri artar.

### 1.4.2. Yarışmasız inhibisyon

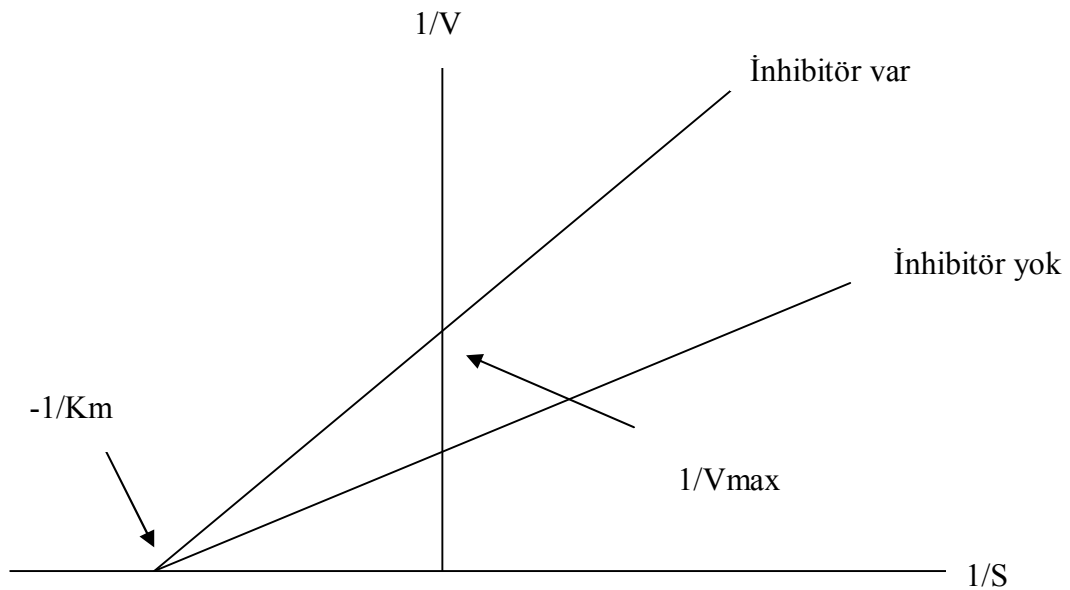
Yarışmasız inhibisyonunda inhibitör ve substrat arasında yarışma olmamaktadır, inhibitör ve substrat aynı anda enzime bağlanabilmektedir.

Bu durumda bağlanma enzimin aynı bölgesinde olmamaktadır. İnhibitör ve substrat farklı bölgelere bağlandığından dolayı enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelmektedir.

Bu nedenle, substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon ortadan kalkmamaktadır. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken  $K_M$  değeri sabit kalmaktadır. Yarışmasız inhibisyon Şekil 1.7' de gösterilmiştir.



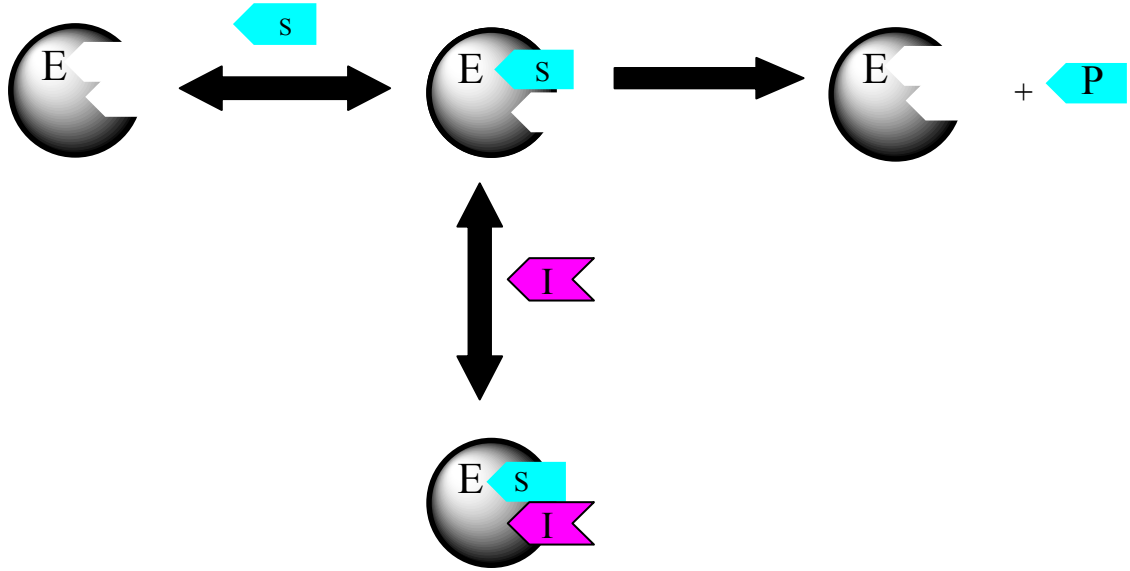
Şekil 1.7. Yarışmasız enzim inhibisyonu (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim)



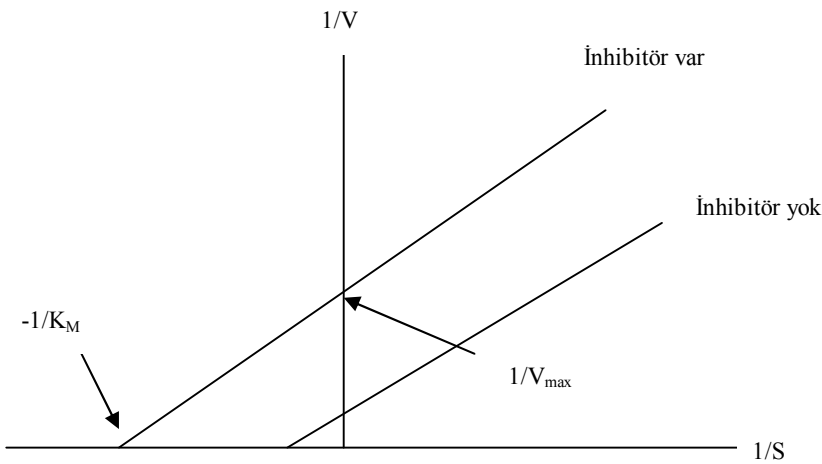
Şekil 1.8. Yarışmasız enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

### 1.4.3. Yarı yarışmalı inhibisyon

Yarı yarışmalı inhibisyon türünde inhibitör serbest enzime bağlanmaz. Sadece ES kompleksine bağlanabilmektedir. Bu yüzden tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyon türüne daha az rastlanırken, iki substratlı reaksiyonlarda yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durumda inhibitörler var olduğu sürece ortamdaki sürekli olarak ES kompleksi uzaklaşmaktadır ve bunun sonucunda  $K_M$  azalır. Ayrıca bu ortamda ESI kompleksi sürekli var olduğundan  $V_{max}$  değeri de düşmektedir. Yarı yarışmalı inhibisyon Şekil 1.9’ da gösterilmiştir [1].



Şekil 1.9. Yarı yarışmalı enzim inhibisyonu (S: Substrat, I: İnhibitör, P: Ürün, E: Enzim)



Şekil 1.10. Yarı yarışmalı enzim inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

### 1.5. Enzim aktivite birimleri

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda bulduklarından miktarlarının ölçümü çok zordur. Ancak aktiviteleri ölçülebilmektedir. Bir enzimin aktivitesi farklı şekillerde ifade edilebilir. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorpsiyon değışikliği bir birim olarak ifade edilebilmektedir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu uluslararası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir. Optimum şartlarda, bir ünite enzim, bir dakikada 1 µmol ürünün oluşumunu (veya 1 µmol substratın dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarıdır.

#### Spesifik aktivite

Bir enzimin aktivitesini tanımlamak için kullanılan aktivitedir. Bir enziminin spesifik aktivitesi, 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanır. Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir. Spesifik aktiviteden yola çıkarak enzim ünitesini miligram olarak tanımlamak da mümkündür.

ünite/spesifik aktivite ( ünite/mg) = miligram enzim

#### Katal

Uluslararası Biyokimya Birliği, Enzim Alt Komisyonu tarafından önerilmiş bir birim de katal (Kat)'dır. Optimum şartlarda 1 katal, 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

### 1.6. Enzimlerin adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları

Enzimler, önceleri dönüşüme uğrattıkları maddeler “substrat” adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, “az” eki getirilerek isimlendirilmiştir. Fakat zamanla daha farklı ve daha fazla enzimin keşfedilmesi ile sistematik bir isimlendirmeye ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle yeni keşfedilen enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yeni bir adlandırılmaya ve sınıflandırılmaya tabi

tutulmaktadır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır. Buna göre enzim sınıfları aşağıda verilmiştir [9].

- Oksidoredüktazlar
- Transferazlar
- Hidrolazlar
- Liyazlar
- İzomerazlar
- Ligazlar (Sentetazlar)

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme (elektron transferi) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen vericidir. Katalizledikleri reaksiyon tipine göre, dehidrogenazlar oksidazlar ve redüktazlar olarak adlandırılır. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidazlar olarak isimlendirilirler.

2. Transferazlar: Moleküller arası grup (metil, açıl, glikozil yada fosfat gibi) transferini katalizleyen enzimdir.

3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların ( C-C, C-O, C-N ve bazı diğer bağların) hidrolitik yıkımını katalizleyen enzimlerdir. Ayrıca suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizlerler.

4. Liyazlar: C-C, C-O ve C-N bağlarının eliminasyon yoluyla yıkımını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar bu grubun örnekleridir.

5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal olarak yeniden düzenlenmeyi (izomerik şekil oluşumu reaksiyonları) katalizleyen enzimlerdir. Katalizledikleri değişik izomerizasyon tipine göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, mutaz vb. gibi alt isimler alırlar.

6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların hidrolizi ile birlikte yürüyen karbon ve O, S, N arası bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Aminoasitleri aktive eden enzimler, açılCoA – sentetazlar bu grubun örnekleridir [9].

Uluslar arası enzim sınıflandırmasında her enzime 4 numara verilmektedir (C:1.2.3.4.). İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını göstermektedir.

### **1.7. Afinite kromatografisi**

Afinite kromatografisi, saflaştırılmak istenen molekülün matriks'e kovalent olarak immobilize olan liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir ve bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Çoğu zaman saflaştırma ve aktif metaryalin geri kazanılması oldukça yüksektir. Diğer tekniklerle saflaştırma işlemi çok basamak gerektirirken, afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırma yapılabilir. Yüksek seçiciliğinden dolayı ve birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden, afinite kromatografisi birçok amaç için kullanılır [13, 14]. Bunlar;

- a) Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için
- b) Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabii şekillerini ayırmak için
- c) Büyük miktarlardaki kirleticiyi, küçük miktardaki biyolojik metaryallerden ayırmak için

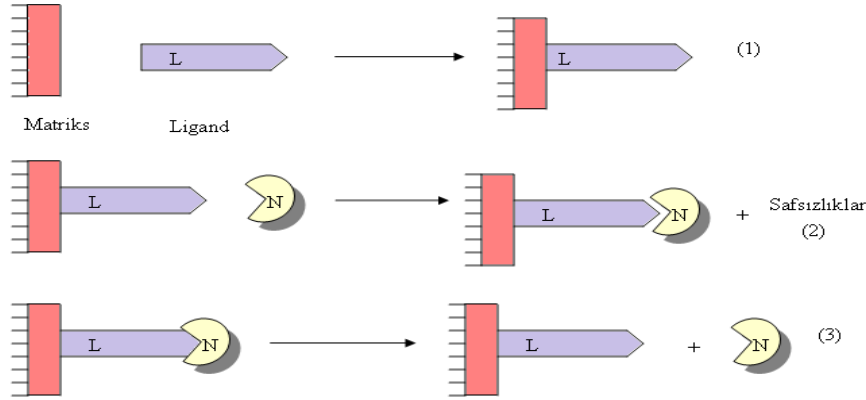
İlk olarak 1910 yılında amilazın, nişastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda afinite kromatografisi kullanılmıştır. Afinite kromatografisinin geçmiş denemelerdeki eksik yanları ortadan kaldırılmış ve hatta siyanojen brömür ile aktifleştirilmiş Sepharose jeli 1972 yılında Pharmacia Fine Chemicals tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda farklı fonksiyonel gryplar vasıtasıyla matrikslere immobilize olan bir seri ligand elde edilmiştir ve aynı zamanda birçok biyolojik maddeyi ayırabilecek spesifik adsorbanlar üretilmiştir [15].

### **1.8. Afinite kromatografisi prensibi ve uygulandığı biyolojik sistemler**

#### **1.8.1. Afinite kromatografisi prensibi**

Başarılı bir ayırım yapılabilmesi için biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligand gerekmektedir. Bunun içinde immobilize edilen ligandın ilgili madde (N) yani numune için spesifik bağlama afinitesi olması gerekir ve bağlanmayan materyalin yani

safsızlığın yikanmasından sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli adsorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması gerekmektedir. Afinite kromatografisinin prensibi Şekil 1.11’de gösterilmiştir:



Şekil 1.11. Afinite kromatografisi prensibi [13]

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

Şekil 1.11’da görüldüğü üzere (1)’de ligand matrikse kovalent bağlanır, (2)’de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup safsızlıklar akar ve (3)’de numune elüe edilir. Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Tablo 1.1’ de gösterilmiştir [16].

Tablo 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler [13]

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

### 1.8.1.1. Matriks

Matriks olarak afinite kromatografisinde Sephadex, Sepharose, Bio-jel gibi birçok jeller kullanılır. İnci şeklinde dizilmiş bir agaroz jel olan Sepharose içlerinde en çok kullanılanıdır. Bu jel, matriks için gerekli olan bütün şartlara sahiptir.

Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent olarak bağlanması için kolayca türevlendirilebilir. Sepharose 4B bunlar arasında en çok kullanılanıdır. Jel, oldukça yüksek spesifik adsorpsiyon göstermektedir. Bunun böyle olması afinite kromatografisinin gücünün spesifik etkileşmelerinden kaynaklanmaktadır. Jelin ince yapısı, çok iyi bir akış özelliği ve partiküller arasında minimum kanallama sağlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı da iyi bir ayırma mümkündür. Bazı durumlarda bu jel yerine, bu jelin bir başka türevi kullanılabilir. Sepharose üzerinde hazırlanan adsorbanlar, yüksek ve düşük pH, deterjanlar ve disosiyatörlü maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklıdır [17].

### 1.8.1.2. Ligand

Afinite kromatografisinde, katı destek materyaline “ligand” adı verilen özel bir molekül immobilize edilmektedir. Ligand saflaştırılmak istenen materyale karşı spesifik bir biyolojik ilgi duyar ve onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamaktadır.

Ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözeltilerde  $10^{-4}$ - $10^{-8}$ M arasında olması istenilen bir durumdur.  $10^{-4}$  M'dan daha büyük ayrışmaya sahip olan etkileşmeler, afinite kromatografisi için uygun değildir.  $10^{-8}$  M'dan daha küçük ayrışma sabitlerine sahip olan maddelerden meydana gelen afinite kromatografisinde ise, bağlı maddelerin inaktive edilmeden bağlanması için zor bir durumdur.

Çeşitli fonksiyonel gruplara sahip olan ligand, saflaştırılacak molekülle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır [18].

### 1.8.1.3. Uzantı Kolu

Afinite kromatografisinde saflaştırılması istenen molekülün liganda bağlanması konusunda önemli bir problem yaşanmaktadır. Çoğu zaman matriks ile saflaştırılacak

molekül arasında, sterik engellemelerden dolayı saflaştırılması istenen molekülün liganda bağlanması konusunda sorun yaşanabilir ve bunun sonucunda saflaştırma verimi azalabilir. Bundan dolayı, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına uzantı kolları sokulur. Bu durum özellikle enzim saflaştırmalarında önemlidir. Çünkü, spesifik bağlanmanın olacağı enzimlerin aktif bölgeleri genellikle molekülün iç kısımlarında bulunmaktadır. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü Şekil 1.12’de verilmiştir.



Şekil 1.12. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü. (1) uzantı kolu olmadığı zaman bağlanma zordur, (2) uzantı kolu bulunduğundan bağlanma kolayca olur. (L: Ligand, N: Numune) [13]

İşlevin yerine getirebilmesi için uzantı kolunun uzunluğu oldukça önemlidir. Uzantı kolu çok kısa ise, kol etkisiz olmaktadır ve bu durumda ligand numuneye bağlı olan maddeye tutunamamaktadır. Uzantı kolu çok uzun ise, spesifik olmayan etkiler fazla olur ve bu durumda ayırmanın seçiliği azalmaktadır. Bazı çalışmalar, çok uzun uzantı kollarının numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını göstermiştir ve hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisinde istenilen bir durum değildir [19].

#### 1.8.1.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi

Ligandı bağlayacak jelin seçiminde, ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi ve saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilmesi gerekir. Örneğin, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları vasıtasıyla bağlanabilir ve bu durumda inhibitörün enzim ile spesifik bağlanma aktivitesi korunmuş olmaktadır. Ligandlardaki bağlanma bölgelerinin yeri hakkında önceden bilgi bulunmadığı zamanlarda ise deneme yanılma yönteminin yapılması gerekir. Ligandı immobilize etmek için çoğunlukla kullanılan gruplar ve ligandların bağlanabileceği jeller Tablo 1.2’de verilmiştir [20].

Tablo1.2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlandıkları jeller  
[13]

Ligand	Fonksiyonel grup	Bağlanacak Jel
Protein peptid aminoasit	Amino	CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		CH- Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH- Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Karboksil	AH- Sepharose 4B
	Tiyol	Tiyopropil- Sepharose 6B
		Aktifleştirilmiş tiyol sepharose
Epoksi aktif- Sepharose 6B		
Şeker	Hidroksil	Epoksi aktif- Sepharose 6B
	Amino	CH- Sepharose 4B
		Aktif. CH- CH- Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
Karboksil	AH- Sepharose 4B	
Polinükleotit	Amino	CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		Tiyopropil- Sepharose 6B
Koenzim, kofaktör Antibiyotik, steroid vs.	Amino, karboksil, tiyol veya hidroksil	Uzantı kolu jel kullanılarak

### 1.9. Peroksidaz Enzimi

Antioksidan enzimler ve endojen antioksidanların her ikisinde de oksidasyonu önleme mekanizması aynıdır [21]. Bu her iki tür mekanizmada da hücre hasarlarına sebep olan serbest radikaller giderilerek oksidatif hasarları engellenmektedir. Süperoksitdizmutaz, peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler, bitki dokularında oksi-radikal detoksifikasyon prosesinde büyük öneme sahiptirler [22]. Antioksidan enzimlerin aynı zamanda serbest oksijen radikallerini gidererek biyolojik oksidatif hasarları engellediği bildirilmektedir. Başka bir deyişle biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türleri antioksidan bileşikler gibi enzimler tarafından da giderilmektedir [23].

Peroksidaz (POD) [E.C: 1.11.1.7], hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan  $H_2O_2$  bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır [24, 25].

Hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda,  $H_2O_2$ 'ten başka bir substrata ihtiyaç duymayan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer kompartımanlarında aktivitesini göstermek için  $H_2O_2$ 'ten başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir [26].

POD, hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrogenasyonunu da katalizler [27, 28].

Canlılarda görev yapan farklı peroksidaz enzimleri vardır. Peroksidaz enzimlerinin en önemlilerinden biri olan glutatyon peroksidazın önceleri sadece hayvanlarda yaygın olarak bulunduğu kabul edilirken [29], yakın dönemlerde yapılan çalışmalar bitkilerde de  $H_2O_2$  giderilmesi için glutatyon peroksidazın görev yaptığını göstermiştir [30].

Diğer bir peroksidaz türü olan askorbat peroksidaz izoenzimleri birçok farklı bitkide bulunmuştur. Aynı anda bitki hücresinin farklı kompartımanlarında lokalize olmuş durumdadır. Örneğin kloroplastlarda [31, 32] ve sitozolde [33- 35] askorbat peroksidaz izoenzimleri tespit edilmiştir. Bu enzimler indirgeme substratı olarak özellikle askorbat kullanır ve askorbat-glutatyon olarak bilinen reaksiyon döngüsüne katılırlar. Döngü enzimler tarafından askorbatın indirgenmiş formunun yeniden oluşturulması ile tamamlanır [36]. Dalton ve arkadaşları benzer çalışmalarını bezelye yapraklarında gerçekleştirmişlerdir [37].

Peroksidaz enziminin bitkilerde hormonal faaliyet [38], savunma mekanizmaları [39], sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması [40] ve lignin biyosentezi [41] gibi hayati fonksiyonlarda rol aldığı bildirilmiştir.

Peroksidazlar doğada yaygındır ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir ki bu fonksiyonlar;  $H_2O_2$  nin giderilmesi, hücre duvarlarında ligninin parçalanması [42] ve biyosentezi, oksin metabolizması ve yara iyileşmesi için savunma [43] ve patojen ya da böceklere karşı savunma [44] gibi fonksiyonlardır.

Peroksidazlar mikroorganizma, bitki ve hayvan gibi organizmalarda geniş ölçüde yayılmıştır. POD özellikle hücre duvarında bulunur [45] ve bitkilerin büyümesini ve gelişmesini kontrol eden önemli enzimlerin biridir.

Peroksidaz, hücre duvarlarının lignifikasyon [46], suberizasyon [47], oksin oksidasyon [48], yaşlanması [49], organogenez [50], fenol oksidasyonu [51], hücre duvarı proteinlerinin çapraz bağlanması [52], tuz stres toleransı [53] ve doku hasarı ve patojenik mikroorganizmalardan gelen enfeksiyonlardan korunma [54-56] da dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerinde yer alır.

POD yüksek hassasiyetinden dolayı mikroanalitik ve klinik tanı için de önemli bir ayıraç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, ilaç, kimya ve gıda sanayinde peroksidaz için yeni uygulamalar önerilmektedir [57].

Peroksidaz yaygın substrat özgüllüğüne sahiptir ve bu özellikler peroksidazı endüstriyel, analitik ve biyokimyasal uygulamalarda kullanışlı yapar. Peroksidazlar fenolik reçine sentezi için bir katalizör [58] ve tıbbi teşhis malzemeleri için ticari olarak kullanılır [59].

Ticari olarak peroksidazlar, alkaloid üretimi, biyosensör yapımı, hava kirliliği ve hasar kontrolü [60], gıda üretimi, gıda depolama, organik bileşiklerin biyotransformasyonu, fenoller ve aromatik aminler içeren endüstriyel atık sularının arıtılması [61], oksidanların üretimi, yakıtlarda lignin parçalama, biyo-bozulma işlemi, araştırma ve tıbbi teşhis için ikincil antikorların üretimi, dimerik alkaloidlerin üretimi, birçok dondurulmuş meyve kalitesinin bozulmasının önlenmesi, organik bileşiklerin Biyodönüşümleri, hazır yiyeceklerin bozulmasının önlenmesi [62] amacı ile kullanılmaktadır.

POD ve katalaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in enzimatik uzaklaştırılması için iki ana sistemdir ve hücre duvarlarının peroksidatif hasarı antioksidatif peroksidaz enzim sistemi tarafından kontrol edilmiştir [63]. Ancak çok sayıda katalizlediği reaksiyonlar ve önemli sayıdaki izoenzimik türler nedeni ile peroksidazın metabolizmada oynadığı rol açık değildir [64]. Bu nedenle, POD, klinik tanı için ve yüksek hassasiyet nedeniyle mikroanalitik immunoassay için yaygın şekilde kullanılır.

Tıbbi, kimyasal ve gıda sektörlerinde POD için yeni uygulamalar önerilmiştir [65]. Diğer uygulamalar, çeşitli aromatik bileşiklerin sentezi ve peroksidlerin gıda ve endüstriyel atıklarından kaldırılmasını içerir [66].

Peroksidazların fizyolojik rolü ile ilgili olarak enzim normal büyüme sırasında sekonder hücre duvardaki ligninlerin oluşumuna [67] ve bitkiler hastalandığında ya da yaralandığında lignin, suberin vb. gibi fenolik polimerlerin oluşumuna katılır [68,69].

Peroksidazların organik moleküllerin biyotransformasyonu için kullanıldığı bildirilmiştir [55, 70, 71]. Onun daha yüksek katalitik aktivitesinden dolayı, çok sayıdaki kimyasallar POD kullanılarak değiştirilebilir. Aynı zamanda çeşitli aromatik bileşiklerin sentezi, atık sudan fenollerin uzaklaştırılması ve gıda, içecek ve endüstriyel atıklardan peroksidlerin atılması gibi uygulamalar için kullanılabilir [72].

Peroksidaz enzimini saflaştırma çalışmaları 1960'lerden beri yapılmakta olup farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırılmıştır. İyon değişim, afinite, hidrofobik ve metal afinite kromatografisi bildiklerimizden birkaç tanesidir [73].

Peroksidaz, karalâhana [55], brokoli [69,74], bamyâ [75], tütün [76], arpa [77], lahanâ [78], pamuk [79], tatlı patates yumruları [80], bürüksel lahanâsı [81], domates [82,83], havuç [84], portakal [85], kavun [86], çay yaprakları [87] gibi birçok bitkiden farklı kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. Bu amaçla; endüstriyel, analitik, biyomedikal, mikro analitik ve klinik tanıda büyük öneme sahip olan peroksidaz enziminin maliyet açısından oldukça düşük ve zaman açısından diğer kromatografik yöntemlere göre daha kısa olan afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması amaçlanmıştır.

## 2. BÖLÜM

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktive edilmiş sepharose-4B, guaiakol, bovine serum albumin (BSA), amonyum sülfat, sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbası, sodyum karbonat, 4-aminobenzohidrazit, hidrojen peroksit, formaldehit, sodyum tiyosülfat, sodyum klorür, glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, brom timol mavisi, gliserol, tirozin, trihidroksimetilaminometan (Tris), etanol, metanol Sigma Chemical Company'den; sodyum sülfat, sodyum dodesilsülfat (SDS), sodyum perklorat, sodyum azotür, gümüş nitrat, hidroklorik asit, sülfirik asit, L-Tirozin, fosforik asit, izoproponal E. Merk AG'den; potasyum fosfat, sodyum hidroksit, triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den;  $\beta$ -merkaptoetanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den; kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) günlük olarak marketten temin edilmiştir.

#### 2.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıda verilen alet ve cihazlar kullanılmıştır.

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

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

### 2.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla çift destile su kullanılmıştır.

#### Afinite kolonunun hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH:10) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanıldı): 2,1 g NaHCO<sub>3</sub> 200 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH:10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 mL'ye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH: 8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanıldı): 0,84 g NaHCO<sub>3</sub> 80 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH: 8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.
3. 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH: 7,4) (4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkamasında kullanıldı): 1,211 g Tris 150 mL destile su içerisinde çözüldü. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

### **Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler**

0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7,0) (Sıvı azot parçalamasından sonra bitki dokularının içine alındığı tampon): 4,08277 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 7,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

### **Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler**

1. 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan tampon): 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 950 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 1 L tamamlandı.

2. 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,8) (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonuna homojenatın tatbikinden sonra kolonu yıkamada kullanılan tampon): 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  350 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 400 mL'ye tamamlandı.

3. 1M NaCl/25mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,8) (Peroksidaz enziminin kolondan elüe edilmesinde kullanılan tampon) 11,7 g NaCl ve 0,6805 g 180 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 6,8'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 200 mL'ye tamamlandı.

### **Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler**

1. 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,0) (Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH: 6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

2. 45 mM Guaiakol çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 498  $\mu\text{L}$  guaiakol alınarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3. 22,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): %30'luk 1,11 g/mL olan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 228  $\mu\text{L}$  alınarak destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

### **Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler**

Coomassie brillant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltili): 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiliye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltili karanlık ortamda muhafaza edildi.

### **Elektroforez için kullanılan çözeltiler**

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8,8) : 12,114 g Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH: 8,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH: 6,8) : 12,114 g Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:6,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözümlenerek elde edildi.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin, 450 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.
7. % 0,1'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 mL NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
8. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 mL, % 100'lük gliserinden 1 mL ve % 0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak saf suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µL numune tamponundan 50 mL olacak şekilde β-merkaptetanol ilave edildi.

### **Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler**

- 1. Tespit çözeltisi:** 60 mL saf su, 30 mL % 96'lik etanol, 10 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.
- 2. Redüksiyon Çözeltisi:** 4,8 g Sodyum asetat, 45 mL Etanol ve 80 mL saf su karıştırıldı, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 mL glutaraldehit eklenip saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
- 3. Boyama çözeltisi:** 100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su'da çözülüp üzerine 30 µL formaldehit eklendi.
- 4. Yıkama Çözeltisi 1:** 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su'da çözüldü ve üzerine 120 µL formaldehit ilave edildi.
- 5. Yıkama çözeltisi 2:** 1 mL gliserin ve 250 mL'lik % 5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

### **Deneylerde kullanılan inhibitör stok çözeltiler**

0,034 M 4-aminobenzohidrazit çözeltisi: 0,0712 g 4-aminobenzohidrazit tartılıp 14 mL suda çözüldü.

## **2.4. Yöntemler**

### **2.4.1. Protein tayini**

#### **2.4.1.1. Kalitatif protein tayini**

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır [88].

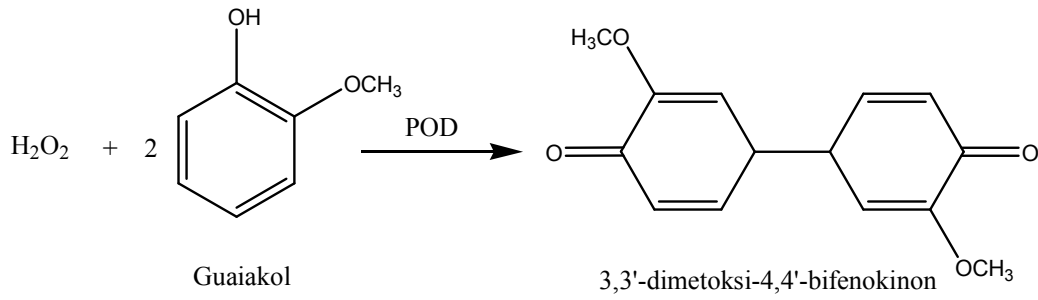
Kromatografi sonucunda elde edilen elüatlar kuvarz küvetlere alındı ve spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorblansları ölçüldü.

#### 2.4.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{max}=465$  nm) ve mavi ( $\lambda_{max}=595$  nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1- 100  $\mu$ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden bovine serum albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu$ L konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu$ g protein değerleri standart grafik haline getirildi. Sonra 595 nm’de absorbans değerleri okundu ve standart grafik çizilerek protein miktarları belirlendi [89].

#### 2.4.2. Peroksidaz aktivitesi tayini

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür,  $H_2O_2$  tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm’de izlenmesi esasına dayanır (Şekil 2.1) [90].



Şekil 2.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi [14]

Tablo 2.1. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki küvet içeriği

Kullanılan Çözeltiler	Kör (mL)	Numune (mL)
Aktivite Tamponu (0,1 M pH:6)	1,0	0,9
Guaiakol (45 mM)	1,0	1,0
Hidrojen Peroksit (22,5 mM)	1,0	1,0
Enzim	-	0,1

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

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

$D_r$  = Seyreltme katsayısı

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

Reaksiyon enzim çözeltisinin ilavesiyle başlatıldı ve 3 dakika süreyle her 1 dakikada bir olmak üzere oda sıcaklığında  $470 \text{ nm}$ 'de absorbans artışı spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edildi.

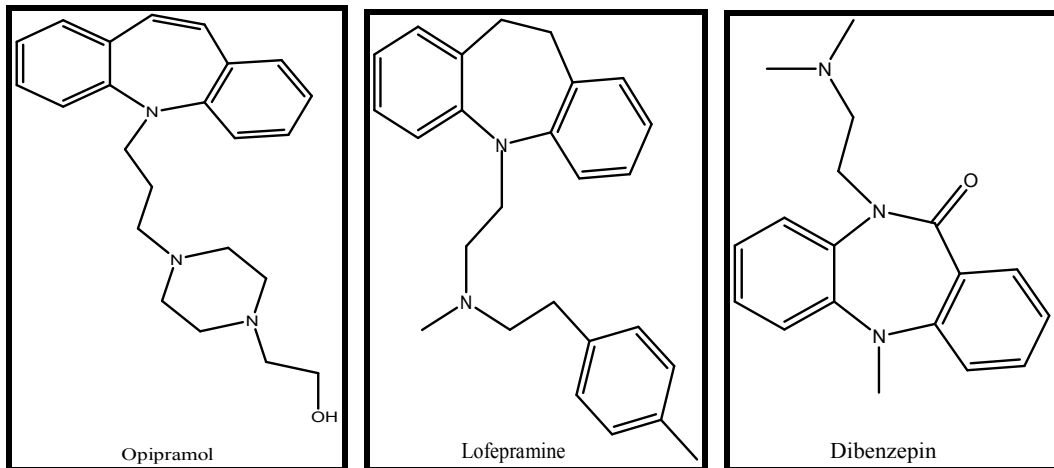
## 2.5. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması çalışmaları

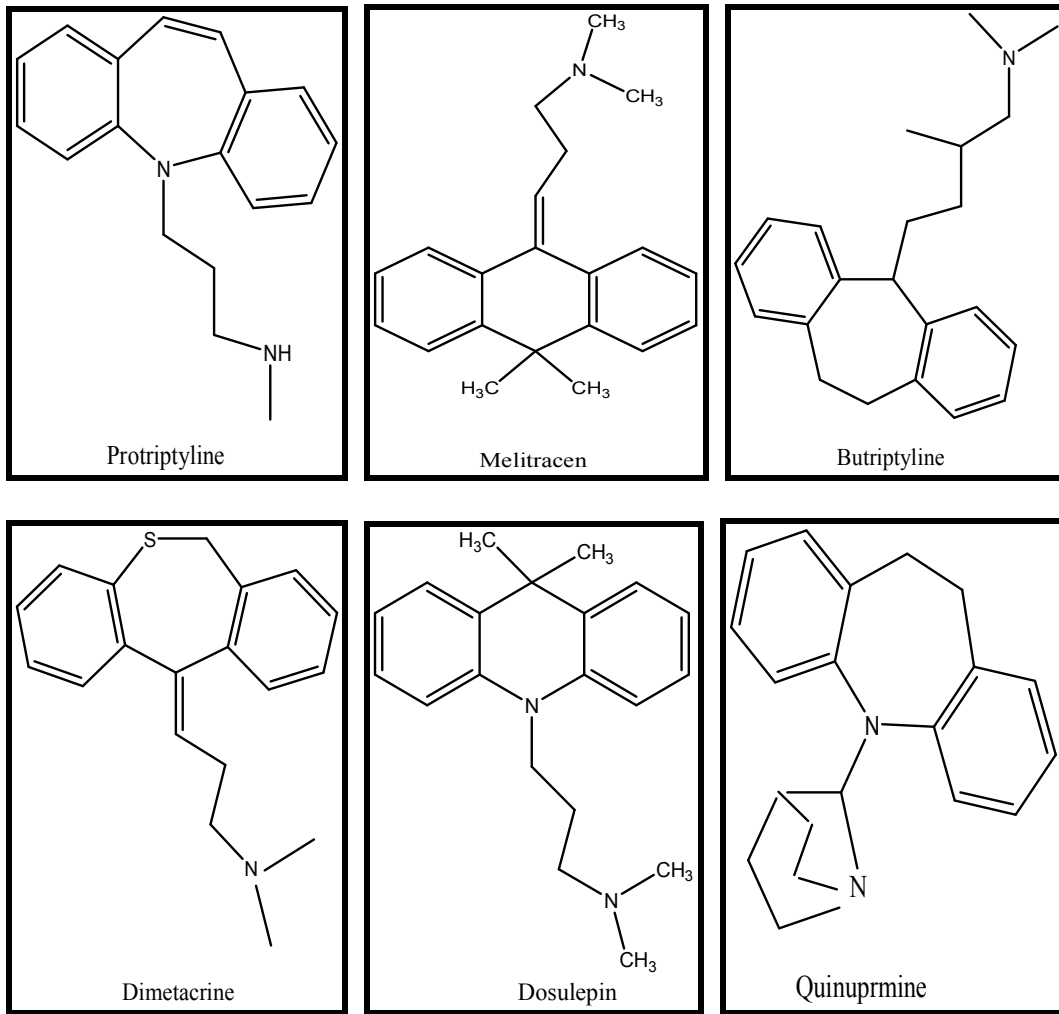
### 2.5.1. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) homojenatının hazırlanması

20 g taze kırmızı lahana tartıldı ve blender cihazı ile küçük parçalara bölündü. Parçalar sıvı azot ilave edilerek toz haline getirildi ve üzerine 0,3 M pH: 7,0 olan tampondan 50 mL ilave edilerek 1-2 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu karışım 2.400 rpm'de birkaç kez homojenizatörden geçirilerek bitki hücresinin parçalanması ve homojenize olması sağlandı. Homejenat süzüldü ve santrifüj tüplerine doldurularak 16.000 xg'de bir saat boyunca santrifüj edildi. Süpernatant çökelekten ayrıldı. Elde edilen süpernatant daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere + 4°C'de muhafaza edildi.

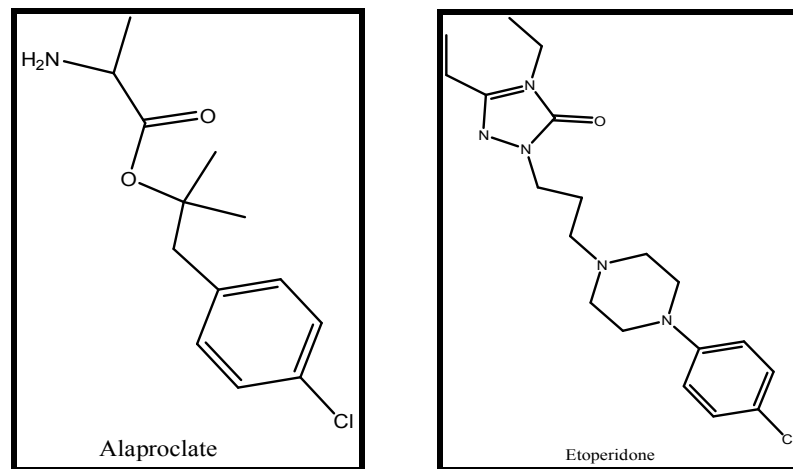
### 2.5.2. POD inhibitörleri ve ligand seçimi

Peroksidaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarından literatürdeki enzimin inhibitörleri tespit edildi [91- 93]. Literatürde bulunan inhibitörlerden faydalanarak POD'un afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında en uygun diazonyum tuzu oluşturabilecek ligandlar seçilerek afinite jellerinin hazırlanması yapıldı. POD'un bilinen inhibitörleri Şekil 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7'de verilmiştir.

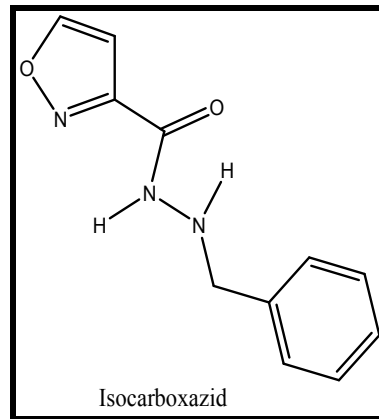
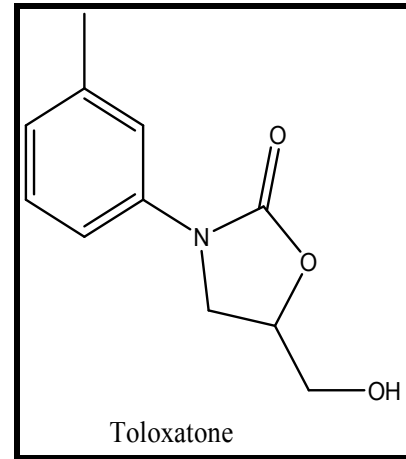
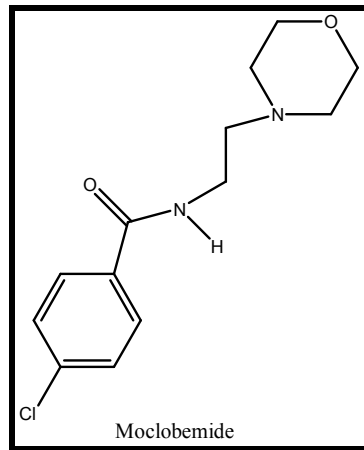




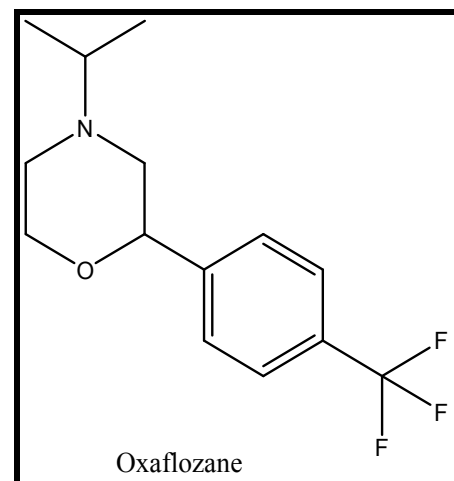
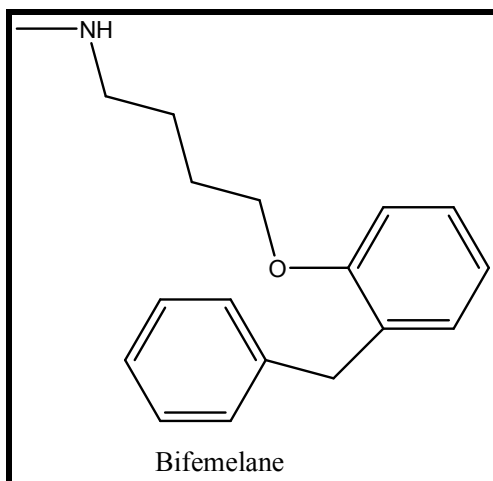
Şekil 2.2. Seçici olmayan monoamin geri alım inhibitörleri [14]

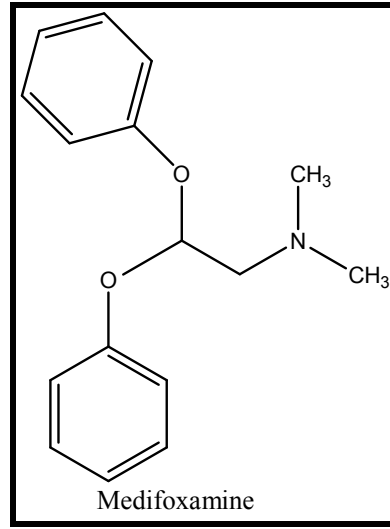


Şekil 2.3. Seçici serotonin geri alım inhibitörleri [14]

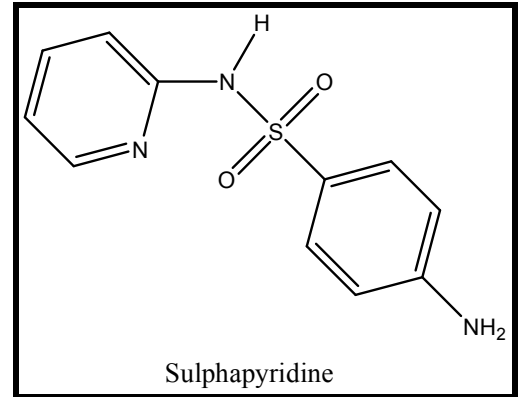
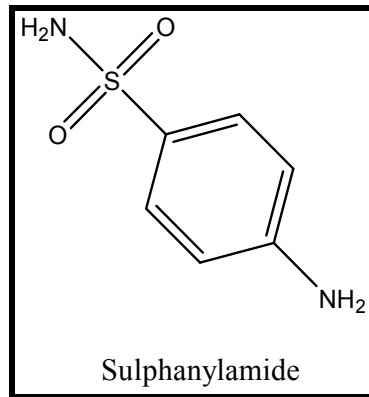


Şekil 2.4. Seçici olmayan monoamin oksidaz inhibitörleri [14]

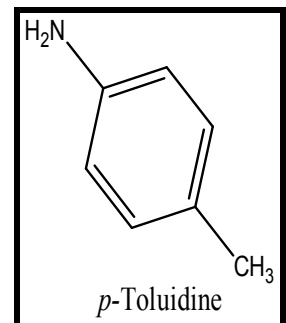
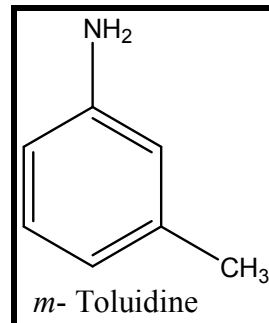
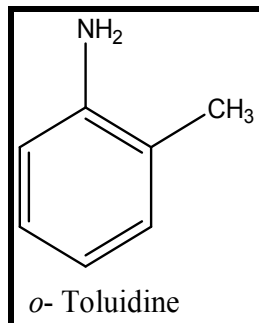
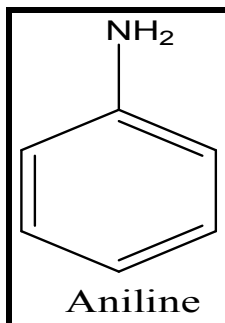


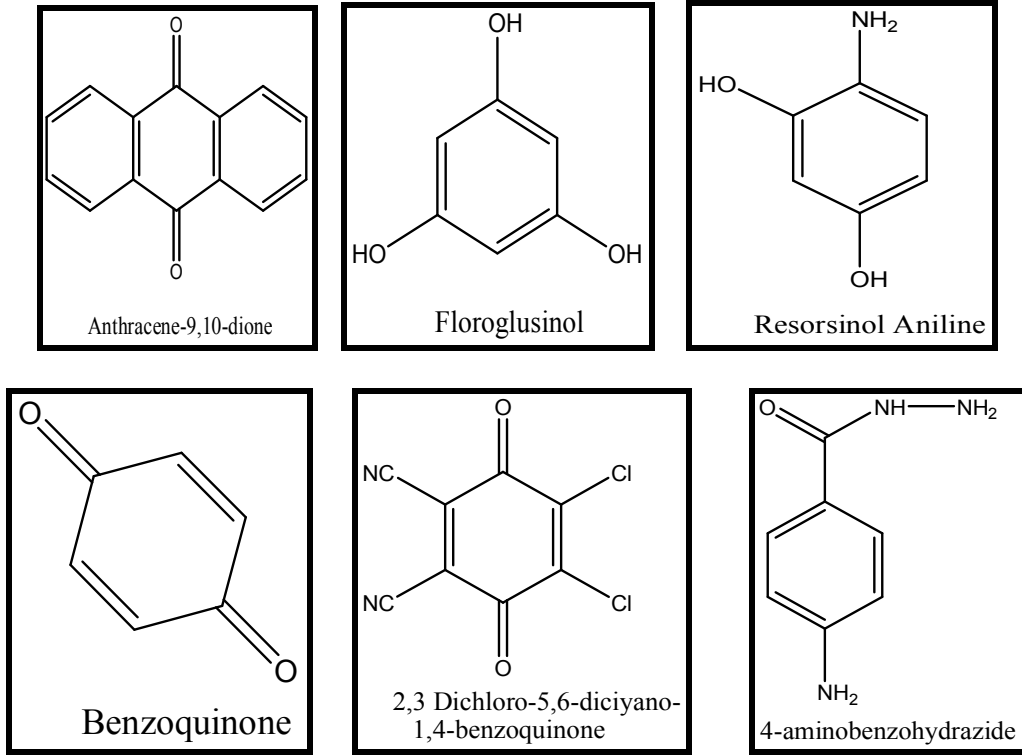


Şekil 2.5. Diğer antidepresanlar [14]



Şekil 2.6. Mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan inhibitörler [14]





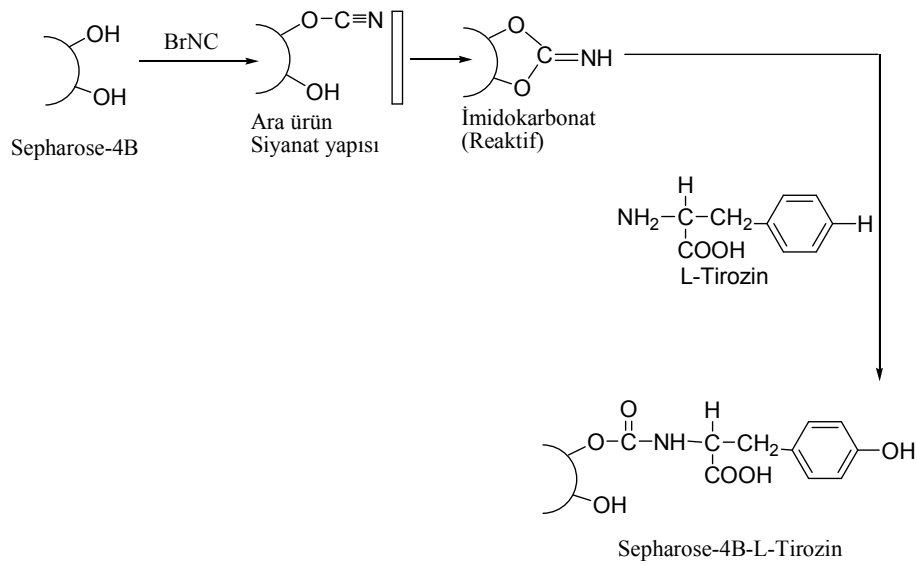
Şekil 2.7. Bilinen diğer organik moleküller [14]

Bilinen bu inhibitörlerden molekül yapıları tirozin uzantı kolu ile diazonyum tuzu oluşturabilecek olanlar sülfanilamit, sülfapiridin, o-toluidine, m-toluidine p-toluidine, anilin, benzokain ve 4-aminobenzohidrazit olduğu tespit edildi. Bu nedenlerden dolayı; tez çalışmasında 4-aminobenzohidrazit inhibitörü, POD enziminin saflaştırılmasında afinite kolon ligandı olarak seçildi.

### 2.5.3. Afinite jelinin hazırlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matrisine L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak bağlandı. Daha sonra 4-aminobenzohidrazitin tirozine kenetlenmesi sağlandı. Hazırlanan jelde; tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitör ise enzimi spesifik olarak bağlayacak kısmı oluşturmaktadır. Afinite jelinin hazırlanması 2.5.3.1' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

### 2.5.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması

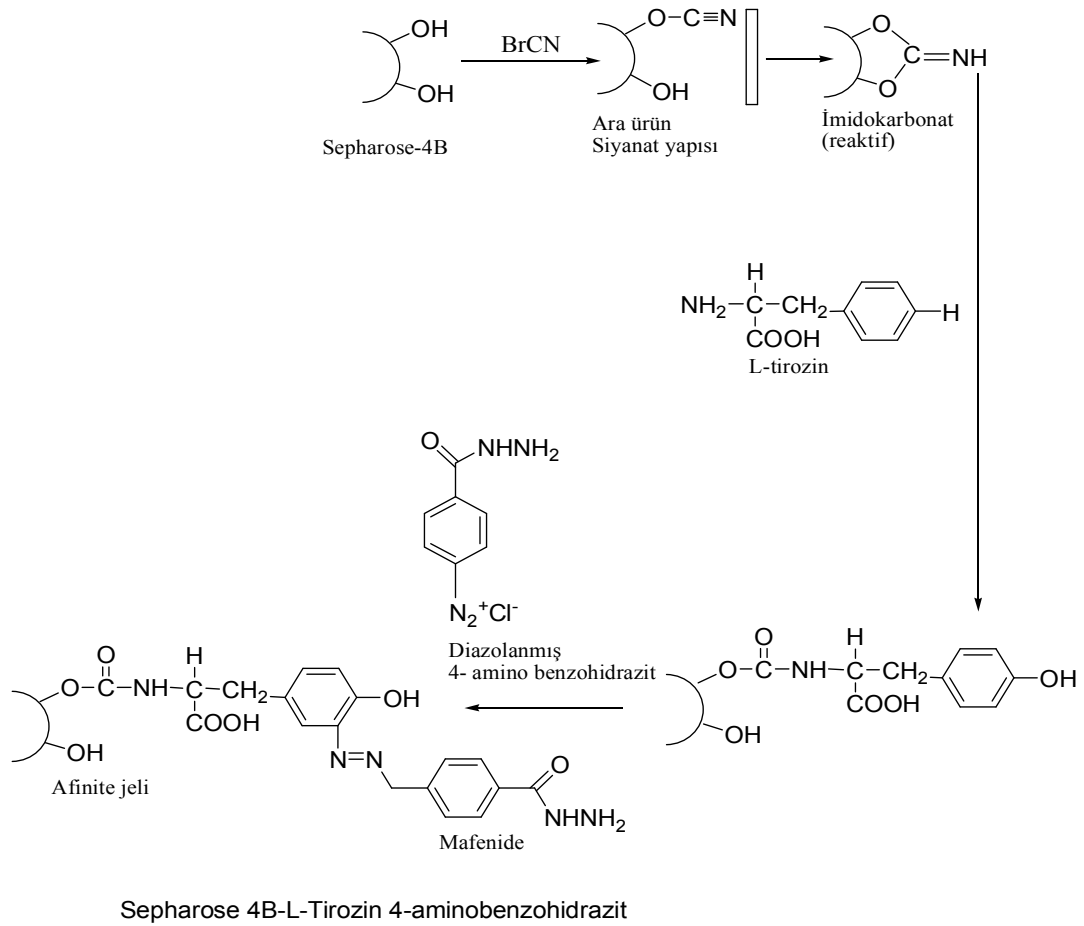


Şekil 2.8. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması [14]

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra süspansiyon, +4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca +4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar afinite jeli bol su ile yıkandı. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH: 8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Şekil 2. 8).

### 2.5.3.2. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirmesi

İnhibitör'den 25 mg alınarak 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, inhibitör çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'da sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı [94]. Hazırlanan jele bağlanma modeli Şekil 2.9' da verilmiştir.



Şekil 2.9. 4-aminobenzohidrazit kenetlendirilmesi bağlanma modeli [14]

#### 2.5.4. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH: 6,8) içine alınarak jel süspansiyonu edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolon dengeleninceye kadar yıkama yapıldı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

### 2.5.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Bölüm 2.5.1’de açıklandığı gibi hazırlanan homojenatın 5 mL’si 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH: 6,8 tamponu ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi ve kolon 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH: 6,8 çözeltisi ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH: 6,8 tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 mL/saat’e ayarlandı ve elüatlar 1,5’er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm’deki absorbans değeri köre karşı ölçüldü.

### 2.5.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

POD enzimi afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmlı metoduna uygun olarak yapıldı [95] ve saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi. Standart olarak molekül ağırlıkları 10 kDa ile 250 kDa arasında değişen proteinler kullanıldı.

Bu amaçla; elektroforez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

**Ayırma jelinin hazırlanışı:** 5 mL 1 M Tris-HCl (pH: 8,8), 4,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %10 SDS, 0,13 mL %5’lik TEMED (N,N,N’,N’-tetrametil etilen diamin) ve 3,13 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,2 mL %10’luk amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER) ilave edildi.

**Yığma jelinin hazırlanışı:** 0,41 mL 1 M Tris-HCl (pH: 6,8), 0,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10’luk SDS, 0,03 mL %5’lik TEMED ve 2,45 mL saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine %10’luk PER’den 0,1 mL ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar enjektörle döküldü. Hava almamasına dikkat edildi. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma

jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jelin kuruması için bekletildi. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan kuyucuklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle tespit edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı [96].

## **2.6. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin karakterizasyon çalışmaları**

Hazırlanan afinite kromatografisi kolanlarından saflaştırılacak peroksidaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için guaiakol substratı kullanarak optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH ve guaiakol için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

### **2.6.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışmaları**

Peroksidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 olan 0,1 M  $KH_2PO_4$  tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir

tamponda enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

### **2.6.2. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışmaları**

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 olan 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak  $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat aryla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

### **2.6.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları**

Peroksidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmali su banyosu kullanıldı. Optimum pH ve optimum iyonik şiddette olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içersinde uygun sıcaklığa ayarlı su banyosunda 5 dk bekletilerek istenilen sıcaklığa getirildi ve son olarak enzim çözeltisi pipetlendi.  $0^\circ\text{C}$  ile  $80^\circ\text{C}$  arasında  $10^\circ\text{C}$  aralıklarla her sıcaklık için aktivite ölçümü yapıldı. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

### **2.6.4. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları**

Optimum iyonik şiddetleri belirlemek amacıyla optimum pH'da kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD için 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 mM'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

### **2.6.5. Guaiakol için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin Hesaplanması**

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; guaiakol kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak tabloda gösterildi [97].

### **2.6.6. Kullanılan ligand için kinetik çalışmalar**

Ligand olarak kullanılan inhibitörün guaiakol substratına bağı olarak,  $IC_{50}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: oda sıcaklığında ve optimum pH'da, 45 mM guaiakol konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edilerek, % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi.

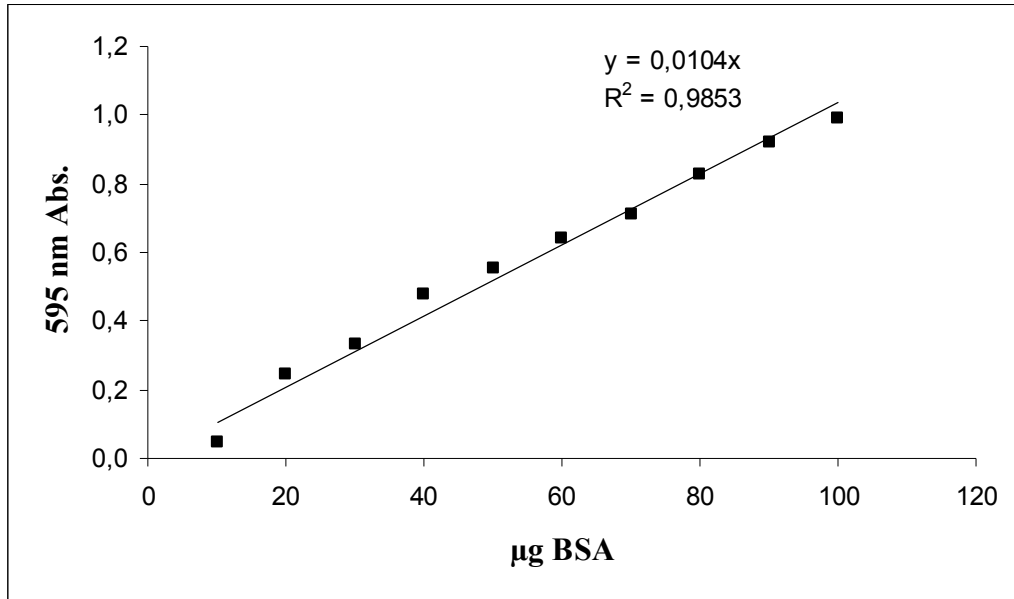
Daha sonra inhibisyon türünün belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu.

### 3. BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 3.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Kırmızı lahana bitkisinden hazırlanan homojenat ve afinite kolonundan saflaştırılan peroksidaz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla bölüm 2.4.1.2.'de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Homojenatlar ve afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1' de gösterildi.

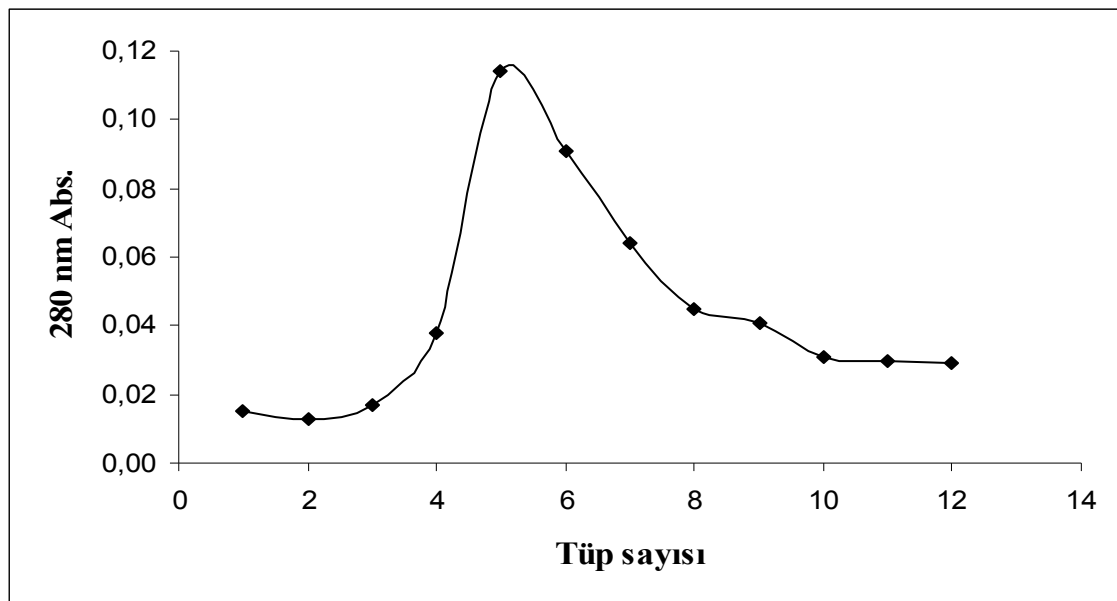


Şekil 3.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik (BSA: Bovine Serum Albumin)

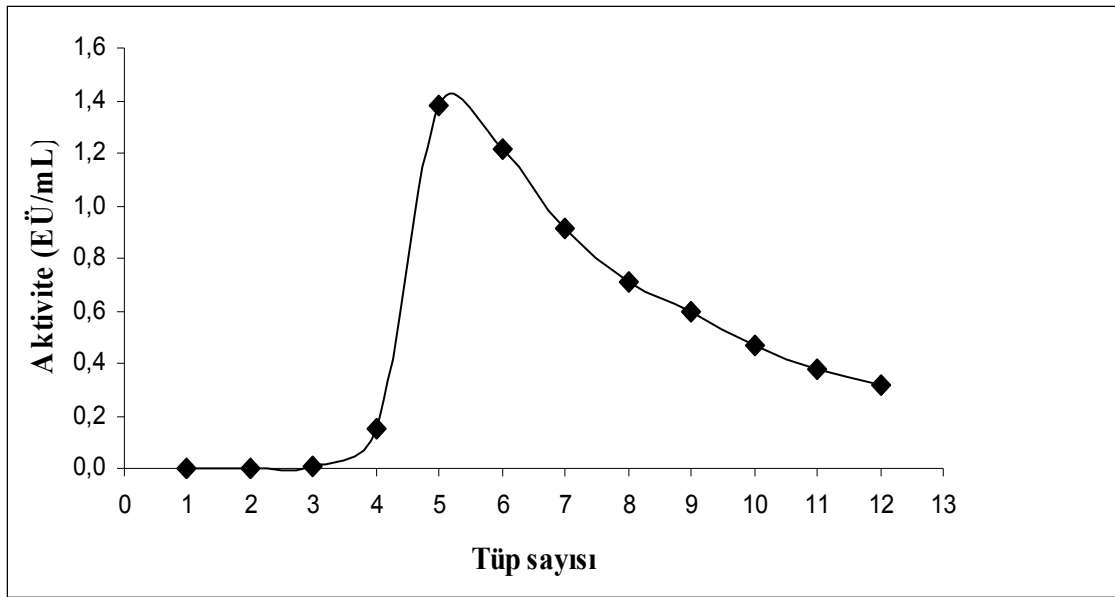
### 3.2. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması çalışma sonuçları

#### 3.2.1. POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Bölüm 2.5.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, bölüm 2.5.1’de belirtildiği gibi kırmızı lahana bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5’er mL ayrı ayrı dengelenmiş kolona pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 35 mL/saat’e ayarlanarak 1,5’er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm’de absorbands değerleri ölçülerek kalitatif protein tayinleri yapıldı. 280 nm’de ölçülen absorbands değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 3.2 ’te verildi. Absorbans gösteren tüplerin 470 nm’de aktivitelere bakıldı. 470 nm’de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 3.3’de gösterildi.



Şekil 3.2. Afinite kolundan elde edilen elüatların 280 nm deki Absorbans değerlerinin tüp sayısı ile değişimi



Şekil 3.3. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit afinite kolondan elde edilen elüatların 470 nm'deki absorban değerlerinin tüp sayısı ile değişimi

### 3.2.2. POD enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Hazırlanan jel kolono paketlendikten sonra 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,8) tamponu ile dengelendi. 2.5.1'de belirtildiği gibi kırmızı lahanada bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5'er mL ayrı ayrı kolona tatbik edildi ve kolonlar 400 mL 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,8) tamponu ile yıkandı. Böylece peroksidaz enziminin kolona tutunması sağlandı. Sonra 1M NaCl/25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi 1,5'er mL hacimler şeklinde elüe edildi. Elüsyon sırasında peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 mL/saat'e ayarlandı.

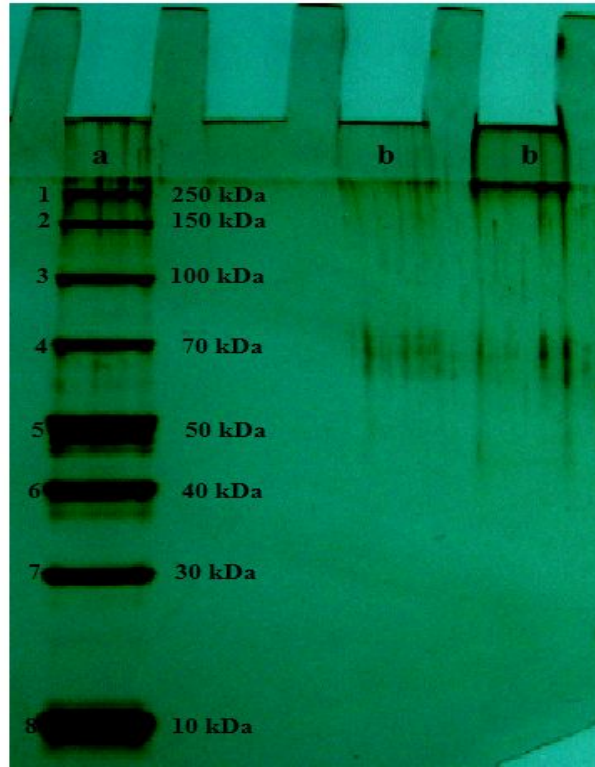
Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit kullanılan kolondan kırmızı lahanada bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırma basamaklarında 470 nm'de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Peroksidaz enziminin afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları

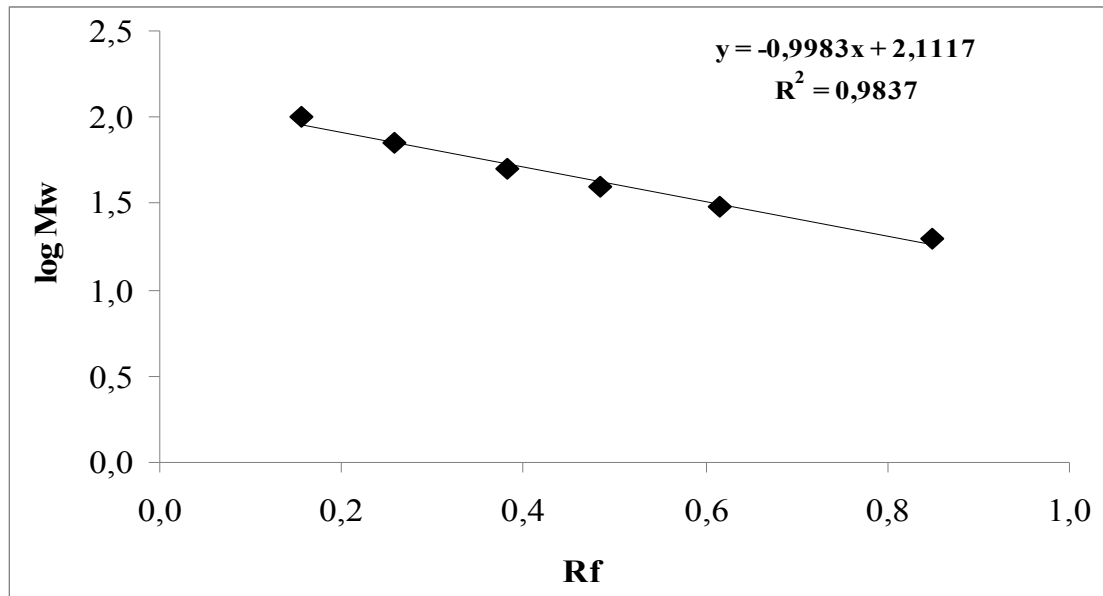
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein miktarı (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Yüzde verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
<b>Homojenat</b>	5 mL	24,72	0,84	4,2	123,6	29,43	100	1
<b>Sepharose 4B Afinite Kromatografisi</b>	5 mL	0,71	0,0002	0,001	3,55	3550	2,9	120,6

### 3.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu 4-aminobenzohidrazit afinite kolonu ile kırmızı lahanadan saflaştırılan peroksidaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bu amaçla bölüm 2.5.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforez kuyularına sırayla saflaştırılan peroksidazlar ve standart proteinler uygulandı ve uygun şartlarda jel üzerinde yürütüldü. Daha sonra gümüş boyama yapılan jelin fotoğrafı alındı ve saflaştırılan enzimin mol kütlesi log MK-Rf grafiği çizilerek tespit edildi. Sonuçlar, Şekil 3.4, 3.5 ve Tablo 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.4. 4-aminobenzohidrazit kolonundan saflaştırılan kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı  
 \*(a Nolu kuyu: Standart proteinler, b Nolu kuyular: Saflaştırılan kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD )



Şekil 3.5. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) dan saflaştırılan POD enziminin SDS-PAGE sonucu çizilen Rf-log MK grafiği

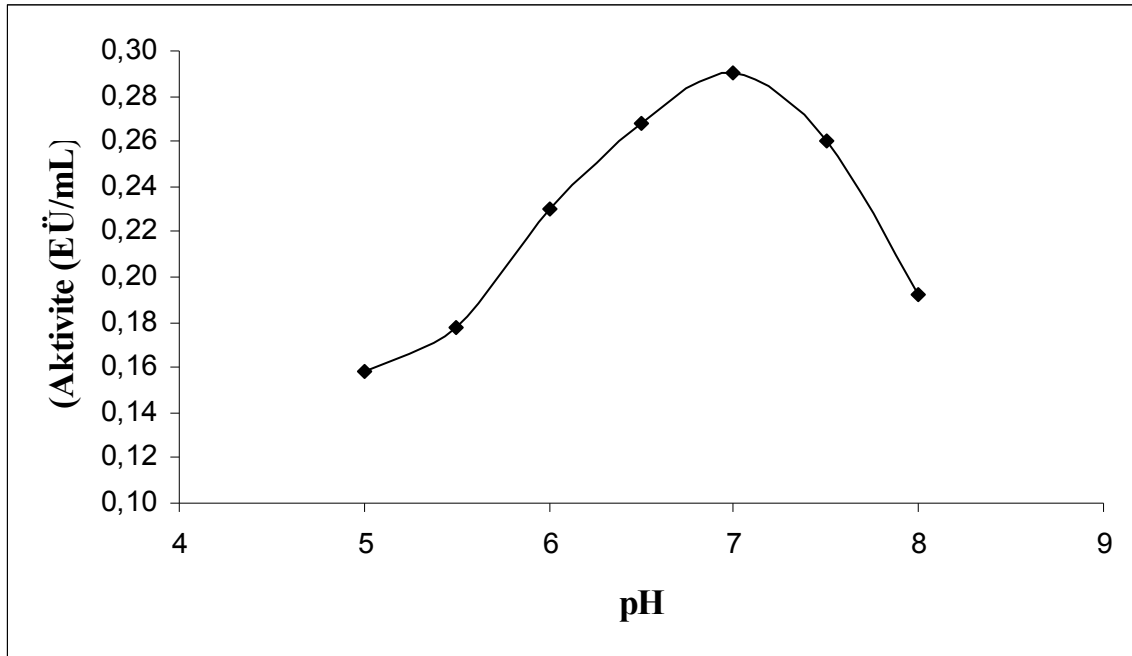
Tablo 3.2. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) dan saflaştırılan POD enzimi için SDS-PAGE ile molekül tayini sonuçları

Enzim	Bitki	Molekül Kütlesi
Peroksidaz (POD)	Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata F. Rubra</i> )	69,3

### 3.3. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin karakterizasyon çalışmaları ile ilgili sonuçlar

#### 3.3.1. Peroksidaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

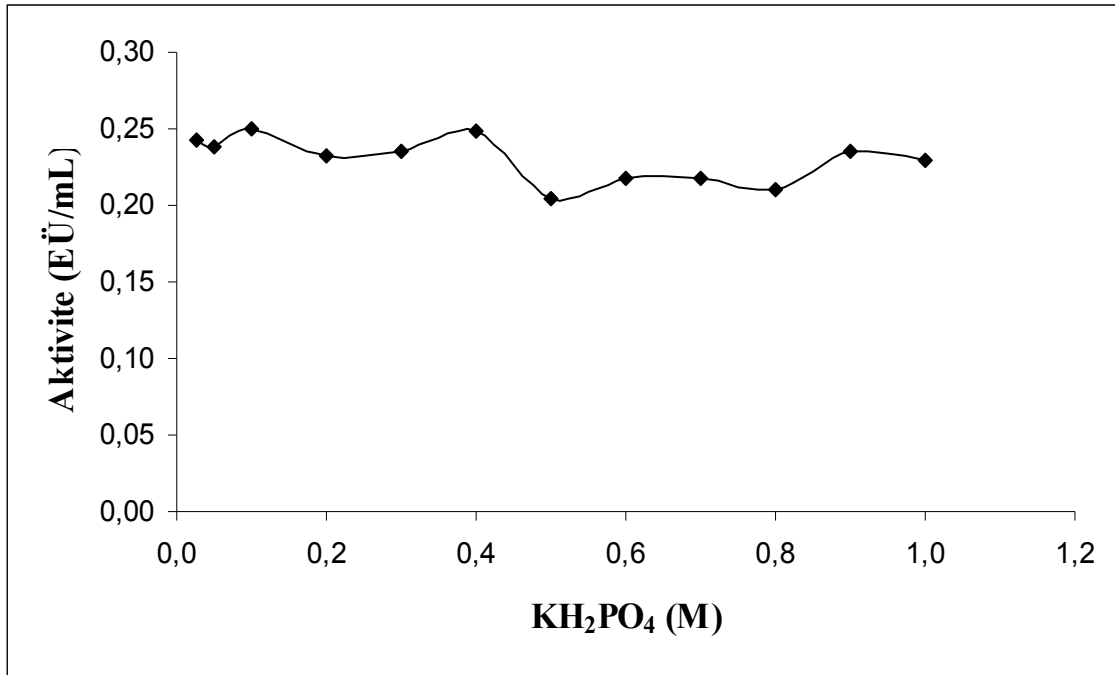
Kırmızı lahanadan saflaştırılan POD enziminin optimum pH çalışması bölüm 2.6.1’de anlatıldığı şekilde pH 5,0- 8,0 aralığında değişen 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 3.6). Kırmızı lahanadan saflaştırılan POD enzimi için optimum pH: 7 olarak belirlendi.



Şekil 3.6. Kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enziminin aktivitesinin (EÜ/mL) pH ile değişimi

### 3.3.2. Peroksidaz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışma sonuçları

Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 2.6.4'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar çizelge ve aktivite-konsantrasyon grafikleri halinde gösterildi (Şekil 3.7). Yapılan çalışmalar sonucu kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enzim için en uygun iyonik şiddetin 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,5) tamponu olduğu tespit edildi.

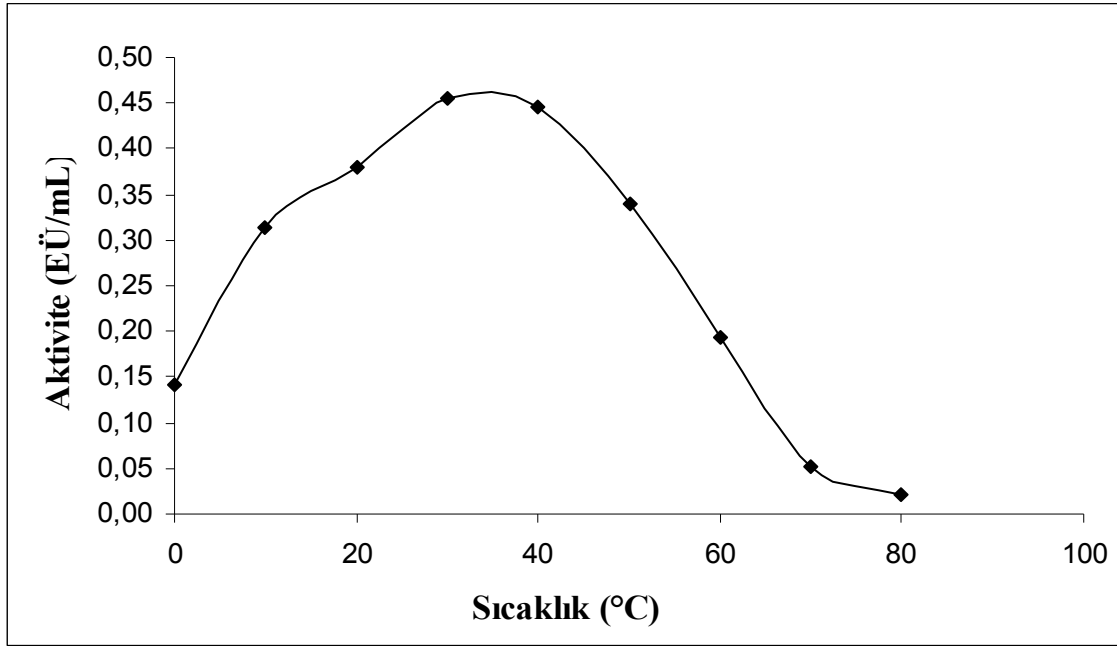


Şekil 3.7. Değişik konsantrasyonlardaki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH:7,0) tampon çözeltileri kullanılarak kırmızı lahanada (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enzimi için çizilen Aktivite (EÜ/mL)-İyonik şiddet (M) grafiği

### 3.3.3. Peroksidaz enzimi için optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere kırmızı lahanada (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) için optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6,5) tamponu kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm

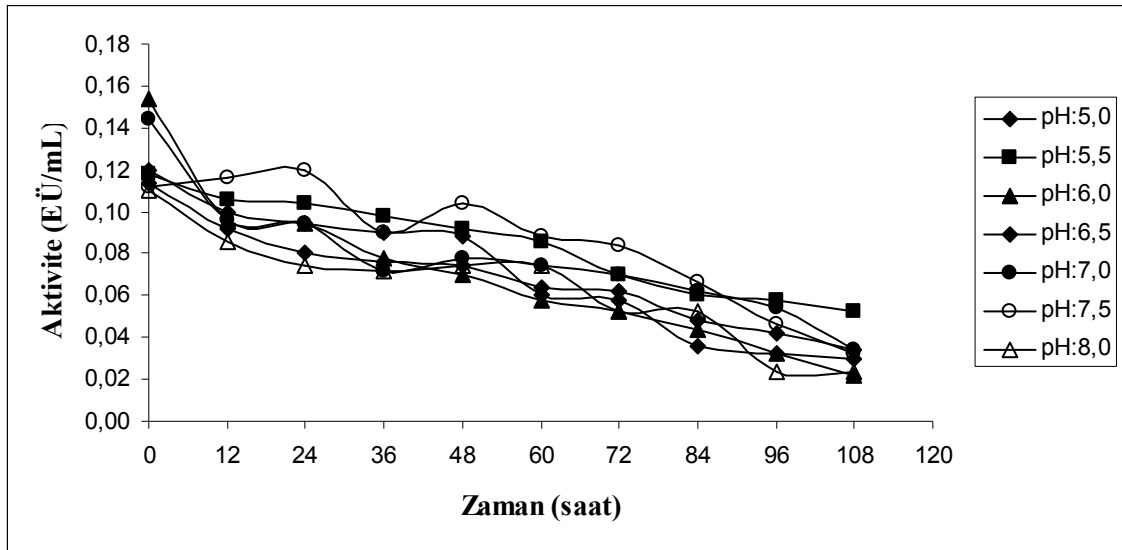
2.6.3’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8’de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD için optimum sıcaklık 30°C olarak tespit edildi.



Şekil 3.8. Kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığı için Aktivite (EÜ/mL)-Sıcaklık (°C) grafiği

### 3.3.4. Peroksidaz enzimi için stabil pH çalışma sonuçları

Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) peroksidaz enzimlerinin stabil pH’ları bölüm 2.6.2’te anlatıldığı şekilde pH’ları 5.0- 8.0 aralığında 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltileri kullanılarak hazırlanan enzim stoklarının gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 3.9). Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enzimi için stabil pH, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponunda pH: 5,5 olarak belirlendi.



Şekil 3.9. Değişik pH'lardaki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi kullanılarak kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

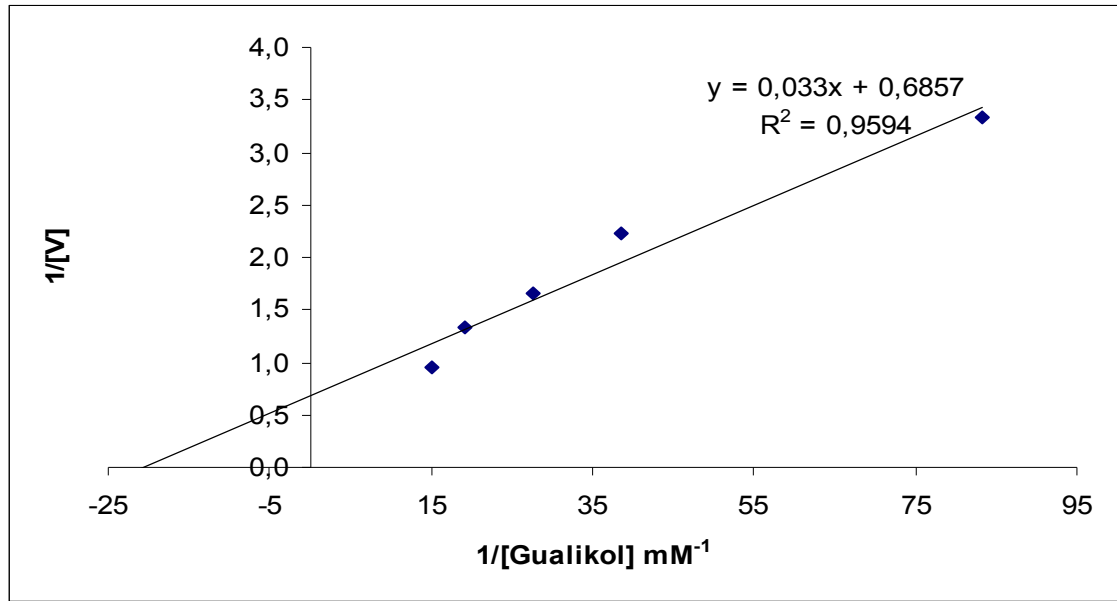
### 3.3.5. Guaiakol substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Tablo 3.3. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enzimi için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunmasına yönelik guaiakol derişimi ve aktivite çizelgesi

Gualikol (mM)	Aktivite (EÜ/mL)
0,30	0,012
0,45	0,026
0,60	0,036
0,75	0,052
1,05	0,066

Guaiakol substratı için kırmızı lahana bitkisinden saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi çalışmaları bölüm 2.6.5'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Bitki POD için en az 5 farklı guaiakol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı.  $1/[\text{Guaiakol}]-1/V$  Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu

grafikten  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.3 ve Şekil 3.10'da görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda guaiakol için  $K_M$  değeri kırmızı lahanada 0,048 mM olarak bulunurken  $V_{max}$  ise kırmızı lahanaya 1,46 EÜ/mL olarak tespit edildi.



Şekil 3.10. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin guaiakol için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi grafiği

### 3.3.6. Kullanılan inhibitörün $K_i$ ve $IC_{50}$ değerlerinin bulunması yönelik yapılan çalışma sonuçları

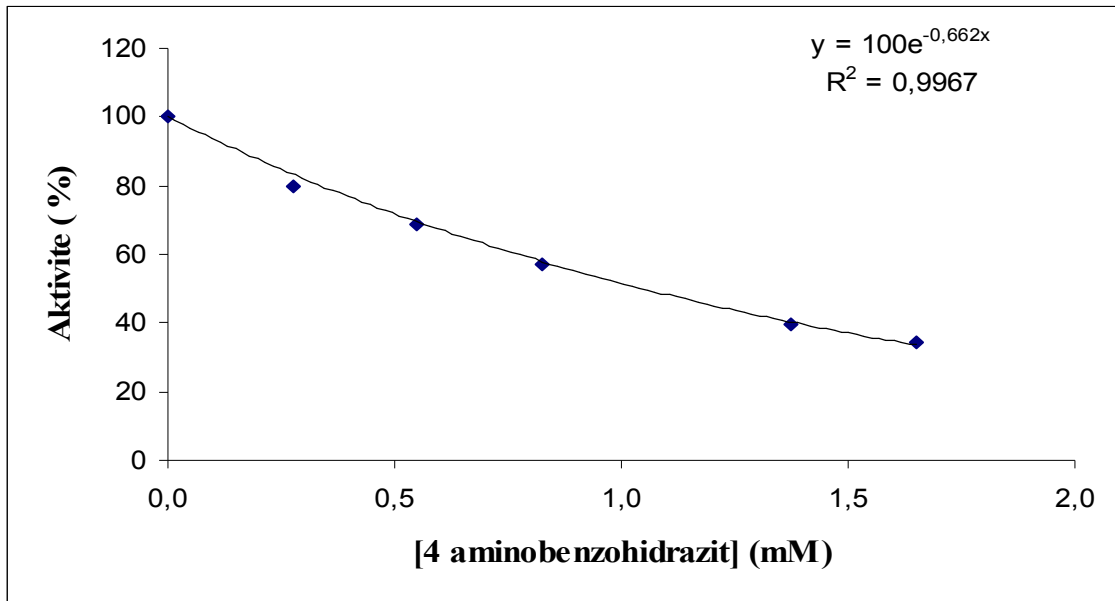
Bu çalışmada 4-aminobenzohidrazit inhibitörü saf suda çözülerek kırmızı lahanadan saflaştırılan peroksidaz enzimi üzerine guaiakol substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda guaiakol (45mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Tablo 3.4 ve 3.5'de gösterildi ve % Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizilerek  $IC_{50}$  değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 3.11'de gösterildi. Kırmızı lahanada peroksidaz  $IC_{50}$  değeri 1,047 mM olarak tespit edildi.

Tablo 3.4. Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan çalışmalarda bulunan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

[4-aminobenzohidrazit] (mM)	%Aktivite
0,000	100
0,275	79,7
0,550	69,0
0,825	57,3
1,375	39,9
1,650	34,3

Tablo 3.5. Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin aktivitesi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan  $IC_{50}$  çalışmasında kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü					
Fosfat Tamponu (mL)	Guaiakol (mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	Fosfat Tamponu (mL)	Guaiakol (mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)
0,45	1,00	1,00	0,550	0,000	0,45	1,00	1,00	0,450	0,000	0,10
0,45	1,00	1,00	0,525	0,025	0,45	1,00	1,00	0,425	0,025	0,10
0,45	1,00	1,00	0,500	0,050	0,45	1,00	1,00	0,400	0,050	0,10
0,45	1,00	1,00	0,475	0,075	0,45	1,00	1,00	0,375	0,075	0,10
0,45	1,00	1,00	0,425	0,125	0,45	1,00	1,00	0,325	0,125	0,10
0,45	1,00	1,00	0,400	0,150	0,45	1,00	1,00	0,300	0,150	0,10



Şekil 3.11. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enzimi aktivitesinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile değişimi

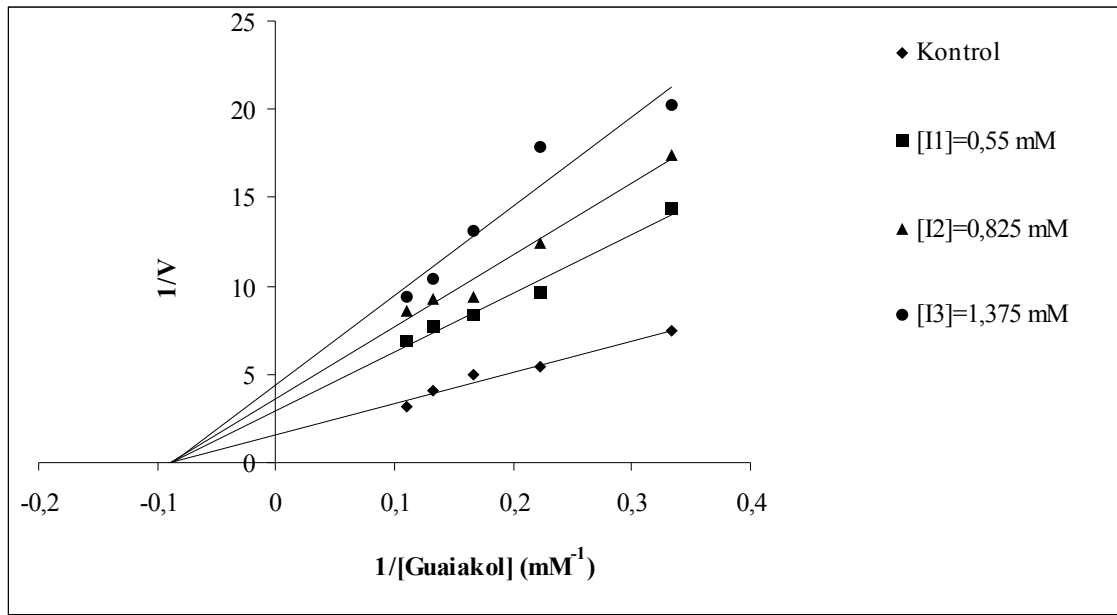
Daha sonra inhibisyon türlerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar ve deney prosedürü Tablo 3.6, 3.7 ve 3.8’de verilmiştir. Ayrıca elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 3.12’de gösterilmiştir. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enzimi için  $K_i$  sabiti  $0,0702 \pm 0,05$  mM ve inhibisyon tipi ise yarışmasız olarak tespit edildi.

Tablo 3.6. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün Ki değerlerinin tespitinde kullanılan substrat konsantrasyonu ve aktivite değerlerini gösteren çizelge

	Guaiakol (mM)	Aktivite (EÜ/mL)
Kontrol	3,0	0,135
	4,5	0,184
	6,0	0,200
	7,5	0,248
	9,0	0,312
0,55	3,0	0,069
	4,5	0,104
	6,0	0,120
	7,5	0,130
	9,0	0,146
0,825	3,0	0,057
	4,5	0,080
	6,0	0,106
	7,5	0,108
	9,0	0,116
1,375	3,0	0,049
	4,5	0,056
	6,0	0,076
	7,5	0,096
	9,0	0,106

Tablo 3.7. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimi üzerine 4-aminobenzohidrazit inhibitörünün  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan deney prosedürü

Kör Tüp					Numune Tüpü					
Fosfat Tamponu (mL)	Guaiakol (mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	Fosfat Tamponu (mL)	Guaiakol (mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Saf su (mL)	İnhibitör (mL)	POD (mL)
0,45	0,20	1,00	1,350	0,000	0,45	0,20	1,00	1,250	0,000	0,10
0,45	0,30	1,00	1,250	0,000	0,45	0,30	1,00	1,150	0,000	0,10
0,45	0,40	1,00	1,150	0,000	0,45	0,40	1,00	1,050	0,000	0,10
0,45	0,50	1,00	1,050	0,000	0,45	0,50	1,00	0,950	0,000	0,10
0,45	0,60	1,00	0,950	0,000	0,45	0,60	1,00	0,850	0,000	0,10
0,45	0,20	1,00	1,300	0,050	0,45	0,20	1,00	1,200	0,050	0,10
0,45	0,30	1,00	1,200	0,050	0,45	0,30	1,00	1,100	0,050	0,10
0,45	0,40	1,00	1,100	0,050	0,45	0,40	1,00	1,000	0,050	0,10
0,45	0,50	1,00	1,000	0,050	0,45	0,50	1,00	0,900	0,050	0,10
0,45	0,60	1,00	0,900	0,050	0,45	0,60	1,00	0,800	0,050	0,10
0,45	0,20	1,00	1,275	0,075	0,45	0,20	1,00	1,175	0,075	0,10
0,45	0,30	1,00	1,175	0,075	0,45	0,30	1,00	1,075	0,075	0,10
0,45	0,40	1,00	1,075	0,075	0,45	0,40	1,00	0,975	0,075	0,10
0,45	0,50	1,00	0,975	0,075	0,45	0,50	1,00	0,875	0,075	0,10
0,45	0,60	1,00	0,875	0,075	0,45	0,60	1,00	0,775	0,075	0,10
0,45	0,20	1,00	1,125	0,125	0,45	0,20	1,00	1,025	0,075	0,10
0,45	0,30	1,00	1,025	0,125	0,45	0,30	1,00	0,925	0,075	0,10
0,45	0,40	1,00	0,925	0,125	0,45	0,40	1,00	0,825	0,075	0,10
0,45	0,50	1,00	0,825	0,125	0,45	0,50	1,00	0,725	0,075	0,10
0,45	0,60	1,00	0,725	0,125	0,45	0,60	1,00	0,625	0,075	0,10



Şekil 3.12. Kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enzimi üzerine uygulanan 4-aminobenzohidrazit'in inhibisyon türünü gösteren grafik

Tablo 3.8. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) POD enzimlerinin 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları

Bitki	IC <sub>50</sub> (mM)	[İnhibitör] (mM)	K <sub>i</sub> değeri (mM)	Ortalama K <sub>i</sub> (mM)	İnhibisyon tipi
Kırmızı lahanada ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata F. Rubra</i> )	1,047	0,550	0,670	0,0702±0,05	Yarışmasız
		0,825	0,679		
		1,375	0,756		

## 4.BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 4.1.Tartışma ve Sonuç

Peroksidaz (POD) enzimi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan, prostetik grup olarak hem grubu ihtiva eden  $H_2O_2$  varlığında çeşitli elektron vericilerin oksidasyonunu katalizleyen bir oksidoredüktazdır [98]. Çok sayıdaki izoenzimleri ve in vitro olarak katalizlediği reaksiyonların çeşitliliği nedeniyle henüz canlı organizmada belirli bir izoenzim fonksiyonu atamak mümkün değildir [99].

POD, organik çözücülerin fenol polimerizasyonunu katalizlemede [100], atık sulardaki zehirli fenollerini parçalamada [101], sentetik boya ağartmada [102] kullanılmaktadır.

Peroksidazlar birçok iyonik formları mevcut olan, canlı ortamında bitki büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden anahtar enzimlerden biridir. Aynı bitki kaynağı içinde bulunan birçok izoperoksidaz formunun moleküler kütlesi, optimal pH ve sıcaklık, izoelektrik nokta, substrat özgülüğü, amino asit ve şeker bileşimi ve ısı stabilitesi açısından önemli ölçüde farklılık gösterebilir. İşlevsel olarak, bu enzimler bir reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktaz gibi davranırlar ve burada  $H_2O_2$  akseptör (alıcı) olarak davranır ve diğer bir bileşik hidrojen atomlarının donörü (verici) olarak davranır [49].

POD enziminin saflaştırılması üzerine literatürde birçok kromatografik metot bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler zaman açısından uzun sürmektedir aynı zamanda maliyet açısından önerdiğimiz yönteme göre daha maliyetlidir [103].

Tez kapsamında kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) bitkisinden POD enziminin saflaştırılması amacı ile afinite jeli hazırlanmıştır. Ligand olarak 4-aminobenzohidrazit'in bağlı olduğu afinite kolonundan saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri, SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi ve kullanılan ligandın kinetik özellikleri belirlenmiştir.

Hazırlanan afinite kolonundan elde edilen kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) elüatlarının 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüş ve toplanan fraksiyonlara kalitatif protein tayini yapılmıştır. Kantitatif protein tayinleri ise afinite kromatografisi ile saflaştırılan kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) peroksidaz enzim çözeltileri ve homojenatlardaki protein miktarları Bradford metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı, bozucu etkilere karşı daha az hassas olması ve reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir olmasıdır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişmektedir ve protein boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalabilmektedir.

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) peroksidazın aktivitesi, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı yönteme göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu yöntem, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve yükseltgenme sonucu oluşan 3,3-dimetoksi-4,4-bifenokinon renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır [90].

4-aminobenzohidrazit POD inhibitörüdür [104]. 4-aminobenzohidrazit gibi inhibitörler yapılarında benzen halkasına bağlı serbest -NH<sub>2</sub> bulundurur. 4-aminobenzohidrazit inhibitörü ile afinite jeli hazırlanmıştır ve kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) POD enziminin saflaştırılması Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzohidrazit afinite kromatografisi kullanılarak yapılmıştır.

Hazırlanan afinite kolonuna kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) numunesinin tatbiki için öncelikle homojenat hazırlanmıştır. Homojenat hazırlanırken hücreleri parçalamak için dondurma çözme tekniği kullanılmıştır. Dondurma çözme tekniği en etkili hücre parçalama tekniğidir. Kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) homojenatı hazırlandıktan sonra kolondan geçirildi ve POD enzimi kolona tutunarak diğer tüm kirliliklerin yıkama tamponu ile uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon tamponu ile kolona tutunmuş POD enzimi elüe edilmiştir. Elüe edilen tüm fraksiyonlara aktivite tayini ve kantitatif protein tayini yapılmıştır.

Elde edilen veriler ile hesaplamalar yapılmış ve kırmızı lahana (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) POD enzimi için saflaştırma tabloları çizilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tek kromatografik işlemle POD enzimi kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Capitata F. Rubra*) 3550 (EÜ/mg) ve 2,9 verimle 120,6 kat saflaştırılmıştır. Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) ve %33 verimle 33,5 kat saflaştırmıştır [64]. Deepa ve arkadaşları palmiye ağacı yaprağından (*Elaeis guineensis* Jacq.) POD enzimini 3 kromatografik adımda 251090.90 (EÜ/mg) ve %54 verimle 429 kat saflaştırmıştır [105]. Pandey ve arkadaşları baklagilden (*Leucaena leucocephala*) POD enzimini 4 kromatografik adımda 63.4 (EÜ/mg) ve % 26.09 verimle 89.3 kat saflaştırmıştır [106]. Sakharov ve arkadaşları palmiye ağacından (*Roystonea regia*) 5 kromatografik adımda 6170 (EÜ/mg) ve % 12,5 verimle 73 kat saflaştırmıştır [107]. Pandey ve arkadaşları papayadan (*Carica papaya*) POD enzimini üç kromatografik adımda 68,59 (EÜ/mg) ve %44,37 verimle 30,22 kat saflaştırmışlardır [108]. Kumar ve arkadaşları karayip bitkisinden (*Euphorbia cotinifolia*) iyon değişim kromatografisi kullanarak 28 (EÜ/mg) ve % 3,3 verimle saflaştırmıştır [109]. Al-Senaïdy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 906,2 (EÜ/mg) ve %5,8 verimle 17 kat saflaştırmıştır [110]. Rudrappa ve arkadaşları kırmızı pancar köklerinden (*Beta vulgaris* L.) POD enzimini iki kromatografik adımda 10500,0 (EÜ/mg) ve 15 kat saflaştırmıştır [111]. Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) ve %0,2 verimle 19,33 kat saflaştırmıştır [112]. Mdluli marula meyvesinden (*Sclerocarya*

*birrea subsp. Caffra*) POD enzimini üç kromatografik adımda 361,469 (EÜ/mg) ve % 1,3 verimle 19 kat saflaştırmıştır [113]. Lavery ve arkadaşları at turpundan (*Armoracia rusticana*) POD enzimini iki kromatografik adımda 772,25 (EÜ/mg) ve %71,3 verimle 291 kat saflaştırmıştır [114]. Lo'pez-Molina ve arkadaşları enginar çiçeklerinden (*Cynara scolymus* L.) POD enzimini dört kromatografik adımda 174 (EÜ/mg) ve % 2,3 verimle 54 kat saflaştırmıştır [115].

Saflaştırılan kırmızı lahanada (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) peroksidaz enziminin saflığının kontrolü için ve molekül ağırlıklarının tespiti için SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE görüntüsü kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) izole edilen peroksidaz enziminin saf olduğu belirlenmiştir. Elde edilen tek bandın molekül ağırlıkları çizilen Rf-logMK grafiklerinden bulunmuştur. Çizilen grafikte kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enziminin mol kütlesi 69,3 kDa olarak bulunmuştur.

Literatürde yapılan saflaştırma çalışmaları neticesinde peroksidaz enzimi için birçok izoenzim yapısı bulunmuştur. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen bu izoenzimlerin molekül kütleleri; palmye ağacı yapraklarında [105] 48 kDa, palmye ağacında [107] 51 kDa, karayip bitkisinden [108] 43.11 kDa, tatlı patates köklerinden [83] 37 kDa, at turpunda [114] 37 kDa, domateste [82, 83] 43 kDa, vanilya çekirdeğinde [116] 46,5 kDa, kırmızı pancarda [117] 45 kDa, karalâhanada [62] 95 kDa, zeytinde [118] 44kDa, hurma yapraklarında [105] 55 kDa olarak tespit edilmiştir. İzole edilen peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıkları 35-95 kDa arasında saflaştırılan kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enzimi için bulduğumuz molekül ağırlıkları literatürle uyum içindedir.

Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra peroksidaz enzimi için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) saflaştırılan POD enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH değerleri belirlenmiştir.

Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 5,0- 8,0 aralığında 0,1 M'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponlarında peroksidaz enziminin gösterdiği aktivite spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) saflaştırılan POD enziminin optimum pH değeri 0,1 M'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponunda 7,0 olduğu tespit edilmiştir. Köksal ve Gülçin karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum pH'yı fosfat tamponunda 5,0 olarak bulmuşlardır [70]. Deepa ve arkadaşlarının palmye yaprak yağı (*Elaeis guineensis* Jacq.) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH 5,0 olarak bulmuşlardır [105]. Saraiva ve arkadaşlarının zeytin (*Olea europaea* L.) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH 7,0 olarak bulmuşlardır [119]. Pandey ve arkadaşlarının baklagil (*Leucaena leucocephala*) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH fosfat tamponunda 5,0 olarak bulmuşlardır [106]. Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) elden edilen peroksidazın optimum pH'sını Tris/HCl tamponunda 7,5 olarak bulmuşlardır [62]. Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum pH değerini fosfat tamponunda 5,2 olarak bulmuştur [112]. Lavery ve arkadaşları başka bir çalışmada at turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazının optimum pH'sını fosfat tamponunda 7,0 olarak tespit etmişlerdir [114]. Kumar ve arkadaşlarının karayip bitkisi (*Euphorbia cotinifolia*) peroksidazı üzerine yaptığı çalışmada optimum pH fosfat tamponunda 7,0 olarak bulmuşlardır [109]. Peroksidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda genellikle optimum pH değeri 5,0-7,5 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Tez kapsamında bulunan optimum pH değeri literatürde bulunan değerlerle uyum içindedir.

Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için için 0,025 ile 1,0 M arasında daha önce belirlenen optimum pH'da fosfat tamponu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Optimum iyonik şiddet kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD için 0,1 M olarak bulunmuştur. Köksal ve arkadaşları ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan peroksidaz'ın optimum iyonik şiddetini 0,075 M olarak bulmuştur [112]. Köksal ve Gülçin karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidazı üzerinde yaptığı çalışmada optimum iyonik şiddeti 1,0 M olarak tespit etmişlerdir [70].

Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını belirlemede optimum pH ve optimum iyonik şiddette 10'ar °C artışla 0-80°C aralığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulunmuştur. Saraiva ve arkadaşları zeytinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 34,7°C [122], Marquez ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 16°C [116], Pandey ve arkadaşları baklagilden saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 55°C [106], Al-senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 55°C [112], Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 40°C [105], Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 30°C [70], Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 60°C [115], Kumar ve arkadaşları karayip bitkisinden (*Euphorbia cotinifolia*) saflaştırılan POD enziminin optimum sıcaklığını 50°C [109] olarak bulmuşlardır.

Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) POD enziminin stabil pH deneylerinde pH 5,0- 8,0 aralığında 10 mM'lık fosfat tamponu kullanılmıştır. Hazırlanan bu tampon çözeltiler ve enzim stokları kullanılarak 12 saat ara ile 108 saat boyunca aktivite ölçümleri yapılarak enzimin stabil olduğu pH tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler neticesinde kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) peroksidazı için stabil pH 5,5 bulunmuştur. Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin stabil pH değerini 5,5 bulmuştur [115]. Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin stabil pH'sını 8,5 olarak tespit etmişlerdir [70]. Başka bir çalışmada ise Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin stabil olduğu değeri 6,5 olarak bulmuşlardır [62].

Kırmızı lahanaya (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enziminin guaiakol substratına olan ilgisini tespit etmek amacıyla peroksidaz enzimi için en az beş farklı guaiakol konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlenmiştir. 1/V ve 1/[S] değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanmıştır. Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) peroksidaz için  $K_M$  değeri 0,048 mM ve  $V_{max}$  değeri 1,46 EÜ/mL.dk olarak hesaplanmıştır. Deepa ve Arumughan palmya yapraklarından saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 3,96 mM olarak bulmuşlardır [105]. Saraiva ve arkadaşları zeytinden (*Olea europaea* L.) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 0,53 mM olarak bulmuşlardır [119]. Al-senaidy ve Ismael hurma yapraklarından (*Phoenix dactylifera* L.) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 0,77 mM olarak bulmuşlardır [110]. Pandey ve arkadaşları baklagilden (*Leucaena leucocephala*) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 2.9 mM olarak bulmuşlardır [106]. Lavery ve arkadaşları at turpu (*Armoracia rusticana*) POD enziminin  $K_M$  değerini 0,5 mM olarak bulmuşlardır [114]. Suzuki ve arkadaşları buğday tohumundan saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 0,028 mM olarak bulmuşlardır [120]. Gülçin ve Yıldırım karalâhanadan (*Brassica oleracea*) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 5,5 mM olarak bulmuşlardır [62]. Aruna ve arkadaşları *Raphanus sativus* köklerinden saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 4.78mM olarak bulmuşlardır [67]. Köksal ve Gülçin karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 141,64 ve  $V_{max}$  değerini 7500 EÜ/mL.dk olarak bulmuşlardır [70]. Köksal ıspanak (*Spinacia oleracea*) yapraklarından saflaştırılan POD enziminin  $K_M$  değerini 17,35 mM ve  $V_{max}$  değerini 1234 EÜ/mL.dk olarak bulmuştur [112]. Kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) saflaştırılan POD enzimi için bulunan  $K_M$  değeri enzim substrat kompleksinin sağlamlığının bir ölçüsüdür.  $K_M$  değerinin yüksek olması ES kompleksinin bağlanmasının zayıf olduğunu yani enzimin substrata ilgisinin az olduğunu gösterir. Yapmış olduğumuz çalışmalarda bulunan  $K_M$  değerlerine bakıldığında kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) peroksidaz enziminin guaiakol substratına olan ilgisinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* F. *Rubra*) bitkisinden saflaştırılan peroksidaz enzimi üzerine ligand olarak kullanılan 4-aminobenzohidrazit inhibitörü için detaylı kinetik çalışma yapılmıştır. Saflaştırılan peroksidaz enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, guaiakol (45 mM) reaksiyon ortamına 5 farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite ölçüm yapıldı. Bulunan bu değerlerle % Aktivite- konsantrasyon grafikleri çizildi. Çizilen bu

grafiklerden kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) peroksidaz enzimi için  $IC_{50}$  değeri 1.047 mM bulunmuştur.  $IC_{50}$  değerleri bulunduktan sonra kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) bitkisinden saflaştırılan POD enzimiyle 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümlerden sonra  $1/V$  ve  $1/S$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen bu grafiklerden kırmızı lahana (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) POD enziminin inhibisyon çeşiti ve  $K_i$  değeri bulunmuştur. Kırmızı lahanadan (*Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra*) saflaştırılan peroksidazın  $K_i$  sabiti  $0,0702 \pm 0,05$  mM, inhibisyon tipi yarışmasız olarak bulunmuştur.

POD enziminin saflaştırılması ile ilgili birçok kromatografik yöntem olmasına rağmen enzimlerin saflaştırılmasında çok önemli bir yöntem olan afinite kromatografisi ile ilgili literatürde çok detaylı saflaştırma prosedürü yoktur. Bu çalışmada POD enziminin saflaştırılmasında kullanılan siyanojen bromürle aktive edilmiş Sepharose 4B matrisine 4-aminobenzohidrazit ligandı bağlanarak hazırlanan afinite kolonu ile ilgili literatürde hiçbir bilgiye rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında POD enzimi mevcut yöntemlerden farklı bir afinite jeli ile saflaştırılmıştır. Tez kapsamında sunulan çalışmanın yeni bir yöntem olarak literatüre katkı sağlayacak olması çalışmayı önemli kılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Keha, E., Kvrevioğlu. .., 2009. Biyokimya. Aktif yayınları, 97- 125, Erzurum.
2. Lehninger, A.L., 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers Inc New York, 64.
3. Bingl, G., 1983. Biyokimya. Güven Matbaası. 285, Ankara.
4. Tzn, C., Biyokimya, Palme yayıncılık, 81, Ankara, 2005.
5. Bakan, N., Kimyasal kinetik ve kataliz-Enzimler, 2007-2008.
6. Turgut, H.., 2009. Sakarya bölgesinde yetişen deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Kimya anabilim dalı.
7. Güngör, K., 2008. Çağla badem (*Prunus dulcis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Kimya anabilim dalı.
8. www.mustafaaltinisik.org. /Enzim, Nisan 2008.
9. Akın, K.O., 2008. enzimler, tusdata,.
10. Gözükara, E.M., 1989. Biyokimya. Ofset Repromat LTD Őti., 792-795, Ankara.
11. Segel, I.H., 1975. Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York.
12. Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
13. Atasever, A., 2010. Laktoperoksidaz enziminin sığır sütünden afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya anabilim dalı.

14. Kalm, R., 2012. Peroksidaz enziminin afinite kromatografisi tekniği ile karaturp (*Raphanus sativus L.*) ve şalgamdan (*Brassica rapa L.*) saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Atatürk üniversitesi, Fen bilimler enstitüsü, Kimya ana bilim dalı.
15. Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. **Nature**, **214** (5095), 1302-1304.
16. Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. **European Journal of Biochemistry**, **18**: 351-360.
17. Cuatrecasas. P., 1970. Protein purification by affinity chromatography - derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. **Journal of Biological Chemistry**, **245**: 3059- 3065.
18. Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology**, **159**: 417- 419.
19. Ocarra, P., Barry S., 1974. Griffin T spacer arms in affinity chromatography - use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. **Febs Letters**, **43**: 169- 175.
20. Keha, E.E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu.Doçentlik tezi, Erzurum.
21. Lesham, Y.Y., 1988. Plant senescence processes and free radicals. **Free Radical Biologyand Medicine**, **5**: 39–49.
22. Salin, M.L., Day, E.D., Crapo, J.D., 1978. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **187**: 223–228.

23. Harris, E. D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes. **Faseb Journal**, **6**: 2675-2683.
24. Adams, J.B., 1978. The inactivation and generation of peroxidase in Relation to the high temperature-short time processing of vegetables. **Journal Food Technology**, **13**: 281-297.
25. Whitaker, J.R., 1994. Catalase and peroxidase. **In Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 565- 578.
26. Scandalios J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 275-316.
27. Pütter, J., Becker, R., 1987. *Methods of enzymatic analysis: Peroxide*. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, 286.
28. Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspect of plant peroxidase biosynthetic-studies. **Annual Review in Plant Physiology**, **38**: 205.
29. Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, **543**, Oxford.
30. Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G., 1997. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, **100**: 234-240.
31. Asada K., 1994. Production and action of oxygen species in photosynthetic tissues, in: Foyer, Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stres and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-104.
32. Laloue, H., Weber-Lotfi, F., Lucau-Danila, A., Guillemaut, P., 1997. Identification of ascorbate and guaiacol peroxidases in needle chloroplasts of spruce trees. **Plant Physiology and Biochemistry**, **35**: 341-346.

33. Elia, M.R., Borraccino, G., Dipierro, S., 1992. Ascorbate peroxidase from potato tubers. **Plant Science**, **85**: 17–21.
34. Ohya, T., Morimura, Y., Saji, H., Mihara, T., Ikawa, T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. **Plant Science**, **125**: 137–145.
35. Caldwell, C. R., 2003. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **51**: 4589–4595.
36. Inze D., Van Montagu M., 1995. Oxidative stress in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, **6**: 153–158.
37. Jimenez A., Hernandez J.A., del Rio L.A., Sevilla F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, **114**: 275–284.
38. Wakamatsu, K., Takahama, U., 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. **Physiologia Plantarum**, **88**: 167–171.
39. Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. **Biochimica et biophysica acta**, **1080**: 245–250.
40. Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H., 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **45**: 596–598.
41. Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. Var esculenta D.C.) peroxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **48**: 1574–1579.
42. Lin, C.C., Chen, L.M., Liu, Z.H., 2005. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. **Plant Science**, **168**: 855–861.

43. Mohan, R., Bajar, A.M., Kolattukudy, P.E., 1993. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap1*) by wounding in transgenic tobacco and activation of *tap1*/GUS and *tap2*/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. **Plant Molecular Biology**, **21**: 341–354.
44. García-Laraa, S., Arnasonb, J.T., Díaz-Pontonesc, D., Gonzalezc, E., Bergvinsona, D.J., 2007. Soluble peroxidase activity in maize endosperm associated with maize weevil resistance. **Crop Science**, **47**:1125–1130.
45. Chen, E.L., Chen, Y.A., Chen, L.M., Liu, Z.H., 2002. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. **Plant Physiology Biochemistry**, **40**: 439- 444.
46. Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., Milrad, D.E., Forchetti, S., Tigier, H., Valpuesta, V., 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, **122**: 1119- 1127.
47. Bernards, M.A., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A., Plourde, G.L., 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. **Plant Physiology**, **121**: 135- 145.
48. Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. **Phytochemistry**, **41**: 1029- 1034.
49. Santos, C.L., Campos, A., Azevedo, H., Caldeira, G., 2001. In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, **52**: 351- 360.
50. 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**: 345- 353.
51. Lagrimini, L.M., 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. **Plant Physiology**, **96**: 577- 583.

52. Schnabelrauch, L.S., Kieliszewski, M., Upham, B.L., Alizedeh, H., Lamport, D.T.A., 1996. Isolation of pI 4.6 extension peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. **Plant Journal**, **9**: 477- 489.
53. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, **42**: 462- 468.
54. Sakharov, I.Y., Castillo, J.L., Areza, J.C., Galaev, I.Y., 2000. Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaies guineensis*. **Bioseparation**, **9**: 125- 132.
55. Gülçin, İ., Yıldırım, A., 2005. Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. Acephala. **Asian Journal of Chemistry**, **17**: 2175- 2183.
56. Sat, I.G., 2008. The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **African Journal of Biotechnology**, **7**: 2248- 2253.
57. Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, **43**: 565- 568.
58. Dordick, J.S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M., 1987. **Biotechnology and Bio-engineering**, **30**:31–36.
59. Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase-evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**, **101**:1571–9.
60. Lee, M.Y., 2002. Effects of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> on the activities of antioxidant enzymes in geranium seedlings. **Phytochemistry**, **59**: 493–9.
61. Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M., Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**, **105**:1312–20.

62. Dicko, M.H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A.G., Van Berkel, W.J., 2006. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. **Febs Journal**, **273**:2293–307.
63. Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, **151**: 59- 66.
64. Kim, S.S., Lee, D.J., 2005. Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*. **Journal of Plant Physiology**, **162**: 609-617.
65. Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R., 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, **43**: 565-568.
66. Aruna, N., Lali, A., 2001. Purification of a plant peroxidase using reversibly soluble ion-exchange polymer. **Process Biochemistry**, **37**: 431- 437.
67. Pedreno, M.A., Ferrer, M.A., Gaspar, T.H., Munoz, R., Barcelo, A., 1995. The polyfunctionality of cell wall peroxidases avoids the necessity of an independent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system for phenolic coupling in the cell walls. **Plant Peroxidases News**, **5**: 3- 8.
68. Dixon, R.A., Palva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, **7**: 1085- 1097.
69. Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) buds. **Protein and Peptide Letters**, **15**: 320-326.
70. Dordick, S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M., 1987. Polymerization of phenoles catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. **Biotechnology and Bioengineering**, **30**: 31- 36.

71. Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moler, C.R., Weichold, O., Hoch, U., Scherier, P., 1999. Biotransformations with peroxidases. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, **63**: 74- 108.
72. Torres, F., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., 1997. Bio-catalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in media containing organic solvents. **Water Science and Technology**, **36**: 37- 44.
73. Singh, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, **32**: 39–49.
74. Tipawan, T., Barrett, M., 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea var. Italica*) peroxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**: 3206–3214.
75. 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**: 4158–4163.
76. Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. **Phytochemistry**, **41**: 1029–1034.
77. Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K., 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, **120**: 501
78. McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. **Food Chemistry**, **23**: 305–319.
79. Triplett, B. A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). **Plant Science**, **8**: 147- 154.
80. Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Science**, **163**: 1011–1019.

81. McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. **Food Chemistry**, **23**: 305–319.
82. Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. **Journal Food Science**, **45**: 60–63.
83. Signoret, A., Crouzet, J. 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. **Agricultural and Biological Chemistry**, **46**: 459.
84. Nair, A. R., Showalter, A. M. 1996. Purification and characterization of a woundinducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. **Biochemistry biophys. Research Communication**, **226**: 254.
85. Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, **49**: 29- 36.
86. Rodriguez L, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia-Canovas,F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. **Journal Agricultural Food Chemistry**, **48**: 1537–1541.
87. Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N.F. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, **114**: 1237- 1245.
88. Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations. **John Wiley and Sons Inc**, **403**, New York.
89. Bradford, M.M., Williams, W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. **Federation Proceedings**, **35**: 274- 274.
90. Şişecioglu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H. B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, **4** (12): 1187-1196.

91. Geike, F., Parasher, C.D., 1975. Simple screening-test for detection of lactoperoxidase inhibitors. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, **276**: 77-78.
92. Doerge, D.R., 1986. Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitrogens. **Biochemistry**, **25**: 4724- 4728.
93. Kumar, R., Bhatla, K.L., 1995. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. **Acta Crystallographica**, **51**: 1094- 1096.
94. Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. **Analytical Biochemistry**, **57**: 467- 476.
95. Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. **Nature (London)**, **227**: 680- 683.
96. Temel, D., 2006. Doğal Ve Sentetik Biomateryallerde, Osteogenic (rhBMP-7) Ve Angiogenic (bFGF) Büyüme Faktörleri İle İnsan Osteoblast Hücrelerinin Gelişiminin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Adana.
97. Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, **57**: 685 1934.
98. Rompel, A., Albers, M., Naseri, J.I., Gerdemann, C., 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). **Biochimica et Biophysica Acta**, **1774**: 1422–1430.
99. Gaspar, T., Penel, C., Hagega, D., Greppin, H., 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development process. **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**, 249–280
100. Dordick, S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M., 1987. Polymerization of phenoles catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. **Biotechnology and Bioengineering**, **30**: 31- 36.

101. Dec, J., Bollag, J.M., 1994. Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. **Environmental Science and Technology**, **28**: 484–491.
102. Spadara, J.T., Renganathan, V., 1994. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes : mechanism of disperse yellow 3 degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **312**: 301–307.
103. Özdemir, H., Aygül, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of kinetic properties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, **31**(2): 125- 134.
104. Kettle, A.J., Gedye, C.A., Winterbourn, C.C, 1997. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochemical Journal**, **321**: 503- 508.
105. Deepa, S. S., Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf. **Phytochemistry**, **61**: 503–511.
106. Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **167**: 367- 376.
107. Sakharov, I.Yu., Vesga B, M.K., Galaev, I.Yu., Sakharova, I.V., Pletjushkina, O.Yu., 2001. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. **Plant Science**, **161**: 853–860
108. Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. **Applied Biochemistry Biotechnology**, **167**: 367- 376.
109. Kumar, R., Sing, K.A., Sing, V.K., Jagannadham, M.V., 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: **Euphorbia cotinifolia**. **Process Biochemistry**, **46**: 1350- 1357.

110. Al-Senaigy, A.M., Ismael, M.A., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera L.*). **Saudi Journal of Biological Sciences**, **18**: 293–298
111. Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M., Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris L.*). **Food Chemistry**, **105**: 1312–1320.
112. Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. **International Journal of Pharmacology**, **7** (1): 135- 139.
113. Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). **Food Chemistry**, **92**: 311–323.
114. Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D’Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **58**: 8471- 8476.
115. Lo’pez-Molina, D., Heering, H.A., Smulevich, G., Tudela,J., Thorneley, R.N.F., Garc’ia-Ca’novas, F., Rodr’iguez-Lo’pez, J.N., 2003. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus L.*, **Journal of Inorganic Biochemistry**, **94**: 243–254
116. Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., Pardio, V.T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **Food Science and Technology**, **41**: 1372- 1379.
117. Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N.M., Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris L.*). **Food Chemistry**, **105**:1312–1320.

118. Tzika, E.D., Sotiroudis, T.G., Papadimitriou, V., Xenakis, A., 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). **European Food Research and Technology**, **228**: 487- 495.
119. Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**, 101,1571- 1579.
120. Suzuki,T., Honda,Y., Mukasa, Y., Kim,S.,2006. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. **Phytochemistry**, 67,219–224
121. Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassicaoleracea* L. var. *botrytis*) buds, **Protein & Peptide Letters**, 15.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Burcu SOMTÜRK

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 27 Mayıs 1987, TOKAT

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 0545 252 60 60

Email: [bsomtirk@erciyes.edu.tr](mailto:bsomtirk@erciyes.edu.tr)

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü  
Melikgazi/KAYSERİ

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	E.Ü Fen Bilimler Enstitüsü	2013
Lisans	G.O.P Üniversitesi Kimya	2009
Lise	G.O.P Lisesi, TOKAT	2005

2010 yılından itibaren Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.